



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO DI FARMACOLOGIA, CHEMIOTERAPIA E TOSSICOLOGIA MEDICA
“E. TRABUCCHI”

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

DOTTORATO IN FARMACOLOGIA, CHEMIOTERAPIA E TOSSICOLOGIA MEDICHE

XXIV CICLO

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE BIO/14

RUOLO DELLA MITOCONDRIOGENESI NELLA NEUROPROTEZIONE:

NUOVI APPROCCI ALLA TERAPIA SPERIMENTALE DELL'ISCHEMIA CEREBRALE

TUTOR

Ch. mo Prof. Michele O. Carruba

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Ch. mo Prof. Alberto Panerai

DOTTORANDO

Dott. Andrea Delbarba

Matricola: R08264

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

INDICE	2
1 . INTRODUZIONE	4
1.1 DISFUNZIONI MITOCONDRIALI E NEURODEGENERAZIONE: UNO SGUARDO D'INSIEME	5
1.2 ELEMENTI DI BIOLOGIA MITOCONDRIALE	8
1.2.1 <i>Il ciclo vitale del mitocondrio</i>	11
1.2.2 <i>Fusione, fissione e mitofagia</i>	13
1.2.3 <i>Regolazione trascrizionale della mitocondriogenesi</i>	14
1.2.3.1 Regolatori trascrizionali della funzione e biogenesi mitocondriale	15
1.2.3.2 Coregolatori della mitocondriogenesi	19
1.2.3 Condizioni e interventi che promuovono la mitocondriogenesi	21
1.2.4 Strategie mitocondriogenetiche	23
1.3 L'ICTUS CEREBRALE: IL PROBLEMA CLINICO	25
1.3.1 <i>Fisiopatologia dell'ictus cerebrale ischemico</i>	27
1.4 LA REAZIONE ENDOGENA ALL'ATTACCO ISCHEMICO: UN FENOMENO BIFASICO	29
1.5 STRATEGIE TERAPEUTICHE NELL'ICTUS CEREBRALE ISCHEMICO	30
1.4.1 <i>La riperfusione cerebrale: procedure di trombolisi</i>	30
1.5.1 <i>La neuroprotezione: una speranza sinora disattesa</i>	32
1.5.1.1 Molecole che bloccano i fenomeni eccitotossici	32
1.5.1.2 Farmaci Antiossidanti	33
1.5.1.3 Molecole antiapoptotiche	33
1.5.1.4 Strategie antiinfiammatorie	33
1.5.1.5 Farmaci multifunzionali	35
1.5.2 <i>Una terapia da ripensare</i>	37
1.5.3 <i>La mitocondriogenesi come fenomeno adattativo all'ischemia cerebrale e possibile target terapeutico</i>	38
1.6 L'ENZIMA GLICOGENO SINTASI CHINASI 3B (GSK-3B)	39
1.6.1 <i>Gli inibitori di GSK-3 e il loro crescente interesse in terapia</i>	41
1.6.2 <i>L'inibizione di GSK-3β: un fattore neuroprotettivo</i>	43
1.6.3 <i>GSK-3β e PGC-1α</i>	44
2 . SCOPO DEL LAVORO	45
3 . MATERIALI E METODI	48
3.1 COLTURE NEURONALI	49

3.2	PLASMIDI E TRASFEZIONI	49
3.3	DEPRIVAZIONE DI OSSIGENO E GLUCOSIO (OGD) IN VITRO	49
3.4	VALUTAZIONE DELLA LESIONE ISCHEMICA IN VITRO	50
3.5	WESTERN BLOT	50
3.6	ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE	51
3.7	ATTIVITÀ DELLA CITRATO SINTASI	51
3.8	ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA	52
3.9	ANALISI DELLA PRODUZIONE MITOCONDRIALE DI SUPEROSSIDO	53
3.10	PROCEDURA CHIRURGICA DI OCCLUSIONE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA (MCAO)	53
3.11	QUANTIFICAZIONE DEL VOLUME DELL'INFARTO CEREBRALE	54
3.12	ANALISI STATISTICA	54
4	. RISULTATI	55
4.1	L'INATTIVAZIONE DI GSK-3 PROMUOVE LA MITOCONDRIOGENESI NEI NEURONI	56
4.2	L'INIBIZIONE DI GSK-3 β PROTEGGE I NEURONI CORTICALI DAL DANNO ISCHEMICO IN VITRO	60
4.3	L'INIBIZIONE DI GSK-3 RIPRISTINA LA MITOCONDRIOGENESI DURANTE L'OGD	64
4.4	L'INIBIZIONE DI GSK-3 ATTIVA UNA RISPOSTA ANTIOSSIDANTE E RIDUCE LA PRODUZIONE DI ROS DURANTE L'ISCHEMIA NEURONALE	67
4.5	L'SB216763 SVOLGE UN RUOLO NEUROPROTETTIVO NELL'INFARTO CEREBRALE NEL TOPO	69
4.6	SCREENING DI MOLECOLE MITOCONDRIOGENETICHE PER LA TERAPIA DELL'ISCHEMIA CEREBRALE	71
5	. DISCUSSIONE	73
6	. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	76
7	. BIBLIOGRAFIA	79
	<i>RINGRAZIAMENTI</i>	93

1. INTRODUZIONE

1.1 Disfunzioni mitocondriali e neurodegenerazione: uno sguardo d'insieme

Le malattie neurodegenerative sono un gruppo vasto ed eterogeneo di patologie caratterizzate da una selettiva e progressiva morte di alcuni sottotipi neuronali. In molti casi, esse insorgono per cause sconosciute e progrediscono incessantemente. Le terapie utilizzate oggi in clinica alleviano solo i sintomi di queste patologie, e il loro utilizzo cronico è spesso accompagnato da numerosi effetti collaterali; non esistono farmaci in grado di modificare il naturale decorso di queste malattie.

Nonostante le diversità fenotipiche delle malattie neurodegenerative, grazie alle scoperte degli ultimi dieci anni sulla loro fisiopatologia (spesso dovuti agli studi sulle mutazioni genetiche identificate in un gruppo ristretto di queste malattie), sono stati descritti alcuni temi comuni a molte di esse. Questi includono disturbi nei meccanismi del controllo di qualità della cellula (come lo stress del reticolo endoplasmatico, difetti nella funzione proteosomica e autofagica e l'accumulo di proteine misfolded), stress ossidativo, neuroinfiammazione e anomalie nel traffico cellulare. Attualmente, uno dei temi che emergono con maggior forza aprendo nuove interpretazioni alla fisiopatologia delle malattie neurodegenerative è il ruolo dell'alterata funzionalità mitocondriale (Schon e Przedborski, 2011).

Molte delle principali patologie neurodegenerative croniche, come la malattia di Alzheimer (AD), Parkinson (PD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), hanno insorgenza sporadica, cioè sorgono senza alcuna causa di tipo genetico. Tuttavia, in rari casi, esse vengono ereditate. I fenotipi delle malattie sporadiche e familiari sono indistinguibili, probabilmente per i comuni meccanismi condivisi. Le mutazioni genetiche che portano all'insorgenza della malattia, sia nella forma familiare che in quella sporadica, riguardano più geni. Negli ultimi anni, 188 loci genetici sono stati associati a malattie neurodegenerative ereditarie, come AD, PD, SLA, malattia di Charcot-Marie-Tooth, paraparesi spastica ereditaria, malattia di Huntington (HD), atrofia ottica e atassia spino cerebellare, e sono stati identificati 106 geni-malattia. Di questi 106 geni, ben 36 sono associati alla funzione mitocondriale in modo diretto (24 geni, attraverso le proteine coinvolte in processi mitocondriali biochimici e strutturali) o in modo indiretto (12 geni, tramite proteine che non sono necessariamente mitocondriali ma che sono associate alla comunicazione tra mitocondri e reticolo endoplasmatico). La numerosità dei geni mitocondriali associati alle malattie neurodegenerative (24/106, circa il 23%) depone fortemente per un ruolo determinante della disfunzione mitocondriale nella loro patogenesi (Schon e Przedborski, 2011).

La funzione primaria dei mitocondri consiste nel generare energia sotto forma di ATP: un ruolo grazie al quale questi organelli sono considerati la “centrale elettrica” della cellula. Il cervello è un organo ad elevatissima attività metabolica, e i neuroni del SNC hanno una intensa richiesta energetica che necessita di una perfetta funzionalità mitocondriale. Come si può collegare la disfunzione mitocondriale alla neurodegenerazione? In primo luogo, un difettoso funzionamento mitocondriale provoca un deficit della respirazione cellulare e della produzione energetica, con ovvie conseguenze deleterie sulla vitalità neuronale. Inoltre, mitocondri disfunzionanti producono un eccesso di radicali liberi dell’ossigeno (ROS) (Guarente, 2008). La formazione di ROS si verifica quando la catena di trasporto degli elettroni non funziona correttamente. Sebbene la formazione di ROS svolga anche il ruolo di segnale intracellulare, una eccessiva produzione di ROS è associata a neurodegenerazione (Onyango et al., 2010).

I mitocondri sono in costante movimento nella cellula. Essi si fondono e dividono, si frammentano e si separano, esistono sia in cluster che come entità singole. Quando non si muovono, essi si possono ancorare ad altri organelli, come il reticolo endoplasmatico, e alla membrana plasmatica. Questo processo è particolarmente importante in cellule dalla forma allungata, come i neuroni: i mitocondri sono concentrati nelle terminazioni presinaptiche, all’estremità dell’assone, e nelle porzioni postsinaptiche, all’estremità dei dendriti, dove la domanda energetica è particolarmente elevata. L’incapacità dei mitocondri di svolgere questi processi dinamici altera la fisiologia del neurone, che ha la necessità di avere “mitocondri funzionanti al posto giusto nel momento giusto”. Iniziali evidenze suggeriscono che difetti nelle dinamiche mitocondriali possano contribuire ai meccanismi di neurodegenerazione (Schon e Przedborski, 2011) ma questa ipotesi richiede ulteriori studi e approfondimenti.

Infine, alterazioni nei fisiologici processi di turnover mitocondriale, cioè la produzione di nuovi mitocondri - o mitocondriogenesi - e l’eliminazione dei mitocondri invecchiati - o mitofagia - possono contribuire alla neurodegenerazione. Una diminuzione della mitocondriogenesi si osserva in tutto l’organismo durante l’invecchiamento: questo evento è particolarmente deleterio a livello del sistema nervoso centrale (SNC). Un ridotto turnover delle componenti mitocondriali porta a inefficiente respirazione cellulare e a iperproduzione di ROS, con ossidazione di lipidi, proteine e DNA. Quindi, mantenere un alto ricambio mitocondriale durante l’invecchiamento può essere importante nel prevenire gli effetti nocivi del malfunzionamento mitocondriale. I ricercatori del settore sono oggi convinti che interventi volti a mantenere la mitocondriogenesi cerebrale durante l’invecchiamento possano prevenire lo sviluppo di malattie neurodegenerative.

Se molti studi riguardano il ruolo dei mitocondri nella patogenesi delle malattie neurodegenerative croniche, non di meno è da mettere in rilievo l’importanza di alterazioni

mitocondriali in patologie cerebrali acute come il trauma o l'ictus cerebrale. L'iperproduzione di ROS è un ben noto evento in corso di ischemia cerebrale, e il corretto funzionamento mitocondriale può contribuire a contrastare gli effetti deleteri degli eventi ischemici nel cervello (Chen et al., 2011). Recenti evidenze sperimentali mettono in luce le potenzialità di terapie "mitocondrioprotettive" in corso di ischemia cerebrale (Vosler et al., 2009; Chen et al., 2011).

Nel presente lavoro sono state prese in esame e revisionate le attuali conoscenze sulla funzione mitocondriale in corso di ischemia cerebrale. E' stata quindi intrapresa una ricerca sperimentale allo scopo di verificare la capacità mitocondriogenetica dei neuroni durante l'insulto ischemico, utilizzando modelli in vitro e in vivo, con lo scopo ultimo di identificare farmaci con potenzialità "mitocondriogenetiche" per strategie terapeutiche innovative.

1.2 Elementi di biologia mitocondriale

I mitocondri sono organelli citoplasmatici presenti in tutte le cellule aerobie eucariotiche, sono raggruppati in regioni cellulari con intensa attività metabolica, dove è maggiore il bisogno di ATP. Osservati al microscopio elettronico, i mitocondri appaiono tipicamente come strutture ovali di diversi micrometri di lunghezza con un diametro di 0,5-1 μm . Caratteristica distintiva di questi organelli è la presenza di due membrane, una membrana esterna ed una interna. La membrana esterna non costituisce una barriera di permeabilità significativa per gli ioni e le piccole molecole, mentre quella interna è impermeabile. Lo spazio delimitato dalla membrana interna è detto matrice mitocondriale; la membrana si estende nella matrice formando delle pieghe dette creste mitocondriali, dove si concentrano gli enzimi della catena respiratoria. Fin dalla loro scoperta, si è riconosciuta l'importanza dei mitocondri come siti dell'ossidazione aerobica dei prodotti del metabolismo. Nel mitocondrio, infatti, avviene l'ossidazione del piruvato e degli acidi grassi, il metabolismo dell'azoto e la biosintesi dell'eme. In questo organello trova anche sede la catena di trasporto degli elettroni e il sistema di fosforilazione ossidativa che fornisce l'energia, in forma di ATP, necessaria alle funzioni cellulari. La maggior parte dell'energia che si forma dall'ossidazione degli acidi grassi e di carboidrati è convertita nel potere riducente di NADH e FADH₂ all'interno della matrice mitocondriale. La catena respiratoria, che ha sede sulla membrana interna, consiste in una serie di pompe protoniche elettrogeniche che convertono questo potenziale riducente in un gradiente protonico elettrochimico (Figura 1.1). Il potenziale elettrochimico di questo gradiente è poi convertito grazie all'attività dell'ATP-sintasi in legami fosfati ad alta energia dell'ATP. Negli adipociti bruni, lo stesso gradiente può essere dissipato al fine di generare calore attraverso l'attività di proteine specializzate definite *uncoupling protein* (UCP).

I mitocondri, insieme ai cloroplasti, sono gli unici organelli extranucleari delle cellule eucariotiche che possiedono un proprio sistema genetico: nei vertebrati, il genoma mitocondriale consiste in una molecola di DNA circolare a doppio filamento (mtDNA). Il genoma mitocondriale comprende solo una piccola parte di tutti i geni necessari all'architettura molecolare e alle funzioni biologiche dell'organello. Il mitocondrio è considerato, dal punto di vista genetico, semiautonoma in quanto dipende strettamente dall'espressione di geni nucleari per lo svolgimento di tutte le sue funzioni biologiche. Per esempio, la maggior parte delle subunità proteiche che costituiscono i cinque complessi della catena respiratoria e il sistema della fosforilazione ossidativa sono codificate nel nucleo. Geni nucleari regolano, inoltre, la trascrizione, traduzione e replicazione del mtDNA (Scarpulla, 2008).

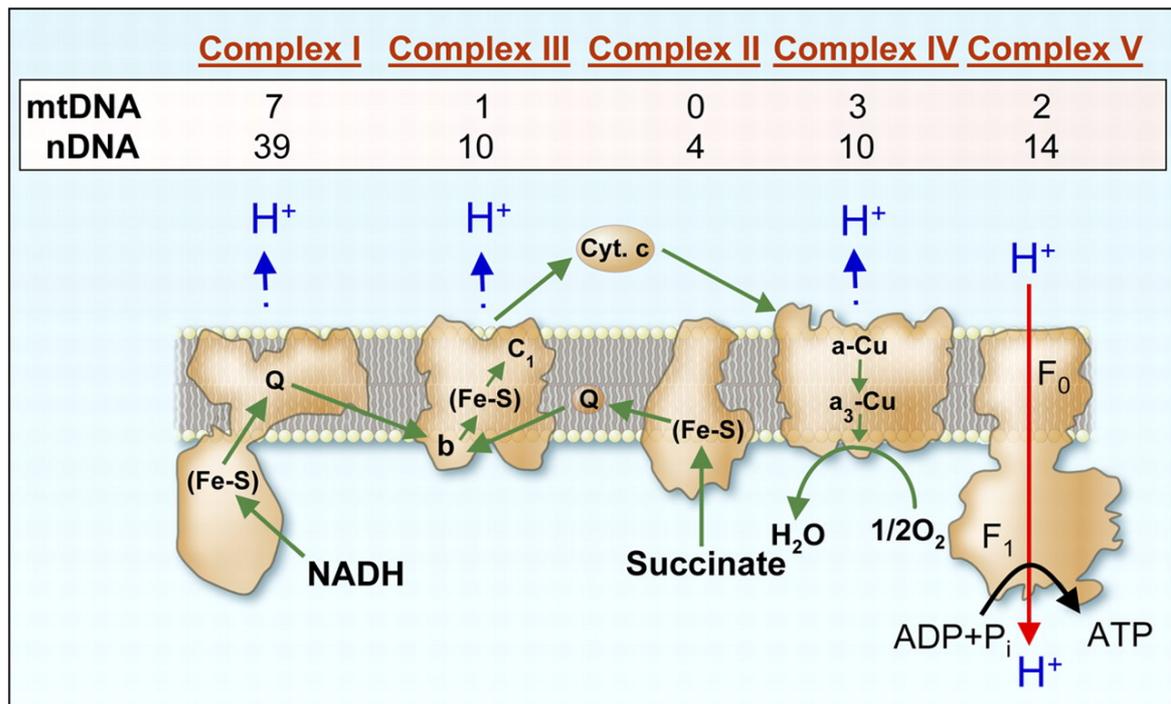


Figura 1.1 Rappresentazione schematica dei cinque complessi (I-V) della catena respiratoria localizzati nel doppio strato lipidico della membrana mitocondriale interna.

Sono anche mostrati i trasportatori di elettroni non legati alla membrana mitocondriale: citocromo c (Cyt c) e coenzima Q (Q). Le frecce verdi mostrano il percorso degli elettroni attraverso i componenti della catena respiratoria. Le frecce blu interrotte mostrano i siti di pompaggio dei protoni dalla matrice allo spazio citosolico dei complessi I, III, e IV. La freccia rossa mostra il flusso di protoni, dal citosol alla matrice, attraverso il complesso V accoppiato alla sintesi di ATP. Sopra ogni complesso è indicato il numero delle subunità proteiche codificate dal genoma nucleare (nDNA) e mitocondriale (mtDNA) (Scarpulla, 2008).

Da tempo studi genetici e biochimici hanno stabilito che l'apparato genetico mitocondriale ha caratteristiche distinte rispetto a quello nucleocitosolico. A differenza del genoma nucleare, dove il DNA codificante è solo una piccola percentuale del DNA totale, il mtDNA di mammifero e degli altri vertebrati mostra una grande economia nell'organizzazione delle sequenze. I geni mitocondriali, infatti, mancano di introni e sono disposti uno di seguito all'altro, tra loro possono interpersi piccole regioni intergeniche. Il genoma mitocondriale dei vertebrati è una molecola circolare superavvolta a doppia elica (filamento H: pesante, filamento L: leggero) di circa 16.5 kb la cui intera capacità codificante proteica è finalizzata alla sintesi di 13 proteine che funzionano come subunità essenziali per i complessi respiratori I, III, IV e V. I geni che

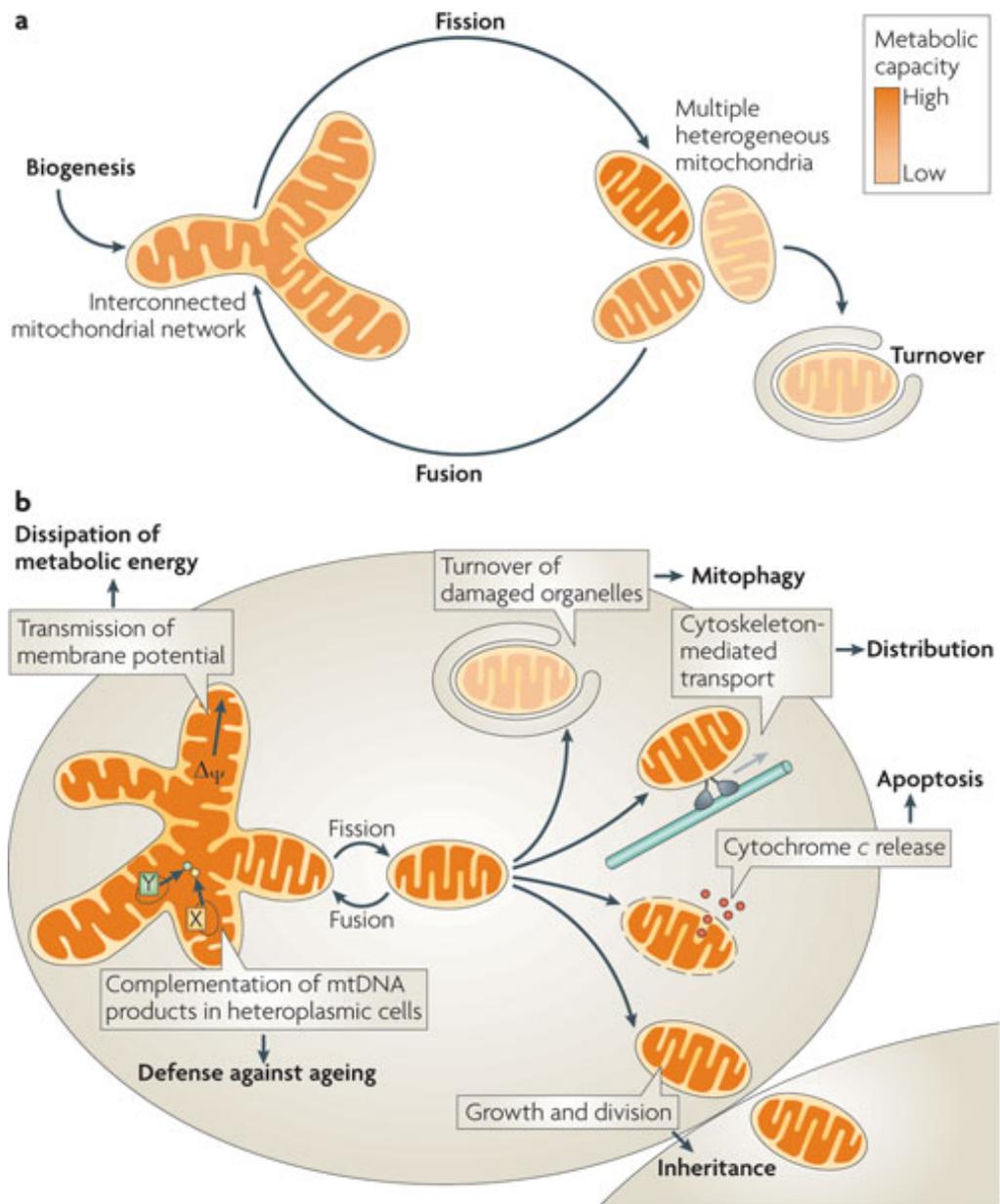
codificano per il complesso II sono interamente nucleari. Il mtDNA codifica anche per 22 tRNA, 2 rRNA necessari per la traduzione delle subunità respiratorie all'interno della matrice mitocondriale. Le cellule somatiche di mammifero generalmente hanno 10^3 - 10^4 copie di mtDNA con circa 2-10 genomi per organello. Questi genomi replicano indipendentemente dal ciclo cellulare che è strettamente legato alla replicazione del DNA nucleare. Alcune molecole di mtDNA sono sottoposte a cicli multipli di replicazione mentre altre non replicano per nulla. Questo, insieme alla separazione casuale di mtDNA durante la divisione cellulare, permette la segregazione di sequenze varianti durante la mitosi (Scarpulla, 2008).

La trascrizione di mtDNA è completamente dipendente da prodotti genici codificati dal nucleo. Le unità trascrizionali mitocondriali sono complessi siti all'interno della regione regolatoria D-loop del mtDNA in prossimità dei promotori bidirezionali (LSP, HSP1 e HSP2). La macchina trascrizionale è costituita da: POLRMT (RNA polimerasi mitocondriale), TFAM (fattore mitocondriale trascrizionale A) e una delle due isoforme di TFB (TFB1M o TFB2M), fattori trascrizionali specifici che legano in modo reversibile sia POLRMT che TFAM. TFAM, oltre a fungere da attivatore trascrizionale, svolge anche l'importante ruolo di stabilizzatore del mtDNA (Scarpulla, 2008).

1.2.1 Il ciclo vitale del mitocondrio

Il ciclo vitale dei mitocondri inizia con la divisione degli organelli preesistenti, un fenomeno noto come mitocondriogenesi, e termina con la degradazione degli organelli danneggiati o in sovrannumero, tramite un fenomeno cellulare chiamato mitofagia. Il processo di rinnovamento mitocondriale, cioè un buon equilibrio tra mitocondriogenesi e mitofagia, è indispensabile per ottimizzare la funzionalità della respirazione cellulare: infatti, i mitocondri di nuova formazione hanno un'elevata capacità di produzione energetica; al contrario, i mitocondri invecchiati hanno una ridotta capacità metabolica (Westermann et al., 2010). Durante la loro vita, i mitocondri sono inoltre sottoposti a numerosi cicli di fissione e fusione. Infatti, negli anni '80, grazie a studi avanzati di microscopia, si è dimostrato che i mitocondri sono organelli molto dinamici e possono costruire una fitta rete di collegamenti intracellulari, nonostante essi appaiano come singole entità. In molte cellule eucariote, i mitocondri si muovono continuamente lungo il citoscheletro e, frequentemente, si dividono e si fondono tra loro. Le due attività contrapposte e bilanciate, fusione e fissione, danno vita al compartimento mitocondriale della cellula, e questo assetto dinamico dei mitocondri permette alle cellule di rispondere ai diversi cambiamenti delle condizioni fisiologiche. Uno spostamento del bilancio mitocondriale verso la fusione favorisce la formazione di mitocondri interconnessi, mentre se si sposta verso la fissione si formano molti frammenti mitocondriali. La diffusa rete di mitocondri generata dalla fusione è vantaggiosa nelle cellule con un metabolismo attivo, contribuendo alla dissipazione energetica (Skulachev et al., 2001). Al contrario, in cellule quiescenti i mitocondri sono presenti sotto forma di numerose, piccole e distinte sfere o bastoncelli (Collins et al., 2002).

Gli studi sulla fusione e sulla fissione mitocondriale si sono intensificati negli ultimi anni, in quanto le dinamiche mitocondriali sono importanti per capire molti processi biologici, incluso il mantenimento della funzione mitocondriale, l'apoptosi e l'invecchiamento (Detmer et al., 2000).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.2 Il ciclo vitale dei mitocondri. a) Mitocondriogenesi, fissione e fusione mitocondriale si alternano durante la vita del mitocondrio. I mitocondri invecchiati, che hanno una ridotta capacità metabolica, sono rimossi. b) Le dinamiche mitocondriali sono coinvolte nella modulazione di importanti funzioni biologiche (Westermann, 2010).

1.2.2 Fusione, fissione e mitofagia

Nonostante i numerosi dati disponibili sulla fissione e fusione mitocondriale, il preciso meccanismo molecolare ancora non è stato ben chiarito. Tuttavia, sono stati identificati molti dei principali effettori. Drp1 è una GTPasi e interviene nella fissione della membrana mitocondriale e del perossisoma (Koch et al., 2003; Cho et al., 2009). Fis1 è localizzata nella membrana esterna ed è il recettore di Drp1. L'overespressione di Fis1 accelera la fissione, mentre il suo silenziamento inibisce la frammentazione mitocondriale (James et al., 2009; Yoon et al., 2003). Drp1 subisce modificazioni post-trascrizionali durante la fissione mitocondriale. La prima di queste modificazioni è la fosforilazione che favorisce la distribuzione dei mitocondri nelle nascenti cellule figlie (Chang et al., 2007). Inoltre, Drp1 è substrato per reazioni con l'ossido nitrico, portando a S-nitrosilazione, o trasferimento di NO che regola la funzione proteica (Cho et al., 2009; Wang et al., 2009).

