

# **Università della Calabria**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE**

**SCUOLA DI DOTTORATO "LIFE SCIENCES"**

**SSD: BIO/09**

**XXV CICLO**

***Il ruolo della Cromogranina A e dei suoi peptidi  
derivati, Serpinina e Catestatina, nella  
fisiopatologia cardiaca***

**CANDIDATO**

**Dott. Stefano Gentile**

**DOCENTE TUTOR**

Dott.  
Tommaso Angelone

**COORDINATORE**

Prof.ssa  
Maria Carmela Cerra

**IL DIRETTORE DELLA SCUOLA**

Prof. Marcello Canonaco

---

*Anno Accademico 2011/2012*

# **INDICE**

<b>SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>SOMMARIO</b>	<b>6</b>
<b>CAPITOLO I: introduzione</b>	<b>13</b>
1.1 Organizzazione genomica per la <i>Chga</i>	<b>17</b>
1.2 Sintesi, immagazzinamento e processamento della CgA	<b>21</b>
1.3 Ruolo biologico della CgA	<b>24</b>
1.3.1 <i>CgA e fisiopatologia cardiovascolare</i>	<b>25</b>
1.4 Peptidi derivati dalla CgA e loro funzioni biologiche	<b>27</b>
1.5 Ruolo della CST nella sindrome metabolica	<b>29</b>
1.6 Serpinina: importante fattore coinvolto nella sopravvivenza cellulare e nella neuro protezione	<b>30</b>
<b>CAPITOLO II: materiali e metodi</b>	<b>32</b>
2.1 Animali	<b>33</b>
2.2 Cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff	<b>34</b>
2.2.1 <i>Condizioni basali</i>	<b>35</b>

2.3	Protocolli	36
2.3.1	<i>Stimolazione dei preparati cardiaci con CgA</i>	36
2.3.2	<i>Coinvolgimento del pathway del NO nel meccanismo d'azione della CgA</i>	36
2.3.3	<i>Ruolo dell'endotelio coronarico nel meccanismo d'azione della CgA</i>	36
2.4	Valutazione dei livelli di fosforilazione di Akt e eNOS	37
2.5	Processamento proteolitico intracardiaco della CgA	38
2.5.1	<i>Cromatografia ad affinità</i>	38
2.5.2	<i>Sandwich ELISA per la CgA</i>	39
2.6	Analisi dei peptidi della serpinina nel cuore di ratto mediante HPLC	40
2.6.1	<i>Stimolazione dei preparati cardiaci con serpinina</i>	40
2.6.2	<i>Coinvolgimento dei recettori <math>\beta</math>1-adrenergici: trattamento con Nebivololo e CGP20712A, ed EC50</i>	41
2.6.3	<i>Coinvolgimento del pathway AC/cAMP/PKA/PDE3</i>	41
2.6.4	<i>Ruolo della pompa SERCA2a nel meccanismo d'azione cardiaco della serpinina</i>	42
2.6.5	<i>Misurazione dei livelli di cAMP e cGMP negli estratti di cuore di ratto trattati con serpinina e pGlu-serpinina</i>	42
2.6.6	<i>Muscolo papillare di ratto isolato</i>	43
2.7	Misurazione del glicerolo, delle adipochine, dei lipidi e della CST nel sangue e nel mezzo di coltura cellulare	43
2.7.1	<i>Trattamento degli espianati di tessuto adiposo con CST e leptina</i>	44

2.7.2 Preparazione delle colture primarie di adipociti	44
2.7.3 Misurazione dei livelli di fosforilazione di AMPK e Stat 3	45
2.7.4 Analisi dell'ossidazione degli acidi grassi in vivo	46
2.7.5 Ossidazione degli acidi grassi negli espianti di tessuto adiposo e nelle colture cellulari	47
2.7.6 PCR Real-Time	48
2.8 Statistica	49
<b>CAPITOLO III: risultati</b>	<b>50</b>
3.1 Azione diretta della CgA intera sul cuore dei ratti Wistar	51
3.2 Coinvolgimento del pathway dello NO	55
3.3 Misurazione dei livelli di cAMP e cGMP negli estratti di cuore di ratto	60
3.4 Effetti della CgA intera sul cuore di ratto adulto normoteso (WKY) ed iperteso (SHR)	61
3.5 Coinvolgimento del pathway dello NO nei cuori SHR trattati con CgA	65
3.6 Processamento intracardiaco della CgA	67
3.7 Determinazione della presenza dei peptidi della serpinina mediante HPLC e saggi ELISA	70
3.8 Effetti della serpinina e dei suoi peptidi sull'inotropismo e sul lusitropismo	72
3.9 Effetti della pGLu-serpinina sul muscolo papillare di ratto isolato	76

3.10 Coinvolgimento del pathway $\beta$ 1-AR/AC/PKA e PDE3 nel meccanismo d'azione della serpinina	<b>77</b>
3.11 Coinvolgimento del calcio intracellulare	<b>80</b>
3.12 Interazione della serpinina e della pGlu-serpinina con i recettori $\beta$ 1 adrenergici	<b>81</b>
3.13 Effetti delle serpinine sulla fosforilazione di ERK1/2, GSK3 $\beta$ , PLNser16 e PLNthr17 e sui livelli intracellulari di cAMP	<b>83</b>
3.14 Effetti della CST sui livelli plasmatici di lipidi e leptina nei topi Chga-KO	<b>86</b>
3.15 Effetti della CST sulla lipogenesi, sull'ossidazione degli acidi grassi e sull'espressione genica nei topi Chga-KO	<b>93</b>
3.16 Effetti della CST sulla lipolisi mediata dai recettori adrenergici(AR) negli adipociti	<b>100</b>
3.17 La CST ripristina gli effetti della leptina nei topi Chga-KO	<b>104</b>
3.18 Modulazione dell'azione periferica della leptina da parte della CST nei topi DIO e <i>ob/ob</i>	<b>107</b>
3.19 Effetti della CST e della leptina sul tessuto adiposo di topi DIO e <i>ob/ob</i>	<b>111</b>

<b>CAPITOLO IV: discussione e conclusioni</b>	<b>118</b>
4.1 Azione diretta della CgA intera su cuori di ratti Wistar e SHR	<b>119</b>
4.2 La serpinina, agisce come un modulatore positivo della performance cardiaca	<b>124</b>
4.3 La CST modula l'omeostasi metabolica	<b>127</b>
4.4 Conclusioni	<b>131</b>
 <b>CAPITOLO V: bibliografia</b>	 <b>133</b>

# *Summary*

## Summary

In the present study we evaluated the cardiac effects of both full-length Chromogranin (CgA) and its derived peptide serpinin in rat models of physiological (normotension) and pathological (hypertension) conditions. Moreover, in the last part we analyzed the role of the C-terminus CgA peptide catestatin (CST) as a modulator of lipids metabolism in mice.

The cardiovascular role of Chromogranin A (CgA) and its proteolytic fragments is well documented. Its plasma levels correlate with severe cardiovascular diseases (Ceconi et al., 2002). Moreover, the CgA-derived peptides Vasostatin-1 (VS-1) and CST elicit cardiosuppression via an anti-adrenergic/Nitric Oxide-cGMP mediated mechanism (Angelone et al., 2008).

*Full-length CgA study* - We evaluated whether and to which extent: i) intracardiac CgA processing is affected by physical (heart perfusion) and/or chemical stimuli (Isoproterenol: Iso, and Endothelin-1: ET-1); ii) the full-length CgA exerts direct cardiac activity. By using both Langendorff perfusion and Western Blotting technique we found that, the perfusion itself, as well as Iso and ET-1 stimulation induce cardiac CgA processing in low molecular weight fragments. We also found that CgA (1 and 4 nM) dilated coronaries and induced negative inotropism and lusitropism which disappeared at higher concentrations (10 and 16 nM). The increased eNOS phosphorylation in CgA treated hearts indicated the involvement of the NO-cGMP-PKG cascade. We suggest that: i) the heart generates CgA fragments in response to hemodynamic and excitatory challenges; ii) full-length CgA directly affects myocardial and coronary function.

## Summary

These results contribute to depict the mechanisms which orchestrate the cardiac sympathochromaffin/CgA axis, and to expand the knowledge on the adrenergic control of the heart under normal conditions and in the presence of stimulation.

*Serpinin study* - The involvement of CgA in cardiac biology is also supported by the observation that genetic ablation of the chromogranin A (*Chga*) gene in mice results in high blood pressure, which can be rescued by either pretreatment with CST or the introduction of the human CgA gene in the *Chga*<sup>-/-</sup> background (Mahapatra et al., 2005). These data support the idea that VS-1 and CST can function as cardiac counter-regulators in 'zero steady-state error' homeostasis, particularly under intense CAs-induced myocardial stress, a hypothesis that is gaining support, particularly among cardiologists (Tota et al., 2010; Mazza et al., 2010). This area of research is now enriched by the recent discovery that CgA is intracellularly processed at its highly conserved C terminus to yield a 2.9 kDa peptide, named serpinin (Ala26Leu), that can be modified at its N-terminus to form a pyro-glutamate residue (pGlu23Leu) (Koshimizu et al., 2011a,b). Serpinin induces PN-1 expression in (neuro)endocrine cells to up-regulate granule biogenesis via a cAMP-protein kinase A-Sp1 pathway, while pGlu-serpinin inhibits cell death. In this study we tested the hypothesis that serpinin peptides are produced in the heart and act as novel  $\beta$ -adrenergic-like cardiac modulators. We detected serpinin peptides in the rat heart by HPLC and ELISA methods. The peptides included predominantly Ala29Gly and pGlu-serpinin and a small amount of serpinin. Using the Langendorff perfused rat heart to evaluate hemodynamic changes, we found that serpinin and pGlu-serpinin exert, within the first 5 min after administration, dose-dependent positive inotropic and lusitropic effects at 11-165 nM. pGlu-serpinin-induced contractility is more potent than that of serpinin, starting from 1 nM. Using the isolated rat papillary muscle preparation to

## Summary

measure contractility in terms of tension development and muscle length, we further corroborated the pGlu-serpinin-induced positive inotropism. Ala29Gly was unable to affect myocardial performance.

Both pGlu-serpinin and serpinin act through a  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor/Adenylate Cyclase/cAMP/PKA pathway, indicating that, contrary to the  $\beta$ -blocking profile of the other CgA-derived cardiosuppressive peptides, VS-1 and CTS, these two C-terminal peptides act as  $\beta$ -adrenergic-like agonists. In cardiac tissue extracts, pGlu-serpinin increased intracellular cAMP levels and phosphorylation of Phospholamban(PNL)ser16, ERK1/2 and GSK-3 $\beta$ . Serpinin and pGlu-serpinin peptides emerge as novel  $\beta$ -adrenergic inotropic and lusitropic modulators, suggesting that CgA and the other derived cardioactive peptides can play a key role on how the myocardium orchestrates its complex response to sympatho-chromaffin stimulations.

*CTS study on lipid metabolism* - Chromogranin A knockout (*Chga*-KO) mice display increased adiposity despite high levels of circulating catecholamines and leptin. Consistent with data on diet-induced obese (DIO) mice, desensitization of leptin receptors due to hyperleptinemia is believed to contribute to the obese phenotype of *Chga*-KO mice. In contrast, obesity in *ob/ob* mice is caused by leptin deficiency. To characterize the metabolic phenotype, *Chga*-KO mice were treated with the CHGA-derived peptide CST that is deficient in these mice. CST treatment reduced fat depot size and increased lipolysis and fatty acid oxidation. In liver, CST enhanced oxidation of fatty acids as well as their assimilation into lipids, effects that are attributable to the upregulation of genes promoting fatty acid oxidation (*Cpt1 $\alpha$* , *Ppara*, *Acox* and *Ucp2*) and incorporation into lipids (*Gpat* and *CD36*). CST did not affect basal or Iso-

## Summary

stimulated cAMP production in adipocytes but inhibited phospholipase-C activation by the  $\alpha$ -AR agonist phenylephrine, suggesting inhibition of  $\alpha$  - AR signaling by CST. Indeed, CST mimicked the lipolytic effect of the  $\alpha$ -AR blocker phentolamine on adipocytes. Moreover, CST reversed the hyperleptinemia of *Chga*-KO mice and improved leptin signaling as determined by phosphorylation of AMPK and Stat3. CST also improved peripheral leptin sensitivity in DIO mice. In *ob/ob* mice, CST enhanced leptin-induced signaling in adipose tissue.

These results implicate CST in a novel pathway that promotes lipolysis and fatty acid oxidation by blocking  $\alpha$ -AR signaling as well as by enhancing leptin receptor signaling.

Taken together the results of our work strengthen the role of the prohormone CgA and of its bioactive peptides as endocrine regulators of cardiac homeostasis in both physiological and pathological conditions, also restoring impaired lipid metabolism, often associated with cardiovascular diseases.

# *Sommario*

Il ruolo cardiovascolare della CgA e dei suoi peptidi bioattivi è stato ampiamente documentato. I livelli plasmatici di CgA (range fisiologico da 0.5nM a 5nM), inizialmente utilizzati nella pratica clinica come biomarker di tumori neuroendocrini (O'Connor and Bernstein, 1984; Stridsberg and Husebye, 1997), rappresentano anche un importante marker per le disfunzioni del sistema cardiocircolatorio come ad esempio l'ipertensione essenziale, le cardiomiopatie ipertrofico/dilatative e l'insufficienza cardiaca (Ceconi et al., 2002).

Recentemente Jansson et al. (2009), e Rosjo et al. (2010), hanno dimostrato che i livelli di CgA nella sindrome coronarica acuta forniscono informazioni prognostiche indipendentemente dagli altri markers di rischio convenzionali. L'importanza della CgA nella biologia cardiaca è inoltre supportata dall'osservazione che la delezione del gene per la CgA nei topi provoca lo sviluppo di ipertensione, che può essere riportata a livelli fisiologici trattando gli animali con CST o reintroducendo il gene per la CgA in topi con background *Chga*<sup>-/-</sup> (Mahapatra et al., 2005).

I livelli plasmatici di CgA aumentano in condizioni di eccessiva stimolazione del sistema simpatico, particolarmente evidente nell'insufficienza cardiaca. Ceconi et al. (2002) e Pieroni et al. (2007), hanno dimostrato che in pazienti affetti da insufficienza cardiaca le concentrazioni plasmatiche di CgA sono aumentate (10-20 nM; 500-1000ng/ml), e strettamente correlate alla severità della patologia.

Al momento non sono però disponibili informazioni sugli effetti diretti della CgA intera sul cuore, e sui fattori che regolano la sua produzione e processamento a livello miocardico.

Il presente lavoro ha quindi lo scopo di chiarire se, e in che misura, la CgA intera induce effetti diretti sulla performance cardiaca, e la possibilità di un processamento proteolitico intracardiaco stimolo-dipendente della proteina. Utilizzando ratti normotesi (WKY) e ipertesi (SHR), abbiamo valutato i) gli effetti miocardici e coronarici della CgA intera nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff; ii) il pathway trasduzionale (Akt/NOS/NO/cGMP/PKG) coinvolto nel suo meccanismo d'azione; iii) il processamento intracardiaco della CgA in seguito a stimolazione  $\beta$ -adrenergica con ISO.

Dal processamento della CgA deriva una serie di peptidi bioattivi; fra questi i peptidi N-terminali VS-1/2, (VS-1 CgA<sub>1-76</sub>; VS-2 CgA<sub>1-113</sub>), e il peptide C-terminale CST (CgA<sub>352-372</sub>), hanno effetti cardioattivi.

La CST promuove l'angiogenesi (Theurl et al., 2010), abbassa la pressione sanguigna (Mahapatra et al., 2005; Fung et al., 2010; Gaede and Pilowsky, 2012), riduce la contrattilità cardiaca (Angelone et al., 2008; Mazza et al., 2008; Imbrogno et al., 2010), e incrementa la sensibilità dei barocettori (Gayen et al., 2009a; Gaede and Pilowsky, 2010).

Recentemente è stato scoperto un nuovo frammento derivato dalla CgA. A livello della regione C-terminale, altamente conservata, il clivaggio proteico ad opera delle proormone convertasi (PC1/2/3), genera un frammento di 2.9 kDa, la "serpinina" (Ala26Leu), il quale può subire una modificazione all'estremità N-terminale per formare un residuo di piro-glutammato (pGlu23Leu o pGlu-serpinina) (Koshimizu et al., 2011a,b). La presenza di entrambe le forme di serpinina è stata rilevata in colture di cellule di ghiandola pituitaria (AtT20). Questi peptidi sono in grado di inibire la morte

cellulare indotta da stress ossidativo (Koshimizu et al., 2011a), e di promuovere la biogenesi dei granuli secretori nelle cellule endocrine regolando l'espressione di un inibitore delle proteasi, la proteasi nexina-1 (PN-1), che previene la degradazione delle proteine dei granuli nell'apparato di Golgi.

È stato osservato che i peptidi della serpinina agiscono attraverso il pathway AC/cAMP/PKA (Koshimizu et al., 2011b), suggerendo che il meccanismo eccitatorio indotto dalla serpinina potrebbe controbilanciare gli effetti antiadrenergici e cardioinibitori indotti dalla CST e VS-1.

Ad oggi non esistono evidenze sperimentali sul possibile ruolo cardioattivo della serpinina; pertanto nel presente lavoro di tesi è stata valutata la presenza di questo peptide e delle sue forme alternative nel cuore di ratto; è stato inoltre osservato in che modo influenzano la performance miocardica e la vasoattività coronarica.

La serpinina e la pGlu-serpinina inducono un effetto positivo dose-dipendente sulla contrazione (inotropismo) del cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff e sui muscoli papillari isolati, nonché sul rilassamento (lusitropismo) miocardico. Questi effetti miocardici sono stati accompagnati da una lieve, ma non significativa, vasodilatazione coronarica. Un terzo peptide, la serpinina Ala29Gly, non ha influenzato la performance cardiaca a nessuna delle concentrazioni testate.

Sia la serpinina che la pGlu-serpinina sembrano agire attraverso il pathway  $\beta$ 1-AR/AC/cAMP/PKA. Questi dati evidenziano le proprietà cardio-circolatorie della serpinina e della pGlu-serpinina, fornendo ulteriori informazioni su come i peptidi CgA derivati possano, controbilanciandosi, regolare finemente l'attività cardiaca in risposta a stimoli  $\beta$ -adrenergici.

Il quadro clinico dei pazienti affetti da cardiopatie è complicato da un'altra patologia che si accompagna spesso alle cardiopatie, la sindrome metabolica. È stato constatato, infatti, che circa il 30% di pazienti con cardiopatia ischemica acuta sono affetti da sindrome metabolica (ad esempio diabete, obesità). Il peptide CgA derivato dall'isletto pancreatico (CgA<sub>250-301</sub>, PST) (Tatemoto et al., 1986; O'Connor et al., 2005; Gayen et al., 2009b), svolge diverse funzioni a livello metabolico, in particolare sul metabolismo del glucosio (Tatemoto et al., 1986). Tuttavia non sembra avere effetti a livello cardiovascolare. Studi recenti hanno evidenziato il ruolo della PST e della CST nel regolare la secrezione di insulina mantenendo l'omeostasi fra l'effetto anti-insulina della PST, e gli effetti insulino-sensitizzanti della CST. (Gayen et al., 2009b).

È stata valutata la possibile azione della CST sul metabolismo lipidico che, come è ben noto, risulta alterato nei soggetti obesi. Le cellule adipose sono regolate dalle catecolamine attraverso quattro tipi di AR:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  e  $\alpha_2$  (Arner, 1999; Arner, 2005). L'attivazione dei recettori  $\beta$ -AR, coinvolgendo le proteine G stimolatorie, aumenta la produzione di cAMP; questo a sua volta attiva la PKA, la quale fosforila la lipasi ormone sensibile (HSL) causando l'idrolisi dei lipidi. Al contrario, l'attivazione dei recettori  $\alpha_2$ -AR, accoppiati a proteine G inibitorie, inducono effetti opposti sulla lipolisi (Lafontan et al., 1997; Stich et al., 1999, 2003; Lafontan and Langin, 2009). Pertanto l'azione netta delle catecolamine sulla lipolisi dipende dall'equilibrio fra recettori  $\beta$ - e  $\alpha$ -AR (Arner, 2005).

Normalmente l'azione lipolitica indotta dai recettori  $\beta$ -AR prevale sull'azione  $\alpha$ -AR. Una continua stimolazione del sistema nervoso simpatico o un aumento delle catecolamine plasmatiche, è spesso associato alla desensitizzazione dei  $\beta$ -AR (Mori et

al., 2007). Studi *in vivo* hanno dimostrato che l'azione lipolitica delle catecolamine è ridotta nei soggetti obesi (Bougnères et al., 1997; Jensen, 1997). Il trattamento ripetuto con epinefrina induce soppressione della lipolisi, basale e indotta da epinefrina, sia in soggetti normopeso che obesi (Townsend et al., 1994). Anche negli studi *in vitro* la risposta lipolitica indotta dall'epinefrina è diminuita dal pretrattamento con la stessa molecola (Stallknecht et al., 1997).

Sulla base di questi dati, è stato ipotizzato che l'aumentata massa adiposa dei topi iperadrenergici Chga-KO (Gayen et al., 2009a) possa rispecchiare la desensitizzazione dovuta all'aumento delle catecolamine circolanti (Mahapatra et al., 2005). I topi Chga-KO mostrano, nonostante gli elevati livelli circolanti di catecolamine e leptina, una notevole adiposità. Le catecolamine inibiscono la secrezione della leptina (Fritsche et al., 1998; Scriba et al., 2000; Couillard et al., 2002); la desensitizzazione del  $\beta$ -AR potrebbe prevenire tale effetto, causando un aumento dei livelli di leptina e della massa adiposa, così come mostrato nei topi Chga-KO e in altri modelli sperimentali di obesità. Come osservato nei topi DIO (diet induced obesity), l'aumento di leptina circolante induce la desensitizzazione dei recettori per la leptina, possibile causa del fenotipo obeso dei topi Chga-KO.

Sulla base di queste osservazioni, è stato ipotizzato che la CST possa ridurre l'obesità ripristinando la sensibilità dei recettori adrenergici e dei recettori per la leptina attraverso la normalizzazione dei livelli plasmatici di catecolamine e leptina. È stato infatti osservato che il trattamento cronico con CST induce una significativa riduzione della massa adiposa nei topi Chga-KO. Il trattamento con CST ha inoltre determinato

una riduzione del peso corporeo e della massa adiposa anche nei topi DIO, senza alterare l'assunzione di cibo.

Sia nei topi DIO che nei topi *ob/ob*, in cui l'obesità è dovuta all'incapacità di produrre leptina, la CST è in grado di incrementare gli effetti della leptina sul metabolismo e sul signaling del tessuto adiposo. Le nostre osservazioni suggeriscono che la riduzione della massa grassa dopo trattamento cronico con CST è dovuta ad un aumento della lipolisi e della mobilizzazione dei lipidi; inoltre sembra che la CST agisca attraverso i recettori  $\alpha 2$ -AR e i recettori per la leptina. In linea con tali osservazioni, la CST promuove l'ossidazione degli acidi grassi e il signaling della leptina.

*Capitolo I:  
introduzione*

La CgA è un membro della famiglia delle granine (Winkler and Fischer-Colbrie, 1992)

La presenza delle cromogranine è stata dimostrata in diversi granuli secretori di un'ampia varietà di cellule endocrine, neuroendocrine e neuronali, dove le proteine sono immagazzinate insieme ormoni, neuropeptidi e neurotrasmettitori, e successivamente co-rilasciate in risposta a diversi stimoli fisiologici e farmacologici.

Le altre due cromogranine maggiormente presenti nei granuli cromaffini sono la cromogranina B (CgB) detta anche secretogranina I (Falkensammer et al., 1985) e la secretogranina II (SgII) detta anche secretogranina C (Rosa et al., 1985). Questa classe di proteine è attualmente conosciuta come la famiglia delle cromogranine/secretogranine, o più semplicemente famiglia delle granine, che include anche altri membri quali le secretogranine III e IV (Taupenot et al., 2003; Helle 2004).

La struttura primaria delle granine è stata determinata attraverso il clonaggio del cDNA proveniente da diverse specie di mammiferi. Sono state identificate le sequenze della CgA bovina (Benedum et al., 1986; Iacangelo et al., 1986), umana (Konecki et al., 1987), di ratto (Iacangelo et al., 1986; Parmer et al., 1989), e di topo (Wu et al., 1991).

L'analisi della sequenza della CgA bovina ha rilevato la presenza di otto coppie di aminoacidi basici, sei dei quali risiedono nella regione C-terminale (Benedum et al., 1986; Iacangelo et al., 1986). Ogni coppia di aminoacidi basici rappresenta un potenziale sito di clivaggio per le pro-ormone convertasi, PC1/3 e PC2, le quali generano una serie di peptidi biologicamente attivi.

La CgA umana è una proteina di 439 aminoacidi con un peso molecolare di 49 kDa. L'mRNA codifica per una molecola di 457 aminoacidi; i primi 18 residui costituiscono la sequenza segnale. Confrontando le sequenze della CgA bovina e umana è stato

osservato che i domini N-terminali sono altamente conservati fra le due specie. La regione centrale della CgA umana mostra un certo grado di variabilità rispetto a quella bovina (36%) (Helman et al., 1988; Helle et al., 1993).

Iacangelo e collaboratori (1988) stabilirono la struttura primaria della CgA di ratto. È una proteina di 466 aminoacidi 18 dei quali formano la sequenza segnale, che presenta l'83% di omologia con quella bovina. Il peso molecolare è di 50.2 kDa. Le sequenze della CgA bovina e di ratto presentano altre omologie, come ad esempio le coppie di aminoacidi basici, sette dei quali hanno la stessa localizzazione. Le regioni C- e N-terminale risultano altamente conservate fra le due specie.

Rieker et al. (1988) dimostrarono che le cellule cromaffini di pecora, maiale, cavallo, guinie-pig, pollo, topo e rana contengono una o più proteine che reagiscono con l'anticorpo per la CgA bovina.

Venne in seguito dimostrato che la CgA non è contenuta solo all'interno dei granuli secretori delle cellule cromaffini, ma è ubiquitariamente distribuita nelle vescicole secretorie di cellule endocrine, neuroendocrine e neuronali (Huttner et al., 1991; Winkler and Fischer-Colbrie 1992; Helle and Angeletti 1994; Iacangelo and Eiden 1995; Taupenot et al., 2003).

Cohn et al. (1982) osservarono che la proteina SP-I (secretory protein-I), presente in grandi quantità nei granuli delle ghiandole paratiroidee, immunoreagisce con l'anticorpo diretto contro la CgA. Allo stesso modo, l'anticorpo anti-SP-I reagisce con la CgA. Questa scoperta è stata successivamente confermata da altri gruppi di ricerca (Nolan et al., 1985; Lassman et al., 1986; Hearn, 1987).

Ahn et al. (1987), hanno stabilito la struttura primaria di SP-I, e suggerito che SP-I e CgA potevano essere codificate dallo stesso gene.

La presenza di CgA è stata rilevata anche nelle cellule C della ghiandola tiroidea e nei tumori associati (O'Connor et al., 1983; Cohn et al., 1984; Rindi et al., 1986; Hearn, 1987; O'Connor and Deftos, 1987 Schmid et al., 1987). La CgA proveniente dalle cellule C tumorali ha una massa molecolare di 78 kDa e reagisce con gli anticorpi anti-CgA bovina.

Anche nel pancreas endocrino è stata dimostrata la presenza di proteine che reagiscono con l'anticorpo anti-CgA bovina. Hutton et al. (1985) isolarono una proteina di 20 kDa da cellule sane di pancreas di ratto e da cellule tumorali. Questa proteina ( $\beta$ -granina) veniva riconosciuta dagli anticorpi contro la CgA bovina, mentre la sua sequenza presentava forti omologie con la regione N-terminale della CgA di ratto proveniente dalle cellule cromaffini delle ghiandole surrenali (Hutton et al., 1988; Iacangelo et al., 1988a), suggerendo che la  $\beta$ -granina è un frammento derivante dal taglio proteolitico della CgA a livello del pancreas endocrino del ratto.

La CgA è presente anche nel lobo anteriore e intermedio della ghiandola pituitaria (O'Connor et al., 1983; Somogyi et al., 1984; Lassman et al., 1986).

Un gran numero di cellule endocrine del tratto gastrointestinale reagiscono con gli anticorpi anti CgA (Facer et al., 1985; Varndell et al., 1985; Rindi et al., 1986; Grube et al., 1987; Hearn, 1987; Qian et al., 1988). Le cellule enterocromaffini del piccolo intestino risultano fortemente immuno-marcate.

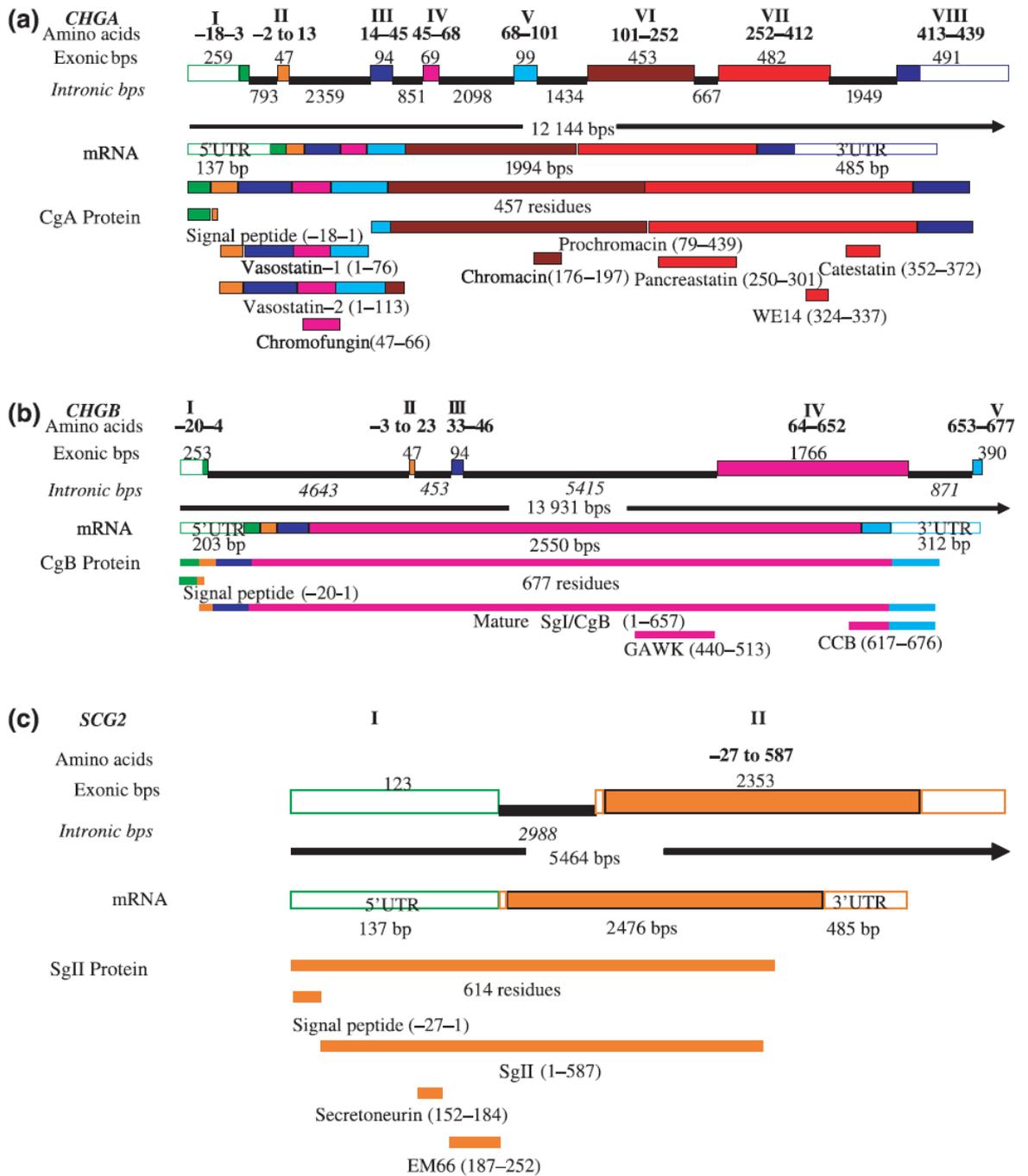
Immunoreattività agli anticorpi anti-CgA è stata rilevata anche a livello encefalico (corteccia cerebrale, amigdala, cervelletto, ippocampo, gangli della base, midollo spinale), e nel sistema nervoso periferico (Somogyi et al., 1984). Nonostante l'ampia distribuzione, il cervello presenta una concentrazione di CgA mille volte inferiore a quella osservata nelle ghiandole surrenali (O'Connor and Frigon, 1984).

## 1.1 Organizzazione genomica per la Chga

Il gene per la CgA è localizzato sul cromosoma 14 ed è lungo 12.15 kb. L'organizzazione e la regolazione del sistema Chga/CgA, è stata studiata nei bovini (Iacangelo et al., 1991), nell'uomo (Mouland et al., 1994) e nel topo (Wu et al., 1991). Il gene Chga è organizzato in otto esoni e presenta, sia al 5' che al 3', delle regioni non tradotte (UTR). La sequenza segnale di 18 aminoacidi e la regione 5' UTR sono contenute nel primo esone, mentre l'esone numero otto codifica per la regione C-terminale e il 3' UTR della CgA. Il trascritto è lungo circa 2 kb e viene tradotto in una proteina di 457 aminoacidi. Gli esoni 2-5 codificano per la regione N-terminale. I due residui altamente conservati di cisteina, che generano ponti disolfuro, sono contenuti nell'esone 3. L'esone 5 contiene il dominio poli Q, specifico per la CgA murina. Questa sequenza rappresenta un'inserzione in un dominio della Chga ben conservato fra le varie specie di mammiferi, piuttosto che un evento di splicing alternativo che include sequenze polinucleotidiche contenute in una regione intronica. L'esone 6 contiene la sequenza che codifica per la regione corrispondente al peptide cromostatina, ed è l'esone che presenta il più alto grado di variabilità di sequenza fra le diverse specie. L'esone 7 contiene la sequenza che codifica per il peptide PST. Il gene Chga bovino

presenta un polimorfismo nella regione che codifica per la PST, che genera una variante del peptide contenente un residuo di arginina o di istidina. È stata osservata la presenza di ambedue le varianti in campioni di tessuto bovino, suggerendone la natura allelica (Watkinson et al., 1991), mentre nel genoma umano è stato trovato un singolo gene Chga (Iacangelo et al., 1991; Mouland et al., 1994; Ahnet et al., 1987), localizzato appunto sul cromosoma 14 (Murray et al., 1987; Modi et al., 1989).

L'organizzazione degli esoni del gene Chgb è simile a quella descritta per Chga nelle regioni che codificano per l' N- e il C- terminali della proteina. In particolare, la sequenza che codifica per i residui di cisteina che formano il ponte disolfuro è contenuta nel terzo esone; l'ultimo esone contiene sequenze con elevata omologia a quelle del gene Chga (Pohl et al., 1990). La struttura di Chga e Chgb suggerisce che i due geni possano essersi generati da un evento di duplicazione. Il gene per la SgII non presenta invece omologie significative con gli altri due geni, nonostante il suo prodotto proteico presenti caratteristiche fisico-chimiche simili a quelle della CgA e della CgB (Schimmel et al., 1992) (Fig. 1.1 A,B,C).



**Fig. 1.1:** rappresentazione schematica del gene umano per la Chga, Chgb e Scg2 con i corrispondenti trascritti, proteine e peptidi derivati. (A) Chga, (B) Chgb e (C) Scg2 sono localizzate sul cromosoma 14, 20 e 2 rispettivamente. Gli esoni sono indicati con i numeri romani mentre il numero di aminoacidi codificato da ogni esone è indicato in grassetto. I colori identificano i peptidi e gli esoni che li codificano mentre la numerazione si riferisce alla posizione del peptide della proteine intera.

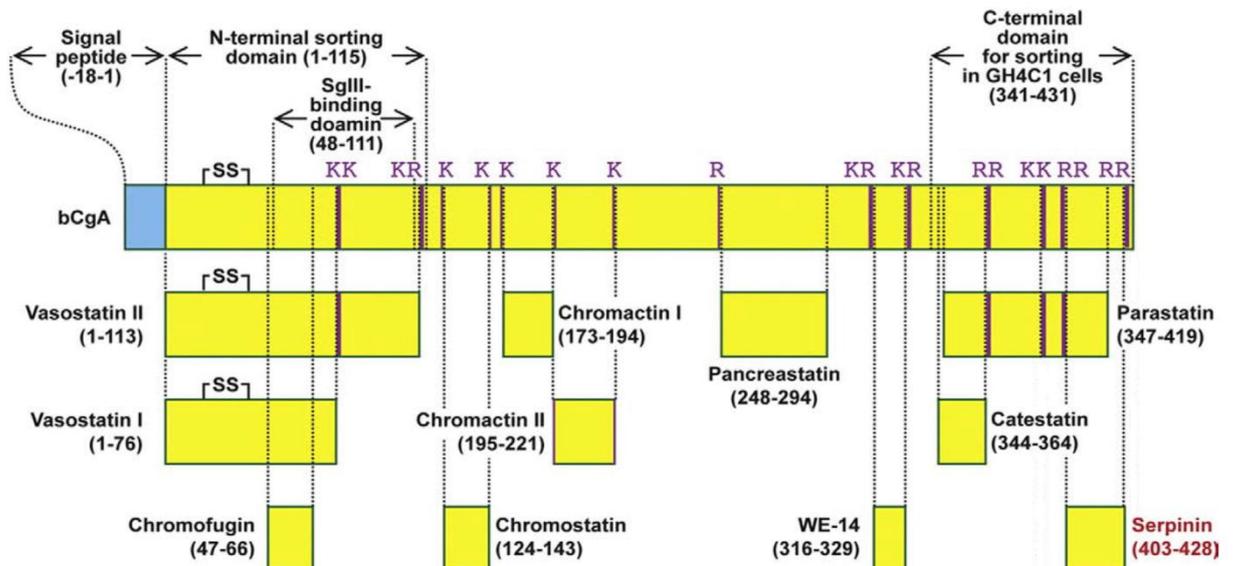
La CgA è espressa in una gran varietà di cellule, ognuna delle quali co-esprime uno specifico ormone e/o neurotrasmettitore. Il gene della CgA risponde infatti a diversi segnali ormonali che regolano l'espressione dei polipeptidi. Lo studio dell'elevata espressione della CgA nella ghiandola pituitaria, nella ghiandola surrenale e nelle ghiandole paratiroidi, ha portato alla comprensione della regolazione della biosintesi della CgA da parte degli estrogeni, dei glucocorticoidi, della vitamina D e del calcio. È stato infatti osservato che, nella ghiandola pituitaria, l'espressione dell'mRNA per la CgA è diminuito dagli estrogeni (Anouar et al., 1991; Anouar and Duval 1992; Fischer-Colbrie et al., 1992), mentre i glucocorticoidi ne up-regolano l'espressione sia nella ghiandola pituitaria che nelle ghiandole surrenali (Sietzen et al., 1987; Fischer-Colbrie et al., 1988; Grino et al., 1989; Iacangelo et al., 1991).

Il pattern generale di regolazione dell'espressione di CgA nel sistema neuroendocrino suggerisce che la proteina è normalmente prodotta in eccesso nelle cellule secretorie, e che un aumento dell'attività secretoria è accompagnata ad una riduzione della degradazione della CgA piuttosto che da un aumento dell'espressione del gene Chga (Waschek et al., 1987; Russell et al., 1990).

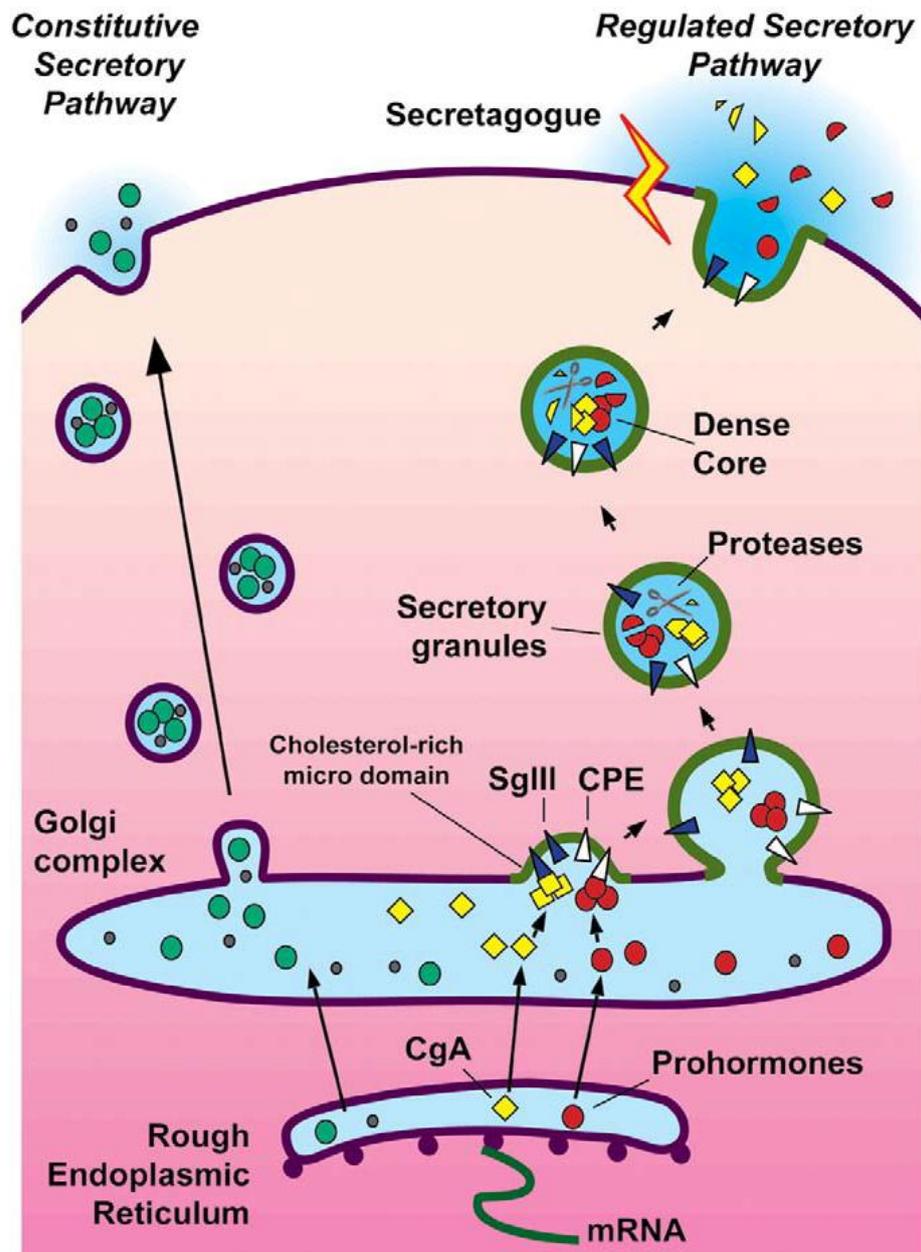
Studi sul gene umano, di ratto e murino, hanno dimostrato la presenza di una regione responsiva ai glucocorticoidi di approssimativamente 600 basi, localizzata subito prima della sequenza di inizio trascrizione del gene (Rozansky et al., 1994). È stato rilevato, nella sequenza del gene Chga, un sito denominato Pit-1 (TATNCAT), che regola l'espressione dei geni per gli ormoni somatotropo e prolattina, e molto probabilmente anche l'espressione di Chga nella ghiandola pituitaria (Nelson et al., 1988; Wu et al., 1994).

## 1.2 Sintesi, immagazzinamento e processamento della CgA

La CgA viene sintetizzata nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e inserita nelle cisterne del RER grazie alla sua sequenza segnale. Viene successivamente trasportata all'apparato di Golgi e immagazzinata, insieme ad altre proteine secretorie e lisosomiali, in vescicole nel trans-Golgi (TGN), per la formazione di granuli secretori immaturi. Successivamente la CgA, a differenza di altri pro-ormoni, è solo parzialmente processata all'interno dei granuli dando origine ad una serie di peptidi bioattivi (Fig. 1.2 e 1.3).



**Fig. 1.2:** rappresentazione schematica della struttura della CgA bovina (bCgA), che mostra i domini funzionali e le coppie di aminoacidi basici che fungono da siti di clivaggio.



