

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

FACOLTÀ DI FARMACIA E
SCIENZE DELLA NUTRIZIONE E DELLA SALUTE

Dottorato di Ricerca in

“Biochimica cellulare e attività dei farmaci in oncologia”

XXI CICLO

Settore disciplinare BIO/09

Ruolo del pathway trasduzionale dell'ossido
nitrico (NO) nella regolazione umorale
dell'attività cardiaca

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Diego Sisci

Docente Tutor

Chiar.mo Prof. Maria Carmela Cerra

Candidata

Dott.ssa Elisabetta Filice



SUMMARY **1****PREMESSA E SCOPO DELLA TESI** **4****INTRODUZIONE** **10**

1.	IL MAGGIORE SENSORE-INTEGRATORE ENDOCRINO /AUTOCRINO /PARACRINO: IL SISTEMA NOS-NO	10
1.1	LO NO: EFFETTI CONCENTRAZIONE-DIPENDENTE E COMPARTIMENTO-DIPENDENTE	11
1.2	LO NO: MODULATORE A BREVE E A LUNGO TERMINE	14
1.3	NO E STIMOLAZIONE ADRENERGICA	15
2.	IL CONTROLLO AUTOCRINO-PARACRINO DEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE	15
2.1	MODULAZIONE AUTOCRINO-PARACRINA DELL'ATTIVITÀ CARDIACA	17
2.1.1	LE CATECOLAMINE	17
2.1.2	LA CROMOGRANINA A (CGA) E I PEPTIDI DA ESSA DERIVATI	20
2.2	MODULAZIONE ENDOCRINA DELLA FUNZIONALITÀ CARDIACA: IL 17 β -ESTRADIOLO (17 β E2)	25
2.2.1	GLI ESTROGENI	25
2.2.2	ESTROGENI E TERAPIA ESTROGENICA NELL'UOMO	26
2.2.3	MODULAZIONE INTRACELLULARE ESTROGENICA DEL SEGNALE	27

MATERIALI E METODI **32**

1	MODELLO SPERIMENTALE. IL CUORE ISOLATO E PERFUSO SECONDO LANGENDORFF	32
2	ANIMALI	33
3	METODI	33
3.1	ISOLAMENTO E PERFUSIONE DEL CUORE DI RATTO SECONDO LA METODICA LANGENDORFF	33
3.1.1	APPARATO DI PERFUSIONE	33
3.1.2	DISSEZIONE, ISOLAMENTO ED INCANNULAZIONE DEL CUORE	35
3.1.3	MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ CONTRATTILE DEL CUORE.	36
3.1.4	PERFUSIONE E COMPOSIZIONE DEL PERFUSATO	37

3.1.5	SISTEMA DI ACQUISIZIONE E REGISTRAZIONE DEI PARAMETRI	38
3.1.6	PARAMETRI DELL'ATTIVITÀ CARDIACA	39
4	REVERSE-TRANSCRIPTION PCR (RT-PCR)	41
5	IMMUNOBLOTTING	43
6	PROTOCOLLI SPERIMENTALI	46
6.1	COMPOSTI CHIMICI	46
6.1.1	PCR	47
6.1.2	Immunoblotting	48
6.2.	CONDIZIONI BASALI DI PERFUSIONE	48
6.3.	CURVE DOSE-RISPOSTA	49
6.4.	PREPARAZIONI ISOPROTERENOLO (ISO) STIMOLATE	49
6.5.	PREPARAZIONI ENDOTELINA-1 (ET1) STIMOLATE	49
6.6.	COINVOLGIMENTO DELLE PROTEINE $G_{i/o}$	50
6.7.	STUDIO SUL MECCANISMO D'AZIONE	50
7.	DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI INTRACELLULARI DI cGMP E DI cAMP	50
8.	STATISTICA	51
<u>RISULTATI</u>		<u>52</u>
1.	EFFETTO CARDIOMODULATORE DELLA RCGA1-64	52
1.1	EFFETTO INOTROPO E LUSITROPICO DELLA RCGA1-64	52
1.2	ATTIVITÀ ANTIADRENERGICA DELLA RCGA1-64	53
1.3	EFFETTO DELLA RCGA1-64 IN PRESENZA DI ET1	54
1.4	COINVOLGIMENTO DELLE PROTEINE $G_{i/o}$	54
1.5	PATHWAYS TRASDUZIONALI ATTIVATI DALLA RCGA1-64	54
2.	EFFETTO CARDIOMODULATORE DEL 17β-E2	64
2.1	ESPRESSIONE CARDIACA DEI RECETTORI ESTROGENICI $ER\alpha$, $ER\beta$ E GPR30	64
2.2	AZIONE INOTROPA E LUSITROPICA DEL 17 β E2 E STIMOLAZIONE BASALE DI GPR30	64
2.3	COINVOLGIMENTO DEI RECETTORI $ER\alpha$ E $ER\beta$	66
2.4	COINVOLGIMENTO DELLE PROTEINE $G_{i/o}$	66
2.5	COINVOLGIMENTO DEL PATHWAY TRASDUZIONALE ERK-PI3K-PKA	67
2.6	COINVOLGIMENTO DELLA VIA ENOS-NO	67
3.	MODULAZIONE LUSITROPICA β3-ADRENERGICA	80
3.1	ESPRESSIONE CARDIACA DEL RECETTORE β 3-ADRENERGICO	80

3.2.	STIMOLAZIONE BASALE DEL RECETTORE β 3-ADRENERGICO	80
3.3.	COINVOLGIMENTO DEI RECETTORI ADRENERGICI β 1/ β 2 E DELLE PROTEINE G _i /O DI MEMBRANA	81
3.3.	ATTIVITÀ ANTIADRENERGICA DEL BRL	81
3.4.	COINVOLGIMENTO DELLA VIA NO-CGMP-PKG	82
<i>DISCUSSIONE</i>		88
1.	MODULAZIONE AUTOCRINA/PARACRINA CARDIACA MEDIATA DALLA RCGA1-64	89
1.1	LA RCGA1-64 È UN INIBITORE CARDIOATTIVO	89
1.2	INFLUENZE ANTIADRENERGICHE E MODULAZIONE DELL'EFFETTO ENDOTELINA-MEDIATO	92
1.3	TRASDUZIONE DEL SEGNALE RCGA1-64 _{S-S} MEDIATA	95
2.	MODULAZIONE CARDIACA MEDIATA DA UN FATTORE ENDOCRINO PURO: IL 17β-E2	96
2.1	IL 17 β -E2 È UN ORMONE CON ATTIVITÀ CARDIOTROPICA	97
2.2	MODULAZIONE CARDIACA DA STIMOLAZIONE BASALE DI GPR30	98
2.3	Coinvolgimento di ER α e ER β nell'effetto cardiotropo del 17 β -E2	100
2.4	PATHWAYS TRASDUZIONALI ATTIVATI DAL 17 β -E2	102
2.5	PATHWAYS TRASDUZIONALI MEDIATI DA ATTIVAZIONE DI GPR30	104
3.	MODULAZIONE LUSITROPICA NOS/NO-DIPENDENTE DELLA FUNZIONALITÀ CARDIACA: IL β3-AR	106
3.1.	SISTEMA β 3-ADRENERGICO: UN NUOVO PATHWAY NEUROENDOCRINO INTRINSECO	106
3.2.	ATTIVITÀ "ANTIADRENERGICA" DEL β 3-AR	108
3.3	PATHWAY TRASDUZIONALE ATTIVATO DAL β 3-AR	110
<i>CONCLUSIONI</i>		112
<i>BIBLIOGRAFIA</i>		116

Summary

Over the last 50 years, a large number of cardiovascular studies identified the ability of cardiac non-neuronal cells to synthesize and release several substances which are themselves involved in the control of heart performance. The first to be identified were catecholamines (CAs) and natriuretic peptides (NPs). Thanks to compartmentalized cardiac and vascular receptors, these substances activate local autocrine and paracrine circuits and regulate cardiovascular homeostasis in health and disease. This knowledge has firmly established the concept of the heart as an endocrine organ. Such scenario was enriched by the identification of a growing number of molecules (i.e. Angiotensin II, Adrenomedullin, Ghrelin, Neuropeptide Y, etc.) that, produced by the heart, exert endocrine/paracrine/autocrine cardiac actions. During the last five years, Chromogranin A (Cga) and its derived peptidic fragments have emerged as new players in the scenario of the endocrine heart. Cga is endo-proteolytically processed to give rise to several peptides of biological importance, including the fragment rCga1-64. A highly conserved cleavage N-terminal site is the bond 64-65, that reproduces the native rat sequence (rCga1-64), corresponding to the human N-terminal Cga-derived Vasostatin-1. Before being an endocrine organ, the heart mainly is a sensitive target for several nervous and humoral modulators whose transduction mechanisms, in many cases, converge on the nitric oxide (NO) pathway, which represents a signalling node. Although it cannot be properly considered a cardiac hormone, the highly diffusible gas NO, for its pleiotropic actions, represents a potent autocrine and paracrine modulator of cardiovascular physiology. Its production provides the

heart with a finely tuned tonic modulation of contractility, energetics and substrate metabolism, influencing cell growth and survival. At the same time, it works as a very sensitive spatio-temporal organizer through connection-integration processes, thereby playing a role in autocrine/paracrine networks configuration.

Aim of this study was to investigate the influence of the heart-derived rCga1-64 peptide and a pure endocrine factor, the 17β -estradiol, on the performance of the mammalian male heart. The direct influence of 17β -estradiol (17β E2) on the male heart has received little attention, even though multidisciplinary data have revealed 17β E2-induced cardiovascular actions. Attention was also focused on the role by the newly discovered adrenergic receptor β 3AR. The involvement of the NOS-NO system in the signal transduction cascade activated by these substances was analyzed by using the rat heart isolated and perfused according to Langendorff, a highly validated experimental model to study the cardiac performance of mammals.

Results showed that rCga1-64 induced negative inotropism and lusitropism as well as coronary dilation, counteracting Isoproterenol (Iso)- and endothelin(ET1)-induced positive inotropic effects and ET-1-dependent coronary constriction. The negative inotropism observed is probably due to an endothelial PI3K-dependent-NO positive activation.

Through the non genomic effect that require both activation of the classic estrogen receptor (ER) α and ER β and the novel estrogenic membrane G protein-coupled receptor, named GPR30, it found that negatively affected cardiac performance in a dose-dependent manner. 17β E2-induced cardiac responses involved Gi/o protein

coupled membrane receptor, ERK1/2, PI3K, PKA, and eNOS transduction pathways.

In light of the recent identification of a novel type of cardiac β -receptor, called β 3-AR, and of the emerging new adrenergic mechanisms which control the mammalian heart, it found that the activation of the adrenoceptors elicits negative lusitropic actions modulating in a positive manner the NO-cGMP pathway.

The data from this work confirm the hypothesis that autocrine/paracrine rCga1-64, produced by the heart (human, rat), and the 17β -E2, a pure endocrine factor, are important homeostatic regulators of the cardiovascular system, able to active a NOS/NO system positioned at the cross-road of many extrinsic and intrinsic neuro-endocrine pathways (i.e. β 3-adrenergic system).

Premessa e scopo della tesi

Il cuore oltre a rappresentare un importante bersaglio di numerose molecole di natura ormonale e nervosa, è sito di produzione di diversi ormoni, i quali esercitano importanti funzioni autocrino/paracrine sia in condizioni fisiologiche che patologiche. La scoperta che il cuore possiede cellule con caratteristiche mioendocrine ha quindi permesso di definire senza equivoci la natura del cuore come organo endocrino.

Pur non essendo considerato un vero e proprio ormone, l'ossido nitrico (NO) rappresenta un importante modulatore spazio/temporale autocrino/paracrino dei processi di connessione/integrazione dei segnali intracellulari, coinvolto in un ampio range di processi fisiologici e patologici atti a mantenere l'omeostasi cardiovascolare.

Lo NO viene generato da una famiglia di enzimi conosciuti come NO-sintasi (NOSs). Lo NO è una specie radicalica libera, con un elettrone spaiato, capace di interagire con più substrati, qualità che spiega la varietà di reazioni biologiche in cui è coinvolto. Tali effetti, spesso opposti, sono il risultato di una modulazione spazio-temporale delle diverse isoforme della NOS. Esso può interagire con altri radicali, ioni metallici di transizione e nucleofili come i tioli e le amine, producendo così effetti diretti o indiretti.

Gli effetti diretti spesso coinvolgono interazioni tra lo NO e i complessi metallici. Le reazioni tra lo NO e proteine contenenti il gruppo eme sono fisiologicamente più rilevanti e includono interazioni con la guanilato ciclastasi solubile (sGC) e il citocromo P450. L'attivazione della sGC porta ad un aumento della concentrazione di cGMP ed alla attivazione di una protein-chinasi cGMP-dipendente (PKG) il cui ruolo fondamentale è quello di modulare negativamente

la concentrazione del calcio intracellulare. Inoltre, lo NO può interagire con le proteine non-eme contenenti ferro e le proteine contenenti zinco.

Gli effetti indiretti dello NO sono mediati da specie nitrogeno reattive prodotte dall'interazione tra lo NO e l'ossigeno o i radicali superossido.

A basse dosi di NO (< 1 μ M) prevalgono gli effetti diretti mentre ad alte dosi (>1 μ M) gli effetti indiretti sono predominanti (reviewed in Cerra & Pellegrino, 2007). Ciò, a livello cardiaco, si traduce in un effetto ormesico per cui si produce un effetto inotropo negativo ad alte concentrazioni di NO ed il contrario a basse concentrazioni (Massion et al., 2003). Il profilo spaziale degli effetti NO-dipendenti è garantito dalla selettiva localizzazione intracellulare delle diverse isoforme della NOS.

Il sistema intracardiaco NOS/NO è posizionato al crocevia di molti pathway trasduzionali neuroendocrini intrinseci e estrinseci atti a modulare l'attività cardiaca sia di molecole di derivazione propriamente cardiaca sia di sostanze nervose e umorali di derivazione extracardiaca.

Nel contesto della modulazione autocrino/paracrina dell'attività cardiaca, numerose evidenze sperimentali riportano la capacità di cellule cardiache non neuronali di sintetizzare e rilasciare catecolamine (CAs). Queste cellule, cui è stato dato il nome di ICA (Intrinsic Cardiac Adrenergic) (Huang et al., 1996), sono capaci di generare un segnale paracrino adrenergico, recettore-mediato, regolatore dell'attività cardiaca. Recentemente il pool cardiaco dei recettori adrenergici (ARs) è stato arricchito dalla scoperta di un nuovo sottotipo di recettore, identificato come β 3-AR, anch'esso associato a proteine G di membrana (Gauthier et al., 2000) e caratterizzato da un'alta omologia con i classici β 1/ β 2 ARs

(rispettivamente 51% e 46%; Skeberdis, 2004). La stimolazione del recettore β_3 -AR induce un effetto inotropo negativo associato ad una riduzione dell'ampiezza e della durata del potenziale (Gauthier et al., 1996). Questo effetto è mediato dal rilascio di NO attraverso attivazione della eNOS (Gauthier et al., 1998; Varghese et al., 2000). Il conseguente incremento intracellulare di cGMP comporta attivazione della fosfodiesterasi di tipo 2 (PDE2) e quindi decremento di cAMP intracellulare. Questo induce un meccanismo a feedback negative β_3 -AR /NO/cGMP che limita l'effetto β_1 -cAMP-dipendente (Mongillo et al., 2006).

Una nuova famiglia di modulatori endocrini intracardiaci è rappresentata dalla Cromogranina A (Cga) e dai peptidi da essa derivati. Nel miocardio, la Cga è co-immagazzinata e co-rilasciata con il peptide natriuretico atriale (ANP) in cellule mioendocrine non-adrenergiche e nelle fibre del Purkinje. La Cga è precursore di peptidi biologicamente attivi prodotti in seguito a clivaggio proteolitico. Tra questi, il frammento Cga 1-76 o Vasostatina 1 (VS-1), chiamato così per la sua capacità di rilassare vasi precontratti (Aardal & Helle, 1992) rappresenta un importante inibitore della funzionalità cardiaca, agendo da stabilizzatore cardiaco soprattutto in condizioni di intensa stimolazione, quale quella in risposta alle CAs (Cerra et al., 2006; Cappello et al., 2007; Pieroni et al., 2007; Gallo et al., 2007).

Inizialmente identificata nei granuli delle cellule mioendocrine atriali e del sistema di conduzione di cuore di ratto (Steiner et al., 1990), più recentemente, la Cga e i peptidi da essa derivati sono stati identificati anche a livello del miocardio umano (Pieroni et al., 2007). La VS-1, insieme a molti altri frammenti VS-1-derivati, quali la Cga1-40, Cga4-57, Cga 47-66 e Cga 67-76, è prodotta naturalmente a livello cardiaco. Infatti, diversi frammenti N-terminali contenenti il

dominio VS-1 sono stati ritrovati in estratti di cuore di ratto (Cga4-113, Cga1-124, Cga1-135 e Cga1-199) insieme ad un grande frammento, corrispondente alla Cga intatta, da cui derivano in seguito a clivaggio proteolitico intracardiaco (Glattard et al., 2006).

Già nel 1993, Metz-Boutigue e collaboratori avevano suggerito l'esistenza di un sito dibasico in posizione 64-65 che rappresenta un putativo sito di clivaggio della proteina. E' stato quindi ipotizzato che nel cuore di ratto, il peptide prodotto corrispondente alla hrVS-1, sia il frammento 1-64. Nel cuore isolato e perfuso di ratto, la VS-1 umana (hrVS-1) esercita un effetto inotropo (Cerra et al., 2006) e lusitropico (Pieroni et al., 2007) negativo che coinvolge la cascata trasduzionale NOS/NO/cGMP/PKG (Cappello et al., 2007). Inoltre questo peptide esercita un antagonismo non competitivo di tipo funzionale nei confronti della stimolazione adrenergica (Cerra et al., 2006).

Un importante regolatore extracardiaco umorale del sistema NOS/NO è il 17 β estradiolo (17 β -E2). Questo modulatore endocrino presenta un'attività cardiovascolare nell'uomo (Bagatell et al., 1994; Sudhir et al., 1997, 1997) esercitando i propri effetti attraverso due sottotipi recettoriali, ER α e ER β . Recenti lavori hanno dimostrato la presenza di un nuovo recettore accoppiato a proteina G di membrana (GPR30) capace di legare il 17 β -E2 (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005) e coinvolto nei meccanismi attivati dagli estrogeni (Norfleet et al., 2000; Razandi et al., 1999; Chambliss et al., 2000). GPR30 è un recettore associato a proteine G α s (Thomas et al., 2005), localizzato a livello della membrana plasmatica (Filardo et al., 2007). Esso regola l'attività di due enzimi associati alla membrana plasmatica, l'adenilato ciclastasi (AC), che è una proteina integrale di membrana (Filardo et al., 2002), e le metalloproteinasi della matrice

(MMPs), anch'esse integrate con la membrana plasmatica o associate con la superficie extracellulare della membrana (Filardo et al., 2003). Dati sperimentali e clinici suggeriscono che molti degli effetti cardiaci del $17\beta\text{E}2$ siano associati a benefici effetti sul profilo lipidico, all'attività antiossidante e fibrinolitica (Williams et al., 1992; Gorodeski et al., 1998). Studi in vivo e in vitro hanno evidenziato che il $17\beta\text{E}2$ è in grado di modulare la contrattilità cardiaca in cuori di coniglio maschio (Raddino et al., 1986).

Classicamente, quando l'esposizione è prolungata, l'effetto mediato dal $17\beta\text{E}2$ è associato ad un'azione "genomica" (Mendelsohn, 2002), mentre un effetto non-genomico (alternativamente chiamato "non trascrizionale" o "non nucleare") si presenta dopo pochi minuti dalla somministrazione dell'ormone (Lantin-Hermoso et al., 1997; Caulin-Glaser et al., 1997). In quest'ultimo caso, livelli fisiologici di $17\beta\text{E}2$ rapidamente stimolano la produzione di monossido d'azoto (Hale et al., 1996). Il $17\beta\text{E}2$ attiva la eNOS (Chen et al., 1999) sia attraverso l'attivazione della cascata delle MAPK sia attraverso il pathway PI3K-Akt (Simoncini et al., 2000). Infatti, recenti studi hanno dimostrato, a livello caveolare, la presenza del recettore estrogenico α e la diretta interazione di questi con la subunità p85 della PI3K e quindi l'attivazione del pathway PI3K-Akt-eNOS (Mendelsohn, 2002). Inoltre, il $17\beta\text{E}2$ è in grado di indurre rilascio di cAMP (Pietras & Szego, 1980; Porter et al., 1997), idrolisi dei fosfoinositoli attraverso attivazione della PKC (Graber et al., 1993), aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare dovuto ad un influsso di calcio extracellulare (Tesarik & Mendoza, 1995) ed una mobilitazione del calcio immagazzinato nella cellula (Lieberherr et al., 1993).

Scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di estendere le conoscenze in merito alla modulazione umorale dell'attività cardiaca alla luce delle più recenti scoperte in merito al ruolo cardiotropico

esercitato da sostanze prodotte dal cuore stesso, e quindi responsabili di un'azione autocrino/paracrino a circuito breve, e da sostanze più fisiologicamente a carattere endocrino, quindi responsabili di un più largo circuito di modulazione. In particolare, utilizzando il prepara del cuore di ratto isolato e perfuso secondo la metodica Langendorff, sono stati presi in considerazione quale modulatore autocrino/paracrino di derivazione cardiaca, la rCga1-64, e quale modulatore endocrino puro, il 17 β -estradiolo. Da un lato quindi si è inteso esaminare l'attività della rCga1-64, sia in condizioni basali che sotto stimolazione adrenergica. Al fine di valutare la relazione struttura-funzione, sono stati anche confrontati gli effetti cardiaci del frammento non modificato (rCga1-64_{s-s}) con due forme che hanno subito modificazioni post-traslazionali, la rCga-64_{SH} e la rCga1-64_{OX}. Dall'altro lato, si è voluta analizzare l'azione del 17 β -estradiolo sul cuore di ratto maschio. Inizialmente, sono stati valutati gli effetti emodinamici e inotropi del 17 β E2 in condizioni basali. In seguito, attraverso l'uso di selettivi agonisti, è stato valutato il coinvolgimento di un nuovo recettore di membrana GPR30, come nuovo effettore del 17 β E2, e il coinvolgimento di ER α e ER β nella regolazione della funzionalità cardiaca.

Ulteriori indagini hanno consentito di chiarire il meccanismo d'azione che sottende l'effetto di questi modulatori. In entrambi i casi è stato esaminato il coinvolgimento della via trasduzionale NOS/NO/cGMP/PKG soprattutto alla luce della co-localizzazione, a livello caveolare, di eNOS, recettori adrenergici (α e β), proteine Gi/0, AKT/PKB, ER α e β , GPR30. Alla luce di ciò, è stata anche valutata, nel cuore di ratto isolato e perfuso, la presenza e la ricaduta funzionale indotta dai recettori β 3-adrenergici e del loro cross-talk con il pathway trasduzionale NOS/NO.

Introduzione

1. Il maggiore sensore-integratore endocrino /autocrino /paracrino: il sistema NOS-NO

Il pathway trasduzionale NOS-NO riveste un ruolo cruciale nella trasduzione del segnale associato alla modulazione della performance cardiaca (Brutsaert et al., 1998).

Lo NO viene prodotto ubiquitariamente a livello miocardico dove risulta essere coinvolto in un ampio range di processi fisiologici e patologici atti a mantenere l'omeostasi cardiovascolare.

Viene generato da una famiglia di enzimi conosciuti come NO-Sintasi (NOSs) che catalizzano la conversione dell'aminoacido L-arginina in L-citrullina in presenza di O₂ e NADPH.

Sono state identificate tre isoforme della NOS: neuronale (nNOS o NOS1), inducibile (iNOS o NOS2) ed endoteliale (eNOS o NOS3). La nNOS e la eNOS sono accomunate dal fatto di essere costitutivamente espresse ed essere Ca²⁺-dipendenti ed, anche se descritte come principalmente presenti rispettivamente nel tessuto neuronale e in quello endoteliale, tuttavia caratterizzano non pochi tipi cellulari (Snyder, 1995).

Il legame con la calmodulina rappresenta la tappa fondamentale che permette la sintesi dello NO (Su et al., 1995; Abu Soud et al., 1996). Tale legame avviene per la nNOS e la eNOS a concentrazioni fisiologiche di Ca²⁺ citoplasmatico mentre la iNOS genera NO in modo Ca²⁺-indipendente.

Lo NO è una specie radicalica libera, con un elettrone spaiato, capace di interagire con più substrati, qualità che spiega la varietà di reazioni biologiche in cui è coinvolto. Confrontato con le altre specie radicaliche, lo NO è relativamente stabile, malgrado la sua alta

reattività. Esso può interagire con altri radicali, ioni metallici di transizione e nucleofili come i tioli e le amine, producendo così effetti diretti o indiretti (Wink & Mitchell, 1998; Grisham et al., 1999).

Gli effetti diretti spesso coinvolgono interazioni tra lo NO e i complessi metallici. Le reazioni tra lo NO e proteine contenenti il gruppo eme sono fisiologicamente più rilevanti e includono interazioni con la sGC e il citocromo P450. Inoltre, lo NO può interagire con le proteine non-eme contenenti ferro e le proteine contenenti zinco.

Gli effetti indiretti dello NO sono mediati da specie nitrogeno reattive prodotte dall'interazione tra lo NO e l'ossigeno o i radicali superossido (Pellat et al., 1990).

1.1 Lo NO: effetti concentrazione-dipendente e compartimento-dipendente

Lo NO è altamente diffusibile e capace di produrre effetti in siti relativamente lontani da quello di produzione. La sua bassa idrosolubilità e la sua alta liposolubilità gli permettono di diffondere e penetrare facilmente all'interno delle cellule. Tuttavia, pur diffondendo facilmente, l'azione dello NO è limitata dalla sua sintesi e dalla reazione con i costituenti cellulari.

Gli effetti indotti dallo NO risultano concentrazione-dipendente: infatti a basse dosi (< 1 μM) prevalgono gli effetti diretti mentre ad alte dosi (>1 μM) gli effetti indiretti sono predominanti (reviewed in Cerra & Pellegrino, 2007).

Bersaglio cellulare primario dello NO è la sCG la cui attivazione porta ad un aumento della concentrazione di cGMP ed alla attivazione di una protein-chinasi cGMP-dipendente (PKG) il cui ruolo fondamentale è quello di modulare negativamente la concentrazione

del calcio intracellulare. Ciò, a livello cardiaco, si traduce in un effetto ormesico per cui si produce un effetto inotropo negativo ad alte concentrazioni di NO; il contrario si verifica a basse concentrazioni (Massion et al., 2003).

Gli effetti dello NO risultano essere compartimento-dipendente; infatti diversi, e spesso opposti, effetti dello NO nel cuore risultano da una interazione spazio-temporale con le isoforme della NOS. La localizzazione subcellulare e tissutale delle NOSs, che riguarda la loro interazione con proteine del citoscheletro, domini lipidici specializzati e cascate fosforilative, appare cruciale nella regolazione spazio-temporale della performance cardiaca mediata dallo NO in relazione alle richieste dell'organismo (Barouch et al., 2002).

La diversa localizzazione subcellulare della eNOS e della nNOS rende conto della regolazione autocrina e paracrina esercitata dallo NO sulla funzionalità cardiaca. La eNOS è localizzata a livello delle cellule endoteliali endocardiche e coronariche e nei cardiomiociti (Feron et al., 1996) mentre la nNOS è localizzata a livello delle terminazioni nervose autonome, nei gangli e nei cardiomiociti (Danson et al., 2005; Xu et al., 1999). Recenti scoperte riportano la presenza sia della eNOS che della nNOS a livello dei distretti subcellulari nei cardiomiociti (Feron et al., 1996; Xu et al., 1999; Williams et al., 2006) dove si suppone siano accoppiate a distinte molecole effettrici e inducano effetti diversi in seguito all'attivazione enzimatica. Questo si spiega pensando alla limitata diffusione dello NO nei cardiomiociti, dovuta sia al legame con la mioglobina (le cui concentrazioni citoplasmatiche risultano alte) che funge da scavenger dello NO, sia, soprattutto in diversi stati patologici, all'abbondanza di anioni superossido che, reagendo con lo NO, ne limitano la biodisponibilità.

La eNOS è maggiormente localizzata nelle caveolae dove si co-localizza con la caveolina-3 (proteina strutturale specifica delle caveolae dei cardiomiociti) e dove convergono molti segnali intracellulari atti a modulare la produzione di NO (review in Shaul, 2002). La nNOS è stata inizialmente localizzata a livello del reticolo sarcoplasmatico (SR) (Xu et al., 1999) sebbene successivamente, è stata ritrovata associata alle proteine della membrana sarcolemmale (Williams et al., 2006; Xu et al., 2003), specialmente in condizioni di scompenso cardiaco (Damy et al., 2003, 2004; Bendall et al., 2004) (Fig. 1).

Lo NO prodotto dalla nNOS localizzata a livello dello SR, può inibire l'ingresso di Ca^{2+} attraverso i canali al calcio di tipo L e stimolare il re-uptake di Ca^{2+} nello SR attraverso la fosforilazione del fosfolambano. È stata ipotizzata anche una interazione con i recettori per la rianodina (RyR). Inoltre lo NO di derivazione neuronale può modulare la risposta inotropica da stimolazione β -adrenergica (in maniera bifasica) e inibire l'attività delle xantine ossidoriduttasi (XOR) limitando lo stress ossidativo e, indirettamente, incrementando la disponibilità di NO nel miocardio.

Lo NO prodotto dalle eNOS localizzate a livello dell'endotelio microvascolare coronarico esercita, invece, i suoi effetti paracrini in maniera cGMP-dipendente inducendo un rilascio più veloce e un incremento della distensibilità miocardica (attraverso una riduzione PKG-dipendente della sensibilità al Ca^{2+} dei miofilamenti), inibizione dell'inotropismo positivo beta adrenergico, riduzione della respirazione mitocondriale e del consumo di ossigeno. La eNOS presente a livello dei cardiomiociti (soprattutto nelle caveolae) è coinvolta nella mediazione della risposta inotropica positiva allo stiramento sostenuto attraverso l'incremento della probabilità di apertura dei RyR. (reviewed in Seddon et al., 2007)

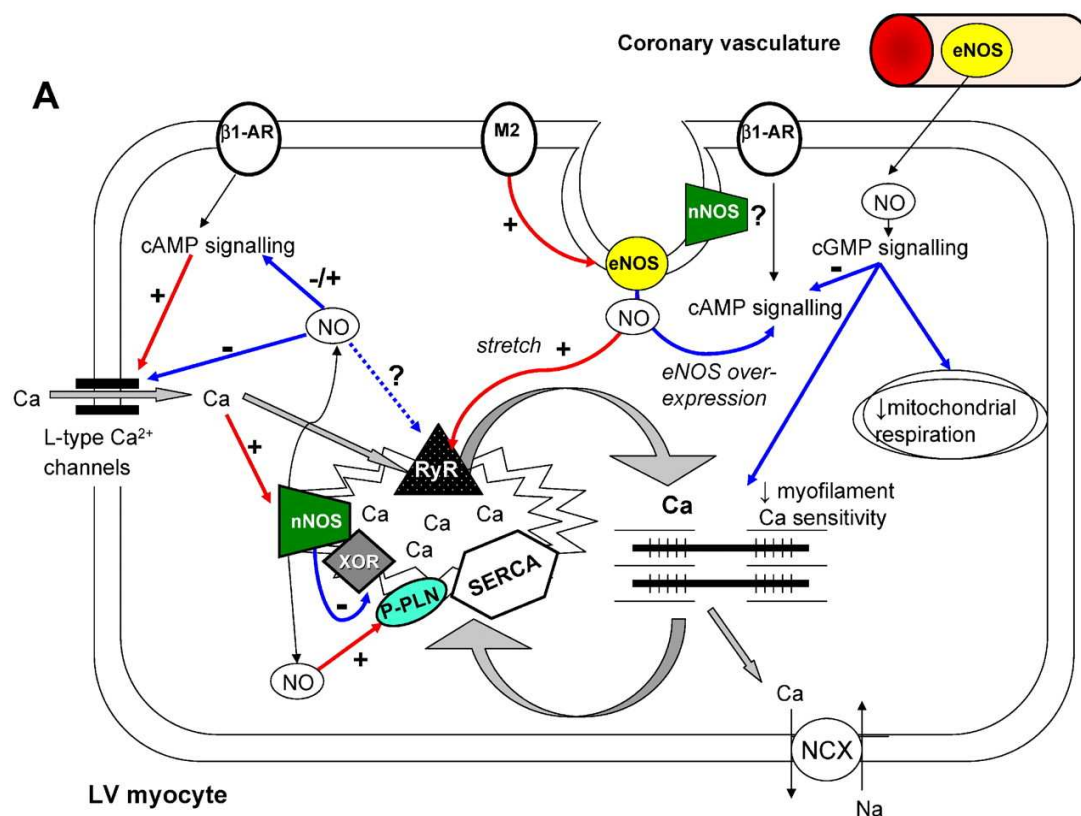


Fig. 1: Regolazione autocrina e paracrina dello NO della funzionalità cardiaca.

1.2 Lo NO: modulatore a breve e a lungo termine

Lo NO influenza direttamente a breve e a lungo termine diversi aspetti della fisiologia cardiaca quali la contrattilità, l'accoppiamento eccitazione-contrazione, la frequenza cardiaca, il consumo di ossigeno, la respirazione mitocondriale e l'apoptosi (Brutsaert, 2003; Khan et al., 2003).

Lo NO è anche coinvolto nei processi attivati nei cardiomiociti in caso di sepsi o in seguito ad esposizione a citochine o durante il danno miocardico da ischemia/riperfusion (Brutsaert, 2003; Massion & Balligand, 2003). In alcune situazioni, questi effetti nitreggici diretti sul miocardio dipendono dalla concentrazione di NO, dal tipo di isoforma della NOS coinvolta, dal target tissutale (ad es. miociti atriali o ventricolari), dal microambiente (quindi dallo stato di ossidazione o dal bilancio ossido riduttivo) e dalla specie esaminata (reviewed in Cerra & Pellegrino, 2007).

1.3 NO e stimolazione adrenergica

Evidenze sperimentali supportano l'idea di un ruolo della NOS come controregolatore dell'inotropismo positivo cardiaco indotto da stimolazione β -adrenergica. Non risulta ancora chiaro il meccanismo molecolare che associa la stimolazione adrenergica all'attivazione cardiaca della NOS. Essendo sensibili alle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare, la nNOS e la eNOS potrebbero essere attivate dall'incremento del Ca^{2+} conseguente, per es. all'aumento della frequenza cardiaca (Kaye et al., 1996) o all'incremento di catecolamine. Infatti, è riportata in letteratura la capacità degli agonisti adrenergici di attivare le isoforme della NOS sensibili al calcio in cardiomiociti (Musialek et al., 1997; Kanai et al., 1997). Se questo avviene nei microdomini come le caveolae dove sono colocalizzati recettori adrenergici (Xiang et al., 2002) ed eNOS (Feron et al., 1996), o deriva da un incremento del calcio citosolico ancora è da verificare. Tuttavia i dati a disposizione sostengono l'importante ruolo rivestito dal recettore β_3 adrenergico nell'attivazione della eNOS nel muscolo cardiaco di diverse specie di mammiferi, incluso l'uomo (Gauthier et al., 1998).

L'attivazione del pathway recettore β_3 adrenergico-eNOS, il cui effetto si oppone alla classica azione inotropica positiva mediata dal segnale β_1 - β_2 adrenergico, può rappresentare un meccanismo di protezione nei confronti della eccessiva stimolazione catecolaminergica, con eccessivo consumo di ossigeno, sovraccarico di calcio e quindi cardiotossicità (Massion et al., 2003).

2. Il controllo autocrino-paracrino del sistema cardiovascolare

Da più di 50 anni, numerosi studi hanno evidenziato la capacità di cellule cardiache non neuronali di sintetizzare e rilasciare

catecolamine (CAs) e peptidi natriuretici (NPs), i quali, attraverso l'attivazione di circuiti locali autocrini e paracrini, regolano l'omeostasi cardiovascolare in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Questo ha permesso di inserire il cuore in un contesto più ampio di attività biologiche, considerandolo non solo come semplice pompa emodinamica ma anche come organo endocrino, multifunzionale e interattivo, capace di produrre ormoni con azione autocrino-paracrina, inseriti in una complessa rete di sistemi integrati atti a mantenere l'omeostasi dei fluidi, elettrolitica e emodinamica.

Pioneristici studi di microscopia elettronica su atri di cuori di mammifero hanno evidenziato la presenza di un doppio fenotipo cellulare, secretorio e contrattile (Kisch, 1963; Jamieson & Palade, 1964). Studi successivi hanno confermato la presenza di cellule simil-endocrine a livello atriale (Bompiani et al., 1959; Palade, 1961; Jamieson & Palade, 1964; McNutt & Fawcett, 1969; Forssmann & Girardier, 1970; Berger et al., 1972) enfatizzando la funzione secretoria di queste cellule "mioendocrine". Queste scoperte hanno permesso di definire il cuore come un organo endocrino. Questo scenario è stato arricchito dall'identificazione di un numero crescente di molecole, quali l'angiotensina II, l'adrenomedullina, la grelina, il neuropeptide Y, la Cga e numerose altre, le quali, prodotte dal cuore, esercitano una azione paracrina e autocrina (Tabella 1).

In molti casi, il segnale attivato da queste sostanze richiede la modulazione del sistema intracardiaco NOS/NO, il quale quindi rappresenta un vero e proprio sistema integrato autocrino/paracrino il quale, per la sua organizzazione spaziale e temporale, risulta inserito all'interno dei crocevia dei segnali trasduzionali attivati.

SOSTANZE	SITO DI PRODUZIONE
Adrenomedullina	Cardiomiociti e fibroblasti (atriali e ventricolari) (Kato et al., 2003)
Aldosterone	Atri e ventricoli (ratto) (Delcayre et al., 2000)
Angiotensina II	Sistema renina-angiotensina cardiaco e vascolare (Dzau, 1993)
Catecolamine	Cellule ICA (Huang et al., 1996; 2005)
CoASSG (Coenzima A glutatione disolfuro)	Tessuto miocardico (Luo et al., 2006)
Citochine	Cardiomociti ed endotelio vascolare (Kaye et al., 1996)
Endotelina I	Endotelio vascolare e tessuto cardiaco (Shah, 1996; Beaulieu & Lambert, 1998)
Peptidi natriuretici	Atri, ventricoli e vasi coronarici (Beaulieu & Lambert, 1998)
Neuropeptide Y	Tessuto nodale, atri e vasi coronarici (Beaulieu & Lambert, 1998)
NO prodotto dalle NOS	Endotelio, miocardio, cellule nervose, etc. (Shah, 1996)
Ossitocina	Tessuto cardiaco (ratto) (Jankowski et al., 1998)
Prostanoidi	Cellule endoteliali e cardiomiociti (Shah, 1996)
Sostanza P	Nodo seno-atriale e atrio-ventricolare (Beaulieu & Lambert, 1998)

Tabella 1: Principali ormoni cardiaci e siti di produzione

2.1 Modulazione autocrino-paracrina dell'attività cardiaca

2.1.1 Le catecolamine

Le attività metaboliche, contrattili ed elettriche del cuore sono influenzate dalle catecolamine (CAs) attraverso il loro legame ai recettori adrenergici α e β . Le CAs, adrenalina e noradrenalina, giungono al cuore dalla circolazione sanguigna o dalle terminazioni nervose autonome. Recentemente sono state individuate, in cuori di

mammiferi, cellule capaci di generare un segnale paracrino adrenergico. A queste cellule, che non presentano una morfologia simile a quella delle cellule neuronali o cromaffini, è stato dato il nome di cellule ICA (Intrinsic Cardiac Adrenergic) (Huang et al., 1996). Le cellule ICA sono distribuite a livello atriale e ventricolare, in intimo contatto con i cardiomiociti (Huang et al., 1996). Esse sono capaci di mediare un segnale adrenergico paracrino e risultano coinvolte nella regolazione della frequenza cardiaca, della conduzione e nella regolazione della pressione sanguigna (Huang et al., 1996).

La presenza di queste cellule rientra in quella che è la fine modulazione catecolaminergica del cuore. Infatti, le CAs, interagendo con specifici recettori, α e β adrenergici (ARs), attivamente regolano non solo l'inotropismo quanto anche il lusitropismo. Attraverso il classico segnale accoppiato ad attivazione di proteine G, le CAs modulano la produzione di cAMP con conseguente attivazione di una proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA) la quale induce fosforilazione dei canali al Ca^{2+} presenti nel sarcolemma. Ne consegue un aumento dell'efflusso di calcio nella cellula con incremento della contrazione (effetto inotropo positivo). Tuttavia, viene accelerato anche il rilascio per fosforilazione del fosfolambano, il quale aumenta la ricaptazione del Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico, e della Troponina I, che inibisce la fissazione del Ca^{2+} alla Troponina C (effetto lusitropico positivo) (Li et al., 2000).

Recentemente il pool cardiaco di ARs è stato arricchito dalla scoperta di un nuovo sottotipo di recettore adrenergico, identificato come β_3 -AR, anch'esso associato a proteine G di membrana (Gauthier et al., 2000) e caratterizzato da un'alta omologia con i classici β_1/β_2 ARs (rispettivamente 51% e 46%; Skeberdis, 2004).

Esso è attivato da concentrazioni fisiopatologiche di noradrenalina in presenza di inibizione dei recettori α_1 e β_1/β_2 (Gauthier et al., 1998) e da agonisti selettivi (quali BRL37344, SR58611, CGP12177, CL316243), che non presentano alcuna azione sui sottotipi β_1/β_2 ARs (Skeberdis, 2004). Il β_3 -AR è stato funzionalmente identificato in cuori di mammifero (di cane, guinea-pig, umano; Gauthier et al., 1999) e nei vertebrati non-mammiferi (in *Anguilla anguilla*; Imbrogno et al., 2006). In particolare, nel cuore di mammifero, il β_3 -AR modula una risposta che risulta essere specie- e compartimento-dipendente (Gauthier et al., 2000). Nel ventricolo umano, la sua stimolazione mediata da agonisti selettivi, quali BRL37344, SR58611A e CL316243 induce un effetto inotropo negativo associato ad una riduzione dell'ampiezza e della durata del potenziale (Gauthier et al., 1996). Inoltre, nel cane, tutti gli agonisti β_3 -AR modulano un effetto inotropo negativo meno pronunciato rispetto al cuore umano (Gauthier et al., 1999). Al contrario, i cuori di ratto e di guinea-pig risultano responsivi solo al BRL37344 (ratto) ed al CL316243 (guinea-pig), mostrando una riduzione del 20-30% del picco della tensione (Gauthier et al., 1999). D'altra parte, nessun effetto è stato evidenziato in preparazioni atriali umane esprimenti il β_3 -AR (Chamberlain et al., 1999).

La variabilità specie-specifica e il profilo farmacologico eterogeneo degli β_3 -AR-agonisti risulta essere correlato alla diversa espressione cardiaca del recettore (Gauthier et al., 1999). A tal fine, studi multifunzionali hanno identificato nel cuore di ratto elevati livelli proteici e di mRNA β_3 -AR-associati (Dincer et al., 2001) così come la sua espressione sulla superficie di cellule di ventricolo (Barbier et al., 2004). Inoltre, la sua espressione risulta aumentata in

condizioni patologiche, come nel ratto diabetico streptozotocina-indotto (Dincer et al., 2001).

La trasduzione del segnale mediata dal β 3-AR induce un effetto inotropo negativo la cui natura è ancora da esaminare. In ventricoli umani, il β 3-AR media la sua azione attivando le proteine Gi di membrana (Gauthier et al., 1996) e inducendo il rilascio di ossido nitrico (NO) attraverso attivazione dell'isoforma endoteliale della ossido nitrico sintasi (eNOS) (Gauthier et al., 1998; Varghese et al., 2000). Il conseguente incremento intracellulare di cGMP comporta attivazione della fosfodiesterasi di tipo 2 (PDE2) e quindi decremento di cAMP intracellulare. Questo induce un meccanismo a feedback negative β 3-AR /NO/cGMP che limita l'effetto β 1-/cAMP-dipendente (Mongillo et al., 2006).

2.1.2 La Cromogranina A (Cga) e i peptidi da essa derivati

La Cromogranina (Cga) è una proteina acida di 49 kDa co-immagazzinata con amine, nucleotidi, calcio e altri ormoni peptidici nei granuli secretori di diverse cellule endocrine e neuronali e rilasciata nello spazio extracellulare per esocitosi (O'Connor, 1983; Halban & Irminger, 1994). Livelli circolanti elevati di Cga sono stati riscontrati in pazienti con tumore neuroendocrino (Nobels et al., 1998), in casi di insufficienza renale (Hsiao et al., 1990) o epatica (O'Connor et al., 1989) e in altre condizioni patologiche (Giampaolo et al., 2002; Gussi et al., 2003; Feldman & Eiden, 2003; Abou-Saif et al., 2003). Inoltre, pazienti infartuati o affetti da scompenso cardiaco cronico mostrano elevati concentrazioni circolanti di Cga le quali sono correlate alla gravità della patologia e risultano quindi un indicatore prognostico di mortalità (Ceconi et al., 2002; Corti et al., 2000; Omland et al., 2003).

Evidenze sperimentali suggeriscono che, a livello intracellulare, la Cga sia coinvolta nella biogenesi delle vescicole secretorie mentre, a livello extracellulare, agisca come proormone (Helle & Aunis, 2000). Il processamento proteolitico tessuto-specifico porta alla produzione di diversi peptidi con funzioni biologiche diverse (Taupenot et al., 2003). Questi includono: la vasostatina-1 (VS-1), un potente vasodilatatore e cardioinibitore (Aardal & Helle et al., 1992); la catestatina, un inibitore del rilascio di CAs, caratterizzato da proprietà antipertensive (Mahapatra et al., 2005); la pancreastatina, un peptide disglicemico (Zhag et al., 2006).

In particolare, le vasostatine risultano agire come “stabilizzatori” endocrino/paracrini cardiaci, soprattutto in seguito a stimolazione adrenergica, come si verifica in risposta allo stress (Cerra et al., 2006) e in condizioni di infarto miocardico, dove mediano un effetto protettivo (Mahapatra et al., 2005).

Evidenze sperimentali hanno dimostrato la presenza di Cga all'interno dei granuli secretori di cellule mioendocrine di atrio di ratto e la sua co-localizzazione con il peptide natriuretico atriale (Steiner et al., 1990). Inoltre, da studi di dosaggio proteico su granuli secretori di cellule mioendocrine di ratto, è emersa la presenza di differenti bande immunoreattive alla Cga (Steiner et al., 1990), il che suggerisce la presenza di frammenti derivanti dal clivaggio proteolitico della proteina. In seguito, la Cga e i frammenti da essa derivati sono stati riscontrati anche a livello delle fibre del Purkinje atriali e ventricolari (Weiergraber et al., 2000) e nelle terminazioni nervose simpatiche (Miserez et al., 1992).

Successivamente, Glattard e collaboratori (2006) hanno dimostrato che il cuore di ratto è in grado di produrre e processare peptidi contenenti vasostatina e di immagazzinarli all'interno delle vescicole secretorie dei cardiomiociti. Oltre alla presenza di Cga e di numerosi

frammenti C-terminali da essa derivati, essi hanno riscontrato la presenza di quattro peptidi contenenti la sequenza VS-1 e ne hanno identificato il sito per il loro processamento post traslazionale; essi corrispondono ai frammenti Cga4-113, Cga1-124 (vasostatina II), Cga1-135 e Cga1-199.

Sebbene sia difficile capire se la Cga sia proteoliticamente clivata a livello miocardico, il fatto che il frammento N-terminale, corrispondente alla VS1, sia presente nel cuore di ratto, suggerisce che il processamento possa effettivamente avvenire a tale livello (Glattard et al., 2006).

Il processamento proteolitico potrebbe avvenire all'interno dei cardiomiociti da dove i frammenti verrebbero successivamente secreti anche se, la presenza di proteasi extracellulari localizzate sia sulle membrane dei cardiomiociti che nella matrice extracellulare, suggerisce che il processamento si possa verificare a livello extracellulare dopo la loro secrezione (Glattard et al., 2006).

La produzione endocrina di Cga e di peptidi da essa derivati è stata confermata dalla recente scoperta di una co-localizzazione Cga/BNP nel miocardio umano (Pieroni et al., 2007). In questo contesto, la co-localizzazione intracardiaca di Cga/BNP suggerisce una correlazione funzionale con il sistema natriuretico. Infatti, il BNP, insieme con altri NPs, regola negativamente la performance cardiaca deprimendo l'attività cardiaca a lungo e a breve termine e inducendo una marcata ipotensione. Inoltre la scoperta di una over-espressione della Cga nella miocardiopatia dilatativa e ipertrofica, pone questo peptide come un contro regolatore omeostatico della funzionalità cardiaca (Pieroni et al., 2007).

Questo suggerisce che i frammenti VSs-derivati possano esercitare una regolazione autocrino/paracrina dell'attività cardiaca, poiché, in cuori normali o stressati, uno specifico stimolo ne induce il

processamento proteolitico con conseguente aumento della produzione locale di frammenti VSs-derivati a basso peso molecolare. La produzione di alcuni di essi potrebbe anche avvenire a livello extracellulare come già evidenziato nella ghiandola surrenale (Yanaihara et al., 1999).

A livello cardiaco, questi frammenti terminano con un potenziale sito di clivaggio che potrebbe essere riconosciuto da una pro ormone-convertasi o una carbossipeptidasi (Muth et al., 2004; Zheng et al., 2004) con conseguenti modificazioni post-traslazionali. Infatti, la differenza tra massa molecolare teorica e quella sperimentale dei frammenti mostra che essi risultano fosforilati, ossidati e/o glicosilati.

Queste modificazioni post traslazionali includono la fosforilazione sulla Ser96, la glicosilazione a livello della Thr126, e l'ossidazione su tre residui di metionina. La fosforilazione della Cga è probabilmente relativa non solo al tipo e allo stato fisiologico dell'organo ma anche all'attività del peptide. Per esempio, la fosforilazione è importante per modulare l'attività antimicrobica della cromacina (Strub et al., 1996). La glicosilazione della Cga è coinvolta nella protezione contro l'attività delle proteasi (Metz-Boutigue et al., 1993; Strub et al., 1995). L'ossidazione, riscontrata a livello dei residui di metionina, potrebbe essere coinvolta nei meccanismi redox all'interno dei granuli (Sirimanne & May, 1995).

La Cga di ratto (rCga) è una proteina acida di 448 aminoacidi con un punto isoelettrico di 4.5-5, contenente un ponte disolfuro e numerosi residui monobasici (Kornfeld & Kornfeld, 1985) e dibasici, che potrebbero rappresentare dei potenziali siti di clivaggio per gli enzimi proteolitici. (Glattard et al., 2006). Metz-Boutigue e collaboratori (1993) hanno caratterizzato un processamento intragranulare e extracellulare della Cga nelle cellule cromaffini della

ghiandola surrenale bovina, mostrando che questo processamento inizia a livello N-terminale e C-terminale della proteina. Tra i frammenti generati, la Cga1-76 (VS-1) e la procromacina Cga79-431 rappresentano i maggiori prodotti del processamento proteolitico (Beaubien et al., 1995; Metz-Boutigue et al., 1993). Invece, nella rCga, a causa della mancanza del primo sito dibasico (McVicar et al., 1991; Drees et al., 1991; Hutton et al., 1988), il principale frammento N-terminale prodotto è la β -granina (rCga1-128), corrispondente alla VS-2. Il confronto tra le tre sequenze di VS-1 bovina, umana e di ratto (88%, 86 %, 89% e 82% di omologia tra Cga1-76 di ratto e bovina/umana, Cga17-38, Cga1-64 e Cga65-76, rispettivamente), come evidenziato in Tabella 2, mostra che la sequenza N-terminale di ratto non contiene il sito dibasico Lys77Lys78 rispetto alla corrispondente sequenza umana, mentre contiene un residuo di glutammato in posizione 15. Questo evidenzia una divergenza tra le modalità di processamento proteolitico nell'uomo e nel ratto. Tra i maggiori siti di clivaggio proteolitico, il ponte disolfuro 64-65, presente nella porzione N-terminale della proteina e incluso nella sequenza delle VSs risulta altamente conservato (Metz-Boutigue et al., 1993).

L'unità INSERM 575 dell'Università "Louis Pasteur" di Strasburgo (Francia), ha sintetizzato questo frammento N-terminale, corrispondente alla sequenza nativa di ratto (rCga1-64 con ponte S-S, da ora rCga1-64_{S-S}) così come due forme modificate, la rCga1-64 senza S-S (da ora rCga1-64_{S-H}) e la forma ossidata (da ora rCga1-64_{OX}) al fine di valutare il loro putativo ruolo cardiotropico in preparazioni di cuore di ratto. Allo stesso modo, è stato sintetizzato il frammento di 12 aminoacidi corrispondente al frammento endogeno Cga65-76 affiancato da una coppia dibasica nella porzione C-terminale che è stata precedentemente identificata e studiata da

Metz-Boutigue e collaboratori (1993) nello spazio extracellulare in colture di cellule cromaffini stimolate.

	1	17	38	64	72
<i>Rattus norvegicus</i>	LPVNSPMTKGD	TKVMKCVLEVIS	SDSLSKESPMPV	SPCELETLQGD	BEVLSILRHQNL
<i>Homo sapiens</i>	LPVNSPMTKGD	TEVMKCVLEVIS	SDTLSEKESPMP	VSEKCFETLRGD	BEILSILRHQNL
<i>Bos taurus</i>	LPVNSPMTKGD	TEVMKCVLEVIS	SDTLSEKESPMP	VSEKCFETLRGD	BEILSILRHQNL
<i>Mus musculus</i>	LPVNSPMTKGD	TKVMKCVLEVIS	SDSLSKESPMP	VSEKCFETLRGD	BEILSILRHQNL
	79				
<i>Rattus norvegicus</i>	Q	Q	Q	Q	Q
<i>Homo sapiens</i>			HSSFDE	DELSEV	FENQSP
<i>Bos taurus</i>			HSSFDE	DELSEV	FENQSP
<i>Mus musculus</i>	Q	Q	Q	Q	Q

Tabella 2: confronto tra la sequenza della hCga1-115 con rCga1-130 (modificata da Cerra et al., 2006). In grassetto, i residui che nella rCga1-64 e nella rCga65-76 differiscono dalla hCga1-64 e Cga65-76, rispettivamente.

2.2 Modulazione endocrina della funzionalità cardiaca: il 17β-estradiolo (17βE2)

2.2.1 Gli estrogeni

Il 17beta-estradiolo (17β-E2) è il principale ormone steroideo femminile, prodotto principalmente dalle ovaie e dalla ghiandola surrenale, il quale oltre alla indiscutibile azione a livello uterino, è in grado di influenzare anche l'attività di altri organi e tessuti. Ad esempio, a livello osseo, il 17β-E2 è implicato nella regolazione della densità ossea (Heilberg et al., 2005); a livello celebrale, contribuisce significativamente al meccanismo della Long Term Potentiation (LTP) (Toran-Allerand, 2004; 2005) mentre in tessuti tumorali, il 17β-E2 stimola la proliferazione cellulare.

A livello cardiovascolare il 17β-E2 presenta degli effetti benefici (Lakoski & Herrington, 2005; Ling et al., 2006; Mendelsohn & Karas, 1999) la cui rilevanza medica rimane ancora da definire. È accertata la capacità dell'ormone estrogenico di influenzare l'equilibrio dei lipidi plasmatici a favore del colesterolo HDL (Lawlor et al., 2006). A livello cardiaco, esso presenta un effetto inotropo negativo ed induce una vasodilatazione della vascolatura coronarica (Guo et al., 2005). Insieme, queste azioni, in parte possono rendere conto del perché le donne, in epoca premenopausale, siano maggiormente protette dalla

potenziale insorgenza di malattie cardiovascolari rispetto all'uomo (Lissin & Cooke, 2000).

Nelle donne, le concentrazioni plasmatiche di estrogeni sono basse nella fase preadolescenziale e incrementano con il menarca. Il range varia tra 100 pg/ml durante la fase follicolare e 600 pg/ml durante la fase dell'ovulazione. Le concentrazioni possono aumentare fino a 20 000 pg/ml durante la gravidanza. Con la menopausa, le concentrazioni sieriche si riducono a valori simili, o più bassi, di quelli maschili della stessa età (5–20 pg/ml) (Ling et al., 2006) (Tabella 3)

	Uomo	Donne (pre-menopausa)	Donne (post-menoapausa)
Estradiolo (E2)	73-184 pmol/L	73-1285 pmol/L*	37-110 pmol/L
Estrone (E1)	37-185 pmol/L	111-592 pmol/L*	74-148 pmol/L
Estriolo (E3)	<7 pmol/L	<7 nmol/L†‡	<7 nmol/L†
Progesterone	0.3-0.9 nmol/L	1-64 nmol/L‡	<7 nmol/L
Testosterone	10.4-34.7 nmol/L	1.04-2.43 nmol/L†	1.04-2.43 nmol/L†

Tabella 3: ranges di concentrazioni sieriche dei maggiori ormoni steroidei sessuali nell'uomo e nella donna (adattato da Greenspan & Strewler, 1997). *: i livelli di estradiolo e di estrone variano ampiamente e ciclicamente durante il ciclo mestruale; † i valori non sono individualmente determinati per ogni gruppo; ‡ i livelli di estriolo e progesterone aumentano significativamente durante la gravidanza (valori superiori rispettivamente a 139 nmol/L e 640nmol/L).

2.2.2 Estrogeni e terapia estrogenica nell'uomo

Diversi studi hanno dimostrato che gli estrogeni presentano un'attività cardiovascolare nell'uomo dove livelli fisiologici di 17β -E2 aiutano a mantenere nella norma le concentrazioni plasmatiche del colesterolo HDL (Bagatell et al., 1994) e regolano l'attività ossea e cardiaca. A tale livello, la perdita della funzionalità del recettore ER α è associata ad una riduzione del flusso coronarico associato a vasodilatazione e ad una calcificazione prematura delle coronarie stesse (Sudhir et al., 1997, 1997) con incremento del rischio di infarto del miocardio (Shearman et al., 2003). Questi studi

suggeriscono, quindi, un ruolo degli estrogeni nella fisiologia cardiovascolare maschile.

2.2.3 Modulazione intracellulare estrogenica del segnale

Gli effetti degli estrogeni sono mediati da uno specifico recettore, di cui si conoscono due isoforme, quella α (ER α) (Jensen & DeSombre, 1973) e quella β (ER β) (Kuiper et al., 1996).

Pur presentando una grande omologia strutturale, i due sottotipi recettoriali presentano evidenti differenze per quel che concerne i domini di attivazione trascrizionale e la distribuzione nei tessuti (Dechering et al., 2000; Kuiper et al., 1997). Tuttavia, la loro caratterizzazione funzionale induce ad accettare che le diverse funzioni fisiologiche del 17 β -E2 siano da rapportare all'azione combinata di ambedue le isoforme (Koehler et al., 2005) anche se presentano delle differenze in termini di affinità nei confronti degli estrogeni; infatti, ER β presenta una minore affinità per il 17 β -E2 rispetto a ER α (Kuiper et al., 1997).

Il legame degli estrogeni ai recettori estrogenici localizzati a livello nucleare avviene con una elevata affinità; questo processo permette al complesso di legare specifici siti del DNA conosciuti come elementi responsivi agli estrogeni (ERE) all'interno dei quali si ritrova la regione promoter dei geni target, con sintesi di specifici mRNA e produzione di un numero di proteine responsabili degli effetti dell'ormone in differenti tipi cellulari (Truss & Beato, 1993). ER α e ER β regolano differenti geni target. È stato osservato che essi possono dare origine a opposti segnali regolatori in risposta allo stesso ormone.

Di recente, un ampio numero di lavori scientifici ha descritto la presenza di una nuova classe di recettori estrogenici associati alla membrana plasmatica, simili o distinti dai classici recettori

estrogenici nucleari (Acconcia et al., 2004; Li et al., 2003; Razandi et al., 2003; Toran-Allerand et al., 2002). Questi recettori modulano diversi aspetti della funzione cellulare estrogenica, associando al tradizionale meccanismo genomico un nuovo segnale non-genomico rapido (ad es. attivazione PLC/PKC, rilascio di Calcio intracellulare, attivazione delle MAPK) (Levin, 1999; Kelly & Levin, 2001).

Recenti lavori hanno dimostrato la presenza di un nuovo recettore accoppiato a proteina G di membrana (GPR30) capace di legare il 17β -E2 (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005) e coinvolto nei meccanismi attivati dagli estrogeni.

Inizialmente identificato nella linea cellulare di linfoma di Burkitt, GPR30 successivamente è stato individuato in tessuti responsivi agli estrogeni quali seno, cuore, leucociti, cervello e endotelio vascolare (per la review si rimanda a Filardo, 2002). GPR30 conferma la struttura tipica che definisce i 7TMRs, con un sito di clivaggio nel dominio amino terminale e sette domini idrofobici che servono per ancorare GPR30 alla membrana plasmatica.

GPR30 è un recettore associato a proteine $G\alpha_s$ (Thomas et al., 2005), localizzato a livello della membrana plasmatica (Filardo et al., 2007). Esso regola l'attività di due enzimi associati alla membrana plasmatica, l'adenilato ciclastasi (AC), che è una proteina integrale di membrana (Filardo et al., 2002), e le metalloproteinasi della matrice (MMPs), anch'esse integrate con la membrana plasmatica o associate con la superficie extracellulare della membrana (Filardo et al., 2003). Il coinvolgimento di GPR30 nel segnale attivato dagli estrogeni è stato per la prima volta dimostrato da Filardo e collaboratori (2000) quando essi dimostrarono che l'attivazione di ERK 1/2 indotta dagli estrogeni risultava indipendente dall'attivazione dei classici recettori.

