

Università degli Studi della Calabria

Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

XXI° ciclo

Settore Disciplinare BIO/09

*Azione cardiaca della catestatina
in Rana esculenta*

Dott.^{ssa} Sandra Francesca BARBIERI

Docenti Tutors

Dott.^{ssa} Alfonsina GATTUSO

Dott.^{ssa} Rosa MAZZA

Coordinatore

Ch.mo Prof. Marcello CANONACO

Anno Accademico 2007/2008

A Salvatore

Indice

Summary	5
Premessa e scopo	8
Introduzione	12
1. LA CROMOGRANINA A	13
2. LA CATESTATINA	18
2.1 Sintesi e struttura della Catestatina	18
2.2 Varianti polimorfiche della Cts umana	22
2.3 Inibizione della secrezione catecolaminergica	27
2.4 Azione antimicrobica della Cts	33
2.5 Azione della Cts a livello cardiovascolare	34
3. FATTORI RILASCIATI DALL'ENDOTELIO ENDOCARDICO	37
3.1 Ossido nitrico	37
3.2 Endotelina-1	42
3.3 Meccanismo d'interazione NO-ET-1 a livello cardiaco	50
Materiali e Metodi	52
1. TRATTAMENTO DEGLI ANIMALI	53
2. PROCEDURA DI ISOLAMENTO	53
3. APPARATO DI PERFUSIONE	54
4. COMPOSIZIONE DEL PERFUSATO	57
5. MISURE E CALCOLI DEI PARAMENTRI CARDIACI	57
6. COMPOSTI CHIMICI	58
7. CONDIZIONI BASALI	60
8. TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	61
8.1 Curve concentrazione-risposta della Cts	61
8.2 Cts e stimolazione adrenergica	62
8.3 Effetto dell'endotelina-1	63
8.4 Effetti della Cts o dell'ET-1 prima e dopo trattamento con inibitori del sistema NO-cGMP e con Triton X-100	63
8.5 Effetti della Cts e dell'ET-1 in presenza di BQ788 e BQ123	64
8.6 Interazione Cts-ET-1 prima e dopo trattamento con BQ788	65
9. ANALISI STATISTICA	65
Risultati	66
1. EFFETTI DELLA Cts SULLA PERFORMANCE CARDIACA IN CONDIZIONI BASALI	67
2. AZIONE ANTI-ADRENERGICA DELLA Cts	68
3. EFFETTI DELLA Cts PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON INIBITORI DEL SISTEMA NOS-NO- cGMP E CON TRITON X-100	72
4. EFFETTI DELL'ET-1 IN CONDIZIONI BASALI	73
5. EFFETTI DELL'ET-1 IN PRESENZA DI BQ788 E BQ123	75
6. EFFETTI DELL'ET-1 PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON INIBITORI DEL SISTEMA NOS-NO- cGMP E CON TRITON X-100	77
7. INTERAZIONE Cts-ET-1	80
8. EFFETTO DELL'ISOPROTERENOLO PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON Cts O Cts PIÙ BQ788	83
Discussione	85

1. EFFETTI DELLA CATESTATINA E MECCANISMO D’AZIONE	87
2. INTERAZIONE CATESTATINA-ENDOTELINA-1	92
Conclusioni	98
Bibliografia	101

Summary

Catestatin (Cts), Chromogranin A (CGA)-derived peptide, acts as an endogenous inhibitor of catecholamine release, as a potent vasodilator *in vivo* and as an anti-hypertensive agent. In particular, low levels of catestatin, are associated with augmented adrenergic responses to stressors and increased risk of hypertension.

Using the isolated avascular frog heart as a bioassay, in which the interactions between the endocardial endothelium and the subjacent myocardium can be studied without the confounding effects of the vascular endothelium, we tested the direct cardiotropic effects of bovine Cts (CGA₃₄₄₋₃₆₄) and its interaction with β -adrenergic (isoproterenol, ISO) and endothelin-1 (ET-1) signaling. Cts dose-dependently decreased stroke volume (SV) and stroke work (SW), with a threshold concentration of 11 nM, approaching the *in vivo* level of the peptide. Furthermore, the Cts effect was abolished by pretreatment with either nitric oxide synthase (N^G-monomethyl-L-arginine) or guanylate cyclase (ODQ) inhibitors, or an ETB receptor (ETBR) antagonist (BQ 788). Cts also noncompetitively inhibited the positive inotropic action of ISO. In addition, Cts inhibited the positive inotropic effect of ET-1, mediated by ETA receptors, and did not alter the negative inotropic ET-1 influence mediated by ETBR. Cts action through ETBR was further suggested when, in the presence of BQ-788, Cts failed

to inhibit the positive inotropism of both ISO and ET-1 stimulation. We concluded that the cardiotropic actions of Cts, including the β -adrenergic and ET-1 antagonistic effects, support a novel role of this peptide as an autocrine-paracrine modulator of cardiac function, particularly when the stressed heart becomes a preferential target of both adrenergic and ET-1 stimuli.

Premessa e scopo

La Catestatina (Cts), è un frammento peptidico di 21 aminoacidi, derivante dal clivaggio proteolitico della Cromogranina A (CGA) in posizione C-terminale e prodotto all'interno dei granuli secretori delle cellule cromaffini della midollare del surrene e delle fibre nervose simpatiche post-gangliari (*Simon et al., 1988*). Essa viene rilasciata insieme alle catecolamine ed alla CGA in seguito a stimolazione colinergica, mediata dal recettore nicotinic, e rappresenta un importante modulatore autocrino a feedback negativo di questo processo di secrezione (*Mahata et al., 1997*). E' stato dimostrato che la Cts agisce mediante un antagonismo di tipo non competitivo sul recettore nicotinic bloccando la corrente ionica che evoca lo stimolo per il rilascio catecolaminergico (*Herrero et al., 2002*); oltre ad inibire la secrezione delle catecolamine, essa è in grado di bloccare la desensitizzazione recettoriale dovuta ad una stimolazione ripetuta e/o persistente, evitando il blocco della trasmissione simpatica (*Mahata et al., 1999*). E' stato individuato un suo ruolo anche nell'ambito della trascrizione, in quanto la Cts è capace di inibire lo stimolo trascrizionale accoppiato alla stimolazione della secrezione catecolaminergica, sempre mediante interazione inibitoria sul recettore nicotinic (*Mahata et al., 2003*).

A livello vascolare, studi effettuati in ratti *in vivo* hanno dimostrato che la Cts determina un potente rilassamento attraverso il rilascio d'istamina, la quale legandosi ai recettori H₁ provoca un aumento della produzione di ossido nitrico (NO) (*Kennedy et al., 1998*). Inoltre, la dimostrazione che in soggetti ipertesi e normo-tesi, con una storia familiare di ipertensione, sono presenti ridotti livelli circolanti di Cts, suggerisce che tale diminuzione possa rappresentare la prima manifestazione di un successivo sviluppo della patologia (*O'Connor et al., 2002*).

In base agli effetti antipertensivi della Cts noi ipotizziamo che essa possa essere anche dotata di proprietà cardioattive, aggiungendosi così agli altri componenti molecolari dello "zero steady-state error". Ciò è supportato anche da precedenti studi i quali hanno dimostrato che i frammenti N-terminali della CGA, le Vasostatine, possiedono rilevanti proprietà cardiosoppressive ed antiadrenergiche (*Corti et al., 2002; 2004; Tota et al., 2003; Imbrogno et al., 2004; Cerra et al., 2006; 2008; Helle et al., 2007*).

Dal momento che nulla finora si conosce sui possibili effetti cardiotropi della Cts, ad eccezione di un lavoro svolto in contemporanea sul ratto (*Angelone et al., 2008*), è parso interessante verificare se essa possa esercitare un controllo omeostatico sulla performance meccanica cardiaca sia in condizioni basali che fisiopatologiche.

Utilizzando come bioassay cuori avascolari di *Rana esculenta*, dove l'assenza della componente coronarica permette di valutare effetti diretti sul miocardio, la presente ricerca ha inteso testare gli effetti cardiotropi della Cts bovina sia in condizioni basali che dopo stimolazione β -adrenergica e da endotelina-1 (ET-1). È stato, inoltre, investigato il possibile coinvolgimento del pathway EE-NO-cGMP nell'azione indotta dalla Cts nonché la possibile interazione tra Cts ed ET-1.

I risultati ottenuti in questo studio permettono di attribuire alla Cts, al pari delle vasostatine, un ruolo di primaria importanza nel mantenimento dell'omeostasi cardiaca nei vertebrati non mammiferi.

Introduzione

1. LA CROMOGRANINA A

La Cromogranina A (CGA) è una proteina anionica appartenente alla famiglia delle cromogranine/secretogranine, collettivamente nota come “granine”. Le cromogranine sono glicoproteine acide idrosolubili localizzate nella matrice dei granuli secretori elettrondensi delle cellule cromaffini, cellule derivanti dalla cresta neurale, che costituiscono la midollare del surrene ed il sistema neuroendocrino diffuso (*Taupenot et al., 2003; O'Connor et al., 1984; Winkler e Fischer-Colbrie, 1992*). Le granine si distinguono in cromogranina A (CGA), cromogranina B (CGB) (secretogranina I), cromogranina C (secretogranina II) o pancreastatina, secretogranina III/1B 1075 (SgIII), secretogranina IV (HISL-19) e secretogranina V (7B2) o peptide NESP-55 (*Feldman e Lee, 2003*). Il ruolo fisiologico delle granine non è ancora completamente definito, ma in relazione alla loro abbondanza e alla distribuzione nei tessuti neuroendocrini, sono verosimilmente coinvolte in molteplici attività biologiche intra- ed extra-cellulari.

La CGA, in considerazione delle sue caratteristiche biologiche e della sua utilità clinica, è una delle proteine più importanti. La CGA (48 KDa) è costituita da una singola catena polipeptidica di 439 residui amminoacidici, che nel genoma umano viene codificata da 8 esoni sul cromosoma 14

(posizione q32.2-q32.3) (*Murray et al., 1987; Huttner et al., 1991*). Una volta sintetizzata nel reticolo endoplasmatico rugoso, la proteina si sposta nell'apparato del Golgi per le modifiche post-traduzionali, quindi alle vescicole per l'immagazzinamento (*Taupenot et al., 2003*). La CGA subisce modificazioni post-traduzionali dovute ai siti di fosforilazione (costituiti da serina), O-glicosilazione, sializzazione e sulfatazione (grazie ai residui di tirosina). Il ponte disolfuro (S-S) all'N-terminale (posizione 17-38 pb; corrispondente ad una parte della vasostatina-1 ricco di residui idrofobici), presente anche nella CGB, contiene informazioni necessarie alla proteina per dirigersi verso l'apparato del Golgi per il processamento post-traduzionale (*Taupenot et al., 2003*). All'N-terminale è, inoltre, presente (posizione 43-45; Arg-Gly-Asp) la sequenza amminoacidica RGD, coinvolta nel trasporto intracellulare e nel successivo ancoraggio alla membrana endocellulare durante il trans-Golgi network (*Benedum et al., 1986*). Studi recenti effettuati da Mosley e collaboratori (2007) hanno evidenziato che la struttura secondaria ad alfa elica coil-coil della CGA è necessaria per il “packing” nei granuli secretori. La proteina, all'interno delle vescicole, lega numerose sostanze tra cui le catecolamine, il Ca^{2+} , l'ATP, la proencefalina ed il neuropeptide Y, con cui viene successivamente co-immagazzinata e co-secreta per esocitosi nel torrente circolatorio, per

prender parte ai processi omeostatici (*O'Connor et al., 1984; Banks e Helle, 1965*). La CGA è una proteina acida (pH 4.9), per l'alto contenuto di residui carichi negativamente: residui di acido aspartico (4%), glutammico (21%) e prolina, che rendono il peptide termostabile e gli conferiscono la capacità di legare il calcio (*Taupenot et al., 2003; Reiffen e Gratzl, 1986*). La distribuzione della proteina è ubiquitaria, essa infatti è contenuta nell'ipofisi, nel pancreas, nello stomaco, nell'intestino, nelle rimanenti ghiandole endocrine, ma anche nel SNC, SNP e nei nervi noradrenergici. La CGA è stata inoltre di recente localizzata in cellule mio-endocrine di cuore di ratto (*Steiner et al., 1990; Glattard et al., 2006*) ed nei cardiomiociti nel ventricolo umano (*Pieroni et al., 2007*).

Dalla letteratura è emerso che la CGA è il precursore di alcuni peptidi con funzioni endocrine, paracrine ed autocrine. Infatti, la CGA possiede un'importante funzione di tipo pro-ormonale dimostrata e basata sull'identificazione di potenziali siti di clivaggio nella struttura molecolare, che ne evidenzia il ruolo come precursore inattivo di peptidi biologicamente attivi, differenziati e funzionanti sia in sede intragranulare, che in sede extra-cellulare (*Metz-Boutigue et al., 1993*). La CGA subisce rimodellamento proteolitico e processamento in 12 siti di clivaggio intragranulari (*Mahata et al., 2003*). Sebbene siano possibili azioni di

clivaggio anche a carico di altre regioni della molecola, il processo proteolitico è ricorrente soprattutto a livello delle estremità N- e C-terminali (*Benedum et al., 1986*). Dalla CGA, ad opera dei pro-ormoni convertasi 1 e 2 e di una proteasi tessuto specifica, hanno origine peptidi biologicamente attivi (*Metz-Boutigue et al., 1993; Doblinger et al., 2003*). Dalla pre-proteina originano: le vasostatine (aa 1-76, aa 1-113) la cromostatina (aa 124-143), le cromacine (aa 173- 194), la pancreastatina, (aa 243-294), il WE-14 (aa 316-329) e la Catestatina (aa 344-364) (*Mahata et al., 1997; Aardal et al., 1993*) (Fig. 1).

Fig. 1 Visione schematica del trascritto primario della CGA da cui si originano peptidi CGA-derivati (*Taupenot et al., 2003*).

Normalmente nei mammiferi i livelli di CGA nel plasma sono equivalenti a 1-4 nM; concentrazioni sieriche più elevate sono state riscontrate

nell'insufficienza renale, in lesioni epatiche, nelle neoplasie prostatiche, nella gastrite cronica atrofica, nell'insufficienza respiratoria (*Taupenot et al., 2003*) e nei processi di immunità innata grazie all'attività anti-microbica (*Keiffer et al., 2003; Feldman e Lee, 2003*), in varie forme di tumore neuroendocrino (*Aardal et al., 1996; Nobels et al., 1998*) come pure in alcune forme di stress circolatorio (*Helle e Angeletti, 1994*) e nelle malattie cardiache croniche (*Corti et al., 2000*).

Ciò suggerisce che a livello cardiovascolare la CGA potrebbe svolgere un'azione di protezione in risposta a condizioni di stress, regolando il fabbisogno ematico durante situazioni di emergenza (*Helle e Angeletti 1994*). In particolare, nei pazienti con malattie cardiache croniche, queste elevate concentrazioni sono correlate con la severità della malattia, rappresentando un indicatore prognostico di mortalità (*Ceconi e al., 2002*). Aumentati livelli plasmatici di CGA sono stati riscontrati in condizioni di ipertensione arteriosa (*O'Connor et al., 2002*) ed un recente studio ha dimostrato per la prima volta la produzione e il rilascio di CGA dal ventricolo umano i cui livelli risultano incrementati nei soggetti infartuati (*Pieroni et al., 2007*). Nell'insieme, questi dati mettono in luce l'importanza della CGA nella biologia cardiaca.

2. LA CATESTATINA

2.1 Sintesi e struttura della Catestatina

La Catestatina (Cts) (CGA₃₄₄₋₃₆₄ bovina, CGA₃₅₂₋₃₇₂ umana) è un peptide attivo di 21 amminoacidi derivante dalla porzione C-terminale della CGA, a seguito di un solo clivaggio nei residui basici R e RR (Arg343, Arg366, Arg367) ad opera delle pro-convertasi. Esperimenti d'immunoprecipitazione con anti-catestatina hanno consentito l'identificazione (in base alla differenza di massa molecolare) delle varianti CGA₃₄₃₋₃₆₈ e CGA₃₃₂₋₃₃₆, anche esse rilasciate dal precursore CGA (*Lee et al., 2003*) (Fig.2).

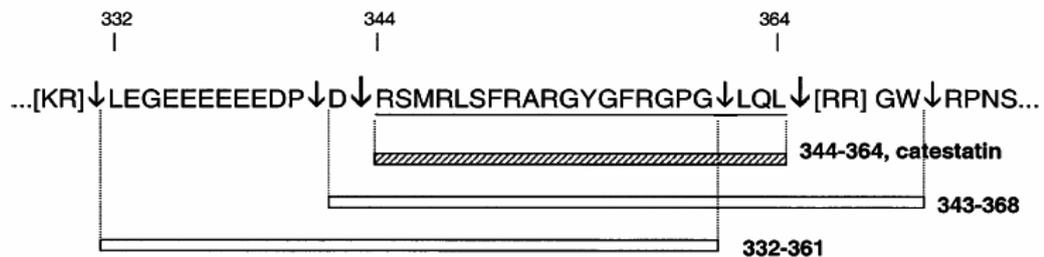


Fig. 2 Origine della Cts per clivaggio della CGA bovina. Rappresentazione schematica della sequenza aa della Cts(CGA₃₄₄₋₃₆₄) e delle varianti CGA₃₄₃₋₃₆₈ e CGA₃₃₂₋₃₃₆ (*Lee et al., 2003*).

Studi biomolecolari hanno evidenziato che l'attività inibitoria sul rilascio di catecolamine della Cts (CGA₃₄₄₋₃₆₄) dipenderebbe dalla sua composizione strutturale. Attraverso studi di homology modeling, è stato dimostrato che

la sequenza amminoacidica della Cts è altamente conservata in diverse specie di mammifero (uomo CGA₃₅₄₋₃₇₄, bue CGA₃₄₄₋₃₆₄, ratto CGA₃₆₇₋₃₈₇) e che tutte e tre le specie mostrano una simile attività inibitoria sul rilascio di catecolamine, agendo a livello del recettore nicotinic (*Mahata et al., 1997*). Tsigelny e collaboratori (1998) hanno dimostrato che la Cts risulta essere formata da due foglietti β antiparalleli a 10 Å l'uno dall'altro, connesse da loop e stabilizzate da interazioni idrofobiche tra i foglietti β (Fig. 3).

Fig. 3 Modello strutturale della Cts. A) Struttura della Cts ottenuta con Homology modeling. In rosso i siti di legame elettronegativi, in blu i siti di legame elettropositivi, in verde i siti di legame idrofobici e in marrone i siti idrofilici. **B)** Orientamento spaziale della struttura primaria della Cts ottenuto attraverso il calcolo dell'energia elettrostatica (*Tsigelny et al., 1998*).

Lo stesso lavoro riporta anche il ruolo centrale svolto da tre residui amminoacidici (Arg351 Arg353 Arg 358) ritrovati all'interno del frammento della Cts. Infatti, il peptide si lega al recettore grazie all'elettropositività di questi tre residui del loop. Le tre catene laterali

elettropositive della Cts, costituenti un motivo β -strand/loop/ β -strand, permettono un diretto orientamento del peptide nel legare il dominio extracellulare elettronegativo del recettore nicotinicco (*Tsigelny et al., 1998*) (Fig. 4).

Studi di mutagenesi sito diretta, effettuati da Mahata e collaboratori (2000), hanno confermato il ruolo chiave delle tre arginine nell'interazione con il recettore nicotinicco. E' stato infatti dimostrato che la sostituzione con alanina di una sola delle tre arginine del loop riduce di almeno 12 volte l'attività inibitoria del peptide sulla secrezione nicotino-stimolata, con un sostanziale aumento dei valori di IC_{50} della Cts. La potenzialità di questi 3 residui è fortemente condizionata dall'intorno, costituito da un core di 15 amminoacidi, infatti, la sostituzione di anche un solo amminoacido riduce l'attività inibitoria del peptide. La sostituzione amminoacidica selettiva, effettuata all'interno del core, rivela l'importanza di: Met346, Leu348, Phe350, Arg351, Arg353, Gly354, Tyr355, Phe357 e Arg358 nella secrezione delle catecolamine; anche l'inibizione nicotinicca diminuisce con la delezione di ogni singolo amminoacido. Gli amminoacidi che contribuiscono ad inibire la desensitizzazione del rilascio delle catecolamine sono: Arg344, Met346, Leu348, Ser349, Phe350, Arg353, Gly354, Tyr355, Gly356, e Arg358. Da ciò si può concludere che un

piccolo core di 15 amminoacidi è sufficiente per esercitare inibizione sul rilascio delle catecolammine, sul segnale di trasduzione cationico-nicotinico, sul blocco della desensitizzazione agonista-indotta e sulla trasduzione del segnale di cationi nicotinici (Ca^{2+} , Na^{+}) (*Mahata et al., 2000; Tsigelny et al., 1998*) (Fig. 4).

Fig. 4 Interazione della Cts bovina con il dominio extracellulare del recettore nicotino-colinergico in *Torpedo*, nella regione del poro cationico. Nella figura sono rappresentate la porzione extracellulare delle subunità α , β , γ , e δ del recettore nicotinicco *Torpedo*. In blu i residui basici corrispondenti alle due Arg 353 e 358. In bianco i residui dibasici corrispondenti alle altre subunità del recettore nicotinicco: Arg 87 e Lys 104 nella subunità α ; Arg 87 nella subunità γ . In verde le subunità recettoriali: Leu 87 e Leu 104 nella subunità β ; Leu m104 in quella γ ; Leu 89 e Tyr 106 nella subunità δ (*Tsigelny et al., 1998*).

2.2 Varianti polimorfiche della Cts umana

Studiando la sequenza amminoacidica della Cts umana (CGA₃₅₂₋₃₇₂) sono state scoperte tre varianti polimorfiche, la Pro370Leu, la Gly364Ser e l'Arg374Gln, codificate dal 4% del corredo cromosomico complessivo (*Wen et al., 2004*). La Gly364Ser, la variante meglio rappresentata, con frequenza del 3-4%, induce *in vitro* alterazione nei recettori nicotinici e *in vivo* è causa di profonde alterazioni del sistema nervoso autonomo umano. Per individuare modificazioni strutturali della CGA che potessero interferire col ruolo fisiologico del peptide, il gene della CGA è stato sequenziato in quattro gruppi etnici diversi. La variante Gly364Ser è stata riscontrata in 3 etnie (5/88 Asiatica, 5/102 bianca, 1/56 ispanica), ma non ricorre in quella Africana-Americana (*Mahata et al., 2004*). Questa variante è infatti il risultato di un'antica mutazione aplo tipica “out of Africa” insorta 69600 anni fa (*Rao et al., 2007*). Le varianti Pro370Leu e Arg374Gln sono relativamente rare, con una frequenza dello 0.6% circa. La variante Pro370Leu è stata ritrovata solo in mammiferi non primati. La variante Arg374Gln, che è la forma meno rappresentata, nello scambiare un residuo di Arg con uno di Gln provoca la distruzione del sito di processamento di-basico (Arg373Arg374) al C-terminale della Cts, con produzione di una

sequenza amminoacidica più lunga che impedisce la formazione di un peptide funzionante (*Mahata et al., 2004; Wen et al., 2004*).

