



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E
NATURALI

Dottorato di Ricerca in
“Biologia Animale”

XXIII CICLO

Settore disciplinare BIO/09

La Catestatina come nuovo modulatore
autocrino/paracrino dell'attività cardiaca

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Maria Carmela Cerra

Candidata

Dott.ssa Teresa Pasqua

Docente Tutor

Chiar.mo Prof. Bruno Tota

SUMMARY	1
PREMESSA E SCOPO	4
INTRODUZIONE	7
1 La cromogranina A	8
1.1 CGA: il ruolo di pro-ormone	10
1.2 CGA e biogenesi dei granuli secretori	12
1.3 CGA e patologie cardiovascolari	13
1.4 CGA e produzione intracardiaca	17
2 La catestatina	18
2.1 Struttura della Cts	21
2.2 Inibizione della secrezione catecolaminergica	22
2.3 Blocco della desensitizzazione	25
2.4 Accoppiamento “stimolo secrezione vescicolare-trascrizione”	26
2.5 Azione cardiovascolare <i>in vivo</i>	27
2.6 Azione anti-microbica, chemiotattica e angiogenetica	30
2.7 Cts e ipertensione	33
2.8 Cts e produzione intracardiaca	35
2.9 Cts umana e sue varianti naturali	36
MATERIALI E METODI	39
1 METODICA LANGENDORFF	40

1.1 Animali	41
1.2 Apparato di perfusione	41
1.3 Dissezione, isolamento ed incannulazione del cuore	43
1.4 Misurazione dell'attività contrattile del cuore	44
1.5 Perfusione e composizione del perfusato	45
1.6 Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri	46
1.7 Parametri dell'attività cardiaca	47
2 IMMUNOBLOTTING	50
3 BIOTIN SWITH ASSAY	52
4 DOSAGGIO ELISA	54
5 PROTOCOLLI SPERIMENTALI	55
5.1 Composti chimici	55
5.1.1 Langendorff	55
5.1.2 Immunoblotting	56
5.2 Condizioni basali di perfusione	57
5.3 Curve dose-risposta di Cts-WT, Cts-P370L, Cts-G364S	57
5.4 Preparati isoproterenolo (Iso) stimolati	58
5.5 Preparati Endotelina-1 (ET-1) stimolati	58
5.6 Meccanismo d'azione della Cts-WT	59
5.6.1 Coinvolgimento di recettori di membrana	59
5.6.2 Coinvolgimento delle proteine G_{I/O}	59

5.6.3 Coinvolgimento del pathway dell'ossido nitrico (NO)	59
5.6.4 Coinvolgimento di un endotelio funzionale	60
5.6.5 Ruolo della fosfoinositide-3 Chinasi (PI-3-K) e della Fosfodiesterasi-2 (PDE2)	60
6 Analisi statistica	61
RISULTATI	63
1 CURVE DOSE-RISPOSTA DI WT-CTS, P370L-CTS E G364S-CTS: EFFETTI SU INOTROPISMO E LUSITROPISMO CARDIACI	64
2 AZIONE ANTI-ADRENERGICA DI WT-CTS, P370L-CTS, G364S-CTS	66
3 WT-CTS, P370L-CTS E G364S-CTS IN PREPARAZIONI ET-1 STIMOLATE	68
4 MECCANISMO D'AZIONE DELLA WT-CTS (CTS)	68
4.1 Coinvolgimento dei recettori di membrana	68
4.2 Coinvolgimento delle proteine G_{I/O}	69
4.3 Coinvolgimento del pathway dell'NO	70
4.4 Coinvolgimento di un endotelio funzionale	71
4.5 Ruolo della Fosfoinositide-3 Chinasi (PI-3-K) e della Fosfodiesterasi-2 (PDE2)	71
5 BIOTIN SWITCH ASSAY	72
DISCUSSIONE	92
1 CTS E SUE VARIANTI UMANE NELLA PERFORMANCE CARDIACA BASALE DI MAMMIFERO	93
2 AZIONE ANTI-ADRENERGICA DELLA CTS E DELLE SUE VARIANTI NATURALI	101

3 CTS IN PREPARATI ET-1 STIMOLATI	103
4 MECCANISMO D'AZIONE DELLA CTS	104
5 S-NITROSILAZIONE DELLE PROTEINE CARDIACHE	111
CONCLUSIONI	113
BIBLIOGRAFIA	117

Summary

Catestatin (Cts) is a 21 amino acidic neuropeptide derived from the proteolytic cleavage, on specific dibasic sites, of Chromogranin A (CgA₃₅₂₋₃₇₂) (Mahata et al., 1997), a protein localized in the catecholamine storage vesicles of adrenal medulla, endocrine, neuroendocrine and neuronal cells (Winkler & Fischer-Colbrie; 1992; Huttern et al., 1991).

Cts displays an important activity on the inhibition of nicotinic cholinergic stimulation of catecholamine release; this peptide, in fact, acts as a non-competitive nicotinic cholinergic antagonist. It binds the nicotinic receptor which is responsible for the secretion stimulus after the interaction with its physiological agonist, acetylcholine (Mahata et al., 1997). For this reason, CgA₃₅₂₋₃₇₂ is considered to play an important role in regulating catecholamine release from chromaffin cells and neurons through an autocrine negative feedback (Mahata et al., 1997); a function in autonomic control of cardio-vascular system is also proposed (Rao et al., 2007).

By exploring naturally occurring polymorphism in the amino acid sequence of CgA corresponding to Cts, three human variants were identified: Gly364Ser, Pro370Leu and Arg374Gln (Mahata et al., 2004). These peptides, compared with the wild type form, showed a different capacity in inhibiting nicotinic receptor and catecholamine release, with the following order of potency: Pro370Leu > WT > Gly364Ser > Arg374Gln.

In humans, CgA is elevated and its processing to Cts is diminished in hypertension (O'Connor et al., 2002). Diminished Cts is observed not only in hypertensive individuals but also in the early-normotensive offspring of patients with hypertension, suggesting that an early deficiency of Cts might play a pathogenic role in the subsequent development of the disease (Kim & Loh, 2005). Consistent with human findings, prevention of endogenous Cts expression by targeted ablation (knockout) of

the mouse CgA locus (CgA-KO) resulted in severe hypertension that can be rescued specifically by replacement of the Cts peptide (Mahapatra et al., 2005). Cts acts as a potent vasodilator in rats and humans. While the G364S-Cts variant caused profound changes in human autonomic activity and seemed to reduce the risk of developing hypertension (Rao et al., 2007). In addition, Cts has been shown to induce chemotaxis (Egger et al., 2008) and acts as an antimicrobial (Briolat et al., 2005), as well as an angiogenic peptide (Theurl et al., 2010).

On the basis of informations regarding Cts, the aim of this work was to identify a cardiotropic activity for this peptide and its variants, to describe a hypothetical anti-adrenergic action for them and to evaluate their action in the presence of Endothelin-1 (Et-1) stimulation. At last, attention was focused on understanding the mechanism of action responsible for the cardiac effects of WT-Cts, under both basal conditions and under adrenergic stimulation.

The study was performed using the isolated and perfused rat heart according to Langendorff, beside biomolecular techniques, such as immunoblotting, ELISA analysis and the Biotin Switch Assay.

Results displayed negative inotropic and lusitropic effects for WT-Cts and its variant P370L-Cts, but not for G364S-Cts. All the peptides showed an anti-adrenergic action, but G364s-Cts seemed to be the most powerful in doing this. Also ET-1 inotropism and vasoconstriction were antagonized by the peptides.

Analysis of WT-Cts mechanism of action point out involvement of β_2/β_3 -adrenergic receptors (ARs) and ET_B receptor, underlining an interest of G_i proteins, IP-3-k, Nitric Oxide (NO) pathway and PDE2. Involvement of a functional endothelium was demonstrated. The key role established for NO suggested evaluation of cardiac protein

S-Nitrosylation, that demonstrated an increase in β -arrestin and phospholamban (PLN) S-nitrosylation.

Taken together, these data strongly support the hypothesis that Cts may be a component of an endocrine/paracrine regulation of cardiac function. In fact, in the rat heart, CgA is stored in nonadrenergic myoendocrine atrial cells in association with atrial natriuretic peptide (Steiner et al., 1990) and CgA-derived fragments may also originate from cardiac sympathetic nerve termini (Miserez et al., 1992).

The cardioactive property of Cts may also add a new piece of information to the expanding and fascinating area of brainheart connections, as epitomized by various models of stress, including human neurogenic heart disease, in which the myocardium is excitotoxically damaged by abnormally high levels of catecholamines, either circulating or released by cardiac sympathetic nerve terminals (Samuels, 2007).

PREMESSA E SCOPO

La Cts è un frammento peptidico di 21 aminoacidi, derivante dal clivaggio proteolitico della Cromogranina A (CgA) e prodotto all'interno dei granuli secretori delle cellule cromaffini della midollare dei surreni e delle fibre nervose simpatiche post-gangliari (Mahata et al., 1997). Essa viene rilasciata insieme alle catecolamine (CAs) ed alla CgA in seguito a stimolazione colinergica, mediata dal recettore nicotino, e rappresenta un importante modulatore autocrino a feedback negativo di questo processo di secrezione (Mahata et al., 1997).

E' stato dimostrato che la Cts agisce mediante un antagonismo di tipo non competitivo sul recettore nicotino bloccando la corrente ionica che evoca lo stimolo per il rilascio catecolaminergico (Herrero et al., 2002); oltre ad inibire la secrezione delle CAs, essa è in grado di bloccare la desensitizzazione recettoriale dovuta ad una stimolazione ripetuta e/o persistente, evitando il blocco della trasmissione simpatica (Mahata et al., 1999). E' stato individuato un suo ruolo anche nell'ambito della trascrizione, in quanto si è dimostrata capace di inibire lo stimolo trascrizionale accoppiato alla stimolazione della secrezione catecolaminergica, sempre mediante interazione inibitoria sul recettore nicotino (Mahata et al., 2003).

Studi condotti su ratti *in vivo* hanno dimostrato che la Cts determina una potente vasodilatazione attraverso l'induzione del rilascio di istamina, la quale agisce sui recettori H₁ provocando un aumento della produzione di ossido nitrico (NO) (Kennedy et al., 1998); anche recentissimi studi condotti *in vivo* su individui umani hanno evidenziato vasodilatazione (Fung et al., 2010).

È stato dimostrato che soggetti ipertesi e soggetti normo-tesi, con una storia familiare di ipertensione, presentano ridotti livelli circolanti di Cts, a dimostrazione del fatto che tale diminuzione possa rappresentare la prima manifestazione di un successivo sviluppo della patologia (O'Connor et al., 2002). Studi atti ad individuare polimorfismi a livello

del locus genico della CgA hanno rivelato l'esistenza di tre ricorrenti mutazioni puntiformi, nella regione corrispondente alla Cts, che si manifestano nell'espressione di tre varianti umane del peptide (Wen et al., 2004). Difatti, in alcuni individui, sebbene con una frequenza relativamente bassa, ricorrono naturalmente le forme modificate Glicina 364 Serina (G364S-Cts), Prolina 370 Leucina (P370L-Cts) ed Arginina 374 Glutamina (A374G-Cts) che differiscono per potenza ed efficacia rispetto alla forma WT (Mahata et al., 2004). Particolare attenzione è rivolta alla forma G364S-Cts che sembra causare, nei portatori, profondi cambiamenti dell'attività nervosa autonoma associati ad un ridotto rischio di sviluppare ipertensione (Rao et al., 2007).

Sono state evidenziate per la Cts anche un'azione antimicrobica (Briolat et al., 2005), chemiotattica (Egger et al., 2008) ed angiogenetica (Theurl et al., 2010).

Un'informazione che aggiunge prestigio al ruolo della Cts come peptide capace di modulare la performance cardiaca in maniera autocrina/paracrina è la scoperta circa la sua produzione intracardiaca (Biswas et al., 2010) insieme a quella già stabilita per la CgA (Pieroni et al., 2007).

Alla luce dei dati derivanti da studi effettuati sia *in vivo* che *in vitro*, va delineandosi per la Cts un ruolo di primaria importanza nell'ambito della fisio-patologia cardiovascolare degli organismi, principalmente come modulatore autocrino/paracrino dell'attività miocardica.

Pertanto, scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di investigare il possibile ruolo cardiotropico della WT-Cts e delle sue varianti P370L-Cts e G364S-Cts nonché una loro eventuale attività anti-adrenergica ed anti-endotelinergica. L'attenzione è stata, poi, focalizzata sulla forma wild type della Cts al fine di individuare un meccanismo d'azione responsabile degli effetti osservati per il peptide in condizioni basali e in presenza di stimolazione adrenergica.

INTRODUZIONE

1 La Cromogranina A

La Cromogranina A (CgA) è stato il primo membro della famiglia delle Granine ad essere isolato e caratterizzato.

Le Granine, proteine a carattere secretorio, sono i prodotti di distinti geni, contraddistinte da un eccesso di residui amminoacidici acidi che conferiscono loro una netta carica positiva. Esse sono distribuite ubiquitariamente nelle cellule secretorie del sistema nervoso e del sistema neuroendocrino diffuso di vertebrati e invertebrati (Helle, 2004). Appartengono a questa famiglia anche la Cromogranina B (CgB), la Secretogranina II (SgII) (Huttner et al., 1991), e le Secretogranine III (SgIII), IV (SgIV), V (SgV), VI (SgVI), E VII (SgVII) (Helle, 2004).

Quando dal cDNA è stata identificata la sequenza primaria della CgA bovina come una proteina di 46 kDa (Benedum et al., 1986; Iacangelo et al., 1986) si è pensato che la forma matura di tale proteina potesse differire, nei mammiferi, non solo per sequenza primaria ma pure per estensione, essendo la proteina bovina (bCgA₁₋₄₃₁) più corta di quella umana (hCgA₁₋₄₃₉) e di quella di ratto (rCgA₁₋₄₄₈) (Iacangelo, Okayama & Eiden, 1988). Tuttavia, confrontando la regione N- e la regione C-terminale di diverse specie, rispettivamente la CgA₁₋₇₆ e la CgA₃₁₆₋₄₃₁, è stato riscontrato un elevato grado di omologia e conservazione, che suggerisce una loro importanza per le proprietà di ormone della CgA (Helle et al., 2007; Winkler & Fischer-Colbrie, 1992); contrariamente la regione centrale presenta una certa variabilità (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992). Una costante della struttura della CgA di tutte le specie è rappresentata dal ponte disolfuro formato dai due residui di cisteina 17 e 38 (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992) e dall'elevato contenuto in residui amminoacidici acidi che sembrano

essere indispensabili per il sequestro dei peptidi e degli ormoni nei granuli secretori (Taupenot et al., 2003).

Nello specifico, la CgA umana è una proteina acida solubile di 439 aminoacidi (~48 kDa), il cui gene (FIG. 1), costituito da 8 esoni e mappato in corrispondenza del cromosoma 14q32.12, genera un trascritto nucleotidico di 2043 bp delle quali 1374 vengono tradotte in una proteina di 457 aa (comprendenti anche un peptide segnale di 18 residui aminoacidici), mentre 260 bp e 409 bp rimangono regioni non tradotte (Konecki et al., 1987; Mouland et al., 1994; Mahata et al., 1997).

La CgA, inizialmente è stata individuata nelle vescicole di deposito delle CAs nella midollare del surrene (Blaschko et al., 1967; Schneider et al., 1967), ma studi successivi hanno evidenziato una sua localizzazione anche a livello dei granuli secretori delle cellule endocrine, esocrine, neuroendocrine e neuronali (Huttner et al., 1991; Taupenot et al., 2003). Nell'uomo adulto, la maggiore sorgente di CgA è la midollare del surrene, seguono poi, in ordine di contenuto, l'ipofisi, il pancreas, lo stomaco, l'intestino tenue, il cervello (corteccia frontale), le paratiroidi e la tiroide (Takiyyuddin et al., 1990).

Il principale compito della CgA all'interno dei granuli secretori è il controllo della loro pressione osmotica attraverso il sequestro degli ioni Ca^{2+} , dell'ATP e dei peptidi o degli ormoni che fisiologicamente vi si trovano localizzati, insieme ai quali viene rilasciata in seguito a precisi stimoli (Winkler e Fischer-Colbrie, 1992; O'Connor e Defetos, 1986; Parmer et al., 1993). Nel plasma umano, normalmente, la concentrazione di CgA è circa pari a 0.5 nM (O'Connor et al., 1999).

Accanto a questo ruolo regolatorio, la CgA possiede, però, altre importanti azioni biologiche scoperte solo di recente come la capacità di agire come pro-ormone, la capacità di modulare la biogenesi dei granuli secretori ed il coinvolgimento in una serie di patologie umane tra cui i tumori neuroendocrini, l'ipertensione e l'infarto cardiaco.

Diversi studi hanno dimostrato la presenza della CgA nei granuli secretori di cellule mioendocrine atriali di ratto e la sua co-localizzazione con l'ANP (Steiner et al., 1990). In seguito, il peptide ed i frammenti da esso derivati sono stati riscontrati sia a livello delle fibre del Purkinje atriali e ventricolari (Weiergraber et al., 2000) che nelle terminazioni nervose simpatiche (Miserez et al., 1992). Questi studi hanno fatto ipotizzare una produzione intracardiaca di CgA, poi confermata da Glattard e collaboratori (2006) nel miocardio di ratto, e da Pieroni e collaboratori (2007) nel miocardio umano.

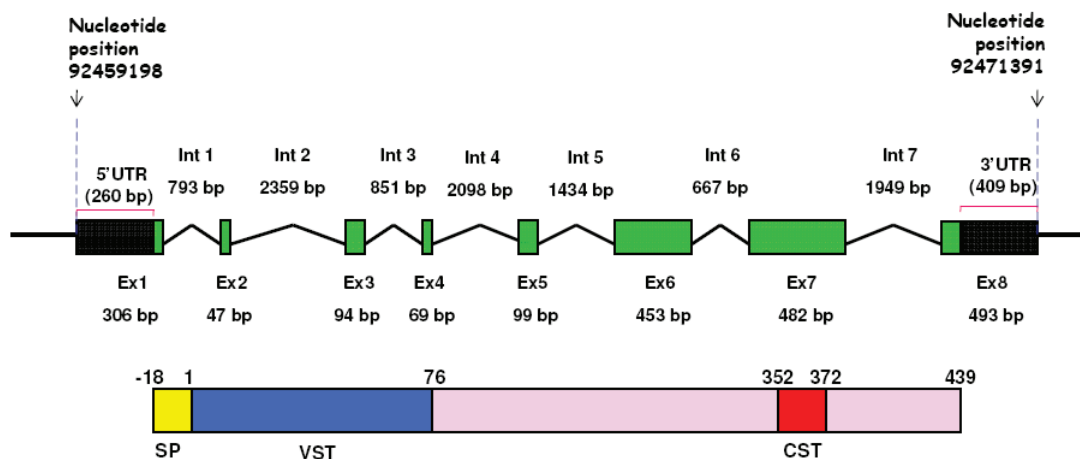


FIGURA 1. Rappresentazione schematica del gene della CgA umana e del suo prodotto proteico (VST= Vasostatina-1, CgA₁₋₇₆; CST= Cts, CgA₃₅₂₋₃₇₂) (Sabu et al., 2010).

1.1 CgA: il ruolo di pro-ormone

La CgA rappresenta il precursore di peptidi biologicamente attivi, di minori dimensioni, capaci di regolare in maniera autocrina la secrezione neuroendocrina di varie cellule (Metz-Boutigue et al., 1993; Parmer et al., 1993). Infatti, la sua struttura primaria rivela la presenza di 8-10 paia di siti dibasici, altamente conservati, che rappresentano il

substrato di diverse proteasi (PC1/3, PC2, plasmina, etc.) da cui vengono generati peptidi più piccoli (Wu et al., 1991; Parmer et al., 1993). Da un punto di vista biologico, importanti sono alcune modificazioni post-traslazionali come le glicosilazioni e le solforilazioni (Strub et al., 1996). I livelli di queste modificazioni post- traslazionali e il processamento proteolitico possono differire da tessuto a tessuto (Metz-Boutigue et al., 1993)

I peptidi CgA-derivati in grado di modulare l'attività di diversi tipi cellulari sono: la Pancreastatina (CgA₂₄₈₋₂₈₈), che inibisce il rilascio di insulina glucosio-dipendente dalle cellule β del pancreas (Tatemoto et al., 1986); la β -granina (rCGA₁₋₁₁₄) (Drees and Hamilton, 1994; Hutton et al., 1987) e la Parastatina (Fasciotto et al., 1993), che inibiscono il rilascio dell'ormone paratiroideo (CgA₃₄₇₋₃₇₉); la Cts (hCgA₃₅₂₋₃₇₂), che inibisce il rilascio di CAs (Simon et al., 1988); la Vasostatina-1 (CgA₁₋₇₆) e la Vasostatina-2 (CgA₁₋₁₁₃), capaci di rilassare la muscolatura liscia vasale (Aardal and Helle, 1992; Helle et al., 1993; Drees et al., 1991).

In particolare, per le Vasostatine (Vs) è già stato descritto un ruolo come “stabilizzatori endocrino/paracrini cardiaci”, soprattutto in seguito a stimolazione adrenergica, una classica risposta fisiologica allo stress, (Cerra et al., 2006) e in diverse patologie cardiache (Pieroni et al., 2007). La VS-1, inoltre, è in grado di determinare un inotropismo negativo dose-dipendente mediante antagonismo di tipo funzionale non competitivo sulla stimolazione adrenergica nel cuore di ratto (Cerra et al., 2006), manifestando insieme a questo effetto anche un'azione cardioprotettiva (Cappello et al., 2007).

1.1 CgA e biogenesi dei granuli secretori

I granuli secretori sono organuli specializzati, presenti all'interno di particolari tipi cellulari, preposti all'immagazzinamento di molecole secretorie che possono essere rilasciate mediante esocitosi in risposta a stimoli extracellulari, la cui formazione prevede l'espressione di una serie di geni che coordinano la loro biogenesi (Palade, 1975).

La CgA potrebbe rappresentare un interruttore "on/off" della biogenesi dei granuli secretori in quanto strettamente correlata ai meccanismi fondamentali per il sequestro e l'immagazzinamento di molecole bioattive sia nella midollare del surrene che nel sistema neuroendocrino. Poiché La CgA non è localizzata a livello del nucleo cellulare si ipotizza che essa possa agire direttamente sull'apparato di Golgi e sul pathway secretorio (Day & Gorr, 2003).

Sperimentalmente è stato, infatti, dimostrato che l'espressione di CgA è in grado di indurre la formazione di granuli secretori elettroendocrini anche a livello di cellule non endocrine (Kim et al., 2001; Huh et al., 2003; Beuret et al., 2004) e che, invece, una sua deplezione riduce severamente questo processo anche in linee cellulari neuroendocrine (Kim et al., 2001). E' stato, inoltre, provato che in assenza di CgA i livelli di altre proteine vescicolari, come la Cromogranina B, la Carbossipeptidasi E e la Sinaptotagmina sono ridotti a causa di una loro aumentata degradazione, mentre una trasfezione di CgA previene questa diminuzione (Kim et al., 2003).

In aggiunta, la correlazione tra produzione di CgA e numero di granuli secretori (Kim et al., 2001) suggerisce che la maturazione degli organuli è titolata dalla presenza di CgA. Alcuni autori ritengono che la CgA possa agire sulla condensazione del contenuto dei granuli secretori (Gorr et al., 1987), aggregandosi o legando in maniera specifica

proteine sequestrate al loro interno (Gorr et al., 1992; Gorr et al., 1989). La CgA potrebbe, inoltre, agire come proteina tampone contribuendo al mantenimento del pH acido lumenale dei granuli, in maniera del tutto simile a quanto descritto per i proteoglicani solfonati delle cellule esocrine (Venkatesh & Gorr, 2002).

In ogni caso, in assenza di CgA il contenuto dei granuli, anche quelli maturi, non viene trattenuto al loro interno ma viene trasportato verso il compartimento endosomiale-lisosomiale grazie ad uno specifico pathway secretorio (Arvan & Castle, 1998) per essere degradato (Kim et al., 2001). Da questo punto di vista, quindi la CgA potrebbe agire come un agente di aggregazione o come un fattore di assemblaggio capace di prevenire il trasferimento del contenuto dei granuli verso i lisosomi.

Pertanto, è stato proposto che la CgA possa regolare la biogenesi ed il numero dei granuli che si formano non a livello genico in qualità di gene master ma, piuttosto, a livello post-trascrizionale, modulando la stabilità e la reperibilità delle proteine necessarie a tale processo (Kim et al., 2003). (Fig. 2)

1.3 CgA e patologie cardiovascolari

L'ipertensione, o elevata pressione sanguigna arteriosa, è la principale patologia cardiovascolare tra le popolazioni urbane, considerata la sua incidenza (~30-45%) (Lloyd-Jones et al., 2010; Gong & Hubner, 2006). Si tratta di una patologia asintomatica e cronica, ad eziologia per lo più sconosciuta, accompagnata da serie complicazioni come l'infarto del miocardio, l'insufficienza cardiaca congestizia, l'ictus, l'insufficienza renale cronica terminale (ESRD) ed il danno alla retina. Viene considerata come una malattia dai tratti complessi, causata dalla predisposizione di diversi geni e da uno stile di vita poco sano (Gong & Hubner, 2006).

I principali candidati per lo sviluppo della patologia ipertensiva sono stati identificati nel sistema renina-angiotensina-aldosterone, nel sistema nervoso simpatico, nel sistema chinina-callicreina, nell'endotelina e nell'ossido nitrico (Gong & Hubner, 2006; Pravenec & Kurtz, 2007).

Poiché la CgA è distribuita in maniera ubiquitaria nei granuli secretori del sistema endocrino e nervoso e poiché viene liberata insieme alle CAs ed ai neuropeptidi nella circolazione sistemica, essa potrebbe essere utilizzata come un significativo indicatore dell'attività simpatica e surrenale in condizioni fisiologiche e patologiche (Taupenot et al., 2003). Infatti, la concentrazioni plasmatica di CgA è strettamente correlata al grado di rilascio delle CAs (Dimsdale et al., 1992), lasciando ipotizzare che la sua valutazione possa essere un fattore indicativo della patogenesi dell'ipertensione essenziale; difatti, è anche documentato il rapporto tra ipertensione essenziale, aumentata attività simpatica ed aumentati livelli di norepinefrina (Goldstein et al., 1990).

In soggetti umani sani, i livelli plasmatici di CgA si aggirano intorno a 5 nM, sebbene in letteratura si possano riscontrare anche valori inferiori (fino a 0,5 nM), forse dipendentemente dai metodi analitici utilizzati e dalla specificità degli anticorpi impiegati (Helle et al., 2007). Peculiarmente, anche l'ora di prelievo dei campioni di sangue (mattina, pomeriggio o sera) sembra incidere sui livelli di CgA rintracciati, essendoci un incremento di circa il 40% dalla mattina alla sera, che dimostra un ritmo circadiano nella concentrazione plasmatica della proteina (Bernini et al., 2002, Helle et al., 2007)

Diversi studi hanno dimostrato che sia nei roditori che negli uomini l'ipertensione genetica è strettamente correlata ad un aumento dei livelli plasmatici di CgA, 99.9 ± 6.7 ng/mL rispetto ai 62.8 ± 4.7 ng/mL dei soggetti normotesi (Takiyyuddin et al., 1995), e ad un'accresciuta biogenesi dei granuli secretori (Takiyyuddin et al., 1995). Inoltre,

studi effettuati su gemelli hanno evidenziato una significativa ereditarietà delle concentrazioni plasmatiche di CgA (Takiyyuddin et al., 1995). A conferma di tali dati ottenuti su soggetti umani, in modelli di ipertensione genetica, come i ratti ed i topi, l'espressione del gene per la CgA nella midollare del surrene è significativamente più elevata, supportando l'ipotesi di un'associazione fenotipica tra elevati livelli di CgA e ipertensione essenziale (Schober et al., 1989; O'Connor et al., 1999).

Il rilascio di CAs viene successivamente bloccato dal frammento CgA-derivato Cts, co-secreto insieme alla CgA ed alla norepinefrina, che antagonizza gli effetti simpatici abbassando la pressione sanguigna (Taupenot et al., 2003; Mahata et al., 1997) (FIG. 2). I soggetti ipertesi presentano, oltre che elevati livelli plasmatici di CgA, anche ridotti livelli di Cts (O'Connor et al., 2002).

Inoltre, studi effettuati da Mahapatra e collaboratori su topi *knock out* per il gene della CgA hanno fornito le prove sperimentali a sostegno dell'importante ruolo di questo peptide nell'evoluzione dell'ipertensione essenziale; essi hanno dimostrato che la mancata espressione del gene per la CgA è in relazione con una riduzione del numero e delle dimensioni dei granuli secretori, con un aumento della pressione sanguigna e con un ingrandimento del ventricolo sinistro; invece, una trasfezione degli stessi topi con il gene umano della CgA, o la somministrazione di Cts esogena, sono risultati in grado di contrastare l'insorgenza e la manifestazione di tali effetti (Mahapatra et al., 2005).

I livelli sierici di CgA aumentano sostanzialmente, fino a 10-20 nM dipendentemente dalla gravità del disturbo, nell'insufficienza cardiaca cronica (Ceconi et al., 2002), nell'infarto del miocardio complicato (Estensen et al., 2006) e nella sindrome coronarica acuta (Jansson et al., 2009). Tali dati documentano che i livelli circolanti di CgA possono servire come indicatore prognostico indipendente per pazienti con infarto

del miocardio complicato (Estensen et al., 2006), predicendo anche la mortalità a lungo termine e l'insufficienza cardiaca nelle sindromi coronariche acute (Jansson et al., 2009). La concentrazione plasmatica di CgA aumenta anche in pazienti con cardiomiopatia dilatativa e cardiomiopatia ipertrofica, rispetto a controlli sani (Pieroni et al., 2007), a causa del sostanziale contributo nel rilascio di CgA da parte delle cellule miocardiche (Pieroni et al., 2007). Pertanto, elevate concentrazioni di CgA nella circolazione sono correlate all'ipertensione essenziale, all'infarto del miocardio ed alla cardiomiopatia, riflettendo un ruolo cruciale di questa proteina come biomarker per lo stato delle malattie cardiovascolari.

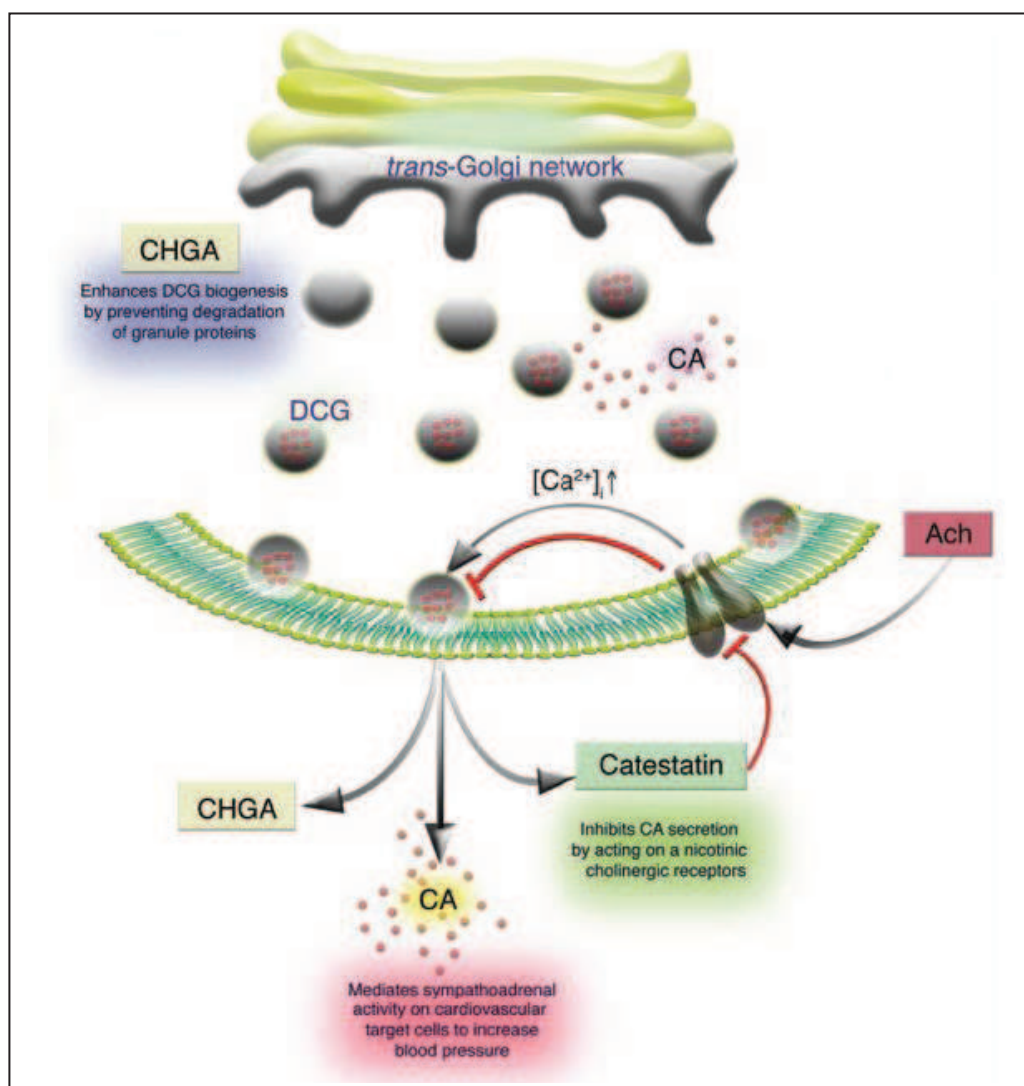


FIGURA 2. Correlazione tra biogenesi dei granuli secretori CgA-mediata, rilascio delle CAs ed inibizione da parte della Cts (Kim e Loh, 2005).

1.4 CgA e produzione intracardiaca

Circa 30 anni fa, grazie alla scoperta dei peptidi natriuretici, i primi ad essere definiti ormoni cardiaci, è stata dimostrato il nuovo e importante ruolo del cuore come organo endocrino (De Bold et al., 1981). In particolare, con l'identificazione (Huang et al., 1996) di una popolazione di cellule cardiache intrinseche adrenergiche (ICA) sia nel cuore di roditori che nel cuore umano è stata avvalorata l'ipotesi secondo cui il cuore possa fungere da interfaccia tra i terminali nervosi noradrenergici e le CAs circolanti secrete dalla midollare del surrene.

Tra le diverse sostanze individuate come prodotti cardiaci, sicuramente riveste un ruolo importante la scoperta relativa alla produzione intracardiaca di CgA soprattutto alla luce delle sue già note implicazioni nelle patologie cardiovascolari

Difatti, la CgA è espressa in vari tipi cellulari cardiaci. Studi di immunistochemica hanno rilevato la sua presenza nei granuli secretori di cellule mioendocrine atriali noradrenergiche del cuore di ratto. Peculiarmente, in questi granuli mioendocrini, la CgA è co-localizzata insieme al peptide ANP e subisce processamento proteolitico addirittura maggiore che nella midollare del surrene (Steiner et al., 1990). Successivamente la proteina è stata identificata anche nelle fibre di conduzione di Purkinje, sia di atrio che di ventricolo, e nei cardiomiociti (Weigergraber et al., 2000).

Anche il frammento CgA derivato, Vs-1, è stato identificato in estratti di cuore di ratto, a dimostrazione di un suo ruolo nella fisiologia cardiaca mediante azione autocrina/paracrina (Glattard et al., 2006). Evidenze circa la produzione ed il rilascio di CgA da parte del miocardio umano sono state fornite da Pieroni e collaboratori, i quali attraverso un sistema di dosaggio ELISA sono riusciti a valutare i livelli della proteina in tessuto di ventricolo sinistro di miocardio di soggetti con cardiomiopatia dilatativa ed ipertrofica (Pieroni et al., 2007).

Una co-localizzazione insieme al peptide natriuretico (BNP) cerebrale è stata dimostrata in cardiomiociti ventricolari, ma esistono anche dati a supporto di una correlazione tra CgA e livelli circolanti di BNP (Pieroni et al., 2007).

In tessuto miocardico sano generalmente non viene riscontrata la proteina, né mediante ELISA né mediante immunistochemica, sebbene grazie alla RT-PCR sia stato comunque individuato il relativo mRNA (Pieroni et al., 2007).

Si ipotizza che l'iperproduzione di CgA a livello miocardico possa rappresentare un meccanismo regolatorio del rimodellamento cardiaco in pazienti con infarto del miocardio, cardiomiopatie e insufficienza cardiaca.

2 La Catestatina

Nel 1988, Simon e collaboratori individuarono un frammento generato dalla proteolisi della CgA capace di inibire il rilascio di CAs da colture di cellule cromaffini di bovino. Ciò nonostante, per circa dieci anni da quel momento l'identità di tale peptide rimase indefinita. Infatti, solo nel 1997, Mahata e collaboratori riuscirono ad identificare l'esatto dominio, all'interno della struttura della CgA bovina, capace di inibire il rilascio catecolaminergico, grazie alla sintesi di 15 peptidi, dall'estensione media di 22 aa, testati su cellule di feocromocitoma (PC12) (Mahata et al., 1997). Dei peptidi testati, solo uno risultava essere in grado di inibire la secrezione catecolaminergica indotta dalla stimolazione colinergica nicotinic sia su PC12 che su neuriti noradrenergici, tale peptide era il frammento CgA₃₄₄₋₃₆₄, da allora definito Cts proprio per questa sua attitudine inibitoria (Mahata et al., 1997). L'utilizzo di uno specifico anticorpo diretto contro questo peptide bloccava l'inibizione secretoria (Mahata et al., 1997) che tra l'altro risultava specifica solo nei confronti del rilascio di CAs indotto dalla

stimolazione nicotinic colinergica (Mahata et al., 1997). In effetti, tale inibizione non si manifesta nel caso di una secrezione stimolata da fattori diversi dall'attivazione del recettore nicotinic, come la depolarizzazione della membrana, lo ionoforo del calcio o l'alcalinizzazione delle vescicole secretorie (Mahata et al., 1997); allo stesso tempo, però, i recettori purinergici P2x delle PC12, che inducono secrezione in risposta all'ATP, non vengono inibiti dalla Cts (Lin et al., 1995). Poiché tali recettori appartengono alla stessa famiglia di recettori-canale (cationici attivati da ligandi extracellulari) cui appartiene il recettore nicotinic, è stata suggerita una certa specificità della Cts per questi ultimi.

Difatti la trasduzione del segnale cationico (Na^+ , Ca^{2+}) viene selettivamente distrutta dalla Cts. Così come accade per i classici antagonisti nicotinici, la Cts blocca l'ingresso di Na^+ nel citosol, stimolato dal recettore nicotinic, nel citosol bloccando parallelamente la secrezione delle CAs; inoltre, blocca anche l'ingresso di Ca^{2+} dallo spazio extracellulare verso il citosol, ma solo se prodotto dall'attivazione nicotinic colinergica (Mahata et al., 1997).

Anche elevate dosi di Nicotina non sono in grado di abolire tale effetto, suggerendo un antagonismo nicotinic di tipo non competitivo (Mahata et al., 1997) per la Cts, sebbene sia ancora oggetto di studio l'individuazione del suo esatto sito di interazione a livello della proteina recettoriale. Siccome, però, l'inibizione Cts indotta è rapidamente e completamente reversibile risulta difficile pensare che possa essere il legame al sito della nicotina responsabile dell'antagonismo osservato. Allo stesso tempo, poiché la Tossina della Pertosse non modifica tali effetti della Cts, sembra improbabile un'azione indiretta del peptide sul recettore nicotinic (Milligan, 1988). Alla luce di tali dati, per la Cts va delineandosi il ruolo di nuovo modulatore omeostatico autocrino con feedback

negativo nell'ambito dei meccanismi di controllo del rilascio di Cas dalle cellule cromaffini e dai neuroni.

La biogenesi della Cts fisiologicamente attiva richiede il processamento proteolitico del suo precursore, la CgA, all'interno dei granuli secretori delle cellule cromaffini della midollare del surrene e delle cellule endocrine e neuroendocrine, secondo un processo che prevede il coinvolgimento di specifiche proteasi e specifici meccanismi che sono ancora non propriamente chiari.

La regione della Cts all'interno della struttura primaria della CgA bovina è delimitata all' N- e al C-terminale da motivi (RXXR) riconosciuti dalla furina (Molloy et al., 1992) e, ancora, al C-terminale da un sito dibasico (RR). In particolare, i siti RXXR e RR del C-terminale sono altamente conservati tra le specie di mammifero, mentre il sito RXXR all'N-terminale è presente solo nella CgA bovina e in una particolare variante della CgA umana (Helman et al., 1988).

E' stato dimostrato che la plasmina, importante enzima fibrinolitico, *in vitro* è in grado di clivare la CgA, generando Cts attiva sulla secrezione catecolaminergica di PC12 (Biswas et al., 2008); ma anche il coinvolgimento delle serina proteasi PC1/PC3 e PC2 è ben documentato (Doblinger et al., 2003; Scamuffa et al., 2006). Altri studi hanno rilevato la presenza, all'interno delle vescicole secretorie, dell'enzima Catepsina L (CTSL), una cisteina proteasi recentemente descritta come nuovo enzima proteolitico per i neuropeptidi (Yasothornsrikul et al., 2003; Funkelstein et al., 2008) Questi studi indicano che la CgA possa essere substrato per l'attività della CTSL e che la stessa Cts possa essere generata dall'intervento di tale enzima (Biswas et al., 2009).

In ogni caso, la sequenza aminoacidica della CgA, corrispondente alla regione della Cts è altamente conservata tra le specie di mammifero (uomo CgA₃₅₂₋₃₇₂, bovini CgA₃₄₄₋₃₆₄,

ratto CgA₃₆₇₋₃₈₇) nelle quali il peptide mostra attività del tutto simili (Mahata et al., 1997).

2.1 Struttura della Cts

La porzione di CgA bovina corrispondente alla Cts biologicamente attiva è formata da due foglietti β anti-paralleli connessi da un'ansa aminoacidica cationica (Tsigenly et al., 1998). Prima che la CgA sia sottoposta a clivaggio proteolitico, la regione della Cts è costretta, per motivi sterici e di repulsione elettrostatica, ad assumere una posizione all'interno della molecola tale per cui la sua attività è inibita, almeno fino al momento in cui subentra il processamento proteolitico (Simon et al., 1988; Mahata et al., 1997). Inoltre, quando, durante la proteolisi, vengono allontanate le sequenze di aminoacidi che fiancheggiano la Cts, la forza in grado di contrastare il dispiegarsi della struttura terziaria e, quindi la perdita dell'attività, sembra risiedere nelle interazioni idrofobiche che intercorrono tra le catene laterali apolari di Leu³⁴⁸, Phe³⁵⁰, Tyr³⁵⁵, Phe³⁶⁰, Pro³⁷⁰, Leu³⁶² e Leu³⁶⁴ (Tsigenly et al., 1998). Sembra che questo centro idrofobico sia capace di mantenere stabilmente la conformazione tipica della Cts (Tsigenly et al., 1998).

Studi di mutagenesi, effettuati sostituendo selettivamente particolari aminoacidi della struttura primaria della Cts con Alanina (Ala), hanno consentito l'individuazione di residui indispensabili per l'attività del peptide. Infatti, la sostituzione dei residui di Arg³⁵¹, Arg³⁵³ e Arg³⁵⁸ con Ala comporta un sostanziale aumento dei valori di IC₅₀ della Cts, a dimostrazione del cruciale ruolo funzionale di questi residui di arginina (Tsigenly et al., 1998). Successivamente è stato dimostrato che le tipiche azioni della Cts sono garantite da un frammento peptidico compreso nella parte centrale della sequenza primaria della CgA, corrispondente alla CgA₃₄₄₋₃₅₈ (Mahata et al., 2000).

La disposizione tridimensionale che la Cts assume nello spazio è responsabile anche della carica positiva che la molecola reca a livello dell'ansa che congiunge i due foglietti β . Questo assetto suggerisce l'orientamento direzionale con cui il peptide potrebbe andare ad interagire col dominio extracellulare, molto negativo, del recettore nicotinic (Tsigenly et al., 1997).

2.2 Inibizione della secrezione catecolaminergica

Il recettore colinergico nicotinic (nAChR) appartiene alla famiglia dei recettori-canale, complessi proteici intrinseci di membrana. Si tratta di un eteropentamero costituito da 4 subunità diverse presenti in un preciso rapporto stechiometrico, generalmente 2α , 1β , o 1ϵ , 1γ e 1δ (Gotti et al., 1997). Quando il recettore interagisce a livello extracellulare con l'acetilcolina (ACh), il suo ligando fisiologico, esso subisce una modificazione conformazionale che rende il poro del canale permeabile a Na^+ , il cui ingresso nella cellula provoca una depolarizzazione della membrana che si traduce in un potenziale eccitatorio. La depolarizzazione attiva canali per il Ca^{2+} voltaggio dipendenti e l'entrata di questo ione nella cellula rappresenta l'evento scatenante il processo di fusione dei granuli con la membrana, in quanto attiva la proteina vescicolare sinaptotagmina (Calakos e Scheller, 1996). Questo tipo di trasmissione del segnale è tipico delle sinapsi gangliari del sistema nervoso autonomo; in particolare, le fibre simpatiche post-gangliari e le cellule endocrine cromaffini della midollare del surrene, che esprimono sulla propria superficie recettori nicotinici, interpretano questa depolarizzazione come lo stimolo che induce il processo di fusione vescicolare e, quindi, la secrezione delle CAs.

La Cts è un potente inibitore del rilascio catecolaminergico determinato dalla stimolazione nicotinic colinergica con azione sulle cellule di feocromocitoma, sulle cellule endocrine e neuroendocrine (Mahata et al., 1997, 1998, 1999). Il peptide sembra agire come un antagonista colinergico nicotinic che blocca il segnale di trasduzione cationico, mediato da Na^+ e Ca^{2+} (Mahata et al., 1997).

Esperimenti effettuati su colture cellulari PC12 e su cellule cromaffini bovine, hanno dimostrato che la Cts (marcata con l'isotopo radioattivo ^{125}I) si lega con alta affinità e specificità alle superfici di queste cellule mediante interazioni col recettore nicotinic (Taupenot et al., 2000).

Procedure più specifiche hanno consentito l'individuazione del preciso sito di legame e del tipo di antagonismo recettoriale. Le cellule leganti la Cts marcata sono state trattate con concentrazioni crescenti di Carbamilcolina, un agonista del recettore colinergico nicotinic neuronale (nAChR), il quale, non riducendo l'entità del legame del peptide alla superficie cellulare, ha suggerito che il sito di legame per la Cts potesse essere un sito distinto da quello dell'agonista; ciò è stato dimostrato anche da studi farmacologici nei quali la Nicotina è risultata incapace di contrastare l'effetto inibitorio tipico del peptide a qualunque concentrazione (Mahata et al., 1997).

Inoltre, la Cts non è in grado di spiazzare l'agonista per nAChR Epibatidina e lascia inalterato il suo sito di legame, facendo ipotizzare un antagonismo di tipo non competitivo (Mahata et al., 1997).

L'antagonismo non competitivo è stato dimostrato esponendo colture cellulari di PC12, trattate con Cts- ^{125}I , alla Sostanza P, un inibitore del nAChR (Clapham & Neher, 1984; Livett & Marley, 1993). In questi esperimenti la sostanza P è stata in grado di spiazzare in maniera dose-dipendente la Cts dalla superficie cellulare (Taupenot et al., 2000). Considerato che la Sostanza P agisce mediante un legame diretto e non competitivo su

un sito diverso da quello dell'agonista Ach (Livett & Zhou, 1991) e che inibisce il legame della Cts al recettore, si è concluso che i due peptidi potessero interagire con lo stesso sito del nAChR e che la Cts potesse presentare un antagonismo non competitivo al pari della Sostanza P. La Cts, inoltre, presenta un'affinità maggiore per il recettore, come provato da valori di IC₅₀ inferiori rispetto a quelli della Sostanza P (Mahata et al., 1997).

Il sito di legame della Cts è anche diverso da quello di antagonisti nicotinici non competitivi di natura non peptidica e di piccole dimensioni, come l'Esametonio e la Clonidina, i quali penetrano all'interno del poro cationico per interagire con i domini ad α elica M2 (Taupenot et al., 2000).

Studi effettuati sulle membrane cellulari di *Torpedo Californica* arricchite di recettori nicotinici, hanno dimostrato che la Cts interagisce con il dominio extracellulare elettronegativo del complesso proteico, minimizzando le energie elettrostatiche e di Van Der Waals (Taupenot et al., 2000). In particolare, il legame sembra interessare regioni idrofobiche sulle subunità δ , γ , e β del nAChR: in questa configurazione di energia minima la Cts andrebbe ad occludere completamente il poro cationico del recettore (Tsigelny et al., 1998). Questo modello di interazione spiegherebbe anche l'antagonismo non competitivo del peptide nei confronti del nAChR.

Gli studi condotti *in vitro* sono stati recentemente supportati da studi *in vivo* condotti su topi transgenici, nei quali l'attivazione diretta del nAChR mediante infusione di nicotina aumentava di circa 2.7 volte il rilascio di CAs nel torrente circolatorio (Mahata et al., 2003). Il pretrattamento con Cts, invece, è in grado di ridurre di circa l'80% tale secrezione (Mahata et al., 2003), indicando che anche *in vivo* tale peptide agisce come antagonista nicotinic.

2.3 Blocco della desensitizzazione

Il fenomeno della desensitizzazione denota la perdita della capacità di rispondere a particolari stimoli, cui vanno incontro alcune cellule ed alcuni tessuti, quando vi sia una esposizione prolungata e/o ripetuta.

La desensitizzazione del recettore nicotinicò è stata descritta per la prima volta nella placca neuro-muscolare da Katz e Thesleff (1957) ma si manifesta anche a livello dei recettori neuronali. Poiché la Cts e la sostanza P interagiscono, presumibilmente, con lo stesso sito sul nAChR, inibendo il rilascio catecolaminergico (Taupenot et al., 2000), si è ipotizzato che il peptide CgA-derivato potesse avere in comune con la sostanza P anche la capacità di proteggere le cellule dalla desensitizzazione del recettore nicotinicò (Livett & Marley, 1993).

Esperimenti condotti su colture cellulari PC12 hanno, infatti, rivelato che la Cts non solo blocca il rilascio catecolaminergico nicotino-dipendente, ma riesce anche ad antagonizzare l'effetto desensitizzante provocato da una prima esposizione all'agonista nicotinicò: entrambi gli effetti sono dose-dipendenti, non competitivi e non cooperativi (Mahata et al., 1999). Il blocco della desensitizzazione da parte della Cts può risultare utile e vantaggioso per un organismo in circostanze che richiedono un aumento dell'attività simpatica; in casi come uno stress prolungato, la Cts potrebbe aumentare e sostenere il rilascio di CAs, proteggendo dalla desensitizzazione nicotinicò che, altrimenti, bloccherebbe la secrezione delle molecole bioattive (Mahata et al., 1999).

Tali dati sono di fondamentale importanza se si considera la capacità delle cellule cromaffini e degli assoni simpatici di generare autonomamente un antagonista endogeno in grado di agire a livelli cruciali dell'omeostasi catecolaminergica.

2.4 Accoppiamento “stimolo secrezione vescicolare-trascrizione”

L'attivazione del recettore nicotinic e la stimolazione della secrezione vescicolare sono accoppiati ad eventi cellulari che servono a compensare la deplezione catecolaminergica cui i granuli secretori vanno incontro: la sintesi di nuove molecole bioattive e la trascrizione della CgA. Lo stimolo nicotinic colinergico provoca depolarizzazione della membrana e conseguente ingresso di Ca^{2+} attraverso canali voltaggio dipendenti; questo ione è in grado di attivare la Proteina Chinasi K (PKC) la quale fosforila ed attiva la proteina MAPK (mitogen activated protein kinase) la cui azione culmina nell'attivazione, mediante fosforilazione, del fattore di trascrizione CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding Protein). Quest'ultimo lega specifiche sequenze di DNA delle quali è capace di stimolare la trascrizione in seguito a modificazione conformazionale. Nel caso dello stimolo trascrizionale associato al rilascio delle CAs ed evocato dall'attivazione del recettore nicotinic, CREB induce la trascrizione del gene codificante per la CgA (Mahata et al., 2003). Lo stesso processo può essere azionato indirettamente dalla reserpina, un inibitore del trasportatore vescicolare per le CAs (Mahata et al., 2003).

La Cts non solo blocca il rilascio di CAs, ma inibisce anche la risposta trascrizionale (FIG. 3), dovuta allo stimolo nicotinic, delle fibre simpatiche post-gangliari e delle cellule cromaffini della midollare del surrene (Mahata et al., 2003).

Esperimenti condotti *in vivo* su topi transgenici hanno dimostrato che il trattamento con nicotina aumenta fino a 2 volte l'espressione del gene per la CgA, mentre l'iniezione intraperitoneale con Cts inibisce del 90% tale fenomeno, confermando i dati ottenuti *in vitro*.

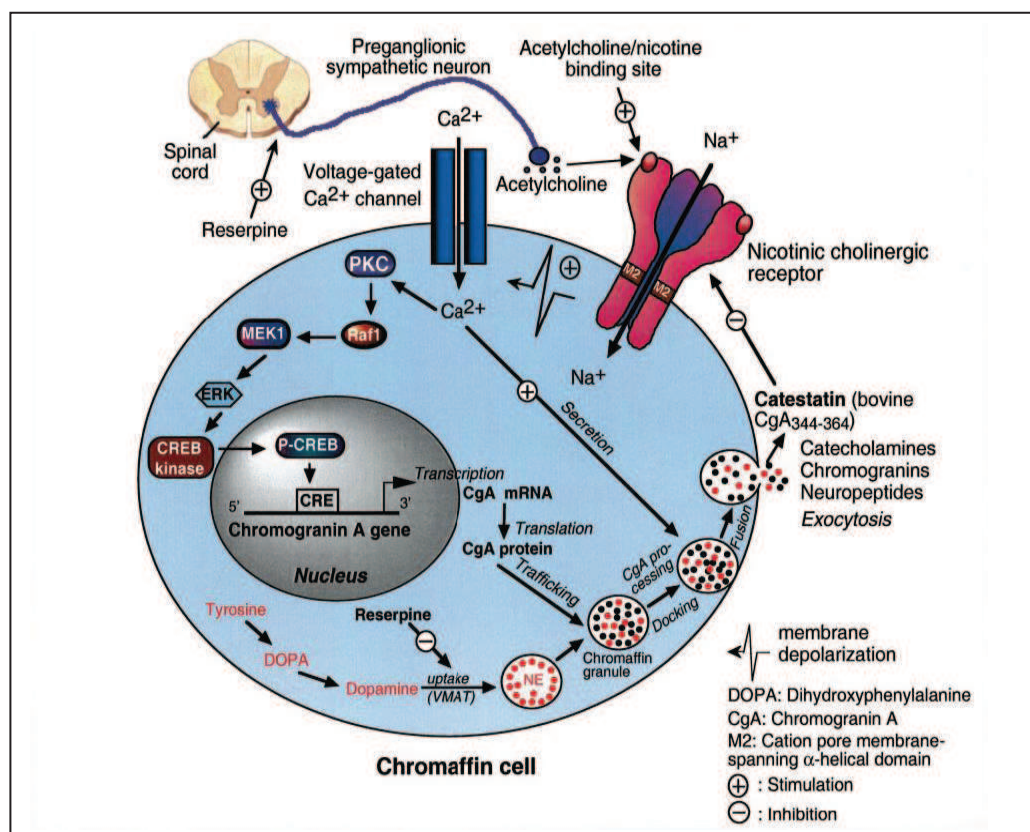


FIGURA 3. Azioni della Cts in seguito ad interazione con il recettore nicotinico: blocco del rilascio catecolaminergico ed inibizione della trascrizione.