Una subpopolazione di ER α e ER β localizzata a livello della membrana plasmatica è responsabile, insieme a GPR30, delle azioni non genomiche (Norfleet et al., 2000; Razandi et al., 1999; Chambliss et al., 2000)

L'effetto non genomico compare pochi minuti dopo la stimolazione cellulare. Esso recluta diversi componenti di trasduzione del segnale localizzati a livello della membrana e del citosol. Tra questi, il calcio e il monossido d'azoto (NO), recettori tirosin chinasi [ad es. epidermal growth factor receptor (EGFR) e insulin-like growth factor (IGF) 1 receptor (IGF-1R)], recettori associati a proteine G, protein chinasi [ad es. PI 3-chinasi (PI3K), Akt, membri della famiglia delle MAPK, recettori non tirosin chinasi Src e le proteine chinasi A e C].

Tra i differenti messaggeri rapidamente indotti dagli estrogeni attenzione deve essere rivolta all'ossido nitrico (NO) (Mendelsohn & Karas, 1999). Il 17 β -E2 attiva la eNOS in maniera bifasica attraverso le MAPK o attivando il pathway PI3K-Akt in maniera tale da incrementare il rilascio di NO (Simoncini et al., 2000).

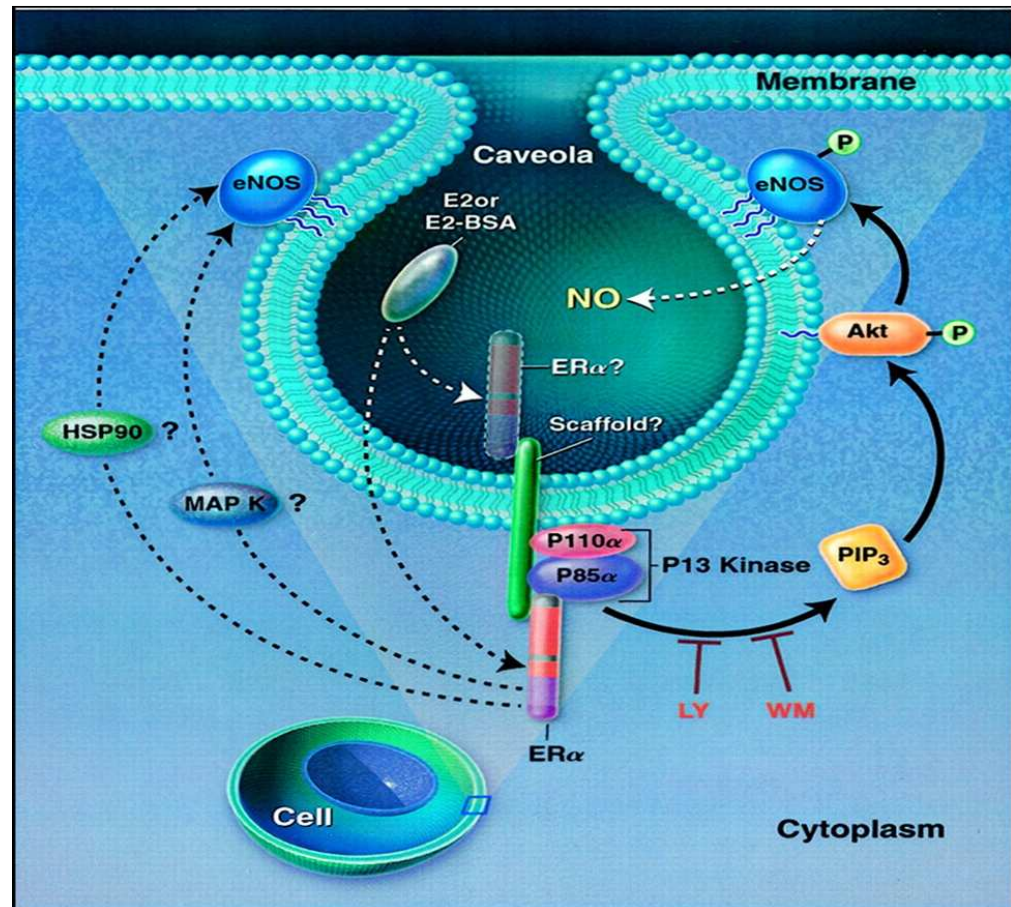


Fig. 2: effetto non genomico del 17βE2.

La famiglia delle MAPK rappresenta un comune target nell'azione non nucleare degli estrogeni. Il 17β-E2, nei cardiomiociti attiva anche la protein chinasi regolata da segnali extracellulari 1 e 2 (ERK 1/2). Recenti studi hanno dimostrato, a livello caveolare, la presenza del recettore estrogenico α e la diretta interazione di questi con la subunità p85 della PI3 chinasi e quindi l'attivazione del pathway PI3chinasi-Akt-eNOS.

L'attivazione della PI3K induce il reclutamento della serina/treonina chinasi Akt/PKB alla membrana plasmatica (Shiojima & Walsh, 2002). Questo risulta in una fosforilazione della Akt in posizione T308 e S473.

Un importante target della Akt è la eNOS, la cui fosforilazione avviene in posizione serina 1177 (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). Questo induce un incremento calcio indipendente

dell'attività della eNOS. Poiché Akt può incrementare l'attività di eNOS, e gli estrogeni attivano Akt, questo pathway potrebbe spiegare l'incremento estrogeno-mediato della produzione di NO.

Il segnale estrogenico non genomico riguarda anche recettori di membrana associati a proteine G. Infatti, il 17β -E2 attiva proteine $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha s}$ le quali risultano in grado di stimolare la produzione di inositolo trifosfato e attivare l'adenilato ciclasi (Razandi et al., 1999). Evidenze sperimentali supportano il ruolo di GPR30 nel mediare l'azione rapida degli estrogeni (Filardo & Thomas, 2005). Infatti è in grado di mediare tanto il segnale genomico che quello non genomico in risposta agli estrogeni (Couse & Korach, 1999; Baker et al., 2003; Toran-Allerand, 2004; Shughrue et al., 2002). Inizialmente identificato come recettore orfano, successivamente è stato dimostrato che la sua sola presenza (in cellule ERs negative) è sufficiente per l'attivazione estrogeno indotta di ERK 1/2 (Filardo et al., 2000). Delucidazioni sul suo ruolo biologico giungono dall'identificazione di uno specifico agonista selettivo per il GPR30 identificato da Bologna e collaboratori (2006) e in grado di attivare la PI3K. Questo apre nuove possibilità di studio di questo nuovo recettore al fine di valutare le specifiche funzioni da esso mediate indipendentemente da quelle indotte da attivazione dei classici recettori.

Materiali e metodi

1 Modello sperimentale. Il cuore isolato e perfuso secondo Langendorff

La metodica del cuore isolato e perfuso di ratto secondo Langendorff rappresenta un valido strumento per lo studio dell'attività cardiaca e per testare gli effetti di diverse sostanze sulla pressione coronarica, sulla contrazione muscolare e sulla frequenza del battito cardiaco. Oggi è usata per una miriade di funzioni: dallo studio degli effetti associati all'alterazione di un singolo gene sulla fisiologia cardiaca a studi atti a valutare nuovi mezzi terapeutici per proteggere il cuore dall'ischemia e da altri danni. Oltre a fornire risultati altamente riproducibili, durante ogni singolo esperimento è possibile valutare in tempo reale e in sincrono una serie di parametri fisiologici, biochimici, farmacologici quali la funzione contrattile, la frequenza cardiaca, la pressione coronarica, il metabolismo cardiaco e l'attività elettrica. La metodica, attraverso la perfusione retrograda del cuore mediante incannulazione dell'aorta, permette di valutare l'attività del cuore intatto, il quale, in opportune condizioni di ossigenazione, perfusione e temperatura, presenta la sua classica autoritmicità miogena. La metodica del Langendorff rientra pienamente nello studio della fisiologia cardiovascolare e, benché l'attività cardiaca non risenta dell'influenza di altri organi, della circolazione sistemica, del controllo nervoso centrale e autonomo che la ricondurrebbero a situazioni più reali, essa risulta altamente utile quando si voglia analizzare l'attività cardiaca senza influenze periferiche. Infatti, rappresenta un modello ben validato per studiare l'effetto di diverse sostanze sul cuore senza che esso venga falsato dall'interferenza di agenti esterni, controllando l'effetto di singole concentrazioni, e

valutare accuratamente le relazioni dose-risposta e analizzare il meccanismo d'azione.

2 Animali

Gli esperimenti, autorizzati dal Ministero della Sanità (Roma, Italia) e regolati dal decreto legislativo 116 del 1992, prevedono l'utilizzo di ratti maschi del ceppo Wistar, dal peso di 180-250 g, forniti dalla Harlan (Udine, Italia).

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

3 Metodi

3.1 *Isolamento e perfusione del cuore di ratto secondo la metodica Langendorff*

3.1.1 *Apparato di perfusione*

L'apparato impiegato nella metodica Langendorff è costituito da un serbatoio contenente la soluzione di perfusione Krebs-Henseleit (KHs), una pompa peristaltica, una trappola per bolle, un bagno termoregolatore ed un sistema di acquisizione dati con interfaccia McLab (Fig. 3).

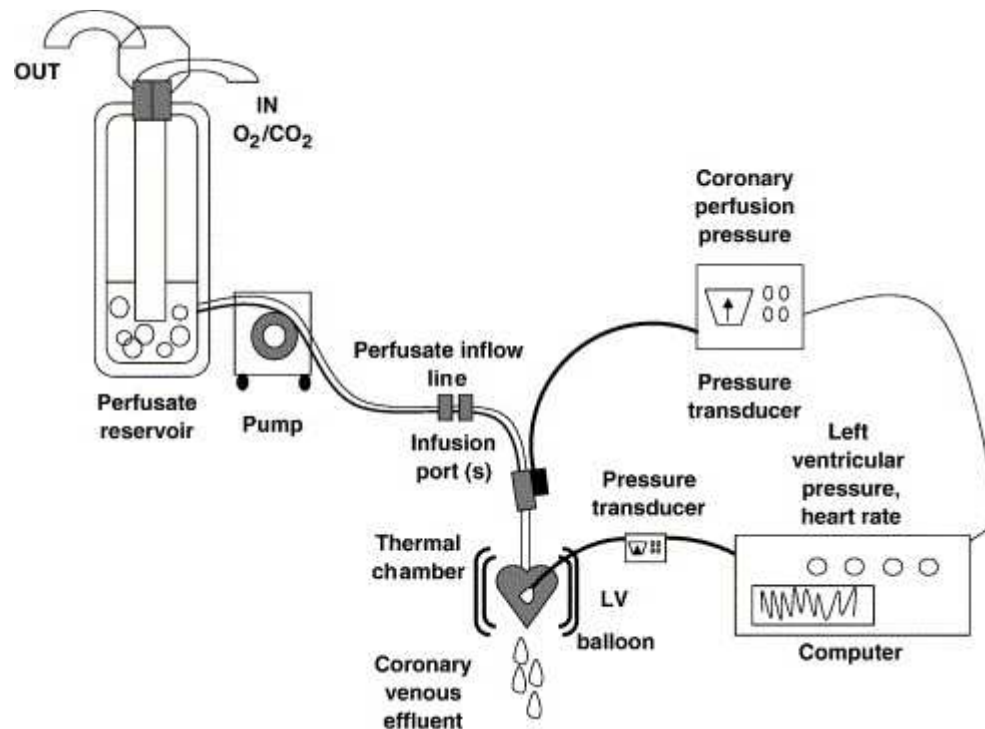


Fig. 3: Rappresentazione schematica dell'apparato di perfusione

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

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

L'apparato presenta due trasduttori (Model BLPR, cod 18700), il primo registra la pressione del ventricolo sinistro e la frequenza cardiaca, il secondo la pressione coronarica, entrambi sono collegati

ad un sistema di acquisizione dati McLab a sua volta collegato ad un computer (Pentium III, Hewelett Packard Brio).

3.1.2 Dissezione, isolamento ed incannulazione del cuore

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

Dopo aver verificato che l'animale sia completamente privo di riflessi, e che, quindi, l'anestesia abbia dato un pieno effetto, si effettua un'incisione trans-addominale che consente di evidenziare la cavità toracica; il torace viene aperto attraverso un taglio bilaterale lungo il margine inferiore dalle ultime alle prime costole e la gabbia toracica viene sollevata esponendo il cuore. L'organo è espantato dopo recisione dell'aorta, della vena cava e dei vasi polmonari, per essere subito immerso in un beker contenente la soluzione di perfusione, mantenuta a 4°C al fine di evitare danni ischemici (Hearse & Sutherland, 2000). Successivamente, l'aorta viene incannulata per iniziare la perfusione retrograda a flusso costante. Generalmente, l'intervallo di tempo che intercorre tra l'espanto e l'incannulazione non deve superare i 30 secondi (Galinaes & Hearse, 1990).

La cannula di perfusione aortica presenta un diametro esterno di 1,8 mm, per un cuore di ratto di 250 g, e può essere realizzata in vetro, plastica o acciaio inossidabile. Per ridurre al minimo la possibilità che si formino bolle al momento dell'incannulazione, è opportuno che la soluzione di perfusione goccioli dalla cannula già prima che il cuore venga collegato attraverso l'aorta e fissato mediante legatura con del filo di seta (Sutherland & Hearse, 2000).

Dopo aver fissato il cuore, viene praticata una piccola incisione a livello dell'arteria polmonare, che potrebbe essere accidentalmente

legata durante l'incannulazione, in modo da favorire un adeguato drenaggio; inoltre, per prevenire l'accumulo di perfusato nel ventricolo sinistro, viene effettuato all'apice ventricolare un piccolo foro mediante l'ausilio di un ago. Perché il cuore si stabilizzi completamente, dal momento in cui inizia la perfusione, sono necessari almeno 20 minuti (Sutherland & Hearse, 2000).

3.1.3 Misurazione dell'attività contrattile del cuore

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

Di fondamentale importanza è la valutazione dell'attività contrattile, la cui misurazione prevede l'utilizzo di un palloncino in lattice, collegato ad un trasduttore di pressione (Modello BLPR, cod 18700), e collocato nel ventricolo sinistro (Sutherland & Hearse, 2000).

L'atrio sinistro viene rimosso per facilitare l'inserimento del palloncino nella cavità ventricolare attraverso la valvola mitrale. Una volta posizionato, esso viene gonfiato con acqua distillata mediante una microsiringa (Hamilton 250 μ L), in modo da regolarne il volume. I palloncini gonfiati ad un volume di 80-100 μ L dovranno generare una pressione endodiastolica inferiore a 3 mm Hg (Klebanov et al., 1997). Il loro volume viene aumentato con incrementi graduali di 20 μ L, finché la pressione generata raggiunge un plateau, di circa 5 mm Hg, corrispondente al lavoro isovolumetrico del cuore (Bartfly et al., 1999). Volumi eccessivi potrebbero compromettere il tessuto cardiaco, inducendo ischemia e rendendo instabile il preparato con un'aumentata tendenza a sviluppare aritmie (Sutherland & Hearse, 2000).

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

3.1.4 *Perfusione e composizione del perfusato*

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

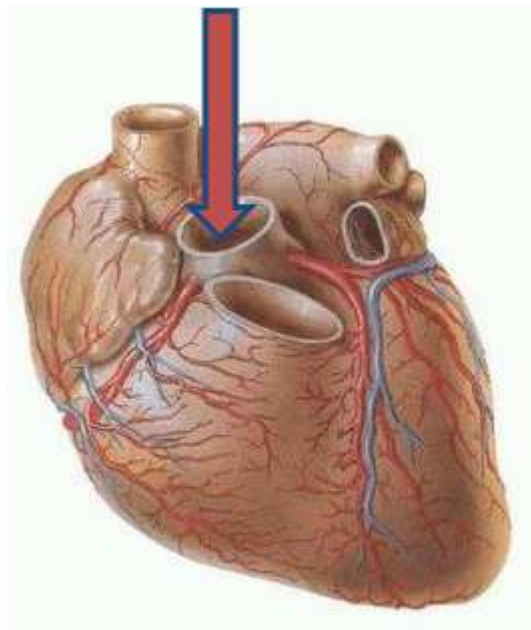


Fig. 4: Perfusione retrograda del cuore.

La soluzione di perfusione è il tampone bicarbonato di Krebs-Henseleit (KHs), modificato rispetto alla formulazione originaria con una concentrazione di ioni calcio inferiore (Legssyer et al., 1997; Doring, 1990). Il tampone è composto da (in mM) NaCl 113, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2, glucosio 11, mannitolo 1.1, Na-piruvato 5.

Nella preparazione del tampone KH sono indispensabili alcuni accorgimenti che servono a garantirne la qualità. In particolare, il

CaCl₂ deve essere aggiunto solo alla fine per evitare la precipitazione dei suoi sali; a tal fine, occorre anche mantenere il pH ad un valore ottimale di 7.4, attraverso continua ossigenazione con una miscela di O₂ (95%) + CO₂ (5%); inoltre è necessario filtrare la soluzione con una membrana di cellulosa da 0,8 μ per rimuovere possibili impurità.

Il continuo rifornimento di O₂ è, inoltre, indispensabile a supportare il normale metabolismo tissutale, per mantenere il gradiente transmembrana e per garantire la funzione contrattile cardiaca (Sutherland & Hearse, 2000).

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

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

3.1.5 Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri

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

L'interfaccia McLab utilizzata è un sistema collegato a due trasduttori di pressione e ad una sonda di temperatura: il primo trasduttore, collegato al palloncino, permette di registrare la pressione del ventricolo sinistro; il secondo trasduttore permette di misurare la pressione coronarica; il terzo canale è connesso ad una

termocoppia che consente di monitorare la temperatura durante tutto il corso dell'esperimento.

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

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

3.1.6 Parametri dell'attività cardiaca

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

1) parametri relativi all'attività sistolica:

- LVP (Left Ventricular Pressure, mmHg), rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- $+ (LVdP/dt)_{max}$ (mmHg x s⁻¹), (indicata come Vmax), indica la massima velocità di contrazione ventricolare;
- TTP (Time To Peak, ms), rappresenta il tempo necessario a raggiungere il picco di contrazione sistolica isovolumetrica;
- HR (Heart Rate, battiti x min⁻¹), rappresenta la frequenza cardiaca;

- RPP (Rate Pressure Product, mmHg x battiti x min⁻¹), pari al prodotto tra LVP ed HR, rappresenta un indice del lavoro cardiaco;

2) parametri relativi al recupero diastolico:

- LVEDP (Left Ventricular End Diastolic Pressure, mmHg x s⁻¹), è la pressione telediastolica sviluppata dal ventricolo sinistro;

- - (LVdP/dt) max (mmHg x s⁻¹), (indicata come Vmin), indica la massima velocità di rilassamento ventricolare;

- HTR (Half Time Relaxation, ms), indica la metà del tempo necessario al ventricolo sinistro per il completo recupero diastolico;

- T/-t è dato dal rapporto tra + (LVdP/dt) max e - (LVdP/dt) max;

3) parametri relativi alla funzionalità coronarica:

- CP (Coronary Pressure, mmHg), è la pressione di perfusione coronarica.

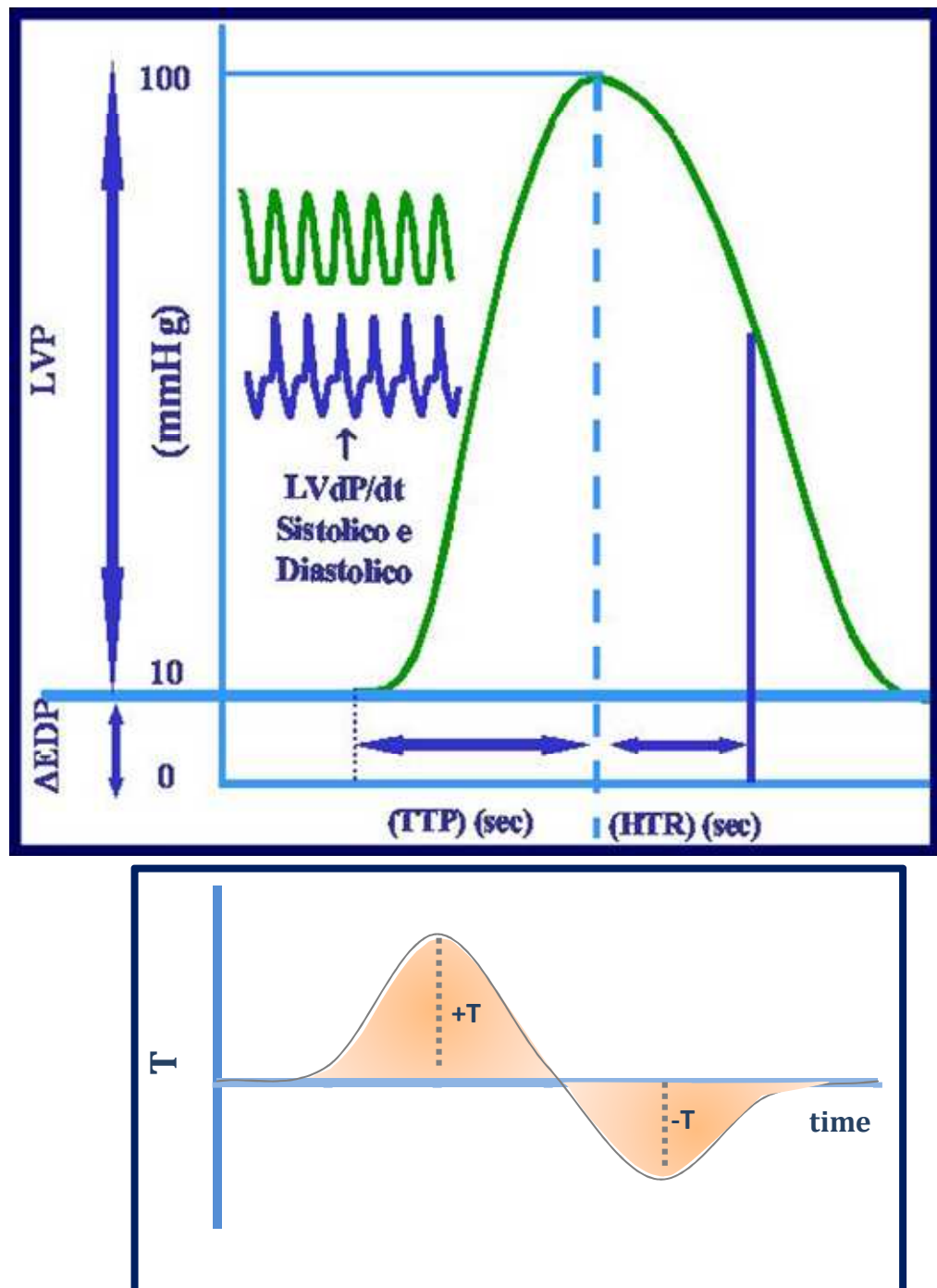


Fig. 5: Descrizione dei parametri emodinamici di base.

4 Reverse-Transcription PCR (RT-PCR)

Per la valutazione dell'mRNA è stata utilizzata una tecnica semiquantitativa che sfrutta l'incorporazione diretta della digossigenina-11-dUTP (DIG-dUTP) durante l'amplificazione del

cDNA. Alla fine della perfusione, da ogni singolo cuore di ratto, è stato isolato il ventricolo sinistro per essere omogenato. L'RNA totale è stato isolato usando come reagente il Trizol (Invitrogen, Milano, Italia). L'integrità dell'mRNA è stata confermata dalla visualizzazione di distinte bande 18S e 28S in seguito ad elettroforesi in gel al 1,5% di agarosio colorato con bromuro di etidio. Per rimuovere le eventuali contaminazioni genomiche di DNA, 1µg di RNA è stato trattato con acqua RNase free DAase (RQ1, Promega). L'mRNA ottenuto è stato convertito in cDNA secondo un protocollo che prevede l'utilizzo di 1 µg di RNA totale con una soluzione composta da 20 pmol di oligo (dt) in 30 µl di una miscela contenente 10X PCR Buffer, Tris-HCl 50mM (pH=8.3), KCl 75 mM MgCl₂ 3mM, DTT 5mM, 0.67 µg/µl di RNAsin. Tale miscela è stata denaturata a 72 °C per 5 min, mantenuta 15 min a temperatura ambiente e poi incubata 90 min a 37 °C dopo l'aggiunta del dNTP 2 mM e dell'enzima Reverse Transcriptasi (RT) M-MLV (200 U). Come controllo negativo, campioni di RNA duplicato sono stati incubati nello stesso buffer senza MLV-RT. Al termine della reazione, l'enzima RT è stato inattivato mediante bollitura per 3 min.

Il cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante PCR. E' stato preparata una miscela di reazione di 20µl contenente 2µl del cDNA ottenuto, 0.2µl di Taq DNA Polimerasi 500 U, 1 µl di PCR Buffer 10X (Tris-HCl 20 mM (ph=8.4), KCl 50 mM), 1µl di MgCL₂ 2.5 mM, 1µl di PCR-DIG Labeling Mix Plus (0.1 mM dATP, dCTP, dUTP, 0.285 mM di d UTP, 1.5µl di DIG dUTP), 1.5 pmol di ciascun primer utilizzato e acqua RNAsi free. La gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stata usata come controllo dell'effettiva amplificazione mediante PCR.

Ogni campione così amplificato è stato separato su gel d'agarosio all'1.2% mediante corsa elettroforetica condotta a voltaggio costante

(90V) in TAE Buffer 1X. Terminata la corsa elettroforetica il gel è stato incubato 15 min in una soluzione denaturante (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M) e altri 15 min in una soluzione neutralizzante (Tris-HCl 0.5M (pH=7.5), NaCl 3M).

Dopo l' incubazione il DNA, separato su gel, è stato trasferito su una membrana di nylon. Il gel è stato posto su un foglio di carta Whatman da 3 mm imbevuto con una soluzione di SSC 10X (NaCl 1.5 M, Sodio Citrato 150 mM pH=7.0) e ricoperto con la membrana di nylon sulla quale è stata poggata una pila di carta da filtro e un peso di circa 500 g in modo tale da garantire il trasferimento del DNA della membrana per capillarità. Dopo circa 90 min di trasferimento, il DNA è stato fissato sulla membrana tramite UV-Crosslinker (Bio-Rad). La membrana è stata poi incubata per 30 min in una Blocking Solution in modo da bloccare i siti aspecifici di interazione idrofobia, e poi 30 min in una soluzione diluita 1:1000 di anticorpo anti-DIG coniugato alla perossidasi. Il segnale emesso dalla perossidasi è stato rivelato tramite chemiluminescenza usando il Kit ECL System.

5 Immunoblotting

I ventricoli sinistri sono stati omogenati in ghiaccio in presenza di un reagente di lisi, il RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) contenente inibitori delle proteasi, (1mmol/L aprotinina, 20mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride e 200mmol/L sodium orthovanadate); successivamente l'omogenato è stato centrifugato a 200g per 10 min a 4°C al fine di rimuovere il pellet e recuperare l'intero contenuto proteico. Il dosaggio delle proteine totali è stato eseguito mediante valutazione colorimetrica con il metodo di Bradford, utilizzando come standard una curva ottenuta dalla densità ottica dell'albumina sierica (BSA) a diverse concentrazioni partendo da una soluzione di 1mg/ml. A 50 µl di lisato proteico,

diluito 1:10, viene aggiunto 1 μ l di reattivo di Bradford e la soluzione così ottenuta è letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda λ di 595 nm. Il metodo di Bradford si basa sulla osservazione che il massimo di assorbanza di una soluzione di Comassie Brilliant Blue G250 si sposta da 465 a 595 nm in seguito al legame con le proteine. La quantità di colorante legato dipende dal contenuto di aminoacidi basici nelle proteine in soluzione. Aliquote di lisato cellulare aventi la stessa quantità di proteine totali (50 μ g) sono state sottoposte a separazione elettroforetica mediante tecnica riducente SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10%. L' SDS conferisce un involucro negativo che permetterà la loro separazione solo per peso molecolare e non per carica elettrica netta posseduta, facendo in modo che, sotto l'azione del campo elettrico applicato, tutte le proteine migrino verso il polo positivo.

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

Dopo la corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite dal gel su un foglio di nitrocellulosa mediante trasferimento con camera MINI-TRANSBLOT in buffer di trasferimento a basso contenuto salino (TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 e SDS 0.1%, Metanolo 20%). Il gel e la nitrocellulosa sono stati disposti in modo da formare un "sandwich" all'interno di una camera formata da due elettrodi paralleli: in questo sistema la membrana di nitrocellulosa si verrà a trovare tra l'anodo e il gel. Il trasferimento delle proteine è stato

favorito dall'applicazione di una differenza di potenziale di circa 65V per 1,5 h a 4°C. L'effettivo trasferimento delle proteine sulla membrana è stato controllato immergendo per 2-3 min il foglio di nitrocellulosa in una soluzione di Red Poinceau. Successivamente la membrana è stata posta in una soluzione di milk non-fat in TBST 1X (TrisHCl 100 mM pH 7.5, NaCl 1 M, Tween 20 all'1%) per 1 h a temperatura ambiente in modo da bloccare tutti i siti aspecifici di interazione idrofobica. Dopo un breve lavaggio con buffer TBS 1X, il filtro di nitrocellulosa è stato incubato over-night con l'anticorpo primario specifico per la proteina da analizzare. Successivamente la soluzione con l'anticorpo primario è stata rimossa e la membrana sottoposta a tre lavaggi di 10 min ognuno con TBST 1X. In seguito la membrana è stata incubata per 1 h con anticorpo secondario (mouse-IgG o rabbit-IgG diluizione 1:3000 in TBST 1% e milk non-fat al 5%) in grado di riconoscere la porzione costante della IgG utilizzata come anticorpo primario coniugato con la perossidasi di rafano.

A questo punto il filtro di nitrocellulosa è stato nuovamente lavato con TBST 1X e sottoposto a tecnica di immunorilevazione mediante l'utilizzo del Kit ECL System in chemiluminescenza. L'enzima perossidasi, coniugato all'anticorpo secondario, è in grado di catalizzare in condizioni basiche l'ossidazione del luminolo, un substrato chemiluminescente. Il luminolo passando attraverso uno stato eccitato emette una certa quantità di luce che può essere visualizzata esponendo il filtro trattato ad un lastra fotografica (Hyperfilm ECL) (Fig. 6).

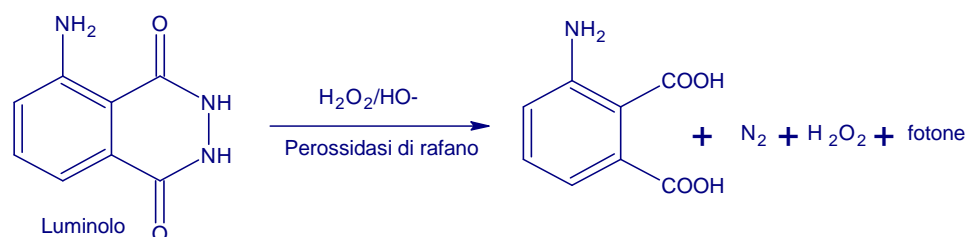


Fig. 6: Reazione di ossidazione del luminolo

6 Protocolli sperimentali

6.1 Composti chimici

La rCga1-64 è stata cortesemente fornita dal Prof.ssa Marie-Hélène Metz-Boutigue dell'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale di Strusburgo (Francia). G1, (1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone è stato fornito dalla Calbiochem (VWR International, Milano, Italia). 17βE2, LY294,002 (LY), PD98059 (PD), H-89, NG-monomethyl-L-arginina (L-NMMA), L-N5-(1-iminoethyl)ornithine (L-NIO), [2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide] (PTIO), 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-one (ODQ), KT5823, Wortmannina, Isoproterenolo (Iso), Endotelina-1 (ET1), BRL37344, nadololo, fentolamina, carbacolo, SR59230, anantina, emoglobina (Hb) e la tossina della pertosse (PTx) sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. 1,3,5-tris (4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT), Diarylpropionitrile (DPN) e ICI182,780 (ICI) sono stati forniti da Tocris Chemicals (Bristol, UK). L748337 è stato fornito da Merck Research Laboratories (Rahway, NJ, USA).

Tutte le sostanze sono state preparate sotto forma di soluzione madre.

rCga1-64, Iso, ET1, L-NMMA, PTIO, BRL37344, carbacolo, fentolamina, Hb e PTx sono stati solubilizzati in acqua bidistillata;

KT5823 in acetato di etile; 17 β E2 e PD in etanolo; nadololo in metanolo; anantina in acido acetico; tutti gli altri composti sono stati sciolti in DMSO. Le soluzioni madre sono state successivamente diluite in KHs in modo da ottenere le concentrazioni utilizzate nei singoli esperimenti.

Gli esperimenti con ODQ, Wortmannina e KT5823 sono stati effettuati utilizzando un apparato modificato in modo da proteggere la sostanza dalla luce ed evitarne la degradazione.

6.1.1 PCR

Trizol Reagent (Invitrogen); cloroformio, isopropanolo, etanolo al 75% (Sigma-Aldrich Italy). Agarosio, TAE (tris Acetato/EDTA) pH 8; NaCl, sodio citrato, acido maleico, NaOH, Tris HCl, Tween 20, Carta Whatman 3 mm (Sigma-Aldrich); Reverse Transcriptase M-MLV, Oligo (dt); RNasi Buffer, dNTP Buffer, DTT, PCR buffer 10X, Taq DNA Polymerase, MgCl₂, PCR DIG Labeling Mix Plus (Invitrogen); Primer per AR e CD1 (MWG,Italy); 36B4, Nylon Membrane, Blocking Reagent ed anticorpi Anti-DIG Fab (Roche Diagnostics); ECL System (GE Healthcare Germany).

Nel presente lavoro sono stati amplificati i seguenti geni: ER α , ER β , GPR30 e GAPDH di 427, 262, 217 e 133 paia di basi, rispettivamente; β 3 AR, adiponectina (ADP) di 418 e 523 paia di basi rispettivamente.

I primers sono:

5'-CGCTACTGTGCTGTGTGTAACG-3' (ER α forward);

5'-GTGGTTCAGCATCCAATAAGG-3' (ER α reverse);

5'-TTCCCGGCAGCACCAGTAACC-3' (ER β forward);

5'-TCCCTCTTTGCGTTTGGACTA-3' (ER β reverse);

5'-TGGTGGTGAACATCAGCTTC-3' (GPR30 forward),

5'-AAGCTCATCCAGGTGAGGAA-3' (GPR30 reverse);

5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3' (GAPDH forward);

5'-TACTCAGCACCAGCATCACC-3' (GAPDH reverse);
5'-GCAACCTGCTGGTAATCACA-3', (β 3AR forward);
5'-GGATTGGAGTGACACTCTTG-3', (β 3AR reverse);
5'-CTACTGTTGCAAGCTCTCC-3' (ADP forward);
5'-CTTCACATCTTTCATGTACACC-3' (ADP reverse).

Come controllo positivo è stato anche usato lo RNA estratto da tessuto ovarico di ratti femmine del ceppo Wistar per i recettori estrogenici e il tessuto adiposo di ratti maschi del ceppo Wistar per il recettore β 3adrenergico.

6.1.2 Immunoblotting

Hepes, NaCl, MgCl₂, EGTA, Glicerolo, Triton-X-100 (TBS-T), Sodio-dodecil-solfato (SDS), Metanolo, Aprotinina, Na-orto-vanadato, PMS-F (Fenilmetilsulfonilfluoride), Polioxi-Etilen-Sorbitan-Monolaureato, Tween 20 (Sigma-Aldrich), ECL-Kit (GE Healthcare), Hyperfilm ECL (Roche Diagnostics), Carta Whatmann 3 mm, Bradford Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich), Mini Trans Blot (Biorad, Italy), Hybond-P Nitrocellulose (GE Healthcare), BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), Albumina Sierica Bovina frazione V (BSA) (Sigma-Aldrich). Gli anticorpi primari usati sono stati per: GPR30 (MBL-Eppendorf, Milan, Italy), ER β (Serotec, Milan, Italy) e ER α (MC-20), ERK2, pERK 1/2, p-eNOS e GAPDH (Santa-Cruz Biotechnology, DBA, Italy). L'anticorpo secondario anti-mouse coniugato con perossidasi di rafano, anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con perossidasi di rafano (GE Healthcare).

6.2. Condizioni basali di perfusione

Gli esperimenti, in accordo con i dati riportati in letteratura (Legssyer et al., 1997; Doring, 1990), sono stati condotti con perfusione retrograda a flusso costante. La performance cardiaca è

stata stabilizzata in circa 15-20 minuti, mentre la durata dell'esperimento è stata determinata dal tipo di protocollo eseguito. Tutti gli esperimenti sono stati realizzati a valori costanti di pH (7,4) e di temperatura (37°C) e su ciascun cuore è stato testato un singolo protocollo per evitare fenomeni di desensitizzazione.

6.3. Curve dose-risposta

Esperimenti preliminari, effettuati sottoponendo il preparato cardiaco a ripetute dosi della sostanza da esaminare rivelano assenza di desensitizzazione (dati non mostrati).

Alla luce di questa evidenza sono state effettuate curve dose-risposta perfondendo il preparato con dosi crescenti di sostanza. Ciascuna concentrazione è stata somministrata per dieci minuti, al termine dei quali sono stati valutati gli effetti sui parametri emodinamici.

6.4. Preparazioni Isoproterenolo (Iso) stimulate

Al fine di ottenere informazioni circa la capacità antiadrenergica della sostanza da testare, in seguito alla stimolazione da Iso, sono state generate curve dose-risposta perfondendo il cuore con KHS arricchito con concentrazioni crescenti di Iso da solo (da 0.1 nM a 1 µM). Queste curve sono state poi comparate con quelle ottenute esponendo il cuore a concentrazioni crescenti di Iso (da 0.1 nM a 1 µM) in presenza di una singola concentrazione di sostanza.

6.5. Preparazioni Endotelina-1 (ET1) stimulate

Per verificare la capacità della sostanza di neutralizzare la stimolazione da ET1, i cuori, dopo stabilizzazione, sono stati perfusi per 10 minuti con ET1 (1 nM); successivamente vengono riportati alle condizioni di controllo con KHS e in seguito ripperfusi con una

singola concentrazione della sostanza da sola e in seguito con la sostanza più 1nM di ET1 per altri 10 min.

6.6. Coinvolgimento delle proteine $G_{i/o}$

Per valutare il coinvolgimento delle proteine $G_{i/o}$, i cuori sono stati pretrattati per 60 min con KHS arricchito con PTx (0.01 nM) e successivamente sono stati esposti per 10 min alla sostanza da testare. Studi di desensitizzazione recettoriale delle proteine $G_{i/o}$ sono stati effettuati perfondendo il cuore per 30 minuti con lo specifico agonista e successivamente esponendo il preparato per 10 minuti con la sostanza da testare.

6.7. Studio sul meccanismo d'azione

Per stabilire il coinvolgimento di specifici effettori della cascata trasduzionale attivata dalla molecola da esaminare, i preparati cardiaci sono stati perfusi con la specifica molecola per 10 min. Successivamente, dopo aver riportato i cuori alle condizioni iniziali tramite lavaggio con soluzione fisiologica, i preparati sono stati perfusi prima con KHS contenente lo specifico antagonista per 10 minuti e successivamente esposti all'inibitore in presenza della sostanza per altri 10 minuti.

7. Determinazione delle concentrazioni intracellulari di cGMP e di cAMP

Per la determinazione delle concentrazioni del cGMP e del cAMP i cuori, precedentemente congelati in azoto liquido (200–300 mg), sono stati omogenati con acido tricloroacetico al 6% a 0°C e centrifugati a 10,000 g per 10 minuti. Dopo aver prelevato il supernatante, questo viene lavato tre volte con dietil etere saturato con acqua; la fase acquosa viene raccolta e conservata a -80°C. La determinazione delle concentrazioni di cGMP e cAMP viene

effettuata usando un kit commerciale di dosaggio immunoenzimatico (Biotrack Enzymeimmunoassay (EIA) System; Amersham Biosciences).

8. Statistica

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

I parametri emodinamici ed i valori ad essi riferiti sono stati espressi come medie \pm errore standard delle variazioni percentuali, rilevate nel corso degli esperimenti, rispetto ai valori di controllo.

Poiché ogni cuore rappresenta il controllo di se stesso, la significatività statistica della variazione tra la condizione test (in presenza di sostanza) e la condizione basale di controllo è stata determinata mediante lo Student's t-test per campioni appaiati; in questo caso, per un valore di $p < 0,05$ la variazione è stata considerata significativa (*), per $p < 0,01$ molto significativa (**), per $p < 0,001$ molto molto significativa (***)).

Il confronto tra i gruppi, utile per individuare eventuali differenze significative tra le diverse condizioni sperimentali, viene effettuato tramite analisi della varianza one-way ANOVA, seguita dal test di Bonferroni; le variazioni sono state considerate significative per $p < 0,05$ (§). Le curve dose-risposta della stimolazione della LVP di Iso da solo e di Iso in presenza dei diversi peptide sono state analizzate usando il programma GraphPad Prism 4.02. questo programma fornisce, per ogni curva, il $-\log$ della concentrazione (in M) che induce il 50% dell'effetto (EC50) di Iso da solo e Iso in presenza dei diversi peptidi.

Risultati

1. Effetto cardiomodulatore della rCga1-64

1.1 Effetto inotropo e lusitropico della rCga1-64

Curve dose-risposta di rCga1-64_{S-S}, rCga1-64_{SH} e rCga1-64_{OX} sono state effettuate dopo stabilizzazione dei parametri cardiaci ed in condizioni basali di perfusione, cioè in assenza di stimolazione chimica e/o fisica. Esse hanno consentito di analizzare il ruolo modulatore dei tre peptidi nei confronti della contrattilità e del rilassamento cardiaco. Un'analisi dell'andamento delle tre curve ha permesso di compiere uno studio struttura-funzione dei tre peptidi correlato alla diversa attività cardiaca.

Esperimenti di *time course* su preparati perfusi solo con KHS, la cui attività è stata monitorata e misurata ogni 10 minuti, hanno dimostrato che la stabilità del preparato si mantiene per almeno 180 minuti (dati non mostrati). Inoltre, la ripetuta somministrazione di singole dosi dei tre peptidi (33 nM) ha confermato l'assenza di fenomeni desensitizzanti ed ha mostrato che, in tutti e tre i casi, si evidenzia un effetto massimo a 5 minuti dall'applicazione che rimane stabile per 15-20 minuti e poi decresce gradualmente col tempo (dati non mostrati).

Le curve dose-risposta sono state effettuate perfondendo i preparati cardiaci con concentrazioni crescenti di ciascun peptide rCga1-64_{S-S}, rCga1-64_{SH} e rCga1-64_{OX} in un range fisiologico tra 11 e 165 nM. I parametri dell'attività cardiaca sono stati valutati dopo 10 minuti dalla somministrazione di ciascuna soluzione a diversa concentrazione.

La somministrazione del frammento rCga1-64_{S-S} induce un significativo effetto inotropo negativo concentrazione-dipendente

associato a una significativa vasodilatazione, come evidenziato da un decremento della LVP e della CP, a partire da 33 nM. Il peptide causa anche una riduzione della RPP e della $+(LVdP/dt)_{max}$, significativa a partire da 65 nM, senza modificare la frequenza cardiaca (HR) (Fig. 7). Inoltre, da un'analisi sul lusitropismo, emerge la capacità di questo peptide di indurre un effetto lusitropico negativo deducibile da una diminuzione della $-(LVdP/dt)_{max}$ e da un incremento di T/T significativo a partire da 65 nM. Sulla HTR il peptide non ha apportato alcuna significativa modificazione (Fig. 8).

La rCga1-64_{SH}, invece, riduce la LVP a 65, 100 e 165 nM, senza modificare gli altri parametri (Fig. 7, 8).

La rCga1-64_{OX} significativamente incrementa la HR alle dosi più basse e la $+(LVdP/dt)_{max}$ alle dosi più alte senza modificare gli altri parametri (Fig. 7,8).

1.2 Attività antiadrenergica della rCga1-64

Al fine di valutare una possibile azione anti-adrenergica dei tre peptidi, i preparati cardiaci sono stati perfusi con KHS contenente concentrazioni crescenti di Iso (0,1 nM-1 μ M) da solo e in combinazione con singole concentrazioni di rCga1-64_{S-S} (11, 33 e 65 nM), rCga1-64_{SH} (165 nM), rCga1-64_{OX} (165 nM).

L'analisi della variazione percentuale della LVP ha consentito la determinazione della EC₅₀ di Iso da solo e Iso in presenza di ciascuno dei tre peptidi. Il valore (espresso come logM) della EC₅₀ di Iso da solo è -8.67 ± 0.3 ($r^2= 0.84$), di Iso + rCga1-64_{S-S} (11, 33 e 65 nM) è, rispettivamente, -8.7 ± 0.36 ($r^2= 0.84$), -7.5 ± 0.57 ($r^2= 0.67$), -7.8 ± 1.15 ($r^2= 0.35$); di Iso+rCga1-64_{SH} (165 nM) è -8.44 ± 0.28 ($r^2= 0.89$) mentre di Iso+rCga1-64_{OX} (165 nM) è -7.28 ± 0.22 ($r^2= 0.91$).

Il test ANOVA rivela un'interazione significativa fra l'Iso e i tre frammenti rCga1-64 (Fig. 9).

1.3 Effetto della rCga1-64 in presenza di ET1

L'ET-1 è un peptide di 21 aminoacidi con elevata attività vasocostrittrice (Yanagisawa et al., 1988), capace di indurre un effetto inotropo positivo in cuori isolati e perfusi di mammifero (Brunner et al., 2006).

Per stabilire la capacità del frammento rCga1-64_{s-s} di contrastare gli effetti mediati dall'ET1, i cuori sono stati perfusi con KHs contenente ET1 (1 nM) da solo e in presenza di rCga1-64_{s-s} (65 nM). Il peptide ha contrastato l'effetto positivo indotto dall'ET1 sia sulla LVP che sulla RPP e ha ridotto significativamente la vasocostrizione coronarica ET1-dipendente (Fig. 10).

1.4 Coinvolgimento delle proteine Gi/o

Per verificare il coinvolgimento delle proteine Gi/o, i cuori sono stati perfusi con KHs contenete PTx (0,01 nM) in presenza di rCga1-64_{s-s} (65 nM). Il trattamento con la tossina della pertosse ha abolito l'effetto inotropo e lusitropico negativo rCga1-64_{s-s} mediato sui parametri cardiaci LVP, +(LVdP/dt)_{max}, -(LVdP/dt)_{max} ed ha annullato la vasodilatazione indotta dal peptide Cga-derivato (Fig. 12).

1.5 Pathways trasduzionali attivati dalla rCga1-64

Studi sul meccanismo d'azione che sottende l'effetto mediato dal frammento rCga1-64, hanno indotto a valutare il coinvolgimento della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K). A tal fine, i cuori sono stati perfusi con rCga1-64_{s-s} (65 nM) in presenza di Wortmannina (10 nM), un selettivo antagonista della PI3K. Il pretrattamento con la Wortmannina ha abolito gli effetti inotropi e lusitropici negativi e la vasodilatazione indotti dalla rCga1-64_{s-s} (Fig. 13).

Per valutare il coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG nell'effetto cardiomodulatore mediato dalla rCga1-64_{s-s} (65 nM), i preparati cardiaci sono stati trattati con L-NIO (10 μM) con PTIO (10 μM), con ODQ (10 μM) e KT5823 (0.01 μM) in presenza del frammento. Il trattamento con L-NIO, inibitore selettivo dell'isoforma endoteliale dell'ossido nitrico sintasi (eNOS), ha abolito sia l'effetto inotropo negativo del peptide che la vasodilatazione da esso indotta. Come evidenziato dall'analisi della $-(LVdP/dt)_{max}$, lo L-NIO è in grado anche di abolire l'effetto lusitropico negativo indotto dallo rCga1-64_{s-s} (65 nM) (Fig. 14)

Simili risultati sono stati ottenuti in presenza di PTIO, scavenger dello NO, di ODQ, inibitore della guanilato ciclastasi solubile (sGC), e di KT5823, inibitore della proteina chinasi G (PKG) (Fig. 14)

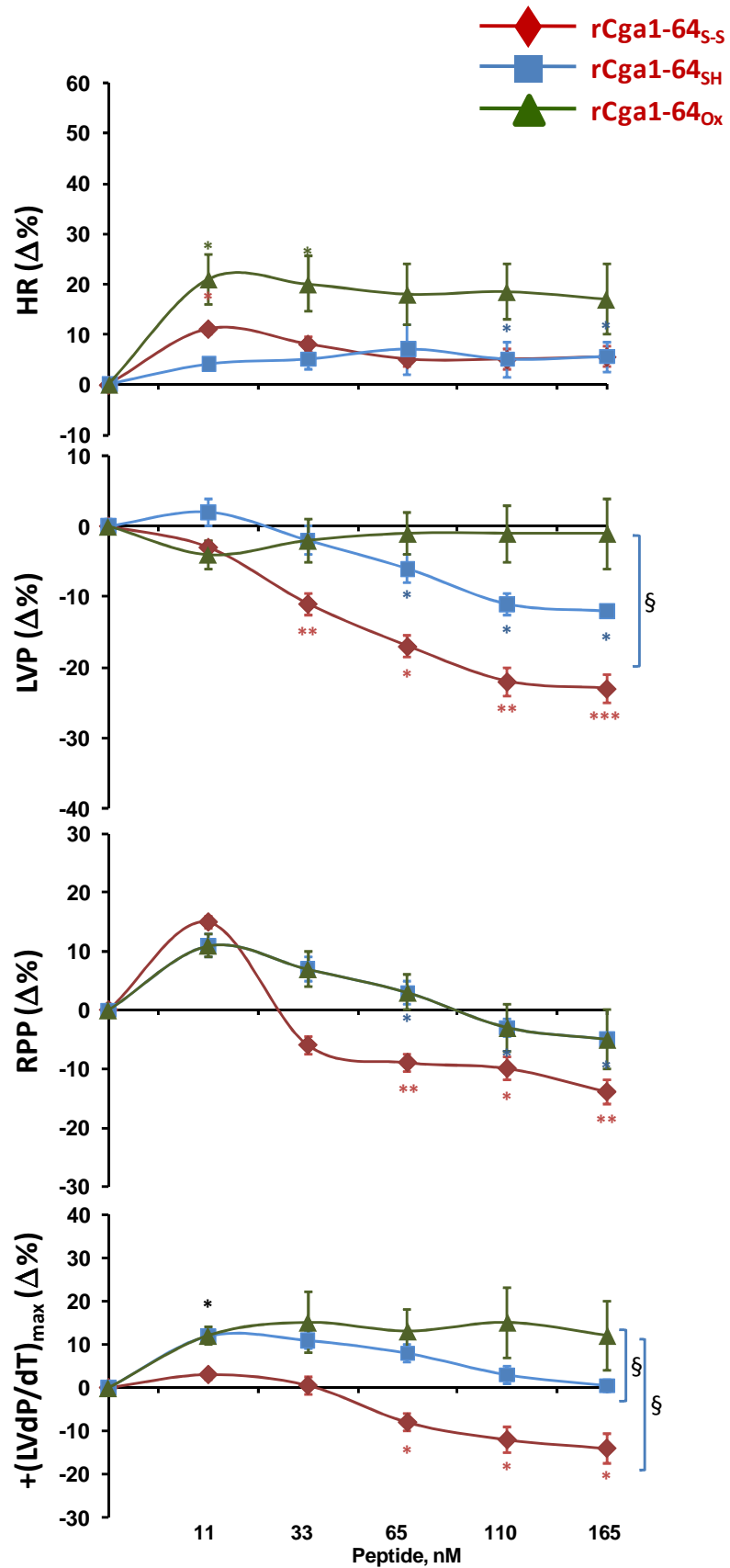


Fig.7: Curve dose-risposta della rCga1-64_{S-S}, rCga1-64_{SH} e rCga1-64_{OX} (11÷165 nM) riferite ai parametri HR, LVP, +(LVdP/dt)_{max} e RPP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

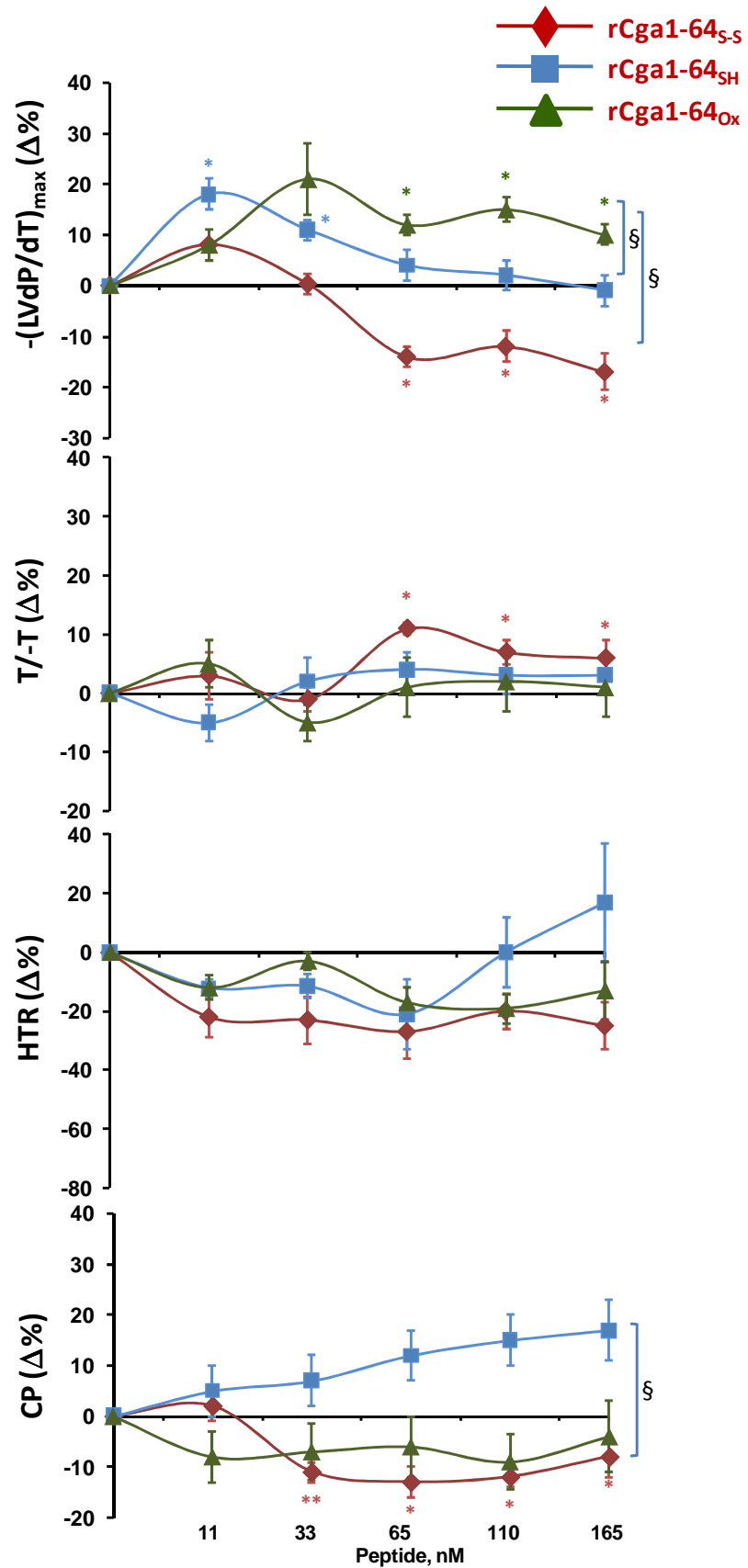


Fig. 8: Curve dose-risposta della rCga1-64_{s-s}, rCga1-64_{sh} e rCga1-64_{ox} (11÷165 nM) riferite ai parametri - (LVdP/dt)_{max}, T/-T, HTR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = p<0.05, ** = p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

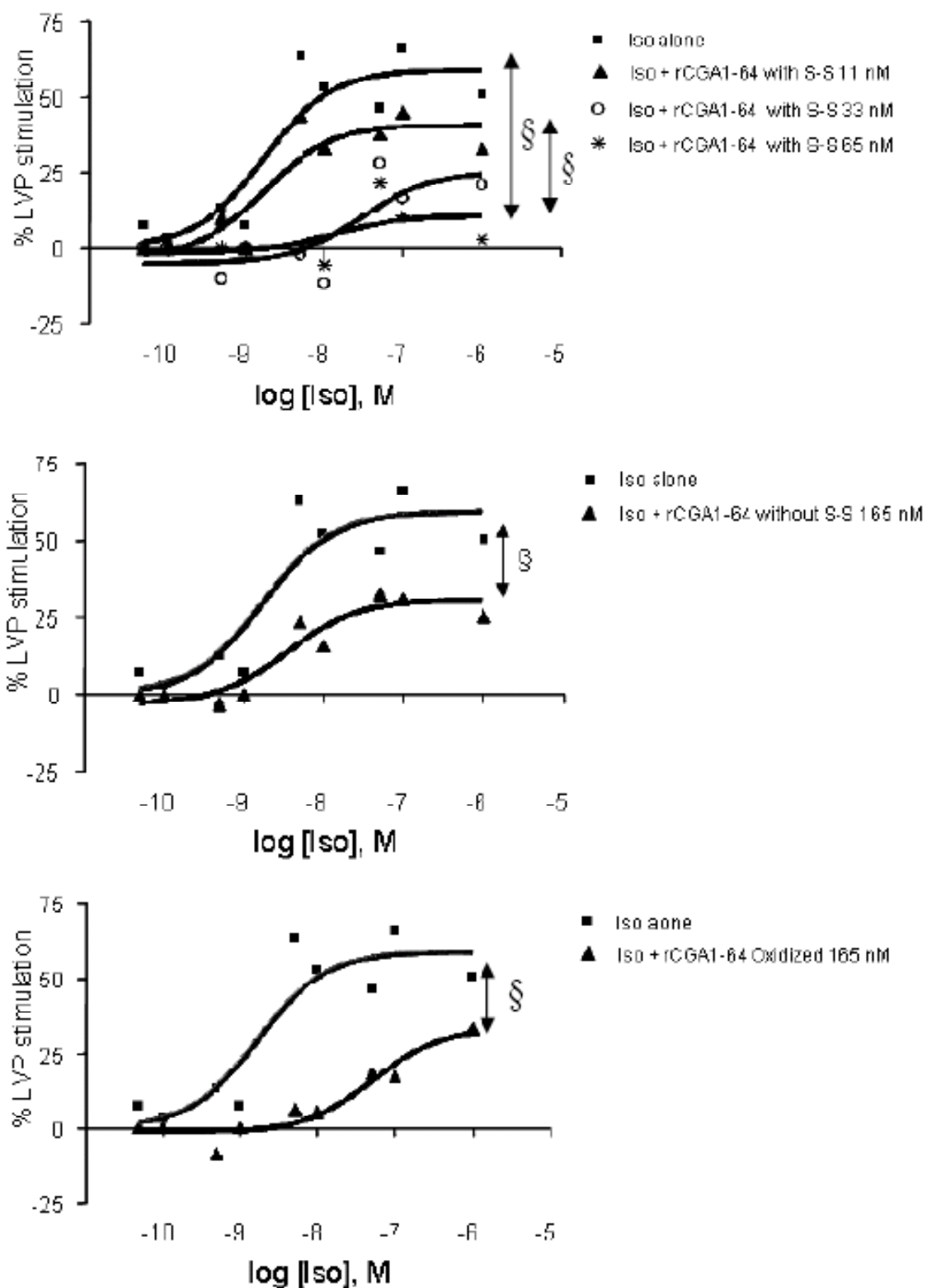


Fig. 9: Curve sigmoidi dose-effetto da stimolazione da Iso (10^{-10} - 10^{-6} M) da solo ed in presenza di singole concentrazioni di rCga1-64_{s-s}, (11, 33 e 65 nM), rCga1-64_{SH} (165 nM) e rCga1-64_{ox} (165 nM). La contrattilità è stata espressa come percentuale di LVP. Il confronto fra gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova seguito dal Bonferroni post hoc test ($S < 0.05$).

