

Università degli Studi della Calabria

**Dottorato di Ricerca in Biologia Animale
XX° ciclo**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09

***Effetti del frammento CGA₁₋₆₄ di ratto sul cuore isolato e
perfuso secondo Langendorff: confronto con hrVS-1***

Dott.^{ssa} Elisabetta PULERA'

Elisabetta Pulera'

Docente Tutor

Ch.ma Prof.^{ssa} Maria Carmela CERRA

Maria Carmela Cerra

Coordinatore

Ch.mo Prof. Bruno TOTA

Bruno Tota

Anno Accademico 2006/2007

Il processo di una scoperta scientifica è, in effetti, un continuo conflitto di
meraviglie.
Albert Einstein

A mio marito

Indice

Premessa e scopo.pag. 1
Summarypag. 5
Introduzionepag. 9
1. Le Cromogranine.	pag. 10
2. Le Vasostatine.pag. 17
Materiali e metodipag. 25
1. Modello sperimentale	pag. 26
2. Animali	pag. 27
3. Apparato di perfusione	pag. 27
4. Dissezione, isolamento ed incannulazione del cuore	pag. 30
5. Misurazione dell'attività contrattile del cuore.	pag. 32
6. Perfusione e composizione del perfusato.pag. 33
7. Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri.	pag. 36
8. Parametri dell'attività cardiaca.pag. 37

9. Protocolli sperimentali.	pag. 40
9.1 Composti chimici.	pag. 40
9.2 Condizioni basali di perfusione.	pag. 41
9.3 Curve dose-risposta del rCGA ₁₋₆₄ con ponte disolfuro, rCGA ₁₋₆₄ senza ponte disolfuro e rCGA ₁₋₆₄ ossidato.	pag. 42
9.4 Azione anti-adrenergica di rCGA ₁₋₆₄ con S-S, rCGA ₁₋₆₄ senza S-S e rCGA ₁₋₆₄ ossidata	pag. 43
9.5 Effetti del rCGA ₁₋₆₄ S-S in presenza di Endotelina-1.	pag. 43
9.6 Coinvolgimento delle proteine Gi/0.	pag. 44
9.7 Coinvolgimento della PI3 chinasi.	pag. 45
9.8 Coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG.	pag. 45
10. Analisi statistica.. . . .	pag. 46
Risultati	pag. 48
1. Azione inotropica e lusitropica del rCGA ₁₋₆₄	pag. 49
2. Confronto del rGCA ₁₋₆₄ con S-S con hrVS-1.	pag. 61
3. Azione anti-adrenergica dei tre peptidi.	pag. 64
4. Effetti del rCGA ₁₋₆₄ in presenza di Endotelina-1.	pag. 66

5. Coinvolgimento delle proteine Gi/0.	pag. 69
6. Coinvolgimento della PI3 chinasi sulla performance basale .	pag. 72
7. Coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG.	pag. 76
Discussione	pag. 80
1. Azione inotropica e lusitropica del rCGA ₁₋₆₄	pag. 81
2. Azione anti-adrenergica dei tre peptidi.	pag. 85
3. Effetti del rCGA ₁₋₆₄ in presenza di Endotelina-1.	pag. 88
4. Coinvolgimento delle proteine Gi/0.	pag. 89
5. Coinvolgimento della PI3 chinasi sulla performance basale .	pag. 91
6. Coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG.	pag. 92
Conclusione	pag. 95
Bibliografia	pag. 98

Premessa e scopo

La Cromogranina A (CGA), membro della famiglia delle granine, rappresenta la maggiore proteina solubile co-sintetizzata e co-rilasciata con le catecolamine nei granuli secretori delle cellule cromaffini (Banks and Helle, 1965). Essa è rilasciata mediante esocitosi ed è rapidamente processata da pro-ormone convertasi e da altre proteasi in maniera tessuto-specifica (Metz-Boutigue et al., 1993), dando origine a diversi peptidi con importanti attività biologiche.

La Vasostatina-1 (VS-1) e la Vasostatina-2 (VS-2), corrispondenti rispettivamente ai polipeptidi CGA 1-76 e CGA 1-113, derivano dal clivaggio del primo e secondo paio di aminoacidi basici del dominio N-terminale della CGA. Essi sono stati chiamati con il termine di Vasostatine (VSs) per la loro capacità di regolare la pressione sanguigna sia a livello arterioso che venoso, riducendo la vasocostrizione indotta da concentrazioni elevate di potassio e da agonisti come noradrenalina ed endotelina (Aardal e Helle, 1992; Angeletti et al., 1994).