2.5 Azione cardiovascolare *in vivo*

In vitro, la Cts agisce come un agente ganglioplegico in grado di inibire in maniera non competitiva il nAChR e di prevenire anche la sua desensitizzazione (Mahata et al., 1997, 1998). Poiché le molecole capaci di determinare un blocco a livello gangliare possono anche influenzare la pressione sanguigna, abbassandola mediante il rilascio di istamina (Fahmy e Soter, 1985), è stato ipotizzato che la Cts potesse sfruttare, *in vivo*, un meccanismo d'azione simile.

Studi effettuati su ratti maschi del tipo Sprague-Dawley, nei quali il flusso simpatico è stato attivato mediante stimolazione elettrica, hanno mostrato che la somministrazione endovenosa di Cts riduce la risposta pressoria con un effetto che persiste anche dopo

che l'azione adrenergica viene bloccata (Kennedy et al., 1998). La Cts aumenta i livelli circolanti di istamina di circa 21 volte, ed il pretrattamento con un antagonista del recettore H₁, come l'idrazina, previene l'azione vasodilatatoria del peptide (Kennedy et al., 1998). Inoltre, sebbene la Cts non alteri i livelli plasmatici di norepinefrina, essa determina un aumento delle concentrazioni di epinefrina di circa 11 volte (Kennedy et al., 1998) effetto questo che sembrerebbe essere mediato dall'istamina, come dimostra il fatto che antagonisti H₁ bloccano l'evento, mentre la somministrazione di istamina esogena lo stimola (Macquin-Mavier et al., 1988). Difatti, la capacità dell'istamina di indurre il rilascio di epinefrina dal surrene in alcune specie (Staszewska-Barczak, 1965; Macquin-Mavier et al., 1988) e da cellule cromaffini, *in vitro*, è ben documentata (Zhang et al., 1995). La vasodilatazione indotta dai recettori H₁ istaminergici viene ridotta dall'inibizione degli enzimi ossido nitrico sintasi (NOS) e aumentata dall'inibizione della fosfodiesterasi (PDE) del cGMP, suggerendo che l'istamina possa agire in parte mediante il rilascio di ossido nitrico (NO) con conseguente attivazione della guanilato ciclasi e produzione di cGMP (Champion & Kadowitz, 1997). Inoltre, la vasodilatazione istamina-indotta è ridotta anche dall'inibizione dei canali per il K⁺ sensibili all'ATP, suggerendo un coinvolgimento anche di tali strutture proteiche (Champion & Kadowitz, 1997).

Poiché l'epinefrina può causare sia vasodilatazione, mediante i recettori β₂-adrenergici, sia vasocostrizione, mediante i recettori α₁-adrenergici (Macquin-Mavier et al., 1988), è possibile che alcuni degli effetti depressori della Cts possano essere mediati da tale ormone.

In ogni caso, *in vivo* la Cts mostra una potente azione vasodilatatoria mediata dal rilascio di istamina e dalla sua azione sui recettori H₁.

Il meccanismo più probabile attraverso il quale la Cts può indurre il rilascio di istamina sembrerebbe essere rappresentatao dalla stimolazione dei mastociti. Nel ratto, il rilascio di istamina da parte dei mastociti può avvenire secondo un pathway IgE-dipendente, oppure grazie a peptidi cationici anfifilici, come il mastoparano (veleno di vespa), la neurotensina (NT), la sostanza P (SP), il neuropeptide Y (NPY) (Krüger et al., 1982; Higashijima et al., 1988; Mousli et al., 1990). Poiché la Cts condivide con tali peptidi la natura chimica (cationica e anfifilica), la sua capacità di stimolare il rilascio di istamina, da mastociti di origine peritoneale e pleurica, è stata confrontata con quella del mastoparano, della SP e della NT, in assenza e in presenza di tossina della pertosse (Krüger et al., 2003). In effetti, la Cts è in grado di stimolare il rilascio di istamina dai mastociti di ratto al pari degli altri agenti peptidici (Krüger et al., 2003) con un meccanismo simile a quello già proposto per il mastoparano, la SP e il NPY. Tale meccanismo prevede l'attivazione di una proteina G_i , come dimostrato da studi di traslocazione e di patch clamp (Higashijima et al., 1988; Mously et al., 1990; Tomita et al., 1991), e come confermato dall'azione soppressoria della tossina della pertosse sull'effetto della Cts (Krüger et al., 2003).

L'azione vasodilatante della Cts è confermata anche da studi effettuati sull'uomo. Difatti, l'infusione locale di Cts esogena, in una vena dorsale della mano, *in vivo*, dopo vasocostrizione farmacologica indotta da fenilefrina, determina vasodilatazione dose-dipendente in soggetti sani, specialmente di sesso femminile, (Fung et al., 2010). Inoltre, le donne presentano più elevati livelli plasmatici di Cts, pur avendo un inferiore concentrazione plasmatica del precursore CgA, rispetto agli uomini, lasciando ipotizzare una maggiore attività di conversione del pro-ormone in Cts (Fung et al., 2010).

2.6 Azione anti-microbica, chemiotattica e angiogenetica

L'immunità innata è rappresentata dal sistema immunitario di difesa contro i microrganismi. Essa è innescata da una serie di peptidi cationici isolati dalla linfa degli insetti, dalla pelle di rana, dai granuli neutrofilici di mammiferi e piante, e da diversi peptidi CgA derivati, come la Vs-1 (Lugardon et al., 2000) e la procromacina (Metz-Boutigue et al., 1998).

Nello specifico, studi recenti hanno dimostrato che la CgA è localizzata anche nelle cellule immunitarie e che il suo processamento fornisce peptidi che esibiscono un'attività anti-microbica che suggerisce un loro coinvolgimento nei processi infiammatori (Metz-Boutigue et al., 1998).

In particolare, è stato ipotizzato che la Cts bovina ed il suo dominio attivo N-terminale (CgA₃₄₄₋₃₅₈) possiedano attività antibatterica, sia per la capacità di attivare il rilascio di istamina, con un ruolo paracrino ed endocrino nell'immunità, sia per la loro natura cationica, caratteristica tipica dei composti antibatterici. Il frammento bCgA₃₄₄₋₃₅₈ presenta attività contro batteri Gram-positivi, come *M. Luteus* e *B. Megaterium*, batteri Gram-negativi, come *E. Coli*, e funghi, come *N. Crassa*, senza contemporaneamente mostrare attività emolitica (Briolat et al., 2005). Il peptide sembra passare rapidamente attraverso la membrana cellulare per poi accumularsi nella parte interna e agire su target intracellulari (Briolat et al., 2005).

Inoltre, la Cts è in grado di penetrare nelle cellule polimorfonucleate, diventando, di fatto, un nuovo membro della famiglia dei peptidi cellula-permeanti, grazie ad un pathway che coinvolge la fosfolipasi A, calcio indipendente, e calmodulina-regolato (Zhang et al., 2009).

Anche la Cts umana e le sue varianti, individuate in studi di risequenziamento della CgA, mostrano azione anti-microbica ma in maniera meno marcata; ciò suggerisce il ruolo cruciale esercitato dal residuo di arginina N-terminale presente nella bCgA₃₄₄₋₃₅₈, ma non nella Cts umana, la cui assenza provoca una netta riduzione dell'efficacia battericida e fungicida (Briolat et al., 2005).

Recentemente, è stata dimostrata la capacità della Cts di inibire, *in vitro*, la crescita di *Plasmodium falciparum* (causa della forma maligna della malaria), presumibilmente mediante l'inattivazione della plasmepsina, una proteasi aspartica coinvolta nella degradazione dell'emoglobina delle cellule dell'ospite che fornisce nutrienti per la crescita del parassita della malaria (Akaddar et al., 2009; Goldberg et al., 1990). La porzione N-terminale della Cts umana sembra essere indispensabile per l'effetto inibitorio massimo sulla crescita del parassita (Akaddar et al., 2009).

La Cts ha mostrato una bassa tossicità nei confronti delle cellule di mammifero indicando un importante ruolo nell'immunità innata. La struttura molecolare potrebbe, teoricamente, essere sfruttata per la progettazione di farmaci da utilizzare contro ceppi batterici che sviluppano resistenze agli antibiotici classici (Briolat et al., 2005).

L'azione chemiotattica della Cts, invece, fu ipotizzata in seguito all'osservazione che vedeva la CgA come un importante costituente delle placche amiloidi della malattia di Alzheimer (Munoz, 1991; Rangon et al., 2003) capace di attivare monociti derivanti dalla microglia, che invadono e circondano le placche rilasciando citotossine responsabili del danno neuronale (Taupenot et al., 1996; Ciesielski et al., 1998; Lechner et al., 2004). Si ipotizzò, allora, che potesse essere la Cts l'elemento in grado di regolare la migrazione dei monociti. Difatti, studi successivi hanno dimostrato che la Cts induce chemiotassi dose-dipendente su monociti umani (Egger et al., 2008) con un effetto massimo alla concentrazione di 1 nM (comparabile con la dose inducente chemiotassi

dei monociti di altre chemochine) (Egger et al., 2008). A livello recettoriale, la Cts potrebbe agire mediante una tirosina chinasi e un recettore accoppiato a proteina G, coinvolgendo la sfingosina-1-fosfato; a livello post-recettoriale, il peptide agirebbe mediante la PI-3-k, lo NO e il pathway delle MAP chinasi (Egger et al., 2008).

Recentissimi studi hanno dimostrato effetti angiogenetici della Cts. L'angiogenesi è un processo che prevede la crescita e lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni da vasi già esistenti e riguarda numerosi e importanti processi fisiologici, come lo sviluppo embrionale e la cicatrizzazione. Difetti nella regolazione dell'angiogenesi spesso degenerano verso condizioni patologiche, come malattie infiammatorie, cuore ischemico, malattie vascolari periferiche, retinopatia proliferativa, tumori solidi (Carmeliet, 2000). I più potenti fattori angiogenici sono il fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF) ed il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF); accanto ad essi anche numerosi neuropeptidi come la SP, il NPY e la secretoneurina (Ziche et al., 1994; Kirchmair et al., 2004). L'ipotesi sulla capacità angiogenica della Cts è nata sulla base della sua omologia funzionale con la SP e sulla base della osservata up-regolazione della CgA dopo ipossia transiente in cellule neuronali, una caratteristica tipica dei fattori angiogenici come VEGF (Marti et al., 2000). La Cts è, infatti, in grado di indurre migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali, attraverso una proteina G e l'attivazione del pathway PI-3-k/Akt, che tra l'altro inibisce l'apoptosi in cellule HUVEC (Theurl et al., 2010). Anche *in vivo* la Cts induce angiogenesi durante il test della neovascolarizzazione della cornea di topo (Theurl et al., 2010).

2.7 Cts e ipertensione

Meccanismi adrenergici sembrano essere coinvolti nella genesi dell'ipertensione sin dalle prime fasi. Poiché un'eccessiva attività simpatica è tra le cause della malattia, e poiché alterazioni nelle risposte simpatiche sono riscontrate anche nei parenti normotesi dei pazienti ipertesi, ci si aspetterebbe che i meccanismi alla base dell'azione della Cts possano essere alterati nella patologia ipertensiva e in soggetti ad elevato rischio per lo sviluppo della malattia. In effetti, le concentrazioni plasmatiche di Cts risultano essere inversamente correlate alla patologia ipertensiva: sono diminuite non solo in casi conclamati di ipertensione essenziale, ma anche in soggetti normotesi con storia familiare per la malattia (O'Connor et al., 2002). In contrasto, i livelli plasmatici di CgA in tali soggetti aumentano, indicando una probabile deficienza nei meccanismi di processamento del pro-ormone. I dati, comunque, indicano che una precoce riduzione nei livelli di Cts, in fase pre-ipertensiva, possa giocare un ruolo patogenetico nel successivo sviluppo dell'ipertensione, suggerendo un meccanismo patofisiologico collegante la Cts alla patologia ipertensiva.

Ridotti livelli circolanti di Cts risultano in una ridotta inibizione della secrezione catecolaminergica e quindi in aumentati livelli di epinefrina nelle urine anche in soggetti normotesi con storia familiare di ipertensione (O'Connor et al., 2002). Anche le concentrazioni plasmatiche di norepinefrina appaiono aumentate in tali soggetti rispetto a persone senza familiarità per la malattia (Ferrier et al., 1993). Pazienti con riduzione dei livelli di Cts mostrano anche una maggiore risposta pressoria allo stress da freddo (O'Connor et al., 2002). Pertanto, le aumentate risposte pressorie allo stress simpato-surrenale in pazienti Cts-deficienti, suggeriscono un meccanismo adrenergico secondo il quale la riduzione dei livelli di Cts possa contribuire, con gli anni, allo sviluppo

dell'ipertensione (O'Connor et al., 2002), emergendo come “fenotipo intermedio” per l'ipertensione essenziale.

A conferma di questi dati, elevata pressione sanguigna ed elevati livelli di CAs plasmatiche sono state riscontrate in topi *knockout* per il gene della CgA. Tali alterazioni vengono recuperate mediante la trasfezione degli animali col gene umano della CgA, oppure mediante somministrazione di Cts (Mahapatra et al., 2005). Inoltre, lo stress da immobilizzazione in topi, sia *wild-type* che *knockout*, monitorati attraverso telemetria, causa incremento della pressione sistolica e della frequenza cardiaca. Entrambi questi effetti sono stati aboliti dalla somministrazione di Cts, che si è dimostrata capace di agire al pari di un agente antiipertensivo, anche in condizioni di stress (Gayen et al., 2009).

Il ruolo della Cts nel SNC è stato testato nel midollo spinale di ratti anestetizzati mediante la sua iniezione intratecale (Gaede et al., 2009), insieme a nicotina e isoproterenolo. In queste condizioni, la Cts attenua gli effetti ipotensivi dell'isoproterenolo e gli effetti ipertensivi della nicotina sulla pressione arteriosa media, sull'attività dei nervi splancnici simpatici e sulla frequenza cardiaca (Gaede et al., 2009), suggerendo che la Cts antagonizza sia i nAChR che i recettori β -adrenergici centrali coinvolti nella regolazione cardiovascolare *in vivo*.

Appurato che la Cts possa agire sia su recettori periferici che centrali, rimangono da chiarire le modalità di tale azione che, da osservazioni non ancora pubblicate (Gayen et al., unpublished observation), sembra poter coinvolgere un incremento delle specie reattive dell'ossigeno, la perossidazione lipidica e la deplezione di NO.

La performance cardiaca è controllata dal sistema nervoso autonomo (SNA); le stesse fluttuazioni dell'ampiezza dei battiti della frequenza cardiaca sono il risultato dell'equilibrio tra SNA parasimpatico e SNA simpatico sul tono cardiaco.

Peculiarmente, alcuni soggetti umani con una variazione genetica della Cts, la G364S, mostrano alterazioni nella funzione dei barocettori, sia simpatici che parasimpatici. Gli eterozigoti per tale variante presentano un maggiore risposta barocettiva, un aumentato indice cardiaco parasimpatico ed un ridotto indice cardiaco simpatico, rispetto agli omozigoti per la Cts-wt. Questa variante della Cts sembra proteggere i soggetti portatori dallo sviluppo futuro di ipertensione, specialmente se uomini (Rao et al., 2007).

Anomalie della sensibilità barocettiva sono state dimostrate sia nell'ipertensione sperimentale che in quella umana (Aars, 1968; West & Korner, 1974); in particolare, i soggetti ipertesi esibiscono una ridotta sensibilità barocettiva rispetto a soggetti normotesi (Bristow et al., 1969; Goldstein, 1983; Grassi et al., 1998); soggetti normotesi, con storia familiare per la patologia ipertensiva, mostrano anch'essi tale riduzione (Parmer et al., 1992).

2.8 Cts e produzione intracardiaca

Uno studio recentissimo (Biswas et al., 2010), attraverso l'immuniprecipitazione di estratti cardiaci murini con Cts e successivi immunoblotting, ha dimostrato che la Cts è generata anche all'interno del cuore di topo confermando ulteriormente il suo ruolo autocrino/paracrino nella funzione cardiaca. Inoltre, negli estratti cardiaci è stata riscontrata una presenza di CgA intera molto inferiore rispetto a quella presente nella midollare del surrene, avvalorando l'ipotesi secondo la quale in tale ghiandola le CAs possano inibire il processamento proteolitico del pro-ormone (Wolkersdorfer et al., 1996). Il processamento intracardiaco della CgA a Cts sembra diminuire in cuori di animali con età più avanzata (Biswas et al., 2010), in accordo con il ruolo cruciale che

va delineandosi per la Cts nella patologia ipertensiva spesso correlata all'avanzare dell'età.

2.9 Cts umana e sue varianti naturali

Studi di risequenziamento della CgA hanno consentito l'individuazione di mutazioni dovute a sostituzioni aminoacidiche (SNP, single nucleotide polymorphisms) nella regione corrispondente alla Cts (Wen et al., 2004).

Circa il 4% dei cromosomi umani codifica naturalmente una delle seguenti varianti della Cts: la Glicina 364 Serina (G364S-Cts), la Prolina 370 Leucina (P370L-Cts) e la Arginina 374 Glutamina (A374G1-Cts).

Le tre varianti sono state scoperte da O'Connor e collaboratori in studi atti ad individuare modificazioni strutturali della molecola di CgA che potessero interferire col ruolo fisiologico di questo peptide nel normale mantenimento dell'omeostasi degli organismi. A tale scopo è stato sequenziato il gene della CgA di 180 soggetti aventi origini relative a quattro gruppi etnici diversi: europei, africani, est asiatici, americani.

La variante G364S-Cts ricorre in 11 dei 180 soggetti studiati, con distribuzione in tutte le etnie tranne negli africani d'America; la P370L-Cts è presente in 2 persone tra quelle considerate, entrambe afro-americane; la A374G1-Cts, presente in una persona su 180, nello scambiare un residuo di arginina con uno di glutamina provoca la distruzione del sito di processamento dibasico che affianca, generalmente, il C-terminale della Cts (Arg373Arg374) impedendo la formazione del peptide con produzione di una sequenza aminoacidica più lunga (Taylor et al., 2000; Herrero et al., 2002; Lee et al., 2003) che probabilmente sfutta il sito proteolitico dibasico successivo Lys400Lys401 (Herrero et al., 2002).

Per le quattro forme di Cts, la WT-Cts e le sue tre varianti naturali, sono stati condotti studi per valutare la loro potenza nell'inibire il rilascio catecolaminergico dipendente da stimolazione nicotinic colinergica. I valori di IC_{50} rilevati sono stati comparati con quelli della forma WT ($IC_{50} 0.82 \pm 0.02 \mu M$) e da essi è risultato che la variante P370L-Cts presenta una potenza maggiore ($IC_{50} 0.37 \pm 0.03 \mu M$), la G364S-Cts mostra un moderato ($IC_{50} 3.65 \pm 0.11 \mu M$), e la A474G1-Cts mostra un severo decremento della potenza ($IC_{50} 22.5 \pm 4.05 \mu M$) (Mahata et al., 2004).

Per tutte le varianti è stata valutata anche l'efficacia, o effetto massimo, come antagonista del recettore nicotinic; a dosi molto alte, la P370L-Cts, la WT-Cts, e la G364S-Cts mostrano inibizione virtualmente completa (~100%) della secrezione catecolaminergica, mentre la A374G1-Cts presenta efficacia del solo 60% senza raggiungere il massimo neanche a dosi elevate (Mahata et al., 2004).

Poiché l'esposizione anche ad alte dosi di nicotina, o di altri agonisti del recettore nicotinic, non è in grado di spiazzare l'effetto della Cts WT e delle sue forme modificate, rimane confermata l'ipotesi di una interazione recettoriale di tipo non competitivo (Mahata et al., 2004).

Tutte le varianti umane della Cts mostrano la capacità di inibire la desensitizzazione recettoriale, dovuta a stimoli persistenti o ripetuti, in modo dose-dipendente con una potenza decrescente con ordine P370L-Cts > WT-Cts > G364S-Cts > A374G1-Cts (Mahata et al., 2004).

La trascrizione del gene CgA accoppiato alla stimolazione della secrezione viene bloccata da tutte le quattro forme del peptide nell'ordine P370L-Cts > WT-Cts > G364S-Cts > A374G1-Cts (Mahata et al., 2004).

Le varianti P370L-Cts e A374G1-Cts sono relativamente rare, con una frequenza di circa 0.6%; la G364S-Cts mostra, invece, una frequenza del 3-4% (Wen et al., 2004).

La presenza di mutazioni nella struttura primaria della CgA e la loro individuazione all'interno del genoma umano è di rilevante importanza se si pensa alla CgA, ed al peptide Cts da essa derivata, come ad un parametro strettamente correlato a disfunzioni del sistema nervoso autonomo, come l'ipertensione; le mutazioni possono rappresentare modificazioni, oltre che della struttura molecolare, della normale attività sia della CgA che del suo frammento (Wen et al., 2004). La CgA agisce come un regolatore di fenotipi intermedi che contribuiscono all'ipertensione; infatti i suoi livelli sono over-espressi in modelli animali con ipertensione genetica (Schober et al., 1989; O'Connor et al., 1999) ed acquisita (Takiyuddin et al., 1993), mentre negli uomini è stata dimostrata una certa ereditabilità delle concentrazioni plasmatiche di CgA (Takiyuddin et al., 1995). Al contrario i livelli circolanti di Cts diminuiscono sia nell'ipertensione diagnosticata sia nei soggetti normo-tesi e geneticamente predisposti allo sviluppo di questo disturbo (Kennedy et al., 1998; Mahata et al., 2000; O'Connor et al., 2002). Studi effettuati su individui eterozigoti per Gly364Ser, che *in vitro* presenta una potenza sul recettore nicotinico ridotta di circa 4.5 volte rispetto alla forma WT, utilizzando come controllo soggetti omozigoti per la forma WT, hanno dimostrato che questa variante provoca profondi cambiamenti nell'attività del sistema nervoso autonomo umano, sia simpatico che parasimpatico, e che sembra ridurre il rischio di sviluppare ipertensione soprattutto nei maschi (Rao et al., 2007).

MATERIALI E METODI

Il presente studio si è avvalso dell'utilizzo di tecniche sperimentali sia fisiofarmacologiche, come la metodica *Langendorff*, sia biomolecolari, come l'immunoblotting, i dosaggi ELISA e il biotin switch assay.

1 METODICA LANGENDORFF

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando, come modello sperimentale fisiofarmacologico, il preparato di cuore di ratto isolato e perfuso secondo la metodica *Langendorff*.

Si tratta di una metodica relativamente semplice che, grazie alle condizioni di perfusione che riflettono molto da vicino l'emodinamica cardiaca dell'animale *in vivo*, si presta agevolmente a studi di tipo fisiofarmacologici.

I vantaggi sostanziali di questo modello consistono nella possibilità di valutare gli effetti cardio-vascolari diretti di numerose sostanze in termini di funzione contrattile, di attività elettrica e di funzione metabolica; nella possibilità di eseguire studi di dosaggio dei farmaci in modo rapido e con esatto controllo delle concentrazioni; nella possibilità di sospendere la somministrazione della sostanza in esame intercambiando i fluidi di perfusione (Cerra et al., 2006). Inoltre, il preparato permette di indurre ischemia regionale, o totale, e di condurre studi sulla risposta cardiaca in seguito a variazioni del flusso coronarico, sulla reattività vascolare, sulla funzionalità dell'endotelio e del muscolo liscio (Cerra et al., 2006).

1.1 Animali

Gli esperimenti, autorizzati dal Ministero della Sanità (Roma, Italia) e regolati dal decreto legislativo 116 del 1992, sono stati realizzati adoperando ratti maschi del ceppo Wistar, dal peso di 180-250 g, forniti dalla Harlan Laboratories s.r.l. (Udine, Italia).

Al loro arrivo, al fine di consentire un completo recupero dallo stress conseguente al trasporto, gli animali sono stati stabulati per almeno quattro giorni in un ambiente climatizzato, con temperatura costante di circa 25°C, illuminato artificialmente per cicli di 12 ore consecutive. Inoltre, i ratti sono stati alimentati *ad libitum* e sacrificati entro massimo venti giorni dal loro arrivo.

1.2 Apparato di perfusione

La metodica *Langendorff* si avvale di un apparato costituito da un serbatoio, contenente la soluzione di perfusione *Krebs-Henseleit*, una pompa peristaltica, una trappola per bolle, un bagno termoregolatore ed un sistema di acquisizione dati con interfaccia McLab (FIG. 4). Uno stimolatore bipolare (Panlab LE 12106), il cui elettrodo viene posizionato a livello dell'atrio destro del cuore, impostato in modo da dettare una frequenza di stimolazione di 340 battiti al minuto, ad un voltaggio di 10 V per una durata di 2 ms, è usato nel corso di esperimenti che richiedono una frequenza costante.

La pompa peristaltica ha il compito di prelevare la soluzione dal serbatoio e di spingerla, attraverso una serie di tubi, nella trappola per bolle, la quale evita la formazione di emboli che potrebbero danneggiare il cuore e falsare il risultato degli esperimenti. Il perfusato raggiunge quindi il cuore attraverso una cannula inserita direttamente nell'aorta.

La temperatura ideale di perfusione ($37-37,5^{\circ}\text{C}$) viene mantenuta da un sistema di termostatazione che controlla tutti i serbatoi contenenti la soluzione fisiologica, la camera che contiene il cuore ed i vari tubi che compongono l'apparato (Cerra et al., 2006). La costanza della temperatura è garantita da un bagno termoregolatore a circolazione esterna, capace di evitare cadute di temperatura lungo l'intero apparato (Cerra et al., 2006).

L'apparato è dotato anche di due trasduttori (Model BLPR, cod 18700), che registrano la pressione del ventricolo sinistro e la pressione coronarica. I quali sono collegati al sistema di acquisizione dati McLab a sua volta collegato ad un computer (Pentium III, Hewlett Packard Brio).

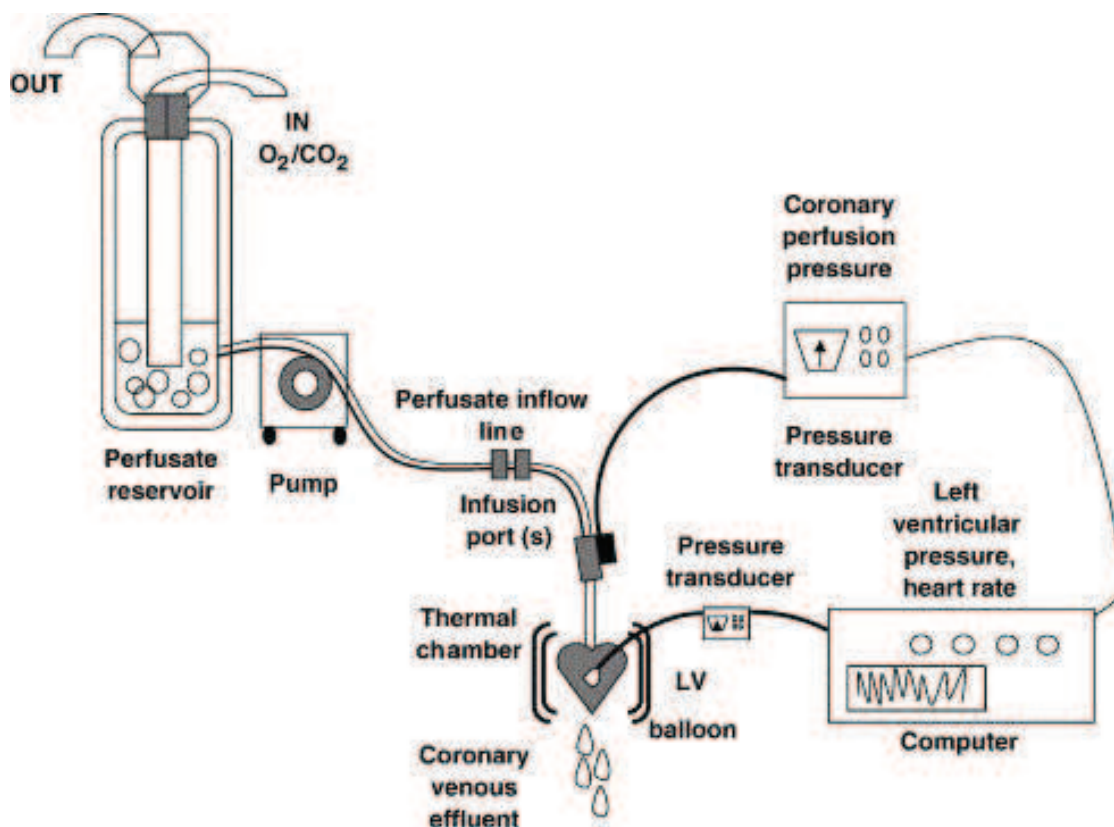


FIGURA 4. Rappresentazione schematica dell'apparato di perfusione

1.3 Dissezione, isolamento ed incannulazione del cuore

Prima di procedere all'isolamento del cuore, l'animale viene anestetizzato mediante iniezione intraperitoneale di carbammato di etile (2g/Kg).

Dopo aver verificato la completa assenza di riflessi nell'animale, si effettua un'incisione trans-addominale che consente di evidenziare la cavità toracica; il torace viene, così, aperto attraverso un taglio bilaterale lungo il margine inferiore dalle ultime alle prime costole e la gabbia toracica viene sollevata esponendo il cuore. L'organo è espantato dopo recisione dell'aorta, della vena cava e dei vasi polmonari, per essere subito immerso in un beaker contenente la soluzione di perfusione, mantenuta a 4°C, al fine di evitare danni ischemici (Cerra et al., 2006). Successivamente, l'aorta viene incannulata per iniziare la perfusione retrograda a flusso costante (FIG. 5); generalmente, con la pratica, l'intervallo di tempo che intercorre tra l'espanto e l'incannulazione non supera i 30 secondi (Cerra et al., 2006).

La cannula di perfusione aortica presenta un diametro esterno di 1,8 mm, per il cuore di un ratto di 250 g, e può essere realizzata in vetro, plastica o acciaio inossidabile (Cerra et al., 2006).

Per ridurre al minimo la possibilità che si formino bolle al momento dell'incannulazione, la soluzione di perfusione viene opportunamente fatta gocciolare dalla cannula già prima che il cuore venga collegato attraverso l'aorta e fissato mediante una legatura con filo di seta (Cerra et al., 2006).

Dopo aver saldamente fissato il cuore, viene praticata una piccola incisione a livello dell'arteria polmonare, che potrebbe essere accidentalmente legata durante l'incannulazione, in modo da facilitare un adeguato drenaggio (Cerra et al., 2006);

inoltre, per prevenire l'accumulo di perfusato nel ventricolo sinistro, viene effettuato nell'apice ventricolare un piccolo foro mediante l'ausilio di un ago.

Quando l'incannulazione è completata e la perfusione è cominciata, affinché il cuore si stabilizzi completamente sono richiesti almeno 10 minuti (Cerra et al., 2006).

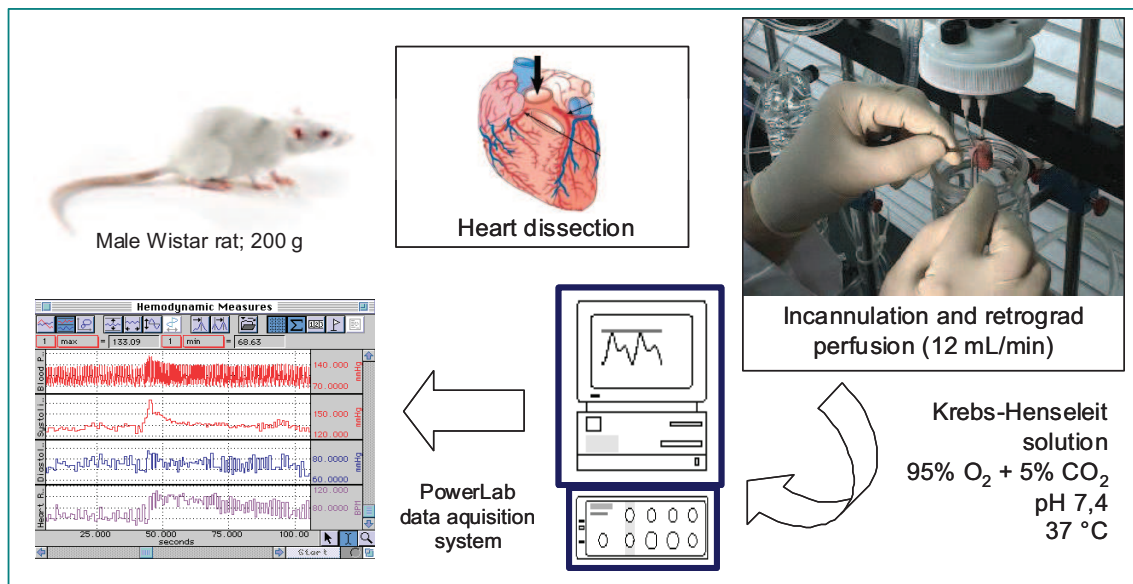


FIGURA 5. Isolamento e incannulazione del cuore di ratto perfuso per via retrograda con soluzione KHS

1.4 Misurazione dell'attività contrattile del cuore

Nel corso dell'esperimento, sia per ottenere informazioni circa l'azione delle sostanze testate, sia per monitorare la stabilità del cuore e riscontrare eventuali aritmie, vengono costantemente misurati particolari parametri dell'attività cardiaca.

Di fondamentale importanza è la valutazione dell'attività contrattile, la cui misurazione prevede l'utilizzo di un palloncino in lattice, collegato ad un trasduttore di pressione (Modello BLPR, cod 18700), che viene collocato nel ventricolo sinistro (Cerra et al., 2006).

L'atrio sinistro viene rimosso per facilitare l'inserimento del palloncino nella cavità ventricolare attraverso la valvola mitrale; una volta posizionato, esso viene gonfiato con

acqua distillata mediante una microsiringa (Hamilton 250 μL), in modo da regolarne il volume.

I palloncini sono utilizzati solo se ad un volume di 80-100 μL generano una pressione inferiore a 3 mm Hg (Cerra et al., 2006). Il loro volume viene aumentato con incrementi graduali di 20 μL , finché la pressione generata raggiunge un plateau, di circa 5 mm Hg, corrispondente al lavoro isovolumetrico del cuore (Bartfly et al., 1999). Volumi eccessivi potrebbero compromettere il tessuto cardiaco, inducendo ischemia e rendendo instabile il preparato a causa di un' aumentata tendenza a sviluppare aritmie (Sutherland et al., 2000).

Quando tutti questi passaggi sono completati, il cuore viene chiuso in una camera mantenuta a 37°C dal bagno termostato.

1.5 Perfusion e composizione del perfusato

Nella metodica di *Langendorff* la perfusione è condotta in senso retrogrado a flusso costante di 10-13,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ per grammo di cuore fresco (Legssyer et al., 1997; Doring, 1990); in questo modo, la valvola aortica viene chiusa forzatamente ed il fluido di perfusione, attraverso le coronarie, perfonde l'intera massa cardiaca e drena, mediante il seno coronario, nell'atrio destro (Sutherland et al., 2000).

La soluzione di perfusione è un tampone bicarbonato, detto *Krebs-Henseleit*, modificato rispetto alla formulazione originaria nella concentrazione di ioni calcio, che è stata ridotta (Legssyer et al., 1997; Doring, 1990). La composizione completa del perfusato può essere schematizzata come segue (mM): NaCl 113, KCl 4.7, NaHCO_3 25, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.8, KH_2PO_4 1.2, glucosio 11, mannitolo 1.1, Na-piruvato 5.

Nella preparazione del tampone Krebs-Henseleit sono indispensabili alcuni accorgimenti che servono a garantirne un'adatta qualità. In particolare, bisogna aggiungere il componente calcio solo alla fine della procedura, per evitare la precipitazione dei suoi sali; è necessario filtrare la soluzione con membrane di cellulosa da 0,8 micron, per rimuovere possibili impurità; occorre mantenere il pH ad un valore ottimale di 7,4, attraverso la continua ossigenazione con una miscela di O₂ (95%) + CO₂ (5%) sempre per impedire la precipitazione dei sali di calcio.

Il continuo rifornimento di O₂ è, inoltre, indispensabile a supportare il normale metabolismo tissutale, per mantenere il gradiente trans-membrana e per garantire la funzione contrattile cardiaca (Sutherland et al., 2000).

Dal punto di vista metabolico, il cuore perfuso utilizza il glucosio come unico substrato energetico per sopperire alla mancanza degli acidi grassi che, sebbene *in vivo* siano la sorgente primaria di energia, non possono essere utilizzati nel preparato sia perchè sono insolubili in acqua sia perchè danno effetti schiumogeni se sottoposti all'azione di gas (Sutherland et al., 2000).

Alla soluzione di perfusione possono, poi, essere aggiunte le sostanze che si desidera testare.

1.6 Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri

L'acquisizione dei dati relativi agli esperimenti avviene attraverso un sistema McLab collegato ad un computer che elabora i dati attraverso un *software Chart 6*, li registra sull' *hard disk* e li visualizza graficamente in tempo reale sul monitor.

L'interfaccia McLab utilizzata è un sistema collegato a due trasduttori di pressione e ad una sonda di temperatura: il primo trasduttore, collegato al palloncino, permette di

registrare la pressione del ventricolo sinistro; il secondo trasduttore permette di misurare la pressione coronarica; il terzo canale è connesso ad una termocoppia che consente di monitorare la temperatura durante tutto il corso dell'esperimento.

I trasduttori di pressione vengono calibrati prima dell'inizio di ogni esperimento utilizzando un manometro a mercurio che permette di impostare sul computer un range fisiologico di valori di pressione in mmHg.

Il sistema di acquisizione simula un registratore su carta che, secondo la velocità di scorrimento impostata, permette di visualizzare singoli momenti dell'esperimento o il percorso sperimentale per intero.

1.7 Parametri dell'attività cardiaca

Il sistema di acquisizione ed elaborazione è impostato in modo tale da calcolare in tempo reale particolari parametri emodinamici (FIG. 6) che vengono salvati su un foglio di supporto Data Pad. Alla fine della registrazione i dati immagazzinati sul Data Pad possono essere trasferiti su un file Microsoft Excel per l'elaborazione statistica. I parametri emodinamici rilevati nel corso di un esperimento sul cuore isolato e perfuso secondo *Langendorff* possono essere distinti in tre classi dipendentemente dalla fase dell'attività cardiaca interessata (Fig.5).

1) parametri relativi all'attività sistolica:

- LVP (Left Ventricular Pressure, mmHg), rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- $+LV(dP/dt)_{max}$ (mmHg x s⁻¹), indica la massima velocità di contrazione ventricolare;

- TTP (Time To Peak, ms), rappresenta il tempo necessario a raggiungere il picco di contrazione sistolica isovolumetrica;
- HR (Heart Rate, battiti x min^{-1}), rappresenta la frequenza cardiaca;
- RPP (Rate Pressure Product, $\text{mmHg} \times \text{battiti} \times \text{min}^{-1}$), pari al prodotto tra LVP ed HR, rappresenta un indice del lavoro cardiaco;

2) parametri relativi al recupero diastolico:

- LVEDP (Left Ventricular End Diastolic Pressure, $\text{mmHg} \times \text{s}^{-1}$), è la pressione telediastolica sviluppata dal ventricolo sinistro;
- $-\text{LV}(\text{dP}/\text{dt})_{\text{max}}$ ($\text{mmHg} \times \text{s}^{-1}$), indica la massima velocità di rilassamento ventricolare;
- HTR (Half Time Relaxation, ms), indica la metà del tempo necessario al ventricolo sinistro per il completo recupero diastolico;
- T/-t è dato dal rapporto tra $+\text{LV}(\text{dP}/\text{dt})_{\text{max}}$ e $-\text{LV}(\text{dP}/\text{dt})_{\text{max}}$;

3) parametri relativi alla funzionalità coronarica:

- CP (Coronary Pressure, mmHg), è la pressione dei vasi coronarici.

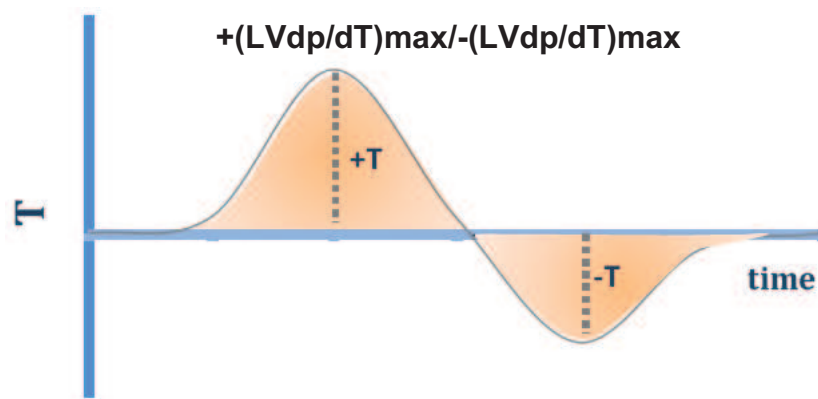
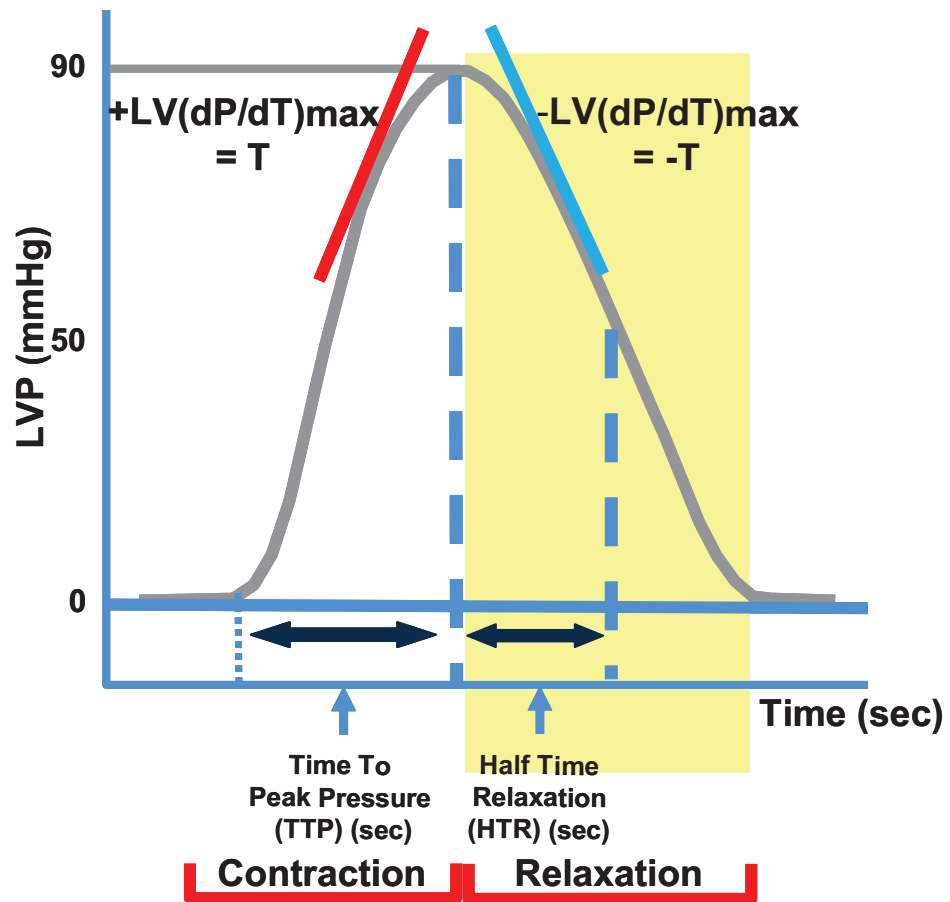


FIGURA 6. Rappresentazione grafica dei parametri emodinamici valutabili mediante il sistema di acquisizione dati PowerLab nella metodica *Langendorff*

2 IMMUNOBLOTTING

Le cellule HUVEC utilizzate per l'analisi di immunoblotting, sono state acquistate dalla ATCC e coltivate in mezzo di coltura Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2) (Lonza), contenente penicillina e streptomina a 37°C e al 5% di CO₂. Le cellule sono state trattate con Cts 110 nM e Cts 110 nM + L-NIO 100 nM, raccolte e lavate due volte in PBS per poi essere lisate.

I ventricoli sinistri sono stati omogenati in ghiaccio in presenza di un reagente di lisi, il RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Milana, Italia) contenente inibitori delle proteasi, (1mmol/L aprotinina, 20mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride e 200mmol/L sodium orthovanadate); successivamente l'omogenato è stato centrifugato a 200g per 10 min a 4°C al fine di rimuovere eventuali detriti per poi recuperare il sovrantante contenente le proteine. Il dosaggio delle proteine totali è stato eseguito mediante valutazione colorimetrica con il metodo di *Bradford*, utilizzando come standard una curva ottenuta dalla densità ottica dell'albumina sierica (BSA) a diverse concentrazioni partendo da una soluzione di 1mg/ml. A 50 µl di lisato proteico, diluito 1:10, viene aggiunto 1 ml di reattivo di *Bradford* e la soluzione così ottenuta è letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda λ di 595 nm. Il metodo di *Bradford* si basa sulla osservazione che il massimo di assorbanza di una soluzione di *Comassie Brilliant Blue G250* si sposta da 465 a 595 nm in seguito al legame con le proteine. La quantità di colorante legato dipende dal contenuto di aminoacidi basici nelle proteine in soluzione. Aliquote di lisato cellulare aventi la stessa quantità di proteine totali sono state sottoposte a separazione elettroforetica mediante tecnica riducente SDS-PAGE su gel di poliacrilammide a diversa percentuale. L'SDS conferisce un involucro negativo che permetterà la loro separazione solo per peso molecolare e non per carica elettrica netta posseduta, facendo

in modo che, sotto l'azione del campo elettrico applicato, tutte le proteine migrino verso il polo positivo.

Al lisato proteico è stato aggiunto in rapporto 1:1 il *buffer Laemmli* per permettere la rottura di eventuali ponti di solfuro presenti nelle molecole. A questo punto si effettua una bollitura di 5 minuti e si caricano i campioni con un marker a peso molecolare noto sul gel di poliacrilammide. Il tutto è immerso in un *buffer* di corsa contenente glicina (TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 e SDS 0.1%). La corsa elettroforetica è stata condotta applicando una differenza di potenziale di 90 V per circa due ore a temperatura ambiente.

Dopo la corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite dal gel su una membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) mediante trasferimento con camera *MINI-TRANSBLOT* in *buffer* di trasferimento a basso contenuto salino (TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 e SDS 0.1%, Metanolo 20%). Il gel e la membrana sono stati disposti in modo da formare un "sandwich" all'interno di una camera formata da due elettrodi paralleli: in questo sistema il foglio di PVDF si verrà a trovare tra l'anodo e il gel. Il trasferimento delle proteine è stato favorito dall'applicazione di una differenza di potenziale di circa 60V per 2 h a 4°C. L'effettivo trasferimento delle proteine sulla membrana è stato controllato immergendo per 2-3 min il foglio di PVDF in una soluzione di Red Poinceau. Successivamente la membrana è stata posta in una soluzione di *milk non-fat* in TBST 1X (TrisHCl 100 mM pH 7.5, NaCl 1 M, Tween 20 all'1%) per 1 h a temperatura ambiente in modo da bloccare tutti i siti specifici di interazione idrofobica. Dopo un breve lavaggio con buffer TBS 1X, il filtro di PVDF è stato incubato overnight con l'anticorpo primario specifico per la proteina da analizzare. Successivamente la soluzione con l'anticorpo primario è stata rimossa e la membrana sottoposta a tre lavaggi di 10 min ognuno con TBST 1X. In seguito la membrana è stata incubata per 1

h con anticorpo secondario (diluizione 1:2000 in TBST 1% e milk non-fat al 5%) in grado di riconoscere la porzione costante della IgG utilizzata come anticorpo primario coniugato con la perossidasi di rafano.

A questo punto la membrana è stata nuovamente lavata con TBST 1X e sottoposto a tecnica di immunorilevazione mediante l'utilizzo del Kit *ECL System* in chemiluminescenza. L'enzima perossidasi, coniugato all'anticorpo secondario, è in grado di catalizzare in condizioni basiche l'ossidazione del luminolo, un substrato chemiluminescente. Il luminolo passando attraverso uno stato eccitato emette una certa quantità di luce che può essere visualizzata esponendo il filtro trattato ad una lastra fotografica (Hyperfilm ECL) (FIG. 7).

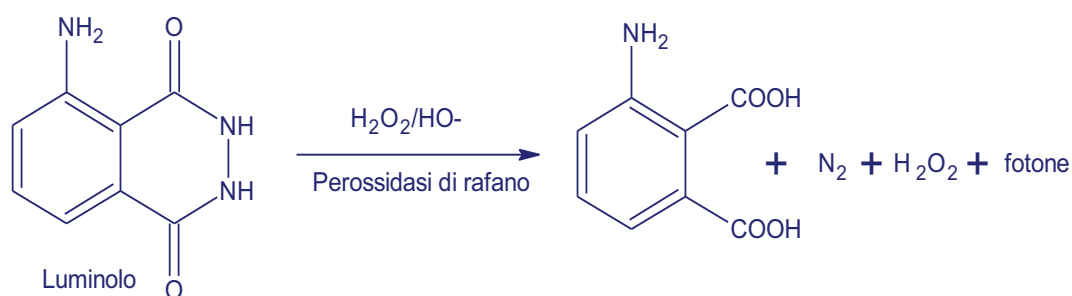


FIGURA 7. Reazione di chemiluminescenza che consente la visualizzazione sulla lastra fotografica

3 BIOTIN SWITCH ASSAY

Al fine di rilevare le proteine S-nitrosilate è stato utilizzato il metodo *Biotin Switch*, così come riportato da Jaffrey e Snyder nel 2001.

Tale saggio prevede come primo step il blocco dei gruppi SH, come secondo step la riduzione dei gruppi SNO a gruppi SH e come terzo step il legame della biotina a tali gruppi SH. Le proteine “biotinilate” vengono successivamente sottoposte ad un comune *Western Blot*. In seguito alla corsa elettroforetica e al trasferimento, le membrane

vengono incubate con la streptavidina e dalla rilevazione del complesso biotina-streptavidina si ha dunque la possibilità di analizzare i livelli di nitrosilazione delle proteine di cuori controllo e cuori trattati.

I cuori di ratto perfusi sono stati istantaneamente congelati in azoto liquido e al momento opportuno omogenati e sottoposti al cosiddetto *Biotin Switch Assay* (Jaffrey et al., 2001; Jaffrey & Snyder, 2001). Il campione di partenza, opportunamente aggiustato alla concentrazione di 1 mg/ml di proteine viene prima trattato con un *blocking buffer* (225 mM Hepes, pH 7.7, 0.9 mM EDTA, 0.09 mM neocuproine, 2.5% SDS, 20 mM MMTS) a 50°C per 20 minuti, affinché i gruppi SH liberi possano essere bloccati; poi viene precipitato con acetone freddo, centrifugato a 4°C per 5 minuti a 2000 g e risospeso in *hens buffer* (250 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, 1% SDS). Tutte queste operazioni vengono condotte al buio. Successivamente i campioni vengono incubati per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione contenente acido ascorbico e biotina: l'acido ascorbico riduce i gruppi SNO in gruppi SH liberi cui la biotina va a legarsi. Le proteine così biotinilate sono nuovamente precipitate con acetone freddo, centrifugate a 4°C per 5 minuti a 2000 g e risospese in *hens buffer*.

Tali proteine biotinilate sono sottoposte a *Western Blot*: le proteine vengono caricate su gel al 10% e, in seguito alla corsa elettroforetica, vengono trasferite su membrana che viene incubata per 1 ora prima con il latte al 5% e poi con la streptavidina diluita 1:5000. Si procede infine con lo sviluppo con ECL su lastra.

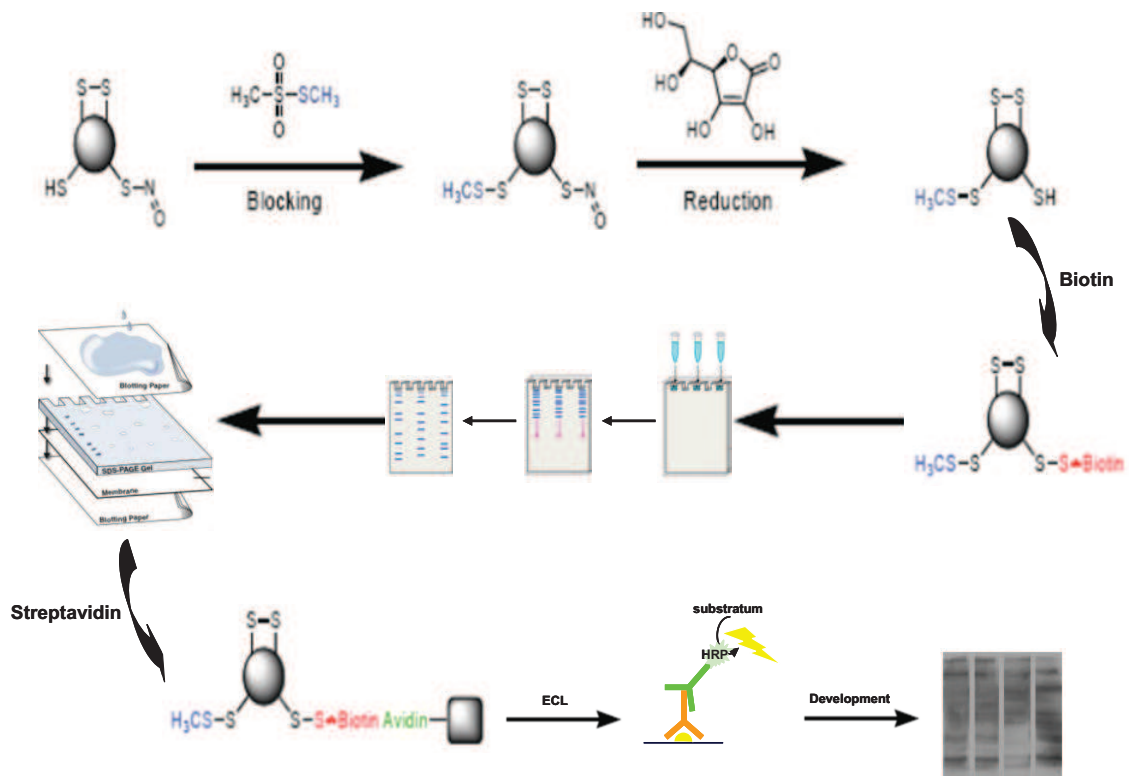


FIGURA 8. Biotin Switch Assay

4 DOSAGGIO ELISA

Per la determinazione delle concentrazioni del cGMP e del cAMP i cuori, precedentemente congelati in azoto liquido (200-300 mg), sono stati omogenati con acido tricloroacetico al 6% a 0°C e centrifugati a 10,000 g per 10 minuti. Dopo aver prelevato il supernatante, questo è stato lavato tre volte con dietil etere saturato con acqua; la fase acquosa è stata raccolta e conservata a -80°C. La determinazione delle concentrazioni di cGMP e cAMP è stata effettuata usando un kit commerciale di dosaggio immunoenzimatico Biotrack Enzymeimmunoassay (EIA) System (Amersham Biosciences).