La fusione della membrana è un processo fondamentale per la vita delle cellule eucariote. Per esempio, le vescicole di trasporto si fondono con gli organelli del pathway secretorio, i gameti si fondono tra loro durante la fecondazione, e i virus entrano nelle cellule ospiti fondendo i loro rivestimenti con le membrane cellulari. La fusione mitocondriale è un processo ben coordinato in cui membrana esterna ed interna fondono in modo separato. I componenti principali di questo meccanismo sono le mitofusine (Mfn1/2) e Opa1. Mfn 1/2 sono localizzate nella membrana esterna del mitocondrio con sia il dominio C- che N-terminale localizzati nel citosol (Santel 2006). OPA1 è un altro componente chiave della fusione mitocondriale e del rimodellamento delle creste mitocondriali. Anche se gli eventi di fusione della membrana interna ed esterna sono separati, i loro meccanismi sono collegati. Per esempio, nei lieviti la proteina Ugo1 funziona come adattatore creando un complesso con Fzo1 (omologo di Mfn) e Mgm1 (omologo di OPA1) che attraversa le membrane (Sesaki et al., 2004; Coonrod et al., 2007). Tuttavia non sono ancora stati scoperti omologhi di Ugo1 nei mammiferi.

L'autofagia è il processo catabolico che si occupa dell'auto-digestione e del turnover di macromolecole e di interi organelli. L'autofagia è in primo luogo un processo protettivo in risposta allo stress cellulare, ma può anche essere associato alla morte cellulare. Gli autofagosomi sono vescicole citoplasmatiche composte da una doppia membrana e che degradano i componenti cellulari. Con il termine mitofagia si intende l'autofagia di componenti mitocondriali. La fissione mitocondriale a volte genera un mitocondrio irregolare, per esempio con potenziale di membrana aumentato in uno compartimento e diminuito nell'altro. Mitocondri depolarizzati si fondono con molte meno probabilità e possono essere degradati per autofagia

(Twig et al., 2008). Inoltre, l'overespressione di Fis1 riduce selettivamente la massa mitocondriale e attiva l'autofagia. La mitofagia è un processo importante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, ma sarà necessario lavorare ancora per definire la relazione tra mitofagia e dinamiche mitocondriali.

1.2.3 Regolazione trascrizionale della mitocondriogenesi

La mitocondriogenesi è un processo complesso che richiede la sintesi, l'importazione e l'incorporazione di proteine e lipidi nel reticolo mitocondriale già esistente, così come la replicazione del DNA mitocondriale. La mitocondriogenesi richiede la trascrizione coordinata sia di un largo numero di geni nucleari che di un ristretto gruppo, ma essenziale, di geni nei mitocondri. La coordinazione tra i due genomi è effettuata da alcune proteine mitocondriali codificate nel nucleo, come TFAM, TFBM1 e TFBM2 che controllano la trascrizione e la replicazione del DNA mitocondriale e vengono indotte in risposta a segnali che promuovono la mitocondriogenesi (Chow et al., 2007; Scarpulla, 2008).

La mitocondriogenesi è un processo adattativo a lungo termine e non sempre è necessaria in caso di richieste energetiche transitorie per soddisfare le quali può essere sufficiente un aumento della funzionalità mitocondriale. Gli studi di Scarpulla e colleghi hanno aperto la strada all'identificazione di fattori di trascrizione in grado di riconoscere motivi conservati su geni della fosforilazione ossidativa (OxPhos), portando all'identificazione del *nuclear respiratory factor-1* (NRF-1) e di *GA-binding protein* (GABP, anche conosciuta come NRF-2) (Scarpulla, 2008). La maggior scoperta che ha permesso di capire come sottogruppi di diversi geni venissero regolati in modo coordinato è stata la scoperta del *proliferator-activated receptor coactivator-1 α* (PGC-1 α) come coattivatore di NRF-1, NRF-2. PGC-1 α è in grado di integrare i segnali fisiologici e aumenta la mitocondriogenesi e la funzione ossidativa. In seguito a PGC-1 α sono stati studiati anche altri coattivatori trascrizionali come PGC-1 β e *pgc-1-related coactivator* (PRC) e altri fattori di trascrizione come i recettori nucleari *estrogen-related receptors* (ERRs) (Handschin et al., 2006; Villena et al., 2008).

1.2.3.1 Regolatori trascrizionali della funzione e biogenesi mitocondriale

L'espressione di numerosi geni coinvolti nella biogenesi e nel mantenimento della funzionalità mitocondriale è sotto il controllo di una rete di fattori di trascrizione nucleari e di vari coregolatori. Questi regolatori trascrizionali permettono una forte e robusta attivazione della mitocondriogenesi in risposta a vari segnali fisiologici.

L'isolamento del gene del citocromo C, uno dei trasportatori della catena respiratoria, ha aperto la strada allo studio dei geni nucleari che regolano le funzioni respiratorie mitocondriali. In particolare, studiando le regioni di controllo del citocromo C è emerso un sito di riconoscimento palindromo per un fattore di trascrizione riconosciuto come fattore respiratorio nucleare 1 (NRF-1). Siti specifici leganti NRF-1 sono presenti nei promotori di diversi geni nucleari necessari per le funzioni respiratorie mitocondriali. La proteina NRF-1 lega il sito di riconoscimento in forma omodimerica e funziona come regolatore positivo della trascrizione. NRF-1 regola l'espressione di molti geni necessari per la funzione respiratoria mitocondriale inclusi i geni nucleari che codificano per le 5 subunità del complesso respiratorio. NRF-1, inoltre, riconosce e attiva i promotori di TFAM e delle due isoforme di TFBM i cui prodotti sono i maggiori regolatori della trascrizione mitocondriale (Scarpulla, 2008).

È importante sottolineare che NRF-1 è in grado di regolare in via indiretta, oltre ai geni coinvolti nella funzione mitocondriale, anche di geni che codificano per enzimi metabolici, inducendo, per esempio, l'espressione dei fattori di trascrizione MEF2A, che a sua volta attiva i geni di COX, Glut4, e PGC-1 α (Ramachandran et al., 2008).

Il silenziamento di NRF-1 provoca una significativa repressione dei geni *target* mitocondriali, suggerendo che NRF-1 sia costitutivamente attivo e importante per l'espressione basale di geni mitocondriali. L'attività di NRF-1 è anche regolata tramite fosforilazione e/o interazione con PGC-1 α , PGC-1 β , PRC e ciclina D1. La fosforilazione di NRF-1 modula la sua traslocazione nel nucleo, oppure la sua capacità di legare il DNA e/o la sua attività trascrizionale (Scarpulla, 2008). L'interazione fisica di NRF-1 con uno dei membri della famiglia di PGC-1 potenzia l'espressione di geni controllati da NRF-1 (Wu et al., 1999; Andersson et al., 2001; Li et al., 2001). Infine, la ciclina D1, che è un repressore della mitocondriogenesi, lega NRF-1 e ne reprime l'attività trascrizionale (Wang et al., 2006; Sakamaki et al., 2006). Molti segnali che inducono la mitocondriogenesi inducono anche l'espressione di NRF-1, suggerendo che NRF-1 sia un sensore energetico nelle cellule dei mammiferi. Per esempio, l'espressione di NRF-1 viene indotta dalla stimolazione elettrica nei cardiomiociti, dall'overespressione di PGC-1 α nei

miotubi, dal siero nei fibroblasti 3T3, dal flusso di Ca^{2+} nei miotubi del muscolo scheletrico e dalla stimolazione con etoposide nei fibroblasti (Scarpulla, 2008; Wu et al., 1999; Ojuka et al., 2003; Fu et al., 2009). In vivo, NRF-1 è indotto nel muscolo in seguito all'esercizio fisico. Infine, NRF-1 viene indotto nel muscolo di ratto alimentato con un analogo della creatina, che attiva AMPK e induce un effetto adattativo simile a quello provocato dall'esercizio fisico (Bergeron et al., 2001).

A supporto del ruolo di NRF-1 nell'espressione di geni mitocondriali, topi con un'isoforma inattiva di NRF-1 non sopravvivono alle prime fasi di vita embrionale, e blastocisti di topi NRF-1^{-/-} hanno un ridotto contenuto di mtDNA e un potenziale di membrana ridotto (Bergeron et al., 2001).

Anche se NRF-1 è necessario per la mitocondriogenesi la sua espressione non è sufficiente per guidare l'intero programma. La sovraespressione di NRF-1 nel muscolo aumenta l'espressione di geni target di NRF-1 ma non aumenta la capacità respiratoria, suggerendo che un meccanismo parallelo debba intervenire insieme a NRF-1 nell'attivare la mitocondriogenesi (Baar et al., 2003).

Un secondo fattore nucleare inizialmente indicato come GABP, ma conosciuto anche con il nome di NRF-2, è stato identificato grazie al suo legame specifico con elementi del promotore della citocromo ossidasi IV (COX IV) (Scarpulla, 2008). GABP svolge un ruolo importante nell'espressione di geni dei componenti della fosforilazione ossidativa (*OxPhos genes*) e di altri geni mitocondriali: modelli *knockdown* di GABP mostrano una ridotta espressione di tutte e dieci le forme di COX, così come di TFAM, TFAM1, TFAM2 e di TOMM, e inoltre hanno una riduzione del 20% dell'attività di COX (Ongwijitwat et al., 2006). Quando fosforilata GABP recluta PGC-1 α e PRC, che a loro volta aumentano l'espressione di GABP.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sono recettori nucleari che rilevano e controllano l'omeostasi lipidica. Questi recettori inoltre regolano l'espressione di geni che codificano per le *uncoupling proteins* (UCPs) che sono trasportatori che risiedono nella membrana interna del mitocondrio e svolgono diversi ruoli nel controllo della termogenesi, nella produzione di ROS e nella funzione ossidativa. Quindi, grazie alla loro capacità di regolare geni del metabolismo lipidico e le UCPs mitocondriali, PPARs sono in grado di favorire funzioni mitocondriali cellule-specifiche e, in particolare, favoriscono il consumo lipidico per produrre ATP in seguito ad una forte richiesta energetica. PPARs interagiscono direttamente con PGC-1 α e PGC-1 β nella regolazione della mitocondriogenesi. PPAR γ e PPAR δ promuovono la mitocondriogenesi in modo specifico in diversi tipi cellulari. L'attivazione di PPAR δ regola la mitocondriogenesi nel muscolo scheletrico: topi trattati con un agonista di PPAR δ mostrano un

aumento nell'*uptake* di lipidi, nell'ossidazione degli acidi grassi e nella mitocondriogenesi; inoltre è aumentata anche l'espressione di UCPs, GLUT4 e PGC-1 α . Queste osservazioni dimostrano che i recettori PPARs, conosciuti in primo luogo per i loro effetti sul metabolismo lipidico, possono avere anche un forte impatto sulla biogenesi e funzionalità mitocondriale agendo da regolatori trascrizionali di PGC-1 α (Tanaka et al., 2003).

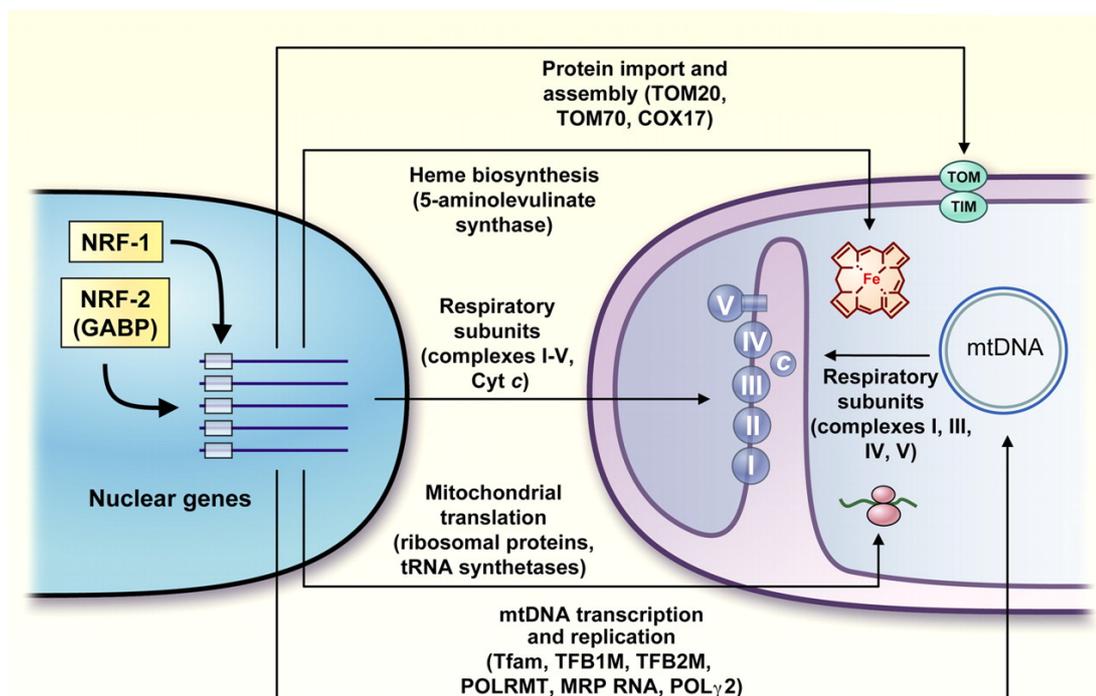


Figura 1.3 Rappresentazione riassuntiva del controllo delle funzioni mitocondriali da parte di NRF-1 e NRF-2 (Scarpulla, 2008)

L'estrogen-related receptor ERR α è coinvolto nella regolazione del metabolismo ossidativo. ERR α è un rappresentante della famiglia dei recettori nucleari "orfani" simili al recettore dell'estrogeno. I recettori ERRs mostrano omologie con il recettore degli estrogeni, in particolare nel dominio che lega il DNA e in quello per altri ligandi. Nonostante le somiglianze, ERRs non sono attivati da estrogeni e, anche in assenza di ligando, possono raggiungere una conformazione costitutivamente attiva (Greschik et al., 2002). L'attività trascrizionale di ERRs è invece regolata

dall'interazione fisica con dei coregolatori, come i coattivatori di SRC e con i membri della famiglia di PGC-1 (Villena et al., 2008). In particolare, ERR α aumenta l'espressione dei suoi geni target solo quando viene co-attivato da PGC-1 (Huss et al., 2002; Schreiber et al., 2003). Al contrario, il legame di ERRs con il corepressore *receptor-interacting protein 140* (RIP140) inibisce l'espressione dei suoi geni *target* (White et al., 2008). L'attività di ERRs viene anche regolata tramite fosforilazione e sumoilazione che ne alterano il legame con il DNA, la dimerizzazione e l'interazione con i co-attivatori.

In coerenza con il loro ruolo nella biogenesi e della funzione mitocondriale, ERRs sono molto espressi in tessuti con un alto fabbisogno energetico (Giguere 2008). Inoltre, ERR α è indotto da PGC-1 α , in risposta a importanti segnali mitocondriogenetici, come l'esposizione al freddo (nel BAT e nel muscolo), al digiuno (nel fegato) e all'esercizio fisico (nel muscolo scheletrico) (Schreiber et al 2004; Cartoni et al., 2005; Ichida et al., 2002). Come visto con altri fattori trascrizionali che regolano l'espressione di geni mitocondriali, anche ERRs controllano l'espressione di geni non mitocondriali. ERRs regolano l'espressione di geni coinvolti nell'omeostasi del Ca²⁺, nella funzione contrattile, nel metabolismo del glucosio, nell'angiogenesi e in altri processi cellulari (Giguere, 2008).

Il cAMP response element-binding (CREB) regola l'espressione delle proteine Cycs (somatic cytochrome C) che svolgono un ruolo centrale per la funzione della catena respiratoria mitocondriale; siti di legame per CREB si trovano anche sui geni di Cox5a, Cox8a e Ucp1 (Scarpulla, 2008). Un aumento di cAMP è associato a variazioni del fabbisogno energetico (per esempio, grazie alla stimolazione adrenergica, nel BAT dopo l'esposizione al freddo o dopo digiuno, nel fegato), e CREB contribuisce alla funzionalità mitocondriale sia direttamente, attivando specifici geni mitocondriali, sia indirettamente, attivando PGC-1 α (Cao et al., 2004; Herzig et al., 2001).

Un numero crescente di studi indica c-Myc come uno dei regolatori della mitocondriogenesi (Scarpulla, 2008). C-Myc è infatti in grado di legare 107 geni mitocondriali, inclusa la DNA polimerasi mitocondriale γ . Inoltre, c-Myc è in grado di attivare PGC-1 β e, quindi, di attivare la mitocondriogenesi (Zhang et al., 2007).

Infine, il fattore di trascrizione YY1 regola sia in modo positivo che negativo, i geni di COX (Scarpulla 2008). Studi recenti hanno dimostrato che YY1 nel muscolo interagisce con PGC-1 α e aumenta l'espressione di geni mitocondriali e la respirazione cellulare (Cunningham et al., 2007). L'interazione tra YY1 e PGC-1 α richiede l'attivazione del mammalian target of rapamycin (mTOR). YY1, quindi, integra le informazioni che provengono da due diversi

pathway: PGC-1 α , che attiva segnali in caso di bassa energia cellulare, mentre mTOR promuove la crescita cellulare in presenza di nutrienti (Jager et al., 2007; Gerhart-Hinez et al., 2007).

1.2.3.2 Coregolatori della mitocondriogenesi

Un piccolo numero di fattori trascrizionali nucleari ha il compito di regolare l'espressione di proteine della catena respiratoria, sia di origine mitocondriale sia nucleare. Solo la presenza di coregolatori può coordinare e integrare i diversi fattori trascrizionali nel complesso programma genetico della mitocondriogenesi (Handschin, 2009).

I coattivatori della famiglia di PGC-1 svolgono un ruolo importante e centrale nel controllo della mitocondriogenesi, integrando segnali fisiologici e aumentando di conseguenza l'attività di diversi fattori di trascrizione. PGC-1 α è stato identificato per primo da Spiegelman e colleghi (Puigserver et al., 1998) come proteina che interagisce con PPAR γ , espressa selettivamente nel BAT, e indotta dopo esposizione al freddo. PGC-1 β e PRC sono stati identificati per le loro similarità con PGC-1 α (Andersson et al., 2001; Lin et al., 2002; Kressler et al., 2002). Questi tre coattivatori regolano l'espressione di un vasto numero di geni mitocondriali e promuovono la mitocondriogenesi (Puigserver et al., 1998).

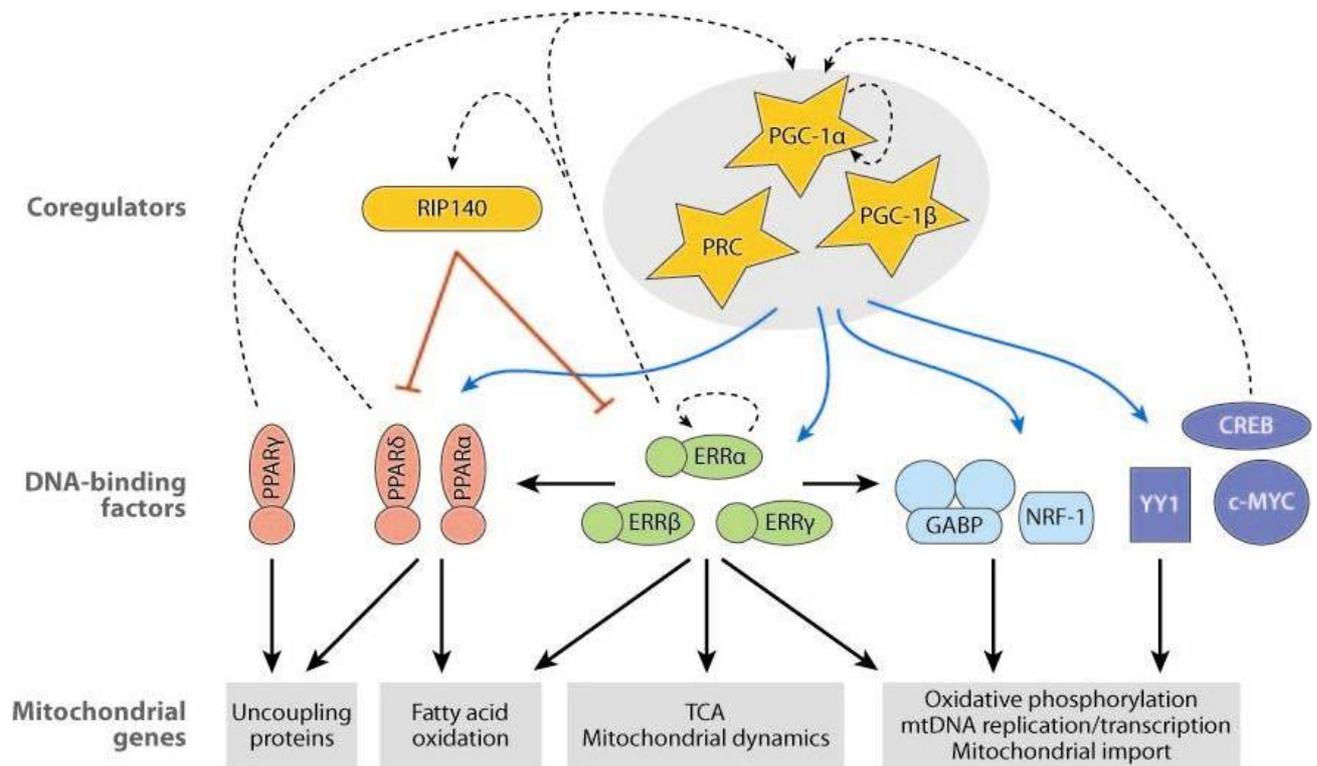
Le proteine della famiglia di PGC-1 hanno caratteristiche molecolari comuni. Primo, esse contengono superfici proteiche che permettono loro l'interazione con NRF-1, GABP, PPARs, ERRs e YY1. Secondo, le tre proteine possiedono uno stesso dominio di attivazione trascrizionale che favorisce l'attivazione dell'espressione genica (Andersson et al., 2001; Vega et al., 2000; Kressler et al., 2002; Puigserver et al., 1999; Knutti et al., 2000). Infine, le proteine PGC-1 contengono siti per modificazioni post-trascrizionali o di interazione con proteine regolatrici (Olson et al., 2008).

L'overespressione di PGC-1 α e PGC-1 β induce la mitocondriogenesi e aumenta la respirazione cellulare in molti tipi cellulari (Handschin et al., 2006). Le proprietà funzionali nei mitocondri di cellule che esprimono PGC-1 α e PGC-1 β differiscono in termini di ossidazione di ATP e di risposta allo stress ossidativo, suggerendo che PGC-1 α e PGC-1 β siano in grado di indurre simili, ma non identici segnali cellulari (St.Pierre et al., 2003). L'overespressione di PRC induce i geni OxPhos, e il *knockdown* di PRC diminuisce l'attività ossidativa del citocromo; tuttavia non è chiaro se l'espressione di PRC sia sufficiente per indurre la mitocondriogenesi (Vercauteren et al., 2008). L'overespressione transgenica di PGC-1 α e di PGC-1 β nel muscolo scheletrico porta ad un aumento del contenuto mitocondriale, dell'espressione dei geni mitocondriali e della *performance* fisica (Calvo et al., 2008; Lin et al., 2002). Topi *knockout* solo per PGC-1 α o solo

per PGC-1 β mostrano solo un lieve difetto di mitocondriogenesi; questo può indicare che i due geni si compensano a vicenda *in vivo*. A supporto di questa ipotesi, l'induzione della mitocondriogenesi *in vitro*, durante il differenziamento di adipociti bruni, non viene alterata dalla mancanza di uno dei due PGC-1, ma viene bloccata se mancano entrambi (Uldry et al., 2006).

Uno degli aspetti più interessanti della biologia di PGC-1 è il potenziale di questi coregolatori di percepire segnali energetici o di deficit metabolico e, di conseguenza, di attivare meccanismi per modificare l'espressione genica. L'attività di questi coattivatori è regolata sia a livello trascrizionale che posttrascrizionale. A livello trascrizionale, sia PGC-1 α che PGC-1 β , sono espressi in modo tessuto-specifico, con alti livelli là dove c'è un'alta richiesta energetica. Inoltre, PGC-1 α , ma non PGC-1 β , è fortemente inducibile in risposta a segnali di domanda energetica, suggerendo che PGC-1 α giochi un ruolo importante nei meccanismi adattativi a lungo termine (Puigserver et al., 1999; Handschin et al., 2009). A livello posttrascrizionale, l'attività di PGC-1 α è regolata tramite fosforilazione da *mytogen-activated protein kinase* (MAPK) p38, AKT, AMPK e *glycogen synthase kinase* (GSK-3) (Jager et al., 2007; Knutti et al., 2001; Olson et al., 2008; Puigserver et al., 2001; Li et al., 2007), tramite deacetilazione da GCN5 e *sirtuin 1* (SIRT1) (Gerhart-Hines et al., 2007; Lerin et al., 2006), tramite metilazione da PRMT1 (Teyssie et al., 2005), tramite ubiquitinazione da parte di SCF^{cdc4} (Olson et al., 2008) e tramite interazione con il repressore MYBBP1A (Fan et al., 2004).

Il corepressore RIP140 svolge l'azione contraria rispetto a PGC-1 α e blocca la mitocondriogenesi. Come PGC-1 α e PGC-1 β , RIP140 interagisce con un largo numero di recettori nucleari (inclusi ERRs e PPARs) (Christian et al., 2006). RIP140 si lega a recettori nucleari e recluta altri corepressori, come l'istone deacetilasi (HDAC), e porta alla soppressione della trascrizione genica. La capacità di RIP140 di reprimere l'espressione di geni mitocondriali dipende dai livelli endogeni di ERR α , indicando come questo fattore di trascrizione possa mediare sia effetti positivi che negativi sull'espressione di geni mitocondriali, a seconda del contesto cellulare e del tipo di coregolatore presente (Powelka et al., 2006). Anche se RIP140 è largamente espresso, c'è una correlazione tra alti livelli di RIP140 e una bassa concentrazione di mitocondri. Per esempio, RIP140 è più espresso nel WAT, povero di mitocondri, piuttosto che nel BAT, che ne è ricco, ed è più espresso in fibre muscolari con metabolismo glicolitico piuttosto che in quelle con metabolismo ossidativo (White et al., 2008). L'espressione di RIP140 è anche indotta da recettori nucleari come ERR α (Nichol et al., 2006). L'induzione di RIP140 mediata da ERR α è un meccanismo per limitare la mitocondriogenesi in presenza di abbondante energia o di nutrienti (Figura 1.4).



AR Hock MB, Kralli A. 2009.
Annu. Rev. Physiol. 71:177–203

Figura 1.4 Riassunto delle vie che controllano la mitocondriogenesi e influenzano la funzione mitocondriale.

1.2.3 Condizioni e interventi che promuovono la mitocondriogenesi

La domanda energetica varia non solo nei diversi tipi cellulari ma anche in diverse condizioni fisiologiche. L'espressione dei geni deputati a controllare la mitocondriogenesi e la funzione mitocondriale viene regolata in risposta a segnali fisiologici innescati in seguito all'aumento della richiesta energetica. Uno degli esempi più conosciuti è l'allenamento fisico prolungato, in cui l'aumento di mitocondriogenesi aumenta la *performance* muscolare (Chow et al., 2007; Rockl et al., 2008). In modo analogo, l'esposizione al freddo per un lungo periodo induce la mitocondriogenesi nel tessuto adiposo bruno (BAT) di piccoli animali, che hanno un'alta capacità di termogenesi adattativa (Klingenspor et al., 2003). Infine, di particolare interesse in considerazione degli attuali stili di vita con eccessivo consumo di cibi ad elevato contenuto

calorico, la restrizione calorica induce mitocondriogenesi (Nisoli et al., 2005; Civitarese et al., 2007).

