

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



**UNIVERSITA' DELLA CALABRIA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA, ECOLOGIA E SCIENZE DELLA TERRA

SCUOLA DI DOTTORATO "LIFE SCIENCES"

INDIRIZZO BIOLOGIA ANIMALE

XXVIII CICLO

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09

*La Catestatina migliora la risposta Frank-Starling in cuori di ratto normotesi e ipertesi agendo come attivatore fisiologico del pathway trasduzionale ossido nitrico-dipendente*

Direttore: *Ch.mo Prof. Marcello Canonaco*

Supervisore: *Ch.mo Prof. Tommaso Angelone*

Dottoranda: *Dott.ssa Patrizia Cuguffo*

---

Anno Accademico 2014/2015

**INDICE**

<i>SUMMARY</i> .....	6
<i>PREMESSA E SCOPO</i> .....	7
<i>INTRODUZIONE</i> .....	10
1 La Cromogranina A.....	11
1.1 CgA: il ruolo di pro-ormone.....	13
1.2 Azioni biologiche della CgA.....	15
1.3 Profilo cardiocircolatorio della CgA full-length.....	16
2. La Catestatina .....	18
2.1 Struttura della Catestatina.....	20
2.2 Funzioni della Catestatina.....	21
2.2.1 Inibizione del rilascio di catecolammine.....	21
2.2.2 Blocco della desensitizzazione.....	23
2.2.3 Stimolazione del rilascio di istamina dai mastociti.....	23
2.2.4 Azione chemiotattica e angiogenetica.....	24
2.2.5 Azioni cardiache della catestatina.....	26
3 Fattori endoteliali.....	28
3.1 Classificazione delle ossido nitrico sintasi.....	30
3.1.1 nNOS.....	32
3.1.2 iNOS.....	32
3.1.3 eNOS.....	34
3.2 Localizzazione intracardiaca delle NOS.....	35
4 Regolazione intrinseca eterometrica: La legge di Starling.....	40
<i>MATERIALI E METODI</i> .....	43
1 Metodica Langerdorff.....	44

---

1.1 Animali.....	45
1.2 Dissezione, isolamento e incannulazione del cuore.....	46
1.3 Modalità di perfusione.....	48
1.4 Apparato di perfusione.....	49
1.5 Composizione del perfusato.....	51
1.6 Sistema di acquisizione dei parametri cardiaci.....	52
1.7 Parametri dell'attività cardiaca.....	53
2 Immunoblotting .....	56
3 Biotin Switch Assay.....	58
4 Dosaggio Elisa.....	59
5 Protocolli Sperimentali.....	60
5.1 Langendorff.....	60
5.2 Immunoblotting.....	61
5.3 Condizioni Basali di perfusione.....	61
6 Risposta Cardiaca al meccanismo Frank-Starling.....	62
6.1 Risposta della CST in cuori WKY e SHR.....	62
6.1.1 Coinvolgimento del pathway dello NO.....	62
6.1.2 Coinvolgimento dell'endotelio delle coronarie.....	63
6.1.3 Dosaggio Elisa: Determinazione dei livelli de cGMP e cAMP intracellulari.....	63
7 Analisi Statistica.....	63
<i>RISULTATI</i> .....	65
1 Condizioni Basali di Perfusione.....	66
2 La CST modula la risposta Frank-Starling in ratti WKY e SHR.....	66
3 Meccanismo d'azione.....	67
3.1 Ruolo dell'endotelio Vascolare.....	67
3.2 Meccanismo di Trasduzione del Segnale: IP3K-eNOS-cGMP pathway.....	68

3.3 Ruolo del Calcio.....	69
3.4 Livelli di cGMP e cAMP .....	69
3.5 S-Nitrosilazione.....	69
3.6 Valutazione dei livelli di fosforilazione di AKT, eNOS, nNOS e PLN.....	70
DISCUSSIONE.....	78
1 Meccanismi coinvolti nella modulazione CST-dipendente della risposta di Frank-Starling.....	81
CONCLUSIONI .....	85
BIBLIOGRAFIA .....	86

## SUMMARY

*The myocardial response to mechanical stretch (Frank-Starling law) is an important physiological cardiac determinant. Modulated by many endogenous substances, it is impaired in the presence of cardiovascular pathologies and during senescence. Catestatin (CST: hCgA352-372), a 21-amino-acid derivate of Chromogranin A (CgA), displays hypotensive/vasodilatory properties and counteracts excessive systemic and/or intra-cardiac excitatory stimuli (e.g., catecholamines and endothelin-1). CST, produced also by the myocardium, affects the heart by modulating inotropy, lusitropy and the coronary tone through a Nitric Oxide (NO)-dependent mechanism. This study evaluated the putative influence elicited by CST on the Frank-Starling response of normotensive Wistar Kyoto (WKY) and hypertensive (SHR) hearts by using isolated and Langendorff perfused cardiac preparations. Functional changes were evaluated on aged (18-month-old) WKY rats and SHR which mimic human chronic heart failure (HF). Comparison to WKY rats, SHR showed a reduced Frank-Starling response. In both rat strains, CST administration improved myocardial mechanical response to increased end-diastolic pressures. This effect was mediated by EE/IP3K/NOS/NO/cGMP/PKG, as revealed by specific inhibitors. CST-dependent positive Frank-Starling response is paralleled by an increment in protein S-Nitrosylation, AKT/eNOS/nNOS and PLN phosphorylations. Our data suggested CST as a NO dependent physiological modulator of the stretch-induced intrinsic regulation of the heart. This may be of particular importance in the aged hypertrophic heart, whose function is impaired because of a reduced systolic performance accompanied by delayed relaxation and increased diastolic stiffness.*

**PREMESSA E SCOPO**

Lo scompenso cardiaco è una complessa sindrome clinica che subentra quando il cuore è incapace di fornire un sufficiente apporto di sangue ai tessuti, dunque di mantenere una gittata cardiaca adeguata alle esigenze metaboliche dell'organismo, e di accogliere il ritorno venoso sistemico (American Heart Association Heart Failure, 2011). È spesso la conseguenza di una diminuita contrattilità ventricolare, dovuta per lo più ad una perdita di cardiomiociti per necrosi o apoptosi. Quando la funzionalità cardiaca è compromessa, ma il miocardio non è troppo danneggiato, si possono attivare dei meccanismi fisiologici di compenso al fine di mantenere la pressione arteriosa e la perfusione degli organi vitali. Tra questi, un importante ruolo compensatorio nelle prime fasi di scompenso è assunto dal meccanismo di Frank-Starling, ovvero la capacità del miocardio di rispondere ad allungamenti con incrementi nella forza contrattile. La forza di contrazione cardiaca è regolata intrinsecamente (*autoregolazione*) in base alla variazione della lunghezza diastolica delle fibre (*eterometria*), in modo tale che il cuore è sempre in condizioni di espellere il volume di sangue che riceve. Questo meccanismo intrinseco che controlla la gittata pulsatoria è detto, perciò autoregolazione eterometrica.

La risposta Frank-Starling è modulata da molte sostanze endogene ed esogene, compreso l'ossido nitrico (NO). Nel miocardio, lo NO prodotto dalle ossido nitrico sintasi (NOS) costitutive condiziona la funzione e lo stato di fosforilazione di diverse proteine che sono coinvolte nell'accoppiamento eccitazione-contrazione, come i canali al  $\text{Ca}^{2+}$  di tipo L (Sears et al., 2003; Wang et al., 2009), la troponina I (Layland et al., 2002) e il fosfolambano (PLN) (Wang et al., 2009) e diminuisce il consumo di  $\text{O}_2$  e l'inotropismo positivo conseguente alla stimolazione adrenergica mediante un meccanismo cGMP-dipendente. Diversi studi hanno chiarito il suo ruolo nello scompenso cardiaco e nel limitare il rimodellamento ventricolare sinistro patologico (Dawson et al., 2005; Godecke et al., 2001). Lo NO induce vasodilatazione mediante una riduzione della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, attraverso il pathway che coinvolge la guanilato ciclasi (GC) e la proteina chinasi G (PKG), la quale è in grado di fosforilare proteine target, come il fosfolambano (PLN) e le pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico, proteine del miocardio coinvolte nell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$ . Questo pathway è di fondamentale importanza per la vasodilatazione poiché inibisce l'idrolisi del fosfatidil-inositolo e la mobilizzazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare.

Recentemente, un ruolo nel controllo della contrattilità e del rilassamento cardiaci, è stato dimostrato per la Catestatina (CST), peptide derivato dalla Cromogranina-A (CgA). La CST (CgA352-372) umana è un'antagonista non competitivo della secrezione di catecolamine indotto dall'attivazione del recettore nicotinico. Essa induce vasodilatazione sia attraverso l'inibizione del rilascio di catecolamine che con un aumento in circolo d'istamina (Mahata et al., 1997; Kennedy et al., 1998; Wen et al., 2004). Angelone e collaboratori (2008, 2012) hanno dimostrato che su cuori di ratto isolati e perfusi secondo metodica Langendorff, la CST suscita cardiosoppressione attraverso il pathway  $\beta_2 / \beta_3$ -AR-NO-cGMP-PKG; contrasta anche l'attività dei  $\beta_1$ -AR e la stimolazione indotta da endotelina (ET-1), suggerendo un legame meccanicistico tra le proprietà antiadrenergiche della CST e la nota influenza simpatico-inibitoria dello NO sulle funzioni cardiovascolari. Il postcondizionamento farmacologico con CST proteggere il cuore di ratti normotesi contro un danno da ischemia / riperfusione (Penna et al., 2010). È interessante notare come sul cuore di ratto iperteso (SHR) la CST induce inotropismo e lusitropismo negativo con vasodilatazione coronarica, con un effetto più potente rispetto ai ratti normotesi (Pasqua et al., 2013). Il meccanismo attraverso cui lo NO media processi cellulari è la S-Nitrosilazione (Hess et al.; 2005). Studi condotti da Angelone e collaboratori (2011) hanno permesso di evidenziare che la CST attraverso l'attivazione delle NOSs, aumenta la produzione di NO il quale andrebbe a S-Nitrosilare la B-arrestina, responsabile dell'effetto antiadrenergico del peptide, e il PLN, responsabile dell'effetto inotropo negativo.

Sulla base di queste premesse è stato progettato il presente studio per valutare gli effetti indotti dalla CST sulla risposta Frank-Starling. Si è voluto indagare sul possibile ruolo della CST nel prevenire lo sviluppo di scompenso cardiaco utilizzando come modello sperimentale ratti spontaneamente ipertesi (SHR) all'età di 18 mesi perché è in questo periodo che inizia a svilupparsi lo scompenso cardiaco e ratti WKY normotesi come controllo attraverso la tecnica del cuore isolato e perfuso secondo metodica Langendorff. Per ciascun gruppo sperimentale sono state generate curve Frank-starling prima e dopo trattamento con una singola concentrazione di CST.

Il coinvolgimento dello NO prodotto a livello endoteliale è stato analizzato esponendo i cuori normotesi e ipertesi a CST dopo trattamento con TRITON X-100, sostanza in grado di danneggiare funzionalmente ma non strutturalmente l'endotelio. Inoltre, per chiarire se l'effetto CST-dipendente sulla risposta di Frank-Starling fosse mediato dallo NO-NOS-

prodotto, i preparati cardiaci normotesi e ipertesi sono stati esposti a singola concentrazione di CST in presenza di un inibitore delle NOSs. Per valutare se la risposta Frank-Starling dipendente da CST fosse mediata dal coinvolgimento del pathway EE / NOS / NO / cGMP / PKG, gli estratti cardiaci di entrambi i gruppi sperimentali sono stati esposti a singola concentrazione di CST in presenza di specifici inibitori di mediatori coinvolti nel pathway. In seguito, analisi di biologia molecolare sono state condotte per la valutazione dei livelli di fosforilazione di proteine quali AKT, eNOS, nNOS e PLN e determinazione dei livelli di cGMP. Infine sono stati anche valutati i livelli di S-nitrosilazione di proteine cardiache a basso, medio ed elevato peso molecolare.

I risultati ottenuti da questo lavoro permettono di identificare la CST come un modulatore fisiologico NO-dipendente della risposta Frank-Starling. I risultati ottenuti in questo lavoro possono essere di particolare importanza per il cuore ipertrofico, la cui funzione è compromessa a causa di una performance sistolica ridotta accompagnata da ritardo nel relax e da una maggiore rigidità diastolica.

***Introduzione***

## ***1 LA CROMOGRANINA-A***

La Cromogranina A (CgA) rappresenta la molecola meglio definita e più studiata della famiglia delle granine. Le granine, proteine a carattere secretorio, sono i prodotti di distinti geni, contraddistinte da molti residui amminoacidici acidi che conferiscono loro una carica netta positiva. Si tratta di proteine idrosolubili, che si rinvencono all'interno dei granuli di secrezione delle cellule endocrine, neuroendocrine e neuronali in associazione ai prodotti di secrezione specifici quali ormoni peptidici, neurotrasmettitori e ammine. A oggi sono stati identificati almeno dieci membri della famiglia delle granine rappresentati dalle cromogranine (cromogranina A e B) e dalle secretogranine (SgII → SgVIII) (Montero-Hadjadje et al., 2008; Bartolomucci et al., 2011). Le proteine cromogranina e secretogranina condividono molte proprietà, fra cui il punto isoelettrico acido (pI), il legame con il calcio, la propensione a formare aggregati (Montero-Hadjadje et al., 2008). In effetti, la presenza delle cromogranine nelle vescicole secretorie, consente a queste di legarsi al  $\text{Ca}^{2+}$ , fornendo una riserva intracellulare notevole dello ione. Studi indicano che la famiglia estesa delle granine è sostanzialmente più ampia delle cromogranine CgA e CgB e delle secretogranine SgII e SgIII, e attualmente comprende anche l'antigene HISL-19 (SgIV), la 7B2 (SgV), la proteina secretoria neuroendocrina del Mr 55,000 (NESP55) (SgVI), la VGF (Sg-VII) e la proSAAS (SgVIII) (Feldman & Eiden, 2003). La maggior parte di queste proteine sono precursori di peptidi biologicamente attivi, i quali modulano, per esempio, le vie del dolore, le reazioni infiammatorie, i disordini metabolici e dell'umore, e la pressione sanguigna. Il gene umano CHGA (CgA) è situato sul cromosoma 14q32.12 ed è organizzato in otto esoni e sette introni; si estende per 12,192 bp e genera un trascritto di 2,041 bp delle quali 1274 sono tradotte in una proteina di 457 AA (comprendenti anche un peptide segnale di 18 residui amminoacidici), mentre 260 bp e 409 bp rimangono regioni non tradotte del gene (Winkler & Fischer-Colbric., 1992; Mahata et al., 1997) (Fig.1).

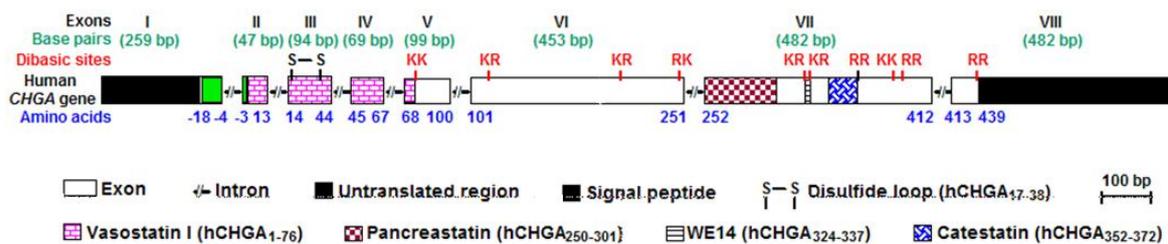


Figura 1: Gene della cromogranina-A

Esistono 10 siti dibasici nella CgA, che sono siti potenziali di una rottura proteolitica (Konecki et al., 1997). I siti dibasici nella CgA variano da un minimo di 7 nei topi ad un massimo di 11 nella rana (Strausberg et al., 2002). Nei vertebrati omeotermi, la CgA è una proteina di circa 48-52 kDa con una struttura a elica (Mosley et al., 2007). Essa è la principale proteina immagazzinata e rilasciata dalle vescicole secretorie contenenti catecolamine presenti nelle cellule cromaffini della midollare del surrene e nei neuroni noradrenergici (Takiyyuddin et al., 1990). È stata anche rilevata ubiquitariamente nelle vescicole secretorie delle cellule endocrine, neuroendocrine e nei neuroni del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP) (Helle et al., 2007; Montero-Hadjadje et al., 2008). La CgA è presente anche in altri tipi di cellule, inclusi i cardiomiociti di diversi vertebrati (Krylova, 2007) tra cui i roditori (Steiner et al., 1990; Biswas et al., 2010; Pasqua et al., 2013) e dell'uomo, in particolare in pazienti affetti da cardiomiopatie e insufficienza cardiaca (Pieroni et al., 2007).

### **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., 2000). In condizioni normali, sotto stimolazione dell'acetilcolina, la CgA è rilasciata per esocitosi con le catecolamine nello spazio extracellulare e passa in circolo, dove esercita i suoi effetti modulatori su organi e tessuti (Helle et al., 2007; Bartololomucci et al., 2011; Angelone et al., 2012). Una volta sintetizzata nel reticolo endoplasmatico rugoso e dopo le successive modificazioni post-traduzionali a livello dell'apparato di Golgi, la CgA si accumula nel trans-Golgi, nei granuli densi di secrezione in associazione ai prodotti specifici della cellula di origine. È in quest'ultima fase che la CgA può andare incontro a processi di frammentazione proteolitica. Per la presenza di 8-10 siti dibasici la CgA funziona come pro-ormone e subisce un processo di clivaggio da parte di proteasi (PC1/3, PC2, plasmina, etc) (Winkler et al., 1992). Questo processo è finemente regolato, dando origine a frammenti peptidici biologicamente attivi (Fig. 2). Questi peptidi possiedono un ampio spettro di azioni biologiche che nel loro complesso s'inseriscono nel controllo omeostatico del sistema cardio-vascolare, endocrino e immunitario attraverso interazioni dirette e indirette con il sistema simpatico-adrenergico neuroendocrino (SAN) (Metz-Boutigue et al., 1993; Parmer et al., 2000; Taupenot et al., 2002). I frammenti biologicamente attivi della CGA includono i peptidi vasoattivi Vasostatina 1 (CgA<sub>1-76</sub>) e Vasostatina 2 (CgA<sub>1-113</sub>), la  $\beta$ -granina (CgA<sub>1-114</sub>), il peptide disglicemico pancreastatina (CgA<sub>250-301</sub>) (Tatemoto et al., 1986), il modulatore del rilascio del paratormone parastatina (CgA<sub>347-379</sub>) (Fasciotto et al., 1993), l'inibitore del rilascio di catecolamine catestatina (CgA<sub>352-372</sub>) (Simon et al., 1988), e la serpinina, scoperta recentemente (Koshimizu et al., 2010).

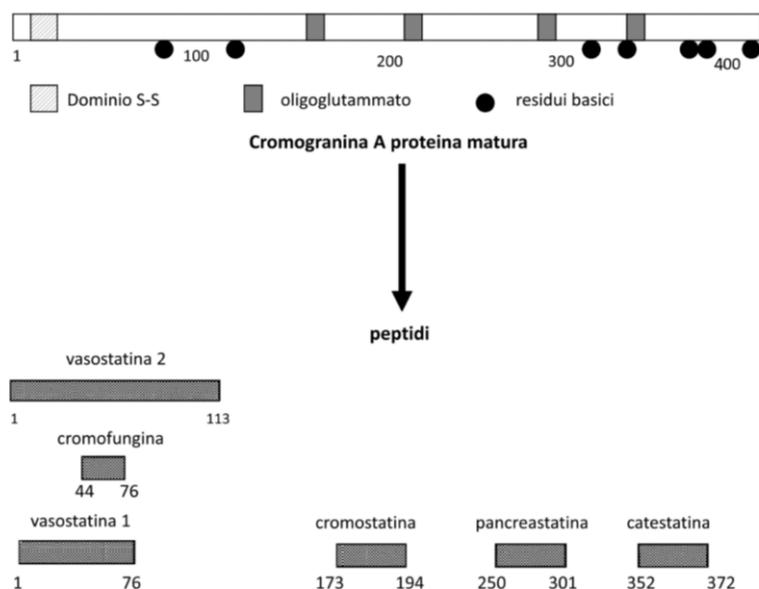


Figura 2. Cromogranina A e i principali peptidi da essa derivati per azione di differenti proteasi

In particolar modo, 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 è inoltre in grado di determinare un inotropismo negativo dose-dipendente mediante antagonismo di tipo funzionale non competitivo sulla stimolazione adrenergica del cuore di ratto (Cerra et al., 2006), manifestando assieme a questo effetto anche un’azione cardioprotettiva. Sebbene non si sappia nulla su come queste attività e gli eventi proteolitici siano coordinati a livello spazio-temporale, è ipotizzabile che sia le azioni sistemiche della CgA e sia quelle indotte dai peptidi che derivano da essa a livello di organi/tessuti (cuore e vasi), possano essere sinergicamente implicate nell'omeostasi circolatoria e possano coordinare e contrastare l’iperattività del sistema simpatico-adrenergico neuroendocrino (SAN) sia in condizioni normali che patologiche (Tota et al., 2014). Vale a dire, che questi peptidi possono funzionare come componenti di controllo “integrali” del sistema omeostatico “*zero steady-state error*” (originariamente applicato per CST e PST), secondo cui, due fattori regolatori agiscono in contrapposizione con risultato integrato (Koeslag et al., 1999). Pertanto, in seguito ad una perturbazione, tali membri riportano la variabile al valore di controllo.

## 1.2 AZIONI BIOLOGICHE DELLA CgA

*Azioni intracellulari della CgA:* Numerosi studi dimostrano che la CgA è coinvolta primariamente nel processo di “granulo-genesi”, cioè nel processo cellulare che conduce alla formazione e alla maturazione dei granuli di secrezione nelle cellule neuroendocrine (Kim et al., 2001; Kim & Loh, 2006). Infatti, la deplezione della CGA mediante *gene targeting* causa riduzione del numero, delle dimensioni e della densità elettronica dei granuli cromaffini adrenergici, come anche l'interruzione della secrezione del trasmettitore (Mahapatra et al., 2005). I meccanismi non sono definiti completamente, ma è sufficientemente accertato che la capacità delle molecole di CgA di aggregarsi in ambiente acido e di legare porzioni specializzate delle membrane cellulari (*lipid rafts*) costituiscano eventi necessari per la formazione di vescicole secretorie a livello della rete del trans-Golgi (Koshimizu et al., 2010). Una seconda azione biologica riferibile alla CgA è di intervenire nel controllo del calcio come secondo messaggero cellulare. Infatti, la proprietà della CgA di legare gli ioni calcio con alta capacità, ma con bassa affinità va a determinare all'interno del granulo un compartimento ad alta concentrazione di calcio che, tuttavia, diviene prontamente disponibile come messaggero a livello citoplasmatico, attraverso l'apertura, recettore mediato e inositol-3 fosfato dipendente, di specifici canali posti sulla membrana granulare (Kim et al., 2001; D'Amico et al., 2014).

*Azioni extra-cellulari della CgA:* Le azioni extra-cellulari della CgA sono complesse e diversificate e ancora ben lontane dall'essere comprese in maniera dettagliata. Al momento, gli studi sono incentrati nel definire un quadro fisiopatologico coerente sul ruolo della CgA e dei frammenti che da essa ne derivano. Sicuramente la CgA e, soprattutto, i peptidi derivati agiscono sia a livello autocrino/paracrino regolando l'attività delle cellule secernenti, che a livello endocrino intervenendo in maniera sistemica su numerosi biosistemi e apparati. Queste azioni riguardano principalmente la capacità da ormone/citochina del CgA di sottoporsi a un *cleavage* finemente regolato. Per quanto concerne l'azione biologica della CgA intatta, il suo ruolo principale sembra quello di regolare l'omeostasi vasale, mantenendo gli endoteli in uno stato quiescente. La perturbazione e il danno vasale inducono la proteolisi della CgA, dando luogo alla formazione di peptidi con azioni biologiche antagonistiche (Helle et al, 2007).

### **1.3 PROFILO CARDIOCIRCOLATORIO DELLA CgA FULL-LENGTH**

La CgA circolante (valori normali: 0,5-2 nM) (Helle et al., 2007; Crippa et al., 2013) aumenta in condizioni di stress derivanti da una sovrattivazione del sistema SAN e in condizioni fisiopatologiche, come ad esempio, infiammazione cronica, tumori neuroendocrini, sindromi coronariche acute e scompenso cardiaco cronico. I livelli plasmatici di CgA sono utilizzati come indicatori prognostici in queste condizioni (Helle et al., 2007; Angelone et al., 2012; D'amico et al., 2014). È importante notare che informazioni pertinenti sui livelli plasmatici di CgA e dei suoi peptidi derivati possono essere meglio ottenuti da studi sierologici (Crippa et al., 2013; Goetze et al., 2014). La lunga emivita della CgA *in vivo* (~18 min) e le sue concentrazioni circolanti relativamente elevate (anche in condizioni normali), riducono la possibilità di false misure e la gestione pre-analitica e le determinazioni finali (Nanes et al., 1989). Le concentrazioni plasmatiche della CgA aumentano fino a 10-20 nM (500-1000 ng/ml) in pazienti con ipertensione essenziale (Takiyyuddin et al., 1995), infarto del miocardio (Omland et al., 2003), insufficienza cardiaca acuta (Dieplinger et al., 2009), sindromi coronariche acute (Jansson et al., 2009), scompenso cardiaco cronico (Ceconi et al., 2002) e cardiomiopatia ipertrofica scompensata (Pieroni et al., 2007). Come inizialmente documentato da Ceconi e collaboratori (2002), i livelli circolanti della CgA sono significativamente paralleli alla gravità delle disfunzioni, e rappresentano un indice indipendente di mortalità. Di conseguenza, da un punto di vista clinico, la CgA sta ora emergendo come un potenziale nuovo biomarcatore diagnostico e prognostico cardiovascolare indipendente dai marcatori convenzionali.

Studi su gemelli hanno indicato che la concentrazione basale della CgA nel plasma è altamente ereditabile (Takiyyuddin et al., 1995). Paragonati a normotesi di pari età, i pazienti con ipertensione essenziale mostrano un aumento della CgA plasmatica e un incremento del rilascio della CgA immagazzinata in risposta alla stimolazione della midollare del surrene in seguito a ipoglicemia insulino-indotta (Takiyyuddin et al., 1995). Queste osservazioni confermano la correlazione tra la CgA e l'attività del sistema SAN. Una funzione rilevante della CgA è la regolazione della barriera endoteliale (Ferrero et al., 2004) e il rimodellamento vascolare conseguente a tumore (Veschini et al., 2011). Sia la CgA e sia la VS-1 sono potenti inibitori del fattore proangiogenico di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), così come della permeabilità delle cellule endoteliali indotta da trombina (Ferrero et al., 2004) e inibiscono le modificazioni sulle cellule

endoteliali provocate dal fattore di necrosi tumorale (TNF) (Ferrero et al., 2004; Dondossola et al., 2011). La somministrazione sistemica di CgA (1 µg) a topi con linfoma riduce potentemente la penetrazione, TNF-indotta, di un colorante sintetico (*blu patent*) nei tessuti con tumore (Dondossola et al., 2011), confermando le osservazioni precedenti, ovvero che la CgA può influenzare le interazioni ospite/tumore (Colombo et al., 2002).

Recentemente, Crippa e collaboratori (2013) hanno riportato nei soggetti sani, la presenza di livelli plasmatici biologicamente rilevanti di CgA *full-length*, di CgA 1-76 (antiangiogenica) e di frammenti privi della regione C-terminale (proangiogenici) e hanno dimostrato che la coagulazione del sangue scatena una conversione trombina-dipendente quasi completa della CgA circolante in frammenti privi della regione C-terminale. Questo rappresenta un nuovo ruolo della CgA come attivatore angiogenico che, in condizioni di angiogenesi perturbata (guarigione di ferite, cancro, ecc), può contribuire all'omeostasi circolatoria e vascolare attraverso effetti angiogenici opposti dei suoi frammenti (probabilmente VS-1 e CST) generati da proteolisi, strettamente regolata a livello spazio-temporale.