Le tre varianti hanno diversa efficacia nell'inibire la sintesi ed il rilascio delle catecolammine e la desensitizzazione agonista-indotta. Per valutare la potenzialità delle varianti nell'inibire il rilascio catecolaminergico, dipendente da stimolazione nicotino-colinergica, i valori di IC_{50} rilevati sono stati comparati con quelli del frammento wilde-tipe (IC_{50} : $0.82 \pm 0.02 \mu\text{M}$). La variante Pro370Leu presenta una potenza maggiore (IC_{50} : $0.37 \pm 0.03 \mu\text{M}$), la Gly364Ser mostra una capacità intermedia (IC_{50} : $3.65 \pm 0.11 \mu\text{M}$), la Arg374Gln mostra un severo decremento della potenza (IC_{50} : $22.5 \pm 4.05 \mu\text{M}$). Tutte le varianti inibiscono la desensitizzazione recettoriale in modo dose-dipendente, con una potenza crescente dell'ordine: Pro370Leu>wilde-tipe>Gly364Ser>Arg374Gln. Seguendo lo stesso ordine crescente, la Cts e le sue varianti, sono in grado di bloccare la trascrizione del gene CGA accoppiato alla stimolazione della secrezione dei granuli (*Wen et al., 2004; Mahata et al., 2004*).

L'interesse scientifico è attualmente rivolto allo studio di mutazioni nella struttura primaria della CGA e alla loro individuazione all'interno del genoma umano. Le mutazioni possono rappresentare modificazioni, oltre che della struttura molecolare, della normale attività della CGA e della Cts.

La CGA agisce da regolatore di fenotipi intermedi che contribuiscono all'ipertensione; il peptide, infatti, risulta over-espresso in casi di ipertensione genetica (essenziale). Negli uomini è stata dimostrata una certa ereditabilità delle concentrazioni plasmatiche di CGA, conseguente allo sviluppo del fenotipo iperteso. Al contrario, i livelli circolanti di Cts (frammento capace di inibire la secrezione di catecolammine) diminuiscono sia in pazienti con ipertensione genetica che in pazienti normotesi con rischio genetico, suggerendo la presenza di una relazione tra i livelli di Cts circolante e la genesi della patologia, nonché la presenza di un fenotipo intermedio nello sviluppo ipertensivo (*Mahapatra et al., 2005*). Studi *in vivo* condotti da O'Connor e collaboratori (2002) hanno mostrato che la variante genetica Gly364Ser potrebbe essere correlata con lo sviluppo del fenotipo iperteso. Successivamente, grazie a studi caso-controllo, Rao e collaboratori (2007) hanno dato prova che la variante eterozigote Gly/Ser porta ad un incremento dell'attività dei barocettori (anche questo sembra essere un tratto ereditabile), normalmente deputati al controllo degli aumenti della pressione sanguigna, conseguenti ad un incremento dell'indice simpatico rispetto a quello parasimpatico. La variante della Cts Gly/Ser è stata rinvenuta solo nell'uomo e non in altri mammiferi, nei quali elevate concentrazioni di CGA o lesioni nei nervi

afferenti e nei nuclei dei barocettori possono provocare ipertensione. La Gly/Ser in modo del tutto casuale, altera *in vivo* l'attività del SNA, generando un polimorfismo che protegge da un futuro sviluppo del fenotipo iperteso, grazie ad un aumento dell'attività del parasimpatico e ad una diminuzione dell'indice simpato-vagale (Rao et al., 2007) (Fig. 5).

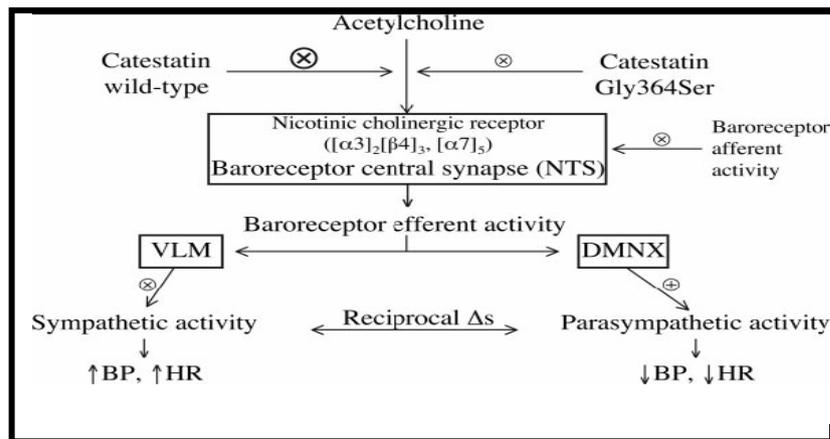


Fig. 5 Ruolo della Gly364Ser nella regolazione dell'attività del sistema nervoso autonomo. L'azione della variabile genetica è stata testata nei barocettori cardiaci a livello delle sinapsi nicotino-colinergico del nucleo del tratto solitario. La stimolazione degli stessi normalmente provoca un riflesso parasimpatico, contrastando l'azione delle catecolammine, in modo da ripristinare la pressione sanguigna. (x) indica inibizione della funzione autonoma; (X) indica un'inibizione ancora più massiccia del SNA. (+) indica stimolazione dell'attività del SNA (Biswas et al., 2008).

Altri studi, effettuati sulla varianti della CGA, hanno invece confermato la relazione esistente tra predisposizione all'insorgenza del fenotipo iperteso e varianti alleliche. Taylor e collaboratori (2000) hanno dimostrato che un difetto durante il processamento della CGA potrebbe indurre un aumento nell'esocitosi dei granuli cromaffini non maturi e di conseguenza secrezione

di CGA mal processata e inattiva. Tale ipotesi è stata confermata da Biswas e collaboratori (2008), grazie a studi *in vitro* sul processamento della CGA umana (hCGA). A seguito della digestione plasminica, dalla hCGA sono stati generati peptidi attivi: il frammento hCGA₃₆₀₋₃₇₃ della Catestatina wild-type (Cts Wt) e le varianti Gly364Ser e Arg374Gln. L'efficienza del clivaggio, nel sito dibasico Arg373↓Arg374 della hCGA₃₆₀₋₃₈₀ sintetica umana, è 3-4 volte meno efficace nella variante Pro370LeuCGA rispetto al wild type. Secondo quanto è emerso in seguito a studi di dicroismo circolare, la causa sarebbe da attribuire a un differente ammontare delle α -eliche e β -sheet tra wild-type e Pro370Leu CGA. Nel wild-type infatti, le strutture secondarie in vicinanza del sito di clivaggio rafforzano la specificità e l'accessibilità della plasmina. La minore efficacia del processo proteolitico operato dalla plasmina in Pro370Leu, accoppiato con la forte associazione alla variante etnica, suggerisce come la variante genetica possa contribuire con diversa prevalenza al rischio cardiovascolare nei diversi gruppi etnici (*Biswas et al., 2008*).

Di recente è stato ipotizzato che le varianti polimorfiche della CGA possano influenzare i livelli di Endotelina secreta nel lume vasale. Infatti, *in vitro*, su cellule endoteliali di vena ombelicale umana, la hrCGA (CGA ricombinante umana) stimola in modo dose-dipendente la secrezione di

ET-1. Questi risultati suggeriscono l'esistenza di una correlazione tra l'endotelio e il sistema simpato-cromaffine nella regolazione del tono vascolare. Non a caso, disfunzioni a livello endoteliale possono predisporre all'ipertensione e all'aterosclerosi (*Lillie et al., 2007*).

2.3 Inibizione della secrezione catecolaminergica

Se da un lato la CGA riveste un importante ruolo nella sintesi, immagazzinamento e rilascio dei granuli cromaffini sia *in vivo* che *in vitro* (*Kim et al., 2001*), la Cts è invece in grado di inibire la secrezione delle cellule cromaffini (*Simon et al., 1988*).

La Cts esercita, infatti, feedback negativo omeostatico sul rilascio di catecolammine dalle cellule cromaffini e dai nervi noradrenergici *in vitro* ed *in vivo* (*Mahata et al., 1997*). Le catecolamine, tra le più importanti l'adrenalina (epinefrina) e la noradrenalina (norepinefrina), sono rilasciate dalle ghiandole surrenali in situazioni di stress o cali di glicemia. Le catecolamine, interagendo sui recettori nicotinici, causano un'attivazione del sistema nervoso simpatico ed il generarsi di effetti tipici come tachicardia, aumenti della pressione sanguigna e dei livelli di glucosio nel sangue.

Il recettore nicotinico-colinergico appartiene alla famiglia dei recettori-canale e presenta una struttura extra-cellulare pentamerica catione-ligante composta da 5 subunità diverse: 2 α , 1 β , 1 γ o 1 ϵ , e 1 δ . Sono state identificate diverse subunità recettoriali: α 2- α 8 e β 2- β 4 nei neuroni dei vertebrati (*Lindstrom et al., 1995; Lukas e Bencherif, 1992*) e α 3, α 5, α 7, β 2, e β 4 nelle cellule di topo PC12 (*Boulter et al., 1990; Wonnacott, 1997*). Le subunità α sono affini per gli agonisti, mentre quelle β influenzerebbero il tempo di genesi della desensitizzazione (*Fenster et al., 1997*), che secondo altri studi sarebbe mediata dalla subunità α (*Vibat et al., 1995*). L'ACh si lega al recettore nicotinico sulle due subunità α , determinando l'apertura di un canale cationico e l'ingresso di Na^+ . Lo ione provoca depolarizzazione stimolando l'entrata di Ca^{2+} e la fuoriuscita di K^+ dalla membrana cellulare. Gli ioni Ca^{2+} entrano all'interno della cellula attraverso canali al calcio voltaggio-dipendenti e all'interno dei granuli cromaffini per antiporto con il Na^+ o per attivazione di una pompa Ca^{2+} -ATPasi. Il calcio entrato stimola la miosina II, che promuove la fusione delle vescicole con la membrana cellulare e la successiva secrezione di catecolammine nel torrente circolatorio (*Rosé et al., 2003*). Oltre all'ACh, tra gli agonisti nicotinici che influenzano la secrezione di catecolammine, ricordiamo la nicotina, la 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP^+), la

carbamilcolina, il polipeptide ipofisario attivante l'adenilato ciclasi (PACAP) e il peptide intestinale vasoattivo (VIP) (*Taupenot et al., 2000*). L'ACh stimola la secrezione di noradrenalina e adrenalina, mentre PACAP e VIP stimolano principalmente la secrezione di adrenalina (*Guo et al., 1994*).

Da studi *in vitro* su cellule di topo PC12, è stato dimostrato che la Cts è un antagonista nicotino-colinergico non competitivo, in quanto non compete con l'acetilcolina (ACh) per lo stesso sito di legame sul recettore nicotinic (*Mahata et al., 1997*). Inoltre, il peptide funziona come un inibitore reversibile del recettore nicotinic; esso è infatti in grado di legare tutti i sottotipi recettoriali con la stessa affinità, sia a livello della midollare del surrene che in diversi distretti e tessuti dell'organismo (*Herrero et al., 2002*). La Cts, in conseguenza dello stimolo indotto dal legame dell'ACh con il recettore nicotinic, blocca la secrezione di adrenalina e noradrenalina, agendo come un antagonista nicotinic. Ad alte dosi un agonista come la nicotina non influenza l'effetto inibitorio della Cts sul rilascio di catecolammine (*Mahata et al., 1997*). Studi effettuati sulle membrane cellulari di *Torpedo Californica* (contenenti recettori nicotinici), hanno dimostrato che la Cts, tramite il dominio elettropositivo, lega la componente elettronegativa del recettore nicotinic nell'interfaccia $\beta\text{-}\delta$.

Tale interazione minimizza le energie elettrostatiche e di Van Der Waals, che gli consentono di occludere completamente il poro cationico del recettore, andando a contrastare la trasduzione del segnale indotta dai cationi nicotinici (Na^+ e Ca^{2+}) (Taupenot et al., 2000). La Cts impedisce il passaggio di Na^+ attraverso il canale cationico (del recettore nicotinico), bloccando l'entrata degli ioni Ca^{2+} dallo spazio extracellulare, di conseguenza viene inibita la liberazione delle catecolammine e la risposta trasduzionale (Mahata et al., 1997). Il blocco della traslocazione ionica potrebbe, inoltre, avvenire mediante ingombro sterico, causato dal legame della Cts con siti ad alta affinità, oppure mediante interazione del peptide a livello di siti multipli di legame a bassa affinità, localizzati all'interfaccia tra recettore e membrana lipidica (Galzi e Changeux, 1995; Lèna e Changeux, 1993) (Fig. 6).

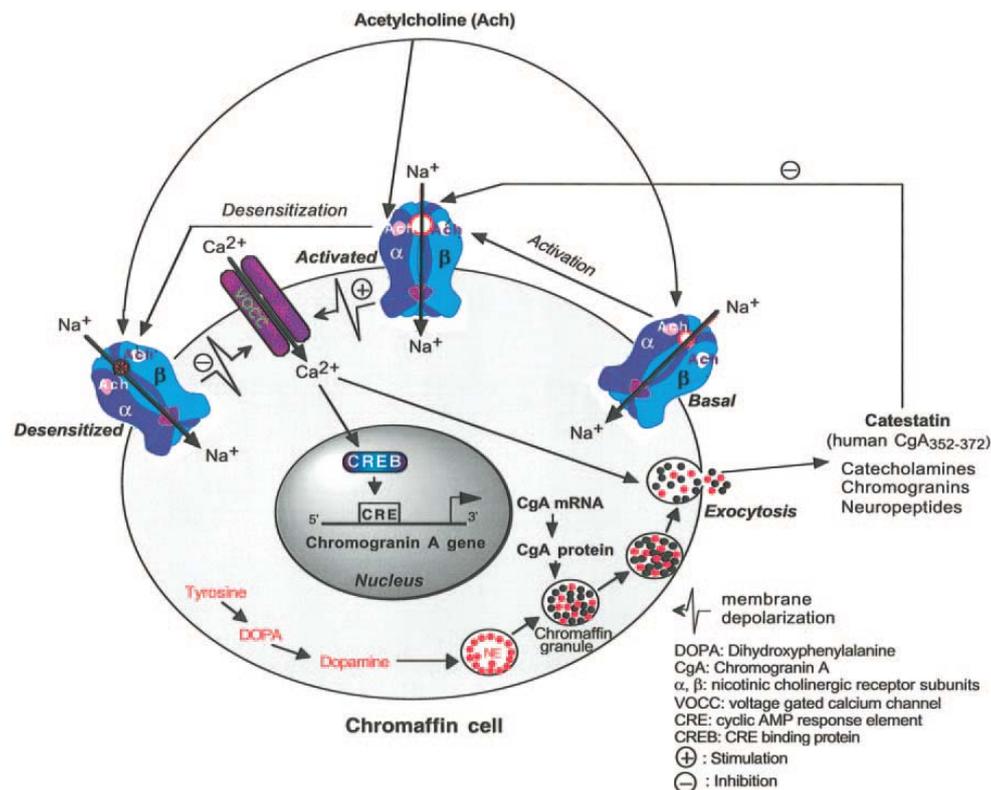


Fig. 6 Modalità d'azione della Cts nella secrezione catecolaminica dalle cellule cromaffini. L'ACh è attiva sui recettori neuronali colinergici. Lo stimolo nicotino-colinergico provoca depolarizzazione della membrana e conseguente ingresso di Ca²⁺ attraverso canali voltaggio dipendenti. Il calcio attiva la Proteina Chinasi K (PKC), la quale fosforila ed attiva la proteina la MAPK (mitogen activated protein kinase). La MAPK attiva mediante fosforilazione il fattore di trascrizione CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding Protein). Quest'ultimo lega specifiche sequenze di DNA che inducono la trascrizione del gene codificante per la CGA (Mahata et al., 2004).

Mahata e collaboratori (1999) hanno, inoltre, evidenziato che la Cts modula la desensitizzazione dei recettori colinergici, mediata da agenti nicotinici, in modo dose-dipendente. L'esposizione persistente ad un agonista causa desensitizzazione, porta cioè ad una disattivazione del recettore, che ha come conseguenza una riduzione dell'effetto stimolatorio. Il recettore

nicotinico, a seguito di una continua esposizione all'agonista, perde la capacità di andare incontro al cambio conformazionale necessario per l'apertura del canale ionico transmembrana. L'azione inibitoria che il peptide esercita sulla secrezione delle catecolammine si effettua solo quando la depolarizzazione della membrana plasmatica e la trasduzione del segnale sono indotte dallo stimolo nicotinico, e non nel caso in cui vengano indotte da uno stimolo differente, come un normale potenziale d'azione. La Cts non ha infatti effetto su agenti che bypassano il recettore nicotinico per depolarizzare la membrana, come KCl e ATP (che apre il canale al potassio), dimostrando specificità solo per il recettore nicotinico (*Mahata et al., 1999*). Questo fenomeno può essere modulato da vari fattori non competitivi quali la sostanza P (*Mahata et al., 2000*), il calcio, la calcitonina (*Ochoa et al., 1989*) e la fosforilazione del recettore (*Huganir et al., 1986*). La sostanza P agisce come la Cts sul rilascio delle catecolammine, ma è meno potente. Il neuropeptide P, a livello del complesso ionoforo del recettore, opera in due modi diversi: inibisce la sintesi di catecolammine tramite agonisti nicotinici o inibisce la desensitizzazione recettoriale (*Mahata et al., 2000*).

2.4 Azione antimicrobica della Cts

Studi recenti hanno dimostrato che la CGA è localizzata anche nelle cellule immunitarie e che il suo processamento favorisce la formazione di peptidi ad attività anti-microbica coinvolti nei processi infiammatori. La porzione N-terminale della Cts, chiamata Cateslitina (bCGA₃₄₄₋₃₅₈), è una componente dell'immunità innata sia per la natura cationica, tipica dei composti antibatterici, che per il rilascio di istamina ad azione immunitaria paracrina/endocrina. Il frammento inibisce la crescita di batteri, funghi e lieviti, senza mostrare alcuna attività emolitica nei confronti degli eritrociti. In particolare agisce sia su batteri Gram (+) come *M. luteus* e *B. megaterium*, che su batteri Gram (-) come *E. coli*. Esplica attività antifungina contro *N. crassa* e contro una varietà di funghi filamentosi (*A. fumigatus*, *F. culmorum*) e diverse forme di Candida (*C. albicans*, *C. tropicalis*). Tale attività antimicrobica è stata osservata sia per la Cts bovina (CGA₃₄₄₋₃₅₈), che per le due varianti polimorfiche umane (Pro370Leu, Gly364Ser). La Cts umana ha un'azione anti-microbica meno marcata, suggerendo il ruolo cruciale esercitato dal residuo di arginina N-terminale presente nella bCGA₃₄₄₋₃₅₈ la cui assenza provoca una netta riduzione dell'efficacia battericida e fungicida della Cts (Briolat et al., 2005).

L'epitelio dell'ospite stabilisce una barriera protettiva contro le infezioni grazie alla produzione di peptidi antimicrobici (antimicrobial peptides, AMPs). La potenzialità della Cts è supportata dall'osservazione che la la CGA è espressa nei cheratinociti. Nella pelle umana la CGA prodotta da eventi proteolitici viene processata in Cts, che esplica funzione antimicrobica. La funzione antimicrobica della Cts è simile a quella delle AMPs, dipende dalle condizioni di crescita e dalla gravità del batterio e può indurre distruzione della membrana cellulare (*Radek et al., 2008*).

2.5 Azione della Cts a livello cardiovascolare

Nel 1999 Mahata e collaboratori avevano ipotizzato che la Cts potesse avere un ruolo chiave nel controllo omeostatico della pressione arteriosa attraverso un'azione vaso-depressiva. Studi su cuori di ratto in cui il sistema simpatico era stato attivato mediante stimolazione elettrica, hanno evidenziato una marcata riduzione della pressione sanguigna (BP) conseguente ad infusione di Cts esogena per via endovenosa (*Mahapatra et al., 2005*). Già in precedenza era stato osservato che l'azione vasodilatatrice si manteneva costante anche dopo il blocco adrenergico (*Kennedy et al., 1998*). La Cts, inoltre, non modifica i livelli di noradrenalina nel plasma ma aumenta i livelli di adrenalina di ben 11 volte

(*Kennedy et al., 1998*). Studi *in vivo* condotti sui mammiferi, hanno mostrato che la Cts antagonizza la risposta pressoria prolungata del neuropeptide Y e dell'agonista del recettore Y1, il neuropeptide Y-[Leu 31,Pro 34] (*Kennedy et al., 1997*). La capacità vasodilatatoria della Cts sembra mediata almeno in parte dal rilascio di istamina, agonista del recettore H₁. L'istamina, attraverso i recettori H₁, riduce la pressione sanguigna e la risposta alla stimolazione simpatica, mediante sintesi di ossido nitrico e apertura di canali per K⁺ sensibili all'ATP (*Champion e Kadowitz, 1997*). A tal proposito, Kennedy e collaboratori (1998) hanno dimostrato che il trattamento del recettore H₁ con un antagonista, come l'idrazina, previene l'azione vasodilatatoria della Cts. E' stato, inoltre, osservato che i livelli endogeni di istamina aumentano in seguito alla somministrazione di Cts di ben 21 volte. L'istamina media il rilascio di adrenalina, che comporta ulteriore vasodilatazione attraverso l'interazione con i recettori β₂ adrenergici. Come la Cts, molti altri peptidi tra cui il neuropeptide Y, la bradichinina e la sostanza P stimolano il rilascio d'istamina (*Emadi-Khiav et al., 1995; Cross et al., 1996; Devillier et al., 1989*). Caratteristiche comuni nei peptidi che mediano il rilascio di istamina sono: la carica positiva (la Cts ha una netta carica positiva +5, mentre la Cromogranina ha carica negativa -2) (*Cross et al., 1996*;

Devillier et al., 1989), l'anfifilicità (*Mousli e Landry, 1994*) e specifiche strutture secondarie (foglietto β) anfipatiche all'estremità N-terminale (*Repke et al., 1987*).