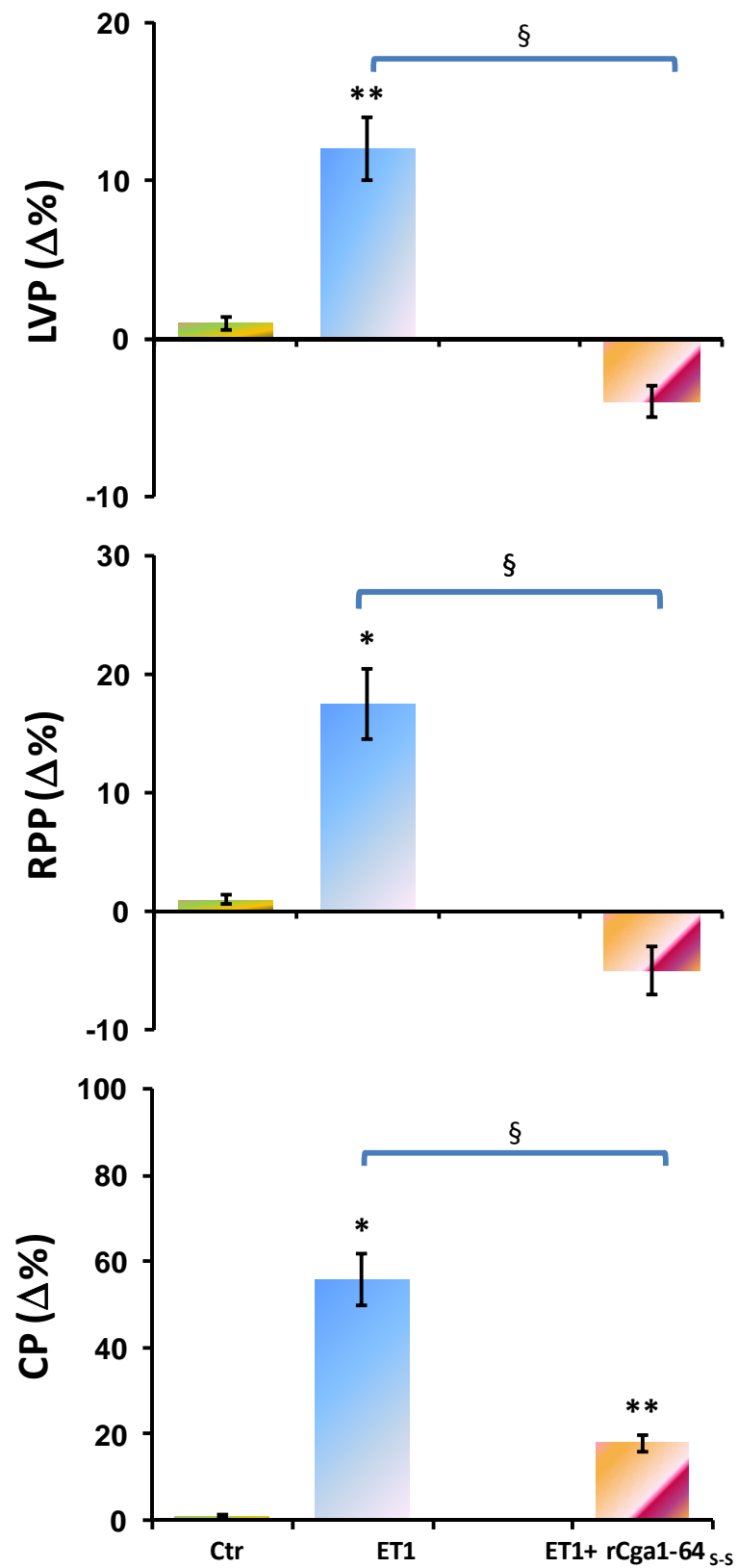


Fig. 10: Effetto dell'ET1 (1 nM) prima e dopo trattamento con rCga1-64_{s-s} sui parametri LVP, RPP e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = p<0.05, ** = p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

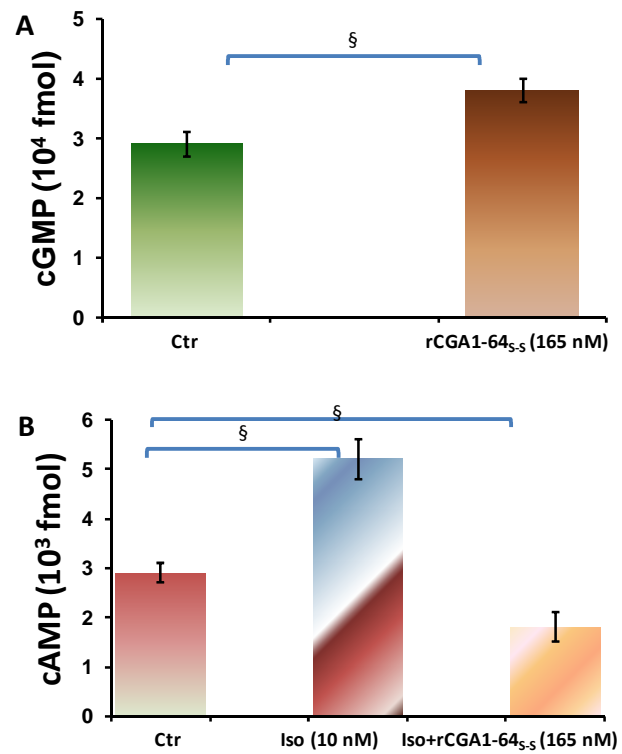


Fig. 11:Variazioni delle concentrazioni intracellulari di A) cGMP in cuori trattati con rCga1-64_{s-s} rispetto al controllo e B) di cAMP in cuori trattati con Iso da solo e in presenza di rCga1-64_{s-s}. I risultati sono espressi come concentrazioni molarie \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

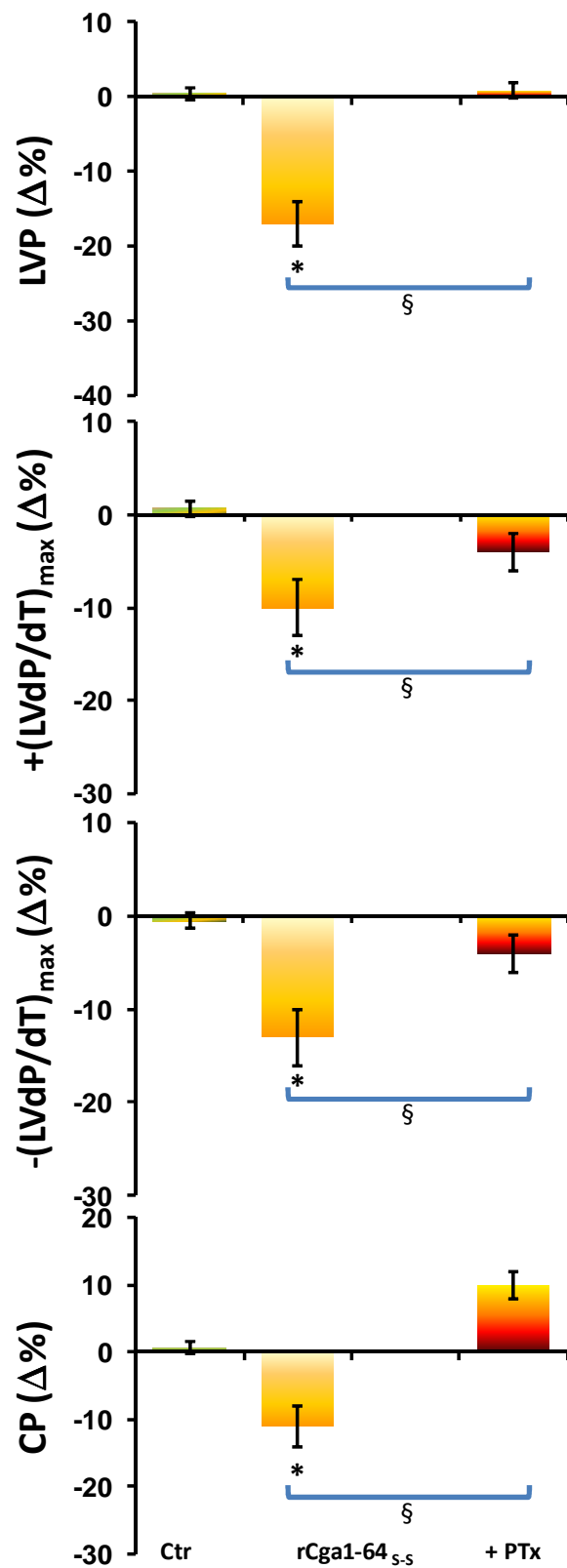


Fig. 12: Effetto della rCga1-64_{s5} prima e dopo trattamento con la PTx (0.01 nM) sui parametri LVP, +(LVdP/dt)_{max}, -(LVdP/dt)_{max} e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = p < 0.05, ** = p < 0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§ < 0.05).

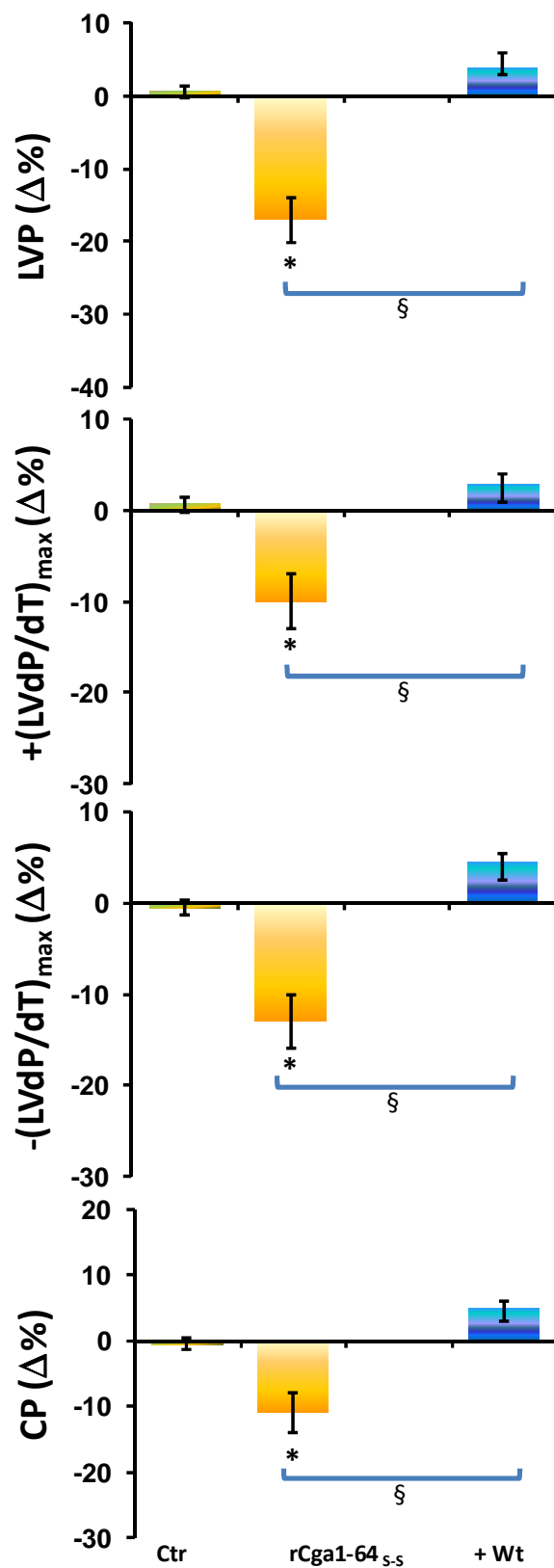


Fig. 13: Effetto della rCga1-64_{S-S} prima e dopo trattamento con la Wt (10 nM) sui parametri LVP, +(LVdP/dt)_{max}, -(LVdP/dt)_{max} e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

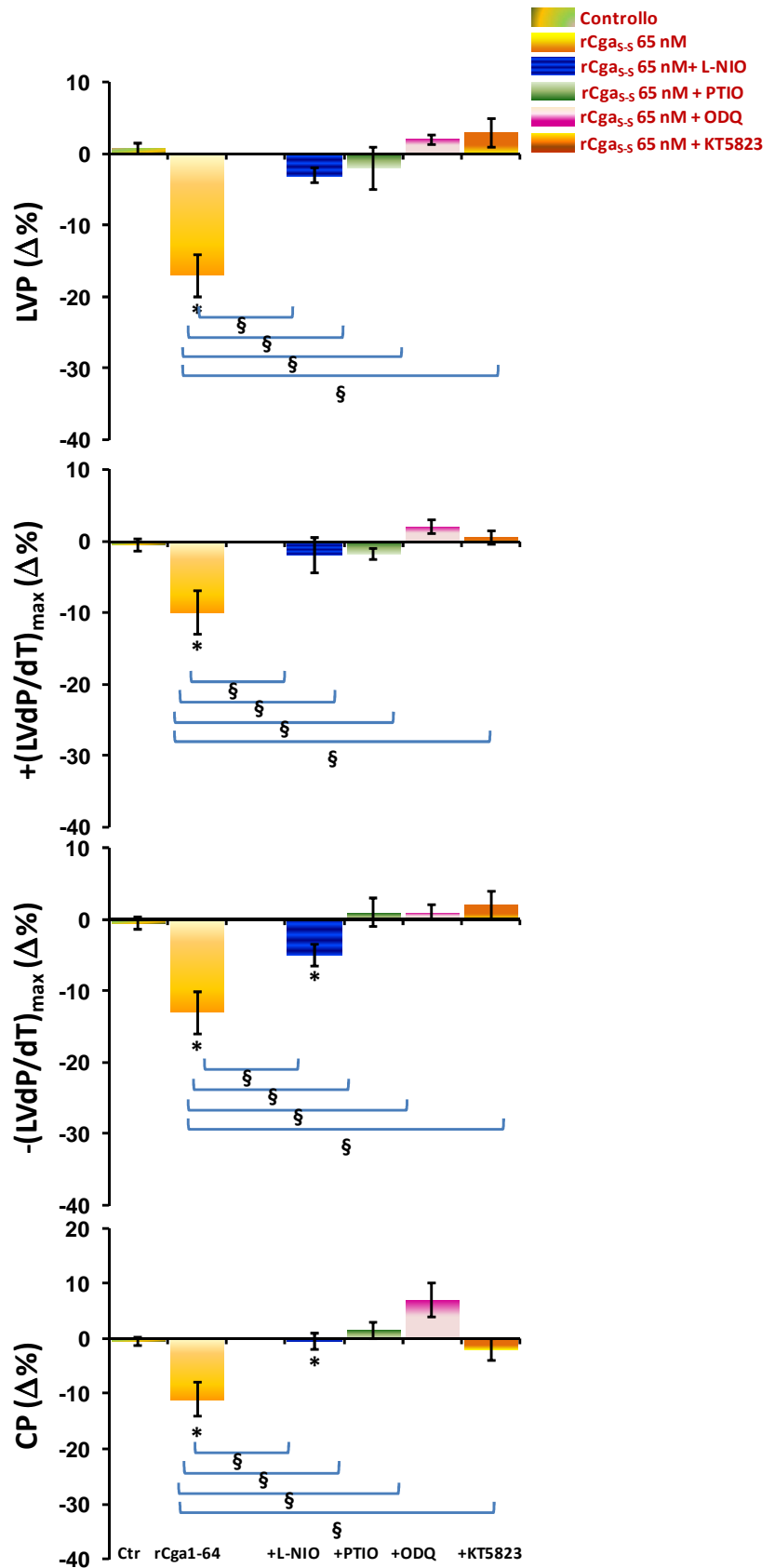


Fig. 14: Effetto della rCga1-64_{s-s} prima e dopo trattamento con L-NIO (10μM), PTIO (10μM), ODQ (10μM), KT5823 (0.1 μM) sui parametri LVP, + (LVdP/dt)_{max}, - (LVdP/dt)_{max} e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali ± errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = p < 0.05, ** = p < 0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§ < 0.05).

2. Effetto cardiomodulatore del 17β -E2

2.1 Espressione cardiaca dei recettori estrogenici $ER\alpha$, $ER\beta$ e GPR30

Analisi di RT-PCR qualitativa e Western blot sono state effettuate su omogenati cardiaci per determinare l'espressione basale dei tre recettori estrogenici α , β e GPR30. Da indagini effettuate usando specifici primers, è stato possibile riscontrare sia il loro prodotto genomico (Fig. 15(a), Linea 2) che il loro prodotto proteico (Fig. 15(b), Linea 2) a livello cardiaco. Estratti di tessuto ovarico, nel quale è riportata la presenza di questi recettori (O'Donnell et al., 2005), sono stati usati come controlli positivi. (Fig. 15 (a, b), linea 3)

2.2 Azione inotropica e lusitropica del 17β E2 e stimolazione basale di GPR30

Le curve dose-risposta del 17β E2 e di G1, agonista selettivo di GPR30, sono state effettuate dopo stabilizzazione dei parametri cardiaci ed in condizioni basali di perfusione, cioè in assenza di stimolazione chimica e/o fisica. Esse hanno consentito di analizzare il ruolo modulatore dei due agonisti nei confronti della contrattilità e del rilassamento cardiaco.

Esperimenti preliminari su preparati sottoposti a *time course* in presenza di sola KHS hanno dimostrato che la stabilità del preparato si mantiene per almeno 180 minuti (dati non mostrati). Inoltre, la somministrazione ripetuta di singole concentrazioni di 17β E2 o di G1 (1 nM) ha provato l'assenza di fenomeni di desensitizzazione ed ha evidenziato un effetto massimo a 5 minuti dall'applicazione che rimane stabile per 15-20 minuti e poi decresce gradualmente col tempo (dati non mostrati).

Per generare le curve dose-risposta, i preparati cardiaci sono stati esposti a concentrazioni crescenti in un range fisiologico tra 1 pM e 10 nM di 17 β E2 o di G1. I parametri dell'attività cardiaca sono stati valutati dopo 10 minuti dalla somministrazione di ciascuna soluzione a diversa concentrazione.

La somministrazione del 17 β E2 induce un effetto inotropo negativo significativo a tutte le concentrazioni testate. Sul lavoro cardiaco (RPP) e sulla massima velocità di contrazione [(LVdP/dt)max] l'ormone esercita una riduzione significativa a partire da 10 pM, associata ad un significativo aumento della frequenza cardiaca (HR) (Fig. 16).

Il 17 β E2 mostra anche un effetto lusitropico negativo con significativa riduzione della massima velocità di rilassamento (-LVdP/dt)max), associata ad un incremento non significativo del T/T e dell'HTR alle concentrazioni più alte (Fig. 17). L'ormone presenta anche un significativo effetto vasocostrittore a partire da 10 pM (Fig. 17).

Dati di letteratura riportano la presenza, a livello della membrana plasmatica, di un nuovo recettore associato a proteine G (identificato come GPR30) capace di mediare l'effetto del 17 β E2 (Filardo et al., 2007).

Al fine di valutare, nel cuore di ratto isolato e perfuso, l'effetto associato a sola attivazione di GPR30, sono state fatte curve dose-risposta esponendo il preparato a concentrazioni crescenti (1 pM±10 nM) di un agonista selettivo di GPR30, G1. Allo stesso modo del 17 β E2, G-1 presenta un effetto inotropo negativo deducibile da una riduzione significativa della LVP non associata a variazioni del lavoro cardiaco e della +(LVdP/dt)max. G1 incrementa la frequenza cardiaca (HR) a tutte le concentrazioni testate ma in maniera significativa alle concentrazioni più basse (1-10 pM) (Fig. 18).

L'attivazione del GPR30 G1-mediata induce un effetto lusitropico positivo evidenziabile da un incremento significativo della $-(LVdP/dt)_{max}$ con riduzione significativa di T/-T e HTR. G1 media un effetto vasocostrittore non significativo (Fig. 19).

2.3 Coinvolgimento dei recettori ER α e ER β

Per esplorare il potenziale coinvolgimento dei classici recettori estrogenici di membrana, ER α e ER β , nell'effetto cardiotropo indotto dal 17 β E2 e da G1, sono stati effettuati esperimenti di antagonismo, perfondendo i cuori con 17 β E2 o G1 in presenza di un antagonista non selettivo delle due isoforme, ICI (100nM). ICI ha abolito l'effetto inotropo negativo del 17 β E2 mentre ha attenuato l'effetto lusitropico e vasocostrittore (Fig. 20). L'effetto cardiotropo G1-mediato e quello vasocostrittore sono stati aboliti da ICI (Fig. 24).

Per verificare il ruolo svolto da ambedue le isoforme del recettore estrogenico, sono state fatte curve dose-risposta esponendo il preparato a concentrazioni crescenti (1pM÷10nM) di agonisti selettivi per ER α e ER β , PPT e DPN, rispettivamente. Entrambi modificano i parametri cardiaci, rispecchiando gli effetti mediati dal 17 β E2 (Fig. 21, 22).

2.4 Coinvolgimento delle proteine G i/o

L'incubazione dei cuori per 60 minuti con la tossina della pertosse (0,01 nM), ha ridotto l'effetto inotropo e lusitropico negativo mediato dal 17 β E2 mentre ha bloccato l'effetto sulle coronarie (Fig. 23). La desensitizzazione di GPR30 attraverso prolungata esposizione a G1 (10nM) riduce l'effetto cardiotropo del 17 β E2 (LVP= $-10.41\pm 1.82\%$), confermando ulteriormente il parziale coinvolgimento di questo recettore nel meccanismo d'azione attivato dal 17 β E2.

2.5 Coinvolgimento del pathway trasduzionale ERK-PI3K-PKA

Al fine di verificare un eventuale coinvolgimento del sistema trasduzionale ERK-PI3K-PKA nel meccanismo d'azione dei due agonisti, i preparati cardiaci di ratto sono stati trattati con $17\beta\text{E}2$ o G1 da soli (1 nM) e in presenza di PD (100 nM), LY (100 nM) e H-89 (10 nM), rispettivamente antagonisti di ERK1/2, PI3K e PKA. Il blocco della trasduzione del segnale di questi mediatori ha abolito l'effetto inotropo negativo del $17\beta\text{E}2$. L'effetto lusitropico negativo dell'ormone è stato attenuato dal PD e da H89 mentre è stato bloccato da LY. L'effetto vasocostrittore è stato attenuato da PD e LY mentre è stato bloccato dallo H89 (Fig. 23).

Per valutare il coinvolgimento delle ERK1/2 nella cascata trasduzionale attivata da GPR30, i preparati cardiaci di ratto sono stati trattati con G1 da solo (1 nM) e in presenza di PD (100 nM). Lo specifico antagonista di ERK1/2 blocca tanto l'effetto cardiotropo che vasocostrittore di G1 (Fig. 24). La conferma di ciò viene dall'analisi western blot di questi cuori che ha permesso di osservare una marcata fosforilazione di questo target indotta da G1 che scompare in presenza di PD (Fig. 25).

2.6 Coinvolgimento della via eNOS-NO

L'ossido nitrico (NO), attraverso l'attivazione della guanilato ciclastasi è un importante mediatore dell'azione del $17\beta\text{E}2$ e di segnali inter- e intra-cellulari (Massion et al., 2003).

Per verificare l'effettivo coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG nell'azione cardiotropa mediata dal $17\beta\text{E}2$, i preparati cardiaci sono stati pretrattati con l'ormone (1 nM) in presenza di L-NIO (10 μM) o ODQ (10 μM).

Il trattamento con L-NIO, inibitore dell'isoforma endoteliale dell'ossido nitrico sintasi (eNOS), ha abolito l'inotropismo del 17 β E2 mentre ne ha solo attenuato l'effetto lusitropico e vasocostrittore (Fig. 23).

L'inibizione mediata dall'ODQ della guanilato ciclasi solubile non ha bloccato gli effetti mediati dal 17 β E2 sull'inotropismo mentre ne attenua l'effetto lusitropico e vasocostrittore (Fig. 24).

Il coinvolgimento della eNOS nella cascata trasduzionale attivata da G1 è stato valutato analizzando la fosforilazione di questo enzima in cuori trattati con solo G1 (1 nM). Dall'analisi proteica mediante western blot è emerso che G1 induce fosforilazione di eNOS. Questa fosforilazione scompare in presenza dell'inibitore delle ERK1/2, il PD (100nM) in cuori trattati con G1 in presenza di questo antagonista (Fig. 25).

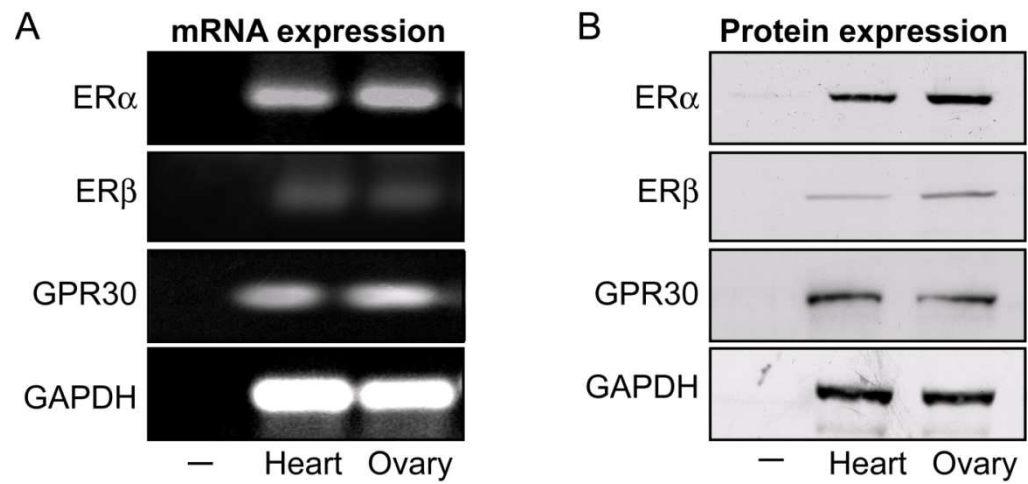


Fig. 15: (a) RT-PCR dei recettori estrogenici (ER) α , ER β , GPR30 e GAPDH di estratti di tessuto cardiaco di ratto maschio (linea 2); il tessuto ovarico di ratto femmina è stato usato come controllo positivo (linea 3). Nella linea 1 è presente l'amplificato in assenza di cDNA (linea 1) (b) Immunoblots (n=10) di estratti di cuore di ratto maschio (linea 2) e ovarico (di ratti femmina) usato come controllo positivo (linea 3) mostrano l'espressione proteica di ER α , ER β , GPR30 e GAPDH, quest'ultimo usato come controllo. Il buffer di lisi senza proteine corrisponde alla linea 1.

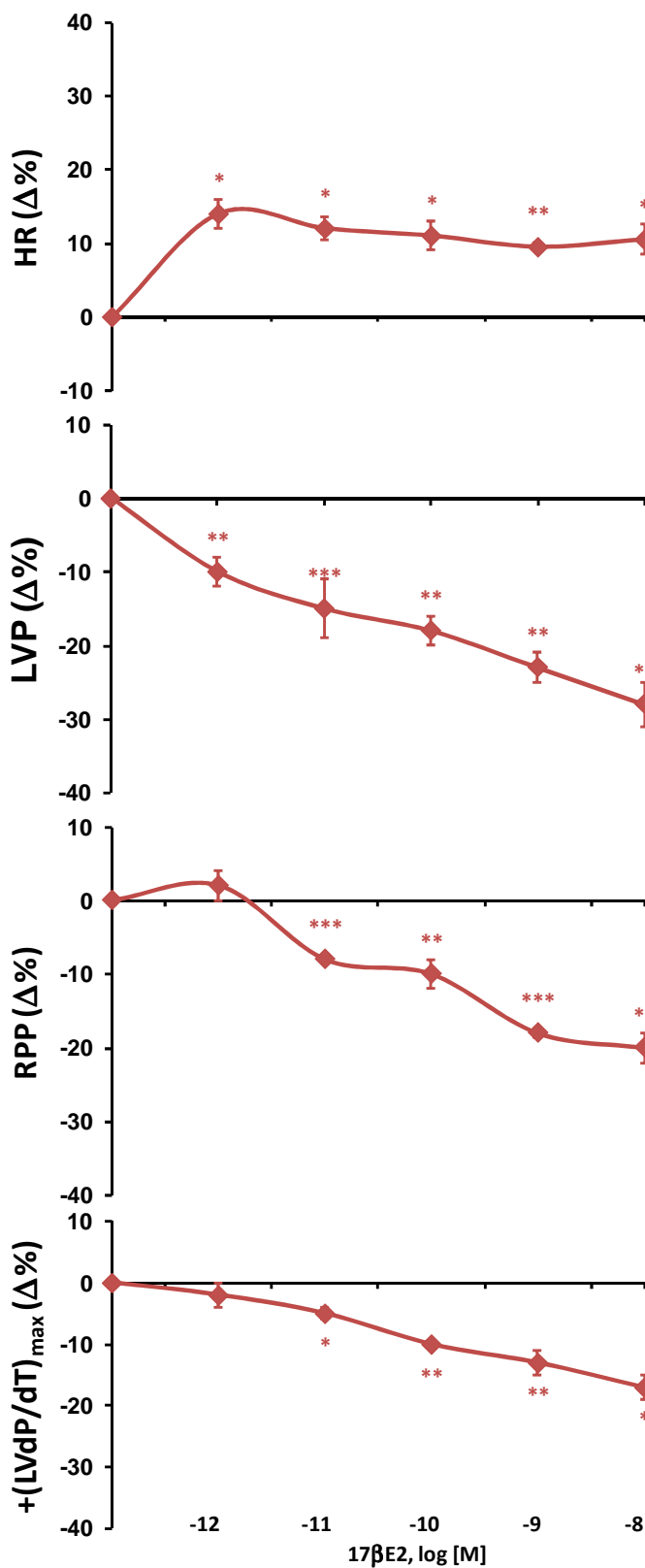


Fig. 16: Curve dose-risposta del 17β -E2 ($1\text{pM}\pm 10\text{nM}$) riferite ai parametri HR, LVP, RPP e $+(LVdP/dT)_{\text{max}}$. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

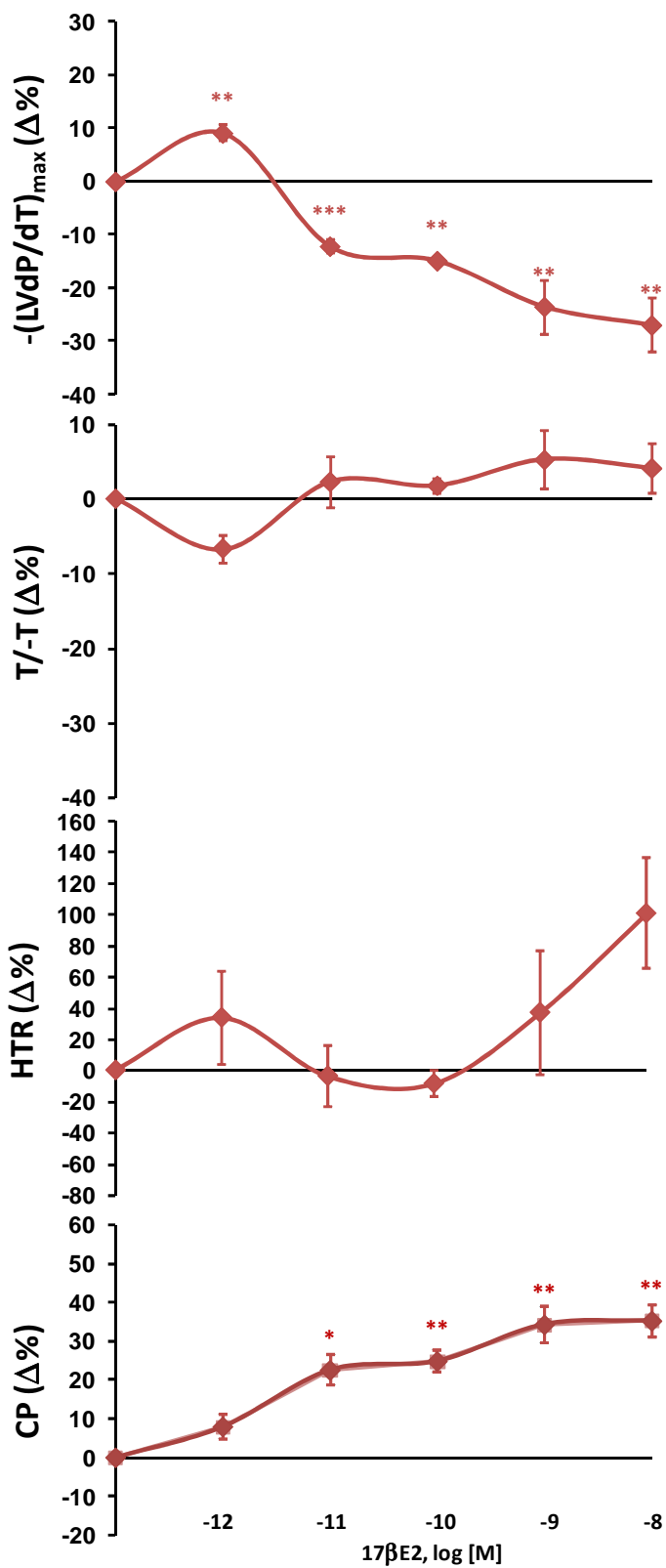


Fig. 17: Curve dose-risposta del 17β-E2 (1pM÷10nM) riferite ai parametri $-(LVdP/dt)_{max}$, T/-T, HTR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = p<0.05, ** = p<0.01.

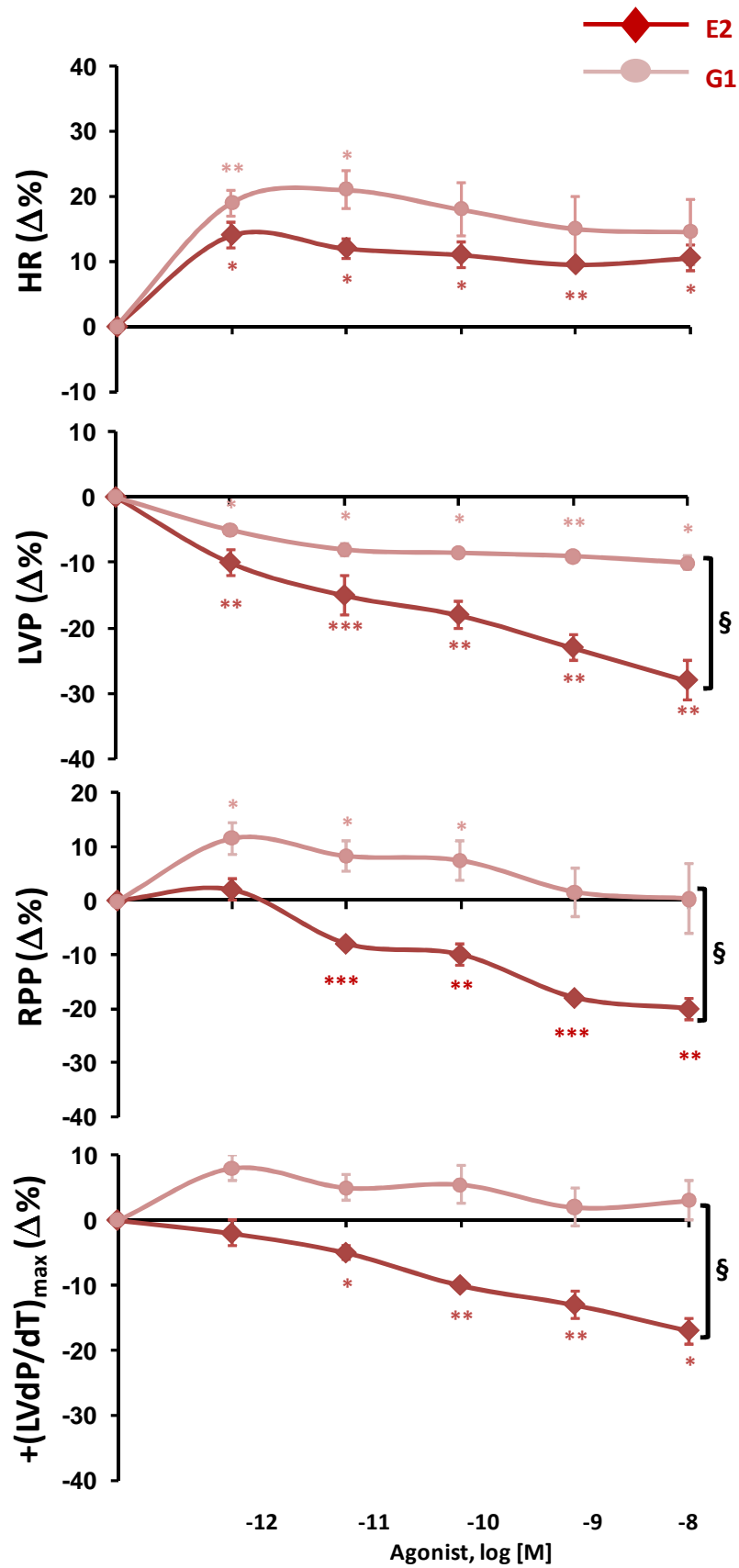


Fig. 18: Curve dose-risposta del 17β -E2 e di G1 (1 pM+10nM) riferite ai parametri HR, LVP, RPP e $+(LVdP/dt)_{max}$. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = p<0.05, ** = p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

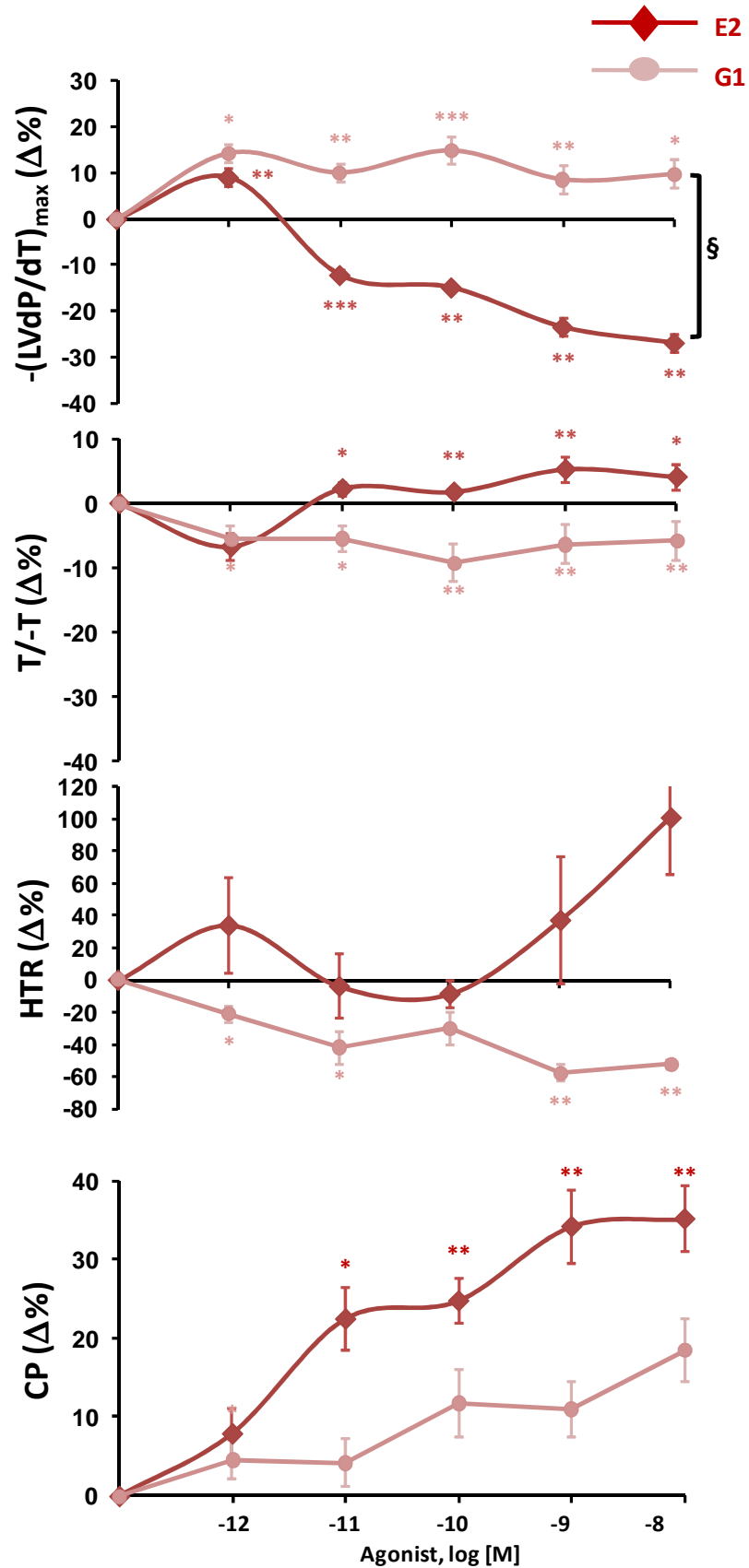


Fig. 19: Curve dose-risposta del 17β -E2 e di G1 (1 pM÷10nM) riferite ai parametri $-(LVdP/dt)_{max}$, T/-T, HTR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p<0.05$, **= $p<0.01$. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova ($\S<0.05$).

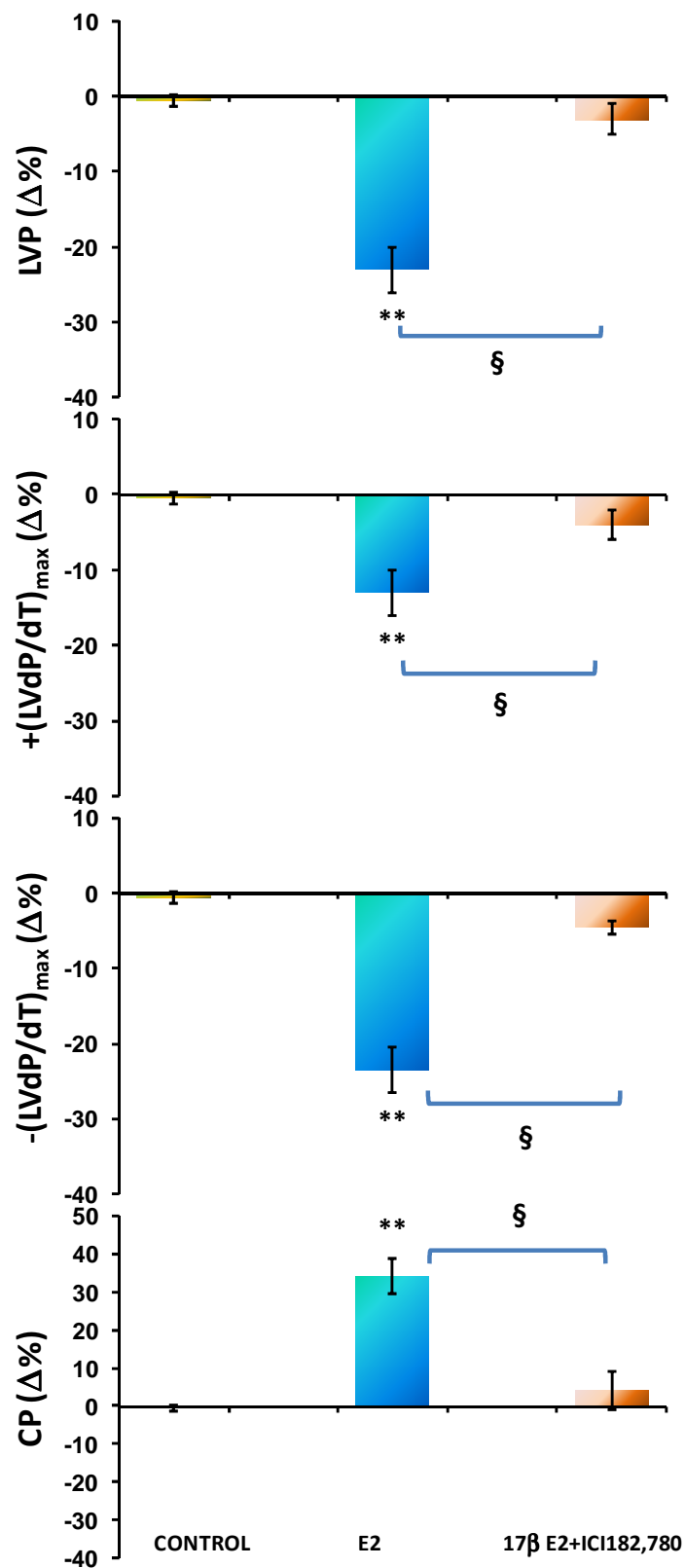


Fig. 20: Effetto del 17β-E2 (1nM) prima e dopo trattamento con ICI (100nM) sui parametri LVP, +(LVdP/dt)_{max}, -(LVdP/dt)_{max}, CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali ± errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

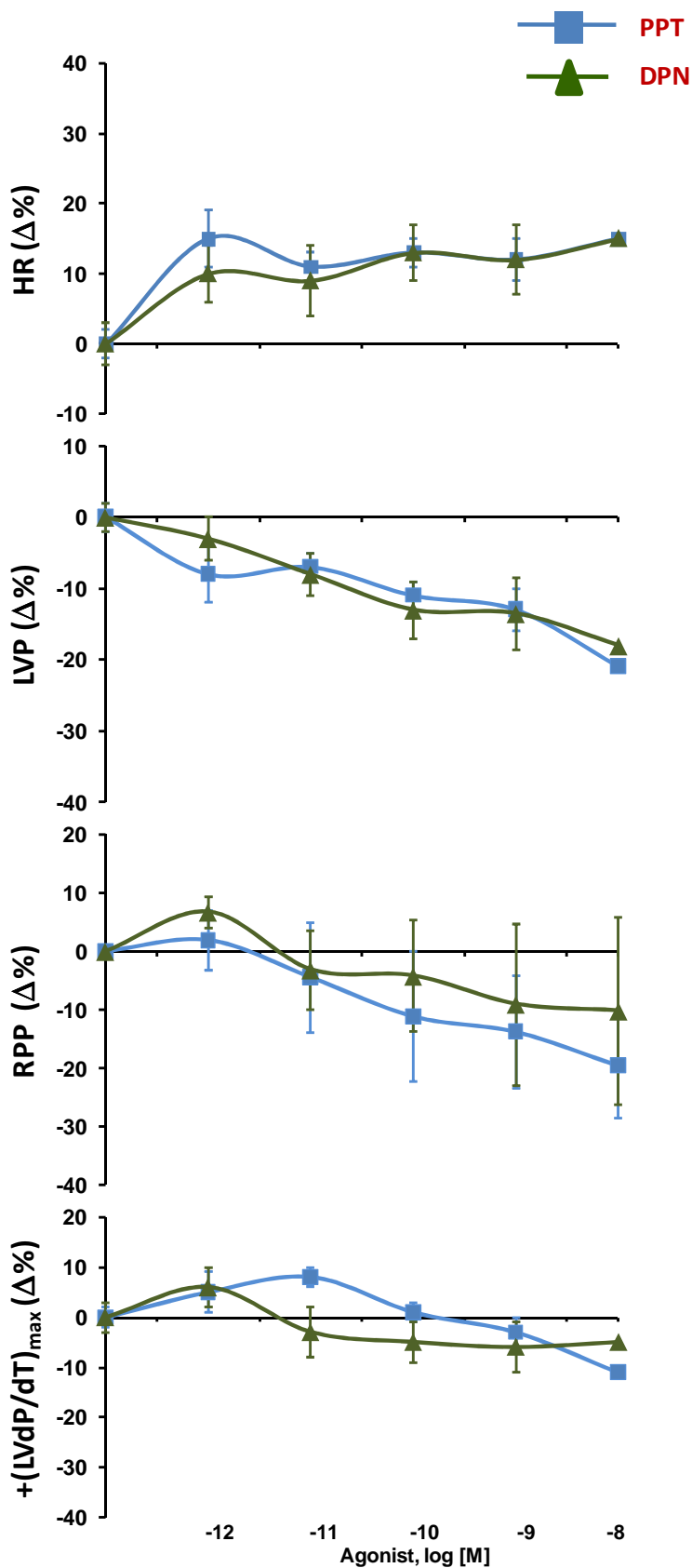


Fig. 21: Curve dose-risposta del DPN e PPT (1pM÷10nM) riferite ai parametri HR, LVP, $+(LVdP/dt)_{max}$ e RPP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= $p<0.05$, **= $p<0.01$. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova ($S<0.05$).

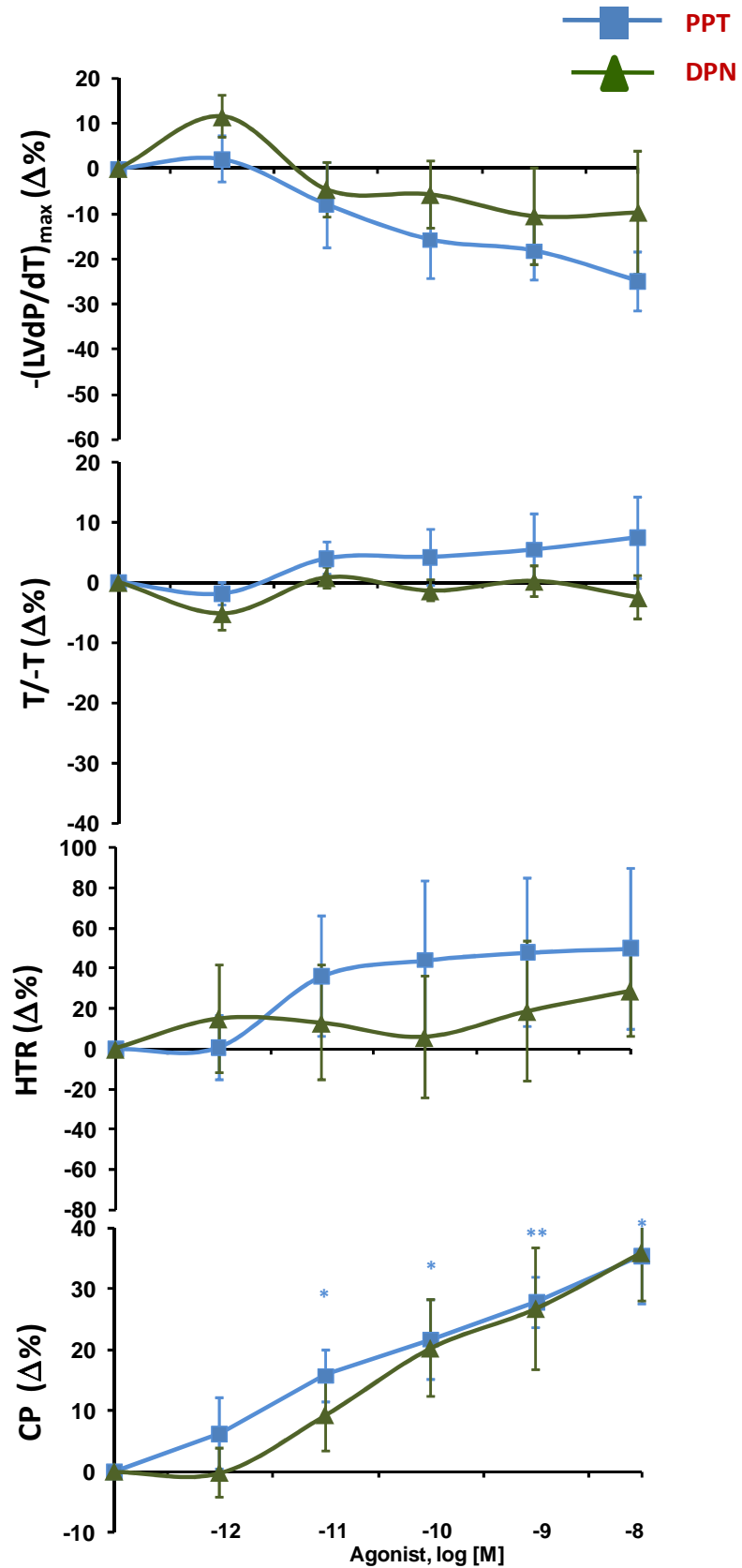


Fig. 22: Curve dose-risposta del DPN e di PPT (1pM÷10nM) riferite ai parametri $-(LVdP/dt)_{max}$, $T/-T$, HTR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova ($S<0.05$).

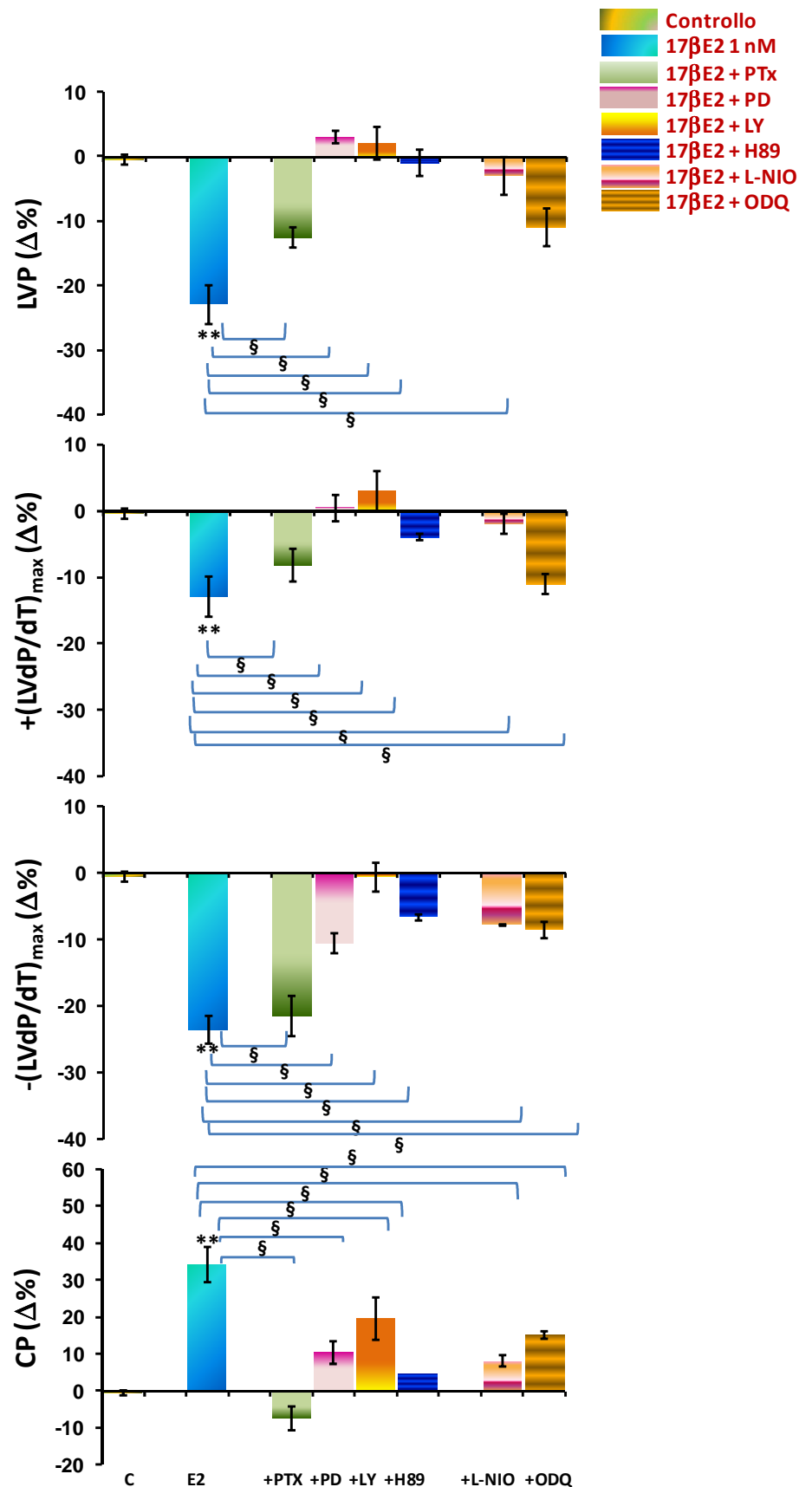


Fig. 23: Effetto del 17β-E2 (1nM) prima e dopo trattamento con PTx (0,01nM), PD (100nM), LY (100nM), H-89 (10nM), L-NIO (10μM), ODQ (10 μM) sui parametri LVP, +(LVdP/dt)_{max}, -(LVdP/dt)_{max} e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali ± errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = p<0.05, ** = p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§<0.05).

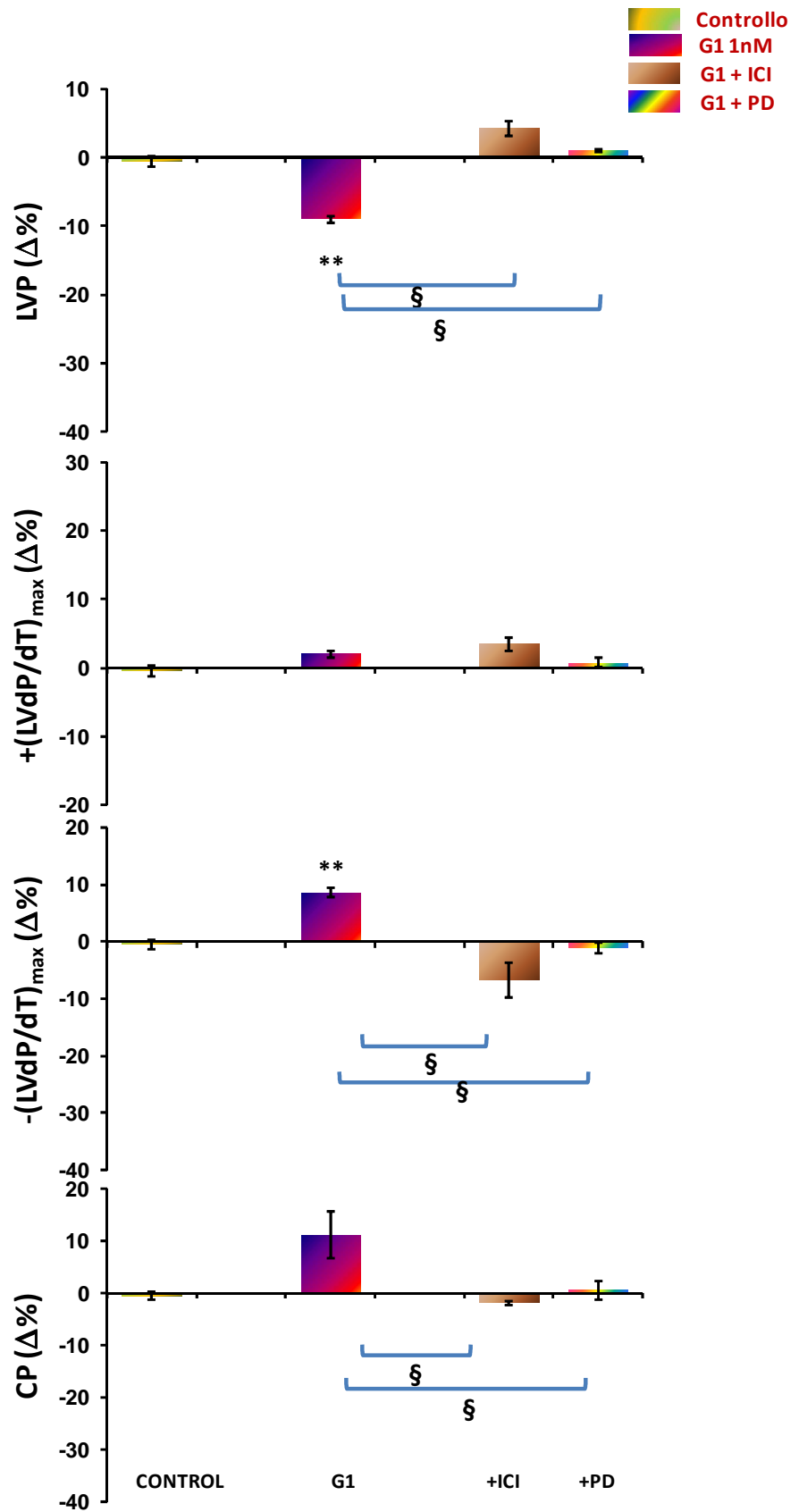
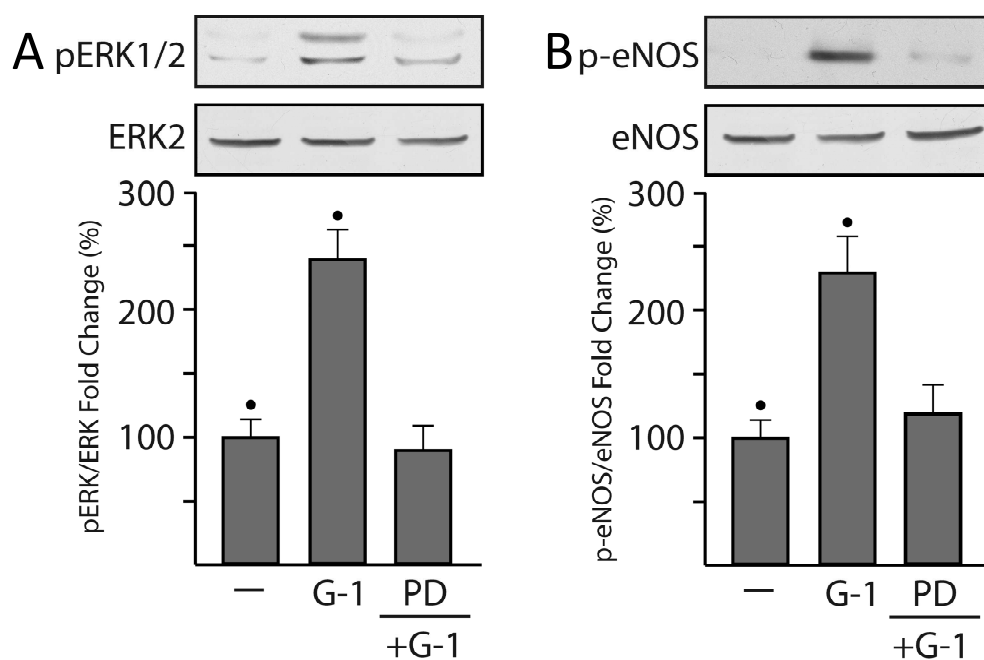


Fig. 24: Effetto di G1 (1nM) prima e dopo trattamento con ICI (100nM), PD (100nM) sui parametri LVP, $+(LVdP/dt)_{max}$, $-(LVdP/dt)_{max}$, CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova (§ < 0.05).