5 **PROTOCOLLI SPERIMENTALI**

5.1 **Composti chimici**

5.1.1 **Langendorff**

Gli esperimenti di perfusione sono stati effettuati utilizzando *Cts wilde-type* e due delle sue varianti umane (*Cts-wt*), la *Cts* Prolina 370 Leucina (*Cts-P370L*) e la *Cts* Glicina 364 Serina (*Cts-G364S*). I tre peptidi sono stati sintetizzati in fase solida, utilizzando come protezione del gruppo aminoacidico N-terminale *Fmoc* (Mahata et al., 2000); essi sono stati purificati (> 95%) mediante RP-HPLC; la loro autenticità e purezza sono state verificate attraverso cromatografia analitica e spettrometria di massa (MALDI). I tre peptidi utilizzati sono stati cortesemente forniti dal Prof. Sushil K. Mahata, del Dipartimento di Medicina e Genetica Molecolare dell'Università di San Diego (San Diego, California).

Isoproterenolo (ISO), Endotelina-1 (ET-1), 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) scavenger dell'ossido nitrico (NO), N^G-monomethyl-arginine (L-NMMA) inibitore delle ossido nitrico sintasi (NOS), N(5)-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine (L-NIO) inibitore selettivo della NOS endoteliale (eNOS); vnyl-N(5)-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine (v-L-NIO) inibitore selettivo della NOS neuronale (nNOS), [N5-(1-imino-3-butenyl)-l-ornithine] (ODQ) inibitore della guanilato ciclasi solubile (sCG), KT5823 inibitore della proteina chinasi G (PKG), Wortmannina inibitore della fosfatidil-inositolo-3-chinasi, SR59230 inibitore selettivo dei recettori beta-3 adrenergici (β_3 -Ars), Nadololo inibitore selettivo dei recettori β_1/β_2 adrenergici, Fentolamina inibitore selettivo dei recettori α adrenergici, Atropina inibitore selettivo dei recettori muscarinici, BQ-788, inibitore selettivo dei recettori ET_B, Tossina della Pertosse (Ptx) disaccoppiante delle proteine G_{i/o}, erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine (EHNA) inibitore selettivo delle fosfodiesterasi 2 (PD2), TRITON 100X

tensioattivo che lede funzionalmente l'endotelio vascolare, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia).

Tutte le sostanze sono state preparate come soluzioni madre solubilizzate in acqua bidistillata, eccetto KT 5823, sciolto in acetato di etile, Nadololo, sciolto in metanolo e ODQ sciolto in etanolo. Le soluzioni madre sono state successivamente diluite in KHs in modo da ottenere le concentrazioni desiderate per i singoli esperimenti.

Gli esperimenti condotti con sostanze fotosensibili come ODQ, Wortmannina e KT5823 sono stati effettuati utilizzando un apparato modificato in modo da proteggere dalla luce ed evitare la degradazione di tali molecole.

5.1.2 Immunoblotting

Hepes, NaCl, MgCl₂, EGTA, Glicerolo, Sodio-dodecil-solfato (SDS), Metanolo, Aprotinina, Na-orto-vanadato, PMS-F(Fenilmetilsulfonilfluoride), Poliossi-Etilen-Sorbitan-Monolaurato, Tween 20 (Sigma Aldrich, Milano, Italia), ECL-Kit (GE Healthcare), Hyperfilm ECL (Amersham), Carta Whatmann 3 mm, Bradford Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich), Mini Trans Blot (Biorad, Italy), Hybond-P Nitrocellulose (GE Healthcare), BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), Albumina Sierica Bovina frazione V (BSA) (Sigma-Aldrich).

Sono stati utilizzati anticorpi primari diretti contro: PLN e pPLN-Ser16 (rabbit polyclonal IgG), eNOS e peNOS (rabbit polyclonal IgG), nNOS e pnNOS (goat polyclonal IgG), β -arrestina (mouse monoclonal IgG).(Santa Cruz, DBA Italia). Gli anticorpi primari sono stati riconosciuti mediante appositi anticorpi secondari anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat coniugati con perossidasi di rafano (Santa Cruz, DBA Italia).

5.2 Condizioni basali di perfusione

Gli esperimenti, in accordo con i dati riportati in letteratura (Legssyer et al, 1997; Doring, 1990), sono stati condotti con perfusione retrograda a flusso costante. La performance cardiaca è stata stabilizzata in circa 15-20 minuti, mentre la durata dell'esperimento è stata determinata dal tipo di protocollo eseguito.

Tutti gli esperimenti sono stati realizzati a valori costanti di pH (7,4) e di temperatura (37°C) e su ciascun cuore è stato testato un singolo protocollo per evitare fenomeni di desensitizzazione.

5.3 Curve dose-risposta di Cts-wt, Cts-P370L, Cts-G364S

Esperimenti preliminari, effettuati con Cts-wt, Cts-P370L e Cts-G364S, utilizzate alla concentrazione di 33 nM, hanno dimostrato che l'applicazione ripetuta di tutti e tre i peptidi, sul cuore di ratto isolato e perfuso secondo *Langendorff*, non provoca desensitizzazione, cioè una ridotta o mancata risposta all'azione della sostanza (dati non mostrati).

Alla luce di questa evidenza, dopo aver stabilizzato il preparato, per ciascuna variante sono state effettuate curve dose-risposta, perfondendo il cuore con concentrazioni crescenti (da 11 nM a 200 nM) di Cts-wt, Cts-P370L e Cts-G364S. Ciascuna concentrazione è stata somministrata per dieci minuti, al termine dei quali sono stati valutati gli effetti sui parametri emodinamici.

Protocolli del tutto simili condotti su preparati elettrostimolati, al fine di discriminare gli effetto inotropi e lusitropici da quelli sulla frequenza, hanno confermato l'andamento dei parametri cardiaci ottenuto su cuori a ritmo spontaneo (dati non mostrati).

5.4 Preparati Isoproterenolo (Iso) stimolati

Al fine di ottenere informazioni circa la capacità antiadrenergica di Cts-wt, Cts-P370L e Cts-G364S, i preparati cardiaci sono stati perfusi per 5 minuti con Iso 5 nM, lavati dall'effetto di tale sostanza, per garantire un ritorno alla performance basale, e perfusi con Iso 5 nM addizionato di singole concentrazioni di ciascuno dei tre peptidi Cts-wt (33 nM), Cts-P370L (110 nM) o Cts-G364S (200 nM).

Al fine di valutare il tipo di antagonismo esercitato dalle varianti nei confronti della stimolazione adrenergica sono state effettuate curve dose-risposta per Iso da solo (da 10^{-10} M a 10^{-6} M) successivamente confrontate con curve dose-risposta di Iso addizionate di singole concentrazioni di Cts-wt (33 nM), Cts-P370L (110 nM) o Cts-G364S (200 nM).

5.5 Preparati Endotelina-1 (ET-1) stimolati

Per verificare la capacità di Cts-wt, Cts-P370L e Cts-G364S di neutralizzare la stimolazione da ET-1, i cuori, dopo stabilizzazione, sono stati perfusi per 10 minuti con ET-1 (1 nM), successivamente riportati alle condizioni di controllo con KHs e in seguito riperfusi con ET-1 addizionata di una singola concentrazione di Cts-wt (33 nM), Cts-P370L (110 nM) o Cts-G364S (200 nM).

5.6 Meccanismo d'azione della Cts-wt

5.6.1 Coinvolgimento di recettori di membrana

Al fine di valutare il coinvolgimento di importanti recettori di membrana nel meccanismo d'azione della Cts-wt, i preparati cardiaci sono stati perfusi con l'inibitore dei β_1/β_2 ARs Nadololo (10 nM), o l'inibitore dei α ARs Fentolamina (100 nM), o l'inibitore dei recettori muscarinici Atropina (10 nM), o l'inibitore dei β_3 ARs SR59230 (100 nM), o l'inibitore dei recettori ET_B BQ788 (100 nM) per 10 minuti. L'effetto di tali molecole è stato lavato con KHs per poi perfondere i cuori per altri 10 minuti con ciascun antagonista addizionato di una singola concentrazione di Cts-wt (110 nM). Al fine di valutare il grado di affinità di Cts per i $\beta_{2/3}$ -Ars, sono stati eseguiti protocolli di IC₅₀, confrontando curve-dose risposta di Nadololo e SR59230 da soli con curve dose-risposta di tali antagonisti addizionati di singole concentrazioni di Cts.

5.6.2 Coinvolgimento delle proteine G_{i/o}

Il coinvolgimento delle proteine G_{i/o} nel meccanismo d'azione della Cts è stato valutato perfondendo i cuori con Cts 110 nM dopo aver preincubato i preparati cardiaci con Ptx (0.01 nM) per 60 minuti.

5.6.3 Coinvolgimento del pathway dell'ossido nitrico (NO)

Il coinvolgimento del pathway dell'NO è stato esaminato bloccando eNOS con L-NIO (10 μ M), NO con PTIO (10 μ M), la guanilato ciclastasi solubile (cGC) con ODQ (10 μ M),

PKG con KT5823 (10 μ M) e valutando gli effetti della Cts prima e dopo la perfusione con tali inibitori. La partecipazione dell'isoforma nNOS è stata determinata mediante l'utilizzo di un suo inibitore selettivo, vL-NIO (100nM). Preliminarmente sono state formulate delle curve dose risposta in base alle quali è stato possibile scegliere la minima concentrazione di antagonista che non altera la funzione cardiaca (dati non mostrati). Aumenti della fosforilazione di eNOS ed nNOS sono stati valutati mediante l'utilizzo di specifici anticorpi primari in analisi di western blotting. L'intervento del cGMP è stato individuato grazie al dosaggio ELISA.

5.6.4 Coinvolgimento di un endotelio funzionale

La necessità della presenza di un endotelio vascolare funzionante, nel meccanismo d'azione della Cts, è stata stimata pretrattando i preparati cardiaci con l'agente tensioattivo Triton-X100 (diluizione 1:200), che lede funzionalmente l'endotelio vascolare, e poi perfondendo con il peptide (110 nM). Il coinvolgimento selettivo della eNOS di origine endoteliale è stata valutata mediante western blotting su colture di HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) trattate con Cts (110 nM) e Cts più L-NIO (10 μ M).

5.6.5 Ruolo della fosfoinositide-3 chinasi (PI-3-k) e della Fosfodiesterasi-2 (PDE2)

Il ruolo della PI-3-k come proteina a monte della cascata dell'NO è stato studiato valutando gli effetti cardiaci della Cts prima e dopo trattamento con Wortmanina (100 nM), un suo inibitore. Il coinvolgimento della PDE2 come substrato del pathway dell'NO è stato stimato grazie all'utilizzo di un suo inibitore selettivo, EHNA (100 nM),

stimando gli effetti della Cts prima e dopo la perfusione con tale antagonista. La partecipazione della PDE2 è stata valutata anche nell'ambito dell'azione antiadrenergica della Cts, valutando gli effetti dell'Iso (5 nM) prima e dopo il trattamento con Cts da sola (110 nM) e con Cts più EHNA (100 nM). I livelli di cAMP, in cuori trattati con Iso e Iso + Cts, sono stati misurati mediante dosaggio ELISA.

6 ANALISI STATISTICA

Al termine di ciascun esperimento, i dati ottenuti vengono elaborati tramite analisi statistica.

I parametri emodinamici ed i valori ad essi riferiti sono espressi come medie \pm errore standard delle variazioni percentuali, rilevate nel corso degli esperimenti, rispetto ai valori di controllo. Poiché ogni cuore rappresenta il controllo di se stesso, la significatività statistica della variazione tra la condizione test (in presenza di sostanza) e la condizione basale di controllo è stata determinata mediante l'analisi one-way ANOVA; in questo caso, la variazione viene considerata significativa per $p < 0,05$ (*).

Il confronto tra i gruppi, utile per individuare eventuali differenze significative tra le diverse condizioni sperimentali, è stato valutato mediante one-way ANOVA, seguita dal Bonferroni post-hoc test; le variazioni sono considerate significative per $p < 0,05$ (§).

Le curve dose-risposta sigmoidi dell'Iso da solo ed addizionato di WT-Cts (33 nM), P370L-Cts (110 nM), o G364S-Cts (200 nM), così come le curve di IC₅₀ effettuate per Nadololo e SR59230, sono state elaborate mediante GraphPad Prism 4.0 ed hanno consentito di estrapolare, per ogni curva, il logaritmo negativo della concentrazione di

capace di produrre, o inibire, il 50% dell'effetto (rispettivamente EC50 e IC50), da solo ed in presenza delle sostanze.

RISULTATI

1 Curve dose-risposta di WT-Cts, P370L-Cts e G364S-Cts: effetti su inotropismo e lusitropismo cardiaci

Le curve dose-risposta di WT-Cts, P370L-Cts e G364S-Cts sono state effettuate dopo stabilizzazione dei parametri cardiaci ed in condizioni basali di perfusione, cioè in assenza di stimolazione chimica e/o fisica. Esse hanno consentito di analizzare il ruolo modulatore dei tre peptidi nei confronti del rilassamento e della contrattilità cardiaca, e i risultati ottenuti dalle curve sono stati utilizzati per realizzare un confronto nell'attività delle tre molecole, allo scopo di correlare le modificazioni strutturali caratterizzanti i tre peptidi con eventuali variazioni dell'azione sui parametri emodinamici.

Esperimenti preliminari su preparati cardiaci sottoposti a *time course*, in presenza di sola soluzione Krebs-Henseleit, i cui parametri sono stati misurati ogni 10 minuti, hanno dimostrato che la stabilità del preparato si mantiene per almeno 180 minuti (dati non mostrati). Inoltre, la somministrazione ripetuta di singole concentrazioni dei tre peptidi (33 nM) ha provato l'assenza di fenomeni desensitizzanti ed ha mostrato che, in tutti e tre i casi, si evidenzia un effetto massimo a 5 minuti dall'applicazione che rimane stabile per 15 minuti per poi decresce gradualmente col tempo (dati non mostrati).

Le curve dose-risposta sono state realizzate mediante l'esposizione del preparato a concentrazioni crescenti di WT-Cts, P370L-Cts o G364S-Cts ed i parametri dell'attività cardiaca sono stati misurati dopo 10 minuti dalla somministrazione di ciascuna soluzione a diversa concentrazione (11 nM-200 nM).

Per la WT-Cts si evidenzia un effetto inotropo negativo dose-dipendente (FIG. 9), rilevabile da una diminuzione significativa di LVP a partire dalla concentrazione 33 nM con un massimo a 165 nM, associata ad un piccolo incremento significativo di HR, a 11 nM e 33 nM (FIG. 9). Il peptide riduce in maniera significativa anche $+(LVdP/dT)_{max}$ a

partire da 110 nM (FIG. 9), mentre induce un aumento significativo dose-dipendente di CP per concentrazioni pari e superiori a 65 nM, con un massimo a 200 nM (FIG.10). Accanto all'effetto sull'inotropismo, la WT-Cts mostra anche un'azione lusitropica negativa, esemplificata dalla riduzione del parametro $-(LVdP/dT)_{max}$ (FIG. 10) significativa a partire dalle concentrazioni. Il valore di T/-t, invece, rimane immutato (FIG. 10).

Anche il peptide P370L-Cts mostra un effetto inotropo negativo, rilevato da una riduzione significativa di LVP a partire da 33 nM con un effetto massimo a 200 nM, e di $+(LVdP/dT)_{max}$, da 65 nM, con un massimo a 200 nM (FIG. 11). In questo caso non sono presenti concomitanti variazioni significative dei parametri HR (FIG. 11) e CP (FIG. 12). L'analisi relativa all'azione lusitropica del peptide ha mostrato un netto effetto negativo, come si può evincere dalla significativa riduzione sia di $-(LVdP/dT)_{max}$, da 65 nM, dall'aumento di T/-t a partire da 33 nM con un massimo a 200 nM (FIG. 12).

La variante G364S-Cts ha, invece, evidenziato risultati molto diversi da quelli ottenuti per gli altri due peptidi. Infatti, a tutte le concentrazioni testate, G364S-Cts non ha modificato in maniera significativa lusitropismo, inotropismo e performance coronarica lasciando inalterati LVP, $+(LVdP/dT)_{max}$ (FIG. 13), $-(LVdP/dT)_{max}$, T/-t e CP (FIG. 14). D'altro canto, però, aumentano in maniera significativa i valori di HR, a 33 e 65 nM (FIG. 13).

2 Azione anti-adrenergica di WT-Cts, P370L-Cts, G364S-Cts

La potenziale attività antiadrenergica dei tre peptidi è stata stimata utilizzando un agonista non selettivo dei recettori β -ARs, cioè l'Iso, alla concentrazione di 5 nM.

L'esposizione del preparato cardiaco all'Iso da solo evidenzia effetti inotropi e lusitropici positivi associati a vasodilatazione. Tali modificazioni della performance cardiaca sono accompagnate da un aumento nei valori dei parametri LVP, $+(LVdP/dT)_{max}$ e $-(LVdP/dT)_{max}$ e da una riduzione di CP. Come riportato da molti autori (Abbott and Lodola, 1992), gli effetti dell'Iso sono significativi nei primi 5 minuti dall'applicazione, mentre tendono a diminuire gradualmente col tempo. Esperimenti preliminari, effettuati mediante somministrazioni ripetute di Iso 5 nM su ciascun cuore, hanno dimostrato l'assenza di desensitizzazione (dati non mostrati). Altri esperimenti hanno consentito la determinazione delle concentrazioni minime dei tre peptidi in grado di bloccare l'attività dell'Iso: tali concentrazioni sono state successivamente utilizzate nei protocolli sperimentali relativi all'azione antiadrenergica (dati non mostrati).

Poiché WT-Cts, P370L-Cts e G364S-Cts hanno mostrato effetti diversi sulla secrezione catecolaminergica dipendente dallo stimolo nicotinico, si è voluta testare se anche l'efficacia delle tre varianti nel contrastare gli effetti lusitropici, inotropi e coronarodilatanti dell'Iso potesse differire dipendentemente dalla modificazione strutturale.

Pertanto, i cuori sono stati perfusi con soluzione Krebs-Henseleit contenente Iso (5 nM) prima e dopo la contemporanea presenza di singole concentrazioni di WT-Cts (33 nM), P370L-Cts (110 nM) o G364S-Cts (200 nM). I parametri emodinamici sono stati misurati dopo 5 minuti dalla somministrazione di ciascuna soluzione.

Tutti e tre i peptidi hanno abolito il tipico effetto indotto dall'Iso (FIG. 15) su LVP con una potenza che va da WT-Cts > G364S-Cts > P370L-Cts. La WT-Cts e la G364S-Cts hanno bloccato anche l'azione dell'Iso su $+(LVdP/dT)_{max}$, mentre la P370L-Cts ha solo attenuato tale effetto. La vasodilatazione coronarica Iso-dipendente è stata bloccata sia dalla WT-Cts che dalla G364S-Cts, mentre la P370L-Cts non ha modificato in maniera significativa questo parametro. Contemporaneamente, i peptidi hanno modificato anche gli effetti dell'Iso sul rilassamento cardiaco. In particolare, la WT-Cts e la G364S-Cts hanno bloccato l'effetto dell'Iso su $-(LVdP/dT)_{max}$, mentre P370L-Cts si è dimostrata incapace di modulare il lusitropismo Iso-indotto.

Per meglio caratterizzare il tipo di antagonismo esercitato dai tre diversi peptidi nei confronti dell'azione adrenergica Iso-stimolata, i preparati cardiaci sono stati perfusi con concentrazioni crescenti di Iso (5 nM - 1 μ M) da solo ed in presenza di singole concentrazioni di WT-Cts (11, 33 e 110 nM), P370L-Cts (110 nM) o G364S-Cts (200 nM). L'Iso da solo ha indotto un aumento significativo di LVP dose dipendente da 5 nM a 1 μ M. La successiva analisi della variazione percentuale di LVP ha consentito la determinazione della EC50 per l'Iso da solo e in presenza di ciascuno dei tre peptidi alla dose utilizzata (FIG. 16). Il valore (espresso come logM) della EC50 per Iso da solo è -8.67 ± 0.3 ($r^2= 0.84$), per Iso addizionato di WT-Cts (11, 33 e 110 nM) è, rispettivamente, -8.7 ± 0.35 ($r^2= 0.85$), -7.35 ± 0.46 ($r^2= 0.73$), -7.2 ± 1.14 ($r^2= 0.29$); per Iso insieme a P370L-Cts (165 nM) è -8.51 ± 0.46 ($r^2= 0.76$); insieme a CatGlySer (200 nM) è -8.61 ± 0.569 ($r^2= 0.60$).

Poiché anche concentrazioni crescenti di Iso sono incapaci di contrastare l'effetto antagonista dei tre peptidi, si può ipotizzare un tipo di antagonismo non competitivo sia per WT-Cts (11, 33 e 110 nM), che per P370L-Cts (110 nM) e G364S-Cts (200 nM).

3 WT-Cts, P370L-Cts e G364S-Cts in preparazioni Et-1 stimulate

La vasodilatazione indotta dalla Cts, *in vivo*, sembra essere mediata, almeno in parte, dal rilascio di istamina e dalla conseguente attivazione dei recettori H₁ (Kennedy et al., 1998). Tuttavia, non è ancora chiaro se la Cts possa essere in grado di rilassare vasi precontratti nel cuore isolato e perfuso di ratto. L'ET-1 è un peptide con elevata attività vasocostrittrice (Yanagisawa et al., 1988), capace di indurre un effetto inotropo positivo in cuori isolati e perfusi di mammifero (Brunner et al., 2006). Per verificare la capacità della Cts, e delle sue varianti, di contrastare l'inotropismo positivo e la vasocostrizione indotta da ET-1, i cuori sono stati perfusi con KHs contenente ET-1 (1 nM) da sola o in combinazione con una delle varianti di Cts. L'ET-1 da sola incrementa i parametri LVP, CP e $+(LVdP/dT)_{max}$, inducendo quindi un effetto inotropo positivo accompagnato da vasocostrizione. Somministrando contemporaneamente WT-Cts (33n M), P370L-Cts (110n M) e G364S-Cts (200n M) di evidenza che gli effetti ET-1-indotti vengono bloccati da ciascuno dei tre peptidi (FIG. 17).

4 Meccanismo d'azione della WT-Cts (Cts)

4.1 Coinvolgimento dei recettori di membrana

Lo studio del meccanismo d'azione cardiaco della Cts è iniziato dalla valutazione del coinvolgimento dei recettori di membrana; gli effetti cardiaci del peptide sono, infatti, stati stimati in presenza di specifici inibitori di alcuni tipi recettoriali. In particolare,

sono stati usati il Nadololo (10 nM) come inibitore non selettivo dei recettori β_1 e β_2 -ARs, lo SR59230 (100 nM), come inibitore selettivo dei β_3 -ARs, la fentolamina (100 nM), come inibitore selettivo degli α -ARs, e BQ788 (100 nM), come inibitore selettivo dei recettori ETb dell'Et-1, l'atropina (10 nM), come inibitore dei recettori muscarinici, e sono stati valutati gli effetti della Cts su LVP, $+(LVdP/dT)_{max}$ e $-(LVdP/dT)_{max}$, prima e dopo la perfusione con ciascuno di questi antagonisti (FIG. 18).

L'atropina non risulta essere in grado di antagonizzare gli effetti inotropi e lusitropici negativi classici della Cts; la fentolamina li attenua, pur non bloccandoli; mentre BQ-788, Nadololo e SR59230, li aboliscono completamente. Il contributo β_1 - β_2 -ARs è stato discriminato grazie all'utilizzo del Nebivololo, antagonista selettivo per i β_1 -ARs, che ha consentito di attribuire l'antagonismo esercitato verso la Cts unicamente ai β_2 -ARs (dati non mostrati).

Esperimenti di IC50 effettuati confrontando curve dose risposta di Cts da sola con curve dose-risposta di Cts addizionata di singole concentrazioni di Nadololo, o Sr59230, al fine di valutare la maggiore o minore affinità del peptide verso uno specifico tipo di recettore β -ARs, hanno evidenziato che la Cts presenta una maggiore affinità per i recettori β_2 -ARs come dimostato dal valore di IC50 inferiore (18,9 nM) per il Nadololo rispetto a quello per SR59230 (33 nM) (FIG. 19).

4.2 Coinvolgimento delle proteine $G_{i/o}$

La partecipazione delle proteine $G_{i/o}$ nel meccanismo d'azione della Cts è stato dimostrato mediante l'incubazione dei preparati cardiaci con Ptx (10 nM), un disaccoppiante di tali proteine, e valutando gli effetti della Cts dopo questo

pretrattamento. La tossina ha abolito i classici effetti inotropi e lusitropici negativi indotti dal peptide (FIG. 20).

4.3 Coinvolgimento del pathway dell'NO

Poiché il pathway trasduzionale eNOS-NO-cGMP-PKG gioca un ruolo chiave nella modulazione della performance cardiaca (Cerra et al., 2007), è stato indagato il possibile coinvolgimento di tale cascata nel meccanismo d'azione della Cts, inibendo selettivamente alcune sue importanti tappe. Si è inibita l'isoforma endoteliale della NOS mediante L-NIO (10 μ M), l'NO attraverso lo scavenger PTIO (10 μ M), la guanilato ciclastasi solubile (sGC) attraverso ODQ (10 μ M) e la PKG mediante KT5823 (0.1 μ M). I risultati ottenuti mostrano che ciascuno di questi inibitori è in grado di abolire gli effetti della Cts su LVP, $+(LVdP/dT)_{max}$ e $-(LVdP/dT)_{max}$, eccezione fatta per KT5823 che li attenua soltanto (FIG. 21).

Visto il nascente ruolo cardiomodulatorio della isoforma neuronale dell'enzima NOS, attraverso l'utilizzo di un suo inibitore selettivo, vL-NIO (100 nM), è stato valutato anche il suo coinvolgimento. Gli effetti inotropi e lusitropici della Cts dopo trattamento con vL-NIO, sono aboliti (FIG. 22A).

Mediante analisi di western blotting, sono stati valutati anche i livelli di fosforilazione della eNOS (FIG. 22B) e della nNOS (FIG. 22C), che risultano significativamente aumentati in estratti ventricolari di cuori trattati con Cts (110 nM). Il coinvolgimento del cGMP è stato invece valutato attraverso dosaggio ELISA, il quale ha confermato un aumento delle concentrazioni intracellulare di tale nucleotide ciclico in cuori perfusi con Cts (FIG. 22D).

4.4 Coinvolgimento di un endotelio funzionale

Il ruolo determinante di un endotelio funzionante nel cardiotropismo Cts-dipendente è stato testato utilizzando un agente tensioattivo, il Triton-X100 (1:200), capace di ledere funzionalmente l'endotelio vascolare, per valutare gli effetti del peptide dopo questo tipo pretrattamento. Dopo la perfusione con Triton-X100 la Cts non mostra più i classici effetti inotropi e lusitropici negativi (FIG. 23A). Inoltre, per valutare il selettivo coinvolgimento di una eNOS di origine endoteliale, sono state condotti immunoblotting su estratti di cellule HUVEC trattate con Cts (110 nM) e con Cts + L-NIO (10 μ M). Tali analisi hanno evidenziato un aumento della fosforilazione dell'enzima eNOS in cellule trattate con Cts e un abolizione di tale evento nelle cellule contemporaneamente trattate con l'inibitore L-NIO (FIG. 23B).

4.5 Ruolo della fosfoinositide-3 chinasi (PI-3-k) e della Fosfodiesterasi-2 (PDE2)

La ricerca di un attivatore che potesse essere a monte della cascata del pathway dell'NO, ha portato alla luce recentissimi risultati ottenuti con un altro importante frammento CgA-derivato, cioè la Vs-1, da Ramella e collaboratori. Nel loro studio, infatti, essi dimostrano come la Vs-1 possa essere in grado di attivare l'enzima eNOS grazie alla preliminare attivazione della PI-3-k. Pertanto, è stato ipotizzato il coinvolgimento di tale chinasi anche nel meccanismo di azione della Cts. A tale scopo gli effetti cardiaci del peptide sono stati valutati prima e dopo il trattamento dei preparati cardiaci con wortmanina (100 nM), un inibitore della PI-3-k, e i risultati evidenziano che tale antagonista è capace di abolire gli effetti cardiaci Cts-dipendenti.

E' anche vero, però, che il dimostrato coinvolgimento parziale della PKG nel cardiotropismo lascia intendere che cGMP possa convogliare la sua azione verso un substrato alternativo. E' ben noto in letteratura (Mongillo et al., 2006), che un classico substrato attivato dal cGMP possa essere la PDE2; utilizzando un inibitore selettivo di tale isoforma dell'enzima (EHNA 100 nM) sono stati valutati gli effetti cardiaci della Cts sia in condizioni basali che sotto stimolazione adrenergica Iso-dipendente dopo trattamento con tale antagonista. EHNA è in grado di abolire l'inotropismo ed il lusitropismo negativi del peptide in condizioni basali (FIG. 24), ma è anche capace di abolire l'azione antiadrenergica osservata per la Cts in presenza di Iso (FIG. 25A).

Il dosaggio ELISA dei livelli intracellulari di cAMP ha evidenziato un aumento delle sue concentrazioni in cuori trattati con Iso (5 nM), ridotto drasticamente in cuori trattati contemporaneamente con Iso + Cts (110 nM) (FIG. 25B).

5 Biotin switch assay

La S-nitrosilazione è recentemente emersa come importante processo in grado di modulare l'attività di importanti proteine cardiache e, quindi, la performance cardiaca stessa. Il biotin switch assay ha consentito di evidenziare un generale aumento della S-nitrosilazione della frazione proteica di membrana in estratti ventricolari di cuori trattati con Cts (110 nM). In particolare, un netto e significativo aumento della S-nitrosilazione è riscontrato a livello di due bande, nella lane relativa al cuore perfuso con Cts, corrispondenti al peso molecolare di circa 50 kDa e di circa 6 kDa.

Per via della nota modulazione dell'endocitosi del recettore β_1 -ARs da parte della β -arrestina S-nitrosilata (P.M.~50 kDa) (Ozawa et al., 2008), utilizzando uno specifico

anticorpo diretto contro tale proteina, sono state condotte analisi di western blotting (sulle membrane stripate) che hanno mostrato corrispondenza tra la banda S-nitrosilata a 50 kDa e la banda riscontrata con l'anticorpo specifico (FIG. 26A). Allo stesso modo, la risaputa regolazione dell'attività cardiaca da parte del PLN S-nitrosilato (Garofalo et al., 2010) ha indirizzato verso l'utilizzo di un anticorpo specifico diretto contro tale proteina per verificare se esse potesse corrispondere con la banda dal peso molecolare di 6 kDa. Difatti, l'analisi di immunoblotting ha evidenziato correlazione tra PLN e banda di 6 kDa (FIG. 26B).

banda di 6 kDa (FIG. 26B).

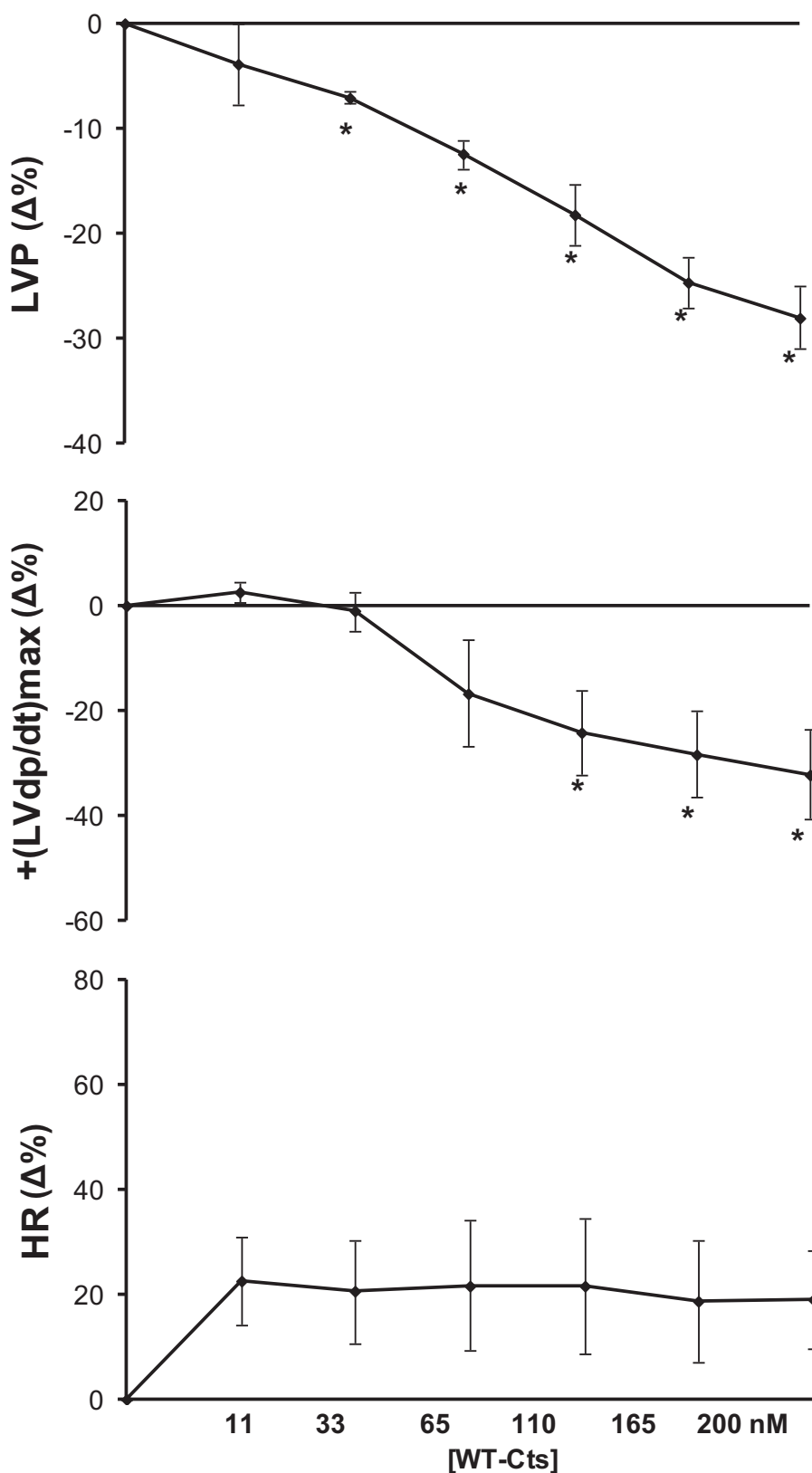


FIGURA 9. Curve dose-risposta per la WT-Cts (11-200 nM) relative ai parametri LVP, +(LVdp/dt)max e HR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: *=p<0.01

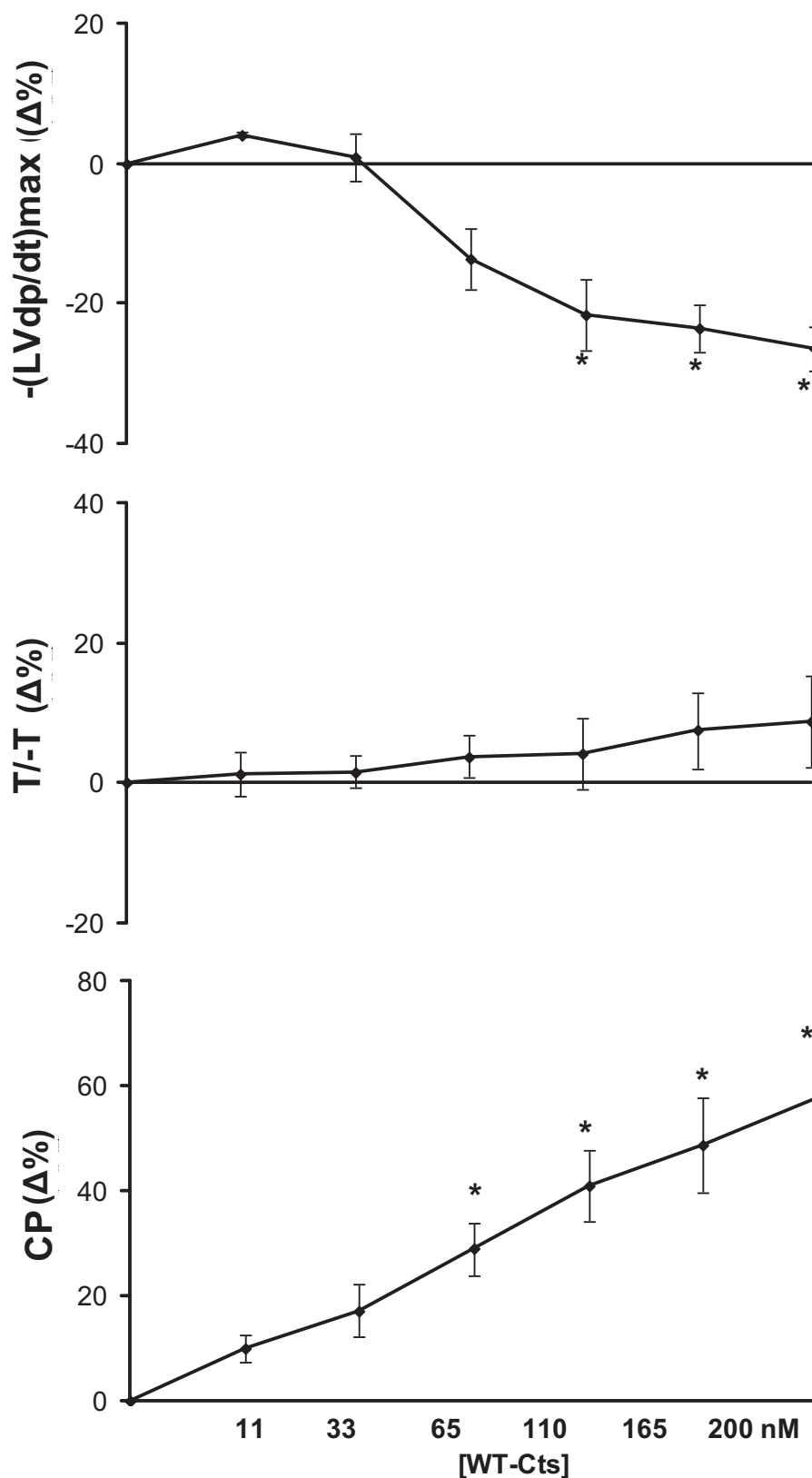


FIGURA 10. Curve dose-risposta per la WT-Cts (11-200 nM) relative ai parametri $-(LVdp/dt)_{max}$, T/T e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$

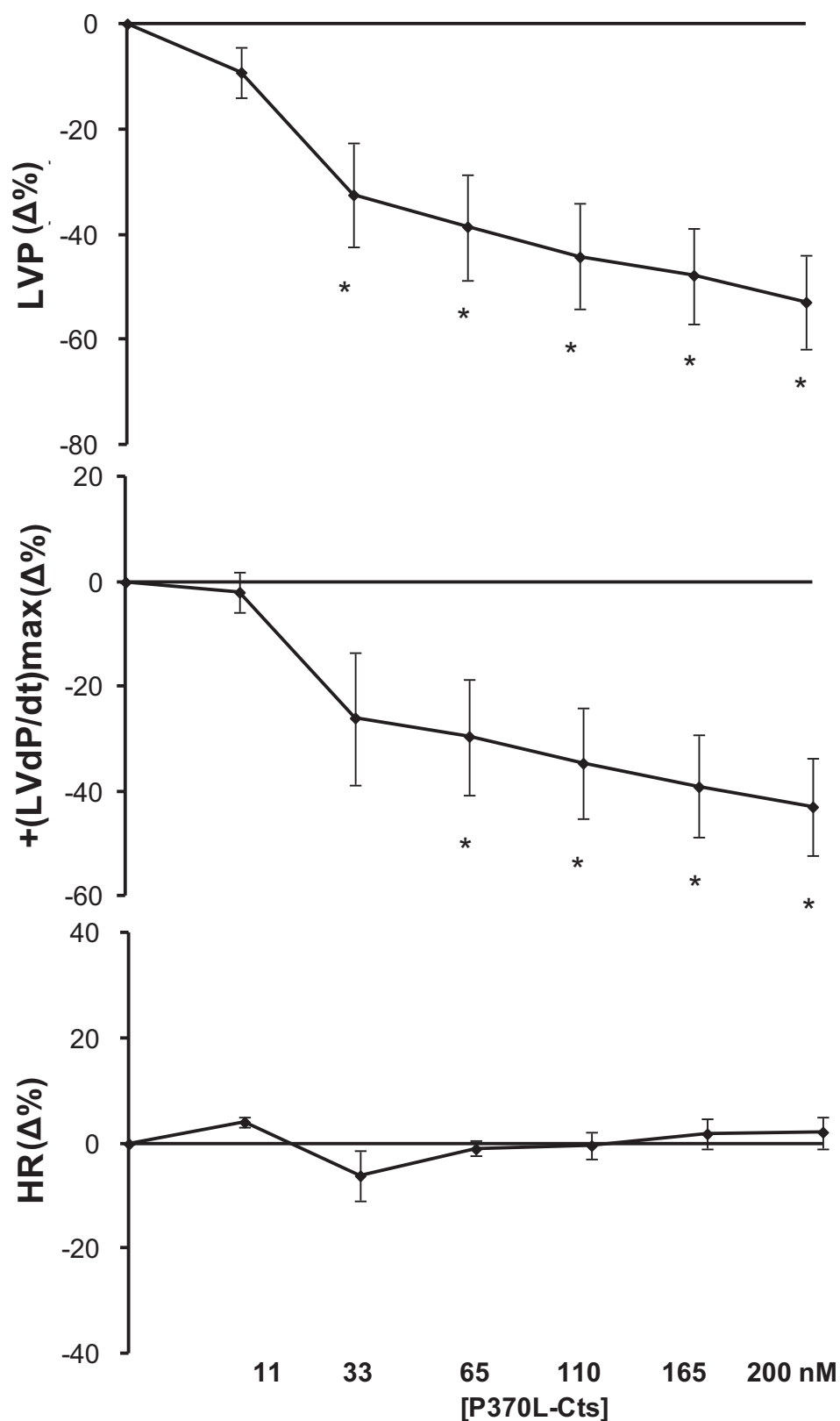


FIGURA 11. Curve dose-risposta per la P370L-Cts (11-200 nM) relative ai parametri LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$ e HR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$

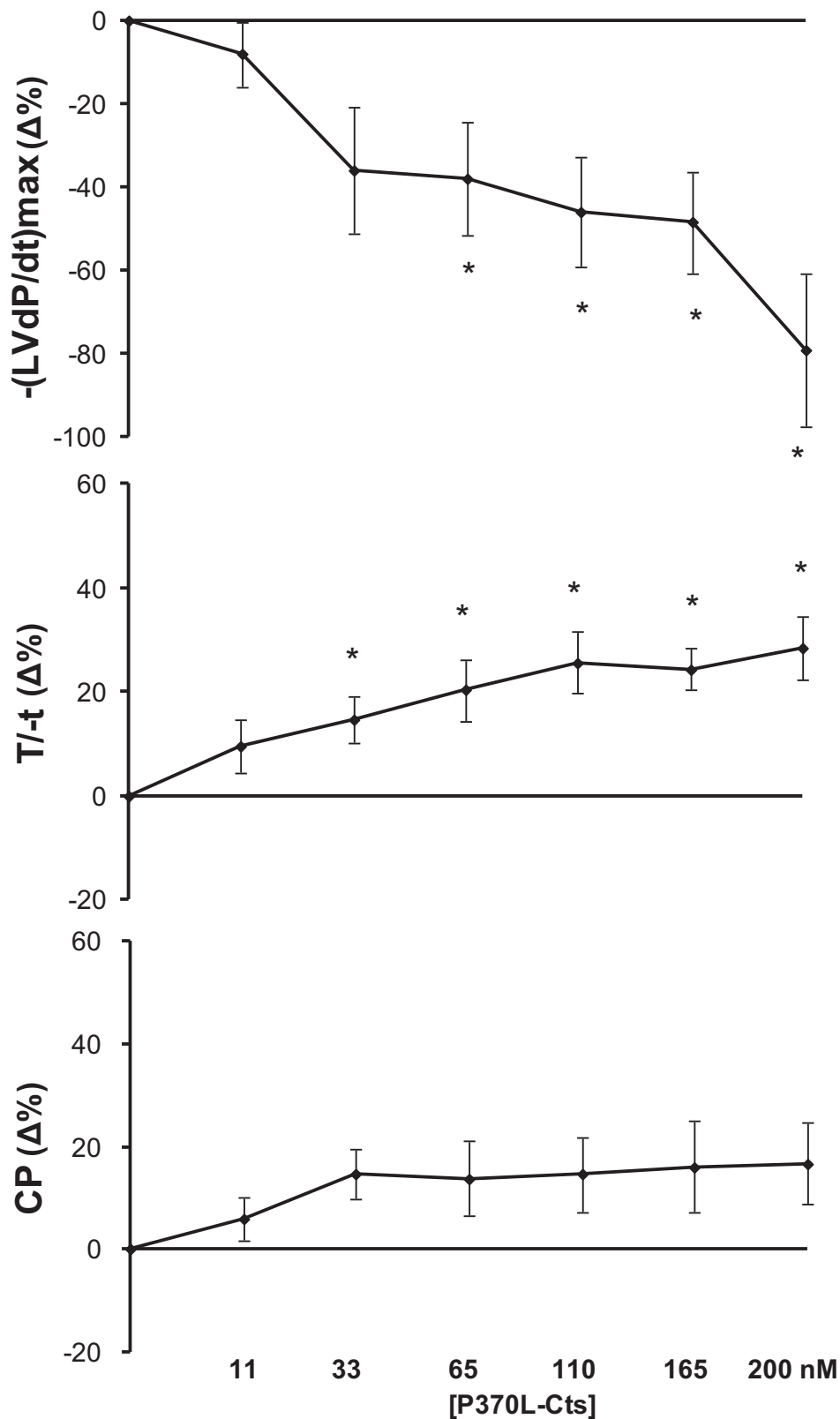


FIGURA 12. Curve dose-risposta per la P370L-Cts (11-200 nM) relative ai parametri $-(LVdp/dt)_{max}$, T/t e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$

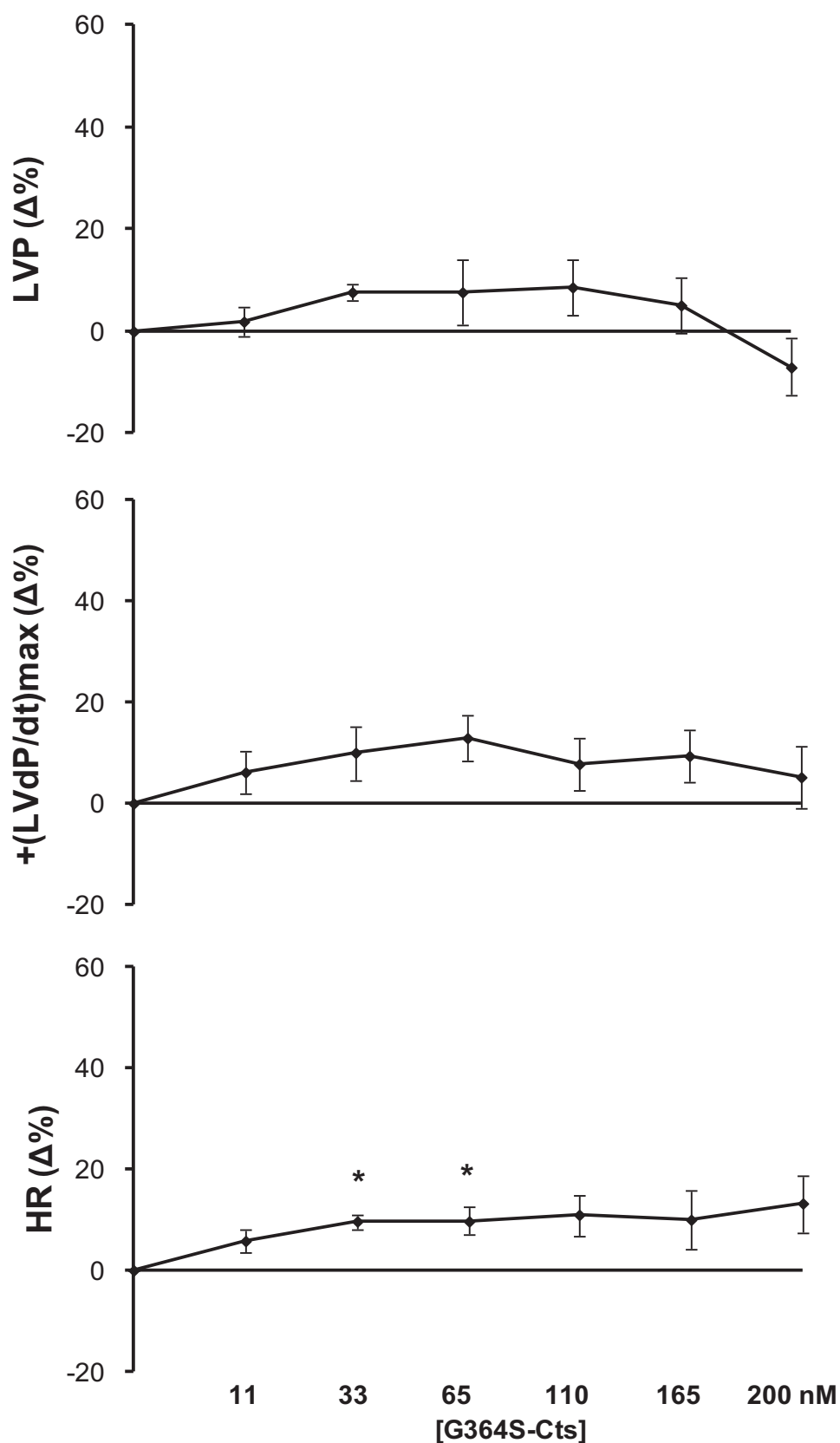


FIGURA 13. Curve dose-risposta per la G364S-Cts (11-200 nM) relative ai parametri LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$ e HR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$

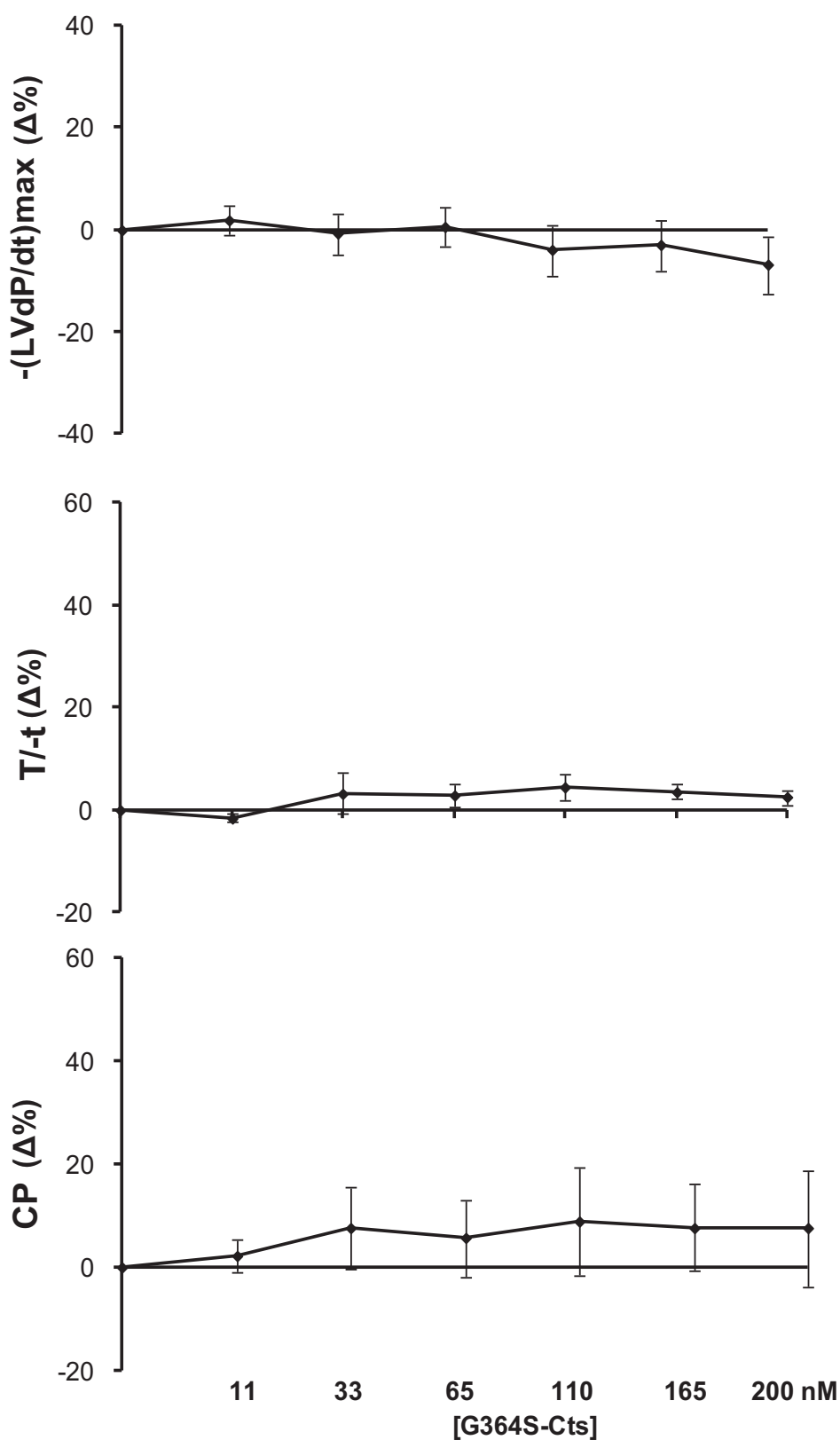


FIGURA 14. Curve dose-risposta per la G364S-Cts (11-200 nM) relative ai parametri $-(LVdP/dt)_{max}$, $T/-t$ e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$

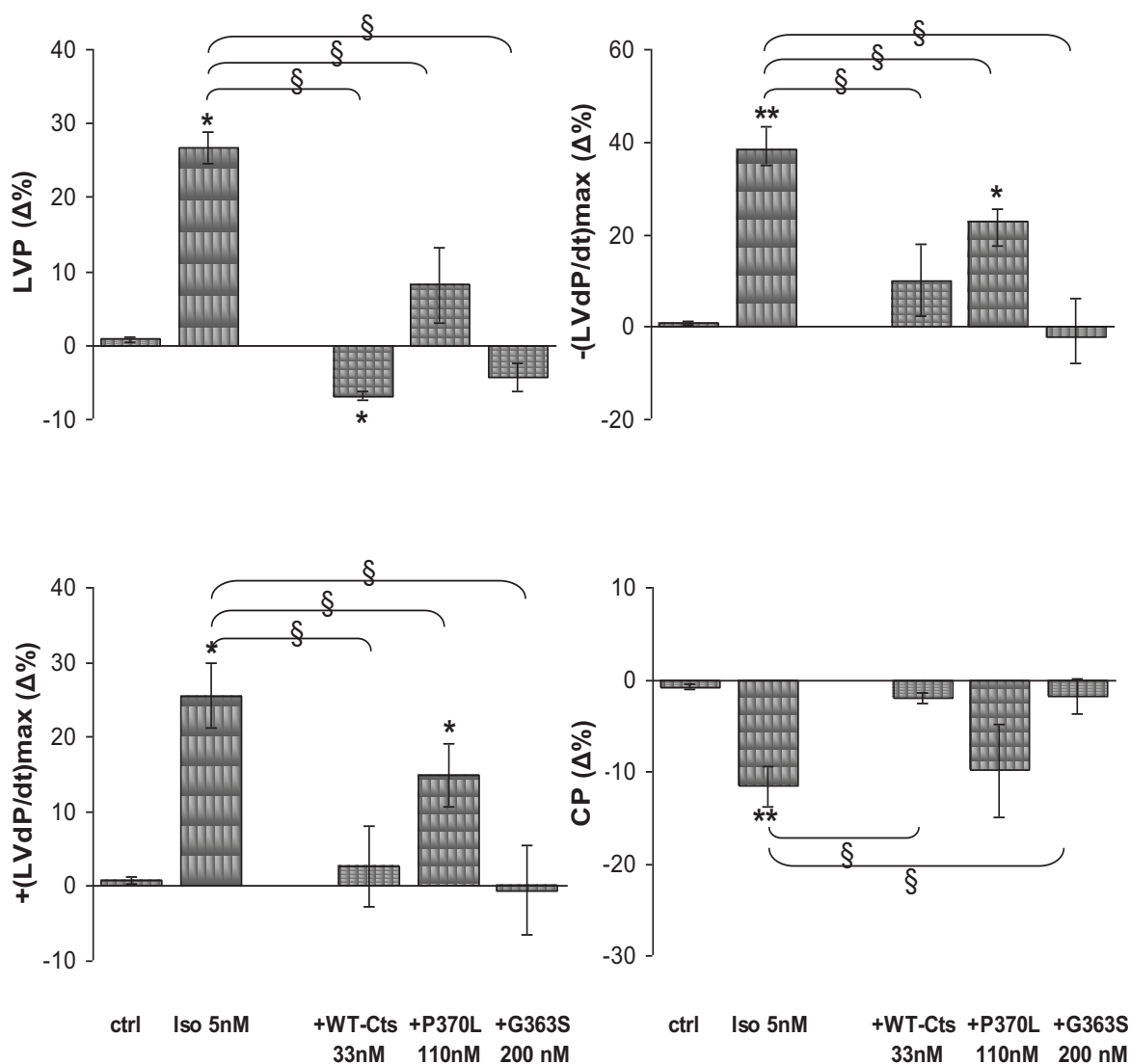


FIGURA 15. Effetti dell'Iso prima e dopo il trattamento con WT-Cts, P370L-Cts o S364G-Cts sui parametri LVP, +(LVdp/dt)max, -(LVdp/dt)max e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con n=8. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: *= $p < 0.01$ Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante two-way-ANOVA: §= $p < 0.05$.