Mahapatra e collaboratori (2005) hanno confermato il ruolo della Cts nel regolare la pressione sanguigna attraverso studi su topi Knock-out per il gene della CGA (CGA^{-/-}). Si è infatti osservato che la delezione del gene, oltre a causare mancata sintesi della CGA e della Cts, determina una mancata regolazione della pressione sanguigna, favorendo quindi l'evolversi dell'ipertensione. Nei topi Knock-out per la CGA la pressione sanguigna sistolica e diastolica risultano elevate almeno cinque/sei volte in più rispetto ai ceppi wild-type.

Recentemente, è stato osservato che nel preparato cardiaco di ratto alla Langerdoff la Cts esercita un effetto cardio-soppressivo ed è capace di contrastare la stimolazione sia adrenergica che da endotelina-1 (*Angelone et al., 2008*). Gli autori hanno ipotizzato, pertanto, che la Cts possa rappresentare una promettente alternativa per una protezione naturale contro l'aumento dell'attivazione beta-adrenergica nella cardiomiopatia ipertensiva. Infine, considerato il ruolo fisiopatologico dell'ET-1 sul cuore stressato ed ischemico, la dimostrazione che la Cts contrasta l'influenza

dell'ET-1 potrebbe rappresentare un altro effetto potenzialmente benefico di questo peptide CGA-derivato (*Angelone et al., 2008*).

3. FATTORI RILASCIATI DALL'ENDOTELIO ENDOCARDICO

L'endotelio endocardico (EE) è un sottile strato di cellule che riveste il lume delle camere cardiache entrando in contatto con il sangue che circola nella cavità del cuore. L'EE, come l'endotelio vascolare, controlla e mantiene la performance cardiaca, attraverso il rilascio di una serie di agenti autocrino-paracrini che influenzano il metabolismo, la crescita, la contrattilità e la ritmicità cardiaca. Tra questi un ruolo fondamentale è svolto dall'ossido nitrico e dall'endotelina.

3.1 Ossido nitrico

Nei sistemi biologici l'ossido nitrico (NO) agisce come messaggero intra- ed inter-cellulare. In seguito ad adeguata stimolazione, le cellule endoteliali producono NO che in parte diffonde nel compartimento ematico, riducendo l'aggregabilità piastrinica e l'adesività dei leucociti alle pareti dei vasi sanguigni, ed in parte raggiunge la sottostante muscolatura liscia inducendone il rilasciamento (*Brennan et al., 2002*). L'ossido nitrico viene

sintetizzato nel citosol, a partire dalla L-arginina, grazie ad una famiglia di enzimi conosciuta come ossido nitrico sintasi (NOS). Sono state identificate tre isoforme NOS: due di tipo costitutivo, la NOS neuronale o nNOS (NOS1) e la NOS endoteliale o eNOS (NOS3), ed una di tipo inducibile, la iNOS (NOS2) (*Lamas et al., 1992*). Le NOS costitutive sono costituite da un omodimero contenente un dominio C-terminale ad azione reduttasica (con NADH e FAD o altri co-substrati redox), un dominio N-terminale ad azione ossidasica (contenente eme) e un dominio centrale di legame per la Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CAM). La CAM ha effetto regolatore, inducendo una modificazione della conformazione della NOS, consente l'interazione spaziale tra i domini N- e C-terminale (*Beasley et al., 1991*). Le tre isoforme catalizzano la produzione di NO attraverso la stessa via biochimica, ma variano nell'espressione tissutale e nella richiesta di calcio intracellulare.

La eNOS è stata localizzata nelle cellule della vascolatura coronarica, in quelle dell'EE e nei cardiomiociti (*Feron et al., 1996*), mentre la nNOS è stata identificata nei nervi del sistema autonomo a livello cardiaco, nei gangli e nei cardiomiociti (*Dason et al., 2005; Xu et al., 1999*). Un passo avanti nelle ricerche è stato dato dalla scoperta che nei cardiomiociti la eNOS e la nNOS sono espresse in compartimenti subcellulari distinti

(*Feron et al., 1996; Xu et al., 1999; Williams et al., 2006*), in cui essi potrebbero essere accoppiati a distinte molecole effettrici, provocando differenti effetti sulla contrattilità. La eNOS, l'isoforma meglio caratterizzata a livello cardiaco, è principalmente localizzata nelle caveole, in cui è localizzata anche la caveolina-1 e dove diversi segnali di traduzione vengono regolati dallo NO (*Shaul, 2002*). L'interazione della eNOS con la caveolina-1 causa inibizione dell'enzima, mentre la calmodulina attivata dal calcio, compete con la caveolina per l'attivazione dell'enzima. Le Heat Shock Protein 90 (HSP90) stimolano l'attività della eNOS, aumentando il legame Ca^{2+} /calmodulina all'enzima.

La nNOS miocardica è stata per la prima volta localizzata nel reticolo sarcoplasmatico (SR) (*Xu et al., 1999*), e successivamente ulteriori studi hanno evidenziato che questa isoforma lega anche alcune proteine della membrana sarcolemmale (*Williams et al., 2006; Xu et al., 2003*) in modo particolare nelle patologie cardiache (*Damy et al., 2003*). L'espressione, la localizzazione intracellulare e l'attività delle isoforme costitutive della NOS potrebbero cambiare in presenza di patologie cardiache portando ad effetti funzionali alterati (*Damy et al., 2003; 2004; Bendall et al., 2004*). Anche la iNOS potrebbe essere espressa in diversi tipi cellulari (endoteliali, cardiomiociti e cellule infiammatorie) (*Massion et al., 2005*).

Nel cuore, la maggior parte degli effetti indotti dallo NO sono mediati dall'attivazione della guanilato ciclastasi solubile (GCs), con conseguente aumento della concentrazione intra-cellulare del cGMP (*Ignarro et al., 1999*). Tuttavia, sono stati anche riportati effetti dello NO mediati da meccanismi cGMP-indipendenti (*Balligand, 2000*) (Fig. 7).

Studi *in vitro* hanno evidenziato che lo NO esogeno a basse concentrazioni induce un effetto inotropo positivo, mentre ad alte dosi causa un effetto inotropo negativo (*Massion et al., 2003*). Tale effetto bifasico appare mediato dai livelli di cGMP, che a dosi diverse può agire su proteine bersaglio come la proteina chinasi G (PKG) e la cAMP fosfodiesterasi stimolata dal cGMP (PDE2). Quando il cGMP attiva la PKG, si ha inibizione diretta della corrente del Ca^{2+} dai canali VOC (voltage dipendenti), normalmente stimolata dalla PKA, e iperpolarizzazione della membrana plasmatica (*Mery et al., 1993; Wahler e Dollinger, 1995*). Se il cGMP attiva la PDE2, si ha riduzione dei livelli intracellulari di cAMP e dell'attività della PKA, quindi della corrente del calcio (*Fischmeister et al., 2005*). L'effetto cardio-inibitorio è dunque il risultato della diminuzione della concentrazione del Ca^{+2} intracellulare, dovuta non solo all'inibizione della cascata trasduzionale del cAMP, ma anche all'iperpolarizzazione della membrana plasmatica, per attivazione della pompa Na^+ -ATPasi e dei canali

del K^+ -calcio attivati, che vengono modulati dalla PKG (*Massion et al., 2003*).

Fig. 7 Pathways dell' NO nei cardiomiociti. In alto: Compartimentazione subcellulare delle isoforme enzimatiche della NOS (eNOS, nNOS, iNOS, e mtNOS) nei cardiomiociti. (caveole, SR-T-giunzioni tubulari, RS, mitocondri). L'effetto della eNOS dipende da uno specifico stimolo (agonisti del β_3 -recettore adrenergico e M2 muscarinico). **A sx:** effetti della stimolazione β -adrenergica sull'accoppiamento eccitazione-contrazione. **A dx:** effetti modulatori dello NO sul pathway β -adrenergico ed effetti cGMP-dipendenti. **In basso:** PKG fosforila la proteina contrattile TnI (troponina), riducendo la sensibilità del miofilamento al Ca^{+2} . La nNOS sembra essere coinvolta nella modulazione dell'accoppiamento eccitazione-contrazione, attraverso una regolazione dei depositi di Ca^{+2} del RS (*Massion et al., 2003*).

3.2 Endotelina-1

L' Endotelina-1 (ET-1) è un peptide vasoattivo di 21 amminoacidi, utilizzato come marker della funzionalità endoteliale, ed identificato da Yanagisawa e collaboratori (1988) nel surnatante di colture di cellule endoteliali aortiche di maiale (ECs). Tra i fattori secreti dall'endotelio, l'ET-1 è il meglio caratterizzato e presenta un potere vasocostrittore 10 volte superiore rispetto all'angiotensina-1 e 2 (*Polontchouk et al., 2002*). L' ET-1, *in vitro*, sostiene la contrazione del muscolo liscio vascolare di arterie e vene (*Inoue et al., 1989; Gillespie et al., 1986*) ed *in vivo* è un potente vasocostrittore coronarico (*Lerman et al., 1991*), renale e sistemico (*Miller et al., 1989*). Dall'analisi genetica dello mRNA sono state identificate tre isoforme ET-1,-2,-3 (*Inoue et al., 1989; Masaki, 2004*) ed una quarta isoforma nota come VIC (vasoactive intestinal contracting peptide), identificata nel topo, un analogo/ortologo specie-specifico dell'ET-2 umana (*Bloch et al., 1991; Kotake-Nara e Saida, 2006*). Lo mRNA dell'ET-1 è stato rinvenuto anche in cellule endoteliali cardiache, cellule epiteliali, macrofagi, fibroblasti, miociti, cellule del SNC, cellule endometriali ed epatociti (*Giannessi et al., 2001*). La sintesi dell'ET-1 avviene nel citosol delle cellule endoteliali ed è regolata a livello genico. L'espressione è stimolata da fattori fisici e chimici, inclusi stress meccanico, ipossia,

angiotensina II, fattori di crescita e citochine (*Maemura et al., 1992*). Gli effetti stimolatori generalmente coinvolgono la mobilitazione cellulare di Ca^{2+} . Al contrario, l'espressione dell'mRNA dell'ET-1 è inibita dallo NO, dai peptidi natriuretici, dalla prostaciclina, dall'eparina e dagli aumenti del flusso ematico; quest'ultimo determina un aumento del rilascio di NO attivato dai recettori per lo shear stress posti sulle cellule endoteliali (*Kourembanas et al., 1993*). In risposta agli stimoli di breve durata, l'ET-1 può essere secreta rapidamente, indicando che il peptide è parzialmente immagazzinato nelle cellule endoteliali (*McClellan et al., 1996; Russell et al., 1998; Takahashi et al., 2005*). Il prodotto iniziale derivante dal gene dell'ET-1 è un peptide chiamato prepro-ET-1 (contenente circa 200 aa), che è trasformato nella "BigET-1" da un enzima denominato "Furin", appartenente alla famiglia delle sublisine (*Blais et al., 2002*). Successivamente, l'enzima di conversione delle endoteline (ECE), di cui sono state rilevate diverse isoforme, clivano la "BigET-1" (contenente circa 40 aa) liberando l'ET-1 matura nella circolazione sistemica (*D'Orleans-Juste et al., 2003*). Nel coniglio ed in altre specie, inclusa quella umana, la BigET-1 esogena può essere anche metabolizzata in un peptide contenente 31 aa [ET-1 (1-31)] da una chinasi. Comunque, dato che le sue azioni *in vivo* sono simili a quelle dell'ET-1, l'ET (1-31) è probabilmente in parte

convertita nel peptide attivo di 21 aa nell'organismo (*Fecteau et al., 2005*) (Fig. 8).

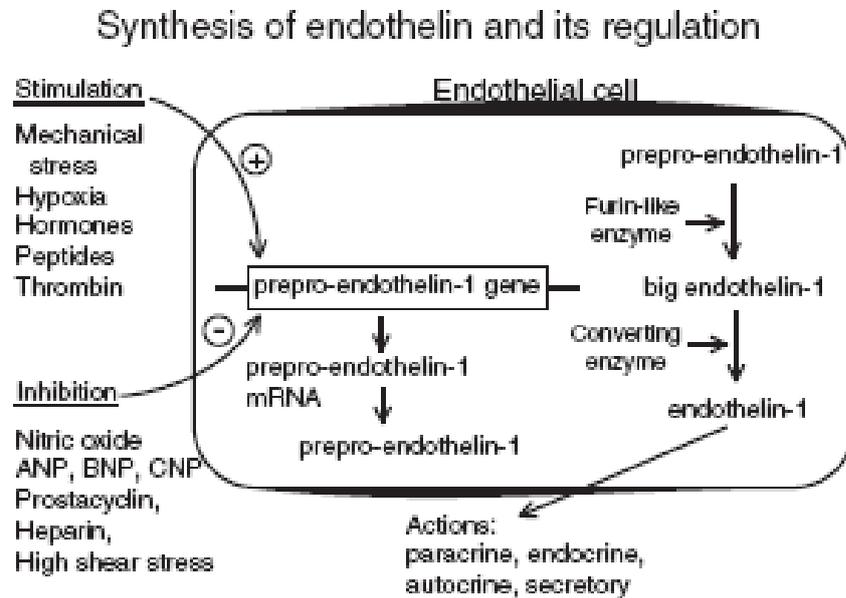


Fig. 8 Sintesi di ET-1 Nel citosol lo mRNA codifica per il precursore polipeptidico di 203-212 aa, la preproET-1. La proteina viene rilasciata dal frammento C-terminale per clivaggi operati da endopeptidasi della famiglia delle subtilisine, che danno origine alla BigET-1 di 37-41aa. La BigET-1 è poi clivata da ECE-1 e ECE-2 “enzima di conversione dell'ET”, per formare il peptide attivo di 21aa (*Giannessi et al., 2001*).

L'ET-1, oltre all'azione vasocostrittrice, esercita un'azione proliferativa sulle cellule del muscolo liscio vascolare (MLV), stimola la produzione di citochine e fattori di crescita, induce la produzione di metallo proteinasi della matrice extracellulare e fibronectina, potenzia l'effetto del fattore di crescita trasformante-beta (TGF- β) e di fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF), modula la sintesi della matrice extracellulare, regola la

permeabilità vascolare e interviene nella stimolazione del sistema nervoso simpatico (*Luscher et al., 2000*). L'ET-1 ha, inoltre, un'azione proinfiammatoria (*Seccia et al., 2003*) stimolando la produzione piastrinica e la produzione di aldosterone (*Galie et al., 2004; Belloni et al., 1996*).

L'ET-1 agisce attraverso l'attivazione di 2 recettori, identificati nel 1990 come ETA ed ETB (*Masaki, 2004*). I 2 recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G; ETA è accoppiato alle proteine Gq e Gs, ETB alle proteine Gq e Gi (*Takagi et al., 1995*). È stato descritto un altro tipo di recettore, ritrovato solo nella *Rana melanofores* e denominato ETC, che è presente sulle cellule endoteliali ed è affine per ET-3 (*Karne et al., 1993*). I recettori hanno una estesa diffusione: muscolo vascolare liscio (MLV), cellule endoteliali cardiache (*Masaki, 2004*), cellule miocardiche, arterie coronariche, vasi polmonari (*Moody et al., 1990*), glomerulo renale (*Martin et al., 1989*), placenta umana (*Nakajo et al., 1989*), utero (*Bouso-Mittler et al., 1989*), muscolo liscio bronchiale, nervi periferici (*Takuwa et al., 1990*), osteoblasti (*Davenport et al., 1989*), ganglio basale, tronco cerebrale, cellule del midollo spinale (*Shinmi et al., 1989*). La struttura recettoriale comprende: un'estremità N-terminale extracellulare (coinvolta nel legame con l'ET), sette domini transmembranari (con 20-27 aa idrofobici) e un'estremità C-

terminale intracellulare-citoplasmatica (*Sokolovsky, 1995*). I ponti disolfuro e il dominio C-terminale delle ET sono punti cruciali, tanto per l'unione del peptide al recettore specifico, quanto per il mantenimento dell'attività biologica (Fig. 9) (*Inoue et al., 1989*).

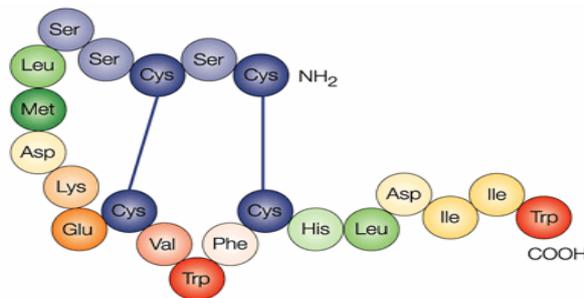


Fig. 9 Struttura dell ET-1 In blu sono riportate le 4 cys coinvolte nella formazione di 2 ponti disolfuro intramolecolari.

Il recettore ETA presenta un'affinità 10 volte maggiore per l'ET-1 ed l'ET-2, controlla le funzioni cardiovascolari e respiratorie mediando vasocostrizione e broncostrizione, ed induce contrazione del muscolo liscio uterino e secrezione di aldosterone. A livello cardiaco il recettore ETA è espresso principalmente sui miociti ed induce effetti inotropi positivi (*Brunner et al., 2006*).

Il recettore ETB, con affinità maggiore per ET-1 ed ET-3, è connesso ad un effetto vasorilassante transitorio, inibisce l'aggregazione piastrinica e la proliferazione miocardica e vascolare. È stato evidenziato che esistono due sottotipi recettoriali per il recettore ETB che mediano effetti opposti sulla contrattilità: ETB1 e ETB2 presenti sia a livello cardiaco (*Leite-Moreira e*

Bras-Silva 2004) che vascolare (*Endoh et al. 1998*). I recettori ETB1, localizzati sull'endotelio vascolare ed endocardico, sono responsabili della vasodilatazione e dell'inotropismo negativo (*Leite-Moreira e Bras-Silva, 2004*), mentre i recettori ETB2, localizzati sulla muscolatura vascolare e sulle cellule miocardiche, mediano vasocostrizione e inotropismo positivo (*Takanashi e Endoh, 1991*). Nella tabella 1 sono riportati gli effetti inotropi eterogenei riscontrati in diversi preparati cardiaci sia di mammiferi, incluso l'uomo, che di non mammiferi. Tali differenze possono essere dipendenti dalla specie e dal modello sperimentale utilizzato.

Infine, i recettori ETB localizzati sulle cellule muscolari lisce di arterie potrebbero essere coinvolti nelle funzioni di clearance dell'ET-1. Questi processi, che hanno luogo soprattutto nei polmoni, ma anche in altri organi come reni, fegato e cuore servono a mantenere bassi i livelli di ET-1 nei tessuti, in un range di concentrazioni tali da determinare vasodilatazione (*Brunner et al., 2006*).

ET-1	Positive inotropic effect	Negative inotropic effect	REFERENCES
RAT (ventricular myocytes)	*		Takanashi and Endoh, 1991
RAT (ventricular myocytes)		*	Cuello et al., 2007
GUINEA PIG (ventricular myocytes)	*		Takanashi and Endoh, 1991
RABBIT (ventricular myocytes)	*		Takanashi and Endoh, 1991
FERRET (ventricular myocytes)	*		Qiu et al., 1992
HUMAN	*		Meyer et al., 1996
MOUSE (strip of ventricle)		*	Izumi et al., 2000
MOUSE (ventricular myocytes)		*	Sakurai et al., 2002
DOG (ventricular trabeculae)		*	Zhu et al., 1997
SALMON	*		Vierimaet al., 2006

Tab.1 Effetti dell'ET-1 a livello cardiaco.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione a livello cardiaco, l'ET-1 legandosi al recettore ETA sui miociti, attiva tramite proteina Gq la fosfolipasi C, che sintetizza IP3 [3'inositolo(1,4,5) trifosfato] e DAG (diacilglicerolo). I secondi messaggeri a loro volta attivano la proteina

chinasi C (PKC) e i canali al Ca^{+2} di tipo L del reticolo sarcoplasmatico (RS). Il DAG incrementa l'antiporto Na^+/H^+ con alcalinizzazione dello spazio intracellulare e successivo incremento dei livelli di calcio (Fig. 10). Il Ca^{2+} può, inoltre, comportare la conseguente depolarizzazione della membrana cellulare, per apertura dei canali al calcio voltaggio-dipendenti (*Yanagisawa et al., 1988; Goto et al., 1989*).

A livello miocitario i meccanismi, responsabili dell'effetto inotropo negativo indotto dall'ET-1, nonché il sottotipo recettoriale coinvolto, sono ancora poco chiari. Considerata la localizzazione dei recettori ETB1 a livello endocardico, l'attivazione del pathway NO-cGMP potrebbe essere responsabile dell'effetto inotropo negativo come si verifica per il rilassamento a livello dell'endotelio vascolare (*Brunner et al., 2006*).

Fig. 10 Trasduzione del segnale dell'ET-1. Meccanismi trasduzionali positivi e negativi nel cuore indotti dall'Endotelina-1 mediante interazione sui ETR (*Brunner et al., 2006*).

3.3 Meccanismo d'interazione NO-ET-1 a livello cardiaco

L'ET-1 e l'ossido nitrico, a livello cardiaco, hanno generalmente azioni contrapposte e la loro produzione in condizioni fisiologiche è molto importante per il mantenimento dell'omeostasi cardiaca; infatti cambiamenti della concentrazione di uno dei due possono determinare alterazioni e disordini cardiaci. La produzione di ET-1 viene stimolata da fattori come: catecolammine, adrenalina, angiotensina II, vasopressina, mediatori procoagulanti, etc (*Kirihara et al., 1989; Schini et al., 1989*). Per contro, vasodilatatori come NO, prostaglandine, peptide natriuretico e l'aumento del flusso sanguigno inibiscono la produzione di ET-1

(*Kourembanas et al., 1993; Morawietz et al., 2000; Balakrishnan et al., 1996*). L'ET-1, a sua volta, limita la produzione di NO e down-regola l'espressione dell'eNOS nelle cellule endoteliali cardiache (*Ramzy et al., 2006*). La modulazione della produzione di ET-1 operata dallo NO può avvenire mediante una via cGMP-indipendente (*Brunner et al., 1996*) o cGMP-dipendente (*Ohkita et al., 2003*). In quest'ultimo caso, l'ET-1 interagendo con il recettore ETB1 a livello endoteliale, determina il rilascio di NO, che grazie alla successiva sintesi del cGMP media effetti inotropi negativi. (*Leite-Moreira e Bras-Silva, 2004*). Una diretta interazione inibitoria, cGMP-dipendente, indotta dallo NO, è stata dimostrata anche nel miocardio umano (*Wiley e Davenport, 2001*).