Fi. 25: Analisi immunoblots di ERK1/2 (A) e eNOS (B) totale e fosforilata in cuori di controllo e in cuori trattati con G1 (1 nM) da solo e in presenza di PD (100 nM). Controllo n=3; G1 n=4; G1+PD n=4. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

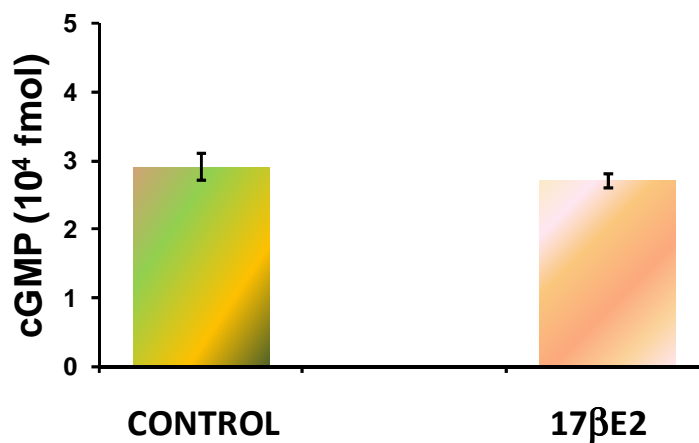


Fig. 26: Variazioni delle concentrazioni intracellulari di cGMP in cuori trattati con 17βE2 (1 nM) rispetto al controllo. I risultati sono espressi come concentrazioni molarie ± errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

3. Modulazione lusitropica β 3-adrenergica

3.1 *Espressione cardiaca del recettore β 3-adrenergico*

Analisi di RT-PCR qualitativa sono state effettuate su omogenati di cuore di ratto maschio per valutare l'espressione basale del recettore β 3-adrenergico. Dagli studi effettuati, è emersa un'espressione genomica basale di questo sottotipo recettoriale adrenergico in cuori di ratto (Fig. 26 (a), linea 1). Come controllo positivo è stato usato il tessuto adiposo (Fig. 26 (a), linea 2), il quale è noto esprimere i β 3-AR (Granneman et al., 1991, Evans et al., 1996) mentre come controllo negativo è stato usato il tessuto testicolare di ratto (Fig. 26 (a), linea 3). Per escludere la contaminazione da adipociti della preparazione cardiaca, è stata eseguita una RT-PCR qualitativa dell'espressione dell'adiponectina, come specifico marker del tessuto adiposo (Milan et al., 2002). L'intensità veramente bassa dell'adiponectina esclude la possibilità di una contaminazione da tessuto adiposo (Fig. 26 (b), linea 4).

3.2 *Stimolazione basale del recettore β 3-adrenergico*

Curve cumulative dose-risposta (1pM÷1 μ M) di un agonista specifico del recettore β 3 adrenergico, il BRL37344, sono state generate esponendo il preparato, in condizioni non stimulate, a concentrazioni crescenti dell'agonista per 10 minuti. L'esposizione a ripetute somministrazioni di una singola concentrazione dell'agonista (10 nM) rileva l'assenza di desensitizzazione (dati non mostrati) Per valutare la stabilità del preparato, parametri inotropi, lusitropici, cronotropi e coronarici sono stati monitorati ogni 10 minuti rivelando una stabilità superiore ai 180 minuti. L'analisi degli effetti cardiaci riporta un'azione lusitropica negativa, evidenziabile

da una significativa riduzione della $-(LVdP/dt)_{max}$ e della HTR associata ad un incremento del rapporto T/-T (Fig. 27).

3.3. Coinvolgimento dei recettori adrenergici β_1/β_2 e delle proteine Gi/o di membrana

Per investigare la possibile interazione tra i classici recettori adrenergici cardiaci, β_1/β_2 e il recettore β_3 , i cuori sono stati perfusi con BRL37344 (10 nM) in presenza di un antagonista aspecifico β_1/β_2 , il nadololo (100 nM) (K_d del nadololo nei confronti di β_1/β_2 ARs= 10-40 nM) (Blin et al., 1993) o in presenza di specifici β_3 -antagonisti, lo SR59230 (100 nM) o il L748337 (100 nM) (Neidhold et al., 2007). I risultati mostrano che il lusitropismo negativo indotto dal BRL37344 non risulta essere influenzato dall'antagonista β_1/β_2 aspecifico mentre è significativamente bloccato da entrambi gli antagonisti β_3 -specifici (Fig. 28). Inoltre, per escludere l'attivazione aspecifica dei recettori α -adrenergici indotta dal BRL, i cuori sono stati perfusi con BRL (10 nM) in presenza di singola concentrazione di fentolamina (1 μ M), antagonista aspecifico dei recettori α -adrenergici. Il trattamento non modifica il lusitropismo negativo escludendo quindi il coinvolgimento di questo sottotipo recettoriale (Fig. 28).

Per verificare il coinvolgimento delle proteine Gi/o di membrana nel meccanismo d'azione dello BRL, i preparati cardiaci sono stati perfusi con PTx (0,01 nM) in presenza di BRL (10 nM). L'incubazione con PTx abolisce l'effetto dell'agonista sulla $-(LVdP/dt)_{max}$ e su T/-T (Fig. 28).

3.3. Attività antiadrenergica del BRL

Per analizzare la modulazione β_3 -mediata del lusitropismo positivo indotto da Iso, i cuori sono stati perfusi con Iso da solo e in presenza

di BRL. I risultati dimostrano che l'attivazione dei recettori β_3 adrenergici contrasta il lusitropismo positivo indotto dall'Iso (Fig. 29).

Per stabilire se i β_3 ARs possano controbilanciare gli effetti Iso-dipendenti, come accade per la controregolazione parasimpatica (per es. muscarinica) dell'attività adrenergica, i cuori sono stati trattati con carbacolo (10 nM), un antagonista colinergico non selettivo e resistente alle acetilcolinesterasi, in presenza di una singola concentrazione di ISO (5 nM). Il trattamento con carbacolo significativamente riduce l'effetto lusitropico positivo Iso-dipendente (Fig. 29).

3.4. Coinvolgimento della via NO-cGMP-PKG

Il coinvolgimento del pathway trasduzionale NO-cGMP-PKG nel cardiotropismo mediato dal BRL è stato esaminato perfondendo il cuore con L-NMMA (10 μ M), un antagonista aspecifico delle NOS, Hb (10 μ M), uno scavenger dello NO, e ODQ (10 μ M), un antagonista della sGC. Tutti questi trattamenti hanno abolito l'effetto del BRL dimostrando la sua dipendenza dal meccanismo NO-cGMP. Al contrario, nessun cambiamento si è verificato in seguito a trattamento con un inibitore specifico della guanilato ciclasi particolata (pGC), l'anantina (10 nM). Il pre-trattamento con un antagonista specifico della PKG, il KT5823 (100 nM), ha abolito l'effetto lusitropico β_3 -indotto. Questi dati chiaramente indicano che la PKG risulta essere coinvolta nella risposta β_3 -mediata (Fig. 30).

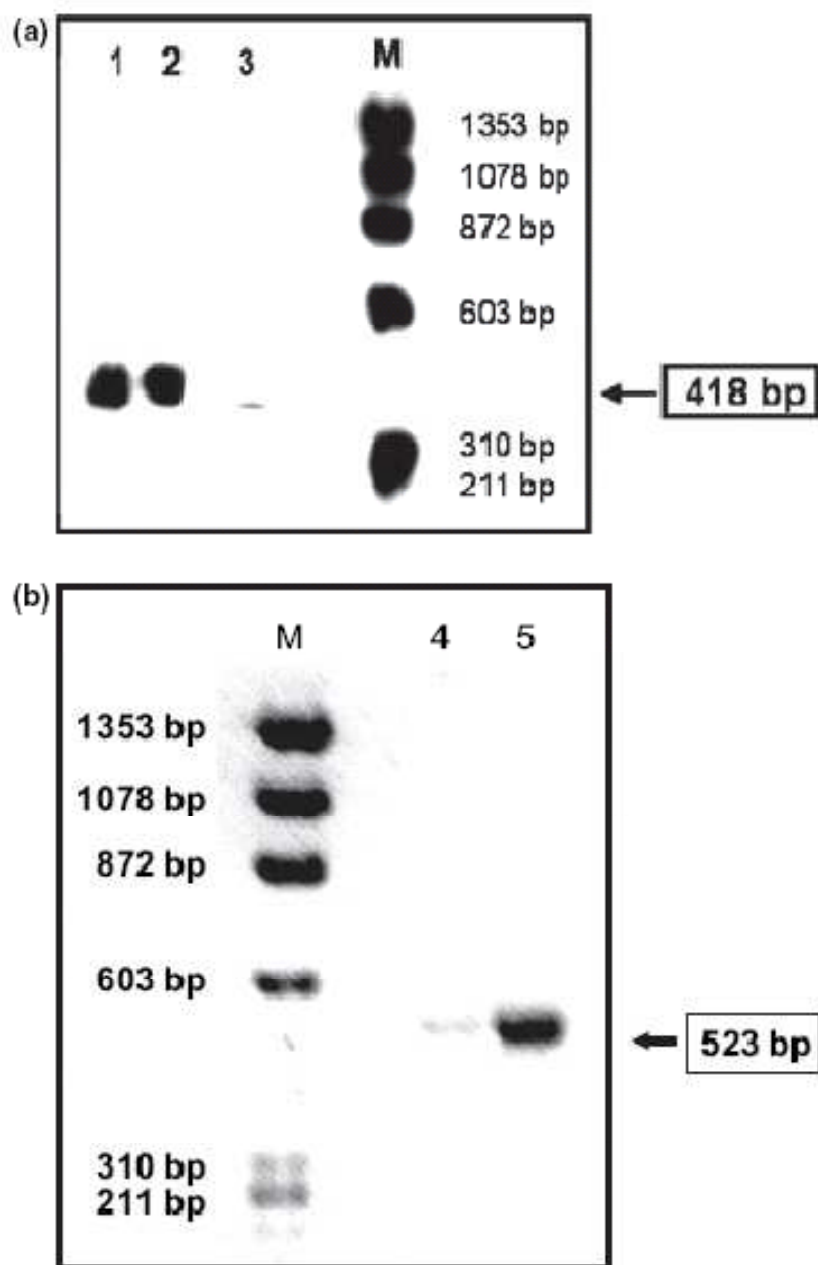


Fig. 26: (a) Espressione dello mRNA mediante RT-PCR dei recettori β_3 adrenergici in estratti di cuore di ratto (linea 1), di tessuto adiposo (linea 2) e tessuto testicolare (linea 3). (b) espressione dello mRNA mediante analisi RT-PCR della adiponectina in estratti di cuore di ratto (linea 4) e tessuto adiposo (linea 5). M= peso molecolare del marker.

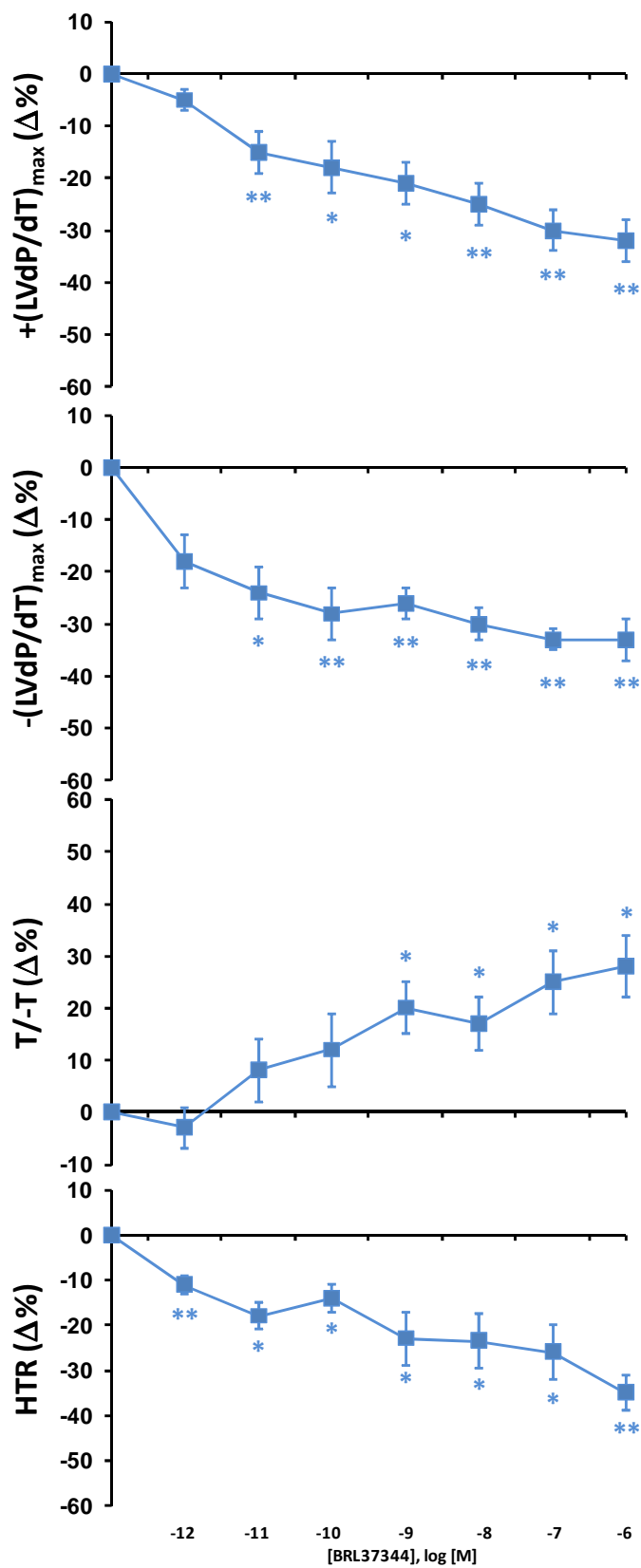


Fig. 27: Curve dose-risposta del BRL ($1\text{pM}\pm 1\mu\text{M}$) riferite ai parametri $+(LVdP/dt)_{\text{max}}$, $-(LVdP/dt)_{\text{max}}$, T/-T e HTR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

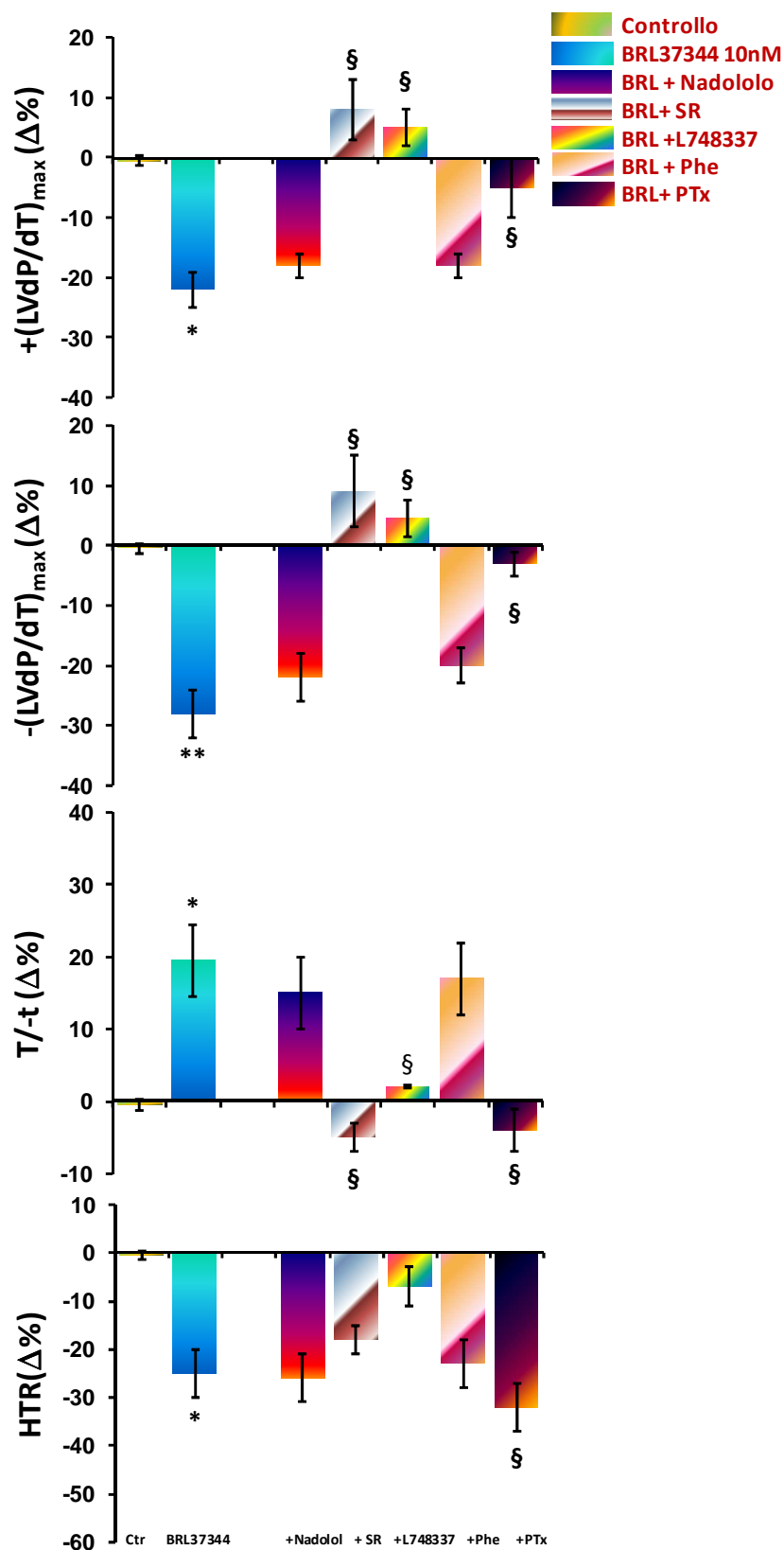


Fig. 28: Effetto del BRL (10nM) prima e dopo trattamento con nadololo (100nM), SR59230 (100nM), L748337 (100nM), fentolamina (1 μ M), PTx (0,01nM) sui parametri $+(LVdP/dt)_{max}$, $-(LVdP/dt)_{max}$, T/-t e HTR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative (one-way ANOVA), rispetto al controllo, di BRL37344 solo vs. KHs sono: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra gruppi: §<0.05.

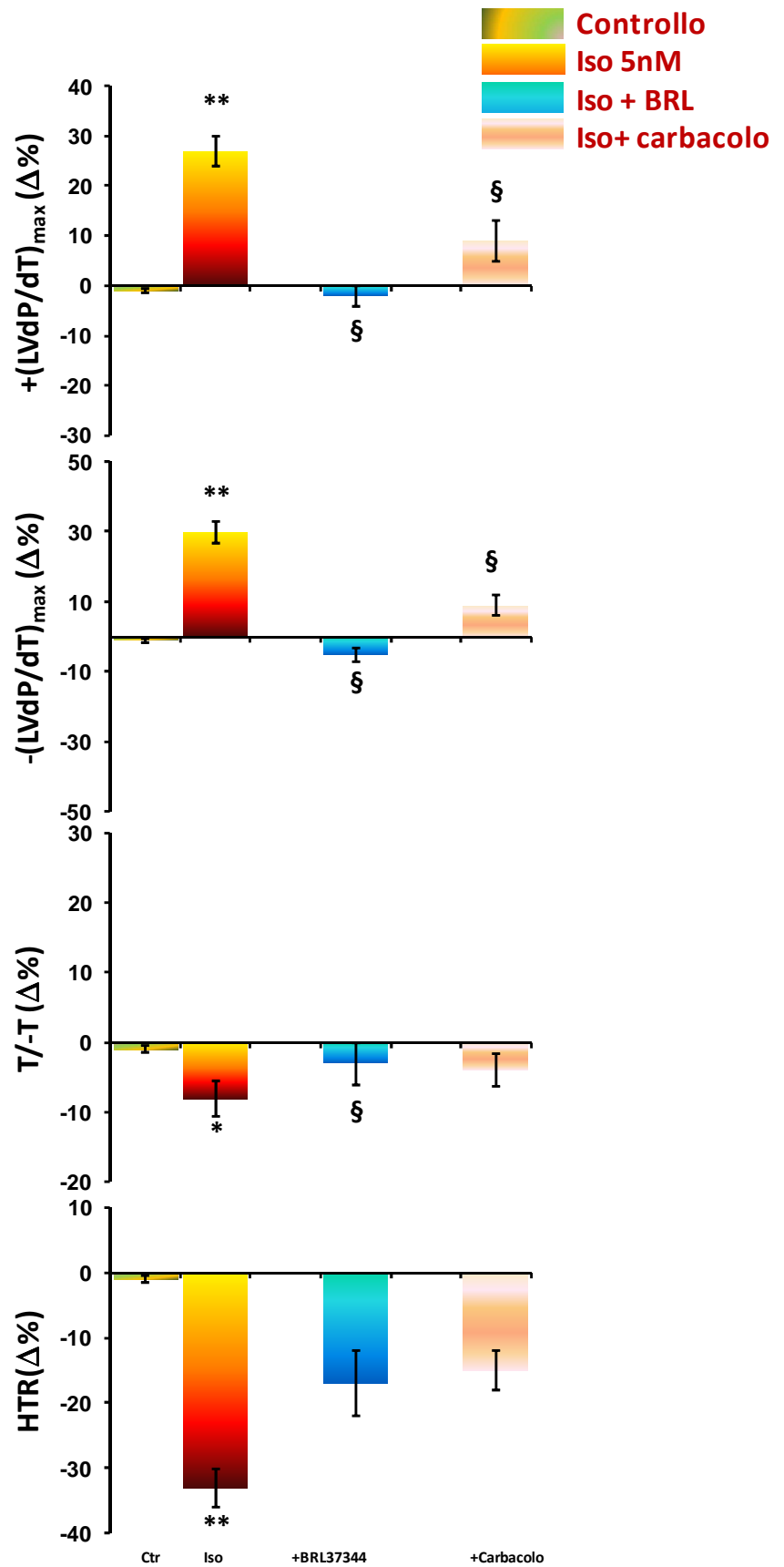


Fig. 29: Effetto dell'Iso (5nM) prima e dopo trattamento con BRL (10 nM) o carbacolo (10nM) sui parametri $+(LVdP/dt)_{max}$, $-(LVdP/dt)_{max}$, T/-T e HTR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative (one-way ANOVA), rispetto al controllo, di Iso solo vs. KHS sono: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Il confronto fra gruppi: § < 0.05 .

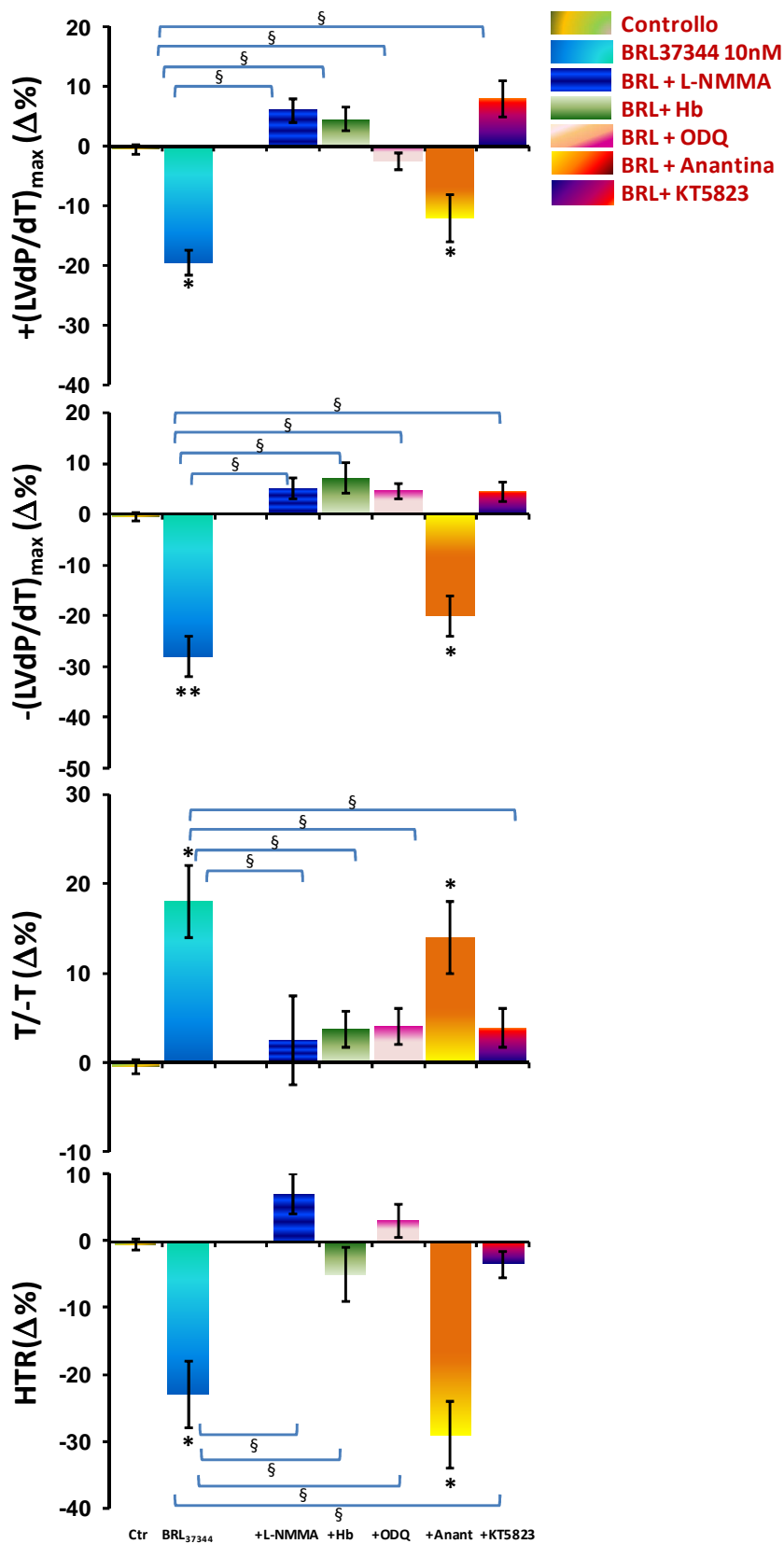


Fig. 30: Effetto del BRL (10nM) prima e dopo trattamento con L-NMMA (10 μ M), Hb (10 μ M), ODQ (10 μ M), Anantina (10 nM), KT5823 (100nM) sui parametri $+(LVdP/dt)_{max}$, $-(LVdP/dt)_{max}$, T/-T e HTR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative (one-way ANOVA), rispetto al controllo, di BRL37344 solo vs. KHS sono: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Il confronto fra gruppi: § < 0.05 .

Discussione

Il presente lavoro di tesi ha illustrato aspetti centrali circa la regolazione umorale della funzionalità cardiaca nella prospettiva di contribuire a definire ciò che oggi appare la nuova frontiera nello studio di un organo, il cuore, considerato non più solo bersaglio di molti mediatori nervosi e umorali, ma attivo organo secretore, capace esso stesso di sintetizzare e rilasciare molecole con funzioni endocrine/paracrine e autocrine. Ciò naturalmente riveste particolare importanza ai fini non solo del fondamentale arricchimento delle conoscenze di base, ma anche in una stimolante prospettiva applicativa in campo diagnostico e/o terapeutico.

I dati ottenuti hanno dimostrato che il frammento rCga1-64, appartenente alla famiglia dei peptidi derivati dalla Cga, precursore proteico sintetizzato, immagazzinato e secreto a livello cardiaco, e il 17 β E2, un fattore endocrino puro, esercitano sul cuore di ratto maschio isolato e perfuso secondo la tecnica Langendorff, un interessante effetto cardiainibitore.

E' emerso che la rCga1-64 induce effetti inotropi e lusitropici negativi associati a vasodilatazione coronarica. E' in grado di antagonizzare in maniera non competitiva la stimolazione da isoproterenolo e la vasocostrizione indotta dal trattamento con ET1.

Al contempo, i dati hanno mostrato che il 17 β E2, attraverso un meccanismo non genomico rapido esercita effetti inotropi e lusitropici negativi mediati dall'attivazione sia dei classici recettori estrogenici, ER α e ER β , sia del nuovo recettore estrogenico di membrana associato a proteine G, il GPR30.

E' da sottolineare che, sia la rCga1-64 che il 17 β E2 sono in grado di contrastare la stimolazione adrenergica (Cerra et al., 2008; Li et al.,

2000). Potenziali candidati nel mediare questo effetto inibitorio potrebbero essere i recettori adrenergici β_3 cardiaci, capaci di modulare negativamente l'inotropismo sia in condizioni fisiologiche che patologiche. A supporto di questa ipotesi è stato analizzato il tono inibitorio β_3 -adrenergico nel cuore di ratto. I risultati hanno dimostrato che l'attivazione del sistema β_3 cardiaco induce un effetto lusitropico negativo che coinvolge il sistema NO-cGMP.

Al centro dei meccanismi trasduzionali responsabili del controllo inibitorio esercitato sia dalla rCga1-64 che dal $17\beta E_2$, un ruolo di primo piano è svolto dall'attivazione del sistema NOS/NO il quale quindi, sempre più si caratterizza come crocevia per importanti pathways modulatori cardiaci neuroendocrini intrinseci ed estrinseci.

Il quadro che emerge dall'analisi complessiva dei dati ottenuti lascia ipotizzare l'esistenza di un cross-talk funzionale tra la rCga1-64/ $17\beta E_2$ e il sistema β_3AR -eNOS che molto plausibilmente si localizza a livello dei microdomini caveolari di membrana, in quanto essi rappresentano strutture specializzate dove sono co-localizzati importanti effettori del segnale tra cui i β_3ARs , ERs, GPR30, eNOS e dove convergono molti segnali intracellulari atti a modulare la produzione di NO.

1. Modulazione autocrina/paracrina cardiaca mediata dalla rCga1-64

1.1 La rCga1-64 è un inibitore cardioattivo

Nel presente studio, recentemente pubblicato su FASEB, [2008; 22(11):3992-4004], è emerso che la rCga1-64 omologa agisce, sul cuore di ratto isolato e perfuso secondo Langendorff, come

modulatore della performance, inducendo un inotropismo e un lusitropismo negativo associato a vasodilatazione coronarica.

La necessità di un'analisi funzionale di questo frammento è nata da uno studio della sequenza della Cga di ratto, condotto da Metz-Boutigue e collaboratori nel 1993, nel quale è stata dimostrata l'esistenza di un sito dibasico in posizione 64-65 probabile sito di clivaggio dal quale si genererebbe un peptide corrispondente alla VS-1 umana (Cga1-76), della quale è conosciuta l'importante azione cardiomodulatrice (Cerra et al., 2006) e cardioprotettiva (Cappello et al., 2007). L'identificazione di frammenti Cga-derivati in estratti cardiaci di ratto, contenenti il frammento 1-64, ha indicato che il cuore è sito di produzione di questi frammenti che svolgerebbero un ruolo autocrino/paracrino (Glattard et al., 2006).

In condizioni basali, la rCga1-64_{S-S} significativamente riduce la LVP, la RPP e la $+(LVdp/dt)_{max}$, indici dell'inotropismo, e la $-(LVdp/dt)_{max}$ e T/-T, indici del lusitropismo, senza modificare la HR. Questi effetti sono rilevabili alle stesse concentrazioni alle quali il suo precursore, la Cga, è presente nel siero umano (livelli normali: 0,5-4 nM; tumori neuroendocrini e scompenso cardiaco cronico: >10nM) (Helle et al., 2007). Il fatto che gli effetti inotropi e luistropici siano simili a quelli indotti dalla hrVS-1 nel cuore di ratto (Cerra et al., 2006) evidenzia le proprietà inotrope negative associate al dominio vasostatina.

Unitamente alla valutazione della contrattilità si è voluta investigare l'attività della rCga1-64 sul lusitropismo cardiaco, cioè sul rilassamento del miocardio. Infatti, negli ultimi anni è stato rivalutato il fondamentale contributo del rilassamento diastolico nel corretto funzionamento del cuore come pompa. Alterazioni della fase diastolica possono precedere disfunzioni nella contrattilità e portare perfino allo scompenso cardiaco (Lorell, 1991). Il rilassamento

cardiaco è un processo attivo con cui il cuore ritorna allo stato precontrattile (Vittone et al., 1994). Le sostanze che inducono un effetto lusitropico positivo aumentano la velocità di rilassamento del miocardio e conseguentemente migliorano il riempimento del ventricolo sinistro, mentre le sostanze che modulano negativamente il lusitropismo provocano un ritardo del rilassamento diastolico ed un ridotto volume di riempimento (Vittone et al., 1994). La valutazione della riduzione indotta dal peptide rCga1-64_{S-S}, della $-(LVdP/dt)_{max}$ e di HTR, entrambi parametri indicativi della performance lusitropica, ha permesso di includere tale frammento tra le sostanze capaci di modulare negativamente il lusitropismo. Questi dati sono in accordo con quanto riportato da Pieroni e collaboratori (2007) i quali hanno dimostrato che, nel cuore di ratto, la somministrazione della sequenza umana della VS-1 induce un effetto lusitropico negativo.

L'effetto vasodilatatore ottenuto in presenza della rCga1-64 significativo a 33 nM suggerisce che il peptide è attivo nel modulare anche l'attività coronarica. Questa reattività coronarica concorda con la vasodilatazione VS-indotta riportata nell'arteria toracica umana, nella vena safena e nelle arterie coronariche bovine in maniera endotelio-indipendente (Brekke et al., 2002; Aardal et al., 1993) ma è in contrasto con l'assenza di reattività coronarica riportata per la hrVS-1 nel cuore di ratto (Cerra et al., 2006). Tale divergenza potrebbe essere dovuta alla presenza della coda Cga67-78 che potrebbe ostacolare l'azione sull'endotelio vasale, alla base dell'effetto vasodilatatore. Tuttavia, anche una sensibilità vascolare specie-specifica del peptide VS omologo rispetto all'eterologo può rendere conto delle differenze osservate riguardo alla reattività coronarica.

Inoltre, curve dose-risposte ottenute perfondendo i cuori con concentrazioni crescenti (11÷165 nM) di due forme modificate della rCga1-64, la rCga1-64_{SH} e la sua forma ossidata sulle metionine (rCga1-64_{OX}), hanno permesso di ottenere informazioni circa il rapporto struttura funzione. I due peptidi modificati non variano significativamente la performance cardiaca confermando l'importanza dell'integrità del ponte disolfuro e della struttura terziaria nell'azione cardiotropica del peptide. Questo è in accordo con quanto osservato da Tota e collaboratori (2003). Infatti, utilizzando come bioassay un preparato *in vitro* di cuore isolato e perfuso di rana (*Rana esculenta*), essi hanno esaminato differenti frammenti di VS-1 bovina e di rana, quali il bCga1-40_{S-S}, bCga7-57, bCga4-16, fCga47-66, bCga47-66 e hanno dimostrato come l'inotropismo sia correlato alle differenze strutturali delle sequenze della VS-1 e che questo effetto è dipendente dalla presenza del ponte disolfuro. Ciò ha enfatizzato l'importanza della conservazione filogenetica della sequenza della VS-1 ed ha comprovato che i frammenti Cga7-57 e Cga1-40 con il ponte disolfuro intatto appaiono più potenti nell'esercitare l'effetto inotropo negativo.

1.2 Influenze antiadrenergiche e modulazione dell'effetto endotelina-mediato

Il fatto che le catecolamine vengano co-secrete con le Cromogranine, in particolare con la Cga ed i suoi peptidi, e che questi ultimi antagonizzino a livello cardiaco gli effetti delle prime, ha indotto a studiare il possibile ruolo modulatore della rCga1-64 sulla stimolazione adrenergica. L'effetto della rCga1-64_{S-S} e delle forme modificate, rCga1-64_{SH} e rCga1-64_{OX}, è stato analizzato conducendo esperimenti di competizione. Le curve di competizione ottenute

hanno dimostrato che essi esercitano verso la stimolazione adrenergica un antagonismo non competitivo. La rCga1-64_{s-s} appare più potente rispetto ai due frammenti modificati confermando quanto già ipotizzato circa l'importanza dell'integrità del ponte disolfuro e della struttura terziaria nell'esplicare anche l'azione antiadrenergica. Inoltre, questi risultati suggeriscono che il meccanismo alla base dell'effetto antiadrenergico della rCga1-64 sia indipendente da quello che sottende l'inotropismo basale poichè i frammenti modificati conservano un effetto contro la stimolazione Iso-dipendente pur non modificando in maniera significativa l'inotropismo basale.

Questi dati sono in accordo con i risultati riportati da Cerra e collaboratori (2006) dai quali è emerso che hrVS-1 esercita un antagonismo non competitivo di tipo funzionale verso la stimolazione adrenergica evidenziando l'importanza biologica della porzione N-terminale della Cga sul cuore di mammifero. Il confronto tra rCga1-64_{s-s} e la hrVS-1 rivela simili effetti inotropi negativi e antiadrenergici [EC50 per la rCga1-64_{s-s} (65 nM) -7.8 ± 1.15 e per la hrVS-1 (65 nM) -7.8 ± 0.78]. Le concentrazioni intracellulari cardiache di cGMP e cAMP indicano che la rCga1-64_{s-s}, in condizioni basali, incrementa i livelli di cGMP mentre riduce, in accordo con la sua azione anti- β -adrenergica, l'incremento dei livelli di cAMP indotti dal trattamento con Iso.

Inoltre, nel presente studio, testando l'attività cardiotropica del frammento sintetico rCga65-76 (dati non mostrati), è emerso che esso non modifica l'inotropismo basale e adrenergico, confermando che il frammento rCga1-64_{s-s} è sufficiente per mediare l'effetto cardiotropo della VS-1. La potenziale funzione biologica del frammento rCga65-76 rimane da stabilire.

Una questione aperta riguarda il possibile meccanismo responsabile dell'inibizione rCga1-64-indotta dell'inotropismo positivo mediato dall'Iso. Come evidenziato per gli altri peptidi contenenti la sequenza VS (Helle et al., 2007), al momento poco si conosce circa i meccanismi che sottendono l'effetto cardiaco della rCga1-64 sui diversi targets intracellulari (endotelio endocardico e coronarico, muscolo liscio, cardiomiociti, terminazioni nervose intracardiache, fibroblasti e altro). Non è noto se possa avvenire attraverso la classica interazione recettore-ligando o, alternativamente, attraverso l'interazione idrofobica tra specifici domini del peptide, quali quelli Cga1-40 e Cga47-66, e regioni spazialmente localizzate del bilayer fosfolipidico con conseguente modulazione degli effettori cellulari (Lugardon et al., 2000). In linea con questa ipotesi, un ulteriore possibile meccanismo alla base dell'inibizione dell'effetto inotropo positivo indotto dall'Iso, potrebbe essere suggerito o da una modulazione allosterica del recettore β -adrenergico, indipendentemente dal sito di legame del ligando, o da una modulazione dei targets intracellulari attivati dallo stesso recettore adrenergico. Inoltre, la riduzione del cAMP osservata potrebbe risultare da una diretta attivazione, in condizioni basali, delle proteine Gi/o sensibili alla PTx in maniera recettore-indipendente, e non associata ad una diretta, e non competitiva azione attraverso i recettori adrenergici e per l'ET1.

Un'importante caratteristica del profilo cardioattivo della rCga1-64_{s-s} è la sua abilità di controregolare l'inotropismo positivo e la vasocostrizione indotta dall'ET1. L'ET1 esercita diverse azioni cardiovascolari, inclusi effetti autocrino/paracrini sulla contrattilità miocardica e un potente effetto vasocostrittore, importante anche nella fisiopatologia di cuori stressati e ischemici (Brunner et al., 2006). In particolare, la vasodilatazione che la rCga1-64_{s-s} induce su

arterie precontratte con ET1, dimostrando, per la prima volta su un letto coronarico intatto, la vasoreattività responsabile del nome stesso di questi peptidi (vasostatine) (Helle et al., 2007), potrebbe rappresentare un altro potenziale effetto benefico attribuibile a questo peptide Cga-derivato. Pertanto, oltre all'effetto antiadrenergico, l'attività anti-ET1 della rCga1-64, fortemente supporta il suo ruolo come controregolatore cardiaco nello "zero steady state error homeostasis" già ipotizzato per gli altri peptidi Cga-derivati (Koeslag et al., 1997). Questa nuova funzione della rCga1-64 come cardiostatina potrebbe essere di notevole rilevanza nella difesa naturale contro l'iperattività cardiaca, come accade nel "neuroendocrine storm" responsabile della cardiomiopatia neuroendocrina e di necrosi miocardica (Tota et al., 2003).

1.3 Trasduzione del segnale rCga1-64_{s-s} mediata

Studi preliminari sul meccanismo d'azione della rCga1-64 evidenziano un coinvolgimento del pathway trasduzionale proteine Gi/o-PI3K-NO. Infatti, nel cuore isolato di ratto, l'effetto inotropo negativo mediato dalla rCga1-64_{s-s} coinvolge il pathway NO-cGMP-PKG. Il coinvolgimento dello NO risulta confermare quanto osservato per la hrVS-1 sia in cuori isolati e perfusi (Cappello et al., 2007) che in cardiomiociti (Gallo et al., 2007). Il segnale NOS-NO-cGMP-PKG intracardiaco è coinvolto nel controllo della performance contrattile del cuore. Per esempio, in miociti ventricolari di ratto, lo NO prodotto attraverso il sistema sCG-PKG induce un decremento delle correnti al Ca²⁺ di tipo L (Abi-Gerges et al., 2001) e la fosforilazione della troponina I, così da modulare negativamente la contrattilità miocardica (Hove-Madsen et al., 1996). In effetti, in studi di preconditionamento ischemico su cuori di ratto isolati secondo la metodica Langendorff, Cappello e collaboratori (2007) hanno

proposto che sia le correnti di tipo L sia la desensitizzazione dei miofilamenti mediata dalla PKG può rendere conto dell'inotropismo negativo e della cardioprotezione ischemica. Inoltre, anche la vasodilatazione coronarica indotta dalla rCga1-64_{S-S} risulta dipendente dall'attivazione del sistema NO-cGMP-PKG il che probabilmente può essere spiegato alla luce del possibile rilascio di NO da parte dell'endotelio (Shah, 1996).

2. Modulazione cardiaca mediata da un fattore endocrino puro: il 17 β -E2

La modulazione estrogenica dell'attività cardiaca di mammifero è stata estensivamente studiata sia dal punto di vista sperimentale che clinico ottenendo spesso dati conflittuali, relazionati alle condizioni e ai modelli sperimentali, allo stato ormonale e al sesso (Ling et al., 2006; Mendelsohn & Karas, 1999). Nelle donne gli estrogeni possono influenzare l'attività cardiaca agendo sia direttamente sul cuore sia indirettamente sulla performance vascolare (Leung et al., 2007). Al contrario, la diretta influenza degli estrogeni sul cuore di maschio ha da sempre ricevuto poca considerazione in virtù del loro ipotizzabile minor ruolo nella fisiologia cardiaca (Barret-Connor & Bush, 1991; Kanel et al., 1976). Per lungo tempo, nell'uomo, gli estrogeni sono stati considerati semplici prodotti della sintesi del testosterone. Solo in seguito si è compresa la loro importante funzione nell'omeostasi ossea, nella fisiologia cardiovascolare e nell'interazione ghiandola pituitaria-gonadi (Nilsson & Gustafsson, 2002; McEwen & Alves, 1999; Katzenellenbogen et al., 2000).

Il 17 β -E2 è il più importante estrogeno prodotto nell'uomo. È sintetizzato dal testosterone o dall'estrone per azione dell'enzima aromatasi o del 17 β -idrossisteroidodeidrogenasi (17 β -HSD), rispettivamente. La quantità di estradiolo prodotto nell'uomo è stata

stimata essere 35–45 μg (0,130– 0,165 μmol) pro die, dei quali il 15–20% è direttamente prodotto dai testicoli (MacDonald et al., 1979). Circa il 60% del $17\beta\text{-E}_2$ circolante deriva dall'aromatizzazione periferica o dal testosterone circolante mentre il 20% è prodotto dalla conversione periferica dell'estrone (Baird et al., 1969a). Di quello circolante, solo il 2–3% è libero, il restante è legato all'albumina o alle globuline leganti gli ormoni sessuali (SHBG) (Dunn et al., 1981). Solo la porzione libera è quella bioattiva. Da studi è emerso che le concentrazioni sieriche di estradiolo variano da 110 ± 54 pmol/l (mean \pm SD; Longcope et al., 1990). Queste concentrazioni sono comparabili a quelle nella donna nella prima fase follicolare del ciclo mestruale.

Nel presente lavoro di tesi è emerso che il $17\beta\text{-E}_2$ esercita un effetto cardiotropo nel cuore di ratto maschio isolato e perfuso secondo la metodica Langendorff. Tale effetto, che coinvolge tanto i classici ERs che il nuovo recettore estrogenico di membrana, GPR30, si traduce in un'azione inotropa e lusitropica negativa associata ad un effetto cronotropo positivo e a vasocostrizione.

2.1 Il $17\beta\text{-E}_2$ è un ormone con attività cardiotropica

I risultati ottenuti dimostrano che in condizioni basali il $17\beta\text{-E}_2$ media un effetto rapido non genomico associato ad una riduzione dose-dipendente significativa della LVP, della $+(LVdP/dT)_{\text{max}}$ e della RPP così da esercitare un effetto inotropo negativo che, pur associato a un incremento della HR, persiste in condizioni di elettrostimolazione (dati non mostrati), confermando che esso non è secondario a variazioni della frequenza cardiaca. Inoltre, il $17\beta\text{-E}_2$ esercita un effetto lusitropico negativo e vasocostrizione coronarica. L'inotropismo negativo $17\beta\text{-E}_2$ -mediato è in linea con precedenti dati ottenuti su cuori isolati di coniglio (Raddino et al., 1986) e su

cardiomiociti isolati di porcellino d'India nei quali l'effetto inotropo negativo è associato all'inibizione delle correnti al calcio di tipo L, coinvolte nella prima fase dell'accoppiamento eccitazione-contrazione (Jiang et al., 1992a). Lo stesso effetto è stato evidenziato anche in preparazioni di cuore umano, in muscoli papillari ventricolari e nelle trabecole atriali isolate, dove l'effetto sembra essere associato a proprietà calcio antagoniste (Sitzler et al., 1996). Nel presente lavoro di tesi, per la prima volta, è stata studiata l'attività lusitropica del 17β -E2. La riduzione della $-(LVdP/dt)_{max}$ indotta dall'ormone, indice di una diminuita velocità di rilassamento, permette di includere il 17β -E2 nelle sostanze capaci di modulare negativamente il lusitropismo.

Inoltre, l'effetto vasocostrittore 17β -E2-mediato osservato è in accordo con studi effettuati su ratti maschi nei quali è emerso che il 17β -E2 attenua il rilassamento endotelio-dipendente indotto dal carbacolo o dall'istamina (Huang et al., 2000) così come riduce il rilascio aortico di prostaciline (Huang et al., 2000). Questi risultati sono in disaccordo con l'effetto vasodilatatore 17β E2-mediato osservato nella femmina (Leung et al., 2007), suggerendo una specificità genere-dipendente.

2.2 Modulazione cardiaca da stimolazione basale di GPR30

Nel presente studio, analisi di RT-PCR qualitativa e Western Blotting hanno permesso di valutare l'effettivo assetto recettoriale estrogenico in ventricoli di cuore di ratti maschi così da correlare l'effetto 17β E2 mediato con la presenza di $ER\alpha$ e $ER\beta$, e di GPR30.

Alla luce di ciò, è stato valutato l'effetto cardiomodulatore non genomico associato ad attivazione selettiva di GPR30. La disponibilità di un agonista selettivo per GPR30, G1, ha permesso di

differenziare le funzioni di GPR30 rispetto a quelle mediate da ER α e ER β nella modulazione del segnale estrogenico (Bologa et al., 2006). L'agonista selettivo di GPR30, G1, induce una significativa riduzione della contrattilità che pur associata a un incremento della HR, persiste in condizioni di elettrostimolazione (dati non mostrati), confermando che essa non è secondaria a variazioni della frequenza cardiaca. Inoltre l'attivazione di GPR30 media un effetto lusitropico positivo associato a vasocostrizione.

In letteratura nulla è riportato circa l'effetto mediato dal GPR30 a livello cardiaco. L'effetto inotropo negativo mediato da attivazione di GPR30 conferma quanto osservato con il 17 β E2 e dimostra il coinvolgimento di questo nuovo recettore di membrana nell'effetto cardiotropo dell'ormone. Inoltre, dal confronto tra le curve dose-risposta del 17 β E2 e di G1, si può ipotizzare che la risposta cardioinibitoria estrogenica possa iniziare a livello caveolare, coinvolgendo inizialmente il GPR30, il quale fungerebbe da "attivatore" del segnale a cui fa seguito l'attivazione dei classici ERs responsabili anch'essi del tono inibitorio osservato. Questo lascia ipotizzare una coordinazione spazio-temporale dei tre recettori attraverso un cross-talk responsabile della loro trans attivazione e dell'effetto estrogenico cardiaco.

Diversamente da quanto osservato per il 17 β E2, l'attivazione di GPR30 media un effetto lusitropico positivo il che potrebbe far ipotizzare un ruolo regolatore del GPR30 del tono estrogenico lusitropico. L'attivazione di GPR30 determina un incremento delle concentrazioni di cAMP come osservato da Filardo e collaboratori (2002) il che potrebbe rendere conto dell'effetto lusitropico positivo osservato. Infatti, il cAMP prodotto potrebbe indurre attivazione della PKA, la quale fosforilando la TnI e il PLB favorirebbe la ricaptazione del calcio che pone termine alla contrazione (Zhang et

al., 1995; Verboomen et al., 1992). Poiché la fase di riempimento cardiaco dipende dalla velocità di recupero diastolico, un rilassamento rapido e completo, quale quello mediato da GPR30, garantisce un miglior riempimento ventricolare (Vittone et al., 1994).

2.3 Coinvolgimento di ER α e ER β nell'effetto cardiotropo del 17 β -E2

Nel presente lavoro è stato dimostrato che l'effetto cardiotropo mediato dal 17 β -E2 coinvolge i ERs e parzialmente, anche proteine Gi/o di membrana. Infatti, il DPN (Sun et al., 1999; Stauffer et al., 2000) e il PPT (Meyers et al., 2001) rispettivamente agonisti selettivi di ER α di ER β , modificano tutti i parametri cardiaci mostrando una tendenza a mimare gli effetti del 17 β -E2. Inoltre, il pretrattamento con un antagonista aspecifico degli ERs, ICI, blocca gli effetti mediati dall'ormone confermando il loro coinvolgimento nel meccanismo di trasduzione del segnale attivato. Al contempo, in cuori di ratto pretrattati con PTx e in cui si è indotta desensitizzazione di GPR30, la risposta al 17 β -E2 è attenuata.

I dati dimostrano che l'effetto del 17 β E2 coinvolge ambedue i classici recettori ER α e ER β , poiché la loro selettiva e indipendente stimolazione induce un effetto cardioinibitore del tutto sovrapponibile a quello osservato in seguito a stimolazione con l'ormone. Ciò lascia ipotizzare un coinvolgimento delle due isoforme nella modulazione del segnale estrogenico. In letteratura è ben documentata l'azione cardiotropica dei due agonisti. In cuori di coniglio femmina, la somministrazione in bolo di PPT, un agonista di ER α , produce un effetto cardioprotettivo riducendo significativamente l'area d'infarto, al contrario di quanto accade somministrando DPN (Booth et al., 2005). Inoltre, in cuori di ratto

femmina, è stato evidenziato che la cardioprotezione abolita dalla ovariectomia può essere revertita dalla somministrazione per due settimane dell'agonista di ER β , DPN (Nikolic et al., 2007).

Sfortunatamente, la mancata disponibilità di un antagonista specifico per le due isoforme, ER α e ER β , e per GPR30 non permette di discriminare lo specifico ruolo attribuibile ad ogni sottotipo recettoriale vista l'attività promiscua del 17 β -E2 sia su ERs che su GPR30 (Thomas et al., 2005).

In questo studio, un antagonista aspecifico degli ERs, ICI, blocca gli effetti mediati dal 17 β -E2 dimostrando il coinvolgimento di ER α e ER β nel meccanismo trasduzionale attivato dal 17 β E2. Ciò è in linea con precedenti lavori sul sistema cardiovascolare in cui, il trattamento con ICI ha abolito completamente l'effetto del 17 β E2 dimostrando che l'effetto estrogenico è recettore-dipendente (Yu et al., 2007).

Inoltre, nel presente lavoro, è stato osservato che l'effetto cardioinibitorio indotto dal 17 β E2 è in parte modulato da attivazione delle proteine G di membrana. Infatti, il trattamento con la PTx attenua l'effetto inotropo e lusitropico dell'ormone mentre blocca l'effetto vasocostrittore. Questo indica che, a livello coronarico, l'effetto estrogenico è modulato da proteine G di membrana in accordo con quanto osservato in precedenza in cellule endoteliali, in cui l'accoppiamento di ER α a proteine Gi/o ha rappresentato l'evento fondamentale per innescare la trasduzione del segnale non genomico (Wyckoff et al., 2001).

In particolare, la desensitizzazione del GPR30 in seguito a trattamento prolungato con G1 attenua l'effetto cardioinibitore dell'ormone.

I risultati indicano che l'effetto cardiotropo del 17 β -E2 è il risultato dell'azione combinata dei classici recettori ERs e di GPR30, ognuno

dei quali contribuisce alla modulazione del segnale estrogenico non genomico.

2.4 Pathways trasduzionali attivati dal 17 β -E2

Analizzando il meccanismo d'azione mediato dal 17 β -E2 nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo Langendorff, è emerso che esso coinvolge tanto il pathway ERK/PI3K/PKA che il sistema eNOS/NO. Infatti, il pretrattamento con PD, LY e H89, antagonisti rispettivamente di ERK1/2, PI3K e PKA, ha bloccato l'effetto inotropo del 17 β -E2. L'effetto lusitropico negativo è attenuato in seguito a inibizione di ERK1/2 e della PKA mentre risulta bloccata da LY, inibitore della PI3K. La PKA risulta essere coinvolta anche nella modulazione dell'effetto vasocostrittore. Il segnale lusitropico negativo 17 β E2 indotto coinvolge l'attivazione della PI3K. Questo enzima potrebbe modulare la ricaptazione del Ca²⁺ in accordo con quanto osservato in cardiomiociti nei quali, l'attivazione di questo enzima si contrappone all'effetto lusitropico positivo indotto da attivazione β 1 adrenergica attraverso inibizione delle correnti al calcio (Leblais et al., 2004). La PI3K è coinvolta anche nella modulazione estrogenica dell'inotropismo unitamente al pathways trasduzionali ERK1/2 confermando quanto osservato in cellule endoteliali dove, l'attivazione di ER α -indotta dal 17 β -E2, culmina da un lato nel reclutamento di ERK1/2 e dall'altro nell'incremento dell'attività del sistema PI3K/Akt (Needling et al., 1999). Inoltre, la loro modulazione avviene in pochi minuti dall'inizio del trattamento lasciando ipotizzare un meccanismo d'azione rapido, non genomico indotto dall'ormone in linea con quanto riportato in letteratura. Infatti, Needling e collaboratori (1999) hanno dimostrato, in cardiomiociti isolati, che il trattamento con 17 β -E2 induce un'attivazione rapida di ERK1/2 che avviene in 5-15 minuti a causa

di effetti non genomici. L'attivazione di ERK1/2 è associata a benefici effetti a livello cardiaco. Infatti, come riportato in letteratura, la stimolazione di ERK1/2 indotta dal 17 β -E2 coincide con l'inibizione del pathway p38MAPK coinvolto nell'ipertrofia miocardica (Shiau et al., 1998; MacRitchie et al., 1997). Il coinvolgimento del pathway PI3k/Akt nella modulazione dell'attività cardiotropica del 17 β -E2 trova conferma con quanto riportato da Simoncini e collaboratori (2000) i quali hanno dimostrato che ER α (e non ER β) si lega in maniera selettiva alla subunità p85 regolatoria della PI3K incrementandone l'attività ed inducendo attivazione di Akt ed eNOS. In entrambi i casi, l'evento finale coinvolge la produzione rapida di NO mediata da eNOS (Simoncini et al., 2000) così come osservato nel presente lavoro, dove è emerso che l'inotropismo negativo 17 β -E2-mediato coinvolge il sistema eNOS-NO poichè l'inibizione della eNOS mediata da L-NIO blocca gli effetti del 17 β -E2. Questo pretrattamento tuttavia attenua l'effetto vasocostrittore e quello lusitropico negativo indotti dal 17 β -E2.

Il trattamento con l'ormone modula la fosforilazione della eNOS in linea con precedenti lavori in cui era stato evidenziata la capacità del 17 β -E2 di regolare l'espressione della eNOS e della iNOS in cardiomiociti di ratto neonato e adulto, femmina e maschio (Nuedling et al., 1999).

L'effetto osservato è di natura rapida e non genomico confermando quanto osservato da Chen e collaboratori (1999) i quali hanno osservato che, in cellule endoteliali, il 17 β -E2 causa attivazione della eNOS in pochi minuti attraverso l'attivazione degli ERs.

Chambliss e collaboratori (2000) hanno riportato che il sistema di segnale ER-eNOS è localizzato nelle caveole delle cellule endoteliali, domini membranari dove è nota la colocalizzazione di molte

molecole segnale, tra cui la PI3K e la eNOS. Queste evidenze avvalorano l'ipotesi secondo cui, nel cuore di ratto isolato e perfuso, l'attivazione della eNOS possa avvenire nei cardiomiociti a livello caveolare in seguito ad attivazione sia di ERK1/2 che della PI3K in tempi molto rapidi.

In letteratura è riportata la capacità dello NO 17 β -E2-prodotto di indurre attivazione del pathway sGC/cGMP e/o modulazione dei canali al potassio Ca²⁺-dipendenti (Filardo et al., 2000). Tuttavia, nel presente lavoro di tesi, è stato osservato che il segnale 17 β -E2-mediato non coinvolge il sistema sGC/cGMP nella modulazione dell'effetto inotropo negativo e vasocostrittore poiché il trattamento con uno specifico inibitore della sGC non modifica l'azione dell'ormone. In accordo con ciò, in cuori esposti al 17 β -E2, le concentrazioni intracellulari di cGMP non si modificano se confrontate con cuori di controllo. È possibile che questo effetto cGMP-indipendente, che può essere realizzato anche mediante la S-nitrosilazione NO-mediata di proteine quali i canali ionici, giochi un ruolo nell'azione cardiotropica del 17 β -E2.

2.5 Pathways trasduzionali mediati da attivazione di GPR30

Nel presente lavoro, il pretrattamento con ICI e PD, antagonisti rispettivamente di ERs e ERK1/2, blocca l'effetto cardiotropo G1-indotto dimostrando il loro coinvolgimento nel meccanismo d'azione di GPR30. L'analisi western blotting di cuori di ratto maschio esposti a G1, ha dimostrato che i livelli di pERK1/2 e peNOS incrementano in seguito a trattamento con l'agonista e che questa fosforilazione si blocca in seguito a trattamento con PD, un antagonista di ERK1/2. Questo lascia ipotizzare che l'effetto cardiotropo indotto da attivazione di GPR30 sia associato a contemporanea attivazione dei

classici recettori estrogenici e che sia modulato da attivazione delle ERK1/2 e da fosforilazione della eNOS.

L'antagonista selettivo degli ERs, ICI, non blocca solo l'effetto ERs 17 β -E2-mediato, ma anche quello indotto da attivazione di GPR30. Questo chiaramente dimostra che l'effetto estrogenico è dipendente dall'attivazione sia degli ERs che di GPR30 e che tra i tre sottotipi recettoriali possa esserci una transattivazione in seguito a trattamento con 17 β -E2 per cui l'inibizione di uno comporta la mancata attivazione degli altri. Questa ipotesi trova riscontro con i dati riportati in cellule tumorali (Albanito et al., 2007; Maggiolini et al., 2004; Vivacqua et al., 2006; Vivacqua et al., 2006) e con quanto osservato in linee cellulari ERs-negative o GPR30-negative, nelle quali l'effetto estrogeno-mediato è vincolato alla presenza dei tre sottotipi recettoriali (Filardo et al., 2000; Aronica et al., 1994). Questo definisce un quadro chiaro in cui risulta cruciale il cross-talk fra i tre sottotipi recettoriali.

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi dimostrano che l'effetto cardiotropo mediato da attivazione di GPR30, richiede la fosforilazione di ERK1/2, in linea con quanto riportato da Filardo e collaboratori (2000) in cellule ERs-negative, in cui l'attivazione di GPR30 ha modulato la fosforilazione di ERK1/2. Inoltre, per la prima volta, è stato dimostrato che l'effetto cardiotropo indotto da attivazione di GPR30 è associato a fosforilazione della eNOS ERK1/2-indotta.

I risultati ottenuti, sebbene preliminari, tracciano quello che potrebbe essere il pathway trasduzionale a valle di GPR30 responsabile dell'effetto osservato nel cuore di ratto isolato e perfuso.

In conclusione, i dati ottenuti suggeriscono un'interazione funzionale tra ERs e GPR30. La loro transattivazione, in seguito a stimolazione

indotta dal 17β -E2, comporta la modulazione di comuni targets intracellulari tra cui l'attivazione del sistema eNOS/NO suggerendo che la produzione di NO possa giocare un ruolo centrale nella risposta del cuore di ratto maschio alla stimolazione estrogenica.

3. Modulazione lusitropica NOS/NO-dipendente della funzionalità cardiaca: il β 3-AR

3.1. Sistema β 3-adrenergico: un nuovo pathway neuroendocrino intrinseco

Nel contesto del controllo inibitorio dell'attività cardiaca, quale quello mediato dalla rCga1-64 e dal 17β E2, e alla luce della loro attività antiadrenergica (Cerra et al., 2008; Li et al., 2000), nel presente lavoro si è analizzato lo stato β 3-adrenergico del cuore di ratto quale sistema trasduzionale responsabile del controllo inibitorio della performance cardiaca rCga1-64- e 17β E2-indotta.