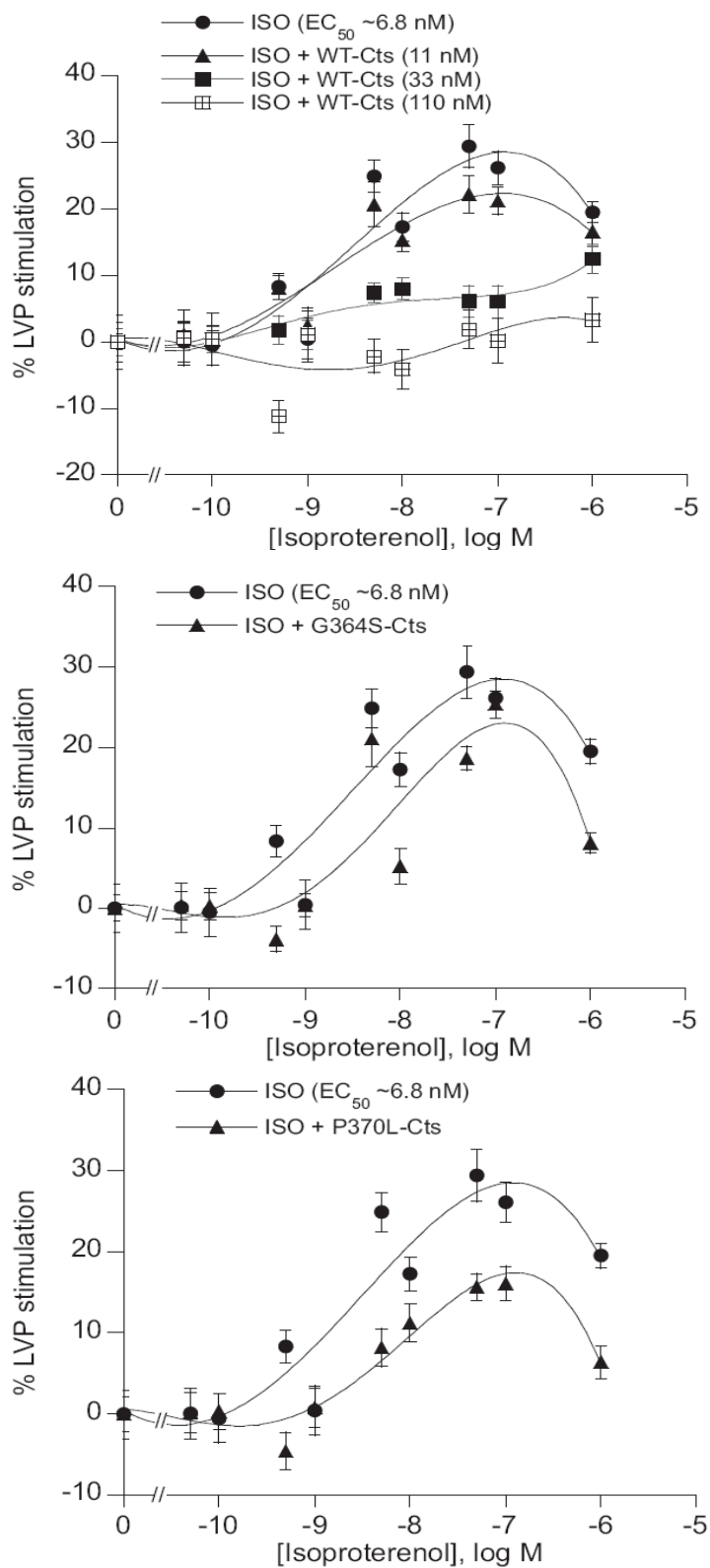


FIGURA 16. Curve di EC₅₀ ottenute confrontando curve dose-risposta di Iso da solo (10⁻¹⁰ M/10⁻⁵ M) e curve dose-risposte di Iso addizionato di singole concentrazioni di WT-Cts (11, 33, 110 nM), di G364S-Cts (200 nM) e P370L-Cts (165 nM). I dati sono stati elaborati mediante one-way ANOVA seguito dal Bonferroni's post hoc test; n=6.

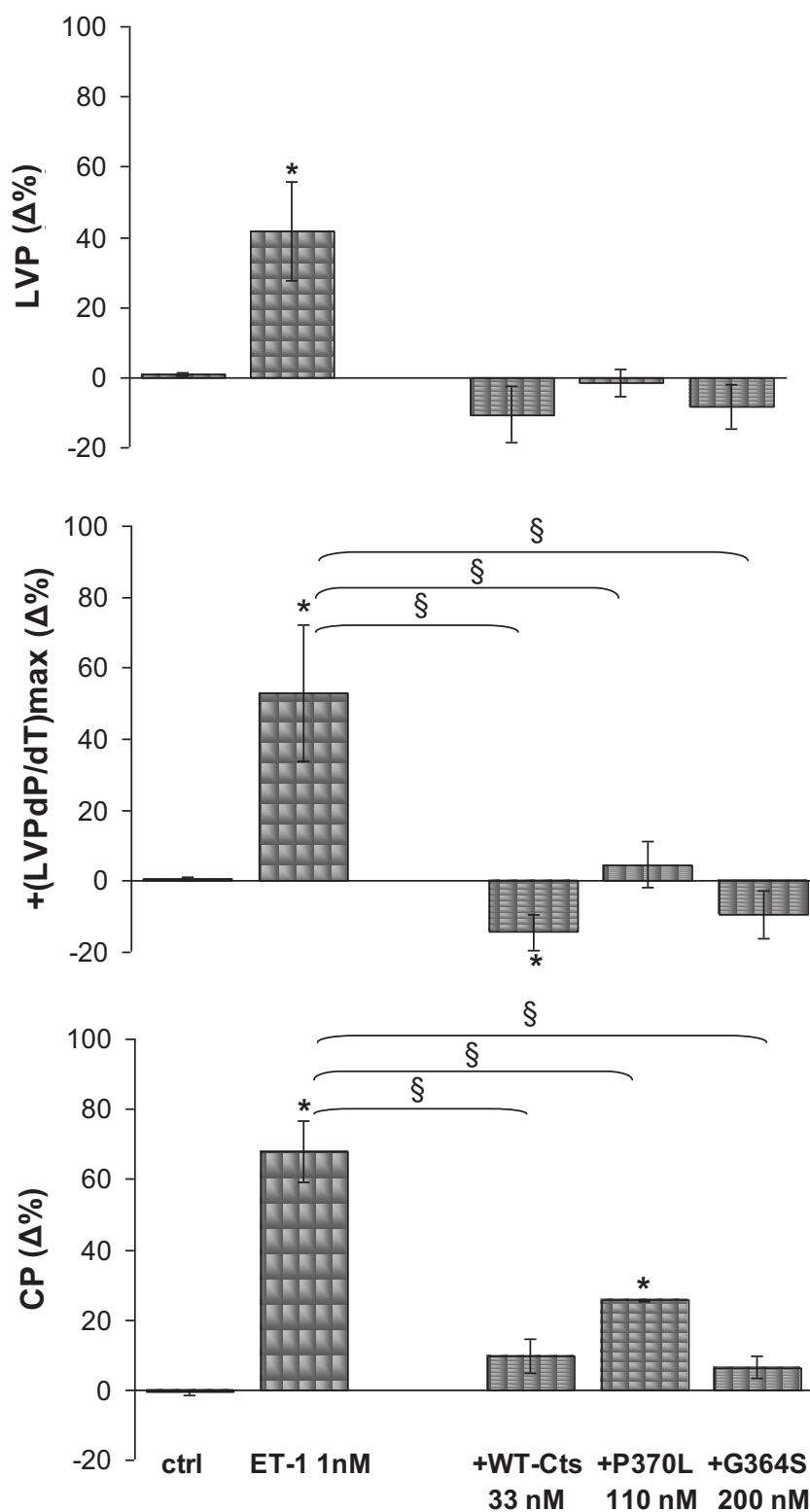


FIGURA 17. Effetti dell' ET-1 prima e dopo il trattamento con WT-Cts, P370L-Cts o S364G-Cts sui parametri LVP, +(LVdp/dt)max e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con $n=8$. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$ Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA: $§=p<0.05$.

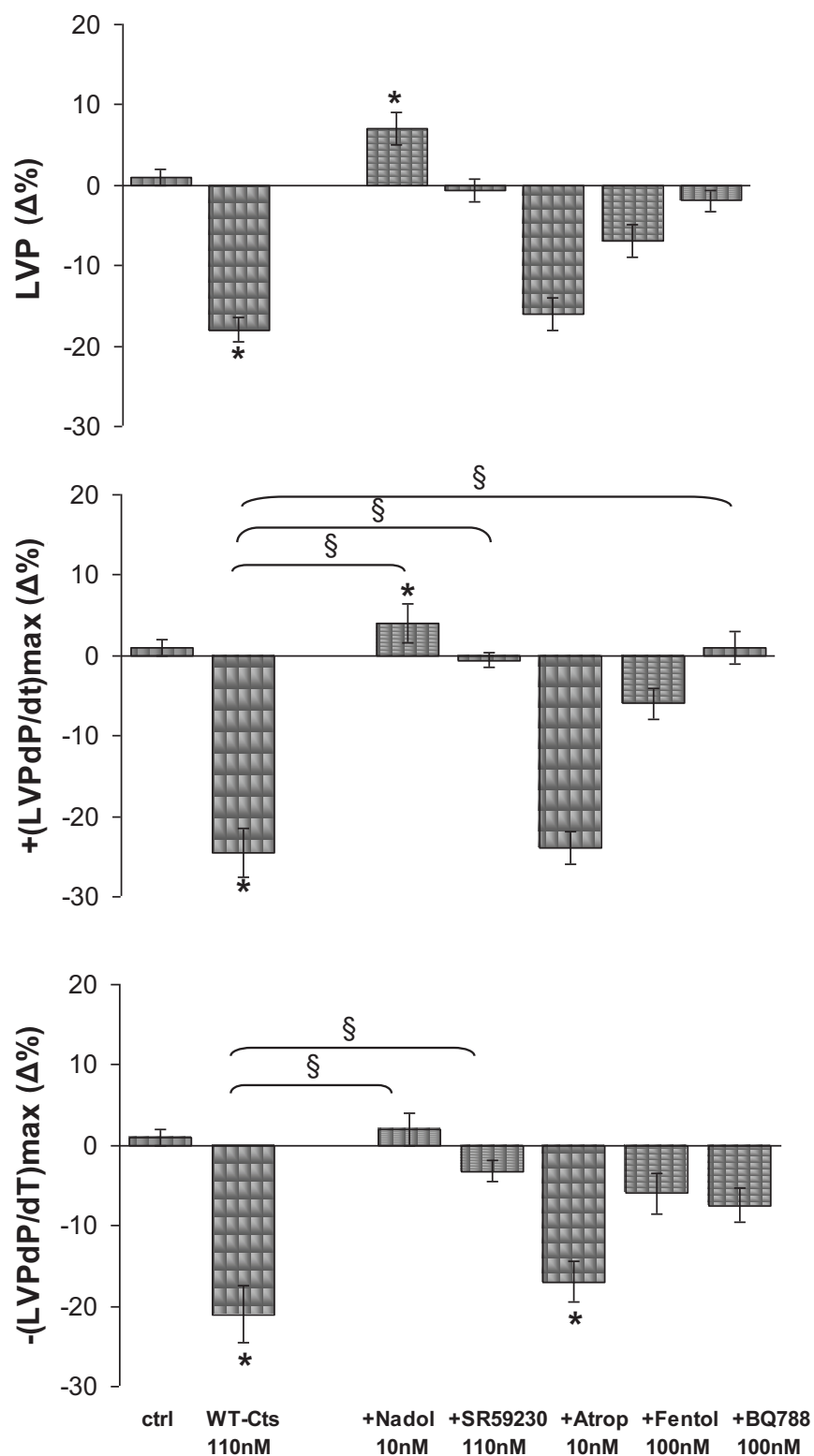


FIGURA 18. Effetti della WT-Cts prima e dopo il trattamento con Nadololo, SR59230, Atropina, Fentolamina, BQ788 sui parametri LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$ e $-(LVdp/dt)_{max}$. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con $n=8$. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$ Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA: $\S=p<0.05$.

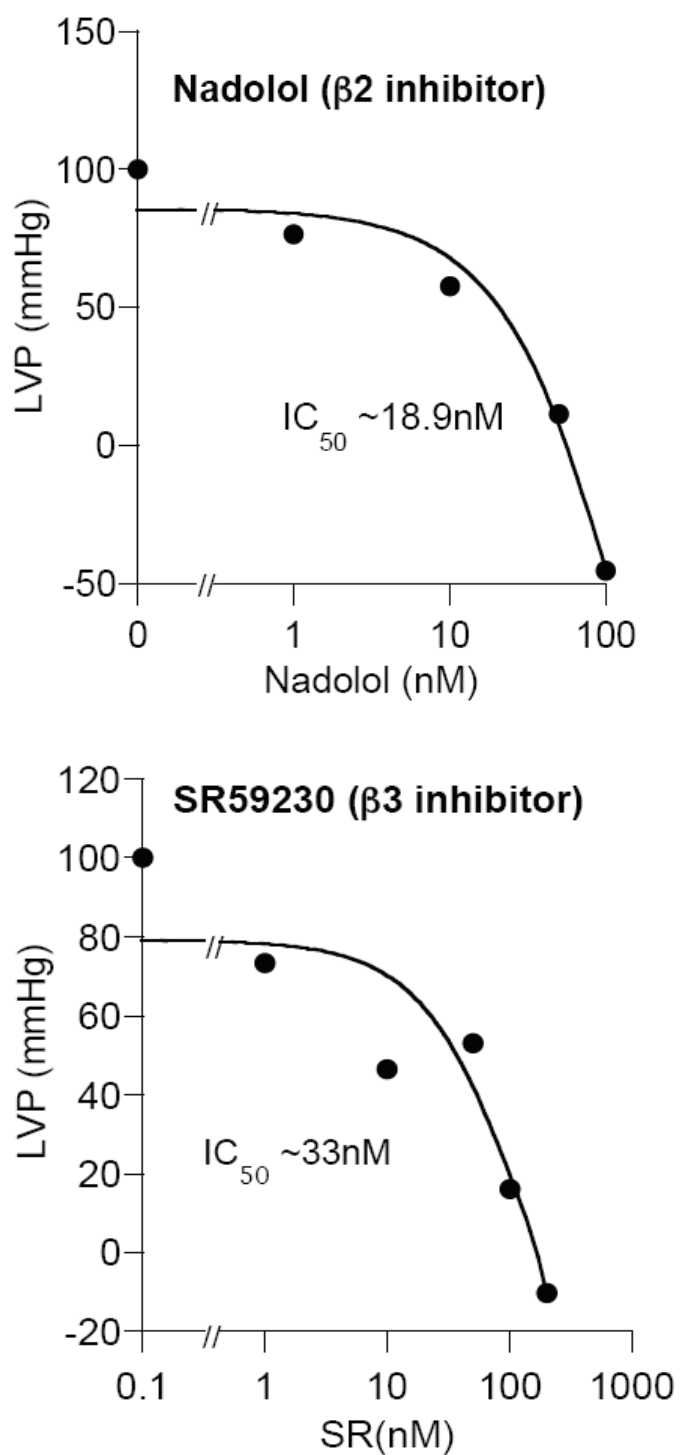


FIGURA 19. Curve di IC_{50} ottenute confrontando curve dose-risposta di WT-Cts da sola (11-200 nM) e curve dose-risposte di Wt-Cts addizionata di singole concentrazioni di Nadololo o SR59230. I dati sono stati elaborati mediante one-way ANOVA seguito dal Bonferroni's post hoc test; n=6.

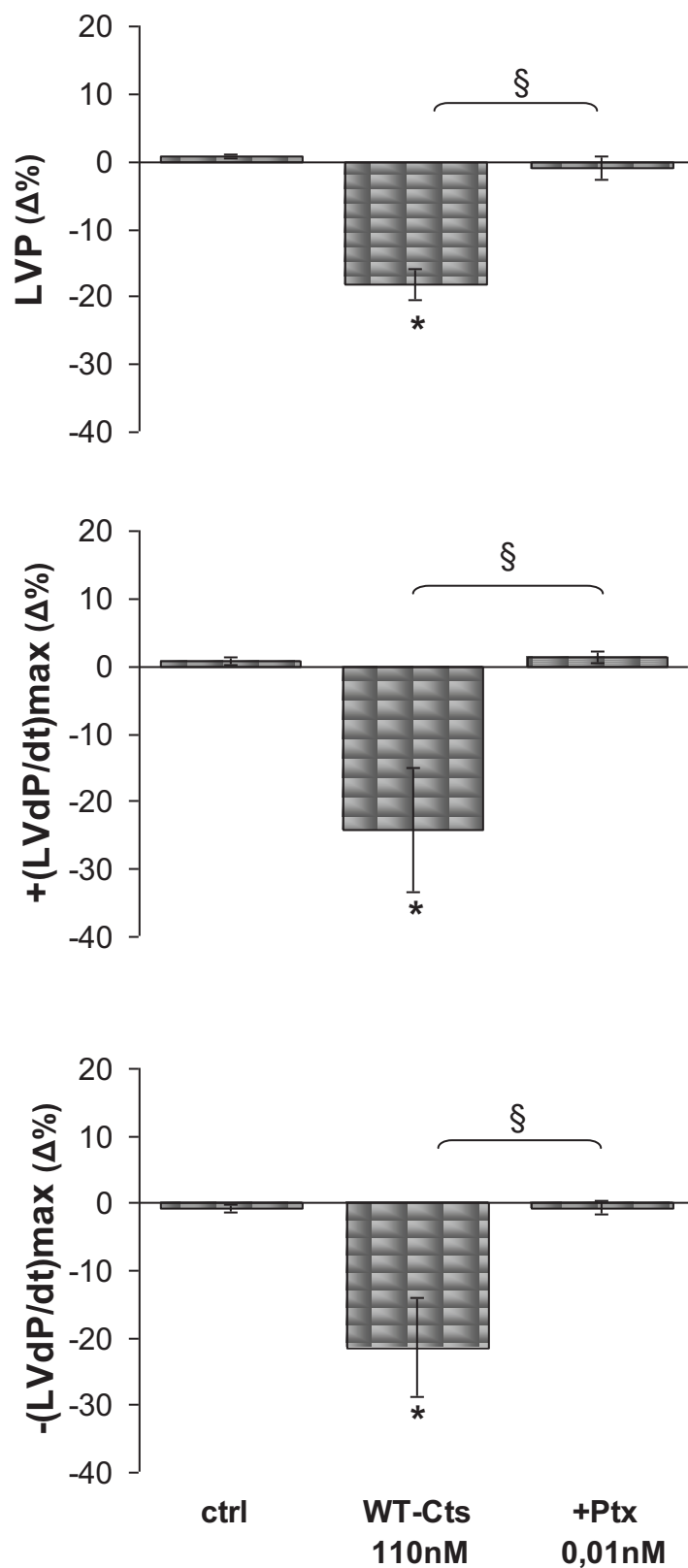


FIGURA 20. Effetti della WT-Cts prima e dopo incubazione con Ptx sui parametri LVP, +(LVdp/dt)max e -(LVdp/dt)max. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con $n=8$. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: *= $p<0.01$ Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA: §= $p<0.05$.

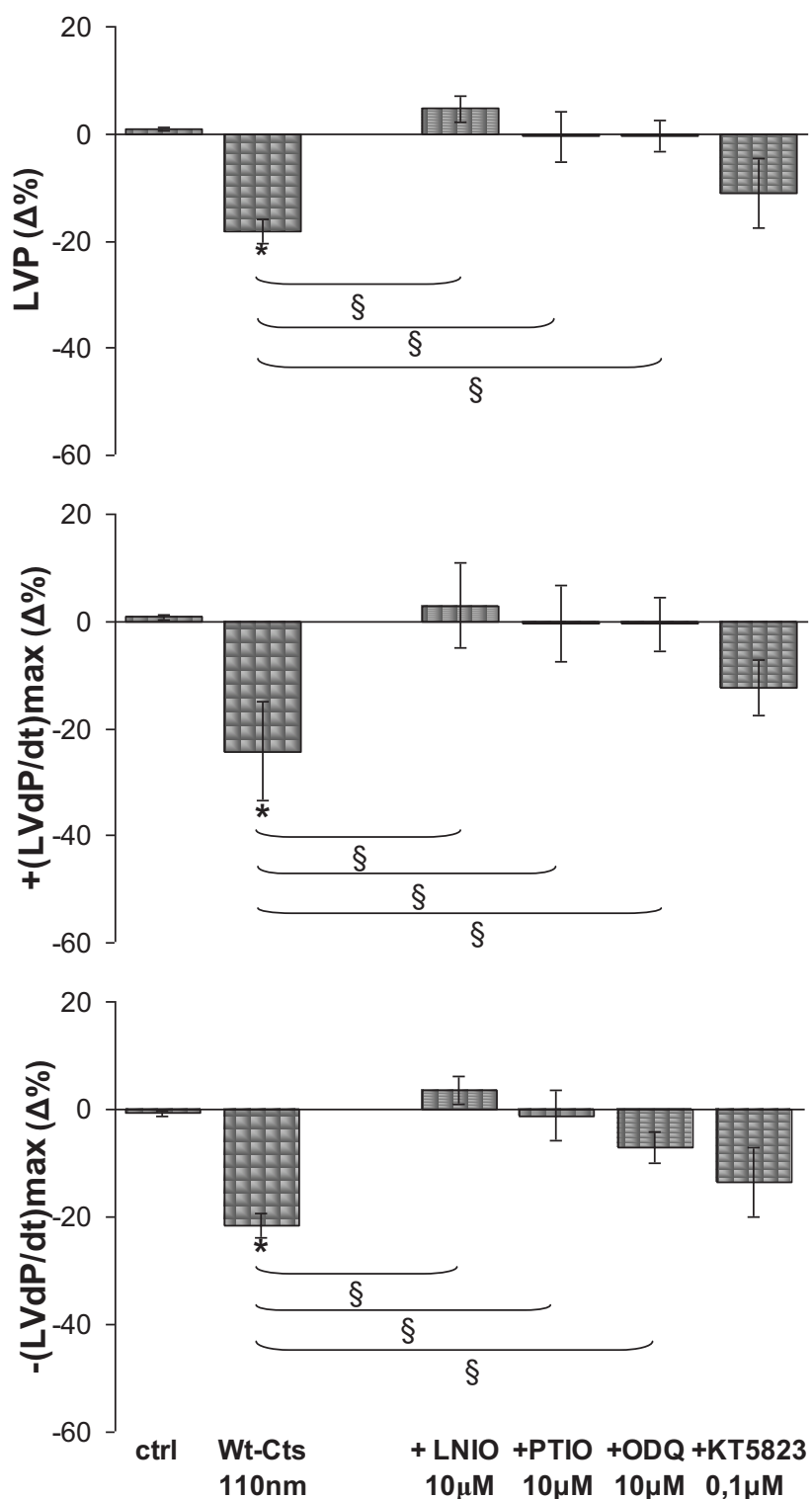


FIGURA 21. Effetti della WT-Cts prima e dopo trattamento con L-NIO, PTIO, ODQ e KT5823 sui parametri LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$ e $-(LVdp/dt)_{max}$. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con $n=8$. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$ Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA: $\S=p<0.05$.

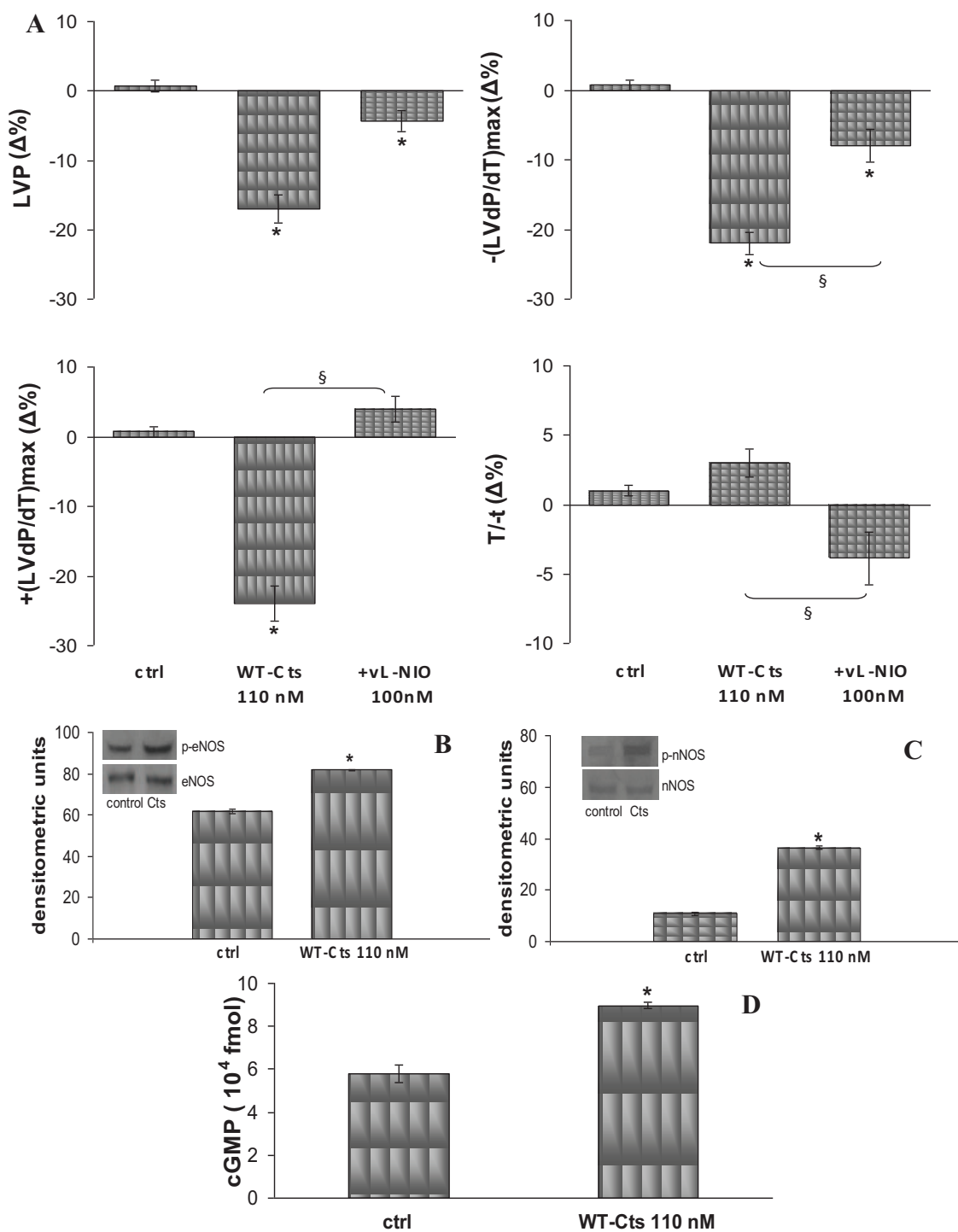


FIGURA 22. Effetti della WT-Cts prima e dopo trattamento con vL-NIO (A) sui parametri LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$, $-(LVdp/dt)_{max}$ e T/T. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con $n=8$. Variazioni della fosforilazione della eNOS (B) e della nNOS (C) in estratti ventricolari trattati con Cts ($n=4$); variazioni delle concentrazioni intracellulari di cGMP (D) in cuori trattati con WT-Cts rispetto al controllo ($n=4$). Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$. Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA: $\S=p<0.05$

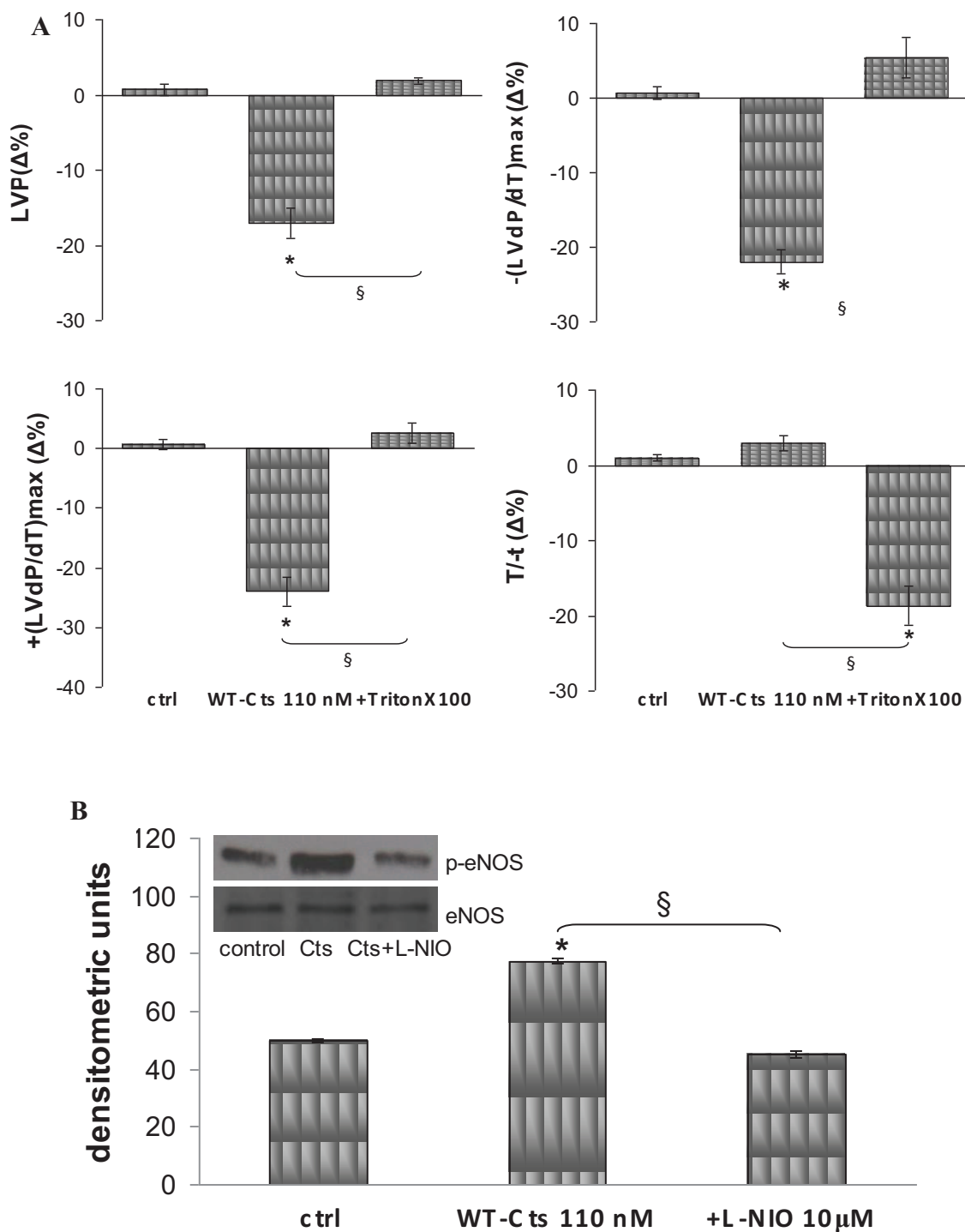


FIGURA 23. Effetti della WT-Cts prima e dopo trattamento con Triton-X100 (1:200) (A) sui parametri LVP, +(LVdp/dt)max, -(LVdp/dt)max e T/T. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con n=8. (B) Variazioni della forforilazione della eNOS in colture HUVEC trattate con Cts e Cts + L-NIO. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: *=p<0.01 Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA); §=p<0.05

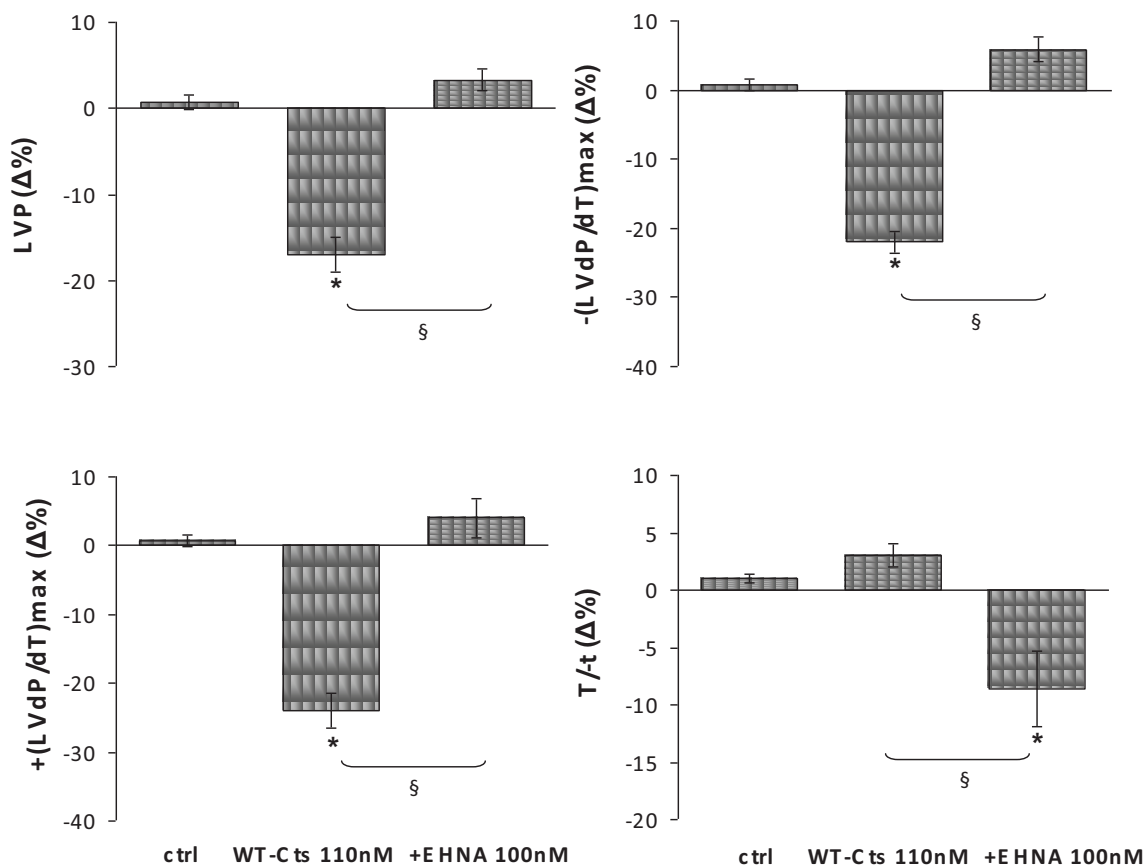


FIGURA 24. Effetti della WT-Cts prima e dopo incubazione con EHNA sui parametri LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$, $-(LVdp/dt)_{max}$ e T/t. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con $n=8$. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$. Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA: $\S=p<0.05$.

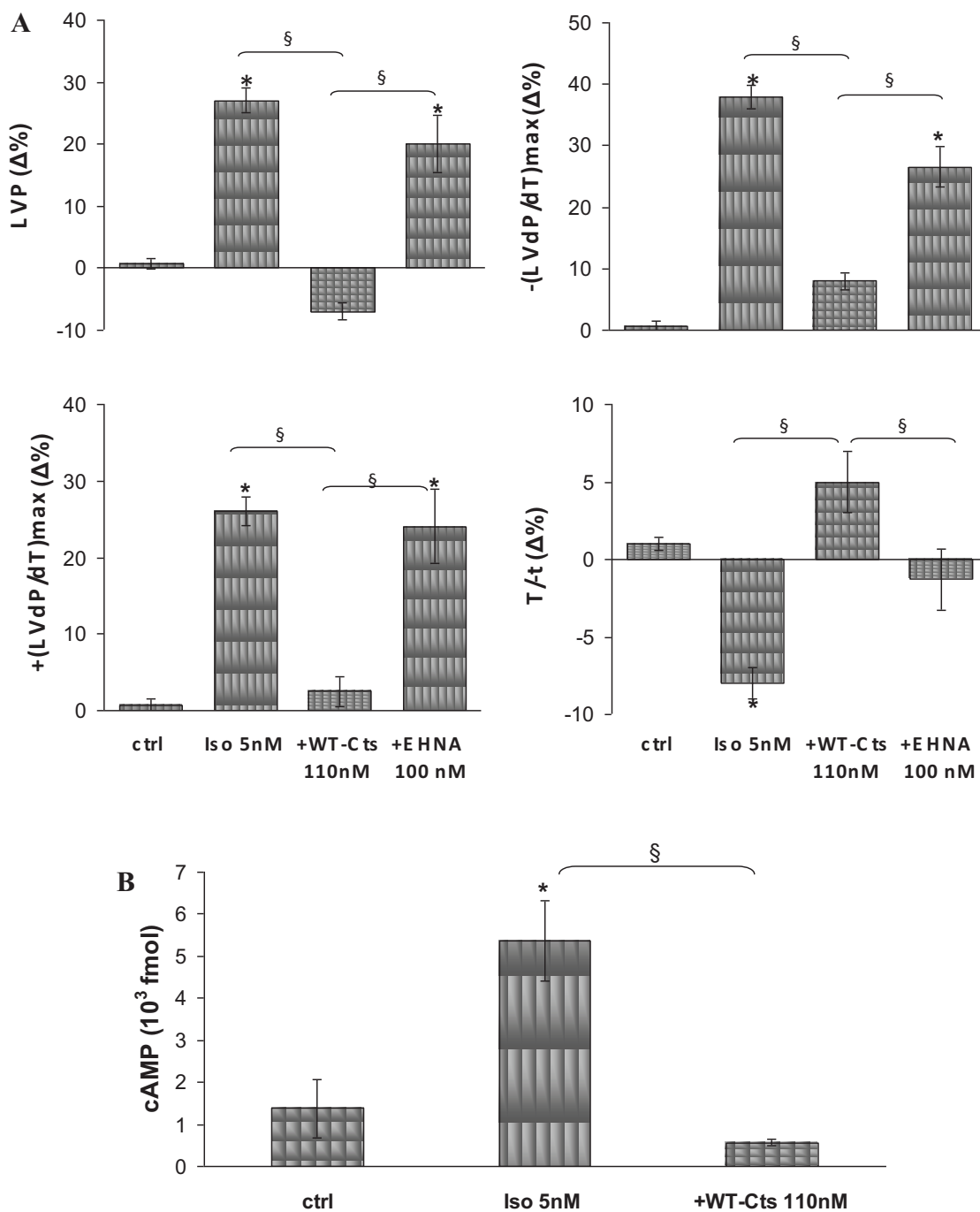


FIGURA 25. Effetti dell'Iso prima e dopo trattamento con Cts e Cts addizionata di EHNA (A) sui parametri LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$, $-(LVdp/dt)_{max}$ e T/T (n=8). (B) Variazioni delle concentrazioni intracellulari di cAMP in cuori trattati con Iso e Iso+Cts rispetto al controllo. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, con n=4. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$ Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante il two-way-ANOVA); $\S=p<0.05$.

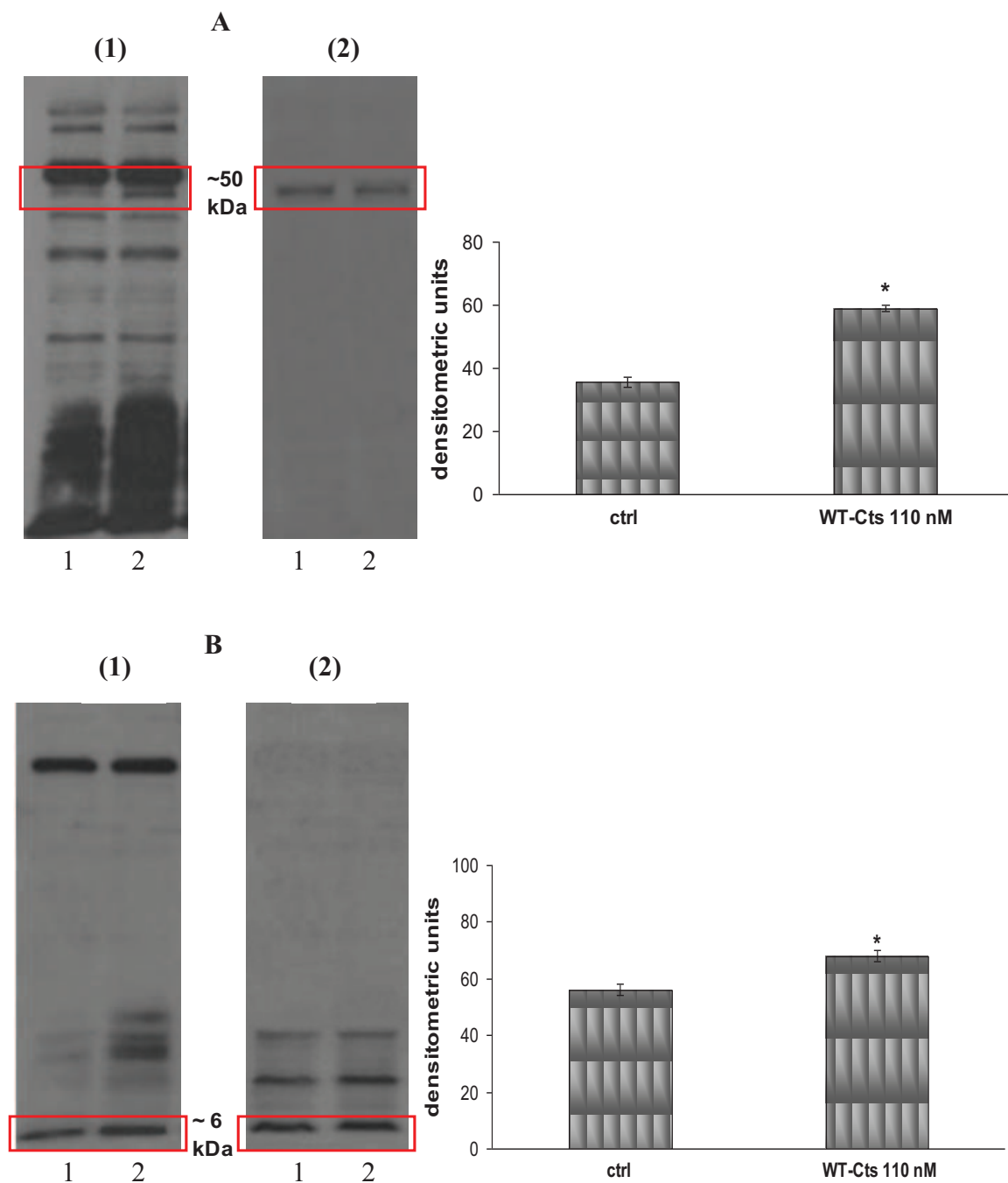


FIGURA 26 Western blotting delle proteine S-nitrosilate (A1 e B1) in cuore di ratto controllo (lane 1) e trattato con Cts (lane 2). Western blotting condotto utilizzando Anti- β -arrestina (A2) e anti-PLN (B2): lane 1 cuore controllo, lane 2 cuore trattato con Cts. Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: $*=p<0.01$

DISCUSSIONE

1 Cts e sue varianti umane nella performance cardiaca basale di mammifero

Sin da quando la Cts è stata individuata ed identificata come un frammento CgA derivato, è stato proposto un suo ruolo modulatore nell'omeostasi del rilascio delle CAs e nel controllo autonomo della pressione sanguigna. Particolare attenzione è rivolta ad un suo possibile coinvolgimento nella protezione o nello sviluppo di patologie, come l'ipertensione, suggerito dalle già note conoscenze riguardanti la CgA ed il suo diretto intervento nella patogenesi di disfunzioni cardiovascolari come lo scompenso cardiaco, l'infarto e l'ipertensione essenziale (Ceconi et al., 2002; Mahapatra et al., 2005).

Il glicopeptide da cui la Cts origina, la CgA, è co-immagazzinato insieme a molecole bioattive, come le CAs, nei granuli elettrodensiti presenti nelle cellule cromaffini della midollare dei surreni e nei terminali delle fibre post-gangliari del sistema nervoso simpatico; insieme ad esse viene rilasciata da tali siti di deposito in seguito a stimolazione colinergica mediata dai recettori nicotinici. Recenti studi, condotti da Mahapatra e collaboratori (2005), hanno dimostrato che topi *knockout* per il gene della CgA (CgA^{-/-}) mostrano una riduzione del numero e della grandezza dei granuli secretori, elevata pressione sanguigna ed un aumento delle dimensioni del ventricolo sinistro; tutte queste manifestazioni fisio-patologiche possono essere contrastate mediante la trasfezione degli stessi animali con il gene umano della CgA o attraverso la somministrazione di Cts esogena, a dimostrazione del fatto che la mancata espressione di CgA, e quindi della Cts, può alterare *in vivo* il controllo autonomo della circolazione generando ipertensione.

La Cts, CgA₃₅₂₋₃₇₂ umana, è un peptide di 21 aminoacidi generato dall'azione di particolari enzimi proteolitici su appositi siti dibasici presenti nella struttura primaria

della CgA. Inizialmente, questo frammento è stato classificato come un antagonista non competitivo del recettore nicotino (Mahata et al., 1997, 1999, 2000, 2004), il quale è responsabile, dopo interazione con il ligando fisiologico Ach, dello stimolo capace di evocare la fusione dei granuli secretori con la membrana plasmatica determinando il rilascio delle CAs nello spazio extra-cellulare. Insieme alla capacità di inibire la secrezione catecolaminergica dipendente dallo stimolo nicotino colinergico, la Cts si è dimostrata capace di contrastare il fenomeno di desensitizzazione del recettore nicotino dovuta ad una sua stimolazione persistente e/o ripetuta (Mahata et al., 1999). Questa azione risulta di elevata utilità in quelle situazioni di aumentato stress che possono provocare, per intervento della desensitizzazione del recettore nicotino, blocco della trasmissione e del rilascio catecolaminergico anche quando vi sia la richiesta di un'aumentata attività simpatica.

Studi effettuati *in vivo* (Kennedy et al., 1998) hanno, inoltre, evidenziato un'azione cardiovascolare indiretta del peptide, che si manifesta con una potente risposta vasodilatatoria, mediata dall'induzione del rilascio di istamina, la quale oltre ad agire attraverso il mediatore chimico NO, è in grado di determinare un aumento dei livelli circolanti di epinefrina che contribuisce ulteriormente all'effetto vasodilatante.

Il coinvolgimento della Cts nello sviluppo dell'ipertensione è confermato da studi che mostrano come in soggetti ipertesi, nei quali la malattia è già stata diagnosticata, o in soggetti normo-tesi che presentano un aumentato rischio di ipertensione per una predisposizione familiare, i livelli circolanti di Cts siano più bassi rispetto ai normali valori di riferimento (O'Connor et al., 2002), mentre le concentrazioni plasmatiche di CgA siano molto superiori rispetto a quelle dei soggetti sani (Takiyyuddin et al., 1995). L'aumento dei livelli di CgA può essere, verosimilmente, considerato come una conseguenza diretta della ridotta produzione di Cts. Sappiamo, infatti, che agendo da

antagonista nicotinico, la Cts non solo blocca la secrezione catecolaminergica, ma inibisce anche la risposta trascrizionale, evocata da tale segnale, che determina la re-sintesi delle molecole perse con il rilascio, compresa la CgA (Mahata et al., 2003). Quando questo tipo di controllo non è pienamente efficiente a causa della ridotta presenza di Cts, si assiste anche ad una aumentata sintesi di CgA responsabile degli elevati livelli plasmatici riscontrati negli ipertesi.

Il presente lavoro di tesi, alla luce degli effetti cardio-vascolari che la Cts ha mostrato *in vivo* e degli effetti modulatori a feedback negativo che ha esibito anche *in vitro*, ha voluto indagare la possibile azione cardiaca diretta del peptide, mediante l'utilizzo di un modello sperimentale che ricrea fedelmente le condizioni fisiologiche del cuore di mammifero: il cuore di ratto isolato e perfuso secondo la metodica *Langendorff*. L'attività sperimentale ha focalizzato la sua attenzione non solo sull'azione cardiotropica della WT-Cts, la forma del peptide fisiologicamente espressa negli uomini, ma ha anche indagato gli effetti cardiaci diretti delle sue varianti umane, P370L-Cts e G364S-Cts, naturalmente codificate in alcuni individui, per comprendere in che modo una mutazione puntiforme a livello di un singolo aminoacido possa interferire con la normale azione della WT-Cts. Le varianti della Cts sono state individuate durante studi di risequenziamento della CgA effettuati al fine di scoprire eventuali polimorfismi riguardanti il suo locus genico. Studi preliminari *in vitro* hanno dimostrato che la P370L-Cts è più potente nell'inibire la secrezione catecolaminergica rispetto alla WT-Cts, che si è dimostrata comunque più potente della G364S-Cts (Mahata et al., 2004).

Il lavoro svolto sul cuore di ratto isolato e perfuso ha rappresentato un sorta di tappa obbligata, necessaria a dare un quadro più ampio e completo delle conoscenze, già ottenute mediante altre tecniche, riguardo l'azione della Cts. La metodica di

Langendorff ha consentito di testare i peptidi addizionandoli direttamente al mezzo di perfusione ed ha permesso il monitoraggio e l'acquisizione dei parametri sia lusitropici che inotropi in tempo reale.

Insieme alla valutazione della contrattilità si è voluto indagare anche l'attività della Cts sul lusitropismo cardiaco, dato che molti studi hanno dimostrato l'importanza della fase di rilassamento per una corretta attività cardiaca. Essa, infatti, determinando il precarico, cioè lo stato tensionale corrispondente all'allungamento delle fibre prima della sistole, rappresenta un requisito essenziale per il corretto riempimento diastolico e, quindi, per il funzionamento del cuore come pompa meccanica (Vittone et al., 1994). L'interesse verso lo studio del lusitropismo ed una sua possibile regolazione da parte della Cts è stato mosso anche dalla scoperta che cambiamenti della fase diastolica possono precedere disfunzioni della contrattilità e addirittura causare scompenso cardiaco (Lorell, 1991). Le sostanze che modulano in senso positivo il lusitropismo aumentano la velocità di rilassamento del miocardio provocando un migliore riempimento del ventricolo sinistro (Vittone et al., 1994), mentre sostanze che modulano negativamente il lusitropismo provocano un ritardo del rilassamento diastolico ed un ridotto volume di riempimento.

Quando interviene la fase di rilassamento, il Ca^{2+} citosolico che ha fornito lo stimolo alla contrazione, deve essere rimosso attraverso lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sulla membrana plasmatica, e la Ca^{2+} -ATPasi, sul reticolo sarcoplasmatico. La regolazione della Ca^{2+} -ATPasi è strettamente connessa allo stato di fosforilazione del PLN (Tada et al., 1975), il quale nello stato non fosforilato interagisce col trasportatore, inibendolo. La sua fosforilazione, invece, attiva la pompa per il Ca^{2+} che determina l'influsso dello ione nel reticolo sarcoplasmatico e, come conseguenza finale, provoca rilassamento, cioè un effetto lusitropico positivo (Vittone et al., 1994).