Il feed-back negativo, che lo NO sviluppa nell'inibire la sintesi di ET-1, dimostra che in condizioni fisiologiche l'effetto indotto dall'ET-1 è bilanciato dalla produzione di NO. È pertanto evidente che la ridotta biodisponibilità dello NO giochi un ruolo chiave nell'omeostasi cardiaca non solo per i suoi effetti diretti, ma anche per la modulazione di altri importanti sistemi cardioattivi, quale appunto quello dell'ET-1 (*Laflamme et al., 2006*). Elevati livelli di ET-1 in diverse malattie cardiovascolari, come ad esempio l'aterosclerosi, sono stati associati ad una ridotta produzione di NO (*Battistini et al., 1993*).

Materiali e Metodi

1. TRATTAMENTO DEGLI ANIMALI

Sono stati utilizzati esemplari di *Rana esculenta*, di entrambi i sessi, del peso medio di $21\text{g} \pm 2$ (media \pm ES), provenienti da Arzano (Napoli). Gli esemplari sono stati tenuti a digiuno in un acquaterrario a temperatura ambiente, dove sono stati stabulati prima di essere utilizzati per gli esperimenti. All'inizio dell'esperimento per ogni animale è stato segnalato peso corporeo e sesso.

2. PROCEDURA DI ISOLAMENTO

Le rane sono state decapitate, despinalizzate per eliminare i riflessi e fissate su una base di dissezione su ghiaccio. La procedura di isolamento del cuore si effettua praticando un'incisione ventrale a T sulla cute, tagliando i muscoli sottostanti e lo sterno. Allo stereomicroscopio si elimina il pericardio e si passa a legare ed incannulare i vasi. Si lega il tronco aortico destro e si taglia a monte del nodo; spostando lateralmente il cuore vengono messe in evidenza le precave destra e sinistra legate e tagliate; la vena polmonare viene legata e tagliata prima della biforcazione. Con una cannula di polietilene riempita di eparina si passa ad incannulare il tronco aortico sinistro, dopo aver praticato un'incisione a becco di flauto sul vaso.

In seguito si solleva il ventricolo e si separa il cuore dai legamenti mettendo in evidenza il seno venoso che rappresenta la via d'ingresso dove, dopo aver praticato un'incisione sul vaso, si inserisce un'altra cannula riempita di soluzione fisiologica. Il cuore così isolato viene collegato all'apparato di perfusione. A fine esperimento si registra il peso di atrio e ventricolo.

3. APPARATO DI PERFUSIONE

L'apparato di perfusione è costituito da una camera di plexiglas in cui viene alloggiato il cuore e da due serbatoi uno d'ingresso (*input*) e uno d'uscita (*output*) (Fig. 12). La camera di perfusione viene riempita di soluzione fisiologica in modo da ricoprire completamente il cuore per evitarne la disidratazione, che resta sospeso nella cameretta grazie agli attacchi per le cannule presenti nel coperchio. Il serbatoio d'ingresso è rifornito del liquido di perfusione per mezzo di una pompa peristaltica, che lo preleva da un serbatoio principale. Il serbatoio di uscita è posto ad un'altezza di 40 cm e riceve il flusso in uscita. Le differenze di altezza tra il livello del liquido di perfusione nei serbatoi di ingresso e di uscita e quello nella camera, costituiscono rispettivamente le pressioni di ingresso e di uscita dalle quali dipendono il precarico (*preload*) ed il postcarico (*afterload*), i due principali parametri che influenzano la performance

cardiaca *in vitro*. A monte della cannula di uscita ed a valle di quella di entrata, sono posizionate due derivazioni connesse con un Trasduttore di pressione MP-20D (Micron Instruments, Simi Valley, CA, USA), che viene a sua volta connesso con un Sistema di acquisizione dati con interfaccia McLab (Ugo Basile, Comerio, Italia). Tale sistema è collegato ad un computer che elabora i dati attraverso il Software Chart 4.2, che permette di registrare i dati sull'Hard-disk e di visualizzarli in tempo reale su monitor (Fig. 13).

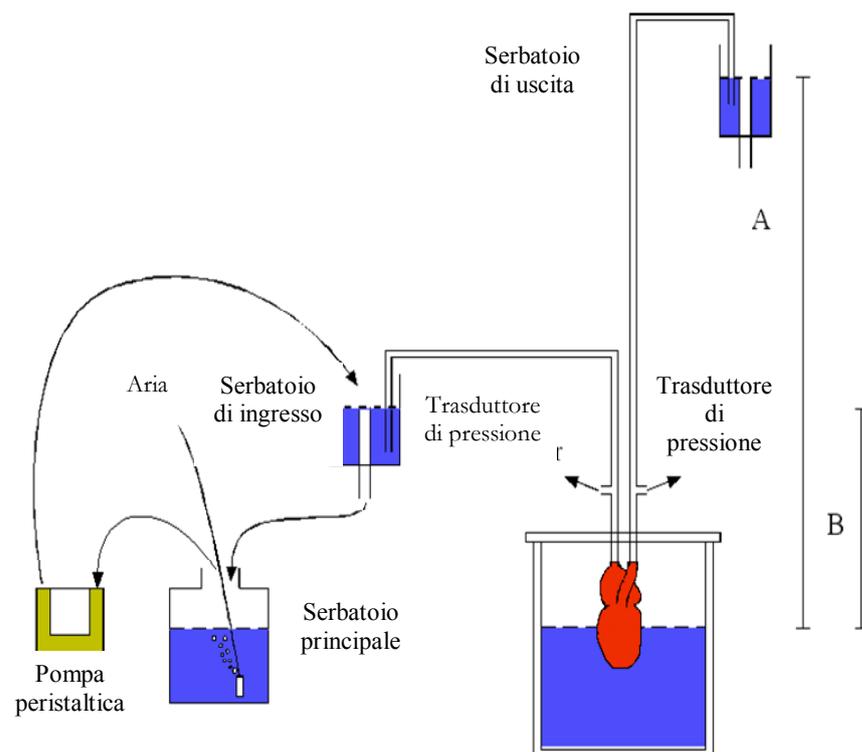


Fig 12 Apparato di perfusione: A= Post-carico B= Pre-carico

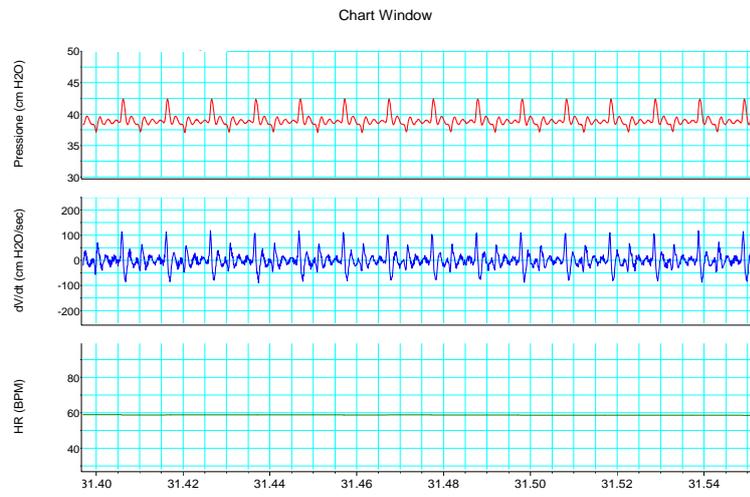


Fig 13 Classico tracciato del PowerLab

4. COMPOSIZIONE DEL PERFUSATO

La soluzione di perfusione ha la seguente composizione: NaCl (156.6 g/l), KCl (0.186 g/l), CaCl₂ (0.11 g/l), Na₂HPO₄ (0.475 g/l), NaH₂PO₄ (0.1 g/l), glucosio (1.009 g/l). La soluzione di perfusione è areata continuamente con una pompa ad aria. Il pH è mantenuto intorno ad un valore di 7.3 - 7.4.

5. MISURE E CALCOLI DEI PARAMENTRI CARDIACI

I valori di pressione di ingresso e di uscita, definiti rispettivamente *preload* e *afterload*, sono stati rilevati attraverso un trasduttore di pressione a sua volta collegato con un sistema di acquisizione dati con interfaccia PwerLab. Gli stessi valori sono stati riferiti ai livelli di perfusato nella camera, ed i valori pressori rilevati sono stati corretti per la resistenza delle cannule ed espressi in cm H₂O.

Possono essere analizzati i seguenti parametri emodinamici:

1. ***La gittata cardiaca (CO)*** espressa in ml/min/kg, è stata determinata pesando il perfusato raccolto in un minuto dal serbatoio di uscita; il peso in grammi del perfusato è stato di seguito rapportato alla densità del mezzo e al peso corporeo dell'animale espresso in Kg.

2. *La pressione massima (Pmax), la pressione minima (Pmin) e la pressione media (Pmedia)*, espresse in cm di H₂O, vengono calcolate automaticamente dal software
3. *Il volume sistolico (SV = Stroke Volume)* è il volume di sangue pompato per ogni battito, espresso in ml/kg, ed è stato calcolato come rapporto tra la gittata cardiaca e la frequenza (CO/HR). Il volume sistolico è usato come indice della performance ventricolare.
4. *Il lavoro sistolico (SW = Stroke Work)* è stato usato come indice della funzionalità sistolica, ed è stato misurato attraverso la seguente equazione:
$$SW = (\text{postcarico} - \text{precarico}) \times SV / \text{peso ventricolare (g)}.$$
5. *La frequenza cardiaca (HR)* è stata calcolata automaticamente dal software ed espressa in battiti/min.

6. COMPOSTI CHIMICI

Tutte le sostanze sono state preparate sotto forma di soluzione madre in acqua bidistillata. Le soluzioni madre sono state successivamente diluite in Ringer in modo da ottenere le concentrazioni utilizzate nei singoli esperimenti.

Negli esperimenti sono state utilizzate le seguenti sostanze:

- **Catestatina (bovina)** → fornita dal Professore Sushil K. Mahata dell'Università della California, San Diego, USA.
- **Endotelina-1 (umana, suina)**→ fornita dal Calbiochem, USA.
- **Isoproterenolo, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA),**
1-H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3a] quinoxalin-1-one (ODQ),
cyclo-[D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp-](BQ123),
N-cis-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-L-γ-methyleucyl-D-
1methoxy carbonyl tryptophanyl-D-norleucine (BQ788),
Toctofenoxipolietaxietanolo (Triton X-100) → forniti dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Il Triton X-100 è stato preparato come soluzione allo 0.05% in acqua bidistillata, l'ODQ è stato preparato come soluzione madre in acqua distillata ed etanolo e conservato a 4°C. Gli esperimenti con ODQ sono stati effettuati utilizzando un apparato modificato in modo da proteggere la sostanza dalla luce ed evitarne la degradazione.

7. CONDIZIONI BASALI

In condizioni basali la perfusione è stata avviata per un periodo di circa 15-20 minuti, necessari per permettere la stabilizzazione della performance cardiaca. I cuori che non si sono stabilizzati entro tale periodo non sono stati utilizzati. Gli esperimenti sono stati eseguiti a temperatura ambiente (18-21°C); durante tutto il periodo della perfusione sono state registrate le pressioni ed il flusso è stato misurato ad intervalli di 5 minuti. Il post-carico è fissato a 40 cm di H₂O e la pressione d'ingresso è stata regolata in modo da ottenere un valore di gittata cardiaca di circa 110 ml/min/kg di peso corporeo; questi valori sono considerati fisiologici per la rana (*Shelton e Jones, 1965*). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati su cuori elettrostimolati, per mantenere costante il ritmo intrinseco cardiaco in condizioni basali di lavoro, al fine di poter valutare l'azione inotropa (variazione della forza contrattile) delle sostanze testate indipendentemente dall'effetto cronotropo (variazione del battito cardiaco). I tempi di perfusione sono stati rigorosamente standardizzati: da una serie di esperimenti time-course è stato evidenziato che la performance cardiaca si mantiene stabile per più di un'ora, cioè l'instaurarsi dello stato ipodinamico non si verifica mai prima di 80 min, in seguito a questo periodo di tempo il flusso inizia a diminuire linearmente fino ad arrivare a zero (*Sys et al.,*

1997). Questi dati sono importanti per stabilire un periodo di tempo in cui la performance del cuore si mantiene costante in modo da eseguire gli esperimenti in questo intervallo. Essendo sicuri di lavorare in condizioni ottimali, ogni variazione dei parametri cardiaci in seguito alla somministrazione di sostanze può essere valutata con più sicurezza, escludendo qualsiasi influenza dovuta al tempo di perfusione. Tutti gli esperimenti effettuati in questo lavoro sono stati completati nel tempo di 80 min.

8. TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

Dopo aver avviato la perfusione con il mezzo di controllo e stabilizzate le condizioni basali, i cuori sono stati perfusi con Ringer contenente la sostanza in esame. I parametri cardiaci sono stati rilevati ad intervalli di 5 minuti per circa 15-20 minuti; come valori di controllo sono state utilizzate le misure ottenute con la sola perfusione di Ringer.

8.1 Curve concentrazione-risposta della Cts

Negli esperimenti in cui sono stati osservati gli effetti della Cts a diverse concentrazioni si è proceduto nel seguente modo: dopo aver avviato la perfusione con il Ringer per stabilizzare il cuore alle condizioni basali,

sono state somministrate dosi crescenti della Cts (11 nM, 33 nM, 65 nM, 110 nM e 165 nM). Gli effetti sui parametri cardiaci sono stati determinati dopo 10-15 minuti della somministrazione della singola dose della sostanza in esame.

8.2 Cts e stimolazione adrenergica

Dopo aver rilevato i parametri di base è stato testato l'effetto dell'ISO (10 nM) per un periodo di circa 10-15 min; in seguito, dopo aver riportato il preparato alle condizioni basali è stata somministrata la Cts ad una singola concentrazione (33 nM, 65 nM o 110 nM) per circa 10-15 minuti e si è continuata la perfusione con il peptide insieme all'isoproterenolo.

Successivamente, sono state generate curve concentrazione-risposta con dosi crescenti di ISO (0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM) sia da solo che in presenza di singole concentrazioni di Cts (33 nM, 65 nM o 110 nM).

In un altro protocollo l'effetto dell'ISO è stato testato dopo pretrattamento con Cts in presenza di BQ788, antagonista del recettore ETB.

8.3 Effetto dell'endotelina-1

Per determinare gli effetti dell'ET-1 sul preparato cardiaco sono stati utilizzati due protocolli differenti: trattamenti a singole concentrazioni e curve cumulative. Nel primo caso, dopo aver avviato la perfusione con il mezzo di controllo per stabilizzare il cuore, è stata somministrata l'ET-1 ad una concentrazione fissa (0.01 nM, 0.1nM, 1nM, 10nM); su ogni cuore è stata testata una sola concentrazione. Gli effetti sui parametri cardiaci sono stati determinati dopo 15-20 minuti dalla somministrazione della sostanza. Per quanto riguarda le curve cumulative, sono state effettuate curve concentrazione-risposta del peptide (da 0.01nM a 10nM) seguendo lo stesso protocollo usato per la Cts.

8.4 Effetti della Cts o dell'ET-1 prima e dopo trattamento con inibitori del sistema NO-cGMP e con Triton X-100

Dopo aver rilevato i parametri di base è stato testato l'effetto della Cts (110 nM) o dell'ET-1 (0.01nM e 1 nM) per 10-15 minuti; in seguito il cuore è stato perfuso con soluzione fisiologica per riportarlo alle condizioni basali. Successivamente, dopo aver pretrattato il cuore con uno degli inibitori del sistema NO-cGMP, L-NMMA (10^{-5} M) oppure ODQ (10^{-5} M) per un egual

periodo, è stata somministrata la Cts (110 nM) o l'Endotelina-1 insieme ad uno degli inibitori per 10-15 minuti.

Nel protocollo con Triton X-100, dopo aver testato l'effetto della Cts (110 nM) o dell'ET-1 (0.01 nM) e ripperfuso il cuore con Ringer, si è passato alla somministrazione di 0.1 ml di Triton X-100 (0.05%). Tale somministrazione è avvenuta previa chiusura della via di ingresso con una pinza, e l'altezza del serbatoio di uscita è stata aumentata al valore 70 cm di H₂O; in tal modo il cuore batteva in condizioni isovolumetriche in modo da evitare per 3-4 sistoli lo svuotamento ventricolare. In tal modo il detergente è in grado di danneggiare funzionalmente l'endotelio endocardico, senza ledere il miocardio sottostante. In seguito è stata riaperta la via di ingresso e il serbatoio di uscita riportato al valore basale (40 cm di H₂O) e si è continuata la perfusione con il mezzo fisiologico in modo da lavare il cuore. Dopo circa 15-20 minuti è stata somministrata la Cts (110nM) o l'ET-1 (0.01 nM) per un periodo di circa 15-20 minuti al fine di valutarne l'effetto dopo danneggiamento funzionale dell'EE.

8.5 Effetti della Cts e dell'ET-1 in presenza di BQ788 e BQ123

Dopo aver stabilizzato il cuore alle condizioni basali, il preparato è stato pretrattato con gli inibitori dei recettori ETA o ETB per l'ET-1 (BQ123;

1 μ M e BQ788; 1 μ M, rispettivamente) per 10-15 minuti ed in seguito è stata somministrata la Cts o l'ET-1 a dosi crescenti (Cts: da 11 a 110 nM; ET-1: da 0.01 a 10 nM) per 10-15 minuti, sempre in presenza di uno degli inibitori.

8.6 Interazione Cts-ET-1 prima e dopo trattamento con BQ788

Dopo aver rilevato i parametri di base, i cuori sono stati pretrattati con Cts (110 nM) per 10-15 minuti ed in seguito è stato testato l'effetto di dosi crescenti di ET-1 (da 0.01 a 1 nM) in presenza di Cts per un periodo di 10-15 min. In un secondo protocollo, dopo aver pretrattato con Cts (110 nM) per 10-15 minuti, i cuori sono stati perfusi con dosi crescenti di ET-1 (da 0.01 a 1 nM) per 10-15 minuti in presenza di Cts e BQ788 (1 μ M).

9. ANALISI STATISTICA

La statistica è stata effettuata utilizzando il test ANOVA (ANalysis Of Variance) a una via e post-hoc test a confronto multiplo di Bonferroni (per il confronto all'interno dello stesso gruppo) oppure il test ANOVA a due vie (per il confronto tra gruppi diversi). Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

Risultati

1. EFFETTI DELLA Cts SULLA PERFORMANCE CARDIACA IN CONDIZIONI BASALI

Al fine di investigare se la Cts fosse in grado di modulare la performance cardiaca in *Rana esculenta*, nella prima parte della ricerca sono state effettuate curve concentrazione-risposta della Cts in condizioni basali, cioè in assenza di stimolazione chimica e/o fisica. Le concentrazioni utilizzate sono state: 11 nM, 33 nM, 65 nM, 110 nM e 165 nM. I risultati hanno mostrato che la Cts induce un effetto inotropo negativo a partire dalla concentrazione di 33nM, indicato dalla riduzione significativa del Volume Sistolico (SV) e del Lavoro Cardiaco (SW). Tale effetto cardiosoppressivo è risultato essere dose-dipendente (-6%, -7.5%, -11%, -13% e -19%, rispettivamente) (Fig. 14).

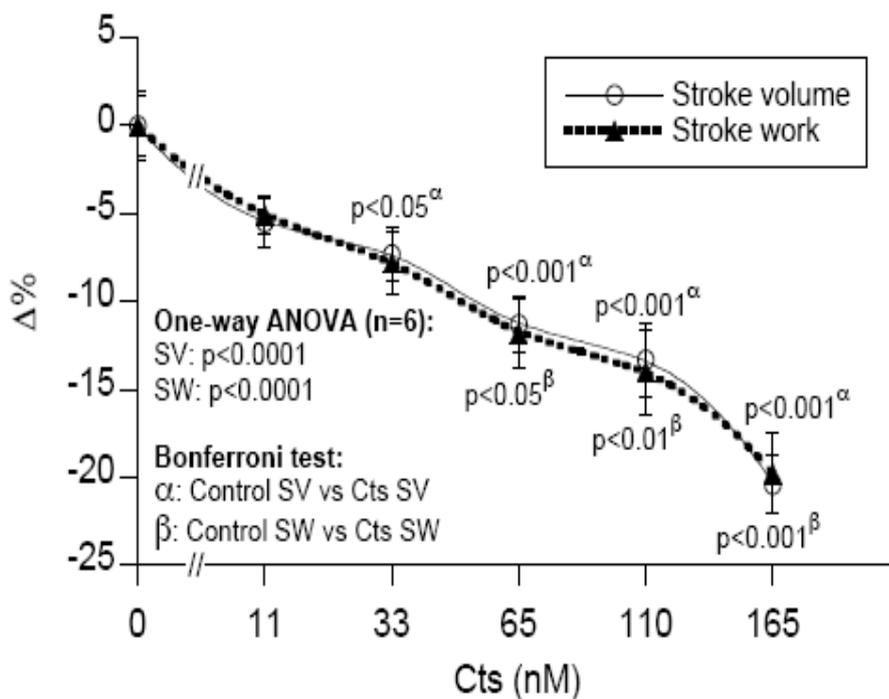


Fig. 14 Curva dose-effetto della Cts sul Volume Sistolico (SV) e sul Lavoro Cardiaco (SW) nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=6).

2. AZIONE ANTI-ADRENERGICA DELLA Cts

Nella fase successiva è stata indagata la possibile natura antagonista della Cts nei confronti della stimolazione adrenergica.

A tale scopo, i preparati cardiaci sono stati perfusi con Ringer contenente ISO (10 nM) in presenza di singole concentrazioni di Cts (33 nM, 65 nM o 110 nM). I risultati ottenuti hanno mostrato che la Cts blocca la risposta da ISO alle concentrazioni di 65 nM e 110 nM (Fig.15). Per ottenere ulteriori

informazioni sulla natura antiadrenergica della Cts i preparati cardiaci sono stati trattati con concentrazioni crescenti di ISO (da 0.1 nM a 1000 nM) da solo o in presenza di una singola concentrazione di Cts (33 nM, 65 nM o 110 nM). L'analisi delle variazioni percentuali dello SV in termini di valori di EC50 dell'ISO da solo e in presenza di Cts suggerisce un antagonismo di tipo non competitivo nei confronti della stimolazione adrenergica (Fig.16). I valori di EC50 (in log M) dell'ISO da solo ed in presenza di Cts (33 nM, 65 nM o 110 nM) sono rispettivamente -7.71 ± 0.15 , -7.98 ± 0.04 , -6.97 ± 0.04 , -7.3 ± 0.07 .