Al pari dei vasi, anche il cuore è un organo target di questi peptidi. In letteratura sono riportati dati che ne mostrano gli effetti cardiosoppressivi in preparati di cuore di pesci, anfibi e mammiferi (Imbrogno et al., 2004; Corti et al., 2004; Tota et al., 2004; Cerra et al., 2006). In particolare, nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo

Langendorff la vasostatina ricombinante umana (hrVS-1-78) induce effetti inotropi negativi e antagonizza l'inotropismo positivo dipendente dalla stimolazione β -adrenergica con un antagonismo di tipo non competitivo (Cerra et al., 2006).

Uno studio recente ha dimostrato in estratti di cuore di ratto la presenza di frammenti N-terminali CGA-derivati, tra i quali peptidi comprendenti la sequenza della VS-1 e della VS-2 nel dominio 1-199 della CGA (Glattard et al., 2006).

Precedentemente, Metz-Boutigue e collaboratori (1993) avevano suggerito l'esistenza di un sito dibasico in posizione 64-65 che rappresenta un putativo sito di clivaggio. E' stato quindi ipotizzato che nel cuore di ratto, il peptide prodotto corrispondente alla hrVS-1, sia il frammento 1-64.

Partendo da queste premesse, scopo di questa ricerca è stato quello di investigare gli effetti del peptide CGA₁₋₆₄ di ratto sul cuore di ratto sia in condizioni basali che sotto stimolazione adrenergica. In particolare, si è voluto esaminare gli effetti del peptide di ratto CGA₁₋₆₄ in presenza di modificazioni strutturali, quali la presenza del ponte disolfuro (S-S), l'assenza del ponte disolfuro e la forma ossidata. E' stato inoltre studiato il meccanismo d'azione che è alla base degli effetti del frammento rCGA₁₋

⁶⁴, usando gli antagonisti delle proteine $G_{i/o}$, della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3-K) e del sistema NO-cGMP-PKG.

Summary

Experimental evidences suggest that Chromogranin A (CGA) plays an intracellular role in secretory vesicle biogenesis and an extracellular function as a prohormone for shorter fragments postulated to have regulatory properties (Helle and Aunis, 2000).

In the rat heart, CGA is stored in non-adrenergic myoendocrine atrial cells containing atrial natriuretic peptide (Steiner et al., 1990) and in Purkinje fibres of the rat atrium and ventricle (Weiergraber et al., 2000). Four vasostatin-containing CgA peptides have recently been extracted from the rat heart, CgA4–113, CgA1–124, CgA1–135 and CgA1–199, in addition to intact CgA and larger sized fragments containing the C-terminus (Glattard et al., 2006), indicating a less extensive CgA processing in the rat heart than in the rat adrenal medulla. Recently, Pieroni and co-workers (2007) have demonstrated that CgA is produced by human myocardium, thus representing a key player in neuroendocrine regulation of cardiac function and a potential therapeutic target in heart failure.

Using isolated and perfused *Langendorff* rat heart preparation, we demonstrated that rCGA₁₋₆₄ with disulfide-bridge induces negative inotropism and lusitropim starting from 33 nM. This action is associated with significantly vasodilation which starts at 33 nM. The structure-

function relationship study shows that the di-sulphide bridge is necessary for the cardiotropic action, because rCGA₁₋₆₄ without S-S has a small cardiotropic effect, while the oxidized peptide hasn't any effect.

The cardiac activity of CGA₁₋₆₄ was compared with that of human recombinant VS (CGA₁₋₇₆). It appeared that the two peptides have a comparable effects. A differences was observed on the coronary pressure which was decreased by the rat peptide while it was not changed by the human fragment.

All three CGA peptides are able to counteract the adrenergic stimulation with a non competitive type of antagonism, showing the following order of potency: rCGA with S-S > rCGA without S-S = rCGA oxidized.

The study of the mechanism of action of rCGA₁₋₆₄ shows that the peptide induces negative inotropism and lusitropism by NO-cGMP-PKG pathway, Gi/Go protein and Wortmannin (IP3K inhibitor) dependent mechanism. Also vasodilation was NO dependent.