I risultati sperimentali elaborati, rilevano che la WT-Cts esibisce un netto effetto inotropo negativo, come dimostrato dalla riduzione del valore di LVP, indice della pressione sviluppata nel ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumico, di circa il 24.7%. Questo primo risultato comincia a definire per la Cts un ruolo emergente di rilevante importanza come agente cardiotropico diretto accanto a quello, già noto, che riveste nel controllo della pressione sanguigna. Addirittura, si potrebbe immaginare che, *in vivo*, l'abbassamento della pressione sanguigna possa essere secondaria, o comunque correlata, all'inotropismo negativo Cts-dipendente. In discordanza, invece, con quanto riscontrato negli studi effettuati su topi CgA^{-/-} (privi di Cga e di Cts), i quali hanno sviluppato elevati valori di pressione sanguigna, i nostri dati riguardo agli effetti diretti della WT-Cts sulla pressione coronarica mostrano una profonda vasocostrizione, con un aumento del valore di CP di circa il 57.7%, al momento molto difficile da spiegare. Studi futuri serviranno a chiarire se questa costrizione è dovuta ad un'azione diretta del peptide sul tessuto coronarico, oppure se si tratta di un effetto anti-adrenergico esercitato a livello dell'innervazione simpatica di questi vasi. La WT-Cts esibisce anche una modulazione negativa del lusitropismo, come dimostrato da una riduzione sia di $-LV(dP/dt)_{max}$ indica una diminuzione della velocità di rilassamento.

La variante G364S-Cts ha una marcata azione sulla performance cardiaca meccanica che, come dimostra l'incremento del parametro RPP (=HR*LVP) (dato non mostrato) indice del lavoro cardiaco, viene aumentata senza modificare in maniera significativa LVP ed aumentando il valore di HR solo a basse concentrazioni. Questa forma del peptide non risulta agire sul lusitropismo cardiaco, né modifica la pressione coronarica. Recentemente il gruppo di lavoro di O'Connor ha riportato che individui eterozigoti per G364S-Cts mostrano aumentate variazioni dell'attività dei barocettori, un'aumentata azione parasimpatica ed una ridotta azione simpatica, accoppiati ad una ridotta

secrezione di CAs (Rao et al., 2007); questi soggetti mostrano, inoltre, una ridotta pressione sanguigna diastolica (~ 5-13 mmHg) risultante in un effetto antipertensivo che sembra interessare in particolare, se non unicamente, i maschi (Rao et al., 2007).

La variante P370L-Cts riduce profondamente il parametro LVP (~ 52.9; inoltre, essa presenta significativi effetti negativi sul lusitropismo come si evince dalla riduzione di $-LV(dP/dt)_{max}$. La P370L-Cts è molto rara, con una frequenza dello 0.6%, e si manifesta unicamente in soggetti con origini africane; studi approfonditi di correlazione struttura-funzione in grado di evidenziare un vantaggio, od uno svantaggio, nell'espressione di tale variante devono essere ancora effettuati; sicuramente un ridotto lavoro cardiaco, come quello evidenziato nella P370L-Cts, corrispondente ad una diminuita richiesta energetica potrebbe risultare utile in alcune condizioni patologiche del cuore.

L'esatto meccanismo mediante il quale la Cts agisce modulando l'attività cardiaca non è chiaro; di certo è noto, poiché ampiamente documentato in letteratura, che essa è un potente antagonista nicotinico. L'individuazione di un meccanismo sarebbe utile anche al fine di relazionarlo alle modificazioni strutturali che interessano le varianti. Nel presente studio è stato evidenziato che la mutazione puntiforme nelle due varianti provoca una deviazione più o meno marcata dagli effetti cardiaci diretti rilevati per la forma WT. Di certo il meccanismo d'azione non interessa l'attività trascrizionale che richiede tempi lunghi, non previsti dalla metodica utilizzata, per riuscire a manifestare i propri effetti.

Studi recenti hanno dimostrato che l'attività cardiaca, oltre ad essere regolata dal sistema nervoso autonomo e dagli ormoni, è modulata anche dai neuroni intracardiaci, concentrati in numerosi gangli cardiaci. Essi costituiscono un vero e proprio complesso nervoso che, insieme all'innervazione autonoma, provvede alla modulazione dell'attività cardiaca sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Kukanova e

Mravec, 2006). A livello dei gangli intracardiaci di mammifero è stata, inoltre, provata la presenza di recettori nicotinici caratterizzati dalle subunità $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, o $\alpha 7$ (Poth et al., 1997; Severance et al., 2004; Purnyn et al., 2004).

Per i gangli intracardiaci si può immaginare un'organizzazione strutturale e funzionale che rispecchia quella dei gangli autonomi, pertanto essi in seguito a stimolazione colinergica, mediata da recettori nicotinici, possono provocare il rilascio finale di CAs o di acetilcolina le quali vanno a modulare l'attività cardiaca. Si può ipotizzare la presenza di recettori nicotinici presinaptici che agiscono come autorecettori per l'Ach e che legando il loro agonista inibiscono un suo ulteriore rilascio nello spazio sinaptico. Poiché la Cts è un potente antagonista del recettore nicotinico, potrebbe agire sugli autorecettori bloccando la loro consueta attività inibitoria e provocando un aumentato rilascio di Ach. Se, contemporaneamente, viene bloccato anche il rilascio intracardiaco di norepinefrina mediante antagonismo sul recettore nicotinico postsinaptico, l'aumentato tono colinergico, per azione sui recettori muscarinici, potrebbe essere responsabile dell'effetto inotropo negativo evidenziato nelle curve dose-risposta della Cts. I risultati presentati, inoltre, evidenziano che l'entità dell'effetto inotropo negativo esercitato da ciascuna variante del peptide è strettamente correlata alla potenza che esse hanno dimostrato, *in vitro*, nell'inibire il rilascio catecolaminergico nicotino-dipendente; sembra quasi che una minore capacità di inibire la secrezione di norepinefrina, e quindi una sua maggiore concentrazione nello spazio extracellulare, riesca a contrastare gli effetti cardiaci mediati dall'Ach. Difatti, si può notare che la P370L-Cts, la più potente nel bloccare la secrezione (IC_{50} , $0.37 \pm 0.03 \mu M$) determina l'inotropismo negativo più marcato con una riduzione di LVP del 52.9%; la WT-Cts, seconda in potenza (IC_{50} $0.82 \pm 0.02 \mu M$), mostra un effetto che riduce LVP solo del

24.7%; la G364S-Cts, la meno potente ($IC_{50} 3.65 \pm 0.11 \mu M$), non modifica significativamente LVP.

Ovviamente, questa ipotesi può essere accettata solo in parte, in quanto il cuore utilizzato nel preparato *Langendorff* è denervato e quindi l'azione ipotizzata per la Cts sarebbe solo transiente e dipendente dalla quantità di Ach ancora presente nelle vescicole residue dei terminali nervosi recisi. Più verosimilmente, la Cts potrebbe attivare un proprio pathway trasduzionale capace di agire direttamente sul tessuto cardiaco e responsabile degli effetti osservati.

Anche gli effetti sul lusitropismo sembrano essere collegati alla potenza esercitata dai tre peptidi nell'inibire il rilascio catecolaminergico: la riduzione di $-LV(dP/dt)_{max}$ più evidente si ha con la P370L-Cts, la WT-Cts ha un effetto più modesto, mentre la S364G-Cts non modifica il parametro.

Lusitropismo ed inotropismo rappresentano due facce di una stessa medaglia in quanto una riduzione della velocità di rilassamento può risultare in un minore riempimento diastolico e, quindi, in una minore forza di contrazione. Una regolazione negativa delle fasi di contrazione e di rilassamento, come accade per Wt-Cts e P370L-Cts, ha come risultato una riduzione del lavoro cardiaco che può essere utile in situazioni particolari di ridotta disponibilità energetica e/o diminuita disponibilità di ossigeno, come accade nell'angina pectoris o nell'ischemia cardiaca. Può essere, quindi, ipotizzato un ruolo cardioprotettivo per questi due peptidi, soprattutto per P370L-Cts la cui azione sul cuore non è accompagnata da una contemporanea costrizione delle coronarie, come invece avviene per la WT-Cts.

2. Azione anti-adrenergica della Cts e delle sue varianti naturali

Considerando i risultati ottenuti nelle curve dose-risposta, che hanno rilevato un'azione modulatrice della performance cardiaca da parte della WT-Cts e delle sue varianti, si è voluto ulteriormente indagare il ruolo dei tre peptidi per evidenziare una loro possibile azione anti-adrenergica.

Questa ipotetica attività è stata valutata per somministrazione contemporanea di uno dei tre peptidi, alla concentrazione desiderata, e di Iso, un agonista non selettivo dei recettori β_1 e β_2 adrenergici (β_1/β_2 -ARs), che determina sul cuore un effetto inotropo e cronotropo positivo mediato dai β_1 -ARs, e vasodilatazione delle coronarie mediata dai β_2 -ARs.

I risultati evidenziano una completa abolizione dell'inotropismo positivo Iso-dipendente da parte di WT-Cts e G364S-Cts, mentre la variante P370L-Cts lo inibisce solo parzialmente (~ 70%); l'ordine dell'efficacia con cui i peptidi contrastano l'aumento del parametro LVP, dovuto all'azione dell'Iso, è WT-Cts > G364S-Cts > P370L-Cts. La vasodilatazione coronarica indotta dall'Iso è stata bloccata sia da WT-Cts (~ 86%) che da G364S-Cts (~ 85%), mentre non è stata modificata dalla esposizione a P370L-Cts.

Anche il lusitropismo positivo Iso-dipendente è modificato dai tre peptidi, sebbene con una potenza diversa dipendente dalla variante somministrata. L'azione di Iso sul parametro $-LV(dP/dt)_{max}$, indice della massima velocità di rilassamento, viene bloccata dalla WT-Cts e dalla G364S-Cts, mentre la P370L-Cts mostra solo un'attenuazione dell'effetto. L'effetto sul parametro T/-T viene abolito solo dalla G364S-Cts, che, nel complesso, risulta la variante più efficace nel contrastare l'azione sia inotropica che lusitropica indotta dall'Iso.

Le curve di competizione ottenute mediante l'esposizione a concentrazioni crescenti di Iso e singole concentrazioni di ognuna delle tre varianti denotano un'incapacità dell'Iso di contrastare gli effetti inibitori di WT-Cts, P370G-Cts e G364S-Cts su LVP; ciò definisce per i tre peptidi un tipo di inibizione non competitiva in accordo con i risultati ottenuti *in vitro* per l'inibizione non competitiva della secrezione catecolaminergica evocata dai recettori nicotinici (Mahata et al., 1997; Mahapatra et al., 2006).

I dati dimostrano un'azione anti-adrenergica per ciascuna delle tre varianti e anche in questo caso si può notare una correlazione tra mutazione puntiforme e variazione dell'attività rispetto a quella della WT-Cts. Infatti, nella P370L-Cts la sostituzione aminoacidica provoca un diminuito effetto anti-adrenergico rispetto a quello osservato nella WT-Cts, mentre la G364S-Cts mostra un'attività anti-adrenergica più marcata rispetto a quella del peptide fisiologicamente espresso. Questi risultati sono in accordo con l'osservazione di Rao secondo la quale gli eterozigoti per la variante G364S-Cts mostrano una minore tendenza a sviluppare ipertensione; si può ipotizzare, infatti, che la maggiore attività anti-adrenergica osservata nel preparato cardiaco, sia in grado di contrastare gli effetti catecolaminergici anche *in vivo*, risultando di grande utilità in situazioni di elevato stress. Infatti, condizioni di stress o paura determinano un aumentato rilascio di epinefrina responsabile degli effetti cardio-vascolari di tipo simpatico, principalmente vasocostrizione ed aumento del lavoro cardiaco; quando questi stimoli siano persistenti o ripetuti, essi possono avere gravi ripercussioni sulla salute, prime tra tutte ipertensione, aritmie, ischemie ed infarti cardiaci. Si può addirittura immaginare che la G364S-Cts rappresenti una evoluzione adattativa della Cts in grado di migliorare le risposte di un organismo agli stimoli stressanti.

Il meccanismo mediante il quale la Cts e le sue varianti determinano un effetto anti-adrenergico non è ancora stato chiarito; poiché in questi nostri esperimenti l'agonista β

adrenergico somministrato è di natura esogena, non si può ricondurre l'effetto ad un'inibizione del rilascio intracardiaco delle CAs. Essendo la Cts un peptide costituito da aminoacidi che recano anche catene laterali polari o dotate di carica, un'ipotesi circa il meccanismo potrebbe consistere nella formazione di interazioni elettrostatiche (legami idrogeno, interazioni di Van der Waals...) con i recettori adrenergici. Questi ultimi sono costituiti da un singolo filamento polipeptidico che attraversa la membrana plasmatica sette volte esponendo a livello extracellulare delle anse aminoacidiche che potrebbero dare vita alle interazioni con la Cts; questo tipo di legame potrebbe precludere all'Iso la formazione dell'interazione recettoriale per l'impossibilità di raggiungere il suo sito e potrebbe spiegare anche l'antagonismo non competitivo evidenziato dai nostri esperimenti.

Studi futuri serviranno a capire se l'azione anti-adrenergica possa dipendere da un antagonismo recettoriale o se la Cts sia capace di attivare un'altra via trasduzionale in grado di contrastare ed abolire gli effetti dell'Iso.

3 Cts in preparati ET-1 stimolati

Un'importante caratteristica del profilo cardioattivo della Cts, e delle sue varianti, è la sua capacità di contrastare l'inotropismo positivo e la vasocostrizione indotti dall'ET-1. L'ET-1 esercita diverse ed importanti azioni cardiovascolari, comprendenti effetti sulla contrattilità miocardica e potente vasocostrizione coronarica (Brunner et al., 2006). La Cts agisce come un potente vasodilatatore in presenza di arterie coronariche precontratte da ET-1. Perciò, insieme all'azione antiadrenergica, l'influenza anti-ET1 della Cts supporta fortemente il suo ruolo di stabilizzatore cardiaco di notevole rilevanza nella naturale difesa contro iperattività cardiaca, come ad esempio in presenza della

“tempesta neuroendocrina” responsabile di cardiomiopatia neuroendocrina e necrosi miocardica (Samuels, 2007).

4 Meccanismo d’azione della Cts

Ad oggi, non sono ancora stati identificati recettori di membrana responsabili di uno specifico legame con la CgA o con i peptidi da essa derivanti, per cui l’ipotesi più plausibile è che gli effetti biologici di tali molecole possano essere mediati dall’interazione aspecifica con strutture proteiche di membrana già ben caratterizzate per altri ligandi endogeni.

A tale scopo, lo studio del meccanismo d’azione della Cts è iniziato valutando il coinvolgimento dei recettori di membrana, focalizzando l’attenzione sui recettori a sette domini (α -elica) transmembrana accoppiati a proteine G.

I risultati di questo lavoro hanno evidenziato che la Cts può espletare la sua azione cardiaca sfruttando un’interazione, di natura ancora da definire, con i β_2/β_3 -ARs e con il recettore ET_B per l’ET-1, noti per il rivestire un ruolo di particolare importanza nella regolazione omeostatica del sistema cardiovascolare. Nei preparati cardiaci perfusi secondo la metodica *Langendorff*, l’interazione della Cts con ciascuno di questi recettori di membrana potrebbe essere responsabile degli effetti inotropi e lusitropici negativi osservati

Il contributo derivante dai β_2 -ARs è stato dimostrato utilizzando il Nadololo. Fino a non molto tempo fa, infatti, si credeva che i cardiomiociti esprimessero solo il sottotipo recettoriale β_1 -AR, ma questa nozione è stata modificata di recente grazie a studi che hanno provato la coesistenza funzionale dei β_1 -ARs e β_2 -ARs nei cardiomiociti di numerosi mammiferi (Xiao et al., 1999) (oltre alla già assodata localizzazione dei β_2 -

ARs a livello delle cellule endoteliali vascolari). Questi recettori, nonostante presentino il 54% di omologia (Dixon et al., 1986), rappresentano entità geneticamente e farmacologicamente distinte. Avendo escluso il coinvolgimento dei β_1 -ARs nel meccanismo d'azione della Cts, mediante l'utilizzo del Nebivololo, l'attenzione dello studio è stata focalizzata sui β_2 -ARs che, al contrario dei β_1 -ARs notoriamente accoppiati a proteine G_s , possono alternativamente accoppiare il proprio pathway trasduzionale sia a proteine G_s che a proteine G_i (Hill & Baker, 2003).

Sebbene informazioni presenti in letteratura parlino di β_2 -ARs accoppiati più strettamente alle proteine G_s , rispetto ai β_1 -ARs, gli effetti inotropi che ci si aspetterebbero in seguito alla loro attivazione non sono molto pronunciati per via della localizzazione nelle caveole e per la presenza di una vera e propria barriera di fosfodiesterasi che limita la diffusione del cAMP (Fishmeister et al., 2006). Gli effetti cardiomodulatori osservati in seguito all'attivazione dei β_2 -ARs sono, pertanto, più fortemente influenzati dall'attivazione del pathway dipendente dalle proteine G_i (Hill & Baker, 2003; Steinberg, 1999). Queste infatti, oltre a limitare gli effetti mediati dalle proteine G_s relativamente alla risposta contrattile, inducono il rilascio di NO (Dedvoka et al., 2002; Kanai et al., 1997) e quindi determinano un'azione inotropa e lusitropica negativa diretta.

In questo studio, l'utilizzo di un disaccoppiante selettivo delle proteine G_i , la Ptx, ha consentito di dimostrare che gli effetti della Cts sono strettamente dipendenti da una proteina inibitoria, come dimostra il fatto che la tossina abolisce gli effetti cardiaci classici osservati per la Cts in condizioni basali. E', pertanto, avvalorata l'idea di un meccanismo d'azione cardiaco che si avvale di β_2 -ARs accoppiati a G_i in grado di mediare gli effetti inotropi e lusitropici negativi osservati.

Tuttavia, tale dato ha suggerito anche il coinvolgimento dei β_3 -ARs, nel meccanismo della Cts, per via della loro ormai nota localizzazione cardiaca e della loro riconosciuta associazione alle proteine G_i . L'utilizzo dell'antagonista selettivo, SR59230, ha infatti consentito di confermare l'ipotesi, evidenziando l'intervento di questo nuovo sottotipo recettoriale nel meccanismo d'azione del peptide.

Solo recentemente, il pool dei β -ARs è stato arricchito con l'introduzione dei β_3 -ARs i quali condividono circa il 50% di omologia con gli altri due β -ARs (Skeberdis, 2004) ed appartengono sempre alla super famiglia dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G (Gauthier et al., 2000). I β_3 -ARs sono attivati da concentrazioni patofisiologiche di noradrenalina, in presenza di blocco degli altri ARs (Gauthier et al., 1998) e da agonisti selettivi come BRL₃₇₃₄₄, SR₅₈₆₁₁, CGP₁₂₁₇₇, CL₃₁₆₂₄₃ che non presentano effetti rilevanti sugli altri β -ARs (Skeberdis, 2004). Essi sono stati identificati nel cuore sia di mammiferi (Gautier et al., 1999; Angelone et al., 2008) che di non mammiferi (Imbrogno et al., 2006 Mazza et al., 2010). La cascata trasduzionale che si innesca in seguito ad attivazione di tali recettori determina sul cuore, previo interessamento delle proteine G_i , un effetto inotropo e lusitropico negativo attraverso (Gautrier et al., 1996). Ciò quindi, risulta in accordo con quanto riscontrato in questo studio, sia riguardo agli effetti cardiaci, sia riguardo al dimostrato coinvolgimento delle proteine G_i nel meccanismo d'azione della Cts.

Esperimenti di IC_{50} , condotti nel corso del presente lavoro di tesi, hanno, inoltre, permesso di dimostrare un'affinità della Cts maggiore per i β_2 -ARs rispetto ai β_3 -ARs.

Considerato il ruolo chiave che un peptide come l'ET-1 riveste nel contesto dell'omeostasi cardiovascolare e nello sviluppo della patologia ipertensiva, si è voluto valutare il coinvolgimento dei suoi recettori nel meccanismo d'azione della Cts. Gli effetti biologici dell'ET-1 sono mediati da due distinti recettori, ET_A ed ET_B , sempre

appartenenti alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G. In questo studio solo il coinvolgimento del sottotipo recettoriale B è stato valutato in quanto l'unico in grado di determinare effetto inotropo negativo sul cuore (Leite-Moreira et al., 2002; Bras-Silva & Leite-Moreira, 2005) e, quindi, l'unico ad essere potenzialmente candidato come mediatore dell'azione della Cts. È stato dimostrato che l'antagonista selettivo per il recettore ET_B, BQ788, è in grado di bloccare gli effetti cardiaci della Cts, avallando l'ipotesi che gli effetti cardio-depressivi del peptide possano coinvolgere tale recettore.

Il dimostrato coinvolgimento dei β_2 -ARs, β_3 -ARs e del recettore ET_B, ciascuno accoppiato mediante un proprio pathway trasduzionale alla produzione di NO, è in accordo con quanto ulteriormente evidenziato nel corso dello studio del meccanismo d'azione della Cts, cioè l'interessamento della cascata eNOS-NO-cGMP-PKG. L'utilizzo di inibitori selettivi di ciascuno step di questa via ha consentito di dimostrare la partecipazione dell'enzima eNOS e della cascata di eventi ad esso associati.

La eNOS, presente sia nelle cellule dell'endotelio vascolare che nei cardiomiociti, è un enzima multi-dominio consistente in una regione N-terminale ossigenasica, che contiene siti di legame per l'eme e la L-arginina (Chen et al., 1997) ed un dominio reduttasico che contiene siti di legame per FMN, FAD, NADPH e la calmodulina (Sessa et al., 1992). La eNOS è classificata come enzima Ca²⁺/Calmodulina (CaM)-dipendente (Busse & Mülsch, 1990) e, difatti, il legame della Calcio-calmodulina (CaM) al suo sito (aa 493-512) è in grado di attivare la sintesi di NO (Presta et al., 1997): in pratica, un aumento delle concentrazioni di Ca²⁺ intracellulare, dipendente o indipendente dall'attivazione di un recettore, aumenta la produzione di NO.

Un possibile meccanismo alla base degli effetti inotropi e lusitropici negativi osservati per la Cts potrebbe essere l'attivazione della eNOS mediante l'intervento di una

proteina G_i accoppiata all'attivazione dei β_2 -ARs e dei β_3 -ARs (Gauthier et al., 1998; Varghese et al., 2000; Yano et al., 2007). L'incremento dei livelli intracellulari di cGMP che ne deriva potrebbe essere responsabile di una riduzione dei livelli di cAMP e del feedback negativo che inibisce gli effetti cAMP-dipendenti (Mongillo et al., 2006).

Relativamente al recettore ET_B , anch'esso risulta essere funzionalmente accoppiato a alla produzione di NO, sia mediante proteine G_i (Hirata et al., 1993), che mediante proteine G_q accoppiate all'attivazione della fosfolipasi C, con produzione di inositolotrifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG) correlati alla mobilitazione dello ione calcio, il quale potrebbe attivare l'enzima eNOS in maniera Ca^{2+} /CaM-dipendente (Busse & Mülsch, 1990).

L'NO è stato inizialmente identificato come un fattore vasorilassante e come un importante regolatore indiretto della funzione cardiaca, ma studi recenti hanno dimostrato che esso è in grado di modulare anche direttamente la contrattilità miocardica (Massion et al., 2003). La regolazione della sintesi di NO, in relazione alla fosforilazione della eNOS, rappresenta un pathway critico della performance cardiaca e, nel caso del presente studio, il coinvolgimento dell'NO, dimostrato mediante l'utilizzo dello scavenger PTIO, sembra essere strettamente associato all'aumento della fosforilazione in Ser 1177 della eNOS osservato sia in estratti ventricolari che in colture HUVEC.

Inoltre, nel presente lavoro è stata dimostrata l'importanza della eNOS di origine endoteliale, come evidenziato dall'analisi effettuata sulle colture HUVEC, e la necessità della presenza di un endotelio funzionale atto a garantire le azioni cardiache della Cts. L'utilizzo del Triton-X100 come agente tensioattivo in grado di ledere funzionalmente l'endotelio vascolare ha consentito di dimostrare che in assenza di tale struttura gli effetti tipici della Cts vengono persi. Tale dato avvalorava ancora di più l'ipotesi del

coinvolgimento dei recettori ET_B, in quanto Leite-Moreira e collaboratori nel 2003 hanno dimostrato che l'effetto inotropo negativo, mediato dalla stimolazione di ET_B, oltre ad essere mediato dall'NO, necessita di un endotelio funzionale.

Accanto al ruolo determinante individuato per l'isoforma endoteliale della NOS è stato valutato e provato anche il coinvolgimento della isoforma neuronale dell'enzima, la nNOS. Negli ultimi anni, infatti, è stata evidenziata l'espressione costitutiva della nNOS a livello dei cardiomiociti (Xu et al., 1999). Il suo ruolo nella modulazione della contrattilità miocardica è supportato e dimostrato dalla sua localizzazione a livello del reticolo sarcoplasmatico, dove l'NO da essa derivato aumenta le probabilità di apertura dei recettori per la rianodina attraverso il processo di S-nitrosilazione (Moens et al., 2010). E' stato, inoltre, dimostrato l'accoppiamento nNOS-β₃-ARs, ma solo in cuori di ratto diabetico e/o anziano (Amour et al., 2007; Birenbaum et al., 2008). In questo studio la partecipazione della nNOS nel meccanismo d'azione della Cts è stato riscontrato sia sui preparati cardiaci perfusi alla *Langendorff*, con l'utilizzo del suo inibitore specifico vL-NIO, che mediante immunoblotting, grazie al quale si è rilevato un significativo incremento della fosforilazione di nNOS in estratti ventricolari trattati con il peptide.

Appurato il coinvolgimento del pathway dell'NO, resta da individuare una molecola responsabile dell'attivazione a monte di questo segnale. Nel 2010, Ramella e collaboratori (2010) hanno dimostrato che la Vs-1, altro frammento peptidico derivante dalla CgA, attiva l'enzima eNOS nelle cellule endoteliali in maniera PI-3-k dipendente. Inoltre, la Cts stessa sfrutta una via mediata dalla PI-3-k e, quindi dall'NO, nel caso all'azione chemiotattica per essa evidenziata (Egger et al., 2008). Pertanto, i risultati ottenuti utilizzando un inibitore della PI-3-k, la wotmannina, nel corso del presente lavoro, hanno confermato che anche nel cuore isolato e perfuso di ratto la Cts utilizza

questa importante chinasi. In aggiunta, numerosi dati di letteratura mettono in luce un'attivazione della PI-3-k mediata dai β_2 -ARs tramite una proteina G_i (Yano et al., 2007; Faucher et al., 2008) che culmina in effetti inotropi e lusitropici negativi, in accordo con quanto osservato nel presente lavoro di tesi, mediante la via dell'NO.

Allo stesso tempo, il parziale coinvolgimento della PKG nel meccanismo della Cts, come documentato dagli esperimenti condotti utilizzando l'inibitore KT5823, lascia supporre il coinvolgimento di un substrato alternativo in grado di mediare il segnale del cGMP. Dopo attenta analisi dei dati presenti in letteratura, si è ipotizzato che questo substrato alternativo potesse essere la PDE2, un enzima in grado di controllare i livelli intracellulari di cAMP favorendo la sua degradazione (Mongillo et al., 2006) mediante un pathway β_3 -AR/NO/cGMP già evidenziato nei cardiomiociti.

Grazie all'utilizzo di inibitore selettivo della PDE2, l'EHNA, il presente studio ha consentito di documentare il coinvolgimento di tale enzima nel meccanismo responsabile degli effetti cardiaci della Cts. Infatti, questo antagonista risulta in grado di abolire gli effetti inotropi e lusitropici della Cts in condizioni basali, ma anche in presenza di stimolazione adrenergica, lasciando quindi dedurre che la PDE2 possa essere responsabile sia degli effetti osservati per il peptide da solo sia degli effetti osservati in presenza dell'agonista adrenergico Iso. Il cGMP, infatti, attivando la PDE2 induce una riduzione dei livelli di cAMP e, quindi, è in grado di spegnere il segnale adrenergico dovuto all'attivazione dei β_1 -ARs (Mongillo et al., 2006). Il dato è ulteriormente confermato dall'analisi ELISA, grazie alla quale sono stati riscontrati aumentati livelli intracellulari di cAMP in estratti ventricolari trattati con Iso e una riduzione drastica di tale nucleotide ciclico in estratti perfusi con Iso addizionato di Cts. Sempre grazie a questa metodica è stato confermato, invece, l'aumento dei livelli di cGMP in estratti di cuori trattati con Cts.

5 S-Nitrosilazione delle proteine cardiache

La S-nitrosilazione sta emergendo quale fondamentale meccanismo con cui l'NO media un gran numero di processi intracellulari (Hess et al., 2005). Recenti scoperte, infatti, hanno mostrato che la S-nitrosilazione regola diversi processi che coinvolgono ad esempio i recettori accoppiati a proteine G (Whalen et al., 2007), la Hsp90 (Martinez-Ruiz et al., 2005), le cascate mitocondriali pro- e anti- apoptotiche (Choi et al., 2002). Inoltre, una irregolare S-nitrosilazione dei recettori della rianodina può contribuire allo sviluppo di aritmie e altre patologie cardiache (Gonzalez et al., 2007; Durham et al., 2008; Lehnart et al., 2008).

Nel presente studio è stata evidenziato un generale aumento dei livelli di S-nitrosilazione delle proteine cardiache in cuori trattati con Cts. Il Biotin Switch Assay e l'immunoblotting hanno consentito di individuare due importanti target di questo processo di S-nitrosilazione dopo trattamento con Cts: la β -arrestina e il PLN.

La β -arrestina è una proteina chiave del processo di desensitizzazione ed internalizzazione dei recettori accoppiati a proteine G, inclusi i β_1 -ARs (Ozawa et al., 2008). Essa lega la forma attivata del recettore, inibendo stericamente il suo accoppiamento alla proteina G e favorendo la sua interazione con la clatrina delle vescicole endocitotiche (Drake et al., 2006; Reiter & Lefkowitz, 2006). La S-nitrosilazione della β -arrestina, ad opera della eNOS, favorisce e velocizza il processo di desensitizzazione del β_1 -ARs (Ozawa et al., 2008) spegnendo il segnale adrenergico, in accordo con quanto riscontrato nel presente lavoro.

Il PLN, invece, è una piccola proteina di membrana in grado di regolare l'attività della SERCA2a (Kimura et al., 1997); la sua forma attiva è rappresentata da un monomero

che si dissocia da un complesso pentamerico che funge da vera e propria riserva (Reddy et al., 1999). La forma monomerica del PLN lega la SERCA2a e la inibisce, mentre nello stato fosforilato il tono inibitorio viene rimosso facilitando l'up-take di ioni calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico (Reddy et al., 1999; Schmidt et al., 2001). Recentemente, accanto alla fosforilazione, anche la S-nitrosilazione è emersa come importante processo modulante l'attività del PLN (Garofalo et al., 2010); anche nello stato S-nitrosilato, il PLN perde l'attività inibitoria sulla SERCA2a, la quale incrementa l'uptake di calcio producendo un effetto inotropo negativo.

Pertanto, si ipotizza che la Cts attraverso l'attivazione di eNOS e nNOS aumenti la produzione di NO il quale potrebbe andare ad S-nitrosilare la β -arrestina, responsabile dell'effetto anti-adrenergico del peptide, ed il PLN, responsabile dell'effetto inotropo negativo osservato.

CONCLUSIONI

Le informazioni ottenute grazie al presente lavoro di tesi, hanno consentito di descrivere un importante ruolo fisiologico per la Cts e le sue varianti umane nell'ambito della modulazione della *performance* cardiaca, permettendo di correlare alle variazioni nella struttura dei tre peptidi anche una diversa attività cardiaca.

In particolare, è stato evidenziato un effetto inotropo e lusitropico negativo con conseguente riduzione del lavoro cardiaco per la WT-Cts e la P370L-Cts, che potrebbero risultare utili in quelle situazioni dovute ad un aumento delle richieste energetiche cardiache rispetto a quelle effettivamente disponibili.

Mentre la potente azione anti-adrenergica evidenziata per la variante G364S-Cts è in accordo con le più recenti informazioni ottenute riguardo tale peptide. Infatti, Rao e collaboratori (2007), oltre ad aver notato, nei soggetti portatori di questa variante, profonde alterazioni nell'attività nervosa autonoma simpatica e parasimpatica hanno evidenziato che essa sembra proteggere dallo sviluppo dell'ipertensione, soprattutto negli individui di sesso maschile, e l'azione anti-adrenergica documentata in questo studio potrebbe apportare un forte contributo a questa protezione.

Invece, la capacità della Cts di agire come un potente vasodilatatore in presenza di vasi coronarici precontratti mediante ET-1, insieme all'azione antiadrenergica evidenziata, supporta fortemente il suo ruolo di stabilizzatore cardiaco, di notevole rilevanza specialmente nella naturale difesa contro l'iperattività cardiaca, che si presenta, ad esempio, nella "tempesta neuroendocrina" responsabile di cardiomiopatia neuroendocrina e necrosi miocardica (Samuels, 2007).

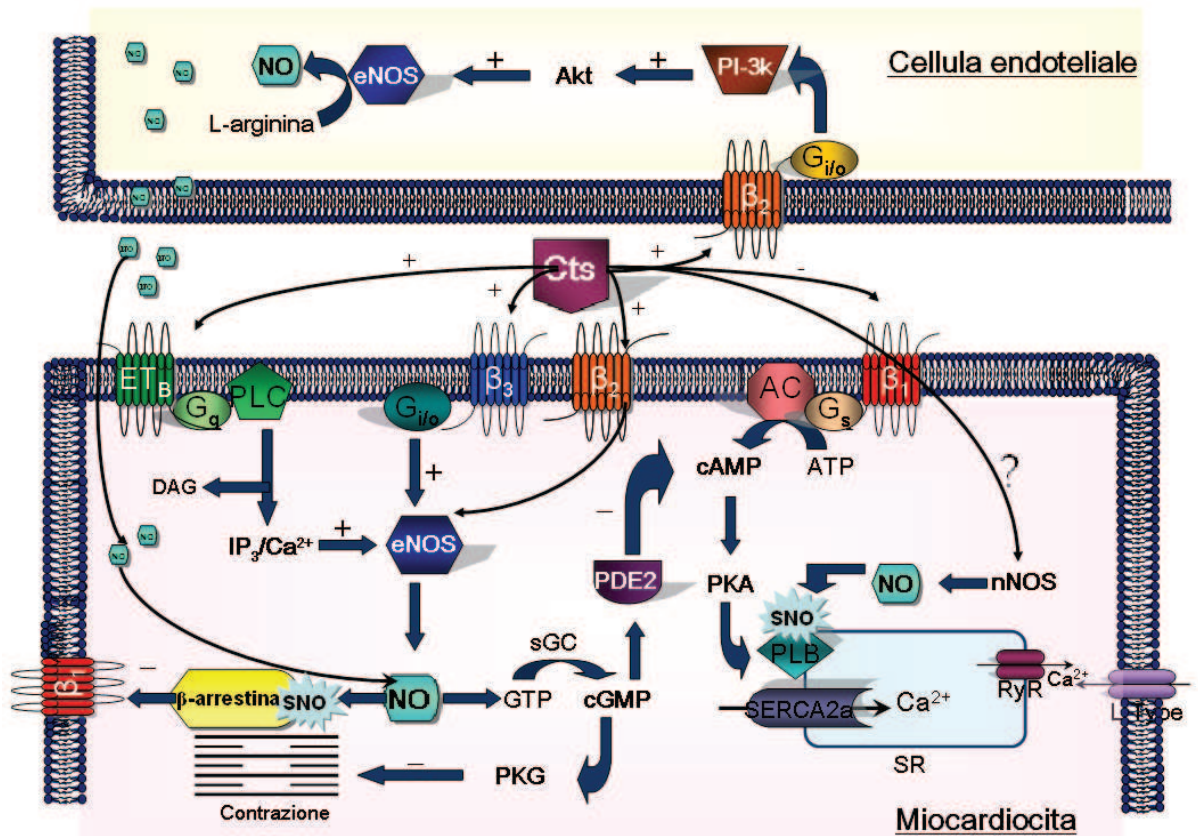
L'attenzione focalizzata sul meccanismo d'azione della WT-Cts ha consentito di evidenziare che il peptide determina i suoi effetti cardiaci attraverso i β_2/β_3 -ARs ed il recettore ET_B, mediante un tipo di interazione che rimane ancora da definire. L'attivazione dei β_2 -ARs porta all'interessamento della cascata G_i/PI-3-k/eNOS;

L'attivazione dei β_3 -ARs è anch'essa accoppiata a G_i /eNOS, mentre il recettore ET_B può coinvolgere la cascata G_i /eNOS oppure la mobilitazione del calcio mediante G_q .

L'NO prodotto mediante questi pathway può modulare il cardiotropismo sia mediante la classica via sGC-cGMP-PKG sia mediante la via alternativa che prevede l'attivazione della PDE2 in maniera cGMP-dipendente. Tali meccanismi intracellulari sono responsabili sia dell'inotropismo e del lusitropismo negativi esercitati dalla Cts in condizioni basali ma anche dell'azione anti-adrenergica osservata per il peptide in presenza di stimolazione da Iso.

Inoltre, il mediatore gassoso NO attiva un altro importante processo in grado di modulare l'attività di diverse proteine cardiache: la S-Nitrosilazione. Il presente lavoro ha infatti dimostrato un aumento nella S-nitrosilazione della β -arrestina, probabilmente ad opera dell'NO eNOS-derivato, e del PLN, probabilmente ad opera dell'NO nNOS-derivato. Nel primo caso si assiste ad un incremento del *trafficking* del β_1 -ARs che potrebbe essere responsabile dell'azione anti-adrenergica esercitata dalla Cts; nel secondo caso, la S-nitrosilazione del PLN comporta un aumento dell'*uptake* degli ioni calcio, che potrebbe essere responsabile dell'effetto inotropo negativo; tale processo potrebbe essere compensato dalla S-nitrosilazione dei recettori per la rianodiana (situazione non verificata in questo lavoro) che potrebbe essere responsabile dell'effetto lusitropico negativo.

Nel complesso, questi dati aggiungono nuova luce sulla importante funzione regolatoria della Cts nell'ambito della *zero steady state error homeostasis* della fisiopatologia cardiovascolare, confermando il ruolo decisivo del segnale NO-mediato, il quale, seppure molto complesso, rappresenta un modulatore centrale convergente in molteplici funzioni cruciali per la regolazione della funzionalità cardiaca in condizioni sia fisiologiche che patologiche.



Ipotetico meccanismo d'azione della Cts

BIBLIOGRAFIA

- Aardal S., Helle K.B. (1992).** The vasoinhibitory activity of bovine chromogranine A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in Isolated segments of human blood vessels. *Regul. Pept.* **41**:9-18
- Aars H. (1968).** Aortic baroreceptor activity in normal and hypertensive rabbits. *Acta Physiol. Scand.* **72**:298-309
- Abbott D., Lodola A. (1992).** The effects of Isoproterenol on the Isolated perfused rat heart. *Res. Commun. Chem. Phatol. Pharmacol.* **76**:125-128
- Akaddar A., Doderer-Lang C., Marzahn M.R., Delalande F., Mousli M., Helle K., Van Dorsselaer A, Aunis D., Dunn B.M., Metz-Boutigue MH, et al. (2009).** Catestatin, an endogenous Chromogranin A-derived peptide, inhibits in vitro growth of Plasmodium falciparum. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**(6):1005-1015
- Amour J., Loyer X., Le Guen M., Mabrouk N., David J.S., Camors E., Carusio N., Vivien B., Andriantsitohaina R., Heymes C., Riou B. (2007).** Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology.* **107**(3):452-460
- Angelone T., Filice E., Quintieri A.M., Imbrogno S., Recchia A., Pulerà E., Mannarino C., Pellegrino D., Cerra M.C. (2008).** Beta3-adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway. *Acta Physiol. (Oxf).* **193**(3):229-239
- Arvan P., Castle D. (1998).** Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J.* **332**:593-610
- Bartfly W.J., Dawood F., Wen W.H., Lehotay D.C., Hou D., Bartfly E., Lou X., Backx P.H., Liu P.P. (1999).** Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc. Res.* **43**:892-900
- Benedum U.M., Baeuerle P.A., Konecki D.S., Frank R., Powell J., Mallet J., Huttner W.B. (1986).** The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO J.* **5**(7):1495-1502
- Bernini G., Moretti A., Salvetti A. (2002).** Chromogranin 'A' in normal subjects, essential hypertensives and adrenalectomized patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **57**(1):41-50
- Beuret N., Stettler H., Renold A., Rutishauser J., Spiess M. (2004).** Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J. Biol. Chem.* **279**:20242-20249
- Birenbaum A., Tesse A., Loyer X., Michelet P., Andriantsitohaina R., Heymes C., Riou B., Amour J. (2008).** Involvement of beta 3-adrenoceptor in altered beta-adrenergic response in senescent heart: role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology.* **109**(6):1045-1053

- Biswas N., Vaingankar S.M., Mahata M., Das M., Gayen J.R., Taupenot L., Torpey J.W., O'Connor D.T., Mahata S.K. (2008).** Proteolytic cleavage of human chromogranin a containing naturally occurring catestatin variants: differential processing at catestatin region by plasmin. *Endocrinology*. **149**(2):749-757
- Biswas N., Rodriguez-Flores J.L., Courel M., Gayen J.R., Vaingankar S.M., Mahata M., Torpey J.W., Taupenot L., O'Connor D.T., Mahata S.K. (2009).** Cathepsin L colocalizes with chromogranin a in chromaffin vesicles to generate active peptides. *Endocrinology*. **150**(8):3547-3557
- Biswas N., Curello E., O'Connor D.T., Mahata S.K. (2010).** Chromogranin/secretogranin proteins in murine heart: myocardial production of chromogranin A fragment catestatin (Chga(364-384)). *Cell Tissue Res*. [Epub ahead of print]
- Blaschko H., Comline R.S., Schneider F.H., Silver M., Smith A.D. (1967).** Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*. **215**:58-59
- Brás-Silva C., Leite-Moreira A.F. (2005).** Modulation of the myocardial effects of selective ETB receptor stimulation and its implications for heart failure. *Rev. Port. Cardiol*. **24**(9):1125-1133
- Briolat J., Wu S.D., Mahata S.K., Gonthier B., Bagnard D., Chasserot-Golaz S., Helle K.B., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (2005).** New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell. Mol. Life Sci*. **62**:377-385
- Bristow J.D., Honour A.J., Pickering G.W., Sleight P., Smyth H.S. (1969).** Diminished baroreflex sensitivity in high blood pressure. *Circulation*. **39**:48-54
- Brunner F., Bras-Silva C., Cerdeira A.S., Leite-Moreira A.F. (2006).** Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther*. **111**, 508-531
- Busse R., Mülsch A. (1990).** Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*. **265**:133-136
- Calakos N., Scheller R.H. (1996).** Synaptic vesicle biogenesis, docking and fusion: a molecular description. *Physiological Reviews*. **76**:1-29
- Cappello S., Angelone T., Tota B., Pagliaro P., Penna C., Rastaldo R., Corti A., Losano G.A., Cerra M.C. (2007).** Human recombinant Chromogranin A-derived Vasostatin-1 Mimics Preconditioning via an Adenosine/Nitric Oxide Signalling Mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. **293**(1):H719-H727
- Carmeliet P. (2000)** VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angiogenesis? *Nat. Med*. **6**(10):1102-1103
- Cecconi C., Ferrari R., Bachetti T., Opasich C., Volterrani M., Colombo B.,**

- Parrinello G., Corti A. (2002).** Chromogranin A in heart failure. A novel neurohumoral factor and predictor for mortality. *Eur. Heart. J.* **23**:967-974
- Cerra M.C., De Iuri L., Angelone T., Corti A., Tota B. (2006).** Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic. Res. Cardiol.* **101**:43-52
- Cerra M.C., Pellegrino D.(2007).** Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions. *Curr. Med. Chem.* **14**:585-599
- Champion H.C., Kadowitz P.J. (1997).** NO release and the opening of K⁺ ATP channels mediate vasodilator responses to histamine in the cat. *Am. J. Physiol.* **273**:H928-937
- Chen P.F, Tsai A.L., Berka V., Wu K.K. (1997).** Mutation of Glu-361 in human endothelial nitric-oxide synthase selectively abolishes L-arginine binding without perturbing the behaviour of heme and other redox centers. *J. Biol. Chem.* **272**:6114-6118
- Choi B.M., Pae H.O., Jang S.I., Kim Y.M., Chung H.T. (2002).** Nitric oxide as a proapoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**:116-126
- Ciesielski-Treska J., Ulrich G., Taupenot L., Chasserot-Golaz S., Corti A., Aunis D., Bader M.F. (1998).** Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J. Biol. Chem.* **273**:14339-14346
- Clapham D.E., Neher E. (1984).** Substance P reduces acetylcholine-induced currents in Isolated bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* **347**:255-277
- Day R., Gorr S.U. (2003).** Secretory granule biogenesis and chromogranin A: master gene, on/off switch or assembly factor? *Trends Endocrinol. Metab.* **14**(1):10-13.
- De Bold A.J., Borenstein H.B., Veress A.T., Sonnenberg H. (1981).** A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* **28**:89-94
- Dedvoka E.N., Wang Y.G., Blatter L.A., Lipsius S.L. (2002).** Nitric oxide signaling by selective β_2 -adrenoceptor stimulation prevents ACh-induced inhibition of β_2 -stimulated Ca²⁺ current in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* **542**:711-723
- Dimsdale J.E., O'Connor D.T., Ziegler M.G., Mills P. (1992).** Chromogranin A correlates with norepinephrine release rate. *Life Sci.* **51**:519-525
- Dixon R.A., Kobilka B.K., Strader D.J., Benovic J.L., Dohlman H.G., Frielle T., Bolanowski M.A., Bennett C.D., Rands E., Diehl R.E. (1986).** Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature.* **321**:75-79
- Doblinger A., Becker A., Seidah N.G., Laslop A. (2003).** Proteolytic processing of chromogranin A by the prohormone convertase PC2. *Regul Pept.* **111**(1-3):111-116

- Doring H.J. (1990).** The Isolated perfused heart according to Langendorff technique-function-application. *Physiol. Bohemoslov.* **39**:481-504
- Drake M.T., Shenoy S.K., Lefkowitz R.J. (2006).** Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* **99**,570-582
- Drees B.M., Rouse J., Johnson J., Hamilton J.W. (1991).** Bovine parathyroid glands secrete a 26-kDa N-terminal fragment of chromogranin A which inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology.* **129**:3381-3387
- Drees B.M., Hamilton J.W. (1994).** Processing of chromogranin A by bovine parathyroid secretory granules: production and secretion of N-terminal fragments. *Endocrinology.* **134**:2057-2063
- Durham W.J., Aracena-Parks P., Long C., Rossi A.E., Goonasekera S.A., Boncompagni S., Galvan D.L., Gilman C.P., Baker M.R., Shirokova N., Protasi F., Dirksen R., Hamilton S.L. (2008).** RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. *Cell.* **133**:53-65
- Egger M., Beer A.G., Theurl M., Schgoer W., Hotter B., Tatarczyk T., Vasiljevic D., Frauscher S., Marksteiner J., Patsch J.R., Schratzberger P., Djanani A.M., Mahata S.K., Kirchmair R. (2008).** Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin. *Eur. J. Pharmacol.* **598**(1-3):104-111
- Estensen M.E., Hognestad A., Syversen U., Squire I., Ng L., Kjekshus J., Dickstein K., Omland T. (2006).** Prognostic value of plasma chromogranin A levels in patients with complicated myocardial infarction. *Am Heart J.* **152**(5):927.e1-6
- Fahmy N.R., Soter N.A. (1985).** Effects of trimethaphan on arterial blood histamine and systemic hemodynamics in humans. *Anesthesiology.* **62**:562-566
- Fasciotto B.H., Trauss C.A., Greeley G.H., Cohn D.V. (1993).** Parastatin (porcine chromogranin A₃₄₇₋₄₁₉), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology.* **133**:461-466
- Faucher F.A., Gannier F.E., Lignon J.M., Cosnay P., Malécot C.O. (2007).** Roles of PKA, PI3K, and cPLA2 in the NO-mediated negative inotropic effect of beta2-adrenoceptor agonists in guinea pig right papillary muscles. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **294**(1):C106-C117
- Ferrier C., Cox H., Esler M. (1993).** Elevated total body noradrenaline spillover in normotensive members of hypertensive families. *Clin. Sci (Lond).* **84**(2):225-230
- Fischmeister R., Castro L.R.V., Abi-Gerges A., Rochais F., Jurevic`ius J., Leroy J., Vandecasteele G. (2006).** Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart. The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ. Res.* **99**:816-828
- Fung M.M., Salem R.M., Mehtani P, Thomas B., Lu C.F., Perez B., Rao F., Stridsberg M., Ziegler M.G., Mahata S.M., O'Connor D.T. (2010).** Direct vasoactive effects of the Chromogranin A (CHGA) peptide Catestatin in humans in

vivo. *Clin. Exp. Hypertension*. **32**(5): 278-287

Funkelstein L., Toneff T., Hwang S.R., Reinheckel T., Peters C., Hook V. (2008). Cathepsin L participates in the production of neuropeptide Y in secretory vesicles, demonstrated by protease gene knockout and expression. *J Neurochem*. **106**(1):384-391

Gaede A.H., Lung M.S., Pilowsky P.M. (2009). Catestatin attenuates the effects of intrathecal nicotine and isoproterenol. *Brain Res*. **1305**:86-95

Garofalo F., Parisella M.L., Amelio D., Tota B., Imbrogno S. (2009). Phospholamban S-nitrosylation modulates Starling response in fish heart. *Proc. Biol. Sci*. **276**: 4043-4052

Gauthier C., Tavernier G., Charpentier F., Langin D., Le Marec H. (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest*. **98**:556-562

Gauthier C., Leblais V., Kobzik L., Trochu J.N., Khandoudi N., Bril A., Balligand J.L., Le Marec H. (1998) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest*. **102**:1377-1384

Gauthier C., Tavernier G., Trochu J.N., Leblais V., Laurent K., Langin D., Escande D., Le Marec H. (1999). Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta(3)-adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **290**:687-693

Gauthier C., Langin D., Balligand J.L. (2000). β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system. *J. Clin. Invest*. **21**:426-430

Gayen J.R., Gu Y., O'Connor D.T., Mahata S.K. (2009). Global disturbances in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin A null mouse. *Endocrinology*. **150**:50275035

Glattard E., Angelone T., Strub J.M., Corti A., Aunis D., Tota B., Metz-Boutigue M.H., Goumon Y. (2006). Characterization of natural vasostatin-containing peptides in rat heart. *FEBS J*. **273**(14):3311-3321.

Goldberg D.E., Slater A.F., Cerami A., Henderson G.B. (1990). Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**(8):2931-2935

Goldstein D.S. (1983). Arterial baroreflex sensitivity, plasma catecholamines, and pressor responsiveness in essential hypertension. *Circulation*. **68**:234-240

Goldstein D.S., Kopin I.J. (1990). The autonomic nervous system and catecholamines in normal blood pressure control and hypertension. Tratto da "Laragh J.H., Brenner B.M., eds *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management*. New York, NY: Raven Press Publishers" Chap. 7

Gong M., Hubner N. (2006). Molecular genetics of human hypertension. *Clin Sci*

(Lond). **110**(3):315-326

Gonzalez D.R., Beigi F., Treuer A.V., Hare J.M. (2007). Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**:20612-20617

Gorr S.U., Kumarasamy R., Dean W.L., Cohn D.V. (1987) New suggestions for the physiological role of secretory protein-I. *Bone Miner.* **2**(4):251-255

Gorr S.U., Shioi J., Cohn D.V. (1989). Interaction of calcium with porcine adrenal chromogranin A (secretory protein-I) and chromogranin B (secretogranin I). *Am J Physiol.* **257**(2 Pt 1):E247-54

Gorr S.U., Hamilton J.W., Cohn D.V. (1992). Regulated, but not constitutive, secretory proteins bind porcine chymotrypsinogen. *J Biol Chem.* **267**(30):21595-21600

Gotti C., Fornasari D., Clementi F. (1997). Human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Progress in Neurobiology.* **53**:199-237

Grassi G., Cattaneo B.M. Seravalle G., Lanfranchi A., Mancina G. (1998). Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension:* **31**:68-72

Helle K.B., Marley P.D., Hogue-Angeletti, Aunis D., Galindo E., Small D.H., Livett B.G. (1993). Chromogranin A: secretion of processed products from the stimulated retrogradely perfused bovine adrenal gland. *J. Neuroendocrinol.* **5**:413-420

Helle K.B. (2004). The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **79**(4):769-794

Helle K.B., Corti A., Metz-Boutigue M.H., Tota B. (2007). The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**(22):2863-2886

Helman L.J., Ahn T.G., Levine M.A., Allison A., Cohen P.S., Cooper M.J., Cohn D.V., Israel M.A. (1988). Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA. *J Biol Chem.* **263**(23):11559-11563

Herrero C.J., Ales E., Pintado A.J., Lopez M.G., Garcia-Palomero E., Mahata S.K., O'Connor D.T., Garcia A.G., Montiel C. (2002). Modulatory mechanism of the endogenous peptide catestatin on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and exocytosis. *J. Neuroscience.* **22**:377-388

Hess D.T., Matsumoto A., Kim S.O., Marshall H.E., Stamler J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**:150-166

Higashijima T., Uzu S., Nakajima T., Ross E.M. (1988). Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem.* **263**(14):6491-6494.