**Fig. 1.3:** biogenesi dei granuli densi nelle cellule neuroendocrine. La CgA e i pro-ormoni sintetizzati nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER), sono trasportati al Golgi e immagazzinati nei granuli densi (DCG). La CgA e i pro-ormoni vengono parzialmente clivati ad opera di proteasi all'interno dei DCG. I granuli vengono rilasciati solo in seguito a stimolazione, a differenza della via secretoria costitutiva che rilascia DCG senza bisogno di stimoli esterni.

Il meccanismo di immagazzinamento della CgA all'interno dei granuli secretori non è ancora stato chiarito. Studi preliminari hanno suggerito che la CgA, che è altamente acida e forma degli aggregati molto grandi a pH acido e in presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno del TGN, entra nei granuli in formazione in maniera passiva (Chanat and Huttner, 1991; Jain et al., 2002).

Alcuni studi hanno recentemente proposto un meccanismo di orientamento della CgA che prevede l'interazione di un dominio aminoacidico con un recettore all'interno del TGN (Cowley et al., 2000; Hosaka et al., 2002; Courel et al., 2006).

Molti gruppi di ricerca hanno dimostrato che il dominio N-terminale della CgA (CgA<sub>1-115</sub>), contenente i due residui di cisteina (Cys17-Cys38) responsabili della formazione del ponte disolfuro, è essenziale per indirizzare la CgA verso il pathway secretorio nelle cellule PC12. Tuttavia questo dominio non sembra funzionare nelle cellule GH4C1 (cellule di ghiandola pituitaria anteriore di ratto). Al contrario, il dominio C-terminale risulta importante per il corretto inserimento della CgA nel pathway secretorio nelle cellule GH4C1 ma non nelle cellule PC12 (Cowley et al., 2000). Questi risultati indicano che le regioni N- e C-terminale funzionano in maniera cellula-specifico.

A differenza di altri pro-ormoni, ad esempio la pro-insulina, la CgA è processata in minor misura all'interno dei granuli. I siti di-basici di clivaggio sono riconosciuti dalle endoproteasi PC1 e PC2 e dalla Catepsina L, presenti nei granuli cromaffini (Yasothornsrikul et al., 2003; Biswas et al., 2009). Dopo il clivaggio endoproteolitico l'esopeptidasi CPE, anch'essa presente nei granuli cromaffini, rimuove i residui basici che si estendono al C-terminale della CgA, generando frammenti biologicamente attivi. Questi frammenti potrebbero andare incontro ad un ulteriore processamento ad opera di

delle endopeptidasi, ad esempio amino peptidasi, (Yasothornsrikul et al., 1998; Hwang et al., 2007), presenti nei granuli secretori, per generare il peptide attivo finale.

### 1.3 Ruolo biologico della CgA

La CgA, insieme agli altri membri della famiglia delle granine (CgB, SgII), è in grado di formare degli aggregati in ambienti acidi e in presenza di ioni  $Ca^{2+}$ , ed è stato dimostrato che questi grandi aggregati inducono fisicamente la formazione di granuli densi nei fibroblasti (Yoo, 1996; Kim et al., 2001; Beuret et al., 2004; Stettler et al., 2009).

Recentemente, sono stati individuati all'interno della CgA dei domini essenziali per la corretta granulogenesi. Anouar e collaboratori, utilizzando dei costrutti mancanti delle regioni N- e C-terminale della CgA di rana, overespressi in cellule COS-7, hanno dimostrato il ruolo fondamentale di queste regioni nella formazione dei granuli cromaffini indotta dalla CgA (Montero-Hadjadje et al., 2009). Anouar e collaboratori osservarono inoltre che l'espressione della CgA intera nelle cellule AtT-20 era in grado, a differenza del costrutto tronco, di veicolare la pro-opiomelanocortina (POMC) all'interno dei granuli cromaffini, suggerendo che la CgA intera facilita l'inserimento di pro-ormoni nei granuli cromaffini (Montero-Hadjadje et al., 2009). Benché sia stato dimostrato che la carbossipeptidasi E (CPE) è il fattore primario coinvolto nel corretto veicolamento di POMC nei granuli secretori, l'over-espressione di CgA o CgB (Natori and Huttner, 1996) nelle cellule AtT-20 sembra incrementare questo processo.

Per identificare i geni codificanti gli inibitori delle proteasi coinvolti nel processo di granulogenesi, sono state eseguite analisi sui profili d'espressione genica in cellule

transfettate con CgA (6T3-bCgA) e cellule non transfettate (6T3-WT). Questa analisi ha dimostrato che l'mRNA dell'inibitore della PN-1 era maggiormente espresso nelle cellule 6T3-bCgA (Kim and Loh, 2006). La microscopia ad immunofluorescenza rivelò che nelle cellule 6T3-bCgA PN-1 e CgA erano co-localizzate nella regione perinucleare, con una distribuzione simile a quella caratteristica del Golgi, mentre non è stata osservata sovrapposizione di segnale nelle regioni cellulari che contengono le vescicole secretorie (Kim and Loh, 2006).

### 1.3.1 CgA e fisiopatologia cardiovascolare

È stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento della CgA in diverse patologie cardio-renali (Winkler and Fischer-Colbrie, 1992; Taupenot et al., 2003; Montero-Hadjadje et al., 2008), in particolare nelle nefropatie ipertensive, e nella genesi dell'ipertensione arteriosa indotta da stress (O'Connor, 1984; Hsiao et al., 1990; Takiyyuddin et al., 1990; Taupenot et al., 2003; Chen et al., 2008). La CgA risulta overespressa in modelli sperimentali di ratti (SHR) e con ipertensione renovascolare (Schober et al., 1989; Takiyyuddin et al., 1993; O'Connor et al., 1999). Nella pratica clinica, la CgA è utilizzata come marker per feocromocitoma (O'Connor et al., 1984; Kimura et al., 1997; Stridsberg and Husebye, 1997), tumori carcinoidi (Natori and Huttner, 1996; Mahapatra et al., 2005; Montesinos et al., 2008), neuroblastomi, tumori neuroendocrini e malattie neurodegenerative. I livelli circolanti di CgA risultano elevati in pazienti con insufficienza cardiaca cronica (Hendi et al., 2006) ed in pazienti che hanno subito un infarto acuto del miocardio (Kim et al., 2005). Il ruolo cardiaco della CgA è supportato anche dall'evidenza di una produzione miocardica di CgA in pazienti con

cardiomiopatia ipertrofica dilatativa (Kim and Loh, 2006). I livelli fisiologici di CgA sono compresi tra 0.5 nM (O'Connor et al., 1993), 2nM (Corti et al., 2000; Ceconi et al., 2002) e 5nM (Stridsberg et al., 2004; Greenwood et al., 2006; Tartaglia et al., 2006). I topi Chga-KO mostrano un'elevata pressione sistolica (SBP) e diastolica (DBP) e alti livelli di catecolamine circolanti (Mahapatra et al., 2005), oltre a scarsa variabilità diurna della SBP, ipertrofia ventricolare dilatativa (Mahapatra et al., 2005) e ridotta sensibilità dei riflessi barocettivi (BRS) (Gayen et al., 2009a).

I livelli plasmatici di CgA aumentano in condizioni di stress, causando eccessiva attivazione del sistema simpatico. Questo comporta un aumento delle catecolamine, dei peptidi natriuretici e fattori del sistema renina-angiotensina. Rispetto ai soggetti sani, i pazienti affetti da insufficienza cardiaca mostrano un aumentato livello di CgA plasmatica (10-20nM: 500-1000ng/ml) (Ceconi et al., 2002; Pieroni et al., 2007). Tali valori sono strettamente associati alla gravità della patologia, rappresentando un indice predittorio di mortalità. Dieplinger e collaboratori (2009) hanno dimostrato una correlazione significativa tra la CgA e il "brain natriuretic peptide" (BNP), noto marker prognostico in pazienti con cardiopatie. Pieroni e collaboratori (2007), hanno dimostrato che, nell'uomo, la CgA è prodotta nel miocardio ventricolare ed è co-localizzata con il BNP all'interno dei cardiomiociti. I livelli plasmatici di CgA e di BNP, in pazienti affetti da insufficienza cardiaca cronica, sono paralleli, suggerendo che i due ormoni sono co-rilasciati.

Tuttavia, non sono al momento disponibili informazioni sugli effetti diretti della CgA intera sul cuore e sui fattori che regolano la sua produzione e processamento a livello miocardico.

## 1.4 Peptidi derivati dalla CgA e loro funzioni biologiche

La PST (hCgA<sub>250-301</sub>) è stato il primo peptide CgA-derivato identificato (Tatemoto et al., 1986; O'Connor et al., 2005; Gayen et al., 2009b), nel pancreas di suino (Tatemoto et al., 1986). Fra tutti i peptidi CgA derivati, la PST è la meno conservata, esibendo il 54% di omologia fra la forma umana e quella murina (Bartolomucci et al., 2011). Dopo il clivaggio proteolitico dalla CgA, la PST subisce amminazione del sito C-terminale ad opera di una monoossigenasi (peptide  $\alpha$ -amidating monooxygenase, PAM), che rende il peptide attivo. Questo peptide ha diversi effetti sul metabolismo del glucosio e sul rilascio di insulina dalle cellule  $\beta$  pancreatiche (Tatemoto et al., 1986). Nell'uomo la PST regola *in vivo* sia il metabolismo dei carboidrati che dei lipidi (O'Connor et al., 2005).

Una delle tre varianti del peptide (PST Gly297Ser) è in grado di potenziare l'effetto inibente sull'assunzione di glucosio (O'Connor et al., 2005). La PST inibisce la secrezione di insulina nei topi, nei cani e nei maiali *in vivo*, e in colture di cellule pancreatiche di ratto *in vitro* (Ahren et al., 1996). La PST non è in grado di inibire il rilascio di insulina indotto da agenti diversi dal glucosio, ad esempio la forskolina (Ahren et al., 1996), ma può inibire la lipogenesi e stimolare la lipolisi negli adipociti di ratto (Sanchez-Margalet et al., 2000, 2010).

Dopo la PST sono stati identificati altri peptidi CgA derivati, tra cui le VS1/2 (hCgA<sub>1-76</sub>, hCgA<sub>1-113</sub>) (Aardal et al., 1993), derivanti dalla porzione N-terminale e con effetto vasodilatante (Aardal and Helle 1992; Aardal et al., 1993; Angeletti et al., 1994). Le vasostatine sono anche in grado di modulare l'adesione cellulare (Ratti et al., 2000), il rilascio di ormoni dalle ghiandole paratiroidi (Russell et al., 1994; Angeletti et al., 1996)

e l'interazione dei fibroblasti e delle cellule della muscolatura liscia con la matrice extracellulare (Di Felice et al., 2006). È stato inoltre dimostrato, nel fegato di topo *in vivo* (Ferrero et al., 2004), e in colture di cellule endoteliali venose ed arteriose *in vitro* (Ferrero et al., 2004; Blois et al., 2006) la modulazione della permeabilità endoteliale indotta dal fattore di necrosi tumorale (TNF).

Le vasostatine agiscono anche come modulatori negativi dell'inotropismo nel cuore dei bassi vertebrati (Corti et al., 2004; Imbrogno et al., 2004), e nel cuore isolato di ratto (Tota et al., 2003; Cerra et al., 2006; Gallo et al., 2007), suggerendo un nuovo ruolo biologico per questi peptidi (Tota et al., 2007).

Altri peptidi CgA-derivati, come ad esempio la cromofungina (hCgA<sub>47-66</sub>), la cromacina (hCgA<sub>176-195</sub>) (Lugardon et al., 2001; Metz-Boutigue et al., 2003) e la procromacina (bCgA<sub>79-431</sub>) (Strub et al., 1996), hanno una potente azione antibatterica e antifungina.

Il peptide CST (hCgA<sub>352-372</sub>; bCgA<sub>344-364</sub>) (Mahata et al., 1997), è stato inizialmente identificato come il più potente antagonista endogeno dei recettori nicotinici, in grado di inibire il rilascio di catecolamine indotto da nicotina con un meccanismo autocrino/paracrino (Mahata et al., 1997; Mahata, 2004). Successivamente, è stato riportato che la CST agisce anche da vasodilatatore in esperimenti su ratti *in vivo*, attraverso il rilascio di istamina (Kennedy et al., 1998). Tale stimolazione del rilascio di istamina fu osservato anche *in vitro* in colture di mastociti (Kruger et al., 2003). La CST inibisce inoltre la desensitizzazione del rilascio di catecolamine indotto dalla nicotina (Mahata et al., 1999). In aggiunta, è stato dimostrato che possiede attività antimicrobica (Briolat et al., 2005).

I livelli plasmatici di CST in soggetti con ipertensione essenziale ereditaria, risultano diminuiti non soltanto nei casi conclamati, ma anche negli individui normotesi con una storia familiare di ipertensione (O'Connor et al., 2002). In linea con le osservazioni effettuate nell'uomo, anche i topi Chga-KO sviluppavano ipertensione severa, che poteva essere riportata a livelli fisiologici trattando gli animali con CST (Mahapatra et al., 2005).

La CST induce vasodilatazione nei ratti e nell'uomo (Kennedy et al., 1998), agendo direttamente sul cuore mediante la regolazione di contrattilità e rilassamento miocardico dei roditori (Angelone et al., 2008); è risultata inoltre capace di migliorare la sensibilità dei barocettori nei topi Chga-KO (Gayen et al., 2009a).

### 1.5 Ruolo della CST nella sindrome metabolica

L'obesità è ormai una patologia globale che potrebbe portare all'insorgenza di insulino-resistenza a livello del tessuto adiposo, del fegato e del muscolo scheletrico, oltre a rappresentare un fattore di rischio critico per lo sviluppo del diabete di tipo 2. La sindrome metabolica, o sindrome X, è un insieme di disordini metabolici che includono insulino-resistenza, iperinsulinemia e dislipidemia, associate ad elevati livelli di trigliceridi nel plasma e/o diminuiti livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL) (Olefsky and Glass, 2010).

A differenza della PST, la struttura della CST è altamente conservata nei mammiferi, con un'omologia dello 86% tra forma umana e murina (Mahata et al., 1997). La CST umana mostra anche significanti omologie con i bassi vertebrati: 38% con il pollo selvatico, 33% con la rana e 19% con zebrafish (Bartolomucci et al., 2011). Sebbene le

proprietà anti-ipertensive e anti-adrenergiche della CST siano state ben stabilite (Mahapatra et al., 2005; Gayen et al., 2009a; Mahata et al., 2010), studi recenti hanno evidenziato un nuovo ruolo della CST nell'aumentare la sensibilità all'insulina. Sembrerebbe in fatti che la PST e la CST abbiano effetti opposti sull'omeostasi del glucosio, mantenendo l'equilibrio fra l'effetto anti-insulina della PST e quello insulino-sensitizzante della CST.

Una delle funzioni principali dell'insulina è l'inibizione della gluconeogenesi; il trattamento cronico con CST in topi Chga-KO, induce la riduzione della produzione epatica di glucosio del 50% .

Negli adipociti, l'insulina promuove la lipogenesi, stimolando l'assorbimento di glucosio e inducendo l'espressione dei fattori ADD-1 (adipocyte determination and differentiation factor 1) e Srebp-1c, che regolano l'espressione dei geni che promuovono la sintesi degli acidi grassi e la lipogenesi in adipociti ed epatociti.

### **1.6 Serpinina: importante fattore coinvolto nella sopravvivenza cellulare e nella neuro protezione**

Le serpinine sono una famiglia di peptidi derivanti dal processamento della regione C-terminale della CgA. Il clivaggio a livello della penultima coppia di residui dibasici in questa regione genera un peptide nominato serpinina-Arg-Arg-Gly, ritrovato anche nel cuore di ratto (Tota et al., 2012). La presenza della serpinina (hCgA<sub>411-436</sub> serpin-Arg26Leu) è stata evidenziata in cellule di ghiandola pituitaria di topo (AtT-20) (Koshimizu et al., 2011b), e nel feocromocitoma umano (Hook et al., 2010). Una forma modificata della serpinina, che porta un residuo piro-glutamico all'N-terminale (serp-

pGlu23Leu), è stata isolata da cuore di ratto (Loh et al., dati non pubblicati) e dalla linea cellulare AtT-20 (Koshimizu et al., 2011a).

Studi sul ruolo della serp-Arg26Leu nella biogenesi dei granuli secretori hanno rivelato che il peptide agisce a livello extracellulare in maniera autocrina/paracrina nelle cellule neuroendocrine. È stato osservato che la serpinin, a una volta rilasciata dai granuli, lega un recettore probabilmente accoppiato a proteine G, attivando la AC e quindi la produzione di cAMP. Questo porta all'attivazione della PKA e alla traslocazione del fattore di trascrizione *sp1* nel nucleo, dove stimola la trascrizione della PN-1, con conseguente aumento della biogenesi dei granuli secretori (Koshimizu et al., 2011b). Studi successivi hanno dimostrato che la serp-pGlu23Leu ha un effetto più potente sulla trascrizione di PN-1 (Koshimizu et al., 2011a).

Studi condotti su cellule AtT-20 hanno dimostrato che il trattamento con serp-Arg26Leu e serp-pGlu23Leu è in grado di inibire l'apoptosi indotta da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gli effetti antiapoptotici indotti da serp-pGlu23Leu risultarono 1000 volte più potenti di quelli indotti da serp-Arg26Leu. Un esperimento simile, eseguito su neuroni di ratto, ha confermato l'inibizione della morte cellulare in seguito a trattamento con serp-pGlu23Leu. Analizzando i livelli dell'mRNA della proteina anti-apoptotica Bcl2 nei neuroni corticali di ratto, è emerso che il trattamento con serp-pGlu23Leu ne aumentava l'espressione, suggerendo il coinvolgimento di un pathway che porta all'aumento dell'espressione di Bcl2 nell'effetto neuroprotettivo indotto da serp-pGlu23Leu.

*Capitolo II:  
materiali e metodi*

## 2.1 Animali

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati ratti Wistar maschi, ratti spontaneamente ipertesi (SHR) e il corrispettivo controllo normoteso i ratti Wistar Kyoto (WKY) (Harlan Laboratories Srl, Udine, Italy). Il peso degli animali si aggirava intorno ai 180-220 g,. Sono stati mantenuti in gabbie apposite in condizioni standard di stabulazione. Gli animali avevano accesso ad acqua e cibo *ad libitum*. Gli esperimenti sono stati eseguiti in conformità alle norme della Guida per la Cura e l'Utilizzo degli Animali da Laboratorio, come pubblicato dal National Institute of Health.

Per gli esperimenti effettuati presso il Dipartimento di Medicina dell'Università della California a San Diego, sotto la supervisione del Professore Sushil Mahata, sono stati utilizzati anche topi maschi di sette mesi (WT  $31.8 \pm 1.2$  g; Chga-KO  $39.2 \pm 1.5$  g), con background genetico misto (129SvJ x C57BL/6). Gli animali sono stati mantenuti in apposite gabbie all'interno di uno stabulario dove veniva riprodotto il ciclo 12h luce/buio, e nutriti con dieta standard *ad libitum*. I maschi C57BL/6 di 8 settimane, sono stati nutriti con una dieta al 60% di lipidi (D12492: Research Diets, Inc., New Brunswick) per un periodo di 16 settimane prima di essere sottoposti agli esperimenti. I topi maschi leptina-deficienti (C57BL/6-*ob/ob*) forniti dalla Jackson Laboratory, sono stati nutriti con dieta standard. Il Comitato Internazionale per la Cura e l'Utilizzo degli Animali (IACUC), ha approvato le procedure sperimentali.

I topi Chga-KO, DIO (diet induced obesity), e *ob/ob* sono stati trattati giornalmente con soluzione salina o CST (5 mg/g peso corporeo, i.p; 12 settimane per i topi Chga-KO e 16 settimane per i topi DIO e *ob/ob*).

## 2.2 Cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff

Gli animali sono stati anestetizzati con carbamato di etile (2g/kg di peso corporeo, i.p.), i cuori sono stati rapidamente espianati e trasferiti in una soluzione fisiologica Krebs-Henseleit (KHS) a freddo. L'aorta è stata subito incannulata con una cannula di vetro e collegata all'apparato di perfusione per dare inizio alla perfusione a flusso costante (12ml/min). All'apice del ventricolo sinistro è stato praticato un foro per impedire l'accumulo di liquido all'interno. Un palloncino di latex riempito d'acqua distillata collegato tramite un catetere ad uno dei due trasduttori di pressione, è stato inserito all'interno della camera ventricolare sinistra attraverso la valvola mitrale permettendo di misurare i parametri meccanici cardiaci.

Il secondo trasduttore di pressione è localizzato al di sopra dell'aorta e permette di monitorare le variazioni della pressione coronarica (CP). La soluzione di perfusione contiene NaCl 113 mM, KCl 4.7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucosio 11 mM, mannitolo 1.1 mM e Na-piruvato 5 mM (pH 7.4, 37°C, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>).

I parametri emodinamici registrati sono poi stati elaborati utilizzando il sistema di acquisizione dati PowerLab e successivamente analizzati con il software Chart (entrambi i software sono distribuiti dalla AD Instruments, Basile, Italy).

### 2.2.1 Condizioni basali

La performance cardiaca è stata valutata considerando i seguenti parametri: pressione ventricolare sinistra (LVP, misurata in mmHg), come indice della contrattilità cardiaca, e il valore massimo della prima derivata della LVP  $(+LVdP/dt)_{max}$ , misurata in mmHg/sec), indice della massima velocità di contrazione del ventricolo sinistro.

Come parametri lusitropici invece sono stati analizzati la derivata negativa dell'LVP  $(-LVdP/dt)_{max}$ , misurata in mmHg/sec), indice della massima velocità di rilassamento ventricolare, e il rapporto fra massima velocità di contrazione e rilassamento  $(+LVdP/dt)_{max}/(-LVdP/dt)_{max}$ ; T/-t).

Inoltre sono stati monitorati la frequenza cardiaca (HR), e la pressione coronarica (CP), per tutta la durata dell'esperimento.(Tabella 2.1).

<b>Parametri inotropi</b>	
<b>LVP</b>	<b>89±3 mmHg</b>
<b><math>(+LVdP/dt)_{max}</math></b>	<b>2492±129 mmHg*s<sup>-1</sup></b>
<b>Parametri lusitropici</b>	
<b><math>(-LVdP/dt)_{max}</math></b>	<b>-1663±70 mmHg*s<sup>-1</sup></b>
<b>T/-t</b>	<b>1.498±1.84 mmHg*s<sup>-1</sup></b>
<b>CP</b>	<b>63±3 mmHg</b>
<b>HR</b>	<b>280±7 mmHg</b>

**Tabella 2.1:** LVP: pressione del ventricolo sinistro;  $(+LVdP/dt)_{max}$ : massima velocità di contrazione del ventricolo sinistro;  $(-LVdP/dt)_{max}$ : massima velocità di rilassamento del ventricolo sinistro; T/-t: rapporto fra massima velocità di contrazione e rilassamento del ventricolo sinistro; CP: pressione coronarica; HR: frequenza cardiaca.

## 2.3 Protocolli sperimentali

### 2.3.1 Stimolazione dei preparati cardiaci con CgA

Sono state generate delle curve dose-risposta perfondendo i campioni con soluzione KHS contenente concentrazioni crescenti di CgA (1 pM-16 nM), per 10 minuti.

### 2.3.2 Coinvolgimento del pathway del NO nel meccanismo d'azione della CgA

Al fine di valutare il coinvolgimento del pathway trasduzionale dello NO negli effetti cardiaci della CgA, i cuori dei ratti Wistar, WKY e SHR sono stati prima stabilizzati per 20 minuti con KHS e poi perfusi per 10 minuti con una soluzione 4nM di CgA. Successivamente, i cuori sono stati ripperfusi con KHS fino a quando i parametri cardiaci sono tornati ai valori basali. A questo punto i cuori sono stati trattati con KHS contenente PTIO (10 $\mu$ M, scavenger dello NO), o L-NIO (10 $\mu$ M, inibitore delle NOSs) o ODQ (10 $\mu$ M, inibitore della guanilato ciclasi), oppure KT5823 (0.1 $\mu$ M, inibitore della PKG). Dopo 10 minuti di perfusione con un singolo inibitore, i cuori sono stati perfusi con una soluzione contenente CgA e ognuno degli inibitori sopra citati.

### 2.3.3 Ruolo dell'endotelio coronarico nel meccanismo d'azione della CgA

Utilizzando il Triton X 100, un detergente in grado di distruggere funzionalmente l'endotelio vascolare, si è voluto valutare il ruolo dell'endotelio coronarico nel meccanismo d'azione cardiaco della CgA. Il Triton è stato somministrato ai cuori in quantità pari all'1% del flusso di perfusione, e rilasciato nel KHS al di sopra dell'aorta

per 1 secondo (Das et al., 2009). Il trattamento con Triton ha inizialmente causato un aumento della pressione coronarica (circa  $37 \pm 5.1$  mmHg al di sopra del valore basale), che è tornata a livello basale dopo circa 20 minuti. I cuori sono stati dunque perfusi per 25 minuti con KHs ed esposti alla CgA. Per verificare se il Triton avesse effettivamente agito sull'endotelio, i cuori trattati con CgA sono stati perfusi con KHs e poi esposti a bradichinina per 10 minuti (100nM). Solo i cuori in cui la bradichinina non ha modificato la CP sono stati presi in considerazione per le analisi successive.

## 2.4 Valutazione dei livelli di fosforilazione di Akt e eNOS

Sono state utilizzate colture di cellule HUVEC ed estratti di ventricolo sinistro dei ratti Wistar, WKY e SHR. Le HUVEC sono state acquistate dalla American Type Culture Collection e fatte crescere in EGM-2 (Lonza), contenente penicillina e streptomina a  $37^{\circ}\text{C}$  al 5% di  $\text{CO}_2$ . Le cellule sono state trattate con CgA (4nM) per 15 minuti, poi raccolte in PBS e lisate in buffer RIPA a freddo (Sigma-Aldrich, Milan, Italy).

I cuori dai quali sono stati prelevati i ventricoli sinistri sono stati perfusi con KHs, con CgA (4nM), con Triton X-100 oppure con Triton X-100 più CgA. I campioni sono stati omogenati in RIPA buffer a freddo (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), contenente inibitori delle proteasi (1 mmol/l di aprotinina, 20 mmol/l di fenilmetilsulfonil fluoride e 200 mmol/l di sodio ortovanadato). Gli omogenati sono stati centrifugati a 200 g per 10 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il reagente Bradford (sigma Aldrich, Milan, Italy). Le proteine sono state separate su gel SDS-PAGE all'8% (per p-eNOS, eNOS, p-nNOS, nNOS sono state caricate  $60\mu\text{g}$  di proteine), oppure al 10% (per

p-Akt, Akt sono state caricate 40µg di proteine), poi trasferite su membrane di nitrocellulosa e incubate a 4°C con anticorpi policlonali anti-fosfo-eNOS (rabbit), anti-fosfo-nNOS (goat) e anti-fosfo-Akt (rabbit) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluiti 1:1000 in TBS-T al 5% di latte in polvere. Gli anticorpi secondari (anti rabbit, goat, peroxidase linked; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), sono stati diluiti 1:2000 in TBS-T al 5% di latte in polvere.

Il segnale di chemiluminescenza (ECL PLUS, Amersham) è stato quantificato e analizzato grazie al software NIH ImageJ 1.6.

### **2.5 Processamento proteolitico intracardiaco della CgA**

I cuori dei ratti Wistar, WKY e SHR sono stati sottoposti a stress fisico mediante perfusione con KHS (20, 60, 120 minuti), e a stimolazione chimica perfondendoli con soluzioni contenenti ISO 1nM, o ISO 100nM oppure ET-1 10nM. I campioni sono stati poi omogenati e separati su gel SDS-PAGE al 10% e incubati con un anticorpo specifico contro una sequenza aminoacidica presente del peptide VS-1 per valutare il processing intracardiaco della CgA.

#### **2.5.1 Cromatografia ad affinità**

L'anticorpo anti CgA è stato utilizzato seguendo il protocollo della ditta fornitrice (GE Healthcare). Il buffer usato conteneva 0.2M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5M NaCl, a pH 8.3. Dopo un'incubazione di 30 minuti con l'anticorpo, i campioni sono stati trattati con un buffer di lavaggio contenente 0.5M etanolamina e 0.5M NaCl sempre a pH 8.3, alternando per

tre volte con una soluzione 0.1 M di acetato e 0.5 M NaCl a pH 4.0 per deactivated ogni possibile gruppo reattivo che non avesse reagito con il ligando e lavare via ogni interazione aspecifica. È stata poi aggiunta una soluzione 0.05M di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 7.0 per temperare il pH. Successivamente è stata aggiunta la soluzione Tris/HCl 75mM a pH 8.0. I campioni di cuore di ratto trattati come descritto in precedenza, sono stati sottoposti a cromatografia ad affinità su colonna ed eluiti con Tris/HCl 75mM pH 8.0. Un buffer contenente 100mM di glicina a pH 2.0 è stato fatto fluire attraverso la colonna, ogni 0.5 ml di campione sono stati raccolti in tubi riempiti con buffer neutralizzante. Tutti i campioni e i buffer utilizzati sono stati conservati a 4°C.

### 2.5.2 Sandwich ELISA per la CgA

Sono stati raccolti campioni di perfusato contenente solo KHS, o ISO 1nM oppure CgA 4nM direttamente dai preparati cardiaci durante la perfusione. Sono stati utilizzati tre tipi di ELISA sandwich: l'anticorpo B4E11 è stato usato per legare la CgA mentre la detection è stata effettuata utilizzando antisiero di coniglio contro la CgA intera (saggio #1), o anti-RRG (saggio #2) oppure CgA<sub>410-439</sub> (saggio #3). I saggi sono stati eseguiti come descritto in letteratura (Ceconi et al., 2002). L'analisi dei controlli positivi ha dimostrato che il saggio #1 è in grado di identificare la CgA intera più il frammento mancante nella regione 410-439; il saggio #2 identifica la CgA intera ma non i frammenti mancanti nella regione 410-439; infine il saggio #3 identifica la CgA intera più i frammenti mancanti nella regione 437-439 (RRG).

## 2.6 Analisi dei peptidi della serpinina nel cuore di ratto mediante HPLC

I cuori di ratto sono stati omogenati in buffer di lisi T-per a freddo (Pierce, Rockland, IL). L'omogenato è stato centrifugato a 13000 rpm per 20 minuti e il supernatante è stato prelevato e purificato attraverso una colonna C18 Sep-pak (Peninsula, Belmont, CA). L'eluato è stato successivamente separato mediante HPLC come descritto in letteratura (Koshimizu et al., 2011a). Le frazioni sono state poi recuperate, liofilizzate, e ricostituite in un buffer EIA e sottoposte ad un saggio ELISA utilizzando anticorpi contro i peptidi serpinina-simili (Koshimizu et al., 2011a), o mediante un sandwich ELISA specifico per il peptide pGlu-serpinina come descritto in letteratura (Koshimizu et al., 2011b). In tali condizioni, la serpinina Ala26Leu ha eluito nella frazione #36, pGlu-serpinina nella frazione #38 e Ala29Gly nella frazione #34.

### 2.6.1 Stimolazione dei preparati cardiaci con serpinina

I cuori sono stati fatti stabilizzare per 20 minuti. Dopo la stabilizzazione, i preparati cardiaci sono stati suddivisi a caso in diversi gruppi e perfusi con concentrazioni crescenti di serpinina (Ala26Leu), pGlu-serpinina (pGlu23Leu) e serpinina Ala29Gly per ottenere delle curve dose-risposta. La ripetuta esposizione dei cuori ad una singola concentrazione (33nM) dei diversi peptidi della serpinina (Ala26Leu o pGlu23Leu o Ala29Gly), rivela che non c'è desensitizzazione (dati non mostrati).

### 2.6.2 Coinvolgimento dei recettori $\beta$ 1-adrenergici: trattamento con Nebivololo e CGP20712A, ed EC50

Per comprendere se i recettori  $\beta$ 1-adrenergici fossero coinvolti nell'effetto inotropo e lusitropico positivi indotti dalla serpinina Ala26Leu o pGlu23Leu, i preparati cardiaci, precedentemente stabilizzati per 20 minuti con KHS, sono stati perfusi con 100nM di Nebivololo o CGP20712A per 10 minuti e successivamente riperfusi con KHS. Quando i parametri cardiaci sono tornati ai livelli basali, i cuori sono stati perfusi con una soluzione contenente una singola concentrazione di serpinina o pGlu-serpinina (11nM), più 100nM di Nebivololo o di CGP20712A per altri 10 minuti.

Per meglio descrivere l'interazione tra la serpinina e i recettori  $\beta$ 1-AR, sono state generate delle curve dose-risposta perfondendo i preparati cardiaci con KHS contenente concentrazioni crescenti di serpinina o pGlu-serpinina (da 1 a 165nM). Queste curve sono poi state confrontate con quelle ottenute perfondendo i cuori con una soluzione contenente dosi crescenti di serpinina o pGlu-serpinina più una singola concentrazione di Nebivololo o CGP20712A (100nM).

### 2.6.3 Coinvolgimento del pathway AC/cAMP/PKA/PDE3

Dopo 20 minuti di stabilizzazione con soluzione KHS, i cuori sono stati perfusi con una singola concentrazione (11nM) di serpinina o pGlu-serpinina per 10 minuti, per poi essere nuovamente perfusi con KHS. Quando i parametri cardiaci sono tornati ai livelli di controllo, ogni cuore è stato perfuso con KHS contenente l'inibitore della AC MDL12330A, o l'inibitore della PKA KT5720, oppure l'inibitore specifico per la

fosfodiesterasi 3 (PDE3) Milrinone. Successivamente, i cuori sono stati esposti ai vari inibitori in presenza di una singola concentrazione (11nM) di serpinina o pGlu-serpinina.

#### 2.6.4 Ruolo della pompa SERCA2a nel meccanismo d'azione cardiaco della serpinina

Per verificare il coinvolgimento del calcio intracellulare nell'azione cardiaca della serpinina o della pGlu-serpinina, i cuori sono stati pretrattati con KHS contenente 100nM di taspigargina, e poi esposti per 10 minuti alla serpinina o alla pGlu-serpinina (11nM).

#### 2.6.5 Misurazione dei livelli di cAMP e cGMP negli estratti di cuore di ratto trattati con serpinina e pGlu-serpinina

Gli estratti dei cuori congelati (200-300mg di tessuto ventricolare), sia trattati con serpinina che non, sono stati sottoposti a trattamento con soluzione al 6% di acido tricloroacetico a 0°C e centrifugati a 10000 g per 10 minuti. Il supernatante è stato prelevato e lavato per tre volte in dietiletere e saturato in acqua. La fase acquosa è stata recuperata e conservata a -80°C. la concentrazione di cAMP è stata misurata utilizzando un saggio immunoenzimatico (Biotrak enzyme immunoassay system; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

### 2.6.6 Muscolo papillare di ratto isolato

I muscoli papillari di ratto sono stati rapidamente dissezionati mediante l'utilizzo di uno stereo microscopio e immersi in una soluzione ossigenata (100% O<sub>2</sub>) di Tyrode contenente NaCl 154mM, KCl 4mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, glucosio 5.5mM, HEPES 5mM a pH 7.4, a 37°C. La frequenza è stata mantenuta costante (120 battiti/min) con un paio di elettrodi connessi ad uno stimolatore (302 T Anapulse, W.P. Instruments, New Haven, CT). Le contrazioni isometriche sono state analizzate da un trasduttore (model 60-2997, Harvard Instruments), e costantemente acquisite tramite il software Labview (National Instruments). Prima di ogni esperimento, i campioni sono stati stabilizzati in soluzione Tyrod per 20 minuti, poi trattati con diverse concentrazioni di pGlu-serpinina (1-33nM) per 10 minuti. Tutte le soluzioni sono state preparate immediatamente prima dell'inizio di ogni esperimento.

### 2.7 Misurazione del glicerolo, delle adipochine, dei lipidi e della CST nel sangue e nel mezzo di coltura cellulare

I topi sono stati fatti digiunare per 12 ore prima del prelievo di sangue. I trigliceridi (TG) e gli acidi grassi non-esterificati (NEFA) sono stati rilevati mediante kit specifici forniti dalla Wako Diagnostics (Richmond, VA). Il glicerolo è stato misurato utilizzando un kit fornito dalla Sigma (St. Louis, MO). I livelli di glicerolo e NEFA sono stati misurati sia nel siero che nel mezzo di coltura di cellule provenienti da espianti degli animali trattati, come indice del livello di lipolisi. Kit ELISA sono stati

utilizzati per determinare i livelli plasmatici di leptina, adiponectina (Millipore, Billerica, MA), e CST (Bachem, Torrance, CA).

Per determinare i livelli plasmatici di CST i campioni e gli standard di riferimento sono stati fatti passare attraverso mini colonne C18 e le frazioni di eluizione sono state quantificate. Lo stesso kit è stato utilizzato per valutare la concentrazione di CST nel mezzo di coltura.

### 2.7.1 Trattamento degli espianti di tessuto adiposo con CST e leptina

I campioni sono stati preparati come successivamente descritto (Thalman et al., 2008). Il tessuto adiposo epididimale proveniente da topi WT, Chga-KO, DIO e *ob/ob*, fatti digiunare per 12 ore, sia quelli trattati con CST che non trattati, sono stati raccolti e conservati in buffer Krebs-Ringer-fosfato (KRP), contenente 10mM di HEPES e 0.5% di BSA. Questi sono stati poi omogenati e trattati con 100nM di CST, 1  $\mu$ M di leptina o soluzione salina per 30 minuti (per l'analisi del pathway di trasduzione), oppure per 3 ore (per valutare la lipolisi e la  $\beta$ -ossidazione).

### 2.7.2 Preparazione delle colture primarie di adipociti

Gli adipociti primari sono stati isolati dal tessuto adiposo epididimale come descritto in letteratura (Karnieli et al., 1981). Il tessuto adiposo proveniente da topi WT e Chga-KO è stato omogenato in una soluzione di Krebs-Ringer HEPES-bicarbonato (KRBH), a pH 7.4, contenente 10mM di bicarbonato, 30mM di HEPES, 200nM di adenosina, 2.5mM di

glucosio e 1% di BSA acidi grassi-free, e digeriti per 30-40 minuti con collagenasi di tipo 1 (10mg/g di tessuto; Invitrogen, Carlsbad, CA) e incubati a 37°C.

L'omogenato è stato poi filtrato attraverso un filtro in nylon a centrifugato a 400 g per 1 minuto. Lo strato oleoso (rilasciato dalle cellule rotte) al disopra dello strato di cellule adipose viene scartato, e lo strato di cellule viene recuperato e lavato tre volte con KRBH tiepido.

### 2.7.3 Misurazione dei livelli di fosforilazione di AMPK e Stat 3

I campioni di tessuto adiposo provenienti da trattamenti *ex vivo* e trattamenti *in vivo* sono stati omogenati in un buffer contenente fosfati e inibitori delle proteasi (20mM Tris/HCl, pH 7.5; 250mM di saccarosio, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 2mM Na<sub>3</sub>CO<sub>4</sub>, 10mM NaF, 2mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM PMSF, 20µg/ml leupeptina, 10µg/ml aprotinina e 1µM LR-microcistina) come descritto in letteratura (Bandyopadhyay et al., 2005; Gayen et al., 2009b). Successivamente gli omogenati sono stati sottoposti a SDS-PAGE e immunoblotting.

Gli anticorpi primari per AMPK e Stat3 sono stati acquistati presso la Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Il kit per la chemiluminescenza è stato acquistato dalla Pierce (Rockford, IL).

#### 2.7.4 Analisi dell'ossidazione degli acidi grassi *in vivo*

Ai topi Chga-KO, DIO e *ob/ob* sono state effettuate delle iniezioni di soluzione fisiologica o soluzione contenente CST (5µg/g di peso corporeo, i.p., due volte al giorno).

Un'ora dopo l'ultima iniezione con soluzione salina o CST, ai topi è stata iniettata una concentrazione di palmitato marcato con carbonio 14 (U-<sup>14</sup>C-palmitato, 0.2mM), e sacrificati tre ore dopo l'iniezione.

Il fegato e il tessuto adiposo (circa 100mg), sono stati omogenati in 0.8 ml di acido perclorico 3.5N e successivamente mescolati in 3 ml di una soluzione di metanolo e cloroformio (2:1). Per ottenere l'omogenato finale, sono stati aggiunti 1.2 ml di acido perclorico 3.5N. La miscela è stata agitata e centrifugata.

Nello strato inferiore sono contenuti i lipidi che avranno incorporato il palmitato marcato con <sup>14</sup>C, mentre lo strato superiore contiene metaboliti acido-solubili parzialmente ossidati (ASM) del <sup>14</sup>C-palmitato. Lo strato inferiore è stato ulteriormente frazionato mediante cromatografia a strato sottile su silica gel.

La lipogenesi del palmitato è stata determinata sulla base della radioattività emessa dall'acido palmitico libero rispetto agli altri lipidi (fosfolipidi, trigliceridi, diacilgliceroli, ecc.) utilizzando una piastra TLC. L'ossidazione completa del <sup>14</sup>C-palmitato è stata misurata nelle colture cellulari ma non nei topi.

### 2.7.5 Ossidazione degli acidi grassi negli espianti di tessuto adiposo e nelle colture cellulari

Colture di cellule 3T3-L1 (preadipociti), sono state fatte differenziare in adipociti utilizzando un cocktail di dexametasone (100nM) per 10 giorni, IBMX (1 $\mu$ M), e insulina (100nM) per dieci giorni. Il mezzo di coltura è stato poi sostituito da DMEM siero free contenente l'1% di BSA. Gli epatociti sono stati sottoposti ad analisi per valutare l'effetto del trattamento con CST sulla lipogenesi e l'ossidazione degli acidi grassi.

Le colture sono state trattate con CST (100nM) per 24 ore e successivamente incubate con U-<sup>14</sup>C-palmitato per 2 ore ( $\mu$ Ci/ml). La misurazione dell'ossidazione degli acidi grassi è stata effettuata seguendo un protocollo sperimentale già noto in letteratura (Mao et al., 2006). Più precisamente, il mezzo di coltura nelle piastre da 24 ore è stato acidificato con una soluzione al 10% di HClO<sub>4</sub> dopo l'incubazione con gli acidi grassi radioattivi e immediatamente coperto con un sottile filtro di carta imbevuto di NaOH 2N. Sulla piastra è stato posto un coperchio di plastica e sigillata con parafilm. Dopo 2 ore di incubazione, il filtro di carta è stato rimosso e sono state evidenziate delle aree da cui si è ricavato dei piccoli dischi utilizzati per determinare la quantità di <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> assorbita dal filtro di carta. Le cellule sono state poi lisate in una soluzione 1N di NaOH e il contenuto proteico è stato misurato utilizzando il reagente di Folin (BioRad, Hercules, CA).

### 2.7.6 PCR Real-Time

I campioni di RNA sono stati estratti utilizzando un kit (RNeasy Plus, Qiagen, Valencia, CA), seguendo il protocollo fornito dall'azienda stessa. Dopo digestione con DNase, 100ng di RNA sono stati incubati per ottenere un trascritto di cDNA in un volume di reazione di 20- $\mu$ l utilizzando un kit ad alta capacit  per cDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA). I campioni sono stati analizzati e successivamente amplificati mediante PCR in un volume di reazione di 25  $\mu$ l contenente 5  $\mu$ l di cDNA (diluizione 1:5), 2xSYBR green PCR Master Mix, e i primers descritti in tabella (Tabella 2.2) (400 nM ognuno).

Le differenze di  $\Delta$ Ct (cycle threshold values) fra i geni target e il gene housekeeping GAPDH sono state utilizzate per calcolare i livelli di espressione.