## 2 LA CATESTATINA

Nel 1988 Simon e collaboratori individuarono un frammento generato dalla proteolisi della CgA capace di inibire il rilascio di Catecolamine (CAs) da colture di cellule cromaffini di bovino. Ciò nonostante per circa dieci anni da quel momento l'identità di tale peptide rimase indefinita. Solo nel 1997 Malata e collaboratori riuscirono a 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 era in grado di inibire la secrezione catecolaminergica indotta dalla stimolazione colinergica nicotinicica sia su PC12 che su neuriti noradrenergici, tale peptide era il frammento CgA344-364, da allora definito CST 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 era specifica solo nei confronti del rilascio di CAs indotto dalla stimolazione nicotinicica 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 nicotinicico, come la depolarizzazione della membrana, lo ionoforo del calcio, l'alcalinizzazione delle vescicole secretorie (Mahata et al., 1997); allo stesso tempo, però, i recettori purinergici P2<sub>x</sub> delle PC12, che inducono secrezione in risposta all'ATP, non sono inibiti dalla CST (Lin et al., 1995). Poiché tali recettori appartengono alla stessa famiglia di recettori-canale (cationici attivati da ligandi extracellulari) cui appartiene il recettore nicotinicico, è stata suggerita una certa specificità della CST per questi ultimi. Difatti, la traduzione del segnale cationico ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) è selettivamente abolita dalla CST. Così come accade per i classici antagonisti nicotinicici, la CST blocca l'ingresso di  $\text{Na}^+$  nel citosol, stimolato dal recettore nicotinicico, bloccando parallelamente la secrezione delle CAs; inoltre, blocca anche l'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  dallo spazio extracellulare verso il citosol, ma solo se prodotto dall'attivazione nicotinicica colinergica (Mahata et al., 1997). Anche elevate dosi di nicotina non sono in grado di abolire tale effetto, suggerendo un antagonismo nicotinicico di tipo non competitivo (Mahata et al., 1997) per la CST, sebbene sia ancora oggetto di studio l'individuazione del suo esatto sito d'interazione a livello della proteina recettoriale. Poiché l'inibizione CST indotta è rapidamente e completamente reversibile, è 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 CST, sembra improbabile un'azione indiretta del peptide sul recettore nicotinic (Milligan, 1998).

La biogenesi della CST 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 ancora non propriamente chiari. La regione della CST all'interno della struttura primaria della CgA bovina è delimitata al N- e C-terminale da motivi (RXXR) riconosciuti dalla furina e ancora al C-terminale da un sito dibasico (RR). In particolare, i siti RXXR e RR del C-terminale sono molto conservati tra le specie di mammifero, mentre il sito RXXR al N-terminale è presente solo nella CgA bovina e in una particolare variante della CgA umana (Helman et al., 1998). È stato dimostrato che la plasmina, importante enzima fibrinolitico, in vitro è in grado di clivare la CgA, generando CST attiva sulla secrezione catecolaminergica di PC12 (Biswas et al., 2008); anche il coinvolgimento della 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 descritta come nuovo enzima proteolitico per i neuro peptidi (Yasothornsrikul et al., 2003; Funkelstein et al., 2008). Questi studi indicano che la CgA può essere substrato per l'attività della CTSL e che la stessa CST possa essere generata dall'intervento di tale enzima (Biswas et al., 2009). In ogni caso la sequenza amminoacidica della CgA, corrispondente alla regione della CST è altamente conservata nelle 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 CATESTATINA

La porzione di CgA bovina corrispondente alla CST biologicamente attiva è formata da due foglietti beta anti-paralleli connessi da un'ansa amminoacidica cationica (Tsigenly et al., 1998). Prima che la CgA sia sottoposta a clivaggio proteolitico, la regione della CST 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., 1998; Mahata et al., 1997). Inoltre, quando durante la proteolisi sono allontanate le sequenze di amminoacidi che fiancheggiano la CST, 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 Leu<sup>348</sup>, Phe<sup>350</sup>, Tyr<sup>355</sup>, Phe<sup>360</sup>, Pro<sup>370</sup>, Leu<sup>362</sup> e Leu<sup>364</sup> (Tsigenly et al., 1998). Sembra che questo centro idrofobico sia capace di mantenere stabilmente la conformazione tipica della CST (Tsigenly et al., 1998). Studi di mutagenesi, eseguiti sostituendo selettivamente particolari amminoacidi della struttura primaria della CST 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 IC<sub>50</sub> della CST, a dimostrazione del cruciale ruolo funzionale di questi residui di arginina (Tsigenly et al., 1998). In seguito è stato dimostrato che le tipiche azioni della CST 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 CST assume nello spazio è responsabile anche della carica positiva che la molecola reca a livello dell'ansa che congiunge i due foglietti beta. Quest'assetto suggerisce l'orientamento direzionale con cui il peptide potrebbe andare a interagire col dominio extracellulare, molto negativo, del recettore nicotinico (Tsigenly et al., 1997).

## 2.2 FUNZIONI DELLA CATESTATINA

### 2.2.1. INIBIZIONE DEL RILASCIO DELLE CATECOLAMMINE

La CST inibisce il rilascio delle catecolammine (CAs). Anche il NPY inibisce il rilascio di catecolammine, ma stimolato dalla depolarizzazione della membrana. La CST, oltre ad avere una potenza 10 volte maggiore rispetto al NPY, emerge come uno specifico e potente inibitore del rilascio di catecolammine nicotino-stimolato (Mahapatra et al., 2006). Diversi studi hanno dimostrato che la CST è un antagonista non competitivo di tale recettore (Mahata et al., 1999). Il recettore colinergico nicotinico (nAChR) appartiene alla famiglia dei recettore canale, complessi proteici intrinseci di membrana. Si tratta di un etero pentamero costituito da 4 sub unità diverse, presenti in un preciso rapporto stechiometrico, generalmente  $2\alpha$ ,  $1\beta$ , o  $1\epsilon$ ,  $1\gamma$  e  $1\delta$  (Gotti et al., 1997).

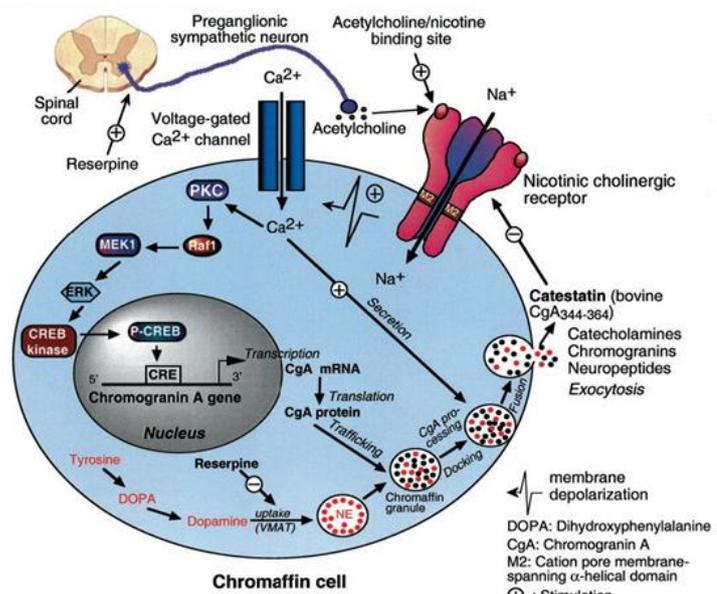


Fig.3: Azioni della CST in seguito ad interazione con il recettore

L'interazione dell'acetilcolina (ACh) con il recettore nicotinico induce una modificazione conformazionale che rende il poro del canale permeabile al  $Na^+$  (Fig.3). L'ingresso del  $Na^+$  nella cellula induce la depolarizzazione della membrana, che si traduce in un potenziale eccitatorio.

La depolarizzazione della membrana attiva i canali al  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti e l'ingresso del  $Ca^{2+}$  nella cellula. Questo ione è in grado di attivare la proteina chinasi K (PKC) la quale fosforila e attiva la proteina MAPK (miogeno 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 nicotino, 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 trasporto vescicolare per le CAs (Mahata et al., 2003). La CST non solo blocca il rilascio delle CAs, ma inibisce anche la risposta trascrizionale, dovuta allo stimolo nicotino, delle fibre simpatiche post-gangliari e delle cellule cromaffini della midollare del surrene (Mahata et al., 2003). Procedure più specifiche hanno consentito l'individuazione del preciso sito di legame e del tipo di antagonismo recettoriale. Le cellule leganti la CST marcata sono state trattate con concentrazioni crescenti di Carbamicolina, un agonista del recettore colinergico nicotino neuronale (nAChR) il quale, non riducendo l'entità del legame del peptide alla superficie cellulare, ha suggerito che il sito di legame per la CST potesse essere un sito distinto rispetto a quello dell'agonista; ciò è stato dimostrato anche da studi farmacologici nei quali la *nicotina* è stata incapace di contrastare l'effetto inibitorio tipico del peptide a qualunque concentrazione (Mahata et al., 1997). Inoltre la CST 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 anche dimostrato esponendo colture cellulari di PC12, trattate con Cts-<sup>125</sup>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 CST dalla superficie cellulare (Taupenot et al., 2000). Considerando che la sostanza P agisce mediante un legame diretto e non competitivo su un sito diverso da quello dell'agonista (Livett & Zhou, 1991) e che inibisce il legame della CST al recettore, si è concluso che i due peptidi potessero interagire con lo stesso sito del nAChR e che la CST potesse presentare un antagonismo non competitivo al pari della sostanza P. La CST presenta inoltre un'affinità maggiore per il recettore, come provato da valori di IC<sub>50</sub> inferiori rispetto a quelli della sostanza P (Mahata et al., 1997). Il sito di legame della CST rispetto a quelli di antagonisti nicotinici non competitivi di natura non peptidica e di piccole dimensioni come l'Esamentonio e la Clonidina, è diverso. Questi, penetrano all'interno del poro cationico per interagire con i domini a  $\alpha$ -elica M2 (Taupenot et al., 2000).

### **2.2.2 BLOCCO DELLA DESENSITIZZAZIONE**

I recettori nicotinici sono sottoposti a desensibilizzazione in caso di esposizione prolungata o ripetuta agli agonisti. La desensitizzazione del recettore nicotinic, fenomeno che denota la perdita della capacità di rispondere a particolari stimoli quando vi sia un'esposizione prolungata e/o ripetuta, è stata descritta per la prima volta nel 1988 da Katz e Thesleff a livello della placca neuro-muscolare. Poiché la CST e la sostanza P interagiscono, presumibilmente, con lo stesso sito sul nAChR, inibendo il rilascio catecolaminergico (Taupernot 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 (Livett & Marley, 1993). Infatti, studi condotti hanno confermato che la CST previene la desensitizzazione del recettore nicotinic con un'IC<sub>50</sub> di ~ 0,28 mM (Mahata et al., 1999). L'inibizione della desensibilizzazione da CST è stata specifica per il nAChR ed è di natura non competitiva rispetto all'agonista (Mahata et al., 1999). La desensibilizzazione del recettore nicotinic provoca una diminuzione dell'assorbimento di Na<sup>+</sup> (82%) che è marcatamente inibita dall'azione della CST, con un IC<sub>50</sub> ~ 0,28 mM. Si pensa che il blocco della desensibilizzazione del recettore nicotinic evocato dalla CST sul rilascio di catecolamine possa essere vantaggioso per un organismo, in particolare durante lo stress in quanto la CST potrebbe sostenere il rilascio delle catecolamine per contrastare la situazione di stress.

### **2.2.3 STIMOLAZIONE DEL RILASCIO DI ISTAMINA DAI MASTOCITI**

Studi condotti su ratti hanno dimostrato che la CST determina una potente vasodilatazione attraverso l'induzione del rilascio d'istamina la quale interagisce con i recettori H1, inducendo un aumento della produzione di ossido nitrico (NO). Mahata e collaboratori (2010) hanno dimostrato che il dominio N-terminale più attivo della CST (bCHGA 344-358) ha causato un rilascio concentrazione dipendente (0,01-5 µM) d'istamina dai mastociti peritoneali e pleurici con un'efficacia migliore rispetto ad altri peptidi, come la sostanza P e la neurotensina (Krüger et al., 2003). Poiché il rilascio di istamina CST-evocato è stato soppresso dalla tossina della pertosse si è ipotizzato il coinvolgimento di

una subunità  $G_i$  nel signaling della CST nel rilascio di istamina che è distinto dal meccanismo di inibizione del rilascio di catecolamine dalle cellule cromaffini.

#### **2.2.4 AZIONE CHEMIOTATTICA E ANGIOGENETICA**

La CgA, è 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-Treska et al., 1998, Lechner et al., 2004). In conformità a questi risultati, è stato ipotizzato che la CST potesse regolare la migrazione dei monociti. Coerentemente con questa ipotesi si è scoperto che la CST induceva una chemiotassi dose-dipendente in monociti, esercitando il suo effetto massimo a 1 nM, che è paragonabile alla dose inducente chemiotassi dei monociti di altre chemochine stabilite (Egger et al., 2008). A livello recettoriale la CST potrebbe agire attraverso una tirosin-chinasi e un recettore accoppiato a proteina G che coinvolge la sfingosina 1-fosfato. A livello post-recettoriale il peptide agirebbe attraverso la IP3K, lo NO e le proteine chinasi attivate da mitogeni. La valutazione degli effetti della CST in modelli animali con presenza di infiammazione o della malattia di Alzheimer è cruciale per determinare la rilevanza biologica chemiotattica della CST.

È stato ipotizzato che la CST bovina e il suo dominio attivo N-terminale (Cha34-358) possiedano attività antibatterica, sia per la capacità di attivare il rilascio d'istamina, con un ruolo paracrino ed endocrino nell'immunità, sia per la loro natura cationica, caratteristica tipica dei prodotti antibatterici. A causa della natura altamente cationica della CST, si è ipotizzato che la CST agirebbe come un peptide antibatterico. Il dominio N-terminale della CST (CgA<sub>344-358</sub>), induce inibizione della crescita di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, di una varietà di funghi filamentosi e di forme di lieviti (Takiyyuddin et al., 1993) senza mostrare attività emolitica.

Il peptide attraversa rapidamente la membrana cellulare, si accumula nella parte interna delle cellule ed agisce su target intracellulari. È stato dimostrato da Metz-Boutigue (1998) che la CST può penetrare nelle cellule polimorfo nucleate (PMN), assumendo così, un ruolo come nuovo membro di peptidi cellula-permeanti. Attraverso il pathway che coinvolge la fosfolipasi A2, calcio indipendente, e calmodulina regolato (Zhang et al.,

2009). Successivamente, è stata rilevata la CgA nei cheratinociti e il suo processamento nella pelle umana; essa penetra attraverso l'epidermide inducendo azioni inibitorie contro gli agenti patogeni della pelle. Questi risultati dimostrano un legame diretto tra il sistema neuroendocrino e quello immunitario. Il gruppo di Metz-Boutigue e Candolfi ha testato *in vitro* gli effetti della CST sulla crescita di *Plasmodium falciparum* e ha scoperto che la CST agisce come un potente inibitore del ceppo di *P. falciparum* sensibile alla chloquine, farmaco utilizzato per la prevenzione e per il trattamento della malaria (Akaddar et al., 2010). Si ritiene che la CST esercita attività antimalarica inattivando le aspartato proteasi che sono coinvolti nella degradazione dell' emoglobina della cellula ospite (Goldberg et al., 1990). Inoltre è stato osservato che i residui di serina a livello della porzione N-terminale della CST sono essenziali per l'inibizione massima della crescita del parassita della malaria. Una valutazione della concentrazione plasmatica di CST nei pazienti con infezione malarica potrebbe essere importante per identificare nella CST un ruolo protettivo. Recenti studi hanno dimostrato effetti angiogenetici. L'angiogenesi, la crescita di nuovi vasi dal sistema vascolare preesistente, è un processo importante in molte condizioni fisiologiche tra cui lo sviluppo embrionale e la guarigione delle ferite. Tuttavia, i difetti nella regolazione dell'angiogenesi spesso sfociano in condizioni patologiche come le malattie infiammatorie e ischemiche del cuore, malattie vascolari periferiche, retinopatia proliferativa, e tumori (Carmeliet, 2000). I fattori angiogenetici più potenti sono il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) e di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Oltre bFGF e VEGF, una varietà di neuropeptidi come la sostanza P (SP), a (SN), e neuropeptide (NP) Y possono esercitare effetti sulle cellule endoteliali (EC) e indurre angiogenesi (Ziche et al., 1994, Kirchmair et al., 2004). La CST condivide diverse caratteristiche con SP (Fung et al., 2010) e punti isoelettrici (pI) comparabili (CST, 12.16, contro SP, 11,14). Inoltre, la CgA è sovraregolata dall'ipossia in cellule neuronali dopo ipossia transitoria (Marti et al., 2001) una caratteristica tipica dei fattori angiogenetici come VEGF. Sulla base delle somiglianze della CST con peptidi angiogenetici, si denota come la CST esercita effetti su cellule endoteliali *in vitro* e induce l'angiogenesi *in vivo*. La CST è 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 CST induce angiogenesi durante il test della neovascolarizzazione della cornea di topo (Theurl et al., 2010).

### **2.2.5 AZIONI CARDIACHE DELLA CATESTASTINA**

L'azione cardiaca della CST (wild-type, CgA umana 352-372) e delle sue varianti naturali (CST-Gly364Ser e CST-Pro370Leu), è stata dimostrata per la prima volta da Angelone e collaboratori nel 2008. Utilizzando il cuore di ratto isolato e perfuso secondo il metodo Langendorff, sono stati valutati gli effetti cardiaci indotti dal peptide. La WT-CST in modo dose-dipendente (da 11 a 200 nM) diminuisce la pressione ventricolare sinistra (LVP, indice di contrattilità) e determina valori positivi e negativi della massima velocità di contrazione sistolica isovolumetrica (LVdP/dt), provoca un aumento della CP (pressione coronarica) e sopprime la vasodilatazione indotta dall'isoproterenolo; al contrario dilata le coronarie pre-costrette con endotelina-1 (ET-1) (Angelone et al., 2008), confermando la vasodilatazione promossa dalla somministrazione esogena di CST nell'uomo studiata da O'Connor e collaboratori (2002). Per quanto riguarda le due varianti della CST, è stato dimostrato che mentre la CST-Gly364-Ser è inefficace sulla performance basale, la CST-Pro370Leu esercita solo un'azione inotropica negativa (riduzione della contrattilità) contrastando gli effetti  $\beta$ -adrenergici (isoproterenolo-dipendenti) inotropi e lusitropici positivi con diverso ordine di potenza. Nel cuore isolato secondo metodo Langendorff (Angelone et al., 2012) e nel muscolo papillare di ratto (Bassino et al., 2011), la CST prima di determinare queste importanti azioni prolungate sul miocardio, induce un precoce e transitorio effetto inotropo positivo che scompare dopo 5 minuti dalla somministrazione. Questo effetto è mediato dall'istamina che agisce tramite il suo recettore H1 in linea con precedenti evidenze che suggeriscono che nel ratto l'attivazione del recettore H1 miocardico media un effetto isotropo positivo istamina-dipendente (Matura ET al., 2004). Il segnale della CST coinvolge i recettori adrenergici  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3, con più alta affinità per il primo, ma non coinvolge il recettore  $\beta$ 1, essendo influenzata dall'inibizione del recettore colinergico (Angelo ET al., 2008). È noto che il recettore adrenergico  $\beta$ 1, accoppiato a proteina Gs, è responsabile dell'isotropismo e lusitropismo positivi, mentre il recettore  $\beta$ 2, accoppiato principalmente a proteine Gi/o, è responsabile degli effetti opposti sulla contrattilità e rilassamento cardiaci (Xiao et al., 1999). Inoltre, la stimolazione del recettore cardiaco  $\beta$ 2-adrenergico associato a proteina Gi può attivare la PI3K (fosfatidil inositolo 3 chinasi) con conseguente inotropismo negativo (Yano et al., 2007).

È interessante notare che, una componente importante del segnale di trasduzione della CST è rappresentato dal pathway PI3K/Akt/eNOS/NO (PI3K/proteina chinasi B/ossido nitrico endoteliale sintasi/ossido nitrico) cGMP-dipendente. Ciò è confermato dal fatto che il blocco di PI3K inibisce l'inotropismo e il lusitropismo indotti dal peptide (Angelone et al., 2012). Il segnale della CST, dipende anche dallo NO endoteliale che a sua volta dipende dalla integrità funzionale dell'endotelio. Per analizzare ulteriormente il meccanismo di trasduzione della CST e delle sue varianti, Bassino e i suoi collaboratori nel 2011 hanno misurato la contrattilità nei muscoli papillari e la concentrazione di  $Ca^{2+}$  nei cardiomiociti isolati in condizioni basali e dopo stimolazione  $\beta$ -adrenergica, valutando la produzione di NO e la fosforilazione di eNOS (PSer1179eNOS) in cellule di cultura BAE-1. I loro dati mostrano che la CST in modo dose-dipendente (5-50 nM) riduce l'effetto della stimolazione  $\beta$ -adrenergica che non deriva da un'azione miocardica diretta del peptide, ma dal rilascio calcio-indipendente/PI3K-dipendente di NO dalle cellule endoteliali endocardiche. Coerentemente con questo, la CST sensibile alla Wortmannina, nelle cellule BAE-1, induce un aumento della produzione di NO calcio-indipendente e la fosforilazione di eNOS. È stato visto che la CST-Pro370Leu, ma non la CST-G364S-CST, esercita un effetto anti-adrenergico e un aumento del rilascio di NO paragonabile alla WT-CST. Nel meccanismo d'azione della CST sembrano essere implicati altri due targets. Uno è quello che coinvolge la PKG (proteina chinasi G), che comporta una diminuzione della contrattilità miocardica, riducendo il flusso di calcio attraverso i recettori L-type e riducendo l'affinità di legame della troponina-C per il  $Ca^{2+}$  (Angelone et al., 2012). L'altro target, invece, coinvolge la fosfodiesterasi di tipo 2 (PDE2) (Angelone et al., 2012). Angelone e collaboratori nel 2012 hanno dimostrato il coinvolgimento sia del fosfolambano (PLN) che della S-nitrosilazione della  $\beta$ -arrestina. La  $\beta$ -arrestina è implicata nella desensibilizzazione e internalizzazione dei recettori associati a proteine G (compreso il recettore adrenergico  $\beta$ 1), mentre la sua S-nitrosilazione accelera la desensitizzazione del recettore adrenergico  $\beta$ -1 (Ozawa et al., 2008). Il PLN controlla la pompa ATPasi per il calcio presente nel reticolo sarcoplasmatico (SERCA2a) con un meccanismo di fosforilazione/defosforilazione in modo che, quando il PLN è defosforilato inibisce la SERCA2a (Reddy et al., 1999), se fosforilato (in Ser16 da PKA, proteina chinasi A), attiva la SERCA2a (Schmidt et al., 2001). Così, il PLN e la S-nitrosilazione appaiono come i targets selettivi del rilascio dello NO indotto dalla CST, in grado di regolare il flusso e la

disponibilità di calcio a livello del reticolo sarcoplasmatico per la contrazione e il rilassamento cardiaco.

Penna e collaboratori (2010) hanno dimostrato che la CST, è anche in grado di indurre cardioprotezione se somministrata durante la fase iniziale della riperfusione nel cuore isolato, o se aggiunta durante l'ischemia in cellule isolate. La CST, somministrata come agente pre-condizionante, induce una minore riduzione delle dimensioni dell'area d'infarto e della contrattura post-ischemica rispetto alla CST-Post. Inoltre, solo la CST-Post migliora significativamente il recupero post-ischemico del parametro LVP (Penna et al., 2010). Di conseguenza, il peptide appare molto più cardioprotettivo come agente postcondizionante. Inoltre, attiva alcuni elementi del pathway RISK, inclusa la NOS, e può antagonizzare gli effetti adrenergici (Herrero et al., 2002; Angelone et al., 2008). Recentissimi studi hanno dimostrato che la CST-Post in cuori ipertrofici di ratti SHR è in grado di ridurre l'area d'infarto, di limitare l'apoptosi e di incrementare l'espressione di fattori pro-angiogenetici come HIF-1 $\alpha$  ed eNOS, effetti accompagnati dall'attivazione del pathway RISK e dalla S-nitrosilazione dei canali al Ca<sup>2+</sup>, che supportano il ruolo cardioprotettivo del peptide (Penna et al., 2014).

### **3 FATTORI ENDOTELIALI**

Vari fattori liberati dagli endoteli sono attivi sul sistema cardiovascolare. Tra questi il fattore endoteliale di rilasciamento, o endothelial derived relaxin factor (EDRF), identificato successivamente con il monossido di azoto o ossido nitrico (NO). Il nome fattore endoteliale di rilasciamento è stato inizialmente attribuito ad una allora non meglio identificata sostanza liberata dagli endoteli, necessaria affinché l'acetilcolina potesse esplicare la sua azione vasodilatatrice (Ignarro et al., 1997). Oggi lo NO è considerato uno dei più importanti mediatori dei processi biologici nel cuore e nei vasi sanguigni. Tuttavia, gli effetti biologici dello NO sono variabili. Poiché è un radicale libero, lo NO può reagire con un gran numero di molecole (Brune et al., 1995; O'Donnell et al., 1999) e per le sue caratteristiche di gas esso attraversa facilmente cellule e tessuti (Bredt et al., 2003). Nei sistemi biologici lo NO agisce come un importante messaggero intra- e inter-cellulare regolando numerosissime funzioni, in primis quella endoteliale vascolare. Infatti in seguito a stimolazione (meccanica o chimica), le cellule endoteliali producono lo NO che, in parte diffonde nel compartimento ematico, riducendo l'aggregazione piastrinica e l'adesività dei

leucociti alle pareti dei vasi sanguigni (effetto antitrombotico) e, in parte raggiunge la sottostante muscolatura liscia vascolare inducendo rilassamento. D'altronde i famosi nitriti e la nitroglicerina sublinguale, ampiamente usate come anti-anginosi decenni prima della scoperta dello NO, sono in realtà dei donatori di questo mediatore ed è relativamente recente la messa a punto delle nitro-aspirine, derivati "nitrati" dell'acido acetilsalicilico in grado di rilasciare lo NO a livello periferico. Rimanendo nell'ambito della farmacologia cardiovascolare, giova anche sottolineare che il *sildenafil* agisce "prolungando" la durata d'azione dello NO a livello dei corpi cavernosi dell'organo genitale maschile, contribuendo in questo modo a migliorare la funzione erettile, variamente compromessa nell'impotenza maschile (Cashen et al., 2002). Oltre all'effetto primario sull'endotelio, allo NO è riconosciuto un ruolo determinante di mediatore biochimico in numerose funzioni. Nel sistema nervoso centrale e nei plessi nervosi periferici non adrenergici e non colinergici dell'albero bronchiale, lo NO funge da neurotrasmettitore provocando un possibile effetto broncodilatatore-antiasmatico e, a livello cerebrale, volge un ruolo importante nel controllo dell'apprendimento e della memoria (Prast et al., 2001); nel tratto gastrointestinale modula la secrezione e la motilità e, a livello renale, conduce ad un'autoregolazione del flusso ematico (Ichihara et al., 1998). In quanto radicale, lo NO è capace di distruggere la membrana plasmatica degli agenti microbici ed è quindi attribuita allo NO un'importante funzione di difesa nei confronti delle infezioni batteriche e probabilmente, nel controllo della crescita dei tumori (Hibbs et al., 1988).

Studi recenti hanno inoltre dimostrato che lo NO ha un'azione stimolante nei confronti della mitocondriogenesi, cioè nella sintesi di nuovi mitocondri (Aquilano et al., 2015). A causa della sua emivita molto breve l'NO è in grado di agire solo in prossimità delle cellule che lo producono e per questo motivo si ritiene che questo gas debba essere considerato un fattore autocrino e paracrino.

Poiché in condizioni fisiologiche lo NO è ossidato a  $\text{NO}^{-2}$  e  $\text{NO}^{-3}$ , non è richiesto nessun meccanismo separato per la sua distruzione (Denninger et al., 1999). Tuttavia, a basse concentrazioni di NO e in assenza di proteine e metalli che contribuiscano alla sua distruzione, la sua decomposizione è molto lenta (Lewis & Deen, 1994).