- Hill S.J., Baker J.G. (2003).** The ups and downs of Gs- to Gi-protein switching. *Br. J. Pharmacol.* **138**(7):1188-1189
- Hinterholz J., Mahata S.K., Jellinger K.A., Marksteiner J. (2004).** Chromogranin peptides in
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S., Kanno K., Imai T., Ohta K., Marumo F. (1993).** Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of Nitric Oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **91**:1367-1373
- Huang M.H., Friend D.S., Sunday M.E., Singh K., Haley K., Austen K.F., Kelly R.A., Smith T.W. (1996).** An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest.* **98**(6):1298-1303
- Huh Y.H., Jeon S.H., Yoo S.H. (2003).** Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **278**:40581-40589
- Huttner W.B., Gerdes H.H., Rosa P. (1991).** Chromogranins/secretogranins-widespread constituents of the secretory granule matrix in endocrine cells and neurons. *Markers for neuronal and endocrine cells.* M. Gratzl and K. Langley, editors. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. 93-131
- Hutton J.C., Davidson H.W., Grimaldi K.A., Peshavaria M. (1987).** Biosynthesis of beta-granin in pancreatic (beta)-cells. *Biochem. J.* **244**:449-456
- hypertension. *Circulation.* **85**:497-503
- Iacangelo A., Affolter H.U., Eiden L.E., Herbert E., Grimes M. (1986).** Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. *Nature.* **323**(6083):82-86
- Iacangelo A., Okayama H., Eiden L.E. (1988).** Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA. *FEBS Lett.* **227**(2):115-121
- Imbrogno S., Angelone T., Adamo C., Pulerà E., Tota B., Cerra M.C. (2006).** Beta3 adrenoceptor in the eel (*Anguilla anguilla*) heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. *J. Exp. Biol.* **209**(Pt 24):4966-4973
- Jaffrey S.R., Snyder S.H. (2001).** The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci. STKE.* **12**:PL1
- Jaffrey S.R., Erdjument-Bromage H., Ferris C.D., Tempst P., Snyder S.H. (2001).** Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell. Biol.* **3**:193-197
- Jansson A.M., Røsjø H., Omland T., Karlsson T., Hartford M., Flyvbjerg A., Caidahl K. (2009).** Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* **30**(1):25-32
- Kanai A.J., Mesaros S., Finkel M.S., Oddis C.V., Birder L.A., Malinski T. (1997).**

β -Adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **273**:C1371-C1377

Katz B., Thesleff S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* **138**:63-80.

Kennedy B.P., Mahata S.K., O'Connor D.T., Ziegler M.G. (1998). Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin in vivo. *Peptides* **19**:1241-1248

Kim T., Loh Y.P. (2005). Chromogranin A: a surprising link between granule biogenesis and hypertension. *J. Clin. Invest.* **115**:1711-1713

Kim T., Tao-Cheng J.H., Eiden L.E., Loh Y.P. (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell.* **106**:499-509

Kim T., Tao-Cheng J.H., Eiden L.E., Loh Y.P. (2003). The role of chromogranin A and the control of secretory granule genesis and maturation. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**:56-57

Kimura Y., Kurzydowski K., Tada M., MacLennan D.H. (1997). Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J. Biol. Chem.* **272**:15061-15064

Kirchmair R., Egger M., Walter D.H., Eisterer W., Niederwanger A., Woell E., Nagl M., Pedrini M., Murayama T., Frauscher S., Hanley A., Silver M., Brodmann M., Sturm W., Fischer-Colbrie R., Losordo D.W., Patsch J.R., Schratzberger P. (2004). Secretoneurin, an angiogenic neuropeptide, induces postnatal vasculogenesis. *Circulation.* **110**(9):1121-1127

Konecki D.S., Benedum U.M., Gerdes H.H., Huttner W.B. (1987). The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J Biol Chem.* **262**(35):17026-17030

Krüger P.G., Aas P., Onarheim J., Helle K.B. (1982). Neurotensin-induced release of histamine from rat mast cells in vitro. *Acta Physiol Scand.* **114**(3):467-469

Krüger PG, Mahata S.K., Helle K.B. (2003). Catestatin (CgA₃₄₄₋₃₆₄) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides. *Regul. Pept.* **114**:29-35

Kukanova B. e Mravec B. (2006). Complex intracardiac nervous system. *Bratisl. Lek. Listy.* **107**:45-51

Lechner T., Adlassnig C., Humpel C., Kaufmann W.A., Maier H., Reinstadler-Kramer K., Hinterhölzl J., Mahata S.K., Jellinger K.A., Marksteiner J. (2004). Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* **39**:101-113

Lee J.C., Taylor C.V., Gaucher S.P., Toneff T., Taupenot L., Yasothornsrikul S., Mahata S.K., Sei C., Parmer R.J., Neveu J.M., Lane W.S., Gibson B.W., O'Connor D.T., Hook V.Y.H. (2003). Primary sequence characterization of catestatin

intermediates and peptides defines proteolytic cleavage sites utilized for converting chromogranin A into active catestatin secreted from neuroendocrine chromaffin cells. *Biochemistry* **42**:6938-6946

Legssyer A.K., Hove-Madsen L., Hoerter J., Fischmeister R. (1997). Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca^{2+} current in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**:579-591

Lehnart S.E., Mongillo M., Bellinger A., Lindegger N., Chen B.X., Hsueh W., Reiken S., Wronska A., Drew L., Ward C.W., Lederer W.J., Kass R.S., Morley G., Marks A.R. (2008). Leaky Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J. Clin. Invest.* **118**:2230-2245

Leite-Moreira A.F., Brás-Silva C., Pedrosa C. (2002). Myocardial effects of ETB receptor stimulation. *Rev. Port. Cardiol.* **21**(9):1009-1016

Livett B.G., Marley P.D. (1993). Non cholinergic control of adrenal catecholamine secretion. *J. Anat.* **183**:277-289

Livett B.G., Zhou X.F. (1991). Substance P interactions with the nicotinic response. *Ann. NY Acad. Sci.* **632**:249-262

Lloyd-Jones D., Adams R.J., Brown T.M., Carnethon M., Dai S., De Simone G., Ferguson T.B., Ford E., Furie K., Gillespie C., Go A. et al (2010). Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* **121**(7):46-215

Lorell B.H. Significance of diastolic dysfunction of the heart. *Ann. Rev. Med.* **42**:411-436

Lugardon K., Raffner R., Goumon Y., Corti A., Delmas A., Bulet P., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (2000). Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **275**(15):10745-10753

Macquin-Mavier I., Clerici C., Franco-Montoya M.L., Harf A. (1988). Mechanism of histamine-induced epinephrine release in guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**:706-709

Mahapatra N.R., O'Connor D.T., Vaingankar S.M., Hikim A.P.S., Mahata M., Ray S., Staite E., Wu H., Gu Y., Dalton N., Kennedy B.P., Ziegler M.G., Ross J.Jr., Mahata S.K. (2005). Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J. Clin. Invest.* **115**:1942-1952

Mahapatra N.R., Mahata M., Mahata S.K., O'Connor D.T. (2006). The chromogranin A fragment catestatin: specificity, potency and mechanism to inhibit exocytotic secretion of multiple catecholamine storage vesicle co-transmitters. *J. Hypertens.* **24**:895-904

Mahata S.K., O'Connor D.T., Mahata M., Yoo S.H., Taupenot L., Wu H., Gill B.M., Parmer R.J. (1997). Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J. Clin. Invest.* **100**:1623-1633

- Mahata S.K., Mahata M., Parmer R.J., O'Connor D.T. (1999).** Desensitization of catecholamine release. The novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A₃₄₄₋₃₆₄) acts at the receptor to prevent nicotinic cholinergic tolerance. *J. Biol. Chem.* **274**:2920-2928
- Mahata S.K., Mahata M., Wakade A.R., O'Connor D.T. (2000).** Primary structure and function of the catecholamine release inhibitory peptide catestatin (chromogranin A₃₄₄₋₃₆₄): identification of amino acid residues crucial for activity. *Mol. Endocrinol.* **14**:1525-1535
- Mahata S.K., Mahapatra N.R., Mahata M., Wang T.C., Kennedy B.P., Ziegler, O'Connor D.T. (2003).** Catecholamine Secretory Vesicle Stimulus-Transcription Coupling *in Vivo*. Demonstration by a novel transgenic promoter/photoprotein reporter and inhibition of secretion and transcription by the chromogranin A fragment catestatin. *J. Biol. Chem.* **278**:32058-32067
- Mahata S.K., Mahata M., Wen G., Wong W.B., Mahapatra N.R., Hamilton B.A., O'Connor D.T. (2004).** The catecholamine release-inhibitory "catestatin" fragment of chromogranin A: naturally occurring human variants with different potencies for multiple chromaffin cell nicotinic cholinergic responses. *Mol. Pharmacol.* **66**:1180-1191
- Marti H.J., Bernaudin M., Bellail A., Schoch H., Euler M., Petit E., Risau W. (2000).** Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol.* **156**(3):965-976
- Martinez-Ruiz A., Villanueva L., Gonzalez de Orduna C., Lopez-Ferrer D. (2005).** S nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:8525-8530
- Massion P.B., Feron O., Dessy C., Balligand J.L. (2003).** Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res.* **93**:388-398
- Mazza R., Angelone T., Pasqua T., Gattuso A. (2010).** Physiological evidence for β 3-adrenoceptor in frog (*Rana esculenta*) heart. *Gen. Comp. Endocrinol.* **169**(2):151-157
- Metz-Boutigue M.H., Garcia-Sablone P., Hogue-Angeletti R., Aunis D. (1993).** Intracellular and extracellular processing of chromogranin A: determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **217**:247-257
- Metz-Boutigue M.H., Goumon Y., Lugardon K., Strub J.M., Aunis D. (1998).** Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18**:249-266
- Milligan G. (1988).** Techniques used in the identification and analysis of function of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins. *Biochem J.* **255**(1):1-13
- Miserez B., Annaert W., Dillen L., Aunis D., De Potter W. (1992).** Chromogranin A processing in sympathetic neurons and release of chromogranin A fragments from sheep spleen. *FEBS Lett.* **314**(2):122-124

- Moens A.L., Yang R., Watts V.L., Barouch L.A. (2010).** Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48(6):1088-1095**
- Molloy S.S., Bresnahan P.A., Klimpel K., Leppla L., Thomas G. (1992).** Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* **267:16396-16402**
- Mongillo M., Tocchetti C.G., Terrin A., Lissandron V., Cheung Y.F., Dostmann W.R., Pozzan T., Kass D.A., Paolucci N., Houslay M.D., Zaccolo M.(2006).** Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res.* **98(2):226-234**
- Mouland A.J., Bevan S., White J.H., Hendy G.N. (1994).** Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *J Biol Chem.* **269(9):6918-6926**
- Mousli M., Bueb J.L., Bronner C., Rouot B., Landry Y. (1990).** G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol Sci.* **11(9):358-362**
- Munoz DG. (1991).** Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of of senile plaques. *Lab. Invest.* **64(6):826-832**
- O'Connor D.T., Deftos L.J. (1986).** Secretion of chromogranin A by peptide producing endocrine neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **314:1145-1151**
- O'Connor D.T., Kailasam M.T., Kennedy B.P., Ziegler M.G., Yanaihara N., Parmer R.J. (2002).** Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *J. Hypertens.* **20:1335-1345**
- O'Connor D.T., Takiyuddin M.A., Printz M.P., Dinh T.Q., Barbosa J.A., Rozansky D.J., Mahata S.K., Wu H., Kennedy B.P., Ziegler M.G. (1999).** Catecholamine storage vesicle protein expression in genetic hypertension. *Blood Press.* **8:285-295**
- O'Connor D.T., Takiyuddin M.A., Printz M.P., Dinh T.Q., Barbosa J.A., Rozansky D.J., Mahata S.K., Wu H., Kennedy B.P., Ziegler M.G. (1999).** Catecholamine storage vesicle protein expression in genetic hypertension. *Blood Press.* **8:285-295**
- of senile plaques. *Lab. Invest.* **64:826-832**
- Ozawa K., Whalen E.J., Nelson C.D., Mu Y., Hess D.T., Lefkowitz R.J., Stamler J.S.(2008).** S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell.* **31(3):395-405**
- Palade G. (1975).** Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* **189:347-358**

- Parmer R.J., Cervenka J.H., Stone R.A. (1992).** Baroreflex sensitivity and heredity in essential
- Parmer R.J., Xi X.P., Wu H.J., Helman L.J., Petz L.N. (1993).** Secretory protein traffic: Chromogranin A contains a dominant targeting signal for the regulated pathway. *J. Clin. Invest.* **92**:1042-1054
- Pieroni M., Corti A., Tota B., Curnis F., Angelone T., Colombo B., Cerra M.C., Bellocchi F., Crea F., Maseri A. (2007).** Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. *Eur. Heart J.* **28**(9):1117-1127
- Poth K., Nutter T.J., Cuevas J., Parker M.J., Adams D.J., Luetje C.W. (1997).** Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. *J. Neurosci.* **15**:586-596
- Pravenec M., Kurtz T.W. (2007).** Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies. *Hypertension.* **49**(5):941-952
- Presta A., Liu J., Sessa W.C., Stuehr D.J. (1997).** Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity. *Nitric Oxide.* **1**:74-87
- Purnyn H.E., Rikhalsky O.V., Skok M.V., Skok V.I. (2004).** Functional nicotinic acetylcholine receptors in the neurons of rat intracardiac ganglia. *Fiziol. Zh.* **50**:79-84
- Ramella R., Boero O., Alloatti G., Angelone T., Levi R., Gallo M.P. (2010).** Vasostatin 1 activates eNOS in endothelial cells through a proteoglycan-dependent mechanism. *J. Cell. Biochem.* **110**(1):70-79
- Rangon C.M., Haik S., Faucheux B.A., Metz-Boutigue MH, Fierville F., Fuchs J.P., Hauw J.J., Aunis D. (2003).** Different chromogranin immunoreactivity between prion and a-beta amyloid plaque. *NeuroReport.* **14**:755-758
- Rao F., Wen G., Gayen J.R., Das M., Vaingankar S.M., Rana B.K., Mahata M., Kennedy B.P., Salem R.M., Stridsberg M., Abel K., Smith D.W., Eskin E., Schork N.J., Hamilton B.A., Ziegler M.G., Mahata S.K., O'Connor D.T. (2007).** Catecholamine release inhibitory peptide catestatin (Chromogranin A₃₅₂₋₃₇₂). Naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation* **115**(17):2271-2281
- Reddy L.G., Autry J.M., Jones L.R., Thomas D.D. (1999).** Co-reconstitution of phospholamban mutants with Ca-ATPase reveals dependence of inhibitory function on phospholamban structure. *J. Biol. Chem.* **274**:7649-7655
- Reiter E., Lefkowitz R.J. (2006).** GRKs and b-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**:159-165

- Samuels M.A. (2007).** The brain-heart connection. *Circulation*. **116**:77-84
- Scamuffa N., Calvo F., Chrétien M., Seidah N.G., Khatib A.M. (2006).** Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J.* **20**(12):1954-1963
- Schmidt A.G., Edes I., Kranias E.G. (2001).** Phospholamban: a promising therapeutic target in heart failure? *Cardiovasc. Drugs. Ther.* **15**:387-396
- Schneider F.H., Smith A.D., Winkler H. (1967).** Secretion from the adrenal medulla: biochemical evidence for exocytosis. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **31**:94-104
- Schober M., Howe P.R., Sperk G., Fischer-Colbrie R., Winkler H. (1989).** An increased pool of secretory hormones and peptides in adrenal medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. **13**:469-474
- Sessa W.C., Harrison J.K., Barber C.M., et al. (1992).** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **267**:15273-15276
- Severance E.G., Zhang H., Cruz Y., Pakhlevanians S., Hadley S.H., Amin J., Wecker L., Reed C., Cuevas J. (2004).** The alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor subunit exists in two Isoforms that contribute to functional ligand-gated ion channels. *Mol. Pharmacol.* **66**:420-429
- Simon J.P., Bader M.F., Aunis D. (1988).** Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:1712-1716
- Skeberdis V.A. (2004).** Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)* **40**:407-413
- Staszewska-Barczak J., Vane J.R. (1965).** The release of catechol amines from the adrenal medulla by histamine *Br J Pharmacol Chemother.* **25**(3):728-742
- Steinberg S.F. (1999).** The molecular basis for distinct β -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ. Res.* **85**:1101-1111
- Steiner H.J., Weiler R., Ludescher C., Schmid K.W., Winkler H. (1990).** Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. *J. Histochem. Cytochem.* **38**(6):845-850
- Strub J.M., Goumon Y., Lugardon K., Capon C., Lopez M., Moniatte M., Van Dorsselaer A., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (1996).** Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem.* **271**(45):28533-28540
- Sutherland F.J., Hearse D.J. (2000).** The Isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol. Res.* **41**:613-627
- Tada M., Kirchberger M.A., Katz A.M. (1975).** Phosphorylation of a 22,000-dalton

component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **250**:2640-2647

Takiyyuddin M.A., Cervenka J.H., Hsiao R.J., Barbosa J.A., Parmer R.J., O'Connor D.T. (1990). Chromogranin A: storage and release in hypertension. *Hypertension.* **15**:237-246

Takiyyuddin M.A., De Nicola L., Gabbai F.B., Dinh T.Q., Kennedy B., Ziegler M.G., Sabban E.L., Parmer R.J., O'Connor D.T. (1993). Catecholamine secretory vesicles. Augmented chromogranins and amines in secondary hypertension. *Hypertension.* **21**(5):674-679

Takiyyuddin M.A., Parmer R.J., Kailasam M.T., Cervenka J.H., Kennedy B., Ziegler M.G., Lin MC, Li J., Grim C.E., Wright F.A., O'Connor D.T. (1995). Chromogranin A in human hypertension. Influence of heredity. *Hypertension.* **26**:213-220

Tatemoto K., Efendic S., Mutt V., Makk G., Feistner G.J., Barchas J.D. (1986). Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature (Lond.).* **324**:476-478

Taupenot L., Ciesielski-Treska J., Ulrich G., Chasserot-Golaz S., Aunis D., Bader M.F. (1996). Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience.* **72**:377-389

Taupenot L., Mahata S.K., Mahata M., Parmer R.J., O'Connor D.T. (2000). Interaction of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (human chromogranin A₃₅₂₋₃₇₂) with the chromaffin cell surface and Torpedo electroplax: implications for nicotinic cholinergic antagonism. *Regul. Pept.* **95**:9-17

Taupenot L., Harper K.L., O'Connor D.T. (2003). The chromogranin-secretory family. *N. Engl. J. Med.* **348**:1134-114

Taylor C.V., Taupenot L., Mahata S.K., Mahata M., Wu H., Yasothornsrikul S., Toneff T., Caporale C., Jiang Q., Parmer R.J., Hook V.Y.H., O'Connor D.T. (2000). Formation of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin from chromogranin A. Determination of proteolytic cleavage sites in hormone storage granules. *J. Biol. Chem.* **275**:22905-22915

Theurl M., Schgoer W., Albrecht K., Jeschke J., Egger M., Beer A.G., Vasiljevic D., Rong S., Wolf A.M., Bahlmann F.H., Patsch J.R., Wolf D., Schratzberger P., Mahata S.K., Kirchmair R. (2010). The Neuropeptide Catestatin Acts As a Novel Angiogenic Cytokine via a Basic Fibroblast Growth Factor-Dependent Mechanism. *Circ. Res.* [Epub ahead of print]

Tomita U., Inanobe A., Kobayashi I., Takahashi K., Ui M., Katada T. (1991). Direct interactions of mastoparan and compound 48/80 with GTP-binding proteins. *J Biochem.* **109**(1):184-189

Tsigenly I., Sugiyama N., Sine S.M., Taylor P. (1997). A model of the nicotinic

receptor extracellular domain based on sequence identity and residue location. *Biophys. J.* **73**:52-66

Tsigenly I., Mahata S.K., Taupenot L., Preece N.E., Mahata M., Khan I., Parmer R.J., O'Connor D.T. (1998). Mechanism of action of chromogranin A on catecholamine release: molecular modeling of the catestatin region reveals a β -strand/loop/ β -strand structure secured by hydrophobic interactions and predictive of activity. *Regul. Pept.* **77**:43-53

Varghese P., Harrison R.H., Lofthouse R.A., Georgakopoulos D., Berkowitz D.E., Hare M. (2000). β 3-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J. Clin. Invest.* **106**:697-703

Venkatesh S.G., Gorr S.U. (2002). A sulfated proteoglycan is necessary for storage of exocrine secretory proteins in the rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol.* **283**(2):C438-45.

Vittone L., Mundiña-Weilenmann C., Mattiazzi A., Cingolani H. (1994). Physiologic and pharmacologic factors that affect myocardial relaxation. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **32**:7-18

Weiergräber M., Pereverzev A., Vajna R., Henry M., Schramm M., Nastainczyk W., Grabsch H., Schneider T. (2000). Immunodetection of α 1E voltage-gated Ca^{2+} channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney. *J Histochem Cytochem.* **48**(6):807-819

Wen G., Mahata S.K., Cadman P., Mahata M., Ghosh S., Mahapatra N.R., Rao F., Stridsberg M., Smith D.W., Mahboubi P., Schork N.J., O'Connor D.T., Hamilton B.A. (2004). Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology. *Am. J. Hum. Genet.* **74**:197-207

West M.J., Korner P.I. (1974). The baroreceptor-heart rate reflex in renal hypertension in the rabbit. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1**:231-239

Whalin M.E., Strada S.J., Thompson W.J. (1988). Purification and partial characterization of membrane-associated type II (cGMP-activatable) cyclic nucleotide phosphodiesterase from rabbit brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **972**:79-94

Winkler H., Fischer-Colbrie R. (1992). The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience.* **49**:497-528

Wolkersdorfer M., Laslop A., Lazure C., Fischer-Colbrie R., Winkler H. (1996). Processing of chromogranins in chromaffin cell culture: effects of reserpine and α -methyl-p-tyrosine. *Biochem. J.* **316**(Pt 3):953-958

Wu H.J., Rozansky D.J., Parmer R.J., Grill B.M., O'Connor D.T. (1991). Structure and function of the chromogranin A gene. Clues evolution and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **266**:13130-13134

Xiao R.P., Cheng H., Zhou Y.Y., Kuschel M., Lakatta E.G. (1999). Recent advances

in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ. Res.* **85**(11):1092-1100

Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Becker L.C. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:657-662

Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T.(1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* **332**:411-415

Yano N., Ianus V., Zhao T.C., Tseng A., Padbury J.F., Tseng Y.T. (2007). A novel signaling pathway for β -adrenergic receptor-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase in H9c2 cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**:H385-H393

Yasothornsrikul S., Greenbaum D., Medzihradzky K.F., Toneff T., Bunday R., Miller R., Schilling B., Petermann I., Dehnert J., Logvinova A., Goldsmith P., Neveu J.M., Lane W.S., Gibson B., Reinheckel T., Peters C., Bogyo M., Hook V. (2003). Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**(16):9590-9595

Zhang D., Shooshtarizadeh P., Laventie B.J., Colin D.A., Chich J.F., Vidic J., de Barry J., Chasserot-Golaz S., Delalande F., Van Dorsselaer A., Schneider F., Helle K., Aunis D., Prevost G., Metz-Boutigue M.H. (2009). Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS ONE.* **4**:e4501

Zhang L., Rodríguez Del Castillo A., Trifaró J.M. (1995). Histamine-evoked chromaffin cell scinderin redistribution, F-actin disassembly, and secretion: in the absence of cortical F-actin disassembly, an increase in intracellular Ca²⁺ fails to trigger exocytosis. *J Neurochem.* **65**(3):1297-308

Ziche M., Morbidelli L., Masini E., Amerini S., Granger H.J., Maggi C.A., Geppetti P., Ledda F. (1994). Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest.* **94**(5):2036-2044

FULL PAPERS

Quintieri A, Angelone T, **Pasqua T**, Gentile S, Mahata SK, Tota B, Cerra MC "Phosphodiesterase-2 (PDE2) an protein S-Nitrosylation mediate the cardiac response of Catestatin". Submitted to *Cell Endocrinol*

Angelone T, **Pasqua T**, Di Majo D, Quintieri AM, Filice E, Amodio N, Tota B, Giammanco M, Cerra MC "Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by Quercetin and Myricetin, two red wine flavonols". *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2010. In press (IF 3.565)

Angelone T, Filice E, Quintieri AM, Imbrogno S, Amodio N, **Pasqua T**, Pellegrino D, Mulè F, Cerra MC "Receptor identification and physiological characterization of glucagon-like peptide-2 in the rat heart". *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2010. In press (IF 3.565)

Mazza R, Angelone T, **Pasqua T**, Gattuso A "Physiological evidence for beta3-adrenoceptor in frog (*Rana esculenta*) heart". *General and Comparative Endocrinology*, 2010, vol. 169:151-157 (IF 2.732)

ATTI DI CONVEGNO

Quintieri A, Angelone T, **Pasqua T**, Gentile S, Mahata SK, Tota B, Cerra MC "Phosphodiesterase-2 (PDE2) an protein S-Nitrosylation mediate the cardiac response of Catestatin". Atti del convegno "XVII Congresso Società Italiana Di Ricerche Cardiovascolari", Imola (BO), October 2010. *Vincitrice del premio "Young Investigator 2010" conferito dalla SIRC*

Angelone T, **Pasqua T**, Filice E, Quintieri A, Imbrogno S, Amodio N, Pellegrino D, Mule' F, Cerra MC "The emerging myocardial and coronary action of Glucagon-derive Peptide-2". Atti del convegno "61° Meeting of The Italian Physiological Society", Varese, Sempember 2010

Tota B, Gattuso A, Mazza R, Angelone T, **Pasqua T** "Beta3-adrenoceptor modulates cardiac function of the frog *Rana esculenta*". Atti del convegno "SEB Annual Main Meeting", Prague, July 2010; pp. 186

Tota B, Angelone T, Quintieri A, **Pasqua T**, Mazza R, Cerra MC, "Interaction between two cardioactive chromogranin A-derived peptides: vasostatin-1 and catestatin". Atti del convegno "6th Meeting on Vasostatin-1: advances and perspectives", Milano, 28-29 May, 2010

Angelone T, **Pasqua T**, Di Majo D, Quintieri A, Filice E, Amodio N, Giammanco M, Cerra MC, "Two red wine flavonoids, Quercetin and Myricetin, exert different myocardial and coronary actions through distinct intracellular pathways". Atti del convegno "XVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Ricerche Cardiovascolari (SIRC)", Imola (Bo), 29-31 Ottobre, 2009


Angelone T, Di Majo D, **Pasqua T**, Quintieri A, Filice E, Vitelli R, Amodio N, Tota B, Giammanco M, Cerra MC "Different myocardial and coronary actions of two red wine flavonoids: Quercetin and Myricetin". Atti del convegno "60th National Congress of the Italian Physiological Society", Siena, 23-25 September, 2009, *Acta Physiologica*:2009, Vol. 197 (672), pp. 2

Quintieri A, Angelone T, **Pasqua T**, Mazza R, Gattuso A, Mahata SK, Tota B, Cerra MC "Inotropic and lusitropic effects of the antihypertensive Catestatin: mechanisms of action in the rat heart". Atti del convegno "XV Congresso Nazionale della Società Italiana di Ricerche Cardiovascolari (SIRC)", Imola (Bo), 9-11 Ottobre, 2008

Angelone T, Quintieri A, Filice E, **Pasqua T**, Mazza R, Metz-boutigue MH, Tota B, Cerra MC "The homologous rat Chromogranin-A1-64 (rCGA1-64) as a novel autocrine-paracrine hormone for myocardial and coronary regulation in the rat". Atti del convegno "Chromaffin cells and Chromogranins: new date and perspectives", Strasburgo, 14-15 Novembre, 2008

Quintieri A, Angelone T, **Pasqua T**, Mazza R, Gattuso A, Metz-boutigue MH, Tota B, Cerra MC "Myocardial and coronary modulation of the homologous rat Chromogranin A1-64 (rCGA1-64) in the rat heart". Atti del convegno "59° Meeting of The Italian Physiological Society", Cagliari, 17-19 September, 2008, vol. 194 (665), pp. 105

AUTHOR QUERY FORM

 ELSEVIER	Journal: NUMECD Article Number: 771	Please e-mail or fax your responses and any corrections to: E-mail: corrections.esco@elsevier.tnq.co.in Fax: +31 2048 52789
---	--	---

Dear Author,

Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list.

For correction or revision of any artwork, please consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof.

Location in article	Query / Remark: click on the Q link to go Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Please check the hierarchy of the section levels.

Thank you for your assistance.



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcd

Nutrition,
Metabolism &
Cardiovascular Diseases

Receptor identification and physiological characterisation of glucagon-like peptide-2 in the rat heart

T. Angelone^a, E. Filice^{b,1}, A.M. Quintieri^{b,1}, S. Imbrogno^a, N. Amodio^d,
T. Pasqua^a, D. Pellegrino^b, F. Mulè^c, M.C. Cerra^{a,b,*}

^a Department of Cell Biology, University of Calabria, Arcavacata di Rende (CS), Italy

^b Department of Pharmaco-Biology, University of Calabria, Arcavacata di Rende (CS), Italy

^c Department of Cell Biology and Development, University of Palermo, Palermo, Italy

^d Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Catanzaro Magna Græcia, Catanzaro, Italy

Received 25 March 2010; received in revised form 26 July 2010; accepted 28 July 2010

KEYWORDS

GLP-2;
GLP-2 receptors;
Rat heart;
G-proteins;
ERK1/2

Abstract *Background and aims:* The anorexigenic glucagon-like peptide (GLP)-2 is produced by intestinal L cells and released in response to food intake. It affects intestinal function involving G-protein-coupled receptors. To verify whether GLP-2 acts as a cardiac modulator in mammals, we analysed, in the rat heart, the expression of GLP-2 receptors and the myocardial and coronary responses to GLP-2.

Methods and results: GLP-2 receptors were detected on ventricular extracts by quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) and Western blotting. Cardiac GLP-2 effects were analysed on Langendorff perfused hearts. Intracellular GLP-2 signalling was investigated on Langendorff perfused hearts and by Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on ventricular extracts.

By immunoblotting and Q-RT-PCR, we revealed the expression of ventricular GLP-2 receptors. Perfusion analyses showed that GLP-2 induces positive inotropism at low concentration (10–12 mol l⁻¹), and negative inotropism and lusitropism from 10 to 10 mol l⁻¹. It dose-dependently constricts coronaries. The negative effects of GLP-2 were independent from GLP-1 receptors, being unaffected by exendin-3 (9–39) amide. GLP-2-dependent negative action involves Gi/o proteins, associates with a reduction of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP), an increase in extracellular signal regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) and a decrease in phospholamban phosphorylation, but is independent from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and protein kinase G (PKG). Finally, GLP-2 competitively antagonised β-adrenergic stimulation.

* Corresponding author. Department of Pharmaco-Biology, University of Calabria, 87030 Arcavacata di Rende (CS), Italy. Tel.: +39 0984 49 2909/3155; fax: +39 0984 49 2906.

E-mail address: cerramc@unical.it (M.C. Cerra).

¹ These authors equally contributed to the work.

0939-4753/\$ - see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.numecd.2010.07.014

Please cite this article in press as: Angelone T, et al., Receptor identification and physiological characterisation of glucagon-like peptide-2 in the rat heart, Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (2010), doi:10.1016/j.numecd.2010.07.014

Conclusions: For the first time, to our knowledge, we found that: (1) the rat heart expresses functional GLP-2 receptors; (2) GLP-2 acts on both myocardium and coronaries, negatively modulating both basal and β -adrenergic stimulated cardiac performance; and (3) GLP-2 effects are mediated by G-proteins and involve ERK1/2.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Q1 Introduction

Glucagon-like peptide (GLP)-1 and GLP-2 derive by proglucagon processing, mainly occurring in the enteroendocrine 'L' cells of the distal intestine [1]. These peptides are co-secreted in a nutrient-dependent manner [2] and, via nervous and local integrated actions, play a role in short-term regulation of appetite and satiety, also influencing many gastrointestinal (GI) functions [3].

GLP-2 is an appetite-inhibiting 33-amino acid peptide [4]. Nutrients produce a biphasic rise of GLP-2 with a rapid postprandial increase of secretion [5]. Once released, the peptide elicits multiple GI actions, including hexose transport enhancement, epithelial permeability reduction and turnover control [2,4], gastric relaxation, inhibition of gastric-acid secretion and reduction of mucosal inflammatory cytokine production [4]. Accordingly, GLP-2 is regarded with interest also in relation to its therapeutic potential in severe intestinal syndromes [6].

GLP-2 acts via a specific G-protein-coupled receptor (GLP-2R) belonging to the class B glucagon-secretin receptor family [7]. This receptor alternatively couples to G_s and G_i/o proteins, thus activating divergent intracellular signalling [8]. GLP-2R exhibits high homology with GLP-1 receptor (GLP-1R), with which it shares several intracellular signalling mediators, such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A [1]. GLP-2R is largely expressed in the GI tract [7], pituitary [9] and hypothalamic [10] and extra-hypothalamic areas of the brain [11]. It is also expressed in lung, cervix and in vagal afferents [4]. This widespread expression suggests that the GLP-2 intestinal functions may be functionally related to unknown whole-organism effects.

The functional correlation between GI and cardiovascular activity is well assessed in both animals and humans. An example is the postprandial increment of both cardiac output and splanchnic blood supply. In this integrated cardiovascular–GI response, numerous neurohumoral substances are involved, including proglucagon-derived peptides. GLP-1 increases heart rate and blood pressure in intact rodents through sympathostimulatory effects [12] while depressing myocardial contractility in rat myocytes and perfused hearts [13]. It also plays a beneficial role in several cardiovascular pathologies [14]. Cardiac effects are mediated by the largely expressed GLP-1R [15].

Contrarily to GLP-1, GLP-2-dependent cardiovascular effects are not described, except for a rapid increase of intestinal blood flow, in part mediated by nitric oxide (NO) [16].

To evaluate whether GLP-2 is involved in mammalian cardiovascular modulation, we analysed in the rat heart: (1) the expression of GLP-2R; (2) the effects of exogenous

GLP-2 on both myocardial and coronary performance; and (3) the intracellular mechanism activated by GLP-2.

Materials

Materials and methods

Male Wistar rats (Harlan Laboratories s.r.l. Udine, Italy) weighing 180–240 g were housed in a ventilated cage-rack system under standard conditions. Animals had food and water access *ad libitum*. Animal care, sacrifice and experiments were supervised according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (US National Institutes of Health, Publication No. 85-23, revised 1996).

Heart-tissue homogenate preparation and quantitative real-time polymerase chain reaction

Hearts were homogenised prior to RNA extraction. Total RNA was extracted with Trizol, according to the manufacturer's protocol. Purity and integrity of RNA were confirmed spectroscopically and by gel electrophoresis before use. Total cDNA was synthesised from RNA by reverse transcription (Invitrogen, Milan, Italy) following the manufacturer's protocol.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-RT-PCR)- mRNA expression level of selected genes was quantified by real-time PCR using Step One sequence detection system. TaqMan assay (Applied Biosystems, Inc., Milano, Italy) (Rn00573037_m1, Rn00597158_m1 and Rn99999916_s1) was used to quantify GLP-2R mRNA. The relative mRNA amounts were calculated by comparative cycle threshold [17] and normalised by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression.

Langendorff perfused rat heart

Rats were anaesthetised with ethyl carbamate (i.p. injection, 2 g kg⁻¹ body weight). Hearts were dissected out and mounted on a Langendorff apparatus for perfusion (constant flow-rate of 12 ml min⁻¹) [18] with a Krebs–Henseleit solution (KHs) composed of (in mmol l⁻¹) NaCl 113, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, mannitol 1.1, Na-pyruvate 5 and gassed with 95% oxygen/5% carbon dioxide (pH 7.4, 37 °C).

To measure left ventricular (LV) pressure (LVP), a water-filled latex balloon connected to a BLPR gauge (Wolfram Research Inc., Champaign, IL, USA), was inserted through the mitral valve into the LV to allow isovolumic contractions and to continuously record mechanical parameters. The balloon was filled with water to obtain an initial LV end-diastolic pressure of 5–8 mmHg. Haemodynamic parameters (heart rate (HR, beats min⁻¹), LVP (mmHg), maximal

values of the first derivative of LVP, $(+)(LVdP/dt)_{max}$, $mmHg\ s^{-1}$, rate pressure product (RPP: $HR \times LVP$, $10^4\ mmHg\ beats\ min^{-1}$), time to peak tension of isometric twitch ($mmHg\ s^{-1}$), maximal rate of LVP decline $(-)(LVdP/dt)_{max}$, $mmHg\ s^{-1}$, half-time relaxation (s), $T/-t$ obtained by $(+)(LVdP/dt)_{max}/-(LVdP/dt)_{max}$, [18] coronary pressure (CP, $mmHg$) were assessed by PowerLab data acquisition system (ADInstruments, Italy). All drug-containing solutions were prepared before experiments. Hearts were equilibrated at basal level for 30 min before the specific protocol.

Basal conditions

Cardiac performance was evaluated by analysing HR (chronotropism), LVP (index of contractility), RPP (index of cardiac work), $(+)(LVdP/dt)_{max}$ (index of maximal rate of LV contraction), $(-)(LVdP/dt)_{max}$ (index of maximal rate of LV relaxation), HTR (time required for 50% tension fall) and $T/-t$ for lusitropism; CP for coronary motility.

GLP-2-stimulated preparations

Hearts were perfused with GLP-2 increasing concentrations (10^{-12} to $10^{-7}\ mol\ l^{-1}$) to generate concentration-response curves. The effects of the peptide were measured at 10 min. To exclude that GLP-2 effects are secondary to coronary constriction, hearts were perfused with papaverine ($10^{-5}\ mol/l^{-1}$) plus increasing GLP-2 concentrations.

GLP-1 receptors involvement

Hearts were perfused with increasing GLP-2 concentrations (10^{-12} to $10^{-7}\ mol\ l^{-1}$), plus a single concentration ($10^{-7}\ mol\ l^{-1}$) of the GLP-1R inhibitor, exendin-3 (9–39) amide.

Gi/o and Gs proteins involvement

Hearts were preincubated (60 min) with pertussis toxin (PTx: $10^{-12}\ mol\ l^{-1}$; Gi/o inhibitor), or cholera toxin (CTx: $10^{-8}\ mol\ l^{-1}$; Gs activator), and then exposed for 10 min to GLP-2 ($10^{-8}\ mol\ l^{-1}$). PTx catalyses adenosine diphosphate (ADP)-ribosylation of the Gi/o α -subunit, uncoupling Gi- membrane receptor interaction [18]. CTx catalyses ADP-ribosylation of an arginine residue on the Gs α subunit, reducing intrinsic guanosine triphosphatase (GTPase) activity.

Nitric oxide involvement

Hearts were perfused with increasing GLP-2 concentrations (10^{-12} to $10^{-7}\ mol/l^{-1}$) plus a single concentration of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) inhibitor L-N5-(1-iminoethyl)ornithine (L-NIO: $10^{-5}\ mol\ l^{-1}$) or the soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-(1,2,4)oxadiazole-(4,3-a) quinoxalin-1-one (ODQ: $10^{-5}\ mol\ l^{-1}$) or the protein kinase G (PKG) blocker KT5823 ($10^{-7}\ mol\ l^{-1}$).

Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cAMP measurements

Frozen heart-extracts tissue obtained after perfusion with $10^{-8}\ mol\ l^{-1}$ GLP-2 were used for cAMP and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) determinations (200–300 mg). Homogenates, treated with 6% trichloroacetic acid at $0\ ^\circ C$, were centrifuged at 10,000 g (10 min). Supernatant was extracted three times with 3 ml of diethyl ether saturated

with water. cAMP and cGMP were measured using a commercial enzyme immunoassay (Biotrack Enzyme immunoassay System; Amersham Biosciences, Sweden).

Isoproterenol-stimulated preparations

Dose-response curves were generated by perfusing the hearts with increasing concentrations ($0.1\ nmol\ l^{-1}$ to $1\ \mu mol\ l^{-1}$) of isoproterenol (Iso) alone plus $10^{-8}\ mol\ l^{-1}$ GLP-2. EC_{50} values were thus calculated.

Western blotting

Ventricles, homogenised in ice-cold radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) containing protease inhibitors ($1\ mmol\ l^{-1}$ aprotinin, $20\ mmol\ l^{-1}$ phenylmethylsulphonyl fluoride and $200\ mmol\ l^{-1}$ sodium orthovanadate), were centrifuged (200 g, 10 min, $4\ ^\circ C$). Protein concentration was determined using Bradford reagent (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). Intestine was used as a positive control. Equal amounts of whole protein extract were resolved on a 10% sodium dodecylsulphate (SDS)-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Milan, Italy), probed overnight ($4\ ^\circ C$) with antibodies against: GLP-2R (MBL International Corporation, USA), total and phosphorylated p-eNOS (Ser 1177), total and p-AKT (Ser473), total and p-ERK1/2(E-4), phospholamban (PLB) (Ser16) and β -actin (C-4) (Santa Cruz Biotechnology, DBA, Italy). Proteins and phosphoprotein levels were detected with horseradish peroxidase-linked secondary antibodies and the ECL[®] System (GE Healthcare, Milan, Italy). Autoradiographs were quantified by arbitrary densitometric units. Data were normalised against β -actin.

Drugs and chemicals

GLP-2, exendin-3 (9–39) amide (Tocris Bioscience; Bristol, UK), PTx, Ctx, L-NIO, Iso and papaverine (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) were solubilised in water, except for ODQ (Sigma-Aldrich, Milan, Italy; dimethylsulphoxide (DMSO)) and KT5823 (Sigma-Aldrich, Milan, Italy; ethyl acetate).

Statistics

Data are the mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical significance of differences within-group was assessed by analysis of variance (ANOVA) test ($p < 0.05$). Multiple comparisons were made using either one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test or two-way ANOVA; $p < 0.05$. Sigmoid curves of Iso plus GLP-2, fitted using GraphPad Prism 4.02, provided the concentration (in $-\log M$) of Iso alone and of Iso plus GLP-2, which induced the 50% effect (EC_{50}).

Results

Cardiac GLP-2 receptors identification

Specific N-terminal antibody directed towards human GLP-2R revealed these receptors to be expressed in rat ventricle (Fig. 1(A), lane 2) and intestine (positive control: 35,51) (Fig. 1(A), lane 3). Ventricular expression was confirmed by mRNA identification by TaqMan Q-RT-PCR (Fig. 1(B)). GLP-2R expression was significantly lower in ventricles than in

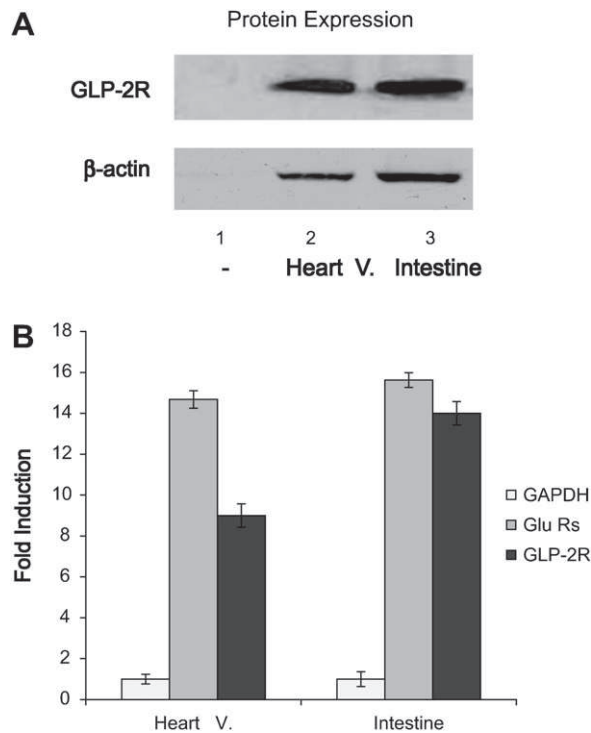


Figure 1 (A) Immunoblots of rat heart (lane 2) and intestine (lane 3) homogenates showing expression of GLP-2R and β -actin as housekeeping protein. Lane 1: lysis buffer. (B) Real-time PCR of GLP-2R, Glu-Rs and GAPDH mRNA expression in heart and intestine extracts ($N = 6$).

intestine, being lower than cardiac Glutamyl tRNA synthetase (Glu-Rs), present in both heart and intestine (Fig. 1(B)) [19].

GLP-2 cardiac effects

Basal conditions

After stabilisation, basal parameters were: HR = 280 ± 7 beats min^{-1} , LVP = 89 ± 3 mmHg, RPP = $2.5 \pm 0.1 \cdot 10^4$ mmHg beats min^{-1} , $+(LVdP/dt)_{\text{max}} = 2492 \pm 129$ mmHg s^{-1} , $T/ -t = 0.08 \pm 0.01$ s, $-(LVdP/dt)_{\text{max}} = -1663 \pm 70$ mmHg s, HTR = 0.05 ± 0.01 s and $T/ -t = -1.49 \pm 1.84$ mmHg s, CP = 63 ± 3 mmHg. Endurance and stability of the preparation, analysed by measuring performance variables every 10 min, showed stability for up to 180 min.

GLP-2-stimulated preparations

LVP and $+(LVdP/dt)_{\text{max}}$ revealed that GLP-2 caused a concentration-dependent inotropic effect, positive at the lowest concentration (10^{-12} mol l^{-1}) and negative at higher concentrations (from 10^{-10} mol l^{-1}) (Fig. 2). Because HR was unchanged (Fig. 2), experiments were conducted on spontaneously beating hearts. Lusitropic analysis revealed a reduction of $-(LVdP/dt)_{\text{max}}$ and an increase of $T/ -t$ significant from 10^{-10} mol l^{-1} . GLP-2 induced a slight but non-significant dose-dependent vasoconstriction (Fig. 2). Results in the presence of the endothelium-independent coronary dilator papaverine indicate that the GLP-2-elicited negative inotropism is independent from coronary constriction (data not shown).

GLP-1 receptors involvement

GLP-1R inhibition by exendin-3 (9–39) amide (10^{-7} mol l^{-1}) unaffected GLP-2_{1–39} induced inotropism, lusitropism and coronary motility. The peptide caused a significant reduction of LVP, $+(LVdP/dt)_{\text{max}}$ and $-(LVdP/dt)_{\text{max}}$, while increasing $T/ -t$ and coronary pressure, without changing HR (Fig. 3).

Mechanism of action of GLP-2

Gi/o and Gs proteins: Exposure to PTx (10^{-11} mol l^{-1} ; Gi/o inhibitor), or CTx (10^{-8} mol l^{-1} ; Gs activator), and then to GLP-2 (10^{-8} mol l^{-1}) revealed that PTx abolished the negative inotropism and lusitropism induced by GLP-2, while not affecting coronary constriction. Contrarily, CTx unchanged GLP-2 effects, except for a reduction of coronary constriction (Fig. 4).

Nitric oxide involvement: The eNOS–NO–cGMP–PKG cascade crucially controls mammalian contractile performance [28]. Its involvement in GLP-2-dependent cardiopropism was tested by perfusing the hearts with L-NIO (10^{-5} mol l^{-1}), ODQ (10^{-5} mol l^{-1}) or KT5823 (10^{-7} mol l^{-1}) in the presence of GLP-2. Antagonist concentrations were selected from preliminary dose–response curves as the lowest concentration that unchanged basal cardiac function. Selective eNOS inhibition by L-NIO alone showed a non-significant reduction of LVP ($-5.13 \pm 2.48\%$ with respect to the control). GLP-2 dose-dependent negative inotropism [i.e., LVP and $+(LVdP/dt)_{\text{max}}$], lusitropism [i.e., $-(LVdP/dt)_{\text{max}}$] and coronary constriction (i.e., CP) were unaffected by L-NIO (Fig. 5); by ODQ, a selective soluble GC inhibitor; and by KT5823, a selective PKG inhibitor (data not shown).

Ventricular p-eNOS, p-Akt, p-ERK1/2 and p-PLB expression: eNOS, Akt, ERK1/2 and PLB phosphorylation was analysed in cardiac extracts after perfusion with 10^{-8} mol l^{-1} GLP-2. GLP-2 did not induce eNOS and Akt phosphorylation. Contrarily, it significantly increased ERK1/2 phosphorylation, while decreasing PLB phosphorylation (see Fig. 5).

Effects of GLP-2 on cAMP and cGMP: Intracellular levels of cGMP and cAMP were measured on cardiac extracts. GLP-2 (10^{-8} mol l^{-1}) reduced cAMP levels, as expected in the presence of negative inotropism and counteraction of adrenergic activation, without changing cGMP levels (data not shown).

Isoproterenol-stimulated preparations

GLP-2 anti-adrenergic action was analysed on heart preparations perfused with increasing concentrations of Iso (0.1 nM–1 μM) either alone or in combination with GLP-2 (10^{-8} mol l^{-1}). EC_{50} values (in logM) of Iso alone were -7.717 ± 0.25 ($r^2 = 0.91$), of Iso plus GLP-2 were -6.82 ± 0.12 ($r^2 = 0.97$). This showed that GLP-2 exerts a competitive antagonism against adrenergic stimulation.

Discussion

We provide, to our knowledge, the first evidence that under basal conditions the rat heart expresses receptors for the appetite-inhibiting peptide GLP-2. We physio–pharmacologically demonstrated that activation of these receptors

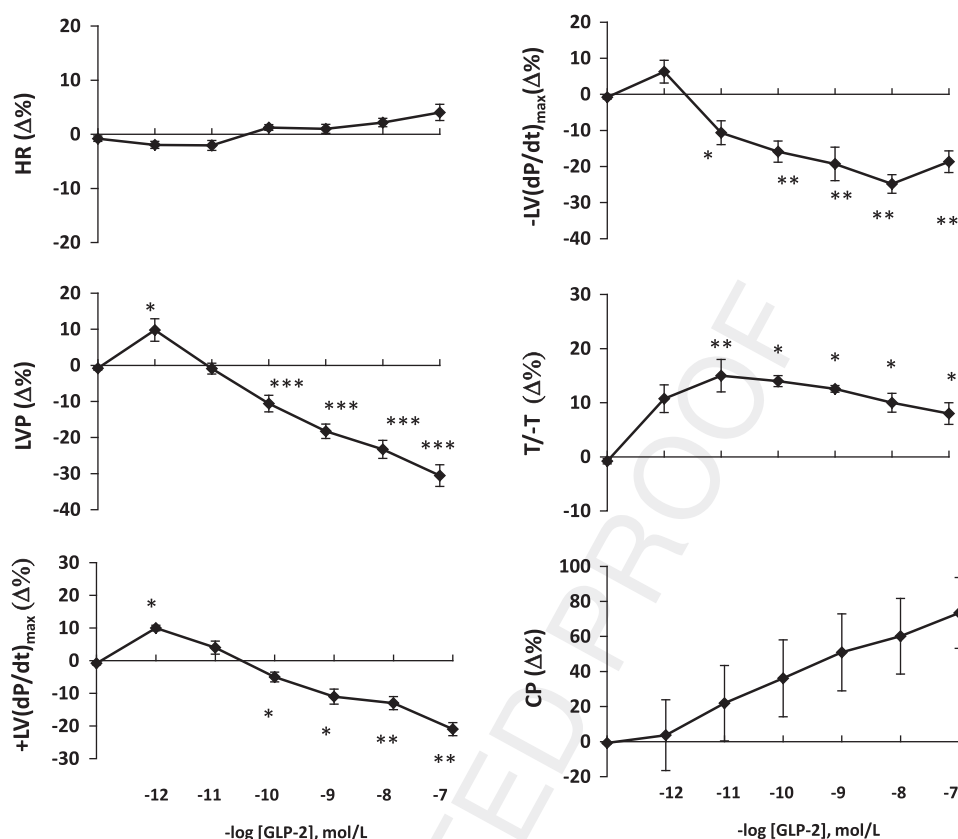


Figure 2 Concentration–response curves of GLP-2 (10^{-12} – 10^{-7} mol/L) on HR (Heart Rate), LVP (left ventricular pressure), RPP (rate pressure product), $+LV(dp/dt)_{max}$ (maximal rate of contraction), $-LV(dp/dt)_{max}$ (maximal rate of relaxation), T/–t and CP (Coronary Pressure) on the rat isolated and Langendorff perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as means \pm SE of 10 experiments for each group. Significance of differences from control values (one-way ANOVA): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

by exogenous GLP-2 induced dose-dependent inotropism and lusitropism and coronary constriction. These effects are mediated by Gi/o proteins and involve PLB and ERK1/2.

Expression of GLP-2R

An antibody directed towards human GLP-2R showed that this receptor is expressed in cardiac ventricle, although to a lesser extent than in the intestine, a known GLP-2 target [7,8]. So far, GLP-2R was believed to be restricted to GI tract, central nervous system [11], vagal afferents, lung and cervix [8,11,20]. Although previous studies failed to detect cardiac GLP-2R RNA by Northern blots [7], we succeeded in detecting GLP-2R in the heart using immunoblot and Q-RT-PCR. The reason for this discrepancy may reside in the different methodological approaches used for receptor detection. At the moment, we cannot discriminate the cardiac cell type (i.e., myocytes, endocardial-endothelial cells) expressing GLP-2R. Further studies are necessary to clarify this issue.

GLP-2 as a cardioinhibitory peptide

Exposure to exogenous GLP-2 indicated that rat cardiac GLP-2R are functional. The peptide stimulates contractility at very low concentrations (10^{-12} mol l^{-1}), while reduced

contractility and relaxation are observed from 10^{-10} mol l^{-1} .

These effects are obtained at GLP-2 concentrations close to the physiological range of circulating peptide encountered in both rats and humans. GLP-2 levels are 700 ± 71 pg ml^{-1} in fasted rats, and increase 3.6-fold in 24-h fed rats. In human, GLP-2 increases 2 h after a meal, rising from 851 ± 230 to 1106 ± 211 pg ml^{-1} [21]. Recently, a clinical study showed that GLP-2, subcutaneously administered at a dose, which corresponds to plasma postprandial levels, slightly increases HR, cardiac output and stroke volume [22]. Although a baroreflex response consequent to a GLP-2-dependent redistribution of mesenteric blood flow may contribute to these *in vivo* effects, the use of an *in vitro* denervated heart excluded indirect neural mechanism from the GLP-2-dependent activity. The biphasic behaviour observed after GLP-2 exposure is a common feature of GLP-2R activation because it was already described in many cell lines expressing this receptor, as well as in target organs and tissues [2,9,23,24]. It was attributed to either a dose-dependent coupling to alternate G-proteins or the unique desensitisation, trafficking and resensitisation, which characterise this receptor [25].

Of note, GLP-1R block by exendin-3 (9–39) amide [11] unaffected the negative inotropism and lusitropism induced by GLP-2, thus excluding GLP-1R involvement. This is of relevance because GLP-1R shares with GLP-2R a high homology and some downstream mediators (e.g., cAMP and PKA) [8].