**Tabella 2.2**

Gene	Primer	Gene	Primer
<i>Acox 1</i>	F: GTC GAC CTT GTT CGC CA R:GGT TCC TCA GCA CGG CTT	<i>CD36</i>	F: TCC AGC CAA TGC CTT TGC R:TGG AGA ATT ACT TTT TCA GTG CAG AA
<i>Cpt 1<math>\alpha</math></i>	F:CAG GAT TTT GCT GTC AAC CTC R: GAG CAT CTC CAT GGC GTA G	<i>Gapdh</i>	F: TAT GTC GTG GAG TCT ACT GGT GT R: GTC ATC ATA CTT GGC AGG TTT CT
<i>Gpat 4</i>	F: TGT CTG GTT TGA GCG TTC TG R: TTC TGG GAA GAT GAG GAT GG	<i>Ppar<math>\alpha</math></i>	F: GGG CTC TCC CAC ATC CTT R: CCC ATT TCG GTA GCA GGT AGT C
<i>Ppar<math>\gamma</math>1</i>	F: GAG TGT GAC GAC AAG ATT TG R: GGT GGG CCA GAA TGG CAT CT	<i>Srebp-1c</i>	F: GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT R: GCT TCC AGA GAG GAG GCC AG
<i>Ucp2</i>	F: CAG CCA GCG CCC AGT ACC R:CAA TGC GGA CGG AGG CAA AGC		

## 2.8 Statistica

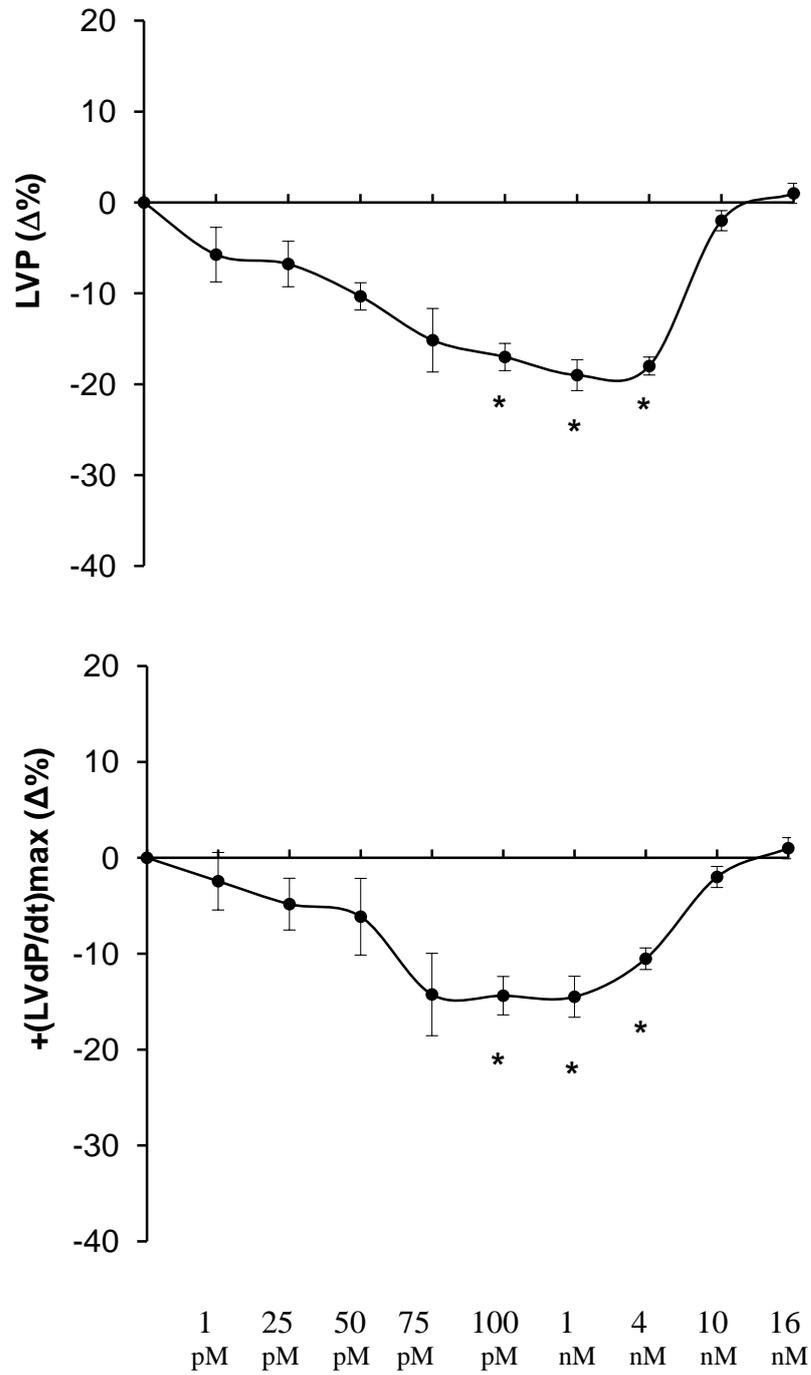
I dati sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . La significatività statistica è stata assegnata utilizzando il t-test di Student oppure ANOVA ad una via ( $p < 0.05$ ). La significatività fra due gruppi di dati è stata calcolata mediante ANOVA seguito dal post-hoc test di Bonferroni. L'interpolazione fra le curve è stata eseguita utilizzando il programma Kaleidograph (Synergy Software, Reading, PA), oppure GraphPad Prism 4.02.

*Capitolo III:  
risultati*

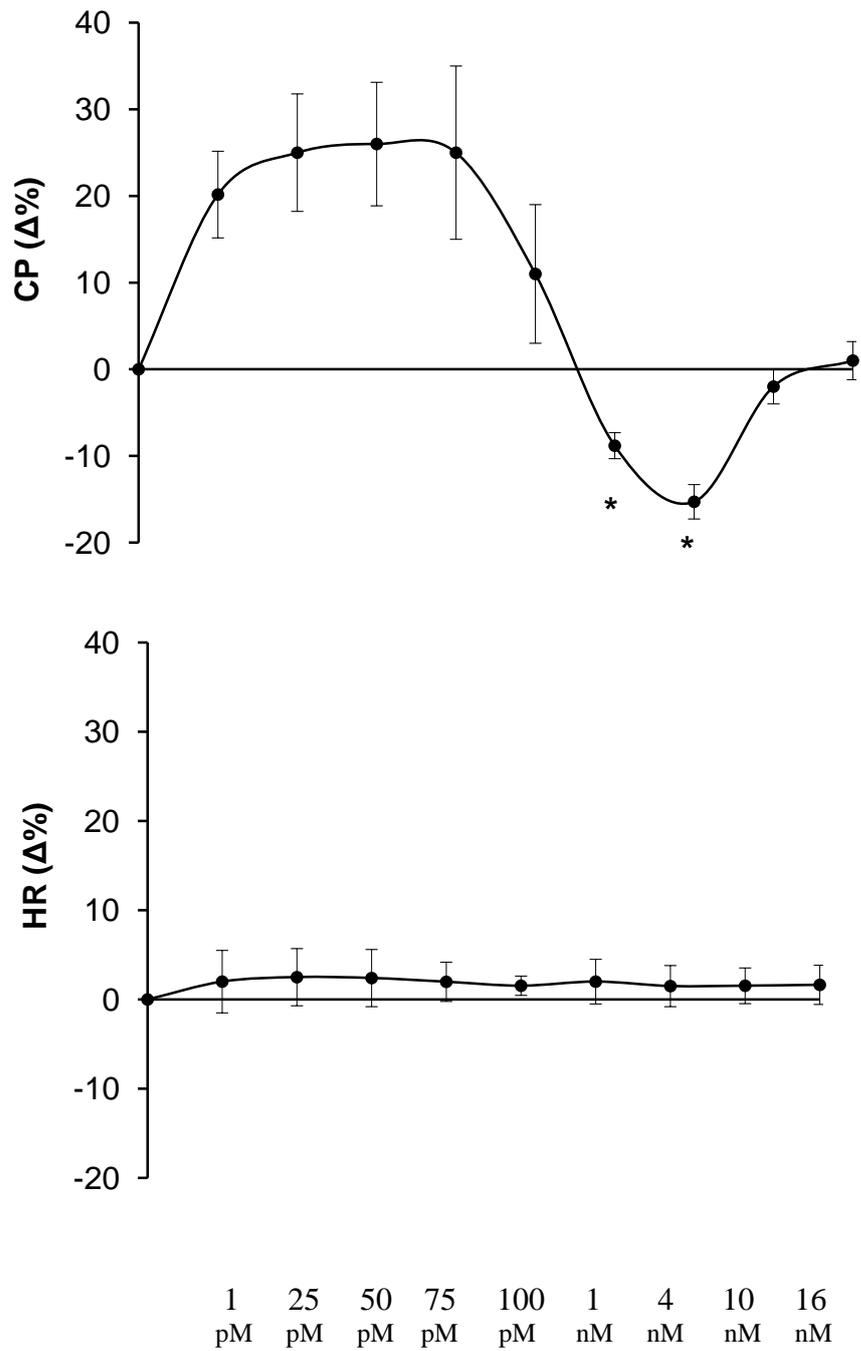
### 3.1 Azione diretta della CgA intera sul cuore dei ratti Wistar

È stato dimostrato che alcuni peptidi derivanti dalla CgA, come ad esempio la VS- 1, il frammento CgA<sub>1-64</sub> di ratto, la CST e la serpinina, modulano la performance cardiaca del cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff (Cerra et al., 2006; Cerra et al., 2008; Angelone et al., 2010, 2012; Ramella et al., 2010; Tota et al., 2012), così come i muscoli papillari di ratto isolati (Cerra et al., 2008; Tota et al., 2012). Per verificare se la CgA intera possa influenzare l'attività cardiaca, i preparati cardiaci sono stati esposti a concentrazioni crescenti di CgA per generare curve dose-risposta.

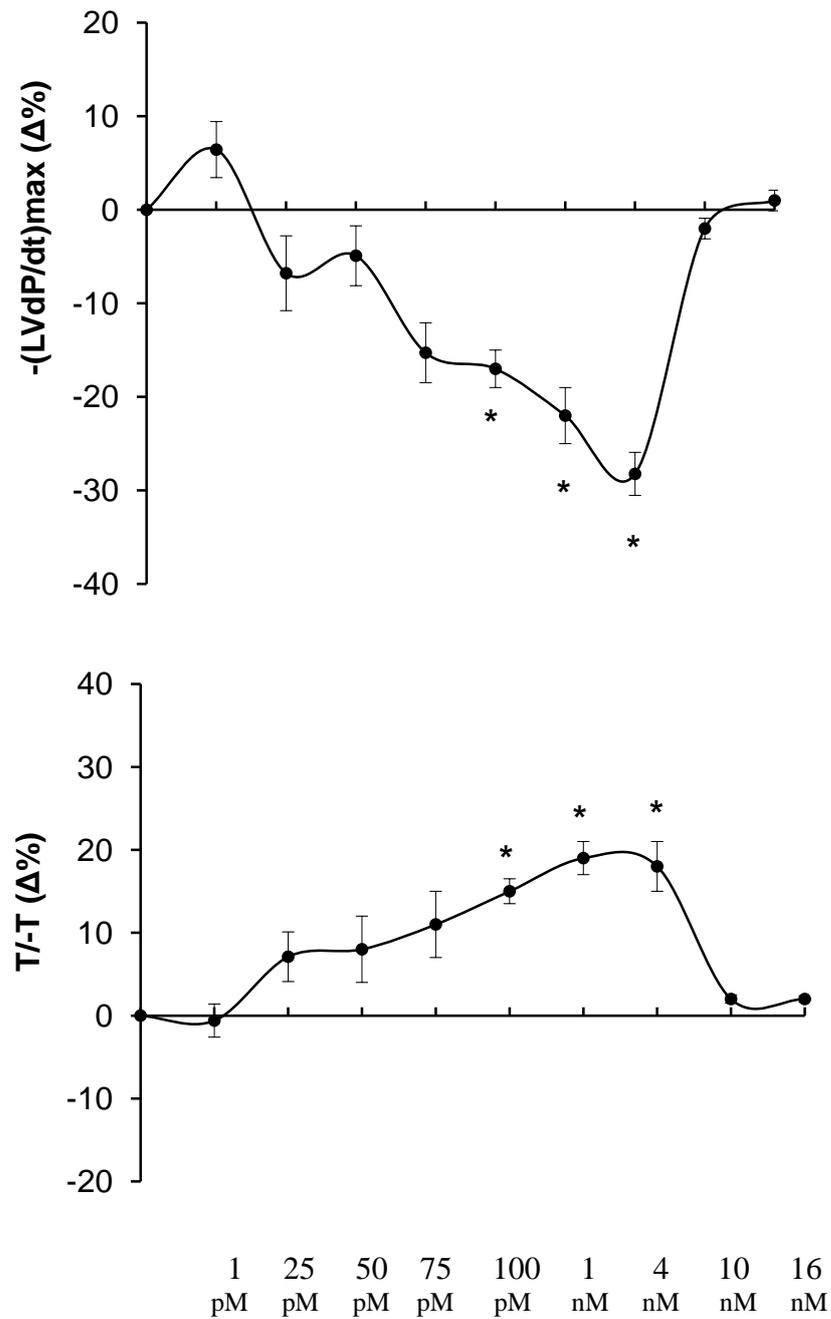
L'analisi dei dati ottenuti ha rivelato che la CgA induce effetti inotropo e lusitropico negativi dalla concentrazione 100pM a 4nM riducendo significativamente LVP e  $+(LVdP/dt)_{max}$  (Fig. 3.1). Alle concentrazioni 1 e 4nM, la CgA ha indotto una significativa vasodilatazione (Fig. 3.2). L'analisi dei parametri lusitropici mostra che la proteina intera è stata in grado di ridurre significativamente  $-(LVdP/dt)_{max}$ , aumentando quindi il rapporto T/t alle concentrazioni di 100pM, 1nM e 4nM (Fig. 3.3). Tuttavia, gli effetti inotropo e lusitropico negativi indotti dalla CgA intera sono stati aboliti alle alte concentrazioni testate (10-16nM). Non sono stati rilevati cambiamenti significativi nella HR (Fig. 3.2).



**Fig. 3.1:** curve dose-risposta per la CgA (1pM-16nM): effetti sulla LVP e +(LVdP/dt)max. Le variazioni percentuali sono state calcolate come media $\pm$ SEM con n=7, e la significatività è stata assegnata mediante ANOVA ad una via (p<0.05).



**Fig. 3.1:** curve dose-risposta per la CgA (1pM-16nM): effetti sulla HR e CP. Le variazioni percentuali sono state calcolate come  $\text{media} \pm \text{SEM}$  con  $n=7$ , e la significatività è stata assegnata mediante ANOVA ad una via ( $p < 0.05$ ).



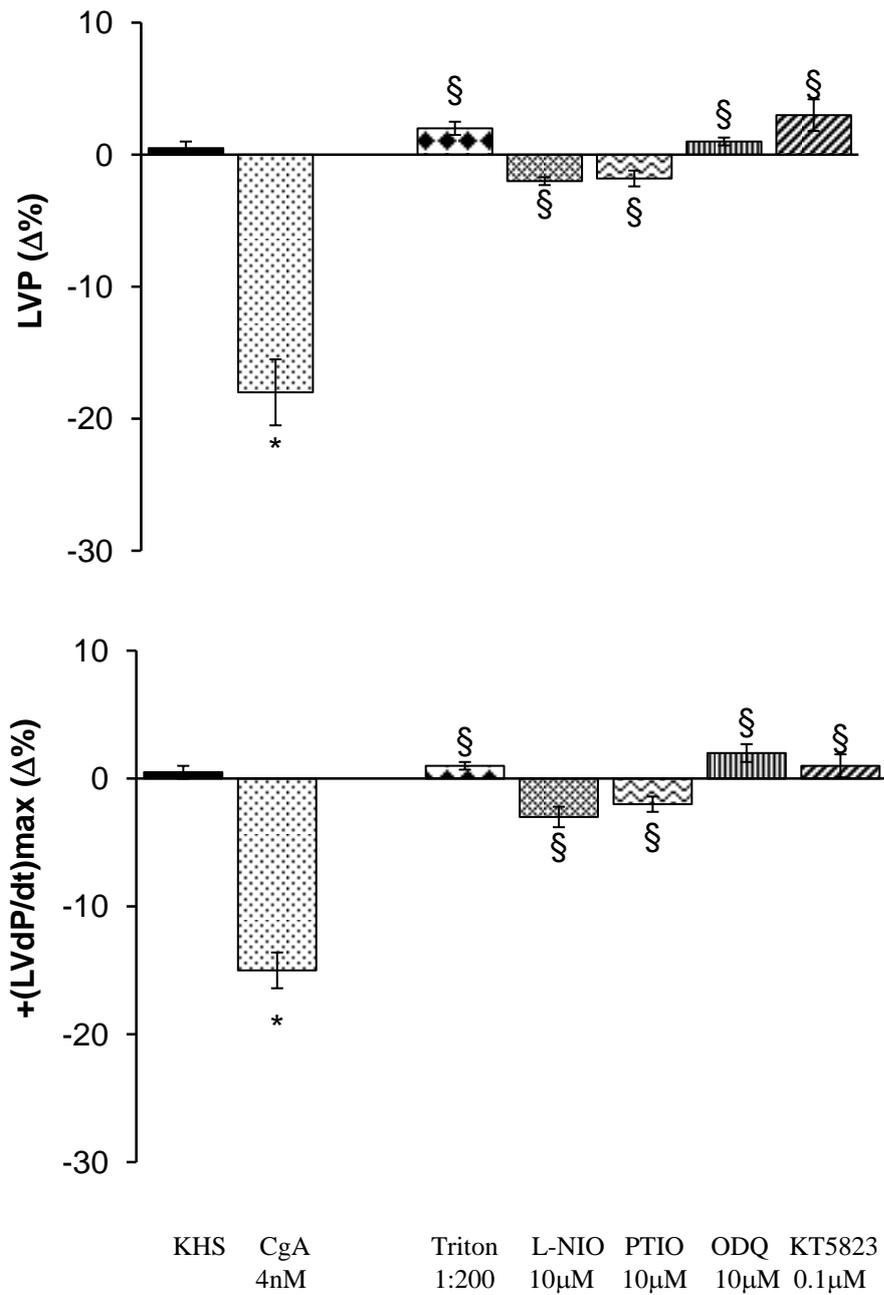
**Fig. 3.1:** curve dose-risposta per la CgA (1pM-16nM): effetti sulla  $-(LVdP/dt)_{max}$  e su  $T/t$ . Le variazioni percentuali sono state calcolate come  $media \pm SEM$  con  $n=7$ , e la significatività è stata assegnata mediante ANOVA ad una via ( $p < 0.05$ ).

### 3.2 Coinvolgimento del pathway dello NO

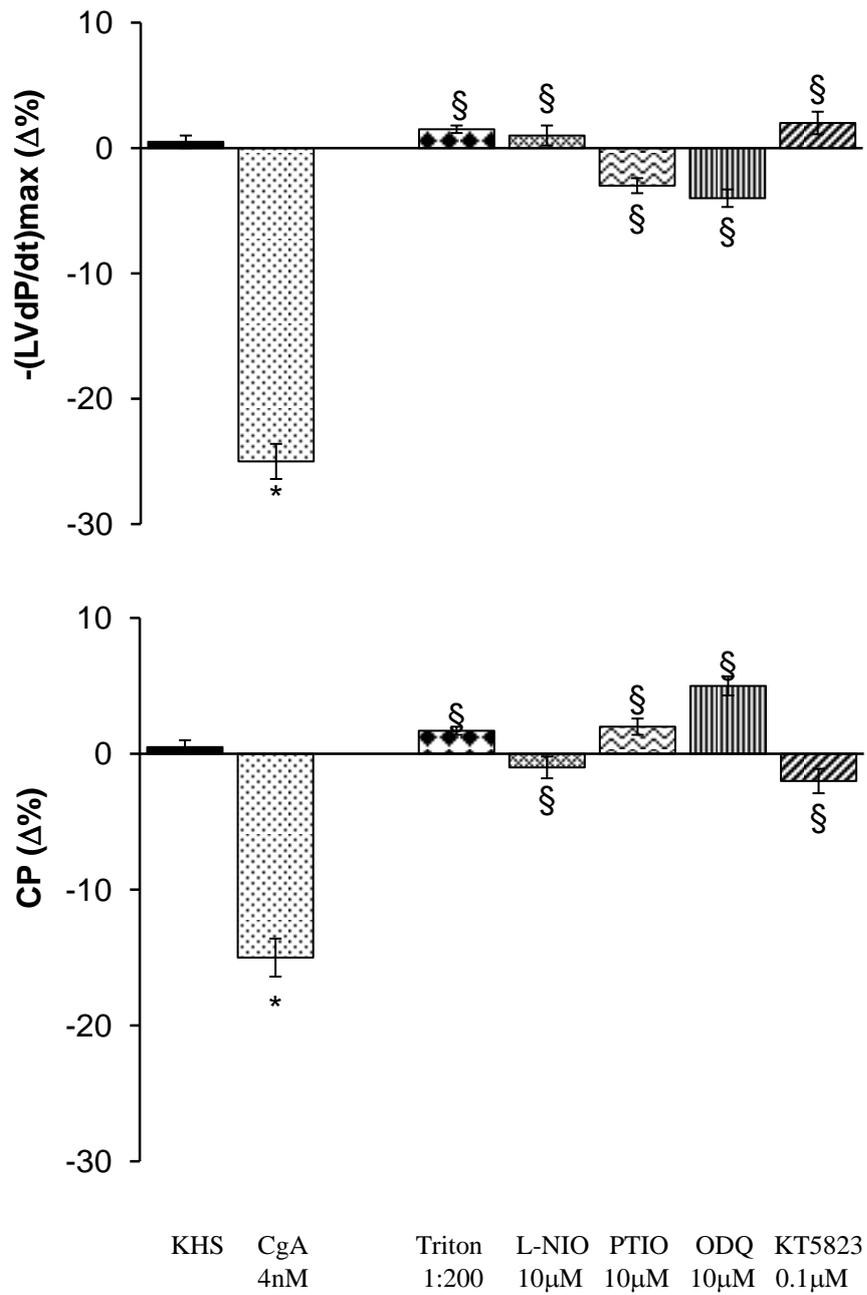
Nel cuore dei mammiferi il sistema NOS/NO/cGMP/PKG media specifici signaling intracardiaci, contribuendo sia alla regolazione battito per battito che quella a lungo termine della performance cardiaca (Angelone et al., 2012). A tal scopo, per valutare il possibile coinvolgimento del pathway dello NO nell'azione cardioattiva della CgA intera, cuori di ratti Wistar sono stati perfusi sia con L-NIO (10 $\mu$ M; inibitore delle NOSs), PTIO (10 $\mu$ M; scavenger dello NO), ODQ (10 $\mu$ M; inibitore della guanilato ciclasi, GC) o KT5823 (0.1 $\mu$ M, inibitore della PKG) in presenza di CgA. Le concentrazioni degli antagonisti sono state scelte sulla base di curve dose-risposta che hanno determinato la concentrazione minima di antagonista tale per cui non si aveva un'alterazione significativa della performance cardiaca.

Gli effetti della CgA su inotropismo, lusitropismo e pressione coronarica, sono stati aboliti in presenza degli inibitori del pathway dello NO (Fig. 3.4 e 3.5).

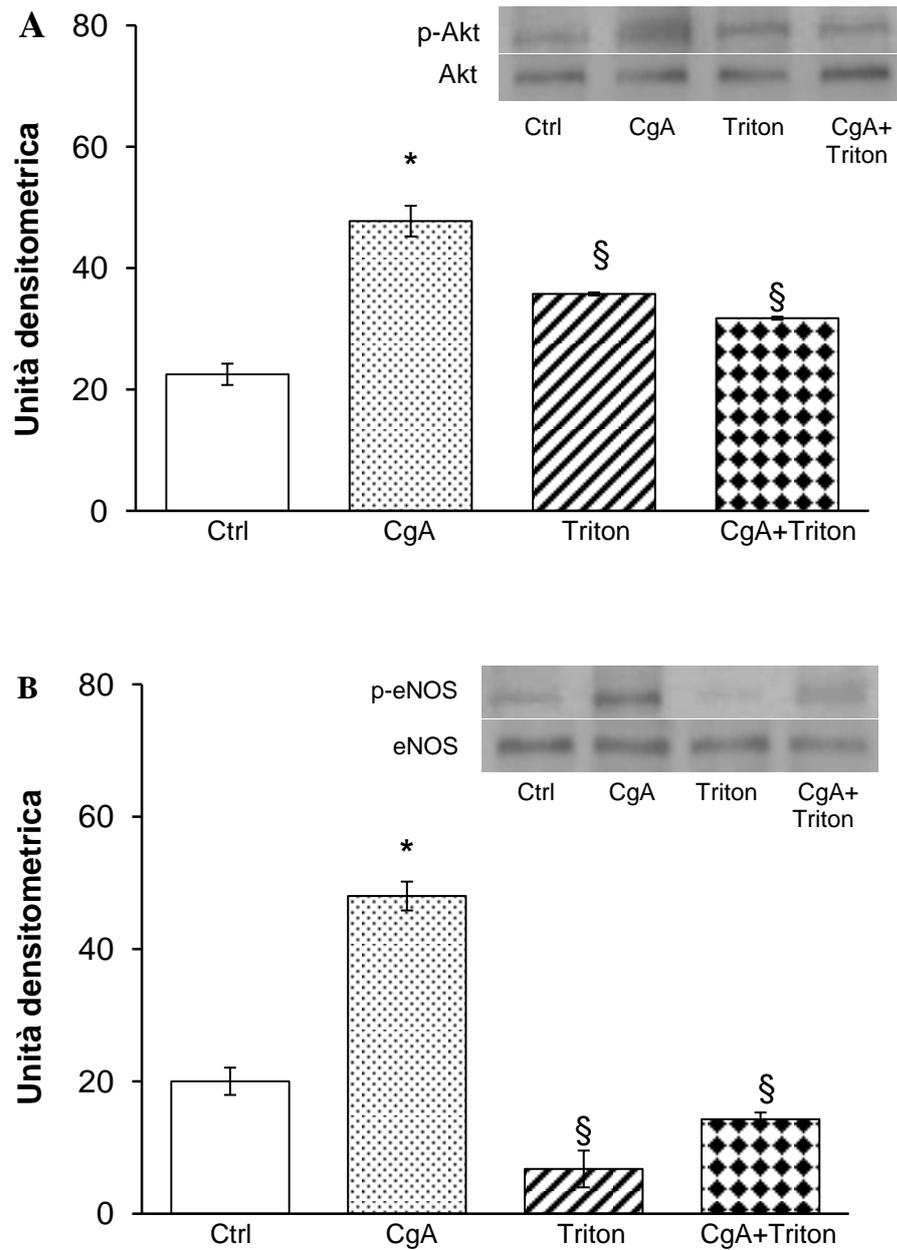
Il ruolo dello NO nel signaling della CgA è stato confermato dall'analisi della fosforilazione di Akt e di eNOS negli estratti di ventricolo di cuore di ratto e nelle colture di cellule HUVEC (Fig. 3.7 A). Alla concentrazione di 4nM, la CgA ha indotto una significativa fosforilazione di Akt inoltre il trattamento con Triton X 100, un detergente in grado di distruggere funzionalmente l'endotelio, ha ridotto la fosforilazione di Akt ed eNOS negli estratti di cuore trattati con CgA mettendo in risalto il ruolo cruciale dell'endotelio nel meccanismo d'azione della CgA (Fig. 3.6). La CgA non ha però indotto fosforilazione di nNOS (Fig. 3.7 B).



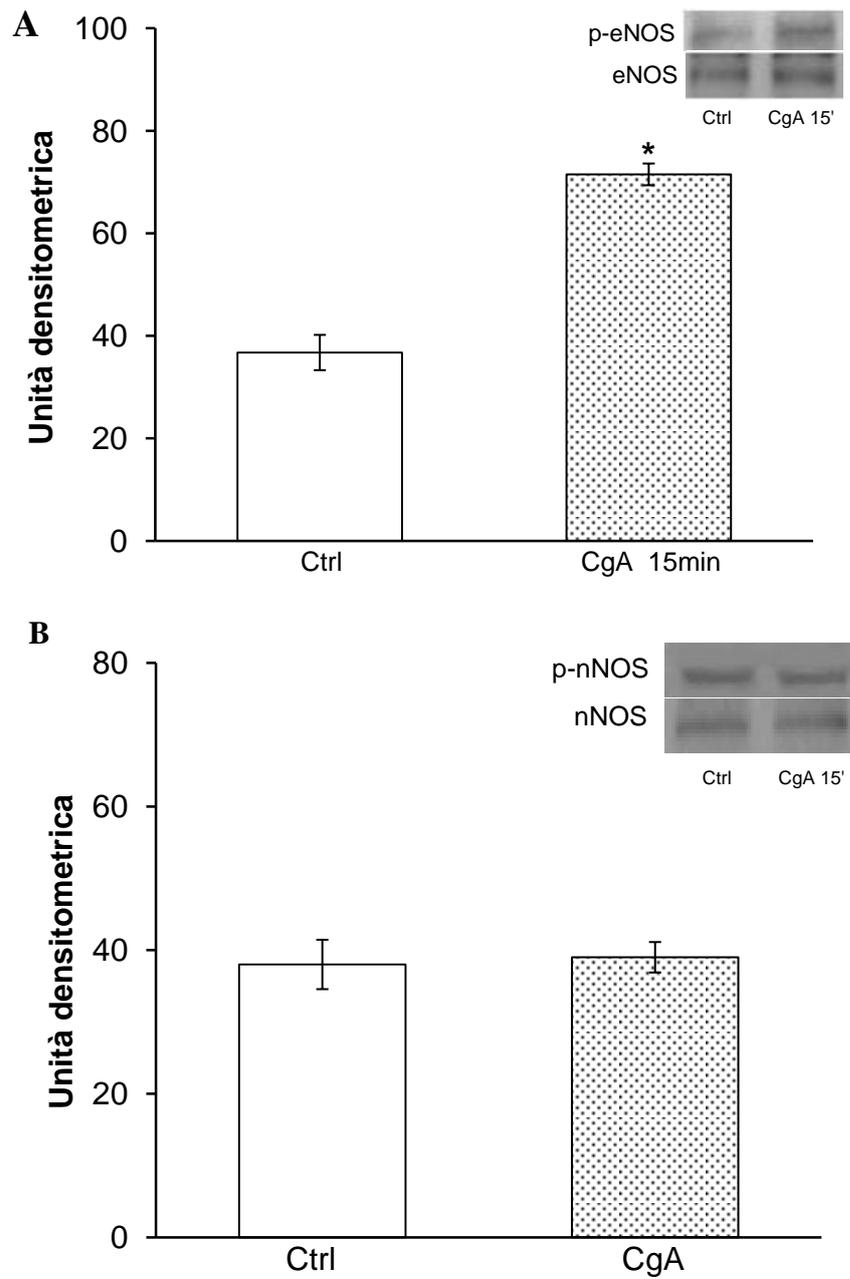
**Fig. 3.4:** effetti della CgA (4nM) su LVP e  $+(LVdP/dt)_{max}$ , dopo trattamento con Triton, e in presenza di L-NIO (10mM), PTIO (10mM), ODQ (10mM) and KT 5823 (0.1mM). La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test (n=6) (§= $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.5:** effetti della CgA (4nM) su  $-(LVdP/dt)_{max}$  e CP, dopo trattamento con Triton, e in presenza di L-NIO (10mM), PTIO (10mM), ODQ (10mM) e KT 5823 (0.1mM). La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test ( $n=6$ ) (§= $p < 0.05$ ).



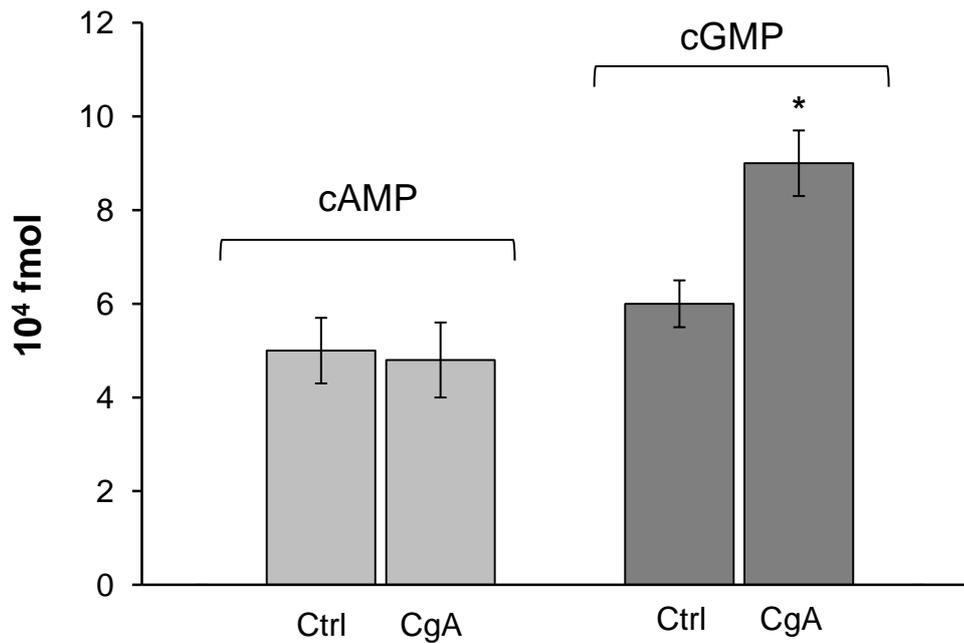
**Fig. 3.6:** fosforilazione di Akt (A) e eNOS (B) negli estratti di ventricolo sinistro di ratto in campioni trattati con CgA (4nM) e in presenza di Triton X100 (dil. 1:200). La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test ( $n=6$ ) (§= $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.7:** fosforilazione di eNOS nelle colture di HUVEC (A), e di nNOS (B) negli estratti cardiaci di ratto trattati con CgA (4nM). La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test ( $n=6$ ) (§= $p < 0.05$ ).

### 3.3 Misurazione dei livelli di cAMP e cGMP negli estratti di cuore di ratto

Abbiamo osservato che negli estratti dei cuori di ratti Wistar trattati con concentrazione singola di CgA (4nM), i livelli di cGMP risultavano significativamente aumentati, a differenza dei livelli di cAMP che rimanevano quasi invariati (Fig. 3.8).



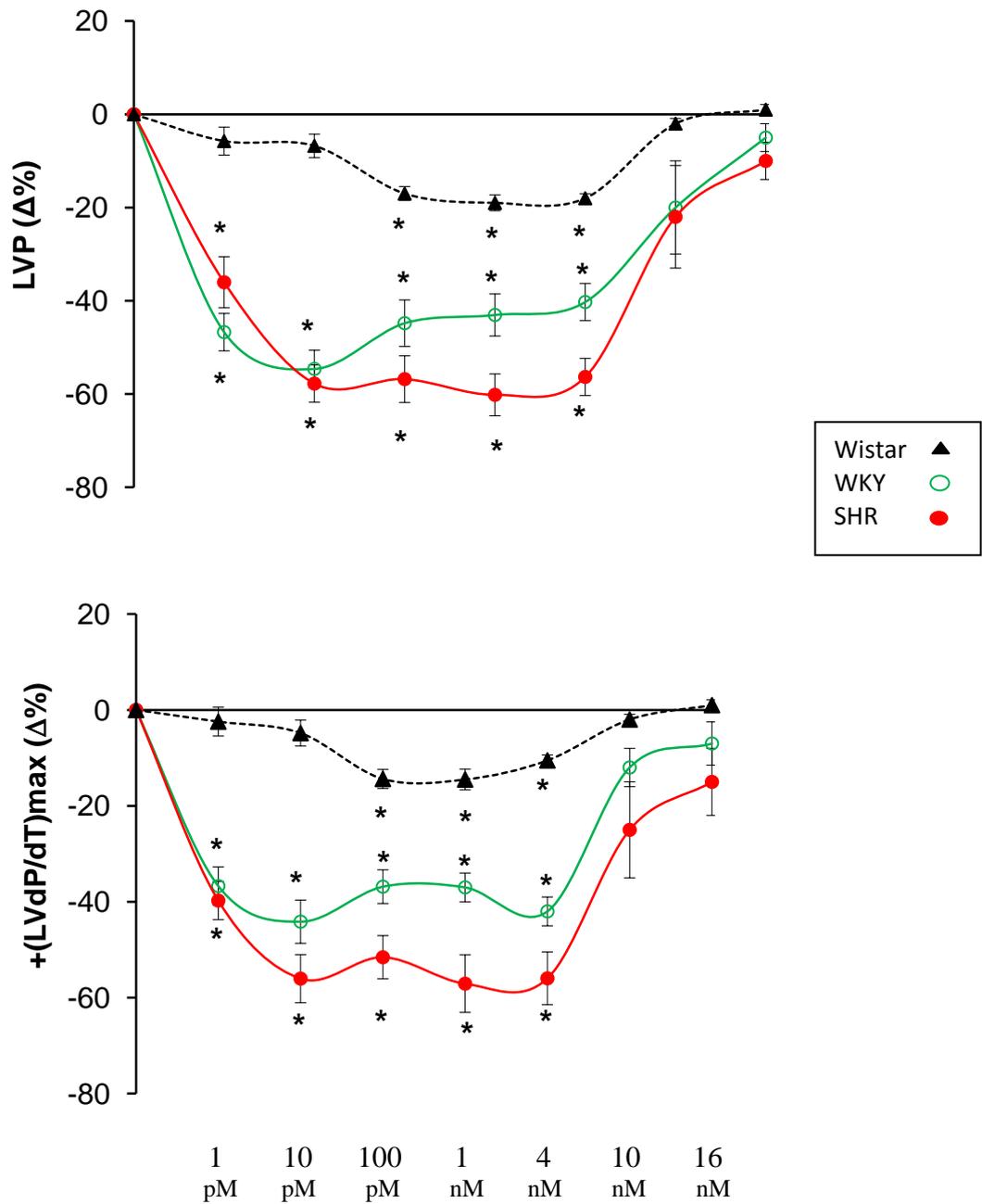
**Fig. 3.8:** gli istogrammi indicano i livelli intracellulari di cAMP e cGMP negli estratti di cuore di ratto. La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ).

### 3.4 Effetti della CgA intera sul cuore di ratto adulto normoteso (WKY) ed iperteso (SHR)

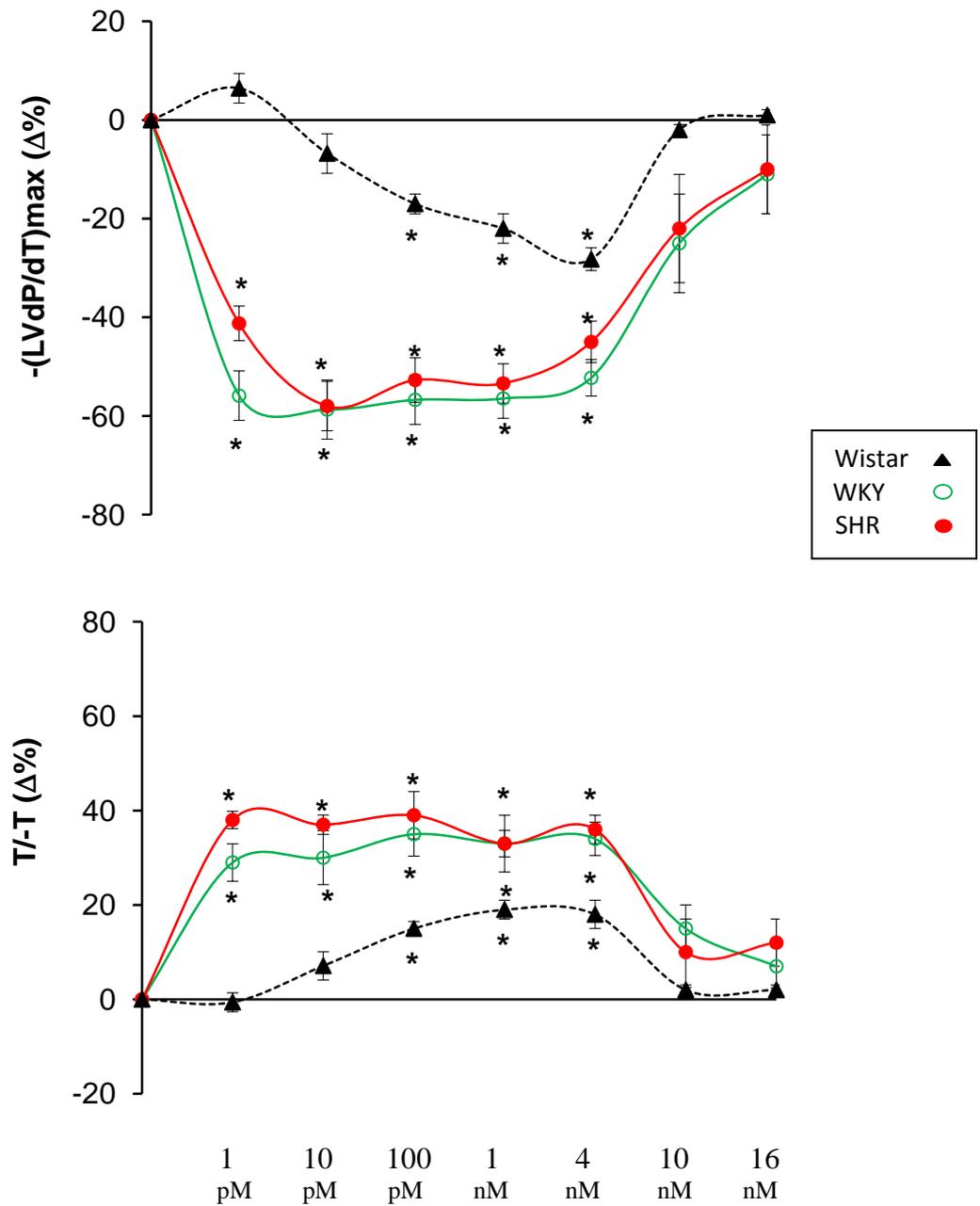
Come riportato in letteratura, l'ablazione del gene Chga causa lo sviluppo di ipertensione nei topi Chga-KO accompagnata da un ingrossamento della massa cardiaca, e una maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e una conseguente deplezione di NO (Gayen et al., 2010a).

Dopo aver analizzato gli effetti della CgA sul cuore di un ratto giovane normoteso, abbiamo voluto anche valutare il ruolo della CgA intera in condizioni patologiche utilizzando come modello il ratto spontaneamente iperteso (SHR) che mima bene le caratteristiche della patologia umana (Doggrell and Brown, 1998).

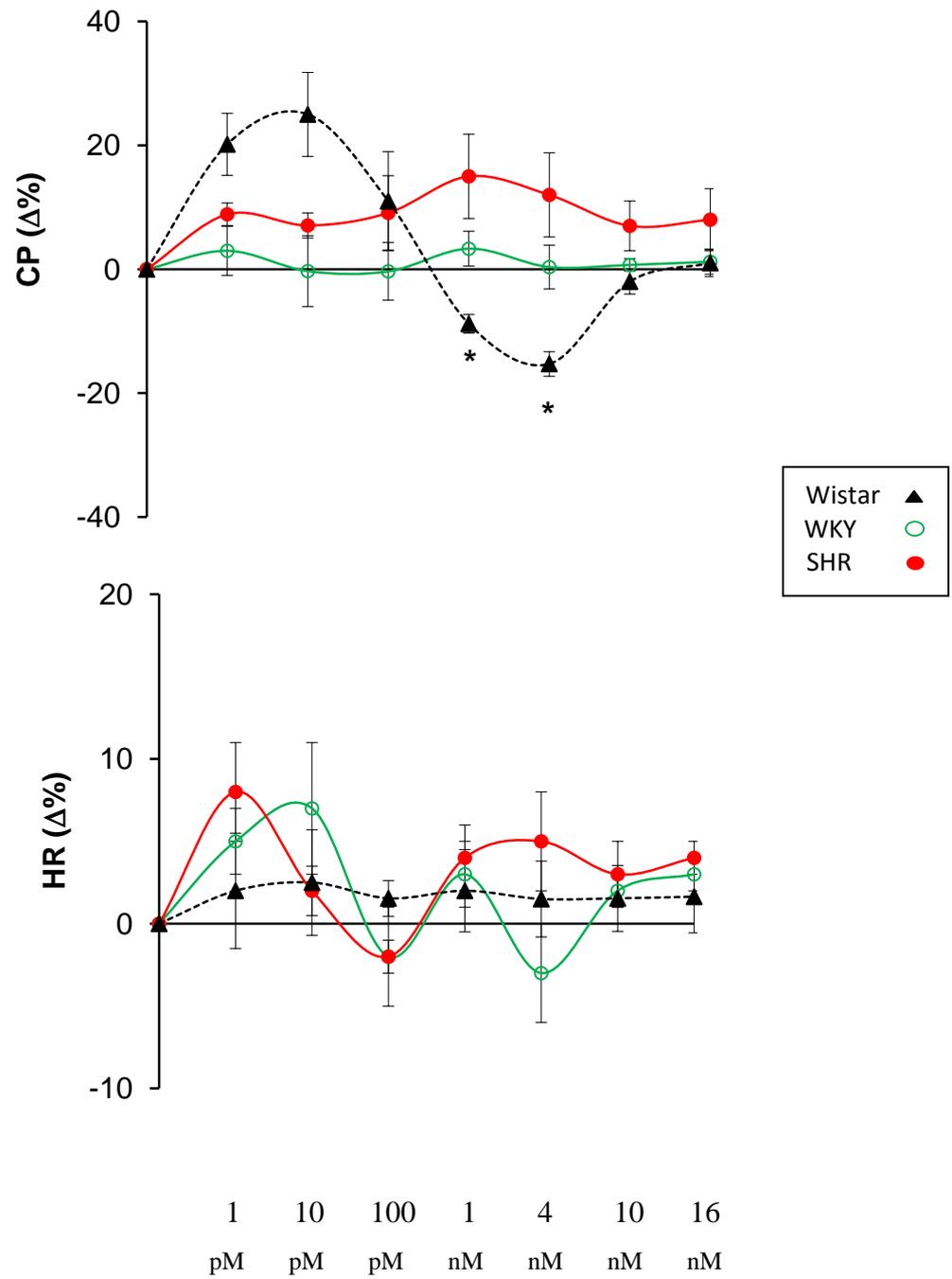
I risultati ottenuti hanno mostrato che la CgA ha indotto effetti negativi significativi sia nei ratti SHR che sui ratti controllo (WKY), a partire dalla concentrazione di 1pM come indicato dall'abbassamento della LVP e della  $+(LVdP/dt)_{max}$  (Fig. 3.9) e della  $-(LVdP/dt)_{max}$ , e dall'aumento del rapporto T/-t (Fig. 3.10). Questi effetti sono stati aboliti alle alte concentrazioni testate (10-16nM). Sia nei cuori SHR che nei WKY, la CgA non ha indotto effetti significativi sulla CP e sulla HR (Fig. 3.11).