L'allenamento fisico attiva segnali che sono associati all'attività fisica, come l'aumento di calcio citoplasmatico indotto dalla contrazione, e segnali di deficit energetico, come l'attivazione di AMPK (Roel et al., 2008). L'esercizio fisico attiva anche il sistema nervoso simpatico, che porta alla stimolazione adrenergica e all'aumento di cAMP. L'aumento di calcio, cAMP, AMPK e altri segnali (come l'ossido nitrico) attivano fattori di trascrizione che controllano l'espressione di geni mitocondriali (Scarpulla et al., 2008; Handschin et al., 2006; Miura et al., 2007). Una singola seduta di allenamento fisico provoca un aumento transiente dei livelli di PGC-1 α , NRF-1, PRC, GABP, ERR α , PPAR δ e di altri geni mitocondriali (Baar et al., 2002; Roel et al., 2008;). L'esposizione al freddo provoca l'attivazione del sistema nervoso simpatico, la stimolazione adrenergica del BAT, e l'aumento di cAMP e dei meccanismi che dipendono da cAMP (come PKA, p38MAPK, CREB) che inducono PGC-1 α (Cao et al., 2004).

Il nostro gruppo di ricerca ha per primo dimostrato che la restrizione calorica (CR), cioè il ridotto introito di calorie con la dieta senza provocare malnutrizione, aumenta la mitocondriogenesi in diversi tessuti, incluso il cervello, nel topo (Nisoli et al., 2005). Questo risultato è successivamente stato confermato da diversi studi condotti nei roditori e nell'uomo; Civitarese et al., 2007, Lambert et al., 2004, Lòpez-Lluch et al., 2008). I segnali molecolari coinvolti nella restrizione calorica includono l'aumento dell'attività di SIRT1, l'aumento dell'attività di AMPK e l'induzione della sintasi endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS). Studi condotti dal nostro gruppo di ricerca nel 2003 avevano in precedenza messo in luce il ruolo mitocondriogenetico dell'ossido nitrico (NO), che induce l'espressione di PGC-1 α tramite la via di cGMP (Nisoli et al., 2003). Di conseguenza, topi che non esprimono eNOS, l'enzima che produce NO e che viene indotto dalla restrizione calorica, mostrano deficit mitocondriali in molti tessuti (Nisoli et al., 2005). Anche gli altri segnali mitocondriogenetici sopra menzionati, attivati in corso di CR, convergono nella regolazione di PGC-1 α , regolandone sia l'espressione che l'attività (Gerhart-Hines et al., 2007; Jager et al. 2007; Borniquel et al., 2006).

1.2.4 Strategie mitocondriogenetiche

La restrizione calorica (CR), o riduzione dell'apporto calorico senza malnutrizione, è la più efficace strategia per prolungare la vita in tutte le specie animali sinora studiate, dai lieviti ai primati (Ingram and Roth, 2011). Gli effetti della CR sono in larga misura da attribuirsi alla prevenzione di svariate patologie dell'invecchiamento. Sia nell'animale che nell'uomo, la CR ritarda l'insorgenza o previene importanti cause di morbilità e mortalità come il cancro, le malattie neurodegenerative, le patologie cardiovascolari, la sarcopenia e il diabete (Baur et al., 2010; Heilbronn et al., 2006). Roditori sottoposti a CR mostrano un danno inferiore a roditori alimentati ad libitum in caso di lesione cerebrale di origine ischemica (Yu e Mattson, 2002).

Nonostante molta attenzione si sia concentrata sull'osservazione che la CR ha effetti benefici nell'uomo (Heilbronn et al., 2006), è improbabile che questo tipo di regime dietetico sia facilmente proponibile a lungo termine. Un efficace trattamento di CR comporta una *compliance* dietetica del paziente con una riduzione dell'apporto calorico del 30-40% al di sotto dei livelli base. Gli studi emergenti in questo settore si sono focalizzati sulla possibilità di identificare molecole ad attività "CR-mimetica", cioè capaci di agire sui meccanismi della CR, in modo da assicurare gli effetti benefici della CR senza richiedere una riduzione nell'assunzione di cibo (Ingram e Roth, 2011; Valerio et al., 2011).

Alcuni farmaci già in uso clinico potrebbero rivelare proprietà CR-mimetiche. Composti potenzialmente CR-mimetici in quanto induttori di mitocondriogenesi in alcuni tessuti, tra cui il cervello di topo, includono i farmaci tiazolidinedioni, attivatori dei PPAR γ (Onyango et al., 2010). In considerazione dell'importante ruolo di controllo della mitocondriogenesi operato del sistema generante NO (Nisoli et al., 2003), molecole in grado di rilasciare NO e di molecole capaci di indurre e/o attivare eNOS potrebbero avere potenzialità CR-mimetiche. Interessante sarebbe indagare le possibili proprietà mitocondriogenetiche della metformina, un farmaco che esercita effetti eNOS-dipendenti (Zou et al., 2004) e favorisce l'attivazione di eNOS in vivo (Davis et al., 2006). La metformina è un farmaco antidiabetico da lungo tempo approvato per uso umano. La somministrazione di metformina è in grado di prolungare la vita nei topi, e di riprodurre gran parte delle modificazioni trascrizionali associate alla CR (Kaeberlein, 2007). Anche i farmaci appartenenti alla classe delle statine, utilizzati in clinica per la terapia delle dislipidemie, meriterebbero un'indagine. Alcune di queste molecole, come la rosuvastatina, un

inibitore della HMG-CoA reduttasi, aumentano infatti i livelli di espressione di eNOS in diversi tessuti (Laufs et al., 2002;).

Nel 2000, Li e collaboratori hanno proposto le sirtuine, proteine omologhe di Sir2 nei lieviti, come fondamentali mediatori degli effetti della CR (Li et al., 2006). Nei mammiferi il gene ortologo di Sir2, SIRT1, deacetila numerosi fattori e cofattori di trascrizione che regolano importanti processi metabolici. L'attivazione di SIRT1 favorisce la longevità nei topi e gioca ruoli importanti nella protezione contro le malattie neurodegenerative (Lavu et al., 2008) anche grazie alla riduzione dei fenomeni di stress ossidativo (Della Morte et al., 2009). Uno dei targets di SIRT1 è PGC-1 α : SIRT1 è in grado di deacetilare PGC-1 α e quindi di aumentare la sua attività trascrizionale, favorendo i processi di mitocondriogenesi. SIRT1 ha suscitato un notevole interesse nella comunità scientifica internazionale grazie alle sue molteplici proprietà e funzioni. Negli ultimi anni anche le industrie farmaceutiche hanno iniziato a sviluppare molecole in grado di attivare SIRT1, e, quindi, di potenziarne gli effetti benefici. Una delle compagnie leader in questo settore è la Sirtris Pharmaceutical. Il composto principale studiato dalla Sirtris è stato il resveratrolo, un polifenolo di origine naturale, che è stato identificato come attivatore di SIRT1 nei mammiferi e di SIR2 negli invertebrati (Howitz et al., 2003). Il resveratrolo è anche un riconosciuto induttore dell'espressione e dell'attività di eNOS (Wallerath et al., 2002). Numerosi studi sono stati condotti per valutare il potenziale di questo composto nel riprodurre gli effetti della CR sulla sopravvivenza e sulla salute (Baur et al., 2010).

Il maggior impegno della Sirtris in questi ultimi anni si è concentrato nello sviluppo di composti sintetici che si comportano da diretti attivatori di SIRT1. Alcuni studi hanno dimostrato un effetto globale sul metabolismo e un allungamento della vita di topi obesi con il composto SRT1720 (Minor et al., 2011). Sono stati identificati numerosi composti candidati e alcuni sono testati al momento in trials clinici per il trattamento del diabete (Milne et al., 2007;).

Se le capacità mitocondriogenetiche delle molecole sopra descritte fossero riscontrate anche nei neuroni, varrebbe senz'altro la pena di avviare studi sperimentali per valutare il loro potenziale terapeutico in modelli animali di neurodegenerazione acuta e cronica.

1.3 L'*ictus* cerebrale: il problema clinico

L'*ictus* cerebrale, che gli anglosassoni definiscono *stroke*, è la seconda causa di morte nell'Unione Europea, con 490.000 morti ogni anno. Più di una donna su otto (13%) e circa un uomo su dieci (9%) muore per questa patologia, e molti altri sono colpiti da eventi non fatali. Nei paesi occidentali il 10-12% dei pazienti affetti da *ictus* muore; nel 25% dei casi, la morte si verifica entro un mese dall'evento, in un terzo dei casi entro sei mesi e nella metà entro un anno. Il 40-50% dei pazienti sopravvissuti presenta disabilità permanenti. La mortalità da *ictus* cerebrale è calata negli ultimi anni nei paesi occidentali, inclusa l'Europa dell'ovest; tuttavia il numero di casi annuali di *ictus* cerebrali mostra un aumento negli ultimi decenni. Questo aumento sarà maggiore del 30% nella popolazione anziana e porterà un notevole carico in termini di costi alla sanità pubblica.

Patogeneticamente, l'*ictus* cerebrale comprende un gruppo eterogeneo di patologie. Nell'85% dei casi l'*ictus* è causato dall'occlusione di un vaso arterioso (*ictus* ischemico), mentre solo il 15% degli *ictus* è causato da un'emorragia intracerebrale (Figura 1). La causa più frequente di blocco focale del flusso sanguigno nel cervello è l'embolia. In altri casi, si verifica la trombosi dei vasi di calibro minore (Mergenthaler et al., 2004).

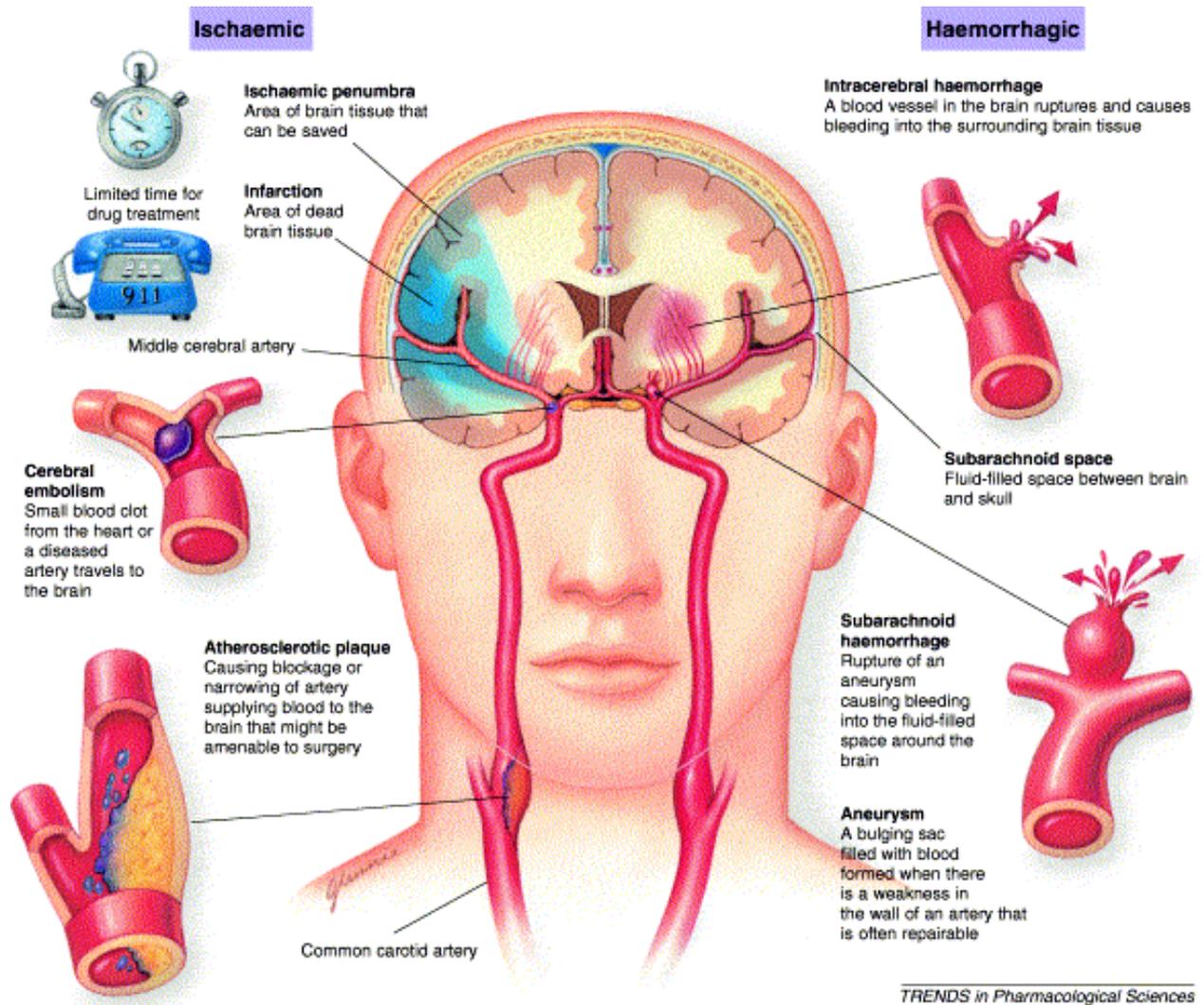


Figura 1.5. Principali cause di ictus cerebrale ischemico e emorragico (Green, R. et al., 2003).

1.3.1 Fisiopatologia dell'ictus cerebrale ischemico

La funzione cerebrale necessita di un continuo apporto di ossigeno e glucosio tramite il flusso sanguigno, e l'interruzione della circolazione sanguigna nel cervello provoca un inevitabile danno cerebrale. La lesione ischemica è il risultato di una cascata di eventi sia cellulari che molecolari innescata da un'improvvisa mancanza del flusso sanguigno e dalla seguente riperfusione nel tessuto ischemico (Lipton et al., 1999). I neuroni sono più vulnerabili delle cellule gliali o vascolari e iniziano velocemente a degradarsi e morire se esposti a ipossia-ischemia. Nell'ischemia causata dall'occlusione dell'arteria cerebrale media, il più comune caso di ictus, il danno è più rapido e severo nel centro della regione colpita, dove il flusso è più debole. Nella periferia della regione ischemica, chiamata penombra ischemica, il danno neuronale si sviluppa più lentamente in quanto il flusso del sangue, derivato da vasi adiacenti (flusso collaterale) mantiene la perfusione cerebrale evitando la morte immediata dei neuroni (Moskowitz et al., 2010). Nel *core* ischemico, il principale meccanismo che causa la morte cellulare è il deficit energetico: senza ossigeno e glucosio i neuroni non possono generare l'ATP necessario rifornire la pompa ionica e mantenere il gradiente ionico lungo la membrana neuronale, in particolare lo scambio $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. In conseguenza grandi quantità di Na^+ e Ca^{2+} nel citoplasma portano al rigonfiamento e alla degenerazione degli organelli, alla perdita dell'integrità della membrana e alla morte della cellula per necrosi. Nella penombra ischemica, la riduzione del flusso non è sufficiente per causare la mancanza di energia, e i neuroni restano vitali per un periodo di tempo prolungato dopo l'insulto. L'accumulo eccessivo di glutammato a livello extracellulare è il maggior fattore che contribuisce alla degenerazione della penombra ischemica. L'iperattivazione dei recettori NMDA del glutammato induce un accumulo citoplasmatico di Ca^{2+} , che attiva enzimi Ca^{2+} -dipendenti, tra cui le proteasi calpaina e caspasi, ed enzimi che producono NO, radicali liberi e metaboliti dell'acido arachidonico. Questi eventi possono causare una morte cellulare per necrosi oppure una morte programmata, a seconda dell'intensità dell'insulto e dello stato metabolico dei neuroni (Figura 1.6). Cellule lese e in fase di morte svolgono un ruolo chiave nel processo infiammatorio post-ischemico perché rilasciano segnali di pericolo che attivano il sistema immunitario (Iadecola e Anrather., 2011).

Negli ultimi decenni, grazie anche all'utilizzo di tecniche di *imaging*, gli studi sulla zona di penombra si sono notevolmente evoluti. Non più considerata un tessuto passivo all'attacco ischemico, la penombra è attivamente coinvolta nei meccanismi reattivi di riparazione e rimodellamento in risposta all'ischemia. Gli studi riguardanti la penombra ischemica sono oggi

al centro dell'attenzione, perché questo è il tessuto cerebrale potenzialmente recuperabile con terapie neuroprotettive (Lo, 2008).

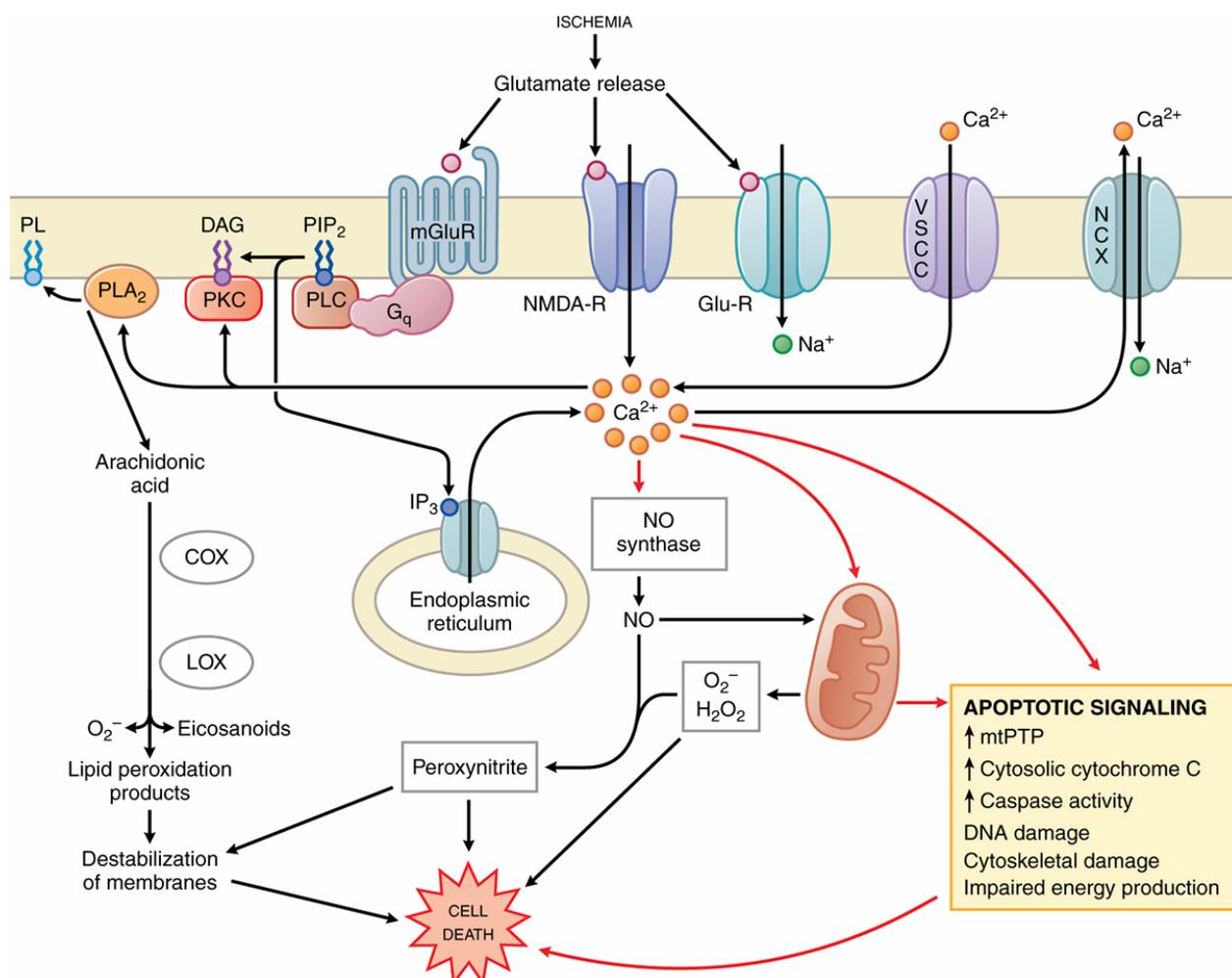


Fig. 1.6: Eventi attivati durante l'ischemia che portano alla morte cellulare.

I meccanismi dell'ischemia sono stati studiati in modelli di ischemia cerebrale *in vitro* e *in vivo* (Lipton et al., 1999; Moskowitz et al., 2010); tuttavia, questi modelli non riproducono tutti gli aspetti dell'ictus nel cervello umano e possono introdurre variabili importanti, come l'anestesia e il trauma chirurgico. Inoltre, differenze nella vascolarizzazione e nella risposta immunitaria nel cervello umano potrebbero alterare l'inizio e l'evoluzione del danno tissutale. Tuttavia, le caratteristiche fisio-patologiche del *core* ischemico sono comparabili tra animali e uomini, e il modello animale di ischemia cerebrale resta una strategia importante per lo studio preclinico dell'ictus cerebrale.

1.4 La reazione endogena all'attacco ischemico: un fenomeno bifasico

L'ischemia cerebrale, oltre che da processi deleteri, è anche caratterizzata da una risposta endogena coordinata per contrastare il danno tissutale. Alcuni eventi adattativi si manifestano precocemente. La riduzione del flusso sanguigno causato dall'occlusione di un'arteria viene bilanciata da un aumento della pressione sanguigna, tramite la produzione di mediatori vasoattivi nel cervello ischemico e dall'attivazione di eNOS, che aumenta la perfusione e riduce la resistenza nei vasi collaterali che suppliscono il territorio ischemico. L'ipossia attiva HIF1, causando una risposta trascrizionale che promuove il trasporto di ossigeno e glucosio nel tessuto. Il deficit energetico associato all'ischemia è contrastato dall'interruzione della sintesi proteica e dell'attività neuronale per ridurre la spesa energetica. Lo stress ossidativo post-ischemico attiva una risposta antiossidante tramite NRF-2, mentre neurotrasmettitori inibitori e trasportatori del glutammato controbilanciano l'eccitotossicità associata all'attivazione dei recettori del glutammato. Gli effetti deleteri dell'apoptosi post-ischemica sono contrastati dall'espressione di fattori anti-apoptotici come Bcl2 e IAP, delle *heat shock proteins* (HSP) e dall'attivazione della protein chinasi Akt. L'infiammazione viene contrastata dalla produzione di citochine anti-infiammatorie e da neurotrasmettitori. L'immunosoppressione sistemica limita lo sviluppo di una risposta immunitaria innata adattativa che potrebbe indurre danno tissutale. L'ischemia è anche associata all'espressione di geni CREB-dipendenti, inclusi fattori di crescita, e alla proliferazione di progenitori di cellule vascolari e neurali che partecipano al riparo tissutale. Questi meccanismi protettivi endogeni limitano l'estensione del danno ischemico cerebrale, come dimostrato in alcuni studi dove la loro inibizione aumenta il danno (Kouroiva et al., 1985; Papadopoulos et al., 2001).

Altri eventi adattativi si manifestano più tardivamente e promuovono i processi riparativi nel cervello danneggiato. Microglia, i macrofagi, i neuroni, gli astrociti e le cellule vascolari secernono fattori di crescita, alcuni di questi, come l'eritropoietina (EPO) e *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), sono anche prodotti da organi periferici e entrano nel cervello attraverso il flusso sanguigno (Navarro et al., 2009). La sinapsi glutammatergica induce l'espressione del *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) attraverso l'attivazione o la trascrizione di CREB. I neuroni sopravvissuti al danno espongono nuovi prolungamenti per ricostituire la connessione neuronale danneggiata. I precursori neuronali invadono l'area danneggiata, e *bone marrow-derived progenitor cells* contribuiscono a ricostruire la rete micro vascolare del cervello. Questi

processi cercano di ricostruire l'omeostasi tissutale attraverso la riorganizzazione della matrice extracellulare, la sostituzione delle cellule danneggiate e la ricostruzione della rete neuronale (Neuwelt et al., 2011).

Studiando come il nostro cervello attiva e implementa questi meccanismi protettivi potremmo ampliare le nostre conoscenze per il trattamento dell'ictus.

1.5 Strategie terapeutiche nell'ictus cerebrale ischemico

L'ischemia cerebrale acuta è una delle patologie che più attira su di sé l'attenzione della ricerca medica, in considerazione della sua rilevanza per la sanità pubblica e della mancanza di terapie soddisfacenti. Dal momento in cui, nella fisiopatologia dell'ischemia cerebrale, è stato stabilito il concetto di penumbra, lo stroke ischemico è stato considerato un processo dinamico e non più un evento irreversibile che conduce alla morte neuronale. Le variabili che influenzano l'evoluzione dello stroke ischemico sono numerose e, in base a queste, dovrebbero teoricamente esistere opzioni terapeutiche diverse. Sfortunatamente, nonostante la conoscenza dei processi fisiopatologici dell'infarto cerebrale si sia notevolmente ampliata negli ultimi 25 anni, i trattamenti clinicamente efficaci sono ancora pochi. Ad oggi, sono essenzialmente due le strategie terapeutiche adottate: la prima si prefigge lo scopo di ricanalizzare l'arteria occlusa, la seconda è finalizzata a proteggere e conservare integro il tessuto cerebrale della *penumbra* (Segura et al., 2008).

1.4.1 La riperfusione cerebrale: procedure di trombolisi

Molti infarti cerebrali sono causati da occlusione trombotica di un'arteria intracranica, e la trombolisi tramite somministrazione endovenosa dell'attivatore tissutale del plasminogeno ricombinante (rt-PA, *alteplase*) è l'unico trattamento approvato dalla FDA e utilizzato in casi selezionati anche in Italia. Rt-PA è un fibrinolitico che si lega alla fibrina presente nel trombo e trasforma il plasminogeno in plasmina, che dà luogo a sua volta alla fibrinolisi locale con limitata proteolisi sistemica. E' stato dimostrato che rt-PA aumenta la probabilità di recupero completo del paziente dal 26% al 39% (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Dal 1996, anno in cui l'rt-PA è stato approvato per il trattamento dello stroke ischemico, l'alteplase doveva essere somministrato entro 3 ore dalla comparsa dei sintomi clinici. Recentemente, lo studio ECASS-3 (Third European Cooperative Acute Stroke Study), dimostrando l'efficacia terapeutica della molecola fino a 4.5 ore dall'inizio dei sintomi, ha allargato la finestra temporale del trattamento con rt-PA, aumentando il numero

di pazienti eleggibili per il trattamento trombolitico (Hacke et al., 2008). Il principale evento avverso correlato alla trombolisi resta l'emorragia intracerebrale sintomatica che si sviluppa nel 6-7% dei pazienti trattati. Il rischio di incorrere in questa complicanza aumenta con l'età, elevati livelli di pressione arteriosa, gravi deficit neurologici e iperglicemia (Donnan et al., 2008). In ogni caso, a causa della finestra temporale ristretta e dei rischi connessi alla terapia trombolitica, ad oggi una assoluta minoranza di pazienti è trattata con questo approccio, anche nei centri più attrezzati.

Negli anni sono state studiate diverse molecole trombolitiche proposte come alternativa all'alteplase, tra queste la *tenecteplase* sembra avere un'emivita più lunga e una maggiore specificità per il plasminogeno rispetto all'rt-PA. In uno studio clinico pilota, tenecteplase ha dimostrato la capacità di favorire la pervietà vascolare e la perfusione cerebrale quando somministrato in una finestra temporale di 3-6 ore dalla comparsa dei sintomi; questi dati e la reale rilevanza clinica restano da confermare con studi futuri (Parsons et al., 2009).

Un promettente approccio nella terapia dello stroke ischemico, che sembra migliorare la riperfusione cerebrale, è l'associazione tra la terapia trombolitica e gli ultrasuoni: sonotrombolisi. Esistono tre diverse tecniche ultrasonografiche in grado di aumentare l'attività trombolitica dell'rt-PA: il doppler transcranico (TCD), doppler transcranico con la tecnica del color-coded duplex (TCCD) e gli ultrasuoni a bassa frequenza (LFUS). Accanto a queste metodiche consolidate, sta emergendo l'utilizzo di microsferi gassose, introdotte inizialmente in campo diagnostico come mezzo di contrasto nelle immagini ultrasonografiche. Sembra che l'utilizzo delle microsferi faciliti il trasferimento dell'energia dall'onda meccanica al sangue stagnante e al trombo, aumentando la probabilità di ricanalizzazione vascolare. Nel complesso, le tecniche di sonotrombolisi oggi utilizzate hanno dimostrato una frequenza di ricanalizzazione completa superiore alla sola trombolisi sistemica (Tsivgoulis et al., 2010).