Il confronto fra le curve, effettuato utilizzando il test ANOVA a due vie, ha dimostrato una differenza significativa tra la curva dell'ISO da solo e quella dell'ISO in presenza di Cts a 65 nM e 110 nM.

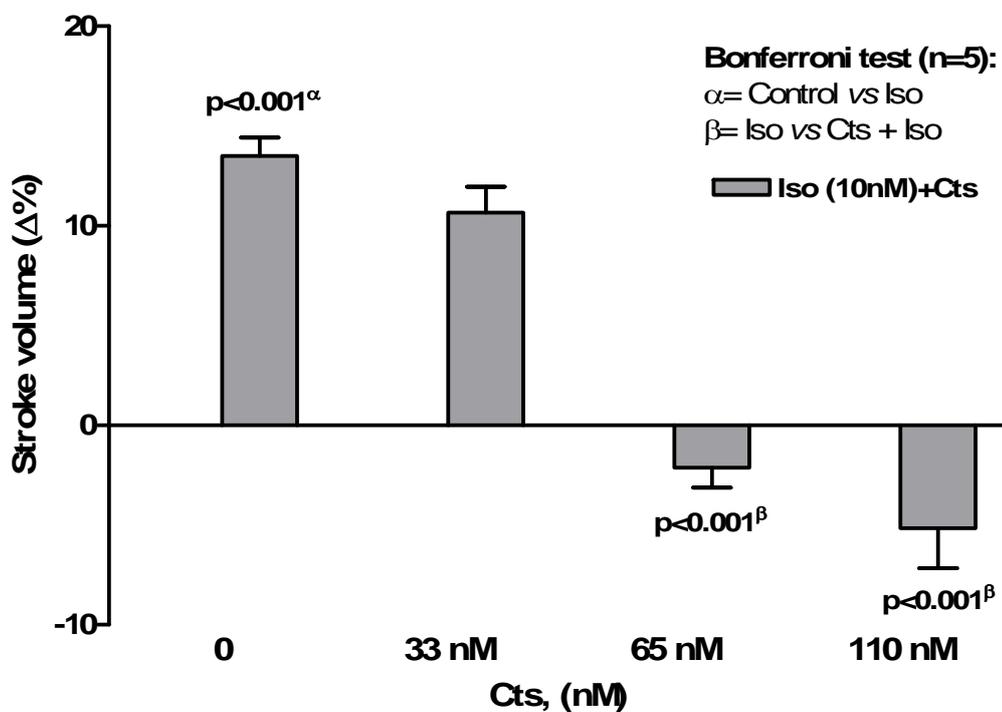


Fig. 15 Effetto dell'isoproterenolo (Iso) prima e dopo pretrattamento con Cts sul volume sistolico nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=5 per ogni gruppo).

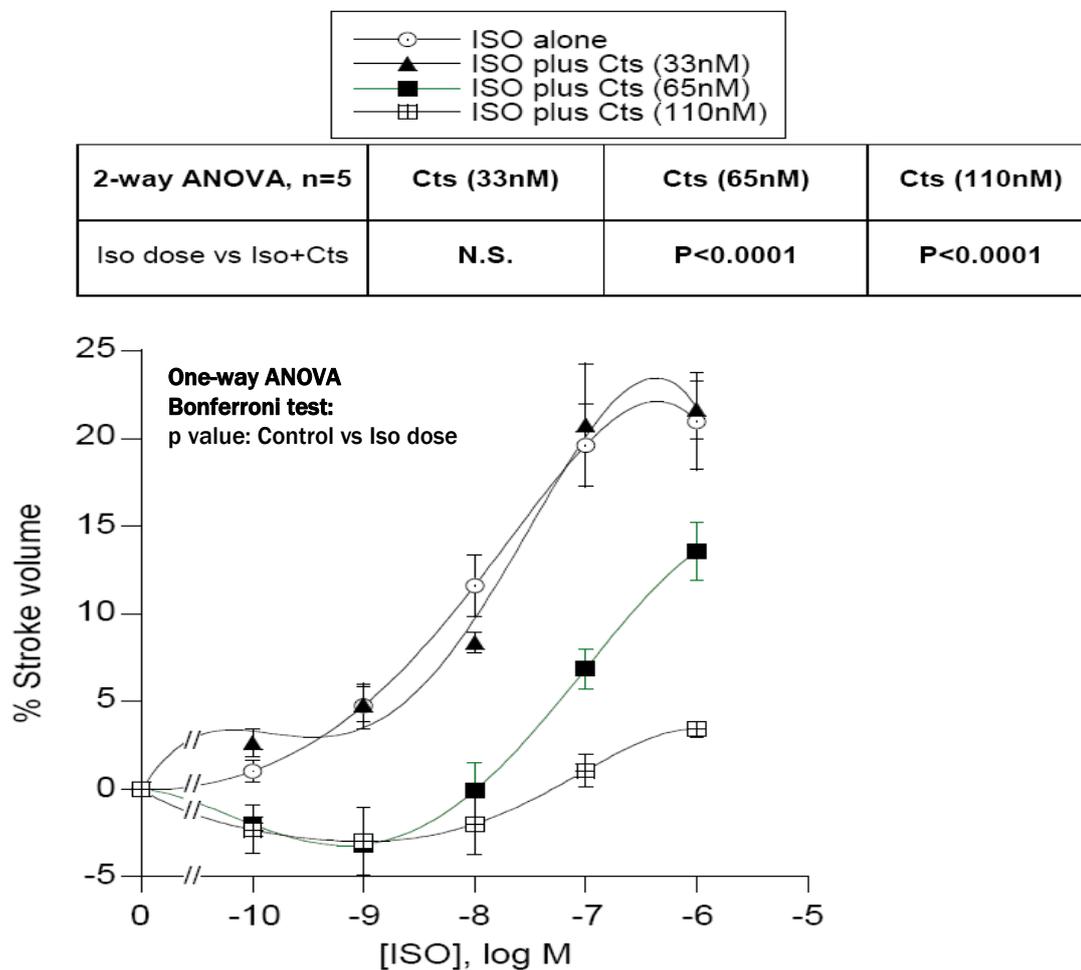


Fig. 16 Curva concentrazione-risposta dell'ISO da solo e dell'ISO + una singola concentrazione di Cts (33nM, 65nM e 110nM) sullo SV nei preparati cardiaci di rana. I valori di EC50 (in logM) dell'ISO e dell'ISO + Cts (33nM, 65nM e 110nM) sono rispettivamente 7.71 ± 0.15 , -7.98 ± 0.04 , -6.97 ± 0.04 , -7.3 ± 0.07 , (n=5 per ogni gruppo).

3. EFFETTI DELLA Cts PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON INIBITORI DEL SISTEMA NOS-NO- cGMP E CON TRITON X-100

E' stato valutato il possibile coinvolgimento del pathway NOS-NO-cGMP e dell'EE nell'azione cardiosoppressiva indotta dalla Cts. A tale scopo l'azione del peptide (110 nM) è stata testata in presenza di L-NMMA (10 µM, inibitore della NOS), di ODQ (10 µM, inibitore della guanilato ciclastasi solubile) e di Triton X-100 (0.05%, un detergente capace di danneggiare solo funzionalmente l'EE). Il pretrattamento con L-NMMA, ODQ e Triton X-100 ha indotto un incremento significativo dello SV (fig. 17). L'effetto cardio-soppressivo della Cts è stato inibito sia dal pretrattamento con l'inibitore della NOS e della guanilato ciclastasi solubile, sia dal danneggiamento funzionale dell'EE indicando che l'effetto inotropo negativo della Cts coinvolge il sistema NOS-NO-cGMP e richiede l'integrità funzionale dell'EE.

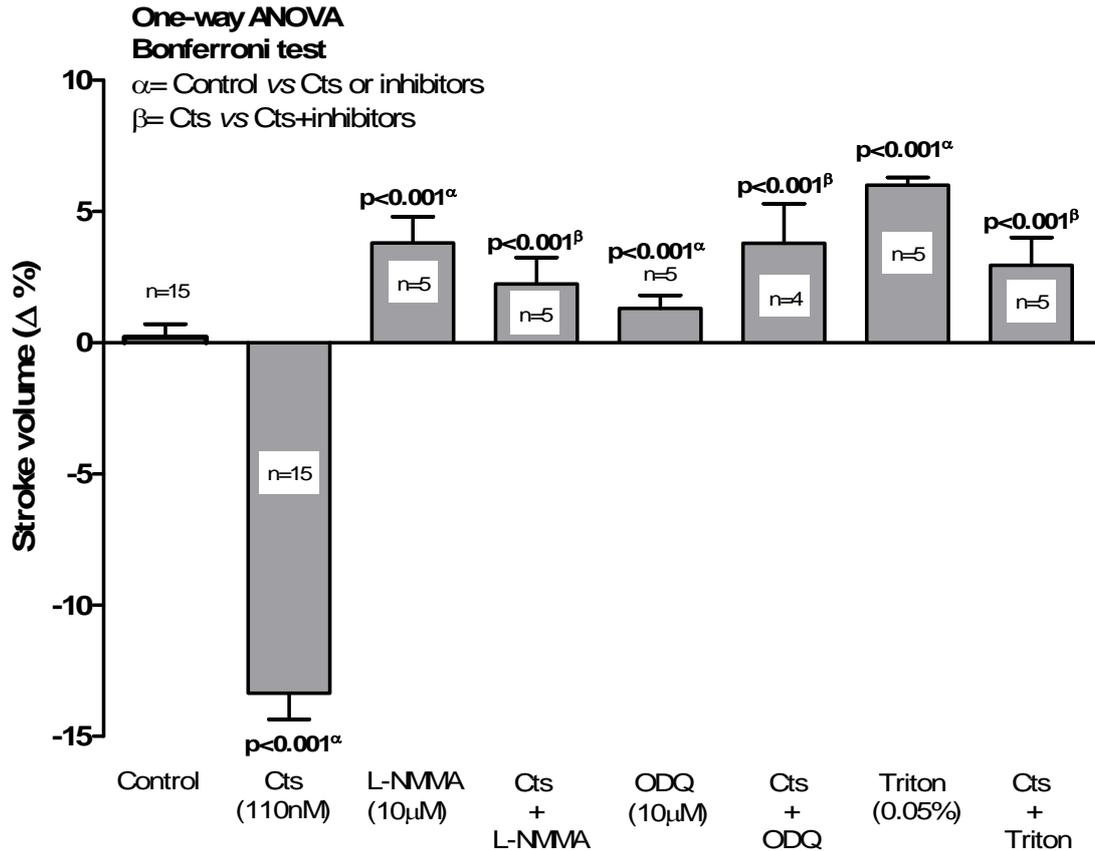


Fig. 17 Effetto della Cts (110 nM) sul volume sistolico, prima e dopo trattamento con inibitori del sistema NO-cGMP e con Triton X-100, nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard.

4. EFFETTI DELL'ET-1 IN CONDIZIONI BASALI

Dati di letteratura hanno mostrato che, nei mammiferi, a livello cardiaco l'ET-1 può esercitare sia effetti inotropi positivi che negativi in varie specie e modelli sperimentali utilizzati (*Brunner et al., 2006*). Nel preparato cardiaco di rana gli effetti dell'ET-1 (da 0.01 nM a 1 nM) in condizioni

basali sono stati testati effettuando sia trattamenti a singole concentrazioni che curve cumulative. In entrambi i casi è stato riscontrato, nel 100% dei preparati, un effetto inotropo negativo significativo alla concentrazione di 0.01 nM, mentre alle altre concentrazioni (0.1, 1 e 10 nM) è stata invece evidenziata una risposta bifasica significativa (un effetto inotropo positivo nel 50% dei preparati ed un effetto inotropo negativo nel restante 50%) (Figg. 18, 19).

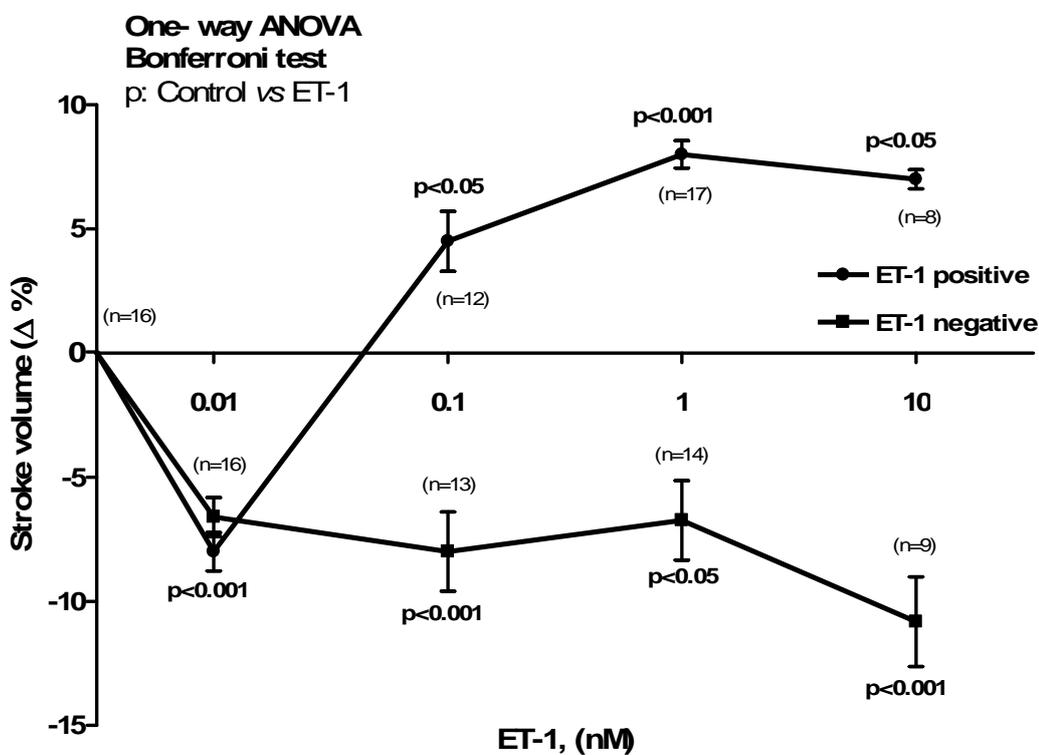


Fig. 18 Effetto dell'endotelina 1 sul volume sistolico nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard.

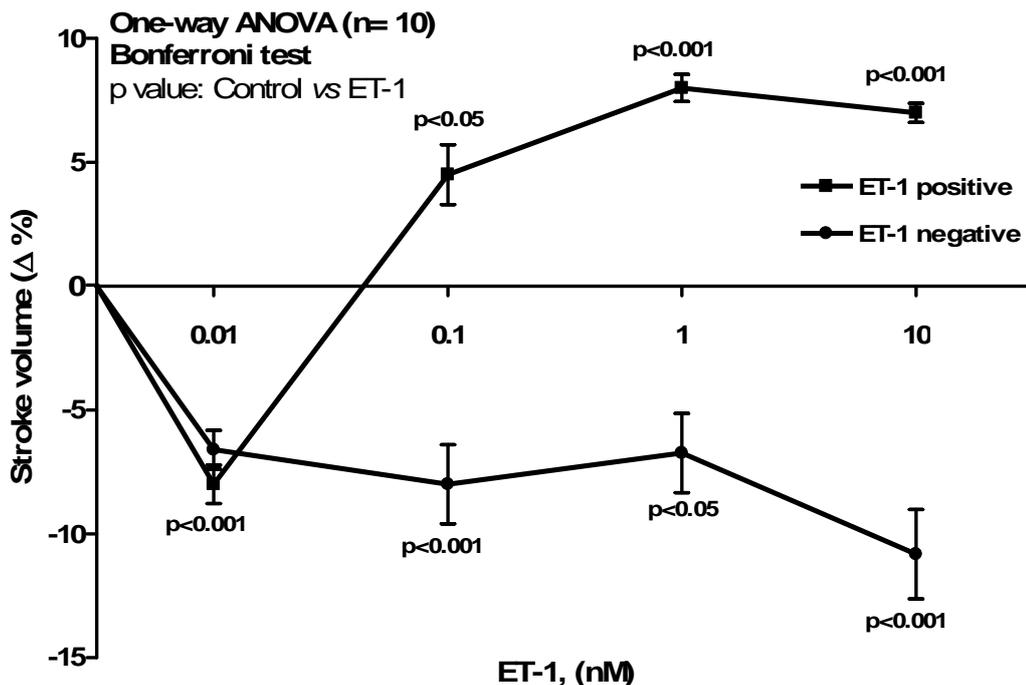
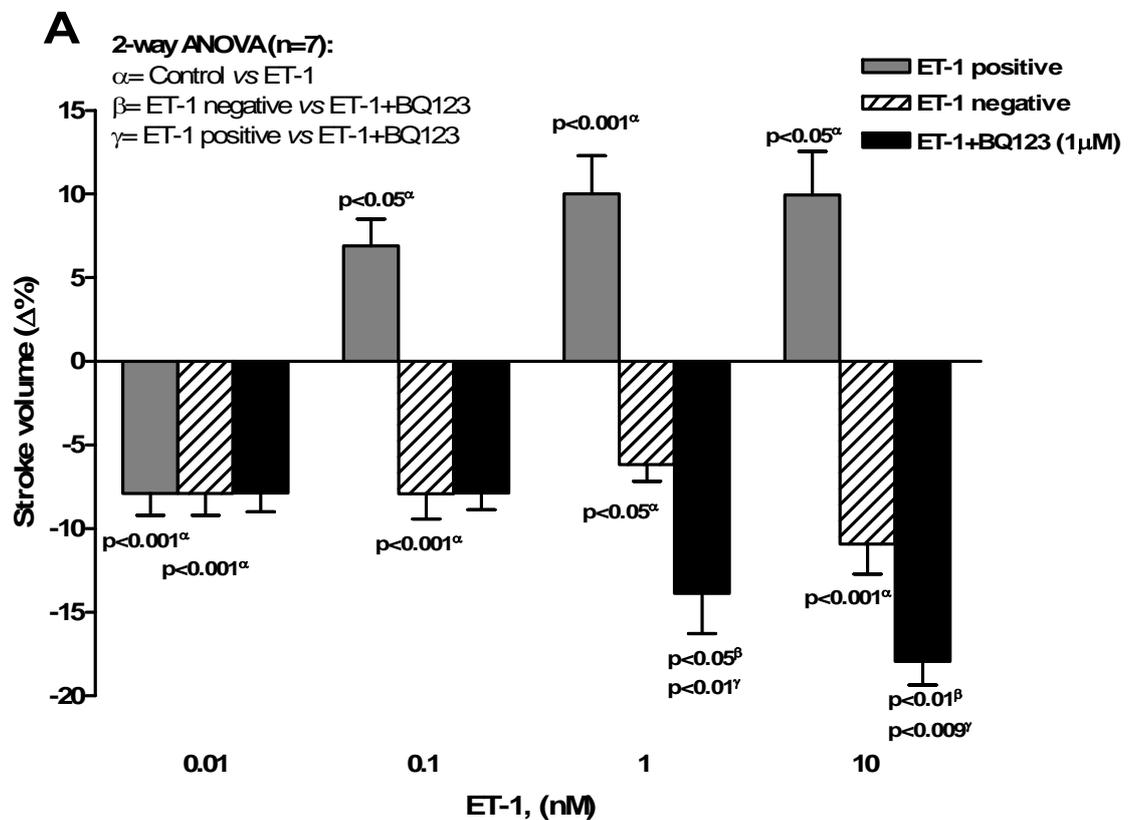


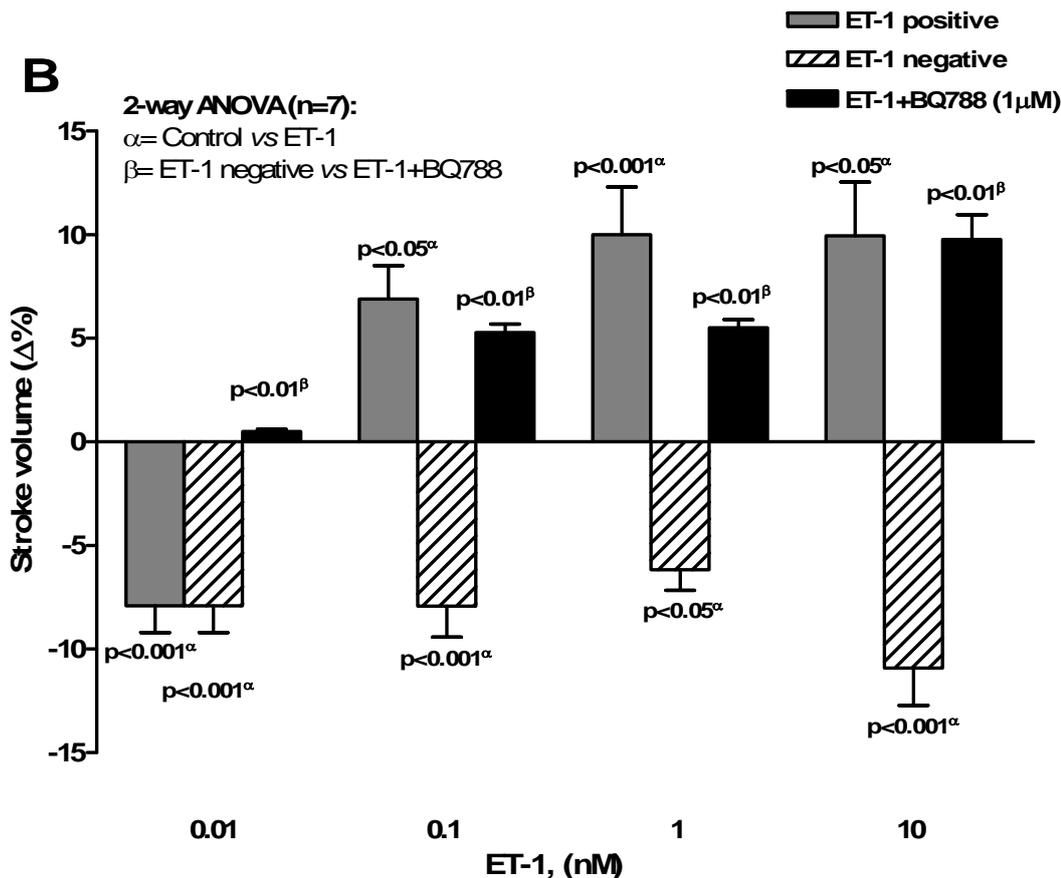
Fig. 19 Curva dose-effetto dell'endotelina-1 sul volume sistolico nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=10).