Il presente lavoro di tesi ha dimostrato che l'attivazione del β 3-AR, in seguito a stimolazione mediata da un agonista selettivo, il BRL37344, induce un effetto lusitropico negativo nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo Langendorff. Questo effetto è associato ad attivazione delle proteine Gi/o sensibili alla PTx e coinvolge il pathway NO-cGMP-PKG. Questi risultati potrebbero fare luce sul ruolo regolatore dell'attivazione bilanciata dei sistemi β 1/ β 2 e β 3 sulla funzionalità diastolica sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

La funzionalità cardiaca è stata ampiamente studiata in relazione allo stato contrattile del cuore (Vittone et al., 1994). Tuttavia, durante l'ultimo decennio, l'interesse è stato rivolto anche allo studio della performance cardiaca del rilassamento e della fase diastolica soprattutto alla luce dell'importanza delle fasi iniziali del rilassamento in vari stati patologici cardiaci (Brutsaert & Sys, 1993).

Valutare il rilassamento cardiaco nel cuore che lavora risulta complesso poiché le variazioni imposte dal precarico al cuore e la non uniformità dei segmenti miocardici adiacenti possono alterare i parametri lusitropici. Il cuore perfuso in condizioni isovolumetriche (tecnica Langendorff) risulta altamente utile nel quantificare lo stato di rilassamento, permettendo un migliore controllo delle variabili lusitropiche (Vittone et al., 1994).

Nel presente studio, inizialmente è stata testata la sensibilità del cuore di ratto perfuso secondo Langendorff, al BRL37344. L'agonista selettivo dei recettori β_3 -adrenergici induce una riduzione dose-dipendente della contrattilità come evidenziato da una riduzione della $+(LVdP/dt)_{max}$. Questo concorda con l'inotropismo negativo β_3 -AR-dipendente descritto non solo nel ratto (Gauthier et al., 1999), ma anche nell'uomo (Gauthier et al., 1996) e nel cane (Gauthier et al., 1999), confermando la ipotizzata selettività del cuore di ratto nei confronti dell'agonista β_3 -adrenergico (Gauthier et al., 1999). Questo effetto è stato correlato alla valutazione, a livello cardiaco, di prodotti trascrizionali codificanti per il recettore. Infatti, nel presente studio, un'analisi di RT-PCR qualitativa ha evidenziato, per la prima volta, l'espressione genomica del β_3 -AR nel cuore di ratto.

E' stato osservato che l'attivazione del β_3 -AR induce una significativa riduzione dose-dipendente della $-(LVdP/dt)_{max}$. Nel cuore di mammifero, il rilassamento dipende dalla performance contrattile (Grassi de Gende et al., 1977). Per cui, un'appropriata analisi degli effetti lusitropici richiede l'elaborazione di ulteriori parametri. Lo HTR rappresenta un ottimo indice dell'accoppiamento eccitazione-rilassamento ed è usato sia per valutare simultaneamente variazioni della contrattilità e del rilassamento sia per quantificare i cambiamenti indotti da diverse sostanze sul lusitropismo miocardico (Brutsaert & Sys, 1989). In questo studio, il decremento della -

(LVdP/dt)_{max} indotto dal BRL37344 è associato ad una significativa riduzione dello HTR, a partire dalle concentrazioni più basse (-12.69%; 10^{-12} M), persistendo alle concentrazioni più alte (-34.01%; 10^{-6} M). Questi dati indicano che sebbene la velocità di declino del picco della pressione ventricolare sinistra si riduca in presenza di una stimolazione β_3 -adrenegica, il tempo necessario per raggiungere il 50% del declino dal picco della pressione diventa più breve. Ulteriori studi permetteranno di valutare questa azione in termini benefici o nocivi per la funzionalità cardiaca. Dall'analisi di questi parametri lusitropici è emerso che l'effetto lusitropico negativo β_3 -AR-dipendente non è influenzato dalla performance contrattile. Inoltre, l'analisi dei parametri emodinamici mette in evidenza che il BRL37344 induce una debole vasodilatazione coronarica che può direttamente o indirettamente alterare il rilassamento ventricolare. Si potrebbe ipotizzare che lo NO di derivazione coronarica possa giocare un ruolo nel lusitropismo β_3 -AR indotto. Infatti, in differenti tipi di preparazioni cardiache, indipendentemente dall'incremento del flusso coronarico, la microcircolazione coronarica influenza il rilassamento miocardico. Questo avviene attraverso il rilascio di sostanze di origine endoteliale (quali lo NO) che in maniera dose-dipendente inducono un anticipato inizio della caduta della pressione coronarica con un meccanismo che coinvolge una modulazione cGMP-PKG-mediata della sensibilità dei miofilamenti al Ca^{2+} (Shah, 1996; Seddon et al., 2007 e referenze seguenti).

3.2. Attività "antiadrenergica" del β_3 -AR

Nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo Langendorff, l'attivazione del β_3 -AR induce un effetto lusitropico negativo non dipendente da simultanea attivazione dei β_1/β_2 -ARs, infatti non è influenzato dal nadololo, un inibitore selettivo dei β_1/β_2 ARs e che

non presenta proprietà antagoniste nei confronti del β 3-AR (Emorine et al., 1989; Galitzky et al., 1993). Da un'attenta analisi dei parametri, è emerso che le concentrazioni effettive di BRL37344 capaci di modulare il rilassamento ventricolare β 3-AR indotto [HTR: 10^{-12} M; $-(LVdP/dt)_{max}$: 10^{-11} M] risultano di gran lunga più basse rispetto alle concentrazioni di agonista responsabili dell'effetto inotropo negativo (1μ M per BRL37344 nel miocardio umano; 1μ M per il CL316243 nel guinea-pig; 0.1μ M per il CGP12177 nel cane) (Gauthier et al., 1999). Nei mammiferi, la stimolazione β 1/ β 2, mediante produzione di cAMP e fosforilazione del fosfolambano (PLB), accelera il rilassamento con conseguenti effetti sulla fase diastolica (Vittone et al., 2002). Questo risulta di notevole importanza per la meccanica cardiaca di recupero sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Bohm & Maack, 2000, Vittone et al., 2002, Mattiazzi et al., 2006). Nel presente studio è stato osservato che in presenza di simultanea stimolazione di β 1/ β 2 e β 3-ARs, indotta dall' Iso (5 nM) e BRL37344 (10 nM), rispettivamente, il classico effetto lusitropico positivo β 1/ β 2-dipendente scompare. Questo indica che nel cuore di ratto, in condizioni fisiologiche, l'attivazione dei β 3-ARs potrebbe contribuire a neutralizzare l'effetto stimolatore β 1/ β 2-mediato sul rilassamento. Inoltre, l'effetto lusitropico negativo mediato dal BRL37344 coinvolge le proteine Gi/o di membrana sensibili alla PTx, coinvolte in diverse cascate trasduzionali inibitorie (Hare et al., 1998), quale quella implicata nell'effetto inotropo negativo β 3-AR-indotto osservato negli uomini (Gauthier et al., 1996), e l'inibizione Gi/o-mediata indotta da attivazione BRL37344-dipendente dei β 3-AR sulle correnti al Ca^{2+} di tipo L (Zhang et al., 2005).

3.3 Pathway trasduzionale attivato dal β 3-AR

In ventricoli umani, il lusitropismo negativo β 3-AR-indotto dipende dalla produzione di NO mediata dalla isoforma endoteliale costitutivamente espressa della NO sintasi (eNOS) e dal conseguente incremento delle concentrazioni intracellulari di cGMP (Gauthier et al., 1998; Varghese et al., 2000). In accordo con questa interazione β 3AR-NO, il presente lavoro ha evidenziato che il lusitropismo negativo indotto dal BRL37344 risulta mediato dal sistema NO-cGMP-PKG. Il coinvolgimento di questo pathway nella risposta lusitropica negativa β 3-adrenergica non era stato mai esplorato finora. Sebbene sia molto dibattuto il ruolo assunto dallo NO nel rilassamento miocardico, soprattutto in relazione alle condizioni sperimentali (quali cuori non stimolati o β -AR stimolati; concentrazioni di NO, dipendenza temporale; Massion & Balligand, 2003; Seddon et al., 2007), è certo che lo NO, attraverso produzione di cGMP, influenza il rilassamento miocardico attraverso riduzione della sensibilità dei miofilamenti al Ca^{2+} , causando una riduzione del tono diastolico, un anticipato inizio del rilassamento isotonico con un piccolo effetto sugli indici della contrazione. Questo effetto, essendo negativamente modulato dal KT5823, induce la fosforilazione della TnI mediante attivazione dalla PKG (Shah et al., 1995; Seddon et al., 2007 e referenze successive). Recentemente, è stato ipotizzato un ruolo per lo NO prodotto dalla isoforma neuronale della NOS (nNOS) nel controllo del rilassamento miocardico sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione adrenergica. La specifica localizzazione della nNOS sullo SR e/o sul sarcolemma suggerisce che esso possa modulare diverse molecole (SERCA2A, PLB, recettore per la rianodina, Ca^{2+} ATPasi sarcolemmali e i canali di tipo L) coinvolte nella regolazione del Ca^{2+} , così da

influenzare il rilassamento miocardico (Ashley et al., 2002; Zhang et al., 2007).

I risultati ottenuti dimostrano anche che il lusitropismo negativo β 3-AR mediato non risulta modificato in presenza di inibizione della pCG mediante pretrattamento con uno specifico antagonista, l'anantina. In accordo con ciò, la cascata attivata dal β 3-AR converge solo sulla sGC, escludendo così la possibilità di una seconda fonte di produzione del cGMP. Questo suggerisce una modulazione lusitropica dell'attività cardiaca spazialmente organizzata e che rende conto della risposta miocardica all'attivazione del β 3-AR.

Conclusioni

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi confermano l'ipotesi secondo cui la rCga1-64, prodotta dal cuore, e il 17 β -estradiolo, un fattore esclusivamente endocrino, agiscono quali importanti regolatori omeostatici del sistema cardiovascolare. In particolare, entrambi gli ormoni sono capaci di attivare il sistema NOS/NO, importante crocevia di molti pathways intrinseci ed estrinseci coinvolti nella fine regolazione dell'attività cardiaca (es. il sistema β 3-adrenergico).

L'analisi dell'effetto cardiotropo del frammento rCga1-64 ha permesso di caratterizzare l'influenza che in modo autocrino/paracrino questo peptide esercita sul cuore di ratto. La proteina progenitrice della rCga1-64 (la Cga) è rilasciata in situazioni di stress insieme alle catecolamine, ma anche in condizioni di scompenso cardiaco cronico per cui i suoi frammenti peptidici potrebbero contribuire a mantenere la funzionalità cardiaca in condizioni patologiche, quali l'ischemia-riperfusion, come evidenziato in recenti studi riguardo l'efficace azione protettiva operata dal frammento umano N-terminale1-78, hrVS-1 (Cappello et al., 2007).

Al contempo è stato dimostrato che l'effetto inotropo negativo indotto dal 17 β -E2 sul cuore di ratto maschio richiede l'attivazione del nuovo recettore di membrane GPR30 oltre ai classici recettori estrogenici ER α e ER β . Questo lascia ipotizzare un possibile cross-talk funzionale tra i diversi sottotipi recettoriali la cui attivazione comporta il coinvolgimento di ERK, PI3K, PKA con conseguente attivazione della eNOS. Anche l'attivazione di GPR30 comporta reclutamento della eNOS, suggerendo che la produzione di NO giochi

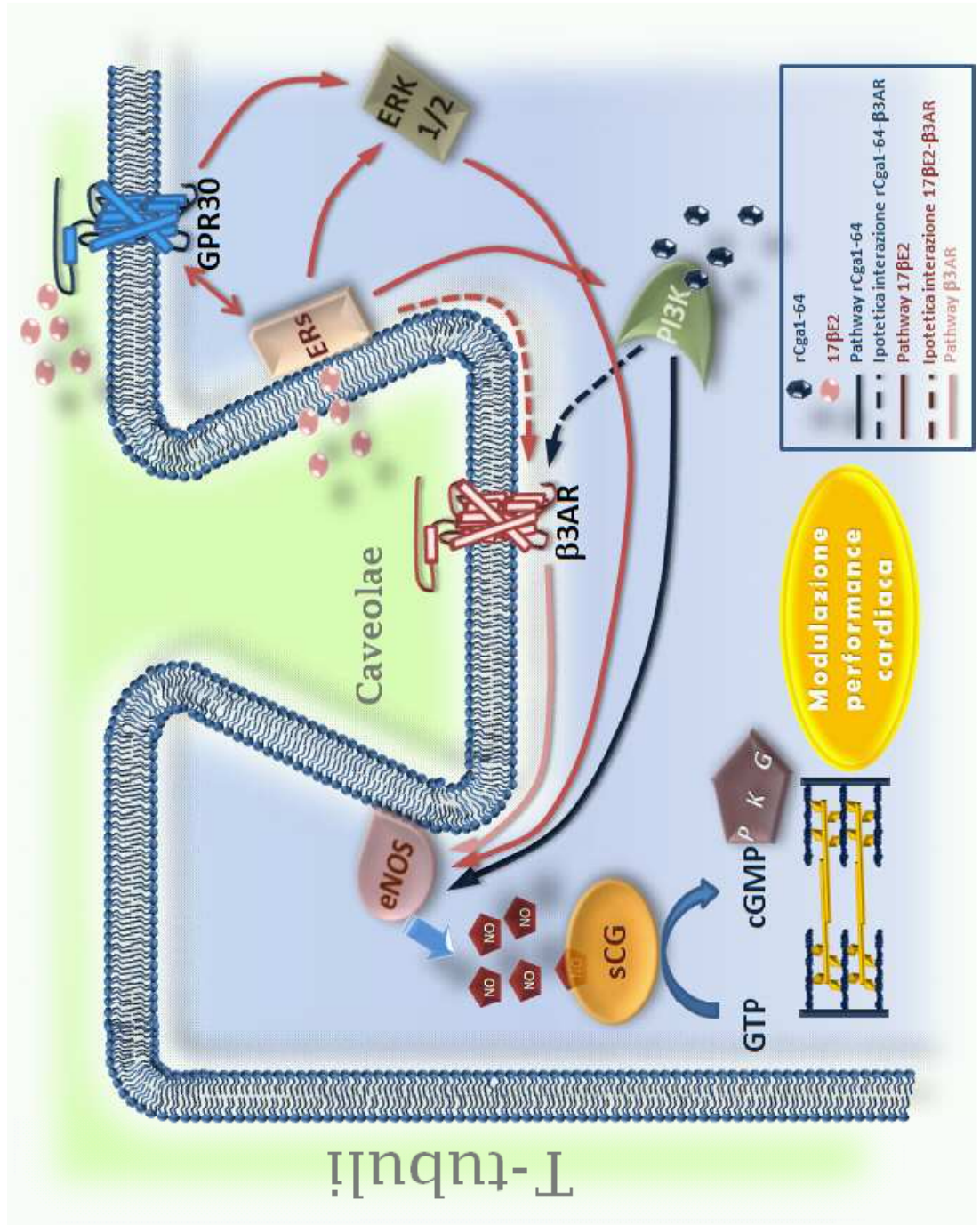
un ruolo cruciale nella risposta del cuore di ratto maschio alla stimolazione estrogenica.

I dati ottenuti ulteriormente confermano che il sistema NOS/NO rappresenta un vero e proprio trasduttore-segnalatore integrato il quale, per la sua organizzazione spaziale e temporale, può essere considerato un regolatore chiave della funzionalità cardiaca. Questo risulta particolarmente importante in situazioni di intensa stimolazione adrenergica (es. sindrome da stress), responsabili di un forte aumento dell'attività cardiaca. A tal proposito, è da sottolineare che tanto la rCga1-64 che il 17 β E2 possano esercitare il loro tono inibitorio e la loro azione antiadrenergica modulando direttamente o indirettamente il sistema β 3-adrenergico cardiaco, contrastando così gli effetti delle catecolamine. Al centro dei meccanismi di regolazione attivati dalle due sostanze umorali, un ruolo di primo piano è svolto dalla cascata trasduzionale NOS/NO/cGMP/PKG. Nel caso della modulazione adrenergica inibitoria cardiaca β 3-mediata, lo NO agirebbe quale "beta-bloccante endogeno".

Il fitto intreccio trasduzionale potrebbe realizzarsi secondo uno specifico profilo spazio-temporale, ad esempio all'interno delle caveolae dove sono co-localizzati importanti effettori del segnale tra cui i β 3AR, ERs, GPR30, eNOS e dove convergono molti segnali inter- e intra-cellulari atti a modulare la produzione di NO sia in condizioni fisiologiche che patologiche quali l'iperstimolazione cardiaca in cui è richiesta una riduzione della performance cardiaca o in condizioni di ischemia-riperfusionne dove una modulazione negativa dell'attività cardiaca limita i danni da ripersione.

In questo contesto, il sistema NOS/NO rappresenta un importante regolatore omeostatico atto a mantenere la condizione di "Zero steady state error homeostasis" in cui assumono una rilevanza fondamentale sia tutte quelle variabili legate al genere (Sun et al.,

2006), sia la localizzazione delle NOS e il sito di produzione dello NO (Barouch et al., 2002; Ziolo & Bers, 2003; Katori et al., 2006; Walsh et al., 2004), sia l'attivazione di pathways trasduzionali cGMP-dipendenti e cGMP-indipendenti che hanno come targets distinti elementi delle proteine contrattili, sia l'effetto ormesico NO-indotto (Mendelson et al., 2003), che le specie prodotte (Kohr et al., 2008; Ziolo et al., 2001; Tocchetti et al., 2007) e lo stato contrattile dei cardiomiociti (Ziolo et al., 2001; Tocchetti et al., 2007; Kojda et al., 1996; Kohr et al., 2008). Nel complesso, questi dati aggiungono nuova luce sulla funzione endocrina del cuore, in cui il segnale NO-mediato, pur molto complesso, rappresenta un modulatore centrale convergente in molteplici funzioni cruciali per la regolazione della funzionalità cardiaca in condizioni fisiologiche che patologiche.



Bibliografia

- Aardal, S., Helle, K.B. The vaso-inhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. (1992) *Regul Pept.*; **41(1)**:9-18.
- Aardal, S., Helle, K.B., Elsayed, S., Reed, R.K., Serck-Hansen, G. Vasostatins comprising the N-terminal domain of chromogranin A suppress tension in isolated human blood vessel segments. (1993) *J. Neuroendocrinol.*; **5**:105-112
- Abi-Gerges, N., Fischmeister, R., Méry, P.F. G protein-mediated inhibitory effect of a nitric oxide donor on the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. (2001) *J Physiol.*; **531(Pt 1)**: 117-130
- Abou-Saif, A., Gibril, F., Ojeaburu, J.V., Bashir, S., Entsuah, L.K., Asgharian, B., Jensen, R.T. Prospective study of the ability of serial measurements of serum chromogranin A and gastrin to detect changes in tumor burden in patients with gastrinomas. (2003) *Cancer*; **98 (2)**: 249-61
- Abu-Soud, H.M., Rousseau, D.L., Stuehr, D.J. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. (1996) *J Biol Chem.*; **271(51)**:32515-8
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P., Marino, M. S-Palmitoylation modulates human estrogen receptor- α functions. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **316**:878-883
- Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Musti, A.M., Andò, S., Maggiolini, M. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. (2007) *Cancer Res.*; **67**:1859-1866
- Aronica, S.M., Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **91**:8517-21
- Ashley, E.A., Sears, C.E., Bryant, S.M., Watkins, H.C. & Casadei, B. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. (2002) *Circulation* **105**:3011-3016
- Bagatell, C.J., Knopp, R.H., Rivier, J.E., Bremner, W.J. Physiological levels of estradiol stimulate plasma high density lipoprotein2 cholesterol levels in normal men. (1994) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; **78**:855-861
- Baird, D.T., Uno, A., Melby, J.C. Adrenal secretion of androgens and oestrogens. (1969) *J Endocrinol.*; **45(1)**:135-6
- Baker, L., Meldrum, K.K., Wang, M., Sankula, R., Vanam, R., Vanam, R., Raiesdana, A., Tsai, B., Hile, K., Brown, J.W., Meldrum, D.R. The role of estrogen in cardiovascular disease. (2003) *J. Surg. Res.*; **115**:325-44

- Balligand, J.L., Kelly, R.A., Marsden, P.A., Smith, T.W., Michel, T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **90**:347–351
- Barbier, J., Rannou-Bekono, F., Marchais, J., Berthon, P.M., Delamarche, P., Carre, F. Effect of training on beta1 beta2 beta3 adrenergic and M2 muscarinic receptors in rat heart. (2004) *Med Sci Sports Exerc*; **36**:949–954
- Barouch, L.A., Harrison, R.W., Skaf, M.W., Rosas, G.O., Cappola, T.P., Kobeissi, Z.A., Hobai, I.A., Lemmon, C.A., Burnett, A.L., O'Rourke, B., Rodriguez, R.E., Huang, P.L., Lima, J.A.C., Berkowitz, D.E., Hare, J.M. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. (2002) *Nature*; **416**:337.
- Barret-Connor, E., Bush, T.L. Estrogen and coronary heart disease in women. (1991) *Journal of the American Medical Association*; **265**:1861-1867.
- Bartfly, W.J., Dawood, F., Wen, W.H., Lehotay, D.C., Hou, D., Bartfly, E., Lou, X., Backx, P.H., Liu, P.P. Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. (1999) *Cardiovasc. Res.*; **43**:892-900
- Beaubien, G., Schafer, M.K., Weihe, E., Dong, W., Chretien, M., Seidah, N.G., Day, R. The distinct gene expression of the pro-hormone convertases in the rat heart suggests potential substrates. (1995) *Cell Tissue Res*; **279 (3)**:539–549
- Beaulieu, P., Lambert, C. Peptidic regulation of heart rate and interactions with the autonomic nervous system. (1998) *Cardiovasc Res.*; **37 (3)**:578-85.
- Bendall, J.K., Damy, T., Ratajczak, P., Loyer, X., Monceau, V., Marty, I., Milliez, P., Robidel, E., Marotte, F., Samuel, J.L., Heymes, C. Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction induced heart failure in rat. (2004) *Circulation*; **110**:2368–75.
- Berger, J.M., Sosa-Lucero, J.C., De La Iglesia, F.A., Lumb, G, Bencosme, S.A. Relationship of atrial catecholamines to cytochemistry and fine structure of atrial specific granules. (1972) In: Bajusz E, Rona G (eds) Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. *Myocardiology*. University Park Press, Baltimore; vol 1:pp 340–350
- Blin, N., Camoin, L., Maignet, B. & Strosberg, D.. Structural and conformational features determining selective signal transduction in the β 3-adrenergic receptor. (1993) *Mol Pharmacol*; **44**:1094–1104
- Bohm, M., Maack, C. Treatment of heart failure with beta-blockers. Mechanisms and results. (2000) *Basic Res Cardiol* **95**:I15–I24
- Bologa, C.G., Revankar, C.M., Young, S.M., Savchuck, N.P., Sklar, L.A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. (2006) *Nat Chem Biol*; **4**:207-212
- Bompiani, G.D., Rouiller, C.H., Hatt, P.Y. Le tissu de conduction du coeur chez le rat. etude au microscope électronique. (1959) *Arch Mal Coeur*; **52**:1257–1274

- Booth, E.A., Obeid, N.R., Lucchesi, B.R. Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. (2005) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **289**:H2039-2047
- Brekke, J.F., Kirkeleit, J., Lugaardon, K., Helle, K.B. Vasostatin Dilators of bovine resistance arteries. (2000) *Adv Exp Med Biol*; **482**:239-246
- Brunner, F., Bras-Silva, C., Cerdeira, A.S., Leite-Moreira, A.F. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. (2006) *Pharmacol Ther*; **111(2)**: 508-531
- Brutsaert, D.L. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. (2003) *Physiol. Rev.*; **83**:59
- Brutsaert, D.L., Franssen, P., Andries, L.J., De Keulenaer, G.W., Sys, S.U. Cardiac endothelium and myocardial function. (1998) *Cardiovasc Res*; **38**:281-290
- Brutsaert, D.L., Sys, S.U. Relaxation and diastole of the heart. (1989) *Physiol Rev*; **69**:1228-1315.
- Brutsaert, D.L., Sys, S.U., Gillebert, T.C. Diastolic dysfunction in post-cardiac surgical management. (1993) *J Cardiothorac Vasc Anesth.*; **7(2 Suppl 1)**:18-20.
- Cappello S., Angelone T., Tota B., Pagliaro P., Penna C., Rastaldo R., Corti A., Losano G., Cerra M.C. Human recombinant chromogranin A-derived vasostatin-1 mimics preconditioning via an adenosine/nitric oxide signaling mechanism. (2007) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **293(1)**: H719-727.
- Caulin-Glaser T., Garcia-Cardena G., Sarrel, P., Sessa, W.C., Bender J.R. 17 β -Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. (1997) *Circulation Research*; **81**:885-892.
- Ceconi, C., Ferrari, R., Bachetti, T., Opasich, C., Volterrani, M., Colombo, B., Parrinello, G., Corti, A. Chromogranin A in heart failure: a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. (2002) *Eur. Heart J*; **23**:967-974
- Cerra, M.C., De Iuri, L., Angelone, T., Corti, A., Tota, B. Recombinant N-terminal fragments of Chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. (2006) *Bas Res Cardiol*; **100**:1-10
- 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. The homologous rat chromogranin A1-64 (rCg1-64) modulates myocardial and coronary function in rat heart to counteract adrenergic stimulation indirectly via endothelium-derived nitric oxide. (2008) *FASEB J.*; **22(11)**:3992-4004
- Cerra, M.C., Pellegrino, D. Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions. (2007) *Curr Med Chem.*; **14 (5)**:585-99
- Chamberlain, P.D., Jennings, K.H., Paul, F. The tissue distribution of the human β_3 -adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the β_3 -

adrenergic in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. (1999) *Int J Obes Relat Metab Disord*; **10**:1057–1065

Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Mineo, C., Liu, P., German, Z., Sherman, T.S., Mendelsohn, M.E., Anderson, R.G.W., Shaul, P.W. Estrogen receptor α and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. (2000) *Circ Res*; **87**(11):e44–e52

Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. (1999) *J Clin Invest*; **103**:401–406

Corti, A., Ferrari, R., and Ceconi, C. Chromogranin A and tumor necrosis factor alpha in heart failure. (2000) *Adv Exp Med Biol*; **482**:351–359

Couse, J.F., Korach, K.S. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us?. (1999) *Endocr. Rev.*; **20**:358–417

Damy, T., Ratajczak, P., Robidel, E., Bendall, J.K., Olivero, P., Boczkowski, J., Ebrahimian, T., Marotte, F., Samuel, J.L., Heymes, C. Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. (2003) *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. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. (2004) *Lancet*; **363**:1365–7

Danson, E.J., Choate, J.K., Paterson, D.J. Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. (2005) *Pharmacol Ther*; **106**:57–74

Dechering, K., Boersma, C., Mosselman, S. Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind. (2000) *Curr. Med. Chem.*; **7**:561–576

Delcayre, C., Silvestre, J.S., Garnier, A., Oubenaissa, A., Cailmail, S., Tatara, E., Swynghedauw, B., Robert, V. Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling. (2000) *Kidney Int.*; **57** (4):1346–51

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt dependent phosphorylation. (1999) *Nature*; **399**:601–5

Dincer, U.D., Bidasee, K.R., Guner, S., Tay, A., Ozcelikay, A.T., Altan, V.M. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. (2001) *Diabetes*; **50**:455–461

Doring, H.J. The Isolated perfused heart according to Langendorff technique-function-application. (1990) *Physiol. Bohemoslov.*; **39**:481–504

Drees, B.M., Rouse, J., Johnson, J., Hamilton, J.W. Bovine parathyroid glands secrete a 26-kDa N-terminal fragment of chromogranin-A which inhibits parathyroid cell secretion. (1991) *Endocrinology*; **129**:3381–33

- Dunn, J.F., Nisula, B.C., Rodbard, D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. (1981) *J Clin Endocrinol Metab*; **53**(1):58-68.
- Dzau, V.J. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. (1993) *Arch Intern Med*; **153** (8):937-42.
- Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C. & Strosberg, A.D. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. (1989) *Science*; **245**:1118–1121
- Evans, B.A., Papaioannou, M., Bonazzi, V.R., Summers, R.J. Expression of b3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. (1996) *Br J Pharmacol*; **117**, 210–216
- Feldman, S.A., Eiden, L.E. The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. (2003) *Endocr Pathol. Spring*; **14** (1):3-23.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T.W., Kelly, R.A., Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. (1996) *J Biol Chem*; **271**:22810–4
- Feron, O., Saldana, F., Michel, J.B., Michel, T. The endothelial nitric-oxide synthase–caveolin regulatory cycle. (1998) *J. Biol. Chem.*; **273**:3125–3128
- Filardo, E.J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. (2002) *J Steroid Biochem Mol Biol*; **80**:231-238
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., Frackelton, A.R. Jr Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HBEGF. (2000) *Mol Endocrinol*; **14**:1649-1660
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, Jr A.R., Bland, K.I. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to- MAPK signaling axis. (2002) *Mol Endocrinol*; **16**:70–84
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Graeber, C.T. Evidence supporting a role for GPR30, an orphan member of the G-protein-coupled receptor superfamily, in rapid estrogen signaling. (2003) In: Watson CS, ed. Identities of membrane steroid receptors. Boston: Kluwer Academic Publishers
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Pang, Y., Graeber, C.T., Shaw, S., Dong, J., Thomas, P. Activation of the Novel Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane (2007) *Endocrinology*; **148** (7):3236–3245
- Filardo, E.J., Thomas, P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. (2005) *Trends Endocrinol Metab*; **16**:362–367

- Forssmann, W.G., Girardier, L. A study of the T-system in rat heart. (1970) *J Cell Biol*; **44**:1–19
- Fulton, D., Gratton, J-P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. (1999) *Nature*; **399**:597–600
- Galinanes, M., Hearse, D.J. Species differences in susceptibility to ischemic injury and responsiveness to myocardial protection. (1990) *Cardioscience*; **1**:127-143
- Galitzky, J., Reverte, M., Portillo, M., Carpenne, C., Lafontan, M. & Berlan, M.. Coexistence of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenoceptors in dog fat cells and their differential activation by catecholamines (1993) *Am J Physiol* **264**:E403–E412
- Gallo, M.P., Levi, R., Ramella, R., Brero, A., Boero, O., Tota, B., Alloatti, G. Endothelium-derived nitric oxide mediates the antiadrenergic effect of human vasostatin-1 in rat ventricular myocardium. (2007) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; **292**(6): H2906-2912
- Gauthier, C., Langin, D., Balligand, J.L. b3-Adrenoceptors in the cardiovascular system. (2000) *J Clin Invest*; **21**:426–430
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., Le Marec, H. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. (1998) *J Clin Invest*; **102**:1377–1384
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., Le Marec, H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. (1996) *J Clin Invest*; **98**:556–562
- Gauthier, C., Tavernier, G., Trochu, J.N., Leblais, V., Laurent, K., Langin, D., Escande, D., Le Marec, H. Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta (3)-adrenoceptor agonists (1999) *J Pharmacol Exp Ther*; **290**:687–693
- Giampaolo, B., Angelica, M., Antonio, S. Chromogranin 'A' in normal subjects, essential hypertensives and adrenalectomized patients. (2002) *Clin Endocrinol (Oxf)*; **57** (1):41-50
- Glattard, E., Angelone, T., Strub, J.M., Corti, A., Aunis, D., Tota, B., Metz-Boutigue, M.H., Goumon, Y. Characterization of natural vasostatin-containing peptides in rat heart. (2006) *FEBS J.*; **273** (14):3311-21
- Gorodeski, G.I., Yang T, Levy M.N., Goldfarb, J., Utian. W.H. Modulation of coronary vascular resistance in female rabbits by estrogen and progesterone. (1998) *J Soc Gynecol Invest*; **5**:197-202
- Graber, R., Sumida, C., Vallette, G., Nunez, E.A. Rapid and long-term effects of 17 beta-estradiol on PIP2-phospholipase C-specific activity of MCF-7 cells. (1993) *Cell Signal*; **5**:181-186
- Granneman, J.G., Lahners, K.N., Chaudhry, A. Molecular cloning and expression of the rat b3-adrenergic receptor. (1991) *Mol Pharmacol*; **40**:895–899

- Grassi de Gende, A.O., Perez Alzueta, A.D. & Cingolani, H.E.. Effect of isoproterenol on the relation between maximal rate of contraction and maximal rate of relaxation. (1977) *Am J Physiol*; **233**:H404–H409
- Greenspan, F.S., Strewler, G.J. Basic & clinical endocrinology. (1997) *Lange Medical Publications*, Los Altos, Calif.
- Grisham, M.B., Jourd'Heuil, D., Wink, D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. (1999) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*; **276**:G315.
- Guo, X., Razandi, M., Pedram, A., Kassab, G., Levin, E.R., Oestrogen induces vascular wall dilation: Mediation through kinase signaling to nitric oxide and oestrogen receptors alpha and beta. (2005) *J. Biol. Chem.*; **280**: 19704–19710
- Gussi, I.L., Young, J., Baudin, E., Bidart, J.M., Chanson, P. Chromogranin A as serum marker of pituitary adenomas. (2003) *Clin Endocrinol (Oxf)*; **59 (5)**:644-8
- Halban, P.A., Irminger, J.C. Sorting and processing of secretory proteins. (1994) *Biochem J*; **299**:1–18
- Hale, S.L., Birnbaum, Y., Kloner, R.A. beta-Estradiol, but not alpha-estradiol, reduced myocardial necrosis in rabbits after ischemia and reperfusion. (1996) *Am Heart J*; **132(2 Pt 1)**:258-62
- Hare, J.M., Kim, B., Flavahan, N.A., Ricker, K.M., Peng, X., Colman, L., Weiss, R.G. & Kass, D.A. Pertussis toxin-sensitive G proteins influence nitric oxide synthase III activity and protein levels in rat heart. (1998) *J Clin Invest* **101**:1424–1431
- Haynes, M.P., Sinha, D., Russell, K.S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., Bender, J.R. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. (2000) *Circ Res*; **87**:677–682
- Hearse, D.J., Sutherland, F.J. Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. (2001) *Pharmacol. Res.*; **41**:597-603
- Heilberg, I.P., Hernandez, E., Alonzo, E., Valera, R., Ferreira, L.G., Gomes, S.A., Bellorin-Font, E., Weisinger, J.R., Oestrogen receptor (ER) gene polymorphism may predict the bone mineral density response to raloxifene in postmenopausal women on chronic hemodialysis. (2005) *Ren. Fail.*; **27**:155–161
- Helle, K.B., Aunis, D. A physiological role for the granins as prohormones for homeostatically important regulatory peptides? A working hypothesis for future research (2000) *Adv Exp Med Biol*; **482**:389–397
- Helle, K.B., Corti, A., Metz-Boutigue, M.H., Tota, B. The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties (2007) *Cell Mol Life Sci.*; **64 (22)**:2863-86
- Hove-Madsen, L., Mery, P.F., Jurevicius, J., Skeberdis, A.V. & Fishmeister, R. Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. (1996) *Basic Res Cardiol* **91**:1–8

- Hsiao, R.J., Mezger, M.S., O'Connor, D.T. Chromogranin A in uremia: progressive retention of immunoreactive fragments. (1990) *Kidney Int*; **37**:955–964
- Huang, A., Sun, D., Koller, A & Kaley, G. 17beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. (2000) *Circulation*; **101**: 94-100
- Huang, M.H., Bahl, J.J., Wu, Y., Hu, F., Larson, D.F., Roeske, W.R., Ewy, G.A. Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart. (2005) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **288 (2)**:H497-503
- Huang, M.H., Friend, D.S., Sunday, M.E., Singh, K., Haley, K., Austen, K.F., Kelly, R.A., Smith, T.W. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. (1996) *J Clin Invest*; **98 (6)**:1298-1303
- Hutton, J.C., Peshavaria, M., Johnston, C.F., Ravazzola, M., Orci, L. Immunolocalization of betagranin: a chromogranin A-related protein of the pancreatic B-cell. (1988) *Endocrinology*; **122**:1014–1020
- Imbrogno, S., Angelone, T., Adamo, C., Pulerà , E., Tota, B., Cerra, M.C. Beta3-adrenoceptor in the eel (*Anguilla anguilla*) heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. (2006) *J Exp Biol*; **209**:4966–4973
- Jamieson, J.D., Palade, G.E. Specific granules in atrial muscle cells. (1964) *J Cell Biol*; **123**:151–172
- Jankowski, M., Hajjar, F., Kawas, S.A., Mukaddam-Daher, S., Hoffman, G., McCann, S.M., Gutkowska, J. Rat heart: a site of oxytocin production and action. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95 (24)**:14558-63.
- Jensen, E.V., DeSombre, E.R. Estrogen-receptor interaction. (1973) *Science*; **182**:126–134
- Jiang, C., Poole-Wilson, P.A., Sarrel, P.M., Mochizuki, S., Collins, P., McLeod, K.T. Effect of 17 beta oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. (1992) *Br J Pharmacol*; **106**:739-745
- Kanai, A.J., Mesaros, S., Finkel, M.S., Oddis, C.V., Birder, L.A., Malinski, T. β -Adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. (1997) *Am J Physiol*; **273**:C1371–C1377
- Kanel, W.B., Hjortland, M.C., McNamara, P.M., Gordon, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. (1976) *Annals of Internal Medicine*; **85**: 447-452.
- Kato, J., Tsuruda, T., Kitamura, K., Eto, T. Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine hormone in the cardiac ventricles. (2003) *Hypertens Res*; **26**:S113-9.
- Katori, T., Donzelli, S., Tocchetti, C.G., Miranda, K.M., Cormaci, G., Thomas, D.D., Ketner, E.A., Lee, M.J., Mancardi, D., Wink, D.A., Kass, D.A., Paolocci, N. Peroxynitrite and myocardial contractility: in vivo versus in vitro effects. (2006) *Free Radic Biol Med*; **41 (10)**:1606–18

- Katzenellenbogen, B.S., Montano, M.M., Ediger, T.R., Sun, J., Ekena, K., Lazennec, G., Martini, P.G.V., McInerney, E.M., Delage-Mourroux, R., Weis, K., Katzenellenbogen, J.A. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. (2000) *Recent Prog Hormone Res*; **55**:163-195
- Kaye, D.M., Kelly, R.A., Smith, T.W. Cytokines and cardiac hypertrophy: roles of angiotensin II and basic fibroblast growth factor. (1996) *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*; **3**:S136-41.
- Kaye, D.M., Wiviott, S.D., Balligand, J.L., Simmons, W.W., Smith, T.W., Kelly, R.A. Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. (1996) *Circ Res*; **78**:217-224
- Kelly, M.J., Levin, E.R. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. (2001) *Trends Endocrinol. Metab.*; **12**:152-156
- Khan, S.A.; Skaf, M.W.; Harrison, R.W.; Lee, K.; Minhas, K.M.; Kumar, A.; Fradley, M.; Shoukas, A.A.; Berkowitz, D.E.; Hare, J.M. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. (2003) *Circ. Res.*; **92**:1322.
- Kisch, B. A significant electron microscopic difference between the atria and the ventricles of the mammalian heart. (1963) *Exp. Med. Surg.*; **21**:193-221
- Klebanov, S., Herlihy, J.T., Freeman, G.L. Effect of long-term food restriction on cardiac mechanism. (1997) *Am. J. Physiol.*; **273**:H2333-2342
- Koehler, K.F., Helguero, L.A., Haldosen, L.A., Warner, M., Gustafsson, J.A. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. (2005) *Endocr. Rev.*; **26**:465-478
- Koeslag, J.H., Saunders, P.T., Wessels, J.A. The chromogranins and the counter-regulatory hormones: do they make homeostatic sense? (1999) *J Physiol.*; **517(Pt 3)**:643-9
- Kohr, M.J., Wang, H., Wheeler, D.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., Ziolo, M.T. Targeting of phospholamban by peroxynitrite decreases {beta}-adrenergic stimulation in cardiomyocytes. (2008) *Cardiovasc Res*; **77 (2)**:353-61
- Kojda, G., Kottenberg, K., Nix, P., Schluter, K.D., Piper, H.M., Noack, E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. (1996) *Circ Res*; **78 (1)**:91-101
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. (1985) *Annu Rev Biochem*; **54**: 631-664
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. (1997) *Endocrinology*; **138**:863-870

- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **93**:5925–5930
- Lakoski, S.G., Herrington, D.M., Effects of oestrogen receptor-active compounds on lipid metabolism. (2005) *Diabetes Obes. Metab.*; **7**:471–477.
- Lantin-Hermoso, R.L., Rosenfeld, C.R., Yuhanna, I.S., German, Z., Chen, Z., Shaul, P.W. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. (1997) *Am J Physiol.*; **273(1 Pt 1)**:L119-26
- Lawlor, D.A., Timpson, N., Ebrahim, S., Day, I.N.M., Smith, G.D. The association of oestrogen receptor alpha-haplotypes with cardiovascular risk factors in the British Women's Heart and Health Study. (2006) *Eur. Heart J.*; **27**:1597–1604
- Leblais, V., Su-Hyun, J., Khalid, C., Maltsev, V., Zheng, M., Crow, M.T. Phosphatidylinositol 3-Kinase Offsets cAMP-Mediated Positive Inotropic Effect via Inhibiting Ca²⁺ Influx in Cardiomyocytes (2004) *Circ Res.*; **95**:1183-1190
- Legssyer, A.K., Hove-Madsen, L., Hoerter, J., Fischmeister, R. Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca²⁺ current in the rat. (1997) *J. Mol. Cell. Cardiol.*; **29**: 579-591
- Leung, S.W., Teoh, H., Keung, W., Man, R.Y. Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways. (2007) *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; **34(8)**:822-6, 2007.
- Levin, E.R. Cellular functions of the plasma membrane oestrogen receptor. (1999) *Trends Endocrinol. Metab.*; **10**:374–377
- Li, L., Haynes, M.P., Bender, J.R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **100**:4807–4812
- Li, L., Jaime, D., Guoxiang, C., Evangelia, G.K., Donald, M.B.. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in b-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. (2000) *Am J Physiol.*; **278**:H769–H779
- Lieberherr, M., Grosse, B., Kachkache, M., Balsan, S. Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. (1993) *J Bone Miner Res.*; **8(11)**:1365-76
- Ling, S., Komesaroff, P., Sudhir, K., Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. (2006) *Clinical Science*; **111**:107–118
- Lissin, L.W., Cooke, J.P. Phytoestrogens and cardiovascular health (2000) *J. Am. Coll. Cardiol.*; **35**:1403–1410
- Longcope, C., Herbert, P.N., McKinlay, S.M., Goldfield, S.R. The relationship of total and free estrogens and sex hormone-binding globulin with lipoproteins in women. (1990) *J Clin Endocrinol Metab.*; **71(1)**:67-72
- Lorell, B.H. Significance of diastolic dysfunction of the heart. (1991) *Ann. Rev. Med.*; **42**:411-436

- Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Corti, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis D., Metz-Boutigue M.-H. Antibacterial and Antifungal Activities of Vasostatin-1, the N-terminal Fragment of Chromogranin. (2000) *A. J. Biol. Chem.*; **275**:15
- Luo, J., Jankowski, V., Henning, L., Schlüter, H., Zidek, W., Jankowski, J. Endogenous coenzyme A glutathione disulfide in human myocardial tissue. *J Endocrinol Invest.*; **29 (8)**:688-93
- MacDonald, P.C., Madden, J.D., Brenner, P.F., Wilson, J.D., Siiteri, P.K. Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. (1979) *J Clin Endocrinol Metab.*; **49(6)**:905-16
- MacRitchie, A.M., Jun, S.S., Chen, Z. German, Z., Yuhanna, I.S., Sherman, T.S., Shaul, P.W. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. (1997) *Circ Res*; **81**:355–362.
- Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A.G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A.M., Picard, D., Andò, S. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. (2004) *J Biol Chem*; **279**:27008-27016
- Mahapatra, N.R., O'Connor, D.T., Vaingankar, S.M., Hikim, A.P., Mahata, M., Ray, S., Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Ross, J., Mahata, S.K. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. (2005) *J Clin Invest.*; **115 (7)**:1942-52
- Massion, P.B., 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
- Massion, P.B., Feron, O., Dessy, C., Balligand, J.L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. (2003) *Circ Res*; **93**:388–98
- Mattiazzi, A., Mundina-Weilenmann, C., Vittone, L., Said, M., Kranias, E.G. The importance of the Thr17 residue of phospholamban as a phosphorylation site under physiological and pathological conditions. (2006) *Braz J Med Biol Res* **39**: 563–572
- McEwen, B.S., Alves, S.E. Estrogen actions in the central nervous system. (1999) *Endocr Rev*; **20**:279-307
- McNutt, N.S., Fawcett, D.W. The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrial muscle. (1969) *J Cell Biol*; **42**:46–67
- McVicar, D.W., Li, F., McCrady, C.W., Merchant, R.E. A comparison of serum-free media for the support of in vitro mitogeninduced blastogenic expansion of cytolytic lymphocytes. (1991) *Cytotechnology*; **6 (2)**:105-113
- Mendelsohn, M.E. Genomic and Nongenomic Effects of Estrogen in the Vasculature (2002) *Am J Cardiol*; **90(suppl)**:3F–6F
- Mendelsohn, M.E., Karas, R.H., The protective effects of oestrogen on the cardiovascular system. (1999) *N. Engl. J. Med.*; **340**:1801–1811

- Metz-Boutigue, M-H., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti, R., and Aunis, D. Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. (1993) *Eur J Biochem*; **217**:247-257
- Meyers, M.J., Sun, J., Carlson, K.E., Marriner, G.A., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: Structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. (2001) *J Med Chem*; **44**:4230-4251
- Milan, G., Granzotto, M., Scarda, A., Calcagno, A., Pagano, C., Federspil, G. & Vettor, R. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. (2002) *Obes Res*; **10**:1095-1103
- Miserez, B., Annaert, W., Dillen, L., Aunis, D., De Potter, W. Chromogranin A processing in sympathetic neurons and release of chromogranin A fragments from sheep spleen. (1992) *FEBS Lett*; **314**:122-124
- Mongillo, M., Tocchetti, C.G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y.F., Dostmann, W.R., Pozzan, T., Kass, D.A., Paolocci, N., Houslay, M.D., Zaccolo, M. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. (2006) *Circ Res*; **98**:226-234
- Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., Trochu, J.N., Gauthier, C., Balligand, J.L. Upregulation of beta (3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. (2001) *Circulation*; **103**:1649-1655
- Musialek, P., Lei, M., Brown, H.F., Paterson, D.J., Casadei, B. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I_h. (1997) *Circ Res*; **81**:60-68
- Muth, E., Driscoll, W.J., Smalstig, A., Goping, G., Mueller, G.P. Proteomic analysis of rat atrial secretory granules: a platform for testable hypotheses. (2004) *Biochim Biophys Acta*; **1699**:263-275.
- Neidhold, S., Eichhorn, B., Kasper, M., Ravens, U., Kaumann, A.J. The function of alpha- and betaadrenoceptors of the saphenous artery in caveolin-1 knockout and wild-type mice. (2007) *Br J Pharmacol* **150**, 261-270
- Nikolic, I., Liu, D., Bell, J.A., Collins, J., Steenbergen, C., Murphy, E. Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective. (2007) *J Mol Cell Cardiol*; **42**:769-780
- Nilsson S, Gustafsson JA 2002 Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37:1-28
- Nobels, F.R., Kwekkeboom, D.J., Bouillon, R., Lamberts, S.W. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. (1998) *Eur J Clin Invest*; **28**:431-440
- Norfleet, A.M., Clarke, C.H., Gametchu, B., Watson, C. Antibodies to the estrogen receptor- α modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptor. (2000) *FASEB J*; **14**:157-165

- Nuedling, S., Kahlert, S., Loebbert, K., Doevendans, P.A., Meyer, R., Vetter, H. and Grohe, C. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. (1999) *Cardiovasc. Res.*; **43**:666-674
- O'Connor, D.T. Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum. (1983) *Regul Pept*; **6**:263-280
- O'Connor, D.T., Pandlan, M.R., Carlton, E., Cervenka, J.H., Hslao, R.J. Rapid radioimmunoassay of circulating chromogranin A: in vitro stability, exploration of the neuroendocrine character of neoplasia, and assessment of the effects of organ failure. (1989) *Clin Chem*; **35**:1631-1637
- O'Donnell, A.J.M., Macleod, K.G., Burns, D.J., Smyth, J.F., Langdon, S.P. Estrogen receptor a mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. (2005) *Endocr Relat Cancer*; **12**:851-66
- Omland, T., Dickstein, K., and Syversen, U. Association between plasma chromogranin A concentration and long-term mortality after myocardial infarction. (2003) *Am J Med*; **114 (1)**:25-30
- Palade, G.E. Secretory granules in the atrial myocardium. (1961) *Anat Rec.*; **139**:262
- Pellat, C., Henry, Y., Drapier, J.C. IFN-gamma-activated macrophages: detection by electron paramagnetic resonance of complexes between L-arginine-derived nitric oxide and non-heme iron proteins. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **166 (1)**:119-125
- Pieroni, M., Corti, A., Tota, B., Curnis, F., Angelone, T., Colombo, B., Cerra, M.C., Bellocchi, F., Crea, F., Maseri, A. Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. (2007) *Eur Heart J.*; **28 (9)**:1117-27
- Pietras, R.J., Szego, C.M. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. (1980) *Biochem J*; **191**: 743-760
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., Safe, S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. (1997) *Mol Endocrinol*; **11**: 1569-1580
- Raddino. R., Manca. C., Poli, E., Bolognesi, R., Visioli, O. Effect of 17 beta-estradiol on the isolated rabbit heart. (1986) *Arch Int Pharmacodyn Ther*; **281**:57-65
- Razandi, M., Pedram, A., Park, S.T., Levin, E.R. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. (2003) *J. Biol. Chem.*; **278**:2701-2712
- Razandi, M., Pedream, A., Greene, G., Levin, E.R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: Studies of ERa and ERb expressed in Chinese hamster ovary cells. (1999) *Mol. Endocrinol.*; **13**:307-319

- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. (2005) *Science*; **307**:1625–1630
- Seddon, M., Shah, A.M., Casadei, B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. (2007) *Cardiovasc Res.*; **75 (2)**:315-26
- Shah, A.M. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. (1996) *Cardiovasc Res.*; **31 (6)**:847-67
- Shah, A.M., Prendergast, B.D., Grocott-Mason, R., Lewis, M.J., Paulus, P.J. The influence of endothelium derived nitric oxide on myocardial contractile function. (1995) *Int J Cardiol* **50**:225–231
- Shaul, P.W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. (2002) *Annu Rev Physiol*; **64**:749–74
- Shearman, A.M., Cupples, L.A., Demissie, S., Peter, I., Schmid, C.H., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Housman, D.E., Levy, D. Association between estrogen receptor α gene variation and cardiovascular disease. (2003) *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*; **290**:2263–2270
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. (1998) *Cell*; **95**:927–937.
- Shiojima, I., Walsh, K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. (2002) *Circ Res*; **90**:1243–50
- Shughrue, P.J., Askew, G.R., Dellovade, T.L., Merchenthaler, I. Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain. (2002) *Endocrinology*; **143**:1643–50
- Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., Liao, J.K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol- 3-OH kinase. (2000) *Nature*; **407**:538–541
- Sirimanne, S.R., May, S.W. Interaction of nonconjugated olefinic substrate analogues with dopamine beta-monooxygenase: catalysis and mechanism-based inhibition. (1995) *Biochem J*; **306(1)**: 77–85
- Sitzler, G, Lenz, O, Kilter, H, La Rosee, K., Bohm, M. Investigation of the negative inotropic effects of 17 beta-oestradiol in human isolated myocardial tissues. (1996) *Br J Pharmacol*; **119**:43-48
- Skeberdis, V.A. Structure and function of beta3-adrenergic receptors. (2004) *Medicina (Kaunas)*; **40**:407–413
- Snyder, S.H. Nitric oxide. No endothelial NO. (1995) *Nature*; **377(6546)**:196-7
- Stauffer, S.R., Coletta, C.J., Tedesco, R., Nishiguchi, G., Carlson, K., Sun, J., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A. Pyrazole ligands: Structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. (2000) *J Med Chem*; **43**:4934-4947

- Steiner, H.J., Weiler, R., Ludescher, C., Schmid, K.W., Winkler, H. Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. (1990) *J Histochem Cytochem*; **38**:845–850
- Strub, J.M., Garcia-Sablone, P., Lonning, K., Taupenot, L., Hubert, P., Van Dorsselaer A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H. Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla: identification of secretolytin, the endogenous 614-626 C-terminal fragment with antibacterial activity. (1995) *Eur. J. Biochem*; **229**:356-368
- Strub, J.M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H. Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. (1996) *J Biol Chem*; **271(45)**:28533-28540
- Su, Z., Blazing, M.A., Fan, D., George, S.E. The calmodulin-nitric oxide synthase interaction. Critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. (1995) *J Biol Chem*; **270(49)**:29117-22
- Sudhir, K., Chou, T.M., Chatterjee, K., Smith, E.P., Williams, T.C., Kane, J.P., Malloy, M.J., Korach, K.S., Rubanyi, G.M. Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. (1997) *Circulation*; **96**:3774–3777
- Sudhir, K., Chou, T.M., Messina, L.M., Hutchison, S.J., Korach, K.S., Chatterjee, K., Rubanyi, G.M. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. (1997) *Lancet*; **349**:1146–1147
- Sun, J., Meyers, M.J., Fink, B.E., Rajendran, R., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S. Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor α or estrogen receptor- β . (1999) *Endocrinology*; **140**:800-80413.
- Sun, J., Picht, E., Ginsburg, K.S., Bers, D.M., Steenbergen, C., Murphy, E. Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca $^{2+}$ channel α 1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. (2006) *Circ Res*; **98 (3)**:403–11
- Sutherland, F.J., Hearse, D.J. The Isolated blood and perfusion fluid perfused heart. (2000) *Pharmacol. Res.*; **41**:613-627
- Taupenot, L., Harper, K.L., O'Connor, D.T. The chromogranin–secretogranin family. (2003) *N Engl J Med*; **348**:1134–1149
- Tesarik, J., Mendoza, C. Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. (1995) *J Clin Endocrinol Metab*; **80**: 1438–1443
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. (2005) *Endocrinology*; **146**:624-632

- Tocchetti, C.G., Wang, W., Froehlich, J.P., Huke, S., Aon, M.A., Wilson, G.M., Di Benedetto, G., O'Rourke, B., Gao, W.D., Wink, D.A., Toscano, J.P., Zaccolo, M., Bers, D.M., Valdivia, H.H., Cheng, H., Kass, D.A., Paolocci, N. Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-cycling. (2007) *Circ Res*; **100** (1):96–104
- Toran-Allerand, C.D., Guan, X., MacLusky, N.J., Horvath, T.L., Diano, S., Singh, M., Connolly Jr., E.S., Nethrapalli, I.S., Tinnikov, A.A. ERX: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. (2002) *J. Neurosci.*; **22**:8391–8401
- Toran-Allerand, C.D., Oestrogen and the brain: beyond ER-alpha and ER-beta. (2004) *Exp. Gerontol.*; **39**:1579–1586
- Toran-Allerand, C.D., Oestrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-oestradiol. (2005) *Ann. NY Acad. Sci.*; **1052**:136–144
- Toran-Allerand, C.D. A plethora of estrogen receptors in the brain: Where will it end?. (2004) *Endocrinology*; **145**:1069–74
- Tota, B., Mazza, R., Angelone, T., Nullans, G., Metz- Boutigue, M.H., Aunis, D., Helle, K.B. Peptides from the N-terminal domain of chromogranin A (vasostatins) exert negative inotropic effects in the isolated frog heart. (2003) *Regul Pept*; **114**:123–130
- Truss, M., Beato, M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. (1993) *Endocr Rev*; **14**:459–79
- Varghese, P., Harrison, R.H., Lofthouse, R.A., Georgakopoulos, D., Berkowitz, D.E., Hare, M. b3-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. (2000) *J Clin Invest*; **106**:697–703
- Verboomen H, Wuytack F, De Smedt H, Himpens B, Casteels R (1992) Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J.* 286 (Pt 2):591–595
- Vittone, L., Mundiña-Weilenmann, C., Mattiazzi, A., Cingolani, H. Physiologic and pharmacologic factors that affect myocardial relaxation. (1994) *J Pharmacol Toxicol Methods*; **32**:7-18
- Vittone, L., Mundiña-Weilenmann, C., Said, M., Ferrero, P. & Mattiazzi, A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. (2002) *J Mol Cell Cardiol* **34**:39–50
- Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Albanito, L., Madeo, A, Rago, V., Carpino, A., Musti, A.M., Picard, D., Andò, S., Maggiolini, M. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30. (2006) *Mol Pharmacol*; **70**:1414-1423
- Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Recchia, A.G., Musti, A.M., Picard, D., Andò, S., Maggiolini, M. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative

- effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. (2006) *Mol Endocrinol*; **20**:631-646
- Walsh, E.K., Huang, H., Wang, Z., Williams, J., de Crom, R., van Haperen, R., Thompson, C.I., Lefer, D.J., Hintze, T.H. Control of myocardial oxygen consumption in transgenic mice overexpressing vascular eNOS. (2004) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **287** (5):H2115-21
- Weiergraber, M., Pereverzev, A., Vajna, R., Henry, M., Schramm, M., Nastainczyk, W., Grabsch, H., Schneider, T. Immunodetection of alpha1E voltage-gated Ca (2+) channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart and in distal tubules of human kidney. (2000) *J Histochem Cytochem*; **48**:807-819
- Williams, J.C., Armesilla, A.L., Mohamed, T.M.A., Hagarty, C.L., McIntyre, F.H., Schomburg, S., Zaki, A.O., Oceandy, D., Cartwright, E.J., Buch, M.H., Emerson, M., Neyses, L. The sarcolemmal calcium pump, a-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. (2006) *J Biol Chem*; **281**:23341-8
- Williams, J.K., Adams, M.R., Herrington, D.M., Clarkson, T.B. Short term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. (1992) *J Am Coll Cardiol*; **20**:452-457
- Wink, D.A., Mitchell, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*; **25**:434
- Wyckoff, M.H., Chambliss, K.L., Mineo, D., Yuhanna, I.S., Mendelsohn, M.E., Mumby, S.M., Shaul, P.W. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). (2001) *J Biol Chem*; **276**:27071-27076
- Xiang, Y., Rybin, V.O., Steinberg, S.S., Kobilka, B. Caveolar localization dictates physiologic signaling of 2 adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. (2002) *J Biol Chem.*; **277**:34280-34286
- Xu, K.Y., Huso, D.L., Dawson, T.M, Bredt, D.S., Becker, L.C. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**:657-62
- 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. Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. (2003) *J Biol Chem*; **278**:41798-803
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. (1988) *Nature*; **332(6163)**:411-415
- Yanaihara, H., Hata, M., Nishikawa, Y., Hoshino, M., Yanaihara, N., Murai, M. Application of region-specific immunoassay for human chromogranin A: substantial clue for detection and measurement of chromogranin A in human plasma. (1999) *Regul Pept*; **80 (1-2)**:83-90

- Yu, H.P., Hsieh, Y.C., Suzuki, T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., Bland, K.I., Chaudry, I.H. The PI3K/Akt pathway mediates the nongenomic cardioprotective effects of estrogen following trauma-hemorrhage. (2007) *Ann Surg*; **245(6)**:971-7
- Zhag, K., Rao, F., Wen, G., Salem, R.M., Vaingankar, S., Mahata, M., Mahapatra, N.R., Lillie, E.O., Cadman, P.E., Friese, R.S., Hamilton, B.A., Hook, V.Y., Mahata, S.K., Taupenot, L., O'Connor, D.T. Catecholamine storage vesicles and the metabolic syndrome: The role of the chromogranin A fragment pancreastatin. (2006) *Diabetes Obes Metab.*; **8 (6)**:621-33
- Zhang R, Zhao J, Potter, JD. (1995) Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca²⁺ affinity of cardiac troponin C. *J Biol Chem* 270:30773–30780
- Zhang, Y.H., Zhang, M.H., Sears, C.E., Emanuel, K., Redwood, C., El-Armouche, A., Kranias, E.G. & Casadei, B. Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. (2007) *Circ Res.*; **102(2)**:242-9
- Zhang, Z.S., Cheng, H.J., Onishi, K., Ohte, N., Wannenburg, T. & Cheng, C.P. Enhanced inhibition of L-type Ca²⁺ current by beta₃-adrenergic stimulation in failing rat heart. (2005) *J Pharmacol Exp Ther* **315**:1203–1211
- Zheng, M., Streck, R.D., Scott, R.E., Seidah, N.G., Pintar, J.E. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. (1994) *J Neurosci*; **14**:4656–4673.
- Ziolo, M.T., Bers, D.M. The real estate of NOS signaling: location, location, location. (2003) *Circ Res*; **92 (12)**:1279–81
- Ziolo, M.T., Katoh, H., Bers, D.M. Positive and negative effects of nitric oxide on Ca²⁺ sparks: influence of beta-adrenergic stimulation. (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **281 (6)**:H2295–303

Al termine di questa faticosa ma piacevole “avventura scientifica”, desidero ringraziare la Prof. Maria Carmela Cerra che ha coordinato il mio lavoro di ricerca in questi tre anni inserendomi in un lavoro per me molto interessante e stimolante. La sua professionalità e la sua disponibilità mi sono state d’aiuto in anni così fruttuosi ma allo stesso tempo così duri.

Un ringraziamento speciale va al Dott. Tommaso Angelone per la sua amicizia e per i consigli che hanno contribuito alla mia formazione e crescita nel campo professionale.

Un sincero ringraziamento va a tutti coloro che, in momenti diversi e in vari modi, mi sono stati vicini incoraggiandomi in questo cammino e contribuendo a farmi credere nelle mie possibilità e a perseguire le mie ambizioni. GRAZIE.

Elisabetta

Pubblicazioni scientifiche

Angelone, T., **Filice, E.**, Quintieri A., Imbrogno S., Recchia A. G., Pulera' E., Mannarino C., Pellegrino D., Cerra M. C. Beta3-adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway (2008) *Acta Physiol*; **193**: 229-239.