### 3.1 CLASSIFICAZIONE DELLE OSSIDO NITRICO SINTASI

Lo NO è un semplice gas biatomico sintetizzato da una famiglia di enzimi chiamati NO sintasi (NOS) (Singh et al., 1997; Schulz et al., 2004). Identificate e descritte per la prima volta nel 1989, le NOS, costituiscono da anni un campo di indagine di notevole importanza nel settore della ricerca. Tra il 1991 e 1994 sono state purificate e clonate le tre principali isoforme di questi enzimi, ma solo dopo anni di studio, nel 1998, con l'assegnazione del premio Nobel a Furchgott, Ignarro e Murad, si riconobbe il ruolo fisiopatologico che tali enzimi rivestono nell'organismo umano, principalmente per la produzione dello NO. La NOS ha una struttura dimerica; ogni monomero contiene un dominio ossigenasico e un dominio reduttasico (Fig 4). Il dominio N-terminale è quello ossigenasico e contiene siti di legame per l'eme, la tetrabioperidina (BH<sub>4</sub>), (BH<sub>4</sub> è fondamentale per l'espressione dell'attività di NOS ) e L-arginina (Tayeh et al., 1989). Il dominio ossigenasico è legato al dominio reduttasico C-terminale attraverso un sito di riconoscimento della calmodulina (CaM). Il dominio reduttasico porta siti di legame per flavinadenindinucleotide (FAD), flavinmononucleotide (FMN) e nicotinamide adenin-dinucleotide fosfato (NADPH).

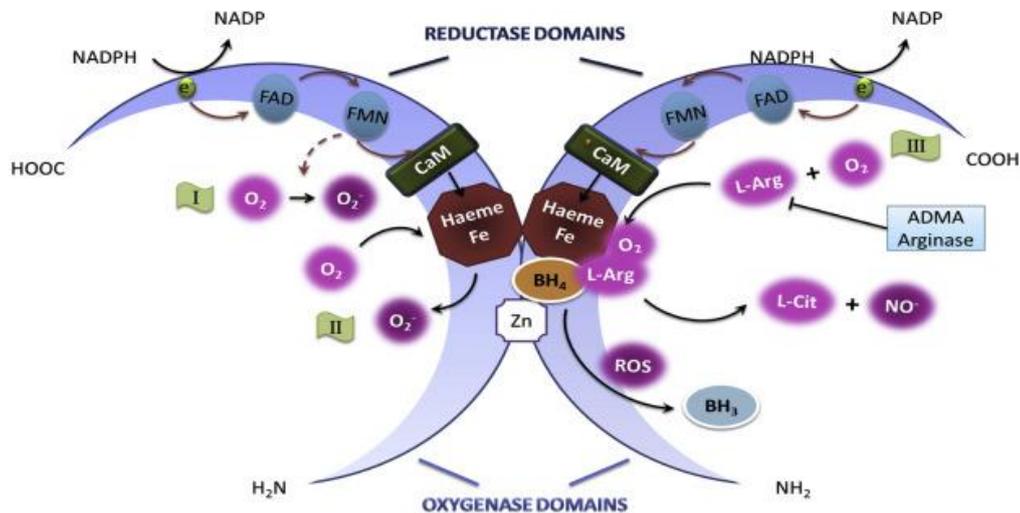
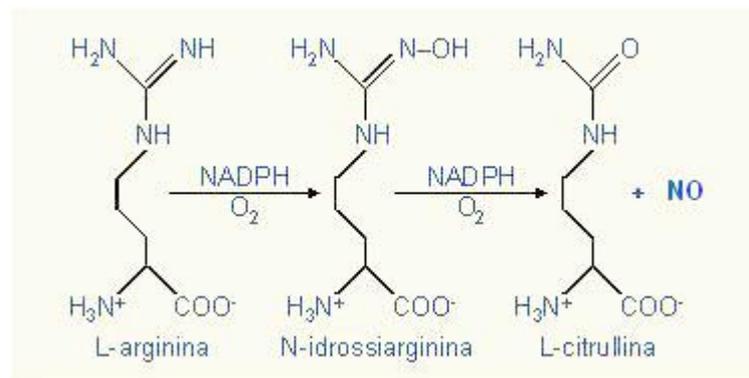


Figura 4: Omodimeri di ossido nitrico sintasi (NOS). (I) Come monomero, NOS produce  $O_2^-$  invece di  $NO^-$  (II) Come omodimero, una significativa quota di  $O_2^-$  aumenta quando le concentrazioni di L-arginina (L-Arg) scendono al di sotto dei livelli necessari per saturare l'enzima; (III) quando presenti la L-arginina e la tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) si legano per interagire con la NOS. Il flusso di elettroni fornito dal NADPH passa attraverso la flavina adenina dinucleotide (FAD), la flavina mononucleotide (FMN), la calmodulina (CaM), giunge alla protoporfirina IX e alla fine viene utilizzato nella produzione di NO. La BH<sub>4</sub> è essenziale per l'accoppiamento NOS e per le specie reattive dell'ossigeno (ROS). La sua ossidazione nella forma radicalica BH<sub>3</sub>, porta al disaccoppiamento della NOS.

Il ruolo dei cofattori flavinici è di accettare gli elettroni dal NADPH e di cederli all'eme. Probabilmente questo è il punto di controllo su cui agisce la CaM attraverso un effetto cinetico (Stuehr et al., 1991). L'eme è il punto finale di cessione degli elettroni. Le isoforme delle NOSs sono del tutto diverse tra loro, prodotti da geni differenti con diversa localizzazione, regolazione, proprietà catalitiche e sensibilità agli inibitori vale a dire, la NOS neuronale (nNOS, NOS-1), la NOS inducibile (iNOS, NOS-2) e la NOS endoteliale (eNOS, NOS-3). La CaM è necessaria per l'attività enzimatica di tutte tre le isoforme di NOS.

La dipendenza dal calcio della sintesi di NO distingue le tre isoforme di NO: nNOS ed eNOS hanno una richiesta di calcio molto più grande di quella di iNOS. Il legame della CaM aumenta la velocità di trasferimento degli elettroni dal NADPH alle flavine del dominio reduttasico e dal centro reduttasico all'eme.

L'enzima catalizza la seguente reazione:



La scarsa disponibilità o assenza del substrato (L-arginina), una riduzione di co-fattori, come la tetraidrobiopterina, si traduce nel disaccoppiamento della NOS, portando alla produzione di anione superossido e  $\text{H}_2\text{O}_2$  a scapito dello NO (Chen et al., 2008). Ciò può spiegare i risultati paradossali nelle cellule sottoposte a stress ossidativo (una causa importante di disaccoppiamento della eNOS) in caso di aumento dell'espressione di eNOS che viene osservato senza concomitante aumento della produzione di NO.

### 3.1.1 *nNOS*

La *nNOS* produce NO sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico e quindi svolge un ruolo nella comunicazione cellulare (Bredt et al., 1990; Dawson et al., 1991; Toda et al., 2012). Lo NO prodotto da *nNOS* è implicato nella regolazione dell'eccitabilità neuronale, nel potenziamento a lungo termine o nella depressione della plasticità sinaptica, così come nella memoria e nei processi di apprendimento. Inoltre, lo NO prodotto da *nNOS* regola il rilascio di neurotrasmettitori come acetilcolina, l'istamina e serotonina (Prast et al., 2001, Straub et al., 2007). *nNOS* si esprime anche nei miociti cardiaci e scheletrici (Xu et al., 1999, Kobzik et al., 1994), nelle cellule muscolari lisce e cellule endoteliali (Bachetti et al., 2004), lo strato avventiziale di arterie del pene (Burnett et al., 1992), e nelle cellule della macula densa nel rene (Bachmann et al., 1995). Nelle arterie dei topi spontaneamente ipertesi (SHR), ma non in ratti normotesi Wistar-Kyoto (WKY), *nNOS* è espressa nelle cellule della muscolatura liscia e la sua attivazione è stimolata in parte dall'angiotensina II. L'ipossia acuta aumenta l'espressione di *nNOS* ma riduce la sua attività a causa di una riduzione del substrato, mentre l'ipossia cronica induce un aumento della sintesi e dell'attività di *nNOS* che attenuano l'ipossia indotta dalla vasocostrizione (Semenza et al., 2005, Ward et al., 2005).

### 3.1.2 *iNOS*

L'espressione/ presenza della *NOS inducibile* è minima in condizioni fisiologiche. Questa isoforma è calcio-insensibile e produce continuamente NO una volta che è espressa (Gross et al., 1991). L'induzione della *iNOS* si verifica principalmente durante un'infezione, un'inflammatione cronica e nei tumori (Kröncke et al., 1998). L'attivazione di *iNOS* richiede il fattore di trascrizione legante i promotori dei geni dell'interferone di tipo I e del nuclear factor kappa-light-chain-enhancer (NF- $\kappa$ B) e questo spiega perché l'espressione di *iNOS* è caratteristica dell'inflammatione (Kamijo et al., 1994; Martin et al., 1994; Xie et al., 1994; Zamora et al., 2000; Morris et al., 2003; Lowenstein et al., 2004; Suschek et al., 2004; De Stefano et al., 2006). Mentre nel caso delle *NOS* costitutive l'azione dello NO si manifesta quasi immediatamente dopo lo stimolo, nel caso della *iNOS* l'azione dello NO compare tardivamente (dopo almeno 3 ore dallo stimolo iniziale) e può durare oltre 24 ore.

La comparsa ritardata della iNOS è dovuta al fatto che l'enzima non si trova preformato, ma deve venire sintetizzato. La produzione di iNOS in cellule muscolari lisce vascolari in seguito ad esposizione a citochine pro-infiammatorie è una delle principali cause di ipotensione, cardiodepressione e iporeattività vascolare nello shock settico (Schini et al., 1991; Kirkebøen et al., 1999; Sharshar et al., 2003; Spink et al., 1995) infatti l'attivazione della iNOS e la corrispondente produzione di NO avvengono in modo massivo nello shock settico e possono portare a morte del paziente in seguito a grave e irreversibile caduta della pressione arteriosa (Kirkebøen et al., 1999).

La iNOS è un enzima ad alto rendimento e genera fino a 1000 volte di più NO rispetto alla eNOS (Goldenbaum et al., 1993). Lo NO, iNOS-derivato può portare a effetti nocivi, non a causa delle azioni dirette dello NO *per sé*, ma piuttosto per aumenti di concentrazione di NO che diventa disponibile per reagire con il radicale superossido ( $O_2^-$ ), legame questo che porta alla formazione del radicale perossinitrito ( $ONOO^-$ ) altamente nocivo e, più a valle, di ulteriori derivati quali nitrili e idrossili (SoRelle et al., 1998).

### 3.1.3 eNOS

Rappresenta la principale isoforma e la sua attività è importante per la regolazione della funzione vascolare (Zhang et al., 2011) L'attività della eNOS, e quindi la produzione di NO può essere avviata/rafforzata da diversi stimoli (Fig. 5) (Dimmeler et al., 1999) come l'acetilcolina, (Chen et al., 1996; Xu et al., 1996; Cohen et al., 1997; Kellogg et al., 2005), la bradichinina (Davisson et al., 1996; Danser et al., 1998; Coppo et al., 2000; Bae et al., 2003), l'istamina (Mannaioni et al., 1997; Kishi et al., 1998; Lantoiné et al., 1998; Li et al., 2003; Mondillo et al., 2009) il 17 $\beta$ -estradiolo (Caulin-Glaser et al., 1997; Nekooeian et al., 1998; Chen et al., 1999; Selles et al., 2001; Miyazaki-Akita et al., 2007).

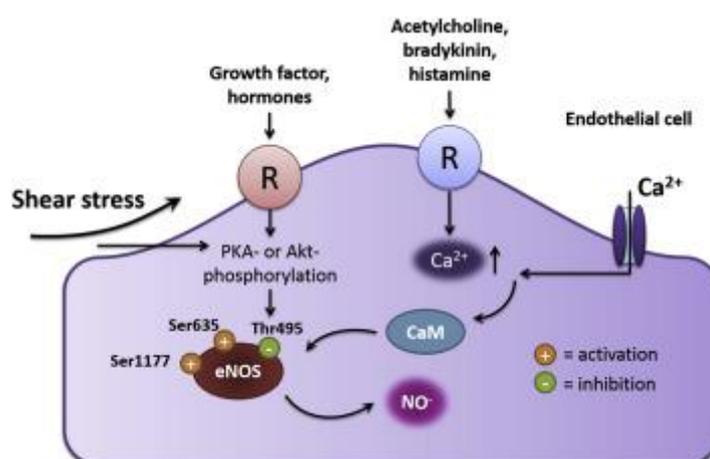


Figura 5: Stimoli che attivano e/o disattivano la eNOS

Agonisti, come acetilcolina, bradichinina e istamina, agiscono sui recettori specifici sulla membrana delle cellule endoteliali per indurre aumenti della concentrazione intracellulare di calcio, che si lega alla calmodulina e porta all'attivazione del dominio di legame della calmodulina alla eNOS (Fig. 4) (Kuchan et al., 1994; Hall et al., 1997; Walch et al., 2000; Parsons et al., 2006). D'altra parte, la fosforilazione di eNOS indipendentemente dalla concentrazione di calcio è anche importante per l'attivazione dell'enzima perché facilita il flusso attivo degli elettroni dal dominio reduttasico al dominio ossigenasico (Sessa, 2004).

La fosforilazione è una modificazione post-traslazionale, che aggiunge un fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) che a sua volta, viene rimosso dalla fosfatasi (Butt et al., 2000). Questa modificazione altera l'attività di eNOS e la fosforilazione di vari residui amminoacidici può indurre differenti effetti opposti (Kolluru et al., 2010). Così, per eNOS, il residuo Ser1177 (o Ser1179 seconda delle specie) rappresenta un sito di attivazione mentre il residuo Thr495 rappresenta un dominio inibitorio. Protein-chinasi A (PKA) e proteine chinasi B (Akt) attivano eNOS fosforilando la Ser1177 in risposta a vari stimoli (Dimmeler et al., 1999; Chen et al., 1999). Al contrario, il perossido di idrogeno e la bradichinina attivano la eNOS per produrre NO fosforilando la Ser1177 e defosforilando la Thr495 (Harris et al., 2001; Thomaset al., 2002). Aumenti di rilascio di NO indotto da un aumento dello shear stress e del  $17\beta$ -estradiolo sono dovuti principalmente a questo pathway calcio-indipendenti (Dimmeler et al., 1999; Caulin-Glaser et al., 1997; Kuchan et al., 1994). In particolare, lo shear stress induce la fosforilazione di eNOS in Ser1179 e Ser635 in maniera PKA-dipendente (Boo et al., 2000).

### **3.2 LOCALIZZAZIONE INTRACARDIACA DELLE NOS**

Malgrado i termini nNOS, ed eNOS facciano pensare ad una presenza ben localizzata dei due enzimi, è stato col tempo visto che sia la nNOS che la NOS possono essere presenti in tessuti diversi da quello in cui sono state inizialmente riscontrate. Così, mentre negli endoteli è stata rinvenuta solo la eNOS, nei cardiomiociti sono presenti tutti e tre i tipi di enzimi (Balligand et al., 1997).

La funzione contrattile è influenzata dalla quantità di NO; a basse dosi (submicromolari), sembra che ci sia un piccolo effetto inotropo positivo, mentre a più alte concentrazioni (micromolare o superiore) le dosi hanno effetti inotropi negativi (Mohan et al., 1995; Shah et al., 2000). Di conseguenza, gli effetti biologici dello NO nel cuore possono variare notevolmente a seconda di quale isoforma della NOS sia attivata e della quantità di NO rilasciato. Ciò è ulteriormente aggravato dall'espressione differenziale delle isoforme NOS in vari tipi di cellule cardiache: l'espressione di eNOS è più alta nell' endocardio e nelle cellule endoteliali microvascolari cardiache (Vanhoutte et al., 2009), mentre l'espressione di iNOS ha dimostrato di essere relativamente più elevato nei cardiomiociti.

La stimolazione Beta-adrenergica di cuori di topi knockout eNOS - / - induce effetti inotropi positivi, mentre nei cuori di Topi knockout nNOS - / -, sono stati osservati effetti inotropi negativi (Barouch et al., 2002). Il meccanismo alla base di questi effetti paradossali dello NO è dovuto alla posizione subcellulare di queste due isoforme della NOS (Bredt et al., 2013). Pertanto, la localizzazione spaziale delle specifiche isoforme della NOS in distretti distinti nelle cellule cardiache ha importanti implicazioni per gli effetti dello NO sulla funzione contrattile (Fig.6).

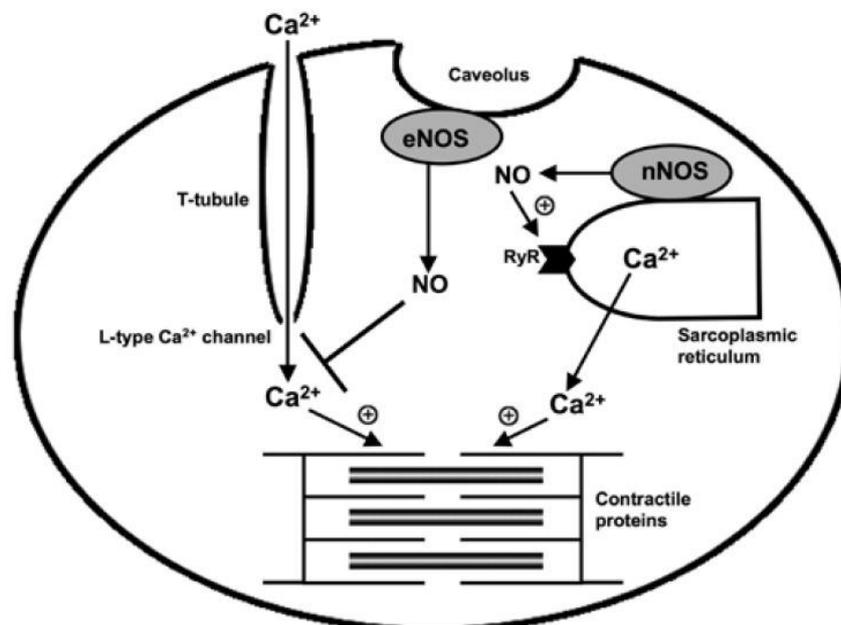


Figura 6: Nel cardiomiociti, eNOS associata alle caveole e ai canali del calcio di tipo L, induce inibizione del rilassamento. D'altra parte, nNOS associata al reticolo sarcoplasmatico (SR) e ai recettori rianodinici (RyR), induce aumento del rilascio del calcio necessario per l'avvio della contrazione muscolare.

Nei cardiomiociti, la eNOS è associata intimamente con le caveole che sono i centri specializzati nell'attività di segnalazione, associate ai recettori  $\beta$ -adrenergici e canali al  $\text{Ca}^{2+}$  L-type. La co-localizzazione di eNOS, con i recettori  $\beta$  e canali al  $\text{Ca}^{2+}$  permette allo NO eNOS-generato di avere una poca distanza di diffusione per attivare i suoi bersagli molecolari (Barouch et al., 2002). Il risultato netto di questa interazione è un effetto inotropo negativo, dal momento che lo NO impedisce l'apertura del canali  $\text{Ca}^{2+}$  e quindi l'inibizione dell'effetto inotropo positivo  $\beta$ -adrenergico indotto.

La nNOS è localizzata sul reticolo sarcoplasmatico (SR) e in prossimità dei recettori rianodinici (RyR); pertanto lo NO- nNOS generato può facilmente attivare i recettori RyR per rilasciare  $\text{Ca}^{2+}$  dal SR e causare un effetto inotropo positivo, mediando così un effetto sulla funzione contrattile del miocardio (Barouch et al., 2002).

Lo NO contribuisce alla regolazione della contrazione del miocardio e alla sua protezione nel pre- e post-condizionamento ischemico. Diversi studi hanno chiarito il suo ruolo nello scompenso cardiaco e nel limitare il rimodellamento ventricolare sinistro (Dawson et al., 2005; Godecke et al., 2001). Lo NO induce vasodilatazione mediante una riduzione della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, causata dal pathway che coinvolge la guanilato ciclasi (GC) e la PKG. L'attivazione della GC da parte dello NO porta alla formazione del cGMP che, a sua volta, attiva la PKG, la quale è in grado di fosforilare proteine target, come il PLN e le  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico, proteine del miocardio coinvolte nell'omeotasi del  $\text{Ca}^{2+}$ . Questo pathway è di fondamentale importanza per la vasodilatazione poichè inibisce l'idrolisi del fosfatidil-inositolo e la mobilitazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare. Inoltre, il pathway NO-cGMP-PKG contrasta la vasocostizione indotta dall'attivazione dei recettori dell'endotelina, dell'angiotensina II e della vasopressina (Tang et al., 2003).

La figura 7 mostra come lo NO vada ad influenzare l'inotropismo cardiaco inducendo la produzione di cGMP, il quale, a basse concentrazioni, inibisce l'attività della fosfodisterasi III (PDE III), impedendo così l'idrolisi del cAMP e consentendo il suo accumulo nelle cellule (Kojda, 2001; Kojda et al., 1996). Inoltre, basse concentrazioni di NO possono attivare l'adenilato ciclasi (AC), con conseguente formazione del cAMP che, accumulandosi nella cellula, attiva la proteina chinasi A (PKA), responsabile dell'apertura dei canali al  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti del sarcolemma e del recettore della rianodina

(Ry/R) del reticolo sarcoplasmatico, dunque dell'aumento della contrazione del miocardio (Marx et al., 2000).

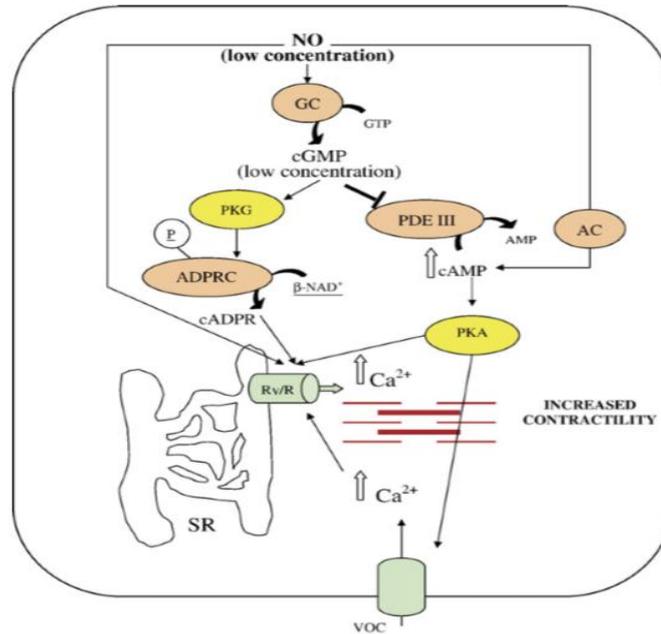


Figura 7. Effetto inotropo positivo di basse concentrazioni di NO. L'apertura dei VOC del sarcolemma da parte della PKA e dei canali Ry/R da parte della PKA e del cADPR induce un incremento del  $Ca^{2+}$  intracellulare, con conseguente effetto inotropo positivo.

La figura 8 illustra come il cGMP può chiudere i canali del  $\text{Ca}^{2+}$  mediante l'attivazione della PKG. Questo pathway è attivato da una elevata produzione di cGMP in risposta ad alte concentrazioni di NO ed è responsabile dell'effetto inotropo negativo. Alte concentrazioni di NO possono indurre una riduzione della contrazione del miocardio anche attraverso un pathway cGMP-indipendente che consiste nella riduzione della respirazione mitocondriale nei miocardiociti.

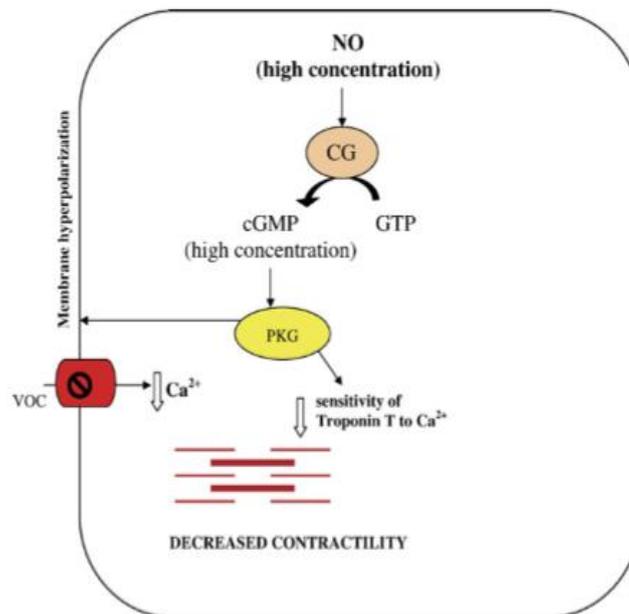


Figura 8. Effetto inotropo negativo di elevate concentrazioni di NO e di cGMP. La PKG induce una iperpolarizzazione di membrana che chiude i canali al  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti e riduce la sensibilità della troponina al  $\text{Ca}^{2+}$ , entrambi gli effetti sono responsabili dell'inotropismo negativo.

#### **4 REGOLAZIONE INTRINSECA ETEROMETRICA: LA LEGGE DI STARLING**

La risposta cardiaca ai cambiamenti di ritorno venoso e di riempimento ventricolare è intrinseca al cuore e non dipende da meccanismi neuroumorali estrinseci, anche se tali azioni possono modificare la risposta cardiaca intrinseca. La *capacità del cuore di modificare la sua forza di contrazione e, pertanto, la gittata sistolica in risposta ai cambiamenti di ritorno venoso* è definita meccanismo di *Frank-Starling* (o legge di Starling del cuore) (Starling et al., 1926). In condizioni fisiologiche, la risposta del miocardio a un allungamento è bifasica e comporta un rapido (entro un battito) aumento dell'inotropismo cardiaco cioè, la risposta Frank-Starling, che è seguita da un lento aumento anche se meno pronunciato della forza di contrazione, cioè, *l'effetto Anrep*.

Il rapido aumento della contrazione si verifica a causa di un incremento, lunghezza-dipendente, della formazione dei ponti trasversi e dall'aumento della sensibilità al  $\text{Ca}^{2+}$  dei miofilamenti mentre l'aumento lento che segue è associato a un incremento delle concentrazioni intracellulari  $\text{Ca}^{2+}$  (Calaghan & White et al., 1999). Per spiegare perché la distensione delle fibre miocardiche ne faccia aumentare la forza di contrazione, sono state formulate alcune ipotesi. La prima ipotesi considera la posizione di filamenti spessi di miosina e dei filamenti sottili di actina nel sarcomero. Affinché si possa avere il massimo sviluppo di forza, è necessario che le due linee Z possano essere tratte verso il centro del sarcomero in modo da avere una sovrapposizione ottimale tra actina e miosina. Come si può notare dalla figura 9, il massimo sviluppo di forza avviene solo se la lunghezza di riposo della fibra non è troppo breve, quindi tutti i ponti trasversi rivolti verso le due estremità del sarcomero potranno inserirsi sui filamenti sottili del lato verso cui sono rivolti, cosicché sullo stesso filamento sottile, potranno inserirsi anche i ponti trasversi del lato opposto. Se lo stiramento della fibra provoca un allungamento del sarcomero, tutti i ponti trasversi potranno inserirsi nel modo più appropriato per sviluppare la massima forza. Una sovrapposizione ottimale dei filamenti spessi e sottili è raggiunta quando il sarcomero ha una lunghezza compresa tra 2.0-2.2  $\mu\text{m}$ . A lunghezze superiori, la tensione decade e la sovrapposizione tra i miofilamenti diminuisce con meno opportunità di formazione di ponti trasversi.