**Fig. 3.9:** curve dose-risposta: effetti della CgA (1pM-16nM) su LVP e +(LVdP/dt)max. La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test ( $n=6$ ) (§= $p < 0.05$ ).



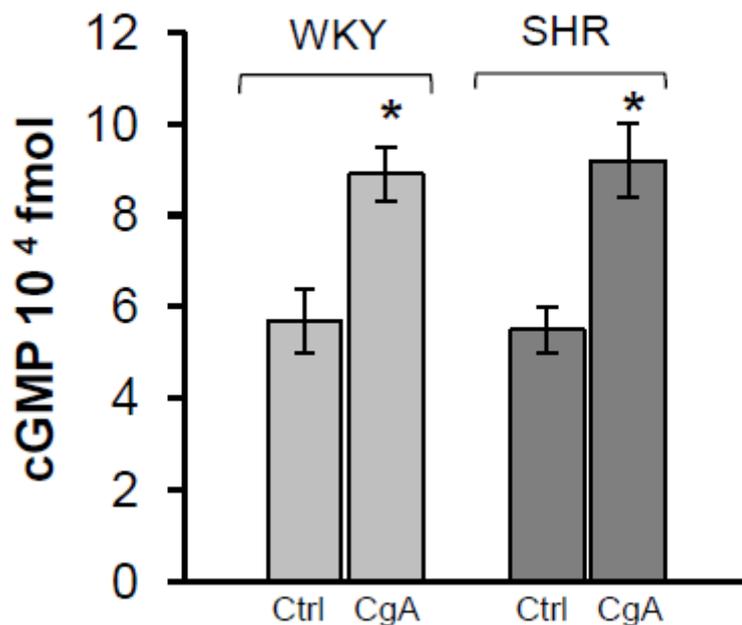
**Fig. 3.10:** Curve dose-risposta: effetti della CgA (1pM-16nM) su  $-(LVdP/dt)_{max}$  e  $T/-t$ . La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA ( $*=p<0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test ( $n=6$ ) ( $\$=p<0.05$ ).



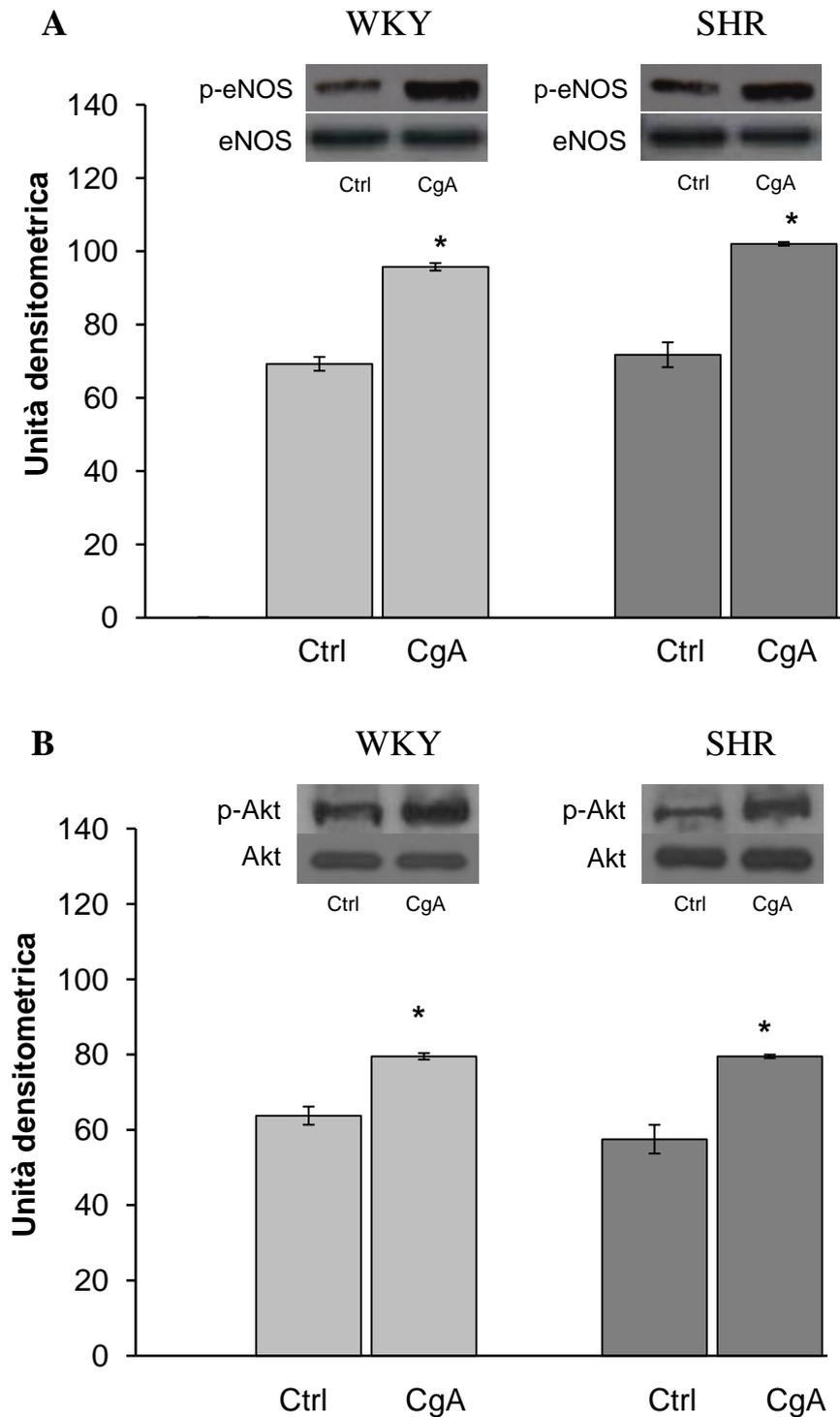
**Fig. 3.11:** curve dose-risposta: effetti della CgA (1pM-16nM) su CP e HR. La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test ( $n=6$ ) ( $\$=p < 0.05$ ).

### 3.5 Coinvolgimento del pathway dello NO nei cuori SHR trattati con CgA

Per verificare se il pathway del NO fosse coinvolto negli effetti cardiaci indotti dalla CgA intera nei cuori di ratti SHR, i preparati cardiaci sono stati omogenati e sottoposti a Western blotting e saggi ELISA. I dati ottenuti mostrano un aumento della fosforilazione di Akt e di eNOS sia nei cuori WKY che SHR (Fig. 3.13 A e B). È stato anche rilevato un aumento significativo dei livelli intracellulari di cGMP (Fig. 3.12).



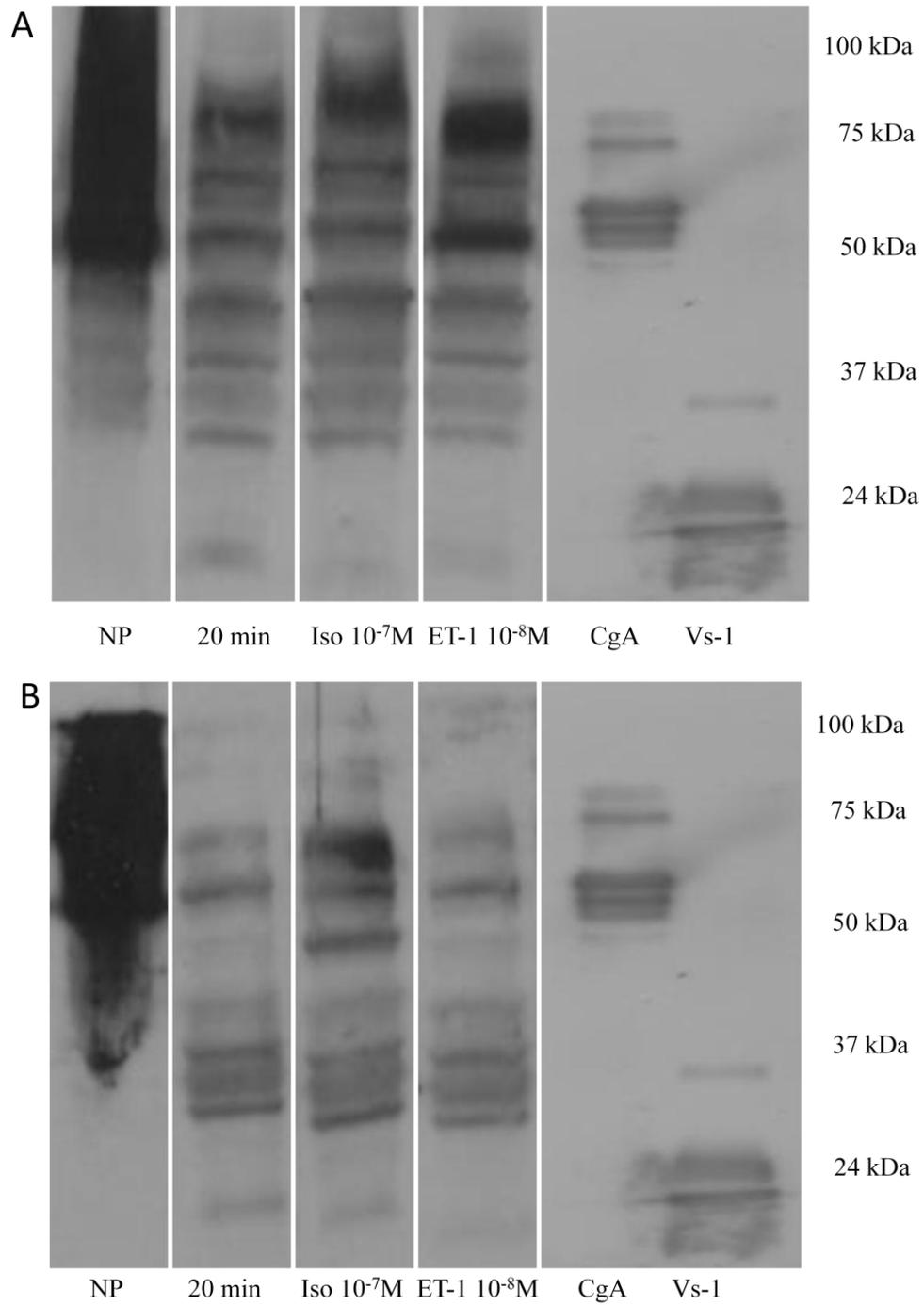
**Fig. 3.12:** gli istogrammi indicano i livelli intracellulari di cGMP negli estratti di cuore di ratto WKY e SHR. La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ).



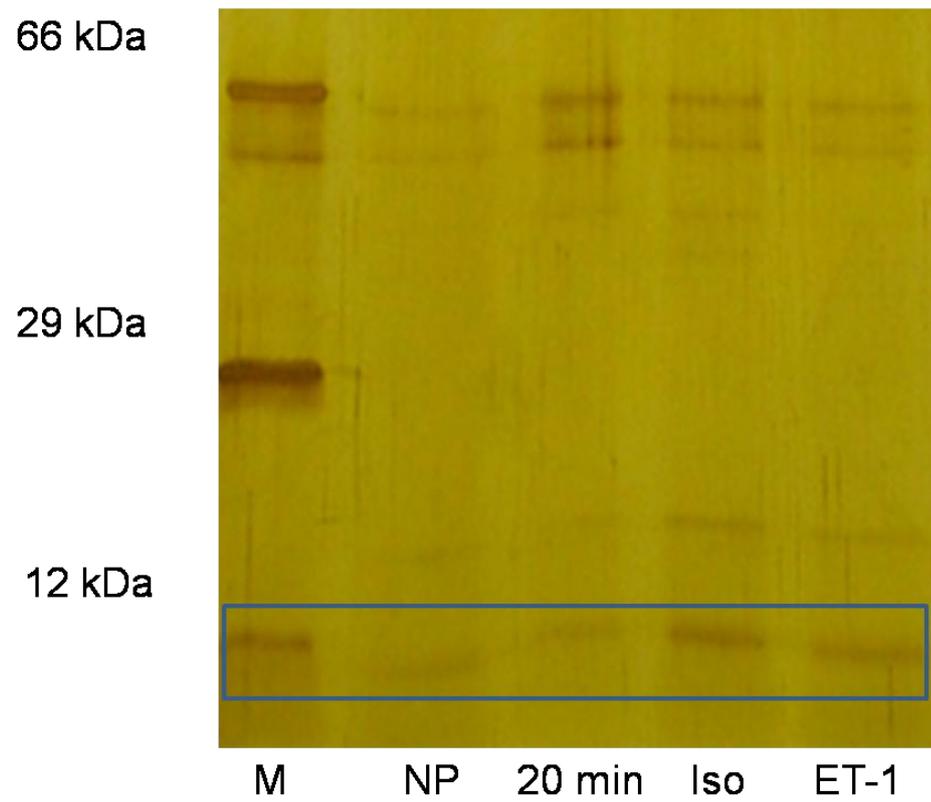
**Fig. 3.13:** fosforilazione di eNOS (**A**) e Akt (**B**) negli estratti di ventricolo sinistro di ratto WKY e SHR in campioni trattati con CgA (4nM) e in presenza di Triton X100 (dil. 1:200). La significatività è stata calcolata mediante one-way ANOVA (\*= $p < 0.05$ ) seguito da Bonferroni's post-hoc-test ( $n=6$ ) (§= $p < 0.05$ ).

### 3.6 Processamento intracardiaco della CgA

Glattard e collaboratori (2006), hanno dimostrato che la CgA è soggetta ad un processamento proteolitico intracardiaco dal quale originano i peptidi bioattivi come la CST, VS-1 e la serpinina. Per stabilire se in presenza di stimoli fisici e chimici, la CgA cardiaca vada incontro a clivaggio proteolitico, i cuori sono stati perfusi sia con KHS, oppure ISO (1 e 100nM), oppure ET-1 (10nM). I campioni sono stati successivamente omogenati e sottoposti ad analisi Western blotting. Dall'analisi è emerso che in tutti e tre i casi, perfusione con KHS, ISO e ET-1, è presente una forte banda immunoreattiva di alto peso molecolare (tra gli 80 e i 50 kDa), corrispondente alla massa molecolare della CgA intera di ratto (Fig. 3.14 A-B). Oltre a questa banda di alto peso molecolare, sono state individuate altre bande corrispondenti ai frammenti N-terminali della CgA contenenti la sequenza aminoacidica della VS-1 (Fig. 3.14 A e B), sia nei campioni WKY che SHR. Questa banda invece, non è stata rilevata nei campioni non perfusi. La cromatografia ad affinità ha confermato la presenza di VS-1 negli estratti dei cuori perfusi con KHS, ISO e ET-1, ma non nei cuori non perfusi (Fig. 3.15).



**Fig. 3.14:** estratti di cuori di ratti WKY (A) non perfusi (NP), perfusi solo con KHS (20min), oppure con ISO 10<sup>-7</sup>M e ET-1 10<sup>-8</sup>M; estratti di cuori di ratti SHR (B) non perfusi (NP), perfusi solo con KHS (20min), oppure con ISO 10<sup>-7</sup>M e ET-1 10<sup>-8</sup>M.

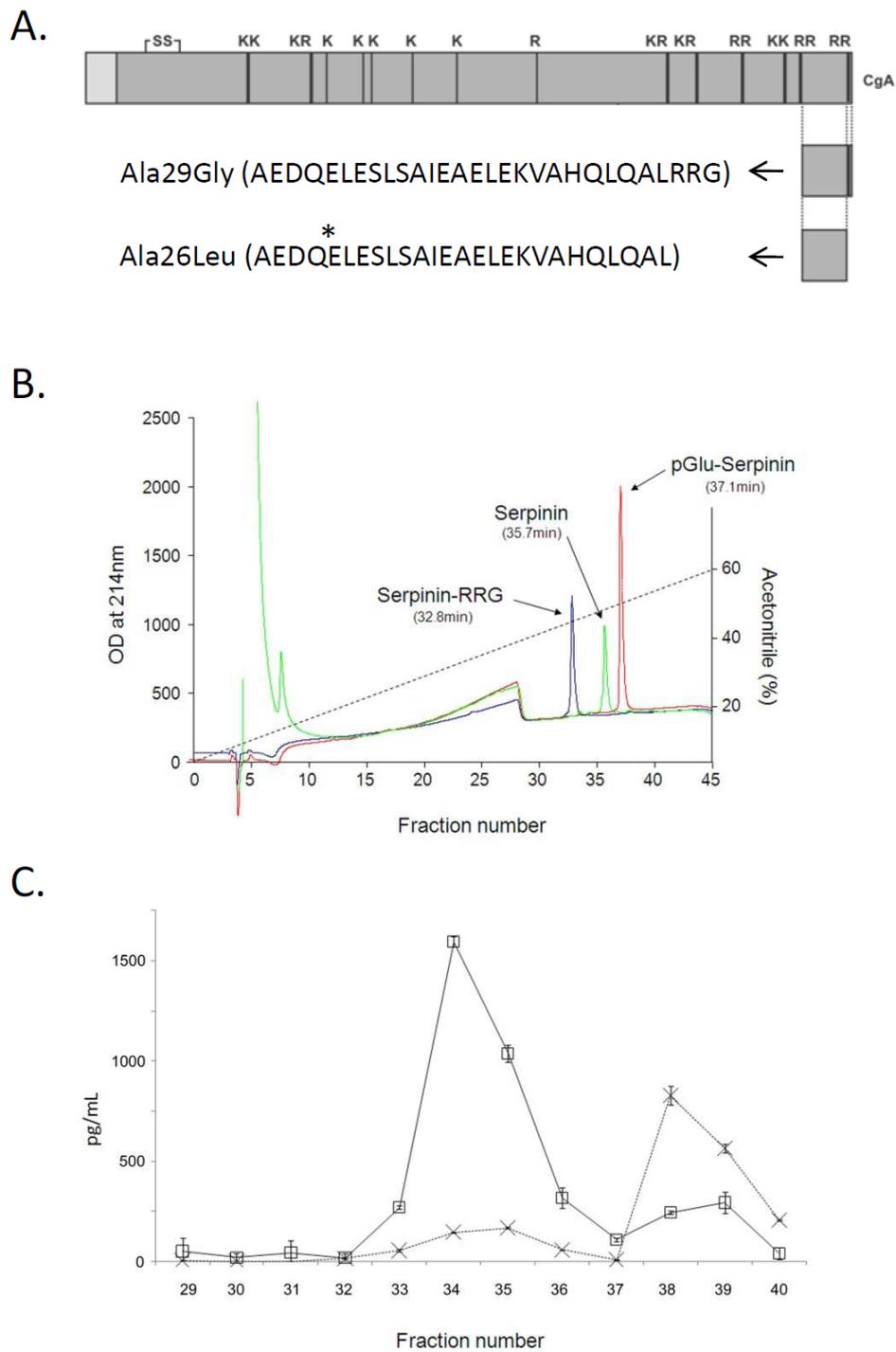


**Fig. 3.15:** cromatografia ad alta affinità. Il riquadro blu indica la banda relativa al frammento della VS-1 identificato mediante anticorpo specifico (CgA4-16).

### 3.7 Determinazione della presenza dei peptidi della serpinina mediante HPLC e saggi ELISA

E' stato osservato che la CgA viene processata nel cuore di ratto a livello della regione C-terminale, per generare una serie di peptidi simili alla serpinina (Fig. 3.16 A). Per identificare questi peptidi, sono stati utilizzati degli standard sintetici della serpinina e separati mediante HPLC per identificarne i profili di eluizione. La serpinina presentava un profilo di eluizione nella frazione #36 mentre la pGlu-serpinina nella frazione #38. Il peptide allungato, Ala29GLy, presentava un profilo di eluizione nella frazione #34 (Fig. 3.16 B).

I peptidi purificati estratti dal cuore di ratto, sono stati sottoposti a cromatografia su colonna C18. Due picchi corrispondevano al peptide lungo Ala29Gly nella frazione #34, e al peptide pGlu-serpinina nella frazione #38. Un lieve segnale nella frazione #36 corrispondeva alla serpinina (Fig. 3.16 C). Utilizzando un saggio ELISA abbiamo voluto identificare il picco predominante relativo al profilo di eluizione nella frazione #38 proprio del peptide pGlu-serpinina (Fig. 3.16C). La concentrazione della pGlu-serpinina era di  $103.8 \pm 14.7$  pg/g di cuore di ratto.



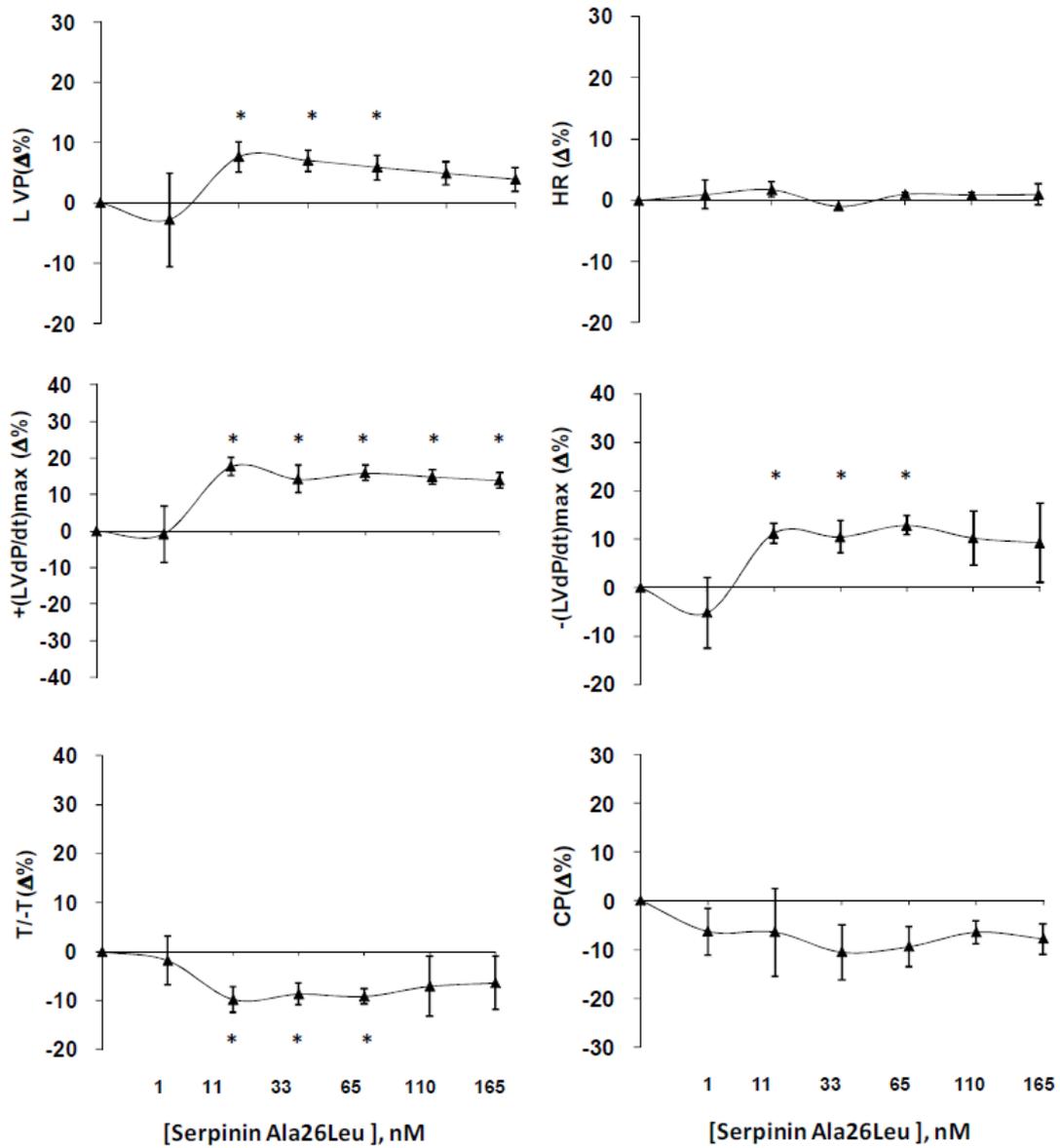
**Fig. 3.16:** i peptidi sintetici serpinina, serpinina R-R-G e p-Glu-serpinina, sono stati sintetizzati dalla Phoenix pharmaceutical. L'asterisco indica il residuo di glutamato che cicizza per formare la p-Glu-serpinina (A). I profili di eluizione sono stati ottenuti mediante HPLC: Serpinina-R-R-G 32.8 min, serpinina 35.7 min, pGlu-serpinina 37.1 min. (B). Le frazioni ottenute sono state purificate e usate per un saggio ELISA specifico per la pGlu-serpinina (C).

### 3.8 Effetti della serpinina e dei suoi peptidi sull'inotropismo e sul lusitropismo

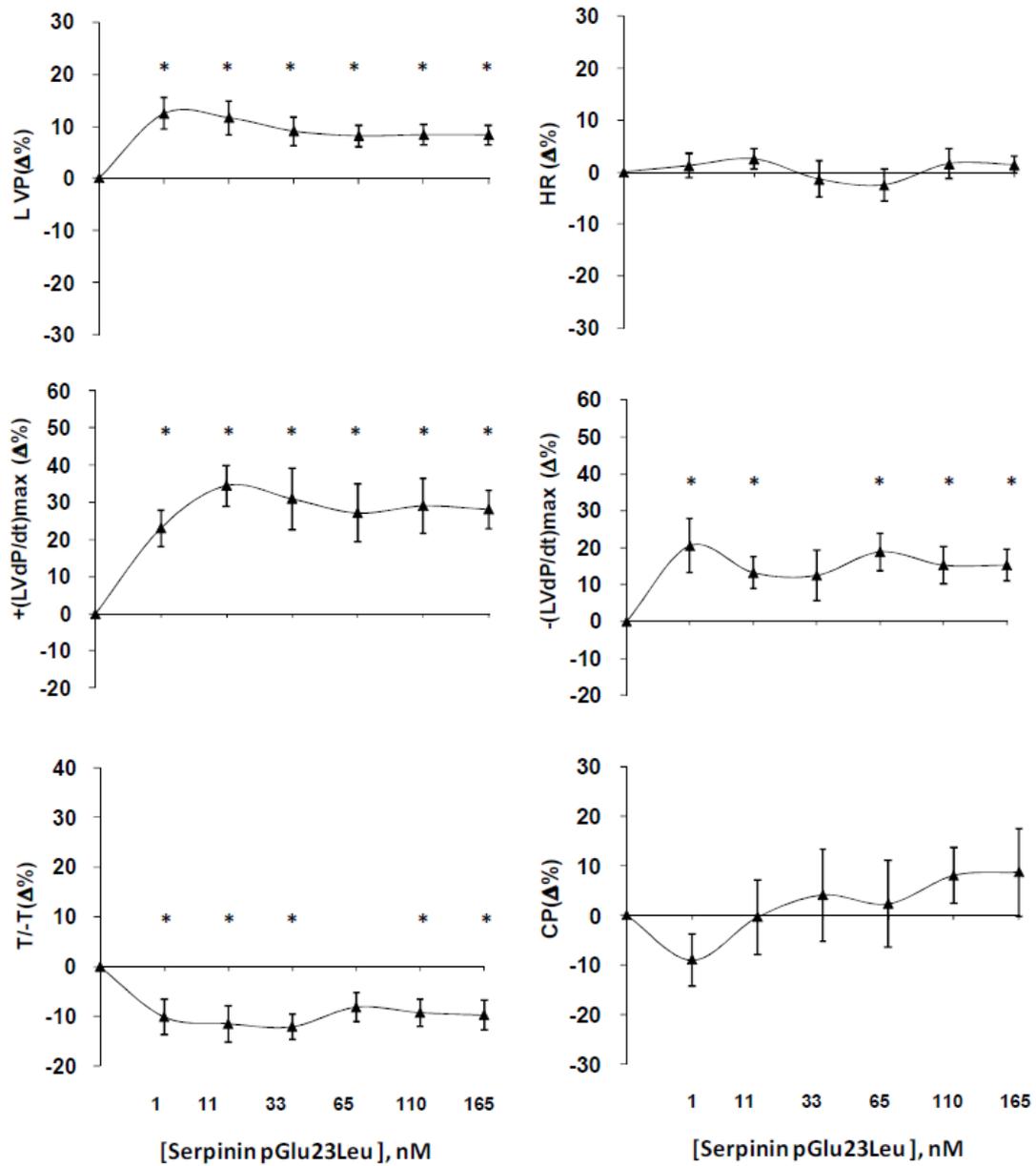
Per determinare se la serpinina, o gli altri due peptidi pGlu-serpinina e serpinina Ala29Gly, influenzano o meno l'attività cardiaca basale del cuore di mammifero, i preparati di cuore di ratto sono stati perfusi con dosi crescenti dei tre peptidi per generare delle curve dose-risposta. Gli effetti dei tre peptidi sono rimasti stabili per almeno 10 minuti. I parametri cardiaci sono stati misurati ogni 5 minuti. La serpinina (concentrazioni da 1 a 165 nM), ha indotto un significativo effetto inotropo e lusitropico positivo dose-dipendente a partire dalla concentrazione di 11 nM, senza modificare la HR (Fig. 3.17). Il peptide ha inoltre indotto vasodilatazione riducendo quindi la CP (Fig.3.17).

Il trattamento con pGlu-serpinina (concentrazione da 1 a 165 nM), ha indotto un effetto inotropo e lusitropico più potente di quello indotto dalla serpinina, già a partire dalla concentrazione di 1nM (Fig. 3.18). Tuttavia la pGlu-serpinina non ha modificato significativamente HR e CP (Fig. 3.18).

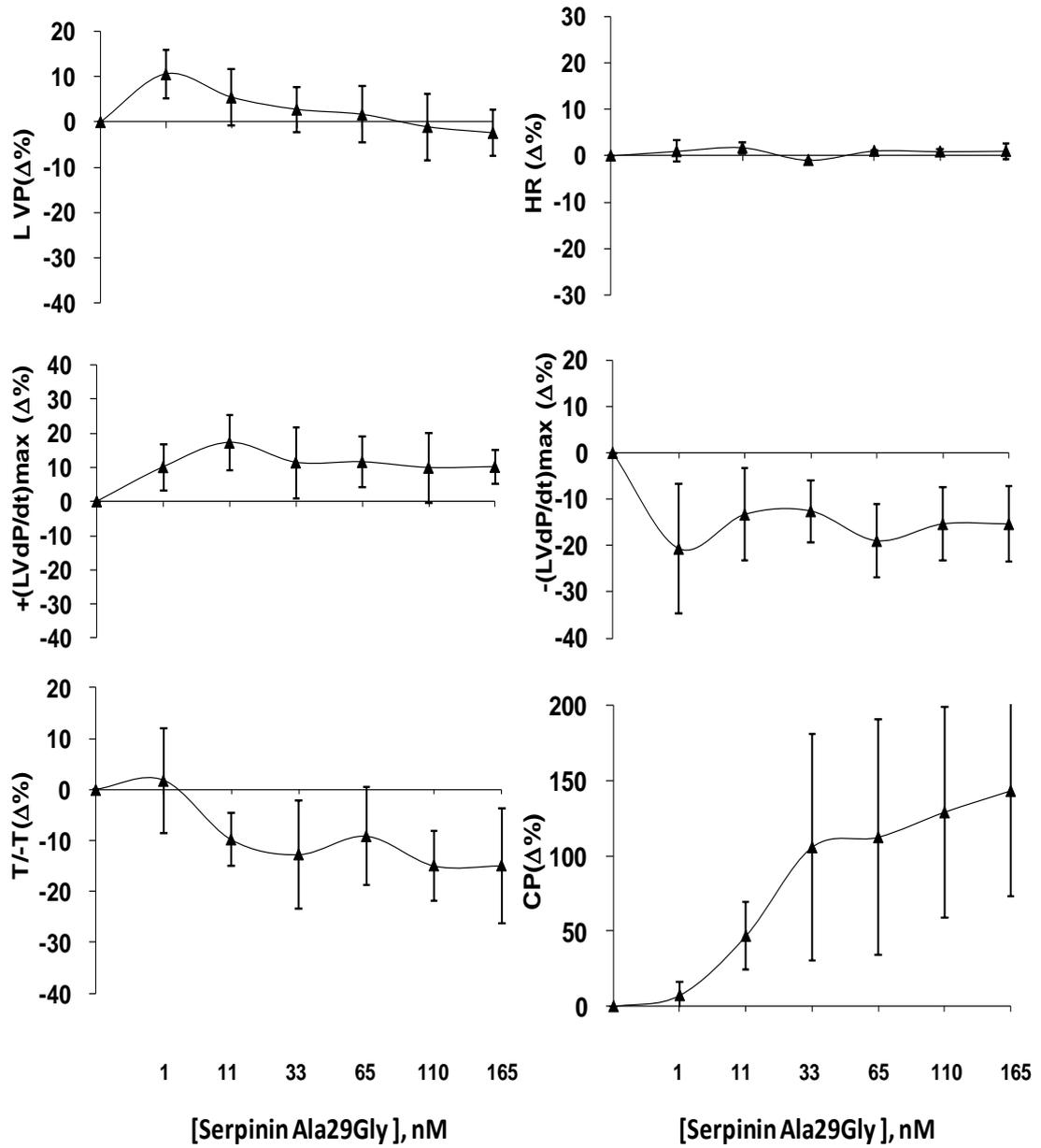
Infine, il trattamento con il peptide lungo, Ala29Gly, non ha influenzato significativamente la performance cardiaca a tutte le concentrazioni testate (Fig. 3.19). Sulla base dunque dei dati relativi alle curve basali, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione solamente sui peptidi serpinina e pGlu-serpinina.



**Fig. 3.17:** effetti della serpinina (Ala26Leu, 1-165nM) su HR, sui parametri relativi all'inotropismo LVP e +LVdP/dt)max, sui parametri lusitropici -LVdP/dt)max e T/-t, e sulla CP. Le significatività sono state assegnate mediante test ANOVA ad una via (\*= p<0.05), seguito dal post-hoc-test di Bonferroni (n=6).



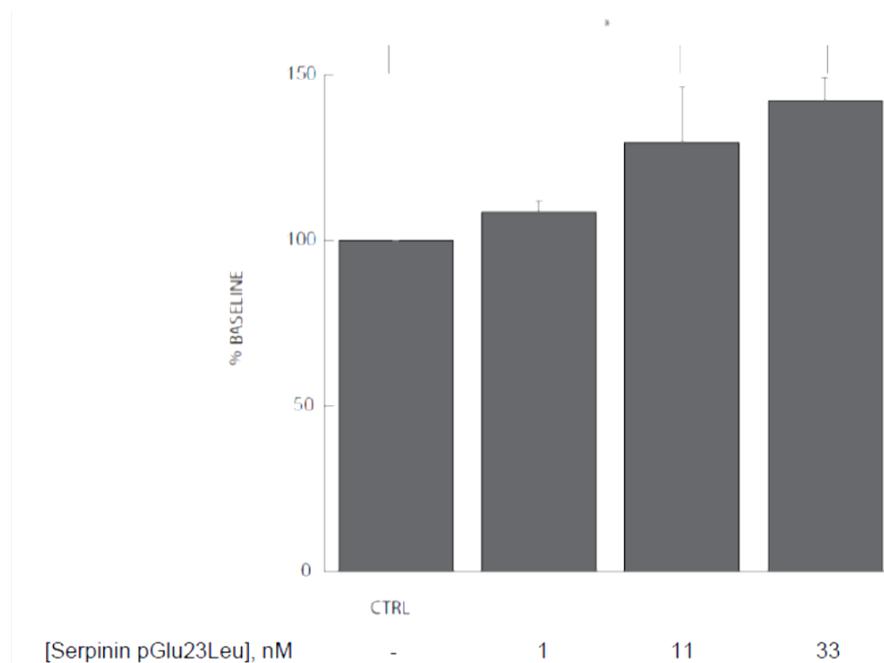
**Fig. 3.18:** effetti della pGlu-serpinina (pGlu23Leu) su HR, sui parametri relativi all'inotropismo LVP e +LVdP/dt)max, sui parametri lusitropici -LVdP/dt)max e T/-t, e sulla CP. Le significatività sono state assegnate mediante test ANOVA ad una via (\*=  $p < 0.05$ ), seguito dal post-hoc-test di Bonferroni ( $n=6$ ).



**Fig. 3.19:** effetti della serpinina (Ala29Gly) su HR, sui parametri relativi all'inotropismo LVP e + (LVdP/dt)max, sui parametri lusitropici - (LVdP/dt)max e T/-t, e sulla CP. Le significatività sono state assegnate mediante test ANOVA ad una via (\*= p<0.05), seguito dal post-hoc-test di Bonferroni (n=6).

### 3.9 Effetti della pGlu-serpinina sul muscolo papillare di ratto isolato

Il muscolo papillare di ratto è stato usato per misurare gli effetti diretti della serpinina sullo sviluppo di tensione e nella variazione di lunghezza della fibra muscolare. Grazie a questa procedura i risultati ottenuti non sono stati influenzati dalla frequenza cardiaca e dal flusso coronarico. Il peptide pGlu-serpinina ha indotto un effetto positivo sulla contrattilità miocardica, particolarmente significativo alle concentrazioni di 11 e 33nM (Fig. 3.20). Il picco massimo è stato raggiunto dopo 3-4 minuti di trattamento. L'effetto inotropo positivo indotto dalla pGlu-serpinina è stato completamente annullato in presenza di una soluzione di Tyrod.

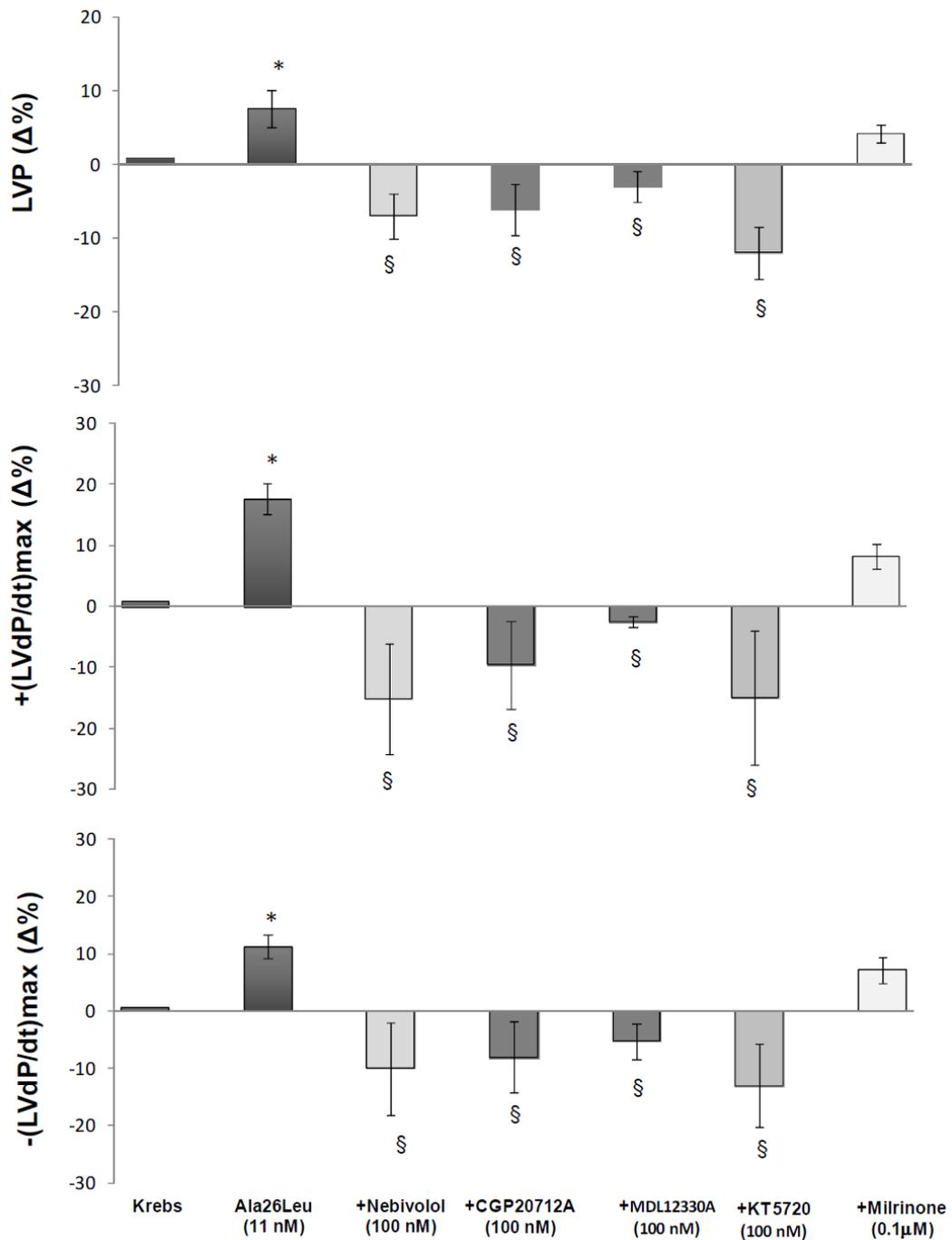


**Fig. 3.20:** effetti della pGlu-serpinina (1-11-33 nM) sul muscolo papillare di ratto isolato. Le significatività sono state assegnate mediante test ANOVA ad una via (\*=  $p < 0.05$ ), seguito dal post-hoc-test di Bonferroni ( $n=6$ ).