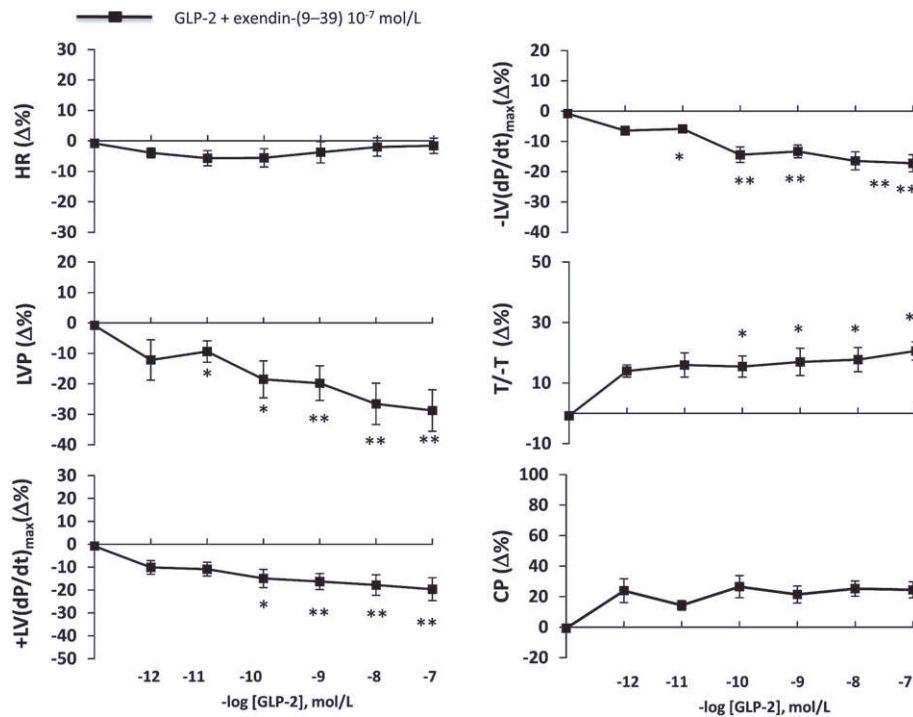


Figure 3 Concentration-dependent responses of GLP-2 (10⁻¹²–10⁻⁷ mol/L) in the presence of GLP-1R antagonist, exendin-3 (9–39) amide (10⁻⁷ mol/L) on HR (Heart Rate), LVP (left ventricular pressure), RPP (rate pressure product), +LV(dP/dt)_{max} (the maximal rate of contraction), -LV(dP/dt)_{max} (the maximal rate of relaxation), T/-t and CP (Coronary Pressure) on the isolated and Langendorff perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as means ± SE of 8 experiments. Significance of differences from control values (one-way ANOVA): *p < 0.05, **p < 0.01.

Signalling pathways for GLP-2

Analysis of the intracellular mechanisms triggered by agonist activation of GLP-2R revealed multiple and often interacting pathways [4]. GLP-2R dose-dependently couples to either Gi/o or Gs proteins, thus differently influencing

cAMP [8]. We show here that GLP-2-dependent cardiac effects involve Gi/o proteins. Consistent with this, GLP-2 exposure is accompanied by a decrease in intracellular cAMP.

Vascular studies suggest a link between GLP-2 and NO. GLP-2 increases intestinal constitutive NOS activity and

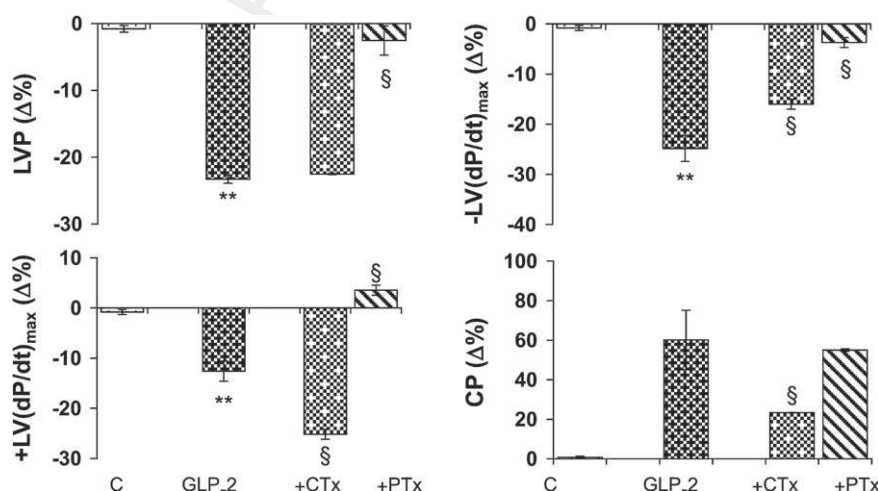


Figure 4 GLP-2 effects before and after treatment with PTx (10⁻¹¹ mol/L) or CTx (10⁻⁸ mol/L) on LVP (left ventricular pressure), +LV(dP/dt)_{max} (maximal rate of contraction), -LV(dP/dt)_{max} (maximal rate of relaxation) and CP (Coronary Pressure) on the isolated and Langendorff perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as means ± SE of 6 experiments for each group. Significance of differences from control values of GLP-2 vs Krebs–Henseleit solution (KHs) (one-way ANOVA): *p < 0.05, **p < 0.01. Comparison between groups treated with GLP-2 vs PTx or CTx (one-way ANOVA): §p < 0.05.

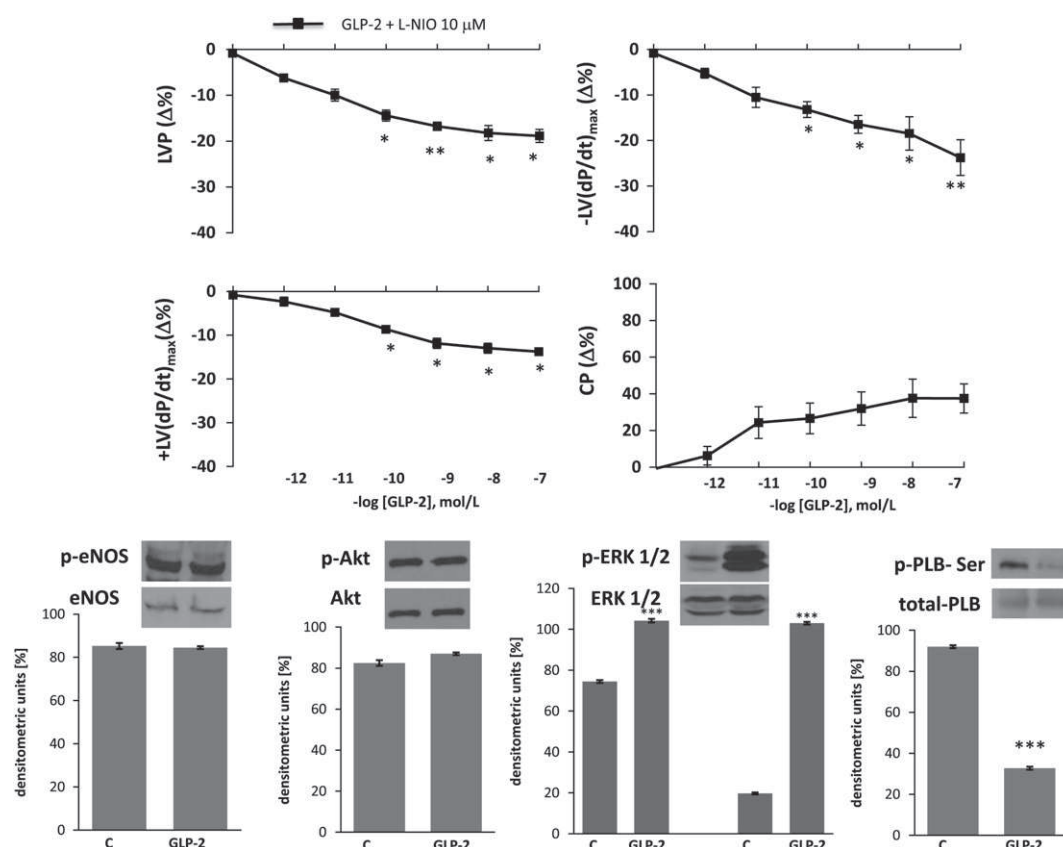


Figure 5 (A) Concentration-dependent responses of GLP-2 (10^{-12} - 10^{-7} mol/L) in the presence of eNOS antagonist (L-NIO: 10^{-5} mol/L) on LVP (Left Ventricular Pressure), $+LV(dP/dt)_{max}$ (maximal rate of contraction), $-LV(dP/dt)_{max}$ (maximal rate of relaxation) and CP (Coronary Pressure) on the isolated and Langendorff perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as means \pm SE of 8 experiments. Significance of differences from control values (one-way ANOVA): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Immunoblots of p-eNOS, eNOS, p-Akt, Akt, p-ERK1/2, ERK1/2, p-PLB and PLB in untreated and GLP-2 treated hearts. Percentage changes were evaluated as means \pm SE of 8 experiments for each group. Significance of differences from control values (one-way ANOVA): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

endothelial NOS expression [16]. In addition, GLP-2R uses the NO pathway to increase intestinal blood flow [22]. In contrast with these findings, we showed that GLP-2-mediated cardioactivity is independent from the eNOS/NO system and is not accompanied by changes in eNOS and Akt phosphorylation.

GLP-2 cardiomodulation is paralleled by increased ERK1/2 phosphorylation. This agrees with recent data obtained in different cell types in which GLP-2R activation stimulates ERK1/2 phosphorylation to control cell growth and proliferation [26,20]. In the heart, ERK1/2 mediates short- and long-term responses elicited by many cardioactive substances [27]. It is involved in the negative inotropism induced by oestrogen-mediated activation of the membrane receptor G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) [28] and participates in the Reperfusion Injury Salvage Kinases pathway, which protects the heart against ischemia/reperfusion injuries [29].

Notably, GLP-2 reduced PLB(Ser16) phosphorylation, suggesting this protein is involved in the negative inotropism and lusitropism induced by the peptide. It is known that both levels and degree of PLB phosphorylation enhance Ca²⁺ transients, contractility and relaxation via a modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2a)-mediated SR

Ca²⁺ uptake, and an enhancement of ryanodine receptors-mediated SR Ca²⁺ release [30].

GLP-2 as an anti-adrenergic peptide

We observed that GLP-2 competitively counteracts Iso-dependent stimulation. Other negative inotropic peptides, such as the hippocampal cholinergic neurostimulating peptide [18] and the chromogranin-A-derived fragments, that is, vasostatins and catestatin, act in a non-competitive manner to counteract adrenergic stimulation [31]. Presently, we cannot explain the mechanisms underlying GLP-2 effect on Iso-dependent action. Changes in the ratio of intracellular modulators (i.e., cAMP/cGMP) may relate to this [32]. Moreover, receptor-receptor interactions between β -adrenergic receptors and GLP-2R may occur at the plasma membrane. Clustering of G-protein-coupled receptors in aggregates or receptor mosaics results in the reciprocal modulation of their binding characteristics and downstream pathways, their co-operativity playing a role in decoding signal transduction [33].

In conclusion, we demonstrated that the heart expresses functional receptors for GLP-2 whose activation affect

basal inotropic and lusitropic performance, also competitively counteracting β -adrenergic cardiostimulation. These results, by extending to the heart the GPL-2 sensitivity, may contribute to change the current view concerning the intestine-specific effects of the peptide. This is of relevance in view of the large application of GLP-2-based therapies in many GI diseases [2].

Acknowledgement

This work was supported by the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca of Italy (Programma di Ricerca Scientifica di Interesse Nazionale: M. C. Cerra, D. Pellegrino, S. Imbrogno, F. Mulè; MURST 60%: M. C. Cerra), the 'Dottorato di Ricerca in Biologia Animale' (T. Pasqua), 'Fondazione Cassa di Risparmio di Calabria e Lucania', Research project: 'Cuore-cervello: nuovi orizzonti biomedici nello studio di neuropeptidi ad attività cardiovascolare' (M.C. Cerra, T. Angelone) and by the 'Dottorato di Fisiologia' University of Turin, the 'Istituto Nazionale di Ricerca Cardiovascolare' and 'Compagnia San Paolo', Italy (A.M. Quintieri).

References

- [1] Drucker DJ. Glucagon-like peptides. *Diabetes* 1998;47:159–69.
- [2] Dubé PE, Forse CL, Bahrami J, Brubaker PL. The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* 2006;131:589–605.
- [3] Schjoldager BT, Mortensen PE, Christiansen J, Orskov C, Holst JJ. GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Dig Dis Sci* 1989;34:703–8.
- [4] Dube PE, Brubaker PL. Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E460–5.
- [5] Xiao Q, Boushey RP, Drucker DJ, Brubaker PL. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* 1999;117:99–105.
- [6] Scott RB, Kirk D, MacNaughton WK, Meddings JB. GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat. *Am J Physiol* 1998;275:G911–21.
- [7] Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F, Vyas TB, Rizkalla G, Wang H, et al. Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1569–73.
- [8] Yusta B, Boushey RP, Drucker DJ. The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem* 2000;275:35345–52.
- [9] Hoossein NM, Gurd RS. Human glucagon-like peptides 1 and 2 activate rat brain adenylate cyclase. *FEBS Lett* 1984;178:83–6.
- [10] Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Romer J, Vrang N. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med* 2000;6:802–7.
- [11] Lovshin J, Estall J, Yusta B, Brown TJ, Drucker DJ. Glucagon-like peptide (GLP)-2 action in the Murine central nervous system is enhanced by elimination of GLP-1 receptor signaling. *J Biol Chem* 2001;276:21489–99.
- [12] Yamamoto H, Lee CE, Marcus JN, Williams TD, Overton JM, Lopez ME, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest* 2002;110:43–52.
- [13] Zhao T, Parikh P, Bhashyam S, Bolukoglu H, Poornima I, Shen YT, et al. Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:1106–13.
- [14] Grieve DJ, Cassidy RS, Green BD. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *Br J Pharmacol* 2009;157(8):1340–51.
- [15] Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 1996;137:2968–78.
- [16] Guan X, Stoll B, Lu X, Tappenden KA, Holst JJ, Hartmann B, et al. GLP-2-mediated up-regulation of intestinal blood flow and glucose uptake is nitric oxide-dependent in TPN-fed piglets 1. *Gastroenterology* 2003;125:136–47.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [18] Angelone T, Goumon Y, Cerra MC, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Tota B. The emerging cardioinhibitory role of the hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP). *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318:336–44.
- [19] Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1880–99.
- [20] Nelson DW, Sharp JW, Brownfield MS, Raybould HE, Ney DM. Localization and activation of GLP-2 receptors on vagal afferents in the rat. *Endocrinology* 2007;148(5):1954–62.
- [21] Brubaker PL, Crivici A, Izzo A, Ehrlich P, Tsai CH, Drucker DJ. Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology* 1997;138(11):4837–43.
- [22] Bremholm L, Hornum M, Andersen UB, Holst JJ. The effect of glucagon-like peptide-2 on arterial blood flow and cardiac parameters. *Regul Pept* 2010;159(1–3):67–71.
- [23] Walsh NA, Yusta B, DaCampa MP, Anini Y, Drucker DJ, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa. *Endocrinology* 2003;144:4385–92.
- [24] Shin ED, Estall JL, Izzo A, Drucker DJ, Brubaker PL. Mucosal adaptation to enteral nutrients is dependent on the physiological actions of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* 2005;128:1340–53.
- [25] Koehler JA, Yusta B, Drucker DJ. The HeLa cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways. *Mol Endocrinol* 2005;19:459–73.
- [26] Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, et al. Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res* 2000;90(1):13–8.
- [27] Clerk A, Sugden PH. Signaling through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in cardiac myocytes. *Biochem Cell Biol* 2004;82(6):603–9.
- [28] Filice E, Recchia AG, Pellegrino D, Angelone T, Maggiolini M, Cerra MC. A new membrane G-protein coupled (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17 beta-estradiol in the male rat. *J Physiol Pharmacol* 2009;60(4):3–10.
- [29] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448–60.
- [30] Ginsburg KS, Bers DM. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled

- 1041 SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. *J Physiol* 2004;556:
1042 463–80. 1049
- 1043 [31] Cerra MC, Gallo MP, Angelone T, Quintieri AM, Pulerà E, 1050
1044 Filice E, et al. The homologous rat chromogranin A1-64 1051
1045 (rCGA1-64) modulates myocardial and coronary function in rat 1052
1046 heart to counteract adrenergic stimulation indirectly via 1053
1047 endothelium-derived nitric oxide. *FASEB J* 2008;22(11): 1054
1048 3992–4004. 1055
- [32] Casadei B, Sears CE. Nitric-oxide-mediated regulation of 1056
cardiac contractility and stretch responses. *Prog Biophys Mol*
Biol 2003;82(1–3):67–80.
- [33] Agnati LF, Tarakanov AO, Ferré S, Fuxe K, Guidolin D.
Receptor-receptor interactions, receptor mosaics, and basic
principles of molecular network organization: possible impli-
cations for drug development. *J Mol Neurosci* 2005;26(2–3):
193–208.

UNCORRECTED PROOF

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcdNutrition,
Metabolism &
Cardiovascular Diseases

Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols

T. Angelone^{a,*}, T. Pasqua^a, D. Di Majo^c, A.M. Quintieri^b, E. Filice^b,
N. Amodio^d, B. Tota^a, M. Giammanco^c, M.C. Cerra^{a,b}

^a Lab of Cardiovascular Pathophysiology, Dept of Cell Biology, University of Calabria, 87030 Arcavacata di Rende (CS), Italy

^b Dept. of Pharmaco-Biology, University of Calabria, 87030 Arcavacata di Rende (CS), Italy

^c Dept. of Medicine, Pneumology, Physiology and Human Nutrition, University of Palermo, Palermo, Italy

^d Dept. of Experimental and Clinical Medicine, University of Catanzaro Magna Græcia, Catanzaro, Italy

Received 29 July 2009; received in revised form 29 September 2009; accepted 19 October 2009

KEYWORDS

Quercetin;
Myricetin;
Myocardial contractility;
Vasoreactivity;
Nitric oxide

Abstract *Background and Aims:* Moderate red wine consumption associates with lower incidence of cardiovascular diseases. Attention to the source of this cardioprotection was focused on flavonoids, the non-alcoholic component of the red wine, whose intake inversely correlates with adverse cardiovascular events.

We analysed whether two red wine flavonoids, quercetin and myricetin, affect mammalian basal myocardial and coronary function.

Methods and results: Quercetin and myricetin effects were evaluated on isolated and Langendorff perfused rat hearts under both basal conditions and α - and β -adrenergic stimulation. The intracellular signalling involved in the effects of these flavonoids was analysed on perfused hearts and by western blotting on cardiac and HUVEC extracts. Quercetin induced biphasic inotropic and lusitropic effects, positive at lower concentrations and negative at higher concentrations. Contrarily, Myricetin elicits coronary dilation, without affecting contractility and relaxation. Simultaneous administration of the two flavonoids only induced vasodilation. Quercetin-elicited positive inotropism and lusitropism depend on β 1/ β 2-adrenergic receptors and associate with increased intracellular cAMP, while the negative inotropism and lusitropism observed at higher concentrations were α -adrenergic-dependent. NOS inhibition abolished Myricetin-elicited vasodilation, also inducing Akt, ERK1/2 and eNOS phosphorylation in both ventricles and HUVEC. Myricetin-dependent vasodilation increases intracellular cGMP and is abolished by triton X-100.

* Corresponding author. Tel./fax: +39 (0)984492906.

E-mail address: t.angelone@unical.it (T. Angelone).

Conclusions: The cardiomodulation elicited on basal mechanical performance by quercetin and the selective vasodilation induced by myricetin point to these flavonoids as potent cardioactive principles, able to protect the heart in the presence of cardiovascular diseases.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Flavonoids are present in fruits, vegetables, nuts and plant-derived beverages such as tea and wine. Most flavonoids share a common three-ring structure in which two are aromatic rings and one is heterocyclic [1]. Quercetin and myricetin, two flavonoids belonging to the flavonol class, are important dietary constituents. Quercetin is significantly present (70% of flavonoids daily intake) in the human diet, being contained in green tea, onions, apple skin and red wine [1,2]. Contrarily, myricetin, a constituent of blackcurrants, red wine and grape juice, etc, is less consumed [3].

Flavonoids inhibit platelet aggregation, scavenge free radicals, prevent cell proliferation and reduce levels of plasma low-density lipoproteins [4]. Some flavonoids produce concentration-dependent relaxation responses in contracted arterial rings [5]. Accordingly, there is a growing interest in their use for treating cardiovascular diseases. Quercetin possesses vasodilator activities [6]. Indeed, chronic oral treatment with quercetin protects against impaired vascular endothelial function in various experimental hypertensive models [7]. Quercetin exposure improves endothelium-dependent vascular relaxation and reduces α 1-adrenoceptors (ARs) mediated contractions of isolated spontaneously hypertensive rat (SHR) aorta. These effects probably depend on endothelial nitric oxide (NO) protection [7]. In *in vivo* studies on SHR, orally administered quercetin reduces blood pressure, and cardiac and renal hypertrophy, presumably thanks to its antioxidant properties [8]. Also myricetin has several therapeutic applications, such as anticancer [9], antiviral and antimicrobial [10], platelet antiaggregatory [11], antioxidant [12] and cytoprotective [13]. In rats, myricetin inhibits the Isoproterenol(Iso)-induced cardiotoxicity and possesses a significant therapeutic value in myocardial infarction prophylaxis [14].

Except for this promising information, nothing is known regarding the effects directly elicited by quercetin and myricetin on myocardial contractility and relaxation.

We investigated whether these flavonoids affect the basal inotropic, lusitropic and coronary performance of the mammalian heart. For this purpose, we utilized the isolated and Langendorff perfused rat heart preparation. Since quercetin and myricetin often associate in foods, cardiac performance was evaluated in the presence of the two flavonols administered both alone and in combination. We also evaluated the signal transduction pathways involved in their cardiac effects.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (Harlan Laboratories s.r.l. Udine, Italy) weighing 180–240 g were housed in a ventilated cage rack

system under standard conditions. Animals had food and water access *ad libitum*. Animal care, sacrifice and experiments were supervised according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Isolated Langendorff heart preparation

Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ethyl carbamate (2 g/kg rat, i.p.) and the hearts, rapidly excised, were immediately cannulated at the aorta and connected to the Langendorff apparatus to start perfusion with buffered Krebs–Henseleit solution (KHs) at constant flow rate (12 mL/min) [15]. A water-filled latex balloon, connected to a BLPR gauge (BLPR, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), was inserted through the mitral valve into the left ventricle to allow isovolumic contractions and to continuously record mechanical parameters. Another pressure transducer located just above the aorta recorded coronary pressure (CP). The perfusion solution consisted of a modified non-re-circulating KHs containing (in mmol/L) NaCl 113, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, mannitol 1.1, Na-pyruvate 5 (pH 7.4; 37 °C; 95% O₂–5% CO₂). Haemodynamic parameters were assessed using a PowerLab data acquisition system and analysed using a Chart software (both from ADInstruments, Basile, Italy).

Basal conditions

Cardiac performance was evaluated for inotropism by analyzing the left ventricular pressure (LVP, in mmHg) (index of contractility), the rate–pressure product (RPP) (index of cardiac work), the maximal value of the first derivative of LVP [$+(LVdP/dt)_{max}$] (mmHg/s) (index of the maximal rate of left ventricular contraction), Ttp (Time to Peak Tension of isometric twitch), and for lusitropism by analyzing the maximal rate of left ventricular pressure decline of LVP [$-(LVdP/dt)_{max}$] (mmHg/s), the half time relaxation (HTR) (s) (time required for tension to fall from the peak to 50%) and $T/-t$ ratio obtained by $+(LVdP/dt)_{max}/-(LVdP/dt)_{max}$. Mean CP (mmHg) was the average of values obtained during several cardiac cycles [15].

Quercetin and myricetin stimulated preparations: Preliminary experiments (data not shown) obtained by repetitive exposure of each heart to one concentration of either quercetin or myricetin (10^{-9} mol/L) revealed no desensitization. Thus, concentration–response curves were generated by perfusing the hearts with KHs plus increasing concentrations of either quercetin or myricetin (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) for 10 min.

Involvement of adrenergic and cholinergic receptors: Hearts were perfused with KHs enriched with the specific

drug before and after quercetin addition. The antagonist concentration was based on preliminary dose–response curves as the first dose which does not significantly affect heart performance.

To verify the involvement of adrenergic and cholinergic receptors in the mechanism of action of quercetin, dose–response curves were produced by perfusing the hearts with KHs enriched with increasing concentrations of quercetin (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L), plus a single concentration of either nadolol (10^{-7} mol/L) or phentolamine (10^{-7} mol/L) or atropine (10^{-7} mol/L), β_1/β_2 -ARs, α -ARs, muscarinic receptors selective antagonists, respectively.

Nitric oxide involvement: The involvement of NO on the myricetin vascular action was evaluated by dose–response curves produced by perfusing the hearts with KHs enriched with increasing concentrations of myricetin (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) plus a single concentration of L-NMMA (10^{-5} mol/L), NOS inhibitor.

Endothelial involvement: To evaluate the involvement of the coronary vascular endothelium, coronary artery endothelial dysfunction was achieved by a brief perfusion with triton X-100 (1:200 dilution) administered after 30 min of equilibration. Triton X-100 infusion was equivalent to 1% of the flow rate delivered into the KH buffer immediately above the aorta for 1 s [16,17]. Subsequently, hearts were perfused for 25 min with normal KHs before the coronary actions of myricetin were examined as described above.

cGMP and cAMP measurements: Extracts of frozen heart tissue obtained after perfusion with a single concentration of quercetin (10^{-6} mol/L) or myricetin (10^{-9} mol/L) were used for cGMP and cAMP determinations (200–300 mg). Homogenates were treated with 6% trichloroacetic acid at 0 °C and centrifuged at 10,000g for 10 min. The supernatant was extracted three times with 3 mL of diethyl ether saturated with water, and the aqueous phase was collected and stored at –80 °C. cGMP and cAMP concentrations were measured using a commercial enzyme immunoassay (Bio-track Enzyme immunoassay (EIA) System; Amersham Biosciences).

Western blotting: HUVEC cells were bought from ATCC and grown in EGM-2 endothelium supplemented medium (Lonza) containing penicillin and streptomycin at 37 °C and 5% CO₂. Early passage HUVEC cells were treated with myricetin (10^{-6} mol/L and 10^{-9} mol/L) and with myricetin (10^{-6} mol/L) plus L-NIO (10^{-7} mol/L) and then collected, PBS-washed twice and lysed in ice-cold RIPA buffer. Ventricles obtained after perfusion with a single concentration of quercetin (10^{-6} mol/L) or Myricetin (10^{-9} mol/L) were homogenized in ice-cold RIPA buffer (Sigma–Aldrich, Milan, Italy) containing a mixture of protease inhibitors (1 mmol/L aprotinin, 20 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride and 200 mmol/L sodium orthovanadate). Then homogenates were centrifuged at 200g for 10 min at 4 °C to remove debris. Protein concentration was determined using Bradford reagent (Sigma–Aldrich). Equal amounts of whole protein extract were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Milan, Italy), probed overnight at 4 °C with antibodies against p-eNOS, p-ERK1/2 and p-Akt (Santa-Cruz Biotechnology, DBA, Italy), and then revealed using the Enhanced Chemiluminescence system (GE Healthcare, Milan, Italy).

Solutions and drugs

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone); myricetin (3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone); nadolol; phentolamine; atropine; N^G-monomethyl-arginine (L-NMMA); selective eNOS inhibitor, N⁵-(1-imino-3-butenyl)-L-ornithine (L-NIO); triton X-100 were purchased from Sigma Chemical Co. (Sigma–Aldrich, Milan, Italy). All solutions were prepared in double-distilled water; quercetin was prepared in small amounts of NaOH solution (50 mg/mL), nadolol in methanol. Stock solutions of each drug were obtained by adding double-distilled water; dilutions were made in KHs immediately before use.

Preliminary experiments showed that equivalent amounts of NaOH and methanol in KHs without drugs unchanged basal cardiac performance.

Statistics

Data are the mean \pm SEM. Since each heart represents its own control, the statistical significance of differences within-group was assessed using the ANOVA test ($p < 0.05$). Comparison between groups was made by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni correction for post hoc *t*-tests. Differences were considered to be statistically significant for $p < 0.05$.

Results

Basal conditions: After 20 min of stabilization, the following basal recordings were measured: LVP = 89 ± 3 mmHg, heart rate = 280 ± 7 beats/min, RPP = $2.5 \pm 0.1 \times 10^4$ mmHg beats/min, CP = 63 ± 3 mmHg, $+(LVdP/dT)_{max} = 2492 \pm 129$ (mmHg/s), Ttp = 0.08 ± 0.01 (s), $-(LVdP/dT)_{max} = -1663 \pm 70$ (mmHg/s), HTR = 0.05 ± 0.01 (s) and $T/-t$ or $+(LVdP/dT)_{max}/-(LVdP/dT)_{max} = -1.49 \pm 1.84$ (mmHg/s). Endurance and stability of the preparation, analysed by measuring performance variables every 10 min, showed stability for up to 180 min.

Inotropic, lusitropic and coronary actions

Quercetin: Quercetin effects on basal cardiac performance were evaluated by exposing heart preparations to increasing concentrations of quercetin to generate concentration–response curves. Since quercetin effects remained stable until 15–20 min, cardiac parameters were measured at 10 min.

Quercetin caused: i) concentration-dependent biphasic inotropic and lusitropic effects, shown by significant increased LVP, RPP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$, from 10^{-11} mol/L to 10^{-8} mol/L; ii) a significant decrease of LVP, RPP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$ at 10^{-7} mol/L and 10^{-6} mol/L; iii) no effect on HTR and $T/-t$; iv) a non significant increase of CP (Fig. 1).

Myricetin: Myricetin effects on basal cardiac performance were evaluated by exposing heart preparations to increasing concentrations of myricetin to generate concentration–response curves. Since the effects of myricetin remained stable until 15–20 min, cardiac parameters were measured at 10 min.

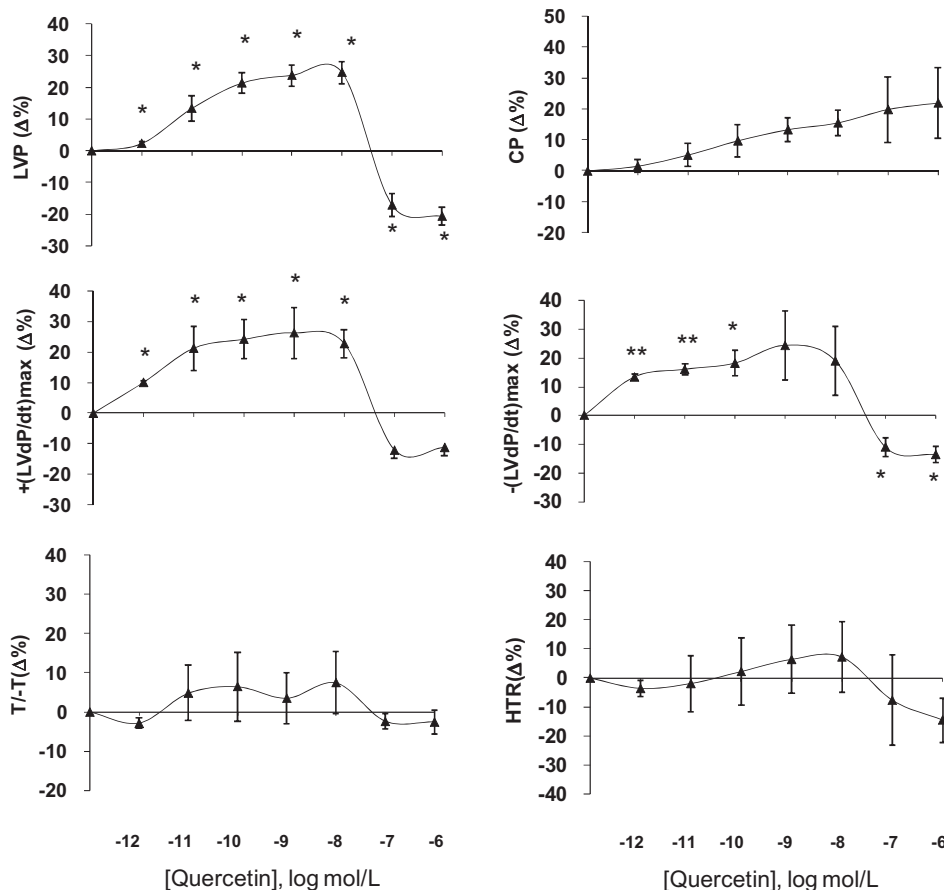


Figure 1 Isolated Langendorff heart: Concentration-dependent response curves of quercetin (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) on LVP, CP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$, HTR, $T/-t$. For abbreviations and basal values see Section 2. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments. Significance of difference from control values was done by one-way ANOVA: * = $p < 0.05$.

Myricetin unchanged inotropic and lusitropic parameters while inducing a dose-dependent coronary dilation at the lowest concentrations tested (Fig. 2).

Inotropic, lusitropic and coronary actions of quercetin and myricetin co-administration: Possible synergic and/or additive and/or antagonistic effects of quercetin and myricetin were evaluated by exposing rat cardiac preparations to increasing concentrations of a mixture of quercetin and myricetin to generate concentration–response curves. Co-administration of the two flavonols did not change cardiac contractile and relaxing performance while inducing a significant vasodilation starting from 10^{-10} mol/L (Fig. 3).

Involvement of adrenergic and cholinergic receptors in quercetin-dependent effects: Nadolol (10^{-7} mol/L), β_1/β_2 -ARs antagonist, abolished the positive inotropism and lusitropism on LVP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$ but unchanged the negative inotropism and lusitropism observed at higher concentration. It did not affect CP (Fig. 4A). Phentolamine (10^{-7} mol/L), α -ARs antagonist, abolished the negative inotropism and lusitropism on LVP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$ at higher concentrations tested as well as the coronary constriction (Fig. 4B).

To verify the involvement of cholinergic receptors, hearts were perfused with atropine (10^{-7} mol/L), non-selective antagonist of muscarinic receptors, in the presence of increasing concentrations of quercetin. Atropine did not change the inotropic and lusitropic effects induced by quercetin (data not shown).

Nitric oxide involvement in the myricetin-dependent mechanisms: NO signalling in the myricetin-dependent effect was examined by perfusing the hearts with L-NMMA, a selective NOS inhibitor. Under basal conditions, L-NMMA (10^{-5} mol/L) alone reduced LVP of $-5.13 \pm 2.48\%$, a variation which was not significantly different from control. L-NMMA abolished the myricetin-mediated vasodilation at all concentrations tested (Fig. 5A).

Endothelial involvement in the myricetin-dependent mechanisms: The involvement of vascular endothelium in the myricetin-dependent vasodilation was examined after endothelial inactivation by triton X-100 [16]. The detergent abolished the myricetin-dependent vasodilation (Fig. 5B).

Effects of quercetin and myricetin on cGMP and cAMP in whole hearts extracts: cGMP and cAMP content was measured on cardiac extracts after treatment with quercetin and myricetin. cGMP levels were increased by

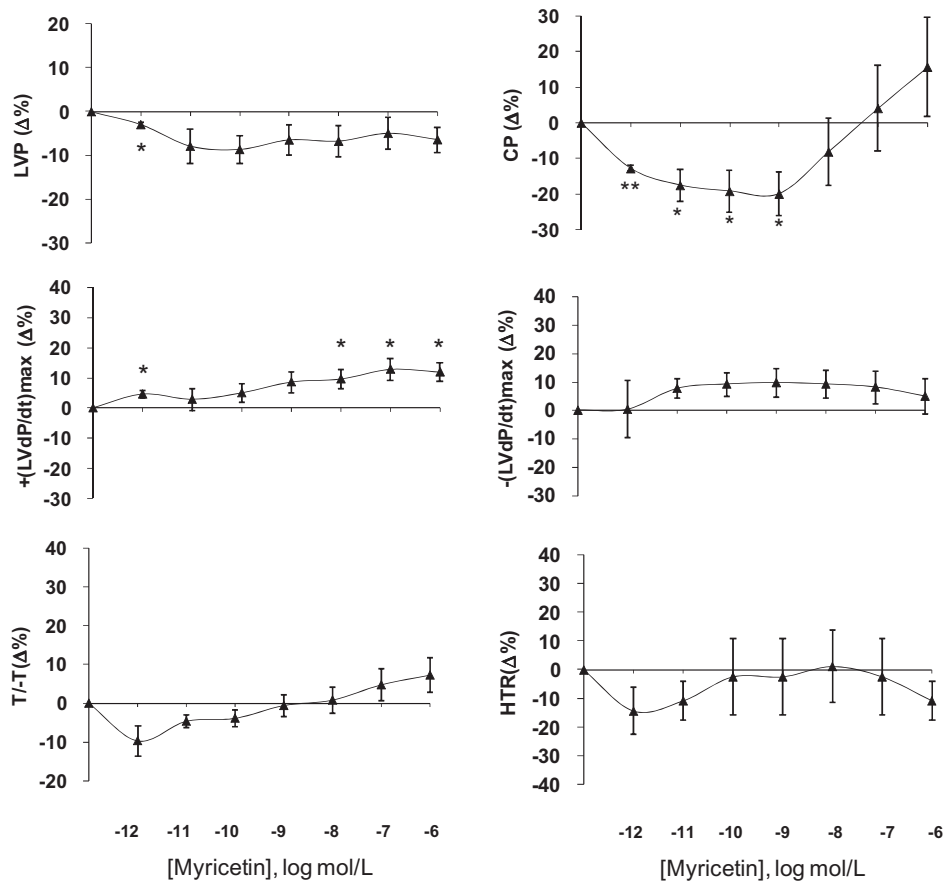


Figure 2 Isolated Langendorff heart: Concentration-dependent response curves of myricetin (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) on LVP, CP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$, HTR, $T/-t$. For abbreviations and basal values see Section 2. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments. Significance of difference from control values was done by one-way ANOVA: * = $p < 0.05$.

myricetin (10^{-9} mol/L) and unchanged by quercetin (10^{-8} mol/L). Contrarily, only quercetin increased cAMP intracellular levels (Fig. 5C and D).

p-Akt, p-eNOS, p-ERK1/2 expression in cardiac ventricle and HUVEC: Akt–eNOS–ERK phosphorylation was analysed in both perfused hearts and HUVEC treated with either quercetin or myricetin. Myricetin (10^{-9} mol/L and 10^{-6} mol/L) elicits eNOS phosphorylation in both perfused hearts and HUVEC (Fig. 5E and F), and Akt and ERK1/2 phosphorylation in perfused hearts (Fig. 5G and H). Contrarily, Quercetin (10^{-6} mol/L) did not induce eNOS phosphorylation (Fig. 5E).

Discussion

Quercetin and myricetin effects on myocardium and coronary reactivity

In this study we demonstrate that quercetin and myricetin, two flavonols present in various foods, including red wine [3], importantly affect myocardial and coronary performance, showing dissimilar effects and mechanisms of action. On the isolated and Langendorff perfused rat heart

quercetin induces a biphasic inotropism and lusitropism: positive at lower concentrations, and negative at higher concentrations, while it constricts coronaries. Contrarily, myricetin does not change both contractile and relaxing performance, but it strongly dilates the coronaries, being effective starting from low concentrations (10^{-12} mol/L). Notably, the flavonols' concentrations which affect heart performance are within the same range of the plasma flavonol levels on habitual diets (from 0 to 43.7 ng/mL).

The quercetin-induced hormetic effect on myocardial performance agrees with the biphasic influence elicited on other experimental system, such as degenerating retinal pigmental epithelial cells in which dietary quercetin exerts the strongest protection at lower concentrations and a lower protection at higher concentrations [17]. Although quercetin was already shown to be cardioactive, being positive chronotropic on guinea-pig pacemakers [18] and positive inotropic on guinea-pig papillary muscles [19], we are the first to describe the acute effects of this flavonol on a whole mammalian heart.

It is normally assumed that the vascular effects of quercetin consist of a vasorelaxation of precontracted vessels [6,20]. In our cardiac preparations, high concentrations of this flavonol contract the unstimulated coronary

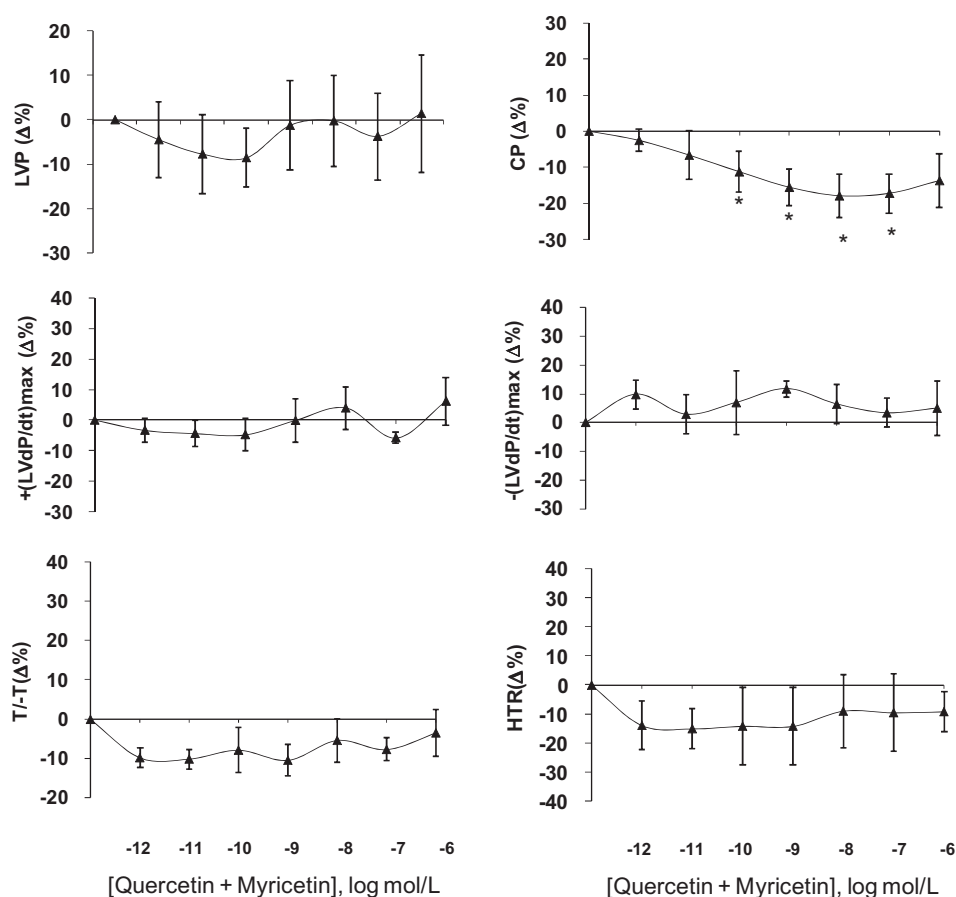


Figure 3 Isolated Langendorff heart: Concentration-dependent response curves of quercetin and myricetin co-administration (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) on LVP, CP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$, HTR, $T/-t$. For abbreviations and basal values see Section 2. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments. Significance of difference from control values was done by one-way ANOVA: * = $p < 0.05$.

vasculature. These differences may be explained by either a district-specific effect (i.e. coronaries vs aorta or uterine vessels) [6] or by the functional state of the vessels (unstimulated vs precontracted). However, the involvement of α -ARs cannot be excluded since quercetin-dependent vasoconstriction disappears in the presence of phentolamine.

Different from quercetin, myricetin acts as a potent selective coronary dilator without myocardial effects. This coronary modulation may be of great importance in relation to cardioprotection. As shown on contracted arterial rings [5], a major part of the flavonoids concentration-dependent relaxation is directly attained on vascular smooth muscle [6,21]. Several molecular features of myricetin account for this notable vasodilatory ability, the 5 and 7 hydroxyl groups in the B ring, the 4' hydroxyl group in the A ring, and the double bond at 2, 3 in the C ring being the essential substituent groups for a good relaxation activity [22].

Notably, the coronary dilation persists if quercetin and myricetin are co-administered, although the other cardiac parameters remain unchanged. This indicates that the myricetin-dependent coronary effect dominates on the cardiomodulation elicited by quercetin. This is of particular relevance since these two flavonols are frequently assumed

together with the diet, being associated in many flavonoid-rich foods [3].

Quercetin-dependent signalling

Analysis of the mechanism of action responsible for the quercetin-elicited cardiotropism indicated an involvement of β_1/β_2 -ARs, α -ARs, cAMP. Quercetin-induced positive inotropism and lusitropism, being abolished by nadolol, appear to require β_1/β_2 -ARs. Contrarily, in the presence of phentolamine, the negative inotropism and lusitropism observed at high quercetin concentrations disappear, indicating their dependence by α -ARs. These results suggest for quercetin a double interaction with α - and β -ARs, as already reported [23,24]. In fact, the catechol structure of the ring A and the hydroxyl group at position 3, which correspond to the hydroxyl group at β -carbon of catecholamines [25], may account for this interaction.

The quercetin-induced positive inotropism is accompanied by an increase of cAMP levels, strengthening the involvement of the β -ARs-cAMP signalling. Alternatively, and/or additionally, as suggested by Bhansali and co-workers [24], quercetin positive inotropism may require the

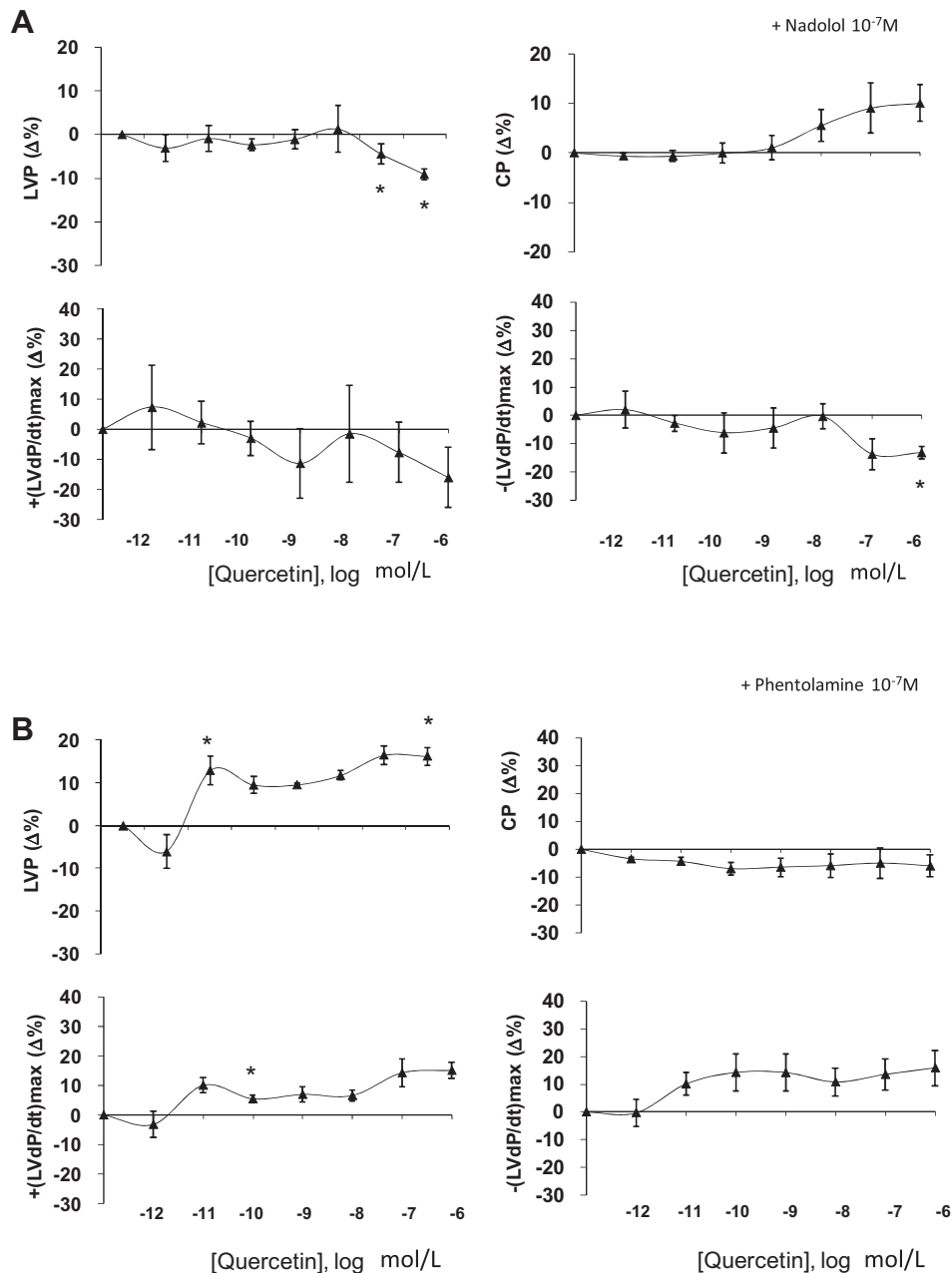


Figure 4 Isolated Langendorff heart: Concentration-dependent responses of quercetin (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) plus nadolol (10^{-7} mol/L) (A) or phentolamine (10^{-7} mol/L) (B) on LVP, CP, $+(LVdP/dt)_{max}$ and $-(LVdP/dt)_{max}$. For abbreviations and basal values see Section 2. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments for each group. Significance of difference from control values was done by one-way ANOVA: * = $p < 0.05$.

inhibition of Na^+/K^+ -ATPase, like in the case of cardiac glycosides (Fig. 6).

Myricetin-dependent signalling

The signalling associated with the selective myricetin-induced vasorelaxation was analysed on isolated rat hearts and HUVEC. In the heart, myricetin-dependent coronary dilation was blocked by both eNOS inhibition and triton X-100 and positively correlates with intracellular cGMP. Mammalian cardiac NOS–NO–cGMP system is a key mediator

of intracardiac signalling which controls vasodilation as well as the myocardial performance. eNOS is expressed in endothelial cells and releases NO which targets soluble GC, negatively affecting smooth muscle and inducing relaxation [26]. Our experiments on both cardiac and HUVEC extracts suggest that myricetin induces PI3K-Akt/NOS and ERK1/2 phosphorylation, agreeing with the Akt-dependent NOS phosphorylation observed by Westermann and co-workers [27]. Active phosphorylated eNOS generates NO which strongly contributes to vasorelaxation. The involvement of the endothelial-derived NO in flavonol-dependent

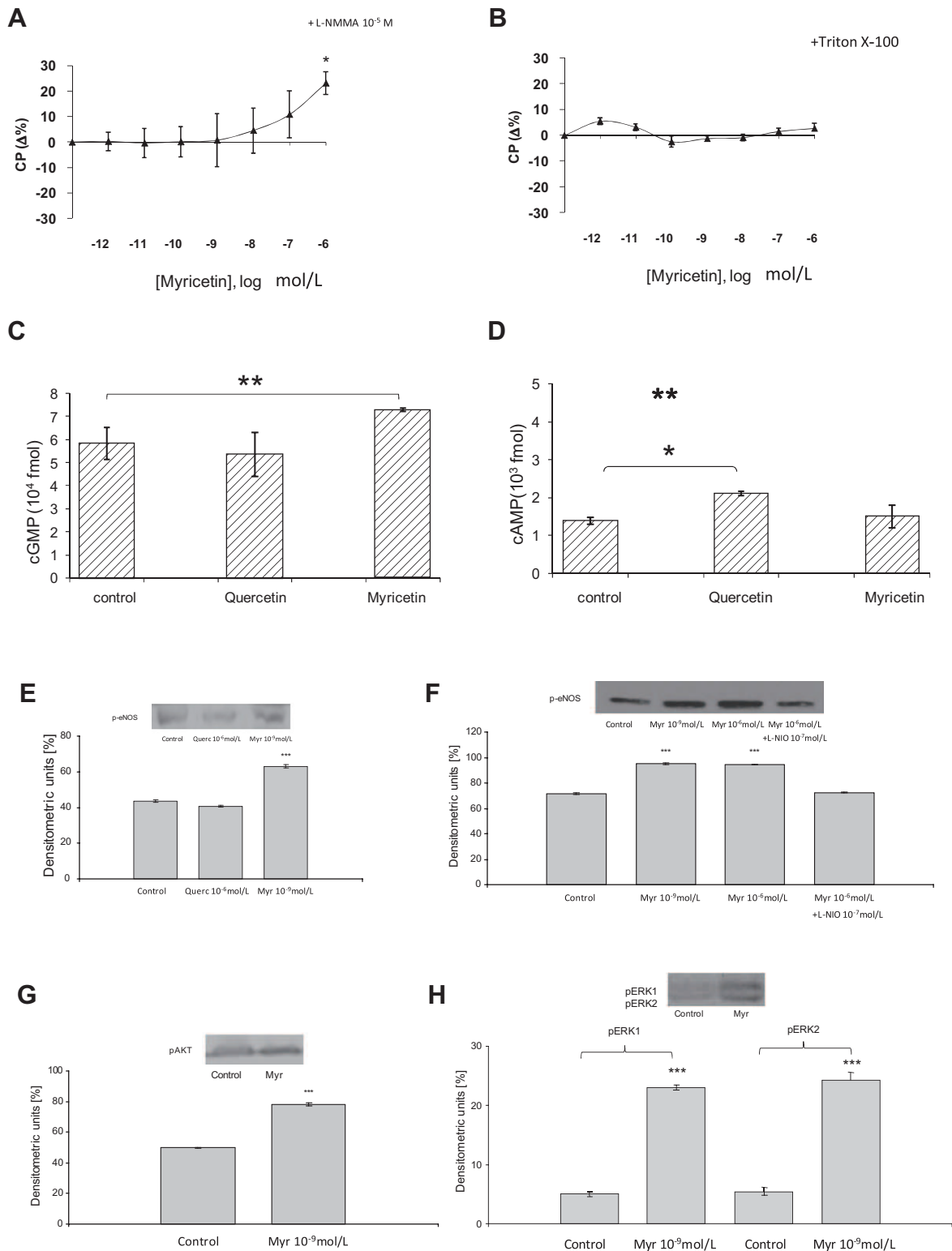


Figure 5 *Isolated Langendorff heart*: Concentration-dependent responses of myricetin (from 10^{-12} to 10^{-6} mol/L) plus L-NMMA (10^{-5} mol/L) (A) or triton X-100 (B) on CP. For abbreviations and basal values see Section 2. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments for each group. Significance of difference from control values (ANOVA); * = $p < 0.05$. *Extracts of whole rat hearts*: cGMP and cAMP concentrations in heart extracts ($n = 8$). Open columns (Control; filled columns (cGMP)) (plus quercetin 10^{-8} mol/L or myricetin 10^{-9} mol/L) (C), filled columns (cAMP) (Control and plus quercetin 10^{-8} mol/L or myricetin 10^{-9} mol/L) (D). *p-Akt, p-eNOS, p-ERK1/2 expression in cardiac ventricle and HUVEC*: Panel E: representative western blot experiment showing that myricetin (10^{-9} mol/L), but not quercetin (10^{-6} mol/L), increases P-Ser1179eNOS expression in cardiac ventricle. Panel F: representative western blot experiment showing that P-Ser1179eNOS expression is increased by myricetin (10^{-6} mol/L and 10^{-9} mol/L) and is strongly reduced by L-NIO (10^{-7} mol/L) in HUVEC. Panels G and H: representative western blot experiment showing that P-AKT and P-ERK1/2 expression is increased by myricetin (10^{-6} mol/L) in cardiac ventricle. Comparison between groups (one-way ANOVA): * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

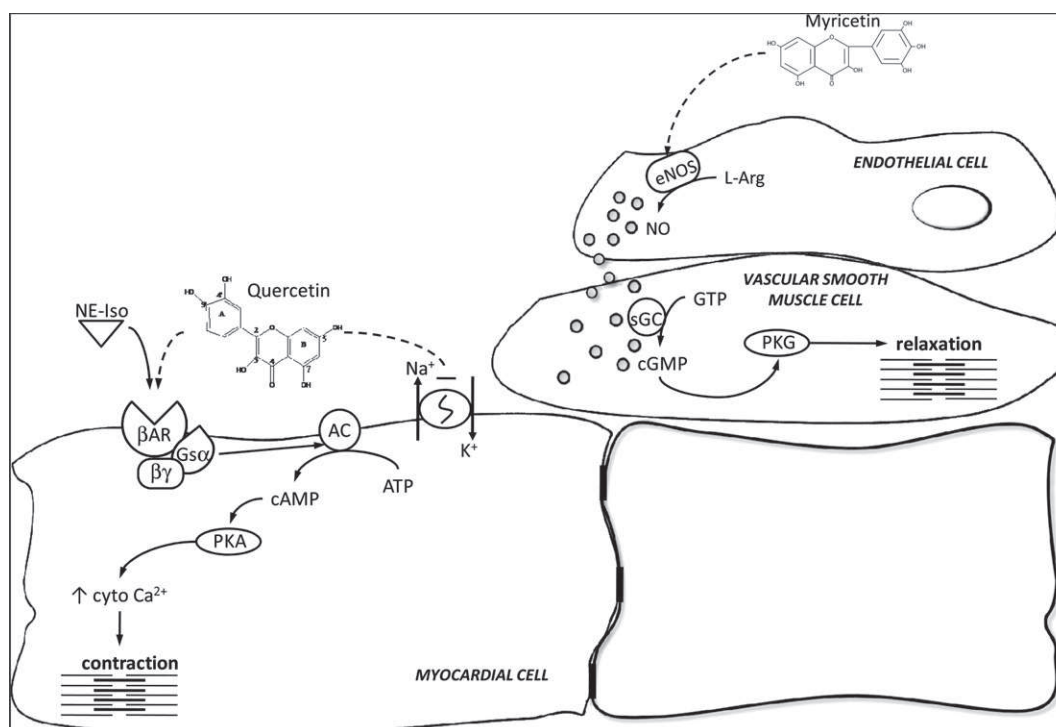


Figure 6 Representative scheme showing the proposed intracellular signalling of quercetin and myricetin in the rat heart.

vasorelaxation is well known [3,21]. Presumably, the 3-hydroxyl group in the ring C of flavonols is required for the endothelium-dependent component of flavonol relaxation [28] (Fig. 6).