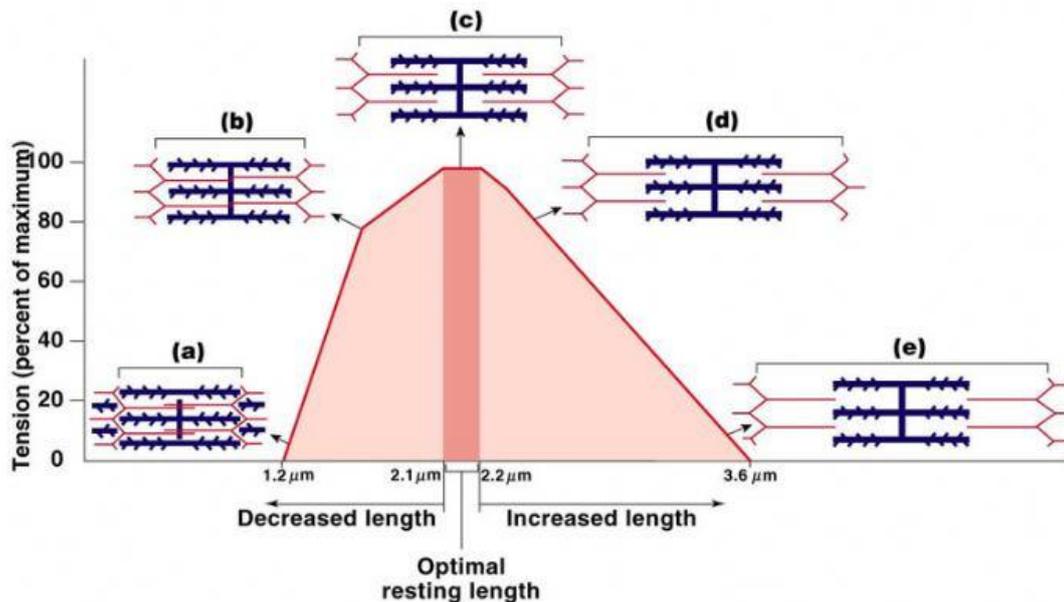


Figura 9: Possibili posizioni dei miofilamenti per il meccanismo Frank-Starling

Tutto ciò indica che più il miocardio è stirato dal riempimento, più alta sarà la sua forza di contrazione e la quantità di sangue pompata (Gordon et al., 2001; Kobayashi & Solaro, 2005).

Un'altra ipotesi che può spiegare il meccanismo di Starling è l'aumento dell'affinità del  $\text{Ca}^{2+}$  per la troponina C in seguito ad aumenti delle concentrazioni intracellulari dello ione. In assenza di  $\text{Ca}^{2+}$  la tropomiosina che è legata al complesso delle troponine T, I e C, impedisce il legame tra actina e miosina. Quando il  $\text{Ca}^{2+}$  lega la troponina C, legata a sua volta alla troponina I, permette alla tropomiosina di spostarsi lungo il filamento di actina consentendo alle teste della miosina di formare i ponti trasversi con l'actina (Gordon et al., 2001). La terza ipotesi consiste nell'attivazione della nNOS che sintetizza lo NO in risposta allo stiramento della fibra (Zhang et al., 2009). La nNOS localizzata tra i tubuli trasversi e le cisterne del reticolo sarcoplasmatico (Casadei e Sears, 2003; Khan et al., 2003; Massion e Balligand, 2003), una volta attivata, produce lo NO il quale a sua volta stimola l'apertura dei canali rianodinici per il  $\text{Ca}^{2+}$  con conseguente aumento della sua concentrazione intracellulare. Questo pathway suggerisce che il meccanismo di Frank-Starling, almeno in parte, può essere mediato dal rilascio di NO (Casadei and Sears, 2003; Pelat et al., 2005).

Lo stretch può inoltre stimolare nei miocardiociti l'eNOS localizzata in prossimità dei tubuli T del sarcolemma e la nNOS presente sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico. Lo NO prodotto mediante eNOS ed nNOS apre i canali Ry/R, così da indurre un aumento della forza di contrazione. L'eNOS è implicata sia nella risposta rapida (Frank - Starling) che lenta (Anrep) in seguito ad uno stiramento della fibra. Fisiologicamente, l'effetto Anrep costituisce un potente meccanismo attraverso il quale il cuore si adatta a un brusco aumento del post-carico, che avviene dopo l'attuazione della legge di Frank-Starling. È un esempio di autoregolazione omeometrica per cui il cuore aumenta le prestazioni meccaniche nel battito in seguito ad un aumento improvviso della pressione aortica. Gleb Von Anrep dimostrò nel 1912 che un'occlusione dell'aorta discendente toracica, induceva un aumento della pressione sistolica, mentre riduceva la gittata. Essendo però l'aumento della pressione, superiore a quello della diminuzione della gittata sistolica, il lavoro per battito risultava aumentato. Lo stiramento meccanico prolungato stimola il rilascio di angiotensina II (Ang II) dal miocardio ventricolare, che, a sua volta, contribuisce all'effetto Anrep *tramite* un meccanismo che comporta il rilascio di endotelina 1 (ET-1) (Pérez et al., 2001; Calaghan et al., 2001). È stato postulato che un aumento  $Ca^{2+}$  in entrata tramite lo scambiatore  $Na^+-Ca^{2+}$  (NCX) dopo l'attivazione del trasportatore  $Na^+-H^+$  (NHE) può svolgere un ruolo importante nel mediare l'effetto Anrep (Pérez et al., 2001; von Lewinski et al., 2004).

***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, il preparato di cuore di ratto isolato e perfuso secondo la metodica Langendorff. Si tratta di una metodica che, grazie alle condizioni di perfusione che riflettono molto da vicino l'emodinamica cardiaca dell'animale in vivo, si presta agevolmente a studi fisiofarmacologici. I vantaggi sostanziali di questo modello sperimentale consistono nella possibilità di valutare gli effetti cardiovascolari diretti di numerose sostanze in termini di funzione contrattile, di attività elettrica e di funzione metabolica; nella possibilità di eseguire studi di dosaggio di 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 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). La metodica, che utilizza il preparato del cuore di ratto isolato e perfuso per indagare l'attività meccanica cardiaca, fu messa a punto per la prima volta nel 1897 da Oscar Langendorff, medico e fisiologo tedesco. I suoi primi esperimenti sono stati condotti per lo più utilizzando cuori di gatto, ma anche di cane e coniglio.

La metodica ha subito modifiche e miglioramenti nei decenni successivi e a oggi rientra pienamente tra le metodiche d'elezione per lo studio della fisiologia cardiovascolare.

Il principio di base del cuore isolato e perfuso secondo Langendorff è l'impiego della perfusione retrograda del cuore mediante incannulazione dell'aorta, che permette di valutare l'attività del cuore intatto, il quale, in opportune condizioni di ossigenazione, perfusione e temperatura, presenta la sua classica auto ritmicità miogena. Durante la perfusione retrograda, trovando chiusa la valvola aortica, il perfusato è dirottato nelle arterie coronariche e attraverso il sistema vascolare coronarico, fuoriesce dal seno coronarico che si apre nell'atrio destro e nell'arteria polmonare. In teoria se non vi è sfondamento delle valvole aortiche, le cavità cardiache rimangono vuote durante tutta la riperfusione. Benché l'attività cardiaca non risenta dell'influenza di altri organi, della

circolazione sistemica, del controllo nervoso centrale e autonomo che la ricondurrebbero a situazioni più reali, la metodica è molto utile quando si voglia analizzare l'attività cardiaca senza influenze periferiche. I vantaggi sostanziali di questa metodica consistono nella possibilità di valutare in *real time* e in sincrono una serie di parametri fisiologici, biochimici, farmacologici, quali la funzione contrattile, attività elettrica, frequenza cardiaca, pressione coronarica e metabolismo cardiaco in base all'effetto diretto di numerose sostanze; 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. Inoltre, il preparato permette di indurre ischemia regionale o totale, e di condurre studi sulla risposta cardiaca in seguito a variazioni del flusso cardiaco, sulla reattività vascolare, sulla funzionalità dell'endotelio e del muscolo liscio.

### ***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 SHR di peso pari a  $442 \pm 13$  g e i loro controlli normotesi Wistar Kyoto (WKY) di peso pari a  $477 \pm 16$  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  $25^{\circ}\text{C}$ , 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. I ratti sono stati sottoposti a misurazione della pressione sistolica quotidianamente mediante il metodo classico tail cuff, al fine di valutare le condizioni ipertensive degli animali utilizzati nel presente studio. La pressione arteriosa misurata prima di ciascun esperimento mediante il tail cuff method era: WKY: pressione sistolica =  $148 \pm 12$  mmHg e pressione diastolica =  $86 \pm 2$  mmHg; SHR: pressione sistolica =  $218 \pm 14$  mmHg e pressione diastolica =  $128 \pm 4$  mmHg. Il peso del ventricolo sinistro nei ratti WKY era di  $2.28 \pm 0.03$  e nei ratti SHR era  $4.01 \pm 0.09$  (\* $p < 0.05$  versus WKY).

## 1.2 DISSEZIONE, ISOLAMENTO ED INCANNULAZIONE DEL CUORE

Prima di procedere all'isolamento del cuore, è necessario anestetizzare rapidamente l'animale in modo da ridurre al minimo lo stress. L'animale è anestetizzato mediante iniezione intraperitoneale di carbammato di etile (2g/Kg).

Dopo aver verificato che l'animale sia completamente privo di riflessi, e che, quindi l'anestesia abbia dato pieno effetto, si realizza un'incisione

trans-addominale (FIG.10) che consente di evidenziare la cavità toracica; il torace è quindi aperto con un taglio bilaterale lungo il margine inferiore dalle ultime alle prime costole, al fine di rimuovere la cute e i muscoli sottostanti. A questo punto, la gabbia toracica è sollevata, esponendo il cuore.

L'organo è espantato dopo incisione dell'aorta, della vena cava e dei vasi polmonari e subito immerso in un becker contenete la soluzione di perfusione mantenuta a 4° C per evitare danni ischemici (Hearse & Sutherland, 2000).

In seguito, l'aorta viene incannulata (FIG.11) per iniziare la perfusione retrograda a flusso costante.

Alcuni ricercatori preferiscono incannulare l'aorta *in situ* prima dell'espanto del cuore ma qualunque sia la procedura, è importante che la perfusione vascolare sia ristabilita il più presto possibile (Sutherland et al., 2000).

Con la pratica l'intervallo che intercorre tra l'espanto e l'incannulazione non supera i 30 secondi (Galinares et al., 1990). La cannula di perfusione aortica può essere costituita da una notevole varietà di materiali quali il vetro, la plastica o l'acciaio inossidabile e il suo diametro esterno è di circa 3 mm per il cuore di un ratto di 250g (Sutherland et al., 2000).

Per ridurre al minimo la possibilità che si formino bolle al momento dell'incannulazione, è consigliabile che la soluzione di perfusione goccioli dalla cannula già prima che il cuore sia collegato attraverso l'aorta e fissato mediante una legatura con filo di seta (Sutherland

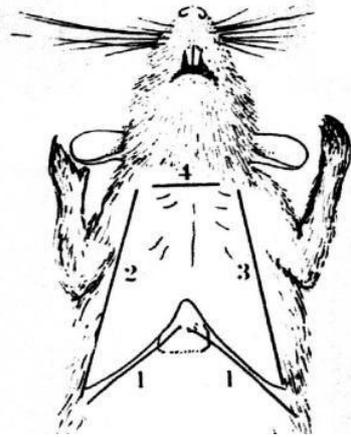


Figura 10: Incannulazione dell'aorta

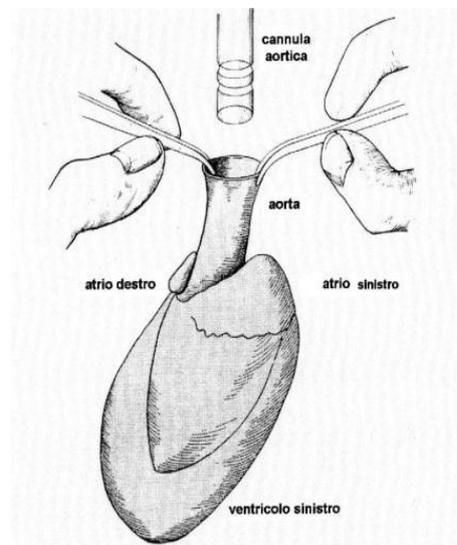


Figura 11: Incisione trans-addominale

et al., 2000). Dopo aver fissato il cuore, è praticata una piccola incisione a livello dell'arteria polmonare, che potrebbe essere accidentalmente legata durante l'incannulazione, in modo da favorire un adeguato drenaggio; inoltre per prevenire l'accumulo di perfusato nel ventricolo sinistro, è effettuato all'apice ventricolare un piccolo foro mediante l'ausilio di un ago.

Una volta completata l'incannulazione e iniziata la perfusione, la funzione contrattile e il ritmo cardiaco si stabilizzano completamente in circa 20 minuti (Sutherland et al., 2000) (FIG.12.)

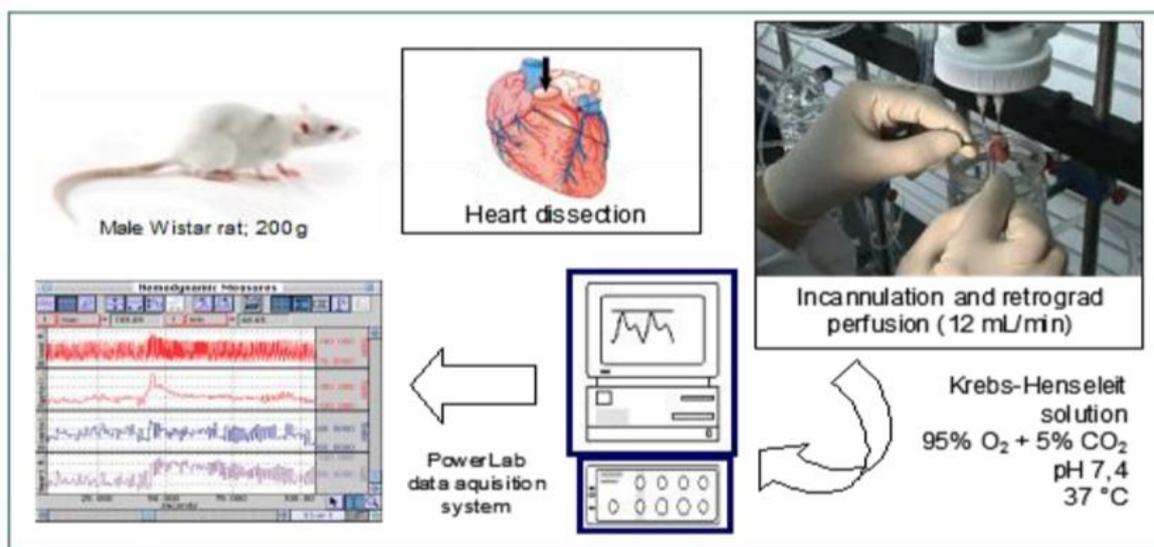


Figura 12. Isolamento e incannulazione del cuore di ratto perfuso per via retrograda con soluzione KHs.

### ***1.3 MODALITÀ DI PERFUSIONE***

Il metodo di Langendorff prevede l'incannulazione dell'aorta che viene in tal modo collegata a un serbatoio contenente il fluido di perfusione ossigenato. La perfusione è condotta in senso retrogrado, a flusso costante di 10-13,5ml•min<sup>-1</sup> per grammo di cuore fresco (Legssyer et al., 1997; Doring et al., 1990), normalmente dell'ordine di una pressione di perfusione pari a 60-100 mmHg.

In entrambi i casi, le valvole aortiche vengono chiuse forzatamente e il fluido di perfusione attraverso le coronarie perfonde l'intera massa cardiaca, e drena mediamente il seno coronarico nell'atrio destro (Sutherland et al., 2000). La perfusione a flusso costante aggiunge un ulteriore elemento di stabilità al preparato.

A volte, è necessario procedere con la perfusione a pressione costante in quanto è necessario valutare l'autoregolazione del sistema e quindi adattare automaticamente il volume di perfusato diretto ai vari distretti cardiaci nel momento in cui vi sono variazioni di frequenza o di lavoro o quando è imposta un'ischemia regionale (Sutherland et al., 2000). La temperatura ideale di perfusione è intorno a 37-37,5 °C, che si ottiene tramite un sistema di termostatazione che controlla tutti i serbatoi contenenti il perfusato, la camera di perfusione e i vari tubi che compongono l'apparato (Sutherland et al., 2000). Il sistema più efficace prevede l'utilizzo di un bagno termostato a circolazione esterna con un accurato disegno del circuito per evitare eventuali cadute di temperature lungo l'apparato (Sutherland et al., 2000).

#### 1.4 APPARATO DI PERFUSIONE

L'apparato impiegato nella metodica Langendorff è costituito da un serbatoio contenente la soluzione di perfusione Krebs-Henseleit (KHs), una pompa peristaltica, una trappola per bolle, un bagno termoregolatore e un sistema di acquisizione dati interfaccia PowerLab (Fig.13).

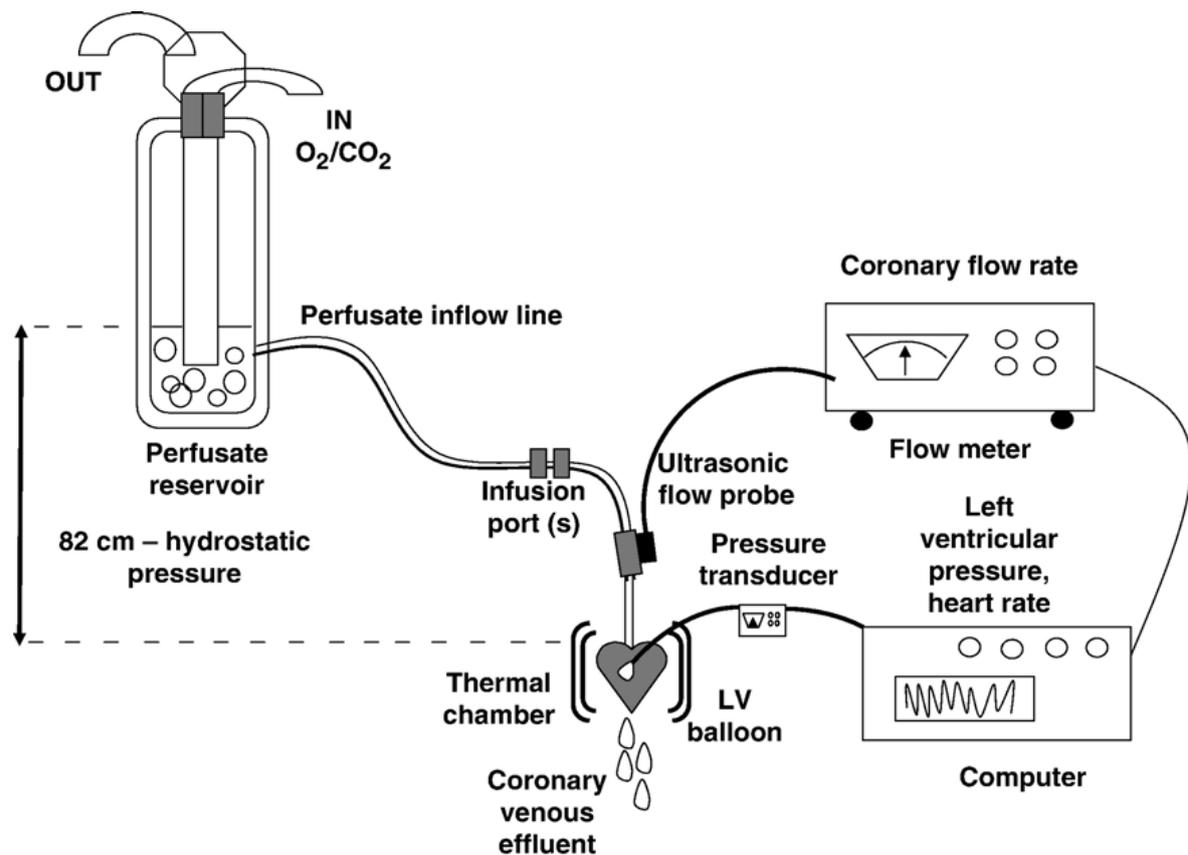


Figura 13: Rappresentazione schematica dell'apparato di perfusione

L'apparato presenta due trasduttori (model BLPR, cod. 187000) che registrano rispettivamente la pressione del ventricolo sinistro e la frequenza cardiaca il primo, mentre la pressione coronarica il secondo. Entrambi i trasduttori sono collegati al sistema di acquisizione dati PowerLab, che a sua volta è collegato a un computer (Pentium III, Hewelett Packard Brio).

La pompa peristaltica ha il compito di prelevare la soluzione dal serbatoio e di spingerla, attraverso una serie di tubi, dapprima nella trappola per bolle al fine di evitare la formazione di emboli che potrebbero danneggiare il cuore e falsare il risultato degli esperimenti e successivamente al cuore attraverso una cannula inserita direttamente nell'aorta.

### 1.5 COMPOSIZIONE DEL PERFUSATO

La maggioranza degli studi in letteratura prevedono l'uso come mezzo di perfusione del tampone bicarbonato secondo Krebs e Henseleit (KHs) (Sutherland et al., 2000). Il tampone bicarbonato KHs ha la seguente composizione:

Sostanze	Concentrazione in nM
NaCl	113
KCl	4.7
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.2
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.8
NaHCO <sub>3</sub>	25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
Sodio Piruvato	5
Glucosio	11
Mannitolo	1.1

Il KHs preparato quotidianamente, deve essere mantenuto a un pH di 7.4 attraverso la continua ossigenazione con una miscela 95% e 5% CO<sub>2</sub>.

Per evitare la precipitazione dei Sali di calcio, che potrebbero occludere le arterie coronariche, è consigliabile aggiungere il componente calcio alla fine della preparazione della soluzione. Inoltre il KHs dovrà essere opportunamente filtrato con membrane di nitrocellulosa (Millipore) da 0,8 micron al fine di rimuovere le impurità che possono essere presenti anche nei più puri prodotti chimici commerciali.

Dal punto di vista metabolico, il cuore perfuso è in grado di utilizzare il glucosio come unico substrato energetico per sopperire alla mancanza degli acidi grassi che, sebbene in vivo sono la sorgente primaria d'energia, non possono essere utilizzati nel preparato perché

risultano insolubili in soluzioni acquose e danno effetti schiumogeni se sottoposti all'azione di gas (Sutherland et al., 2000).

Le sostanze da testare possono essere aggiunte al KH alle concentrazioni desiderate, mentre nel caso di composti instabili questi possono essere infusi attraverso un braccio laterale della cannula aortica, regolandone opportunamente la concentrazione.

### ***1.6 SISTEMA DI ACQUISIZIONE DEI PARAMETRI CARDIACI***

L'acquisizione dei dati è stata compiuta attraverso un sistema McLab, collegato a un computer che elabora i dati attraverso il software Chart 4.2. Tale sistema consente di registrare i dati sull'hard-disk e di visualizzarli graficamente in tempo reale sul monitor. L'interfaccia McLab utilizzata è un sistema a quattro vie, collegato a due trasduttori di pressione, a una sonda di temperatura e a un ossimetro. Il primo trasduttore, collegato al palloncino, permette di registrare la pressione del ventricolo sinistro, mentre il secondo misura la pressione coronarica; il terzo canale è connesso a una termocoppia che consente di monitorare la temperatura durante tutto il corso dell'esperimento; il quarto canale potrebbe essere utilizzato per la misurazione del consumo d'ossigeno mediante un ossimetro i cui elettrodi vanno posti a livello della cannula aortica (via d'ingresso al cuore) e dell'arteria polmonare (via d'uscita del perfusato). I trasduttori di pressione sono calibrati prima dell'inizio di ogni esperimento utilizzando un manometro a mercurio, che permette di impostare sul computer un range fisiologico di valori pressori 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 i parametri emodinamici che sono 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 rilevanti nel corso di un esperimento sul cuore isolato e perfuso possono essere distinti in tre classi in relazione alla fase dell'attività cardiaca interessata (FIG.14):

1) Parametri relativi all'attività sistolica:

- ❖ **LVP** (Left Ventricular Pressure), espressa in mmHg, rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- ❖ **(LVdP/dt)max**, espressa in mmHg per s-1 (indicata come Vmax), indica la massima velocità di contrazione sistolica isovolumetrica;
- ❖ **TTP** (Time To Peak), espresso in msec, rappresenta il tempo necessario a raggiungere il picco di contrazione sistolica isovolumetrica;
- ❖ **HR** (Heart Rate), espressa in battiti/min, rappresenta la frequenza cardiaca;
- ❖ **RPP** (Rate Pressure Product), pari al prodotto tra LVP ed HR ed espresso in  $10^{-4}$  mmHg/battiti/min, rappresenta un indice del lavoro cardiaco.

2) Parametri relativi al recupero diastolico :

- ❖ **LVEDP** (Left Ventricular End Diastolic Pressure), espressa in mmHg per s-1, è la pressione telediastolica sviluppata dal ventricolo sinistro;
- ❖ **-(LVdP/dt)max**, espressa in mmHg per s-1 (indicata come Vmin), indica la massima velocità di rilasciamento ventricolare;

- ❖ **HTR** ( Half Time Relaxation), espresso in msec, indica la metà del tempo necessario al ventricolo sinistro per il completo recupero diastolico;
- ❖ **T/-t** è dato dal rapporto tra  $+ (LVdP/dt)_{max}$  e  $- (LVdP/dt)_{max}$ .

3) Parametri relativi alla funzionalità coronarica:

- ❖ **CP** (Coronary Pressure), espressa in mmHg, è la pressione di perfusione coronarica.

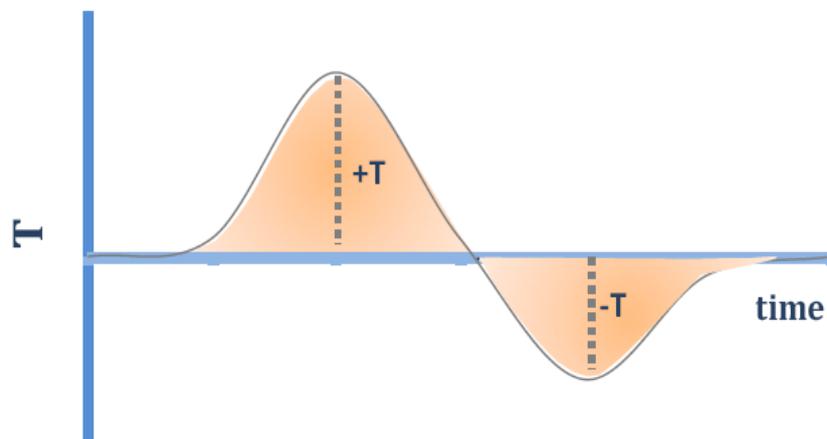
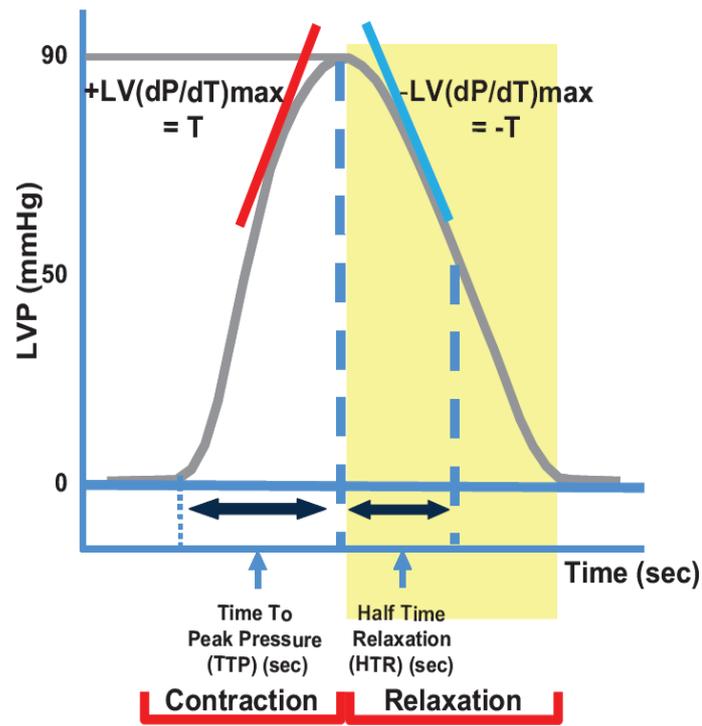


Figura 14. Rappresentazione grafica dei parametri emodinamici valutabili mediante il sistema di acquisizione dati PowerLab nella metodica Langendorff.