Cerra, M.C., Gallo, M., Angelone, T., Quintieri, A., Pulerà, E., **Filice, E.**, Guérolde, B., Shooshtarizadeh, P., Levi, R., Ramella, R., Brero, A., Boero, O., Metz-Boutigue, M.H., Tota, B., Alloatti, G. 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 (2008) *FASEB J*; **22(11)**:3992-4004.

Recchia, A.G., **Filice, E.**, Pellegrino, D., Dobrina, A., Cerra, M.C., Maggiolini, M. Endothelin-1 induces Connective Tissue Growth Factor expression in cardiomyocytes (2008) *J Mol Cell Cardiol. In press*

β_3 -Adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway

T. Angelone,^{1,2} E. Filice,¹ A. M. Quintieri,¹ S. Imbrogno,² A. Recchia,¹ E. Pulerà,² C. Mannarino,² D. Pellegrino¹ and M. C. Cerra^{1,2}

¹ Department of Pharmaco-Biology, University of Calabria, Arcavacata di Rende (CS), Italy

² Department of Cell Biology, University of Calabria, Arcavacata di Rende (CS), Italy

Received 29 March 2007,
revision requested 27 May 2007,
final revision received 3 January
2008,
accepted 8 January 2008
Correspondence: M. C. Cerra,
Department of Pharmaco-Biology,
University of Calabria, 87030
Arcavacata di Rende (CS), Italy.
E-mail: cerramc@unical.it

Abstract

Aims: Using a model of isolated and Langendorff-perfused rat heart we analysed whether activation of β_3 -adrenergic receptors (β_3 -ARs) influences ventricular lusitropic performance. We also focused on the NOS/NO/cGMP/PKG cascade as the signal transduction mechanism.

Methods: Hearts were treated with increasing concentrations (from 10^{-12} to 10^{-6} M) of BRL₃₇₃₄₄, a selective β_3 -AR agonist, and cardiac performance was evaluated by analysing both lusitropic parameters and coronary motility. Cardiac preparations were also perfused with BRL₃₇₃₄₄ in the presence of either isoproterenol (ISO) or nadolol, or pertussis toxin (PTx), or selective inhibitors of the NOS/NO/cGMP/PKG pathway.

Results: BRL₃₇₃₄₄ caused a significant concentration-dependent reduction in $(LVdP/dt)_{min}$, a decrease in half time relaxation significant starting from 10^{-12} M, and an increase in $(LVdP/dt)_{max}/(LVdP/dt)_{min}$ ratio (T/t). BRL₃₇₃₄₄ abolished the ISO-mediated positive lusitropism. β_3 -AR-dependent effects on relaxation were insensitive to β_1/β_2 -AR inhibition by nadolol (100 nM), and were abolished by $G_{i/o}$ protein inhibition by PTx (0.01 nM). NO scavenging by haemoglobin (10 μ M), and nitric oxide synthase (NOS) inhibition by NG-monomethyl-L-arginine (10 μ M) revealed the involvement of NO signalling in BRL₃₇₃₄₄ response. Pre-treatment with inhibitors of either soluble guanylate cyclase (ODQ; 10 μ M) or PKG (KT₅₈₂₃; 100 nM) abolished β_3 -AR-dependent negative lusitropism. In contrast, anantin (10 nM), an inhibitor of particulate guanylate cyclase, did not modify the effect of BRL₃₇₃₄₄ on relaxation.

Conclusion: Taken together, our findings provide functional evidence for β_3 -AR modulation of ventricular relaxation in the rat heart which involves PTx-sensitive inhibitory Gi protein and occurs via an NO-cGMP-PKG cascade. Whether the effects of β_3 -AR stimulation on lusitropism are beneficial or detrimental remains to be established.

Keywords β_3 -adrenoceptors, isoproterenol, lusitropism, nitric oxide, pertussis toxin, rat heart.

Cardiac muscle relaxation (lusitropism) is an active process that substantially contributes to optimal cardiac performance. It starts towards the end of the ejection and continues throughout the isovolumic period until the opening of atrio-ventricular valves (Vittone *et al.* 1994 and references therein). By allowing the myocar-

dium to return to precontractile conditions of length and force, it controls diastolic filling, and thus contractility (inotropism). Many endogenous and exogenous substances, both under physiological conditions and in the presence of pathological challenges, are able to interfere with relaxation either decelerating (negative

lusitropic) or hastening (positive lusitropic) it. An example is catecholamines and catecholaminergic drugs that, by interacting with α - and β -adrenergic receptors (ARs), actively regulate not only inotropism, but also lusitropism (see Vittone *et al.* 1994 for references; Li *et al.* 2000). This is the case of the unspecific β_1/β_2 agonist isoproterenol (ISO) that, by acting on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump activity, on the rate of phospholamban (PLB) phosphorylation/dephosphorylation, and to a lesser extent on troponin I sensitivity to Ca^{2+} , induces the heart to relax faster (Li *et al.* 2000). Recently, the cardiac pool of ARs has been enriched by a novel receptor type, called β_3 -AR, which shares a high homology with β_1 - and β_2 -ARs (51% and 46% identity respectively; Skeberdis 2004), and belongs to the superfamily of G-protein-coupled receptors (Gauthier *et al.* 2000). It is activated by pathophysiological concentrations of noradrenaline, in the presence of α_1 -, and β_1 -, β_2 -AR block (Gauthier *et al.* 1998), and by selective agonists (i.e. BRL₃₇₃₄₄, SR₅₈₆₁₁, CGP₁₂₁₇₇, CL₃₁₆₂₄₃), which exert almost irrelevant effects on β_1 - and β_2 -ARs (Skeberdis 2004).

β_3 -ARs have been functionally detected in the heart of both mammalian (i.e. dog, guinea-pig, rat, human; Gauthier *et al.* 1999) and non-mammalian (e.g. the teleost *Anguilla anguilla*; Imbrogno *et al.* 2006) vertebrates. In particular, in the mammalian heart, important differences, depending on the species and/or the anatomical region within the myocardium, have been observed in response to β_3 -AR activation (Gauthier *et al.* 2000). For example, in human ventricle, β_3 -AR stimulation via BRL₃₇₃₄₄, SR_{58611A} and CL₃₁₆₂₄₃ leads to a negative inotropism associated with reduced action potential amplitude and duration (Gauthier *et al.* 1996). Also in dog, all β_3 -AR agonists induce a negative inotropic effect that is less pronounced than in human heart (Gauthier *et al.* 1999). Contrarily, rat and guinea-pig hearts only respond to BRL₃₇₃₄₄ (rat) and CL₃₁₆₂₄₃ (guinea-pig), showing a 20–30% decrease in peak tension (Gauthier *et al.* 1999). On the other hand, no effects have been detected in human atrial preparations expressing the β_3 -AR subtype (Chamberlain *et al.* 1999), and in ferret (Gauthier *et al.* 1999).

Such interspecies variability and heterogeneous pharmacological profile of β_3 -AR agonists were correlated with the cardiac expression of the receptor (Gauthier *et al.* 1999). To this end, recent multitechnique studies identified in the rat heart remarkable levels of β_3 -AR mRNA and protein (Dincer *et al.* 2001), as well as the cell surface expression of ventricular β_3 -ARs (Barbier *et al.* 2004). Interestingly, receptor expression increased under pathological challenges, such as in streptozotocin-induced diabetic rats (Dincer *et al.* 2001).

The transduction pathways of the β_3 -AR-induced negative inotropism are currently under investigation. In

human ventricular muscle, β_3 -AR effect on contractility requires activation of Gi proteins (Gauthier *et al.* 1996) and endothelial nitric oxide synthase (NOS)-dependent NO production (Gauthier *et al.* 1998, Varghese *et al.* 2000). The subsequent increase in intracellular cGMP short-circuits on phosphodiesterase₂ (PDE₂), thus decreasing cAMP. This generates a β_3 -AR/NO/cGMP negative feedback which limits β_1 -cAMP-dependent effects (Mongillo *et al.* 2006). Interestingly, cardiac β_3 -AR signalling appears phylogenetically conserved. In fact, we recently demonstrated in *A. anguilla* that β_3 -AR activation decreases cardiac mechanical performance through a pertussis toxin (PTx)-sensitive Gi protein mechanism which involves a NO-cGMP-cGMP-activated protein kinase (PKG) cascade (Imbrogno *et al.* 2006).

In spite of the increasing studies aimed at elucidating both the intimate mechanisms of β_3 -AR inotropic control of the heart and its putative clinical and therapeutic implication, no data are currently available on the role of β_3 -ARs on lusitropism. The present research investigated whether, in the rat heart, β_3 -AR activation affects ventricular relaxation. For this purpose we utilized the rat heart isolated and perfused according to Langendorff which represents a well-suited approach to analyse lusitropism. In fact, as the ventricular systole occurs at isovolumic conditions, it is possible to evaluate the relaxation performance without the influence of contraction (Vittone *et al.* 1994). We also analysed the downstream transduction mechanism, mainly focusing on NOS/NO/cGMP/PKG signalling.

Results indicate that β_3 -AR stimulation induces negative lusitropism; this effect couples with PTx-sensitive inhibitory Gi protein and occurs via an NO-cGMP-PKG cascade.

Materials and methods

Animals

We used male Wistar rats (Morini, Bologna, Italy) weighing 220–250 g. Animal care, killing and experiments were supervised according to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe No. 123, Strasbourg, 1985). Rats were anaesthetized with ethyl carbamate (2 g kg⁻¹ body weight, i.p.). Hearts were rapidly excised and processed for the specific protocol.

Isolated heart preparation

Excised hearts were immediately transferred in ice-cold buffered Krebs-Henseleit solution (KHs). Aorta was immediately cannulated with a glass cannula and

connected with the Langendorff apparatus to start perfusion at a constant flow rate of 12 ml min⁻¹. To avoid fluid accumulation, the apex of the left ventricle (LV) was pierced. A water-filled latex balloon, connected to a BLPR gauge (Wolfram Research, Champaign, IL, USA), was inserted through the mitral valve into the LV to allow isovolumic contractions and to continuously record mechanical parameters. The balloon was progressively filled with water up to 80 μ L to obtain an initial left ventricular end diastolic pressure of 5–8 mmHg (Cerra *et al.* 2006 and references therein). Coronary pressure (CP) was recorded using another pressure transducer located just above the aorta. The perfusion solution consisted of a modified non-recirculating KHs containing (in mM): NaCl, 113; KCl, 4.7; NaHCO₃, 25; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 1.8; KH₂PO₄, 1.2; glucose, 11; mannitol, 1.1; Na-pyruvate, 5. pH was adjusted to 7.4 with NaOH and the solution was equilibrated at 37 °C by 95% O₂–5% CO₂. Haemodynamic parameters were assessed using a PowerLab data acquisition system and analysed using a chart software (both purchased from ADInstruments, Basile, Italy).

Experimental protocols

Basal conditions. The performance of the rat heart was evaluated by analysing the left ventricular pressure (LVP, in mmHg), which is an index of contractile activity, the rate-pressure product (RPP), an index of cardiac work (Georget *et al.* 2003), the maximal values of the first derivative of LVP [(LVdP/dt)_{max}] (mmHg s⁻¹), which indicates the maximal rate of left ventricular contraction, time to peak tension of isometric twitch, the maximal rate of left ventricular pressure decline of LVP [(LVdP/dt)_{min}] (mmHg s⁻¹), the half time relaxation (HTR) (s), which is the time required for intraventricular pressure to fall from the peak to 50% (Brutsaert & Sys 1989) and the *T*/*t* ratio obtained by (LVdP/dt)_{max}/(LVdP/dt)_{min} (Vittone *et al.* 1994). Each heart was electrically paced at a frequency which corresponds to its spontaneous (non-paced) beating rate. The mean CP (mmHg) was calculated as the average of values obtained during several cardiac cycles (Cerra *et al.* 2006).

Drug application

BRL-stimulated preparations. To test desensitization of β_3 -ARs, we preliminarily perfused the hearts with single repeated doses of BRL₃₇₃₄₄ (10 nM). Experiments revealed the absence of desensitization. Thus, concentration–response curves were obtained by perfusing the cardiac preparation with KHs enriched with increasing concentrations of BRL₃₇₃₄₄ (from 10⁻¹² to 10⁻⁶ M) for 10 min.

β_1 - β_2 receptors and G_{i/o} protein involvement. To obtain information about the involvement of β_1 - β_2 and α receptors on the lusitropic effect induced by BRL₃₇₃₄₄, cardiac preparations, stabilized for 20 min with KHs, were perfused with nadolol (100 nM), SR₅₉₂₃₀ (100 nM), L₇₄₈₃₃₇ (100 nM) or phentolamine (1 μ M) for 10 min and then washed-out with KHs. After returning to control conditions, each heart was perfused with KHs containing a single concentration of BRL₃₇₃₄₄ (10 nM) plus nadolol (100 nM), SR₅₉₂₃₀ (100 nM) phentolamine (1 μ M) for another 10 min.

To verify the involvement of G_{i/o} proteins in the lusitropic action of β_3 -receptor activation, the hearts were pre-incubated for 60 min with KHs enriched with PTx (0.01 nM) and then exposed for 10 min to 10 nM of BRL₃₇₃₄₄. As shown in the rat heart (Angelone *et al.* 2006 and references therein), PTx catalyses the ADP ribosylation of the α -subunit of G_{i/o} proteins and uncouples the interaction between Gi and inhibitory receptors of adenylate cyclase, such as adrenergic receptors.

Isoproterenol-stimulated preparations. Cardiac preparations, stabilized for 20 min with KHs, were perfused with 5 nM ISO for 10 min and then washed-out with KHs. After returning to control conditions, each heart was perfused with KHs containing a single concentration of either BRL₃₇₃₄₄ (10 nM) or carbachol (10 nM) plus ISO (5 nM) for another 10 min.

NO pathway inhibitor-stimulated preparations. To obtain preliminary information about the involvement of the NO pathway on the lusitropic action of BRL₃₇₃₄₄, hearts, stabilized for 20 min with KHs, were perfused with BRL₃₇₃₄₄ (10 nM) for 10 min and then washed-out with KHs. After returning to control conditions, each heart was perfused with KHs containing the NOS inhibitor NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (10 μ M) or haemoglobin (Hb; NO scavenger) (10 μ M), or the soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3a] quinoxalin-1-one) (10 μ M), or the particulate guanylate cyclase inhibitor anantin (10 nM) or the PKG blocker KT₅₈₂₃ (100 nM). Hearts were then exposed to the specific drug plus 10 nM of BRL₃₇₃₄₄. The antagonist concentration was selected on the basis of the results of preliminary concentration–response curves as the highest dose that did not significantly affect cardiac performance.

Heart tissue homogenate preparation and RT-PCR analysis

Hearts (*n* = 6) were homogenized with a motor-driven homogenizer prior to RNA extraction. Total RNA was extracted with the Trizol reagent according to the

manufacturer's protocol. Each RNA sample was treated with DNase I (Ambion, Austin, TX, USA), and purity and integrity of the RNA were confirmed spectroscopically and by gel electrophoresis before use. RT-PCR was performed as described by Maggiolini *et al.* (1999). The primers for β_3 -AR were sense: 5'-GCAACCTGCTGGTAATCACA-3', reverse: 5'-GGATTGGAGTGACACTCTTG-3', and for adiponectin (ADP) sense: 5'-CTACTGTTGCAAGCTCTCC-3', reverse: 5'-CTT-CACATCTTTCATGTACACC-3', to amplify fragments of 418 and 523 base pairs respectively. The PCR products along with the molecular-weight markers were separated on a 1.2 % agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Drugs and chemicals

BRL₃₇₃₄₄, ISO, nadolol, phentolamine, carbachol, SR₅₉₂₃₀, L-NMMA ([NG-monomethyl-L-arginine]), ODQ ([1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]), anantin, Hb, KT₅₈₂₃ and PTx were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA); L₇₄₈₃₃₇ was purchased from Merck Research Laboratories (Rahway, NJ, USA). BRL37344, ISO, carbachol, phentolamine, L-NMMA, Hb and PTx were prepared in double-distilled water; nadolol was prepared in methanol; ODQ, SR₅₉₂₃₀ were prepared in DMSO; anantin was prepared in acetic acid; KT₅₈₂₃ was prepared in ethyl acetate. Dilutions were made in KHs immediately before use.

Statistics

Data are expressed as mean \pm SEM. Significance of differences from control values and comparison between groups were calculated by one-way ANOVA. Differences were considered to be statistically significant for $P < 0.05$.

Results

β_3 cardiac expression

We performed RT-PCR qualitative analysis of heart homogenates to determine the expression of β_3 -ARs. Using specific primers (Myslivičėk *et al.* 2006), we found that the rat heart expresses β_3 -ARs (Fig. 1a, lane 1). We used extracts of rat adipose tissue (Fig. 1a, lane 2), which is known to express β_3 -ARs (Granneman *et al.* 1991, Evans *et al.* 1996), as a positive control and extracts of rat testis tissue (Fig. 1a lane 3) as a negative control. To exclude the contamination of the cardiac preparations by adipocytes we performed RT-PCR analysis of heart homogenates and adipose tissue with adiponectin, as a specific marker of adipose tissues

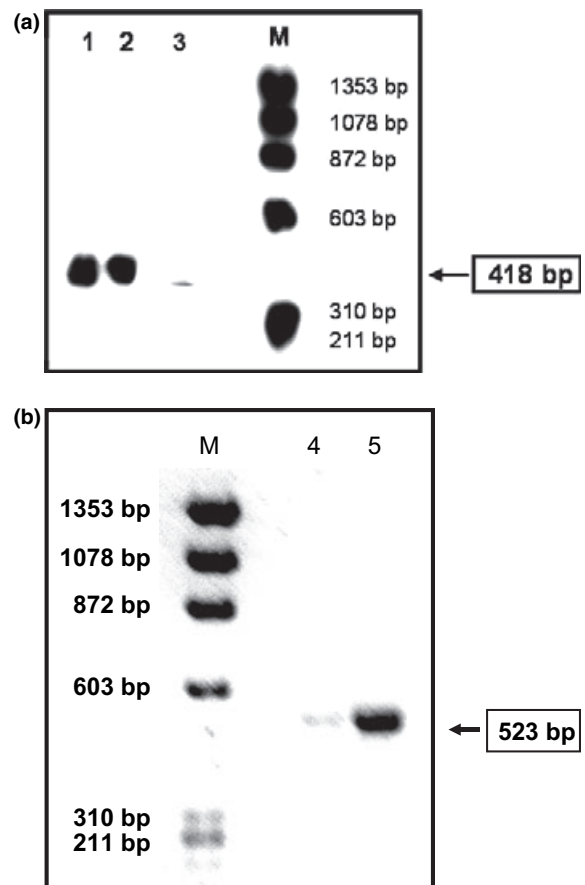


Figure 1 (a) RT-PCR evaluation of β_3 receptor mRNA expression in extracts of rat heart (lane 1), adipose tissue (lane 2) and testis tissue (lane 3). (b) RT-PCR evaluation of adiponectin mRNA expression in extracts of rat heart (lane 4) and adipose tissue (lane 5). M, molecular weight marker.

(Milan *et al.* 2002). The very low intensity of the adiponectin band excluded the possibility of a contamination by adipose tissue (Fig. 1b lane 4).

Basal conditions

Perfused hearts were allowed to maintain a spontaneous rhythm for up to 20 min. To assess the endurance and stability of the preparation, inotropic, chronotropic, lusitropic and coronary parameters were measured every 10 min, showing that the heart is stable for up to 180 min (Fig. 2a). Baseline haemodynamic variables are listed in Table 1.

β_3 basal stimulation

Cumulative concentration–response curves (from 10^{-12} to 10^{-6} M) of the selective β_3 -AR agonist (BRL₃₇₃₄₄) were generated by exposing the cardiac preparations, under basal (unstimulated) conditions, to increasing

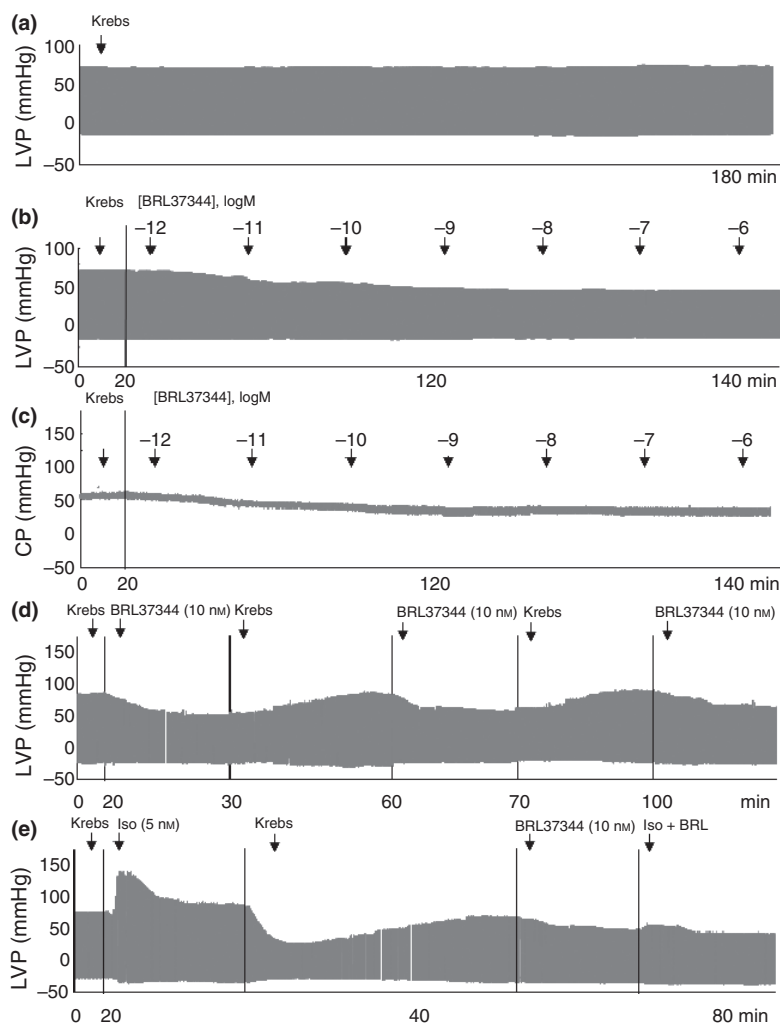


Figure 2 Representative left ventricular pressure (LVP; basal value = 88 ± 2.8 mmHg) traces showing: (a) the time course obtained in the presence of vehicle alone; (b) the effects of increasing concentrations (10^{-12} to 10^{-6} M; each arrow represents the administration of a single concentration) of BRL₃₇₃₄₄ on LVP; (c) the effects of increasing concentrations (10^{-12} to 10^{-6} M; each arrow represents the administration of a single concentration) of BRL₃₇₃₄₄ on coronary pressure (CP); (d) the effects of single repeated doses of BRL₃₇₃₄₄ (10 nM); (e) the effect of ISO alone (5 nM) and in the presence of BRL₃₇₃₄₄ (10 nM).

Table 1 Basal cardiac parameters

LVP (mmHg)	HR (beats min ⁻¹)	RPP (mmHg beats min ⁻¹)	(LVdP/dt) _{max} (mmHg s ⁻¹)	(LVdP/dt) _{min} (mmHg s ⁻¹)	Time to peak (s)	HTR (s)	T/-t (mmHg s ⁻¹)	CP (mmHg)
88 ± 2.8	281 ± 5	$2.5 \pm 0.4 \times 10^4$	2489 ± 124	1664 ± 70	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	-1.48 ± 1.85	62 ± 3.1

LVP, left ventricular pressure; HR, heart rate; RPP, rate-pressure product; (LVdP/dt)_{max}, maximal rate of left ventricular contraction; (LVdP/dt)_{min}, maximal rate of left ventricular pressure decline; Time to peak tension of isometric twitch; HTR, half time relaxation; T/-t, the ratio obtained by (LVdP/dt)_{max}/(LVdP/dt)_{min}; CP, coronary pressure.

concentrations of the agonist (Fig. 2b), as exposure to single repeated doses (10 nM) revealed the absence of desensitization (Fig. 2d). Agonist effects remained stable until 15 min then gradually decreased with time. Accordingly, cardiac parameters were measured at 10 min. Analysis of myocardial effects of BRL₃₇₃₄₄ revealed a negative lusitropic action, represented by a significant reduction in (LVdP/dt)_{min} in parallel with an increase in T/-t and a reduction in HTR (Fig. 3). The β_3 -AR agonist also induced a concentration-dependent negative inotropic effect, revealed by a significant

reduction of (LVdP/dt)_{max} and a concentration-dependent vasodilation, shown by a reduction in CP from 10^{-11} M (-4.89 ± 1.03 %) to 10^{-6} M (-14.85 ± 2.37 %) (Fig. 2c).

Effects of BRL₃₇₃₄₄ after treatment with either nadolol or SR₅₉₂₃₀ or L₇₄₈₃₃₇ or phentolamine

To explore the interaction between β_1/β_2 and β_3 -adrenergic signalling, hearts were perfused with BRL₃₇₃₄₄ (10 nM) in the presence of either the specific

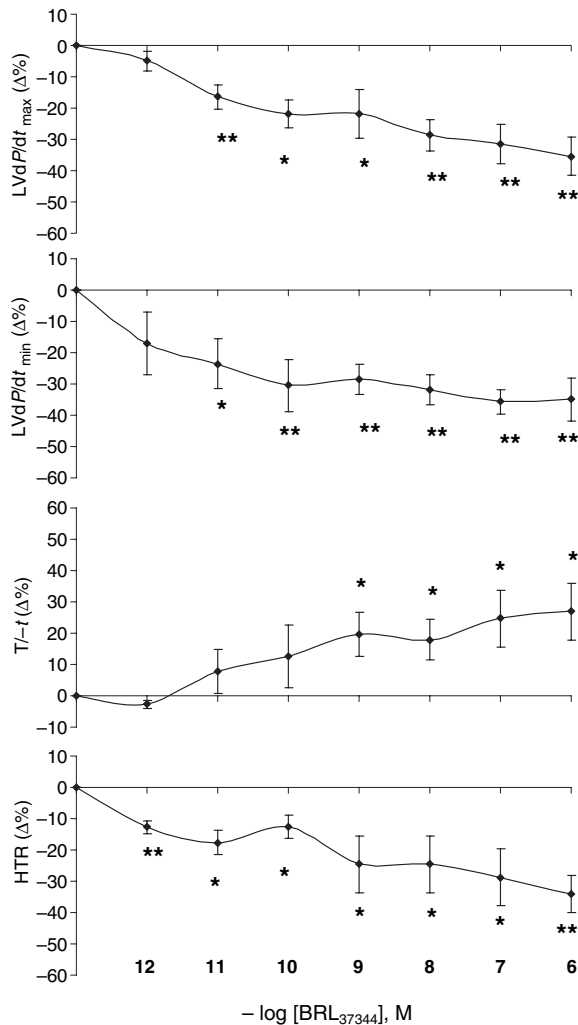


Figure 3 Concentration–response curves of BRL_{37344} (10^{-12} to 10^{-6} M) on $(\text{LVdP/dt})_{\text{max}}$ and $(\text{LVdP/dt})_{\text{min}}$, half time relaxation (HTR), $T/−t$ or $(\text{LVdP/dt})_{\text{max}}/(\text{LVdP/dt})_{\text{min}}$ on the isolated and Langendorff-perfused rat heart. Basal values: $(\text{LVdP/dt})_{\text{max}} = 2489 \pm 124$ (mmHg s^{-1}), $(\text{LVdP/dt})_{\text{min}} = 1664 \pm 70$ (mmHg s^{-1}), HTR = 0.05 ± 0.01 (s), $T/−t = -1.48 \pm 1.85$ (mmHg s^{-1}). Percentage changes were evaluated as mean \pm SEM of seven experiments. Significance of difference from control values (one-way ANOVA): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

inhibitor of β_1/β_2 -ARs, nadolol [100 nM; nadolol Kd on β_1/β_2 -adrenergic receptors ranging from 14 to 40 nM (Blin *et al.* 1993)], or of the specific β_3 -AR antagonists, SR_{59230} (100 nM) and L_{748337} (100 nM) (Neidhold *et al.* 2007). Results showed that the negative lusitropic effect induced by BRL_{37344} was not influenced by β_1/β_2 -AR inhibitors, while it was blocked in the presence of either SR_{59230} or L_{748337} (Fig. 4). At the concentration tested, the treatment with SR_{59230} or L_{748337} alone induced a nonsignificant positive inotropic effect, whereas nadolol alone induced a

nonsignificant negative inotropic effect (Fig. 4). Moreover, to exclude unspecific activation of α -ARs by BRL_{37344} , the hearts were perfused with BRL_{37344} (10 nM) in the presence of a single concentration of phentolamine (1 μM). The treatment did not modify the β_3 -AR-dependent negative inotropism, excluding the involvement of α -ARs (Fig. 4).

Involvement of $G_{i/o}$ proteins in BRL_{37344} -induced effects

To verify the involvement of the $G_{i/o}$ protein system in the mechanism of action of BRL_{37344} , cardiac preparations were perfused with KH containing PTx (0.01 nM) in the presence of BRL_{37344} . In the rat heart, PTx catalyses the ADP ribosylation of the alpha-subunit of $G_{i/o}$ and uncouples the interaction between Gi and inhibitory receptors of adenylate cyclase, such as muscarinic receptors (Angelone *et al.* 2006, and references therein). Incubation of the hearts for 60 min with PTx abolished the effects of BRL_{3734} on $(\text{LVdP/dt})_{\text{max}}$, $(\text{LVdP/dt})_{\text{min}}$ and $T/−t$ (Fig. 4).

Effects of ISO after treatment with BRL_{37344}

To verify whether the ISO-dependent positive lusitropic effect is modulated by activation of β_3 -ARs, hearts were perfused with ISO alone and in the presence of BRL_{37344} (Fig. 2e). The results showed that β_3 -AR activation counteracts the ISO-dependent positive lusitropic effect (Fig. 5). To establish whether, like the well-known parasympathetic (i.e. muscarinic) counterbalancing effect on adrenergic activation, β_3 -ARs may contribute to counterbalance the effects of ISO stimulation, the hearts were treated with carbachol (10 nM), a non-selective cholinergic agonist resistant to cholinesterase action in the presence of a single ISO dose (5 nM). The treatment with carbachol significantly reduced the ISO-dependent positive lusitropic effect (Fig. 5).

Involvement of the NO-cGMP-PKG signal transduction pathway

The involvement of NO-cGMP-PKG signalling in BRL_{37344} -dependent cardiotropism was examined by perfusing the cardiac preparations with Hb (10 μM), L-NMMA (10 μM) or ODQ (10 μM). All these treatments abolished the effect of the β_3 -AR agonist demonstrating its dependence on an NO-cGMP mechanism. In contrast, no significant changes in lusitropic parameters were observed after treatment with the particulate guanylate cyclase inhibitor anantin (10 nM). Under basal conditions, the treatment with either Hb alone or anantin alone enhanced LVP of $4.83 \pm 2.7\%$ and $3.16 \pm 2.01\%$, respectively, while ODQ alone or

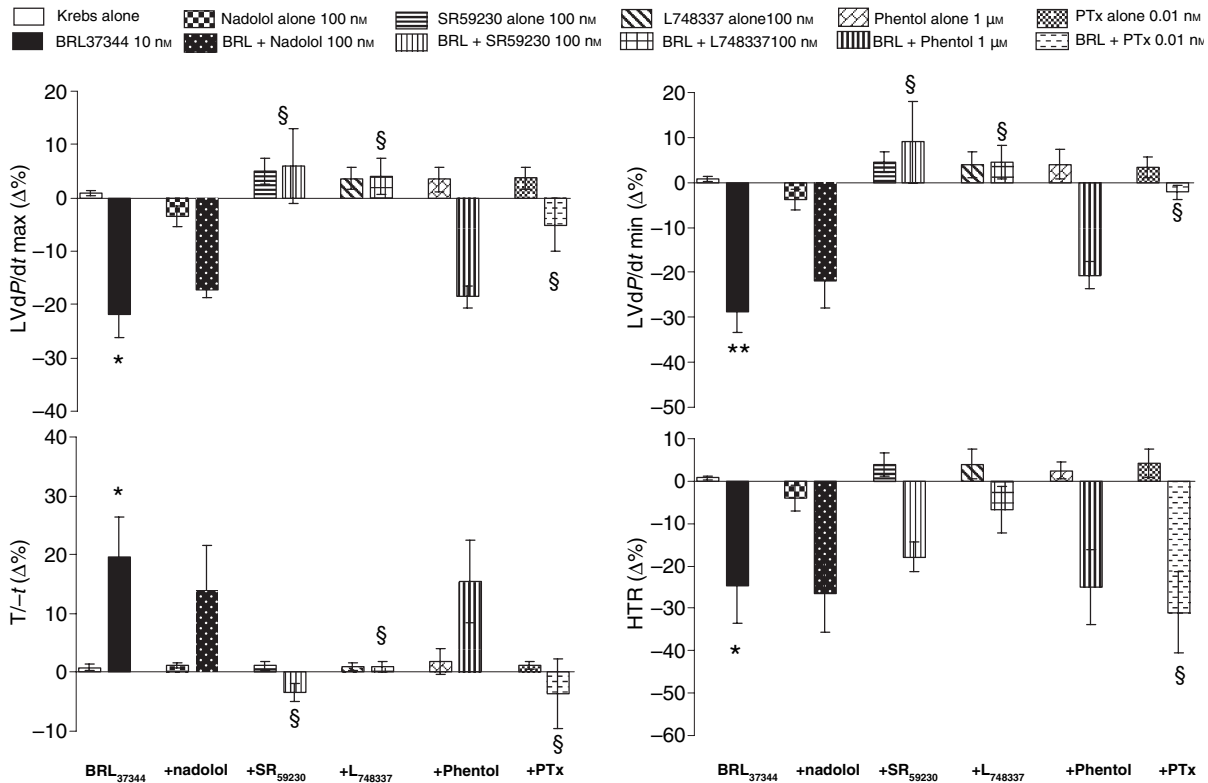


Figure 4 Effects of BRL₃₇₃₄₄ before and after treatment with either nadolol (100 nM), SR₅₉₂₃₀ (100 nM), L₇₄₈₃₃₇ (100 nM), phentolamine (1 μ M) or pertussis toxin (PTx; 0.01 nM) on (LVdP/dt)_{max}, (LVdP/dt)_{min}, half time relaxation (HTR) and T/t on the isolated and Langendorff-perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as mean \pm SEM of six experiments for each group. Significance of difference (one-way ANOVA) from control values of BRL₃₇₃₄₄ alone vs. Krebs-Henseleit solution (KHs): **P* < 0.05, ***P* < 0.01. Comparison between groups of BRL₃₇₃₄₄ alone vs. BRL₃₇₃₄₄ plus nadolol, SR₅₉₂₃₀, L₇₄₈₃₃₇ (100 nM) or PTx: §*P* < 0.05.

L-NMMA alone reduced it by $-4.91 \pm 1.94\%$ and $-5.13 \pm 2.48\%$ respectively. However, these variations were not significantly different from the control values.

It is well known that cGMP could modulate cardiac contractility via activation of the cGMP-PKG pathway (Hove-Madsen *et al.* 1996). Pre-treatment with a specific inhibitor of PKG (KT₅₈₂₃, 100 nM), that when used alone produced a nonsignificant increase of cardiac performance of $5.41 \pm 3.88\%$, abolished the β_3 -AR-dependent lusitropic effect. These results clearly indicate the involvement of PKG in the β_3 -AR-induced response (Fig. 6).

Discussion

This study demonstrates that activation of a β_3 -ARs, via the selective agonist BRL₃₇₃₄₄, induces negative lusitropic effects in the rat heart isolated and perfused according to Langendorff. Such a negative lusitropism couples with PTx-sensitive inhibitory Gi proteins and involves an NO-cGMP-PKG pathway. These results could shed light on the role of the balanced activation of

β_1/β_2 and β_3 -AR systems which regulate diastolic function in both physiological and pathological conditions.

Myocardial function has been often analysed by exclusively examining the contractile state of the heart (Vittone *et al.* 1994). However, during the last decade, there has been a renewed interest in relaxation performance and diastole because of the recognition of the early occurrence of impaired cardiac relaxation and filling in various cardiac diseases (Brutsaert & Sys 1989). Assessing myocardial relaxation in the working whole heart is complex because variations in the load imposed on the heart, and the non-uniformity of adjacent myocardial segments, can alter the lusitropic parameters. Isovolumic perfused hearts (Langendorff technique) are very useful in quantifying the lusitropic state, as they allow a better control of the variables mentioned above (Vittone *et al.* 1994).

In the present study we initially tested the sensitivity of Langendorff rat preparation to BRL₃₇₃₄₄. Agonist application elicits a dose-dependent depression of

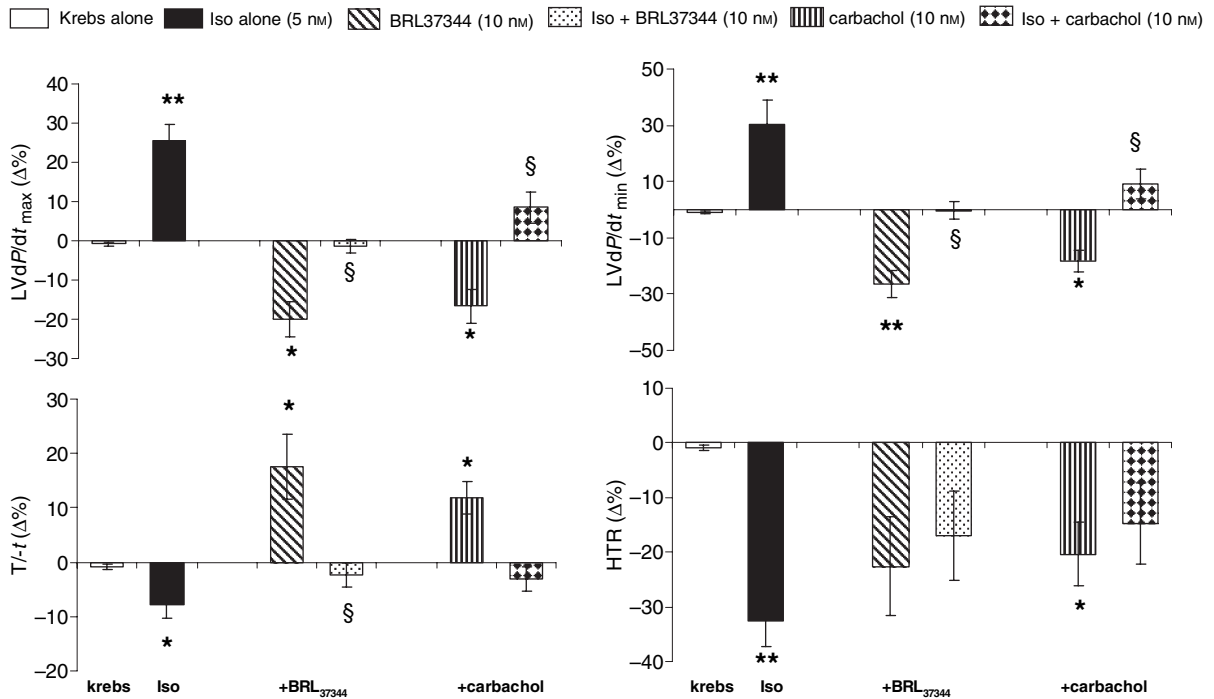


Figure 5 Effects of isoproterenol (5 nM) before and after treatment with BRL₃₇₃₄₄ (10 nM) or carbachol (10 nM) on (LVdP/dt)_{max}, (LVdP/dt)_{min}, half time relaxation (HTR), $T_{1/2}$ on the isolated and Langendorff-perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as mean \pm SEM of six experiments. Significance of difference (one-way ANOVA) from control values of isoproterenol alone vs. Krebs-Henseleit solution (KHs): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Comparison between groups of isoproterenol alone vs. isoproterenol plus either BRL₃₇₃₄₄ or carbachol: § $P < 0.05$.

contractility shown by the reduction in (LVdP/dt)_{max}. This agrees with the β_3 -AR-dependent negative inotropism described not only in rat (Gauthier *et al.* 1999), but also in human (Gauthier *et al.* 1996) and dog (Gauthier *et al.* 1999) cardiac preparations, and confirms the postulated selectivity of the rat heart towards this β_3 -AR agonist (Gauthier *et al.* 1999). So far, in the rat heart β_3 -AR-dependent negative inotropic effects were not correlated with the presence of transcripts encoding the receptor. However, our RT-PCR qualitative analysis indicates that β_3 -ARs are indeed expressed in the rat heart.

We observed that β_3 -AR activation induces a significant dose-dependent reduction in (LVdP/dt)_{min}. In the mammalian heart, the rate of relaxation largely depends on contraction (Grassi de Gende *et al.* 1977). Thus, a more appropriate analysis of the effects of putative lusitropic drugs requires considering additional parameters. HTR represents a good index of contraction-relaxation coupling, which is used to simultaneously evaluate variations in contraction and relaxation and to quantify drug-induced changes in myocardial lusitropy (Brutsaert & Sys 1989). In our study, the BRL₃₇₃₄₄-induced decrease in (LVdP/dt)_{min} was accompanied by a significant reduction in HTR, which began at very low

doses (-12.69% ; 10^{-12} M), and persists up to higher doses (-34.01% ; 10^{-6} M). Our data indicate that, although the peak rate of LV pressure decline is decreased in the presence of β_3 -AR stimulation, the time needed to reach a 50% decline from peak pressure becomes shorter. Whether the effect of β_3 -AR stimulation on relaxation is beneficial or detrimental requires further elucidation. Analysis of the above parameters provides a preliminary indication that the β_3 -AR-dependent negative effect on relaxation is not influenced by the contractile performance. We also found that BRL₃₇₃₄₄ administration induces a slight coronary vasodilation, which may directly and/or indirectly affect ventricular relaxation. We hypothesize that NO derived from the coronary endothelium plays a role in β_3 -AR-elicited lusitropism. In fact, it has been established in different types of cardiac preparations that, independent of the increased coronary flow, the coronary microvascular district influences myocardial relaxation. This occurs through the release of endothelial substances (i.e. NO) that dose dependently induce an earlier onset of LV pressure fall with a mechanism which involves a cGMP-PKG-mediated modulation of myofilament Ca^{2+} sensitivity (Shah 1996, Seddon *et al.* 2007 and references therein).

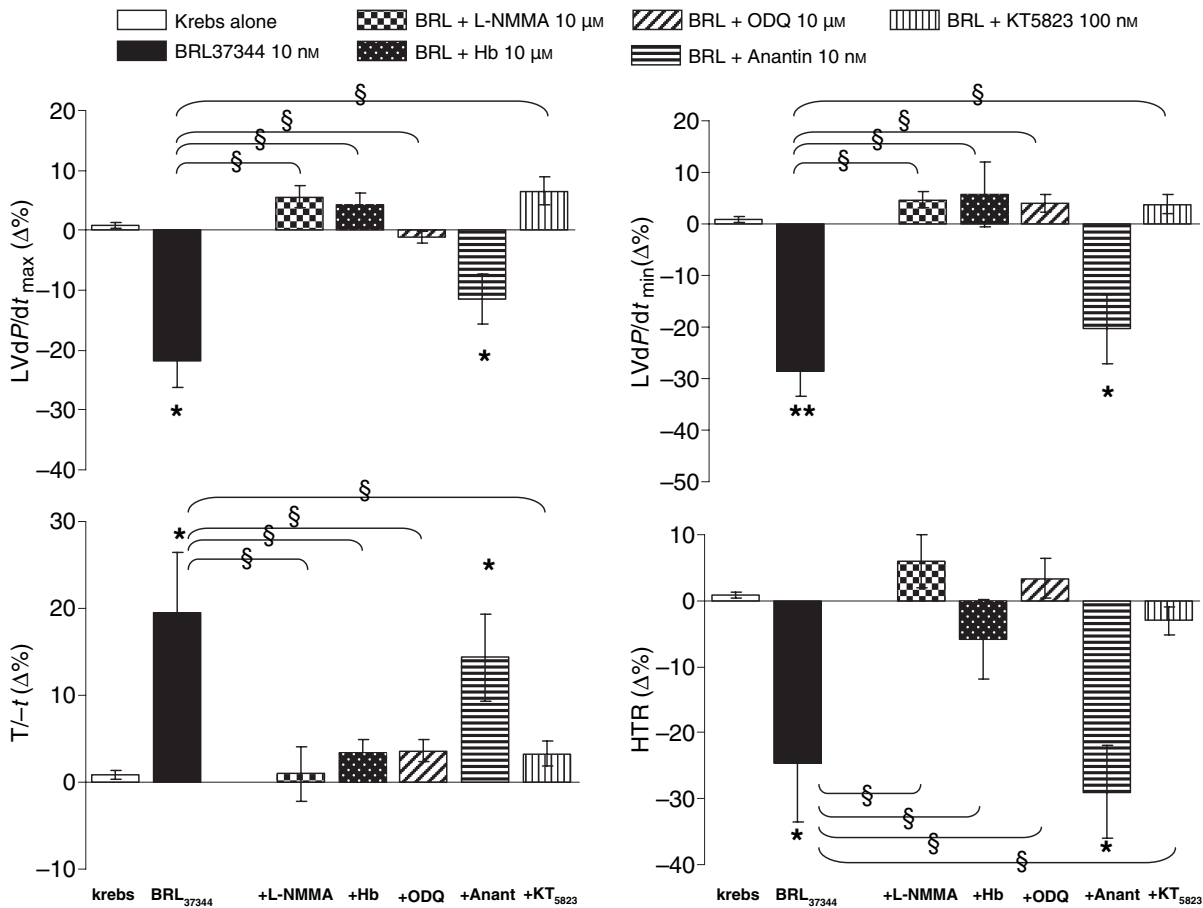


Figure 6 Effects of BRL₃₇₃₄₄ (10 nM) alone and BRL₃₇₃₄₄ in the presence of Hb (10 μ M), L-NMMA (10 μ M), ODQ (10 μ M), anantin (10 nM) and KT₅₈₂₃ (100 nM) on (LVdP/dt)_{max}, (LVdP/dt)_{min}, half time relaxation (HTR), T/-t on the isolated and Langendorff-perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of five to six experiments for each group. Significance of difference (one-way ANOVA) from control values of BRL₃₇₃₄₄ alone vs. control: * P < 0.05; ** P < 0.01. Comparison between groups of BRL₃₇₃₄₄ alone vs. BRL₃₇₃₄₄ plus L-NMMA, ODQ, Hb, anantin or KT₅₈₂₃: § P < 0.05.

In our cardiac preparations the β_3 -AR-induced negative lusitropism does not depend on simultaneous β_1/β_2 -AR activation, as it was unaffected by nadolol, a β_1 - and β_2 -AR inhibitor free of β_3 -AR antagonist properties (Emorine *et al.* 1989, Galitzky *et al.* 1993). Interestingly, the effective concentrations of BRL₃₇₃₄₄ which are able to modulate β_3 -AR ventricular relaxation [HTR: 10^{-12} M; (LVdP/dt)_{min}: 10^{-11} M] were lower than the agonist dose which is responsible for the maximum negative inotropic effect in other mammals (1 μ M for BRL₃₇₃₄₄ in the human myocardium; 1 μ M for CL₃₁₆₂₄₃ in the guinea-pig; 0.1 μ M for CGP₁₂₁₇₇ in the dog) (Gauthier *et al.* 1999). It is not unusual that cardiac agents are active at low doses. In fact, we recently demonstrated in the rat heart that the parasympathetic mimetic hippocampal cholinergic neurostimulating peptide is active at picomolar concentrations (Angelone *et al.* 2006).

In mammals, β_1/β_2 -AR stimulation, via cAMP-dependent PLB phosphorylation, accelerates relaxation with

consequent effects on the diastolic phase (Vittone *et al.* 2002). This is important for myocardial mechanical recovery under both physiological and pathological conditions (Böhm & Maack 2000, Vittone *et al.* 2002, Mattiazzi *et al.* 2006). In this study we observed that in the presence of simultaneous stimulation of β_1/β_2 and β_3 -ARs, by ISO (5 nM) and BRL₃₇₃₄₄ (10 nM), respectively, the classical β_1/β_2 -dependent positive lusitropic effect disappeared. This indicates that in the rat heart, under physiological conditions, β_3 -AR activation may contribute to counteract the β_1/β_2 stimulatory effects on relaxation. Moreover, we found that BRL₃₇₃₄₄-mediated negative lusitropic effects involve PTx-sensitive G_{i/o} proteins. In the heart, these G proteins are involved in various inhibitory transduction cascades (Hare *et al.* 1998), including the β_3 -AR-induced negative inotropic effect observed in humans (Gauthier *et al.* 1996), and the G_{i/o} protein-mediated inhibition of BRL₃₇₃₄₄-dependent β_3 -AR activation on L-type Ca²⁺ current (Zhang *et al.* 2005).

In the human ventricle, β_3 -AR-induced negative inotropism results from the production of NO by the constitutively expressed endothelial isoform of NO synthase (eNOS) and the consequent increase in intracellular cGMP (Gauthier *et al.* 1998, Varghese *et al.* 2000). Consistent with this, β_3 -AR–NO interaction, we found that the BRL₃₇₃₄₄-activated negative lusitropism is mediated by the NO–cGMP–PKG pathway. The involvement of this pathway in the β_3 -AR-negative lusitropic response is of interest, as, to the best of our knowledge, this aspect has not yet been explored so far. Although the role of NO on myocardial relaxation is still under debate, and possibly depends on experimental conditions (e.g. unstimulated vs. β -AR-stimulated hearts; NO concentrations; time dependence; Massion & Balligand 2003, Seddon *et al.* 2007), it has been reported that NO, via cGMP, influences myocardial relaxation, by decreasing the relative myofilament response to Ca^{2+} , and causing a reduction in diastolic tone, an earlier onset of isotonic relaxation with little effect on early contractile indexes. These effects, being negatively affected by KT5823, involve PKG-mediated phosphorylation of troponin I (Shah *et al.* 1995, Seddon *et al.* 2007 and references therein). Of note, recently, a role for nNOS-produced NO has been postulated in the control of myocardial relaxation under both basal and adrenergic-stimulated conditions. The specific location of this NOS isoform in the SR and/or in the sarcolemma suggests that it may modulate molecules (e.g. SERCA2A, PLB, ryanodine receptor, sarcolemma Ca^{2+} ATPase and L-type channels) involved in the regulation of Ca^{2+} transients, thus influencing relaxation (Ashley *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2007).

Interestingly, we found that the β_3 -AR-negative lusitropism is unaffected when natriuretic peptide-sensitive particulate GC (pGC) is inhibited by anantin (10 nM). Accordingly, the β_3 -AR-activated downstream cascade only converges on sGC, thus excluding the possibility of a double additive route for cGMP formation. Such a spatially compartmentalized lusitropic pathway may govern myocardial responses to β -AR activation.

In conclusion, by analysing an extensive panel of lusitropic parameters we showed that, in the Langendorff-perfused rat heart, BRL₃₇₃₄₄-dependent β_3 -AR activation negatively affects myocardial relaxation via an NO–cGMP–PKG pathway. Such a negative modulation, which does not involve β_1/β_2 -ARs, counteracts the ISO-dependent stimulation. This suggests that the β_3 -AR-mediated lusitropic control would function as a ‘protective’ mechanism that, by preventing the effects of excessive β_1/β_2 -AR stimulation, allows preserving a normal cardiac function. Our results are also of interest in view of the potential clinical and therapeutic applications in the case of a deteriorated diastolic function.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

This work was supported by MURST (S. Imbrogno and M.C. Cerra) and by the ‘Dottorato di Ricerca in Biologia Animale’ (E. Pulerà). We are thankful to Prof. M. Maggiolini and Dr A.G. Recchia for their scientific and technical assistance for RT-PCR.

References

- Angelone, T., Goumon, Y., Cerra, M.C., Metz-Boutigue, M-H., Aunis, D. & Tota, B. 2006. The emerging cardio-inhibitory role of the hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP). *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 336–344.
- Ashley, E.A., Sears, C.E., Bryant, S.M., Watkins, H.C. & Casadei, B. 2002. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation* **105**, 3011–3016.
- Barbier, J., Rannou-Bekono, F., Marchais, J., Berthon, P.M., Delamarque, P. & Carre, F. 2004. Effect of training on beta1 beta2 beta3 adrenergic and M2 muscarinic receptors in rat heart. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 949–954.
- Blin, N., Camoin, L., Maigret, B. & Strosberg, D. 1993. Structural and conformational features determining selective signal transduction in the β_3 -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* **44**, 1094–1104.
- Böhm, M. & Maack, C. 2000. Treatment of heart failure with beta-blockers. Mechanisms and results. *Basic Res Cardiol* **95**, I15–I24.
- Brutsaert, D.L. & Sys, S.U. 1989. Relaxation and diastole of the heart. *Physiol Rev* **69**, 1228–1315.
- Cerra, M.C., De Iuri, L., Angelone, T., Corti, A. & Tota, B. 2006. Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res Cardiol* **101**, 43–52.
- Chamberlain, P.D., Jennings, K.H. & Paul, F. 1999. The tissue distribution of the human β_3 -adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the β_3 -adrenergic in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord* **10**, 1057–1065.
- Dincer, U.D., Bidasee, K.R., Guner, S., Tay, A., Ozcelikay, A.T. & Altan, V.M. 2001. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes* **50**, 455–461.
- Emorine, L.J., Marullo, S., Briand-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavie-Klutcho, C. & Strosberg, A.D. 1989. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* **245**, 1118–1121.
- Evans, B.A., Papaioannou, M., Bonazzi, V.R. & Summers, R.J. 1996. Expression of β_3 -adrenoceptor mRNA in rat tissues. *Br J Pharmacol* **117**, 210–216.
- Galitzky, J., Reverte, M., Portillo, M., Carpenne, C., Lafontan, M. & Berlan, M. 1993. Coexistence of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenoreceptors in dog fat cells and their differential activation by catecholamines. *Am J Physiol* **264**, E403–E412.

- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. & Le Marec, H. 1996. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98, 556–562.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Brill, A., Balligand, J.L. & Le Marec, H. 1998. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102, 1377–1384.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Trochu, J.N., Leblais, V., Laurent, K., Langin, D., Escande, D. & Le Marec, H. 1999. Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta(3)-adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 290, 687–693.
- Gauthier, C., Langin, D. & Balligand, J.-L. 2000. β_3 -Adrenoceptors in the cardiovascular system. *J Clin Invest* 21, 426–430.
- Georget, M., Mateo, P., Vandecasteele, G., Lipskaia, L., Defer, N., Hanoune, J., Hoerter, J., Lugnier, C. & Fischmeister, R. 2003. Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J* 17, 1380–1391.
- Granneman, J.G., Lahners, K.N. & Chaudhry, A. 1991. Molecular cloning and expression of the rat β_3 -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 40, 895–899.
- Grassi de Gende, A.O., Perez Alzueta, A.D. & Cingolani, H.E. 1977. Effect of isoproterenol on the relation between maximal rate of contraction and maximal rate of relaxation. *Am J Physiol* 233, H404–H409.
- Hare, J.M., Kim, B., Flavahan, N.A., Ricker, K.M., Peng, X., Colman, L., Weiss, R.G. & Kass, D.A. 1998. Pertussis toxin-sensitive G proteins influence nitric oxide synthase III activity and protein levels in rat heart. *J Clin Invest* 101, 1424–1431.
- Hove-Madsen, L., Mery, P.F., Jurevicius, J., Skeberdis, A.V. & Fishmeister, R. 1996. Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. *Basic Res Cardiol* 91, 1–8.
- Imbrogno, S., Angelone, T., Adamo, C., Pulerà, E., Tota, B. & Cerra, M.C. 2006. Beta3-adrenoceptor in the eel (*Anguilla anguilla*) heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. *J Exp Biol* 209, 4966–4973.
- Li, L., Jaime, D., Guoxiang, C., Evangelia, G.K. & Donald, M.B. 2000. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol* 278, H769–H779.
- Maggiolini, M., Donze, O. & Picard, D. 1999. A non-radioactive method for inexpensive quantitative RT-PCR. *Biol Chem* 380, 695–697.
- Massion, P.B. & 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.
- Mattiazzi, A., Mundina-Weilenmann, C., Vittone, L., Said, M. & Kranias, E.G. 2006. The importance of the Thr17 residue of phospholamban as a phosphorylation site under physiological and pathological conditions. *Braz J Med Biol Res* 39, 563–572.
- Milan, G., Granzotto, M., Scarda, A., Calcagno, A., Pagano, C., Federspil, G. & Vettor, R. 2002. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 10, 1095–1103.
- Mongillo, M., Tocchetti, C.G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y.F., Dostmann, W.R., Pozzan, T., Kass, D.A., Paolucci, N., Houslay, M.D. & Zaccolo, M. 2006. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 98, 226–234.
- Mysliveček, J., Novakova, M., Palkovits, M., Krizanova, O. & Kvetnansky, R. 2006. Distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart. *Life Sci* 79, 112–120.
- Neidhold, S., Eichhorn, B., Kasper, M., Ravens, U. & Kaumann, A.J. 2007. The function of alpha- and beta-adrenoceptors of the saphenous artery in caveolin-1 knockout and wild-type mice. *Br J Pharmacol* 150, 261–270.
- Seddon, M., Shah, A.M. & Casadei, B. 2007. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 75, 315–326.
- Shah, A.M. 1996. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovascular Res.* 31, 847–867.
- Shah, A.M., Prendergast, B.D., Grocott-Mason, R., Lewis, M.J. & Paulus, P.J. 1995. The influence of endothelium-derived nitric oxide on myocardial contractile function. *Int J Cardiol* 50, 225–231.
- Skeberdis, V.A. 2004. Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)* 40, 407–413.
- Varghese, P., Harrison, R.H., Lofthouse, R.A., Georgakopoulos, D., Berkowitz, D.E. & Hare, M. 2000. β_3 -adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest* 106, 697–703.
- Vittone, L., Mundina-Weilenmann, C., Mattiazzi, A. & Cingolani, H. 1994. Physiologic and pharmacologic factors that affect myocardial relaxation. *J Pharmacol Toxicol Methods* 32, 7–18.
- Vittone, L., Mundina-Weilenmann, C., Said, M., Ferrero, P. & Mattiazzi, A. 2002. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol* 34, 39–50.
- Zhang, Z.S., Cheng, H.J., Onishi, K., Ohte, N., Wannenburg, T. & Cheng, C.P. 2005. Enhanced inhibition of L-type Ca^{2+} current by beta3-adrenergic stimulation in failing rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1203–1211.
- Zhang, Y.H., Zhang, M.H., Sears, C.E., Emanuel, K., Redwood, C., El-Armouche, A., Kranias, E.G. & Casadei, B. 2007. Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. *Circ Res* Nov 15 Epub ahead of print.

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

M. C. Cerra,^{*,†} M. P. Gallo,[‡] T. Angelone,^{*} A. M. Quintieri,[†] E. Pulerà,[†] E. Filice,[†] B. Guérolde,[§] P. Shooshtarizadeh,[§] R. Levi,[‡] R. Ramella,[‡] A. Brero,[‡] O. Boero,[‡] M. H. Metz-Boutigue,[§] B. Tota,^{*,1} and G. Alloatti^{‡,1}

^{*}Department of Cell Biology and [†]Department of Pharmaco-Biology, University of Calabria, Calabria, Italy; [‡]Department of Animal and Human Biology, University of Turin, Turin, Italy; and [§]Unity INSERM 575, Physiopathology of Nervous System, University “Louis Pasteur,” Strasbourg, France

ABSTRACT Chromogranin A (CGA), produced by human and rat myocardium, generates several biologically active peptides processed at specific proteolytic cleavage sites. A highly conserved cleavage N-terminal site is the bond 64–65 that reproduces the native rat CGA sequence (rCGA1–64), corresponding to human N-terminal CGA-derived vasostatin-1. rCGA1–64 cardiotropic activity has been explored in rat cardiac preparations. In Langendorff perfused rat heart, rCGA1–64 (from 33 nM) induced negative inotropism and lusitropism as well as coronary dilation, counteracting isoproterenol (Iso) - and endothelin-1 (ET-1) -induced positive inotropic effects and ET-1-dependent coronary constriction. rCGA1–64 also depressed basal and Iso-induced contractility on rat papillary muscles, without affecting calcium transients on isolated ventricular cells. Structure-function analysis using three modified peptides on both rat heart and papillary muscles revealed the disulfide bridge requirement for the cardiotropic action. A decline in Iso intrinsic activity in the presence of the peptides indicates a noncompetitive antagonistic action. Experiments on rat isolated cardiomyocytes and bovine aortic endothelial cells indicate that the negative inotropism observed in rat papillary muscle is probably due to an endothelial phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide release, rather than to a direct action on cardiomyocytes. Taken together, our data strongly suggest that in the rat heart the homologous rCGA1–64 fragment exerts an autocrine/paracrine modulation of myocardial and coronary performance acting as stabilizer against intense excitatory stimuli.—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. 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, 000–000 (2008)

Key Words: endocrine heart • peptide hormones • endothelial cells • stress response

CHROMOGRANIN A (CGA), a 49-kDa acid protein of the “granins” family (1), is costored with catecholamines, nucleotides, calcium, and other peptide hormones in the secretory granules of several endocrine and neuronal cells and is released in the extracellular environment by exocytosis (2). Apart from an intracellular role in secretory vesicle biogenesis (3), CGA exerts an important extracellular function as a prohormone for a number of shorter biologically active peptides produced by tissue-specific proteolytic processing (for references, see ref. 4). In the specific context of cardiocirculatory homeostasis, these include vasostatin (VS) -1, a potent vasodilator and cardioinhibitory agent (5) and catestatin, an inhibitor of catecholamine release characterized by antihypertensive properties (6). In response to stress, CGA and its derived fragments are released in the blood, reaching nanomolar concentrations in the peripheral circulation in humans (7). It is notable that in patients with chronic heart failure, higher CGA concentrations correlate with the severity of the disease, representing a prognostic indicator of mortality (7–9). Elevated circulating levels have also been reported in patients with neuroendocrine tumors (10, 11) as well as in renal (12) and liver (13) failure. This information and the finding that CGA knockout mice show hypertension and cardiac enlargement (14) point to the importance of CGA in cardiocirculatory physiology. Interestingly, CGA-derived VSs appear to function as endocrine/paracrine cardiac stabilizers, par-

¹ Correspondence: B.T., Department of Cell Biology, University of Calabria, 87030 Arcavacata di Rende (CS), Calabria, Italy. E-mail: tota@unical.it; A.G., Department of Animal and Human Biology, University of Turin (TO), Italy. E-mail: giuseppe.alloatti@unito.it
doi: 10.1096/fj.08-110239

ticularly in the presence of intense adrenergic stimuli, *e.g.*, under stress responses (5), and elicit a protective effect against the extension of myocardial infarction (15). In the rat heart, CGA is stored in nonadrenergic myoendocrine atrial cells containing atrial natriuretic peptide (16), in Purkinje fibers of the atrium and ventricle containing the calcium channel α_{1E} subunit (17); in sheep, it is stored in the sympathetic nerve termini (18). Moreover, in the rat heart, in addition to intact CGA and larger fragments containing the C terminus, four VS-containing CGA peptides have been identified, *i.e.*, CGA4–113, CGA1–124 (vasostatin-2), CGA1–135, and CGA1–199 (19). More recently, Pieroni *et al.* (20) demonstrated that CGA is produced by the human myocardium, in which it is colocalized with brain natriuretic peptide and overexpressed in dilated and hypertrophic cardiomyopathy, suggesting a neuroendocrine role in the regulation of cardiac function and a potential therapeutic target in heart failure. The possibility exists that locally derived VSs may exert autocrine/paracrine regulation of cardiac function, because in the normal or stressed heart a specific stimulus-induced proteolytic activation could conceivably generate and locally increase lower molecular mass CGA-derived VSs; production of some of them could also result from extracellular processing, as reported for CGA in the adrenal gland (4).