La trombolisi intrarteriosa (IA) si è dimostrata efficace fino a 6 ore dopo l'inizio dell'occlusione dell'arteria cerebrale media. Nonostante non esistano studi che abbiano comparato la trombolisi intravenosa e quella intrarteriosa, dati indiretti suggeriscono una probabilità maggiore di ricanalizzazione con la trombolisi IA. Questa procedura può essere eseguita esclusivamente in centri altamente specializzati nella terapia dello stroke con accesso immediato all'angiografia cerebrale. La comunità scientifica è concorde nel raccomandare la trombolisi IA nel trattamento di pazienti selezionati con grave stroke iniziato da meno di 6 ore e secondario all'occlusione

dell'arteria cerebrale media, non eleggibili per la terapia con rt-PA (Segura et al., 2008). È stata proposta, inoltre, la combinazione di trombolisi intravenosa e IA, unendo i vantaggi della prima (rapidità dell'inizio della terapia e facile disponibilità) con quelli della seconda (aiuto meccanico alla ricanalizzazione e una maggiore potenza e velocità della dissoluzione del trombo) (Interventional Management of Stroke Investigation, 2007).

In letteratura esistono anche diversi lavori che mostrano l'efficacia della combinazione di angioplastica e trombolisi in pazienti con occlusione della circolazione vertebrobasilare, tuttavia sia l'angioplastica che gli stent dei vasi intracranici restano esperienze aneddotiche nel trattamento acuto dello stroke (Segura, et al., 2008).

1.5.1 La neuroprotezione: una speranza sinora disattesa

La riduzione drastica del flusso sanguigno in un'area cerebrale conseguente all'occlusione di un vaso promuove l'avvio di una complessa cascata biochimica nel tessuto ischemico. Tale evento conduce alla depolarizzazione neuronale e al rilascio di neurotrasmettitori eccitotossici in grado di causare la necrosi cellulare nel *core* ischemico. Tuttavia, nel tessuto circostante, definito *penumbra* ischemica, inizia un processo dinamico che coinvolge diversi meccanismi (l'influsso di calcio intracellulare, la produzione di radicali liberi, l'espressione di molecole di adesione) che esitano nell'infiammazione e nell'apoptosi cellulare. Le strategie neuroprotettive mirano a interrompere questi processi che provocano danno neuronale allo scopo di limitare le alterazioni neurologiche. Gli studi sulle possibilità di neuroprotezione, praticamente assenti in letteratura sino all'inizio degli anni '90, hanno visto un'incredibile aumento da quel momento ad oggi, a seguito delle importanti acquisizioni sugli eventi coinvolti nella fisiopatologia dell'ischemia cerebrale e alla messa a punto di modelli che riproducono l'*ictus* cerebrale in vitro e in vivo. Le strategie terapeutiche che potrebbero potenzialmente arrestare la morte cellulare nel tessuto ischemico sono state recentemente riassunte da Candelario-Jalil (2009).

1.5.1.1 Molecole che bloccano i fenomeni eccitotossici

Negli studi preclinici, in diversi modelli animali di ischemia cerebrale, numerose molecole hanno dimostrato un'elevata potenzialità nel contrastare e ridurre le alterazioni precoci dell'omeostasi cellulare, tra questi: antagonisti dei recettori per il glutammato NMDA e AMPA, bloccanti dei canali del Ca^{2+} o chelanti del Ca^{2+} e GABA agonisti (Segura, et al., 2008). Tuttavia, nessuna di queste molecole ha dimostrato un'effettiva efficacia nel trattamento dei pazienti con stroke. In ogni caso, considerare come bersaglio terapeutico questi eventi precoci del processo

fisiopatologico dell'ictus è già in partenza fallimentare, poiché la maggior parte dei pazienti giunge all'osservazione medica dopo diverse ore dall'inizio dei sintomi, quando una quota significativa del tessuto cerebrale è già andata incontro a necrosi. In più, gli antagonisti dei recettori del glutammato valutati nei trial clinici hanno mostrato una scarsa capacità di raggiungere il tessuto cerebrale e una serie di eventi avversi come: allucinazioni, agitazione ed effetti cardiovascolari.

1.5.1.2 Farmaci Antiossidanti

Numerosi studi preclinici hanno dimostrato l'efficacia delle diverse molecole antiossidanti (tirilazad, ebselen, deferoxamina e NXY-059) nel contrastare il danno ischemico cerebrale. Tuttavia, non è stato dimostrato nessun miglioramento delle funzioni neurologiche quando questi farmaci sono stati testati nel trattamento di pazienti affetti da stroke. Nonostante questi risultati scoraggianti, lo studio di molecole antiossidanti è, ancora oggi, un'area di grande interesse nello sviluppo di nuove terapie neuroprotettive.

1.5.1.3 Molecole antiapoptotiche

Come già visto in precedenza, le cellule della *penumbra* ischemica vanno incontro a morte a seguito dell'attivazione della cascata apoptotica. Durante questo processo ben regolato, i geni che codificano per le caspasi o per i membri della famiglia Bcl (come Bcl-2, Bax e Bim) vengono attivati sia nella fase precoce che in quella più tardiva dell'ischemia. Molecole che bloccano i componenti della famiglia delle caspasi (soprattutto caspasi-3 e-8), come Z-VAD-FMK e Z-DEVD-FMK, o strategie che potenziano l'azione delle proteine Bcl-2 conferiscono una significativa resistenza al danno ischemico.

Nel tessuto ischemico, si verifica un'iperattivazione del PARP-1 [poli(ADP-ribosio)polimerasi] come risposta compensatoria cellulare nel tentativo di riparare il danno del DNA. In realtà, l'attivazione di questo enzima, nell'economia complessiva della cellula, è controproducente poiché si accompagna a deplezione di ATP e ulteriore peggioramento dello stato energetico della cellula già compromessa. Inibitori di PARP-1, come DR-2313, INQ-1001, FR-247304 (Astellas Pharma Inc) e 3-aminobenzamide, hanno un elevato effetto neuroprotettivo riducendo in modo significativo l'apoptosi (Metha, et al., 2007).

1.5.1.4 Strategie antiinfiammatorie

La neuroinfiammazione gioca un ruolo fondamentale nell'evoluzione dello stroke, e poter disporre di strategie terapeutiche che blocchino i processi infiammatori significherebbe attenuare in modo significativo il danno ischemico cerebrale. Dati ottenuti da studi che hanno utilizzato

validati modelli di ischemia cerebrale in roditori, dimostrano che bloccare gli effetti delle citochine proinfiammatorie determina una significativa riduzione del danno ischemico. D'altro canto, diversi lavori hanno evidenziato il coinvolgimento di alcune citochine, ad esempio TNF α , nella risposta riparatoria allo stroke. Allo stesso modo è stato dimostrato che attenuare l'infiltrazione leucocitaria nel tessuto ischemico, contrastando l'attività delle chemochine, ha un potente effetto neuroprotettivo in modelli animali di ischemia cerebrale; tuttavia, mancano dati clinici che possano validare questi risultati (Dirnagl, 2004).

La produzione di metalloproteinasi di matrice (MMP) rappresenta un evento importante della neuroinfiammazione causando alterazioni della BEE che possono associarsi a edema vasogenico, trasformazione emorragica e peggioramento della prognosi del paziente con ictus ischemico. In modelli animali, gli inibitori delle MMP riducono in modo significativo il volume dell'infarto cerebrale, la distruzione della BEE e la comparsa di edema. Tuttavia, la potenzialità clinica di queste molecole è estremamente ridotta a causa del loro livello di tossicità e delle limitazioni di tipo farmacocinetico (Candelario-Jalil, et al., 2009).

Durante l'ischemia cerebrale aumenta significativamente il metabolismo dell'acido arachidonico con una grande produzione di prostanoidi proinfiammatori e di radicali liberi. In modelli animali di ischemia cerebrale, il blocco farmacologico o la delezione genica della fosfolipasi A (che media il rilascio di acido arachidonico dai fosfolipidi) ha un effetto neuroprotettivo. Risultati simili si ottengono anche interferendo con l'attività enzimatica della ciclossigenasi-2 (COX-2): la neuroprotezione, infatti, si evidenzia sia in topi COX-2 deficienti, sia in modelli di ischemia cerebrale in roditori trattati con la nimesulide (inibitore di COX-2), anche a diverse ore di distanza dall'inizio del danno. Ciò nonostante, l'utilizzo di inibitori della COX-2 si associa alla comparsa di tossicità cardiaca che ne preclude l'applicazione clinica. Pertanto, sono stati studiati nuovi bersagli terapeutici a valle dell'enzima COX-2 e studi preclinici promettenti in modelli animali, suggeriscono che il blocco del recettore dei prostanoidi EP1 si accompagna ad un'efficace neuroprotezione. Un aspetto estremamente importante da sottolineare di questi inibitori è che si sono dimostrati efficaci anche quando somministrati a 12 ore di distanza dall'inizio dell'ischemia. Questi risultati sono solo preliminari, saranno necessari ulteriori studi per accertare il reale ruolo degli antagonisti EP1 nella terapia dello stroke (Abe, et al., 2009).

Durante l'ischemia aumenta considerevolmente anche la formazione di NO; l'inibizione farmacologica della NOS, sia inducibile che neuronale, conferisce una protezione in modelli animali di ischemia. Tuttavia, la produzione di NO da parte della NOS endoteliale contribuisce al mantenimento della perfusione cerebrale ed è quindi un evento favorevole nello stroke ischemico. Purtroppo, resta ancora difficile bilanciare gli effetti positivi e negativi dell'NO

nell'ischemia cerebrale a causa della mancanza di inibitori capaci di riconoscere selettivamente le diverse isoforme di NOS.

Sono ancora numerose le strategie terapeutiche oggi vagliate per contrastare il processo neuroinfiammatorio che accompagna lo stroke ischemico. Diversi studi, ad esempio, suggeriscono che PPARs, fattori di trascrizione che controllano il metabolismo lipidico e glucidico, potrebbero rappresentare importanti bersagli terapeutici in questo campo. In modelli di ischemia, l'attivazione di tutte le isoforme di PPAR, e soprattutto di PPAR γ , previene l'infiammazione post-ischemica e il danno ossidativo (Sobrado, 2009).

1.5.1.5 Farmaci multifunzionali

Sono state identificate alcune molecole dotate di diverse modalità d'azione e, pertanto, capaci di bloccare contemporaneamente più meccanismi della cascata ischemica.

In modelli di stroke ischemico, l'eritropoietina (EPO) ha dimostrato una potente azione neuroprotettiva. L'EPO, infatti, è un forte anti-apoptotico, ha proprietà neurorigenerative (stimola la neurogenesi e la differenziazione neuronale) e attiva l'angiogenesi. In diversi studi condotti su animali, il trattamento con EPO riduce la risposta infiammatoria all'ischemia cerebrale. Tuttavia, in un recente trial clinico, la somministrazione di eritropoietina ricombinante in pazienti con ischemia cerebrale non è risultata efficace. Nonostante ciò, il mondo scientifico è concorde nell'incoraggiare ulteriori approfondimenti del potenziale ruolo neuroprotettivo di EPO (Digicaylioglu, 2010).

La citocolina (citidina-5-difosfocolina o CDP-colina) è un prodotto intermedio della sintesi della fosfatidilcolina, costituente importante delle membrane neuronali. La citocolina è in grado di preservare l'integrità delle membrane, aumentando la sintesi di fosfolipidi e inibendo il rilascio di acidi grassi dopo lo stroke. Questo farmaco multifunzionale è già stato approvato in diversi paesi per il trattamento dell'ischemia cerebrale, tuttavia l'evidenza definitiva della sua efficacia clinica è ancora in discussione.

Il fattore di crescita emopoietico G-CSF è stato studiato in modelli di stroke e ha dimostrato potenti effetti neuroprotettivi. G-CSF, infatti, ha proprietà anti-apoptotiche, blocca l'attivazione di diverse proteinchinasi coinvolte nella neuroinfiammazione e sostiene la rigenerazione stimolando la neurogenesi. In uno studio clinico di fase IIa, AX-200 (G-CSF; SYGNIS Bioscience GmbH & Co KG) è risultato sicuro e ha dimostrato segni di efficacia clinica nel trattamento di pazienti con stroke.

Modelli animali di stroke hanno evidenziato un elevato potere neuroprotettivo di alte dosi di albumina umana. L'albumina determina una drastica riduzione dell'edema cerebrale, ha capacità

antiossidanti e mobilita acidi grassi sistemici riducendone la perdita da parte delle membrane cellulari. È in corso un trial clinico di fase III (NCT00235495) sponsorizzato dall'università di Miami che ha l'obbiettivo di studiare l'efficacia del trattamento dello stroke con alte dosi di albumina (Minnerup e Schabitz, 2009).

Le statine, inibendo l'HMG-CoA riduttasi, producono una riduzione significativa della sintesi di colesterolo e una contemporanea clearance delle LDL dalla circolazione sanguigna. Questi farmaci possiedono numerosi effetti di rilevanza nella fisiopatologia dell'ictus ischemico: agiscono come anti-aterotrombotici e anti-infiammatori, stimolano la produzione di eNOS nel tessuto cerebrale, inibiscono le MMP e hanno proprietà antiossidanti. In modelli animali di stroke, il trattamento con atorvastatina ha migliorato il recupero delle funzioni neurologiche attraverso la stimolazione della neurogenesi, sinaptogenesi e angiogenesi. Alla luce dei promettenti risultati ottenuti sui modelli animali, le statine, come l'atorvastatina e la lovastatina, potrebbero avere un effettivo sviluppo nella terapia dello stroke. L'efficacia clinica di questi farmaci nel trattamento dell'ischemia cerebrale deve essere ancora dimostrata, tuttavia la terapia cronica con statine prima di un ictus si associa a stroke di minore gravità e prognosi migliore (Fuentes et al., 2009).

Un altro promettente approccio terapeutico nel trattamento dello stroke è l'iperossia normobarica (NBO). In modelli sperimentali animali, NBO ha dimostrato di migliorare il flusso sanguigno e l'ossigenazione cerebrale, inibire la depolarizzazione peri-infartuale e ridurre l'induzione di MMP mediata dalla NADPH ossidasi. In più, NBO rappresenta una procedura semplice, a basso costo e facilmente accessibile in grado di allungare la finestra temporale per la somministrazione della terapia trombolitica. Le potenzialità di questa strategia sono in studio in un trial clinico di fase II sponsorizzato dal Massachusetts General Hospital (NCT00414726) (Singhal 2007).

1.5.2 Una terapia da ripensare

Sfortunatamente, a fronte di entusiasmanti risultati di centinaia di studi preclinici, tutti gli agenti neuroprotettivi sinora testati si sono dimostrati inefficaci negli studi clinici controllati. Una recente revisione della letteratura ha messo in evidenza il desolante numero di trials clinici fallimentari in questo settore (Ginsberg, 2008). Questa situazione sconcertante deve richiamare la nostra attenzione sulle possibili cause e suggerirci approcci radicalmente diversi. Si sono messe in luce, in particolare, a) la necessità di guardare a terapie combinate, che tengano conto della molteplicità degli eventi patologici attivati in corso di ischemia cerebrale; b) l'utilità di stimolare i processi endogeni di riparazione del danno cerebrale (Ginsberg, 2008). Il cervello infatti, a seguito di un evento ischemico, mette in atto una serie di eventi adattativi, che comprendono vari fenomeni di neuroplasticità, angiogenesi e neurogenesi (proliferazione di cellule staminali neurali, migrazione e differenziamento dei neuroni neoformati) (Figura 1.7) (Candelario-Jalil, 2009). Si ritiene che anziché limitare la morte neuronale – tramite la “*neuroprotection*” – si possa favorire gli eventi riparativi – un approccio anche chiamato “*neurorestoration*”. Su quest'ultimo approccio si concentrano oggi la maggior parte degli sforzi sperimentali (Iadecola e Anrather, 2011).

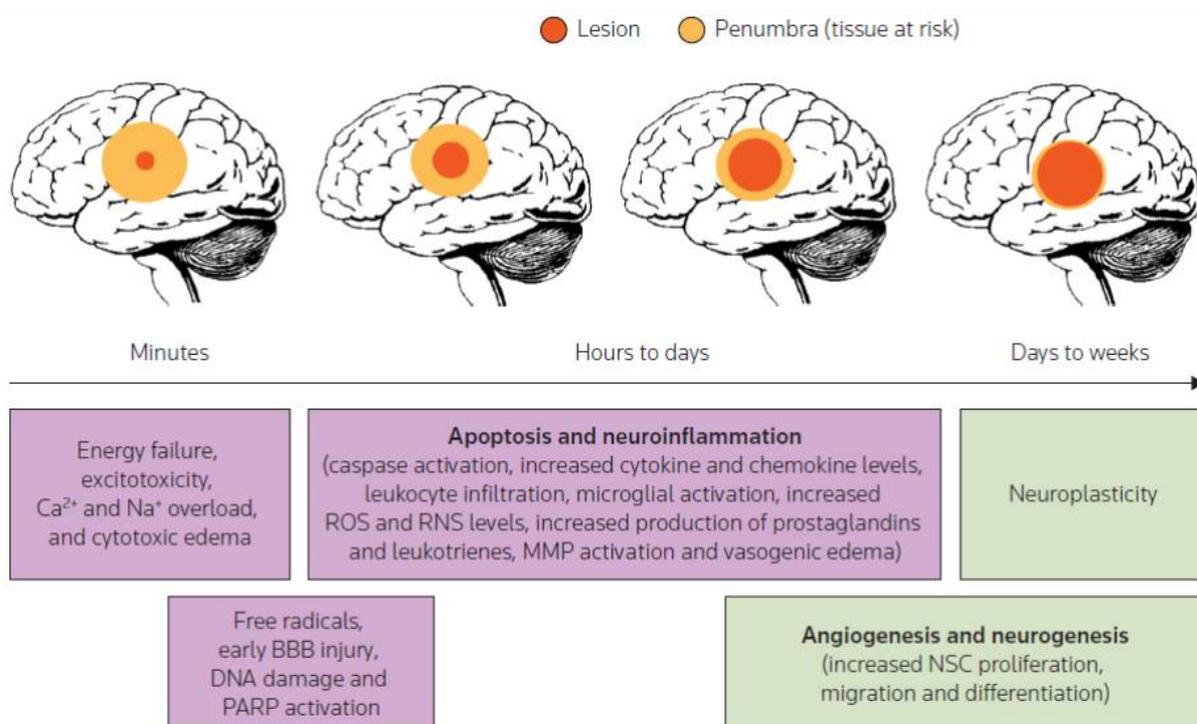


Figura 1.7 :Profilo temporale dei meccanismi di danno e di riparo nell'ischemia cerebrale (Candelario-Jalil, 2009).

1.5.3 La mitocondriogenesi come fenomeno adattativo all'ischemia cerebrale e possibile target terapeutico

Studi condotti in anni recenti hanno suggerito che i processi di mitocondriogenesi siano in grado di migliorare la tolleranza all'ischemia cardiaca (McLeod et al., 2005). Di conseguenza, i regolatori della mitocondriogenesi sono stati proposti come nuovi bersagli terapeutici nel trattamento dell'infarto miocardico. Le informazioni sui fenomeni di mitocondriogenesi nel SNC sono ad oggi molto limitate. PGC-1 α , il principale coordinatore della mitocondriogenesi, è particolarmente abbondante nel prosencefalo e nel cervelletto durante la vita embrionale e nelle prime fasi post-natali, indicando l'importanza di questo regolatore nello sviluppo del sistema nervoso centrale (Cowell, Blake and Russell, 2007). PGC-1 α è anche espresso in varie aree cerebrali in età adulta.

Recentemente, un fenomeno di mitocondriogenesi adattativa è stato descritto a livello cerebrale nel contesto di esperimenti di preconditioning, cioè di ipossia a livelli sublesionali (Gutsaeva et al., 2008) o in modelli di ipossia/ischemia cerebrale neonatale (Yin et al., 2008). Si è osservato che l'ipossia aumenta i livelli di mtDNA, il numero di mitocondri, l'espressione di PGC-1 α e di altri fattori trascrizionali (NRF-1 e Tfam). Queste osservazioni suggeriscono che la mitocondriogenesi possa rappresentare un meccanismo adattativo sinora insospettato, che potrebbe incrementare la capacità bioenergetica cellulare, partecipando ai meccanismi di neuroprotezione, cioè favorendo la sopravvivenza neuronale allo stress ipossico. In fasi più tardive, la mitocondriogenesi reattiva potrebbe cooperare ai meccanismi di neuroriparazione.

Tuttavia, il fenomeno adattativo osservato dopo un'ipossia lieve o transitoria può essere molto diverso dalla risposta ad un'ipossia prolungata (Gutsaeva et al., 2008). In più, la capacità endogena di mitocondriogenesi si riduce con l'invecchiamento, rendendo più difficile lo svilupparsi di un'efficiente risposta adattativa a lesioni ipossiche/ischemiche in soggetti anziani (López-Lluch et al., 2008). In corso di un'ischemia intensa, inoltre, i mitocondri possono andare incontro a danno ossidativo e ad autofagia incontrollata (Vosler et al., 2009); in queste condizioni si assiste a una marcata riduzione del contenuto di mtDNA indicativa dell'inadeguata risposta adattativa mitocondriale (Chen et al., 2001).

La capacità mitocondriogenetica neuronale merita quindi di essere investigata più a fondo in modelli animali di ischemia cerebrale. E' evidente l'estremo interesse di avviare ricerche mirate all'identificazione di strategie farmacologiche in grado di sostenere i fenomeni adattativi di rinnovamento mitocondriale, ove presenti, e di vicariarli, ove deficitari.

1.6 L'enzima glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK-3 β)

La glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK-3) fu originariamente identificata come un enzima coinvolto nella regolazione del metabolismo del glicogeno. Gradualmente è stato scoperto il suo ruolo in altri processi cellulari tanto da essere una molecola estremamente versatile (Chin et al. 2005). GSK-3 partecipa, infatti, alla regolazione della sintesi proteica, alla proliferazione cellulare, al differenziamento, al dinamismo dei microtubuli, alla mobilità cellulare e all'apoptosi (Frame et al. 2001; Grimes et al. 2001).

GSK-3 esiste in due isoforme: α e β , di 51 e 47 kDa rispettivamente, che mostrano un grado di omologia del 98% nel loro dominio catalitico. Entrambe le isoforme sono espresse ubiquitariamente in cellule e tessuti e hanno proprietà biochimiche simili (ma non identiche) (Rayasam et al., 2009).

Diversamente dalla maggior parte delle chinasi, GSK-3 è costitutivamente attiva nelle cellule, e la sua attività può essere inibita da una varietà di stimoli extracellulari.

GSK-3 β è inibita tramite fosforilazione in Ser-9 e GSK-3 α in Ser-21 localizzate nel dominio N-terminale. In aggiunta alla fosforilazione in Ser-9, GSK-3 può essere fosforilata anche in Tyr-126. Studi *in vitro* mostrano che l'enzima si auto fosforila in Tyr-126 aumentando la sua attività. In condizioni particolari, come un aumento temporaneo di calcio intracellulare, uno shock termico o la mancanza di nerve growth factor (NGF), la fosforilazione in Tyr-126 è aumentata, favorendo la morte cellulare per apoptosi.

Il fatto che l'enzima sia coinvolto in numerosi processi cellulari suggerisce che esso possa avere più substrati. GSK-3 richiede una pre-fosforilazione del suo substrato, che viene prima fosforilato da una "priming kinase" su un "priming site" (serina o treonina), il che facilita la seguente fosforilazione da parte di GSK-3. Recenti studi cristallografici su GSK-3 hanno evidenziato tre residui carichi positivamente nel sito catalitico dell'enzima, a formare un "positive binding pocket", il quale facilita un legame efficiente con substrati fosforilati (Eldar-Finkelman, 2002).

Grazie alle sue capacità nel modulare i livelli di glucosio nel sangue, GSK-3 β è stato inizialmente individuato come possibile *target* per il trattamento del diabete. Dopo aver validato la sua rilevanza con studi *in vivo* e *in vitro*, è divenuto un bersaglio farmacologico per la terapia del diabete di tipo 2 e per l'obesità (Gum et al., 2003; Ring et al., 2003). Questo enzima è inoltre coinvolto in altre patologie, per esempio è implicato nella malattia di Alzheimer e in disordini

dell'umore (Hsiung et al., 2003). Recentemente è stato associato all'osteoporosi, all'aterosclerosi, al cancro e all'ipertrofia cardiaca.

Anche se GSK-3 β è un importante target per lo studio di nuovi farmaci, il suo coinvolgimento in numerosi processi potrebbe essere un problema per quanto riguarda la selettività e la specificità di eventuali farmaci. Inoltre Cohen nel 2001 ha evidenziato che trattamenti prolungati con inibitori di GSK-3 β sono oncogenici. Questo avrebbe potuto bloccare lo sviluppo di inibitori di GSK-3 β per il trattamento di patologie croniche come diabete e Alzheimer. Tuttavia, Frame e colleghi nel 2001 hanno descritto un nuovo approccio nello sviluppo di questi inibitori in modo che non abbiano effetti sul *wingless integration (wnt) signalling*, principale responsabile dell'effetto oncogenico. Un approccio simile è stato descritto da Martinez e Perez per disegnare e sviluppare inibitori di GSK-3 β per la malattia di Alzheimer evitando i possibili effetti oncogenici (Martinez and Perez 2008). Inoltre, somministrazioni controllate di dosi appropriate di questi inibitori potrebbero garantirne un utilizzo sicuro, soprattutto in patologie che richiedono una terapia acuta (Eldar-Finkelman, 2002).

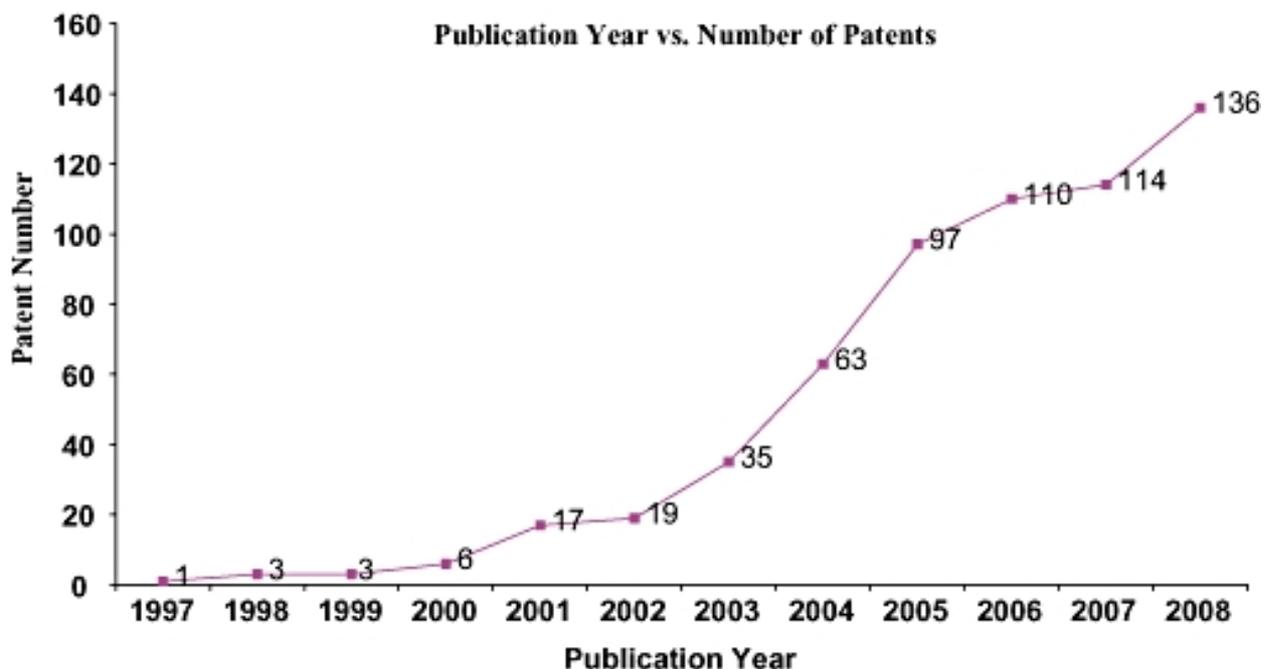


Figura 1.8. Numero di brevetti di inibitori di GSK-3 registrati negli ultimi anni (Phukan et al., 2010).