## 2 IMMUNOBLOTTING

I ventricoli sinistri di cuori WKY e SHR sottoposti a curve Frank-Starling e perfusi con soluzione fisiologia, e cuore sottoposti a Frank-Starling e perfusi con CST (75nM) sono stati omogenati in ghiaccio in presenza di un reagente di lisi, il RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) contenete inibitori delle proteasi, (1mmol/L aprotinina, 20 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride e 200 mmol/L sodiumorthovanadate); in seguito l'omogenato è stato centrifugato a 220g per 10 minuti a 4° C al fine di rimuovere eventuali detriti per poi recuperare il sovratanante contenete proteine (corrispondente a 60µg). 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 50µg di lisato proteico, diluito 1:10, è aggiunto 1ml di reattivo di *Bradford* e la soluzione così ottenuta è letta allo spettrofotometro a una lunghezza d'onda  $\lambda$  di 595nm.

Il metodo *Bradford* si basa sull'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 al 10%. Lo SDS conferisce un involucro negativo che permetterà la separazione proteica 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 esegue una bollitura di 5min 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 90V 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

25mM, Glicina 192mM, pH 8.3 e SDS 0.1%, Metanolo 20% ). Il gel e la membrana sono stati sottoposti 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 2h a 4°C. In seguito la membrana è stata posta in una soluzione di *milk non-fat* in TBS-T 1X (TrisHCl 100mM, pH 7.5, NaCl 1M, Tween 20 all’1%) per 1h a temperatura ambiente in modo da bloccare tutti i siti aspecifici di interazione idrofobica. Dopo un breve lavaggio con buffer TBS 1X, la membrana di PVDF è stata incubata *overnight* con gli anticorpi primario diretto contro le proteine fosforilate pAKT, peNOS, pnNOS e pPLN, e contro le loro rispettive proteine totali (AKT, eNOS, nNOS e PLN), usate come loading control (diluizione 1:1000). Poi, la soluzione con l’anticorpo è stata rimossa e la membrana sottoposta a tre lavaggi di 10min ognuno con TBS-T 1X. In seguito la membrana è stata incubata per 1h con anticorpo secondario (diluizione 1:2000 in TBS-T 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 TBS-T 1X e sottoposta alla tecnica d’immunorilevazione mediante l’utilizzo del kit *ECL® System* in chemiluminescenza. L’enzima perossidasi, coniugato all’anticorpo secondario, è in gradi 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 a una lastra fotografica (Hyperfilm ECL) (FIG.15).

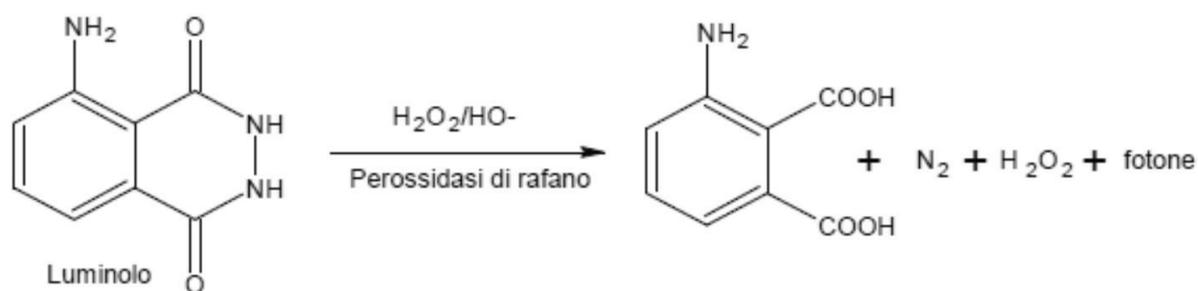
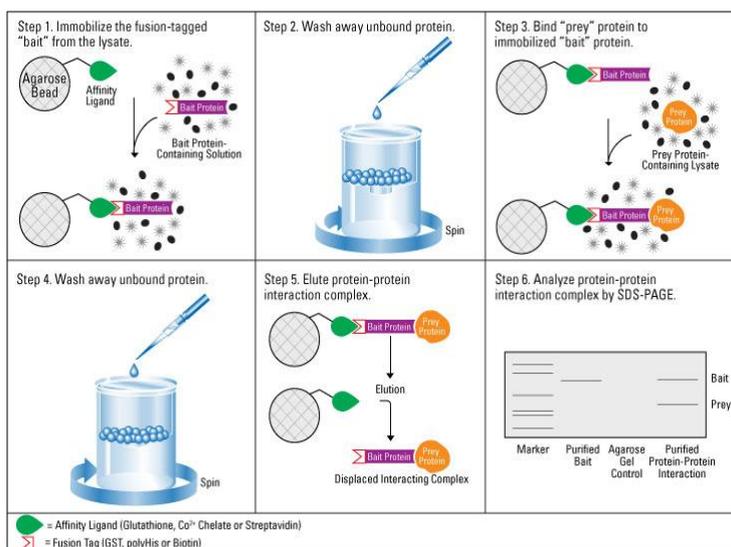


Figura 15: Reazione di chemiluminescenza che consente la visualizzazione sulla lastra fotografica.

### 3 BIOTIN SWITCH ASSAY

Al fine di rilevare le proteine S-nitrosilate è stato utilizzato il metodo Biotin Switch Assay, così come riportato da Jaffrey e Snyder nel 2001. Tale dosaggio prevede come primo step il blocco del gruppo SH, come secondo step la riduzione del gruppo SNO a gruppo SH e come terzo step il legame della biotina a tali gruppi SH (FIG.16). Le proteine “biotinilate” sono ulteriormente sottoposte a un comune Western Blot. In seguito alla corsa elettroforetica e al trasferimento, le membrane sono 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 di 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 1mg/ml di proteine è prima trattato con un blocking buffer (225 nM Hepes, ph 7.7, 0.9 nM EDTA, 0,09 nM neucupoine, 2,5% SDS, 20 nM MMTS) a 50°C per 20 minuti, affinché i gruppi SH liberi possano essere bloccati; poi è precipitato con acetone freddo, centrifugato a 4°C per 5 minuti a 2000 g e risospeso in hens buffer (250 nM Hepes, ph 7.7, 1 nM EDTA, 0,1 nM neocrupoine, 1% SDS).

Figura16: Biotin switch Assay



Tutte queste operazioni sono condotte al buio. In seguito i campioni sono incubati per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione contenente acido ascorbico e biotina: l'acido ascorbico riduce i gruppo SNO in gruppi SH liberi cui la biotina va a legarsi. Le proteine così sono precipitate con acetone freddo, centrifugate a

4°C per 5 minuti a 2000 g e risospese in hens buffer. Tali proteine biotinate sono sottoposte a western blot; caricate su gel al 10. In seguito alla corsa elettroforetica, sono 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 ECL su lastra.

#### 4 DOSAGGIO ELISA

Per la determinazione delle concentrazioni del cGMP e del cAMP i cuori, precedentemente congelati in azoto liquido (200-300mg), sono stati omogenati con acido tricloroacetico al 6% a 0°C e centrifugati a 10.000 giri per 10 minuti. Dopo aver prelevato il supernatante, questo è stato lavato 3 volte con dietilere saturato con acqua; la fase acquosa è stata raccolta e conservata a -80°C. La determinazione delle concentrazioni di cGMP e cAMP è stata compiuta usando un kit commerciale di dosaggio immunoenzimatico Biotrack Enzymeimmunoassay (EIA) System (Amersham Biosciences) (FIG.17).

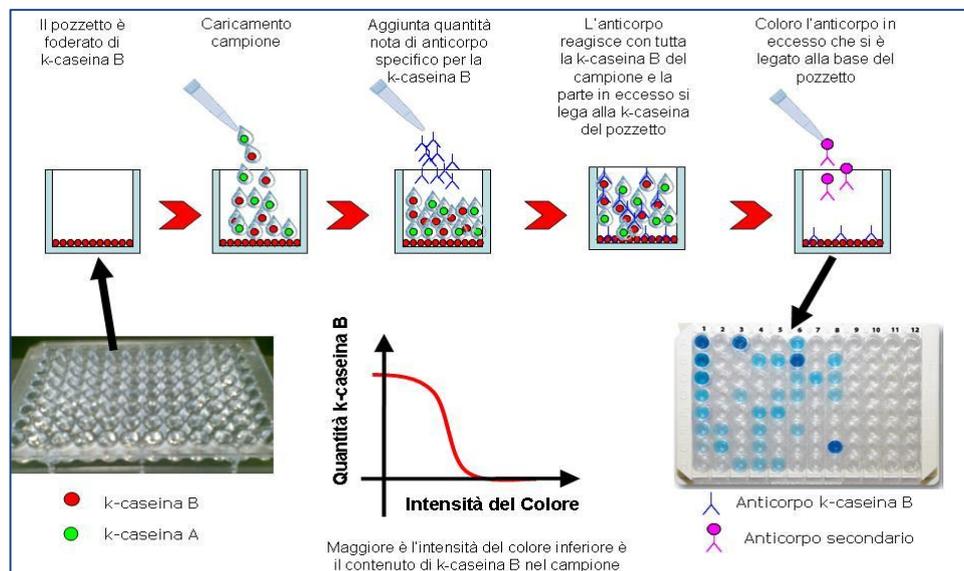


Figura 17: Dosaggio ELISA

## 5 PROTOCOLLI SPERIMENTALI

### *Sostanze utilizzate*

#### *5.1 Langendorff*

Nel presente lavoro sono state utilizzate le seguenti sostanze:

- Carbammato di etile, come anestetico
- Catestatina
- L-NAME- inibitore della NOS
- PTIO, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide-scavenger dell'ossido nitrico
- ODQ, N5- (1-imino-3-butenyl)-L-ornithine)-inibitore della guanilato ciclasi solubile (sGC)
- KT5823- inibitore della protein chinasi G (PKG)
- Triton X-100
- Tapsigargina-Inibitore della pompa SERCA 2°

La catestatina è stata sintetizzata in fase solida, utilizzando come protezione del gruppo amminoacidico N-terminale Fmoc (9-fluorenylmethoxy-carbonyl); il peptide è stato poi purificato (> 95%) mediante RP-HPLC; la sua autenticità e purezza è stata verificata attraverso cromatografia analitica e spettrometria di massa (MALDI).

KT5823 e Tapsigargina sono stati acquistati da Calbiochem (Milano, Italia).

PTIO, ODQ, TRITON X-100, sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO).

Tutte le soluzioni sono state preparate in acqua bidistillata.

ODQ è stato preparato in etanolo.

## **5.2 Immunoblottig**

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

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari policlonali: anti-p-eNOS, anti p-nNOS, anti-p-AKT, anti-p-PLN; gli anticorpi primari sono stati riconosciuti mediante appositi anticorpi secondari (anti-rabbit) coniugati con perossidasi di rafano (Santa Cruz, DBA-Srl, Milano, Italia).

## **5.3 CONDIZIONI BASALI DI PERFUSIONE**

Gli esperimenti, in accordo con i dati riportati in letteratura (Legssyer et al., 1997; Doring et al., 1990), sono stati condotti con perfusione retrograda a flusso costante compreso fra 10 e 13,5 ml/min g-1 (grammo di cuore fresco). La performance cardiaca è stata stabilizzata in circa 15-20 min, 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. Cuori controllo sono stati ottenuti perfondendo i cuori son KH per la durata di 180 min.

## **6 RISPOSTA CARDIACA AL MECCANISMO DI FRANK-STARLING**

Le Curve Starling sono state generate aumentando il volume del palloncino intraventricolare in sei step di 10 microlitri. La funzione cardiaca è stata valutata entro 1 minuto da ogni incremento di volume, corrispondente a uno stato stazionario. La valutazione completa della risposta di Frank-Starling è stata completata entro 15 minuti. Per valutare la sensibilità del cuore di ratto al maggiore precarico, sono state generate doppie curve Frank-Starling. Dopo la valutazione di base, la pressione in entrata è stata portata alle condizioni di controllo ed è stata generata una seconda curva di Starling in presenza di CST (75nM). Questo ha permesso di annullare la "memoria del cuore".

### **6.1 RISPOSTA DELLA CST IN CUORI WKY E SHR**

Per valutare se la CST influenzasse la risposta Frank-Starling in cuori di ratti WKY ed SHR è stata generata una curva di Starling, aumentando la pressione di riempimento in modo graduale e perfondendo i cuori con sola soluzione fisiologica. Dopo la valutazione di base, la pressione d'ingresso è stata riportata alle condizioni di controllo, ed è stata generata una seconda curva Starling in presenza di CST (75 nM).

#### **6.1.1 COINVOLGIMENTO DEL PATHWAY DELLO NO**

In una seconda serie di esperimenti, dopo aver generato una prima curva Frank-Starling, la pressione d'ingresso è stata portata ai valori di controllo, e una seconda curva è stata generata in presenza di CST più un inibitore specifico quale:

- L'inibitore della NOS, L-NAME
- Lo scavenger dello NO, PTIO
- L'inibitore specifico della sGC, 1H-(1,2,4) ossadiazolo-(4,3a) chinossalin-1-one (ODQ)
- L'antagonista della proteina chinasi G (PKG), KT5823
- L'inibitore della pompa SERCA2a, la Tapsigargina

### **6.1.2 COINVOLGIMENTO DELL'ENDOTELIO DELLE CORONARIE**

Per valutare il presunto coinvolgimento, l'endotelio delle coronarie è inattivato mediante una breve perfusione con TRITON X-100 (diluizione 1:200), somministrato 30 minuti dopo la stabilizzazione. Il trattamento con TRITON X-100 induce un incremento precoce della CP ( $37 \pm 5.1$ ), la quale ritorna pressoché ai valori di controllo dopo 20 minuti. La LVP si abbassa significativamente durante il trattamento con TRITON X-100 e poi si recupera completamente entro 20 minuti. La curva di Starling viene generata in presenza di CST (75 nM) come descritto precedentemente. Per verificare l'effetto del TRITON X-100, alla fine del trattamento il cuore è lavato con la soluzione di Krebs e poi riperfuso per 10 minuti con bradichinina (100 nM). Solo i cuori in cui la bradichinina non modifica la CP sono inclusi nell'analisi (Angelone et al., 2012).

### **6.1.3 DOSAGGIO ELISA: DETERMINAZIONE DI cGMP-cAMP INTRACELLULARE**

Al fine di valutare dei livelli del cGMP e cAMP, il tessuto cardiaco congelato (tessuto endocardico e cardiomiociti presi da atri e ventricoli 200-300 mg) è stato sottoposto a un metodo immunoanalitico che ha previsto l'uso di un kit commerciale (Biotrak enzyme immunoassay system; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

## **7 ANALISI STATISTICA**

I parametri emodinamici relativi agli esperimenti di perfusione cardiaca (e i valori a essi riferiti) sono espressi come medie  $\pm$  errore standard (SEM) delle variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo. Il confronto tra i gruppi, utile per individuare eventuali differenze significative tra le diverse condizioni sperimentali, è stato valutato mediante two-way ANOVA, seguito dal Bonferroni post-hoc test; le variazioni sono considerate significative per  $p < 0,05$  (§).

***Risultati***

## 1 CONDIZIONI BASALI DI PERFUSIONE

Dopo 20 minuti di stabilizzazione, sono stati registrati i valori basali. La stabilità è valutata controllando le variazioni della performance cardiaca ogni 10 minuti. Esperimenti preliminari mostrano che i preparati cardiaci si mantengono stabili per un tempo di 180 minuti all'apparato di perfusione. Al termine della stabilizzazione sono stati registrati i seguenti valori basali di perfusione:

- ❖  $LVP = 88 \pm 70$  mmHg;
- ❖  $+(LVdP/dt)_{max} = 2489 \pm 124$  mmHg/sec;
- ❖  $TTP = 79,71$  mmsec;
- ❖  $LVEDP = 11,35$  mmHg/ sec;
- ❖  $-(LVdP/dt)_{max} = -1664 \pm 70$  mmHg/sec;
- ❖  $HTR = 0,05 \pm 0,01$  msec;
- ❖  $HR = 218,72$  battiti/minuto;
- ❖  $RPP = 2,00 \cdot 10^{-4}$  mmHg/ battiti/minuto;
- ❖  $CP = 63 \pm 3$  mmHg;
- ❖  $T/-t = +(LVdP/dt)_{max}/-(LVdP/dt)_{max} = -1,48 \pm 1,85$  mmHg/sec;
- ❖  $\tau (Tau) = 0.04 \pm 0.01$  s<sup>-1</sup>.

La resistenza e la stabilità dei cuori isolati e perfusi secondo la metodica *Langendorff*, sono state misurate controllando le variazioni della performance cardiaca ogni 10min. Da esperimenti preliminari di *time course* su preparati perfusi solo con KHs, è emerso che i preparati di cuore di ratto sono stabili per un tempo di 180 min all'apparato di perfusione (dati non mostrati).

## **2 LA CST MODULA LA RISPOSTA FRANK-STARLING IN RATTI NORMOTESI E IPERTESI**

Precedenti studi hanno dimostrato che, sul cuore di ratto la CST induce effetti inotropi negativi ad una concentrazione compresa tra 11 e 200nM (Angelone et al., 2008). In condizioni basali, questi effetti hanno raggiunto un massimo a 5 minuti dopo l'esposizione iniziale e sono rimasti stabili fino a 20 minuti (Angelone et al., 2008; 2012). Per determinare gli effetti che la CST esercita sulla risposta cardiaca del meccanismo di Frank-Starling, la performance cardiaca è stata valutata prima e dopo trattamento con una singola concentrazione di CST in ratti normotesi e ipertesi. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando una concentrazione di CST pari a 75 nM, ovvero la dose in grado di indurre effetti inotropi e lusitropici negativi corrispondenti al valore di EC50 (Angelone et al., 2008; 2012; Penna et al., 2010). In questo studio, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando una concentrazione di CST pari a 75 nM, la quale è in grado di esercitare effetti inotropi e lusitropici negativi e corrisponde al valore di EC50 del peptide. (Angelone et al., 2008; 2012; Penna et al., 2010). I risultati ottenuti mostrano un significativo aumento della risposta di Frank-Starling in presenza di CST rispetto a quanto ottenuto in cuori controllo, rilevabile da un aumento significativo di LVP (mmHg) e LVdP/dt max (mmHg), sia nei cuori ipertesi che in quelli normotesi (FIG. 18). Tuttavia, la risposta eterometrica al trattamento con CST è più evidente nei cuori di ratti ipertesi. Inoltre, si osserva anche un cambiamento significativo nel rilassamento del miocardio, documentato dalla LVdP/dt min sia nei cuori normotesi che in quelli ipertesi (FIG.18).

### **3 MECCANISMO D' AZIONE**

Il meccanismo d'azione responsabile della modulazione della risposta Frank-Starling CST-dipendente è stato valutato su entrambi i cuori di ratti normotesi e ipertesi. Sulla base di curve dose risposta precedenti (dati non mostrati), tutti gli inibitori sono stati utilizzati in una concentrazione che non ha influenzato significativamente la performance cardiaca (dati non mostrati) .

#### **3.1 RUOLO DELL'ENDOTELIO VASCOLARE**

È noto che l'endotelio vascolare (VE) è una fonte importante di NO il quale svolge un ruolo chiave nella mediazione di specifici signaling intracellulari coinvolti nel controllo battito per battito e a lungo termine della performance contrattile (Desjardins et al., 2006). Per chiarire se la modulazione della risposta Frank-Starling CSTdipendente coinvolgesse lo NO, VE-prodotto, cuori normotesi e ipertesi sono stati esposti a CST dopo trattamento del VE con il TRITON X- 100, sostanza in grado di danneggiare funzionalmente ma non strutturalmente l'endotelio. Questo pre-trattamento modifica la risposta cardiaca al meccanismo di Frank-Starling CST-dipendente poiché riduce la risposta al precarico, come dimostrato dalla riduzione del parametro LVP ( $50,3 \pm 7,9$  in WKY e  $59 \pm 2.7$  in SHR) rispetto ai cuori perfusi con soluzione fisiologica, supportando ulteriormente il ruolo centrale dello NO derivato dall'endotelio nella modulazione della risposta Frank-Starling (FIG.19).

### 3.2 MECCANISMO DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

#### *IP3K – eNOS-NO-cGMP pathway*

In condizioni basali, la CST induce un'azione cardiosoppressiva, attraverso il pathway IP3K-NOS-eNO-e-cGMP (Angelone et al., 2008; 2012). Per determinare se nella modulazione CST-dipendente della risposta Frank-Starling, siano coinvolti l'IP3K ovvero l'attivatore del pathway dello NO e, lo NO, NOS-prodotto i cuori isolati normotesi e ipertesi sono stati trattati con una singola concentrazione di CST (75 nM) in presenza dell'inibitore dell'IP3K, ovvero la Wortmannina (100 nM) e dell'inibitore della NOS ovvero L-NAME (10 mM). Entrambi i trattamenti hanno abolito l'aumento della risposta Frank-Starling CST -dipendente sia in cuori normotesi sia in quelli ipertesi (FIG.20). Il coinvolgimento dello NO endogeno è stato confermato utilizzando il PTIO (100 nM) scavenger dello NO, che ha abolito la risposta CST dipendente su cuori WKY e SHR (FIG. 19).

Considerando che lo NO modula la performance cardiaca mediante l'attivazione della sGC, entrambi i gruppi sperimentali sono stati trattati con una singola concentrazione di CST (75 nM) in presenza di ODQ (10  $\mu$ M), un potente ossidante e inibitore della sGC (FIG. 20). Poiché ODQ ha bloccato l'effetto CST-dipendente sulla risposta di Frank-Starling, come dimostrato dalla riduzione della LVP, per valutare ulteriormente il coinvolgimento del cGMP i cuori normotesi e ipertesi sono stati perfusi con KT5823 (0.1  $\mu$ M), inibitore della PKG. Al pari di quanto osservato in presenza di ODQ, il trattamento con KT5823 blocca l'azione positiva sul meccanismo di Frank-Starling indotta dalla CST, confermando che, anche in condizioni di stretch, la CST è uno stimolo paracrino per il signaling NO-sGC-PKG (FIG. 20). Quando i cuori sono stati perfusi con Wortmannina, L-NAME, P-TIO, ODQ e KT5823, il parametro LVP in cuori WKY al massimo precarico era rispettivamente  $71.7 \pm 4.3$ ;  $70.9 \pm 6.9$ ;  $7.08 \pm 6.1$ ;  $68.5 \pm 6$ ;  $67.3 \pm 6.6$ , mentre in cuori SHR, al massimo precarico il parametro LVP era rispettivamente  $68.4 \pm 1.4$ ;  $66.2 \pm 1.7$ ;  $66.7 \pm 1.5$ ;  $49.1 \pm 5.4$ ;  $68.6 \pm 1.5$ , rispettivamente. Questi effetti non sono stati significativi per quanto riguarda la somministrazione di solo di Krebs.

### **3.3 RUOLO DEL CALCIO**

La disponibilità del calcio intracellulare contribuisce alla risposta Frank-Starling del miocardio (Calaghan et al., 2009). Per valutare il coinvolgimento del calcio intracellulare negli effetti indotti dalla CST sugli aumenti del precarico, cuori di ratti WKY e SHR sono stati esposti a CST più la tapsigargina, un inibitore della pompa SERCA2a. La perfusione con tapsigargina ha ridotto significativamente l'aumento della risposta Frank-Starling CST-dipendente in entrambi i cuori WKY e SHR (FIG.20) rafforzando il ruolo del reticolo sarcoplasmatico nella ricaptazione del Ca<sup>2+</sup>. La tapsigargina ha indotto un aumento non significativo del parametro LVP ( $68,5 \pm 5$  in WKY e  $55,8 \pm 2,0$  in SHR) al massimo precarico, rispetto al solo Krebs.

### **3.4 LIVELLI DI cGMP E cAMP**

Considerando che la CST agisce attraverso il pathway NO-cGMP in questo lavoro è stato visto che le concentrazioni di cGMP intracardiache sono più elevate nei cuori trattati con CST rispetto a quelli perfusi con sola soluzione fisiologica. La concentrazione del cGMP, determinato con dosaggio ELISA sono superiori nei cuori SHR rispetto ai cuori WKY esposti a CST (FIG.21). Abbiamo anche dimostrato che le concentrazioni di cAMP erano simili in entrambi i cuori WKY e SHR (dati non mostrati).

### **3.5 S-NITROSILAZIONE**

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 in estratti ventricolari di cuori sottoposti a curve di Frank-Starling e perfusi con CST. In entrambi i cuori WKY e SHR, il peptide ha indotto un aumento della S-nitrosilazione di proteine ad alto, medio e basso peso molecolare (FIG.24).

### ***3.6 VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI FOSFORILAZIONE DI AKT, eNOS, nNOS, PLN***

Per verificare ulteriormente il coinvolgimento del pathway dello NO negli effetti cardiaci indotti dalla CST, i preparati cardiaci sono stati sottoposti a Western Blotting. I dati ottenuti mostrano un aumento della fosforilazione di AKT, eNOS, nNOS e del PLN (FIG.22-23).

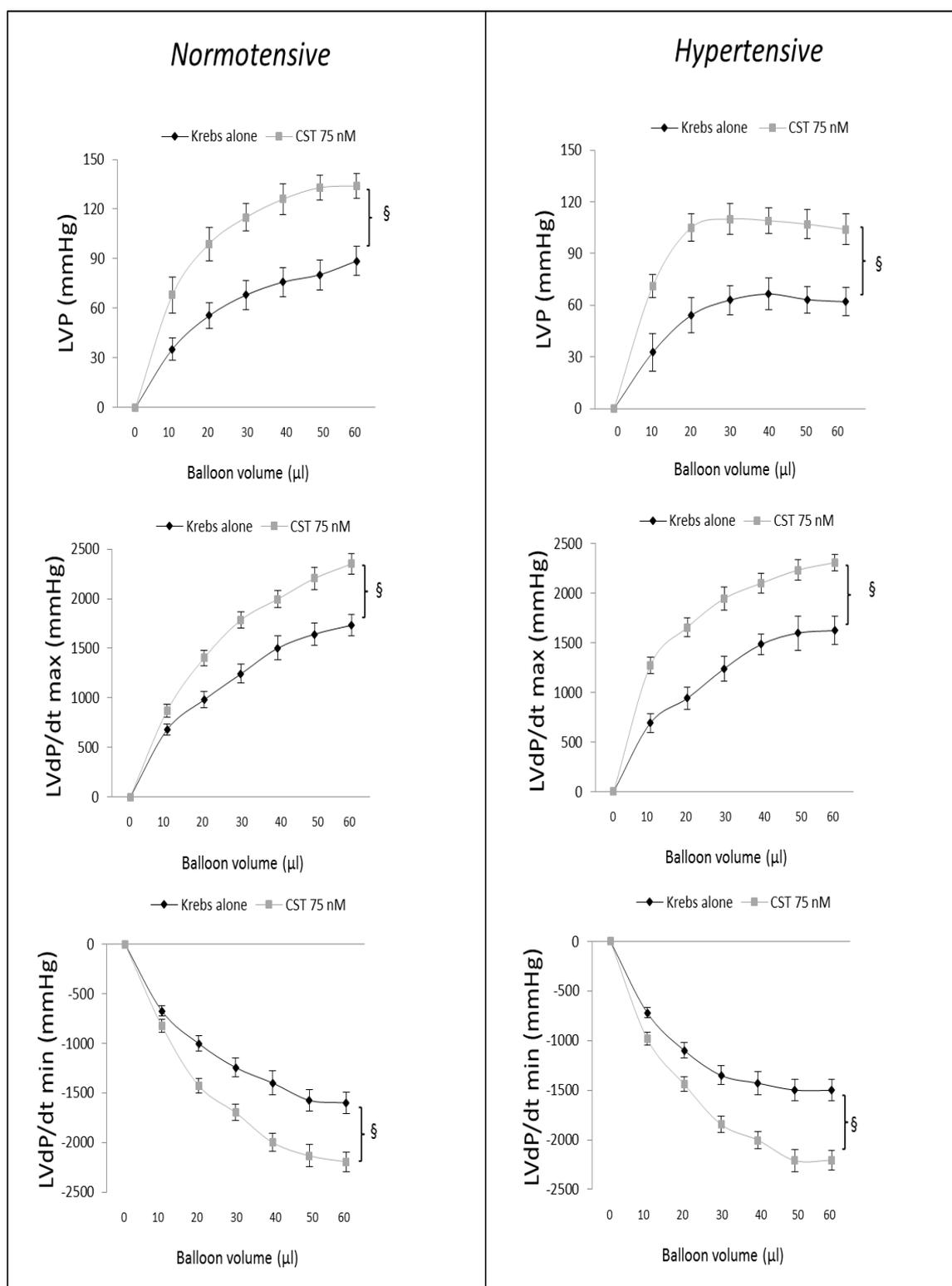


Figura 18: Effetti dell'incremento di 10  $\mu\text{L}$  del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi ai parametri LVP, LVdP/dt max e LVdP/dt min prima e dopo trattamento con una singola concentrazione di CST (75 nM) in cuori di ratti normotesi e ipertesi. I risultati sono espressi in mmHg. Le variazioni significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante two-way ANOVA:  $\$=p<0.05$ .