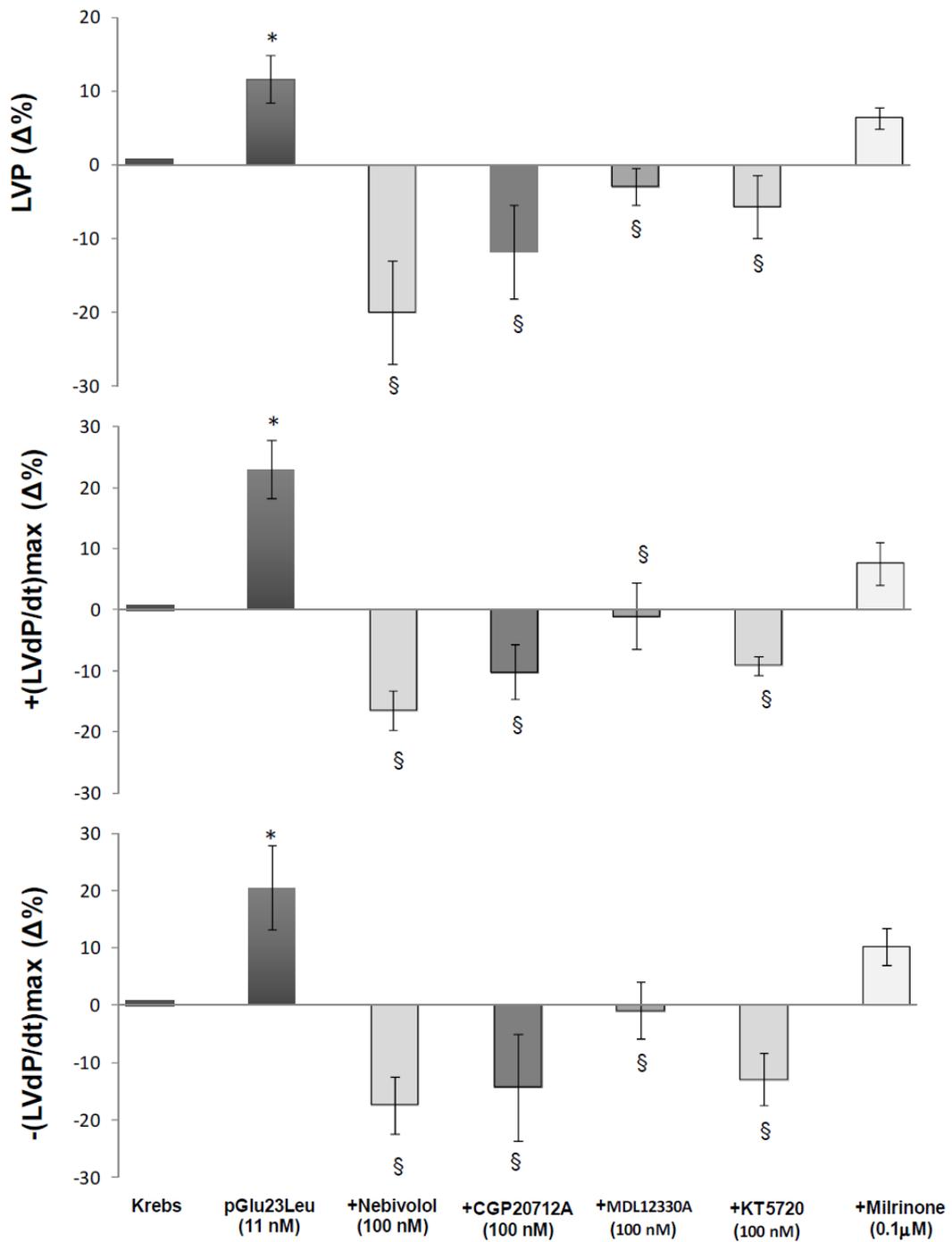
### 3.10 Coinvolgimento del pathway $\beta$ 1-AR/Adenilato ciclasi/PKA e PDE3 nel meccanismo d'azione della serpinina

I preparati cardiaci di ratto sono stati perfusi con soluzione fisiologica contenente Nebivololo, un antagonista dei recettori  $\beta$ 1 (Gao and Vanhoutte, 2011), oppure l'antagonista più selettivo CGP20712A (Gonzalez-Munoz et al., 2011), in presenza di serpinina (Fig. 3.21), o di pGlu-serpinina (Fig. 3.22). Entrambi gli inibitori (100nM) hanno annullato gli effetti positivi indotti da serpinina (Fig. 3.21) e da pGlu-serpinina (Fig.3.22). Abbiamo utilizzato l'inibitore MDL123330A, specifico per AC (De Arcangelis et al., 2010), per verificare il coinvolgimento della AC nel meccanismo d'azione dei due peptidi. I cuori di ratto sono stati perfusi con serpinina e pGlu-serpinina più MDL123330 alla concentrazione di 100nM. In presenza di MDL12330A gli effetti positivi di serpinina e pGlu-serpinina sono stati aboliti (Fig. 3.21, Fig. 3.22).

Il coinvolgimento della PKA e della PDE3 nell'attività cardioaca delle serpinine, è stato valutato perfondendo i cuori con KT5720 (100nM) inibitore della PKA, oppure Milrinone (0.1 $\mu$ M) inibitore della PDE3, più di serpinina o pGlu-serpinina. In presenza di KT5720 gli effetti positivi indotti dalle serpinine sono stati annullati mentre il Milrinone non ha modificato significativamente tali effetti (Fig. 3.21, Fig. 3.22).



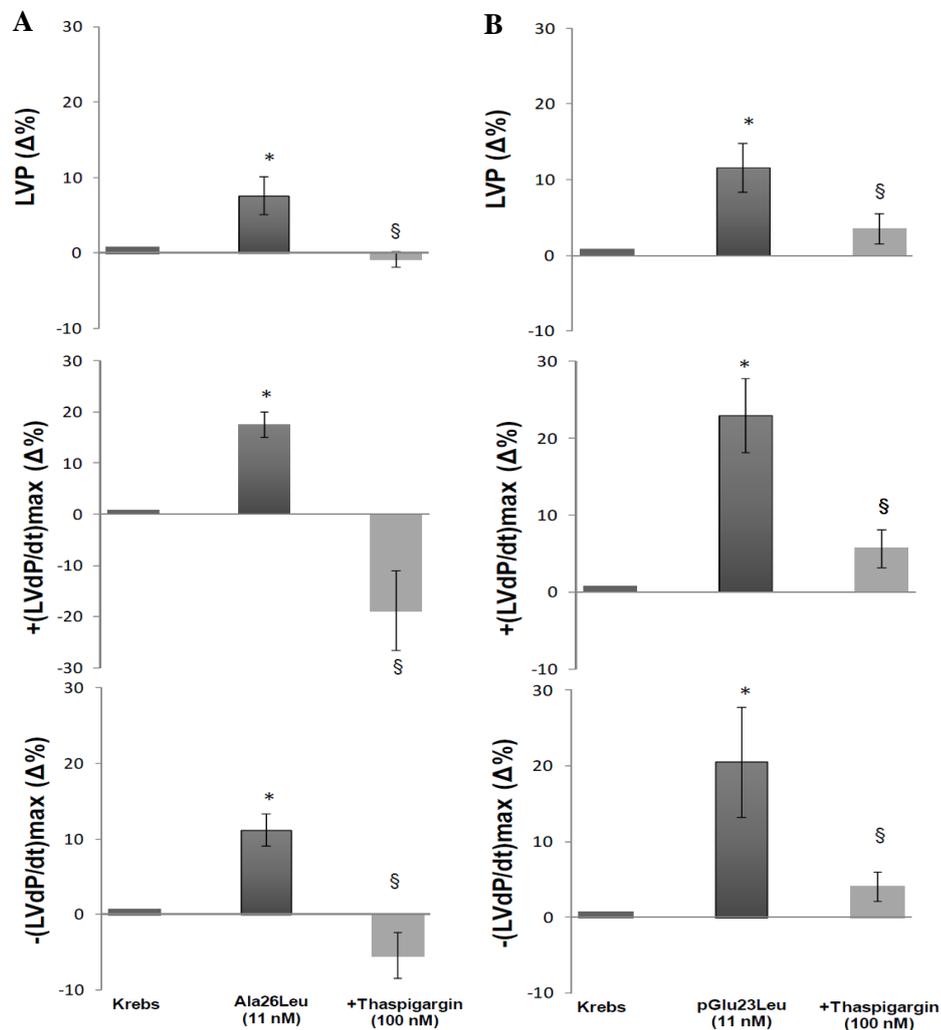
**Fig. 3.21:** effetti della serpinina (Ala26Leu) (11nM), da sola in presenza di Nebivololo (100nM), CGP20712A (100nM), MDL12330A (100nM), KT5720 (100nM), Mirlinone (0.1μM), sui parametri cardiaci LVP, +(LVdP/dt)max e -(LVdP/dt)max. Le significatività sono state assegnate mediante test ANOVA ad una via (\*= p<0.05), seguito dal post-hoc-test di Bonferroni (n=6).



**Fig: 3.22:** effetti della serpinina (pGlu23Leu) (11nM), da sola in presenza di Nebivololo (100nM), CGP20712A (100nM), MDL12330A (100nM), KT5720 (100nM), Mirlinone (0.1μM), sui parametri cardiaci LVP, +(LVdP/dt)max e -(LVdP/dt)max. Le significatività sono state assegnate mediante test ANOVA ad una via (\*= p<0.05), seguito dal post-hoc-test di Bonferroni (n=6).

### 3.11 Coinvolgimento del calcio intracellulare

Per determinare il ruolo del calcio intracellulare nella risposta cardiaca indotta dalle serpinine, i preparati cardiaci sono stati perfusi con Tapsigargina (100nM), un inibitore della pompa SERCA2a. L'inotropismo e il lusitropismo positivi indotti da serpinina (Fig. 3.23 A) e da pGlu-serpinina (Fig. 3.23 B), sono stati annullati in presenza dell'inibitore.



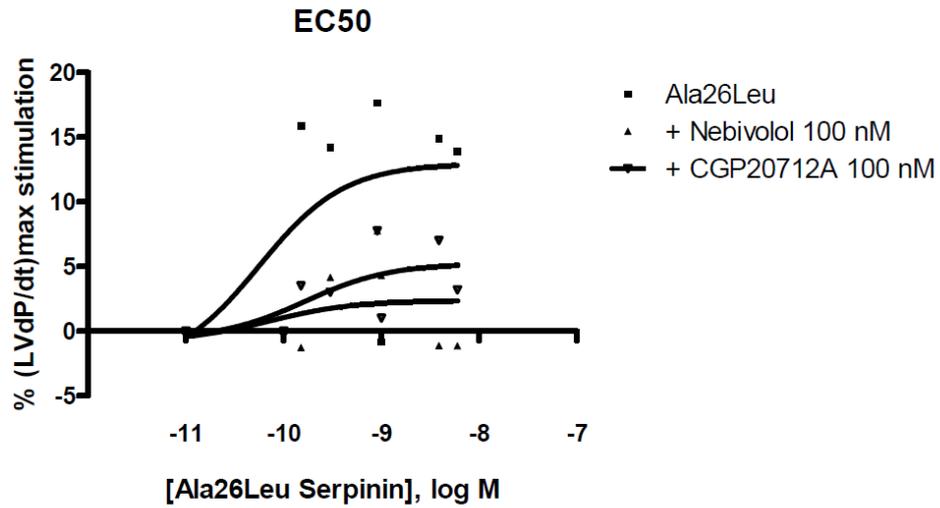
**Fig. 3.23:** effetti della serpinina (A) e della pGlu-serpinina (B) (11nM) da sola e in presenza di Tapsigargina sui parametri cardiaci LVP, +(LVdP/dt)max e -(LVdP/dt)max. Le significatività sono state assegnate mediante test ANOVA ad una via (\*= p<0.05), seguito dal post-hoc-test di Bonferroni (n=6).

### 3.12 Interazione della serpinina e della pGlu-serpinina con i recettori $\beta$ 1 adrenergici

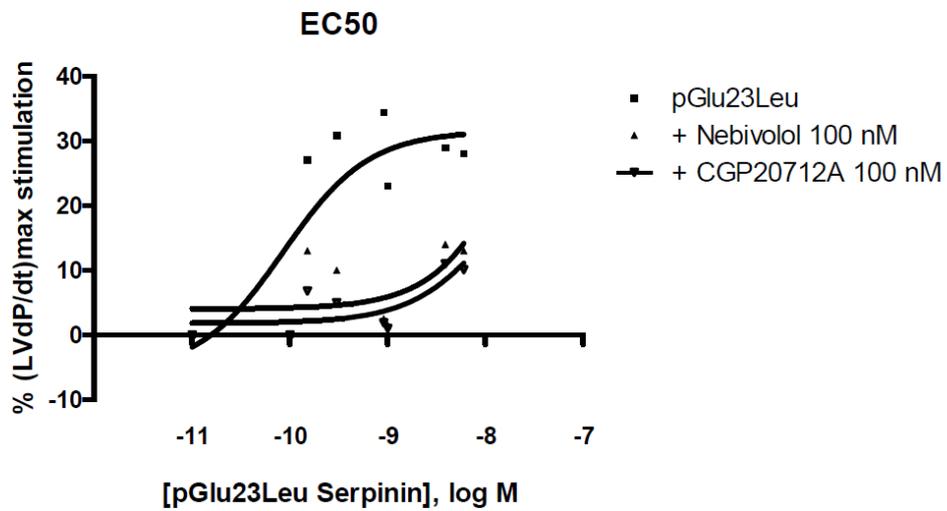
Per meglio comprendere l'interazione delle serpinine con i recettori  $\beta$ 1 adrenergici, i cuori sono stati perfusi con soluzione fisiologica contenente concentrazioni crescenti di serpinina (Fig. 3.24 A) o pGlu-serpinina (Fig. 3.24 B) (concentrazioni da 1 a 165nM), sia da sole che in presenza di una singola dose di inibitore (100nM), nello specifico Nebivololo o CGP20712A. La stimolazione con serpinina ha indotto un aumento significativo di LVP. L'analisi delle variazioni di LVP ha prodotto dei valori di EC50 in presenza sia delle concentrazioni crescenti di serpinina o pGlu-serpinina da sole, sia in combinazione con gli inibitori Nebivololo e CGP20712A.

I valori di EC50 (espressi come log M) ottenuti rispettivamente per serpinina da sola o pGlu-serpinina da sola sono stati  $-10.25 \pm 1.2$  ( $r^2=0.30$ ) e  $-10.07 \pm 0.5$  ( $r^2=0.67$ ), mentre quelli relativi a serpinina più Nebivololo/CGP20712A sono stati  $-10.35 \pm 2.58$  ( $r^2=0.07$ ) e  $-9.77 \pm 0.85$  ( $r^2=0.41$ ), infine quelli relativi a pGlu-serpinina più Nebivololo/CGP20712A sono stati  $-8.2 \pm 1.9$  ( $r^2=0.43$ ) e  $-7.08 \pm 2.52$  ( $r^2=0.60$ ) (fig. 3.2.9 A-B). Questi dati indicano un antagonismo di tipo non competitivo da parte dei due inibitori nei confronti di serpinina e pGlu-serpinina.

A)



B)

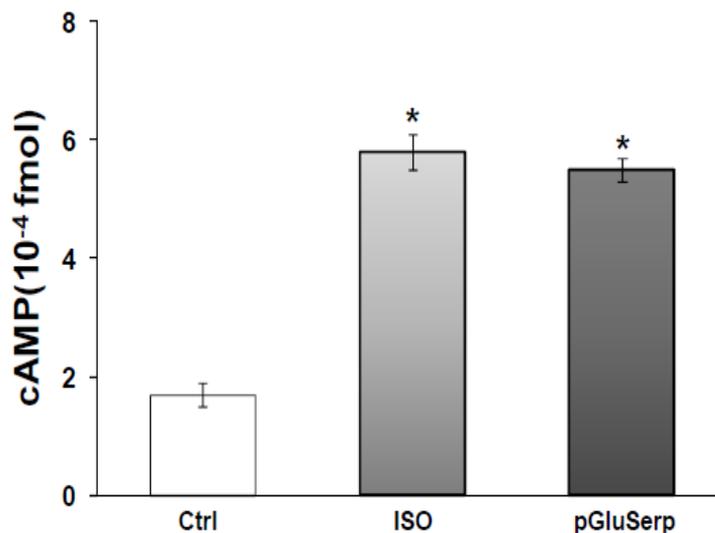


**Fig. 3.24:** curve dose-risposta relative alla stimolazione dell'LVP indotta da serpinina (Ala26Leu) da sola e in presenza di Nebivololo o CGP20712A (A), e pGlu-serpinina da sola e in presenza di Nebivololo o CGP20712A (B). Le curve sono state calcolate mediante GraphPad Prism 4.02. Per ogni curva è stato calcolato il log della concentrazione che induceva il 50% dell'effetto (EC50) di serpinina e pGlu-serpinina.

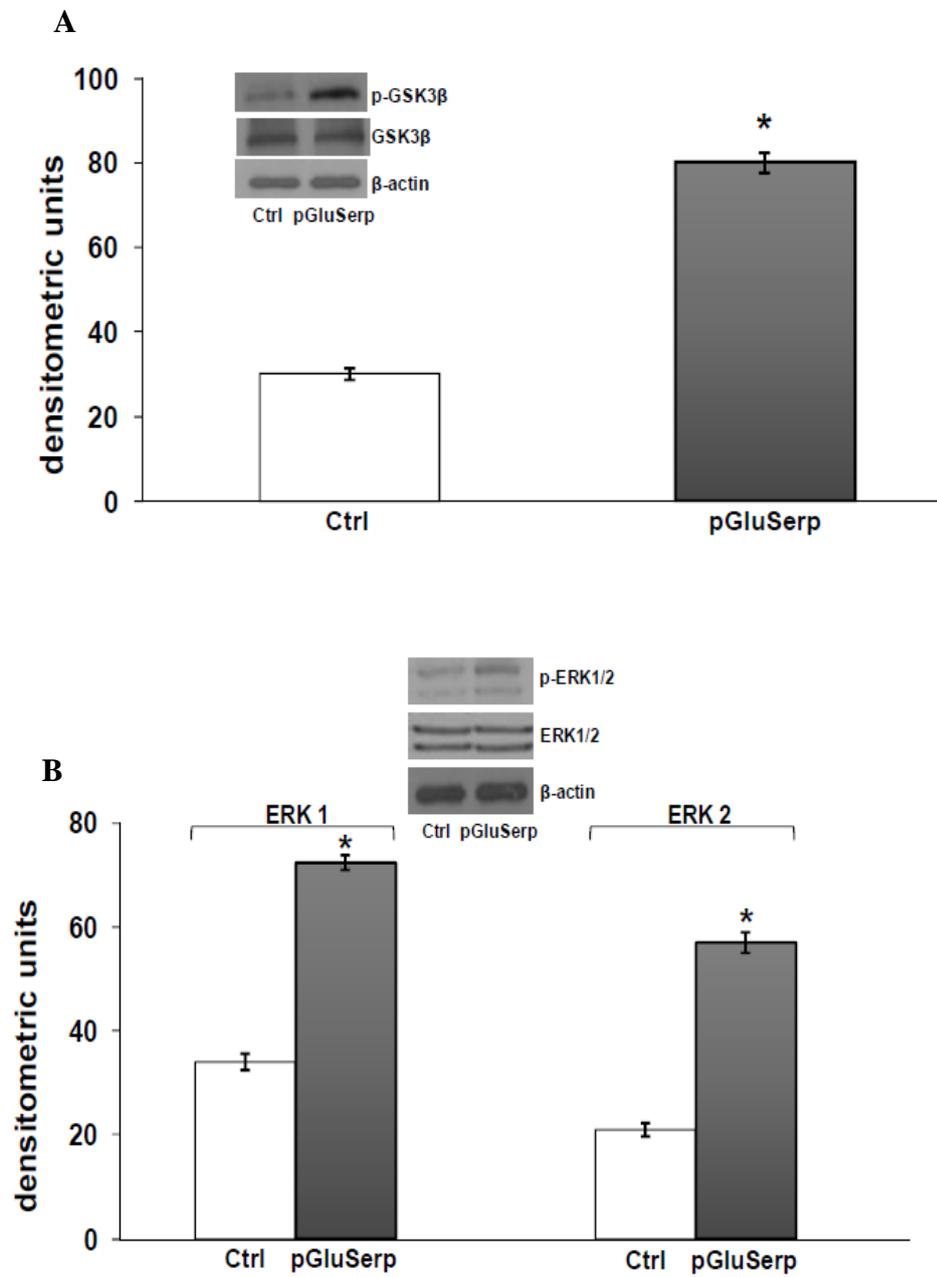
### 3.13 Effetti delle serpinine sulla fosforilazione di ERK1/2, GSK3 $\beta$ , PLNser16 e PLNthr17 e sui livelli intracellulari di cAMP

Abbiamo misurato i livelli di cAMP nei campioni di cuori di ratto. Nei cuori trattati con pGlu-serpinina alla concentrazione di 33nM, si è osservato un aumento significativo dei livelli di cAMP, coerentemente con l'effetto positivo sull'inotropismo indotto dal peptide. L'effetto sui livelli di cAMP indotto dalla pGlu-serpinina, era simile a quello indotto dalla stimolazione con ISO (Fig. 3.25).

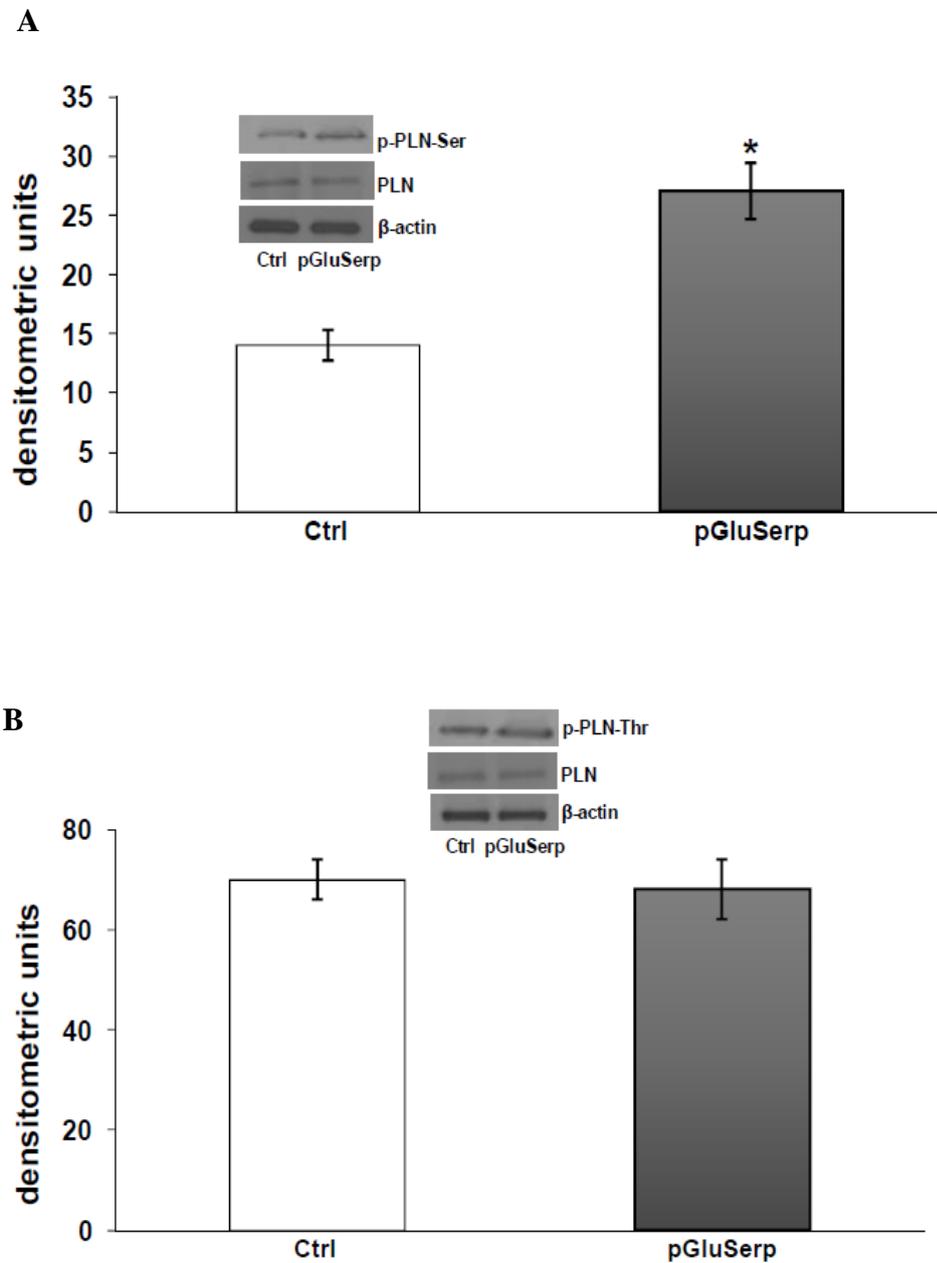
È risaputo che l'inotropismo e il lusitropismo positivi sono associati alla fosforilazione di alcune proteine intracellulari quali ERK1/2, GSK3 $\beta$ , PLNser16 o PLNthr17 (Gonzalez-Munoz et al., 2011). Per valutare il contributo di queste proteine negli effetti cardiaci indotti da pGlu-serpinina, sono stati effettuati dei western-blotts. Nei campioni trattati con il peptide, abbiamo osservato un significativo aumento della fosforilazione di GSK3 $\beta$ , ERK1/2 e PLNser 16 ma non PLNthr17 (Fig. 3.26 A-B; Fig. 3.2.7 A-B).



**Fig. 3.25:** concentrazioni di cAMP negli estratti di cuore di ratto. Le variazioni percentuali sono state valutate come media $\pm$ SE su 4 esperimenti, \*= p<0.05, \*\*= p<0.01 vs controllo



**Fig. 3.26:** fosforilazioni di GSK3 $\beta$  (A) e ERK1/2 (B) negli estratti cardiaci trattati con singola dose (11nM) di pGlu-serpinina. Le variazioni percentuali sono state valutate come media $\pm$ SE su 4 esperimenti, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  vs controllo.



**Fig. 3.27:** fosforilazioni di PLNser16 (A) e PLNthr17 (B) negli estratti cardiaci trattati con singola dose (11nM) di pGlu-serpinina. Le variazioni percentuali sono state valutate come  $media \pm SEM$  su 4 esperimenti, \*=  $p < 0.05$ , \*\*=  $p < 0.01$  vs controllo.

### 3.14 Effetti della CST sui livelli plasmatici di lipidi e leptina nei topi Chga-KO

La concentrazione plasmatica della CST nei topi wild type (WT) nutriti con una dieta normale è risultata essere di 3.8 ng/ml (Fig. 3.28). La somministrazione di CST (iniezioni intraperitoneali (i.p.) di 5µg/g di peso corporeo, al giorno per 12 giorni), ha aumentato la concentrazione plasmatica di CST a 7.0 ng/ml nei topi WT, mantenendo questo livello per almeno 4 ore (dati non mostrati). Nei topi nutriti con una dieta al 60% di grassi (high fat diet, HFD, per 16 settimane), i livelli plasmatici di CST erano più bassi rispetto ai WT (2.8 ng/ml). Dopo trattamento con CST ( i.p., 5µg/g di peso corporeo, al giorno per 12 giorni) la concentrazione è aumentata fino al valore di 5.8 ng/ml nei WT, mentre nei topi Chga-KO la concentrazione plasmatica non superava i 2.3 ng/ml.

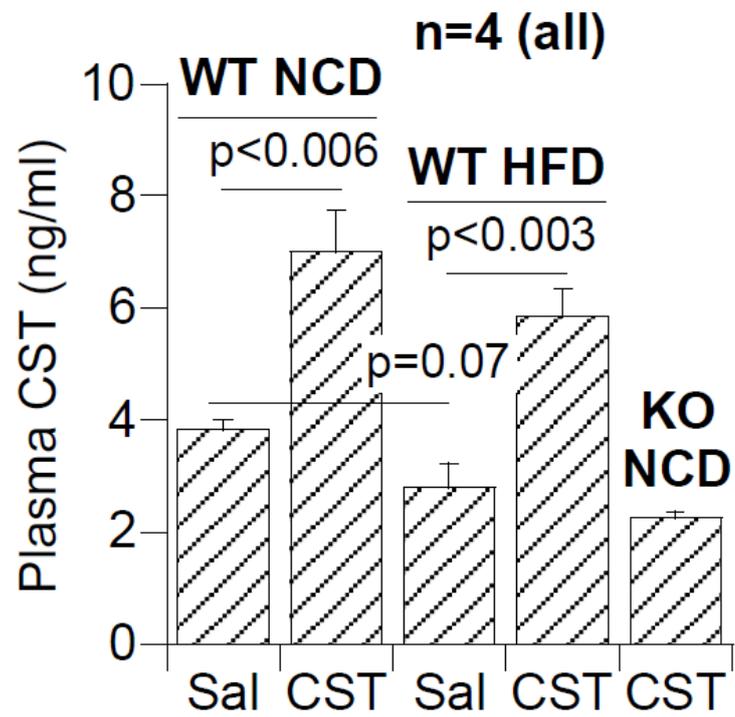
Il trattamento cronico con CST ha ridotto le dimensioni del tessuto adiposo epididimale nei Chga-KO fino ai livelli fisiologici (riduzione del 25% della massa grassa rispetto al peso corporeo), senza tuttavia alterare il peso corporeo né il peso del fegato dell'animale (Fig. 3.29 A e B).

I livelli plasmatici di trigliceridi (TG) nei topi Chga-KO sono stati abbassati in seguito a trattamento cronico con CST (Fig. 3.30 A). Questa diminuzione dei TG plasmatici può essere dovuta in parte ad un aumento della lipolisi, come confermato dai livelli elevati di glicerolo e di acidi grassi non-esterificati (NEFA) nel plasma (Fig. 3.30 B e Fig. 3.31 A).

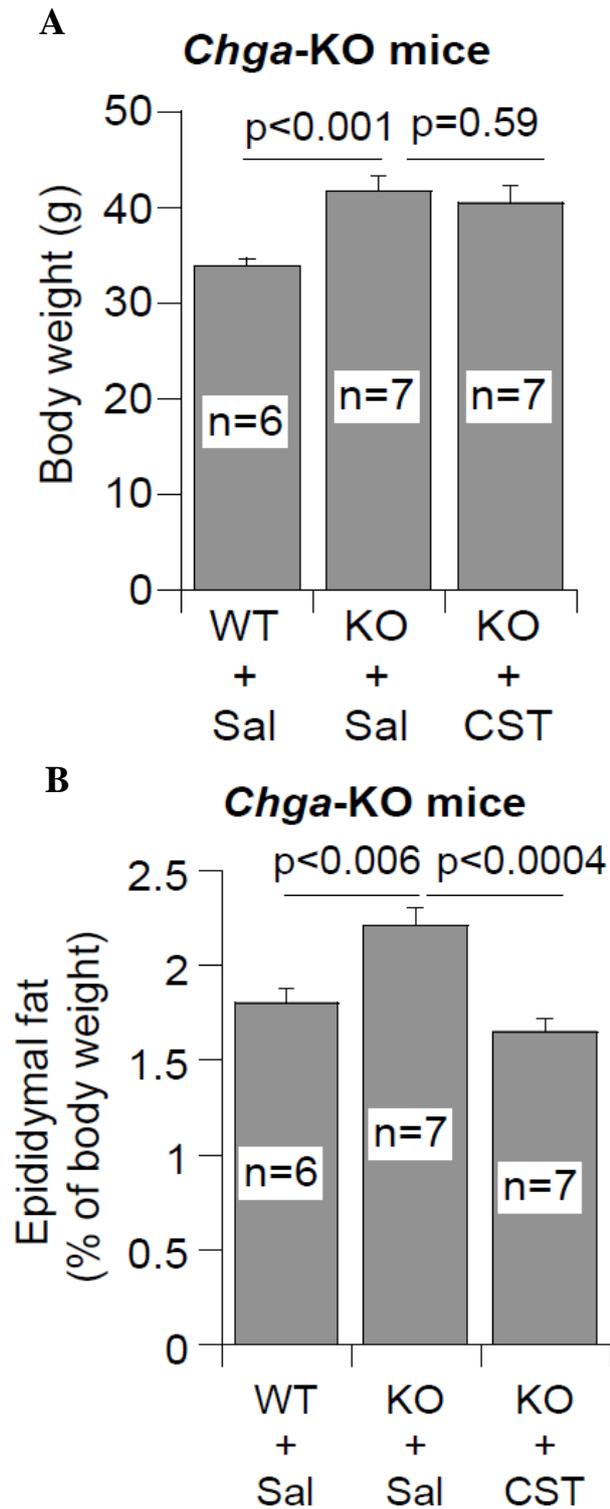
Abbiamo riscontrato che i livelli plasmatici di leptina dei topi Chga-KO sono più alti rispetto ai WT (Fig. 3.31 B), in accordo con l'assenza, in questi topi, del frammento CgA-derivato PST (Gayen et al., 2009b).

Il trattamento con CST ha indotto un abbassamento dei livelli plasmatici di leptina nei topi Chga-KO, addirittura al disotto di quelli misurati nei topi WT (Fig. 3.31 B), suggerendo che la leptina agisce anche a livelli sub-fisiologici nei topi Chga-KO. La CST ha inibito anche la produzione di leptina nelle colture di adipociti 3T3-L1 (Fig. 3.32), probabilmente agendo direttamente sulla secrezione della leptina indipendentemente da altri fattori. Benchè sia risaputo che la leptina incrementa l'ossidazione degli acidi grassi e diminuisce l'assunzione di cibo (Seeley et al., 1996; Minokoshi et al., 2002), l'iperleptinemia prolungata potrebbe desensitizzare il suo recettore e portare all'obesità come osservato nei topi DIO (diet induced obesity) (Wang et al., 2005; Knight et al., 2010). Dai dati ottenuti abbiamo ipotizzato che la CST è in grado di ristabilire l'azione della leptina nei topi Chga-KO invertendo la desensitizzazione dei recettori causata dall'iperleptinemia.

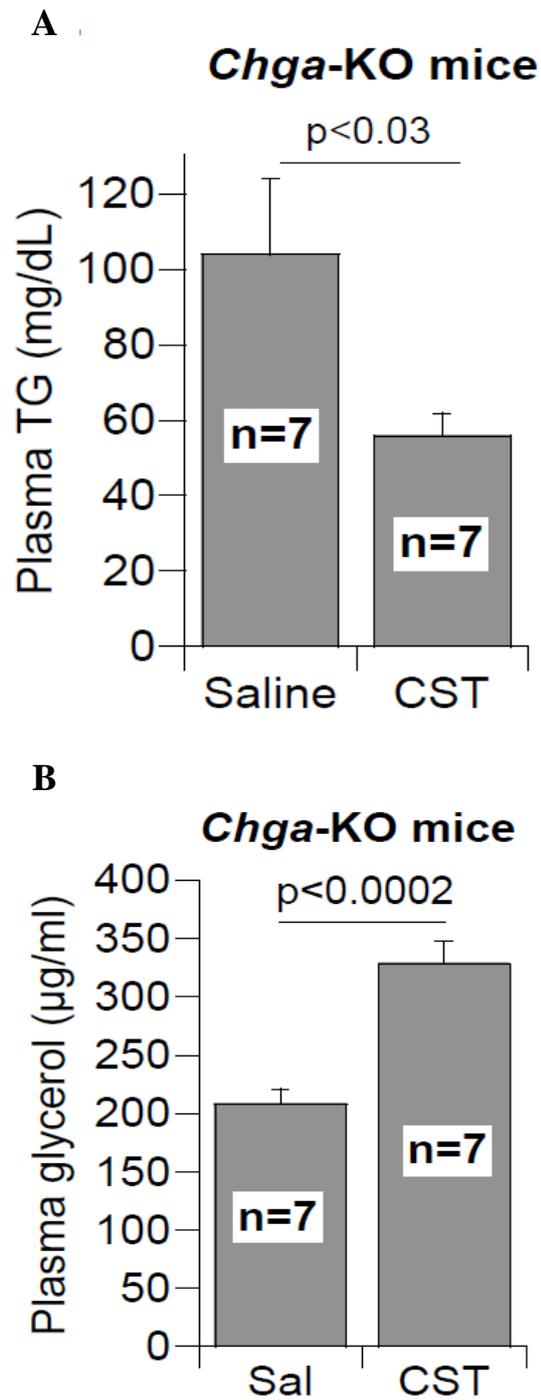
Nonostante l'abbassamento dei livelli plasmatici di leptina, non vi è stato un aumento dell'assunzione di cibo nei topi Chga-KO (dati non pubblicati), suggerendo che la CST mantiene funzionante il meccanismo d'azione della leptina nel cervello.



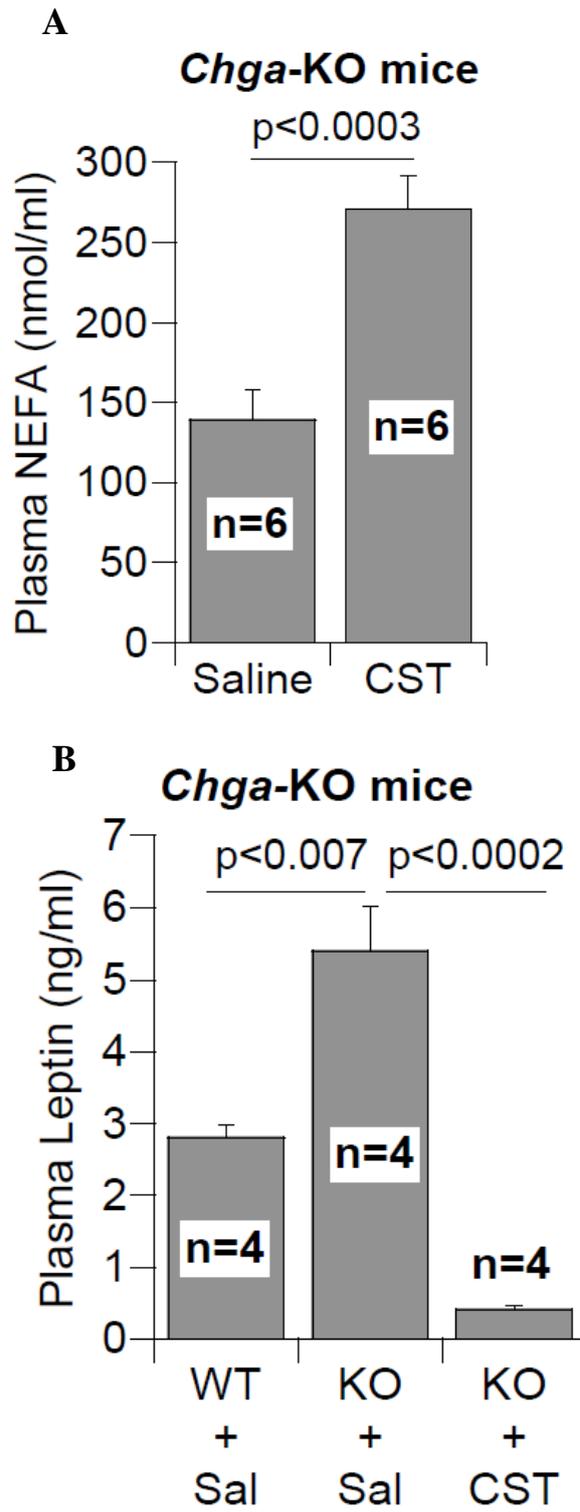
**Fig. 3.28:** concentrazione plasmatica di CST in topi WT (28 settimane) a dieta normale (NCD) o al 60% di grassi (HFD), e in topi Chga-KO (28 settimane) a dieta NCD trattati con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5 $\mu$ g/g peso corporeo/giorno).



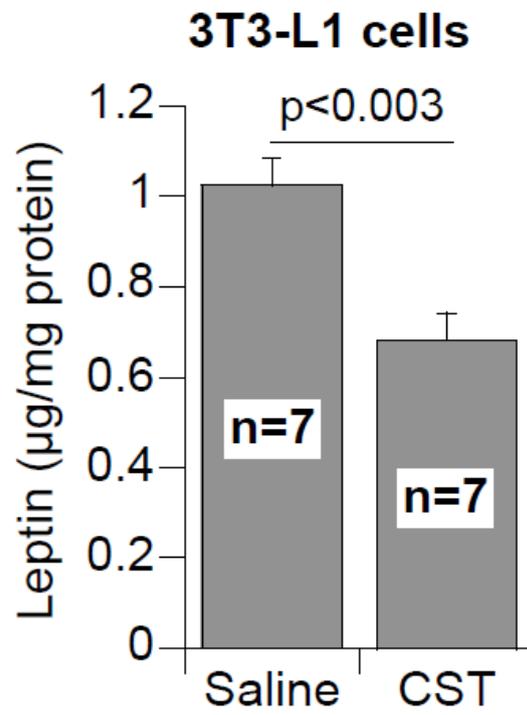
**Fig. 3.29:** variazioni del peso corporeo (A), e delle dimensioni del tessuto adiposo (B) nei topi WT e Chga-KO trattati con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5 $\mu$ g/g peso corporeo/giorno).



**Fig. 3.30:** concentrazione plasmatica di trigliceridi (TG) (A), e glicerolo (B) nei topi WT e Chga-KO trattati con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5µg/g peso corporeo/giorno).



**Fig. 3.31:** concentrazione plasmatica di NEFA (A) e di leptina (B) nei topi WT e Chga-KO trattati con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5µg/g peso corporeo/giorno).



**Fig. 3.32:** concentrazione di leptina nel mezzo di colture di adipociti 3T3-L1 in campioni trattati con CST o soluzione salina.

### 3.15 Effetti della CST sulla lipogenesi, sull'ossidazione degli acidi grassi e sull'espressione genica nei topi Chga-KO

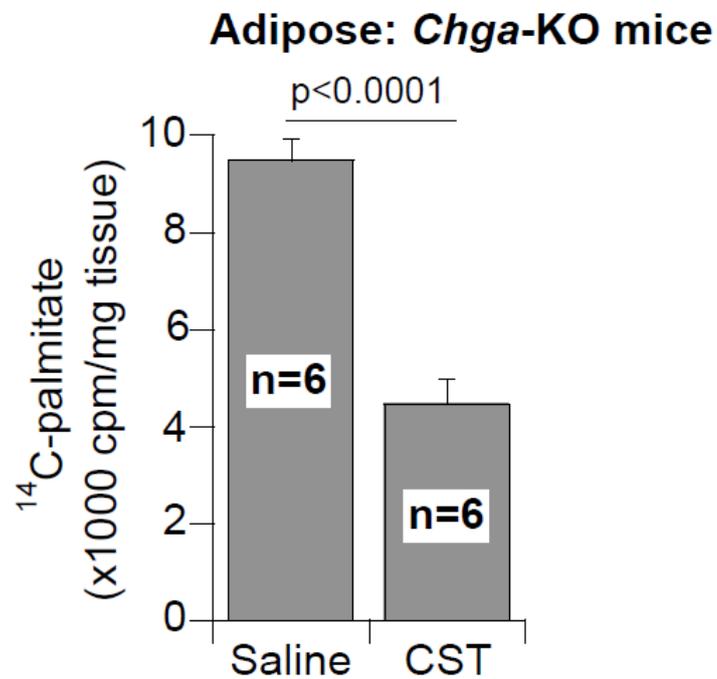
Analizzando la quantità di palmitato marcato con C<sup>14</sup> nei lipidi, è emerso che nei topi Chga-KO la CST ha effetti tessuto specifici. L'inserimento del palmitato-C<sup>14</sup> nei lipidi è risultato diminuito nel tessuto adiposo ma aumentato nel tessuto epatico dopo trattamento con CST (Fig. 3.33; Fig. 3.34 A) In contrasto, La CST ha stimolato l'ossidazione del palmitato in metaboliti acidi solubili (ASM) sia nel tessuto adiposo che epatico (Fig. 3.34 B; Fig. 3.35 A). L'effetto della CST sull'ossidazione del palmitato-C<sup>14</sup> in colture di epatociti HepG2 e adipociti 3T3-L1, è stato valutato misurando la formazione di <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (Fig. 3.35 B).

Sulla base dei dati ottenuti abbiamo concluso che la CST inibisce l'espansione del tessuto adiposo e promuove l'assorbimento di acidi grassi a livello epatico dove ne incrementa l'ossidazione.

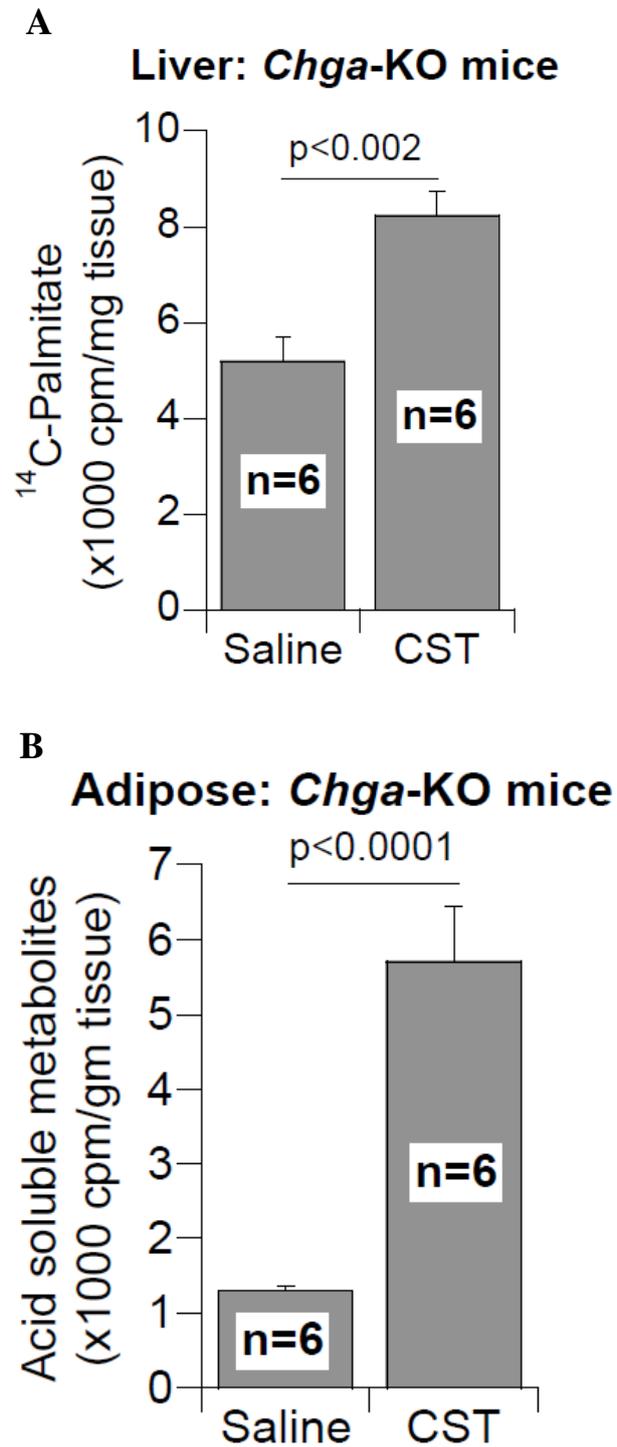
L'analisi dell'mRNA a livello epatico ha rivelato che la CST induce un aumento dell'espressione di *carnitina-palmitoiltransferasi 1α* (Cpt1α), il *peroxisome proliferator-activated receptor-α* (Ppara), la *acil-CoA ossidasi 1* (Acox1), e la *proteina disaccoppiante 2* (Ucp2), tutti geni coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi (Fig. 3.36 A-B; Fig. 3.37 A-B).