1.6.1 Gli inibitori di GSK-3 e il loro crescente interesse in terapia

Anche se GSK-3 è stato scoperto 30 anni fa, l'interesse verso GSK-3, come potenziale bersaglio molecolare nello sviluppo di nuovi farmaci, è andato sempre più crescendo solo negli ultimi anni. Per valutare l'importanza di questo target basta considerare il numero di brevetti: dai 4 registrati nel 1999 ai 20 nel 2001, raggiungendo un picco di 136 pubblicazioni nel 2008 (Figura 1.8).

L'inibizione di questo enzima potrebbe, infatti, essere utile in condizioni patologiche associate ad aumenti abnormi della sua attività, come il diabete di tipo 2 e la malattia di Alzheimer (Figura 1.9). Sul numero totale di brevetti circa 153 riguardano la malattia di Alzheimer e circa 170 cancro e diabete. Questo fenomeno indica chiaramente il crescente interesse dell'industria farmaceutica verso gli inibitori di GSK-3. È interessante notare come, nonostante il gran numero di brevetti degli ultimi anni, sia davvero minimo il numero di inibitori di GSK-3 nelle diverse fasi di ricerca e sperimentazione clinica.

In più, è stato dimostrato che gli inibitori specifici di GSK-3 mimano l'azione terapeutica degli stabilizzanti dell'umore, come litio e acido valproico (inibitori aspecifici dell'enzima) e potrebbero, pertanto, essere utili per la cura del disturbo bipolare. Partendo dallo studio delle proprietà proapoptotiche dell'enzima, molti ricercatori suggeriscono un potenziale utilizzo degli inibitori di GSK-3 nel trattamento di patologie neurodegenerative (Phukan et al., 2010).

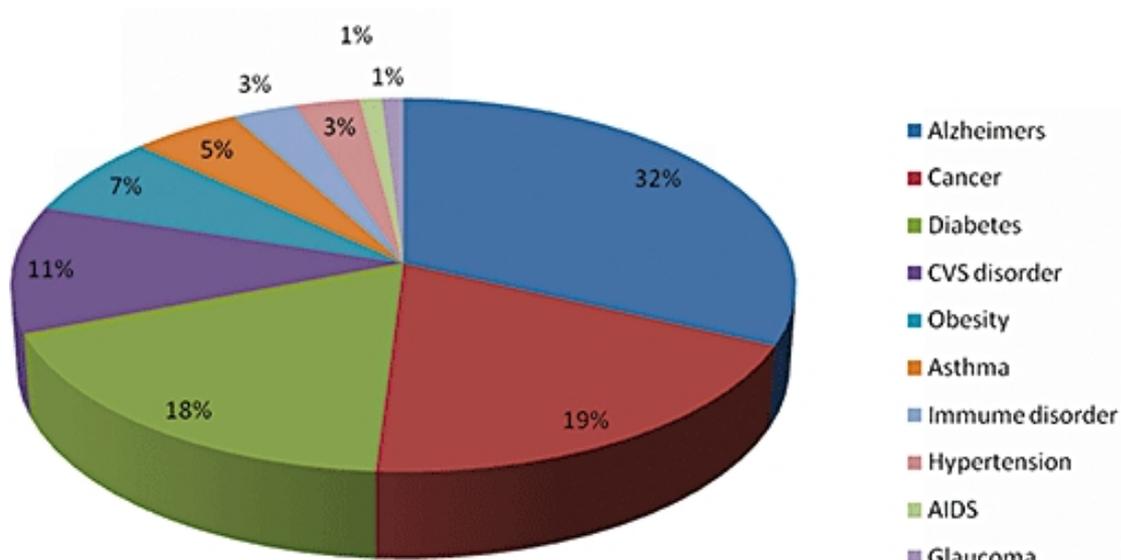


Figura 1.9. Indicazioni terapeutiche degli inibitori di GSK-3 (Phukan et al., 2010).

Due composti strutturalmente diversi (SB-216763 e SB-415286), sviluppati dalla Glaxo Smith Kline, inibiscono l'enzima con IC50 nell'ordine del nano molare (Coghlan et al., 2000). I due inibitori di GSK-3 agiscono con meccanismo ATP-competitivo. Il farmaco (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO) è un potente e selettivo inibitore di GSK-3 α/β . L'inibizione avviene in modo reversibile tramite competizione con l'ATP (Meijer et al., 2003). Un altro inibitore di interesse farmacologico è N-(4-Methoxybenzyl)-N'-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)urea (ARA014418), anch'esso inibisce GSK-3 in modo competitivo con l'ATP (Bhat et al., 2003). La formula di struttura di questi inibitori è illustrata nella figura 1.10.

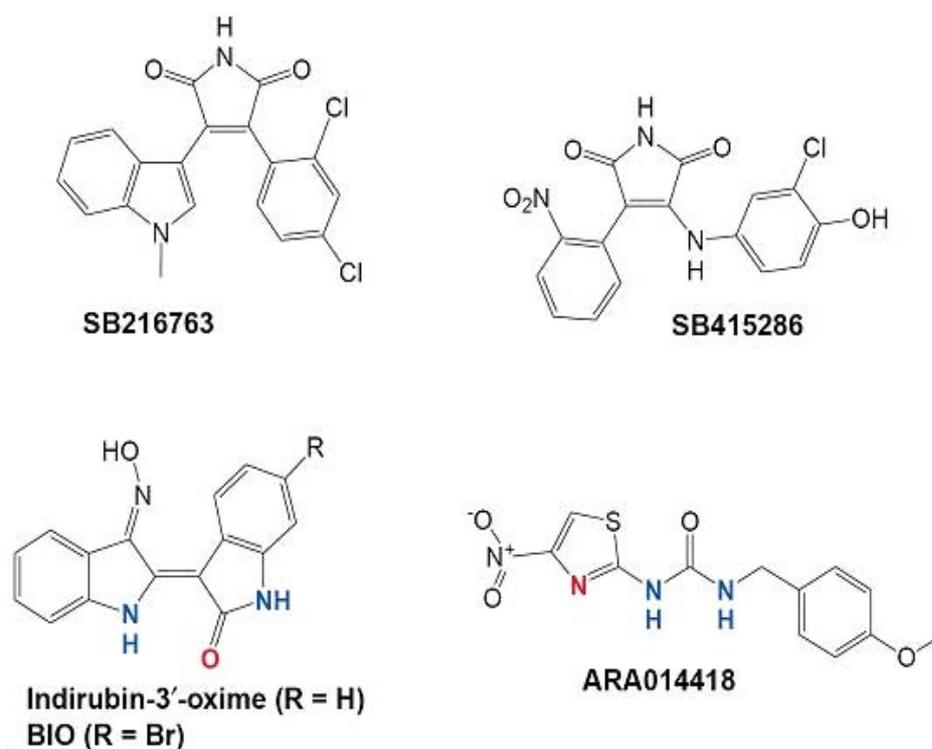


Figura 1.10 Struttura di alcuni inibitori di GSK-3 (Meijer et al., 2004).

1.6.2 L'inibizione di GSK-3 β : un fattore neuroprotettivo

In letteratura, crescenti evidenze dimostrano che GSK-3 β è coinvolto nella patogenesi di malattie del sistema nervoso centrale. GSK-3 β è, infatti, responsabile della regolazione di fattori di trascrizione che possono influenzare la sopravvivenza cellulare attraverso numerosi meccanismi e molecole chiave. In particolare, esiste una correlazione diretta tra l'espressione/attività di GSK-3 β e l'apoptosi.

Alcuni studi (revisionati da Eldar-Finkelman, 2002) hanno dimostrato che un aumento dell'attività di GSK-3 è correlato con un incremento della mortalità neuronale *in vitro* e che l'aumento dell'attività di GSK-3 precede l'apoptosi. Per esempio: l'attivazione di GSK-3 nelle cellule granulose del cervelletto porta a morte cellulare; GSK-3 facilita l'apoptosi indotta dalla staurosporina in cellule umane di neuroblastoma (SH-SY5Y). Inoltre, l'inibizione dell'enzima è neuroprotettiva: il trattamento di colture primarie neuronali con inibitori specifici di GSK-3 β (SB-216763 o SB-415286) protegge dalla morte neuronale indotta da una riduzione dell'attività del fattore di sopravvivenza PI3K (Cross et al., 2001); anche l'inibizione di GSK-3 β con il litio protegge i neuroni dall'apoptosi.

L'attività di GSK-3 β è cruciale per il benessere della cellula e la sua totale mancanza ne provoca la morte. Tuttavia, un'iperattività incontrollata dell'enzima è letale. I neuroni sembrano essere più sensibili di altre cellule all'iperattività di GSK-3 β (Eldar-Finkelman, 2002).

GSK-3 inoltre è una delle principali chinasi coinvolte nella fosforilazione della proteina Tau nella malattia di Alzheimer, processo cruciale che porta alla formazione di aggregati di proteina Tau. Numerose evidenze suggeriscono che GSK-3 interferisca direttamente nella biologia della beta-amiloide (A β), che precede la fosforilazione della proteina Tau nella patogenesi dell'Alzheimer. A β accelera la formazione di aggregati e la fosforilazione della proteina Tau attraverso diversi meccanismi, inclusa l'attivazione di GSK-3 β .

Esami *post mortem* su tessuti cerebrali di pazienti con malattia di Parkinson (PD) hanno evidenziato un'elevata attività di GSK-3 β nello striato (Lei et al., 2011).

È stato dimostrato che GSK-3 β è iperfosforilato in Tyr-126, e quindi iperattivato, in diversi modelli cellulari e animali di neurodegenerazione. In particolare, un aumento patologico di livelli di GSK-3 β fosforilato in Tyr-126 si osserva in corso di ischemia cerebrale (Bath et al., 2000). Inoltre il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che l'inibizione di GSK-3, attivata dalla leptina, protegge neuroni corticali di topo dal danno ischemico *in vitro* (Valerio et al., 2006).

Tutte queste evidenze fanno di GSK-3 β un importante bersaglio farmacologico per il trattamento di malattie neurodegenerative. Dati preclinici indicano che l'inibizione di GSK-3 β potrebbe svolgere una funzione vitale nel trattamento di disordini neurologici (Gould, 2006).

1.6.3 GSK-3 β e PGC-1 α

In un interessante lavoro del 2008, Anderson e colleghi hanno dimostrato una relazione tra GSK-3 β e PGC-1 α , il principale regolatore della mitocondriogenesi. PGC-1 α si trova nel citoplasma e, in condizioni di stress, viene attivato tramite fosforilazione, entra nel nucleo, dove attiva la trascrizione dei suoi geni target. A questo punto, PGC-1 α può essere degradato oppure essere stabilizzato e restare nel nucleo per un tempo più lungo. In seguito, il *pool* citoplasmatico di PGC-1 α viene rinnovato attraverso la trascrizione del gene.

In questo lavoro, Anderson ha dimostrato che GSK-3 β regola la stabilità proteica di PGC-1 α , lo attiva tramite fosforilazione e, quindi, ne controlla la sua degradazione a livello nucleare e il suo turnover. Se lo stimolo di stress è di tipo acuto, GSK-3 β è attivo e fosforila PGC-1 α , che entra nel nucleo e avvia una risposta transiente, poichè viene degradato in breve tempo. Infatti, in presenza di inibitori di GSK-3 β , PGC-1 α si accumula nel nucleo. Nel caso invece di uno stimolo cronico, GSK-3 β viene fosforilato, e quindi inibito, e PGC-1 α viene stabilizzato a livello nucleare attivando una risposta prolungata (Anderson et al., 2008). A sostegno di questo lavoro, Piantadosi e colleghi nel 2008 hanno dimostrato che l'inibizione di GSK-3 β si accompagna ad un aumento dei livelli cellulari di NRF-1, uno dei partner trascrizionali di PGC-1 α (Piantadosi et al., 2008). GSK-3 β può quindi essere un importante regolatore del processo di mitocondriogenesi in condizioni di stress.

2. SCOPO DEL LAVORO

La produzione energetica delle cellule neuronali dipende strettamente dalla produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa mitocondriale. Durante l'ischemia cerebrale si sviluppano numerosi meccanismi responsabili di uno scompenso bioenergetico mitocondriale che si accompagna a una grave deplezione di ATP e alla successiva morte neuronale (Soane et al., 2007). In caso di lesione, i neuroni innescano risposte endogene con finalità rigenerative. In particolare, processi di mitocondriogenesi adattativa sono stati descritti in modelli animali di ipossia cerebrale (Gutsaeva et al., 2008) e danno cerebrale da ipossia/ischemia neonatale (Yin et al., 2008). Tuttavia, in modelli di ischemia focale prolungata, è stata descritta una perdita permanente del contenuto di DNA mitocondriale, indicativa del fallimento del meccanismo di compenso mitocondriale (Chen et al., 2001).

L'ischemia causa alterazioni mitocondriali che, insieme alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), sono tra i meccanismi chiave del danno neuronale (Galluzzi et al., 2009). Dati in letteratura suggeriscono che la biogenesi di nuovi mitocondri funzionali, favorendo la funzionalità della catena respiratoria, possa portare a una riduzione della produzione di ROS (Guarente, 2008). È possibile ipotizzare che meccanismi che attivano la mitocondriogenesi possano limitare gli effetti deleteri dell'ischemia anche tramite la riduzione del danno ossidativo cerebrale.

In seguito a numerose evidenze sul ruolo protettivo di inibitori di GSK-3 β in corso di ischemia miocardica, (Tong et al., 2002; Juhaszova et al., 2009), diversi gruppi di ricerca hanno considerato l'enzima glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK-3), e in particolar modo la sua isoforma GSK-3 β , un possibile bersaglio per la terapia dell'ischemia cerebrale (Koh et al., 2008; Cowper-Smith et al., 2008).

In questo contesto, sono di notevole interesse i dati pubblicati dal nostro gruppo di ricerca che dimostrano il ruolo neuroprotettivo della leptina in modelli di ischemia cerebrale in vitro e in vivo (Valerio et al. 2009). La leptina, ormone con diverse attività neuroendocrine, è in grado di ridurre l'entità della lesione ischemica attraverso l'attivazione di diversi pathway intracellulari (MEK, PI3K e PKC) che convergono nella inattivazione di GSK-3 β , tramite la sua fosforilazione in Ser-9.

Dati recenti hanno evidenziato un'affascinante relazione tra GSK-3 β e la biologia mitocondriale; in particolare, l'attivazione dell'enzima induce la degradazione proteasomica di PGC-1 α

(coattivatore trascrizionale che regola in modo coordinato l'intero programma mitocondriogenetico) (Anderson e Prolla, 2009). Allo stesso modo, l'inibizione di GSK-3 β si accompagna alla stabilizzazione di PGC-1 α e a un aumento dei suoi livelli nelle colture primarie di neuroni (Olson et al., 2008). In piú, l'inattivazione di GSK-3 β aumenta il contenuto cellulare di NRF-1 (*nuclear respiratory factor-1*) (Piantadosi et al., 2008), un partner trascrizionale di PGC-1 α implicato nell'espressione dei geni richiesti per la funzione respiratoria mitocondriale.

Nel loro insieme, queste osservazioni ci hanno spinto ad investigare il possibile ruolo neuroprotettivo dell'inibizione di GSK-3 β nei confronti dell'ischemia cerebrale, focalizzandoci in particolare sulla regolazione della mitocondriogenesi e della produzione di ROS. Abbiamo pianificato il nostro lavoro prevedendo l'utilizzo di validati modelli di ischemia cerebrale *in vitro* e *in vivo*.

I nostri studi *in vitro* hanno perseguito i seguenti obiettivi:

- a) valutare come l'inibizione di GSK-3 β influenza i diversi indicatori di mitocondriogenesi nei neuroni corticali di topo e in cellule di neuroblastoma murino Neuro2A;
- b) verificare se l'inibizione di GSK-3 β sia in grado di esercitare un effetto protettivo sulle cellule neuronali ischemiche;
- c) investigare se l'inibizione di GSK-3 β sia in grado di ripristinare la mitocondriogenesi compromessa durante l'ischemia neuronale;
- d) stabilire se il trattamento con inibitori di GSK-3 β attivi una risposta antiossidante e riduca la produzione di ROS nei neuroni ischemici.

Ci siamo proposti quindi di esaminare gli effetti di un farmaco inibitore di GSK-3 β sull'esito dell'infarto cerebrale nel topo *in vivo*.

Infine, abbiamo avviato ricerche al fine di identificare altri possibili composti mitocondriogenetici, capaci di esercitare effetti neuroprotettivi in corso di ischemia cerebrale. In considerazione degli effetti CR-mimetici delle sirtuine, abbiamo testato alcuni attivatori farmacologici di Sirt1.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture neuronali

L'allestimento delle colture primarie di neuroni corticali è stato eseguito come originalmente descritto da Brewel et al (Brewel et al. 1993) con alcune lievi modifiche apportate nel nostro laboratorio (Valerio et al., 2009). Le cortecce cerebrali sono state isolate da cervelli di embrioni di topi CD1 (Charles River Breeding Laboratories, Calco, Italia) allo stadio embrionale di 15 giorni. Le cortecce venivano poi riunite e dissociate meccanicamente fino ad una sospensione a singola cellula, quindi centrifugate a 200 X g per 5 minuti e piastrate su petri o vetrini precedentemente trattati con poly-D-lisina (Sigma-Aldrich) ad una densità di 2,5-7,5 X 10⁴ cellule/cm². Il terreno di coltura utilizzato è composto da Neurobasal medium (Invitrogen) a cui sono stati aggiunti il 2% di B27 (Invitrogen), glutammina 500 µM (Euroclone), penicillina 100 unità/ml e streptomina 100 µg/ml (Euroclone) (N- B27). I neuroni venivano lasciati differenziare sino a 12 giorni *in vitro* (*days in vitro*, DIV).

Le cellule di neuroblastoma murino Neuro2A (American Type Culture Collection) venivano tenute in coltura in DMEM (Euroclone) contenente 10% di siero bovino fetale (Euroclone), glutammina 2mM (Euroclone), penicillina 100 unità/ml e streptomina 100 µg/ml (Euroclone).

Le cellule sono state trattate con SB216763 (Tocris, Avonmouth, UK), 6-Bromindirubin-30-oxime (BIO, Calbiochem, San Diego, CA), AR-A014418 (Calbiochem), rotenone, CCCP, antimicina A (Sigma-Aldrich) come indicato nella sezione Risultati.

3.2 Plasmidi e Trasfezioni

I mutanti *dominant negative* di GSK-3β, pEGFP-GSK-3β-K85R e pEGFP-GSK-3β-R96A (Liang e Chuang, 2006), sono stati gentilmente forniti dal Dr De-Maw Chuang. Le cellule Neuro2A sono state trasfettate per 48 ore sia con plasmidi contenenti i mutanti di GSK-3β che con il vettore vuoto pEGFP-C1 (Clontech) usando il LipofectamineTM LTX e Plus Reagent (Invitrogen).

3.3 Deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) in vitro

La deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) è un modello in vitro di ischemia ampiamente riconosciuto (Grabb e Choi, 1999) ed in uso nel nostro laboratorio (Valerio et al., 2009). Per l'esperimento di OGD, neuroni corticali primari, mantenuti in coltura per 11-13 giorni, sono stati trasferiti in una soluzione salina bilanciata priva di glucosio (BSS; 116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 1,1 mM NaH₂PO₄, 26,2 mM NaHCO₃, 1,8 mM CaCl₂), precedentemente

saturata con una miscela gassosa composta da 95% N₂ e 5% CO₂ e scaldata a 37°C. Le cellule sono state quindi poste in una camera anaerobica insufflata per 10 minuti con 95% N₂ e 5% CO₂ e sono state poi incubate a 37°C per 3 ore. La concentrazione di ossigeno durante il periodo di OGD era inferiore allo 0,4%, come misurato tramite un ossimetro (Servomex 580A).

Nel frattempo, i corrispondenti neuroni di controllo sono stati trasferiti in BSS contenente 5,5 mM glucosio, saturata in precedenza con 95% O₂/5% CO₂ e riscaldata a 37°C, incubata quindi a 37°C per 3 ore in condizioni normossiche. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state utilizzate per la preparazione di estratti proteici o mantenute per 24 ore in terreno di recupero contenente 0,4% B-27 in condizioni normossiche.

3.4 Valutazione della lesione ischemica in vitro

Il danno neuronale secondario a OGD è stato valutato attraverso la misurazione della quantità di lattato deidrogenasi (LDH) rilasciata nel terreno di coltura nelle 24 ore seguenti l'esposizione a OGD, utilizzando CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Il dosaggio dell'LDH è stato effettuato in doppio su esperimenti di OGD svolti in triplo in almeno tre differenti colture cellulari.

3.5 Western Blot

Gli estratti proteici sono stati ottenuti da neuroni corticali o da Neuro2A come descritto in precedenza (Valerio et al., 2006). In breve: le cellule sono state lavate in PBS e lisate in presenza di una miscela di inibitori delle proteasi (Sigma Aldrich) e di 1 mM NaVO₄ e 10 mM NaF per inibire le fosfatasi. La sospensione cellulare è stata sonicata 20 sec e centrifugata a 10,000 x g per 20 min a 4 °C. Il surnatante è stato isolato e la concentrazione proteica degli estratti è stata determinata utilizzando il BCA Protein Assay Reagent (Pierce).

Un uguale quantitativo proteico è stato caricato per la corsa elettroforetica su Gel Pre-Cast 4-12% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen). Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su membrane di PVDF (Amersham Biosciences).

Le membrane sono state incubate overnight a 4°C con i seguenti anticorpi:

- Anti-PGC-1 α (Cell Signalling) 1:1000
- Anti-NRF1 (Rockland) 1:1000
- Anti-COX IV (Molecular Probes) 1:1000
- Anti-Cyt C (BD Pharmingen) 1:1000

-Anti-GAPDH (Chemicon) 1:1000

-Anti-Actina (Sigma) 1:10000

Dopo i lavaggi, le membrane sono state incubate con gli anticorpi secondari coniugati a HRP (Amersham Biosciences) e il segnale è stato rilevato tramite il kit di ECL Plus (Amersham Biosciences). L'intensità delle bande è stata quantificata densitometricamente usando il software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics) ed è stata calcolata mediando i valori di almeno tre esperimenti eseguiti con campioni provenienti da preparazioni cellulari diverse.

3.6 Analisi del DNA mitocondriale

Il numero di copie del DNA mitocondriale è stato misurato attraverso la PCR quantitativa come descritto in precedenza (Tedesco et al., 2008). Il DNA totale è stato estratto dalle cellule neuronali o dal tessuto cerebrale utilizzando il kit QIAamp DNA (Qiagen) seguendo la procedura indicata dal produttore. Il mtDNA è stato amplificato usando primer specifici per il gene mitocondriale citocromo B (Cyt B) e poi normalizzato sul DNA genomico amplificando il gene nucleare della fosfoproteina ribosomiale P0 (Arbp/36B4).

I primers impiegati erano i seguenti:

Cyt B

Sense 5'-CTTCGCTTTCCACTTCA TCTT ACC-3'

Antisense 5'-TTGGGTTGTTTGA TCCTGTTTCG-3'

36B4

Sense 5'-AGGA T A TGGGA TTCGGTCTCTTC-3'

Antisense 5'-TCATCCTGCTTAAGTGAACAAACT-3'

3.7 Attività della citrato sintasi

L'attività della citrato sintasi è stata misurata da estratti cellulari totali ai quali è stato aggiunto un buffer contenente 0.1 mM acido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico, 0.5 mM ossalacetato, 50µM EDTA, 0.31 mM acetil CoA, 5mM idrocloridio trietanolamina e 0.1 M Tris-HCl pH 8.1 (Tedesco et al., 2008). L'attività enzimatica è stata calcolata tramite la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm e alla temperatura di 30°C ed espressa in nmol di citrato prodotte/min/mg di proteine.

3.8 Analisi dell'espressione genica

L'RNA totale veniva estratto dalle cellule utilizzando il kit RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen) come indicato dal produttore. Dopo trattamento con DNAsi, 1 µg di RNA veniva retrotrascritto tramite il kit iScript™ cDNA Synthesis kit (Biorad Laboratories): all'RNA erano aggiunti, per un volume finale di 20 µl, 4 µl di 5X Reaction mix (contenente gli oligo dT, esameri random e i dNTPs), 1 µl di soluzione contenente la retrotrascrittasi (iScript Reverse Transcriptase) e acqua priva di nucleasi. Il protocollo termico consisteva in: 5 min a 25°C; 30 min a 42°C; 5 min a 85°C. Gli esperimenti di PCR quantitativa sono stati eseguiti utilizzando iCycler iQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad), per ogni reazione si impiegavano 2 µl di cDNA in un volume finale di 25 µl. La miscela di reazione prevedeva, oltre al cDNA, i primer (0,4 µM) e l'iQ SyberGreen SuperMix (Bio-Rad), contenente la sonda intercalante iQ SyberGreen per monitorare l'andamento dell'amplificazione. I primers sono stati disegnati utilizzando il software Beacon Designer 4.0 (Premier Biosoft International). Il profilo termico usato era composto da uno step iniziale di 95°C per 15 min seguito da 40 cicli di 10 sec a 95°C (step di denaturazione) e 30 sec a 60°C (step di annealing).

Le reazioni erano condotte in triplo e i nostri risultati erano calcolati come descritto in precedenza (Nisoli et al., 2005). La media dei cicli soglia del gene di interesse (CT) era confrontata con quella ottenuta per il gene *housekeeping* 36B4, ottenendo quindi il valore ΔCT . Il livello relativo di espressione genica era espresso come $2^{-\Delta\Delta CT}$, dove $\Delta\Delta CT$ è la differenza fra il ΔCT del controllo e quello del trattato.

I primers che venivano utilizzati erano i seguenti:

PGC-1 α

Sense 5'-ACTATGAATCAAGCCACTACAGAC-3'

Antisense 5'-TTCA TCCCTCTTGAGCCTTTCG-3'

Nrf-1

Sense 5'-ACAGATAGTCCTGTCTGGGGAAA-3'

Antisense 5'-TGGTACATGCTCACAGGGATCT-3'

Tfam

Sense 5'-AAGACCTCGTTCAGCATATAACATT-3'

Antisense 5'-TTTTCCAAGCCTCATTTACAAGC-3'

Cyt c

Sense 5'-ATAGGGGCATGTCACCTCAAAC-3'

Antisense 5'-GTGGTTAGCCATGACCTGAAAG-3'

Cox IV

Sense 5'-GTGGTTAGCCATGACCTGAAAG-3'

Antisense 5'-TT AGCA TGGACCA TTGGA T ACGG-3'

SOD1

Sense 5'-GGCTTCTCGTCTTGCTCTC-3'

Antisense 5'-AACTGGTTCACCGCTTGC-3'

SOD2

Sense 5'-GCCTCCCAGACCTGCCTT AC-3'

Antisense 5'-GTGGT ACTTCTCCTCGGTGGCG-3'

Catalase

Sense 5'-CACTGACGAGA TGGCACACTTTG-3'

Antisense 5'-TGGAGAACCGAACGGCAATAGG-3'

36B4

Sense 5'-AGGA T A TGGGA TTCGGTCTCTTC-3'

Antisense 5'-TCATCCTGCTTAAGTGAACAAACT-3'

3.9 Analisi della produzione mitocondriale di superossido

Per misurare la produzione mitocondriale di superossido nei neuroni corticali sottoposti a OGD, il marcatore MitoSOXTM Red (Invitrogen) è stato aggiunto alle cellule vive alla fine del periodo di recupero ad una concentrazione di 2 μ M, in accordo con quanto indicato dal produttore. Le cellule venivano incubate con MitoSOX Red per 10 minuti, lavate due volte con HBSS contenente calcio e magnesio, fissate, contromarcate con Hoechst 33258 (Invitrogen), colorante fluorescente che lega il DNA, e montate su vetrino porta-oggetto con il FluorSave (Calbiochem). Le immagini sono state acquisite utilizzando il microscopio confocale ZEISS LSM 510 META e l'intensità di fluorescenza è stata analizzata con il software LSM 5, versione 3.5 (Carl Zeiss). I valori ottenuti sono il risultato medio di due esperimenti eseguiti in doppio.