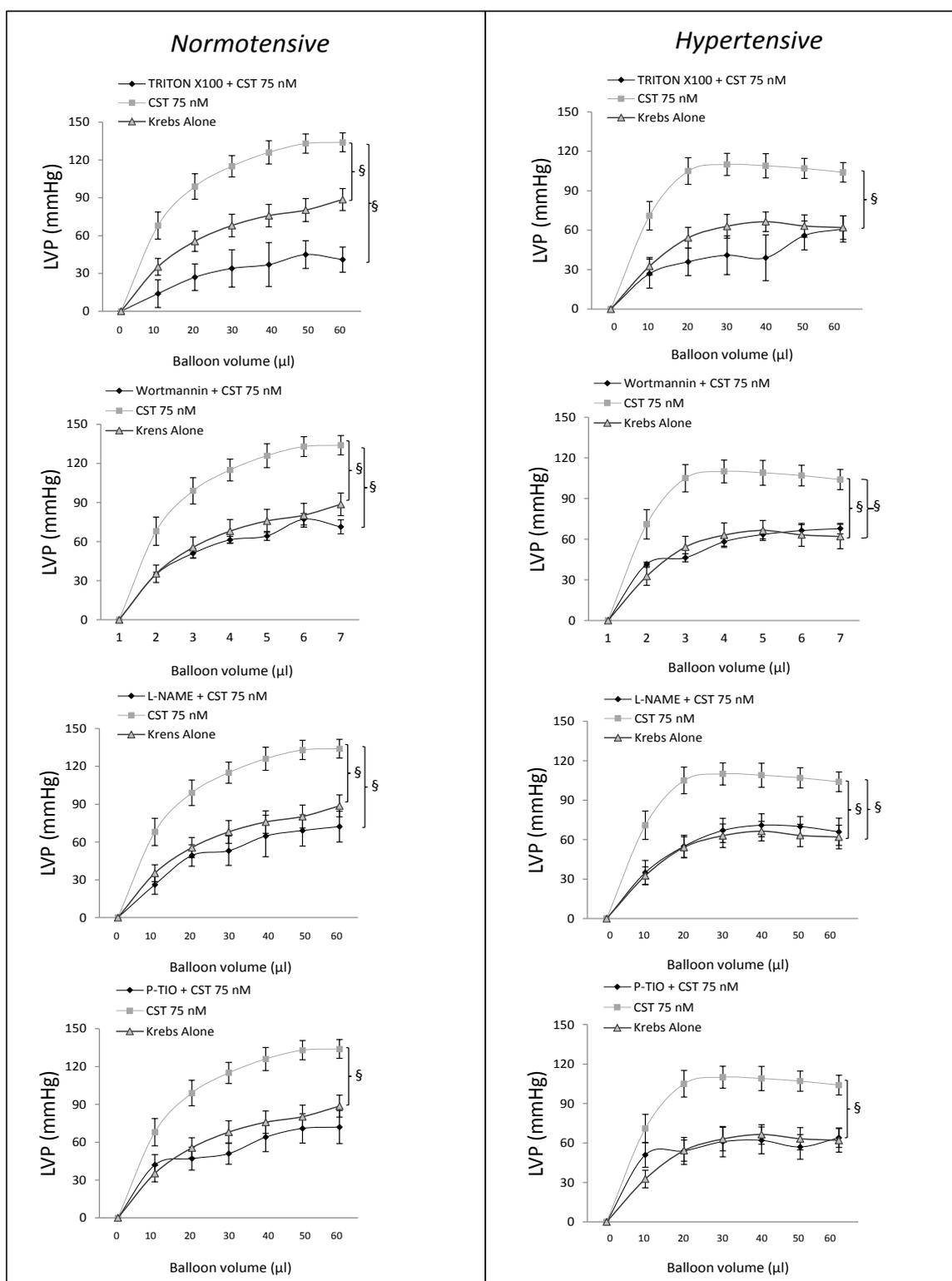


Figura 19: Effetti dell'incremento di 10  $\mu\text{L}$  del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi al parametro LVP, dopo trattamento con CST (75 nM) e con CST + TRITON X-100, dopo trattamento con CST e con CST + L-NAME (10 nM) e dopo trattamento con CST con Cts + PTIO (100 nM) in cuori di ratti normotesi e ipertesi. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali  $\pm$  errore standard. Le variazioni significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante two-way ANOVA: §= $p < 0.05$

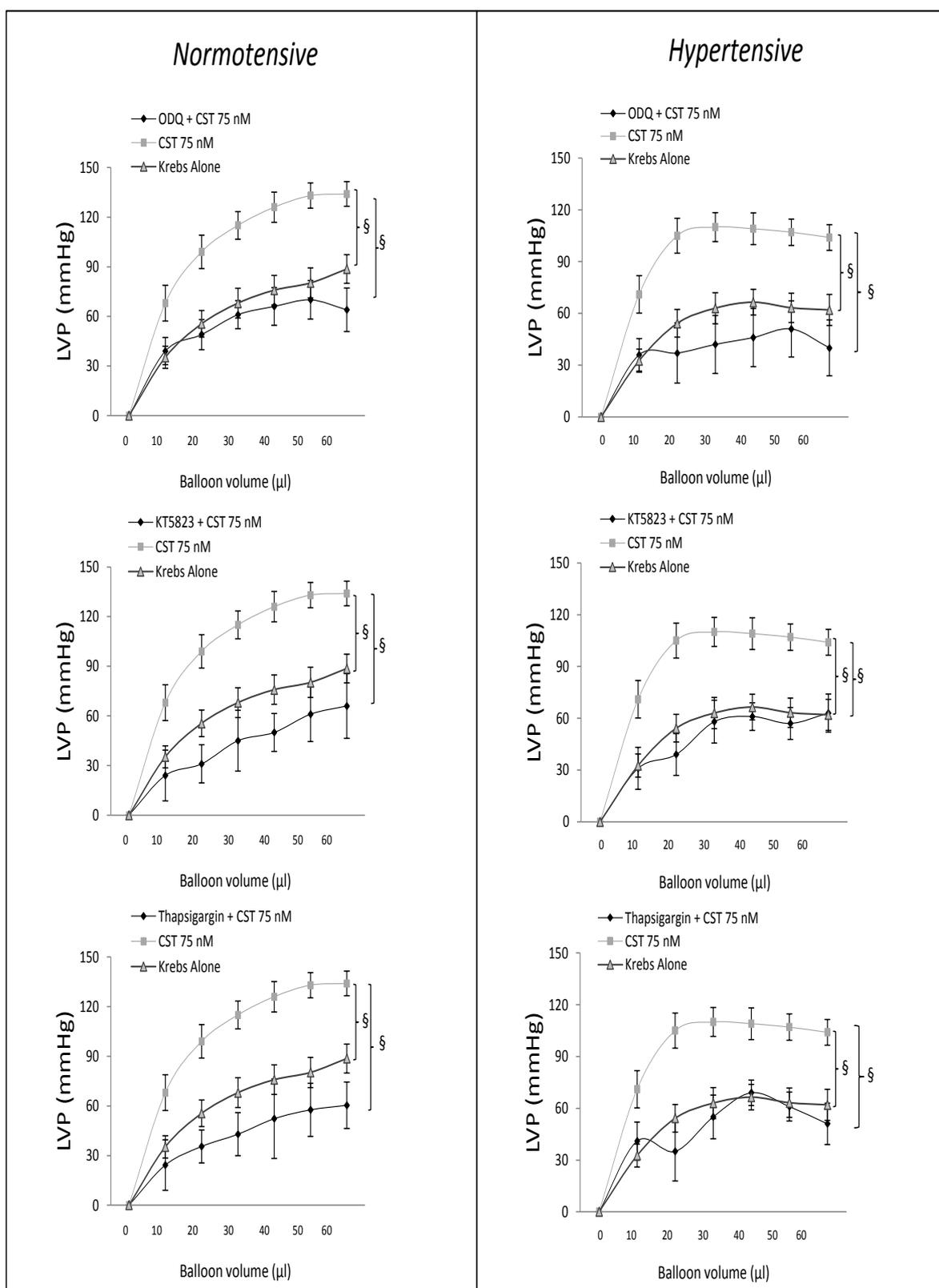


Figura 20. Effetti dell'incremento di 10  $\mu\text{L}$  del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi al parametro LVP, dopo trattamento con singola concentrazione di CST (75 nM) o CST + ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), CST (75 nM) o CST + KT5823 (0.1  $\mu\text{M}$ ) e CST (75 nM) o CST + Tapsigargina in cuori di ratti normotesi e ipertesi. Le variazioni significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante two-way ANOVA: §= $p < 0.05$ .

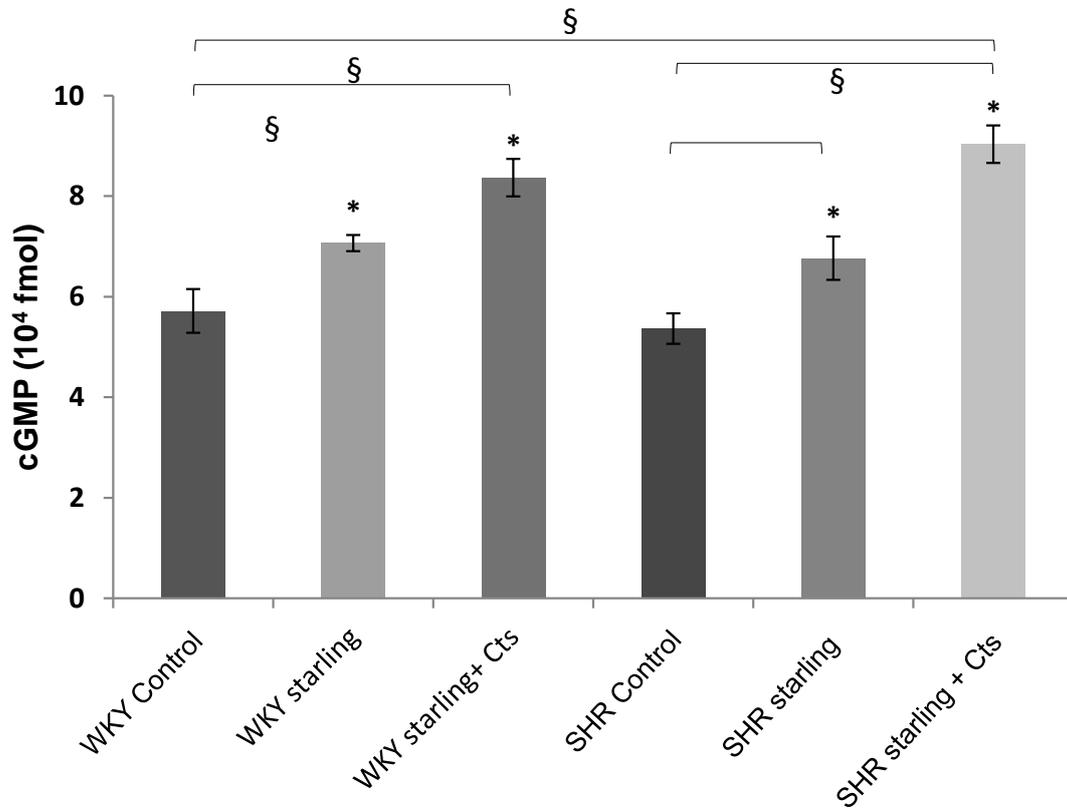


Figura 21: Valutazione dei livelli di cGMP in omogenati cardiaci di cuori di ratti normotesi (WKY) e ipertesi (SHR) sottoposti a curve di Starling, Starling + CST. Le variazioni significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante one-way ANOVA: §= $p < 0.05$ .

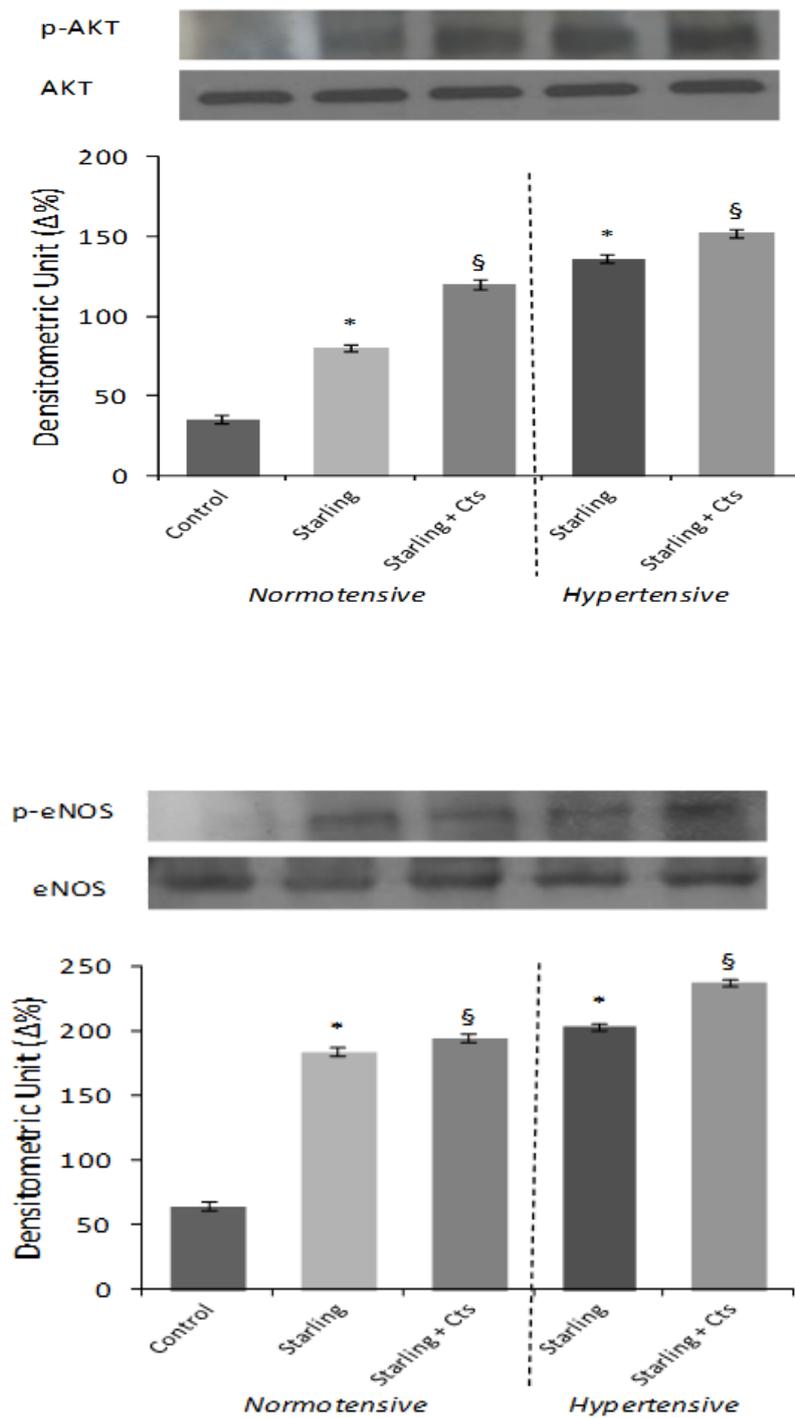


Figura 22. Espressione di p-AKT e p-eNOS in cuori WKY ed SHR sottoposti a curve di Starling, e Starling + CST. Le variazioni significative rispetto al controllo sono state elaborate con una media  $\pm$  SEM: §= $p < 0.05$

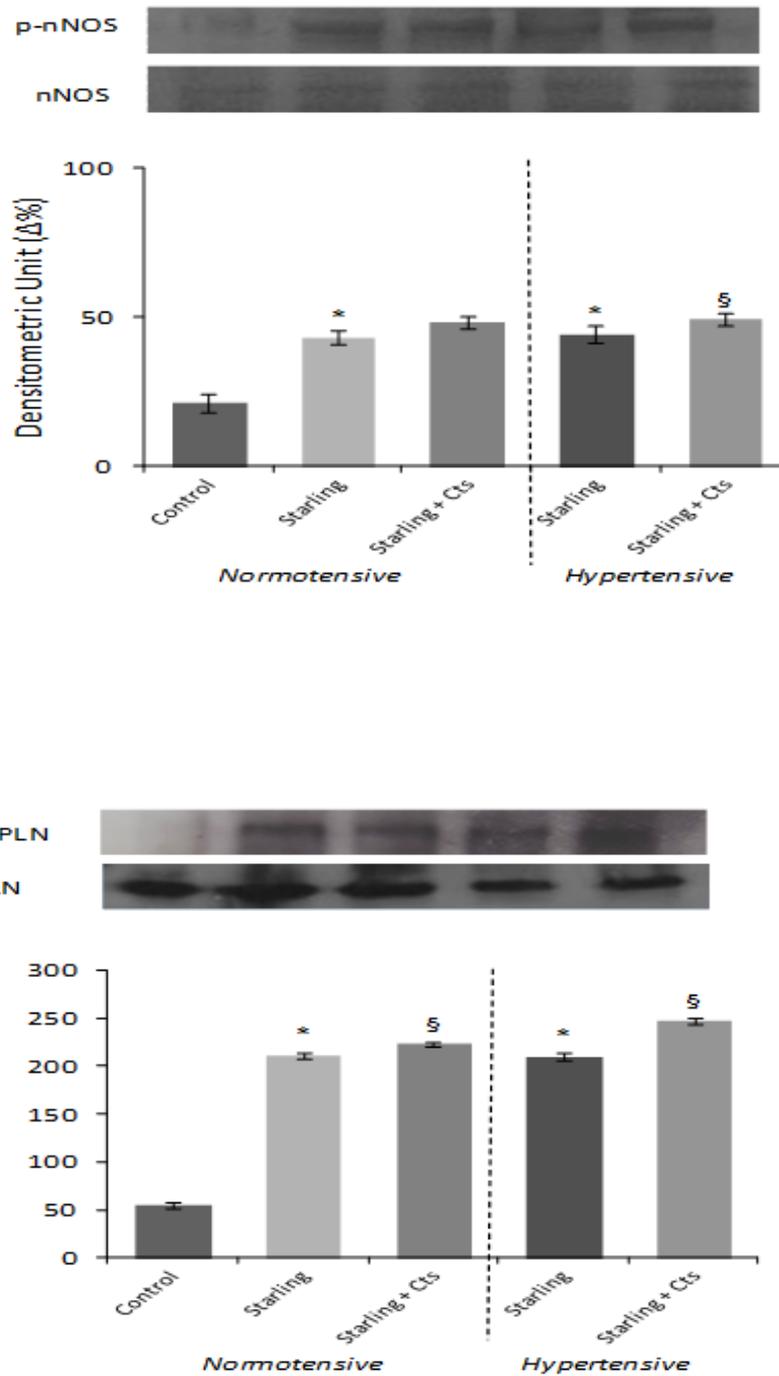


Figura 23: Espressione di p-nNOS e p-PLN in cuori WKY ed SHR sottoposti a curve di Starling, e Starling + CST. Le variazioni significative rispetto al controllo sono state elaborate con una media  $\pm$  SEM:  $\$=p<0.05$

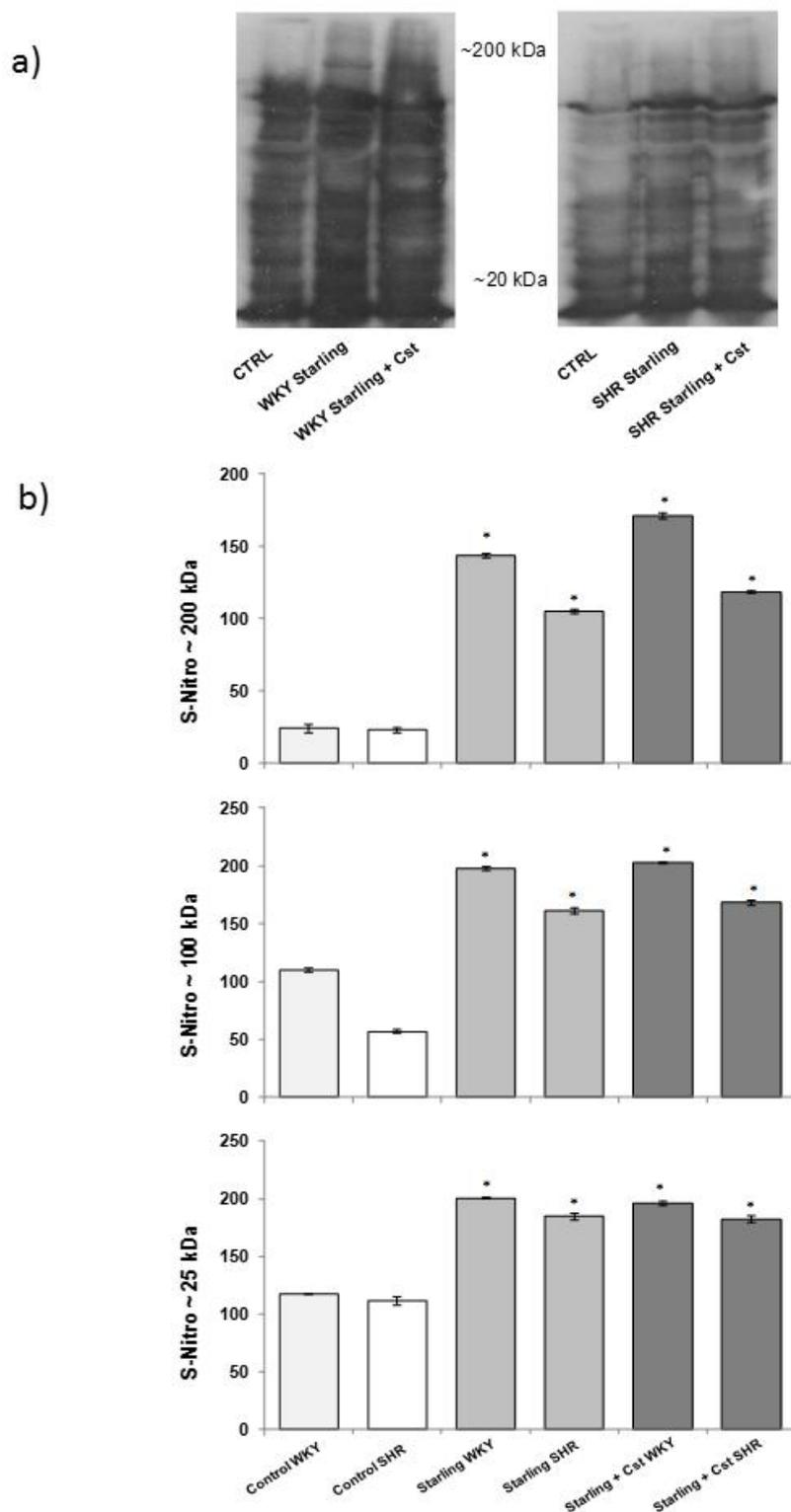


Figura 24: (a) Analisi Western Blotting di roetine S-Nitrosilate in ventricoli cardiaci di WKY e SHR. (b)Analisi densitometrica delle bande S-Nitrosilate ad alto peso molecolare (~200 kDa), a medio peso molecolare (~100 kDa) e a basso peso molecolare (~25 kDa).

*Discussione*

E' ormai accertato che il peptide CST, derivato da taglio proteolitico della CgA, è in grado di modulare il sistema cardiovascolare sia in condizioni fisiologiche sia patologiche (Angelone et al., 2008). Queste azioni, che mimano gli effetti mediati dallo NO, includono cardiodepressione, vasodilatazione, azione anti-adrenergica e cardioprotezione dai danni da I/R (Angelone et al., 2008; 2012; Perrelli et al., 2013). Recentemente, usando il cuore di rana come biomassa, è stato osservato che la CST regola anche la risposta di Frank-Starling (Mazza et al., 2012). Il presente lavoro, per la prima volta, ha dimostrato che nel cuore di ratto, considerato prototipo del cuore di mammifero, la CST migliora la risposta di Frank-Starling. Quest' azione si verifica non solo in condizioni di normotensione, come osservato nei ratti WKY, ma anche in presenza d'ipertensione, come quella che si verifica in ratti SHR, un ben riconosciuto modello di disfunzione cardiaca indotta da ipertensione associata a senescenza. Dai risultati ottenuti si evince che gli effetti CST-dipendenti coinvolgono l'endotelio vascolare e richiedono l'attivazione del pathway AKT/NOS/NO/cGMP/PKG.

Questi effetti sono accompagnati da un aumento della S-nitrosilazione di proteine miocardiche.

Lo stretch meccanico è un importante stimolo fisiologico e patologico nel cuore, che consente di ottimizzare la funzione contrattile del miocardio in risposta alle esigenze funzionali del tessuto (Katz et al., 2002). Sebbene il suo significato biologico sia noto da tempo, i meccanismi molecolari che lo consentono non sono del tutto chiari. In condizioni fisiologiche, la risposta del miocardio allo stretch è bifasica e comporta un grande e rapido (entro un battito) aumento dell'inotropismo, cioè, *la risposta Frank-Starling propriamente detta*, seguita da un lento e un aumento, anche se meno pronunciato della forza di contrazione, cioè, *l'effetto Anrep* (Cingolani et al., 2013). In preparati di muscolo cardiaco isolato è stato dimostrato che i cambiamenti nella lunghezza originaria del muscolo influenzano l'attivazione dei miofilamenti, secondo la relazione classica nota come *attivazione lunghezza-dipendente* (Parmley et al., 1973; Fabiato et al., 1975; Lakatta et al., 1977). Questi meccanismi includono cambiamenti strutturali delle proteine contrattili in risposta ad aumenti della concentrazione del  $Ca^{2+}$ , cambiamenti di attività di effettori intracellulari come IP3 e PKC, e l'apertura di canali in seguito a stretch (Crozatier, 1996), nonché variazioni a carico di proteine, prime fra tutte la titina e cambiamenti nell'organizzazione spaziale dei filamenti contrattili (*lattice hypothesis*) (Fukuda et al., 2009).

La titina, una proteina ad altissimo peso molecolare, è importante per determinare la geometria e la distanza tra filamenti spessi e filamenti sottili, in modo tale che le variazioni della lunghezza del sarcomero tramite attraverso la titina, sono trasformati in differenti distanze tra filamenti spessi e filamenti sottili, e quindi maggiore o minore probabilità d'interazione tra le teste di miosina e i filamenti di actina (Fukuda et al., 2009).

Dall'analisi condotta in questo studio, è emerso che, su cuori di ratto normotesi, la CST aumenta significativamente la performance contrattile in risposta allo stiramento, come dimostrato dall'incremento dei parametri LVP e LVDP/dTmax. Essa potenzia anche la risposta diastolica, come mostrato da un incremento del parametro LVDP/dTmin. Da sottolineare che la CST migliora la risposta di Frank-Starling anche su ratti ipertesi SHR di 18 mesi di età, momento nel quale l'ipertensione arteriosa sfocia in ipertrofia e scompenso ventricolare (Boluyt et al., 1995; Han et al., 2014). Sebbene non siano state compiute valutazioni morfometriche per descrivere il livello d'ipertrofia nel cuore di ratto SHR, i dati di letteratura disponibili e il maggiore peso del cuore osservato in questi animali rispetto a quelli di controllo normotesi, ha indicato l'esistenza d'ipertrofia ventricolare. A supporto del deterioramento morfofunzionale, il cuore dei ratti SHR usati in questo studio ha mostrato una performance alterata, esemplificata da una ridotta contrattilità espressa sia da una riduzione del parametro LVP che da una diminuita risposta di Frank-Starling, quando perfusi con soluzione fisiologica. E' interessante che l'esposizione alla CST ne ha potenziato la performance miocardica in risposta al preload. Questo può essere vantaggioso per il cuore malato poiché allevia il danno funzionale, possibilmente apportando benefici anche limitandone il progressivo deterioramento funzionale. Ulteriori studi su ratti SHR giovani chiariranno se e in che misura gli effetti della CST sulla risposta Frank-Starling dipendono dal livello d'ipertrofia e da una compliance diastolica modificata. Questo potrebbe essere interessante in quanto il ratto SHR, prima dei 18 mesi, rappresenta un modello di pre-scompenso cardiaco.