Conclusions

This study provides evidence that quercetin and myricetin are potent cardiovascular principles in the rat heart with selective effects on both myocardium and coronaries. The myricetin-dependent coronary action is stronger than the quercetin-induced myocardial effect, since it persists when the two flavonols are co-administered. Our observations are in line with the reduced risk of cardiovascular disease induced by moderate consumption of red wine [29]. Hopefully, increased knowledge on the physio-pathological significance of these flavonols, particularly in relation to myocardial and coronary protection, may pave the way for medically oriented research.

Acknowledgment

This work was supported by "Fondazione Cassa di Risparmio di Calabria e Lucania" (B. Tota, M.C. Cerra, T. Angelone), the "Istituto Nazionale di Ricerca Cardiovascolare" (INRC) Italy (A.M. Quintieri) and by the Italian Ministry of University and Research (MURST ex 60%: M.C. Cerra and B. Tota).

Conflict of Interest

None declared.

References

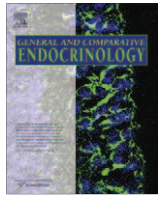
- [1] Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:2073–85.
- [2] de Vries JH, Janssen PL, Hollman PC, van Staveren WA, Katan MB. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett* 1997;114: 141–4.
- [3] Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992;40:2379–83.
- [4] Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33:1061–80.
- [5] Fusi F, Saponara S, Pessina F, Gorelli B, Sgaragli G. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations: a comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *Eur J Nutr* 2003;42:10–7.
- [6] Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006a;33:345–50.
- [7] Machha A, Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovas Pharmacol* 2005;46:36–40.
- [8] Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001;133:117–24.
- [9] Ko CH, Shen SC, Lee TJ, Chen YC. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4:281–90.
- [10] Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barrè-Sinoussi F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem* 1990;190:469–76.

- [11] Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res* 1991;64:91–100.
- [12] Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988;37:837–41.
- [13] Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002;36:1199–208.
- [14] Tiwari R, Mohan M, Kasture S, Maxia A, Ballero M. Cardioprotective potential of Myricetin in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *Phytother Res* 2009 [Epub ahead of print].
- [15] Angelone T, Quintieri AM, Brar BK, Limchaiyawat PT, Tota B, Mahata SK, et al. The antihypertensive chromogranin a peptide catestatin acts as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac inotropism and lusitropism. *Endocrinology* 2008;149:4780–93.
- [16] Kennedy RH, Owings R, Shekhawat N, Joseph J. Acute negative inotropic effects of homocysteine are mediated via the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:812–7.
- [17] Kook D, Wolf AH, Yu AL, Neubauer AS, Priglinger SG, Kampik A, et al. The protective effect of quercetin against oxidative stress in the human RPE in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1712–20.
- [18] Laekeman GM, Glaeys M, Rwangabo PC, Herman AG, Vlietinck AJ. Cardiovascular effects of 3-methylquercetin. *Planta Med* 1986;52:433–7.
- [19] Itoigawa M, Takeya K, Ito C, Furukawa H. Structure–activity relationship of cardiotonic flavonoids in guinea-pig papillary muscle. *J Ethnopharmacol* 1999;65:267–72.
- [20] Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Vaez-Mahdavi MR, Roghani-Dehkordi F. Mechanisms underlying quercetin-induced vasorelaxation in aorta of subchronic diabetic rats: an in vitro study. *Vascul Pharmacol* 2004;42:31–5.
- [21] Zhang YH, Park YS, Kim TJ, Fang LH, Ahn HY, Hong JT, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen Pharmacol* 2000;35:341–7.
- [22] Xu YC, Leung SWS, Yeung DKY, Hu LH, Chen GH, Che CM, et al. Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* 2007;68:1179–88.
- [23] Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2006b;73:1–7.
- [24] Bhansali BB, Subhash V, Goyal RK. Cardiac effects of quercetin on the isolated rabbit and frog heart preparations. *Indian J Pharmacol* 1987;19:100–7.
- [25] Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH, Huang HL. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure–activity relationships. *Biochem Pharmacol* 2004;68:2087–94.
- [26] Shah AM. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1996;31:847–67.
- [27] Westermann D, Riad A, Richter U, Jäger S, Savvatis K, Schuchardt M, et al. Enhancement of the endothelial NO synthase attenuates experimental diastolic heart failure. *Basic Res Cardiol* 2009 [Epub ahead of print].
- [28] Qin CX, Chen X, Hughes RA, Williams SJ, Woodman OL. Understanding the cardioprotective effects of flavonols: discovery of relaxant flavonols without antioxidant activity. *J Med Chem* 2008;51:1874–84.
- [29] Lagrue-Lak-Hal AH, Andriantsitohaina R. Red wine and cardiovascular risks. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2006;99:1230–5.



Contents lists available at ScienceDirect

General and Comparative Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygcenPhysiological evidence for β_3 -adrenoceptor in frog (*Rana esculenta*) heart

Rosa Mazza, Tommaso Angelone, Teresa Pasqua, Alfonsina Gattuso*

Dept. of Cell Biology, University of Calabria, 87036 Arcavacata di Rende (CS), Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2010

Revised 3 August 2010

Accepted 6 August 2010

Available online 13 August 2010

Keywords:

 β_3 Adrenoceptors

Isoproterenol

Nitric oxide

cGMP

PDE2

PKG

ABSTRACT

β_3 -Adrenergic receptors (ARs) have been recently identified in mammalian hearts where, unlike β_1 - and β_2 -ARs, induce cardio-suppressive effects. The aim of this study was to describe β_3 -AR role in the frog (*Rana esculenta*) heart and to examine its signal transduction pathway. The presence of β_3 -AR, by using Western blotting analysis, has been also identified. BRL₃₇₃₄₄, a selective β_3 -AR agonist, induced a dose-dependent negative inotropic effect at concentrations from 10^{-12} to 10^{-6} M. This effect was not modified by nadolol (β_1/β_2 -AR antagonist) and by phentolamine (α -AR antagonist), but it was suppressed by the β_3 -AR-specific antagonist SR₅₉₂₃₀ and by exposure to the Gi/o proteins inhibitor Pertussis Toxin. In addition, the involvement of EE-NOS-cGMP-PKG/PDE2 pathway in the negative inotropism of BRL₃₇₃₄₄ has been assessed. BRL₃₇₃₄₄ treatment induced eNOS and Akt phosphorylation as well as an increase of cGMP levels. β_3 -ARs activation induce a non-competitive antagonism against ISO stimulation which disappeared in presence of PKG and PDE2 inhibition. Taken together our findings provide, for the first time in the frog, a role for β_3 -ARs in the cardiac performance modulation which involves Gi/o protein and occurs via an EE-NO-cGMP-PKG/PDE2 cascade.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The main neuro-humoral mechanism controlling cardiac function is the activation of the adrenergic system by catecholamines. Noradrenaline, mainly released by the sympathetic nerves, and adrenaline, secreted by adrenal glands into the circulation, regulate myocardial contractility by interacting with α - and β -adrenergic receptors (ARs).

The original classification of β -ARs, into β_1 - and β_2 -ARs (Lands et al., 1967), was modified after the discovery of a third subtype (β_3 -AR) primarily found in the adipose tissue where it mediates lipolysis and thermogenesis (Emorine et al., 1989) and, more recently, detected also in mammalian heart, including human, dog, rat, and guinea pig (Gauthier et al., 1996; Cheng et al., 2001; Dinçer et al., 2001; Kitamura et al., 2000).

Concerning the physiological role of β_3 -AR at cardiac level, recent observations reported that in several mammalian species its stimulation, in contrast with β_1 - and β_2 -AR subtypes, marked decreases cardiac contractility (Gauthier et al., 2000, for references) and negatively affects ventricular relaxation (Angelone et al., 2008). All three β -ARs subtypes belong to the G protein-coupled receptors characterized by seven transmembrane domains, but while β_1 - and β_2 -ARs increase intracellular cAMP through Gs proteins stimulation, the β_3 isoform is coupled to Gi proteins (Gauthier et al., 1996). The activation of Gi proteins does not induce

adenylyl cyclase inhibition, but rather an activation of the nitric oxide (NO) pathway, with stimulation of sGC and production of cGMP (Gauthier et al., 1998).

In mammalian hearts, species- and tissue-dependent differences have been observed in response to β_3 -ARs stimulation (Gauthier et al., 2000, for references). For example, while in human ventricle, BRL₃₇₃₄₄ (a selective β_3 -AR agonist) induces a negative inotropic effect through NO signaling (Gauthier et al., 1998), in human atria it stimulates L-type Ca^{2+} channels through a cAMP-dependent pathway. This suggests that, depending on the cellular context, β_3 -ARs can activate stimulatory or inhibitory pathways, by Gs-mediated or Gi/o-mediated mechanisms, respectively (Skeberdis et al., 2008).

In spite of the increasing studies aimed to elucidate the cardiac role of β_3 -AR in mammals, the currently available data in non-mammalian vertebrates are represented by few studies on a limited number of species. Nickerson and co-workers (2003) reported the presence of a β_3 -AR in the heart of the rainbow trout, but its role was not investigated. Another study provided functional evidence in the eel *Anguilla anguilla* heart for a β_3 -AR-dependent negative inotropism (Imbrogno et al., 2006).

In amphibian hearts, the knowledge concerning the role of β_3 -ARs are non-existent apart from a study carried out at single-cell level which reported no stimulation of L-type Ca^{2+} current ($I_{\text{Ca,L}}$) by β_3 -AR agonists in the frog ventricular myocytes (Skeberdis et al., 2008) where the β -adrenergic stimulation of the L-type Ca^{2+} current involved mainly β_2 -AR subtype (Skeberdis et al., 1997). Because contractility is a more integrated response than $I_{\text{Ca,L}}$ amplitude in a single myocyte, it is feasible to suppose that many

* Corresponding author.

E-mail address: a.gattuso@unical.it (A. Gattuso).

other factors will participate in the inotropic response to β 3-AR agonists in an intact organ where functional interactions among its components occur. Thus, since nothing is known in amphibians at whole organ level, we have employed the isolated and perfused heart of the frog *Rana esculenta* to analyse the role of β 3-ARs in the cardiac performance modulation and their putative presence in the ventricular tissue. We have also analysed the β 3-ARs downstream transduction mechanism as well as their involvement in the cardiac response to classical β -adrenergic stimulation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Animal maintenance and experimental procedures, approved by the Italian University Minister, were in accordance with the Guide for the Use and Care of Laboratory Animals (European Communities Council Directive 1986).

Frog hearts ($N = 105$) were isolated from both male and female specimens of *Rana esculenta* and connected to a perfusion apparatus as previously described (Gattuso et al., 1999). Experiments were performed at room temperature (18–20 °C). The hearts were perfused with saline equilibrated with air and composed (in mM) of NaCl: 115, KCl: 2.5, CaCl₂: 1.0, Na₂HPO₄: 2.15, NaH₂PO₄: 0.85, glucose: 5.6. The buffer pH was adjusted to 7.30–7.35 by Na₂HPO₄ addition.

Hemodynamic parameters were measured through two MP-20D pressure transducers (Micron Instruments, Simi Valley, CA, USA) connected to a PowerLab data acquisition system and analysed by using Chart software (ADInstruments, Basile, Italy). Pressures were corrected for cannula resistance. Heart rate (HR) was calculated from pressure recording curves. Cardiac output (CO), collected over 1 min and weighed, was corrected for fluid density and expressed as volume measurement (ml/min) normalized to the wet body weight in kg. Stroke volume (SV, CO/HR) was used as index of inotropism. Ventricular stroke work (SW), an index of systolic functionality, was calculated as (mJ/g) = (afterload – preload, mmHg) \times stroke volume (ml)/ventricle weight (g).

2.2. Drugs and chemicals

[4-[2-[[2-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxy-ethyl]amino]propyl]-phenoxy]acetic acid sodium (BRL₃₇₃₄₄), 3-(2-ethylphenoxy)-1-[[[(1S)-1,2,3,4-tetrahydronaphth-1-yl]amino]-(2S)-2-propanol oxalate salt (SR₅₉₂₃₀), isoproterenol (ISO), nadolol, L-N5-(1-iminoethyl)ornithine (L-NIO), 1H-[1,2,4]oxadiazole-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), KT₅₈₂₃, Pertussis Toxin (PTx), erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All the solutions were prepared in double-distilled water (ODQ and KT₅₈₂₃ were prepared in DMSO); dilutions were made in Ringer's solution immediately before use.

2.3. Protocols

2.3.1. Basal conditions

The minimal output pressure set at 3.92 kPa and the input pressure regulated to obtain a CO of about 110 ml/min/kg (wet body weight) were within the physiological range. Hearts that did not stabilize within 10–15 min from the onset of perfusion were discarded. These parameters were stable for more than 1 h (Gattuso et al., 1999) and all the experiments were carried out within this period. To analyse the inotropic effects excluding the chronotropic action of substances, all protocols were performed on electrically paced preparations by using a Grass S44 stimulator (frequency identical to that of control, non-paced hearts).

2.3.2. Drug application

After stabilization, the hearts were perfused for 10–15 min with Ringer's solution enriched with increasing concentration of BRL₃₇₃₄₄ (from 10⁻¹² to 10⁻⁶ M) to generate cumulative concentration–response curves. The effects of 10⁻⁹ M of BRL₃₇₃₄₄ (this agonist concentration was chosen since its effect on SV inhibition developed with an EC₅₀ of -8.364 ± 0.52 ($r^2 = 0.84$)) were then tested in the presence of either β 1/ β 2-ARs antagonist nadolol, or specific β 3-AR antagonist SR₅₉₂₃₀, or alpha-adrenergic antagonist phentolamine, or detergent Triton X-100, or nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NIO, or soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ, or inhibitor of G proteins Pertussis Toxin (PTx), or protein kinase G (PKG) blocker (KT₅₈₂₃) or PDE2 inhibitor EHNA. In the above-mentioned protocols the hearts were perfused for 15–20 min with Ringer's solution enriched with the specific drug before the addition of BRL₃₇₃₄₄. In the case of PTx the hearts were pre-incubated for 40 min with PTx before BRL₃₇₃₄₄ somministration.

2.3.3. Isoproterenol stimulated hearts

To investigate the putative antagonistic action of BRL₃₇₃₄₄ against the positive inotropic action of ISO, concentration–response curves of ISO (from 10⁻⁹ to 10⁻⁶ M) were performed in absence and in presence of single concentrations of BRL₃₇₃₄₄ (10⁻⁹ M). The antagonistic action of BRL₃₇₃₄₄ towards ISO stimulation was also tested after pre-treatment with EHNA and KT₅₈₂₃.

2.3.4. cGMP and cAMP measurements

Extracts of frozen cardiac ventricle tissue obtained after perfusion with a single concentration of BRL₃₇₃₄₄ were used for cAMP and cGMP determinations (200–300 mg). Homogenates were treated with 6% trichloroacetic acid at 0 °C and centrifuged at 10,000g for 10 min. The supernatant was extracted three times with 3 ml of diethyl ether saturated with water, and the aqueous phase was collected and stored at –80 °C. cAMP and cGMP concentrations were measured using a commercial enzyme immunoassay (Biotrack Enzymeimmunoassay (EIA) System; Amersham Biosciences).

2.3.5. Western blotting analysis

Cardiac ventricles were homogenized in ice-cold RIPA buffer (Sigma–Aldrich, Milan, Italy) containing a mixture of protease inhibitors (1 mmol/L aprotinin, 20 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride and 200 mmol/L sodium orthovanadate) and then centrifuged at 200g for 10 min at 4 °C to remove tissue debris. Protein concentration was determined using Bradford reagent according to the manufacturer's recommendations (Sigma–Aldrich). Equal amounts of whole protein extract were resolved on 8% SDS–PAGE gels (for eNOS and p-eNOS, 60 μ g) or 10% SDS–PAGE gels (for Akt and p-Akt, 40 μ g, for β 3-AR, 75 μ g and for β -actin, 50 μ g), transferred to a PVDF transfer membrane (GE Healthcare, Milan, Italy), blocked with non-fat-dried milk and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. The following primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology), diluted 1:1000 in TBS-T containing 5% non-fat dry milk, were used: rabbit polyclonal anti-NOS3(H-159) raised against amino acids 2–160 of NOS3 of human origin; rabbit polyclonal anti-phospho-eNOS(Ser1177) raised against a short amino acid sequence containing phosphorylated Ser1177 of NOS3 of human origin; rabbit polyclonal anti Akt1/2/3(H136) raised against amino acids 345–480 of Akt1/2 of human origin; rabbit polyclonal anti-phospho-Akt1/2/3(Ser473) raised against a short amino acid sequence containing phosphorylated Ser473 of Akt1 of human origin; goat polyclonal anti- β 3-AR(M20) raised against a peptide mapping at the C-terminus of β 3-AR of mouse origin, and mouse monoclonal anti- β -Actin(C4) raised against gizzard Actin of chicken origin. Anti rabbit, anti goat and anti mouse secondary antibodies peroxidase linked were diluted 1:2000 in TBS-T containing 5% non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology). The immunodetect-

tion of proteins and phosphoproteins was performed using an enhanced chemiluminescence kit (ECL PLUS, Amersham). Autoradiographs were obtained by exposure to X-ray films (Hyperfilm ECL, Amersham). Immunoblots were digitalized and the densitometric analysis of the bands was carried out using NIH IMAGE 1.6 for a Macintosh computer based on 256 grey values (0 = white; 256 = black).

2.4. Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SEM of percentage changes obtained from individual experiments. Multiple comparisons were assessed by using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Statistical significance was concluded at $P < 0.05$. The concentration–response curves of the reduction of stroke volume induced by ISO alone and by ISO plus BRL₃₇₃₄₄ were fitted using GraphPad Prism 4.02. This provided the $-\log$ of the concentration (in M) that induced the 50% effect (EC_{50}) of ISO alone and ISO plus BRL₃₇₃₄₄.

3. Results

3.1. Basal conditions

As previously described (Gattuso et al., 1999), the *in vitro* isolated and perfused frog heart preparation generates cardiac hemodynamic responses that mimic those obtained *in vivo*. After 15–20 min of stabilization, the following basal recordings were obtained: SV = 1.61 ± 0.1 ml/kg; SW = 3.65 ± 0.35 mJ/g; HR = 59.6 ± 1.8 beat/min; preload = 0.13 ± 0.03 kPa; afterload = 3.8 ± 0.04 kPa and CO = 108.5 ± 2.3 ml min⁻¹ kg⁻¹.

3.2. Effects of β_3 -adrenergic stimulation on basal cardiac performance

Concentration–response curves of selective β_3 -AR agonist were generated by exposing the cardiac preparations to increasing concentrations of BRL₃₇₃₄₄, since exposure to single repeated doses of BRL₃₇₃₄₄ revealed absence of receptor desensitization (data not shown). BRL₃₇₃₄₄ (10^{-12} to 10^{-6} M) induced a concentration-dependent negative inotropic effect, revealed by a significant reduction of SV and SW already at 10^{-12} M (Fig. 1A).

3.3. β_3 Cardiac receptors identification

By using specific antibody, we found that the frog heart expresses β_3 -AR (Fig. 1B, lane 1). We used extracts of frog skin tissue (Fig. 1B, lane 3), which is known to express β_3 -ARs (Bellantuono et al., 2008), as a positive control. Testis tissue (Angelone et al., 2008) and BSA were used as negative controls (Fig. 1B, lane 4 and 2, respectively).

3.4. Effects of BRL₃₇₃₄₄ after treatment with nadolol, phentolamine, SR₅₉₂₃₀ and PTx

To explore the putative involvement of β_1/β_2 - and α -ARs in the β_3 -adrenergic signaling, hearts were perfused with BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M) in presence of a specific β_1/β_2 -ARs antagonist, nadolol (10^{-7} M) or in presence of the α -ARs antagonist, phentolamine (10^{-8} M). Results show that the negative inotropic effect induced by BRL₃₇₃₄₄ was not influenced by β_1/β_2 - or α -ARs inhibition. By contrast, the pre-treatment with the specific β_3 -ARs antagonist, SR₅₉₂₃₀ (10^{-8} M), abolished the BRL₃₇₃₄₄-dependent negative inotropic effect indicating a specific role for β_3 -ARs in this effect (Fig. 2).

β_3 -ARs belong to the superfamily of G protein-coupled receptors and it has been reported that, in human (Gauthier et al.,

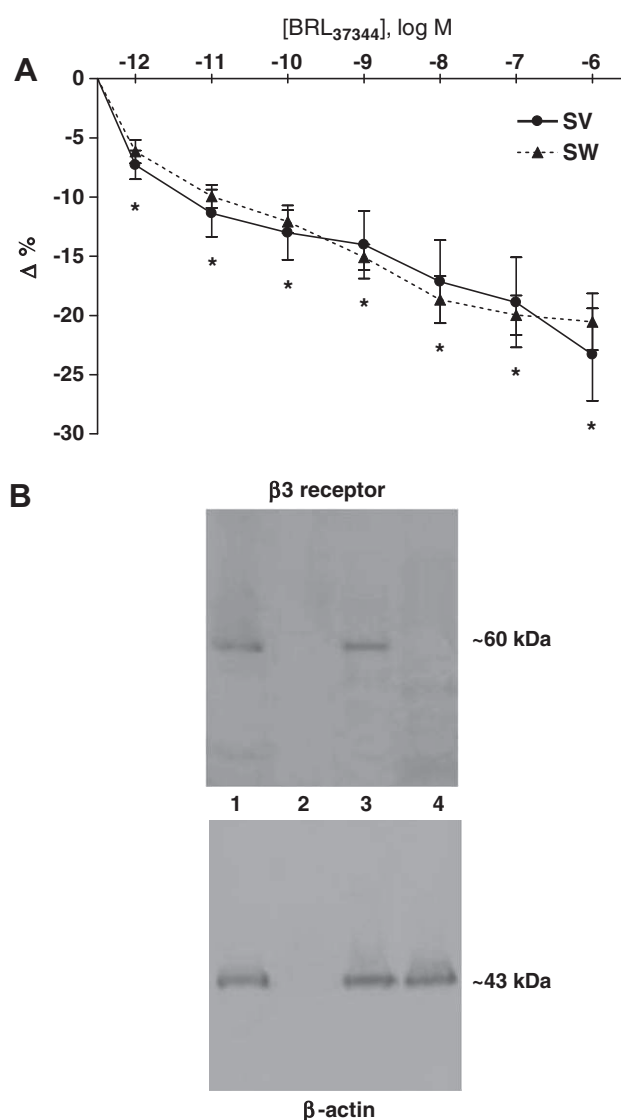


Fig. 1. (A) Cumulative concentration–response curves of BRL₃₇₃₄₄ on stroke volume (SV) and stroke work (SW) in isolated and perfused paced frog hearts. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of six experiments. Significance of difference from control values (one-way ANOVA): $P < 0.05$. (B) Western blotting analysis indicating β_3 receptor expression in the frog ventricle (lane 1); BSA (lane 2) and testis (lane 4) were used as negative controls; skin (lane 3) was used as positive control. Total protein level was normalized to β -actin.

1998), rat (Angelone et al., 2008) and eel (Imbrogno et al., 2006) hearts, β_3 -AR agonists exert negative inotropic effects related with activation of inhibitory Gi/o proteins. To verify the involvement of Gi/o proteins in the β_3 -AR-induced negative inotropic action, frog cardiac preparations were pre-treated with PTx (10^{-11} M). PTx catalyzes the ADP-ribosylation of the alpha-subunits of Gi/o. This prevents the interaction of these specific G proteins with their receptors impairing the downstream signals. Although the pre-treatment with PTx alone did not modify significantly basal cardiac performance (data not shown), it abolished the BRL₃₇₃₄₄-dependent negative inotropic effect, suggesting the involvement of the Gi/o protein system (Fig. 2).

3.5. Involvement of the endocardial endothelium (EE)-NOS-cGMP pathway

There is evidence that cardiac effects of the β_3 -adrenoceptor are mediated by activation of the endothelial NOS-NO-cGMP pathway

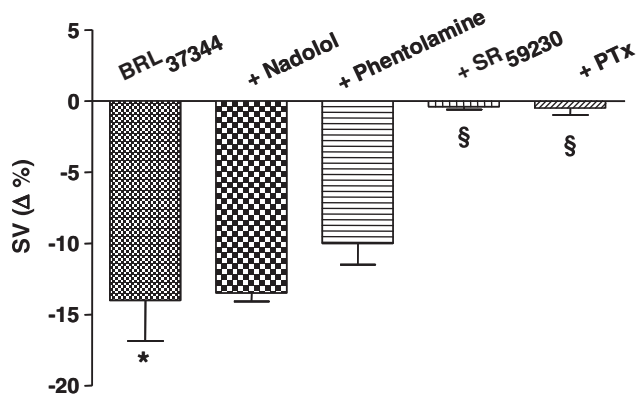


Fig. 2. Effects of BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M), before and after treatment with either nadolol (10^{-7} M), or phentolamine (10^{-8} M), or SR₅₉₂₃₀ (10^{-8} M), or PTx (10^{-11} M), on SV in isolated and perfused paced frog hearts. Percentage changes were evaluated as mean \pm SEM of 5–6 experiments for each group. Significance of difference from control values (one-way ANOVA): * $P < 0.05$. Comparison between groups (one-way ANOVA): § $P < 0.05$. Nadolol, SR₅₉₂₃₀, or PTx *per se* did not induce significant changes on SV. Phentolamine *per se* induced significant decrease of SV (Gattuso et al., 1999).

(human: Gauthier et al., 1998; eel: Imbrogno et al., 2006; rat: Angelone et al., 2008). To investigate whether also in frog this pathway is involved in the negative inotropism mediated by BRL₃₇₃₄₄, cardiac preparations were treated with either NOS (L-NIO ; 10^{-5} M) or guanylate cyclase (ODQ; 10^{-5} M) inhibitors. L-NIO and ODQ abolished the effect of the β_3 -AR agonist demonstrating its dependence on a NO-cGMP mechanism. In addition, the EE integrity appeared necessary for the cardio-inhibitory action of BRL₃₇₃₄₄ because functional damage of the EE with Triton X-100 (0.05%) abrogated this effect (Fig. 3).

3.6. Involvement of the PDE2 and PKG on the BRL₃₇₃₄₄-induced effects

There is evidence that in frog cardiac myocytes, cGMP decreases Ca^{2+} influx through L-type channels by the stimulation of PDE2 (cAMP phosphodiesterase) (Hartzell and Fischmeister, 1986). To

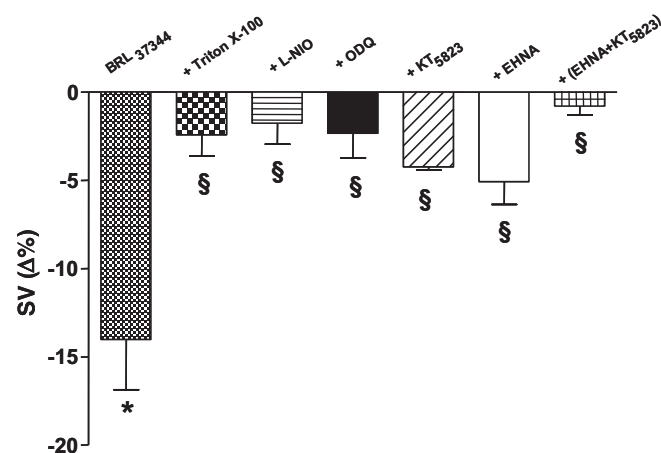


Fig. 3. Effects of BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M), before and after treatment with either Triton X-100 (0.05%), or L-NIO (10^{-5} M), or ODQ (10^{-5} M), or KT₅₈₂₃ (10^{-7} M), or EHNA (10^{-7} M), or KT₅₈₂₃ plus EHNA on SV in isolated and perfused paced frog hearts. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM. $N = 5$ –6 experiments for each group. Significance of difference from control values (one-way ANOVA): * $P < 0.05$. Comparison between groups (one-way ANOVA): § $P < 0.05$. KT₅₈₂₃ and EHNA *per se* did not induce significant changes on SV. Triton X-100, L-NIO and ODQ, *per se* induced significant increases of SV (Sys et al., 1997; Gattuso et al., 1999; Acierio et al., 2008).

explore whether PDE2 activity is involved in the negative inotropism of BRL₃₇₃₄₄, the cardiac preparation were pre-treated with EHNA, a selective inhibitor of PDE2. EHNA (10^{-7} M) significantly reduced the negative inotropism of BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M) (Fig. 3). Since cGMP modulates cardiac contractility also *via* PKG pathway (Fischmeister et al., 2005), we pre-treated the heart with a specific PKG inhibitor (KT₅₈₂₃; 10^{-7} M). This treatment also reduced significantly the BRL₃₇₃₄₄-dependent inotropic action. When both PKG and PDE2 were simultaneously inhibited by pre-treatment with KT₅₈₂₃ plus EHNA, the negative inotropism of BRL₃₇₃₄₄ was abolished confirming the co-involvement of PKG and PDE2 in its cardio-suppressive action (Fig. 3).

3.7. p-eNOS and p-Akt expression in cardiac ventricle

The phosphorylated eNOS (i.e. p-eNOS) and Akt (i.e. p-Akt) were analysed in perfused hearts after treatment with BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M). The results showed a significant increase of eNOS and Akt phosphorylation in the BRL₃₇₃₄₄ treated hearts (Fig. 4).

3.8. Influence of BRL₃₇₃₄₄ on ISO-induced inotropic effects

To investigate whether BRL₃₇₃₄₄ can act as an antagonist against ISO stimulation, concentration response curves of ISO (10^{-10} to 10^{-6} M) were performed in absence and in presence of BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M). Frog cardiac preparations exposed to ISO confirmed the classical positive inotropic response as reflected by significant increments of SV (Gattuso et al., 1999; Mazza et al., 2008). The pre-treatment with BRL₃₇₃₄₄ abolished the ISO-mediated SV in-

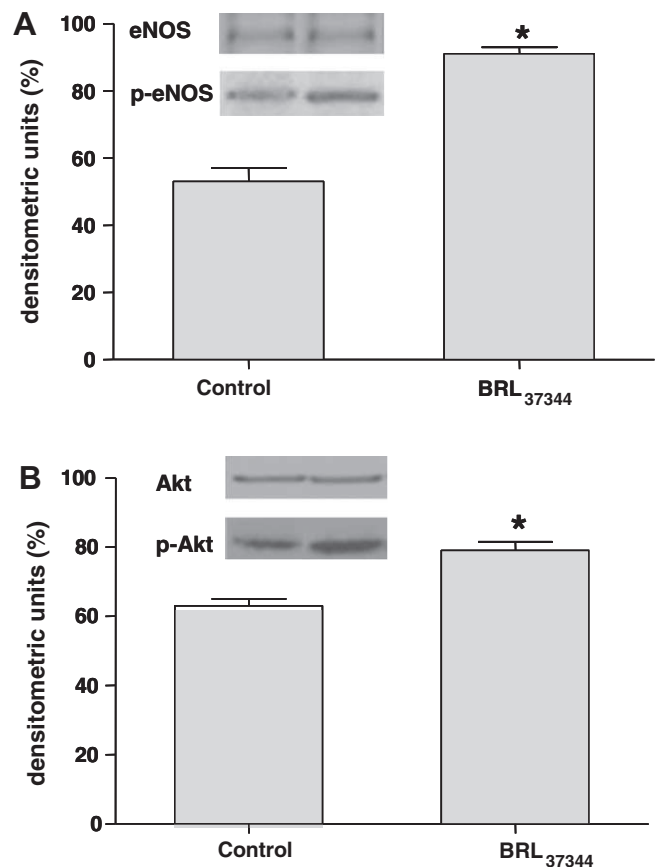


Fig. 4. p-Akt and p-eNOS expression in frog ventricle. (A) Representative Western blotting signals indicating p-eNOS (Ser1177) expression in control and BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M) treated hearts. (B) Representative Western blotting signals indicating p-Akt (Ser473) expression in control and BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M) treated hearts. Comparison between groups (one-way ANOVA): * $P < 0.05$. $N = 3$ for each group.

crease, through a non-competitive antagonism (Fig. 5A). To investigate the possible involvement of PDE2 and/or PKG in the antiadrenergic action of BRL₃₇₃₄₄, the hearts were perfused with ISO (10^{-8} M) after treatment with either EHNA (10^{-7} M) or KT₅₈₂₃ (10^{-7} M) in presence of BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M). Of note, when PDE2 or PKG were inhibited, BRL₃₇₃₄₄ was not able to modify the ISO-dependent inotropic response (Fig. 5B).

3.9. Effects of BRL₃₇₃₄₄ on cAMP and cGMP in whole hearts extracts

To test the involvement of cGMP and cAMP pathways in the mechanism of action of BRL₃₇₃₄₄, measurements of the intracellular cGMP and cAMP levels on cardiac extracts were performed. Results showed that BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M) significantly increased cGMP levels at basal conditions, while decreased the ISO-induced increase in cAMP, as is to be expected for its negative inotropic and antiadrenergic action, respectively (Fig. 6A and B).

4. Discussion

In this study, we reported that the selective β_3 -AR agonist, BRL₃₇₃₄₄, negatively affected cardiac mechanical performance in the isolated and perfused working frog heart. This action coupled with PTx-sensitive inhibitory Gi/o proteins and involved an EE-NOS-cGMP-PDE2/PKG pathway. The presence of β_3 -AR in the frog heart was confirmed by Western blotting analysis performed by using specific antibody.

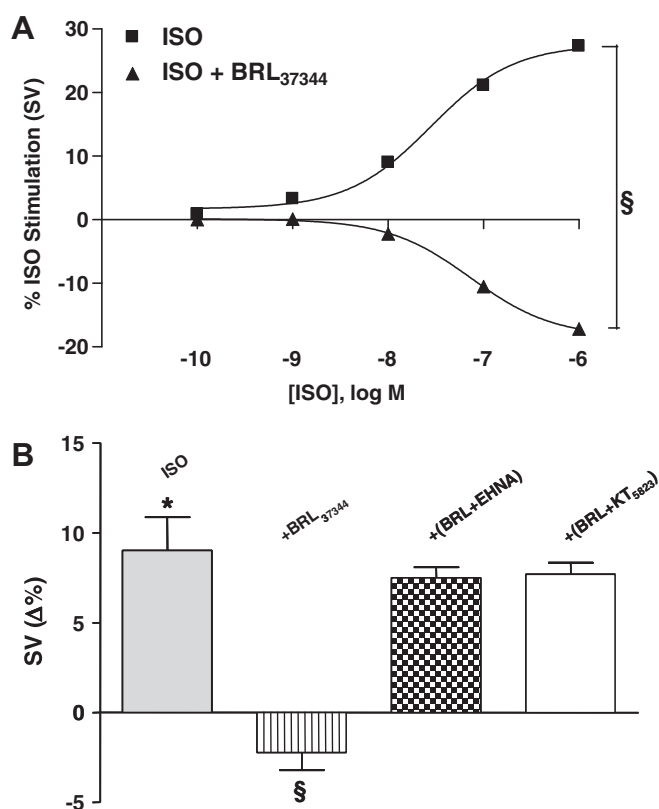


Fig. 5. (A) Concentration–response curves of isoproterenol (ISO; 10^{-10} to 10^{-6} M) alone and plus BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M) on SV in isolated and perfused paced frog hearts. $N = 5$ –6 experiments for each group. The EC_{50} values (in log M) of ISO alone and ISO plus BRL₃₇₃₄₄ were -7.5 ± 0.1 ($r^2 = 0.99$) and -7.13 ± 0.02 ($r^2 = 0.99$), respectively. (B) Effects of ISO (10^{-8} M) before and after treatment with BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M), or BRL₃₇₃₄₄ plus EHNA (10^{-7} M), or BRL₃₇₃₄₄ plus KT₅₈₂₃ (10^{-7} M) on SV in isolated and perfused paced frog hearts. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM. $N = 5$ –6 experiments for each group. Significance of difference from control values (one-way ANOVA): $P < 0.05$. Comparison between groups (one-way ANOVA): $§P < 0.05$.

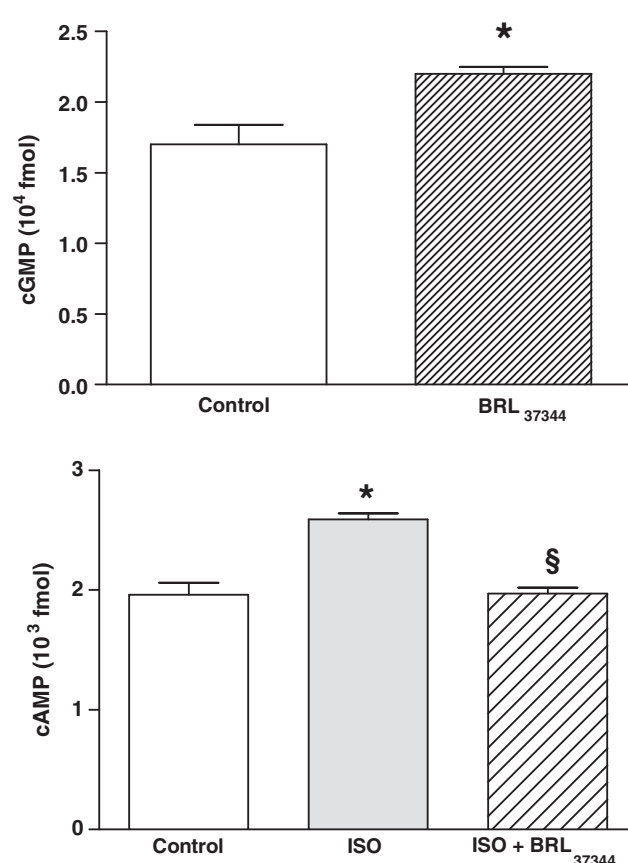


Fig. 6. (A) cGMP levels before and after BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M) treatment. (B) cAMP levels before and after treatment with ISO (10^{-8} M) alone and ISO plus BRL₃₇₃₄₄ (10^{-9} M). Significance of difference from control values (one-way ANOVA): $^*P < 0.05$. Comparison between groups (one-way ANOVA): $§P < 0.05$. $N = 4$ for each group.

4.1. BRL₃₇₃₄₄ stimulation and signaling transduction pathway

BRL₃₇₃₄₄ induced a concentration-dependent negative inotropic response revealed by a reduction of SV and SW in the range of concentrations tested (from 10^{-12} to 10^{-6} M). This effect resulted significant starting from the lower concentration used and reached a value of $23.37 \pm 3.9\%$ (SV) and of $20.53 \pm 2.39\%$ (SW) below control at the higher one. These concentrations are similar to those used in mammals and in the teleost *A. anguilla* (Gauthier et al., 1999; Imbrogno et al., 2006; Angelone et al., 2008).

In our cardiac preparations, the BRL₃₇₃₄₄-induced negative inotropism appeared independent on simultaneous activation of both β_1/β_2 -ARs and α -ARs, as it was unaffected by nadolol (a β_1/β_2 -adrenoceptor antagonist with a low affinity for β_3 -ARs) and phentolamine (a non-selective α -adrenergic antagonist). By contrast, it was abolished by pre-treatment with SR₅₉₂₃₀, a specific β_3 antagonist.

There is evidence that, unlike β_1/β_2 -ARs, β_3 -ARs are coupled to Gi/o proteins. PTx, which inhibits Gi/o proteins via ADP-ribosylation of α -subunits, is routinely used to identify the class of G protein involved in a biological response. Data obtained from human ventricular tissues, canine and rat cardiomyocytes (Rozec and Gauthier, 2006 for references), as well as from isolated eel and rat hearts (Imbrogno et al., 2006; Angelone et al., 2008), showed that pre-treatment by PTx abolished the negative inotropic effect induced by β_3 -AR stimulation. Similar results have been obtained in the present study suggesting that the BRL₃₇₃₄₄ effect is coupled with PTx-sensitive inhibitory Gi/o proteins also in the frog heart.

In human, rat and eel cardiac tissues (Gauthier et al., 1998; Angelone et al., 2008; Imbrogno et al., 2006), the downstream signaling induced the production of NO with consequent increase in cGMP levels by soluble guanylyl cyclase activation. The NOS isoform involved is probably the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Gauthier et al., 1998), which is expressed in both endothelial cells and ventricular cardiomyocytes. A constitutive NOS, restricted to EE cells enveloping the ventricular and atrial trabeculae of the frog heart, was firstly documented by us (Sys et al., 1997) and recently corroborated by the presence of the activated eNOS (phospho-Ser1177-eNOS) (Acierno et al., 2008). Endocardial endothelial NOS appears, in the avascular heart of the frog, as the major source of NO able to modulate ventricular performance under basal (Sys et al., 1997; Acierno et al., 2008) and chemical stimulated (Gattuso et al., 1999; Mazza et al., 2008) conditions. Consistent with these data, we have found that in the frog heart the BRL₃₇₃₄₄-induced negative inotropism is mediated by an EE-NOS-cGMP signal transduction pathway since it was abolished by the functional damage of endocardial endothelium (Triton X-100) as well as by the pre-treatment with NOS (L-NIO) and guanylate cyclase (ODQ) inhibitors. The involvement of NOS pathway in the mechanism of action of β -AR has been confirmed by the increased phosphorylation of eNOS and Akt after BRL₃₇₃₄₄ treatment.

Intracellular pathways that downregulate cardiac contractility in response to cGMP elevation include targets such as the cGMP-dependent protein kinase (PKG) (Méry et al., 1991; Sumii and Sperelakis, 1995) and the cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) (Hartzell and Fischmeister, 1986; Méry et al., 1995). cAMP-hydrolyzing PDEs constitute a large multigenic family, four members of which have been found and characterized in the heart: PDE1, PDE2, PDE3 and PDE4. Although all four isoforms have been found in the frog heart (Jurevicius et al., 2003), PDE2 represents the dominant isoform in the membrane fraction of frog ventricles (Simmons and Hartzell, 1998; Lugnier et al., 1992) and its activity dominates over any other PDE isoforms when cGMP is elevated. In the isolated frog myocytes, its activation mediates a strong inhibition of cAMP-enhanced $I_{Ca,L}$ by cGMP and/or NO donors (Fischmeister and Hartzell, 1987; Méry et al., 1993, 1995) and EHNA, the specific PDE2 inhibitor, is able to antagonize the NO donors- or cGMP-mediated effects on $I_{Ca,L}$ (Dittrich et al., 2001). By contrast, in guinea pig and rat hearts PKG mainly accounts for the inhibitory effect of cGMP on $I_{Ca,L}$, suggesting that differences exist among species (Fischmeister et al., 2005 for references).

Since in our experiments EHNA reduced, but did not abolish the negative effect of BRL₃₇₃₄₄, we tested the hypothesis of the PKG involvement in this action. The pre-treatment with KT₅₈₂₃ (10^{-7} M) attenuated the negative inotropic effect of β -AR signaling, suggesting that also PKG is a target involved in the cGMP-stimulated inhibitory effect of BRL₃₇₃₄₄. When both EHNA and KT₅₈₂₃ were co-infused, the negative inotropic action of BRL₃₇₃₄₄ was abolished confirming a co-involvement of PKG and PDE2 in its action. Our findings, showing that a rise in intracellular cGMP levels occurred consequent to β -AR stimulation, support that cGMP stimulates, at the same time, PDE2 and PKG activities. In fact, the modulatory effects of cGMP on cAMP-hydrolyzing PDE arise in a range (from nanomolar to micromolar concentrations) comparable to that at which cGMP activates also PKG (Zaccolo and Movsesian, 2007) indicating that both these targets may represent the final step of the cGMP-mediated signaling in the frog heart. Of note, a NO-cGMP-PKG-dependent mechanism, involved in the inotropic effects of cardioactive agents, has been recently reported by us in the frog heart (Cerra et al., 2009).

4.2. Anti-adrenergic action of BRL₃₇₃₄₄

In frog ventricular myocytes, ISO stimulation is mediated by β -adrenergic receptors (Skeberdis et al., 1997) and cAMP-dependent

phosphorylation (Hartzell et al., 1991). In this study we observed that the pre-treatment with BRL₃₇₃₄₄ inhibited the classical ISO-dependent positive inotropism, with a non-competitive antagonism. This action may result from the effects of cGMP on cAMP hydrolysis. It is known that in frog ventricular cells cGMP does not influence basal I_{Ca} but significantly decreases the I_{Ca} elevated by beta-adrenergic agonists or by intracellular perfusion with cAMP, through the cAMP hydrolysis via a cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (Hartzell and Fischmeister, 1986). In this context, our results suggest that β -AR, through the increase of cGMP levels, may counteract β 2 signaling in the frog heart. In fact, we have observed that BRL₃₇₃₄₄ increased cGMP levels while reduced the ISO-induced increase in cAMP in the heart extracts. These findings are in line with the recent work on frog ventricular myocytes (Skeberdis et al., 2008) in which, although β -AR agonists did not affect basal $I_{Ca,L}$, they inhibited the ISO stimulatory effect on $I_{Ca,L}$.

Moreover, the pre-treatment with EHNA, which *per se* did not modify the ISO response (data not shown), impaired the ability of BRL₃₇₃₄₄ to antagonize the ISO positive inotropic response, according to an involvement of PDE2 in this mechanism. These data are compatible with the hypothesis that cGMP, via a β -AR-coupled EE-NOS-dependent pathway, modulates β -AR-generated cAMP by increasing PDE2 activity. A key role for PDE2 in the attenuation of β -adrenergic signaling via a β -AR-activated feedback loop has been recently reported in rat ventricular myocytes (Mongillo et al., 2006). On the other hands, the results obtained in our preparations with KT₅₈₂₃ delineated also a key role for PKG in the attenuation of β -adrenergic signaling via a β -AR-activated pathway, highlighting that both PKG and PDE2 were implicated in the anti-adrenergic action of β agonist.

In conclusion, the present study documented for the first time in the working frog heart a negative inotropic action by β -AR stimulation. This action has been supported by the presence of β -ARs in the frog heart. We reported that the activation of β -ARs induced a rise in intracellular cGMP levels and a reduction of the ISO-induced cAMP increase. cGMP induced both PDE2 and PKG activation which, in turn, affected basal contractility as well as the anti-adrenergic action of BRL₃₇₃₄₄. The presence of β -ARs in the frog heart and their involvement in counteracting β -adrenergic stimulation may help a better understanding of potential approaches to treat stress conditions shedding light on the role of a balanced regulation of β 1/ β 2 and β -AR systems which regulate systolic function. As indicated by the present study, a combination of different methodologies (i.e. using intact isolated working heart and signaling studies) and the comparative approach represents an useful tool for future investigations of physiological role of adrenergic regulation.

Acknowledgments

This work was supported by MIUR (Ministry of Education, University and Research (of Italy to R.M., T.A., A.G. and by "Doctorate in Animal Biology" to T.P.

References

- Acierno, R., Gattuso, A., Guerrieri, A., Mannarino, C., Amelio, D., Tota, B., 2008. Nitric oxide modulates the frog heart ventricle morphodynamics. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 51–60.
- Angelone, T., Filice, E., Quintieri, A.M., Imbrogno, S., Recchia, A., Pulera', E., Mannarino, C., Pellegrino, D., Cerra, M.C., 2008. β -Adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway. *Acta Physiol.* 193, 229–239.
- Bellantuono, V., Cassano, G., Lippe, C., 2008. The adrenergic receptor subtypes present in frog (*Rana esculenta*) skin. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 160–164.
- Cerra, M.C., Angelone, T., Parisella, M.L., Pellegrino, D., Tota, B., 2009. Nitrite modulates contractility of teleost (*Anguilla anguilla* and *Chionodraco hamatus*,

- i.e. the Antarctic hemoglobinless icefish) and frog (*Rana esculenta*) hearts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787, 849–855.
- Cheng, H.J., Zhang, Z.S., Onishi, K., Ukai, T., Sane, D.C., Cheng, C.P., 2001. Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ. Res.* 89, 599–606.
- Dinçer, U.D., Bidasee, K.R., Güner, S., Tay, A., Özçelikay, A.T., Altan, V.M., 2001. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes* 50, 455–461.
- Dittrich, M., Jurevicius, J., Georget, M., Rochais, F., Fleischmann, B.K., Hescheler, J., Fischmeister, R., 2001. Local response of L-type Ca^{2+} current to nitric oxide in frog ventricular myocytes. *J. Physiol.* 534, 109–121.
- Emorine, L.J., Marullo, S., Briand-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., Strosberg, A.D., 1989. Molecular characterization of the human beta3-adrenergic receptor. *Science* 245, 1118–1121.
- Fischmeister, R., Hartzell, H.C., 1987. Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. *J. Physiol.* 387, 453–472.
- Fischmeister, R., Castro, L., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Vandecasteele, G., 2005. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp. Biochem. Physiol. A* 142, 136–143.
- Gattuso, A., Mazza, R., Pellegrino, D., Tota, B., 1999. Endocardial endothelium mediates luminal ACh-NO signaling in isolated frog heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 276, H633–H641.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., Marec, H.L., 1998. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* 102, 1377–1384.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., Le Marec, H., 1996. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.* 98, 556–562.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Trochu, J.N., Leblais, V., Laurent, K., Langin, D., Escande, D., Le Marec, H., 1999. Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta3-adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 687–693.
- Gauthier, C., Langin, D., Balligand, J.L., 2000. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 426–431.
- Hartzell, H.C., Fischmeister, R., 1986. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca^{2+} current in single heart cells. *Nature* 323, 273–275.
- Hartzell, H.C., Méry, P.F., Fischmeister, R., Szabo, G., 1991. Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. *Nature* 351, 573–576.
- Imbrogno, S., Angelone, T., Adamo, C., Pulerà, E., Tota, B., Cerra, M.C., 2006. Beta3-adrenoceptor in the eel (*Anguilla anguilla*) heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. *J. Exp. Biol.* 209, 4966–4973.
- Jurevicius, J., Skeberdis, V.A., Fischmeister, R., 2003. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following beta2-adrenergic stimulation of I_{CaL} in frog ventricular myocytes. *J. Physiol.* 551, 239–252.
- Kitamura, T., Onishi, K., Dohi, K., Okinaka, T., Isaka, N., Nakano, T., 2000. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation in the beating guinea pig heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35, 786–790.
- Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P., Brown, T.J., 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214, 597–598.
- Lugnier, C., Gauthier, C., Le Bec, A., Soustre, H., 1992. Cyclic nucleotide phosphodiesterases from frog atrial fibers: isolation and drug sensitivities. *Am. J. Physiol.* 262, H654–H660.
- Mazza, R., Gattuso, A., Mannarino, C., Brar, B.K., Barbieri, S.F., Tota, B., Mahata, S.K., 2008. Catestatin (chromogranin A344–364) is a novel cardiosuppressive agent: inhibition of isoproterenol and endothelin signaling in the frog heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H113–H122.
- Méry, P.F., Lohmann, S.M., Walter, U., Fischmeister, R., 1991. Ca^{2+} current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1197–1201.
- Méry, P.F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F., Fischmeister, R., 1993. Nitric oxide regulates cardiac Ca^{2+} current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J. Biol. Chem.* 268, 26286–26295.
- Méry, P.F., Pavoine, C., Pecker, F., Fischmeister, R., 1995. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 48, 121–130.
- Mongillo, M., Tocchetti, C.G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y.F., Dostmann, W.R., Pozzan, T., Kass, D.A., Paolucci, N., Houslay, M.D., et al., 2006. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ. Res.* 98, 226–234.
- Nickerson, J.G., Dugan, S.G., Drouin, G., Perry, S., Moon, T.W., 2003. Activity of the unique-adrenergic Na⁺/H⁺ exchanger in trout erythrocytes is controlled by a novel 3-AR subtype. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R526–R535.
- Rozec, B., Gauthier, C., 2006. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Ther.* 111, 52–73.
- Simmons, M.A., Hartzell, H.C., 1998. Role of phosphodiesterase in regulation of calcium current in isolated cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 33, 664–671.
- Skeberdis, V.A., Jurevicius, J., Fischmeister, R., 1997. Pharmacological characterization of the receptors involved in the beta-adrenoceptor-mediated stimulation of the L-type Ca^{2+} current in frog ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1277–1286.
- Skeberdis, V.A., Gendviliene, V., Zablockaitė, D., Treinys, R., Macianskiene, R., Bogdelis, A., Jurevicius, J., Fischmeister, R., 2008. beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca^{2+} current. *J. Clin. Invest.* 118, 3219–3227.
- Sumii, K., Sperelakis, N., 1995. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 77, 803–812.
- Sys, S.U., Pellegrino, D., Mazza, R., Gattuso, A., Andries, L.J., Tota, B., 1997. Endocardial endothelium in the avascular heart of the frog: morphology and role of nitric oxide. *J. Exp. Biol.* 200, 3109–3118.
- Zaccolo, M., Movsesian, M.A., 2007. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ. Res.* 100, 1569–1578.