3.10 Procedura chirurgica di occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO)

L'occlusione permanente dell'arteria cerebrale media (MCAO) è stata operata in topi CD1 seguendo una metodica descritta da Storini et al. (Storini et al., 2006). Gli animali sono stati anestetizzati (induzione con 5% isoflurano in N₂O/O₂ (70/30%) e mantenimento con 1.5% isoflurano nella stessa miscela). È stata effettuata un'incisione verticale di 1 cm nello scalpo, il

muscolo temporale è stato sezionato, quindi è stato praticato un foro di 2 mm a livello della giunzione tra l'arcata zigomatica e l'osso squamoso. La porzione distale dell'arteria cerebrale media è stata esposta e occlusa in modo permanente tramite elettrocoagulazione. La temperatura intraoperatoria è stata mantenuta a $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. 48 ore (per l'analisi del mtDNA) o 7 giorni (per la quantificazione del volume dell'infarto) dopo la pMCAO, i topi sono stati anestetizzati con equitensin (120 μl /topo i.p.) e sacrificati. I loro cervelli sono stati immediatamente congelati tramite immersione in isopentano a -45°C per 3 min e chiusi in vials per la conservazione a -70°C sino al momento dell'utilizzo.

3.11 Quantificazione del volume dell'infarto cerebrale

La misurazione dell'infarto è stata condotta su sezioni coronali ottenute al criostato (40 μm) in modo seriale alla distanza di 320 μm e colorate con neutral red (Neutral Red Gurr Certistain, BDH). Su ogni fetta, l'area dell'infarto, dall'apparenza pallida, è stata delineata in cieco su uno schermo. L'area infartuata è stata determinata sottraendo dall'area totale dell'emisfero controlaterale l'area del tessuto sano dell'emisfero ipsilaterale, come descritto da Storini et al. (2006). Il volume dell'infarto è stato calcolato tramite l'integrazione delle aree ischemiche attraverso un analizzatore di immagini ed il software Analytical Image System (Imaging Research Inc., Brock University, St. Catharines, Ontario, Canada).

3.12 Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati con un t test a due code o con test ANOVA ad una via seguito dal test post hoc di Bonferroni, per le comparazioni multiple. I dati sono presentati come medie \pm errore standard (SE). Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software GraphPad Prism, versione 4.0 (GraphPad Software).

4. RISULTATI

4.1 L'inattivazione di GSK-3 promuove la mitocondriogenesi nei neuroni

L'enzima GSK-3 è una chinasi serina/treonina presente in due diverse isoforme, α e β , con proprietà funzionali simili, ma non completamente sovrapponibili. Per valutare il possibile ruolo dell'inibizione di GSK-3 sulla regolazione della mitocondriogenesi, abbiamo studiato la modulazione di una serie di indicatori della cascata mitocondriogenetica in colture di neuroni corticali murini trattati con la molecola SB216763, un potente inibitore selettivo per il sito di legame dell'ATP comune a entrambe le isoforme di GSK-3 α e β (Coghlan et al., 2000).

Abbiamo osservato che il trattamento con SB216763 1 μ M (per 6 o 24 ore) causa un aumento dei livelli di mRNA di NRF-1 e Tfam senza influenzare i livelli di PGC-1 α . Con lo stesso trattamento, aumenta anche l'espressione della citocromo ossidasi IV (COX IV) e del citocromo C (Cyt C), due componenti essenziali della catena respiratoria mitocondriale (Figura 4.1).

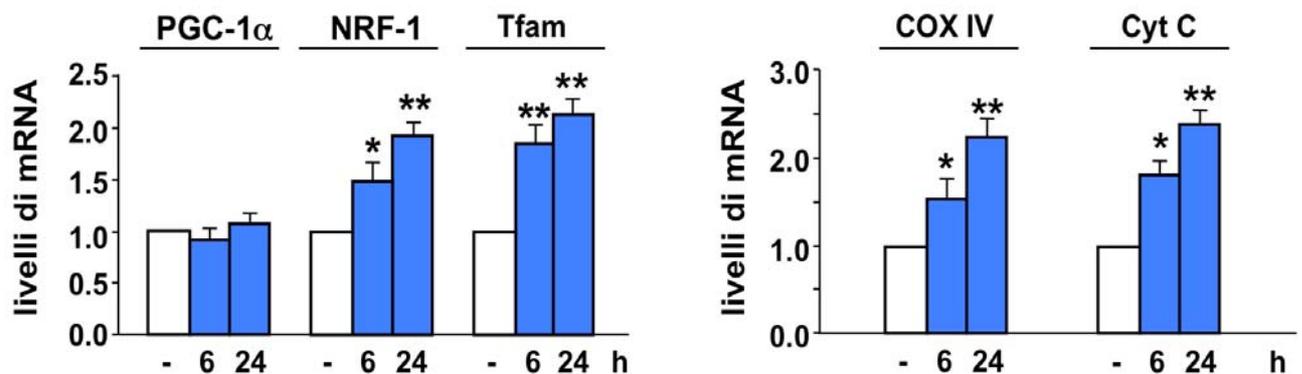


Figura 4.1 L'SB216763 modula i livelli di mRNA dei marker della mitocondriogenesi.

I livelli di trascrizione dei marker della mitocondriogenesi sono stati misurati con RT-PCR quantitativa in colture di neuroni corticali murini: i valori ottenuti nei campioni trattati con SB216763 per 6 e 24 ore (colonne blu) sono stati espressi in relazione ai valori dei neuroni controllo non trattati (colonne bianche). *p < 0.05 e **p < 0.01 vs controlli.

Abbiamo poi misurato i livelli dell'espressione proteica dei diversi marker della mitocondriogenesi. L'inibizione di GSK-3 con SB216763 (1 μ M) aumenta i livelli proteici di PGC-1 α : l'incremento della proteina nei neuroni corticali di topo è già statisticamente significativo dopo 6 ore di trattamento con SB216763 e permane per almeno 48 ore. Questo risultato è in accordo con l'osservazione che l'inibizione di GSK-3 interferisce con il turnover di PGC-1 α (Anderson e Prolla, 2009). In modo parallelo SB216763 induce un aumento anche nei livelli proteici di NRF-1, COX IV e Cyt C (Figura 4.2).

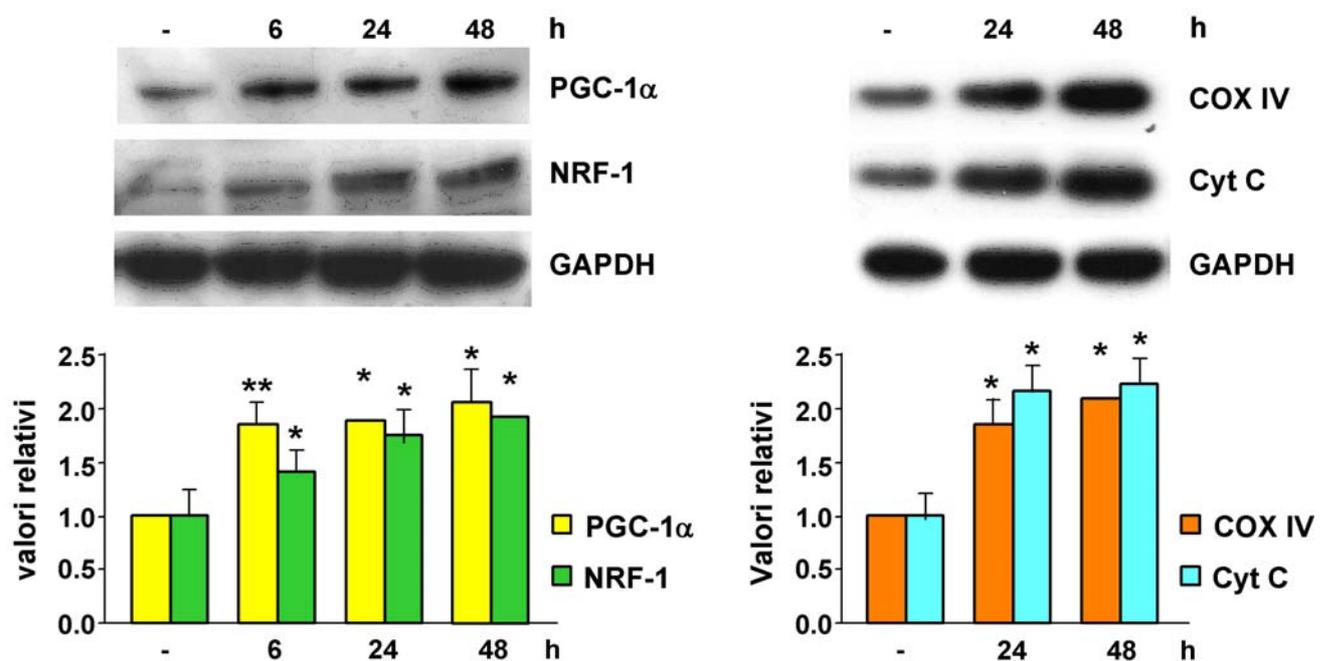


Figura 4.2 L'SB216763 induce i livelli proteici dei marker della mitocondriogenesi

I livelli di espressione proteica di PGC-1 α , NRF-1, COX IV e Cyt C sono stati valutati tramite Western blot, in neuroni corticali di topo trattati con SB216763 per diversi tempi (6, 24 e 48 ore). Pannello superiore: immagini di blot da esperimenti rappresentativi; pannello inferiore: grafico della quantificazione densitometrica dei blot (tre preparazioni diverse di neuroni corticali; le proteine di interesse sono state normalizzate su GAPDH). *p < 0.05 e **p < 0.01 vs controlli.

Per valutare altri indicatori della mitocondriogenesi nelle colture di neuroni corticali murini trattate con SB216763 abbiamo misurato la quantità di mtDNA (marker del contenuto mitocondriale) e l'attività dell'enzima citrato sintasi (marker della massa e della funzione mitocondriale).

Nei neuroni trattati con SB216763 1 μ M il contenuto di mtDNA è aumentato in modo statisticamente significativo rispetto ai neuroni controllo non trattati.

Il trattamento con SB216763 1 μ M incrementa anche l'attività della citrato sintasi nei neuroni corticali (Figura 4.3).

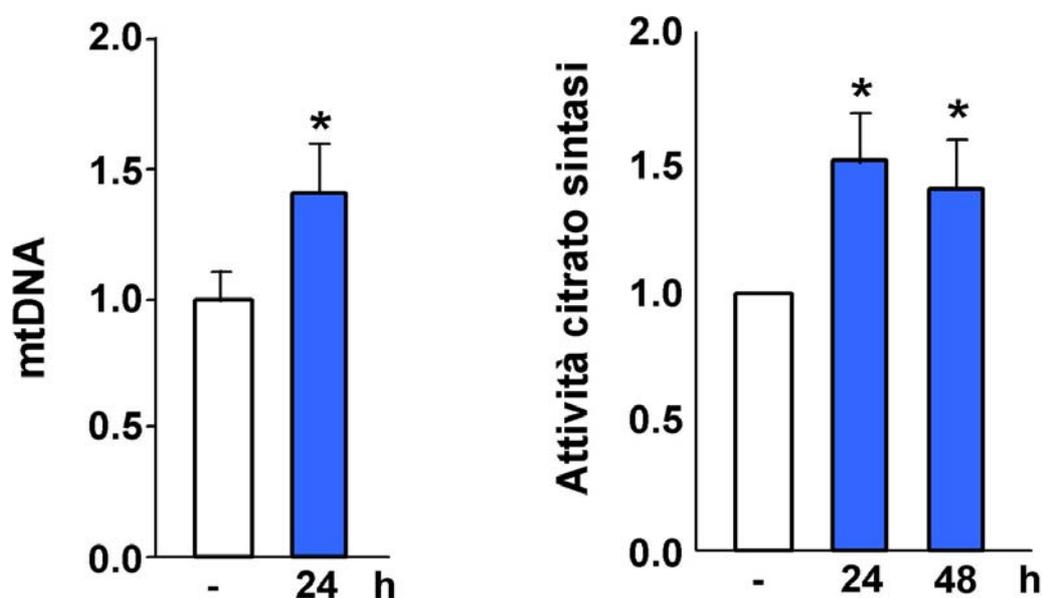


Figura 4.3 Effetti del trattamento con SB sui livelli del mtDNA e sull'attività dell'enzima citrato sintasi

La quantità di mtDNA è stata misurata attraverso la PCR quantitativa 24 ore dopo il trattamento con SB216763 (colonna blu) ed espressa come numero di copie di mtDNA in rapporto al numero di copie del DNA nucleare comparandola con i valori delle cellule non trattate. Il diagramma esprime la media di tre esperimenti.

L'attività della citrato sintasi è stata misurata in neuroni corticali di topo dopo 24 o 48 ore di trattamento con SB216763 (colonne blu) ed espressa come valori relativi rispetto all'attività misurata nelle cellule di controllo (colonna bianca). * $p < 0.05$ vs controlli.

Per studiare il ruolo dell'inibizione specifica dell'isoforma GSK-3 β sulla modulazione dei marker di mitocondriogenesi nelle cellule neuronali, abbiamo trasfettato cellule di neuroblastoma murino (Neuro2A) con mutanti *dominant-negative* specifici per GSK-3 β : GSK-3 β -K85R e GSK-3 β -R96A (Liang e Chuang, 2006). I livelli proteici di PGC-1 α , NRF-1 e COX IV sono significativamente aumentati in cellule Neuro2A trasfettate con GSK-3 β : GSK-3 β -K85R e GSK-3 β -R96A per 48 ore (Figura 4.4).

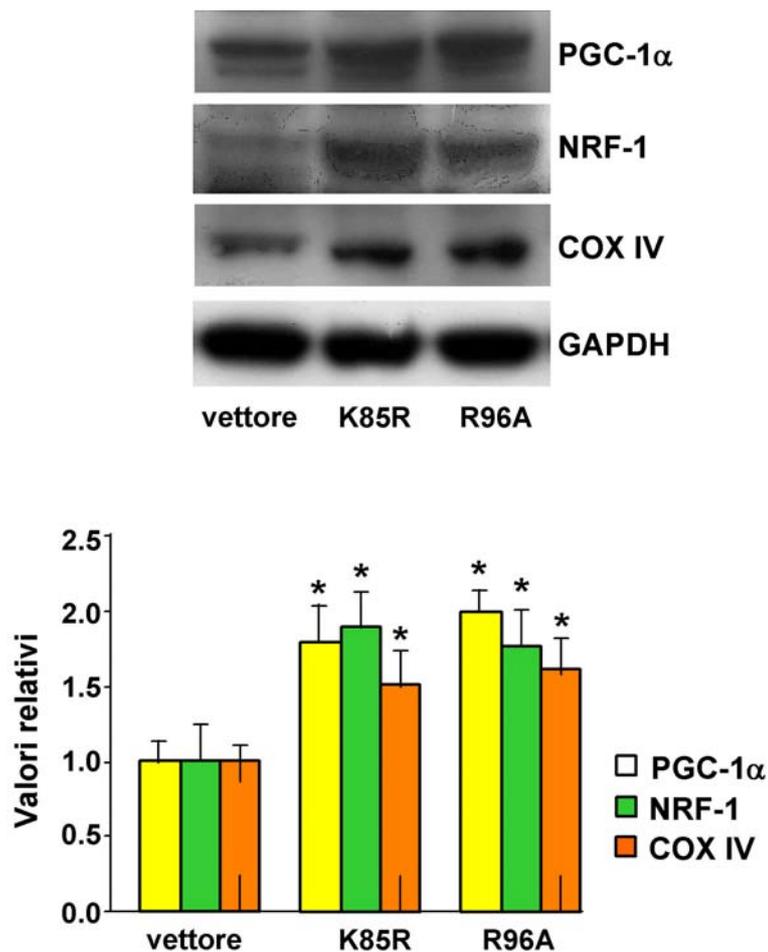


Figura 4.4 Effetto dei mutanti *dominant-negative* di GSK-3 β sulla mitocondriogenesi

I livelli di espressione proteica di PGC-1 α , NRF-1 e COX IV sono stati valutati tramite Western blot in estratti proteici di Neuro2A trasfettate con GSK-3 β -K85R e GSK-3 β -R96A per 48 ore. Pannello superiore: immagini di blot da esperimenti rappresentativi; pannello inferiore: grafico della quantificazione densitometrica dei blot (le proteine di interesse sono state normalizzate su GAPDH). *p < 0.05 vs le cellule trasfettate con il vettore vuoto.

4.2 L'inibizione di GSK-3 β protegge i neuroni corticali dal danno ischemico in vitro

La lesione ischemica che segue l'occlusione di un vaso è scatenata dalla riduzione dell'apporto di ossigeno e glucosio alle cellule. Un validato modello di ischemia cerebrale *in vitro* consiste nel sottoporre i neuroni alla deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) (Grabb e Choi, 1999). L'effetto di diverse dosi di SB216763 sull'OGD in vitro è stato testato in colture primarie di neuroni corticali di topo. Il rilascio di LDH nel terreno di coltura è stato misurato come indice di morte neuronale.

Abbiamo osservato che i livelli di LDH rilasciati nel terreno di coltura dai neuroni corticali, dopo 3 ore di OGD seguite da 24 ore di recupero, aumentano di tre volte se comparati con quelli di neuroni corticali di controllo non esposti a OGD (Figura 4.5).

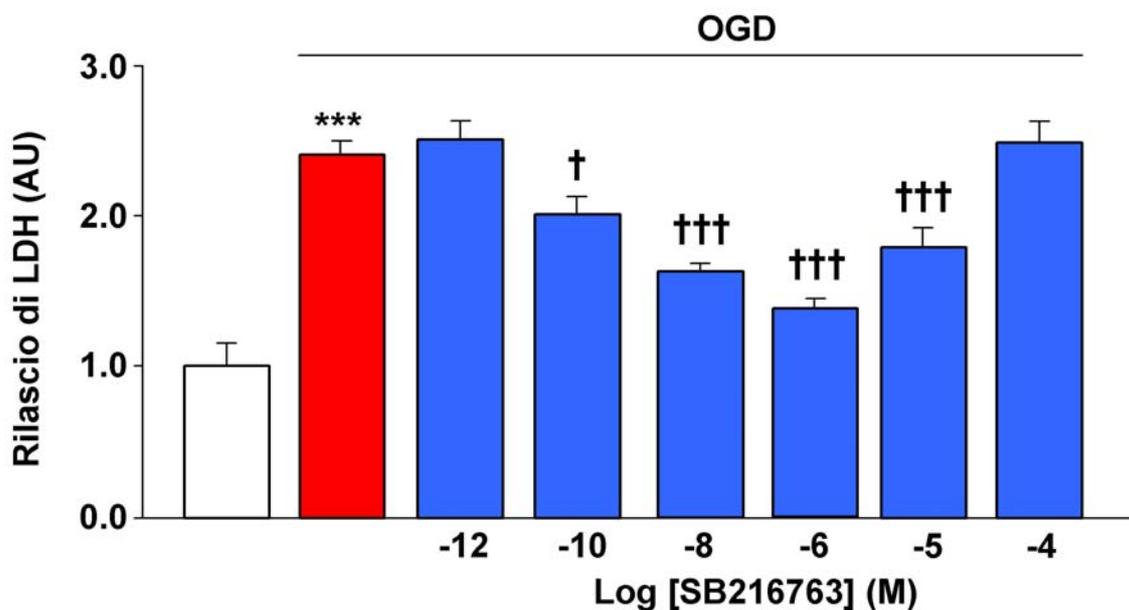


Figura 4.5 Neuroprotezione dose-dipendente da SB216763 in corso di OGD

Neuroni corticali di topo sono stati esposti per 3 ore a OGD e quindi lasciati recuperare 24 ore in terreno di coltura in condizioni normossiche. I neuroni di controllo (colonna bianca) sono stati incubati per 3 ore in una soluzione salina contenente glucosio in condizioni normossiche, poi posti in terreno di coltura per 24 ore di recupero. Dove indicato, i neuroni sono stati pretrattati con SB216763 (0.1-10 μ M) per 15 minuti e incubati in presenza di SB216763 durante tutto il

tempo di OGD e di recupero. La morte neuronale è stata determinata dal rilascio di LDH. $***p < 0.001$ vs i valori di controllo. $†p < 0.05$, $††p < 0.01$ e $†††p < 0.001$ vs i valori di OGD.

Per valutare se l'SB216763 si comporta da fattore di sopravvivenza in condizioni ischemiche, è stato somministrato alle colture neuronali 15 minuti prima dell'OGD e mantenuto durante l'OGD e nelle 24 ore di recupero. La morte neuronale indotta da OGD si riduce in modo dose-dipendente in seguito a trattamento con SB216763 (0.1 nM-10 μ M), con un'inibizione massima a 1 μ M (Figura 4.5).

L'efficacia dell'SB216763 si manifesta anche in assenza di pretrattamento durante l'ischemia *in vitro*. Infatti, abbiamo osservato che l'SB216763, alla dose di 1 μ M, protegge le cellule neuronali dal danno indotto tramite OGD anche se somministrato all'inizio o alla fine del periodo ischemico (Figura 4.6).

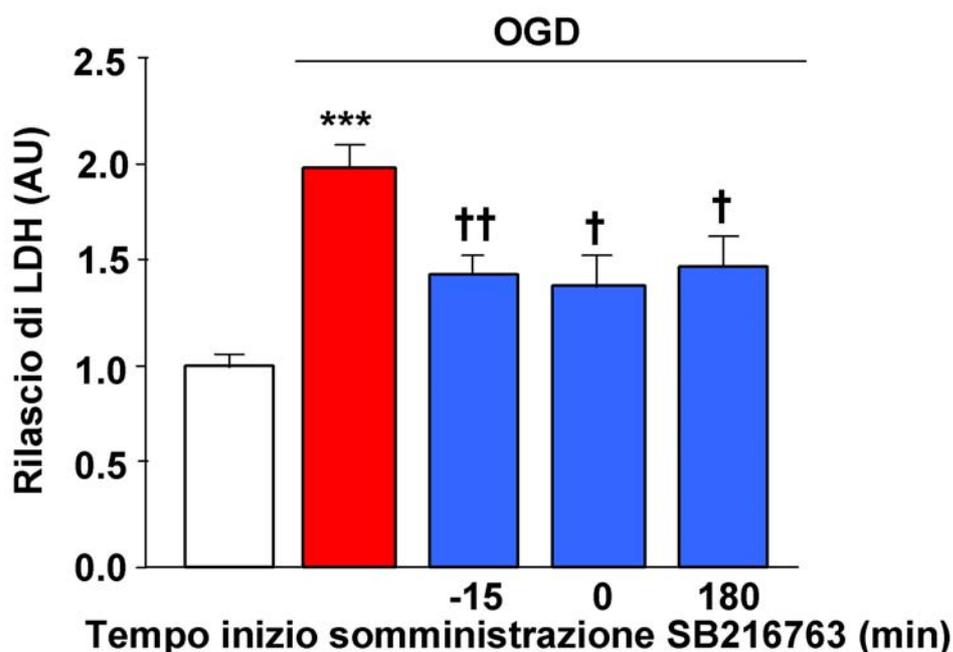


Figura 4.6 Effetto della somministrazione ritardata di SB216763 sul rilascio di LDH indotto da OGD.

L'esperimento di OGD è stato condotto come in figura 4.5. L'inizio dell'OGD è stato considerato come tempo 0. L'omissione di SB216763 nei 15 minuti di preincubazione (tempo d'inizio, 0) o durante la preincubazione e l'OGD (tempo d'inizio, 180), risulta comunque in una significativa protezione. $***p < 0.001$ vs i valori di controllo. $†p < 0.05$ e $††p < 0.01$ vs i valori di OGD.

Abbiamo poi pensato di verificare se altri noti inibitori selettivi di GSK-3 fossero in grado di svolgere un'azione neuroprotettiva sui neuroni corticali esposti a OGD. Il trattamento con AR-A014418 (0.5 μ M) (Bhat et al., 2003) e con BIO (0.2 μ) (Meijer et al., 2003) previene la morte neuronale in corso di OGD (Figura 4.7).

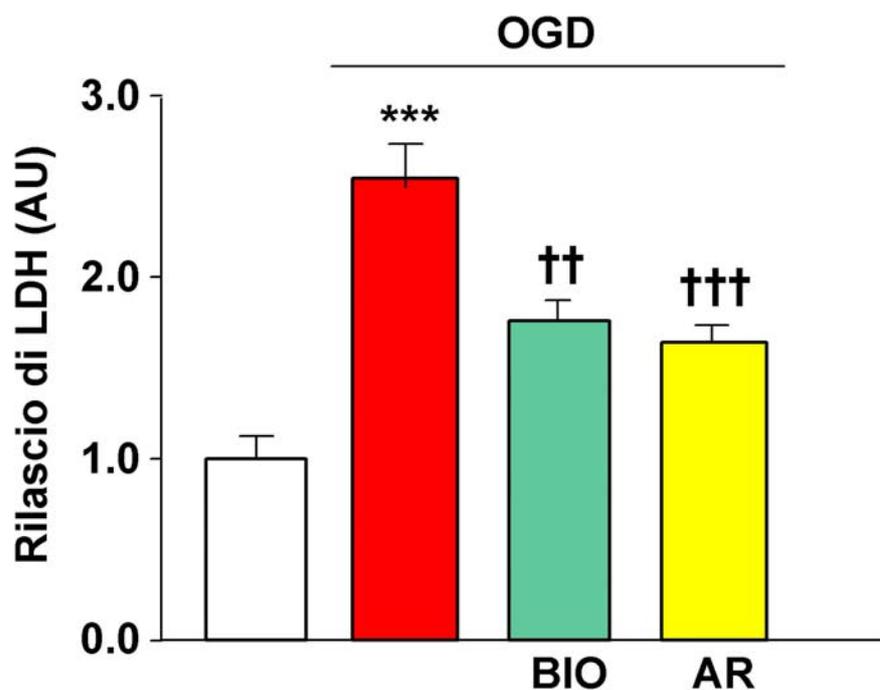


Figura 4.7. Diversi inibitori di GSK3 proteggono i neuroni dall'apoptosi durante OGD.

I neuroni sono stati esposti a AR (0,5 μ M) o BIO (0,2 μ M) nelle stesse condizioni descritte nella figura 4.5 per l'SB216763, durante l'OGD. ***, $p < 0.001$ vs i valori di controllo. †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ vs i valori di OGD.

Abbiamo in seguito voluto indagare l'effettivo ruolo svolto dalla subunità β di GSK-3 nell'effetto neuroprotettivo osservato con i trattamenti farmacologici. A tale scopo abbiamo sottoposto a OGD cellule Neuro2A precedentemente trasfettate con i mutanti *dominant-negative* specifici per GSK-3 β . L'inibizione dell'attività di GSK-3 β mediante la trasfezione con GSK-3 β -K85R o GSK-3 β -R96A ha ridotto significativamente la morte delle cellule Neuro2A sottoposte a OGD (Figura 4.8).