5. EFFETTI DELL'ET-1 IN PRESENZA DI BQ788 E BQ123

È noto che l'ET-1 a livello cardiaco induce i suoi effetti inotropi attraverso l'attivazione di due differenti recettori: il recettore ETA ed il recettore ETB. Al fine di valutare il ruolo di tali recettori nel mediare la risposta inotropica dell'ET-1 nel cuore di rana, dosi crescenti del peptide (da 0.01nM a 10 nM) sono state testate in presenza di inibitori dei recettori ETA ed ETB, rispettivamente BQ123 e BQ788. I risultati hanno dimostrato che in seguito al pretrattamento con BQ123 (1 μ M) l'ET-1 induce a tutte le

concentrazioni testate un effetto inotropo negativo (Fig. 20A), mentre in seguito al pretrattamento con BQ788 (1 μ M), il peptide induce alle dosi più alte (0.1, 1, 10 nM) sempre un effetto positivo (Fig. 20B). Ciò sembra indicare che l'effetto inotropo positivo indotto dall'ET-1 è mediato dai recettori ETA e quello negativo dai recettori ETB.





20 Fig. Curva dose-risposta dell'ET-1 (0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM) sul volume sistolico, prima e dopo pretrattamento con BQ123 (1 μM) (A) e BQ788 (1 μM) (B), nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=7).

6. EFFETTI DELL'ET-1 PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON INIBITORI DEL SISTEMA NOS-NO- cGMP E CON TRITON X-100

Dati di letteratura hanno evidenziato la localizzazione dei recettori ETB a livello dell'endotelio endocardico (EE) dei mammiferi con conseguente

attivazione del pathway NOS-NO-cGMP (*Brunner et al., 2006*). Per verificare il possibile coinvolgimento di tale pathway e del ruolo dell'EE nell'azione cardiaca indotta dall'ET-1 nel preparato di rana, sono stati utilizzati L-NMMA (10 μ M), ODQ (10 μ M) e Triton X-100 (0.05%). L'abolizione dell'effetto inotropo negativo dell'ET-1 in seguito al pretrattamento sia con gli inibitori della NOS e della guanilato ciclastasi che dopo danneggiamento funzionale dell'EE (Fig. 21), ha evidenziato il coinvolgimento del sistema NOS-NO-cGMP in tale risposta ed il ruolo fondamentale svolto dall'EE integro.

In contrasto, l'effetto inotropo positivo del peptide è rimasto inalterato dal pretrattamento con L-NMMA (Fig. 22) escludendo, pertanto, il coinvolgimento dell'ossido nitrico.

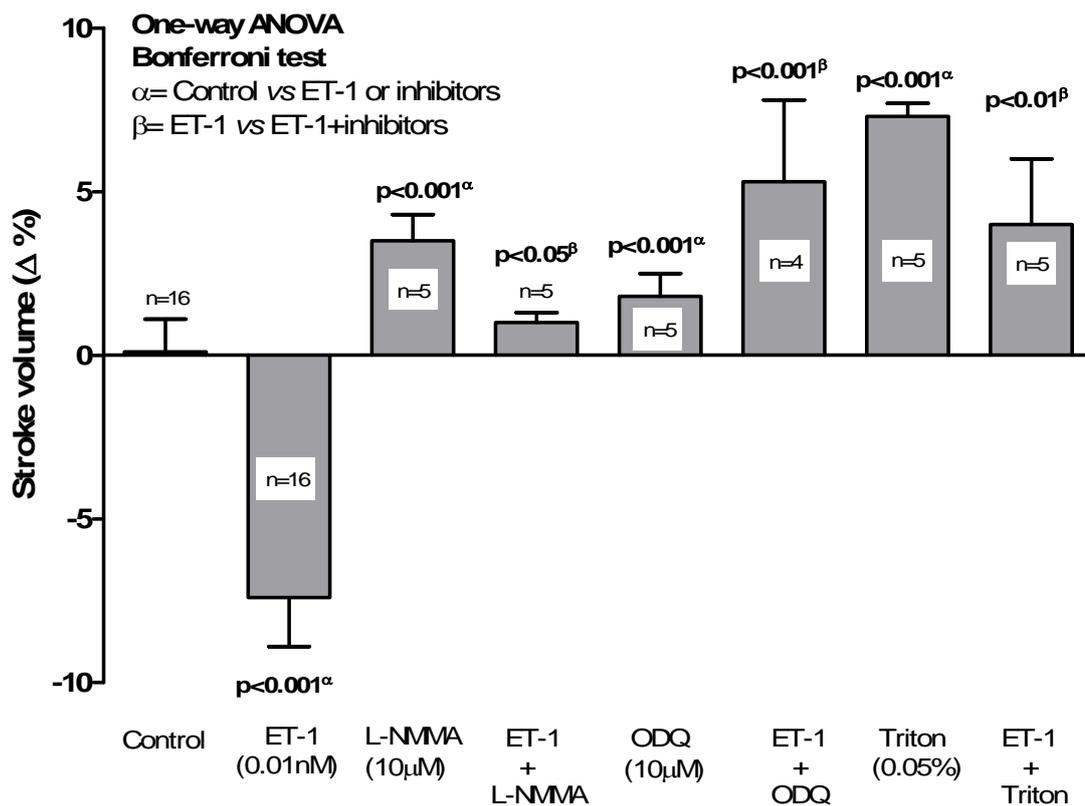


Fig. 21 Effetto dell'ET-1 (0.01 nM) sul volume sistolico, prima e dopo trattamento con inibitori del sistema NO-cGMP e con Triton X-100, nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard.

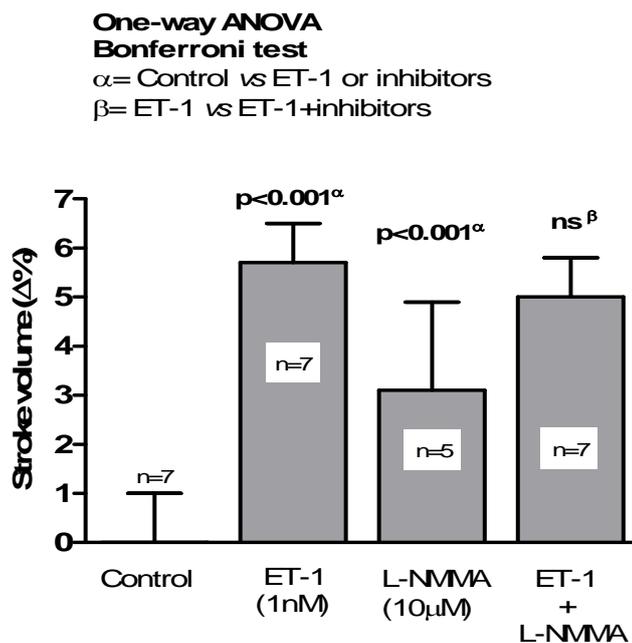


Fig. 22 Effetto dell'ET-1 (1 nM) sul volume sistolico, prima e dopo trattamento con L-NMMA, nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard.

7. INTERAZIONE Cts-ET-1

Lillie e collaboratori (2007) hanno osservato che la CGA ricombinante umana è capace di stimolare il rilascio di ET-1 da cellule endoteliali umane. Partendo da tale evidenza, che suggerisce una possibile interazione tra sistema simpato-cromaffine e sistema endoteliale, in questo lavoro si è inteso investigare se la Cts, frammento C-terminale della CGA, potesse modulare la risposta da Endotelina-1.

In una prima fase dello studio, l'effetto della Cts a dosi crescenti (11÷110 nM) è stato testato in presenza di inibitori dei recettori ETA ed ETB

(rispettivamente BQ123 e BQ788). I risultati hanno dimostrato che, mentre il pretrattamento con BQ123 (1 μ M) non ha modificato la risposta cardiosoppressiva della Cts, la somministrazione di BQ788 (1 μ M) ha bloccato completamente l'azione del peptide (Fig. 23). Ciò sembra indicare che l'effetto inotropo negativo indotto dalla Cts è mediato esclusivamente dai recettori ETB.

Successivamente, la curva concentrazione-risposta dell'ET-1 (0.01÷1 nM) è stata testata prima e dopo trattamento con Cts (110 nM). I risultati hanno mostrato che, in presenza di Cts, l'effetto inotropo positivo dell'ET-1, mediato dai recettori ETA, viene abolito a tutte le dosi testate, evidenziando sempre un effetto inotropo negativo (Fig. 24).

Tuttavia, quando l'ET-1 a dosi crescenti (0.01÷1 nM) è stata testata in presenza di Cts (110 nM) e di BQ788 è stato evidenziato un effetto inotropo positivo a tutte le dosi testate; ciò indica che poichè la capacità della Cts di bloccare l'effetto inotropo positivo dell'ET-1 è stata abolita dal pretrattamento con tale inibitore, la Cts interagisce con i recettori ETB nel modulare l'effetto inotropo positivo dell'ET-1 (Fig. 24).

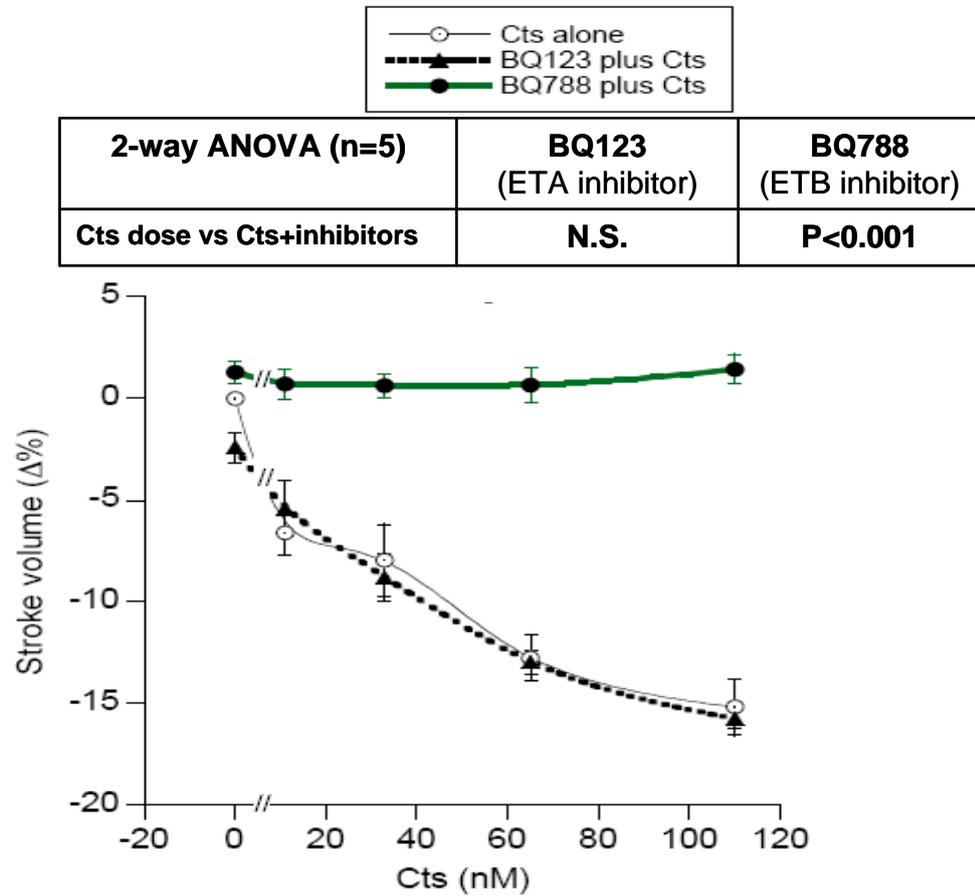


Fig. 23 Curva concentrazione-risposta della Cts (11 ÷ 110 nM) sul volume sistolico, prima e dopo pretrattamento con BQ788 (1 μ M) e BQ123 (1 μ M), nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=5).

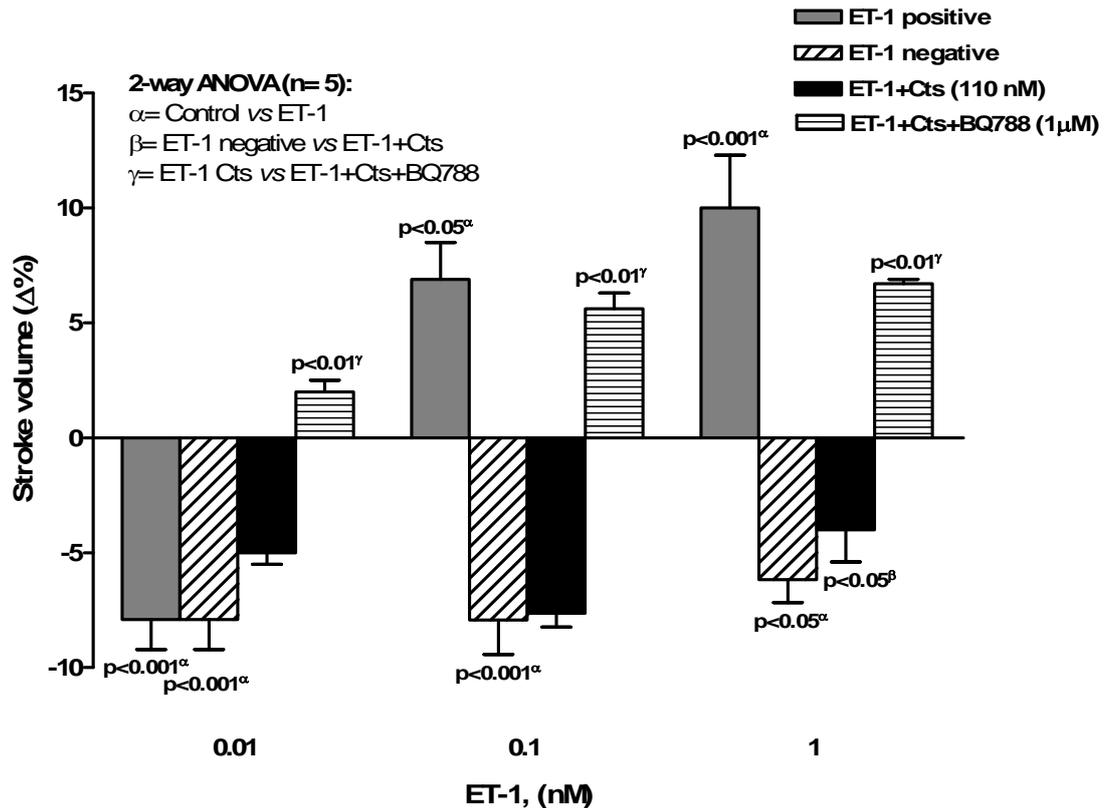


Fig. 24 Interazione ET-1-Cts prima e dopo trattamento con BQ788 (1 μ M) sul volume sistolico nel cuore isolato e perfuso di rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=5).

8. EFFETTO DELL'ISOPROTERENOLO PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON Cts O Cts PIÙ BQ788

Dati precedenti mostrati in questo lavoro hanno evidenziato, sia l'effetto anti-adrenergico della Cts (65 e 110 nM), sia l'importanza del recettore ETB nel mediare l'effetto cardio-soppressivo della Cts nel preparato cardiaco di rana. Si è voluto, pertanto, indagare se il recettore ETB fosse

coinvolto anche nella capacità da parte della Cts di contrastare la stimolazione adrenergica. A tal proposito l'effetto dell'isoproterenolo è stato osservato prima e dopo trattamento con Cts e BQ788. I risultati hanno mostrato una completa abolizione dell'effetto anti-adrenergico della Cts suggerendo, quindi, il ruolo chiave del recettore ETB nell'antagonizzare la classica risposta adrenergica da parte della Cts (Fig. 25).

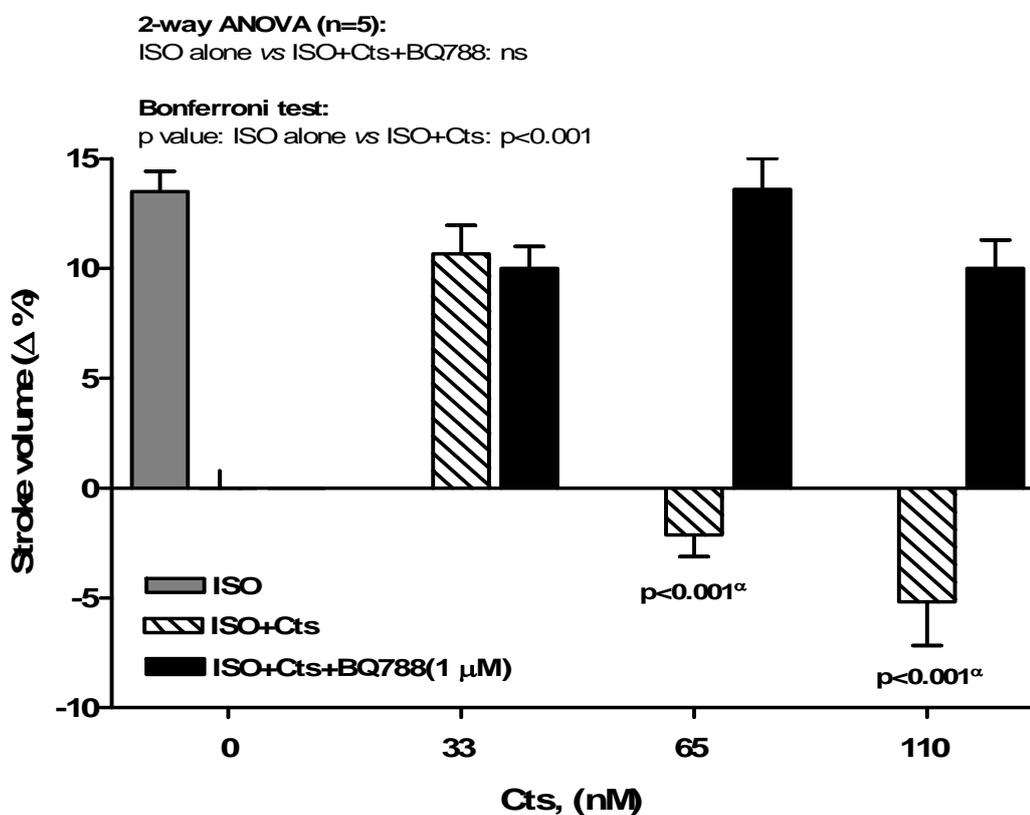


Fig. 25 Effetto dell'ISO (10nM) sul volume sistolico prima e dopo trattamento con Cts (33, 65, 110nM) o Cts + BQ788 (1 μM) nel cuore isolato e perfuso di rana

Discussione

Il preparato cardiaco *in vitro* permette di effettuare studi fisiologici e farmacologici evitando le influenze neurogene ed umorali sistemiche. Il preparato di cuore isolato e perfuso utilizzato in questo lavoro è stato messo a punto nel nostro laboratorio (Sys *et al.*, 1997). Esso utilizza un cuore intero che si contrae spontaneamente e che lavora in condizioni paragonabili a quello *in vivo*; infatti, è in grado di pompare volumi di perfusato in condizioni fisiologiche di precarico e postcarico. Anche i tempi di perfusione sono stati rigorosamente standardizzati: da una serie di esperimenti time-course è stato evidenziato che la performance cardiaca si mantiene stabile per più di un'ora, cioè l'instaurarsi dello stato ipodinamico (Sys *et al.* 1997) non si verifica prima di 80 minuti; in seguito a questo periodo di tempo il flusso inizia a diminuire linearmente fino ad arrivare a zero. Questi dati sono importanti per stabilire un periodo di tempo in cui la performance del cuore si mantiene costante, in modo da eseguire gli esperimenti nell'intervallo ottimale. Essendo sicuri di lavorare in condizioni sperimentalmente attendibili, ogni variazione dei parametri cardiaci, in seguito alla somministrazione delle sostanze da testare, può essere valutata con più sicurezza, così da escludere qualsiasi influenza dovuta al tempo di perfusione.

Nei vertebrati non mammiferi, come anfibi e pesci, il cuore è avascolare o parzialmente vascolarizzato, con un unico ventricolo altamente trabecolato. Ciò può essere vantaggioso in quanto permette di valutare effetti diretti sulla performance cardiaca prescindendo da influenze della componente coronarica. Inoltre, dato l'alto rapporto esistente tra superficie cavitaria e volume ventricolare, l'endotelio endocardico (EE) raggiunge una notevole estensione e rappresenta l'unica barriera esistente tra sangue e miocardio. In tal senso, il ruolo assolto dall'EE come sensore di stimoli intracavitari, sia fisici che chimici, potrebbe risultare molto più importante rispetto a quello svolto negli omeotermi. Considerati gli effetti che i peptidi CGA-derivati esercitano sulla vasomotilità di diversi distretti vascolari, incluse le arterie coronariche, l'utilizzo di un cuore avascolare è apparso molto vantaggioso nello studio dell'azione della Cts.

1. EFFETTI DELLA CATESTATINA E MECCANISMO D'AZIONE

La Cts, co-rilasciata con le catecolamine e con la CGA dai granuli secretori della midollare del surrene in seguito a stimolazione colinergica, rappresenta un importante modulatore a feedback negativo del processo di rilascio delle catecolamine agendo come un antagonista endogeno del recettore colinergico nicotinico (*Mahata et al., 1999*). La Cts è, inoltre, un

potente vasodilatatore *in vivo* attraverso la stimolazione del rilascio di istamina (*Kennedy et al., 1998*) ed un agente anti-ipertensivo (*O'Connor et al., 2002*).

I dati sugli effetti diretti della Cts sulla funzione cardiaca sono, fino ad oggi, praticamente inesistenti ad eccezione di un recente studio, contemporaneo a questo, in cui è stato osservato che la Catestatina wild-type (WT-Cts) esercita un effetto cardio-soppressivo significativo nel preparato cardiaco di ratto secondo Langerdoff (*Angelone et al., 2008*).

In questo lavoro, utilizzando un cuore avascolare quale quello di rana, si è voluto indagare sull'azione diretta della Cts sia in condizioni basali che sotto stimolazione adrenergica e da endotelina-1, nonché sul meccanismo d'azione che sottende al suo effetto.