## ***1 MECCANISMI COINVOLTI NELLA MODULAZIONE CST-DIPENDENTE DELLA RISPOSTA DI FRANK-STARLING***

Il presente studio ha mostrato che l'endotelio vascolare e il pathway NO-cGMP sono coinvolti nel miglioramento CST-indotto della risposta di Frank-Starling sia in ratti normotesi che ipertesi. Questo è stato mostrato dall'assenza degli effetti indotti dalla CST dopo il danno endoteliale indotto da Triton-X100, così come dopo l'esposizione del cuore perfuso a L-NAME, inibitore della eNOS, e allo scavenger dello NO, PTIO. Inoltre, è stato osservato che, sia nei ratti WKY che SHR, gli effetti positivi indotti dalla CST sulla risposta di Frank-Starling sono aboliti dal blocco specifico della sGC mediante ODQ e sono accompagnati da un incremento dei livelli intracellulari di cGMP. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni che hanno mostrato, sul cuore isolato e perfuso secondo Langendorff (Angelone et al., 2008) così come su muscoli papillari e cardiomiociti isolati che gli effetti basali della CST e la sua azione anti adrenergica richiedono un endotelio coronarico intatto e reclutano il pathway PI3K/Akt-NO-cGMP-PKG pathway (Angelone et al., 2008; 2012).

E' noto che, insieme all'endotelio endocardico, l'endotelio vascolare coronarico rappresenta una fonte molto importante di NO paracrino prodotto dalla eNOS (Perrelli et al., 2013) mentre i miocardiociti generano NO autocrino attraverso la eNOS e la nNOS localizzate nelle caveole di membrana e in prossimità del reticolo sarcoplasmatico (Petroff et al., 2010, Stojanovic et al., 2001, Hammond et al., 2012). Una volta rilasciato, lo NO attiva la sGC incrementando la produzione di cGMP e questo permette un'adeguata vasodilatazione coronarica, controllando al contempo il comportamento meccanico dei miocardiociti (Layland et al., 2002; Prendergast et al., 1997). Il risultato è l'ottimizzazione della risposta ventricolare, sia sistolica che diastolica non solo in condizioni basali, ma anche in risposta allo stretch. Questo è di fondamentale importanza in quegli stati patologici caratterizzati da disfunzione diastolica, inclusa l'ipertrofia ventricolare e lo scompenso cardiaco (Boluyt et al., 1995). Nel cuore scompensato dei ratti SHR anziani, caratterizzato da una disfunzione nella contrazione e nel rilassamento (Crabos et al., 1997, Bayraktutan et al., 1998; Hammond et al., 2012.), i meccanismi per la generazione di NO sono danneggiati a causa anche dell'endotelio disfunzionale e di una diminuita espressione della eNOS (Ito et al., 1997). In queste circostanze, una ridotta disponibilità di NO, e la conseguente limitazione della perfusione coronarica del miocardio, accrescono il deterioramento della performance emodinamica.

E' noto che lo NO è coinvolto anche nella risposta mioardica allo stretch, con un meccanismo regolato in termini spaziali e temporali. Durante le due fasi della risposta allo stiramento (quella rapida e quella lenta; vedi sopra), il sistema NOS-NO interviene seguendo una ben precisa sequenza temporale che coinvolge le NOS costitutive (eNOS e nNOS) localizzate all'interno del miocardio e nell'endotelio, sia vascolare sia endocardico (Garofalo et al., 2009). Nella fase rapida, la nNOS localizzata nel SR genera NO il quale induce un incremento del  $Ca^{2+}$  intracellulare attraverso la modulazione del complesso PLN-SERCA (Zhang et al., 2009). Questo evento è accompagnato da un rilascio di NO eNOS-dipendente dall'endotelio vascolare che induce la formazione dei ponti trasversi e aumenta la sensibilità del  $Ca^{2+}$  per la Troponina C (Prendergast et al., 1997; Petroff et al., 2010). Nella fase lenta, lo stretch delle fibre determina un'attivazione dell'eNOS la quale, attraverso la via NO-GC-cGMP, induce un aumento transitorio del  $Ca^{2+}$  e aumento della forza di contrazione (Casadei et al., 2003). In questa cascata di eventi della normale fase lenta, la PKG gioca un ruolo permissivo, come recentemente dimostrato nei muscoli papillari (Casadei et al., 2003). Così, fisiologicamente, la produzione endogena NO è temporalmente modulata per sostenere la diversa risposta allo stretch. Nello studio concernente il ruolo della CST nella risposta miocardica allo stiramento, bisogna rilevare che i parametri cardiaci, sia nei WKY sia in quelli SHR sono stati misurati 1 min dopo ogni incremento del volume del palloncino intraventricolare, operando così all'interno della prima fase (Cingolani et al., 2003; Casadei et al., 2003). E' importante da rilevare che le azioni della CST sono accompagnate da S-nitrosilazione di proteine e dalla produzione di cGMP, suggerendo l'attivazione dei meccanismi NO-dipendenti. Inoltre, come mostrato in questo ma anche in precedenti studi, la CST sembra interagire con l'endotelio vascolare contribuendo alla generazione paracrina di NO (Angelone et al., 2008; 2012). Tuttavia rimane una questione irrisolta se il peptide modula soltanto la prima o anche la fase inotropa tardiva, o entrambe.

E' stato osservato che nei ratti WKY e SHR l'effetto positivo suscitato dalla CST sulla risposta di Frank-Starling è abolito dall'inibizione specifica della sGC da parte dell'inibitore ODQ, accompagnata da un aumento dei livelli del cGMP intracellulare. E' noto che l'attivazione dello NO incrementa la produzione di cGMP da parte della sGC. A sua volta il cGMP attiva la PKG che riduce la concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$  per chiusura dei canali lenti di membrana e anche i canali rianodinici del reticolo sarcoplasmatico, modulando negativamente la contrattilità cardiaca, attraverso

fosforilazione della troponina I e ridotta affinità del  $\text{Ca}^{2+}$  per la troponina C (Layland et al., 2002; Prendergast et al., 1997). Allo stesso tempo, un aumento di attività della pompa SERCA2a indotta dallo NO consente un modo rapido di adattamento alla contrattilità miocardica aumentando il reuptake del calcio nel SR (Zhang et al., 2008).

Nel presente studio, si è osservato che la CST ha incrementato la risposta Frank-Starling nei ratti WKY e nei ratti SHR mediante un aumento dei livelli di cGMP e l'attivazione della PKG. Questo è stato dimostrato inibendo la sGC mediante trattamento con ODQ, il quale ha annullato gli effetti della CST, e mediante la misurazione dei livelli di cGMP. Inoltre, l'attivazione del pathway PI3K/Akt-NO-cGMP-PKG è stata dimostrata mediante analisi Western Blotting che ha mostrato incrementi dei livelli di fosforilazione di AKT, eNOS, nNOS e del PLN.

E' noto che lo NO media la risposta inotropica allo stretch mediante un meccanismo che coinvolge la S-nitrosilazione delle proteine miocardiche (Massion et al., 2005). Esso, oltre ad attivare le vie di segnalazione cGMP-dipendenti, può modificare direttamente i residui sulfidrilici di proteine mediante S-nitrosilazione (Hess et al., 2005). Usando il metodo del biotin switch, nel presente studio sono stati valutati i livelli di S-nitrosilazione delle proteine nei cuori WKY ed SHR esposti alla manovra di Frank-Starling in presenza di CST. I risultati mostrano che il peptide induce un incremento NO-dipendente della S-nitrosilazione di proteine prevalentemente ad alto, medio e basso peso molecolare. Sebbene ulteriori studi siano necessari per chiarire il target di queste modificazioni post-traslazionali, è noto che nel cuore di mammifero, potenziali targets di S-nitrosilazione sono i recettori accoppiati a proteine G (Whalen et al., 2007), Hsp90, una chaperonina coinvolta nell'attivazione della eNOS (Martinez-Ruiz et al., 2005), e cascate mitocondriali pro ed anti apoptotiche (Choi et al., 2002). In aggiunta, la S-nitrosilazione modula i canali per la rianodina, i canali al potassio e gli L-type calcium channels (Choi et al., 2002). Questo influenza in maniera importante i cicli del  $\text{Ca}^{2+}$  e la contrattilità (Gonzales et al., 2009). È interessante notare che, sia nei ratti WKY sia negli SHR abbiamo osservato un aumento della S-nitrosilazione di proteine con peso molecolare intorno a 100 kDa. Questo corrisponde al peso molecolare apparente della dinamina, una GTPasi che può essere S-Nitrosilata dallo NO (Kang-Decker et al., 2007) e che recentemente si sta delineando nel cuore come regolatore del traffico e della funzione dei canali ionici, inclusi i canali del calcio di tipo L (Li et al., 2013).

***Conclusioni***

## **CONCLUSIONI**

Nel presente lavoro è stato dimostrato che in cuori normotesi WKY e ipertesi SHR la CST influenza positivamente la risposta Frank-Starling attraverso lo NO prodotto dal VE, e il pathway PI3K/NO/cGMP/PKG. L'evidenza che l'effetto CST-dipendente sulla risposta Frank-Starling sia della stessa grandezza di quella indotta dallo NO, è supportata dal fatto che il frammento CgA-derivato, contribuisce alla regolazione umorale della risposta eterometrica ventricolare funzionando come un attivatore endogeno delle NOS (Angelone et al., 2012). Questo accade non solo in condizioni normali, ma anche in presenza di una funzione cardiaca alterata, come dimostrato dai dati ottenuti sul cuore scompensato di ratto SHR. A lungo termine, questa produzione di NO indotta dalla CST può essere vantaggiosa per il cuore scompensato al fine di contrastare il danno, al pari di quanto descritto a proposito dello NO in modelli animali di ipertrofia miocardica secondaria all'ipertensione e in studi clinici (Wen et al., 2004, Young et al., 2014).

I risultati ottenuti sono rilevanti poiché contribuiscono a descrivere meglio i meccanismi fisiologici endogeni che consentono adeguate risposte a cambiamenti emodinamici e possono aprire la strada a studi volti a valutare l'applicazione putativa della CST in condizioni cardiache avverse. Questo può essere il caso di pazienti con insufficienza cardiaca caratterizzata da dilatazione ventricolare o diminuita modulazione autonoma cardiaca accompagnata da un aumento del post-carico, che dipendono dalla risposta Frank-Starling per mantenere un'adeguata portata cardiaca.

***Bibliografia***

- ❖ American Heart Association Heart failure. Available from: [http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartFailure/HeartFailure\\_UCM\\_002019\\_SubHomePage.jsp](http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartFailure/HeartFailure_UCM_002019_SubHomePage.jsp). (2011).
- ❖ Akaddar A, Doderer-Lang C, Marzahn MR, Delalande F, Mousli M, Helle K, Van Dorsselaer A, Aunis D, Dunn BM, Metz-Boutigue MH, Candolfi E. *Catestatin, an endogenous chromogranin A-derived peptide, inhibits in vitro growth of Plasmodium falciparum*. (2010). *Cell Mol Life Sci*, 67(6):1005-15.
- ❖ Angelone T., Quintieri A.M., Pasqua T., Gentile S., Tota B., Mahata S.K., Cerra M.C.. *Phosphodiesterase type-2 and NO-dependent S-Nitrosylation mediate the cardioinhibition of the antihypertensive catestatin*. (2012). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 302 (2) pp. H431–H442.
- ❖ Angelone T., Quintieri A.M., Brar B.K, Limchaiyawat P.T., Tota B., Mahata S.K., Cerra M.C.. *The antihypertensive chromogranin a peptide catestatin acts as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac inotropism and lusitropism*. (2008). *Endocrinology.*, 149 (10) pp. 4780–4793.
- ❖ Aquilano K, Lettieri Barbato D, Rosa CM. *The multifaceted role of nitric oxide synthases in mitochondrial biogenesis and cell differentiation*. (2015). *Commun Integr Biol*, 29;8(2):e1017158.
- ❖ Bachetti T, Comini L, Curello S., Bastianon D, Palmieri M, Bresciani G. *Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells*. (2004). *J Mol Cell Cardiol.*, 37, pp. 939–945.
- ❖ Bachmann S., Bosse H.M, Mundel P. *Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney*. (1995). *Am J Physiology-Renal Physiology*, 268 pp. F885–F898.
- ❖ Bae S.W, Kim H.S, Cha Y.N, Park Y.S., Jo S.A, Jo I. *Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway*. (2003). *Biochem Biophysical Res Commun*, 306 pp. 981–987.
- ❖ Balligand JL, Cannon PJ. *Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (1997). 17:1846–1858.
- ❖ Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW. et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. (2002). *Nature*416:337–340.
- ❖ Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S.K., Fischer-Colbrrie, R., Loh, Y.P and Salton,S.R. *The extended granin family: structure, function, and biomedical implications*. (2011). *Endocr Rev*. 6,755–797.

- ❖ Bassino E, Fornero S, Gallo MP, Ramella R, Mahata SK, Tota B, Levi R, Alloatti G. *A novel catestatin-induced antiadrenergic mechanism triggered by the endothelial PI3K-eNOS pathway in the myocardium.* (2011). *Cardiovasc Res*, 91(4):617-24.
- ❖ Bassino E., Fornero S., Gallo M.P., Gallina C., Femminò, S., Levi R., Tota B., Alloatti G. *Catestatin exerts direct protective effects on rat cardiomyocytes undergoing ischemia/reperfusion by stimulating PI3K-Akt-GSK3 $\beta$  pathway and preserving mitochondrial membrane potential.* (2015). *PLoS One* 16,10: e0119790.
- ❖ Bayraktutan U., Yang Z.K., Shah A.M. *Selective dysregulation of nitric oxide synthase type 3 in cardiac myocytes but not coronary microvascular endothelial cells of spontaneously hypertensive rat.* (1998). *Cardiovasc. Res.*, 38 pp. 719–726.
- ❖ Biswas N, Vaingankar SM, Mahata M, Das M, Gayen JR, Taupenot L, Torpey JW, O'Connor DT, Mahata SK. *Proteolytic cleavage of human chromogranin a containing naturally occurring catestatin variants: differential processing at catestatin region by plasmin.* (2008). *Endocrinology*, 149(2):749-57.
- ❖ Biswas N, Rodriguez-Flores JL, Courel M, Gayen JR, Vaingankar SM, Mahata M, Torpey JW, Taupenot L, O'Connor DT, Mahata SK. *Cathepsin L colocalizes with chromogranin a in chromaffin vesicles to generate active peptides.* (2009). *Endocrinology*, 150 (8): 3547-57.
- ❖ Biswas N, Curello E, O'Connor DT and Mahata SK. *Chromogranin/secretogranin proteins in murine heart: myocardial production of Chromogranin A fragment catestatin (Chga(364-384)).* (2010). *Cell Tissue Res*. 3:353–361.
- ❖ Boo Y.C., Hwang J., Sykes M., Michell B.J., Kemp B.E., Lum H. *Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by a protein kinase A-dependent mechanism.* (2002). *Am J Physiology-Heart Circulatory Physiology*, 283 pp. H1819–H1828.
- ❖ Brecht D.S., Hwang P.M. Snyder S.H. *Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.* (1990). *Nature*, 347 pp. 768–770.
- ❖ Brecht DS. *Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem.* (2003). *J Cell Sci.* ;116:9–15.
- ❖ Brune B, Lapetina EG. *Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for nitric oxide signaling.* (1995). *Gen Eng*, 17:148–164.
- ❖ Burnett A.L, Lowenstein C.J., Brecht D.S, Chang T., Snyder S.H. *Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection.* (1992). *Science*, 17;257(5068):401-3.
- ❖ Butt E., Bernhardt M., Smolenski A., Kotsonis P., Fröhlich L.G., Sickmann A. *Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases.*(2000). *J Biol Chem*, 275 pp. 5179–5187.

- ❖ Crabos M., Coste P, Paccalin M., Tariosse L., Daret D., P. Basse, Bonoron-Adele S. *Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats.* (1997). *J. Mol. Cell. Cardiol*, 29, pp. 55–65.
- ❖ Calaghan S.C, White E. *The role of calcium in the response of cardiac muscle to stretch.* (1999). *Prog. Biophys. Mol. Biol*, 71 pp. 59–90.
- ❖ Calaghan S.C., White E. *Contribution of angiotensin II, endothelin 1 and the endothelium to the slow inotropic response to stretch in ferret papillary muscle.* (2001). *Pflugers. Arch.*, 441 pp. 514–520.
- ❖ Carmeliet P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.* (2000). *Nat Med*6:389–395.
- ❖ Casadei B, Sears CE *Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses.* (2003). *Progress in Biophysics and molecular Biology* 82:67-80.
- ❖ Cashen, D.E. MacIntyre, W.J. Martin. *Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase.* (2002), *Br J Pharmacol*, 136 pp. 693–700.
- ❖ Caulin-Glaser T., Garcia-Cardena G., Sarrel P., Sessa W.C., Bender J.R. *17 $\beta$ -estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization.* (1997). *Circulation Res*, 81 pp. 885–892.
- ❖ Ceconi C, Ferrari R, Bachetti T, Opasich C, Volterrani M, Colombo B, Parrinello G, Corti A. *Chromogranin A in heart failure; a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality.* (2002). *Eur. Heart J*, 23: 967-974.
- ❖ Cerra MC, De Iuri L, Angelone T, Corti A, Tota B. *Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart.* (2006). *Basic Res Cardiol*, 101(1):43-52.
- ❖ Chen CA, Druhan LJ, Varadharaj S. *Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme.* (2008). *J Biol Chem*, 283(40):27038–27047.
- ❖ Chen H.-I., Chiang I.-P., Jen C.J. *Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats.* (1996). *J Biomed Sci*, 3 pp. 454–460.
- ❖ Chen Z., Yuhanna I.S., Galcheva-Gargova Z., Karas R.H., Mendelsohn M.E., Shaul P.W. *Estrogen receptor  $\alpha$  mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen.* (1999). *J Clin Investigation*, 103 p. 401.

- ❖ Chen Z.-P., Mitchelhill K.I., Michell B.J., Stapleton D., Rodriguez-Crespo I., Witters L.A. *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase*. (1999). *FEBS Lett*, 443, pp. 285–289.
- ❖ Choi B.M., Pae H.O., Jang S.I., Kim Y.M., Chung H.T. *Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator*. (2002). *J. Biochem. Mol. Biol.*, 35 pp. 116–126.
- ❖ Cingolani O.H., Yang X.P., Cavasin M.A., Carretero O.A. *Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats*. (2003). *Hypertension*, 41 (2) 249e254.
- ❖ Ciesielski-Treska J., Ulrich G., Taupenot L., Chasserot-Golaz S., Corti A., Aunis D., Bader M.F.. *Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells*. (1998). *J Biol Chem*, 273 pp. 14339–14346. *Circulation Res*, 83 ,pp. 1271–1278.
- ❖ Clapham DE, Neher E. *Substance P reduces acetylcholine-induced currents in isolated bovine chromaffin cells*. (1984 ). *J Physiol*, 347:255-77.
- ❖ Cohen R.A., Plane F., Najibi S., Huk I., Malinski T., Garland C.J. *Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery*. (1997). *Proc Natl Acad Sci*, 94 pp. 4193–4198.
- ❖ Coppo R., Amore A. *Importance of the bradykinin–nitric oxide synthase system in the hypersensitivity reactions of chronic haemodialysis patients*. (2000). *Nephrol Dial Transplant*, 15 pp. 1288–1290.
- ❖ Crippa L., Bianco M., Colombo B., Gasparri A.M., Ferrero E., Loh Y.P. *A new ChromograninA-dependent angiogenic switch activated by thrombin*. (2013). *Blood*, 2, 392–402.
- ❖ Crozatier B. *Stretch-induced modifications of myocardial performance: from ventricular function to cellular and molecular mechanisms*. (1996). *Cardiovasc Res.*;32:25-37.
- ❖ D’Amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P. *Biological function and clinical relevance of Chromogranin A and derived peptides*. (2014). *Endocr Connect*, 3: R45–R54
- ❖ Danser A.H.J., de Vries R., Schoemaker R.G., Saxena P.R.. *Bradykinin-induced release of nitric oxide by the isolated perfused rat heart: importance of preformed pools of nitric oxide-containing factors*. (1998). *J Hypertens*, 16 pp. 239–244.
- ❖ Davisson R.L., Bates J.N, Johnson A.K., Lewis S.J. *Use-dependent loss of acetylcholine- and bradykinin-mediated vasodilation after nitric oxide synthase inhibition evidence for preformed stores of nitric oxide-containing factors in vascular endothelial cells*. (1996). *Hypertension*, 28 pp. 354–360.
- ❖ Dawson A, Davies JI, Morris AD, Struthers AD. *B-type natriuretic Peptide is associated with both augmentation index and left ventricular mass in diabetic patients without heart failure*. (2005). *Am J Hypertens*, 18(12 Pt 1):1586-91.

- ❖ Dawson T.M., Brecht D.S, Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H. *Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues.* (1991). Proc Natl Acad Sci, 88 pp. 7797–780.
- ❖ De Stefano D., Maiuri M.C, Iovine B., Ialenti A, Bevilacqua M.A., Carnuccio R. *The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages.* (2006). J Mol Med, 84 pp. 65–74.
- ❖ Denninger J.W. and Marletta M.A. *Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway.* (1999). Biochim Biophys Acta, 1411(2-3): p. 334-50.
- ❖ Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M.. *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.* (1999). Nature, 399 pp. 601–605.
- ❖ Doblinger A, Becker A, Seidah NG, Laslop A. *Proteolytic processing of chromogranin A by the prohormone convertase PC2.* (2003). Regul Pept, 111(1-3):111-6.
- ❖ Dondossola E., Gasparri A.M., Colombo B., Sacchi A., Curnis F., Corti A. *Chromogranin A restricts drug penetration and limits the ability of NGR-TNF to enhance chemotherapeutic efficacy.* (2011). Cancer Res. 17,5881–5890.
- ❖ Döring HJ. *The isolated perfused heart according to Langendorff technique function—application.* (1990). Physiol Bohemoslov, 39(6):481-504.
- ❖ 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. *Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin.* (2008). Eur J Pharmacol, 598 pp. 104–111.
- ❖ Fabiato A, Fabiato F. *Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarcomere length.* (1975). Nature, 256:54-56.
- ❖ Fasciotto BH, Trauss CA, Greeley GH, Cohn DV. *Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion.* (1993). Endocrinology, 133(2):461-6.
- ❖ Feldman SA, Eiden LE. *The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia.* (2003). Endocr Pathol. Spring;14(1):3-23.
- ❖ Ferrero E., Scabini S., Magni E., Foglieni C., Belloni D., Colombo B. *Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor alpha- induced vascular leakage.* (2004). FASEBJ, 3,554–556.

- ❖ Fornero S., Bassino E., Ramella R., Gallina C., Mahata S.K., Tota B., Levi R., Alloatti G., Gallo M.P. *Obligatory role for endothelial heparan sulphate proteoglycans and caveolae internalization in catestatin-dependent eNOS activation.* (2014). *Biomed. Res. Int.* 2014 783623.
- ❖ Fung MM, Salem RM, Mehtani P, Thomas B, Lu CF, Perez B, Rao F, Stridsberg M, Ziegler MG, Mahata SK. *Direct vasoactive effects of the chromogranin A (CHGA) peptide catestatin in humans in vivo.* (2010). *Clin Exp Hypertens*, 32(5):278-87.
- ❖ Fukuda N, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S. *Titin and troponin: central players in the Frank-Starling mechanism of the heart.* (2009). *Curr Cardiol Rev*, 5(2):119-24
- ❖ Funkelstein L, Toneff T, Hwang SR, Reinheckel T, Peters C, Hook V. *Cathepsin L participates in the production of neuropeptide Y in secretory vesicles, demonstrated by protease gene knockout and expression.* (2008) *J Neurochem*, 106(1):384-91.
- ❖ Galinanes M, Hearse DJ. *Assessment of ischemic injury and protective interventions: the Langendorff versus the working rat heart preparation.* (1990). *Can J Cardiol.* Mar;6(2):83-91.
- ❖ Garofalo F., Parisella M.L., Amelio D., Tota B., Imbrogno S. *Phospholamban S-Nitrosylation modulates Starling response in fish heart.* (2009). *Proc. Biol. Sci.*, 276 pp. 4043–4052.
- ❖ Gödecke A, Heinicke T, Kamkin A, Kiseleva I, Strasser RH, Decking UK, Stumpe T, Isenberg G, Schrader J. *Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts.* (2001). *J Physiol.* 1;532(Pt 1):195-204.
- ❖ Goetze J.P., Alehagen U., Flyvbjerg A., Rehfeld J.F. *Chromogranin A as a biomarker in cardiovascular disease.* (2014). *BiomarkMed*, 1,133–140.
- ❖ Goldberg D.E., Slater A.F., Cerami A, Henderson G.B. *Hemoglobin degradation in the malaria parasite Plasmodium falciparum: an ordered process in a unique organelle.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (1990), pp. 2931–293
- ❖ Goldenbaum G., Dickerson R. *Nitric oxide production by lightning discharges.* (1993). *J Geophys Res Atmos*, 98 pp. 18333–18338.
- ❖ Gonzalez D.R., Treuer A., Sun Q.A., Stamler J.S., Hare J.M. *S-Nitrosylation of cardiac ion channels.* (2009). *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54 188e195
- ❖ Gordon AM, Homsher E, Regnier M. *Regulation of contraction in striated muscle.* (2001). *Physiol Rev*, 80(2):853-924.
- ❖ Gotti C, Fornasari D, Clementi F. *Human neuronal nicotinic receptors.* (1997). *Prog Neurobiol*, 53(2):199-237.
- ❖ Gross S.S., Jaffe E.A, Levi R., Kilbourn R.G. *Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-*

- independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages.* (1991). *Biochem Biophysical Res Commun*, 178 pp. 823–829.
- ❖ Hammond J., Balligand J.L.. *Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling.* (2012). *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 52 pp. 330–340.
  - ❖ Han J.C., Tran K., Johnston C.M, Nielsen P.M.F., Barrett C.J., Taberner A.J., Loisel D.S.. *Reduced mechanical efficiency in left-ventricular trabeculae of the spontaneously hypertensive rat.* (2014). *Physiol. Rep.*, 2 p. e12211.
  - ❖ Harris M.B., Ju H., Venema V.J, Liang H., Zou R, Michell B.J. *Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation.* (2001). *J Biol Chem*, 276 pp. 16587–16591.
  - ❖ Hearse DJ, Sutherland FJ. *Experimental models for the study of cardiovascular function and disease.* (2000). *Pharmacol Res*, 41(6):597-603.
  - ❖ Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH and Tota B (2007). The endocrine role for Chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell. Mol. Life Sci*, 22:2863–2886.
  - ❖ Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. *Protein S-nitrosylation: purview and parameters.* (2005). *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 150– 166.
  - ❖ Helman LJ, Ahn TG, Levine MA, Allison A, Cohen PS, Cooper MJ, Cohn DV, Israel MA. *Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA.* (1988). *J Biol Chem*, 15;263(23):11559-63.
  - ❖ Hibbs J.B. Jr., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M.. *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.* (1988). *Biochem Biophysical Res Commun*, 157 pp. 87–94.
  - ❖ Ichihara S, Inscho E.W., Imig J.D., Navar L.G. *Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function.* (1998). *Am J Physiology-Renal Physiology*, 274 pp. F516–F524.
  - ❖ Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.* (1987). *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:9265–9269.
  - ❖ Jansson A. M., Røsjø H., Omland T., Karlsson T., Hartford M., Flyvbjerg A. *Prognostic value of circulating ChromograninA levels in acute coronary syndromes.* (2009). *Eur.HeartJ.* 1,25–32.
  - ❖ Kamijo R, Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D. *Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages.* (1994). *Science*, 263 pp. 1612–1615.