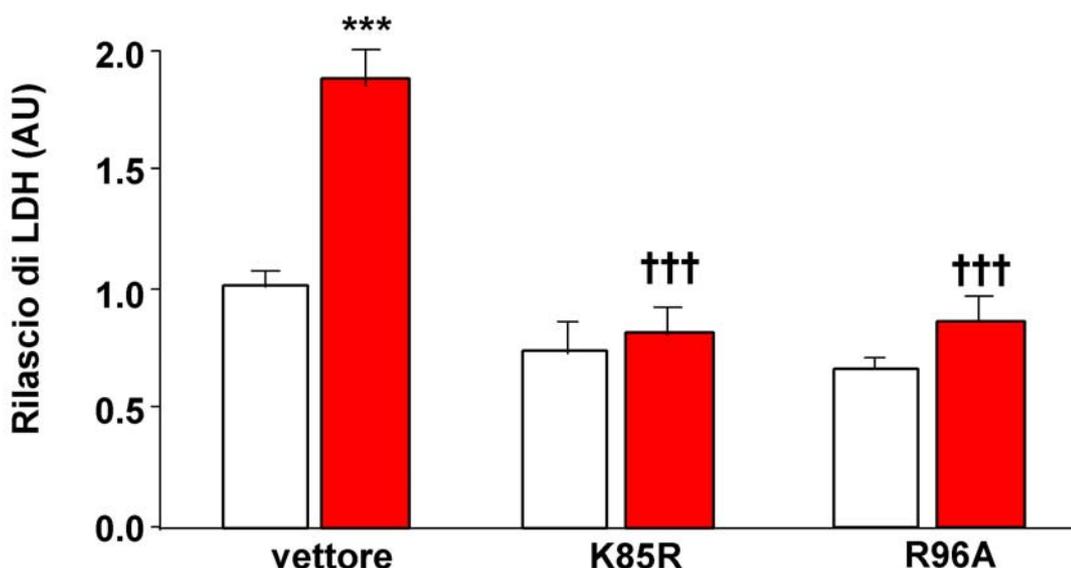


Figura 4.8 Effetto neuroprotettivo della trasfezione di mutanti *dominant-negative* di GSK-3 β in cellule Neuro2A sottoposte a OGD

Cellule Neuro2A, dopo 48 ore di trasfezione, sono state esposte per 4 ore a OGD e quindi lasciate recuperare 24 ore in terreno di coltura in condizioni normossiche (colonne rosse). Le cellule di controllo (colonne bianche) sono state incubate per 4 ore in una soluzione salina contenente glucosio in condizioni normossiche, poi poste in terreno di coltura per 24 ore di recupero. La morte neuronale è stata determinata dal rilascio di LDH. *** $p < 0.001$ vs i valori di controllo. ††† $p < 0.001$ vs i valori di OGD.

4.3 L'inibizione di GSK-3 ripristina la mitocondriogenesi durante l'OGD

Durante l'ischemia cerebrale si verifica uno scompenso bioenergetico mitocondriale, con grave deplezione di ATP che conduce alla morte neuronale (Soane et al., 2007). Un'efficace capacità di rinnovamento mitocondriale potrebbe limitare il danno neuronale. Abbiamo voluto indagare l'integrità della cascata di mitocondriogenesi nel nostro modello di ischemia. Abbiamo trovato che i livelli proteici di PGC-1 α e NRF-1 nei neuroni corticali si riducono in modo significativo dopo 3 ore di OGD ad indicare che nelle nostre condizioni in vitro si determina un grave deficit delle potenzialità mitocondriogeniche. Tuttavia, il trattamento con SB216763 1 μ M è in grado di ripristinare i livelli di PGC-1 α e NRF-1 osservati in condizioni di controllo (Figura 4.9).

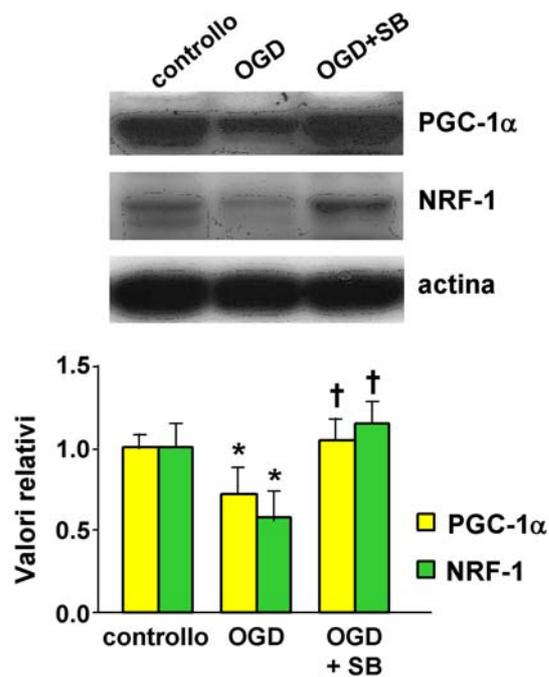


Figura 4.9 Livelli proteici di PGC-1 α e NRF-1 durante OGD trattamento con SB216763

Livelli proteici di PGC-1 α e NRF-1 misurati in neuroni corticali di controllo e in neuroni sottoposti a OGD con o senza trattamento con SB216763 1 μ M. Pannello superiore: immagini di blot da esperimenti rappresentativi; pannello inferiore: grafico della quantificazione densitometrica dei blot (le proteine di interesse sono state normalizzate su actina). * $p < 0.05$ vs i valori controllo. † $p < 0.05$ vs i valori di OGD.

In accordo a quanto accade per i regolatori della mitocondriogenesi, l'OGD provoca una riduzione della massa mitocondriale, stimata attraverso la misurazione del mtDNA, e della funzione mitocondriale, determinata mediante lo studio dell'attività della citrato sintasi. Il trattamento con SB216763 1 μ M è in grado di compensare sia la perdita di mtDNA che di attività enzimatica (Figura 4.10).

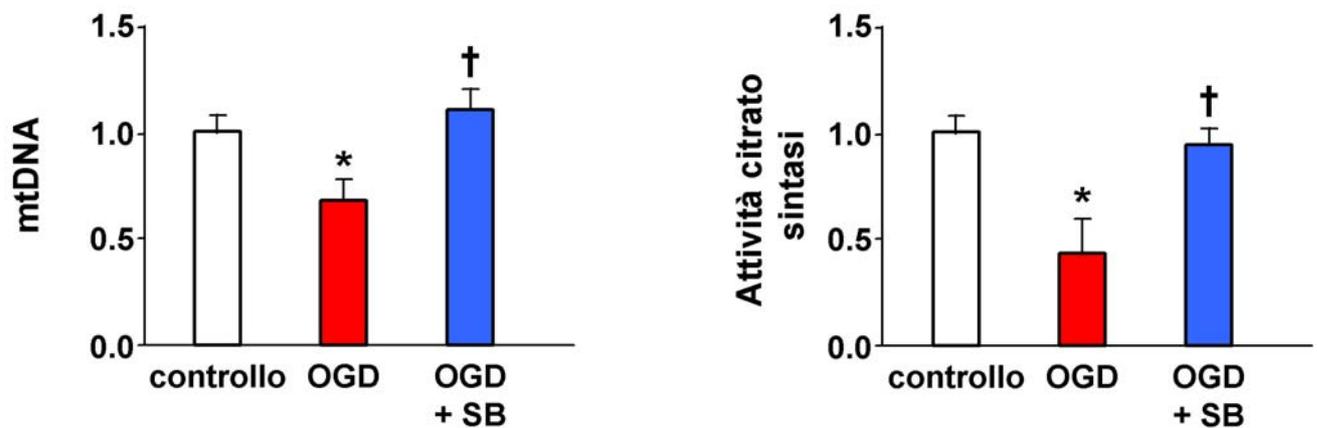


Figura 4.10 Effetti dell'OGD e del trattamento con SB216763 sui livelli del mtDNA e sull'attività dell'enzima citrato sintasi

La quantità di mtDNA e l'attività della citrato sintasi sono state misurate come descritto nella figura 4.3 24 ore dopo OGD. I diagrammi esprimono la media di tre esperimenti. * $p < 0.05$ vs controlli. † $p < 0.05$ vs i valori di OGD.

Ci siamo chiesti se il recupero della funzione mitocondriale potesse essere un meccanismo chiave attraverso cui l'SB216763 svolge il suo ruolo neuroprotettivo nel nostro modello di ischemia cerebrale in vitro. Per chiarire questa ipotesi, abbiamo trattato i neuroni corticali di topo con diversi inibitori mitocondriali durante la procedura di OGD. Il rotenone, un inibitore del complesso I della catena mitocondriale di trasporto degli elettroni, induce la morte dei neuroni corticali in modo dose dipendente (0.1-4 μ M). Il trattamento con rotenone non modifica l'entità del danno neuronale procurato dall'OGD a suggerire che le due modalità di lesione condividono lo stesso meccanismo. Con interesse abbiamo osservato che il rotenone previene completamente la neuroprotezione mediata dall'SB216763. L'inibitore del complesso III della catena respiratoria, antimicina A (3 μ M), e CCCP (2 μ M) si comportano come il rotenone (Figura 4.11). Questi dati supportano l'ipotesi che il ripristino di mitocondri funzionali prenda parte all'effetto anti-ischemico dell'inibizione di GSK-3.

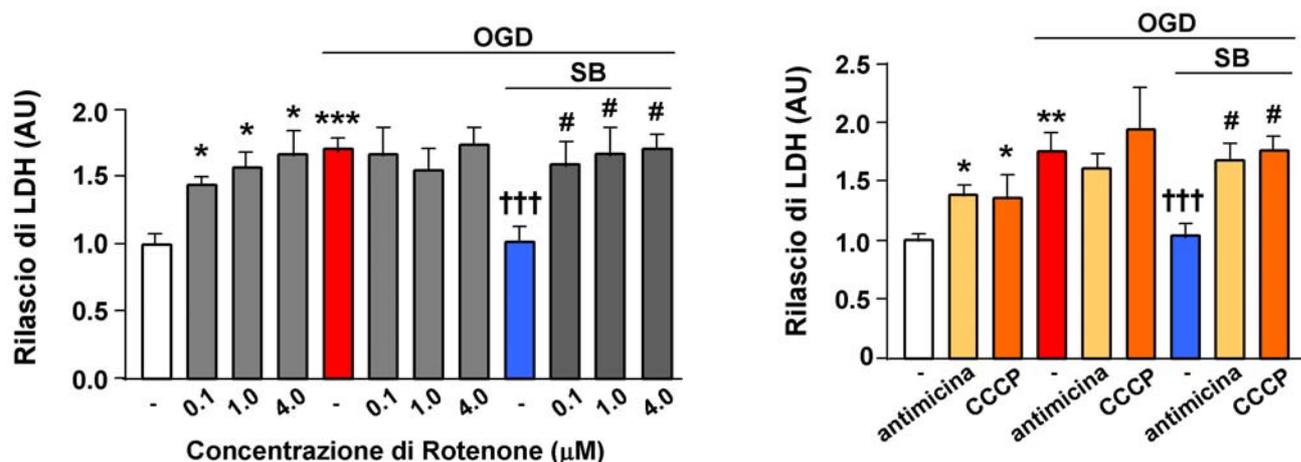


Figura 4.11 Effetto degli inibitori mitocondriali sulla neuroprotezione mediata da SB216763

Rotenone (0.1-4 μ M), Antimicina A (3 μ M) e CCCP (2 μ M) limitano la protezione mediata da SB216763 sulla lesione in corso di OGD. I neuroni corticali sono stati esposti ai diversi inibitori farmacologici 10 minuti prima del trattamento con SB216763, quindi è stato effettuato l'OGD come descritto in precedenza. Gli inibitori farmacologici *per se* aumentano in modo significativo il rilascio di LDH, mentre non modificano l'entità della morte neuronale indotta da OGD. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ vs i controlli; ††† $p < 0.001$ vs OGD; # $p < 0.05$ vs OGD + SB.

4.4 L'inibizione di GSK-3 attiva una risposta antiossidante e riduce la produzione di ROS durante l'ischemia neuronale

Nella maggior parte delle cellule, la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni rappresenta la sede principale di produzione di ROS. Durante l'ischemia, l'attività del complesso respiratorio viene severamente compromessa causando l'alterazione del flusso degli elettroni e l'aumento della produzione di ROS. La generazione di nuovi mitocondri pienamente funzionali potrebbe limitare questo fenomeno. Inoltre, è noto che PGC-1 α , oltre a coordinare la mitocondriogenesi, funge di per sé anche da potente attivatore dei sistemi enzimatici antiossidanti. Ci siamo chiesti se l'inibizione di GSK-3 potesse avere degli effetti sul sistema antiossidante endogeno e sulla produzione di ROS durante l'ischemia.

Abbiamo misurato l'espressione dei diversi enzimi antiossidanti durante l'OGD e dopo il trattamento con SB216763 nei neuroni corticali sottoposti a ischemia. I livelli di mRNA di SOD1 (Cu/Zn-SOD), SOD2 (Mg-SOD) e catalasi calano sensibilmente 3 ore dopo l'OGD; il trattamento con 1 μ M di SB216763 ripristina i livelli di SOD1 e catalasi, e induce l'espressione di SOD2 oltre i livelli dei controlli (Figura 4.12).

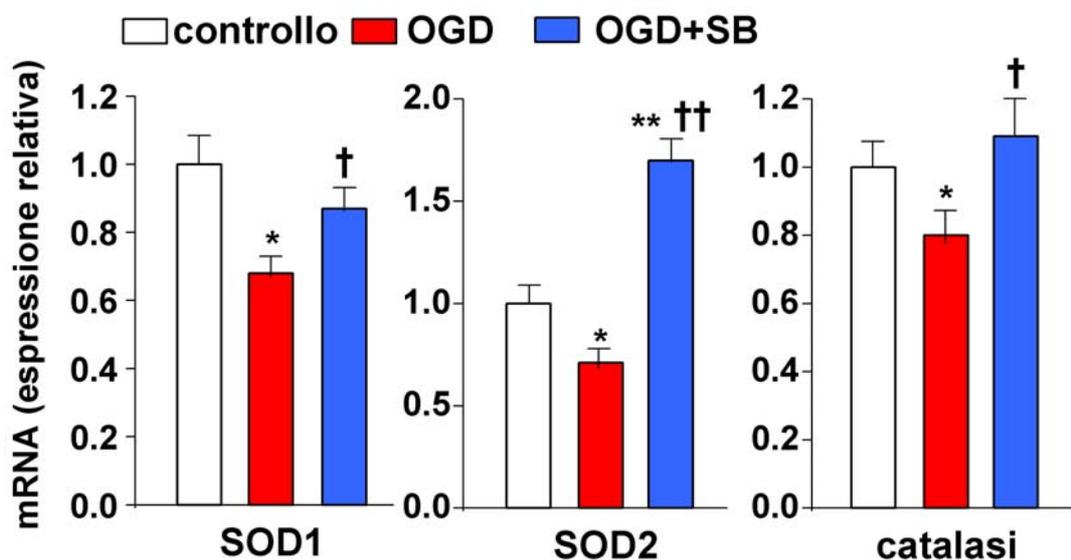


Figura 4.12 Effetto del trattamento con SB216763 sui geni del complesso antiossidante

I livelli di mRNA di SOD1, SOD2 e catalasi sono stati misurati attraverso la RT-PCR quantitativa. I valori dei campioni sottoposti a OGD sono calcolati come espressione relativa rispetto ai valori dei campioni controllo. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs i controlli. † $p < 0.05$ e †† $p < 0.01$ vs i valori di OGD.

L'enzima SOD2 svolge un'azione antiossidante fondamentale riducendo il carico del radicale superossido prodotto durante una lesione ischemica. Attraverso l'utilizzo del MitoSOX Red, un indicatore specifico per il superossido prodotto a livello mitocondriale, abbiamo studiato le variazioni di questo radicale nel nostro modello di ischemia cerebrale. I livelli di superossido nei mitocondri dei neuroni corticali aumentano significativamente a distanza di 3 ore dall'OGD; il trattamento con 1 μ M di SB216763 è in grado bloccare la produzione di superossido a livello mitocondriale durante la lesione ischemica (Figura 4.13).

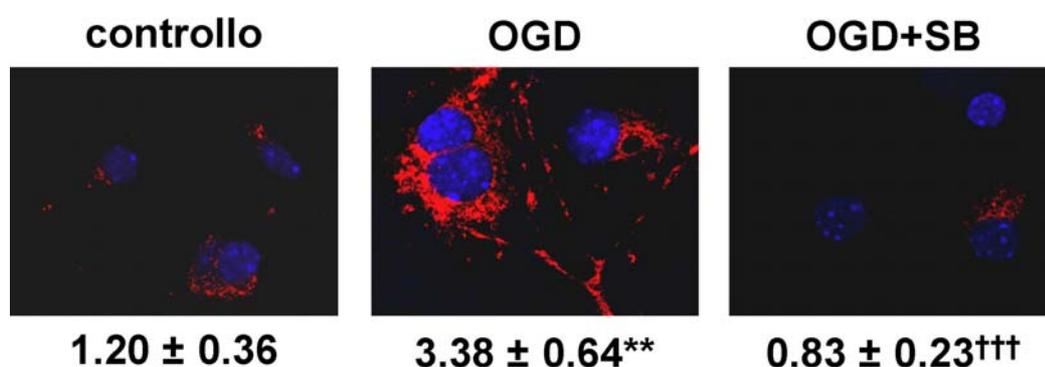


Figura 4.13 Il trattamento con SB216763 riduce la produzione di superossido indotta dall'OGD

Immagini rappresentative di neuroni corticali marcati con MitoSOX Red acquisite al microscopio confocale. L'aumento della fluorescenza 3 ore dopo l'OGD è indicativo dell'incremento della produzione di superossido che torna ai livelli del controllo dopo trattamento con SB216763. La quantificazione dell'intensità della fluorescenza è mostrata sotto le immagini. **p < 0.01 vs i controlli; †††p < 0.001 vs OGD.

4.5 L'SB216763 svolge un ruolo neuroprotettivo nell'infarto cerebrale nel topo

In collaborazione con ricercatori dell'Istituto Mario Negri di Milano, abbiamo indagato gli effetti dell'SB216763 in un modello di ischemia cerebrale focale *in vivo*. Il volume dell'infarto cerebrale provocato da occlusione permanente dell'arteria cerebrale media (pMCAO) nel topo è significativamente ridotto negli animali che ricevono una somministrazione di SB216763 per via sistemica (0.6.2.4 mg/Kg i.p.). La protezione mostra un andamento dose-dipendente, con un effetto massimo alla dose di 2.4 mg/Kg (Figura 4.15). Analogamente a quanto osservato *in vitro*, dosi superiori di SB216763 (4.8 mg/kg) perdono l'efficacia non modificando significativamente il volume dell'infarto (dati non mostrati).

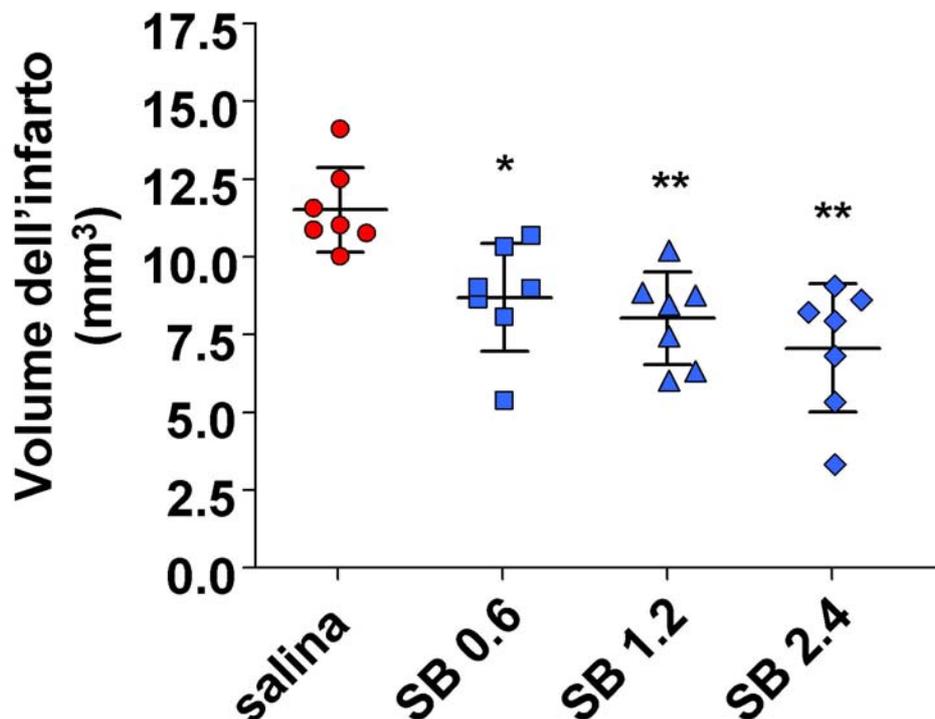


Figura 4.14 Effetto di SB216763 sul volume dell'infarto in topi sottoposti a pMCAO

Il volume dell'infarto è stato misurato 7 giorni dopo pMCAO in topi trattati con SB216763 e in topi controllo trattati con soluzione salina (7 animali per gruppo). *, $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$ vs animali trattati con salina.

Abbiamo poi indagato se, anche nel modello animale di ischemia cerebrale, il recupero della funzionalità mitocondriale prendesse parte alla neuroprotezione mediata da SB216763. A tale scopo abbiamo misurato la quantità di mtDNA in tessuti prelevati dall'area perilesionale 24 ore dopo pMCAO. In accordo con quanto già descritto in letteratura (Chen et al., 2001), i livelli di mtDNA dell'area sottoposta a ischemia sono significativamente ridotti 24 ore dopo pMCAO; la somministrazione sistemica di SB216763 (2.4 mg/kg) al momento dell'inizio di pMCAO riporta i livelli di mtDNA simili a quelli dei topi controllo (Figura 4.15).

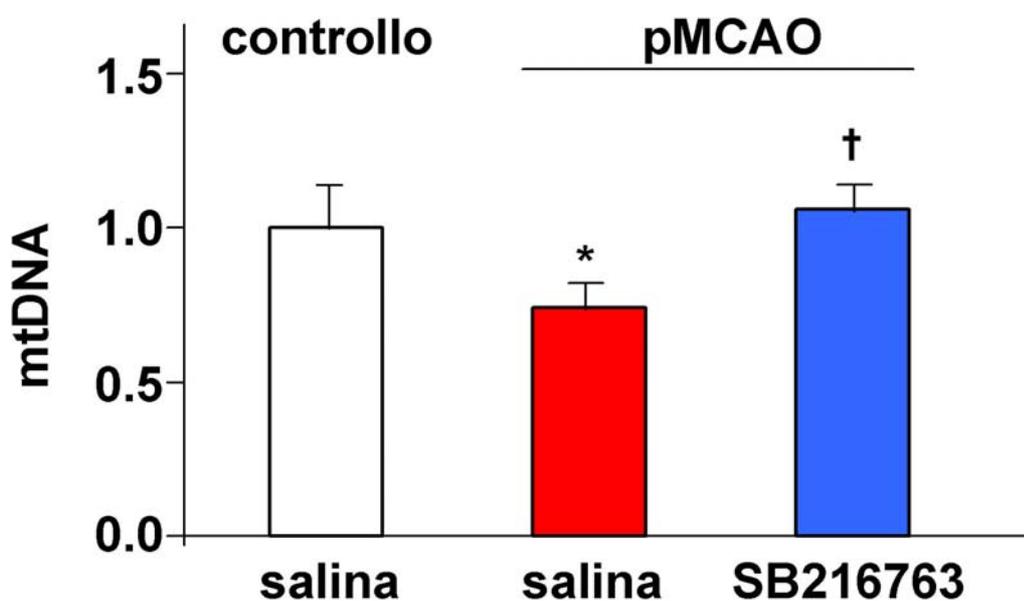


Figura 4.15 Livelli del mtDNA nelle aree cerebrali sottoposte a ischemia

La quantità di mt DNA è stata misurata attraverso la PCR quantitativa nel tessuto corticale perilesionale 24 ore dopo pMCAO in animali controllo trattati con salina e in animali trattati con SB216763. * $p < 0.05$ vs i controlli; † $p < 0.05$ vs pMCAO.

4.6 Screening di molecole mitocondriogenetiche per la terapia dell'ischemia cerebrale

I risultati incoraggianti ottenuti con gli inibitori di GSK-3 ci hanno motivato a intraprendere uno screening di molecole potenzialmente in grado di sostenere la mitocondriogenesi neuronale e di agire in senso protettivo in corso di ischemia cerebrale.

Abbiamo valutato gli effetti mitocondriogenetici di trattamenti per 72 ore con metformina. Alla dose di 50 μM , il farmaco induceva l'espressione di PGC-1 α (1.71 ± 0.19 vs valori di controllo =1; $p < 0.05$). Il farmaco era in grado di indurre anche l'espressione di NRF1 e Tfam (dati non mostrati). La massa mitocondriale è stata determinata nei neuroni corticali quantificando il contenuto di DNA mitocondriale (mtDNA) tramite qPCR per il gene citocromo B. L'esposizione a metformina (50 μM) per 72 ore aumenta il contenuto di mtDNA nei neuroni corticali (1.56 ± 0.11 vs valori di controllo =1; $p < 0.05$).

Abbiamo indagato gli effetti di una molecola Sirtris, il SRT2183, che si comporta da attivatore di SIRT1. L'esposizione a SRT2183 (1 μM) per 48 ore induce l'espressione di PGC-1 α , NRF-1, Tfam e di elementi della catena respiratoria quali citocromo c ossidasi IV (COX IV) e citocromo c (Cyt c) (dati non mostrati). Inoltre, il farmaco alla dose 1 μM aumenta i livelli di mtDNA in modo tempo-dipendente, con effetto massimale dopo 48 ore di trattamento (dato non mostrato).

L'utilizzo del modello di OGD in neuroni corticali di topo ci ha consentito di osservare che la metformina esercita in modo dose-dipendente (50-500 μM) un effetto neuroprotettivo nei confronti del danno neuronale (dato non mostrato). Analogamente, la somministrazione di SRT2183 protegge i neuroni dalla lesione ischemica conseguente a OGD in modo dose-dipendente nel range di concentrazione 0.1-5 μM (Figura 4.16). E' interessante notare che anche con queste molecole, dalla diversa struttura e meccanismo d'azione abbiamo osservato un peculiare andamento della curva dose-risposta nel modello di ischemia neuronale *in vitro*, sovrapponibile a quello osservato in seguito all'uso di SB216763 e di altre molecola ad azione neuroprotettiva *in vitro* e *in vivo* (Valerio et al., 2009; Valerio et al., 2011a).

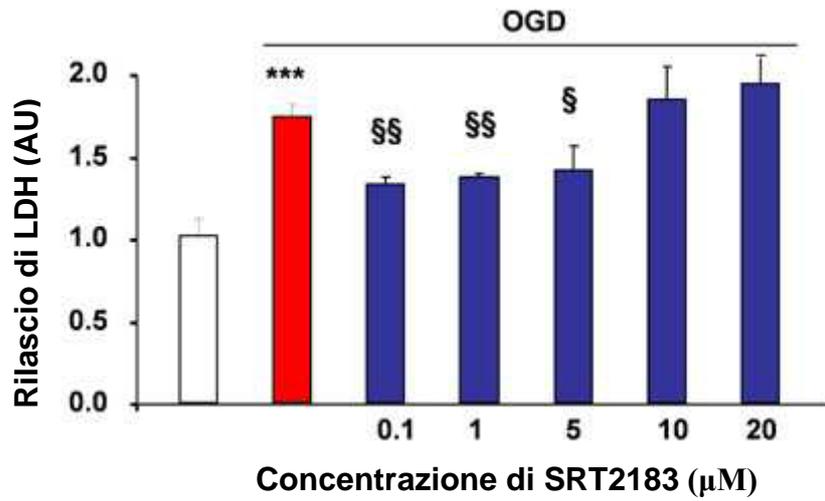


Figura 4.16 Neuroprotezione dose-dipendente da SRT2183 in corso di OGD

I neuroni sono stati esposti a SRT2183 (0,1 µM-120 µM) nelle stesse condizioni descritte nella figura 4.5 per l'SB216763, durante l'OGD. ***, $p < 0.001$ vs i valori di controllo. § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ vs i valori di OGD.

5. DISCUSSIONE

Come già suggerito a proposito dell'ischemia cardiaca, (McLeod et al., 2005) nel nostro lavoro ci siamo proposti di valutare se i fenomeni di mitocondriogenesi possano essere considerati nuovi bersagli terapeutici nel trattamento dell'infarto cerebrale. A seguito di ischemia, il cervello mette in atto meccanismi adattativi immediati e ritardati, volti rispettivamente alla neuroprotezione e al recupero delle capacità funzionali perdute. Recentemente è stato osservato che la mitocondriogenesi entra a far parte di questa risposta adattativa (Gutsaeva et al., 2008; Yin et al., 2008). Tuttavia, è stato anche ipotizzato che in corso di un'ischemia intensa, i mitocondri possano andare incontro a danno ossidativo e ad autofagia incontrollata (Vosler et al., 2009), con riduzione del contenuto di mtDNA indicativa dell'inadeguata risposta adattativa mitocondriale (Chen et al., 2001).