Moreover rCGA₁₋₆₄ is able to counteract the positive inotropism and the potent vasoconstriction induced by ET-1.

The data from this work confirm the hypothesis that VS peptides, also produced by the heart (human, rat), can be considered important

endocrine and/or paracrine homeostatic regulators of the cardiovascular system, both under basal conditions and in the presence of stress (i.e. adrenergic, ET-1).

Introduzione

1. Le Cromogranine

Le Cromogranine appartengono a una famiglia di proteine altamente acide localizzate nei granuli secretori di cellule neuronali e neuroendocrine (Eiden et al., 1987; Huttner et al., 1991; Winkler and Fischer-Colbrie, 1992). Esistono almeno tre forme molecolari tra loro correlate denominate Cromogranina A (CGA), Cromogranina B (CGB) o secretogranina I, e Cromogranina C (CGC) o secretogranina II (Winkler e Fischer-Colbrie 1992). Queste proteine sono prodotte da geni distinti e sono caratterizzate da un eccesso di residui aminoacidici acidi con conseguente carica negativa netta (Helle 2004).

La cromogranina A (CGA), (48 kDa), il primo membro della famiglia delle granine ad essere stato identificato, è una proteina legante il calcio che si trova in molte cellule endocrine. Originariamente identificata come una delle maggiori proteine granulari solubili, è co-sintetizzata e co-rilasciata con le catecolamine nei granuli cromaffini della midollare del surrene (Banks and Helle, 1965) La CGA è costituita da 449 residui aminoacidici di cui i primi diciotto rappresentano la sequenza segnale responsabile del passaggio della proteina nascente attraverso la membrana del reticolo endoplasmatico rugoso (Strub et al., 1997).

La CGA ha un punto isoelettrico di circa 5, dovuto ad un elevato contenuto di acido glutammico. L'abbondanza di coppie di aminoacidi con residui basici, distribuiti abbondantemente nella parte carbossi-terminale, rappresenta un potenziale sito proteolitico per proteasi specifiche, la cui azione produce frammenti CGA-derivati i quali possiedono funzioni biologiche (Strub et al., 1997).

La parte amino-terminale possiede un ponte disolfuro formato da due residui di cisteina in posizione 17 e 38 che appare importante per le diverse attività biologiche della CGA.

La molecola matura della CGA (439 aa, PM 48 KDa) (Metz-Boutigue et al., 1993) è caratterizzata da un'elevata omologia tra i mammiferi, in particolare a livello delle regioni amino- e carbossi-terminali (Winkler e Fischer-Colbrie, 1992; Yanaihara et al., 1998). Studi immunologici hanno identificato proteine analoghe in uccelli, rettili, pesci e persino nei protozoi, indicando l'universalità e la lunga storia filogenetica di questa proteina (Helle e Angeletti 1994). Il confronto delle sequenze della CGA di ratto con quelle bovine ed umane ha rilevato la presenza di tre domini altamente conservati. L'estremità N-terminale della CGA di ratto (1-76) mostra una similitudine dello 85% e una omologia del 93% con la sequenza bovina, mentre con la sequenza umana

rispettivamente 86% e 94%. Il dominio (94-106) possiede 84% di identità e 92% di omologia con la sequenza della CGA sia umana che bovina. Il dominio C-terminale della CGA di ratto (334-448) presenta un'identità pari allo 88% e un'omologia del 98% con lo stesso dominio della CGA bovina, mentre con quello umano rispettivamente il 91% e 96% (Higgins, 1994). (Fig. 2)