- ❖ Kang-Decker N, Cao S., Chatterjee S., Yao J., Egan L.J., Semela D., Mukhopadhyay D, Shah V. *Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-Nitrosylation and activation of dynamin-2.* (2007). *J. Cell. Sci.*, 120, pp. 492–501.
- ❖ Katz A.M. *Ernest Henry Starling, his predecessors, and the “Law of the Heart”.* (2002). *Circulation.*;106:2986–2992.
- ❖ Kellogg D., Zhao J., Coey U., Green J. *Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin.* (2005). *J Appl Physiology*, 98 pp. 629–63.
- ❖ Kennedy B.P., Mahata S.K., O'Connor D.T, Ziegler M.G. *Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin in vivo.* (1998). *Peptides*, 19 pp. 1241–1248.
- ❖ Kim T., and Loh Y.P. *Proteasexin-1 promotes secretory granule biogenesis by preventing granule protein degradation.* (2006). *Mol.Biol.Cell.* 2, 789–798.
- ❖ Kim T., Tao-Cheng J.H., Eiden L.E. and Loh Y.P. *ChromograninA, an “on/off” switch controlling dense-core secretory granule biogenesis.* (2001). *Cell.* 4, 499–509.
- ❖ Kirchmair R, Gander R, Egger M, Hanley A, Silver M, Ritsch A, Murayama T, Kaneider N, Sturm W, Kearny M, Colbrie R, Kircher B, Gaenzer H, Wiedermann CJ, Ropper AH, Losordo DW, Patsch JR, Schratzberg P. *The neuropeptide secretoneurin acts as a direct angiogenic cytokine in vitro and in vivo.* (2004). *Circulation*, 109:777–783.
- ❖ Kirkebøen K., Strand Ø. *The role of nitric oxide in sepsis—an overview.* (1999). *Acta Anaesthesiol Scand*, 43 pp. 275–288.
- ❖ Kishi F., Nakaya Y., Ito S. *Histamine H2-receptor-mediated nitric oxide release from porcine endothelial cells.* (1998). *J Cardiovasc Pharmacol*, 32 pp. 177–182.
- ❖ Kobayashi T, Solaro RJ. *Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility.* (2005). *Annu Rev Physiol*, 67:39-67.
- ❖ Kobzik L., Reid M.B., Bredt D.S., Stamler J.S.. *Nitric oxide in skeletal muscle.* (1994). *Nature*, 372 pp. 546–548
- ❖ Koeslag JH, Saunders PT, Wessels JA. *The chromogranins and the counter-regulatory hormones: do they make homeostatic sense?.* (1999). *J Physiol. Jun 15;517 ( Pt 3):643-9.*
- ❖ Kolluru G.K., Siamwala J.H., Chatterjee S. *eNOS phosphorylation in health and disease.* (2010). *Biochimie*, 92 pp. 1186–1198.
- ❖ Konecki DS, Benedum UM, Gerdes HH, Huttner WB. *The primary structure of human chromogranin A and pncreastatin.* (1987). *J Biol Chem* 262:17026–17030.

- ❖ Kojda G, Kottenberg K. *Regulation of basal myocardial function by NO*. (1999). Cardiovascular Research 41 (3), 514-523.
- ❖ Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter KD, Piper HM, Noack E. *Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes*. (1996). Circulation Research 78 (1), 91-101.
- ❖ Koshimizu H, Kim T, Cawley NX, Loh YP. *Reprint of: Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis*. (2010). Regul Pept.30;165(1):95-101.
- ❖ Krylova M. I. *Chromogranin A: immunocytochemical localization in secretory granules of frog atrial cardiomyocytes*. (2007). Tsitologija 7, 538–543.
- ❖ Kröncke K., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. *Inducible nitric oxide synthase in human diseases*. (1998). Clin Exp Immunol, 113 pp. 147–156.
- ❖ Kruger P.G., Mahata S.K., Helle K.B. *Catestatin (CgA344–364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides*. Regul Pept, 114 (2003), pp. 29–35.
- ❖ Kuchan M.J., Frangos J.A. *Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells*.(1994). Am J Physiology, 266 pp. C628–C636.
- ❖ Lakatta EG, Jewell BR. *Length-dependent activation: its effect on the length-tension relation in cat ventricular muscle*. (1977). Circ Res, 40:251-257.
- ❖ Layland J, Kentish JC. *Myofilament-based relaxant effect of isoprenaline revealed during work-loop contractions in rat cardiac trabeculae*. (2002). J Physiol.;544(Pt 1):171-82.
- ❖ Lantoine F., Iouzalén L., Devynck M., Millanvoye-Van Brussel E., David-Duflho M. *Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca<sup>2+</sup> influx*. (1998). Biochem J, 330 pp. 695–699.
- ❖ Lechner T, Adlassnig C., Humpel C., Kaufmann W.A., Maier H., Reinstadler-Kramer K., Hinterholz J., Mahata S.K., Jellinger K.A, Marksteiner J. *Chromogranin peptides in Alzheimer's disease*. (2004). Exp Gerontol, 39 pp. 101–113.
- ❖ Legssyer AK, Hove-Madsen L, Hoerter J, Fischmeister R. *Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca current in the rat*. (1997). J Mol Cell Cardiol, 29(2):579-91.
- ❖ Lewis R.S. and Deen W.M. *Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions*. (1994). Chem Res Toxicol, 7(4): p. 568-74.
- ❖ Li H., Burkhardt C., Heinrich U.-R., Brausch I., Xia N., Förstermann U. *Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells*. (2003). Circulation, 107 pp. 2348–2354

- ❖ Li J., Zhang D.S., Ye J.C., Li C.M, Qi M., Liang D.D., Xu X.R., Xu L., Liu Y., Zhang H., Zhang Y.Y., Deng F.F, Feng J., Shi D., Chen J.J, Li L., Chen G., Sun Y.F., Peng L.Y., Chen Y.H. *Dynamin-2 mediates heart failure by modulating Ca<sup>2+</sup>-dependent cardiomyocyte apoptosis.* (2013). *Int. J. Cardiol.*, 168 pp. 2109–2119.
- ❖ Livett BG, Marley PD. *Noncholinergic control of adrenal catecholamine secretion.* (1993). *J Anat*, 183 (Pt 2): 277-89.
- ❖ Lowenstein C.J., Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. (2004). *J Cell Sci*, 117 pp. 2865–2867.
- ❖ Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, Hikim AP, Mahata M, Ray S, Staite E, Wu H, Gu Y, Dalton N, Kennedy BP, Ziegler MG, Ross J, Mahata SK *Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued in human ortholog.* (2005). *J. Clin. Invest.* 115: 1942-1952.
- ❖ Mahapatra NR, Mahata M, Mahata SK, O'Connor DT. *The chromogranin A fragment catestatin: specificity, potency and mechanism to inhibit exocytotic secretion of multiple catecholamine storage vesicle co-transmitters.*(2006). *J Hypertens*; 24(5):895-904.
- ❖ Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, Gill BM, Parmer RJ. *Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist.* (1997) *J Clin Invest.* Sep 15;100(6):1623-33.
- ❖ Mahata K, Mahata M., Parmer R.J., O'Connor D.T. *Desensitization of catecholamine release: the novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A<sub>344-364</sub>) acts at the receptor to prevent nicotinic cholinergic tolerance.* *J Biol Chem*, 274 (1999), pp. 2920–2928.
- ❖ Mahata SK, Mahata M, Wakade AR, O'Connor DT. *Primary structure and function of the catecholamine release inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(344-364)): identification of amino acid residues crucial for activity.* (2000). *Mol Endocrinol*, 14(10):1525-35.
- ❖ Mahata SK, Mahapatra NR, Mahata M, Wang TC, Kennedy BP, Ziegler MG, O'Connor DT *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.* (2003). *J Biol Chem*, 22;278(34):32058-67.
- ❖ Mahata SK, Mahata M, Fung MM, O'Connor DT. *Reprint of: Catestatin: a multifunctional peptide from chromogranin A.* (2010). *Regul Pept*, 30;165(1):52-62.
- ❖ Mannaioni P., Bello M., Di Bello M., Mirabella C., Gai P., Schunack W. *Interaction between histamine and nitric oxide in rat mast cells and in isolated guinea pig heart.* (1997). *Int Archives Allergy Immunol*, 113 pp. 297–299.

- ❖ Marti E, Ferrer I, Blasi J. Differential regulation of chromogranin A, chromogranin B and secretoneurin protein expression after transient forebrain ischemia in the gerbil. (2001). *Acta Neuropathol (Berl)*, 101:159–166.
- ❖ Martin E., Nathan C, Xie Q. *Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase*. (1994). *J Exp Med*, 180 pp. 977–984.
- ❖ Martinez-Ruiz A., Villanueva L., Gonzalez de Orduna C., Lopez-Ferrer D. *S-Nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities*. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (2005), pp. 8525–8530.
- ❖ Massion BP, Balligand JL *Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice*. (2003). *Journal of Physiology* 546 (Pt1), 63-75.
- ❖ Massion P.B., Pelat M., Belge C., Balligand J.L. *Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide*. (2005). *Comp. Biochem. Physiol.* 142, 144–150.
- ❖ Matsuda N, Jesmin S, Takahashi Y, Hatta E, Kobayashi M, Matsuyama K, Kawakami N, Sakuma I, Gando S, Fukui H, Hattori Y, Levi R. *Histamine H1 and H2 receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans*. (2004). *J Pharmacol Exp Ther*, 309(2):786-95.
- ❖ Massion P.B., Pelat M., Belge C., Balligand J.L. *Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide*. (2005), *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 142 pp. 144–15.
- ❖ Mazza R, Pasqua T, Gattuso A *Cardiac heterometric response: the interplay between Catestatin and nitric oxide deciphered by the frog heart*. (2012). *Nitric Oxide* 27:4-49.
- ❖ Metz-Boutigue M. H., Garcia-Sablone P., Hogue-Angeletti R., Aunis D. *Intracellular and extracellular processing of Chromogranin A. Determination of cleavage sites*. (1993). *Eur. J. Biochem.* 1, 247–257.
- ❖ Metz-Boutigue M.H, Goumon, Y., Lugardon K., Strub J.M., Aunis D. *Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules*. (1998). *Cell Mol Neurobiol*, 18 pp. 249–266.
- ❖ Milligan G. *New aspects of G-protein-coupled receptor signalling and regulation*. (1998)., 9(1):13-9.
- ❖ Miyazaki-Akita A., Hayashi T., Ding Q.F., Shiraishi H., Nomura T., Hattori Y. *17 $\beta$ -Estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease*. (2007). *J Pharmacol Exp Ther*, 320 pp. 591-598.
- ❖ Mohan P, Sys SU, Brutsaert DL. *Positive inotropic effect of nitric oxide in myocardium*. (1995). *Int J Cardiol*, 50:233–237.

- ❖ Mondillo C., Pagotto R.M., Piotrkowski B., Reche C.G., Patrignani Z.J., Cymeryng C.B., Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y. *Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects.* (2008). *Acta Physiol (Oxf)* 192:309–324.
- ❖ Morris K.R, Lutz R.D., Choi H.S, Kamitani T, Chmura K, Chan E.D. *Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide.* (2003). *Infect Immun*, 71 pp. 1442–1452.
- ❖ Mosley CA, Taupenot L, Biswas N, Taulane JP, Olson NH, Vaingankar SM, Wen G, Schork NJ, Ziegler MG, Mahata SK, O'Connor DT. *Biogenesis of the secretory granule: chromogranin A coiled-coil structure results in unusual physical properties and suggests a mechanism for granule core condensation.* (2007). *Biochemistry* 46:10999–11012.
- ❖ Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y. *Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects.* (2008). *Acta Physiol (Oxf)*;192:309–324.
- ❖ Munoz D.G. Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab Invest*, 64 (1991), pp. 826–832.
- ❖ Nanes MS, O'Connor DT, Marx SJ .Plasma chromogranin-A in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.*(1989 ).69(5):950-5.
- ❖ Nekooeian A.A., Lim S.L., Man R.Y., Pang C.C. *Chronic 17β-estradiol augments relaxant role of basal nitric oxide in blood vessels from rats with heart failure.*(1998). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacol*, 358 pp. 671–677.
- ❖ O'Donnell VB, Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Krishna NR, Barnes KM. *Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion.* (1999). *Chem Res Toxicol*, 12:83–92.
- ❖ O'Connor DT, Kailasam MT, Kennedy BP, Ziegler MG, Yanaihara N, Parmer RJ. *The catecholamine release-inhibitory "catestatin" region of chromogranin a: early decline in humans at genetic risk of hypertension.* (2002).*Ann N Y Acad Sci.* 971:533-5.
- ❖ O'Connor DT. *Direct vasoactive effects of the chromogranin A (CHGA) peptide catestatin in humans in vivo.*(2010). *Clin Exp Hypertens*; 32:278–287.
- ❖ Omland T, Dickstein K, Syversen U. *Association between plasma chromogranin A concentration and long-term mortality after myocardial infarction.* (2003). *Am J Med.* 114(1):25-30.

- ❖ Ozawa K, Whalen EJ, Nelson CD, Mu Y, Hess DT, Lefkowitz RJ, Stamler JS. *S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking*. (2008). *Mol Cell*. Aug 8;31(3):395-405.
- ❖ Parmer R. J., Mahata M., Gong Y., Mahata S. K., Jiang Q., O'Connor D. T. *Processing of Chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for regulating catecholamine secretion*. (2000). *J. Clin. Invest.* 7, 907–915.
- ❖ Parmley WW, Chuck L. *Length-dependent changes in myocardial contractile state*. (1973). *Am J Physiol*, 224:1195-1199.
- ❖ Parsons M.E., Ganellin C.R. *Histamine and its receptors*. (2006). *Br J Pharmacol*, 147 pp. S127–S135.
- ❖ Pasqua T, Corti A, Gentile S, Pochini L, Bianco M, Metz-Boutigue MH. *Full-length human chromogranin-A cardioactivity: myocardial, coronary, and stimulus-induced processing evidence in normotensive and hypertensive male rats hearts*. (2013). *Endocrinology*, 9:3353–3365.
- ❖ Patterson SW, Piper H & Starling EH. *The regulation of the heart beat*. (1914). *J Physiol* 48,357.
- ❖ Pelat M, Massion PB, Balligand JL. *Nitric oxide "at heart": emerging paradigms after a decade*. (2005). *Archive des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*, 98 (3), 242-248.
- ❖ Penna C, Alloatti G, Gallo MP, Cerra MC, Levi R, Tullio F, Bassino E, Dolgetta S, Mahata SK, Tota B, Pagliaro P. *Catestatin improves post-ischemic left ventricular function and decreases ischemia/reperfusion injury in heart*. (2010). *Cell Mol Neurobiol* 30:1171-1179.
- ❖ Penna C, Angotti C, Pagliaro P. *Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning*. (2014). *Exp Biol Med (Maywood)*, 239(6):647-62.
- ❖ Pérez N.G, de Hurtado M.C., Cingolani H.E. *Reverse mode of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response*. (2001). *Circ. Res.*, 88, pp. 376–382.
- ❖ Perrelli M.G, Tullio F., Angotti C., Cerra M.C., Angelone T., Tota B., Alloatti G., Penna C., Pagliaro P. *Catestatin reduces myocardial ischaemia/reperfusion injury: involvement of PI3K/Akt, PKCs, mitochondrial KATP channels and ROS signaling*. (2013). *Pflugers Arch.*, 465 (7) pp. 1031–1040.
- ❖ Petroff M.G., Kim S.H., Pepe S., Dessy C., Marbán E., Balligand J.L., Sollott S.J. *Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca<sup>2+</sup> release in cardiomyocytes*. (2010). *Nat. Cell. Biol.*, 3 (10) pp. 867–873.

- ❖ Pieroni M, Corti A, Tota B, Curnis F, Angelone T, Colombo B. *Myocardial production of Chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function.* (2007). *Eur. Heart J*, 9:1117–1127.
- ❖ Prast H., Philippu A. *Nitric oxide as modulator of neuronal function.* (2001). *Prog Neurobiol*, 64 pp. 51–68.
- ❖ Prendergast B.D., Sagach V.F., Shah A.M. *Basal release of nitric oxide augments the Frank–Starling response in the isolated heart.* (1997). *Circulation*, 96 (4) pp. 1320–1329.
- ❖ Rangon C.M., Haik S., Faucheux B.A., Metz-Boutigue M.H, Fierville F, Fuchs J., Hauw J.J., Aunis D. *Different chromogranin immunoreactivity between prion and  $\alpha$ -beta amyloid plaque.* (2003). *NeuroReport*, 14, pp. 755–758P.
- ❖ Reddy LG, Autry JM, Jones LR, Thomas DD. *Co-reconstitution of phospholamban mutants with the Ca-ATPase reveals dependence of inhibitory function on phospholamban structure.* (1999). *J Biol Chem*, 19;274(12):7649-55.
- ❖ Sears CE, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, Neubauer S, Terrar DA, Casadei B. *Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling.* (2003). *Circ Res.* Mar 21;92(5):e52-9.
- ❖ Scamuffa N, Calvo F, Chrétien M, Seidah NG, Khatib AM. *Proprotein convertases: lessons from knockouts.* (2006). *J*, 20(12):1954-63.
- ❖ Schini V., Junquero D., Scott-Burden T., Vanhoutte P. *Interleukin-1  $\beta$  induces the production of an L-arginine-derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta.* (1991). *Biochem Biophysical Res Commun*, 176 pp. 114–121.
- ❖ Schmidt AG, Edes I, Kranias EG. *Phospholamban: a promising therapeutic target in heart failure?* (2001). *Cardiovasc Drugs Ther.* 15(5):387-96.
- ❖ Schulz R, Kelm M, Heusch G. *Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury.* (1992). *Cardiovasc Res.*2004;61:402–413.
- ❖ Selles J., Polini N., Alvarez C., Massheimer V. *Progesterone and 17  $\beta$ -estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation.* (2001). *Life Sci*, 69 pp. 815–827.
- ❖ Semenza G.L. *New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis.* (2005). *J Clin Investigation*, 115 p. 2976.
- ❖ Sessa W.C. *eNOS at a glance.* (2004). *J Cell Sci*, 117 pp. 2427–2429.
- ❖ Shah AM, MacCarthy PA. *Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function.* (2000). *Pharmacol Ther.* ;86:49–86.

- ❖ Sharshar T, Gray F., de la Grandmaison G.L., Hopkinson N.S., Ross E., Dorandeu A. *Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock.* (2003). *Lancet*, 362 pp. 1799–1805.
- ❖ Schmidt A, Sivaraman J, Li Y, Larocque R, Barbosa JA, Smith C, Matte A, Schrag JD, Cygler M. *Three-dimensional structure of 2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase from Escherichia coli complexed with a PLP-substrate intermediate: inferred reaction mechanism.* (2001). *Biochemistry* 40(17):5151-60.
- ❖ Simon JP, Bader MF, Aunis D. *Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides.* (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;85(5):1712-6.
- ❖ SoRelle R. *Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries.* (1998). *Circulation*, 98, pp. 2365–2366.
- ❖ Spink J., Cohen J., Evans T.J. *The cytokine Responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase activation by nuclear factor- $\kappa$ B.* (1995). *J Biol Chem*, 270 pp. 29541–29547.
- ❖ Starling EH & Visscher MB. *The regulation of the energy output of the heart.* (1926). *J Physiol* 62,243–261.
- ❖ Steiner HJ, Weiler R, Ludescher C, Schmid KW and Winkler H. *Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart.* (1990). *J. Histochem. Cytochem*, 6:845–850.
- ❖ Stojanovic M.O., Ziolo M.T., Wahler G.M., Wolska B.M. *Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes.* (2001). *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 281 pp. C342–C349.
- ❖ Straub V.A, Grant J., O'Shea M, Benjamin P.R. *Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide.* (2007). *J Neurophysiology*, 97, pp. 1088–1099.
- ❖ Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L. *Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse DNA sequences.* (2002). *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16899–16903.
- ❖ Stuehr D. J., Cho H. J., Kwon N. S., Weise M., Nathan C. F. *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7773-7777.
- ❖ Sutherland FJ and Hearse DJ. *The Isolated blood and perfusion fluid perfused heart.* (2000). *Pharmacol Res*, 41: 613-627.

- ❖ Suschek C.V., Schnorr O., Kolb-Bachofen V. *The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all?*. (2004). *Curr Mol Med*, 4, pp. 763–775.
- ❖ Takiyyuddin MA, Cervenka JH, Sullivan PA, Pandian MR, Parmer RJ, Barbosa JA, O'Connor DT. *Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans?*. (1990). *Circulation*, 81:185– 955.
- ❖ 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. *Catecholamine secretory vesicles. Augmented chromogranins and amines in secondary hypertension*. (1993). *Hypertension*, 21 pp. 674–679.
- ❖ Takiyyuddin MA, Parmer RJ, Kailasam MT, Cervenka JH, Kennedy B, Ziegler MG, Lin MC, Li J, Grim CE, Wright FA. *Chromogranin A in human hypertension. Influence of heredity*. (1995). *Hypertension*, 26:213–20.
- ❖ Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME *Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure*. (2003). *Nature Medicine*, 9 (12), 1506-1512.
- ❖ Taupenot L., Ciesielski-Treska J., Ulrich G., Chasserot-Golaz S., Aunis D., Bader M.F.. *Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells*. (1996). *Neuroscience*, 72, pp. 377–389.
- ❖ Taupenot L, Mahata M, Mahata SK, Wu H, O'Connor DT. *Regulation of chromogranin A transcription and catecholamine secretion by the neuropeptide PACAP. Stimulation and desensitization*. (2000). *Adv Exp Med Biol*; 482:97-111.
- ❖ Taupenot L., Harper K. L., O'Connor D. T. *The Chromogranin Secretogranin Family*. (2002). *N. Engl. J. Med.* 348, 1134–1149.
- ❖ Tatemoto K, Efendić S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD. *Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion*. (1986). *Nature*, 4-10;324(6096):476-8.
- ❖ Tayeh, M. A., and Marietta, M. A. *Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor*. (1989). *J Biol. C/tern*. 264, 19654-19658.
- ❖ Theurl M, Schgoer W, Albrecht K, Jeschke J, Egger M, Beer AG, Vasiljevic D, Rong S, Wolf AM, Bahlmann FH, Patsch JR, Wolf D, Schratzberger P, Mahata SK, Kirchmair R. *The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism*. (2010). *Circ Res*, 107(11):1326-35.
- ❖ Thesleff S. *Spontaneous transmitter release at the neuromuscular junction*. (1988). *Fundam Clin Pharmacol*, 2(2):89-101.

- ❖ Thomas S.R., Chen K., Keaney J.F. *Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway.* (2002). *J Biol Chem*, 277 pp. 6017–6024.
- ❖ Toda N., Ayajiki K., Okamura T. *Neurogenic and endothelial nitric oxide regulates blood circulation in lingual and other oral tissues.* (2012). *J Cardiovasc Pharmacol*, 60 pp. 100–108.
- ❖ Tota B, Angelone T, Cerra MC. *The surging role of Chromogranin A in cardiovascular homeostasis.* (2014). *Front Chem*. 14;2:64.
- ❖ Tsigelny I, Sugiyama N, Sine SM, Taylor P. *A model of the nicotinic receptor extracellular domain based on sequence identity and residue location.* (1997). *Biophys J*, 73(1):52-66.
- ❖ Tsigelny I, Mahata SK, Taupenot L, Preece NE, Mahata M, Khan I, Parmer RJ, O'Connor DT. *Mechanism of action of chromogranin A on catecholamine release: molecular modeling of the catestatin region reveals a beta-strand/loop/beta-strand structure secured by hydrophobic interactions and predictive of activity.* (1998). *Regul Pept*, 16;77(1-3):43-53.
- ❖ Vanhoutte P.M. *How we learned to say NO.* (2009). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29 pp. 1156–1160.
- ❖ Veschini L, Crippa L, Dondossola E, Doglioni C, Corti A, Ferrero E. *The vasostatin-1 fragment of chromogranin A preserves a quiescent phenotype in hypoxia-driven endothelial cells and regulates tumor neovascularization.* (2011). *Faseb j*;25(11):3906-14.
- ❖ von Lewinski D, Stumme B, Fialka F, Luers C, Pieske B. *Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium.* (2004). *Circ Res*, 28;94(10):1392-8.
- ❖ Walch L., Brink C., Norel X.. *The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels.* (2000). *Therapie*, 56 pp. 223–226.
- ❖ Wang Y, Khanna R. *Voltage-gated calcium channels are not affected by the novel anti-epileptic drug lacosamide.* (2011). *Transl Neurosci*. Mar;2(1):13-22.
- ❖ Ward M.E., Toporsian M., Scott J.A, Teoh H., Govindaraju V, Quan A. *Hypoxia induces a functionally significant and translationally efficient neuronal NO synthase mRNA variant.* (2005). *J Clin Investigation*, 115 p. 3128.
- ❖ Winkler H, Fischer-Colbrie R. *The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives.* (1992). *Neuroscience* 49:497–528
- ❖ Wen G, Mahata SK, Cadman P, Mahata M, Ghosh S, Mahapatra NR, Rao F, Stridsberg M, Smith DW, Mahboubi P, Schork NJ, O'Connor DT, Hamilton BA. *Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology.* (2004). *Am J Hum Genet*. ;74(2):197-207.

- ❖ Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M, Lakatta EG. *Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction.* (1999). *Circ Res*, 85(11):1092-100.
- ❖ Xie Q., Kashiwabara Y., Nathan C. *Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase.* (1994). *J Biol Chem*, 269 pp. 4705–4708.
- ❖ Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Becker L.C. *Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum.* (1999). *Proc Natl Acad Sci*, 96 pp. 657–662.
- ❖ Xu Z., Tong C., Eisenach J.C. *Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord.* (1996). *Anesthesiology*, 85, pp. 107–111.
- ❖ Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. *Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases.* (2000). *Mol Med*;6(5):347-73.
- ❖ Zhang YH, Dingle L, Hall R, Casadei B. *The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the positive inotropic response to mechanical stretch in the mammalian myocardium.*(2009). *Biochim Biophys Acta.* 1787(7):811-7.
- ❖ Zhang Y.H., Zhang M.H., Sears C.E., Emanuel K., Redwood C., ElArmouche A., Kranias E.G, Casadei B. *Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase deficient mice.* (2008). *Circ. Res*, 102 pp. 242–249.
- ❖ Zhang Y.U., Dingle L., Hall R., Casadei B. *The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the positive inotropic response to mechanical stretch in the mammalian myocardium.* (2009). *Biochim. Biophys. Acta.* 1787 811–817.
- ❖ Zhang D., Shooshtarizadeh P., Laventie B.J., Colin D.A., Chich J.F., Vidic J., de Barry J., Chasserot-Golaz s, F. Delalande, A. Van Dorsselaer, F. Schneider, K. Helle, D. Aunis, G. Prevost, M.H. Metz-Boutigue. *Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase .*(2009). *Plos one*, 4 p. e4501.
- ❖ Zhang Y, Janssens S.P., Wingler K., Schmidt H.H., Moens A.L. *Modulating endothelial nitric oxide synthase: a new cardiovascular therapeutic strategy.* (2011). *Am J Physiology-Heart Circulatory Physiology*, 301 pp. H634–H646
- ❖ Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. *Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P.* (1994). *J Clin Invest*, 94:2036–2044.
- ❖ Ziolo MT, Bers DM. *The real estate of NOS signaling.* (2003). *Circ Res*, 92:1279–1281.
- ❖ Whalen E.J, Foster M.W, Matsumoto A., Ozawa K., Violin J.D., Que L.G, Nelson C.D., Benhar M., Keys J.R, Rockman H.A, Koch W.J, Daaka Y., Lefkowitz R.J., Stamler .S. *Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-Nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2.* (2007). *Cell*, 129, pp. 511–522.

- ❖ Yano N, Ianus V, Zhao TC, Tseng A, Padbury JF, Tseng YT. *A novel signaling pathway for beta-adrenergic receptor-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase in H9c2 cardiomyocytes.* (2007). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(1):H385-93.
  
- ❖ Yasothornsrikul S, Greenbaum D, Medzihradzky KF, Toneff T, Bunday R, Miller R, Schilling B, Petermann I, Dehnert J, Logvinova A, Goldsmith P, Neveu JM, Lane WS, Gibson B, Reinheckel T, Peters C, Bogyo M, Hook V. *Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter.* (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A;*100(16):9590-5.