I nostri studi in vitro dimostrano che la situazione può essere ancora più grave in seguito a ischemia di grave entità. Infatti, nel nostro modello sperimentale di OGD in vitro, abbiamo osservato che la cascata della mitocondriogenesi è compromessa durante il danno ischemico, con una riduzione di fattori chiave come PGC-1 α e NRF-1. Questo fenomeno contribuisce, non solo a ridurre il contenuto cellulare di mtDNA, ma anche la massa e la funzione mitocondriale. Il *pathway* cellulare e molecolare che, durante l'ischemia, porta all'inibizione di PGC-1 α e dei suoi target a valle meriterà di essere studiato approfonditamente. La degradazione di PGC-1 α potrebbe essere attribuita alle azioni svolte delle calpaine che si attivano a seguito di un evento ischemico (Rasbach et al., 2008). Anche un'anomala iperattivazione di GSK-3 β , secondaria alla fosforilazione in Tyr-216 (Bhat et al., 2000) o al taglio all'N-terminale mediato da calpaina (Goni-Oliver et al., 2007), potrebbe essere in grado di ridurre i livelli di PGC-1 α nei neuroni ischemici.

In questo studio abbiamo dimostrato che la riduzione dell'attività di GSK-3 β , attraverso inibitori farmacologici o mutanti *dominant negative*, è protettiva nei confronti del danno ischemico indotto in vitro nei neuroni corticali di topo. Allo stesso tempo, in accordo con lavori presenti in letteratura (Olson et al., 2008), abbiamo dimostrato che l'inibizione di GSK-3 si accompagna ad un aumento dei livelli proteici di PGC-1 α nei neuroni corticali. Dal momento che PGC-1 α è un potente induttore dell'espressione genica di NRF-1, anche i livelli proteici del fattore respiratorio nucleare 1 sono aumentati. L'azione coordinata di PGC-1 α e NRF-1 è importante per attivare il programma della mitocondriogenesi (Scarpulla, 2008). Nel nostro studio, l'inibitore farmacologico di GSK-3 SB216763 si è dimostrato capace di attivare questo programma, mediando il recupero della funzione e della massa mitocondriale, nei neuroni corticali anche

quando sottoposti a ischemia. I nostri dati suggeriscono che la produzione di mitocondri funzionali gioca un ruolo chiave nella neuroprotezione mediata dall'inibizione di GSK-3 in modelli di ischemia in vitro. Il trattamento con inibitori mitocondriali, infatti, abolisce completamente la neuroprotezione mediata dall'SB216763 senza modificare, di per sé, l'entità del danno neuronale procurato dall'OGD.

È noto che l'aumento della formazione di ROS a livello mitocondriale rappresenta uno degli eventi fisiopatologici che partecipano alla cascata ischemica. Dai nostri dati è emerso che SB216763 aumenta i meccanismi antiossidanti endogeni a livello delle cellule neuronali esposte a danno ischemico. In particolare, l'inibizione di GSK-3 si accompagna a un forte incremento dell'attività di SOD2 e al blocco completo della produzione di superossido a livello mitocondriale.

Per valutare gli effetti *in vivo* dell'SB216763, è stato utilizzato un modello di ischemia cerebrale focale che provoca una lesione a livello corticale: l'occlusione permanente dell'arteria cerebrale media (pMCAO) nel topo. Abbiamo dimostrato che la somministrazione sistemica di SB216763 ripristina i livelli normali del contenuto di mtDNA ridotti nel tessuto perilesionale. Nel contempo, SB216763 riduce il volume dell'infarto cerebrale. La neuroprotezione mediata da SB216763 mostra un caratteristico andamento dose-dipendente bifasico con effetto massimo a dosi intermedie, senza mai raggiungere effetti di tossicità. Una curva dose-dipendente simile è stata osservata precedentemente in corso di trattamenti con diverse molecole neuroprotettive in modelli animali di ischemia cerebrale (Calabrese, 2008; Valerio et al., 2009). Di interesse è anche la nostra osservazione che molecole dotate di proprietà mitocondriogenetiche, da noi testate nel modello di ischemia cerebrale in vitro, come la metformina e SRT2183 mostrano una simile modalità di dose-dipendenza. Calabrese ha recentemente discusso il significato di questo caratteristico andamento delle curve dose-risposta comune a diverse molecole e in diversi modelli biologici. L'autore ha evidenziato la necessità di trovare validati parametri nei modelli della sperimentazione pre-clinica che possano meglio indirizzare lo sviluppo di molecole da testare in trial clinici (Calabrese, 2008).

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

I clinici concordano nell'affermare l'urgente necessità di nuove terapie per l'*ictus* ischemico. Attualmente, l'unica terapia per l'ischemia cerebrale si basa sulla somministrazione dell'attivatore tissutale del plasminogeno; tuttavia, a causa della stretta finestra temporale del protocollo terapeutico, essa è attuabile in un numero limitatissimo di pazienti.

Sulla base della complessità degli eventi attivati dall'ischemia cerebrale e dei risultati deludenti di trial clinici con singole molecole, è irrealistico supporre che un singolo farmaco neuroprotettivo possa dare benefici nell'*ictus* cerebrale. Numerosi studi con terapie combinate hanno dimostrato che molecole che agiscono su più bersagli hanno un effetto sinergico o additivo nella neuroprotezione. Per esempio, la nimodipina, un bloccante dei canali del calcio, ha dato risultati positivi se combinata con MK-801, un antagonista dei recettori del glutammato; in aggiunta, l'ipotermia allunga la finestra temporale per la terapia genica con Bcl-2 (Doyle et al., 2008). Attualmente, la terapia combinatoriale è da molti considerata la strategia più promettente per la ricerca futura sull'ischemia cerebrale (Segura et al., 2008). Seguendo questo ragionamento, molecole in grado di agire con molteplici meccanismi d'azione potrebbero essere di notevole interesse.

I più recenti studi sulla fisiopatologia dell'infarto cerebrale mettono in evidenza la necessità di operare positivamente sulla penombra ischemica, tenendo conto dell'andamento complesso della risposta al danno. La fase precoce vede, infatti, l'attivazione di diversi meccanismi che mediano la morte neuronale; tra questi gioca un ruolo preponderante lo stress ossidativo. Nella fase più tardiva, prevalgono i meccanismi di plasticità neuronale e rimodellamento vascolare (Lo, 2008).

Le molecole che inibiscono GSK-3 β potrebbero risultare estremamente efficaci nella terapia dell'infarto cerebrale poiché agiscono attivando diversi meccanismi. Studi in letteratura dimostrano che l'inibizione di GSK-3 esercita effetti favorevoli sui regolatori mitocondriali dell'apoptosi, modulando le proteine della famiglia Bcl-2 e aumentando i livelli soglia di variazione della permeabilità mitocondriale (Juhászova et al., 2009). Inoltre, l'inibizione di GSK-3 β promuove l'angiogenesi (Kaga et al., 2006) ed esercita effetti neurogenici (Mao et al., 2009) e neurotrofici che favoriscono la crescita assonale (Valerio et al. 2006; Dill et al., 2008). Pertanto, gli inibitori di GSK-3 β potrebbero esercitare azioni benefiche sia nella fase immediatamente successiva al danno ischemico, riducendo significativamente lo stress ossidativo, che nella fase ritardata di recupero funzionale, nella quale è essenziale favorire la formazione di

nuovi vasi, che apportino ossigeno e glucosio, e attivare i fenomeni riparativi a carico dei neuroni danneggiati.

I nostri risultati ampliano questi orizzonti, dimostrando nuovi meccanismi d'azione di SB216763. La sperimentazione di queste molecole, in grado di ripristinare la mitocondriogenesi compromessa e inibire la produzione di ROS, potrebbe avviare un approccio innovativo alla terapia dell'ictus cerebrale ischemico.

In linea più generale, i nostri risultati dimostrano che strategie mitocondriogenetiche sono efficaci nel contrastare i deficit mitocondriali osservati in corso di ischemia cerebrale. Le nostre osservazioni ci inducono quindi anche ad ampliare questo orizzonte, avviando ampi *screening* di molecole ad attività mitocondriogenetica, nell'ottica del loro utilizzo con finalità *neurorestorative* nei pazienti affetti da ischemia cerebrale.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abe T, Kunz A, Shimamura M, Zhou P, Anrather J, Iadecola C. The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has wide therapeutic window, is sustained in time and no sexually dimorphic. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29(1):66-72 (2009).
- Anderson R, Prolla T. PGC-1alpha in aging and anti-aging interventions. *Biochim Biophys Acta.* 1790:1059-1066 (2009).
- Andersson U, Scarpulla RC Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 21:3738–49 (2001).
- Baar K, Song Z, Semenkovich CF, Jones TE, Han DH, et al. . Skeletal muscle overexpression of nuclear respiratory factor 1 increases glucose transport capacity. *FASEB J.* 17:1666–73 (2003).
- Bhat R, Shanley J, Correl M, Fieles W, Keith R, Scott C, Lee C. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:11074-11079 (2000).
- Bath R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, Radesater A, Jerning E, Markgren P, Borgegard T, Nylof M, Gimenez-Cassina A, Hernandez F, Lucas J, Diaz-Nido J, Avila J. Structural insights and biological effects of glycogen syntase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem.* 278:45937-45945 (2003).
- Baur JA. Resveratrol, sirtuins and the promises of DR mimetics. *Mech. Aging and Dev.* 131, 261-269 (2010).
- Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, et al. . Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281:E1340–46 (2001).
- Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α . *FASEB J.* 20:1889–91 (2006).
- Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, et al. Nuclear receptors PPAR β/δ and PPAR α direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J. Clin. Investig.* 117:3930–39 (2007).
- Calabrese EJ. Drug therapie for stroke and traumatic brain injury often display U-shaped dose response: occurrence, mechanisms, and clinical implication. *Crit Rev Toxicol.* 38:557-577 (2008).

- Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, et al. Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J. Appl. Physiol.* 104:1304–12 (2008).
- Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: Consideration for development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs.* 10:644-654 (2009).
- Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience.* 158(3):983-994 (2009).
- Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 24:3057–67 (2004).
- Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, et al. Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J. Physiol.* 567:349–58 (2005).
- Chang CR, Blac Kstone C Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282:21583–21587 (2007).
- Chen H, Hu C, He Y, Yang D, Xu J, Hsu C. Reduction and restoration of mitochondrial DNA content after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke.* 32: 2382-2387 (2001).
- Chin, P.C., Nazanin Majdzadeh, Santosh R. D’Mello, Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors, *Mol. Brain Res.* 137:193-201 (2005).
- Christian M, White R, Parker MG. Metabolic regulation by the nuclear receptor corepressor RIP140. *Trends Endocrinol. Metab.* 17:243–50 (2006).
- Chow LS, Greenlund LJ, Asmann YW, Short KR, McCrady SK, et al. Impact of endurance training on murine spontaneous activity, muscle mitochondrial DNA abundance, gene transcripts, and function. *J. Appl. Physiol.* 102:1078–89 (2007).
- Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA S-Nitrosylation of Drp1 mediates b-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324:102–105 (2009).
- Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E; CALERIE Pennington Team. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med*; 4:e76 (2007).

- Coghlan M, Culbert A, Cross D, Corcoran S, Yates J, Pearce N, Rausch O, Murphy G, Carter P, Roxbee Cox L, Mills D, Brown M, Haigh D, Ward R, Smith D, Murray K, Reith A, Holder J. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol.* 7:793-803 (2000).
- Collins, T. J. , Berridge, M. J. , Lipp, P. & Bootman, M. D. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* 21, 1616–1627 (2002).
- Coonrod EM, Karren MA, Shaw JM Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion. *Traffic* 8:500–511 (2007).
- Cowell, K.R. Blake and J.W. Russell, Localization of the transcriptional coactivator PGC-1 α to GABAergic neurons during maturation of the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **502-1**, pp. 1–18 (2007).
- Cowper-Smith C, Anger G, Magal E, Norman M, Robertson G. Delayed administration of a potent cyclin dependent kinase and glycogen synthase kinase 3 β inhibitor produces long-term neuroprotection in a hypoxia-ischemia model of brain injury. *Neuroscience.* 155:864-875 (2008).
- Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD., Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* 77: 94–102 (2001).
- Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* 450:736–40 (2007).
- Della Morte D, Abete P, Gallucci F, Scaglione A, D'Ambrosio D, Gargiulo G, De Rosa G, Dave KR, Lin HW, Cacciatore F, Mazzella F, Uomo G, Rundek T, Perez-Pinzon MA, Rengo F. Transient ischemic attack before nonlacunar ischemic stroke in the elderly. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 17(5):257-62 (2009).
- Detmer, S. A. & Chan, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 870–879 (2007).
- Digicaylioglu M. Erythropoietin in stroke: quo vadis. *Expert Opin Biol Ther.* 10(6):937-949 (2010).
- Dirnagl U. Inflammation in stroke: The good, the bad and the unknown. *Ernst Schering Res Found Workshop.* (47):87-99 (2004).
- Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L, SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha secretase gene ADAM10. *Cell* 142:320-32 (2010).

- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet*. 371:1612-1623 (2008).
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharm*. 55:310-318 (2008).
- Eldar-Finkelman H. Glycogen syntase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med*. 8:126-132 (2002).
- Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med*. 10:355–61 (2006).
- Fan M, Rhee J, St-Pierre J, Handschin C, Puigserver P, et al. Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK. *Genes Dev*. 18:278–89 (2004).
- Frame, P. Cohen, GSK3 takes centre stage more than 20m years after its discovery. *Biochem. J*. 359:1-16 (2001).
- Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, Qi H. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS ONE* 3 (2009).
- Fuentes B, Martinez-Sanchez P, Diez-Tejedor E. Lipid-lowering drugs in ischemic stroke prevention and their influence on acute stroke outcome. *Cerebrovasc Dis*. 27:126-133 (2009).
- Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 10:481-494 (2009).
- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R.. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol*. 551:491–501 (2001).
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J*. 26:1913–23 (2007)
- Giguere V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors (ERRs). *Endocr. Rev*. 29:677–96 (2008).
- Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synaptic overview. *Stroke*. 40:S111-4 (2008).
- Goni-Oliver P, Lucas J, Avila J, Hernández F. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem*. 282:22406-22414 (2007).
- Greschik H, Wurtz JM, Sanglier S, Bourguet W, van Dorsselaer A, et al. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol. Cell* 9:303–13 (2002).

- Grimes, R.S. Jope, The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling, *Prog. Neurobiol.* 65:391-426 (2001).
- Guarente L. Mitochondria—a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell.* 132:171-176 (2008).
- Gutsaeva D, Carraway M, Suliman H, Demchenko I, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi C. Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Neurosci.* 28:2015-2024 (2008).
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 h after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 359:1317-1329 (2008).
- Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* 27:728–35 (2006).
- Handschin C. The biology of PGC-1 α and its therapeutic potential. *Trends in Pharmacol Sci.* 30(6):223-229 (2009).
- Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413:179–83 (2001).
- Hock MB and Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol.*; 71:177-203. Review (2009).
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425:191-6 (2003).
- Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor- α and - γ . Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 277:40265–74 (2002).
- Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat Neurosci.* 14:1363-8 (2011).
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 17:796-808 (2011).
- Ichida M, Nemoto S, Finkel T. Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α). *J. Biol. Chem.* 277:50991–95 (2002).
- Ingram DK, Roth GS. Glycolytic inhibition as a strategy for developing calorie restriction mimetics. *Exp Gerontol*; 46:148-54. Review (2011).

- Interventional Management of Stroke Investigation. The interventional Management of Stroke (IMS) II Study. *Stroke*. 38:2127-2135 (2007).
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:12017–22 (2007).
- James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278:36373–36379 (2003).
- Juhaszova M, Zorov D, Yaniv Y, Nuss H, Wang S, Sollott S. role of glycogen syntase kinase-3 β in cardioprotection. *Circ Res*. 104:1240-1252 (2009).
- Kaga S, Zhan L, Altaf E, Maulik N. Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 40: 138-147 (2006).
- Klingenspor M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp. Physiol*. 88:141–48 (2003).
- Knutti D, Kaul A, Kralli A. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol. Cell. Biol*. 20:2411–22 (2000).
- Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* 278:8597–8605 (2003).
- Koh S, Yoo A, Chang D, Hwang S, Kim S. Inhibition of GSK-3 reduces infarct volume and improve neurobehavioral functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 371:894-899 (2008).
- Kuroiwa, T., Ting, P., Martinez, H. & Klatzo, I. The biphasic opening of the blood–brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol*. **68**, 122–129 (1985).
- Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor α . *J. Biol. Chem*. 277:13918–25 (2002).
- Lambert AJ, Wang B, Yardley J, Edwards J, Merry BJ. The effect of aging and caloric restriction on mitochondrial protein density and oxygen consumption. *Exp. Gerontol*. 39:289–95 (2004).
- Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Böhm M, Nickenig G, Endres M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res*. 28;942:23-30 (2002).

- Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD. Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov.*; 7:841-53 (2008)
- Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, et al. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α . *Cell Metab* 3:429–438 (2006).
- Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell.* 28:91-106 (2006).
- Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277:1645–48 (2002)
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79:1431-568. Review (1999).
- Lòpez-Lluch G, Irusta P, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol.* 43:813-819 (2008).
- Mao Y, Ge X, Frank C, Madison J, Koehler A, Doud M, Tassa C, Berry E, Soda T, Singh K, Biechele T, Petryshen T, Moon R, Haggarty S, Tsai L. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 β / β -catenin signaling. *Cell.* 136:1017-1031 (2009).
- McClelland GB, Craig PM, Dhekney K, Dipardo S. Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Physiol.* 577:739–51 (2006).
- McLeod C, Pagel I, Sack M. The mitochondrial biogenesis regulatory program in cardiac adaptation to ischemia—a putative target for therapeutic intervention. *Trends Cardiovasc Med.* 15:118-123 (2005).
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Maisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis.* 19:151-167 (2004).
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci.* 25:471-80 (2004).
- Meijer L, Skaltsounis A, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol.* 10:1255-1266 (2003).
- Metha SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 54(1):34-66 (2007).

- Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 29;450:712-6 (2007).
- Minnerup J, Schabitz WR. Multifunctional actions of approved and candidate stroke drugs. *Neuropharmacology*. 55(3):363-389 (2009).
- Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Goto M, et al. An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to exercise is mediated by β -adrenergic receptor activation. *Endocrinology* 148:3441–48 (2007).
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, et al.. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115:629–40 (2003).
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 67:181-98 (2010).
- Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, Leybaert L, Molnár Z, O'Donnell ME, Povlishock JT, Saunders NR, Sharp F, Stanimirovic D, Watts RJ, Drewes LR. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci*. 12:169-82 (2011).
- Nichol D, Christian M, Steel JH, White R, Parker MG. RIP140 expression is stimulated by estrogen-related receptor α during adipogenesis. *J. Biol. Chem*. 281:32140–47 (2006).
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 299:896-899 (2003).
- Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, Cardile A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, Clementi E. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:16507-16512 (2004).
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. *Science*. 310:314-317 (2005).
- Nisoli E, Carruba MO. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Science*. 119:2855-2862 (2006).

- Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Holloszy JO. Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.* 17:675–81 (2003).
- Olson B, Hock M, Ekholm-Reed S, Wohlschlegel J, Dev K, Kralli A, Reed S. SCFCdc4 acts antagonistically to PGC-1 α transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes Dev.* 22:252-264 (2008).
- Ongwijitwat S, Liang HL, Graboyes EM, Wong-Riley MT. Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs. *Gene* 374:39–49 (2006).
- Papadopoulos, M. C. et al. Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27, 384–395 (2001).
- Parsons MW, Miteff F, Bateman GA, Spratt N, Loisel A, Attia J, Levi CR. Acute ischemic stroke: imaging-guided teneplase treatment in an extended time window. *Neurology.* 72:915-921 (2009).
- Piantadosi C, Carraway M, Babiker A, Suliman H. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res.* 103:1232-1240 (2008).
- Powelka AM, Seth A, Virbasius JV, Kiskinis E, Nicoloso SM, et al. Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J. Clin. Investig.* 116:125–36 (2006).
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM.. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829–39 (1998).
- Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, et al. Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286:1368–71 (1999).
- Ramachandran B, Yu G, Gulick T. Nuclear respiratory factor 1 controls myocyte enhancer factor 2A transcription to provide a mechanism for coordinate expression of respiratory chain subunits. *J. Biol. Chem.* 283:11935–46 (2008).
- Rasbach K, Green P, Schnellmann R. Oxidants and Ca²⁺ induce PGC-1 α degradation through calpain. *Arch Biochem Biophys.* 478:130-135 (2008).
- Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *British Journ of Pharmacol.* 156:885-898 (2009).
- Reilly SM, Lee CH. PPAR δ as a therapeutic target in metabolic disease. *FEBS Lett.* 582:26–31 (2008).

- Rockl KS, Witeczak CA, Goodyear LJ. Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise. *IUBMB Life* 60:145–53 (2008).
- Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, et al. Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 26:5449–69 (2006).
- Santel A Get the balance right: mitofusins roles in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1763:490–499 (2006).
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 88:611-638 (2008).
- Schon EA and Przedborski S. Mitochondria: the next (neuro)degeneration. *Neuron.* 23;70:1033-53 (2011).
- Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α (ERR α). *J. Biol. Chem.* 278:9013–18 (2003).
- Segura T, Calleja S, Jordan J. Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert Opin Pharmacother.* 9:1071-1085 (2008).
- Sesaki H, Jensen RE Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* 279:28298–28303 (2004).
- Singhal AB. A review of oxygen therapy in ischemic stroke. *Neurol Res.* 29(2):173-183 (2007).
- Skulachev, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26, 23–29 (2001).
- Soane L, Kahraman S, Kristian T, Fiskum G. Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res.* 88:3407-3415 (2007).
- Sobrado M, Pereira MP, Ballesteros I, Hurtado O, Fernandez-Lopez D, Pradillo JM, Caso JR, Vivancos J, Nombela F, Serena J, Lizasoain I, Moro MA. Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPAR γ -dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke. *J Neurosci.* 29(12):3875-3884 (2009).
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivators 1 α and 1 β (PGC-1 α and PGC-1 β) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278:26597–603 (2003).
- Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15924–29 (2003).

- Tedesco L, Valerio A, Cervino C, Cardile A, Pagano C, Vettor R, Pasquali R, Carruba MO, Marsicano G, Lutz B, Pagotto U, Nisoli E. Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes*. 57:2028-2036 (2008).
- Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res*. 90:377-379 (2002).
- Tsivgoulis G, Eggers J, Ribo M, Perren F, Saqqur M, Rubiera M, Sergentanis TN, Vadikolias K, Larrue V, Molina CA, Alexandrov AV. Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis. *Stroke*. 41:280-287 (2010).
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27:433–446 (2008).
- Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*. 3:333–41 (2006).
- Valerio A, Ghisi V, Dossena M, Tonello C, Giordano A, Frontini A, Ferrario M, Pizzi M, Spano PF, Carruba MO, Nisoli E. Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem*. 281:12950-12958 (2006).
- Valerio A, Dossena M, Bertolotti P, Boroni F, Sarnico I, Faraco G, Chiarugi A, Frontini A, Giordano A, Liou H, De Simoni MG, Spano PF, Carruba MO, Pizzi M, Nisoli E. Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF- κ B/c-Rel-dependent transcription. *Stroke*. 40:610-617 (2009).
- Valerio A, Bertolotti P, Delbarba A, Perego C, Dossena M, Ragni M, Spano P, Carruba MO, De Simoni MG, Nisoli E. Glycogen synthase kinase-3 inhibition reduces ischemic cerebral damage, restores impaired mitochondrial biogenesis and prevents ROS production. *J Neurochem*.; 116:1148-59 (2011).
- Valerio A, D'Antona G, Nisoli E. Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: an evolutionary perspective. *Aging (Albany NY)* 3:464-78. Review (2011).

- Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 20:1868–76 (2000).
- Vercauteren K, Gleyzer N, Scarpulla RC. PGC-1-related coactivator (PRC) complexes with HCF-1 and NRF-2 β in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *J. Biol. Chem.* 283:12102–11 (2008).
- Villena JA, Kralli A. ERR α : a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol. Metab.* 8:269–76 (2008).
- Vosler P, Graham S, Wechsler L, Chen J. Mitochondrial Targets for Stroke. Focusing basic science research toward development of clinically translatable therapeutics. *Stroke.* 40(9):3149-3155 (2009).
- Wallerath T, Poleo D, Li H, Förstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol.*41:471-8 (2003).
- Wang C, Li Z, Lu Y, Du R, Katiyar S, et al.. Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:11567–72 (2006).
- Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer’s disease. *J Neurosci* 29:9090–9103 (2009).
- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*;11:872-84. Review (2010).
- White R, Morganstein D, Christian M, Seth A, Herzog B, Parker MG. Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett.* 582:39–45 (2008).
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mooth V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and function through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98:115-124 (1999).
- Yin W, Signore A, Iwai M, Cao G, Gao Y, Chen J. Rapidly increase neuronal mitochondrial biogenesis after hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke.* 39:3057-3063 (2008).
- Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23:5409–5420 (2003).

- Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11:407–20 (2007).

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Michele O. Carruba per avermi dato l'opportunità di lavorare e svolgere il mio dottorato di ricerca nel suo laboratorio.

Grazie al Prof. Alberto Panerai per la professionalità con cui dirige la scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche e per la sua pazienza nel seguire i dottorandi.

Ringrazio il direttore del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie dell'Università degli studi di Brescia, Prof. Maurizio Memo, e il Prof. PierFranco Spano per avermi permesso di frequentare e di lavorare nei laboratori della Sezione di Farmacologia.

Un ringraziamento speciale alla Prof.ssa Alessandra Valerio per la pazienza e la disponibilità che ha sempre avuto nei miei confronti e per essere stata per me un esempio in questi anni.

Ringrazio il Prof. Enzo Nisoli per gli stimoli professionali e culturali che sempre elargisce e con cui mi ha aiutato a crescere.

Grazie alla Prof.ssa Marina Pizzi per il suo sostegno, le sue iniziative culturali e per la stima reciproca che ci lega.

La Dott.ssa Francesca Fenaroli si è unita da poco più di un anno al nostro gruppo di ricerca ma è da molto tempo un'Amica. A lei devo un sincero grazie per avermi seguito con fiducia e pazienza in questo anno e un caloroso augurio per il suo futuro.

Un grazie di cuore a tutto il gruppo di ricerca, a Mattia e Michela, a Laura, Annalisa, Chiara, Francesca, Maurizio e Andrea.

Alla Dott.ssa Paola Bertolotti, un grazie speciale per la sua Amicizia, il suo puntuale sostegno nei miei momenti più difficili e la sua allegra filosofia di vita.

Grazie di cuore a Serena per la sua Amicizia per tutte le volte che mi ha ascoltato e mi ha dato preziosi consigli.

Ringrazio tutti i miei amici di Farmacologia a cui sono molto legato: Giulia, Sara, Francesca, Giovanna, Daniela, Paola, Marina, Gianmarco, Martina, Jessica, Mery, Chiara, Laura, Giusy, Daria, Vanessa, Caterina, Annamaria; a loro un sincero grazie per il clima familiare che si è creato in questo gruppo.

Per ultima, non certo di importanza, la mia Famiglia.

Grazie ai miei fratelli, Gianmario e Mattia, a mia cognata, Alessandra e all'ultimo arrivato Lorenzo, perchè mi hanno sempre dimostrato la loro approvazione e mi hanno aiutato, in questi anni, a ritagliare il tempo necessario per il mio studio.

Non potrò mai smettere di ringraziare i miei genitori, papà Luigi e mamma Luisa, per l'affetto e il rispetto con il quale mi hanno sempre sostenuto; un grazie di cuore per avermi permesso di studiare e di realizzare i miei progetti, per non aver mai dubitato di me e delle mie idee e per avermi sempre spronato ad andare avanti con coraggio e lealtà.

A tutti un Sincero Grazie.