In contrasto la CST non ha indotto effetti significativi sull'espressione dei geni coinvolti nella lipogenesi come ad esempio *sterol regulatory element-binding protein 1* (Srebp-1) e Pparγ (Fig. 3.38). Tuttavia la CST ha stimolato l'espressione del gene per il fattore CD36 (*cluster of differentiation 36*), un trasportatore che media l'assorbimento cellulare degli acidi grassi a catena lunga, come anche il gene per la *glicerolo-3fosfato*

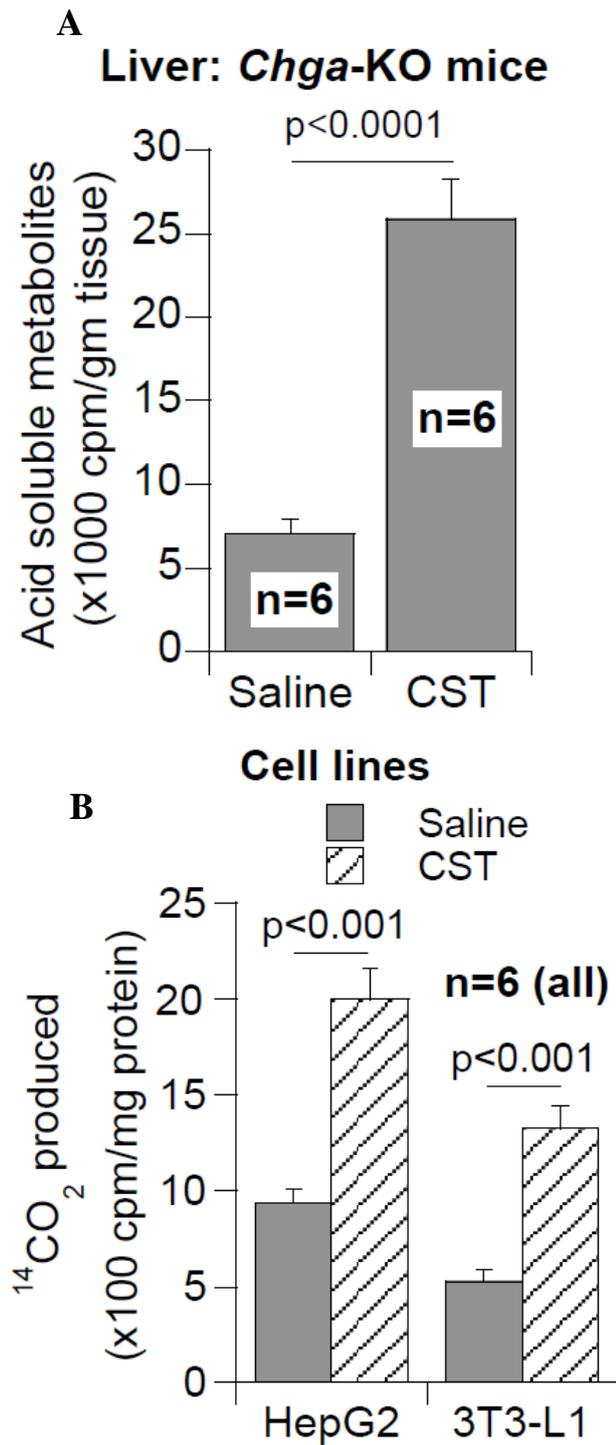
*aciltransferasi 4* (*Gpat4*) che è coinvolta della lipogenesi. Questo indica che la CST stimola l'incorporazione degli acidi grassi nei trigliceridi ma non stimola la lipogenesi *de novo*. In generale quindi, la CST sembra promuovere il flusso di lipidi dal tessuto adiposo verso il fegato dove ne incrementa il catabolismo



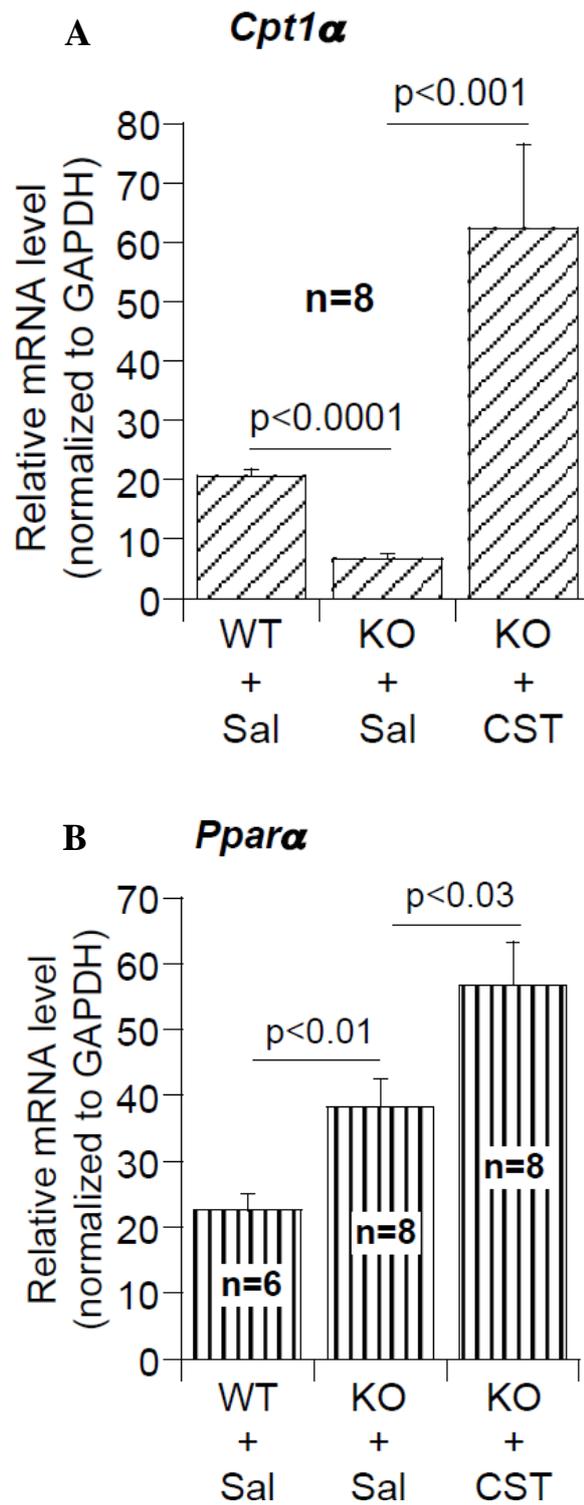
**Fig. 3.33:** concentrazione del palmitato C<sup>14</sup> nei lipidi del tessuto adiposo di topi *Chga*-KO dopo trattamento con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5µg/g peso corporeo/giorno).



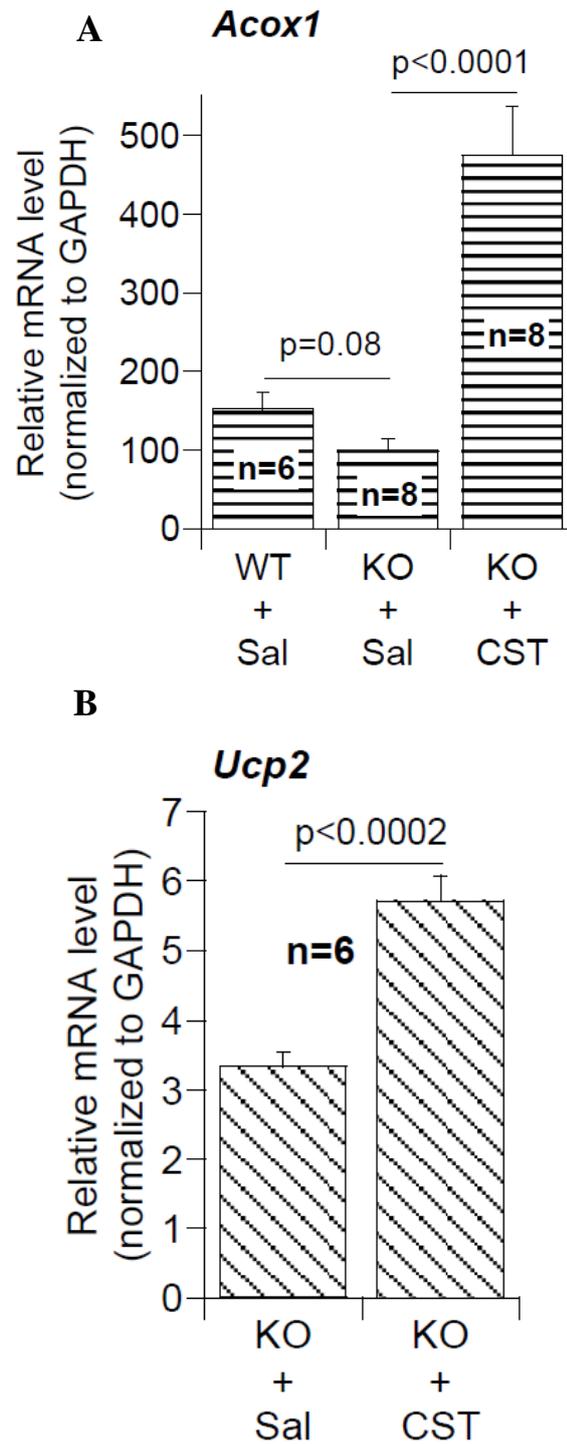
**Fig. 3.34:** concentrazione del palmitato  $\text{C}^{14}$  nei lipidi del tessuto epatico (A) e ossidazione parziale del palmitato in ASM nel tessuto adiposo (B) di topi *Chga*-KO dopo trattamento con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p.  $5\mu\text{g/g}$  peso corporeo/giorno).



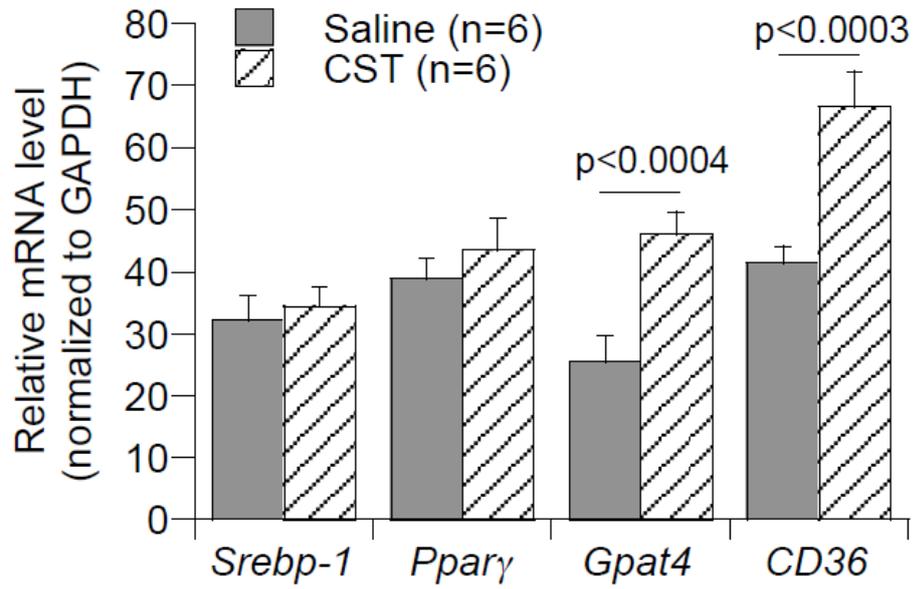
**Fig. 3.35:** ossidazione parziale del palmitato in ASM nel fegato (A) di topi Chga-KO trattati con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5 $\mu$ g/g peso corporeo/giorno); Ossidazione completa del palmitato in  $^{14}\text{CO}_2$  (B) in colture di epatociti (HepG2) e di adipociti (3T3-L1).



**Fig. 3.36:** livelli di espressione del gene *Cpt1  $\alpha$*  (A) e *Ppara $\alpha$*  (B) coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi nel fegato di topi WT e Chga-KO trattati con CST oppure soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5 $\mu$ g/g peso corporeo/giorno).



**Fig. 3.37:** livelli di espressione dei geni coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi *Acox-1*(A) e *Ucp2* (B), nel fegato di topi WT e Chga-KO trattati con CST o soluzione salina per 12 giorni (i.p. 5µg/g peso corporeo/giorno).



**Fig. 3.38:** livelli di espressione dei geni Srebp-1, Ppar $\gamma$ , Gpat4 e CD36 nel fegato di topi WT e Chga-KO trattati con CST per 12 giorni (i.p. 5 $\mu$ g/g peso corporeo/giorno).

### 3.16 Effetti della CST sulla lipolisi mediata dai recettori adrenergici(AR) negli adipociti

Abbiamo esaminato l'effetto diretto della CST in colture cellulari di adipociti 3T3-L1 e di cellule neuroendocrine PC-12. In entrambe le colture la produzione di cAMP risultava aumentata in presenza di ISO ma non in presenza di CST (Fig. 3.39), suggerendo che la CST non agisce attraverso la via di trasduzione dei recettori  $\beta$ -AR.

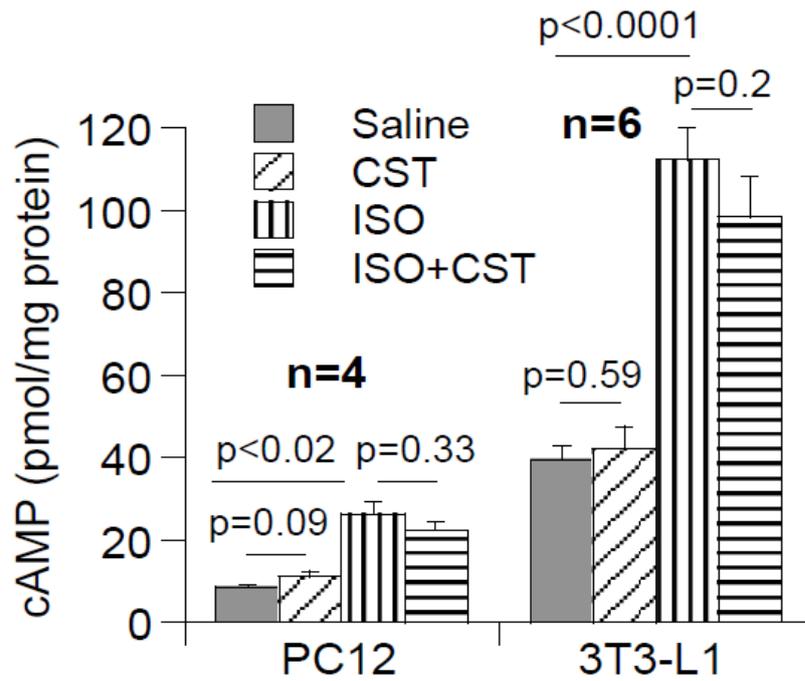
Tuttavia la CST ha attenuato l'attivazione della PLC indotta da fenilefrina (un agonista dei recettori  $\alpha$ -AR) e da epinefrina nelle cellule 3T3-L1 (Fig. 3.40). Dal momento che l'epinefrina stimola sia i recettori  $\alpha$ - che  $\beta$ -AR, l'inibizione del suo effetto sulla PLC da parte della CST potrebbe significare che quest'ultima inibisca selettivamente i recettori  $\alpha$ -AR.

Abbiamo osservato che la CST stessa stimola lievemente l'attività della PLC, questo può voler dire che la CST agisce in maniera  $\alpha$ -AR indipendente (Fig. 3.40). Come nei topi Chga-KO, anche nelle colture di cellule 3T3-L1 la CST ha inibito il rilascio di leptina (Fig. 3.40) mentre ha stimolato quello del glicerolo nelle colture primarie di adipociti (Fig. 3.41).

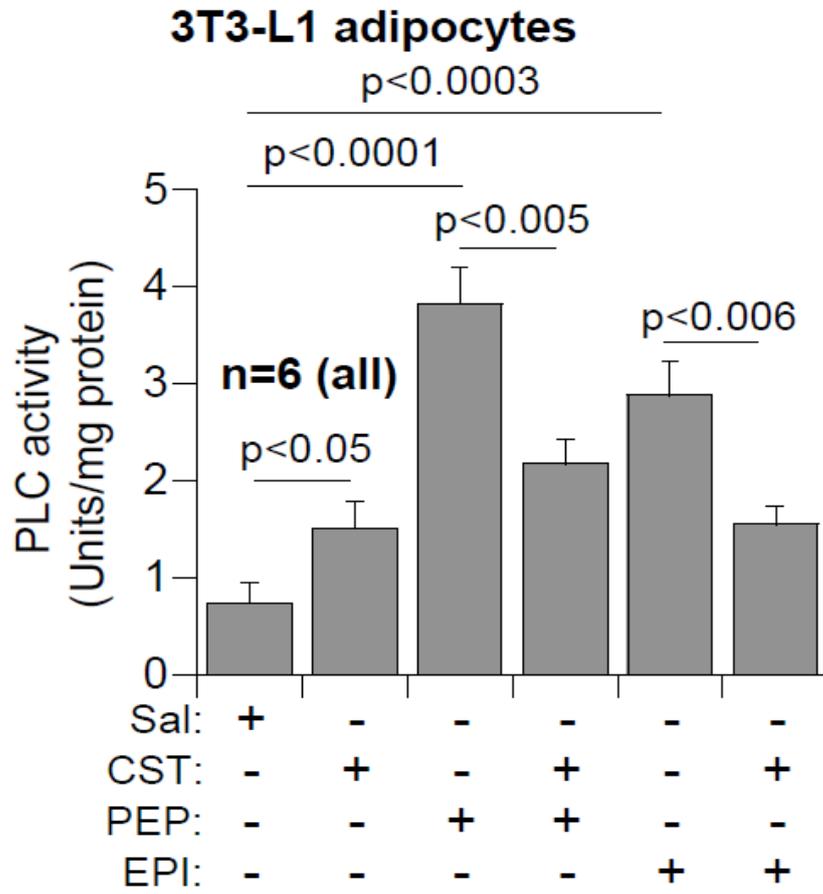
In accordo con i dati presenti in letteratura (Stich et al., 2003) , abbiamo osservato che negli adipociti l'antagonista  $\alpha$ -AR fentolamina, ha stimolato la lipolisi e potenziato gli effetti lipolitici dell'agonista  $\beta$ -AR ISO (Fig. 3.41). Viceversa l'agonista  $\alpha$ -AR fenilefrina ha diminuito fortemente l'effetto lipolitico dello ISO (Fig. 3.41).

Sia la CST che la fentolamina hanno potenziato gli effetti lipolitici dello ISO (Fig. 3.41). Questi dati suggeriscono che la CST agisce in maniera simile all'antagonista  $\alpha$ -AR fentolamina. Questo insieme alla capacità della CST di inibire l'azione della

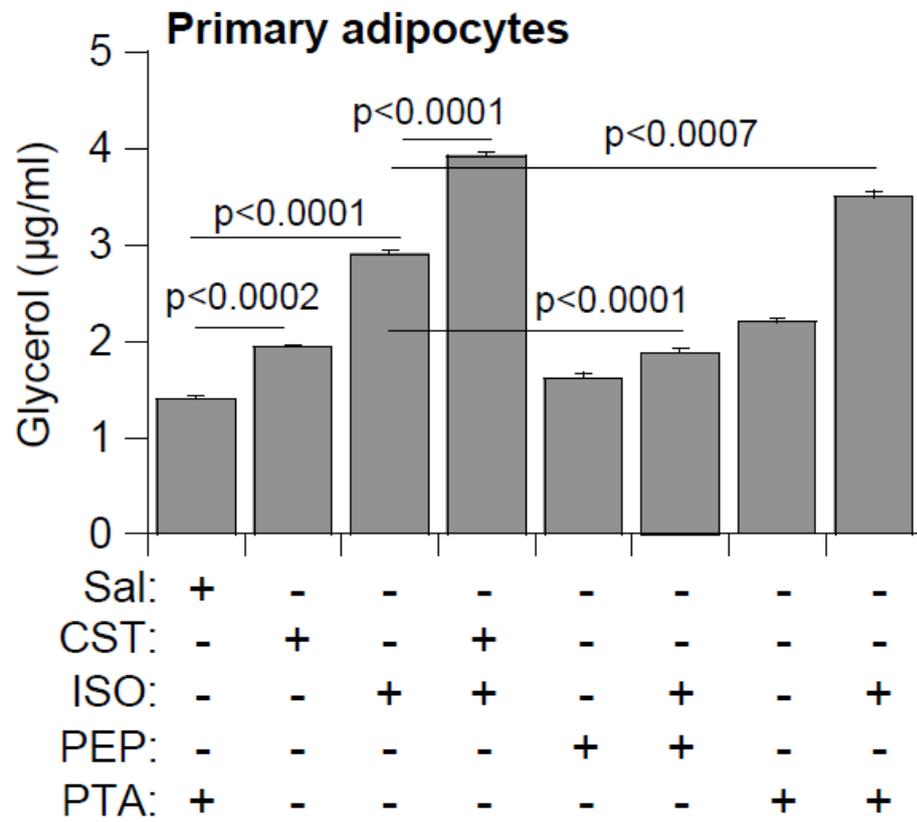
fenilefrina (Fig. 3.40), fa pensare che la CST agisce inibendo la via del segnale dei recettori  $\alpha$ -AR.



**Fig. 3.39:** effetto della CST (100nM, 10 min) sulla produzione di cAMP (A), in cellule PC-12 e 3T3-L1 pretrattate con soluzione salina o isoproterenolo (ISO) (10  $\mu$ M).



**Fig. 3.40:** effetti della CST sull'attività della PLC nelle cellule 3T3-L1 pretrattate con fenilefrina o epinefrina (10 $\mu$ M, 10 min).

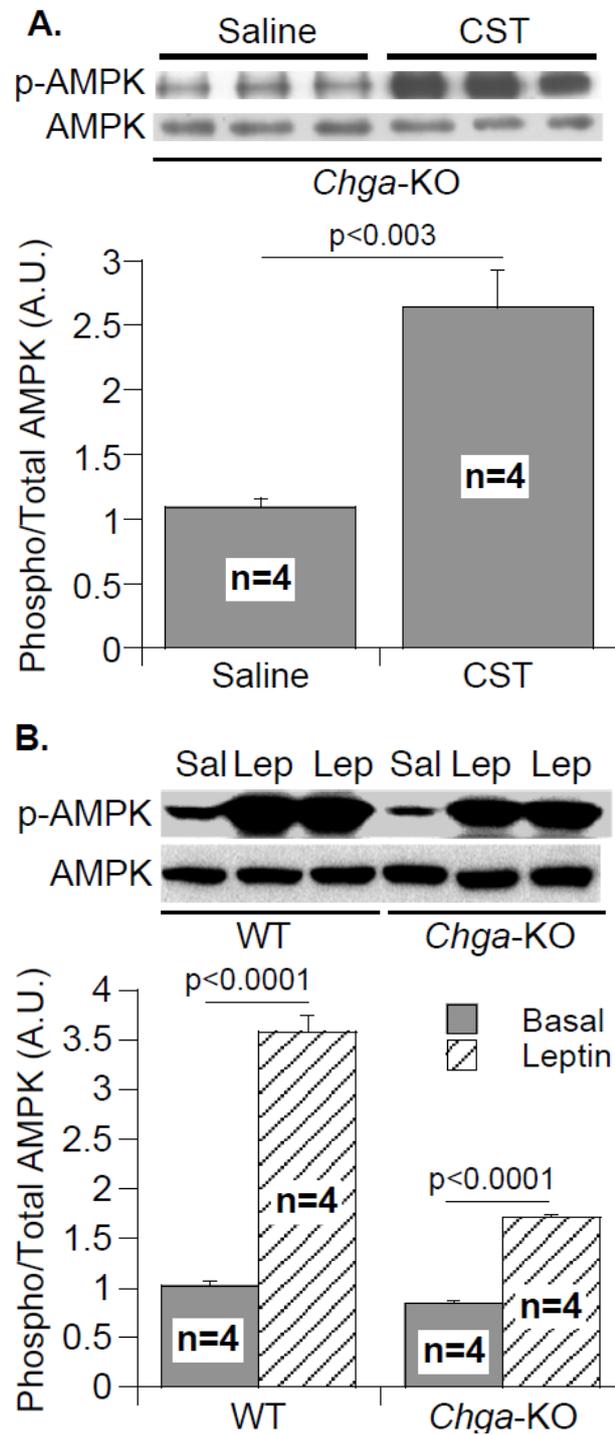


**Fig. 3.41:** effetti della CST sul rilascio di glicerolo da colture primarie di adipociti pretrattate con ISO, fenilefrina (PEP) e fentolamina (PTA) (10µM, 10min).

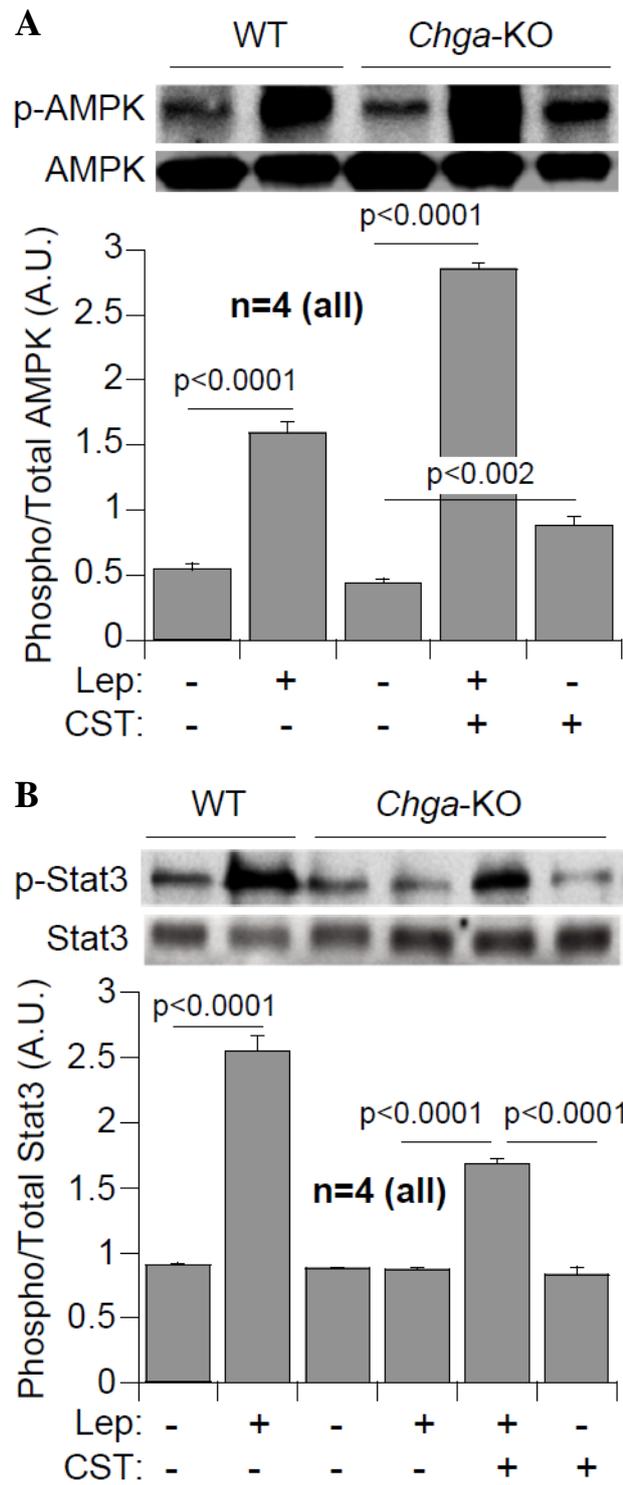
### 3.17 La CST ripristina gli effetti della leptina nei topi Chga-KO

La leptina agisce attraverso le fosforilazioni di AMPK e MAPK, attivando il fattore di trascrizione Stat3 (Vaisse et al., 1996; Kim et al., 2000; Morris and Rui, 2009). L'aumento cronico dei livelli plasmatici di leptina causa la desensitizzazione del suo recettore, ciò porta ad una riduzione della fosforilazione di Stat3 (Wang et al., 2005; Knight et al., 2010). Il trattamento acuto con CST su espianti di tessuto adiposo provenienti da topi Chga-KO, ha stimolato la fosforilazione di AMPK (Fig. 3.42 A) molto probabilmente in maniera leptina-indipendente in quanto lo stesso effetto è stato osservato nelle colture di epatociti.

Il signaling della leptina sembra essere stato down-regolato come evidenziato dalla ridotta fosforilazione di AMPK e Stat3, rispetto ai topi WT, anche dopo trattamento con leptina. (Fig. 3.42 B; Fig. 3.43 A) Il trattamento con CST ha ripristinato la capacità della leptina di stimolare la fosforilazione di AMPK (Fig. 3.43 A) e di Stat3 (Fig. 3.43 B), suggerendo che l'abbassamento dei livelli plasmatici di leptina indotto dalla CST nei topi Chga-KO, potrebbe aver ri-sensitizzato i recettori per la leptina.



**Fig. 3.42:** campioni *Chga-KO* trattati con CST (100nM 30 min) (A), e campioni WT e *Chga-KO* trattati con leptina (1 $\mu$ M 30 min) (B) sottoposti ad immunoblotting per pAMPK e AMPK.



**Fig. 3.43:** campioni di topi WT e Chga-KO trattati con leptina e CST e sottoposti ad immunoblotting per pAMPK e AMPK (A) e pStat3 e Stat3 (B).

### 3.18 Modulazione dell'azione periferica della leptina da parte della CST nei topi DIO e *ob/ob*

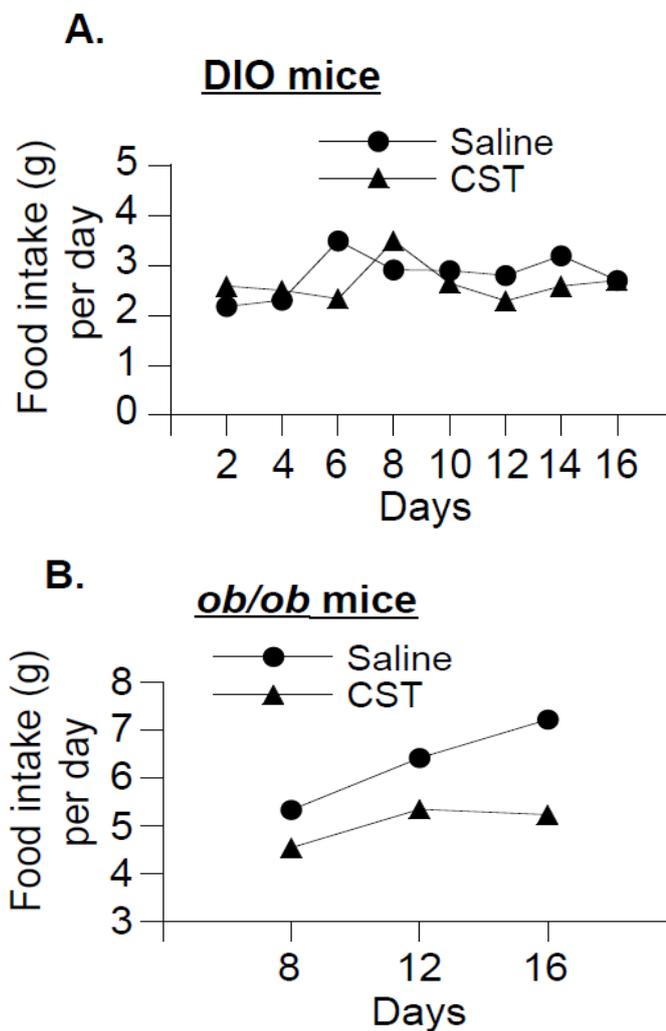
A differenza dei topi Chga-KO che sono insulino-sensibili, i topi DIO e *ob/ob* sono insulino-resistenti ed obesi. In particolare, i topi DIO mostrano leptino-resistenza periferica (Van Heek et al., 1997; El-Haschimi et al., 2000; Lin et al., 2000) mentre i topi *ob/ob* presentano dei recettori per la leptina funzionanti e sono molto sensibili alla leptina esogena (Pelleymounter et al., 1995; Fruhbeck et al., 1997, 1998; Koch et al., 2010). Dal momento che la nostra attenzione è stata rivolta agli effetti della CST sul metabolismo lipidico e sull'attività della leptina a livello del tessuto adiposo e non a livello dell'ipotalamo, abbiamo condotto degli esperimenti *ex vivo* su espianti di tessuto adiposo.

Il tessuto adiposo di questi due modelli sperimentali (DIO e *ob/ob*), offre l'opportunità di approfondire e meglio comprendere le osservazioni fatte sui topi Chga-KO.

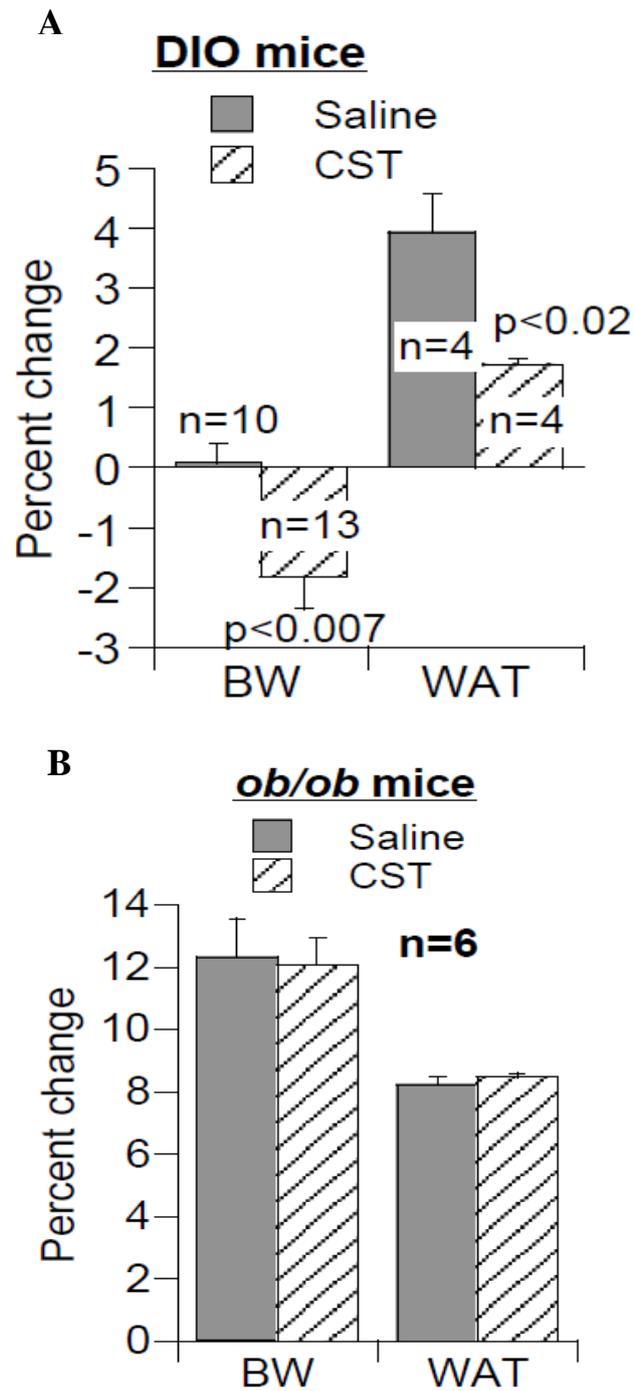
Dopo 16 giorni di trattamento cronico con CST (i.p., 5µg/g di peso corporeo, al giorno) nei topi DIO non sono state osservate variazioni nell'assunzione di cibo a differenza di quanto osservato nei topi *ob/ob* (Fig. 3.44 A-B). E' interessante notare che questa riduzione non è stata accompagnata da una perdita di peso corporeo o diminuzione della massa adiposa nei topi *ob/ob*, mentre nei topi DIO nonostante non vi siano state variazioni nell'assunzione di cibo, si è osservata una significativa riduzione del peso corporeo e della massa adiposa (Fig. 3.45 A-B).

Allo stesso modo la lipolisi, valutata in base ai livelli plasmatici di glicerolo e NEFA, non è risultata influenzata dalla CST nei topi *ob/ob* a differenza dei topi DIO (Fig. 3.46 A-B). Dai dati ottenuti emerge che in termini di assunzione di cibo durante il periodo di

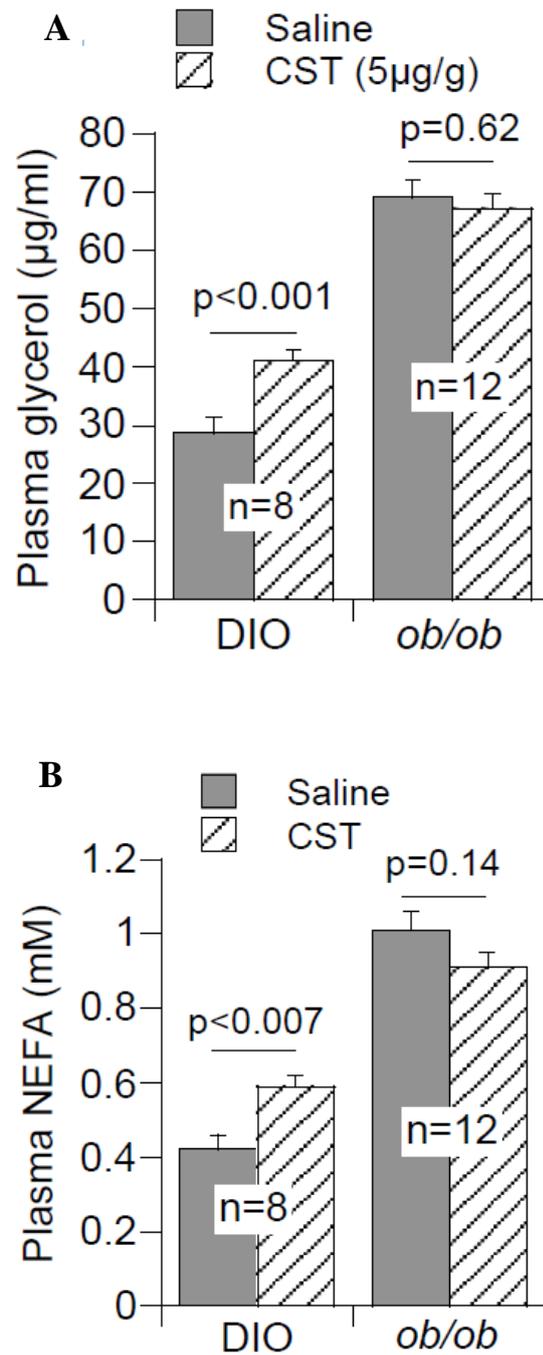
trattamento, la CST potrebbe aver prodotto un effetto a livello centrale nei topi leptino-sensibili (*ob/ob*), ma non in quelli leptino-resistenti (DIO). E' possibile che per poter osservare una riduzione di peso corporeo e di massa adiposa nei topi *ob/ob* sia necessario un trattamento con CST più lungo. Tuttavia l'aumento della lipolisi e la diminuzione della massa corporea e adiposa nei topi DIO, indica che c'è stato un effetto periferico molto significativo indotto dalla CST.



**Fig. 3.44:** i topi DIO e *ob/ob* sono stati trattati con CST (i.p. 5 $\mu$ g/g peso corporeo/giorno) per 16 giorni. Variazione dell'assunzione di cibo nei topi DIO (A) e *ob/ob* (B).



**Fig. 3.45:** sono state calcolate le variazioni percentuali del peso corporeo e della massa adiposa (white adipose tissue, WAT) alla fine del trattamento, nei topi DIO (A) e nei topi *ob/ob* (B).



**Fig. 3.46:** quantificazione dei livelli plasmatici di glicerolo (A), e NEFA (B) nei topi DIO e *ob/ob* al termine del trattamento con CST.

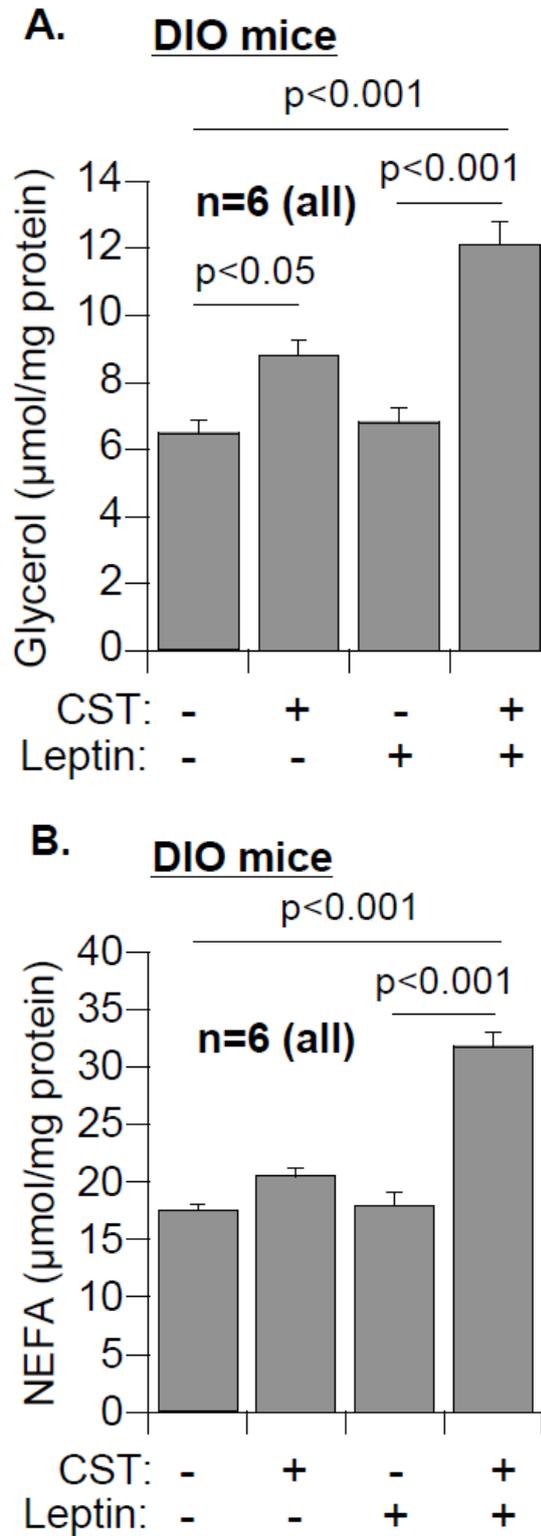
### 3.19 Effetti della CST e della leptina sul tessuto adiposo di topi DIO e *ob/ob*

Per esaminare gli effetti diretti della leptina sulla lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi nel tessuto adiposo, e per capire l'influenza della CST su queste, i topi DIO e *ob/ob* sono stati trattati con CST o soluzione salina ed esposto successivamente gli espianti di tessuto adiposo alla leptina per un tempo di 30 minuti per valutare le fosforilazioni di AMPK e Stat3, o di 3 ore per analizzare la lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi. Dopo l'incubazione con leptina, l'analisi per il glicerolo e per i NEFA rilasciati nel mezzo di coltura ha dimostrato che negli espianti provenienti da topi DIO trattati con CST e leptina, è stata indotta una risposta lipolitica che risultava aumentata dopo un ulteriore trattamento con leptina (Fig. 3.47 A). Lo stesso è stato osservato per la produzione dei NEFA (Fig. 3.47 B). Negli espianti di tessuto adiposo di topi trattati con soluzione salina, l'esposizione alla leptina non ha indotto nessun aumento della produzione di glicerolo e di NEFA (Fig. 3.47 A-B).