I risultati hanno evidenziato che, in condizioni basali, la Cts è capace di modulare la performance cardiaca in modo dose-dipendente in un range di concentrazioni fisiologiche (da 33 a 165 nM), agendo come un fattore cardio-deprimente in grado di modulare in maniera diretta la performance cardiaca.

I dati ottenuti con la Cts, frammento C-terminale della CGA, sono in analogia con quelli precedentemente riportati dal nostro gruppo di ricerca con le vasostatine, frammenti N-terminali della CGA capaci di esercitare in

differenti preparati cardiaci (rana: *Corti et al., 2002, 2004; Tota et al., 2003*; anguilla: *Imbrogno et al., 2004*; ratto: *Cerra et al., 2006; 2008*) un effetto cardio-inibitorio in condizioni basali.

Il principale sistema stimolante a livello cardiaco, è il sistema adrenergico, che diventa iperattivo nella classica sindrome da stress descritta da Hans Selye nel 1936. Elevate cascate eccitatorie, se lasciate incontrollate, potrebbero essere più deleterie dello stesso stress. Wortsman (2002), ha dimostrato che, in soggetti affetti da stress acuto, i livelli sierici di adrenalina sono dell'ordine di 4.5×10^{-8} M e che soggetti con patologie cardiovascolari sono particolarmente suscettibili alla reazione potenzialmente letale dovuta alle catecolammine. E' noto che anche il cuore di rana è un ottimo target degli agonisti β -adrenergici, i quali aumentano marcatamente l'inotropismo cardiaco, l'ampiezza della corrente sarcolemmale del calcio e la velocità di rilassamento (*Skeberdis et al., 1997*). L'epinefrina è il neuro-trasmettitore predominante nel cuore di rana, i cui valori plasmatici in condizioni di riposo risultano essere 5 volte maggiori rispetto a quelle di norepinefrina. Quest'ultima, tuttavia, può aumentare drasticamente in condizioni di stress, in seguito al rilascio da parte della midollare del surrene. In quantità eccessive le due catecolammine

endogene inducono ben noti effetti cardio-tossici sia negli anfibi (*Carleston et al., 1980*) che nei mammiferi incluso l'uomo (*Rona et al., 1959*).

Considerato che le catecolamine sono co-secrete con la CGA ed i suoi peptidi e vista la nota azione inibitrice della Cts sul rilascio di catecolamine stesse, nel presente lavoro è stata investigata la possibile interazione tra Cts e stimolazione adrenergica. La Cts ha abolito la classica risposta inotropa positiva indotta dall'isoproterenolo (agonista β -adrenergico) con un antagonismo di tipo non competitivo. Questi dati sono in accordo con quelli riportati da Angelone e collaboratori (2008) che hanno evidenziato un simile antagonismo della WT-Cts sulla stimolazione adrenergica, nel preparato cardiaco di ratto secondo Langendorff. È interessante notare che anche i frammenti N-terminali della CGA, le Vasostatine, esplicano nella rana (*Corti et al., 2002, 2004; Tota et al., 2003*), nell'anguilla (*Imbrogno et al., 2004*) e nel ratto (*Cerra et al., 2006, 2008*) un'azione antiadrenergica. Nell'insieme questi risultati suffragano l'ipotesi che la Cts, come altri peptidi CGA-derivati, faccia parte di un nuovo sistema ormonale omeostatico regolante, sia in condizioni basali che di stress, la funzione cardiaca.

Ulteriore scopo di questo studio è stato l'individuazione dei possibili segnali di trasduzione che sottendono all'azione cardiotropica della Cts. Nel cuore il sistema NOS-NO-cGMP gioca un ruolo chiave nel mediare segnali intracardiaci specifici coinvolti nel controllo della performance contrattile. Nel cuore di rana, la eNOS è l'isoforma enzimatica meglio rappresentata la cui principale localizzazione (Sys *et al.*, 1997) ed espressione (Acierno *et al.*, 2008) è stata riscontrata a livello dell'EE. Tale tessuto, attraverso il pathway NOS-NO-cGMP modula la performance ventricolare nel cuore di rana sia in condizioni basali (Sys *et al.*, 1997) che sotto stimolazione chimica (colinergica) (Gattuso *et al.*, 1999). Partendo da questi presupposti, nel presente lavoro, si è voluto investigare l'eventuale coinvolgimento del pathway NOS-NO-cGMP nella modulazione dell'inotropismo negativo indotto dalla Cts. L'abolizione dell'effetto inotropo negativo del peptide, in seguito al pretrattamento con inibitori della NOS e della guanilato ciclastasi, ha dimostrato come tale pathway sia determinante affinché esso possa svolgere un'azione cardio-inibitoria. Il ruolo fondamentale dell'EE quale modulatore di stimoli intraluminali, attraverso il rilascio di NO, è stato confermato dal trattamento con Triton X-100: dai dati è emerso che, a seguito del danneggiamento funzionale di questo tessuto, la Cts non è più

in grado di mediare effetti cardio-soppressivi, dimostrando come l'integrità dell'EE sia fondamentale nel trasdurre gli effetti inotropi della Cts.

Questi dati contrastano con quelli ottenuti con la vasostatina, il cui effetto inotropo negativo nel cuore di rana non coinvolge né l'integrità dell'EE né il pathway NOS-NO-cGMP (*Corti et al., 2004*). Ciò suggerisce che due peptidi derivanti da un unico precursore, utilizzati alle medesime concentrazioni, possano esercitare analoghi effetti cardio-soppressivi pur sfruttando vie trasduzionali diverse. Futuri studi potrebbero chiarire il motivo alla base della ridondanza di tale risposta fisiologica, mediata dai peptidi CGA-derivati, e della diversità dei segnali di trasduzione che sottendono a tale effetto.

2. INTERAZIONE CATESTATINA-ENDOTELINA-1

Le vasostatine sono in grado di contrastare la vasocostrizione indotta da concentrazioni elevate di potassio e da agonisti come noradrenalina ed ET-1 (*Aardal e Helle, 1992, Angeletti et al., 1994*) e l'effetto inotropo positivo dell'ET-1 nel cuore di ratto (*Cerra et al., 2008*). Come dimostrato da nostri precedenti studi, anche il cuore di rana è un importante bersaglio per questi peptidi CGA-derivati sul quale inducono un'azione cardio-deprimente ed un effetto anti-adrenergico (*Corti et al., 2002; Tota et al., 2003*).

Considerata l'analogia azione cardio-soppressiva ed antiadrenergica della Cts evidenziata in questo studio, unitamente al già documentato ruolo del peptide come agente ipotensivo, è stata ipotizzata una possibile interazione tra Cts ed ET-1. Tale ipotesi è scaturita anche da un recente lavoro di Lillie e collaboratori (2007) nel quale è stato osservato che la CGA ricombinante umana è capace di stimolare il rilascio di ET-1 da cellule endoteliali umane suggerendo, pertanto, una possibile interazione tra sistema simpato-cromaffine e sistema endoteliale.

Dopo aver valutato l'effetto di base dell'ET-1 nel cuore di rana, è stato investigata la capacità da parte della Cts di modulare la risposta da ET-1 nonché il possibile meccanismo d'azione.

L'endotelina è uno dei regolatori fisiologici essenziali della funzionalità cardiaca e vascolare (*Brunner et al., 2006*). L'ET-1 induce, in molte specie di mammiferi incluso l'uomo, a livello vascolare costrizione e rilassamento dose-dipendenti ed a livello cardiaco effetti inotropi positivi e negativi. Tali effetti sono mediati all'interazione con due differenti recettori: ETA ed ETB che, espressi in vari sedi tissutali, inducono sull'attività cardiovascolare rispettivamente risposte stimolatorie e deprimenti.

In particolare, l'azione inotropica positiva dell'ET-1 è mediata dal recettore ETA attraverso un aumentato trasporto del calcio extracellulare (*Lauer et al., 1992*), un maggior rilascio di calcio dalle riserve sarcolemmali (*Vigne et al., 1992*) ed un aumento della responsività dei miofilamenti al calcio (*Nishimura et al., 1992*). In muscoli papillari di coniglio, Takanashi e Endoh (1991) hanno evidenziato che l'effetto positivo può essere mediato anche dal recettore ETB (sottotipo ETB2). Un effetto inotropo negativo, mediato dai recettori ETB (sottotipo ETB1), è stato osservato su strisce ventricolari di topo e su muscoli papillari di coniglio (*Izumi et al., 2000*) attraverso il rilascio di ossido nitrico e prostaglandine (*Leite-Moreira e Bras-Silva, 2004*).

In questo studio è emerso che l'ET-1, nel preparato cardiaco di rana in condizioni basali, induce a basse dosi (0.01nM) sempre un inotropismo negativo, mentre alle dosi più alte (0.1, 1 e 10 nM) un effetto bifasico: una risposta positiva o negativa (rispettivamente nel 50% dei preparati). Essendo il cuore di rana avascolare, l'effetto inotropo negativo osservato alle concentrazioni più alte (0.1, 1 e 10 nM) indica un diretto effetto sulla contrattilità miocardica non essendo imputabile a vasocostrizione coronarica come riportato nel caso dei mammiferi (*Brunner et al., 2006*).

Nel cuore di rana, l'inibizione del recettore ETA con BQ123 abolisce completamente l'effetto inotropo positivo indotto dall'ET-1, suggerendo che l'ET-1 utilizza tale recettore per esercitare il suo effetto inotropo positivo. Inoltre, la somministrazione di BQ123 non modifica l'effetto inotropo negativo alla concentrazione più bassa (0.01nM), indicando che l'ET-1, a questa concentrazione, attiva esclusivamente i recettori ETB. Al contrario, l'inibizione dei recettori ETB, da parte del BQ788, abolisce completamente l'effetto inotropo negativo a tutte le concentrazioni testate (0.01÷1 nM), evidenziando il coinvolgimento di questi recettori nella risposta negativa.

Un recente studio effettuato in muscoli papillari di coniglio, ha dimostrato che alte concentrazioni di ET-1 (1 nM) inducono un sostenuto effetto inotropo positivo, mentre in presenza dell'antagonista dei recettori ETA si evidenzia un effetto inotropo negativo dovuto all'attivazione degli ETB (*Leite-Moreira e Bras-Silva, 2004*). Lo stesso studio dimostra che la risposta mediata dagli ETB risulta essere NO-dipendente e richiede l'integrità dell'EE.

Simili risultati sono stati ottenuti anche nel presente lavoro: il pretrattamento con L-NMMA, ODQ e Triton X-100 abolisce completamente l'effetto inotropo negativo del'ET-1 confermando il ruolo

determinante del pathway NOS-NO-cGMP e dell'EE in tale risposta. Ciò confermerebbe, inoltre, la localizzazione a livello endocardico dei recettori ETB. Al contrario, nell'effetto inotropo positivo indotto dall'ET-1, mediato dai recettori ETA, non è coinvolta l'attivazione della eNOS in quanto il pretrattamento con L-NMMA non modifica tale risposta.

Allo scopo di verificare se la Cts fosse in grado di modulare gli effetti dell'ET-1, abbiamo effettuato una curva concentrazione-risposta di tale peptide in presenza di Cts. Il pretrattamento con Cts ha abolito completamente la risposta inotropica positiva dell'ET-1 suggerendo una possibile interazione tra Cts e recettori per l'endotelina.

Quando l'effetto della Cts a dosi crescenti è stato testato in presenza di inibitori dei recettori ETB o ETA (rispettivamente BQ788 e BQ123), è emerso che in presenza di BQ788, l'effetto inotropo negativo viene inibito, mentre permane in presenza di BQ123, suggerendo che l'azione cardio-soppressiva della Cts è mediata dai recettori ETB, ma non dagli ETA. L'attivazione dei recettori ETB, a livello endocardico, sarebbe dunque responsabile degli effetti cardio-inibitori indotti dalla Cts attraverso il pathway NOS-NO-cGMP.

Inoltre, la dimostrazione che la capacità della Cts di abolire l'inotropismo positivo dell'ET-1 è annullata in presenza di BQ788, evidenzia che il recettore ETA non è un target per la Cts e conferma il ruolo determinante del recettore ETB nell'azione modulatrice del peptide CGA-derivato. Allo stesso tempo, poiché l'effetto inotropo positivo dell'ET-1 in presenza di Cts non è più visibile neanche alle dosi più elevate, è presumibile che l'attivazione dei recettori ETB da parte della Cts domini sull'attivazione degli ETA operata dall'ET-1.

Il ruolo fondamentale dei recettori ETB nel mediare gli effetti della Cts è stato anche verificato nell'azione anti-adrenergica evidenziata precedentemente. Infatti, la capacità da parte della Cts di contrastare la stimolazione adrenergica scompare completamente dopo la somministrazione di BQ788. Nell'insieme, i risultati ottenuti suffragano l'ipotesi che la Cts possa mediare il suo effetto anti-adrenergico attraverso l'attivazione dei recettori ETB.

Conclusioni

I risultati ottenuti nel presente lavoro hanno dimostrato per la prima volta nel cuore dell'anfibio *Rana esculenta* che la Cts, frammento C-terminale della CGA esercita un effetto cardio-soppressivo in condizioni basali ed un'azione antiadrenergica. Sia l'inotropismo negativo che la capacità di contrastare la stimolazione da isoproterenolo sembrano essere dovute all'interazione del peptide con i recettori ETB, ma non ETA, come evidenziato dall'uso di antagonisti selettivi per tali recettori. Il recettore ETB, localizzato a livello dell'endocardio, attiverebbe a sua volta il pathway NOS-NO-cGMP. La dimostrazione che un EE integro è fondamentale per mediare l'azione cardio-soppressiva della Cts, conferma tale ipotesi evidenziando l'importanza di questo tessuto nel mediare stimoli intraluminali. Un ruolo determinante del recettore ETB è stato anche dimostrato nella capacità della Cts di inibire l'effetto inotropo positivo indotto dall'ET-1, ed avvalorare l'ipotesi di una interazione tra sistema simpato-cromaffine ed endotelio.

Dal punto di vista omeostatico, la funzione di modulatore autocrino-paracrino della Cts potrebbe essere particolarmente importante in condizioni di stress, quando il cuore diviene bersaglio preferenziale di un'iperstimolazione adrenergica o indotta da ET-1. In particolare, l'azione anti-adrenergica della Cts potrebbe rivelare nuove informazioni circa la

connessione “cuore-cervello” e suggerire nuovi meccanismi neuroendocrini che potrebbero contrastare l'inizio e il decorso di condizioni fisiopatologiche determinate dall'iperattivazione adrenergica.

Bibliografia

- Aardal S., 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**:405-12.
- Aardal S, Aardal NP, Larsen TH, Angeletti RH, Stridsberg M, Taupenot L, Aunis D, Helle KB. (1996).** Human pheochromocytoma: different patterns of catecholamines and chromogranins in the intact tumour, urine and serum in clinically unsuspected cases. *Scand. J. Clin. Lab Invest.* **56(6)**:511-23.
- Acierno R, Gattuso A, Guerrieri A, Mannarino C, Amelio D, Tota B. (2008).** Nitric oxide modulates the frog heart ventricle morphodynamics. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*; **151(1)**:51-60.
- Angeletti RH, Aardal S, Serck-Hanssen G, Gee P, Helle KB. (1994).** Vaso-inhibitory activity of synthetic peptides from the amino terminus of chromogranin A. *Acta. Physiol. Scand.* **152(1)**:11-9.
- Angelone T, Quintieri AM, Brar BK, Limchaiyawat PT, Tota B, Mahata SK, Cerra MC. (2008).** The antihypertensive chromogranin a peptide catestatin acts as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac inotropism and lusitropism. *Endocrinology*; **149**:4780-93.
- Balakrishnan S.M., Wang H.D., Gopalakrishnan V., Wilson T.W., McNeill J.R. (1996).** Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hypertension*; **28**:806-809
- Balligand J.L. (2000).** Regulation of cardiac function by nitric oxide. In: Mayer, B. (Ed.), Nitric Oxide. *Handbook of Exp. Pharmacol.*; **43**:206-234.
- Banks P. and Helle K.B. (1965).** The Release of Protein from the Stimulated Adrenal Medulla. *Biochem. J.*; **97**:40c
- Battistini B., D'Orleans-Juste P., Sirois P. (1993).** Endothelins-circulating plasma level and presence in other biological fluid. *Lab. invest.*; **68**:600-628.
- Beasley D., Schwartz J.H., Brenner B.M. (1991).** Interleukin-1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *Clin. Invest.*; **87 (2)**: 602-608.
- Belloni A.S., Rossi G.P., Andreis P.G., Neri G., Albertin G., Pessina A.C., Nussdorfer G.G. (1996).** Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension*; **27**:1153-1159.

Bendall J.K., Damy T., Ratajczak P., Loyer X., Monceau V., Marty I., Milliez P, Robidel E, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. (2004). Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation*; **110**:2368–75.

Benedum U.M., Baeuerle P.A., Konecki D.S., Frank R., Powell J., Mallet 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.

Biswas N., Vaingankar S.M., Mahata M., Das M., Gayen J.R., Taupenot L., Torpey J.W., O'Connor D.T., Mahata S.K. (2008). Proteolytic cleavage of human chromogranin a containing naturally occurring catestatin region by. *Endocrinology*; **149**:749-757.

Blais V., Fugere M., Denault J. B., Klarskov K., Day R., Leduc R. (2002). Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.* **524**: 43–48.

Bloch K.D., Hong C.C., Eddy R.L., Shows T.B., Quertermous T. (1991). cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics*; **10**:236-242.

Boulter J., Hollmann M., O'Shea-Greenfield A., Hartley M., Deneris E., Maron C., Heinemann S. (1990). Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science*; **249**:1033-37.

Bouso-Mittler D., Kloog Y., Wollberg Z. Bdolah A, Kochva E, Sokolovsky M. (1989). Functional endothelin/sarafotoxin receptors in the rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Com.*; **162**:952-57.

Brennan P.A. and Moncada S. (2002). From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*; **84**(2):75-78.

Briolat J., Wu S.D., Mahata S.K., Gonthier B., Bagnard D., Chasserot-Golaz S., Helle K.B., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (2005). New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell. Mol. Life Sciences*; **62**: 377-85.

Brunner F., Bra's-Silva C., Cerdeira A.S., Leite-Moreira. A.F. (2006). Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Therap.*; **111**: 508-31.

Brutsaert DL. (2003). Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance and rhythmicity. *Physiol. Rev.* **83**:59–115,.

Carlsten A, Poupa O, Winell S. (1980). Cardiac lesions in the frog induced by adrenaline. *Acta Pharmacol. Toxicol.*; **47**(5):359-64.

Ceconi C, Ferrari R, Bachetti T, Opasich C, Volterrani M, Colombo B, Parrinello G, Corti A. (2002). Chromogranin A in heart failure; a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality *Eur Heart J.*; 23(12):926-7.

Cerra MC, De Iuri L, Angelone T, Corti A, Tota B (2006). Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res. Cardiol.*; **101(1)**: 43-52.

Cerra M.C., Gallo M.P., Angelone T., Quintieri A.M., Pulerà E., Filice E., Guérolde B., Shooshtarizadeh P., Levi R., Ramella R., Brero A., Boero O., Metz-Boutigue M.H., Tota B., 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(11)**:3992-4004.

Champion H.C. and Kadowitz P.J. (1997). NO release and opening of K⁺ ATP channels mediate vasodilator responses to histamine in the cat. *Am. J. Physiol.*; **273**:928-37.

Corti A., Ferrari R., Ceconi C. (2000). Chromogranin A and tumor necrosis factor- α (TNF) in chronic heart failure. *Adv Exp Med Biol.*; **482**:351-9.

Corti A., Mannarino C., Mazza R., Colombo B., Longhi R., Tota B. (2002). Vasostatin exert negative inotropism in the working heart of the frog. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; **971**:362-65.

Corti A., Mannarino C., Mazza, R., Angelone T., Longhi R., 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(2)**:217-24.

Cross L.J., Beck-Sickinger A.G., Bienert M., Gaida W., Jung G., Krause E., Ennis M. (1996). Structure activity studies of mast cell activation and hypotension induced by neuropeptide Y (NPY), centrally truncated and C-terminal NPY analogs. *Br.J.Pharmacol.*; **117**:325-32.

Cuello F., Bardswell S.C., Haworth R.S., Yin X., Lutz S., Wieland T., Mayr M., Kentish J.C., Avkiran M. (2007). Protein kinase D selectively targets cardiac troponin I and regulates myofilament Ca²⁺ sensitivity in ventricular myocytes. *Circ Res.*; **100(6)**:864-73.

D'Orleans-Juste P., Plante M., Honore' J. C., Carrier E., Labonte' J. (2003). Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*; **81**: 503–510.

Davenport A.P., Nunez D.J., Hall J.A., Kaumann A.J., Brown M.J. (1989). Autoradiographic localization of binding sites for porcine 125-I-endothelin 1 in human, pigs, and rat: functional relevance in humans. *J Cardiovasc. Pharmacol.*; **13**:5166-70.

Damy T., Ratajczak P., Robidel E., Bendall J.K., Olivero P., Boczkowski J., Ebrahimian T., Marotte F., Samuel J.L., Heymes C. (2003). Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB J.* **17**:1934–6.

Damy T., Ratajczak P., Shah A.M., Camors E., Marty I., Hasenfuss G., Marotte F., Samuel J.L., Heymes C. (2004). Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*; **363**:1365–7.

Dawson D., Lygate C.A., Zhang M.H., Hulbert K., Neubauer S., Casadei B. (2005). nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation.* **112(24)**:3729-37.

Devillier P., Drapeau G., Renoux M., Regoli D. (1989). Role of the N-terminal arginine in the histamine-releasing activity of substance P, bradykinin and related peptides. *Eur. J. Pharmacol.*; **168**:53-60.

Doblinger A., Becker A., Seidah N.G., Laslop A. (2003). Proteolytic processing of chromogranin A by the prohormone convertase PC2. *Reg. Pept.*; **111**:111-16.

Emadi-Khiav B., Mousli M., Bronner C., Landry Y. (1995). Human and rat cutaneous mast cells: involvement of a G protein in the response to peptidergic stimuli. *Eur. J. Pharmacol.*; **272**:97-102.

Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Norota I. (1998). Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci.*; **62(17-18)**:1485-9.

Fecteau M.H., Honore´ J.C., Plante M., Labonte´ J., Rae G.A., D’Orleans-Juste P. (2005). Endothelin-1 (1– 31) is an intermediate in the production of endothelin-1 after big endothelin-1 administration *in vivo*. *Hypertension.* **46**: 87– 92.

Feldman S.A. and Lee E.E. (2003). The Chromogranins: Their Roles in Secretion from Neuroendocrine Cells and as Markers for Neuroendocrine Neoplasia. *End. Pathology*; **14**:3-24.