Rat CGA is a 448-amino acid protein with an isoelectric point (pI) of 4.5–5.0, containing a disulfide bridge and displaying numerous monobasic and dibasic (nine) residues serving as a possible recognition signal for endoproteolytic processing (subtilisin-like and trypsin-like) enzymes (21). In rat heart, the detected PC1/3, PC2, and carboxypeptidase H/E (22) might be involved in the CGA maturation process. Metz-Boutigue *et al.* (23) have previously characterized intragranular and extracellular processing of CGA in chromaffin granules from bovine adrenal medulla, showing that the processing starts at both the N terminus and the C terminus of the protein. Among the fragments generated, CGA1–76 (VS-1) and prochromacin (CGA79–431) represent the major products of proteolytic processing in bovine adrenal medulla (23). Conversely, in rat CGA (rCGA), because of the lack of the first dibasic site (24, 25), the first N-terminal cleavage product is β -granin (rCGA1–128), corresponding to vasostatin-2. The alignment of bo-

vine, human, and rat VS-1 (88, 86, 89, and 82% homology between rat and bovine/human CGA1–76, CGA17–38, CGA1–64, and CGA65–76, respectively), depicted in **Table 1**, shows that, in contrast to the human sequence, the N-terminal sequence of rat CGA does not contain the Lys⁷⁷Lys⁷⁸ dibasic site, whereas it does contain an insertion of 15 glutamine residues. Thus, proteolytic processing in humans and in rats is probably different.

Because CGA fragments are likely to be secreted by cardiomyocytes, extracellular processing can be expected to occur in the secreted medium, as shown for CGA and proenkephalin-A secreted from chromaffin cells (23, 26). The presence of extracellular proteases both on cardiomyocyte cell membranes and in the extracellular matrix suggests that extracellular processing does occur, as proposed for angiotensin II. In fact, in the heart, angiotensin-converting enzyme and/or renin, present on cell membranes, are involved in the conversion of angiotensinogen into angiotensin II (27).

Among the major proteolytic cleavage sites involved in CGA processing, the bond 64–65, present in the N-terminal moiety of the protein and included in the VS sequence, is highly conserved (23). For the first time we synthesized this N-terminal fragment, reproducing the native rat sequence (rCGA1–64 with S-S bridge: rCGA1–64_{SS}) to determine its putative cardiotropic activity on rat cardiac preparations. Similarly, we also synthesized and tested the (12-amino acid) endogenous CGA fragment (65–76), flanked by a dibasic pair on the C-terminal side, which was previously identified and detected by Metz-Boutigue *et al.* (23) in the extracellular space of stimulated cultured chromaffin cells. Using both the Langendorff perfused rat heart and isolated papillary muscle, we demonstrate here that rCGA1–64_{SS} induces inotropic, lusitropic, and coronary actions and that the peptide-elicited negative inotropism is endothelium dependent.

Furthermore, to clarify the structure-function relationship, we compared the actions of two modified peptides, *i.e.*, rCGA1–64 without S-S bridge (rCGA1–64_{SH}) and rCGA1–64 oxidized (rCGA1–64_{OX}), revealing the disulfide bridge requirement for their cardiotropic action. Finally, to define the signaling pathways activated by rCGA1–64_{SS}, using rat papillary muscle, isolated rat ventricular cardiomyocytes, and cultured bovine aortic endothelial (BAE-1) cells, we demon-

TABLE 1. Sequence alignment of human CGA1–115 with rat CGA1–130

	1	17	38	64	72
<i>Rattus norvegicus</i>	LPVNSPMTKGDTKVMKCVLEVISDSLSKSPMPVSP	PECLETLQGD	ERVLSILRHQNL	LKELQDLALQGA	KERAQQQQQ
<i>Homo sapiens</i>	LPVNSPMTKGDTEVMKCI	VEVISDTLSKSPMPVSK	ECFETL	RGDERILSILRHQNL	LKELQDLALQGA
<i>Bos taurus</i>	LPVNSPMTKGDTEVMKCI	VEVISDTLSKSPMPVSK	ECFETL	RGDERILSILRHQNL	LKELQDLALQGA
<i>Mus musculus</i>	LPVNSPMTKGDTKVMKCVLEVISDSLSKSPMPVSP	ECLETLQGD	ERILSILRHQNL	LKELQDLALQGA	KERAQQPLK
	79				
<i>Rattus norvegicus</i>	QQQQQQQQQQ	HSSF	FEDELSEVFENQSPA	AKHGDAASEAP	SKDTVEKR
<i>Homo sapiens</i>	HSGF	FEDELSEVLENQSSQAELKEAVEE	PSKDVMEKR		
<i>Bos taurus</i>	HSSY	EDELSEVLEKPNDAQEPKEVTEEV	SSKDAAEKR		
<i>Mus musculus</i>	QQQPPK	QQQQQQQQQQ	EQQHSSFEDELSEVFENQSP	DAKHRDAA	EVPSRDTMEKR

Underscores indicate residues that in rat CGA1–64 and in rCGA65–76 differ from human CGA1–64 and CGA65–76, respectively. Modified from Cerra *et al.* (5).

strated that the rCGA1-64-induced negative inotropism is mainly due to an endothelial phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) -dependent NO release, rather than to a direct action on cardiomyocytes. In contrast, the CGA 65-76 fragment failed to show any cardiotropic activity. Taken together, our data point to rCGA1-64 as a novel cardiac autocrine/paracrine modulator of basal myocardial performance, able, at the same time, to exert a counterregulatory role against excessive excitatory stimuli, particularly heightened by β -adrenergic activity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We used male Wistar rats weighing 220–240 g (Morini, Bologna, Italy S.p.A.). Animal care, sacrifice, and experiments were supervised according to the U.S. National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication 85-23, revised 1996).

Isolated Langendorff heart preparation

Hearts were rapidly excised and transferred to ice-cold buffered Krebs-Henseleit solution (KHS) after the rats had been anesthetized with an intraperitoneal injection of ethyl carbamate (2 g/kg of weight). As described previously (5), the aorta was immediately cannulated with a glass cannula and connected to the Langendorff apparatus to start perfusion at a constant flow rate (12 ml/min). In brief, the apex of the left ventricle (LV) was pierced to avoid fluid accumulation. A water-filled latex balloon, connected to a BLPR gauge (WPI, Inc. Sarasota, FL, USA), was inserted through the mitral valve into the LV to allow isovolumic contractions and to continuously record mechanical parameters. Another pressure transducer located just above the aorta recorded coronary pressure (CP). Hemodynamic parameters were assessed using a PowerLab data acquisition system and analyzed using Chart software (both purchased from ADInstruments, Basile, Italy).

Basal conditions

The cardiac performance of the Langendorff-perfused rat heart was evaluated for inotropic effects by analyzing the left ventricular pressure (LVP) (mmHg), which is an index of contractile activity, the rate-pressure product (RPP), which is an index of cardiac work (28), the maximal value of the first derivative of LVP [$+(LVdP/dt)_{max}$] (mmHg/s), which indicates the maximal rate of LV contraction, and time to peak tension of isometric twitch and for lusitropic effects by analyzing the maximal rate of LVP decline of [$-(LVdP/dt)_{max}$] (mmHg/s), the half-time relaxation (HTR) (s), which is the time required for tension to fall from the peak to 50% (29), and the T/t ratio obtained by $+(LVdP/dt)_{max}/-(LVdP/dt)_{max}$ (30). Mean CP (mmHg) was calculated as the average of values obtained during several cardiac cycles (31).

rCGA1-64-stimulated preparations

Preliminary experiments (data not shown) obtained by repetitive exposure of each heart to one concentration of rCGA1-64_{S-S} (65 nM) revealed the absence of desensitization. In fact, each peptide dose produced a LVP percentage reduction of

17.7 \pm 3.61. Thus, concentration-response curves were generated by perfusing the cardiac preparations with KHS with increasing concentrations of either rCGA1-64_{S-S} or rCGA1-64_{SH} or rCGA1-64_{OX} (from 11 to 165 nM) for 10 min.

Isoproterenol (Iso) -stimulated preparations

To obtain preliminary information on the antagonistic action of either rCGA1-64_{S-S} (11, 33, and 65 nM), rCGA1-64_{SH} (65 and 165 nM), or rCGA1-64_{OX} (65 and 165 nM) toward the Iso-dependent stimulation, dose-response curves were generated by perfusing heart preparations with KHS enriched with increasing concentrations of Iso (0.1 nM-1 μ M) alone. These curves were then compared with those obtained by exposing other cardiac preparations to the same perfusion medium containing increasing concentrations of Iso (0.1 nM-1 μ M) plus a single concentration of either rCGA1-64_{S-S} (11, 33, and 65 nM), rCGA1-64_{SH} (65 and 165 nM), or rCGA1-64_{OX} (65 and 165 nM).

G_{i/o} protein involvement

To evaluate the involvement of G_{i/o} protein in the mechanism of action of rCGA1-64_{S-S}, the hearts were preincubated for 60 min with KHS enriched with pertussis toxin (PTx) (0.01 nM) and then exposed for 10 min to 65 nM rCGA1-64_{S-S}. As shown in the rat heart (see ref. 31 and references therein), PTx catalyzes the ADP-ribosylation of the α -subunit of G_{i/o} proteins and uncouples the interaction between G_i and inhibitory receptors of adenylate cyclase, such as adrenergic receptors.

Involvement of PI3K activity on basal performance

To establish the involvement of PI3K activity in the action mechanism of rCGA1-64_{S-S}, we used wortmannin, a potent inhibitor of PI3K. Cardiac preparations were perfused with 65 nM rCGA1-64 for 10 min and then washed out with KHS. After a return to control conditions, each heart was perfused with KHS containing wortmannin (10 nM) for another 10 min. Then the hearts were exposed to the specific drug plus 65 nM rCGA1-64_{S-S}.

Nitric oxide (NO) -cGMP-protein kinase G (PKG) pathway

To obtain preliminary information about NO pathway involvement in the cardiotropic and vasomotory action of rCGA1-64_{S-S}, cardiac preparations were stabilized for 20 min with KHS. Thus, the hearts were perfused with 65 nM rCGA1-64_{S-S} for 10 min and then washed out with KHS. After a return to control conditions, each heart was perfused with KHS containing the NO scavenger 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO), the nonspecific nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), the soluble guanylate cyclase inhibitor 1*H*-(1,2,4)oxadiazole-(4,4-*a*)quinoxalin-1-one (ODQ), or the protein kinase G blocker KT5823 for another 10 min. Then the hearts were exposed to the specific drug plus 65 nM rCGA1-64_{S-S}.

Endothelin-1 (ET-1) -stimulated preparations

To verify the ability of rCGA1-64_{S-S} to counteract the ET-1 stimulation, the hearts, stabilized for 20 min with KHS, were perfused for 10 min with ET-1 (1 nM) and then washed out with KHS. After a return to control conditions, each heart was perfused with KHS containing a single concentration of rCGA1-64_{S-S} (65 nM) plus 1 nM ET-1 for another 10 min.

cGMP and cAMP measurements

Acid extracts of frozen heart tissue used for cGMP and cAMP determinations (endocardial tissue and cardiomyocytes from atria and ventricles) (200–300 mg) were treated with 6% trichloroacetic acid at 0°C and centrifuged at 10,000 *g* for 10 min. The supernatant was extracted 3 times with 3 ml of diethyl ether saturated with water, and the aqueous phase was collected and stored at –80°C. cGMP and cAMP concentrations were measured using a commercial enzyme immunoassay (Biotrak enzyme immunoassay system; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Isolated papillary muscle

Papillary muscles were dissected free from the left ventricle under a stereomicroscope and superfused with oxygenated Tyrode's solution at 36°C. Papillary muscles were driven at constant frequency (120 beats/min) with a pair of electrodes connected to a 302-T Anapulse Stimulator *via* a 305-R Stimulus Isolator (W. P. Instruments, New Haven, CT, USA) operating in constant current mode. Isometric twitches were evaluated with a Harvard transducer (60-2997) and continuously acquired and recorded with a PowerMac computer, using LabVIEW software (National Instruments Corp., Austin, TX, USA). Before each experiment, papillary muscles were equilibrated in oxygenated (100% O₂) Tyrode's solution for at least 30 min (32). To verify whether rCGA1–64_{S,S}, rCGA1–64_{SH}, or rCGA1–64_{OX} affects mammalian basal cardiac performance, rat papillary muscles were exposed to increasing concentrations of either rCGA1–64_{S,S} (1–100 nM), rCGA1–64_{SH} (50–100 nM), or rCGA1–64_{OX} (50–100 nM) to generate concentration-response curves. Each treatment lasted for 20 min, and then the perfusion was switched to Tyrode's solution alone, to study the reversibility of the effects. To test the antiadrenergic effect of CGA-derived peptides, they were applied in the presence of 1 μM Iso. All solutions containing drugs were prepared immediately before the experiments. N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (1 mM) was used to block the synthesis of NO. Wortmannin (100 nM) was used to block the activity of PI3K.

Ventricular cardiomyocytes

The hearts were explanted, washed in modified calcium-free Tyrode's solution (for this and other solutions, see the next section), and cannulated *via* the aorta. All of the following operations were carried on under a laminar flow hood. The heart was perfused at a constant flow rate of 10 ml/min with calcium-free Tyrode's solution with a peristaltic pump for ~5 min (37°C) to wash away the blood and then with 10 ml of calcium-free Tyrode's solution supplemented with collagenase (0.3 mg/ml) and protease (0.02 mg/ml). Hearts were then perfused and enzymatically dissociated with 30 ml of calcium-free Tyrode's solution containing 50 μM CaCl₂ and the same enzymatic concentration mentioned before. Atria and ventricles were then separated, and the ventricles were cut in small pieces and shaken for 10 min in 20 ml of calcium-free Tyrode's solution in the presence of 50 μM CaCl₂, collagenase, and protease (32).

Measurement of calcium transients

Cardiomyocytes were loaded with indo-1 AM (2 μM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with a 40-min incubation at 37°C. Cells were then washed in control Tyrode's solution and placed on the stage of an inverted microscope. Cells were stimulated electrically at a frequency of 2 Hz by a two platinum electrode insert (RC-37W; Warner Instruments,

Hamden, CT, USA) connected to a bipolar stimulator (SIU-102, Warner Instruments). Calcium transients were evaluated as the fluorescence ratio at 400 nm/490 nm emitted by the cells excited at 350 nm. During the experiments, cardiomyocytes were maintained in standard Tyrode's solution, and solution changes were performed with a microperfusion system. The experiments were recorded by AxoGraph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) on an Apple PowerMac computer and analyzed with IGOR software (Wavemetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA).

BAE-1 cells

The effects induced by rCGA1–64_{S,S} on intracellular calcium concentration and NO production were studied in BAE-1 cells by confocal microscopy. BAE-1 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (lot 15B0019; Biowhittaker, Verviers, Belgium), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, and 0.25 mg/ml Fungizone at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Cells were used at passages 2–6.

Confocal fluorimetric measurements were performed using an Olympus FluoView 200 laser scanning confocal system (Olympus America Inc., Melville, NY, USA) mounted on an inverted IX70 Olympus microscope, equipped with an ×60 oil-immersion objective (NA 1.2). Cells were seeded on glass-bottom dishes (35/22 mm Ø, WillCo Wells, Amsterdam, The Netherlands) at a density of 5000 cells/cm². For simultaneous calcium and NO measurements, cells were loaded simultaneously with fluo-3 AM (2 μM; Invitrogen) and DAR-4M AM (2 μM; Invitrogen) for 30 min at 37°C and excited at 488 and 568 nm. Emission signals were filtered with 515-nm (for fluo-3 AM) and 610-nm (for DAR-4M AM) bandpass filters. During the experiments, BAE-1 cells were maintained in standard Tyrode's solution. Solutions were applied with a microperfusion system (pipette inner diameter 200 μm) (32). X-Y plane images (resolution 512×512 pixels) were acquired every 3.3 s and subsequently analyzed with ImageJ, a public domain Java image-processing software tool (ImageJ, version 1.36; W. Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Changes in intracellular calcium concentration were represented as $(F - F_0)/F_0$ to normalize the traces. As the reaction of DAR-4M AM with NO forming the corresponding fluorescent triazole compound is not reversible, changes in intracellular NO synthesis were both expressed as $(F - F_0)/F_0$ and as the first derivative of the fluorescence signal, to highlight accumulating NO synthesis over slope changes.

Solutions and drugs

rCGA1–64 was synthesized in the INSERM U575, Physiopathology of Nervous System, Strasbourg, France. Peptides were synthesized as follows. Rat CGA1–64 was synthesized on an ABI 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) using the standard procedures of 9-fluorenylmethoxycarbonyl chemistry (33). Formation of the disulfide bridge between C17 and C38 was obtained in the presence of *N*-ethyl-diisopropylamine at pH 8.5, leaving the mixture to stand under open atmosphere for 24 h until the reaction was complete, according to the Ellman test (34). To oxidize CGA1–64, the oxidizing agent was prepared by addition of formic acid to 30% hydrogen peroxide (v/v, 9:1) and stirring at 20°C for 45 min. The mixture was chilled at 0°C for 30 min, and the reaction was stopped by dilution with water (500 μl). Samples were then concentrated by evaporation but

not to dryness. This washing step was repeated 3 times to eliminate completely performic acid.

The perfusion solution consisted of a modified nonrecirculating KHS containing 113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgSO₄, 1.8 mM CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 11 mM glucose, 1.1 mM mannitol, and 5 mM sodium pyruvate (pH 7.4; 37°C; 95%O₂:5%CO₂). Calcium-free Tyrode's solution contained 135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM HEPES, 10 mM glucose, 10 mM butanedione monoxime, and 5 mM taurine, pH 7.40, adjusted with NaOH. Iso, ET-1, L-NMMA, PTIO, ODQ, KT5823, and wortmannin were purchased from Sigma-Aldrich Corp. All drug-containing solutions were freshly prepared before the experiments.

Statistical analysis

All values are presented as the mean ± SE. All data were subjected to ANOVA followed by the Bonferroni correction for *post hoc t* tests. Significance was accepted at $P < 0.05$. The concentration-response curves of the stimulation of LVP induced by Iso alone and by Iso plus different peptides were fitted using GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). This provided for each curve the concentration (in $-\log M$) of Iso alone and of Iso plus different peptides that induced a 50% effect (EC₅₀).

RESULTS

Basal conditions and effects of rCGA1-64_{S,S}

Langendorff perfused heart

Basal parameters of this preparation are presented in **Table 2**. Performance variables measured every 10 min showed that the heart is stable for up to 180 min.

Previous work revealed that human recombinant VS-1 (STA-CGA1-76; hereafter hrVS-1) exerts a negative inotropic effect in isolated rat heart (5) as well in rat papillary muscle (32). To verify whether rCGA1-64_{S,S}, rCGA1-64_{SH}, or rCGA1-64_{OX} affect mammalian basal cardiac performance, rat cardiac preparations were exposed to increasing concentrations of either rCGA1-64_{S,S}, rCGA1-64_{SH}, or rCGA1-64_{OX} to generate concentration-response curves. The effects of all three peptides remained stable until 15–20 min. Accordingly, cardiac parameters were measured at 10 min.

TABLE 2. Baseline cardiac parameters in Langendorff perfused rat heart

Cardiac parameter	Baseline value
LVP	89 ± 3 mmHg
HR	280 ± 7 beats/min
RPP	2.5 ± 0.1 × 10 ⁴ mmHg beats/min
CP	63 ± 3 mmHg
+ (LVdP/dt) _{max}	2492 ± 129 mmHg/s
− (LVdP/dt) _{max}	1663 ± 70 mmHg/s
Time to peak tension	0.08 ± 0.01 s
HTR	0.05 ± 0.01s
T/−t	−1.49 ± 1.84

RCGA1-64_{S,S} caused a concentration-dependent negative inotropic effect, showed by a decrement of LVP, significant starting from 33 nM. The peptide also caused a reduction of RPP and + (LVdP/dt)_{max}, significant from 65 nM, without changing HR (**Fig. 1A**). Analysis of the lusitropic changes revealed a reduction of − (LVdP/dt)_{max} and an increase in T/−t from 65 nM. rCGA1-64_{S,S} did not affect HTR (**Fig. 1A**). Notably, the peptide induced a significant vasodilation starting from 33 nM (**Fig. 1A**). rCGA1-64_{SH} significantly decrease LVP at 65, 110, and 165 nM. No significant changes were detected in the case of the other parameters tested (**Fig. 1A**). rCGA1-64_{OX} significantly increased HR at 11 and 33 nM and + (LVdP/dt)_{max} at 65, 110 and 165 nM, without affecting the other parameters (**Fig. 1A**).

Isolated papillary muscle

We observed that rCGA1-64_{S,S} reduced papillary muscle contractility under both basal conditions and with β-adrenergic stimulation (1 μM Iso). Under basal conditions, low concentrations (1–5 nM) of rCGA1-64_{S,S} had no effect on myocardial contractility (**Fig. 1B**), whereas higher concentrations of rCGA1-64_{S,S} reduced developed tension in a dose-dependent manner. In contrast, neither rCGA1-64_{SH} nor rCGA1-64_{OX} affected papillary muscle contractility (**Fig. 1B**).

Structure-function relationship of three CGA1-64 peptides on Iso- and ET-1-induced myocardial inotropy

Langendorff perfused heart

To verify the possible antiadrenergic action of the three peptides, heart preparations were perfused with KHS containing increasing concentrations of Iso (0.1 nM–1 μM), either alone or in combination with one of the three rCGA peptides. Iso stimulation induced a significant increase of LVP from 5 nM to 1 μM (**Fig. 2A**). The subsequent analysis of the percentage of variations of LVP provided EC₅₀ values in the presence of increasing concentrations of either Iso alone or of Iso plus rCGA1-64_{S,S} (11, 33, and 65 nM), rCGA1-64_{SH} (65 and 165 nM), or rCGA1-64_{OX} (65 and 165 nM). Results showed that rCGA1-64_{S,S} exerts a noncompetitive antagonism on adrenergic stimulation, inducing a dose-dependent reduction of Iso intrinsic activity, which is abolished by a 65 nM concentration of the peptide. rCGA1-64_{SH} and rCGA1-64_{OX} (both at 65 nM) did not modify the intrinsic Iso activity, but they only reduced it at the highest concentration tested (165 nM) (**Fig. 2A**). EC₅₀ values (in logM) and the intrinsic activity of Iso alone and of Iso in the presence of the peptides are shown in **Table 3**.

ET-1, a potent coronary constrictor (35), is able to induce a positive inotropic effect in isolated perfused mammalian heart (36). To establish whether rCGA1-64_{S,S} is able to counteract the ET-1-mediated effects, hearts were perfused with KHS containing ET-1 alone

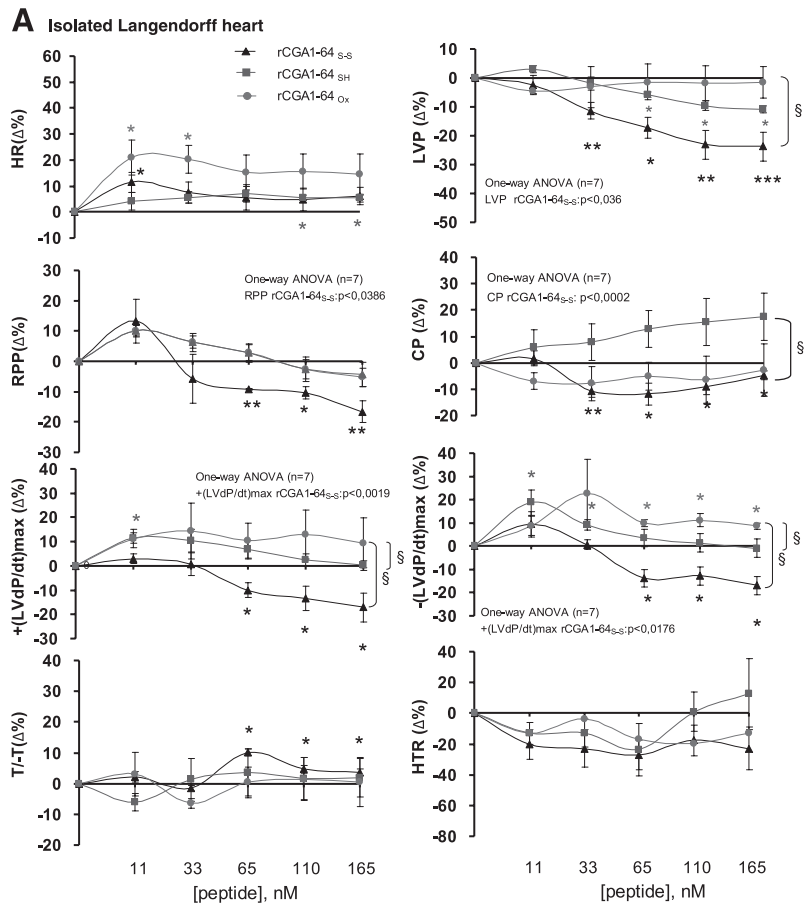
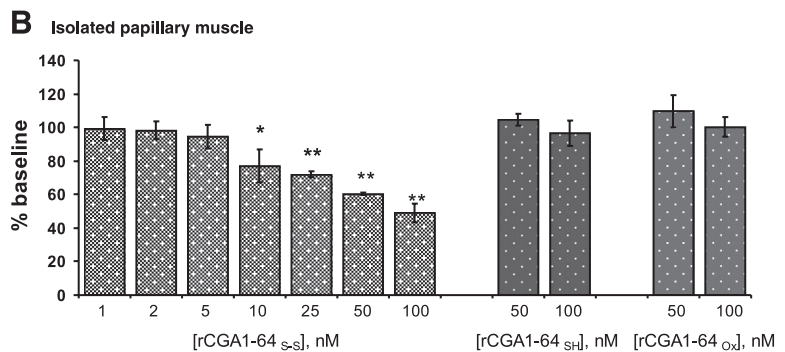


Figure 1. A) Isolated Langendorff heart. Concentration-dependent response curves of rCGA1-64_{S,S}, rCGA1-64_{SH}, or rCGA1-64_{OX} on heart rate (HR), LVP, RPP, CP, + (LVdP/dt)_{max} and - (LVdP/dt)_{max}, HTR, T/-t, or + (LVdP/dt)_{max}/-(LVdP/dt)_{max} on the isolated and Langendorff perfused rat heart preparations. Percentage changes were evaluated as means ± SE of 7 experiments. B) Isolated papillary muscle. Negative inotropic effects of rCGA1-64_{S,S} on contractility (as a percentage above baseline).



or in combination with rCGA1-64_{S,S} at 65 nM. ET-1 alone induces positive inotropism on LVP and RPP and vasoconstriction. The costimulation with rCGA1-64_{S,S} abolished the positive inotropism and significantly reduced the coronary constriction (Fig. 3A).

Isolated papillary muscle

As shown in Fig. 2B, the enhanced contractile response to Iso was blunted by rCGA1-64_{S,S} at and above 50 nM ($P < 0.01$).

Effects of rCGA65-76 on the Langendorff perfused heart

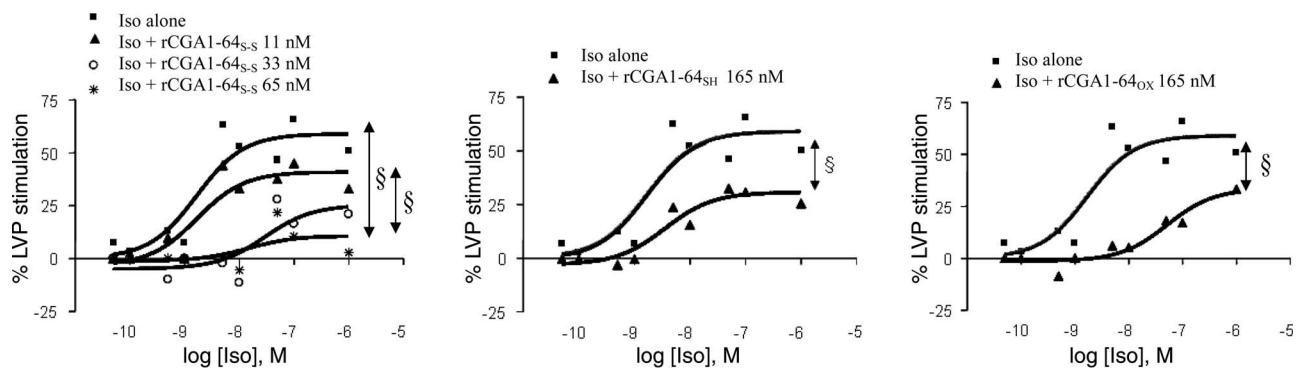
The treatment with rCGA65-76 did not modify cardiac performance at any concentrations tested except for a

small chronotropic effect at and above 11 nM. At 165 nM rCGA65-76 did not modify the intrinsic effect of Iso (results not shown).

Effects of rCGA1-64_{S,S} in rat ventricles

To verify the involvement of cGMP and cAMP pathways in the mechanism of action of rCGA1-64_{S,S}, we performed intracellular cGMP and cAMP measurements on extracts of rat heart. In Fig. 3B, 165 nM rCGA1-64_{S,S} increased cGMP while reducing the Iso-induced increase in cAMP in the heart extracts, as is to be expected for negative inotropism and counteraction of adrenergic activation in the perfused hearts, respectively.

A Isolated Langendorff heart



B Isolated papillary muscle

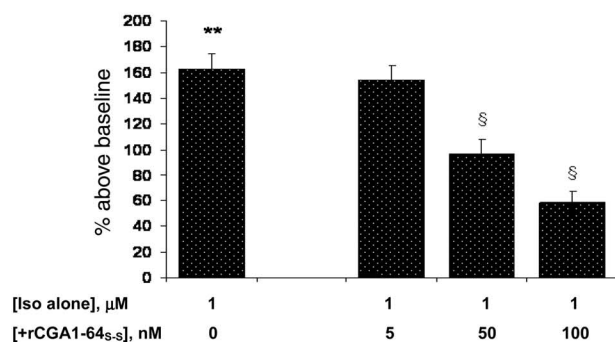


Figure 2. Concentration-dependent effects of rCGA1-64_{s-s} on Iso-stimulation of LVP (A) and on contractility (as a percentage above baseline) (B). For EC₅₀ values see Table 3. Comparison between groups (ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test); **P* < 0.05.

Effects of signal pathway inhibitors on basal response to rCGA1-64_{s-s}

Involvement of G_{i/o} protein and PI3 kinases activity on basal performance

Langendorff perfused heart To verify the involvement of the G_{i/o} protein system, cardiac preparations were perfused with KHS containing PTx in the presence of rCGA1-64_{s-s}. PTx abolished rCGA1-64_{s-s}-mediated negative inotropism [*i.e.*, LVP and +(LVdP/dt)_{max}], -(LVdP/dt)_{max} reduction, and vasodilation] (Fig. 4A). To verify the involvement of PI3K activity in the mechanism of action of the peptide, hearts were perfused with rCGA1-64_{s-s} alone and in the presence of wortmannin (37). Wortmannin abolished both the rCGA1-64-mediated inotropic effect and vasodilation (Fig. 4B).

Isolated papillary muscle On the basis of previous experiments suggesting that the negative inotropic

effect of hrVS-1 is mainly due to the activation of the PI3K-Akt-NO pathway and the consequent release of NO from endothelial cells (32), we studied the effect of rCGA1-64_{s-s} in papillary muscles pretreated with either L-NAME or with wortmannin. We observed that the negative inotropic effect of rCGA1-64_{s-s} was abrogated (Fig. 5A) after pharmacological blockade of NO synthesis. Similarly, pretreatment of papillary muscles with wortmannin before rCGA1-64_{s-s} at and above 50 nM did not reveal a basal negative inotropy as exerted by the peptide alone (Fig. 5A).

NO-cGMP-PKG signal transduction pathway

Langendorff perfused heart The involvement of the NO-cGMP-PKG signaling in rCGA1-64_{s-s}-dependent cardiomodulation was examined by perfusing the cardiac preparations with either PTIO, L-NMMA,

TABLE 3. EC₅₀ and intrinsic activity of Iso alone and Iso plus peptides

Preparation	EC ₅₀	Intrinsic activity of Iso on LVP
Iso alone	-8.7 ± 0.3 (<i>r</i> ² =0.84)	Maximum effect
Iso + rCGA1-64 _{s-s} (11 nM)	-8.7 ± 0.36 (<i>r</i> ² =0.84)	Unchanged
Iso + rCGA1-64 _{s-s} (33 nM)	-7.5 ± 0.57 (<i>r</i> ² =0.67)	Reduced
Iso + rCGA1-64 _{s-s} (65 nM)	-7.8 ± 1.15 (<i>r</i> ² =0.35)	Abolished
Iso + rCGA1-64 _{SH} (65 nM)	-8.6 ± 0.25 (<i>r</i> ² =0.92)	Unchanged
Iso + rCGA1-64 _{SH} (165 nM)	-8.4 ± 0.28 (<i>r</i> ² =0.89)	Reduced
Iso + rCGA1-64 _{OX} (65 nM)	-8.4 ± 0.14 (<i>r</i> ² =0.96)	Unchanged
Iso + rCGA1-64 _{OX} (165 nM)	-7.3 ± 0.22 (<i>r</i> ² =0.91)	Reduced
Iso + rCGA65-76 (165 nM)	-8.2 ± 0.3 (<i>r</i> ² =0.87)	Unchanged

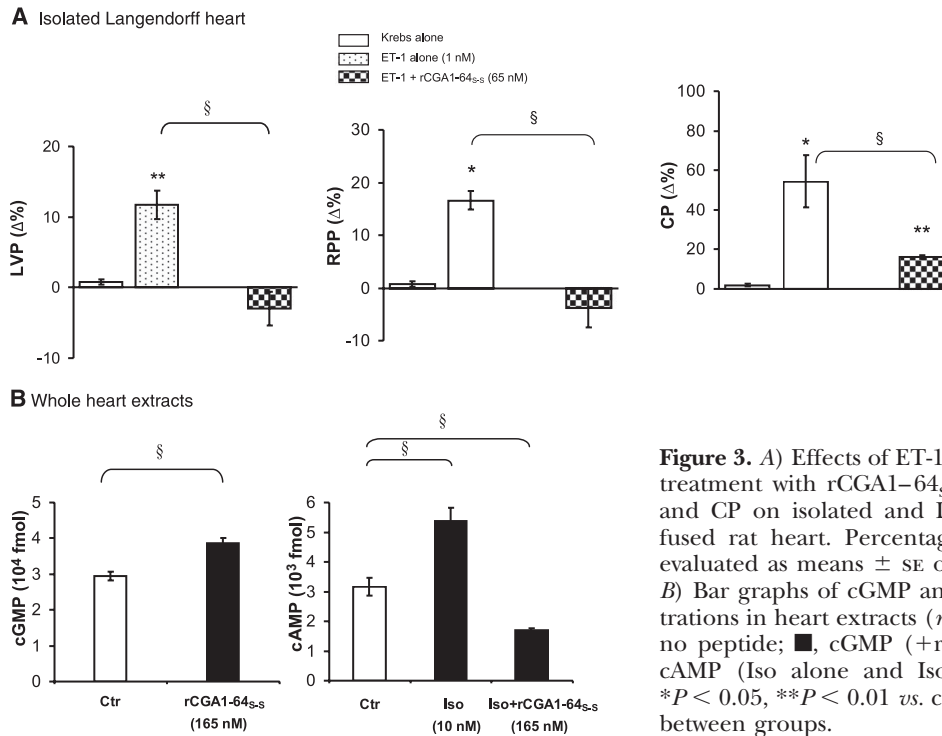


Figure 3. A) Effects of ET-1 before and after treatment with rCGA1-64_{s-s} on LVP, RPP, and CP on isolated and Langendorff perfused rat heart. Percentage changes were evaluated as means \pm SE of 5 experiments. B) Bar graphs of cGMP and cAMP concentrations in heart extracts ($n=8$). \square , control, no peptide; \blacksquare , cGMP (+rCGA1-64_{s-s}); \blacksquare , cAMP (Iso alone and Iso+rCGA1-64_{s-s}). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control. $\S P < 0.05$ between groups.

ODQ, or KT5823 in the presence of the peptide. The concentration of the antagonist was selected on the basis of preliminary dose-response curves as the first dose that does not significantly affect cardiac performance. rCGA1-64_{s-s}-induced reduction of LVP, $+(LVdp/dt)_{max}$, and $-(LVdp/dt)_{max}$; and CP was abolished by both removal of NO by the NO scavenger, PTIO, and NOS inhibition by L-NMMA (Fig. 5B). It was also abrogated by pretreatment with ODQ and KT5823 (Fig. 5B).

Calcium transients in ventricular myocytes To exclude the presence of a direct inotropic effect of rCGA1-64_{s-s} on cardiomyocytes, we performed calcium transient measurements on electric field-stimulated cardiomyocytes, loaded with the fluorescent calcium probe Indo-1.

As shown in Fig. 6, rCGA1-64_{s-s} was without effect on amplitude of calcium transients at basal conditions (Fig. 6A, arrow 2) and the Iso-stimulated response (Fig. 6B, arrow 3) (94.2 ± 2.1 and $96.5 \pm 2.9\%$ of the calcium transient amplitude in the control condition; 50 and 100 nM, $n=8$ and 6, respectively, $P > 0.05$; at 100 nM: $98.1 \pm 10.7\%$ of the Iso-stimulated calcium transient amplitude, $n=5$. $P > 0.05$). Basal and Iso-stimulated transients were not affected by either rCGA1-64_{SH} ($2.2 \pm 0.8\%$, $n=5$ and $2.2 \pm 1.1\%$, $n=5$, respectively) or rCGA1-64_{OX} ($-3.1 \pm 1.9\%$, $n=5$ and $1.9 \pm 2.8\%$, $n=3$, respectively).

NO production by BAE-1 cells

Because previous experiments on isolated papillary muscle and on isolated ventricular myocytes suggested an indirect, endothelium-derived NO-dependent effect

of rCGA1-64_{s-s}, we performed simultaneous NO and intracellular calcium measurements with fluorescent probes on BAE-1 cells. Cells were observed by confocal microscopy after loading with both fluo-3 AM and DAR-4M AM. As a positive control, we used 100 μ M ATP to induce calcium-dependent NO production.

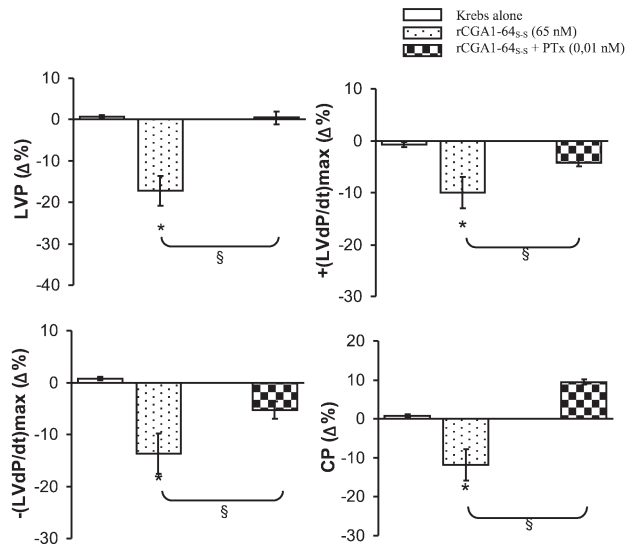
We found that, in contrast with ATP, rCGA1-64_{s-s} enhanced NO production with a mechanism that was independent from the intracellular calcium concentration. To distinguish the increase in DAR-4M AM fluorescence intensity from the accumulating basal NO synthesis, we measured the slope changes by calculating the derivative of the fluorescence intensity. Figure 6C-H shows representative experiments with rCGA1-64_{s-s} on intracellular calcium and NO production in single cells from selected fields. Figure 6C, D, F, G shows normalized fluorescence intensities of fluo-3 and DAR-4M, respectively. The peptide did not affect intracellular calcium, whereas NO production was enhanced (Fig. 6D, E). Figure 6F, G shows the normalized fluorescence intensity of fluo-3 and DAR-4M in BAE-1 cells pretreated with 100 nM wortmannin before addition of rCGA1-64_{s-s}. Wortmannin abolished the peptide effect on NO production (Fig. 6G, H). Figure 6E, H shows the slope of the fluorescence intensity in Fig. 6D, G.

DISCUSSION

rCGA1-64 is a cardioactive inhibitor

In the present study, we demonstrated that the homologous rCGA1-64 acts on the isolated and Langendorff perfused rat heart as a negative modulator of cardiac

A Isolated Langendorff heart



B Isolated Langendorff heart

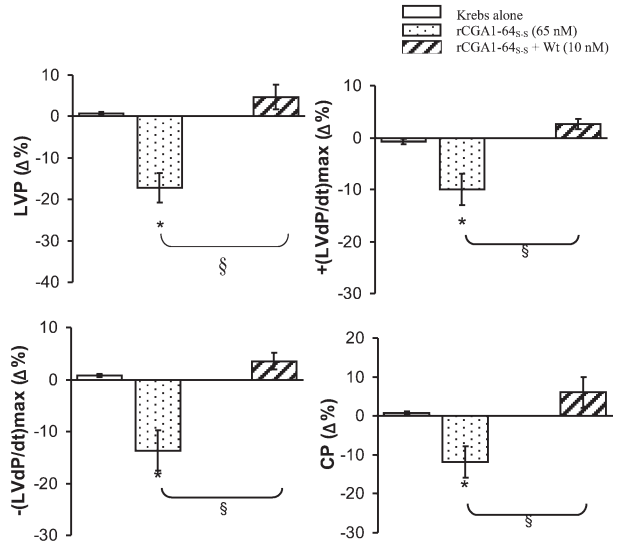


Figure 4. Isolated Langendorff heart. Effects of rCGA1-64_{S,S} before and after treatment with PTx (A) or wortmannin (Wt) (B) on LVP, $+(LVdP/dt)_{max}$, $-(LVdP/dt)_{max}$, and CP. Percentage changes were evaluated as means \pm SE of 5 experiments for each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control. § $P < 0.05$ between groups.

performance, inducing negative inotropism and lusitropism, while exerting coronary vasodilation. These myocardial effects were also obtained on isolated papillary muscle, used as an experimental model in which contractile performance is independent from any alteration of coronary flow and beating frequency. In the isolated heart, under basal (unstimulated) conditions, rCGA1-64_{S,S} significantly reduces LVP, RPP, and $+(LVdP/dt)_{max}$, *i.e.*, indexes of inotropism, and $-(LVdP/dt)_{max}$ and $T/-t$, *i.e.*, indexes of lusitropism, without modifying HR. Of note, these effects of rCGA1-64_{S,S} are elicited at the same concentrations as its precursor, CGA, in human serum (normal levels: 0.5–4 nM; neuroendocrine tumors and last stages of chronic heart failure: >10 nM) (4). The fact that the inotropic and lusitropic effects are similar to those exerted by the hrVS-1 on the rat heart (5) highlights the negative inotropic property of the VS domain. At the same time, the demonstration that rCGA1-64 induces a vasodilatation already significant at 33 nM suggests its involvement also in the regulation of coronary activity. This coronary reactivity agrees with the VS-induced vasodilation reported in human thoracic artery and saphenous vein and in bovine coronary arteries independent of the endothelium (38, 39). However, it is in contrast with the absence of coronary activity reported for the hrVS-1 in the rat heart (5). Therefore, distinct species-specific vascular sensitivities against homologous *vs.* heterologous VS peptides may account for the observed differences in coronary responses. We have recently shown that hrVS-1 has no effect on basal papillary muscle contractility (32); thus, the negative inotropism exerted by rCGA1-64 suggests a more specific action of the homologous peptide on the rat heart.

Antiadrenergic and antiendothelin influences

The analysis of the interactions between rCGA1-64 and the adrenergic signaling on the Langendorff rat heart has revealed that the peptide exerts a functional non-competitive antagonism, confirming previous results obtained with hrVS-1 (5). Accordingly, the antiadrenergic action of rCGA1-64 tested on the isolated papillary muscle preparation also shows that the peptide with the intact S-S bridge reduces the effect of Iso stimulation. Similar data were recently documented for hrVS-1 (32).

Comparison between rCGA1-64_{S,S} and hrVS-1 revealed similar negative inotropic abilities and antiadrenergic action [EC_{50} of rCGA1-64_{S,S} (65 nM) -7.8 ± 1.15 and of hrVS-1 (65 nM) -7.8 ± 0.78]. The intracellular cardiac cGMP and cAMP measurements indicated that rCGA1-64_{S,S} under basal heart performance increases intracardiac cGMP levels on the unstimulated heart while reducing the Iso-induced increased cAMP levels, according to its anti- β -adrenergic action.

An open question concerns the possible mechanisms responsible for the rCGA1-64-induced inhibition of the Iso-mediated positive inotropy. As discussed for other VS peptides (4), at present it is not known whether the cardiac effects of rCGA1-64 on its cellular targets (endocardial and coronary endothelium, smooth muscle, myocytes, intracardiac nerve terminals, fibroblasts, and others) occur *via* a classic receptor-ligand interaction or, alternatively, through hydrophobic interactions between specific peptide domains, *e.g.*, CGA1-40 and CGA47-66, and spatially localized regions of the lipid bilayer with consequent modulation of cellular effectors (40). In line with this hypothesis, at least several possible mechanisms under-

A Isolated papillary muscle

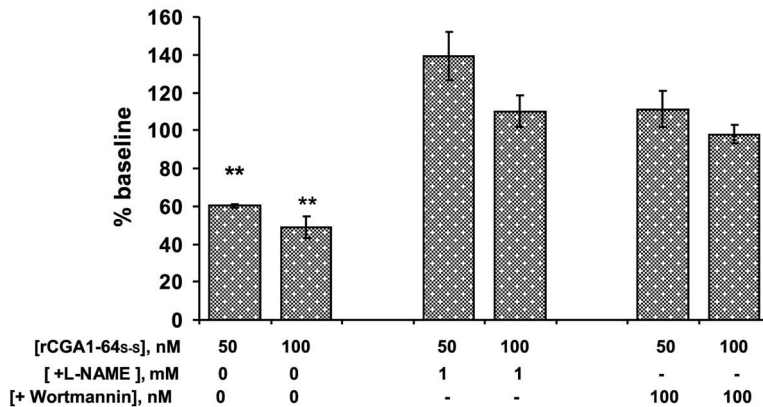
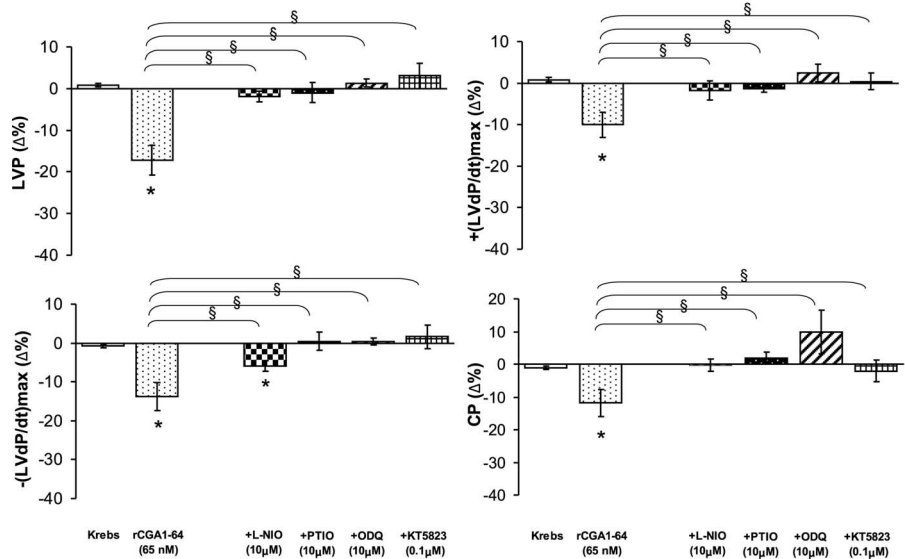


Figure 5. A) Isolated papillary muscle. The significant inotropic effect of rCGA1-64_{S,S} was prevented in the presence of L-NAME or wortmannin. B) Isolated Langendorff heart. Effects of rCGA1-64_{S,S} alone and in the presence of the NO scavenger PTIO, the eNOS inhibitor L-NIO, the guanylate cyclase blocker ODQ, and the PKG inhibitor KT5823 on LVP and $+(LVdP/dt)_{max}$, $-(LVdP/dt)_{max}$, and CP. Percentage changes were evaluated as means \pm SE of 5 to 6 experiments for each group. * $P < 0.05$ vs. control. § $P < 0.05$ between groups.

B Isolated Langendorff heart



lyng the inhibition of the Iso-mediated positive inotropy stimulation may be suggested, with one being *via* an allosteric modulation of the β -adrenergic receptor independent from the ligand binding site and the other being *via* modulation of the downstream intracellular signaling triggered by activation of the β -adrenoreceptor itself. Moreover, the observed cAMP reduction might be the result of a direct activation of the PTX-sensitive $G_{i/o}$ in a receptor-independent manner under basal conditions, independent from a direct, although noncompetitive, action *via* the adrenergic and ET-1 receptors.

An important feature of the rCGA1-64_{S,S} cardioactive profile is its ability to counteract ET-1-induced positive inotropic and coronary constrictor effects. ET-1 exerts diverse and important cardiovascular actions, including autocrine/paracrine myocardial contractile and powerful vasoconstrictor coronary effects, which are also of physiopathological concern in relation to the stressed and ischemic heart (36). In particular, the demonstration that rCGA1-64_{S,S} acts as a potent vasodilator on ET-1-precontracted coronary arteries, which illustrates for the first time on an intact coronary bed

the peptide vasoreactivity responsible for the name *vasostatin* (4), may represent another potentially beneficial attribute of this CGA-derived peptide. Therefore, in addition to the antiadrenergic action, this anti-ET-1 influence of rCGA1-64 strongly supports its role as a cardiac counter-regulatory modulator in “zero steady-state error” homeostasis postulated for other CGA-derived peptides (41). This novel function of rCGA1-64 as a *cardiostatin* may be of notable relevance in the natural defense against exaggerated cardiac hyperactivity, such as the “neuroendocrine storm” responsible for neuroendocrine cardiomyopathy and myocardial necrosis (42).

Structure-function relationship

Analyses using loop-modified peptides have revealed an order of potency for the cardiotropic and antiadrenergic actions: rCGA1-64_{S,S} > rCGA1-64_{SH} > rCGA1-64_{OX}, confirming the significance of the intact disulfide bridge loop. In fact, a previous study on the isolated frog heart using several VS-derived peptides, *e.g.*,

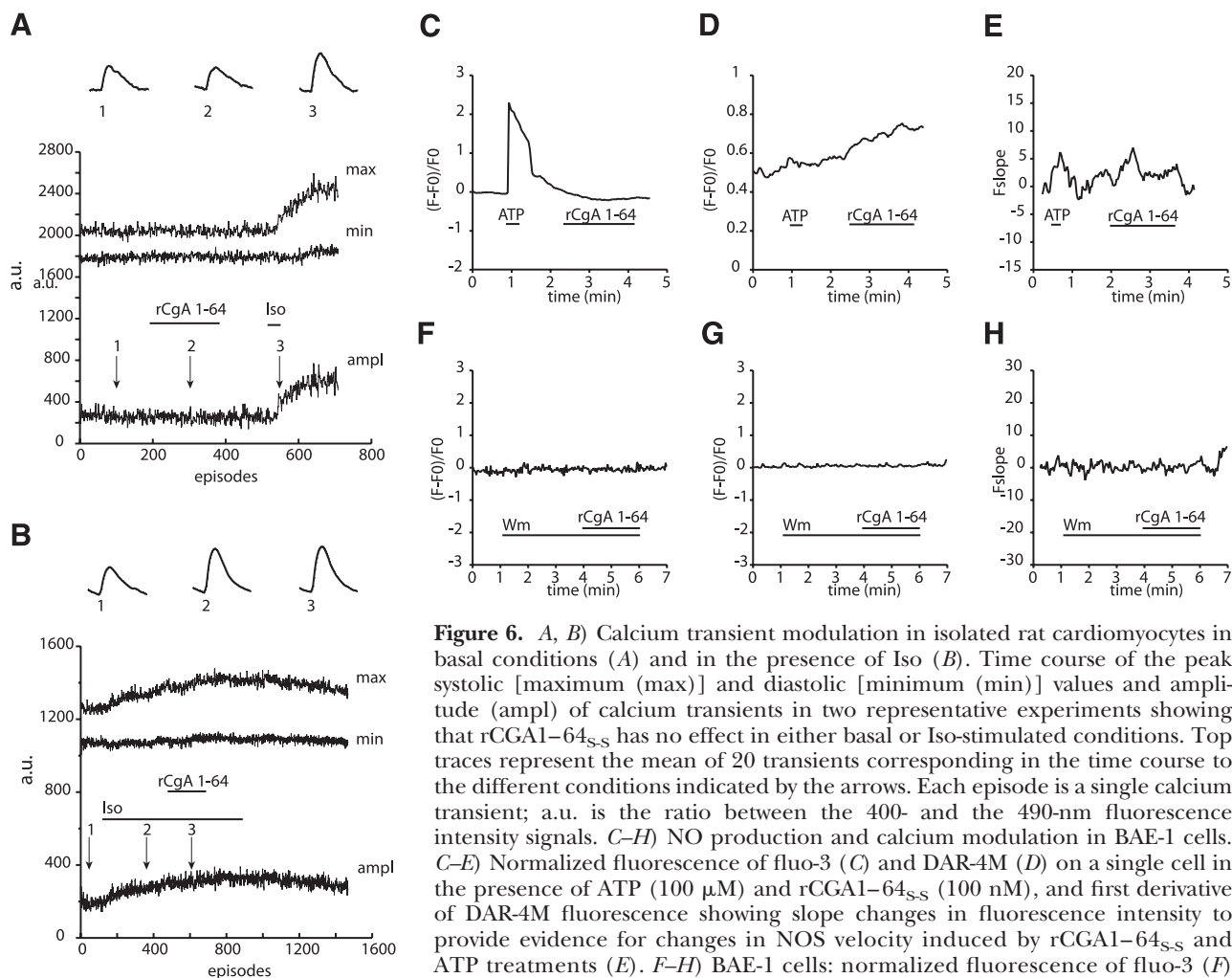


Figure 6. *A, B*) Calcium transient modulation in isolated rat cardiomyocytes in basal conditions (*A*) and in the presence of Iso (*B*). Time course of the peak systolic [maximum (max)] and diastolic [minimum (min)] values and amplitude (ampl) of calcium transients in two representative experiments showing that rCGA1-64_{S-S} has no effect in either basal or Iso-stimulated conditions. Top traces represent the mean of 20 transients corresponding in the time course to the different conditions indicated by the arrows. Each episode is a single calcium transient; a.u. is the ratio between the 400- and the 490-nm fluorescence intensity signals. *C–E*) NO production and calcium modulation in BAE-1 cells. *C–E*) Normalized fluorescence of fluo-3 (*C*) and DAR-4M (*D*) on a single cell in the presence of ATP (100 μ M) and rCGA1-64_{S-S} (100 nM), and first derivative of DAR-4M fluorescence showing slope changes in fluorescence intensity to provide evidence for changes in NOS velocity induced by rCGA1-64_{S-S} and ATP treatments (*E*). *F–H*) BAE-1 cells: normalized fluorescence of fluo-3 (*F*) and DAR-4M (*G*) and DAR-4M fluorescence derivative (*H*) on a single cell in the presence of 100 nM wortmannin (Wm) and 100 nM wortmannin plus 100 nM rCGA1-64_{S-S}. Periods of added drugs and peptide (100 nM rCGA1-64_{S-S}) are indicated by horizontal bars.

CGA1-40 and CGA7-57, has shown the crucial role of the disulfide bridge for the cardiotropic effect (43). Notably, the residues 64-65 correspond to a highly conserved, potential cleavage site in a flexible region of VS-1 (23). On the other hand, the synthetic rCGA65-76 failed to modify basal and adrenergic inotropism, further supporting our conclusion that rCGA1-64_{S-S} is sufficient for the cardiotropic effects of VS-1. The eventual biological function of the rat CGA 65-76 fragment remains to be established.

Signaling pathways for rCGA1-64_{S-S}

Preliminary analysis of the mechanism of action of rCGA1-64 showed an involvement of the G_{i/o} protein-PI3K-NO signal transduction pathway. In fact, in the isolated heart, rCGA1-64_{S-S}-induced negative inotropism was mediated by the NO-cGMP-PKG pathway. The involvement of NO is further corroborated by the findings obtained on the papillary muscle, indicating that the action of rCGA1-64_{S-S} depends on a PI3K-dependent NO release by endothelial cells. In agreement with our previous data obtained using hrVS-1

(32), the present study shows that the effect of rCGA1-64 is not due to a direct action on cardiomyocytes but is mediated by calcium-independent/PI3K-dependent NO release by endothelial cells. Indeed, rCGA1-64, although it had no effect on the intracellular calcium concentration in isolated ventricular cells, promoted the release of NO from BAE-1 cells by means of a calcium-independent mechanism. Further study is necessary for clarifying the eventual involvement of the endocardial endothelium in this mechanism.

NOS-NO-cGMP-PKG intracardiac signaling is known to be involved in the control of the contractile myocardial performance. For example, in rat ventricular myocytes, NOS-produced NO through a soluble GC-PKG mechanism induces a decrease of L-type Ca²⁺ current (44) and troponin I phosphorylation, thus negatively affecting contractility (45). Indeed, in their cardiac preconditioning study on the Langendorff rat heart, Cappello *et al.* (15) proposed that both L-type Ca²⁺ current reduction and PKG-mediated myofilament desensitization to Ca²⁺ may account for hrVS-1-induced negative inotropy and ischemic cardioprotection. Of note, the finding that rCGA1-64_{S-S}-induced coronary

dilation also was abolished by inhibitors of the NO-cGMP-PKG pathway is consistent with the possible endothelial release of vasodilator autacoids, *e.g.*, NO (46).

Calcium-independent activation of endothelial NOS (eNOS) was already reported after stimulation of endothelium with insulin, insulin-like growth factor-1, and estrogens (47). As proposed by Hartell *et al.* (48) and Shaul (49), such a mechanism might involve Akt-dependent NOS phosphorylation. In this perspective, our experiments performed on papillary muscles and on BAE-1 cells treated with wortmannin strongly suggest that the rCGA1-64-induced NO synthesis in both the endocardium-containing rat papillary muscle and the bovine aorta endothelial cells depends on PI3K activation. Interestingly, a recent report proposes a novel calcium-independent mechanism of eNOS activation involving caveolae-mediated endocytosis induced by the albumin-binding protein gp60 and activation of downstream Src, Akt, and PI3K pathways in endothelial cells (50). Because it has been proposed that VSs may interact with the caveolar domain (refs. 4, 51 and references therein) and that endothelial cells internalize CGA1-78 (52), we suggest that a similar mechanism may explain the rCGA1-64_{S-S}-dependent NOS activation in the BAE-1 cells.