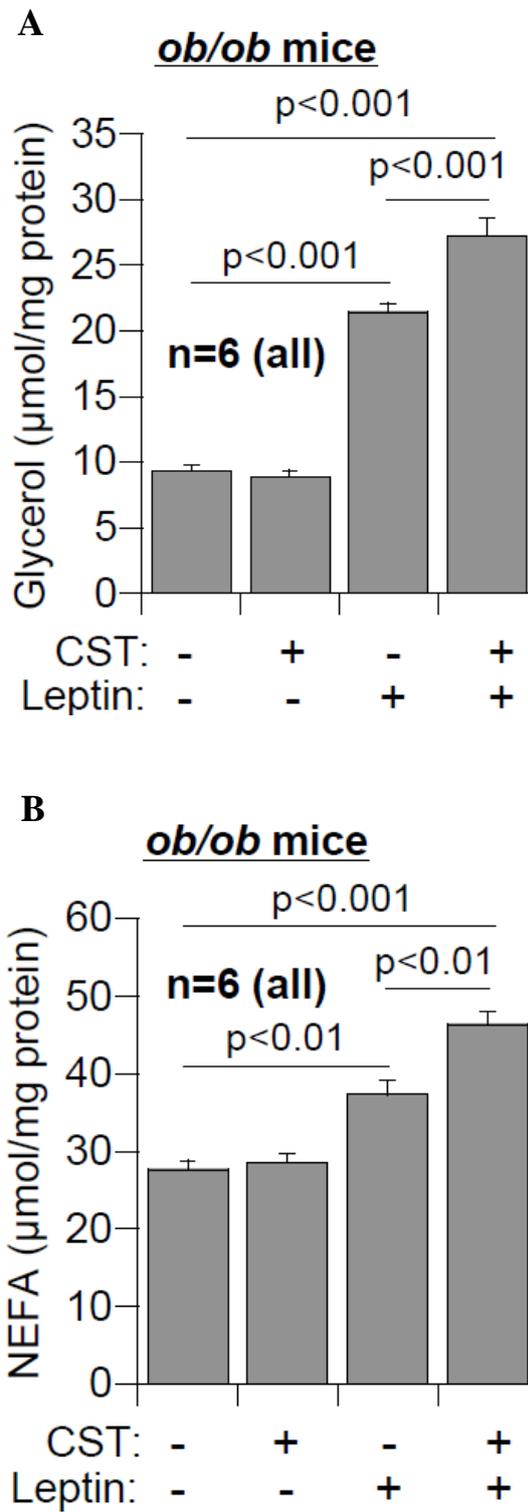
Queste osservazioni supportano l'ipotesi che il trattamento *in vivo* con CST ha ripristinato la sensibilità dei recettori per la leptina nel tessuto adiposo dei topi DIO. Il trattamento cronico con CST non ha influenzato significativamente la lipolisi negli espianti di tessuto adiposo dei topi *ob/ob*, mentre nei campioni trattati con soluzione salina l'esposizione alla leptina ha stimolato la lipolisi (Fig. 3.48 A-B), suggerendo che i) nel tessuto adiposo dei topi *ob/ob* sono presenti recettori funzionanti per la leptina, e ii) la CST non influenza direttamente il funzionamento dei recettori. Tuttavia l'aggiunta di leptina ai campioni trattati con CST ha prodotto un notevole aumento della lipolisi (Fig. 3.48 A-B).

Anche per quanto riguarda la regolazione dell'ossidazione del palmitato in risposta al trattamento con CST e leptina si è osservato lo stesso effetto. Più precisamente, sia la CST che la leptina somministrate da sole non sono state in grado di stimolare l'ossidazione negli espianti di tessuto adiposo provenienti dai topi DIO mentre se co-somministrate hanno avuto un effetto stimolante (Fig. 3.49 A). Nei topi *ob/ob* il trattamento con sola leptina è in grado di stimolare l'ossidazione che aumentava ancora di più in presenza di leptina e CST insieme (Fig. 3.49 B).

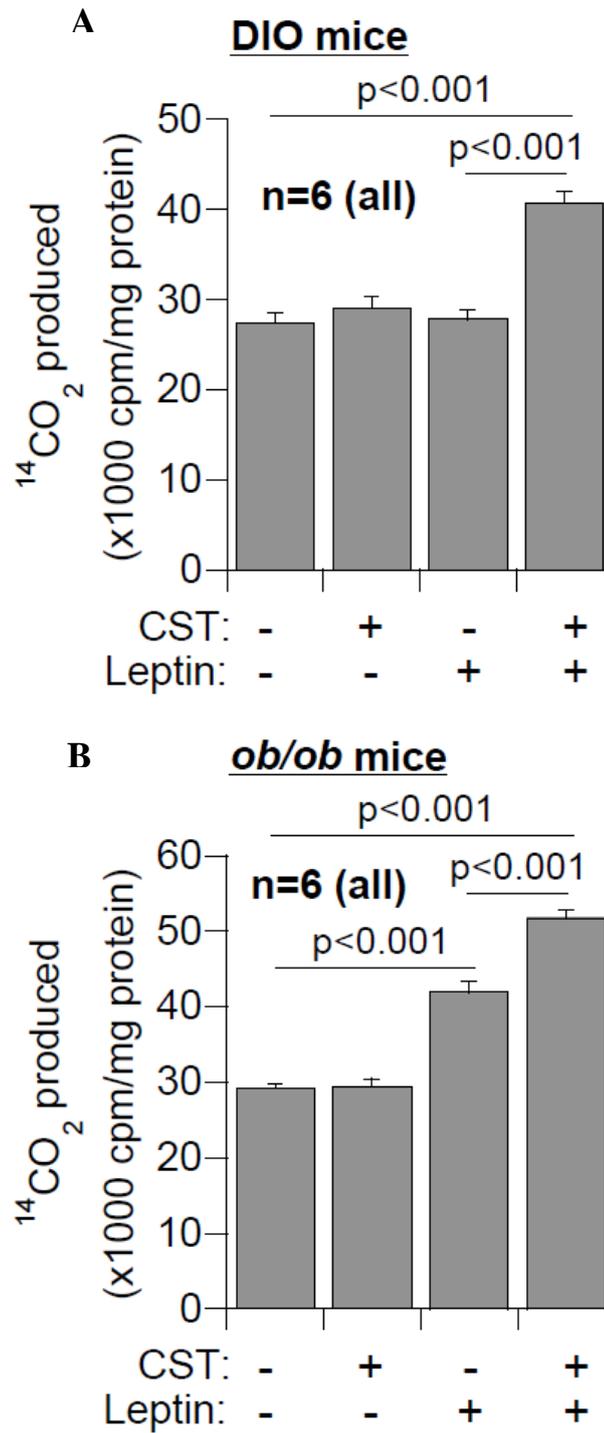
La leptina da sola non è stata in grado di stimolare la fosforilazione di Stat3 e AMPK negli espianti di topi DIO trattati con soluzione salina (Fig. 3.50 A-B). Il trattamento *in vivo* con CST, invece, ha aumentato la fosforilazione di Stat3 ma non di AMPK. Questo può significare che la CST ha indotto un effetto diretto, leptina-indipendente, sulla fosforilazione di Stat3. La successiva esposizione alla leptina degli espianti di tessuto adiposo trattati con CST *in vivo*, è risultata in una maggiore fosforilazione sia di Stat3 che AMPK (Fig. 3.50 A-B). Negli espianti di topi *ob/ob* il trattamento con leptina è stato sufficiente ad indurre la fosforilazione di Stat3 e AMPK (Fig. 3.51 A-B), e anche in questo caso, quando si aggiungeva leptina ai campioni pretrattati con CST, il livello di fosforilazione era più alto.



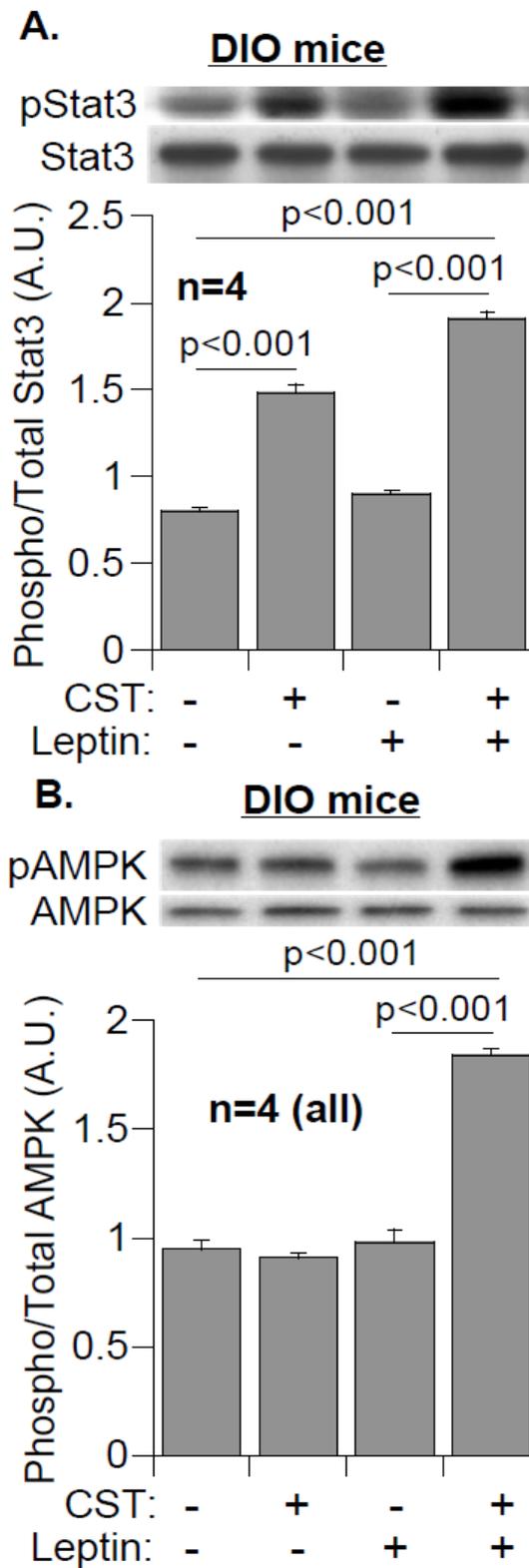
**Fig. 3.47:** concentrazione di glicerolo (A) e NEFA (B) negli espianti di topi DIO trattati con leptina ( $1\mu\text{M}$ ) o soluzione salina per 3 ore.



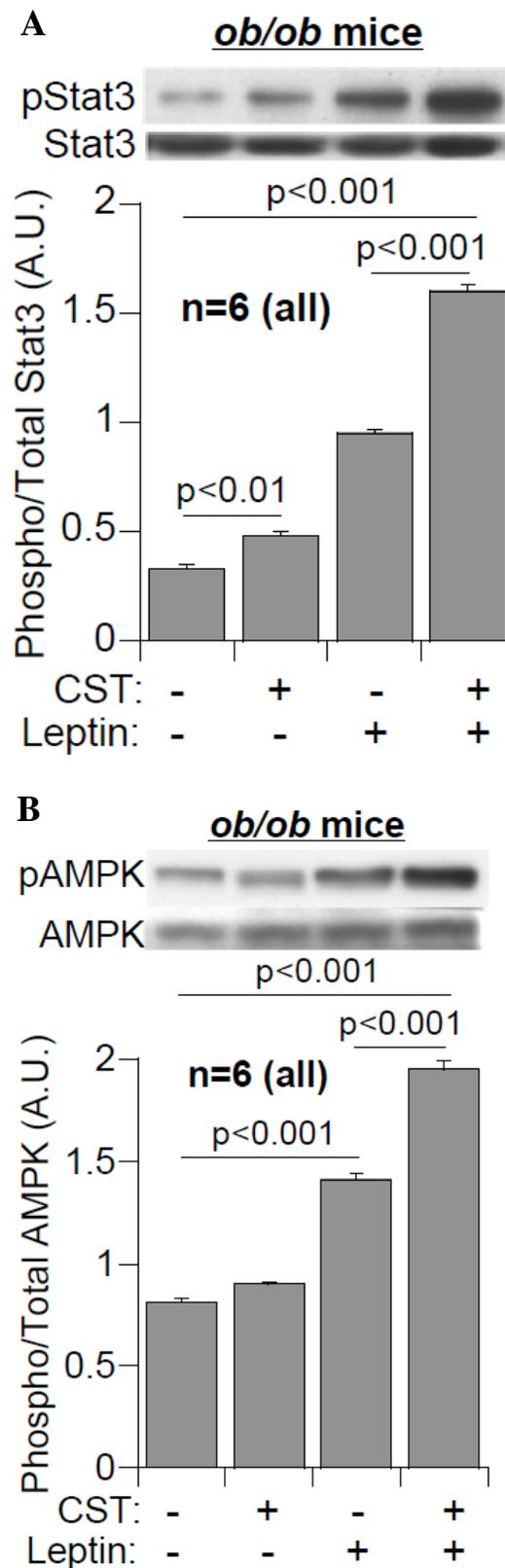
**Fig. 3.48:** concentrazione di glicerolo (A) e NEFA (B) negli espianti di topi *ob/ob* trattati con leptina (1 $\mu\text{M}$ ) o soluzione salina per 3 ore.



**Fig. 3.49:** gli omogenati degli espianti di topi DIO (A) e *ob/ob* (B) sono stati utilizzati per misurare il rilascio di  $^{14}\text{CO}_2$  come parametro della lipolisi.



**Fig. 3.50:** gli espianti dei topi DIO sono stati incubati con leptina (1 $\mu$ M) o soluzione salina per 30 min, omogenati e sottoposti ad immunoblotting per Stat3 (A) e AMPK (B).



**Fig. 3.51:** gli espianti dei topi *ob/ob* sono stati incubati con leptina (1 $\mu$ M) o soluzione salina per 30 min, omogenati e sottoposti ad immunoblotting per Stat 3(A) e AMPK (B).

*Capitolo IV:  
discussione e conclusioni*

#### 4.1 Azione diretta della CgA intera su cuori di ratti Wistar e SHR

Il presente lavoro dimostra, per la prima volta che la CgA intera, a concentrazioni simili a quelle fisiologiche (1nM), è in grado di influenzare la performance del cuore di ratto, inducendo effetti sulla contrattilità miocardica (inotropismo), sul rilassamento (lusitropismo) e a livello coronarico. Queste azioni sono mediate da un meccanismo endotelio-dipendente che prevede il coinvolgimento del pathway di segnalazione IP3K/NO. È stato inoltre dimostrato che, nel cuore di ratto CgA subisce un processo proteolitico che genera frammenti più piccoli, fra cui il peptide cardio- e vaso-attivo VS-1, e che tale processamento è dipendente da stimolazione chimica (ISO, ET-1).

La CgA intera è in grado di indurre effetti inotropi e lusitropici negativi a concentrazioni comprese tra 0.1-4nM, ed una significativa vasodilatazione coronarica a concentrazioni di 1-4nM (precedute da vasocostrizione a concentrazioni più basse). Questi effetti non stati osservati aumentando le concentrazioni (10-16nM), generando una curva a campana. Diverse risposte biologiche, quali ad esempio l'attività anti-tumorale indotta dall'endostatina e l'inibizione dell'angiogenesi mediata dall'interferone- $\alpha$  (Celik et al., 2005; Slaton et al., 1999), incluso l'effetto bifasico della CgA sulla pressione sanguigna e sulla secrezione di CAs osservato nei topi (Vaingankar et al., 2010), esibiscono una curva concentrazione-risposta a campana. I meccanismi responsabili di questo comportamento non sono ancora stati chiariti: un'ipotesi è che questo fenomeno rifletta un meccanismo contro-regolatorio attivato in risposta ad elevate concentrazioni o a variazioni della struttura della CgA (ad esempio della struttura quaternaria), anche in funzione del fatto che la CgA esiste, a pH fisiologico, sia in forma monomerica che in forma dimerica. Ulteriori studi sono necessari per

confermare queste ipotesi. È importante sottolineare che, le concentrazioni bioattive della CgA intera sono molto vicine a quelle osservate nel plasma umano in condizioni fisiologiche. Queste evidenze sperimentali suggeriscono che il pro-ormone intatto è in grado di deprimere la contrattilità cardiaca in maniera diretta e di indurre, al pari dei suoi frammenti derivati VS-1 e CST, vasodilatazione coronarica, anche se a concentrazioni più basse e quindi fisiologicamente più rilevanti. Inoltre la CgA induce effetti inotropo e lusitropico negativi più potenti in ratti SHR rispetto ai ratti Wistar normotesi. La sensibilità del cuore iperteso agli ormoni inibitori (ad esempio Angiotensina II, fattore natriuretico atriale, e oxotremorina) è maggiore rispetto a quella del cuore di ratti normotesi (Anand-Srivastava, 1992). Questo fenomeno è stato attribuito all'overespressione di proteine Gi regolatorie implicate nella riduzione del tono vascolare e nella compromissione della funzionalità miocardica in condizioni di ipertensione (Anand-Srivastava, 1992). È importante notare che la CgA ha indotto effetti coronarici differenti in ratti Wistar e SHR. Infatti, la tipica vasodilatazione indotta da CgA (1-4 nM) non è stata osservata nei ratti SHR.

I nostri risultati dimostrano che, come la VS-I e la CST, anche la CgA intera esercita i suoi effetti cardiosoppressivi attraverso un meccanismo endotelio-NO/cGMP/PKG mediato, suggerendo un pathway di trasduzione del segnale comune. Infatti, i risultati ottenuti utilizzando organi interi e cellule endoteliali isolate suggeriscono che la CgA intatta potrebbe indurre i suoi effetti attraverso l'interazione con la barriera endoteliale, attivando la cascata dello NO responsabile degli effetti miocardici e coronarici. Tale meccanismo endotelio-mediato è coerente con le grandi dimensioni della proteina, che

le impediscono di agire direttamente a livello miocardico. L'endotelio vascolare è una importante sorgente di NO eNOS-derivato (Balligand et al., 2009).

Il coinvolgimento dello NO prodotto dalla NOS nei meccanismi di segnalazione della CgA è stato confermato dai nostri risultati, nei quali l'inibizione specifica della NOS endoteliale aboliva gli effetti cardiaci della CgA. In linea con queste osservazioni funzionali, abbiamo dimostrato che in preparati di cuore isolato e perfuso di ratti Wistar e SHR, come anche in colture HUVEC, il trattamento con CgA stimola la fosforilazione della eNOS. Inoltre, sia in ratti normotesi che in ratti ipertesi, le azioni CgA-indotte richiedono un meccanismo NO-dipendente. Lo NO contribuisce al controllo battito-per-battito ed al controllo a lungo termine della performance contrattile (Balligand et al., 2009). Lo NO prodotto dalla NOS a livello cardiaco esercita una modulazione tonica negativa della contrattilità attraverso un pathway di segnalazione sGC/PKG, riducendo la corrente al calcio dei canali di tipo L e la fosforilazione della traпонina-I (Abi-Gerges et al., 2001). L'attivazione della via NO/cGMP/PKG contribuisce inoltre alla modulazione del rilassamento mediante inibizione della fosforilazione del PLN, riducendo il recupero di calcio nel reticolo sarcoplasmatico (Stojanovic et al., 2001). Infatti, sia in ratti Wistar che in ratti SHR, è stato osservato un effetto negativo della CgA sul rilassamento cardiaco. Il differente effetto coronarico esercitato dalla CgA in preparati cardiaci di ratti Wistar e SHR resta ancora da chiarire. Tuttavia, è possibile ipotizzare che questa perdita di responsività del cuore in condizioni di ipertensione possa essere attribuita ad una riduzione della disponibilità/capacità dello NO di regolare il flusso coronarico basale, a causa di una riduzione della produzione di NO indotta dallo shear-stress (Crabos et al., 1997; Kojda et al., 1998). La compromessa vasodilatazione endotelio-dipendente

osservata nei ratti SHR è stata associata a variazioni strutturali delle arterie miocardiche, e/o ad una riduzione della densità capillare e dell'espressione di eNOS (Crabos et al., 1997).

L'analisi dei perfusati cardiaci ha suggerito che la CgA esogena non viene processata a livello cardiaco, e quindi che gli effetti miocardici esercitati dalla proteina sono da attribuirsi alla molecola intera, escludendo il coinvolgimento dei frammenti derivati.

Nel presente abbiamo osservato che il cuore di ratto normoteso, chimicamente e fisicamente stimolato, genera e processa la CgA nei suoi frammenti più piccoli. Tale processo è stato osservato anche nel cuore di ratto spontaneamente iperteso.

Analisi di Western blotting effettuate sugli estratti cardiaci di ratti Wistar, WKY e SHR, hanno rivelato la presenza di bande immunoreattive di 80-50 kDa. Dal momento che l'anticorpo 5°8, utilizzato per l'immunoblotting, è in grado di legare un dominio aminoacidico presente all'interno della sequenza della VS (epitopo CgA<sub>53-57</sub>), è stato ipotizzato che la banda di 80-50 kDa corrisponda alla CgA intera. I nostri dati sono in linea con quanto osservato da Glattard e collaboratori (2006) riguardo la capacità del cuore di ratto di produrre e processare la CgA nei suoi frammenti bioattivi. Sono inoltre coerenti con il ritrovamento della CgA nel cuore di anfibio (Krylova, 2007), nei granuli secretori atriali di ratto (Steiner et al., 1990), nel sistema di conduzione del cuore di ratto (Weiergraber et al., 2000), nel topo (Biswas et al., 2010), e nel ventricolo umano (Pieroni et al., 2007).

Il presente studio ha dimostrato che la stimolazione fisica e chimica (ISO, ET-1), può indurre il processamento della CgA cardiaca in frammenti più piccoli sia nel cuore normoteso che iperteso. In entrambi i casi si osserva una maggiore intensità delle bande

a basso peso molecolare rispetto a quelle di alto peso molecolare. È importante sottolineare che il processamento della CgA appare particolarmente evidente nei ratti SHR. Sebbene ancora solo qualitative, queste osservazioni potrebbero indicare che nella condizione di ipertensione ci sia una maggiore produzione di peptidi a basso peso molecolare derivanti dalla CgA (ad esempio VS). E' ipotizzabile, alla luce degli effetti cardioprotettivi dei peptidi CgA-derivati, che questa maggiore frammentazione della CgA in condizioni patologiche possa essere un meccanismo benefico che contrasta le condizioni di stress come ad esempio l'ipertensione. La presenza di PC1/3, PC2, e carbossipeptidasi H/E nel cuore di ratto, potrebbe essere collegata al processo di maturazione della CgA cardiaca (Metz-Boutigue et al., 1993). L'analisi del processamento intra- ed extra-granulare della CgA nelle cellule cromaffini della midollare del surrene di bovino, indica che il processo comincia da entrambi le terminazioni N e C (Metz-Boutigue et al., 1993).

La dimostrazione del processamento intracardiaco della CgA supporta la nostra ipotesi che questi frammenti giochino un ruolo nella regolazione autocrina/paracrina dell'omeostasi miocardica e coronarica, mostrando al contempo, un forte effetto anti-adrenergico e anti-endotelina (Cerra et al., 2006, 2008; Tota et al., 2008).

Queste informazioni possono ampliare la concezione classica del cuore come organo endocrino, in relazione soprattutto all'elevata stimolazione adrenergica tipica della condizione di stress (Mazza et al., 2010).

## 4.2 La serpinina agisce come un modulatore positivo della performance cardiaca

Recentemente, è stato dimostrato che la CgA viene clivata a livello della regione C-terminale, ad opera delle pro-ormone convertasi 1 (PC1) e/o PC2 all'interno delle vescicole contenenti CgA nelle cellule cromaffini, per formare le diverse forme del peptide serpinina (Hook et al., 2010; Koshimizu et al., 2011a-b).

Questi peptidi sono la serpinina, la pGlu-serpinina e il peptide esteso Ala29Gly. A livello delle cellule corticotrope, in seguito a stimolazione, la serpinina viene rilasciata per regolare, in maniera autocrina, la biogenesi dei granuli PN-1-dipendente attraverso il pathway cAMP-PKA-Sp1, in modo da rimpiazzare i granuli che sono stati esocitati (Koshimizu et al., 2011b).

Il frammento maggiormente presente nel cuore di ratto è il peptide pGlu-serpina ( $103 \pm 14.7$  pg/g), in minor quantità invece i peptidi serpinina-RRG (Ala29Gly), e il peptide wild type serpinina (Ala26Leu). Questi dati aggiungono nuove informazioni riguardanti il processamento intracardiaco della CgA.

Sulla base di quanto reso noto da Steiner e collaboratori (Steiner et al., 1990), sull'immagazzinamento della CgA all'interno dei cardiomiociti, abbiamo dimostrato la presenza di peptidi endogeni derivanti dalla regione N-terminale della CgA (CgA<sub>4-113</sub>, CgA<sub>1-124</sub>, CgA<sub>1-135</sub>, CgA<sub>1-199</sub>) contenenti la sequenza della vasostatina (Mohammadi et al., 2003). Inoltre recentemente, Biswas et al., (Biswas et al., 2010) hanno messo in luce l'esistenza di peptidi contenenti la sequenza della CST.

Alla luce dei dati riportati nel seguente lavoro, è emerso che la pGlu-serpinina si comporta come un potente agente inotropo positivo, è noto tuttavia in letteratura che i

frammenti N-terminali derivanti dalla CgA, CST e VS-1, svolgono un ruolo cardiosoppressivo (Mazza et al., 2010), abbiamo quindi ipotizzato che in risposta a stimoli specifici in condizioni normali o di stress, la CgA possa essere processata diversamente nel cuore per dare origine a peptidi che agiscono in maniera autocrina/paracrina con effetti opposti al fine di mantenere l'omeostasi cardiaca (Glattard et al., 2006). Questo processamento stimolo-dipendente della CgA nel cuore potrebbe essere molto importante per il corretto funzionamento cardiaco.

Un altro risultato molto significativo è la dimostrazione che la pGlu-serpinina e la serpinina agiscono già a concentrazioni basse (nM) come agonisti  $\beta$ -adrenergici, in maniera simile ai neurotrasmettitori simpatici intracardiaci e le catecolamine circolanti.

La serpinina e la pGlu-serpinina possono infatti aumentare i livelli cellulari di cAMP, inducendo con ciò effetti notevoli sulla performance miocardica. Questo è dimostrato sia dall'analisi emodinamica (cambiamenti della pressione intraventricolare), ottenuti tramite metodica Langendorff, e studi sul muscolo papillare isolato per ottenere dati relativi allo sviluppo di tensione e ai cambiamenti di lunghezza del muscolo cardiaco. I peptidi della serpinina stimolano fortemente l'inotropismo positivo, aumentando la gittata sistolica, e allo stesso tempo accelerando il rilasciamento miocardico diminuendo il tempo totale di diastole.

Gli esperimenti condotti sul muscolo papillare isolato suggeriscono un'azione diretta, indipendente dalle variazioni del flusso coronarico o dai cambiamenti del ritmo cardiaco.

Come per gli altri peptidi derivanti dalla CgA, non è stato identificato un sito specifico di legame o un recettore specifico sia per la serpinina che per pGlu-serpinina. Il peptide

potrebbe legarsi ad un recettore accoppiato a proteine G (GPCR), il che si collegherebbe bene con l'aumento di cAMP (Koshimizu et al., 2011b).

I dati di EC50 rivelano un antagonismo non competitivo da parte della serpinina e della pGlu-serpinina nei confronti del recettore  $\beta$ -adrenergico, in presenza degli inibitori Nebivololo e CGP.

Gli effetti positivi indotti dai due peptidi venivano aboliti in presenza di inibitori selettivi della AC e della PKA (rispettivamente MDL12330A e KT5720), confermando il coinvolgimento di questa cascata trasduzionale.

L'attivazione della PKA porta alla fosforilazione di diverse proteine tra le quali la pompa SERCA e la sua proteina regolatrice il PLN, che sono entrambe coinvolte nella regolazione dell'inotropismo e del lusitropismo (Katz, 1990). La pompa SERCA promuove la rimozione dei cationi  $Ca^{2+}$  dal citoplasma durante la diastole, influenzando così il rilasciamento e la successiva contrazione (Satoh et al., 2011). L'utilizzo dell'inibitore taspigargina, specifico per la pompa SERCA, aboliva gli effetti indotti da serpinina e pGlu-serpinina. È risaputo che l'attività della pompa SERCA è regolata dalla fosforilazione indotta da PKA del PLN (Mattiuzzi et al., 2007). Dai dati ottenuti abbiamo osservato che la pGlu-serpinina induce fosforilazione del PLN sul residuo di serina 16, lo stesso che viene fosforilato come target a valle della cascata  $\beta$ -AR/PKA (Mattiuzzi et al., 2007).

Abbiamo anche osservato che la pGlu-serpinina induce fosforilazione di ERK1/2 e GSK3 $\beta$ . Entrambe le proteine mediano il signaling di PGE2 e EP4 nei miocardici neonatali (He et al., 2010) e sono anche componenti della cascata protettiva RISK (reperfusion injury signaling kinase), coinvolta nella protezione del miocardio in seguito

a danno da ischemia-riperfusionione nei roditori (Das et al., 2009; Penna et al., 2009). Questi elementi potrebbero contribuire agli effetti antiapoptotici della pGlu-serpinina in presenza di radicali dell'ossigeno (ROS), come visto in colture di cellule neuronali da Koshimizu e collaboratori (Koshimizu et al., 2011a).

### 4.3 La CST modula l'omeostasi metabolica

In questo studio è emerso un nuovo ruolo del peptide CST che è in grado di ridurre l'adiposità e di mobilizzare i lipidi dai depositi di grasso. Questi effetti della CST sono stati esaminati nei topi Chga-KO, dove la mancanza di CST endogena fornisce un ottimo background per dimostrare gli effetti indotti dalla CST esogena. Un altro vantaggio di questo modello sperimentale rispetto agli individui WT, è l'aumentata adiposità nonostante una dieta regolare, ovviando il bisogno di indurre obesità attraverso una dieta ricca di grassi. Inoltre, i livelli circolanti di catecolamine in questi animali sono più elevati che nei WT (Gayen et al., 2009), rendendo il tessuto adiposo non responsivo alla lipolisi indotta da catecolamine. I topi Chga-KO presentano anche elevati livelli plasmatici di leptina, adiponectina e corpi chetonici (Gayen et al., 2009b), ciò nonostante la loro massa adiposa rimane notevole.

Queste osservazioni suggeriscono che i topi Chga-KO possono risultare resistenti all'azione di catecolamine e adipochine, e che la riduzione di questa resistenza possa spiegare gli effetti metabolici indotti dalla CST esogena. In fatti, il trattamento con CST nei topi Chga-KO non solo ha causato una riduzione dei livelli circolanti di catecolamine e leptina (Gayen et al., 2009), ma ha ridotto la massa adiposa del 25%.

## *Capitolo IV: discussione e conclusioni*

La CST sembra promuovere la lipolisi nel tessuto adiposo così come l'assorbimento di acidi grassi e successiva ossidazione nel fegato.

In altre parole, il trattamento con CST ha creato le condizioni tali per cui i prodotti della lipolisi (glicerolo e acidi grassi), non vengono riesterificati per l'immagazzinamento. Per tanto, l'effetto metabolico della CST incentiva la mobilizzazione dei lipidi. Questo effetto non è però mediato da un aumento del rilascio di catecolamine o leptina. Dall'altro lato la CST inibisce appunto il rilascio di catecolamine (Mahata et al., 1997; Mahata et al., 2000; Mahata et al., 2004) e la produzione di leptina.

Dal momento che la CST non è in grado di modulare i livelli basali di cAMP, né di influenzare l'effetto dell'isoproterenolo sul rilascio di cAMP nelle cellule PC-12, il suo effetto lipolitico potrebbe non essere mediato dall'attivazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici. L'inibizione del signaling dei recettori  $\alpha$ -adrenergici, invece, potrebbe essere coinvolta nell'azione lipolitica della CST dal momento che è in grado di inibire l'attivazione della PLC da parte della fenilefrina. Dati di letteratura indicano che l'attivazione del signaling dei recettori  $\alpha$ -adrenergici porta all'inibizione della lipolisi mentre il suo blocco favorisce l'effetto lipolitico dovuto alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica (Lafontan et al., 1997). Per tanto, l'inibizione dei recettori  $\alpha$ -AR da parte della CST potrebbe aver spostato il bilancio a favore della lipolisi.

Negli individui obesi, gli elevati livelli plasmatici di leptina inducono desensitizzazione dei suoi recettori, causando l'incapacità di ridurre l'assunzione di cibo e l'incremento dell'ossidazione dei grassi da parte della leptina (Knight et al., 2005; Wang et al., 2005). In tale contesto, la capacità della CST di diminuire la produzione di leptina minimizzando un'esposizione cronica potrebbe aver ristabilito la sensibilità alla leptina

nel cervello e nei tessuti periferici. La CST ha ripristinato il signaling della leptina, attraverso AMPK e Stat3, nei topi Chga-KO, a prova del fatto che è stata ristabilita la sensibilità dei recettori.

Per meglio comprendere l'interazione tra la CST e il pathway della leptina, e per stabilire il ruolo di agente anti-obesità della CST, abbiamo esaminato gli effetti della CST nei topi leptino-resistenti (DIO) e leptina-deficienti (*ob/ob*). È risaputo in letteratura, che i topi DIO mostrano resistenza periferica alla leptina (Van Heek et al., 1997; El-Haschimi et al., 2000). Il trattamento acuto di leptina su espianti di tessuto adiposo di topi DIO, non stimolava la lipolisi, la  $\beta$ -ossidazione, né la fosforilazione di Stat3 e AMPK. Tuttavia, il trattamento cronico con CST di topi DIO per 16 giorni, ha reso possibile la visualizzazione di tutti gli effetti indotti dal trattamento acuto con leptina negli espianti di tessuto adiposo, suggerendo la ri-sensitizzazione dei recettori per la leptina nel tessuto adiposo da parte della CST. Tuttavia il trattamento con CST non ha indotto una riduzione dell'assunzione di cibo nei topi DIO causando però una modesta perdita di peso proporzionale alla riduzione del tessuto adiposo. In aggiunta, i prodotti della lipolisi, glicerolo e NEFA, risultavano aumentati nel siero di questi animali.

A differenza dei topi DIO, i topi *ob/ob* mantengono la sensibilità per la leptina (Pellymounter et al., 1995; Fruhbeck et al., 1997,1998; Koch et al., 2010). Il trattamento acuto con leptina sugli espianti di tessuto adiposo ha stimolato la lipolisi, l'ossidazione degli acidi grassi, e la fosforilazione di Stat3 e AMPK. Gli effetti della leptina venivano aumentati nei campioni pretrattati con CST. È importante sottolineare che il trattamento con CST ha causato una riduzione dell'assunzione di cibo nei topi *ob/ob* (circa il 25%),

svolgendo un effetto leptino-simile. Questo è in contrapposizione con ciò che accade nei topi DIO, dove il trattamento con CST non riduce l'assunzione di cibo. Una delle possibili ragioni che spiegherebbero l'incapacità a ridurre l'assunzione di cibo, attivando i recettori ipotalamici per la leptina, nei topi DIO, è il passaggio limitato della leptina circolante attraverso la barriera ematoencefalica. Quando la leptina veniva somministrata attraverso la via intracerebroventricolare (i.c.v.), poteva attivare il signaling dei recettori ipotalamici nei topi DIO (Van Heek et al., 1997; El-Haschimi et al., 2000; Lin et al., 2000). È tuttavia possibile che, similmente alla leptina, anche la CST se somministrata via i.c.v. sia in grado di ridurre l'assunzione di cibo nei topi DIO ed aumentare la risposta ipotalamica alla leptina. La somministrazione invece intraperitoneale di CST, ha indotto solamente effetti periferici nei topi DIO, aumentando la sensibilità periferica alla leptina.

Nei topi *ob/ob* la CST potrebbe aver avuto qualche effetto a livello centrale causando appunto la riduzione dell'assunzione di cibo, ma per poter osservare una significativa perdita di peso e della massa adiposa, potrebbe essere necessario un trattamento più lungo (6-8 settimane invece che 16 giorni).

Il ripristino del signaling della leptina e l'aumento dell'ossidazione degli acidi grassi nei topi DIO ad opera della CST, insieme alla riduzione di peso e della massa adiposa, suggeriscono un ruolo fisiologico cruciale della CST nel metabolismo dei lipidi essenziale nel prevenire l'obesità. Abbiamo inoltre osservato che la CST stimola la lipolisi agendo da antagonista dei recettori  $\alpha$ -AR.

In conclusione, i nostri dati supportano il ruolo essenziale del peptide endogeno bioattivo CST nel mantenere l'omeostasi durante i disturbi metabolici controllando il

rilascio di catecolamine e della disponibilità di lipidi modulando sia il signaling adrenergico che quello della leptina.

#### 4.4 Conclusioni

La CgA e i suoi peptidi derivati, VS-1 e CST, sono stati indicati come fattori di regolazione dell'omeostasi cardiaca anche in condizioni di intensa stimolazione, come lo stress miocardico indotto dalle catecolamine.

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi è possibile ipotizzare un coinvolgimento del pathway PI3K/Akt/eNOS negli effetti cardio-inibitori esercitati dalla CgA e dai suoi peptidi derivati. Abbiamo infatti osservato, in un modello di cuore di ratto iperteso (SHR), gli effetti cardioinibitori (inotropismo e lusitropismo negativi) della CgA intera; il trattamento con Triton X-100, detergente in grado di ledere funzionalmente l'endotelio coronarico, abolisce tali effetti, suggerendo il coinvolgimento dell'endotelio nel meccanismo d'azione della CgA.

I nostri dati hanno evidenziato che il processamento intracardiaco della CgA intera precedentemente osservato (Glattard et al., 2006), può essere indotto da stimoli di natura fisica e chimica, e che tale fenomeno è significativamente aumentato in cuori di ratti SHR.

È stata recentemente dimostrata l'esistenza di un altro peptide, derivante dalla regione C-terminale della CgA, chiamato serpinina, in grado di regolare la biogenesi dei granuli delle cellule cromaffini attraverso l'attivazione della PKA (Koshimizu et al., 2011a,b). I nostri dati hanno evidenziato che la serpinina è in grado di modulare positivamente la performance cardiaca del cuore di ratto, agendo sui recettori  $\beta$ 1-AR e coinvolgendo la

AC e la PKA. Tali osservazioni rafforzano l'ipotesi che la regolazione spazio-temporale del processamento proteolitico della CgA giochi un ruolo chiave nella modulazione della contrattilità cardiaca, attraverso il bilanciamento degli effetti esercitati dai tre peptidi (CST, VS-1 e serpinina). I dati ottenuti suggeriscono inoltre un ruolo della regolazione della proteolisi della CgA nel mantenimento dell'omeostasi cardiaca anche in condizioni patologiche, e quindi una possibile azione cardioprotettiva.

È ben noto che disfunzioni dell'apparato cardiovascolare sono spesso associate a sindrome metabolica, obesità e diabete. I nostri dati suggeriscono che il peptide cardioattivo CST è in grado di ripristinare il metabolismo lipidico, aumentando la mobilizzazione dei lipidi dal tessuto adiposo al fegato, a livello del quale ne favorisce l'ossidazione. Il trattamento cronico con CST ha infatti indotto una riduzione della massa corporea e della massa grassa di topi DIO e Chga-KO. La CST ha però influenzato anche l'assunzione di cibo, riducendola in topi ob/ob, ma non in topi DIO. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire il meccanismo responsabile di tale effetto.

In conclusione il presente lavoro di tesi rafforza il ruolo del pro-ormone CgA e dei suoi peptidi bioattivi quali regolatori endocrini dell'omeostasi cardiaca in condizioni fisiologiche e patologiche, con effetti sul metabolismo lipidico spesso associato alle patologie cardiovascolari.

*Capitolo V:  
bibliografia*

- Aardal, S. and Helle, K.B.** 1992. "The vaso-inhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels". *Regul. Pept.* **41**, 9-18.
- Aardal, S., Helle, K.B., Elsayed, S., Reed, R.K., Serck-Hanssen, G.** 1993. "Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments". *J. Neuroendocrinol.* **5**, 405-412.
- Abi-Gerges, N., Fischmeister, R. and Mery, P.F.** 2001. "G protein-mediated inhibitory effect of a nitric oxide donor on the L-type  $Ca^{2+}$  current in rat ventricular myocytes". *J. Physiol.* **531**(Pt 1), 117-130.
- Ahn, T.G., Cohn, D.V., Gorr, S.U., Ornstein, D.L., Kashdan, M.A. and Levine, M.A.** 1987. "Primary structure of bovine pituitary secretory protein I (chromogranin A) deduced from the cDNA sequence". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5043-5047.
- Ahren, B., Bertrand, G., Roye, M. and Ribes, G.** 1996. "Pancreastatin modulates glucose-stimulated insulin secretion from the perfused rat pancreas". *Acta Physiol Scand.* **158**, 63-70.
- Al-Fulaij, M.A., Y, Ren, et al.** 2007. "Identification of amino acid determinants of dopamine 2 receptor synthetic agonist function". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 298-307.
- Anand-Srivastava, M.B.** 1992. "Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats. Relationship to adenylate cyclase inhibition". *Biochem. J.* **288**(Pt. 1), 79-85.
- Angeletti, R.H., Aardal, S., Serck-Hanssen, G., Gee, P. and Helle, K.B.** 1994. "Vaso-inhibitory activity of synthetic peptides from the amino terminus of chromogranin A". *Acta Physiol. Scand.* **152**, 11-19.
- Angeletti, R.H., Mints, L., Aber, C. and Russell, J.** 1996. "Determination of residues in chromogranin A (16-40) required for inhibition of parathyroid hormone secretion". *Endocrinology* **137**, 2918-2922.
- Angelone, T., Quintieri, A.M., Brar, B.K., Limchaiyawat, P.T., Tota, B., Mahata, S.K., Cerra, M.C.** 2008. "The antihypertensive chromogranin A peptide catestatin acts as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac inotropism and lusitropism". *Endocrinology* **149**, 4780-4793.
- Angelone, T., Quintieri, A.M., Goumon, Y., Di Felice, V., Filice, E., Gattuso, A., Mazza, R., Corti, A., Tota, B., Metz-Boutigue, M.H. and Cerra, M.C.** 2010. "Cytoskeleton mediates negative inotropism and lusitropism of chromogranin A-derived (human vasostatin 1-78 and rat CgA<sub>1-64</sub>) in the rat heart". *Regul. Pept.* **165**, 78-85.
- Angelone, T., Mazza, R. and Cerra, M.C.** 2012. "Chromogranin-a: multifaceted cardiovascular role in health and disease". *Curr. Med. Chem.* **19**(24), 4042-4050.

- Anouar, Y., Benie, T., De Monti, M., Counis, R. and Duval, J.** 1991. "Estradiol negatively regulates secretogranin II and chromogranin A messenger ribonucleic acid levels in the female rat pituitary but not in the adrenal". *Endocrinology* **129**, 2393-2399.
- Anouar, Y and Duval, J.** 1992. "Direct estradiol down-regulation of secretogranin II and chromogranin A mRNA levels in rat pituitary cells". *Mol. Cell. Endocrinol.* **88**, 97-104.
- Arner, P.** 1999. Int. J. "Catecholamine-induced lipolysis in obesity". *Obes. Relat. Metab. Disord.* 23 suppl. 1, 10-13.
- Arner, P.** 2005. "Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role". *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **19**, 471-482.
- Balligand, J. L., Feron, O. & Dessy, C.** 2009. "eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues". *Physiol. Rev.* **89**, 481-534.
- Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J. And Olefsky, J.K.** 2005. "Increased p58/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle". *Diabetes* **54**, 2351-2359.
- Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S.K., Fischer-Colbrie, R., Loh, Y.P., Salton, S.R.** 2011. "The esterase granin family: structure, function, and biomedical implications". *Endocr. Rev.* **32**, 755-797.
- Benedum, U.M., Baeuerle, P.A., Konecki, D.S., Frank, R., Powell, J., Maller, J. and Huttner, W.B.** 1986. "The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells". *EMBO J.* **5**, 1495-1502.
- Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J., Spiess, M.** 2004. "Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells". *J. Biol. Chem.* **279**, 20242-20249.
- Biswas, N., Rodriguez-Flores, J.L., Courel, M., Gayen, J.R., Vaingankar, S.M., Mahata, M., Torpey, J.W., Taupenot, L., O'Connor, D.T., Mahata, S.K.** 2009. "Cathepsin L colocalizes with chromogranin A in chromaffin vesicles to generate active peptides". *Endocrinology* **150**, 3547-3557.
- Biswas, N., Curello, E., O'Connor, D.T. and Mahata, S.K.** 2010. "Chromogranin/secretogranin proteins in murine heart: myocardial production of chromogranin A fragment catestatin (Chga 364-384)". *Cell Tissue Res.* **342**, 353-361.
- Blois, A., Srebro, B., Mandala, M., Corti, A., Helle, K.B. and Serck-Hanssen, G.** 2006. "The chromogranin A peptide vasostatin-I inhibits gap formation and signal transduction mediated by inflammatory and coronary arterial endothelial cells". *Regul. Pept.* **135**, 78-84.