Fenster C.P., Rains M.F., Noerager B., Quick M.W., Lester R.A. (1997). Upregulation of Surface $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptors Is Initiated by Receptor Desensitization after Chronic Exposure to Nicotine *J. Neurosci.*; **17**:5747-59.

Feron O., Belhassen L., Kobzik L., Smith T.W., Kelly R.A., Michel T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.*; **271**:22810–4.

Fischmeister R., Castro L., Abi-Gerges A., Rochais F., Vandecasteele G. (2005). Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp. Biochem. Physiol.*; **142**:136-43.

- Galie N., Manes A., Branzi A. (2004).** The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.*; **61**:227-37.
- Galzi J.L. and Changeux J.P. (1995).** Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacol*; **34**: 563-82.
- Gattuso A., Mazza R., Pellegrino D., Tota B. (1999).** Endocardial endothelium mediates luminal Ach-NO signaling in isolated frog heart. *Am. J. Physiol.*; **276**:633-41.
- Giannessi D., Del Ry S., Vitale R.L (2001).** The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol. Res.*; **43**(2):111-26(16).
- Gillespie M.N., Owasoyo J.O., McMurtry I.F., O'Brien R.F. (1986).** Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released by endothelial cells in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; **239**:339-43.
- Glattard E., Angelone T., Strub J.M., Corti A., Aunis D., Tota B., Metz-Boutigue M.H., Goumon Y. (2006).** Characterization of natural vasostatin-containing peptides in rat heart. *FebsJ.*; **273**:3311-21.
- Goto K., Kasuya Y., Matsuki N., Takuwa Y., Kurihara H., Ishikawa T., Kimura S., Yanagisawa M., Masaki T. (1989).** Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; **86**(10):3915-8.
- Guo X. and Wakade A.R. (1994).** Differential secretion of catecholamines in response to peptidergic and cholinergic transmitters in rat adrenals. *J. Physiol.*; **475**:539-545.
- Helle K.B. and Angeletti R.H. (1994).** Chromogranin A: a multipurpose prohormone. *Acta Physiol. Scand.*; **152**: 1-10.
- Helle K.B., Corti A., Metz-Boutigue M.H., Tota B. (2007).** The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life Sci.*; **64**(22):2863-86.
- Herrero C.J., Ales E., Pintado A.J., Lopez M.G., Garcia-Palomero E., Mahata S.K., O'Connor D.T., Garcia A.G. Montiel C. (2002).** Modulatory mechanism of the endogenous peptide Catestatin on neuronal nicotinic- acetylcholinic receptors and exocytosis. *J. Neuroscience*; **22**:377-88.
- Huganir R.L., Delcour A.H., Greengard P. and Hess G.P. (1986).** Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature*; **321**:774-76.
- Huttner W.B., Gerdes H.H., Rosa P. (1991).** The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem. Sci.*; **16**:27-30.

- Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. (1999).** Nitric Oxide as a Signaling Molecule in the Vascular System: An Overview. *J. Cardio. Pharmacol.*; **34(6)**:879-86.
- Imbrogno S., Angelone T., Corti A., Adamo C., Helle K.B., Tota B. (2004).** Influence of vasostatsins, the chromogranin A-derived peptides, on the working heart of the eel (*Anguilla anguilla*): negative inotropy and mechanism of action. *Gen. Comp. Endocrinol.*; **139(1)**:20-28.
- Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S. Kasuya Y., Miyauchi T., Goto K., Masaki T. (1989).** The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct iso-peptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **86**:2864-67.
- Izumi M., Miyamoto S., Hori M., Ozaki H., Karaki H. (2000).** Negative inotropic effect of endothelin-1 in the mouse right ventricle. *Eur. J. Pharmacol.*; **396**: 109– 117.
- Karne S., Jayawickreme C.K., Lerner M.R. (1993).** Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.*; **268**:19126-133.
- Kennedy B., Shen G.H., Ziegler M.G. (1997).** Neuropeptide Y mediated pressor responses following high-frequency stimulation of the rat sympathetic nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; **281**:291-96.
- Kennedy B.P., Mahata S.K., O'Connor D.T., Ziegler M.G. (1998).** Mechanism of Cardiovascular Actions of the Chromogranin A Fragment Catestatin In Vivo. *Peptides*; **19**:1241-48.
- Kieffer A.E., Goumon Y., Ruh O., Chasserot-Golaz S., Nullans G.R., Gasnier C., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (2003)** The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J.*; **17**:776-78.
- 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.
- Kirihara H., Yoshizumi M., Suguiyama T. (1989).** Transforming growth factor beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com*; **159**:1435-140.
- Kotake-Nara E. and Saida K. (2006).** Endothelin-2/vasoactive intestinal contractor: regulation of expression via reactive oxygen species induced by CoCl₂, and Biological activities including neurite outgrowth in PC12 cells. *Scient. World Jl.*; **6**:176-86.
- Kourembanas S., Mcquillan L.E., Leung G.K., Faller D.V. (1993).** Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *Clin. J. Invest.* ;**92**:99-104.
- Laflamme K., Roberge C.J., Grenier G., Rémy-Zolghadri M., Pouliot S., Baker K., Labbé R., D'Orléans-Juste P., Auger F.A., Germain L. (2006).** Adventitia

contribution in vascular tone: insights from adventitia-derived cells in a tissue-engineered human blood vessel *FASEB J.*; **20**:1245-47.

Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T. (1992). “Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform”. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*; **89**:6348-52.

Lauer M.R., Gunn M.D., Clusin W.T. (1992). Endothelin activates voltage-dependent Ca²⁺ current by a G protein-dependent mechanism in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.*; **448**: 729-747.

Lee J.C., Taylor C.V., Gaucher S.P., Toneff T., Taupenot L., Yasothornsrikul S., Mahata S.K., Sei C., Parmer R.J., Neveu J.M., Lane W.S., Gibson B.W., O'Connor D.T., Hook V.Y. (2003). Primary Sequence Characterization of Catestatin Intermediates and Peptides Defines Proteolytic Cleavage Sites Utilized for Converting Chromogranin A into Active Catestatin Secreted from Neuroendocrine Chromaffin Cells. *Biochemistry*; **42**:6938-46.

Leite-Moreira A.F. and Bras-Silva C. (2004). Inotropic effects of ETB receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; **287**:1194-99.

Lèna C. and Changeux J.P. (1993). Allosteric modulations of the nicotinic receptors by opiate receptor agonists in cultured adrenal chromaffin cells. *Nature*; **283**: 489-92.

Lerman A., Edwards B.S., Hallett J.W., Heublein D.M., Sandberg S.M., Burnett J.C. (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*; **325**:997-1001.

Lillie E.O., Mahata M., Khandrika S., Rao F., Bunday R.A., Wen G., Chen Y, Taupenot L., Smith D.S., O'Connor S.K. (2007). Heredity of Endothelin Secretion: Human Twin Studies Reveal the Influence of Polymorphism at the Chromogranin A Locus, a Novel Determinant of Endothelial Function. *Circulation*; **115**:2282-2291.

Lindstrom J., Anand R., Peng X., Gerzanich V., Wang F., Li Y. (1995). Neuronal nicotinic receptor subtypes *Ann. N. Y. Acad. Sci*; **757**:100-16.

Lukas R.J. and Bencherif M. (1992) Heterogeneity and regulation of nicotinicacetylcholine receptors.*Int. Rev. Neurobiol.*; **34**, 25-131.

Lüscher T.F., Enseleit F., Pacher R., Mitrovic V., Schulze M.R., Willenbrock R., Dietz R., Rousson V., Hürlimann D., Philipp S., Notter T., Noll G., Ruschitzka F. (2000). Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* ; **102**:2434-440.

Maemura, K., Kurihara, H., Morita, T., Ohhashi, Y., Yazaki, Y. (1992). Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology*. **38**: 29–35.

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.R., Mahata S.K. (2005). Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J. Clin. Inv.*; **115(7)**:1942-52.

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 non competitive nicotinic cholinergic antagonist. *J. Clin. Invest.*; **100**:1623–1633.

Mahata S.K., Mahata M., Parmer R.J., O'Connor D.T. (1999). Desensitization of catecholamine release: the novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A3442364) acts at the receptor to prevent nicotinic cholinergic tolerance. *J. Biol. Chem.*; **274**:2920-28.

Mahata S.K., Mahata M., Wakade A.R., O'Connor D.T. (2000). Primary structure and function of the catecholamine release inhibitory peptide catestatin (chromogranin A 3442364): identification of amino acid residues crucial for activity. *Mol. Endocrinol.*; **14**:1525-35.

Mahata S.K., Mahapatra N.R., Mahata M., Wang T.C., Kennedy B.P., Ziegler M.G., O'Connor D.T. (2003). Catecholamine secretory granules stimulus-transcription coupling in vivo. Demonstration by a novel transgenic promoter/photoprotein reporter and inhibition of secretion and transcription by the Chromogranin A fragment Catestatin. *Biol. Chem.*; **22**:278-34.

Mahata S.K., Mahata M., Wen G., Wong W.B., Mahapatra N.R., Hamilton B.A., O'Connor D.T. (2004). The catecholamine release-inhibitory "catestatin" fragment of chromogranin a: naturally occurring human variants with different potencies for multiple chromaffin cell nicotinic cholinergic responses. *Mol. Pharmacol.*; **66(5)**:1180-91.

Martin E.R., Marsden P.A., Brenner B.M., Ballermann B.J. (1989). Identification and characterization of endothelin binding sites in rat renal papillary and glomerular membranes. *Biochem. Biophys. Res. Com.*; **162**:130-37.

Masaki T. (2004). Historical review: endothelin. *Trends Pharmacol. Sci.*; **25**:219-24.

Massion P.B. and Balligand J.L. (2003). Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J. Physiol.*; **546**: 63-75.

Massion P.B., Pelat M., Belge C., Balligand J.L. (2005) Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **142(2)**:144-50.

- McClellan G., Weisberg A., Winegrad S. (1996).** Effect of endothelin-1 on actomyosin ATPase activity—Implications for the efficiency of contraction. *Circ. Res.*; **78**: 1044– 1050.
- Meyer M., Lehnart S., Pieske B., Schlottauer K., Munk S., Holubarsch C., Just H., Hasenfuss G. (1996).** Influence of endothelin 1 on human atrial myocardium-myocardial function and subcellular pathways. *Basic. Res. Cardiol.*; **91**: 86– 93.
- Mery P.F., Pavoine C., Belhassen L., Pecker F., Fischmeister R. (1993).** Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J. Biol. Chem.*; **268(35)**:26286-95.
- Metz-Boutigue M.H., Garcia-Sablone P., Hogue-Angeletti R., Aunis D. (1993).** Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*; **217**:247-57.
- Miller L.W., Redfield M.M., Burnett J.C. (1989).** Integrated cardiac, renal, and endocrine action of endothelin. *J. Clin. Invest.*; **83**:317-20.
- Moody C.J., Dashwood M.R., Sykes R.M., Chester M., Jones S.M., Yacoub M.H., Harding S.E. (1990).** Functional and autoradiographic evidence for endothelin-1 receptors on human and reactivated cardiac myocytes. *Circ. Res.*; **67**:764-69.
- Morawietz H., Szibor M., Goettsch W., Bartling B., Barton M., Shaw S., Koerfer R., Zerkowski H.R., Holtz J. (2000).** Unloading of the left ventricle by ventricular assist device normalizes increased expression of endothelin ET(A) receptors but not endothelin-converting enzyme-1 in patients with end-stage heart failure. *Circulation*; **102**:188-193.
- Morawietz H., Talanow R., Szibor M., Rueckschloss U., Schubert A., Bartling B., Darmer D., Holtz J. (2000).** Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J. Physiol.*; **525**:761-70.
- Mosley C.A., Taupenot L., Biswas N., Taulane J.P., Olson N.H., Vaingankar S.M., Wen G., Schork N.J., Ziegler M.G., Mahata S.K., O' Connor D.T. (2007).** Biogenesis of the secretory granule: chromogranin a coiled-coil structure results in unusual physical properties and suggests a mechanism for granule core condensation. *Biochemistry*; **46**: 10999-11012.
- Mousli M. and Landry Y. (1994).** Role of positive charges of neuropeptide Y fragments in mast cell activation. *Ag. Act.*; **41**:41-42
- Murray S.S., Deaven L.L., Burton D.W., O'Connor D.T., Mellon P.L., Deftos L.J. (1987).** The gene for human chromogranin A (CgA) is located on chromosome 14. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; **142**:141-6.

- Nakajo S., Sugiura M., Snajdar R.M., Boehm F.H., Inagami T. (1989).** Solubilization and identification of human placental endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Com.*; **164**:205-11.
- Nishimura J., Moreland S., Ahn H.Y., Kawase T., Moreland R.S., van Breemen C. (1992).** Endothelin increases myofilament Ca²⁺ sensitivity in alpha-toxin-permeabilized rabbit mesenteric artery. *Circ. Res.*; **71**(4): 951-9.
- Nobels F.R., Kwekkeboom D.J., Bouillon R., Lamberts S.W. (1998).** Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest.*; **28**(6):431-40.
- O'Connor D.T., Frigon R.P. (1984).** Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. *J. Biol. Chem.*; **259**:3237-3247.
- 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**:1335-45.
- Ochoa E.L., Chattopadhyay A., McNamee M.G. (1989).** Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: Molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell. Mol. Neurobiol.*; **9**:141-78.
- Ohkita M., Takaoka M., Sugii M., Shiota Y., Nojiri R., Matsumura Y. (2003).** The role of nuclear factor-KB in the regulation of endothelin-1 production by nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*; **472**:159-164.
- Pieroni M, Corti A, Tota B, Curnis F, Angelone T, Colombo B, Cerra MC, Bellocchi F, Crea F, Maseri A. (2007).** Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. *Eur. Heart J.* **28**(9): 1117-27.
- Polontchouk L., Ebelt B., Jackels M., Dhein S. (2002).** Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *FASEB J.*; **16**:87-89.
- Qiu Z., Wang J., Perreault C.L., Meuse A.J., Grossman W., Morgan J.P. (1992).** Effects of endothelin on intracellular Ca²⁺ and contractility in single ventricular myocytes from the ferret and human. *Eur J Pharmacol.*; **214**(2-3):293-6.
- Radek K.A., Lopez-Garcia B., Hupe M., Niesman I.R., Elias P.M., Taupenot L., Mahata S.K., O'Connor D.T., Gallo R.L. (2008).** The Neuroendocrine Peptide Catestatin Is a Cutaneous Antimicrobial and Induced in the Skin after Injury. *J. Invest. Dermatol.*; **128**(6):1525-34.
- Ramzy D., Rao V., Tumiati L.C., Xu N., Sheshgiri R., Miriuka S., Delgado D.H., Ross H.J. (2006).** Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation*; **114**:1319–26.

- Rao F., Wen G., Gayen J.R., Das M., Vaingankar S.M., Rana B.K., Mahata M., Kennedy B.P., Salem R.M., Stridsberg M., Abel K., Smith D.W., Eskin E., Schork N.J., Hamilton B.A., Ziegler M.G., Mahata S.K., O'Connor D.T. (2007).** Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A 352–372): naturally occurring amino acid variant gly364ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation*; **115**:2271-81.
- Reiffen F.U. and Gratzl M. (1986).** Ca²⁺ binding to chromaffin vesicle matrix proteins: effect of pH, Mg²⁺ and ionic strength. *Biochemistry*; **25**:4402-6.
- Repke H., Piotrowski W., Bienert M., Foreman J.C. (1987).** Histamine release induced by ArgProLysPro(CH₂)₁₁CH₃ from rat peritoneal mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; **243**:317-21.
- Rona G., Zsoter T., Chappel C., Gaudry R. (1959).** Myocardial lesions, circulatory and electrocardiographic changes produced by isoproterenol in the dog. *Rev. Can. Biol.*; **18**(1):83-94.
- Rosè S.D., Lejen T., Casaletti L., Larson R.E., Dumitrescu Pene T., Trifarò J.M. (2003).** Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J. Neurochemistry*. **85**:287-98.
- Russell, F. D., Skepper, J. N., Davenport, A. P. (1998).** Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*; **31**:424- 430.
- Sakurai K., Norota I., Tanaka H., Kubota I., Tomoike H., Endo M. (2002).** Negative inotropic effects of angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine in indo-1 loaded adult mouse ventricular myocytes. *Life Sci.*; **70**(10):1173-84.
- Schini V.B., Hendrickson H., Heublein D.M., Burnett J.C., Vanhoutte P.M. (1989).** Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*; **165**:333-34.
- Seccia T.M., Belloni A.S., Kreutz R., Paul M., Nussdorfer G.G., Pessina A.C., Rossi G.P. (2003).** Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J. Am. Coll. Cardiol.*; **41**:666-73.
- Shaul P.W. (2002).** Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.*; **64**:749–74.
- Shelton G. and Jones D.R. (1965).** Central blood pressure and heart output in surfaced and submerged frogs. *J. Exp. Biol.*; **42**: 339-57.
- Shinmi O., Kimura S., Sawamura T., Sugita Y., Yoshizawa T., Uchiyama Y., Yanagisawa M., Goto K., Masaki T., Kanazawa I. (1989).** Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **164**:587-93.

- Simon J.P., Bader M.F., Aunis D. (1988).** Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **5**:1712-16.
- Sokolovsky M., (1995).** Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.*; **68**:435-71.
- Steiner H.J., Weiler R., Ludescher C., Schmid K.W., Winkler H. (1990).** Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. *J. Histochem. Cytochem.*; **38**: 845-50.
- Skeberdis V.A., Jurevicius J., Fischmeister R. (1997).** Pharmacological characterization of the receptors involved in the beta-adrenoceptor-mediated stimulation of the L-type Ca²⁺ current in frog ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.*; **121(7)**:1277-86.
- Sys S.U., Pellegrino D., Mazza R., Gattuso A., Andries L.J., Tota B. (1997).** Endocardial endothelium in the avascular heart of the frog: morphology and role of nitric oxide. *J. Exp. Biol.*; **200**:3109-118.
- Takagi Y., Ninomiya H., Sakamoto A., Miwa S., Masaki T. (1995).** Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. *J. Biol. Chem.*; **270**:10072-78.
- Takanashi M. and Endoh M. (1991).** Characterization of positive inotropic effect of Endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* **261**:611-619.
- Takuwa Y., Masaki T., Yamashita K. (1990).** The effect of the endothelin family peptides on cultured osteoblastic cells from rat calvariae. *Biochem. Biophys. Res. Com.*; **170**:998-1005.
- Takahashi, K., Komaru, T., Takeda, S., Sato, K., Kanatsuka, H., Shirato, K. (2005).** Nitric oxide inhibition unmasks ischemic myocardium-derived vasoconstrictor signals activating endothelin type A receptor of coronary microvessels. *Am. J. Physiol.*; **289**: H85– H91.
- Taupenot L., Mahata S.K, Mahata M., Parmer R.J., O'Connor D.T. (2000).** Interaction of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (human chromogranin A) with the chromaffin cell surface and 352-372 *Torpedo* electroplax: implications for nicotinic cholinergic antagonism. *Reg. Pep.*; **95**:9-17.
- Taupenot L., Harper K.L., O'Connor D.T. (2003).** The Chromogranin Secretogranin Family. *N. Engl. J. Med.*; **348**:1134-49.
- Taylor C.V., Taupenot L., Mahata S.K., Mahata M., Wu H., Yasothornsrikul S., Toneff T., Caporale C., Jiang Q., Parmer R.J., Hook V.Y.H., O'Connor D.T. (2000).** Formation of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin from chromogranin A. Determination of proteolytic cleavage sites in hormone storage granules. *J. Biol. Chem.* **275**:22905-915.

- Tota B., Mazza R., Angelone T., Nullans G., Metz-Boutigue M.H., Aunis D., Helle K.B. (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.
- Tsigelny I., Mahata S.K., Taupenot L., Preece N.E., Mahata M., Khana I., Parmera R.J., O'Connor D.T. (1998).** Mechanism of action of chromogranin A on catecholamine release: molecular modeling of the catestatin region reveals a b-strand /loop /bstrand structure secured by hydrophobic interactions and predictive of activity. *Reg. Pep.*; **77**:43-53.
- Vibat C.R., Lasalde J.A., McNamee M.G., Ochoa E.L. (1995).** Differential desensitization properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.*; **15**: 411-25.
- Vierimaa H, Ronkainen J, Ruskoaho H, Vuolteenaho O. (2006).** Synergistic activation of salmon cardiac function by endothelin and beta-adrenergic stimulation. *Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.*; **291(3)**:H1360-70.
- Vigne P, Breittmayer JP, Frelin C. (1992).** Thapsigargin, a new inotropic agent, antagonizes action of endothelin-1 in rat atrial cells. *Am. J. Physiol.* **263(6 Pt 2)**:H1689-94.
- Wahler G.M. and Dollinger S.J. (1995).** Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol.*; **268**:45-54.
- Wen G., Mahata S.K., Cadman P., Mahata M., Ghosh S., Mahapatra N.R., Rao F., Stridsberg M., Smith D.W., Mahboubi P., Schork N.J., O'Connor D.T., Hamilton B.A. (2004).** Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology. *Am. J. Hum. Genet.*; **74**:197-207.
- Wiley K.E. and Davenport A.P. (2001).** Nitric oxide-mediated modulation of the endothelin-1 signalling pathway in the human cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.*; **132(1)**:213-20.
- Williams J.C., Armesilla A.L., Mohamed T.M., Hagarty C.L., McIntyre F.H., Schomburg S., Zaki A.O., Oceandy D., Cartwright E.J., Buch M.H., Emerson M., Neyses L. (2006).** The sarcolemmal calcium pump, α -1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J. Biol. Chem.*; **281**:23341-8.
- Winkler H. and Fischer-Colbrie R. (1992)** The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience*; **49**:497-528.
- Wonnacott, S. (1997).** Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Trends. Neurosci.*; **20**: 92-98.
- Wortzman J. (2002).** Role of epinephrine in acute stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **31(1)**:79-106.

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

Xu K.Y., Kuppusamy S.P., Wang J.Q., Li H., Cui H., Dawson T.M., Huang P.L., Burnett A.L., Kuppusamy P., Becker L.C. (2003). Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. *J. Biol. Chem.*; **278**:41798–803.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*; **332**:411-15.

Zhu ZG, Li HH, Zhang BR. (1997). Expression of endothelin-1 and constitutional nitric oxide synthase messenger RNA in saphenous vein endothelial cells exposed to arterial flow shear stress. *Ann. Thorac. Surg.*; **64(5)**:1333-8.