CONCLUSIONS

In accordance with the concept of CGA serving as a prohormone for shorter fragments with regulatory properties (53) and our previous evidence that intact CGA in the rat heart is processed to smaller N-terminal peptides (19), this study makes it evident that rCGA1-64_{S-S} contains the potent cardiovascular principle of hrVS-1 and CGA7-57 previously demonstrated in eel, frog, and rat hearts (4), involving PI3K-dependent NO release from endocardial cells. It is hoped that increased knowledge on the physiopathological significance of locally produced and/or circulating CGA-derived peptides, particularly in reference to the myocardium and the coronary protection against prolonged and excessive stress (adrenergic and ET stimuli), may pave the way for medically oriented cardiovascular research. FJ

This work was supported by Fondazione Cassa di Risparmio di Calabria e Lucania, research project Cuore-cervello: nuovi orizzonti biomedici nello studio di neuropeptidi ad attività cardiovascolare (B.T., M.C.C., and T.A.); the Italian Ministry of University and Research (MURST ex 60%: B.T., G.A., and M.C.C.); and the Dottorato di Fisiologia, University of Turin, the Istituto Nazionale di Ricerca Cardiovascolare, and Compagnia San Paolo, Italy (A.M.Q.). O.B. was the recipient of research funds from Regione Piemonte (2004).

REFERENCES

- Helle, K. B., and Aunis, D. (2000) A physiological role for the granins as prohormones for homeostatically important regula-

- tory peptides? A working hypothesis for future research. *Adv. Exp. Med. Biol.* **482**, 389–397
- Halban, P. A., and Irminger, J. C. (1994) Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* **299**, 1–18
- Courel, M., Rodemer, C., Nguyen, S. T., Pance, A., Jackson, A. P., O'Connor, D. T., and Taupenot, L. (2006) Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **281**, 38038–38051
- Helle, K. B., Corti, A., Metz-Boutigue, M.-H., and Tota, B. (2007) The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2863–2886
- Cerra, M. C., De Iuri, L., Angelone, T., Corti, A., and Tota, B. (2006) Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res. Cardiol.* **100**, 1–10
- Mahapatra, N. R., Mahata, M., Mahata, S. K., and O'Connor, D. T. (2006) The chromogranin A fragment catestatin: specificity, potency and mechanism to inhibit exocytotic secretion of multiple catecholamine storage vesicle co-transmitters. *J. Hypertens.* **24**, 895–904
- Cecconi, C., Ferrari, R., Bachetti, T., Opasich, C., Volterrani, M., Colombo, B., Parrinello, G., and Corti, A. (2002) Chromogranin A in heart failure; a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. *Eur. Heart. J.* **23**, 967–974
- Corti, A., Ferrari, R., and Cecconi, C. (2000) Chromogranin A and tumor necrosis factor α in heart failure. *Adv. Exp. Med. Biol.* **482**, 351–359
- Omland, T., Dickstein, K., and Syversen, U. (2003) Association between plasma chromogranin A concentration and long-term mortality after myocardial infarction. *Am. J. Med.* **114**, 25–30
- Stridsberg, M., Oberg, K., Li, Q., Engstrom, U., and Lundqvist, G. (1995) Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *J. Endocrinol.* **144**, 49–59
- Nobels, F. R., de Herder, W. W., Kwekkeboom, D. J., Coopmans, W., Mulder, A., Bouillon, R., and Lamberts, S. W. (1994) Serum chromogranin A in the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* **131**, 589–593
- Hsiao, R. J., Mezger, M. S., and O'Connor, D. T. (1990) Chromogranin A in uremia: progressive retention of immunoreactive fragments. *Kidney Int.* **37**, 955–964
- O'Connor, D. T., Takiyuddin, M. A., Printz, M. P., Dinh, T. Q., Barbosa, J. A., Rozansky, D. J., Mahata, S. K., Wu, H., Kennedy, B. P., Ziegler, M. G., Wright, F. A., Schlager, G., and Parmer, R. J. (1999) Catecholamine storage vesicle protein expression in genetic hypertension. *Blood Press.* **8**, 285–295
- Mahapatra, N. R., O'Connor, D. T., Vaingankar, S. M., Hikim, A. P., Mahata, M., Ray Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N., Kennedy, B. P., Ziegler, M. G., Ross, J., and Mahata, S. K. (2005) Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J. Clin. Invest.* **115**, 1942–1952
- Cappello, S., Angelone, T., Tota, B., Pagliaro, P., Penna, C., Rastaldo, R., Corti, A., Losano, G., and Cerra, M. C. (2007) Human recombinant chromogranin a-derived vasostatin-I mimics preconditioning via an adenosine/nitric oxide signalling mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H719–H727
- Steiner, H. J., Weiler, R., Ludescher, C., Schmid, K. W., and Winkler, H. (1990) Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 845–850
- Weiergraber, M., Pereverzev, A., Vajna, R., Henry, M., Schramm, M., Nastainczyk, W., Grabsch, H., and Schneider, T. (2000) Immunodetection of α_{1E} voltage-gated Ca^{2+} channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart and in distal tubules of human kidney. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 807–819
- Miserez, B., Annaert, W., Dillen, L., Aunis, D., and De Potter, W. (1992) Chromogranin A processing in sympathetic neurons and release of chromogranin A fragments from sheep spleen. *FEBS Lett.* **314**, 122–124
- Glattard, E., Angelone, T., Strub, J.-M., Tota, B., Aunis, D., Metz-Boutigue M.-H., and Goumon, Y. (2006) Identification and characterization of vasostatin-containing peptides in rat heart. *FEBS J.* **273**, 3311–3321

20. Pieroni, M., Corti, A., Tota, B., Curnis, F., Angelone, T., Colombo, B., Cerra, M. C., Bellocci, F., Crea, F., and Maseri, A. (2007) Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. *Eur. Heart J.* **28**, 1052–1053
21. Beinfeld, M. C. (1998) Prohormone and proneuropeptide processing: recent progress and future challenges. *Endocrine* **8**, 1–5
22. Muth, E., Driscoll, W. J., Smalstig, A., Goping, G., and Mueller, G. P. (2004) Proteomic analysis of rat atrial secretory granules: a platform for testable hypotheses. *Biochim. Biophys. Acta* **1699**, 263–275
23. Metz-Boutigue, M-H., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti, R., and Aunis, D. (1993) Intracellular and extracellular processing of chromogranin A: determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **217**, 247–257
24. Iacangelo, A., Okayama, H., and Eiden, L. E. (1988) Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA. *FEBS J.* **227**, 115–121
25. Hutton, J. C., Peshavaria, M., Johnston, C. F., Ravazzola, M., and Orci, L. (1988) Immunolocalization of betagranin: a chromogranin A-related protein of the pancreatic B-cell. *Endocrinology* **122**, 1014–1020
26. Goumon, Y., Lugardon, K., Gadroy, P., Strub, J. M., Welters, I. D., Stefano, G. B., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M-H. (2000) Processing of proenkephalin-A in bovine chromaffin cells: identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **275**, 38355–38362
27. Jan Danser, A. H., and Saris, J. J. (2002) Prorenin uptake in the heart: a prerequisite for local angiotensin generation?. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 1463–1472
28. Georget, M., Mateo, P., Vandecasteele, G., Lipskaia, L., Defer, N., Hanoune, J., Hoerter, J., Lugnier, C., and Fischmeister, R. (2003) Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J.* **17**, 1380–1391
29. Brutsaert, D. L., and Sys, S. U. (1989) Relaxation and diastole of the heart. *Physiol. Rev.* **69**, 1228–1315
30. Vittoni, L., Mundiña-Weilenmann, C., Mattiuzzi, A., and Cingolani, H. (1994) Physiologic and pharmacologic factors that affect myocardial relaxation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **32**, 7–18
31. Angelone, T., Goumon, Y., Cerra, M. C., Metz-Boutigue, M-H., Aunis, D., and Tota, B. (2006) The emerging cardio-inhibitory role of the hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 336–344
32. Gallo, M. P., Levi, R., Ramella, R., Brero, A., Boero, O., Tota, B., and Alloati, G. (2007) Endothelium-derived nitric oxide mediates the anti-adrenergic effect of human vasostatin-1 (CGA 1-76) in rat ventricular myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H2906–H2912
33. Atherton, E., and Sheppard, R. C. (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (Rickwood, D., and Hames, B. D., series eds.), IRL Press, Oxford, UK
34. Deakin, H., Ord, M. G., and Stocken, L. A. (1963) Glucose 6-phosphate-dehydrogenase activity and thiol content of thymus nuclei from control and X-irradiated rats. *Biochem. J.* **89**, 296–304
35. Baydoun, A. R., Peers, S., Cirino, G., and Woodward, B. (1989) Effects of endothelin-1 on the rat isolated heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S193–S196
36. Brunner, F., Brás-Silva, C., Cerdeira, A. S., and Leite-Moreira, A. F. (2006) Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* **26**, 364–369
37. Hong, S. J., and Chang, C. C. (1998) Novel inhibition of contractility by wortmannin in skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 849–856
38. Brekke, J. F., Osol, G. J., and Helle, K. B. (2002) N-terminal chromogranin-derived peptides as dilators of bovine coronary resistance arteries. *Regul. Pept.* **105**, 93–100
39. Aardal, S., Helle, K. B., Elsayed, S., Reed, R. K., and Serck-Hanssen, G. (1993) Vasostatin, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J. Neuroendocrinol.* **5**, 405–412
40. Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Corti, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis, D., and Metz-Boutigue M-H. (2000) Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **275**, 10745–10753
41. Koeslag, J. H., Saunders, P. T., and Wessels, J. A. (1999) The chromogranins and the counter-regulatory hormones: do they make homeostatic sense? *J. Physiol.* **517**, 643–649
42. Samuels, M. A. (2007) The brain-heart connection. *Circulation* **116**, 77–84
43. Tota, B., Mazza, R., Angelone, T., Nullans, G., Metz-Boutigue, M-H., Aunis, D., and 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
44. Abi-Gerges, N., Fischmeister, R., and Mery, P. F. (2001) G protein-mediated inhibitory effect of a nitric oxide donor on the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* **531**, 117–130
45. Hove-Madsen, L., Mery, P. F., Jurevicius, J., Skeberdis, A. V., and Fischmeister, R. (1996) Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. *Basic Res. Cardiol.* **91**, 1–8
46. Shah, A. M. (1996) Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **31**, 847–867
47. Shaul, P. W., Afshar, S., Gibson, L. L., Sherman, T. S., Kerecman, J. D., Grubb, P. H., Yoder, B. A., and McCurnin, D. C. (2002) Developmental changes in nitric oxide synthase isoform expression and nitric oxide production in fetal baboon lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, 192–199
48. Hartell, N. A., Archer, H. E., and Bailey, C. J. (2005) Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 781–790
49. Shaul, P. W. (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 749–774
50. Maniatis, N. A., Brovkovich, V., Allen, S. E., John, T. A., Shajan, N., Tiruppathi, C., Vogel, S. M., Skidgel, R. A., Malik, A. B., and Minshall, D. (2006) Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circ. Res.* **99**, 870–877
51. Tota, B., Quintieri, A. M., Di Felice, V., and Cerra, M. C. (2007) New biological aspects of chromogranin A-derived peptides: focus on vasostatins. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 11–18
52. Ferrero, E., Scabini, S., Magni, E., Foglieni, C., Belloni, D., Colombo, B., Curnis, F., Villa, A., Ferrero, M. E., and Corti, A. (2004) Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor α -induced vascular leakage. *FASEB J.* **18**, 554–556
53. Eiden, L. E. (1987) Is chromogranin a prohormone? *Nature* **325**, 301

Received for publication March 26, 2008.

Accepted for publication July 10, 2008.

Endothelin-1 induces Connective Tissue Growth Factor expression in cardiomyocytes

Anna Grazia Recchia, Elisabetta Filice, Daniela Pellegrino, Aldo Dobrina^a, Maria Carmela Cerra and Marcello Maggiolini*

Department of Pharmaco-Biology, Cell Biology, University of Calabria, 87036 Rende (CS), Italy

^aDepartment of Physiology and Pathology, University of Trieste, Italy

Running title: ET-1 induces CTGF expression in cardiomyocytes

Abstract

Endothelin (ET)-1 is a vasoconstrictor involved in cardiovascular diseases. Connective tissue growth factor/CCN2 (CTGF) is a fibrotic mediator overexpressed in human atherosclerotic lesions, myocardial infarction, and hypertension. In different cell types CTGF regulates cell proliferation/apoptosis, migration, and extracellular matrix (ECM) accumulation and plays important roles in angiogenesis, chondrogenesis, osteogenesis, tissue repair, cancer and fibrosis. In the present study, we investigated the ET-1 signaling which triggers CTGF expression in cultured adult mouse atrial-muscle HL-1 cells used as a model system. ET-1 activated the CTGF promoter and induced CTGF expression at both mRNA and protein levels. Real-time PCR analysis revealed CTGF induction also in isolated rat heart preparations perfused with ET-1. Several intracellular signals elicited by ET-1 via ET receptors and even Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) contributed to the up-regulation of CTGF, including ERK activation and induction of the AP-1 components c-fos and c-jun, as also evaluated by ChIP analysis. Moreover, in cells treated with ET-1 the expression of ECM component decorin was abolished by CTGF silencing, indicating that CTGF is involved in ET-1 induced ECM accumulation not only in a direct manner but also through downstream effectors. Collectively, our data indicate that CTGF could be a mediator of the profibrotic effects of ET-1 in cardiomyocytes. CTGF inhibitors should be considered in setting a comprehensive pharmacological approach towards ET-1 induced cardiovascular diseases.

Key Words: Endothelin-1, Connective Tissue Growth Factor, Cardiomyocytes, Signal Transduction, AP-1

1. Introduction

Endothelin-1¹ (ET-1) is a potent vasoconstrictor peptide originally isolated from the conditioned medium of cultured vascular endothelial cells [1]. ET-1 plays a crucial role in several cardiovascular diseases, including chronic heart failure, ischemic heart disease, hypertension, atherosclerosis, pulmonary hypertension and chronic renal failure [2,3]. Although the endothelium is the principle source of vascular ET-1 in humans, other tissues are capable of ET-1 production such as vascular smooth muscle cells (VSMCs), macrophages, leukocytes, fibroblasts, kidney cells and cardiomyocytes [3]. The effects of ET-1 are mediated by two main receptor subtypes, ET_A and ET_B, which although share approximately 60% sequence homology, bind ET-1 with similar affinities. ET_A and ET_B are co-expressed in a variety of human tissues, including the vasculature, whereas in endothelial cells and the renal medulla the ET_B form has been reported to be more abundant [3]. Human cardiomyocytes predominantly express ET_A, although ET_B is present in the heart conducting tissue [3]. Activation of ET_A and ET_B elicits diverse biological responses depending on the identity of the receptor expressed in a particular tissue and the second messenger pathways activated [2,4]. Moreover, ET-1 receptor activation triggers signal transduction cascades that induce the transcription of genes like c-fos and c-jun, which are implicated in the mitogenic, hypertrophic and differentiation effects of ET-1 through the formation of the activator protein 1 (AP-1) complex [4]. In this regard, it is worth to note that different studies have demonstrated an increase in myocardial AP-1 DNA binding activity in experimental

¹ Abbreviations:

ET-1, Endothelin-1; CTGF, Connective tissue growth factor/CCN2; ECM, extracellular matrix; VSMCs, vascular smooth muscle cells; AP-1, activator protein 1; EGFR, epidermal growth factor receptor; DCN, decorin.

models of cardiac hypertrophy [5-6]. Moreover, the use of a dominant negative c-Jun (DN-Jun) which inhibits AP-1 activity has indicated a key role for c-jun as a mediator of cardiomyocyte hypertrophy [7].

Connective tissue growth factor/CCN2 (CTGF) is a heparin-binding 38-kDa member of CCN family proteins that regulates a wide-range of biological effects including cell proliferation, adhesion, angiogenesis, cell migration, extracellular matrix (ECM) production, fibrosis and apoptosis targeting primarily fibroblasts, endothelial cells, epithelial cells, chondrocytes, mesangial cells, neurons and as recently demonstrated also cardiac myocytes [8,9,10,11]. A significant number of studies have provided evidence that an increased expression of CTGF is associated with fibroproliferative disorders [9] and that CTGF knockdown or inhibition can prevent the progression of fibrotic lesions [12,13]. In the cardiovascular system, CTGF overexpression has been reported to be correlated with fibrosis in human atherosclerotic lesions, myocardial infarction and fibrosis [9]. Previous studies have suggested that ET-1 promotes a rapid increase of CTGF expression in cardiac myocytes [14] and that CTGF mediates the profibrotic effects of angiotensin II [15] and ET-1 in VSMCs [16]. Moreover, ET-1 cooperates with growth factor receptor signaling, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), to induce chronic fibrosis [17].

Recently, it has been proposed that the EGFR and other growth factor receptors form signaling networks activated by stimuli that do not directly interact with them [18]. Therefore, even in the absence of growth factor binding to its cognate receptor (e.g. the lack of EGF to bind EGFR) the receptor can be transactivated and trigger a wide array of biological signaling processes. For example, agonists of vasoactive GPCRs, including those for ET-1, are potent stimuli of the EGFR although they do not directly bind to the EGFR [18]. EGFR transactivation by GPCRs is detectable within minutes after GPCR stimulation and the GPCR-induced release of EGFR ligands cannot be easily detected. Indeed, several ligand-independent pathways and a

nonclassical ligand-dependent pathway have been proposed to explain the transactivation of the EGFR [18].

In this study, we evaluated the molecular mechanisms through which ET-1 up-regulates the expression of CTGF in cardiac-muscle HL-1 cells [19] used as a model system. Our data provide novel insights into ET-1 signaling which may lead to profibrotic effects in cardiovascular diseases.

2. Materials & Methods

2.1. Materials

Endothelin-1 (ET-1) and the antagonists BQ123, BQ788, SP600125 (SP), the ROS scavenger N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), Tyrphostin AG1478 (AG, Biomol Research Laboratories, Inc (Milan, Italy), PD98059 (PD, Calbiochem, Milan, Italy) and human recombinant CTGF (Eppendorf, Milan, Italy) were all solubilized in DMSO, except for ET-1 and CTGF which were dissolved in water. Antibodies were as follows: goat anti-CTGF, phospho-ERK, ERK1/2, cJun, phospho-cjun, c-fos, and β tubulin antibodies and secondary antibodies were all purchased from Santa Cruz Biotechnology, DBA, Milan, Italy).

2.2. Cell Cultures

The murine cardiomyocyte-like cell line HL-1 was kindly provided by Dr. William C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, New Orleans, LA). HL-1 cells were cultured according to the published protocol [19] in Claycomb medium (JRH Biosciences, Sigma-Aldrich Srl., Milan, Italy) supplemented with 10% fetal bovine serum (JRH Bioscience, Sigma-Aldrich Srl., Milan, Italy), 100 μ g/ml penicillin/streptomycin, 0.1 mM norepinephrine (Sigma-Aldrich Srl., Milan, Italy) and 2 mM *l*-glutamine (Invitrogen, Milan, Italy).

2.3. Isolated and perfused heart preparations

The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National

Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). All procedures were supervised under the European Community guiding principles for the care and use of animals and the project was supervised by the local ethics committee. Adult male rats (Wistar, 220-280g, Harlan, Udine, Italy) were anaesthetized by i.p. injection of ethyl carbamate (2 g/kg body weight). The hearts were then dissected out and mounted on a Langendorff apparatus for perfusion with a Krebs–Henseleit solution (KHs) composed of 113mM NaCl, 4.7 mM KCl, 25mM NaHCO₃, 1.2 mM MgSO₄, 1.8 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 11 mM glucose, 1.1mM mannitol, 5 mM Na-pyruvate and gassed with 95% oxygen/5% carbon dioxide (pH7.4, 37°C). KHs was delivered at a constant flow-rate of 12 mL/min [20]. To measure cardiac activity, a water-filled latex balloon, connected to a BLPR gauge (WRI, Inc. USA), was inserted through the mitral valve into the left ventricle to allow isovolumic contractions and to continuously record mechanical parameters. The balloon was progressively filled with water up to 80 μ L to obtain an initial left ventricular end diastolic pressure of 5 to 8 mmHg [21]. All hearts were perfused for a 15 min equilibration period. After the equilibration period, hearts (n=3) were perfused for a further 45 minutes with 10nM ET-1 added to the perfusion solution to investigate the effect of the ET-1 on the changes of CTGF RNA expression. Control hearts (n=3) were perfused for up to 45 min after the pre-equilibrium period with Krebs–Henseleit solution (KHs) and vehicle. Solution containing ET-1 was freshly prepared before experiments. Left ventricular pressure, heart rate and coronary flow were monitored throughout the perfusion protocol. At the end of the perfusions, hearts were immediately processed for RNA extraction.

2.4. Reporter gene assays and promoter studies

HL-1 cells were seeded in 24-well plates, and 24 h later, cells were transiently transfected with Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals, Milan, Italy) according to the manufacturer's recommendations using 1 μ g each of CTGF promoter deletion luciferase

(*luc*) constructs (generously provided by Dr. GP Yang (Stanford University, Stanford, CA) [22]. Briefly, the CTGF promoter-reporter plasmid constructs used in transfection experiments include a 1999-bp fragment of the human CTGF promoter (from -1999 to +36, GenBankTM accession numbers AL354866 and AF316368) as well as serial deletion of the promoter at positions -736, -624, and -72. These DNA fragments were amplified by PCR from human genomic DNA and cloned into the luciferase reporter vector pGL3-basic. HindIII and NheI restriction enzyme site was engineered into 3' and 5' primers, respectively, to facilitate directional cloning into the HindIII and NheI site of the pGL3-basic vector. The -624CTGF promoter construct containing mutations from position -174/-166 corresponding to the SMAD binding site was a kind gift from Dr. GP Yang (Stanford University, Stanford, CA). Using the -624CTGF promoter construct as a template we generated mutations from position -118 to -109 corresponding to an AP1 motif with the QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Milan, Italy). The *Renilla* luciferase expression vector pRL-TK (Promega, Milan, Italy) was used as a transfection standard.

2.5. Gene expression studies

Total RNA was extracted from cell cultures and isolated hearts ($n=3$), which were homogenized with a motor-driven homogenizer prior to extraction, using the Trizol commercial kit (Invitrogen, Milan, Italy) according to the manufacturer's protocol. RNA was quantified spectrophotometrically, and its quality was checked by electrophoresis through agarose gels stained with ethidium bromide. Only samples that were not degraded and showed clear 18S and 28S bands under ultraviolet light were used for RT-PCR. Total cDNA was synthesized from the RNA by reverse transcription using the murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Milan, Italy) following the protocol provided by the manufacturer. The expression of selected genes was quantified by real-time RT-PCR using Step One (TM) sequence detection system (Applied

Biosystems Inc, Milan, Italy), following the manufacturer's instructions. Gene-specific primers were designed using Primer Express version 2.0 software (Applied Biosystems Inc, Milano, Italy) and are as follows: for CTGF, ET_A, ET_B, decorin (DCN) and the ribosomal protein 18S, which was used as a control gene to obtain normalized values, the primers were:
 5'-CATTAAGAAGGGCAAAAAGTGCAT-3' (CTGF forward) and 5'-TGCAGCCAGAAAGCTCAAAC-3' (CTGF reverse);
 5'-CGTCGAGAAGTGGCAAAGACT-3' (ET_A forward) and 5'-GGCTTAAGTGAAGAGGGAACCA-3' (ET_A reverse);
 5'-AAGATTGGTGGCTGTTTCAGTTTCT-3' (ET_B forward) and 5'-GAGCATTTTCGAGGTCATCA-3' (ET_B reverse);
 5'-CGCAGTTGGGCAAATGACT-3' (DCN forward) and 5'-ACAGCCGAGTAGGAAGCCTTT-3' (DCN reverse); and 5'-GGCGTCCCCCAACTTCTTA-3' (18S forward), and 5'-GGGCATCACAGACCTGTTATTG-3' (18S reverse). Assays were performed in triplicate, the results were normalized for 18S expression and then calculated as fold induction of RNA expression. For all experiments, cells were switched to medium without serum 24 h before treatments.

2.6. Western-blot analysis

To prepare lysates, HL1 cells were washed in PBS and solubilized with 50mM Hepes solution, pH7.4, containing 1% (v/v) Triton X-100, 4mM EDTA, 1mM sodium fluoride, 0.1mM sodium orthovanadate, 2mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin and 10 μ g/ml aprotinin. Protein concentrations in the supernatant were determined according to the Bradford method. Cell lysates (10-50 μ g of protein) were electrophoresed through a reducing SDS/10% (w/v) polyacrylamide gel and electroblotted on to a nitrocellulose membrane. After the transfer, the membranes were stained with Red Poinseau to confirm the equal loading and transfer. The membrane was blocked and incubated with the polyclonal IgG for

CTGF, phospho-specific p44/42 MAPK, p44/42 MAPK (all purchased from Santacruz, DBA Srl, Milan, Italy). β tubulin was used as loading control. The levels of proteins and phosphoproteins were detected with horseradish peroxidase-linked secondary antibodies and the ECL[®] (Enhanced chemiluminescence) System (GE Healthcare, Milan, Italy). The autoradiographs were scanned to obtain arbitrary densitometric units. Data were normalized against those of the corresponding β tubulin. The experiments were performed in triplicate and the results calculated as mean \pm SD, and expressed as protein change (%).

2.7. Gene silencing experiments.

Cells were plated onto 10-cm dishes, maintained in serum-free medium for 24 h and then transfected for additional 24 h before treatments using Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals, Milan, Italy) and appropriate control vectors, dominant negative DN/c-fos expression vector (A-Fos) (a gift from C. Vinson), or HA-v-Jun mutant Pan-Ala [23]. The SureSilencing[™] shRNA plasmids for mouse EGFR and CTGF and respective negative control plasmids (shRNA) were purchased from Superarray Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA) and were used according to the manufacturer's recommendations. The dominant negative (DN)/c-fos plasmid, a gift from C. Vinson (NIH, Bethesda, MD, USA), consists of an acidic amphipathic protein sequence appended onto the N-terminus of the fos leucine zipper, replacing the normal basic region critical for DNA binding [24]. The expression vector encoding for a nonfunctional c-jun protein mutated in its phosphorylation sites, c-Jun-Pan Ala, has been previously described [23].

2.8. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay.

HL-1 cells were grown in 10 cm dishes to 70–80% confluence, shifted to serum free medium for 24 h and then treated with vehicle or 50 nM ET-1 for 1 h. Thereafter,

cells were cross-linked with 1% formaldehyde and sonicated. Supernatants were immunocleared with sonicated salmon DNA/protein A agarose (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) and immunoprecipitated with anti-c-Fos antibody or non specific IgG (Santa Cruz Biotechnology, DBA, Milan, Italy). Pellets were washed, eluted with a buffer consisting of 1% SDS and 0.1 mol/L NaHCO₃, and digested with proteinase K. DNA was obtained by phenol/chloroform extractions and precipitated with ethanol. A 4 μ l volume of each sample was used as template to amplify by PCR two fragments located next the CTGF-5' flanking region: a fragment of 256 bp containing the AP-1 site and the second fragment of 243 bp not containing the AP-1 site. The primer pairs used to amplify the first fragment were 5'-GCTTTTTCAGACGGAGGAAT-3' (AP-1 forward) and 5'-GTCTGGAGGAGGTTCGGTCT-3' (AP-1 reverse), while the primer pairs used to amplify the second fragment were: 5'-TCTAGGGGCCCATGGTATTT-3' (non AP-1 forward) and 5'-ACACTTTAGCTCGCCAGGAA-3' (non AP-1 reverse).

2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis was done using ANOVA followed by Newman-Keuls' testing to determine differences in means. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. *ET-1 transactivates the promoter of CTGF.*

On the basis of previous studies showing that CTGF expression is up-regulated by several factors involved in cardiovascular diseases [11], we examined whether ET-1 could stimulate CTGF promoter activity in HL-1 cells used as a model system. As shown in Fig. 1, ET-1 strongly transactivated a 1999-base pair DNA fragment of the CTGF promoter transfected in HL-1 cells as well as two deletion constructs retaining 736 and 624 base pairs, respectively, upstream of the initiation start site of the CTGF gene [22]. On the contrary, using a deletion mutant retaining only 72 base pairs, ET-1 was no longer able to induce luciferase activity (Fig. 1). Hence, a region between -624 and -72 within the CTGF promoter is required for the transactivation induced by ET-1. Examination of this sequence revealed an AP-1 site at -118/-109 and a SMAD binding site at -174/-166. A construct bearing a mutated AP-1 sequence (mAP-1) did not show any transcriptional activation by ET-1, which on the contrary transactivated a construct mutated in the SMAD sequence (Fig. 1B). Taken together, these results indicate that the AP-1 site located within the -624 bp segment mediates the responsiveness of the CTGF promoter to ET-1 stimulation.

3.2. *ET-1 up-regulates CTGF expression*

The results obtained in transfection experiments prompted us to evaluate whether increasing concentrations of ET-1 (25nM to 100nM) stimulate CTGF expression in HL-1 cells. The mRNA levels of CTGF increased in a dose dependent manner (Fig. 2A) and as early as 1 hour up to 24 hours upon exposure to 50nM ET-1 (Fig. 2B). Next, having determined by real-time PCR analysis that both ET_A and ET_B receptors are expressed in HL-1 cells although the latter to a lesser extent (Fig. 2C), we used the specific ET_A and ET_B antagonists BQ123 and BQ788, respectively, to ascertain the involvement of

each receptor isoform in CTGF expression by ET-1. As shown in Fig. 2D-E, both ET receptor antagonists prevented the mRNA and protein induction of CTGF by 50nM ET-1, although BQ123 prevented CTGF expression to a lesser extent than BQ788 likely due to the higher expression of ET_A compared to ET_B.

3.3. *The EGFR-ERK transduction pathway is involved in ET-1-induced CTGF expression*

In recent years, increasing evidence has shown that the transactivation of the EGFR mediates ET-1 signaling in vascular cells [25]. Hence, we examined whether the EGFR could be involved in the CTGF expression induced by ET-1. Interestingly, treating HL-1 cells with ET-1 in combination with the EGFR inhibitor AG, the CTGF induction was no longer observed at both mRNA and protein levels (Fig. 3A and B). Moreover, this result was confirmed by knocking-down EGFR expression (Fig. 3C and D), suggesting that the CTGF response to ET-1 occurs through the involvement of EGFR. A large body of data has shown that EGFR transactivation triggers downstream signaling such as activation of the extracellular regulated kinase (ERK)/MAPK pathway, which couples EGFR-mediated signals to gene transcription [26,27]. Notably, in HL-1 cells ET-1 rapidly stimulated ERK phosphorylation, which was blocked in presence of the ERK inhibitor PD (Fig. 4A) and the EGFR inhibitor AG (data not shown). In accordance with the aforementioned results, PD also prevented the ET-1 induced CTGF up-regulation at both mRNA and protein levels by ET-1 (Fig. 4B and 4C). Considering that reactive oxygen species (ROS) have been shown to be implicated in the ET-1 transactivation of EGFR in cardiac fibroblasts [28] and a redox mechanism has been involved in CTGF regulation by ET-1 in VSMCs [16], we treated HL-1 cells with the ROS scavenger NAC which effectively suppressed the up-regulation of CTGF by ET-1 (Fig. 4 D).

3.4. *c-fos and c-jun in ET-1-induced CTGF expression*

On the basis of previous studies [29,30,31,32] including our own [33,34] showing that the activation of the EGFR/ERK cascade leads to a rapid induction of c-fos expression, we attempted to verify whether ET-1 up-regulates c-fos and its involvement in the CTGF increase by ET-1 in HL-1 cells. Noteworthy, a 2 h ET-1 treatment rapidly induced c-fos expression which was no longer evident in presence of either ET_A or ET_B inhibitors (Fig. 5A). Using inhibitors of the EGFR and ERK pathways, AG and PD respectively, we ascertained that the up-regulation of c-fos by ET-1 occurred through the involvement of the EGFR-ERK pathway (Fig. 5B). In order to evaluate whether c-fos contributes to CTGF induction by ET-1, we engineered HL-1 cells to express a dominant-negative c-fos protein, which effectively blocks the AP-1-mediated transcriptional activity [24,34]. Of note, the up-regulation of CTGF expression by ET-1 was abrogated in this experimental context suggesting that ET-1 signals through the EGFR/ERK/c-fos transduction pathway to regulate CTGF expression. On the basis of previous reports showing that an AP-1 site located next to the transcription start site of the CTGF gene is critical for the regulation of CTGF expression [22,35,36] and in accordance with our results obtained in transfection assays (see Fig. 1), we evaluated whether the induction of c-fos upon ET-1 treatment could result in its recruitment to the abovementioned AP-1 site. To this end, we performed ChIP analysis immunoprecipitating cell chromatin with an anti c-fos antibody and amplifying the AP-1 site located next to CTGF-5' flanking region. As shown in Fig. 5D, ET-1 induced the recruitment of c-fos to the AP-1 site and the recruitment of RNA-Pol II (data not shown), whereas amplifying a control DNA sequence we did not obtain any ethidium bromide staining (Fig. 5D). Hence, at least one mechanism regulating CTGF expression by ET-1 involves ERK/c-fos signaling which in turn activates the AP-1 site located next to the 5' flanking region of the CTGF gene. On the basis of previous studies showing that ET-1 is also able to regulate the expression and phosphorylation of c-jun

[31,37] which is an important partner of c-fos in AP-1 complex formation, we examined whether ET-1 could also activate c-jun in HL-1 cells. As shown in Fig. 6A and 6B, ET-1 induced both c-jun expression and phosphorylation and these effects were no longer observed in presence of either the ET_B receptor inhibitor or the JNK inhibitor SP which was also able to abolish the increase of CTGF upon ET-1 exposure (Fig. 6B). Next, the role of c-jun phosphorylation in the regulation of CTGF by ET-1 was confirmed transfecting HL-1 cells with an expression vector encoding a c-jun protein mutated in all phosphorylation sites (see Materials and Methods) (Fig. 6C). Altogether, our findings indicate that the c-fos and c-jun proteins exert a crucial role in mediating CTGF transcription induced by ET-1.

3.5. Role of ET-1 in ECM gene expression

We then sought to determine whether CTGF is involved in ET-1 induced extracellular matrix (ECM) protein regulation. Treating HL-1 cells with ET-1 and recombinant full-length CTGF, we observed an up-regulation by both agents of decorin (DCN), a core proteoglycan protein involved in the pathogenesis of atherosclerosis although contrasting effects have also been reported [38]. (Fig. 7A). Moreover, DCN induction upon ET-1 exposure was abrogated by both ET_A and ET_B inhibitors (Fig. 7B) and by the ROS scavenger NAC (Fig. 7C). The ET-1 induced DCN increase was also abrogated silencing CTGF expression (Fig. 7D-E), indicating the role elicited by CTGF in mediating the ET-1 induced up-regulation of DCN in HL-1 cells.

3.6. ET-1 up-regulates CTGF expression in the perfused rat heart

Next, we examined whether ET-1 could increase CTGF expression in isolated and perfused rat heart preparations. Following the experimental conditions described in the Materials and Methods section, rat atriums were excised after exposure to ET-1 for 1 h and subjected to RNA extraction. Interestingly, ET-1 treatment up-regulated

CTGF expression as assessed by real-time RT-PCR (Fig. 8), confirming results obtained in HL-1 cells.

4. Discussion

Previous studies have indicated that a number of stimuli including ET-1 promote structural changes in cardiovascular disease by activating specific receptors and subsequent intracellular signaling pathways [37,39]. However, the links between ET-1 induced signaling events and the hypertrophic phenotype are largely unknown. In this regard, the changes in gene expression which occur in response to activation of intracellular transduction pathways remain to be fully determined. In primary cultures of neonatal cardiac myocytes, CTGF was identified as a gene acutely induced by ET-1 [14]. Interestingly, the activity of CTGF has recently attracted much interest due to its involvement in fibrosis and ECM protein accumulation [9]. Moreover, CTGF expression increased in experimental models of hypertension, diabetes and myocardial infarction in rodent hearts [40,41,42,43], in human ischemic heart samples [40] and in a recent study CTGF was able to induce the hypertrophy of cardiac myocytes [11]. Considering that CTGF is implicated in fibrosis and hypertrophic growth in different cell contexts, its up-regulation in cardiac myocytes may co-operate together with other factors in the hypertrophic response to ET-1. While CTGF regulation has been extensively studied in different cell contexts including endothelial cells and VSMCs [8], the molecular mechanisms involved in its induction by ET-1 in cardiomyocytes have never been evaluated.

In the present study, we identified a signaling pathway which was activated by ET-1 and triggered the rapid up-regulation of CTGF in HL-1 mouse cardiomyocytes. Our results have clearly demonstrated that in this cellular context ET-1 stimulates CTGF promoter activity, mRNA expression and protein production. ET-1 stimulation involved both ET_A and ET_B receptor subtypes and in addition EGFR, as shown using specific pharmacological inhibitors

and by gene silencing experiments. Moreover, we determined that ERK phosphorylation is rapidly induced by ET-1 along with the up-regulation of both c-fos and c-jun proteins. Transfection assays using deletion constructs of the CTGF promoter sequence and ChIP analysis allowed us to identify an AP-1 site located at -118/-109 within the CTGF promoter sequence as a crucial regulator of CTGF expression by ET-1 in HL-1 mouse cardiomyocytes. We also found that ET-1 induced CTGF expression mediates the increase of the profibrotic ECM proteoglycan decorin [38, and references therein], which has also been shown to have a protective role in atherosclerotic lesions and fibrotic responses dependent on the type of vascular disorder and the stage of a particular disease, [44,45,46,47].

Both the ETA and ETB antagonists, BQ123 and BQ788, respectively, prevented the ET-1-induced CTGF expression in our investigation. Accordingly, in cultured fibroblasts both ET-1 receptor subtypes have been shown to mediate collagen synthesis [48]. In addition, ETA antagonism inhibited neointimal hyperplasia after both balloon injury by attenuating the proliferation of myofibroblasts and VSMCs and ECM formation [49] and in diabetic rats diminished vascular hypertrophy and fibronectin production [50]. ETA antagonists have also demonstrated the ability to inhibit the up-regulation of CTGF by ET-1 in VSMCs [16].

The complexity of the ET-1 signaling pathway has recently received increasing attention. In this regard, it should be pointed out that a variety of stimuli are able to engage growth factor receptors including the EGFR in triggering important physiological effects in absence of the receptor cognate ligands [18]. Interestingly, our data have shown that CTGF expression by ET-1 is abrogated in presence of the ROS scavenger NAC as well as suppressing EGFR. The latter finding was further corroborated by the fact that EGFR inhibition also prevented the ET-1-induced up-regulation of c-fos which was responsible for the AP-1 mediated CTGF expression (see below).

Previous studies reported the activation of AP-1 components by ET-1 in different cell types [51,52] and also in human choriocarcinoma [53]. Notably, AP-1 was involved in many transcriptional responses to ET-1, including the transcription of genes associated with the hypertrophic response [54] and in particular, the regulation of CTGF [35,36]. Accordingly, a treatment with ET-1 rapidly induced the recruitment of c-fos to the AP-1 site located next to the 5' flanking region of the CTGF gene as we determined by ChIP analysis, thus indicating the role elicited by the AP-1 complex in the regulation of CTGF transcription by ET-1 also in HL-1 cardiomyocytes.

As it concerns the involvement of CTGF in fibrotic processes, its function was further emphasized by the observation that the ET-1 induced up-regulation of the ECM protein decorin occurred through CTGF, as we have shown performing gene silencing

experiments. Hence, CTGF could be a mediator of ECM accumulation caused by ET-1 in the cardiac myocytes acting either in a direct manner or stimulating further molecular targets.

Herein, we have provided new insights into the molecular mechanisms involved in the regulation of CTGF by ET-1 in HL-1 cardiomyocytes as well as into the potential of CTGF to mediate the profibrotic effects of ET-1 through the involvement of additional genes such as the ECM component decorin. Our data suggest that CTGF may represent an important molecular target which should be taken into account in setting the pharmacological approach aimed to prevent or treat cardiac fibrotic diseases.

Acknowledgements

This research was supported by Ministero dell'Università e Ricerca Scientifica and Regione Calabria.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide producing vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-5.
- [2] Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 219-224.
- [3] Kirkby NS, Hadoke PW, Bagnall AJ, Webb DJ. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1105-19.
- [4] Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 2006; 110: 386-414.
- [5] Izumi Y, Kim S, Zhan Y, Namba M, Yasumoto H, Iwao H. Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 36: 511-516.
- [6] Yano M, Kim S, Izumi Y, Yamanaka S, Iwao H. Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res* 1998; 83: 752-760.
- [7] Brown PH, Chen TK, Birrer MJ. Mechanism of action of a dominant-negative mutant of c-Jun. *Oncogene* 1994; 9: 791-799.
- [8] Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci* 2006; 119: 4803-4810
- [9] Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 133-44.
- [10] Perbal B. CCN proteins: multifunctional signaling regulators. *Lancet* 2004; 363: 62-64.
- [11] Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, et al. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370: 274-8.
- [12] Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, et al. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1430-40.
- [13] Li G, Xie Q, Shi Y, Li D, Zhang M, Jiang S, et al. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J Gene Med* 2006; 8: 889-900.
- [14] Kemp TJ, Aggeli IK, Sugden PH, Clerk A. Phenylephrine and endothelin-1 upregulate connective tissue growth factor in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 603-6.
- [15] Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* 2003; 108: 1499-1505.
- [16] Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Sanchez-López E, Plaza JJ, Egido J. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005; 97: 125-34.
- [17] Mori T, Kawara S, Shinozakai M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor beta in persistent fibrosis: a mouse model of fibrosis. *J Cell Physiol* 1999; 181: 153-159.
- [18] Fernandez-Patron C. Therapeutic potential of the epidermal growth factor receptor transactivation in hypertension: a convergent signaling pathway of vascular tone, oxidative stress, and hypertrophic growth downstream of vasoactive G-protein-coupled receptors? *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 97-104.
- [19] Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2979-2984.
- [20] Cerra MC, De Iuri L, Angelone T, Corti A, Tota B. Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 43-52.
- [21] Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelici GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 360-369.
- [22] Chaqour B, Yang R, Sha Q. Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2006; 281: 20608-22.
- [23] Vinciguerra M, Vivacqua A, Fasanella G, Gallo A, Cuozzo C, Morano A, et al. Differential phosphorylation of c-Jun and JunD in response to the epidermal growth factor is determined by the structure of

- MAPK targeting sequences. *J Biol Chem* 2004; 279: 9634-41.
- [24] Olive M, Krylov D, Echlin DR, Gardner K, Taparowsky E, Vinson C. A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *J Biol Chem* 1997; 272: 18586-94.
- [25] Chansel D, Ciroldi M, Vandermeersch S, Jackson LF, Gomez AM, Henrion D, et al. Heparin binding EGF is necessary for vasospastic response to endothelin. *FASEB J* 2006; 20: 1936-8.
- [26] Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signaling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 10: 408-12.
- [27] Carpenter G. EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci STKE* 2000; 15 PEI.
- [28] Chen CH, Cheng TH, Lin H, Shih NL, Chen YL, Chen YS, et al.. Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol.* 2006; 69: 1347-55.
- [29] Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signaling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996; 379: 557-60.
- [30] Joo CK, Kim HS, Park JY, Seomun Y, Son MJ, Kim JT. Ligand release-independent transactivation of epidermal growth factor receptor by transforming growth factor-beta involves multiple signaling pathways. *Oncogene.* 2008; 27: 614-28.
- [31] Kodama H, Fukuda K, Takahashi E, Tahara S, Tomita Y, Ieda M, et al. Selective involvement of p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src in endothelin-1-induced JNK activation. *Hypertension.* 2003; 41: 1372-9.
- [32] Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, Sano M, Kato T, Tahara S, et al. Role of EGF Receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Cardiol* 2002; 34(2): 139-50.
- [33] Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates *c-fos* up-regulation by 17- β -estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 27008-27016.
- [34] Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, et al. G-protein coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17- β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1859-1866.
- [35] Xia W, Kong W, Wang Z, Phan TT, Lim IJ, Longaker MT, et al. Increased CCN2 transcription in keloid fibroblasts requires cooperativity between AP-1 and SMAD binding sites. *Ann Surg* 2007; 246: 886-95.
- [36] Moritani NH, Kubota S, Eguchi T, Fukunaga T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T, et al. Interaction of AP-1 and the *ctgf* gene: a possible driver of chondrocyte hypertrophy in growth cartilage. *J Bone Miner Metab* 2003; 21: 205-10.
- [37] Sugden PH, Clerk A. Endothelin signaling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3:343-51.
- [38] He F, Zhang Q, Kuruba R, Gao X, Li J, Li Y, et al. Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 372: 746-51.
- [39] Heineke J, Molkentin JD Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 589-600.
- [40] Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1805-1819.
- [41] Finckenberg P, Inkinen K, Ahonen J, Merasto S, Louhelainen M, Vapaatalo H, et al. Angiotensin II induces connective tissue growth factor gene expression via calcineurin-dependent pathways. *Am J Pathol* 2003; 163: 355-366.
- [42] Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, Yokota T, Zvagelsky D, Schoen FJ, et al. Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C β 2 activation and diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2709-2718.
- [43] Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, et al. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2411-2422.
- [44] Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360: 361-4.
- [45] Kolb M, Margetts PJ, Galt T, Sime PJ, Xing Z, Schmidt M, et al. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the

- fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* 2001a; 163: 770-7.
- [46] Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ, Gauldie J. Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001b; 280: L1327-34.
- [47] Al Haj Zen A, Caligiuri G, Sainz J, Lemitre M, Demerens C, Lafont A. Decorin overexpression reduces atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2006; 187: 31-9.
- [48] Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 2130-34.
- [49] Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR Jr, Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 1999; 99: 1747-1752.
- [50] Fukuda G, Khan ZA, Barbin YP, Farhangkhoue H, Tilton RG, Chakrabarti S. Endothelin-mediated remodeling in aortas of diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 21: 367-375.
- [51] Schinelli S, Zanassi P, Paolillo M, Wang H, Feliciello A, Gallo V. Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression via multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Neurosci.* 2001; 21: 8842-53.
- [52] Gadea A, Schinelli S, Gallo V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci* 2008; 10: 2394-408.
- [53] Rauh A, Windischhofer W, Kovacevic A, DeVaney T, Huber E, Semlitsch M, et al. Endothelin (ET)-1 and ET-3 promote expression of c-fos and c-jun in human choriocarcinoma via ET(B) receptor-mediated G(i)- and G(q)-pathways and MAP kinase activation. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 13-24.
- [54] Omura T, Yoshiyama M, Yoshida K, Nakamura Y, Kim S, Iwao H, et al. Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. *Hypertension* 2002; 39: 81-6.

Figure Legends

Fig.1. (A) Endothelin-1 activates the CTGF promoter. HL-1 cells were transfected with constructs encoding the CTGF promoter or deletion mutants and treated with 50 nM ET-1. (B) The ET-1 responsiveness of the -624CTGF promoter construct was no longer present mutating the -118/-109 AP-1 site (mAP1), while mutations at the -174/-166 SMAD binding site (mSMAD) retained the transcriptional response to ET-1. The luciferase activities were normalized to the internal transfection control and values of cells receiving vehicle (dark bars) were set as 1 fold induction upon which the activity induced by treatments was calculated. Each data point represents the mean \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. ● indicates $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (-) versus treatments.

Fig.2. ET-1 induces CTGF expression in HL-1 cells. (A) Dose-dependent up-regulation of mRNA expression of CTGF by ET-1 evaluated by real-time PCR. (B) Time-course of CTGF mRNA induction following treatment with 50nM of ET-1. (C) ET_A and ET_B mRNA expression evaluated by real-time PCR. 1 μ M ET_A (BQ123) and 1 μ M ET_B (BQ788) inhibitors prevent the mRNA (D) and protein (E) increase of CTGF upon 1 h and 2 h exposure to 50 nM ET-1, respectively. Representative immunoblotting of CTGF is shown in the upper panel E. Values with error bars are the average of 3 separate experiments \pm SD. ● indicates $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (-) versus treatments.

Fig.3. The up-regulation of CTGF by ET-1 requires the EGFR in HL-1 cells. CTGF mRNA (A) and protein (B) increases by 1 h and 2 h exposure to ET-1, respectively, are prevented treating cells with 10 μ M EGFR inhibitor AG1478 (AG). (C) Cells were transfected for 24 h with a control shRNA (vector) or shRNA targeting EGFR (shEGFR) and then treated for 2 h with vehicle (-) or 50nM ET-1. (D) Representative western blot showing the EGFR silencing in HL-1 cells (upper panel). ● indicates $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (-) versus treatments.

Fig.4. The MAPK transduction pathway is involved in the increase of CTGF by ET-1 in HL-1 cells. (A) The rapid (10 min) ERK1/2 phosphorylation by 50 nM ET-1 is prevented treating cells with 10 μ M of the MEK inhibitor PD98059 (PD). The upregulation of CTGF mRNA (B) and protein (C) levels by 50 nM ET-1 is abrogated in presence of 10 μ M PD. (D) CTGF protein induction by 50 nM ET-1 is inhibited by 5mM of the ROS scavenger N-acetyl-cysteine (NAC). Representative Western blots of ERK1/2 phosphorylation and CTGF are shown in the upper panels. ● indicates $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (-) versus treatments.

Fig.5. *c-fos* is involved in ET-1 induced CTGF expression in HL-1 cells. (A) The induction of *c-fos* protein levels by a 2 h treatment with 50 nM ET-1 is prevented in presence of 1 μ M ET_A (BQ123) or ET_B (BQ788) inhibitors. (B) Cells were treated for 2 h with ET-1 in combination with 10 μ M of the EGFR inhibitor AG1478 (AG) or the MEK inhibitor PD98059 (PD), lysed and immunoblotted for *c-fos*. (C) The induction of CTGF protein levels observed treating cells for 2 h with 50 nM ET-1 was abolished transfecting cells with an expression vector encoding for a DN/*c-fos* (AFos). Representative Western blots are shown in the upper panels. ● indicates $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (-) versus treatments. (D) 50 nM ET-1 induces the recruitment of *c-fos* at the AP1 site located at -181/-175 in the CTGF promoter sequence. The amplification of a region lacking the AP-1 site (Control) does not show the recruitment following the same experimental conditions described above. In control samples non-specific IgG was used instead of the primary antibody.

Fig.6. *c-jun* is involved in ET-1 induced CTGF expression in HL-1 cells. The induction of *c-jun* protein levels and *c-jun* phosphorylation (p-*c-jun*) by a 2 h treatment with 50 nM ET-1 is prevented in presence of 1 μ M ET_A (BQ123) or ET_B (BQ788) inhibitors (A) or JNK inhibitor SP600125 (SP) which also abolishes the up-regulation of CTGF observed in the above

described experimental conditions (B) Results similar to those obtained with SP were observed transfecting cells for 24 h with an expression vector encoding for a mutated c-jun protein no longer able to be phosphorylated (pan-ala c-jun) (C) Representative Western blots are shown in the upper panels. ● indicates $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (–) versus treatments.

Fig.7. CTGF mediates the up-regulation of the ECM component decorin by ET-1 in HL-1 cells. (A) Treatments with 50 nM ET-1 or 50 ng/ml CTGF for 24 h induce decorin expression (DCN). 1 μ M ET_A and ET_B inhibitors, BQ123 or BQ788 respectively, and 5mM of the ROS scavenger NAC prevent the up-regulation of DCN upon 24 h exposure to 50 nM ET-1 (B-C) DCN up-regulation by 50 nM ET-1 for 24 h was abrogated transfecting cells with a shCTGF plasmid (D) which effectively silenced CTGF expression (E). ● indicates $p < 0.05$ for cells receiving vehicle (–) versus treatments.

Fig. 8. ET-1 increases CTGF expression in isolated and perfused rat heart preparations. The mRNA expression of CTGF is up-regulated after 1 h perfusion with 10nM ET-1 in isolated rat heart preparations as evaluated by real-time PCR. ● indicates $p < 0.05$ for vehicle treatment (–) versus ET-1.

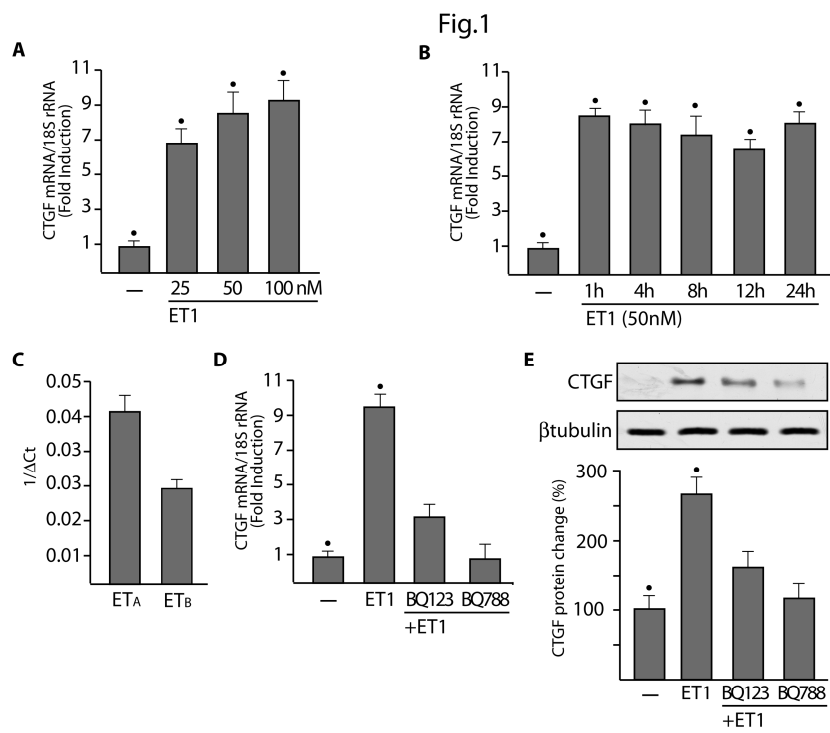
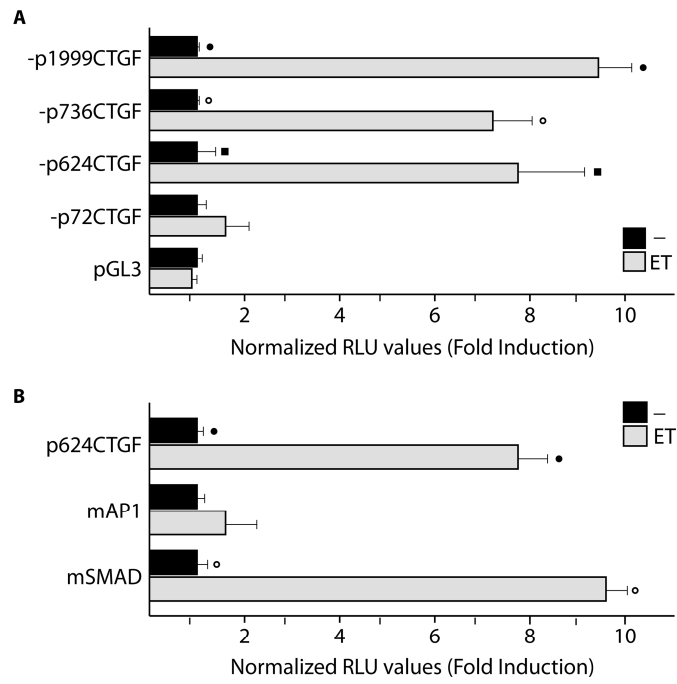


Fig. 2

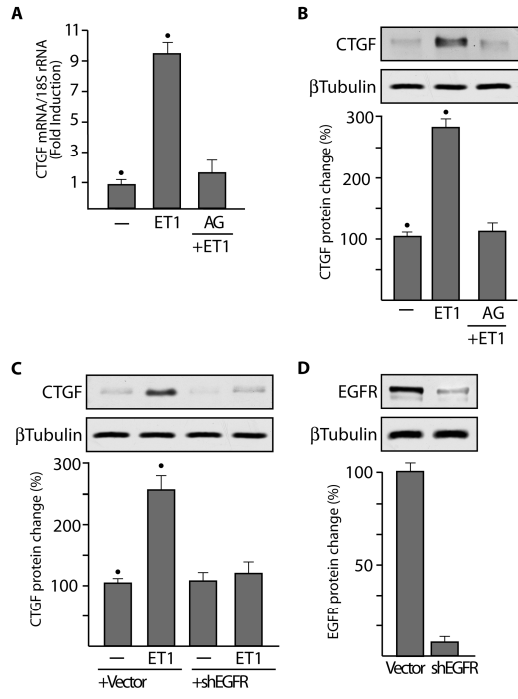


Fig. 3

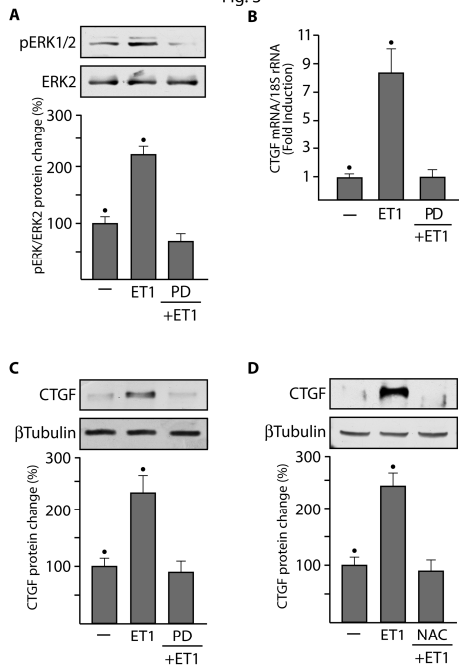


Fig. 4

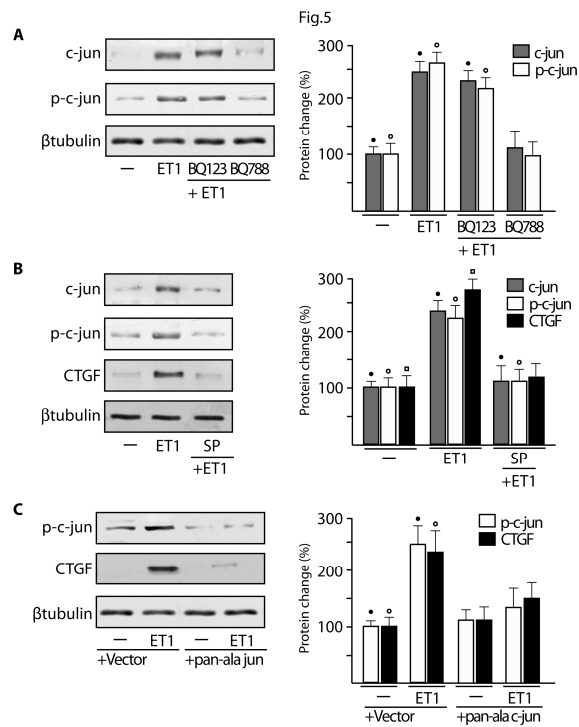
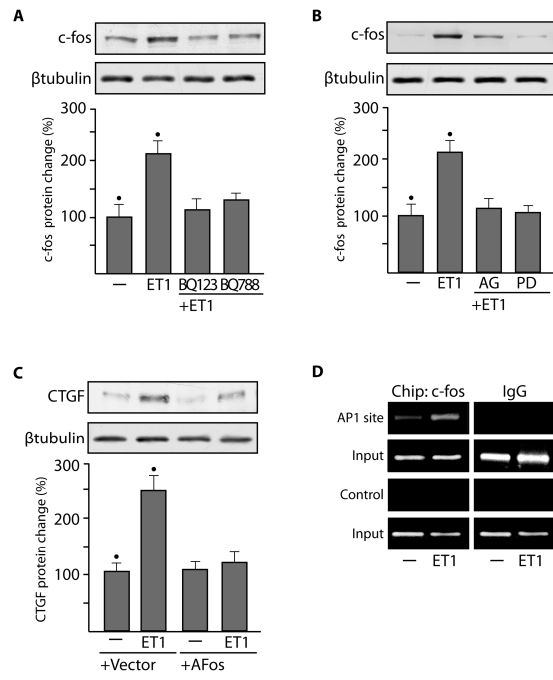


Fig. 6

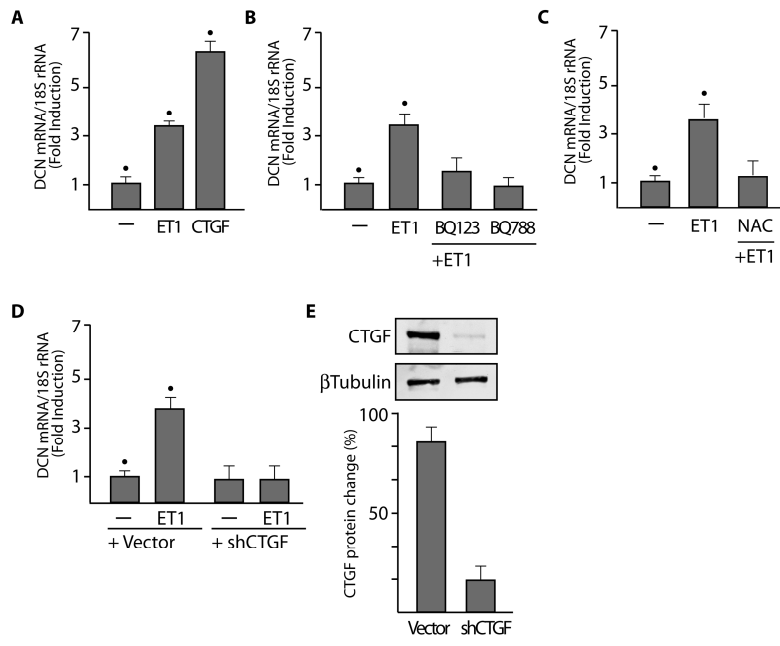


Fig. 7

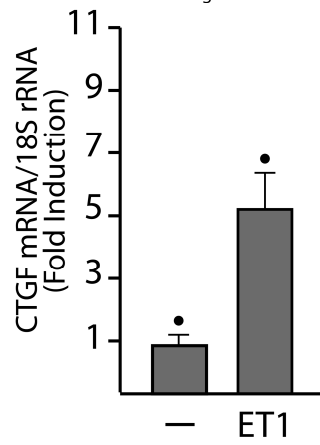


Fig. 8