- Bougneres, P., Stunff, C.L., Pecqueur, C., Pinglier, E., Adnot, P. and Ricquier, D.** 1997. "In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity". *J. Clin. Invest.* **99**, 2568-2573.
- Briolat, J., Wu, S.D., Mahata, S.K., Gonthier, B., Bagnard, D., Chasserot-Golaz, S., Helle, K.B., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H.** 2005. "New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A". *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 377-385.
- Cecconi, C., Ferrari, R., Bachetti, T., Opasch, C., Volterrani, M., Colombo, B., Paricxello, G. and Corti, A.** 2002. "Chromogranin A in heart failure: a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality". *Eur. Heart. J.* **23**, 967-974.
- Celik, I., Surucu, O., Dietz, C., Heymach, J.V., Force, J., Hoschele, I., Becker, C.M., Folkman, J. and Kisker, O.** 2005. "Therapeutic efficacy of endostatin exhibits a biphasic dose-response curve". *Cancer Res.* **65**, 11044-11050.
- Cerra, M.C., De Iuri, L., Angelone, T., Corti, A. and Tota, B.** 2006. "Recombinant N-terminal fragments of chromogranin A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart". *Basic. Res. Cardiol.* **101**, 43-52.
- Cerra, M.C., Gallo, M.P., Angelone, T., Quintieri, A.M., Pulerà, E., Filice, E., Guerold, B., Shooshtarizadeh, P., Levi, R., Ramella, R., Brero, A., Boero, O., Metz-Boutigue, M.H., Tota, B. and Alloatti, G.** 2008. "The homologous rat chromogranin A1-64 (rCGA1-64) modulates myocardial and coronary function in rat heart to counteract adrenergic stimulation indirectly via endothelium-derived nitric oxide". *FASEB J.* **22**, 3992-4004.
- Chanat, E. and Huttner, W.B.** 1991. "Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network". *J. Cell. Biol.* **115**, 1505-1519.
- Chen, Y., Rao, F., Rodriguez-Flores, J.L., Mahapatra, N.R., Mahata, M., Wen, G., Salem, R.M., Shih, P.A., Das, M., Schork, N.J., Ziegler, M.G., Hamilton, B.A., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T.** 2008. "Common genetic variants in the chromogranin A promoter alter autonomic activity and blood pressure". *Kidney Int.* **74**, 115-1205.
- Cohn, D.V., Zangerie, R., Fischer-Colbrie, R., Chu, L.L.H., Elting, J.J., Hamilton, J.W. and Winkler, H.** 1982. "Similarity of secretory protein I from parathyroid gland to chromogranin A from adrenal medulla". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 6056-6059.
- Cohn, D.V., Elting, J.J., Frick, M. and Elder, R.** 1984. "Selective localization of the parathyroid secretory protein-I/adrenal medulla chromogranin A protein family in a wide variety of endocrine cells of the rat". *Endocrinology* **114**, 1963-1974.
- Corti, A., Ferrari, R. and Cecconi, C.** 2000. "Chromogranin A and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), in chronic heart failure". *Adv. Exp. Med. Biol.* **482**, 351-359.

- Corti, A., Mannarino, C., Mazza, R., Angelone, T., Longhi, R. and Tota, B.** 2004. "Chromogranin A N-terminal fragments vasostatin-1 and the synthetic CGA 7-57 peptide act as cardiostatins on the isolated working frog heart". *Gen. Comp. Endocrinol.* **136**, 217-224.
- Couillard, C., Mauriege, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C. and Despres, J.P.** 2002. "Plasma leptin response to an epinephrine infusion in lean and obese women". *Obesity Res.* **10**, 6-13.
- Courel, M., Rodemer, C., Nguyen, S.T., Pance, A., Jackson, A.P., O'Connor, D.T., Taupenot, L.** 2006. "Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A". *J. Biol. Chem.* **281**, 38038-38051.
- Cowley, D.J., Moore, Y.R., Darling, D.S., Joyce, P.B., Gorr, S.U.** 2000. "N- and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules". *J. Biol. Chem.* **275**, 7743-7748.
- Crabos, M., Coste, P., Paccalin, M., Tariosse, L., Daret, D., Besse, P. and Boronon-Adele, S.** 1997. "Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats". *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 55-65.
- Das, A., Salloum, F.N., Xi, L., Rao, Y.J. and Kukreja, R.C.** 2009. "ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice". *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **296**, H1236-H1243.
- De Arcangelis, V., Liu, S., Zhang, D., Soto, D. and Xiang, Y.K.** 2010. "Equilibrium between adenylyl cyclase and phosphodiesterase patterns adrenergic agonist dose-dependent spatiotemporal cAMP/protein kinase A activities in cardiomyocytes". *Mol. Pharmacol.* **78**(3), 340-349.
- Di Filice, V., Cappello, F., Montalbano, A., Ardizzone, N., Campanella, C., De Luca, A., Amelio, D., Tota, B., Corti, A. and Zummo, G.** 2006. "Human recombinant vasostatin-1 may interfere with cell-extracellular matrix interactions". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1090**, 305-310.
- Desjardins, F. and Balligand, J.L.** 2006. "Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease". *Acta Clin. Belg.* **61**, 326-334.
- Doggrell S.A. and Brown L.** 1998. "Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure". *Cardiovasc. Res.* **39**, 89-105.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjorbaek, C and Flier, J.S.** 2000. "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity". *J. Clin. Invest.* **105**, 1827-1832.

- Facer, P., Bishop, A.E., Lloys, R.V., Wilson, B.S., Henessy, R.J. and Polak, J.M.** 1985. "Chromogranin: a newly recognized marker for endocrine cells of the human gastrointestinal tract". *Gastroenterology* **89**, 1366-1373.
- Falkensammer, G., Fischer-Colbrie, R. and Winkler, H.** 1985. "Biogenesis of chromaffin granules: incorporation of sulfate into chromogranin B and into proteoglycan". *J. Neurochem.* **45**, 1475-1480.
- Ferrero, E., Scandini, S., Magni, E., Foglieni, C., Belloni, D., Colombo, B., Curnis, F., Villa, A., Ferrero, M.E. and Corti, A.** 2004. "Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor alpha-induced vascular leakage". *FASEB J.* **18**, 554-556.
- Fischer-Colbrie, R., Iacangelo, A. and Eiden, L.E.** 1988. "Neural and humoral factors separately regulate neuro peptide Y, enkephalin and chromogranin A and B mRNA levels in rat adrenal medulla". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 3240-3244.
- Fischer-Colbrie, R., Schmid, K.W., Mahata, S.K., Mahata, M., Laslop, A. and Bauer, J.W.** 1992. "Sex-related differences in chromogranin A, Chromogranin B and secretogranin II gene expression in rat pituitary". *J. Neuroendocrinol.* **4**, 125-130.
- Fritsche, A., Wahl, H.G., Metzinger, E., Renn, W., Kellerer, M., Haring, H. and Stumvoll, M.** 1998. "Evidence for inhibition of leptin secretion by catecholamines in man". *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **106**, 415-418.
- Fruhbeck, G., Aguado, M. and Martinez, J.A.** 1997. "In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 590-594
- Fruhbeck, G., Aguado, M., Gomez-Ambrosi, J. And Martinez, I.A.** 1998. "lipolytic effect of *in vivo* leptin administration on adipocytes of lean and *ob/ob* mice, but not *db/db* mice". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 99-102.
- Fung, M.M., Salem, R.M., Mehtani, P., Thomas, B., Lu, C.F., Perez, B., Rao, F., Stridsberg, M., Ziegler, M.G., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T.** 2010. "Direct vasoactive effects of the chromogranin A (CHGA) peptide catestatin in humans *in vivo*". *Clin. Exp. Hypertens.* **32**, 278-287.
- Gaede, A.H. and Pilowsky, P.M.** 2010. "Catestatin in rat RVLM is sympathoexcitatory, increases barosensitivity, and attenuates chemosensitivity and the somatosympathetic reflex" *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R1538-1545.
- Gaede, A.H. and Pilowsky, P.M.** 2012. "Catestatin, a chromogranin a-derived peptide, is sympathoinhibitory and attenuates sympathetic barosensitivity and the chemoreflex in rat CVLM". *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **302**, R365-372.

- Gallo, M.P., Levi, R.C., Ramella, R., Brero, A., Boero, O., Tota, B. and Alloatti, G.** 2007. "Endothelium-derived nitric oxide mediates the anti-adrenergic effect of human vasostatin-1 (CgA 1-76) in rat ventricular myocardium". *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **292**, H2906-H2912.
- Gao, Y. And Vanhoutte, P.M.** 2011. "Nebivolol: an endothelium-friendly selective b1-adrenoceptor blocker". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **59**, 16-21.
- Gayen, J.R., Saberi, M., Schenk, S., Biswas, N., Vaingankar, S.M., Cheung, w.W., Najjar, S.M., O'Connor, D.T., Bandyopadhyay, G., Mahata, S.K.** 2009 a. "A novel pathway of insulin sensitivity in chromogranin A null mice: a crucial role for pancreastatin in glucose homeostasis". *J. Biol. Chem.* **284**, 28498-28509.
- Gayen, J.R., Gu, Y., O'Connor, D.T., Mahata, S.K.** 2009 b. "Global disturbance in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin A null mouse". *Endocrinology* **150**, 5027-5035.
- Gayen, J.R., Zhang, K., Ramachandra-Rao, S.P., Mahata, M., Chen, Y., Kim, H.S., Naviaux, R.K., Sharma, K., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T.** 2010. "Role of reactive oxygen species in hyperadrenergic hypertension: biochemical, physiological and pharmacological evidence from targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene". *Circ. Cardiovasc. Genet.* **3**(5), 414-425.
- Glattard, E., Angelone, T., Strub, J.M., Tota, B., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H. and Goumon, Y.** 2006. "Identification and characterization of Vasostatin-containing peptides in rat heart". *FEBS J.* **273**, 3311-3321.
- Gonzalez-Munoz, C., Fuente, T., Medin-Aguerre, S. and Hernandez-Cascales, J.** 2011. "The increase in rat ventricular automaticity induced by salbutamol is mediated through  $\beta$ 1- but not  $\beta$ 2-adrenoceptors: role of phosphodiesterases". *Life Sci.* **88** (25-26), 1095-1101.
- Greenwood, T.A., Rao, F., Stridsberg, M., Mahapatra, N.R., Mahata, M., Lillie, E.O., Mahata, S.K., Taupenot, L., Schork, N.J and O'Connor, D.T.** 2006. "Pleiotropic effects of novel trans-acting loci influencing sympathochromaffin secretion". *Physiol. Genomics* **25**, 470-479.
- Grino, M., Wohlfather, T., Fischer-Colbrie, R. and Eiden, L.E.** 1989. "Chromogranin A messenger RNA expression in the rat anterior pituitary is permissively regulated by the adrenal gland". *Neuroendocrinology* **49**, 107-110.
- Grube, D., Aunis, D., Baber, M.F., Cetin, Y., Jorns, A. and Yoshie, S.** 1987. "Chromogranin A (CGA) in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system. I. CGA in the mammalian endocrine pancreas". *Histochemistry* **85**, 442-452.
- Hearn, A.S.** 1987. "Electron microscopic localization of chromogranin A in osmium-fixed neuroendocrine cells with a protein A-gold technique". *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 795-801.

- Hearn, M.G., Y, Ren, et al.** 2002. "A Drosophila dopamine 2-like receptor: molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14554-14559.
- He, Q., Harding, P. and LaPointe, M.C.** 2010. "PKA, Rap1, ERK1/2, and p90RSK mediate PGE2 and EP4 signaling in neonatal ventricular myocytes". *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **298**, H136-H143.
- Helle, K.B., Marley, P.D., Angeletti, R.H., Aunis, D., Galindo, E., Small, D.H. and Livett, B.G.** 1993. "Chromogranin A: secretion of processed products from the stimulated retrogradely perfused bovine adrenal gland". *J. Neuroendocrinol.* **5**, 413-420.
- Helle, K.B., and Angeletti, R.H.** 1994. "Chromogranin A: a multipurpose prohormone". *Acta Physiol. Scand.* **152**, 1-10.
- Helle, K.B.** 2004. "The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects". *Biol. Rev.* **79**, 769-794.
- Helman, L.J., Ahn, T.G., Levine, M.A., Allison, A., Cohen, P.S., Cooper, M.J., Cohn, D.V. and Israel, M.A.** 1988. "Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA". *J. Biol. Chem.* **263**, 11559-11563.
- Hendi, G.N., Li, T., Girard, L.** 2006. "Targeted ablation of the chromogranin A (ChgA) gene: normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins". *Mol. Endocrinol.* **20**, 1935-1947.
- Hook, V., Bark, S., Gupta, N., Lortie, M., Lu, W.D., Bandeira, N., Funkelstein, L., Wegrzyn, J., O'Connor, D.T., Pevzner, P.** 2010. "Neuropeptidomic components generated by proteomic functions in secretory vesicles for cell-cell communication. *AAPS J.* **12**, 635-645.
- Hosaka, M., Watanbe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y., Takeuchi, T.** 2002. "Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells". *Mol. Biol. Cell.* **13**, 3388-3399.
- Hsiao, R.J., Merzger, M.S. and O'Connor, D.T.** 1990. "Chromogranin A in uremia: progressive retention of immunoreactive fragments". *Kidney Int.* **37**, 955-964.
- Huttner, W.B., Gerdes, H.H. and Rosa, P.** 1991. "The granin (chromogranin/secretogranin) family". *Trends. Biochem. Sci.* **16**, 27-30.
- Hutton, J.C., Hansen, F. and Peshavaria, M.** 1985. "beta-Granins: 21 kDa co-secreted peptides of the insulin granule closely related to adrenal medullary chromogranin A" *FEBS Lett.* **188**, 336-340.

- Hutton, J.C., Nielsen, E. and Katsen, W.** 1988. "The molecular cloning of the chromogranin A-like precursor of beta-granin and pancreastatin from the endocrine pancreas". *FEBS Lett.* **236**, 269-274.
- Hwang, S.R., O'Neill, A., Bark, S., Foulon, T., Nook, V.** 2007. "Secretory vesicles aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin and NPY, containing chromaffin granules". *J. Neurochem.* **100**, 1340-1350.
- Iacangelo, A., Affolter, H., Eiden, L., Herbert, E. and Grimes, M.** 1986. "Bovine chromogranin A: its sequence and the distribution of its messenger RNA in tissues". *Nature* **323**, 82-84.
- Iacangelo, A., Okayama, H. and Eiden, L.E.** 1988. "Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA". *FEBS Lett.* **227**, 115-121.
- Iacangelo, A.L., Grimes, M. and Eiden, L.** 1991. "The bovine chromogranin A gene: structural basis for hormone regulation and generation of biologically active peptides". *Mol. Endocrinol.* **11**, 1651-1660.
- Iacangelo, A. and Eiden, L.E.** 1995. "Chromogranin A: current status as a precursor for bioactive peptides and a granulogenic/storing factor in the regulated secretory pathway". *Regul. Pept.* **58**, 65-88.
- Imbrogno, S., Angelone, T., Corti, A., Adamo, C., Helle, K.B. and Tota, B.** 2004. "Influence of vasostatins, the chromogranin A-derived peptides, on the working heart of the eel (*Anguilla anguilla*): negative inotropy and mechanism of action". *Gen. Comp. Endocrinol.* **139**, 20-28.
- Imbrogno, S., Garofalo, F., Cerra, M.C., Mahata, S.K. and Tota, B.** 2010. "The catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A344-363) modulates myocardial function in fish". *J. Exp. Biol.* **213**, 3636-3643.
- Jain, R.K., Chang, W.T., Geetha, C., Joyce, P.B., Gorr, S.U.** 2002. "In vitro aggregation of the regulated secretory protein chromogranin A". *A. Biochim. J.* **368**, 605-610.
- Jansson, A.M., Røsjø, H., Omland, T., Karlsson, T., Hartford, M., Flyvbjerg, A. and Caidahl, K.** 2009. "Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes". *Eur. Heart J.* **30**(1), 25-32.
- Jensen, M.D.** 1997. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 127-139.
- Karnieli, E., Zarnowski, M. J., Hissin, P.J., Simpson, I.A., Salans, L.B. and Cushman, S.W.** 1981. "Insulin-stimulated translocation of glucose transport system in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity". *J. Biol. Chem.* **256**, 4772-4777.

- Katz, A.M.** 1990. "Inotropic and lusitropic abnormalities in heart failure". *Eur. Heart J.* **11**, 27-31.
- Kennedy, B.P., Mahata, S.K., O'Connor, D.T. and Ziegler, M.G.** 1998. "Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin *in vivo*". *Peptides* **19**, 1241-1248.
- Kim, Y.B., Uotani, S., Pierroz, D.D., Flier, J.S. and Kahn, B.B.** 2000. "In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insuli-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin". *Endocrinology* **141**, 2328-2339.
- Kim, T., Tao-Cheng, J.H., Eiden, L.E., Loh, Y.P.** 2001. "Chromogranin A, an on/off switch controlling dense-core secretory granule biogenesis". *Cell.* **106**, 499-509.
- Kim, T., Zhang, C.F., Sun, Z., Wu, H., Loh, Y.P.** 2005. "Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis". *J. Neurosci.* **25**, 6958-6961.
- Kim, T., Loh, Y.P.** 2006. "Protease nexin-1 promotes secretory granule biogenesis by preventing granule protein degradation". *Mol. Biol. Cell.* **17**, 789-798.
- Kimura, N., Miura, W., Noshiro, T., Mizunashi, K., Hanew, K., Shimizu, K., Watanabe, T., Shibukawa, S., Sohn, H.E., Abe, K., Miura, Y., Nagura, H.** 1997. "Plasma chromogranin A in pheochromocytoma, primary hyperparathyroidism and pituitary hormones. Comparison with catecholamine, parathyroid hormone and pituitary hormones". *Endocr. J.* **44**, 319-327.
- Knight, Z.A., Hannan, K.S., Greengerg, M.L. and Friedman, J.M.** 2010. "Hypeleptinemia is required for the development of leptin resistance". *PloS one* **5**, e11376.
- Koch, C., Augustine, R.A., Steger, J., Ganjam, G.K., Benzler, J., Pracht, C., Lowe, C., Schwartz, M.W., Shepherd, P.R., Anderson, G.M., grattan, D.R. and Tups, A.** 2010. "Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity". *J. Neurosci.* **30**, 16180-16187.
- Kojda, G., Kottenberg, K., Hacker, A. and Noack, E.** 1998. "Alterations of the vascular and the myocardial guanylate cyclase/cGMP-system induced by long-term hypertension in rats". *Pharm. Acta Helv.* **73**, 27-35.
- Konecki, D.S., Benedum, U.M., Gerdes, H.H. and Huttner, W.B.** 1987. "The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin". *J. Biol. Chem.* **262**, 17026-17030.
- Koshimizu, H., Cawley, N.X., Yergey, A.L., Loh, Y.P.** 2011a. "Role of pGlu-seprinin, a novel chromogranin a-derived peptide in inhibition of cell death". *J. Mol. Neurosci.* **45**, 294-303.

- Koshimizu, H., Cawley, N.X., Kim, T., Yergey, A.L., Loh, Y.P.** 2011b. "Serpinin: a novel chromogranin A-derived, secreted peptide up-regulates protease nexin-1 expression and granule biogenesis in endocrine cells". *Mol. Endocrinol.* **25**, 732-744.
- Kruger, P.G., Mahata, S.K. and Helle, K.B.** 2003. "Catestatin (CgA344-364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides". *Regul. Pept.* **114**, 29-35.
- Krylova M.I.** 2007. "Chromogranin A: immunocytochemical localization in secretory granules of frog atrial cardiomyocytes". *Tsitologiya* **49**, 538-543.
- Lafontan, M., Barbe, P., Galatzky, J., Tavernier, G., Langin, D., Carpenne, C., Bousquet-Melou, A. and Berlan, M.** 1997. "Adrenergic regulation of adipocyte metabolism". *Hum. Reprod.* **12 suppl. 1**, 6-20.
- Lafontan, M. and Langin, D.** 2009. "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue". *Prog. Lipid. Res.* **48**. 275-297.
- Lassmann, H., Hagn, C., Fischer-Colbrie, R. and Winkler, H.** 1986. "Presence of chromogranin A,C and C in bovine endocrine and nervous tissues: a comparative immunohistochemical study". *Histochem. J.* **18**, 380-386.
- Lin, S., Thomas, T.C., Storlien, L.H. and Huang, X.F.** 2000. "Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice". *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**, 639-646.
- Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A.E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H.** 2001. "Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A (44-66) derived peptide". *J. Biol. Chem.* **276**, 35875-35882.
- Mahapatra, N.R., O'Connor, D.T., Vaingankar, S.M., Sinha-Hikim, A.P., Mahata, M., Ray, S., Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Ross, Jr J., Mahata, S.K.** 2005. "Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog". *J. Clin. Invest.* **115**, 1942-1952.
- Mahata, S.K., O'Connor, D.T., Mahata, M., Yoo, S.H., Taupenot, L., Wu, H., Gill, B.M., Parmer, R.J.** 1997. "Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist". *J. Clin. Invest.* **100**, 1623-1633.
- Mahata, S.K., Mahata, M., Parmer, R.J. and O'Connor, D.T.** 1999. "Desensitization of catecholamine release. The novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin a 344-364) acts at the receptor to prevent nicotinic cholinergic tolerance". *J. Biol. Chem.* **274**, 2920-2928.
- Mahata, S.K., Mahata, M., Wakade, A.R., and O'Connor, D.T.** 2000. "Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology". *Mol. Endocrinol.* **14**, 1525-1535.

- Mahata, S.K., Mahata, M., Wem, G., Wong, W.B., Mahapatra, N.R., Hamilton, B.A. and O'Connor, D.T.** 2004. "The catecholamine release-inhibitory catestatin fragment of chromogranin A: naturally occurring human variants with different potencies for multiple chromaffin cell nicotinic cholinergic responses". *Mol. Pharmacol.* **66**, 1180-1191.
- Mahata, S.K., Mahata, M., Fung, M.M., O'Connor, D.T.** 2010. "Catestatin: a multifunctional peptide from chromogranin A". *Regul. Pept.* **162**, 33-43.
- Mao, X., Kikani, C.K., Riojas, R.A., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F.J., Fang, Q., Christ-Roberts, C.Y., Hong, J.Y., Kim, R.Y., Liu, F. and Dong, L.Q.** 2006. "APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signaling and function". *Nat. Cell. Biol.* **8**, 516-523.
- Mattiazzi, A., Vittone, L. and Mundina-Weilenmann, C.** 2007. "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis". *Cardiovasc. Res.* **73**, 648-656.
- Mazza, R., Gattuso, A., Mannarino, C., Brar, B.K., Barbieri, S.F., Tota, B. and Mahata, S.K.** 2008. "Catestatin (chromogranin A344-364) is a novel cardiosuppressive agent: inhibition of isoproterenol and endothelin signaling in the frog heart". *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **295**, H113-122.
- Mazza, R., Imbrogno, S. and Tota, B.** 2010. "The interplay between chromogranin A-derived peptides and cardiac natriuretic peptides in cardioprotection against catecholamine-evoked stress". *Regul. Pept.* **165**, 86-94.
- Metz-Boutigue, M.H., Garcia-Sablone, P., Hougue-Angeletti, R. and Aunis, D.** 1993. "Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Detection of cleavage sites". *Eur. J. Biochem.* **217**, 247-257.
- Metz-Boutigue, M.H., Kieffer, A.E., Goumon, Y. and Aunis, D.** 2003. "Innate immunity: involvement of new neuropeptides". *Trends Microbiol.* **11**, 585-592.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Freyer, L.G., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B.B.** 2002. "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase". *Nature* **415**, 339-343.
- Mohammadi, K., Liu, L., Tian, J., Kometiani, P., Xie, Z. and Askari, A.J.** 2003. "Positive inotropic effect of ouabain on isolated heart is accompanied by activation of signal pathways that link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase to ERK1/2". *Cardiovasc. Pharmacol.* **41**, 609-614.
- Modi, W.S., Levine, M.A., Seuanez, H.N., Dean, M. and O'Brien, S.J.** 1989. "The human chromogranin A gene: chromosome assignment and RFLP analysis". *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 814-818.

- Montero-Hadjadje, M., Vaingankar, S., Elias, S., Tostivint, H., Mahata, S.K. and Anouar, Y.** 2008. "Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects". *Acta Physiol.* **192**, 309-324.
- Montero-Hadjadje, M., Elias, S., Chevalier, L., Bernard, M., Tanguy, Y., Turquier, V., Galas, L., Yon, L., Malagon, M.M., Driouich, A., et al.** 2009. "Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides". *J. Biol. Chem.* **284**, 12420-12431.
- Montesinos, M.S., Machado, J.D., Camacho, M., Diaz, J., Morales, Y.G., Alvarez de la Rosa, D., Carmona, E., Castaneyra, A., Viveros, O.H., O'Connor, D.T., et al.** 2008. "The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse". *J. Neurosci.* **28**, 3350-3358.
- Mori, S., Nojiri, H., Yoshizuka, N. and Takema, Y.** 2007. "Rapid desensitization of lipolysis in the visceral and subcutaneous adipocytes of rats". *Lipids* **42**, 307-314.
- Morris, D.L. and Rui, L.** 2009. "Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance". *Am. J. Physiol. Endo. Metab.* **297**, E1247-1259.
- Mouland, A.J., Bevan, S., White, J.H. and Hendy, G.N.** 1994. "Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression". *J. Biol. Chem.* **269**, 6918-6926.
- Murray, S.S., Deaven, L.L., Burton, D.W., O'Connor, D.T., Mellon, P.L. and Deftos, L.J.** 1987. "The gene for human chromogranin A (CgA) is located on chromosome 14". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 141-146.
- Natori, S., Huttner, W.B.** 1996. "Chromogranin B (secretogranin I) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4431-4436.
- Nelson, C., Albert, V.R., Elsholtz, H.P., Lu, L.I.W. and Rosenfeld, M.G.** 1988. "Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor". *Science* **239**, 1400-1405.
- Nolan, J.A., Trojanowsky, J.Q. and Hogue-Ageletti, R.** 1985. "Neurons and neuroendocrine cells contain chromogranin: detection of the molecule in normal bovine tissues by immunohistochemical and immunohistochemical methods". *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 791-798.
- O'Connor, D.T., Burton, D. and Deftos, L.J.** 1983. "Immunoreactive human chromogranin A in diverse polypeptide hormone producing human tumors and normal endocrine tissue". *J. Clin. Endocrin. Metab.* **57**, 1084-1086.
- O'Connor, D.T.** 1984. "Chromogranin A: implications for hypertension". *J. Hypertens. (Suppl. 2)*, S147-S150.

- O'Connor, D.T. and Bernstein, K.N.** 1984. "Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a novel measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma". *N. Engl. J. Med.* **311**, 764-770.
- O'Connor, D.T. and Frigon, R.P.** 1984. "Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay". *J. Biol. Chem.* **259**, 3237-3247.
- O'Connor, D.T., Frigon, R.P., Sokoloff, R.L.** 1984. "Human chromogranin A. Purification and characterization from catecholamine storage vesicles of human pheochromocytoma". *Hypertension* **6**, 2-12.
- O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.** 1987. "How sensitive and specific is measurement of plasma chromogranin A for the diagnosis of neuroendocrine neoplasia?". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **493**, 379-386.
- O'Connor, D.T., Cervenka, J.H., Stone, R.A., Parmer, R.J., Franco-Bourland, R.E., Madrazo, I. and Langlais, P.J.** 1993. "Chromogranin A immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to noradrenergic neuronal activity and variation in neurological disease". *Neuroscience* **56**, 999-1007.
- O'Connor, D.T., Takiyyuddin, M.A., Printz, M.P., Dinh, T.Q., Barbosa, J.A., Rozansky, D.J., Mahata, S.K., Wu, H., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Wright, F.A., Schlager, G., Parmer, R.J.** 1999. "Catecholamine storage vesicle protein expression in genetic hypertension". *Blood Press* **8**, 285-295.
- O'Connor, D.T., Kailasam, M.T., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Yanaihara, N., Parmer, R.J.** 2002. "Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension". *J. Hypertens.* **20**, 1335-1345.
- O'Connor, D.T., Cadman, P.E., Smiley, C., Salem, R.M., Rao, F., Smith, J., Funk, S.D., Mahata, S.K., Mahata, M., Wen, G., Taupenot, T., Gonzalez-Yanes, C., Harper, K.L., Henry, R.R., Sanchez-Margalet, V.** 2005. "Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism in vivo, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 5414-5425.
- Olefsky, J.M. and Glass, C.K.** 2010. "Macrophages, inflammation, and insulin resistance". *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 219-246.
- Parmer, R.J., Koop, A.H., Handa, M.T. and O'Connor, D.T.** 1989. "Molecular cloning of chromogranin A from rat pheochromocytoma cells". *Hypertension* **14**, 435-444.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, F.** 1995. "Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice". *Science* **269**, 540-543.

- Penna, C., Perrelli, M.G., Raimondo, S., Tullio, F., Merlino, A., Moro, F., Geuna, S., Mancardi, D. and Pagliaro, P.** 2009. "Postconditioning induce san anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts". *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 794-501.
- Pieroni M., Corti A., Tota B., Curnis F., Angelone T., Colombo B., Cerra M.C., Bellocci F., Crea F. and Maseri A.** 2007. "Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function". *Eur. Heart J.* **28**, 1117-1127.
- Pohl, T.M., Philips, E., Song, K., Gerdes, H.H., Huttner, W.B. and Ruther, U.** 1990. "Organisation of the mouse chromogranin B (secretogranin I) gene". *FEBS Lett.* **262**, 219-224.
- Qian, J., Hickey, W.F. and Hogue Angeletti, R.** 1988. "Neuroendocrine cells in intestinal lamina propria. Detection with antibodies to chromogranin A". *J. Neuroimmunol.* **17**, 159-165.
- Ramella, R., Boero O., Alloatti, G., Angelone, T., Levi, R. and Gallo, M.P.** 2010. "Vasostatin 1 activates eNOS in endothelial cells a proteoglycan-dependent mechanism". *J. Cell. Biochem.* **110**, 70-79.
- Ratti, S., Curnis, F., Longhi, R., Colombo, B., Gasparri, A., Magni, F., Manera, E., Metz-Boutigue, M.H. and Corti, A.** 2000. "Structure-activity relationships of chromogranin A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smooth muscle cells". *J. Biol. Chem.* **275**, 29257-29263.
- Reiker, S., Fisher-Colbrie, R., Eiden, L.E. and Winkler, H.** "Phylogenetic distribution of peptides related to chromogranins A and B". 1988. *J. Neurochem.* **50**, 1066-1073.
- Rindi, G., Buffa, R., Sessa, F., Tortora, O. and Solcia, E.** 1986. "Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules". *Histochemistry* **85**, 19-28.
- Rosa, P., Hille, A., Lee, R.W., Zanini, A., De Camili, P. and Huttner, W.B.** 1985. "Secretogranin I and II: two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulation pathway". *J. Cell. Biol.* **101**, 1999-2011.
- Røsjø, H., Masson, S., Latini, R., Flyvbjerg, A., Milani, V., La Rovere, M.T., Revera, M., Mezzani, A., Tognoni, G., Tavazzi, L., Omland, T. and GISSI-HF Investigators.** 2010. "Prognostic value of chromogranin A in chronic heart failure: data from the GISSI-Heart Failure trial". *Eur J Heart Fail* **12**(6), 549-556.
- Rozansky, D.J., Wu, H., Tang, K., Parmer, R.J. and O'Connor, D.T.** 1994. "Glucocorticoid activation of chromogranin A gene expression. Identification and characterization of a novel glucocorticoid response element". *J. Clin. Invest.* **94**, 2357-2368.

- Russell, J., Lettieri, D., Adler, J. And Sherwood, L.M.** 1990. "1,25-dihydroxyvitamin D3 has opposite effects on the expression of parathyroid secretory protein and parathyroid hormone genes". *Mol. Endocrinol.* **4**, 505-509.
- Russell, J., Gee, P., Liu, S.M. and Angeletti, R.H.** 1994. "Inhibition of parathyroid hormone secretion by amino-terminal chromogranin A peptides". *Endocrinology* **135**, 337-342.
- Satoh, K., Matsu-Ura, T., Enomoto, M., Nakamura, H., Michikawa, T. and Mikoshiba, K.** 2011. "Highly cooperative dependence of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) 2a pump activity on cytosolic calcium in living cells". *J. Biol. Chem.* In press
- Schimmel, A., Braunling, O., Ruther, U., Huttner, W.B. and Gerdes, H.H.** 1992. "The organization of the mouse secretogranin II gene". *FEBS Lett.* **314**, 375-380.
- Schmid, K.W., Fischer-Colbrie, R., Hagn, C., Jasani, B., Williams, E.D. and Winkler, H.** 1987. "Chromogranin A and B and secretogranin II in medullary carcinomas of the thyroid". *Am. J. Surg. Pathol.* **11**, 551-556.
- Schober, M., Howe, P.R., Sperk, G., Fischer-Colbrie, R., Winkler, H.** 1989. "An increased pool secretory hormones and peptides in adrenal medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats". *Hypertension* **13**, 469-474.
- Schulz E., Gori T. and Münzel T.** 2011 "Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension". *Hypertens Res.* **34**(6), 665-673.
- Scriba, D., Aprath-Husmann, I., Blunn, W.F. and Hauner, H.** 2000. "Catecholamines suppress leptin release from in vitro differentiated subcutaneous human adipocytes in primary culture via beta-1 and beta-2-adrenergic receptors". *Eur. J. Endocrinol.* **143**, 439-445.
- Seeley, R.J., van Dijk, G., Campfield, L.A., Smith, F.J., Burn, P., Nelligan, J.A., Bell, S.M., Baskin, D.G., Woods, S.C. and Schwartz, M.W.** 1996. "Intravascular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats". *Horm. Metab. Res.* **28**, 664-668.
- Sietzen, M., Schober, M., Fischer-Colbrie, R., Scherman, D., Sperk, G. and Winkler, H.** 1987. "Rat adrenal medulla: levels of chromogranins, enkephalins, dopamine beta-hydroxylase and of the amine transporter are changed by nervous activity and hypophysectomy". *Neuroscience* **22**, 131-139.
- Slaton, J.W., Perrotte P., Inoue, K., Dinney, C.P. and Fidler, I.J.** 1999. "Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule". *Clin. Cancer Res.* **5**, 2726-2734.

- Somogyi, P., Hodgson, A.J., De Potter, R.W., Fischer-Colbrie, R., Schober, M., Winkler, H. and Chubb, I.W.** 1984. "Chromogranin immunoreactivity in the central nervous system. Immunochemical characterization, distribution and relationship to catecholamine and enkephalin pathway". *Brain Res. Rev.* **8**, 193-230.
- Stojanovic, M.O., Ziolo, M.T., Wahler, G.M., Wolska, B.M.** 2001. "Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes". *Am J Physiol Cell Physiol.* **281**, C342-C349.
- Stallknecht, B., Bulow, J., Frandsen, E. and Galbo, H.** 1997. "Desensitization of human adipose tissue to adrenaline stimulation studied by microdialysis". *J. Physiol.* **500** (pt 1), 271-282.
- Steiner, H.J., Weiler, R., Ludescher, C., Schmid, K.W. and Winkler, H.** 1990. "Chromogranin A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart". *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 845-850.
- Stettler, H., Beuret, N., Prescianotto-Baschong, C., Fayard, B., Taupenot, L., Spiess, M.** 2009. "Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells". *Biochem. J.* **418**, 81-91.
- Stich, V., de Glisezinski, I., Crampes, F., Suljkovicova, H., Galitzky, J., Riviere, D., Hejnova, J., Lafontan, M. and Berlan, M.** 1999. "Activation of antilipolytic alpha(2)-adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue". *Am. J. Physiol.* **277**, R1076-1083.
- Stich, V., Pelikanova, T., Wohl, P., Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Lafontan, M. and Berlan, M.** 2003. "Activation of alpha2-adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in men". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E599-607.
- Stojanovic, M.O., Ziolo, M.T., Wahler, G.M. and Wolska, B.M.** 2001. "Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes". *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **281**, C342-349.
- Stridsberg, M., Husebye, E.S.** 1997. "Chromogranin A and chromogranin B are sensitive circulating markers for pheochromocytoma". *Eur. J. Endocrinol.* **136**, 67-73.
- Stridsberg, M., Eriksson, B., Oberg, K. and Janson, E.T.** 2004. "A panel of 11 region-specific radioimmunoassay for measurements of human chromogranin A". *Regul. Pept.* **117**, 219-227.
- Strub, J.M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H.** 1996. "Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules". *J. Biol. Chem.* **271**, 28533-28540.

- Takiyyuddin, M.A., Cervenka, J.H., Hsiao, R.J., Barbosa, J.A., Parmer, R.J. and O'Connor, D.T.** 1990. "Chromogranin A. Storage and release in hypertension". *Hypertension* **15**, 237-246.
- Takiyyuddin, M.A., De Nicola, L., Gabbai, F.B., Dinh, T.Q., Kennedy, B., Ziegler, M.G., Sabban, E.L., Parmer, R.J., O'Connor, D.T.** 1993. "Catecholamine secretory vesicles. Augmented chromogranins and amines in secondary hypertension". *Hypertension* **21**, 674-679.
- Tartaglia, A., Portela-Gomes, G.M., Oberg, K., Vezzadini, P., Foschini, M.P., Stridsberg, M.** 2006. "Chromogranin A in gastric neuroendocrine tumors: an immunohistochemical and biochemical study with regio-specific antibodies". *Virchows Arch.* **448**, 399-406.
- Tatemoto, K., Efendic, S., Mutt, V., Makk, G., Feistner, G.J., Barchas, J.D.** 1986. "Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion". *Nature* **324**, 476-478.
- Taupenot, L., Harper, k.L., and O'Connor, D.T.** 2003. "The chromogranin-secretogranin family". *N. Engl. J. Med.* **348**, 1134-1149.
- Thalman, S., Jge-Aubry, C.E. and Meier, C.A.** 2008. "Explant cultures of white adipose tissue". *Methods. Mol. Biol.* **456**, 195-199.
- Theurl, M., Schgoer, W., Albrecht, K., Jeschke, J., Egger, M., Beer, A.G., Vasiljevic, D., Rong, S., Wolf, A.M., Bahlmann, F.H., Patsch, J.R., Wolf, D., Schratzberger, P., Mahata, S.K. and Kirchmair, R.** 2010. "The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism". *Circ. Res.* **107**, 1326-1335.
- Tota, B., Mazza, R., Angelone, T. et al.** 2003. "Peptides from the N-terminal domain of chromogranin A (vasostatins) exert negative inotropic effects in the isolated frog heart". *Regul. Pept.* **114**, 123-130.
- Tota, B., Quintieri, A.M., Di Filice, V. and Cerra, M.C.** 2007. "New biological aspects of chromogranin A-derived peptides: focus on vasostatins". *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **147**, 11-18.
- Tota, B., Angelone, T., Mazza, R., Cerra, M.C.** 2008. "The chromogranin A-derived vasostatins: new players in the endocrine heart". *Curr. Med. Chem.* **15**, 1444-1451.
- Tota, B., Pasqua, T., Gentile, S., Koshimizu, H., Cawley, N.X., cerra, M.C., Loh, Y.P., Angelone, T.** 2011. "C-terminal Chromogranin A-derived serpinin and pyroglutaminated serpinin ad novel cardiac b-adrenergic agonist". In: 62<sup>nd</sup> Meeting of the Italian Physiological Society, p154. Sorrento (Italy): *Acta Physiologica*.

- Tota, B., Gentile, S., Pasqua, T., Bassino, E., Koshimizu, H., Cawley, N.X., Cerra, M.C., Loh, Y.P., Angelone, T.** 2012. "The novel Chromogranin A-derived serpinin and pyroglutaminated serpinin peptides are positive cardiac beta-adrenergic-like isotrope". *FASEB J.* **7**, 2888-2898.
- Townsend, R.R., Klein, S. and Wolfe, R.R.** 1994. "Changes in lipolytic sensitivity following repeated epinephrine infusion in humans". *Am. J. Physiol.* **266**, E155-160.
- Vaingankar, S.M., Li, Y., Biswas, N., Gayen, J., Choksi, S., Rao, F., Ziegler, M.G., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T.** 2010. "Effects of chormogranin A deficiency and excess in vivo: biphasic blood pressure and catecholamine responses". *J. Hypertens.* **28**, 817-825.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E. Jr., Stoffel, M. and Friedman, J.M.** 1996. "Leptin activation of Stat 3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice". *Nat. Genet.* **14**, 95-97.
- Van Heek, M., Compton, D.S., France, C.F., Tedesco, R.P., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Sybertz, E.J., Strader, C.D. and Davis, H.R. Jr.** 1997. "Diet-induced obese mice developed peripheral, but not central, resistance to leptin". *J. Clin. Invest.* **99**, 385-390.
- Varndell, J.M., Lloyds, R.V., Wilson, B.S. and Polak, J.M.** 1985. "Ultrastructural localization of chromogranin: a potential marker for the electron microscopical recognition of endocrine cell secretory granules". *Histochem. J.* **17**, 981-992.
- Wang, M.Y., Orci, L., Ravazzola, M. and Unger, R.H.** 2005. "Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 18011-18016.
- Waschek, J.A., Pruss, R.M., Siegel, S.E., Eiden, L.E., Bader, M.F. and Aunis, D.** 1987. "Regulation of enkephalin, VIP and chromogranin A biosynthesis in actively secreting chromaffin cells: multiple strategies for multiple peptides". *Ann. NY Acad. Sci.* **493**, 308-323.
- Watkinson, A., Jonsson, A.C., Davison, M., Young, J., Lee, C.M., Moore, S. and Dockray, G.J.** 1991. "heterogeneity of chromogranin A-derived peptides in bovine gut, pancreas and adrenal medulla". *Biochem. J.* **276**, 471-479.
- Weiergraber, M., Pereverzev, A., Vajna, R., Henry, M., Schramm, M., Nastainczyk, W., Grabsch, H. and Schneider, T.** 2000. "Immunodetection of alpha1E voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney". *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 807-819.
- Winkler, H. and Fischer-Colbrrie, R.** 1992. "The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives". *Neuroscience* **49**, 497-528.

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

**Wu, H., Rozansky, D.J., Webster, N.J.C and O'Connor, D.T.** 1994. "Cell type-specific gene expression in the neuroendocrine system. A neuroendocrine-specific regulatory element in the promoter of chromogranin A, a ubiquitous secretory granule core protein". *J. Clin. Invest.* **94**, 118-129.

**Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradsky, K.F., Toneff, T., Bunday, R., Miller, R., Schilling, B., Petermann, I., Dehnert, J., Logvinova, A., et al.** 2003. "Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9590-9595.

**Yasothornsrikul, S., Toneff, T., Hwang, S.R., Hook, V.Y.** 1998. "Arginine and lysine aminopeptidase activities in chromaffin granules of bovine adrenal medulla: relevance to prohormone processing". *J. Neurochem.* **70**, 153-163.

**Yoo, S.H.** 1996. "pH, and Ca(2+), dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranin A and B in secretory vesicle biogenesis". *J. Biol. Chem.* **271**, 1558-1565.

## *Ringraziamenti*

Ringrazio di cuore il Dott. Tommaso Angelone mio tutor e mentore, la Prof.ssa Maria Carmela Cerra e il Prof. Bruno Tota e tutto il gruppo di ricerca del laboratorio di Fisiopatologia Cellulare e Molecolare Cardiaca presso il Dip. Di Biologia Cellulare dell'Università della Calabria;

Very special tank goes to Prof. Sushil Mahata, Dr. G. Bandyopadhyay, Dr. N. Dev and Dr. S. Vaingankar from the University of California in San Diego, thank you for your great effort and your kindness.