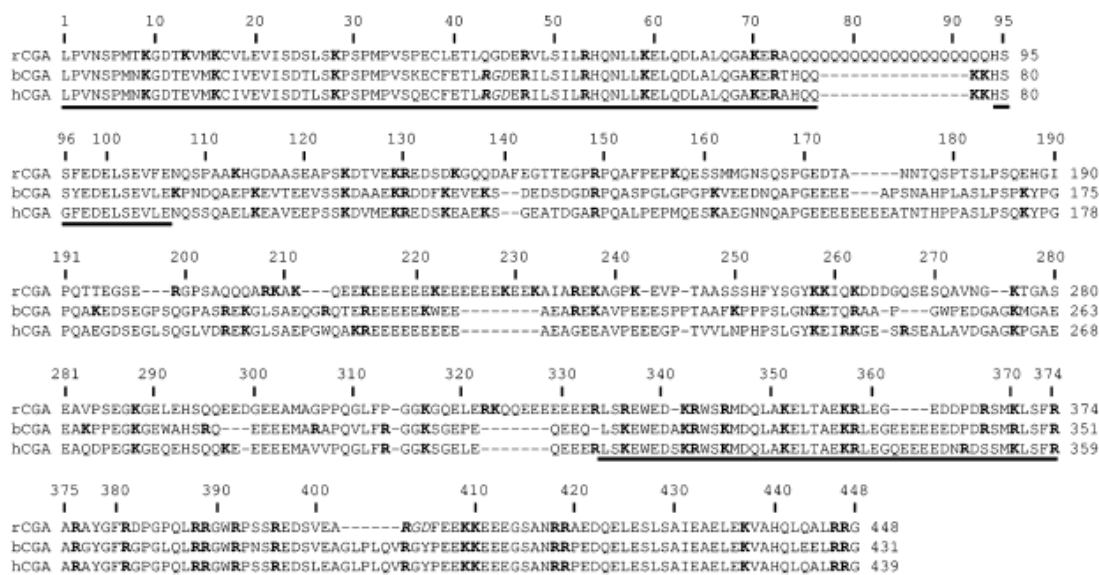


Fig.1. Analisi della struttura primaria della CGA. Confronto delle sequenze della CGA di ratto (r), bovina (b) e umana (h). Le sequenze sottolineate corrispondono alle regioni altamente conservate.

La CGA e i suoi frammenti sono rilasciati nel flusso sanguigno (Nobels et al., 1998): normalmente nei mammiferi i livelli di CGA nel plasma sono equivalenti a 1-4 nM; concentrazioni sieriche più elevate sono state riscontrate in alcune forme di stress circolatorio (Helle e Angeletti 1998), nelle malattie cardiache croniche (Corti et al., 2000) ed in soggetti con varie forme di tumore neuroendocrino (Aardal et al., 1996; Nobels et al., 1998). Ciò suggerisce che la CGA potrebbe svolgere un'azione di protezione in risposta a condizioni di stress, regolando il fabbisogno ematico durante situazioni di emergenza e guarigione (Helle e Angeletti 1998). In particolare, nei pazienti con malattie cardiache croniche, queste elevate concentrazioni sono correlate con la severità della malattia, rappresentando un indicatore prognostico di mortalità (Ceconi e al., 2002). Inoltre, un recente studio ha dimostrato per la prima volta la produzione e il rilascio di CGA dal ventricolo umano che, in soggetti infartuati, contribuisce a incrementare i livelli di CGA plasmatici (Pieroni et al., 2007). Questi dati enfatizzano l'importanza della CGA nella biologia cardiaca.

Evidenze sperimentali suggeriscono che la CGA è coinvolta in numerose funzioni biologiche intra ed extra-cellulari (Hutton et al., 1987; Rosa et al., 1985; Natori e Huttner 1996). A tal proposito Kim e

collaboratori (2001) hanno dimostrato, a livello intracellulare, un coinvolgimento di tale proteina nella biogenesi dei granuli secretori agendo sui geni coinvolti in tale processo, soprattutto a livello post-trascrizionale. E' stato visto, infatti, che la soppressione della sintesi di CGA nelle cellule causa la scomparsa delle proteine nei granuli secretori, ma non degli mRNAs che codificano i geni da essa regolati (Kim et al., 2003).

A livello extracellulare, la CGA possiede una attività biologica di tipo pro-ormonale, dedotta dall'identificazione di diversi siti di clivaggio nella sequenza primaria per un potenziale processo proteolitico (Metz-Boutigue et al., 1993). In particolare, la CGA è clivata da proteasi tessuto-specifico, e ciò da origine a peptidi biologicamente attivi che possono agire in modo autocrino, paracrino ed endocrino (Parmer and Miles, 1998). Precisamente, da essa originano peptidi come la pancreastatina (CGA₂₄₀₋₂₈₈), la parastatina (CGA₃₄₇₋₄₁₉), la catestatina (CGA₃₄₄₋₃₆₄) e le vasostatine (CGA₁₋₇₆, CGA₁₋₁₁₃) (Helle e Angeletti 1994). (Fig. 1)

I peptidi biologicamente attivi sono prevalentemente localizzati nei domini N- e C-terminali della CGA (Angeletti et al., 1996). È documentato che il processo proteolitico della CGA è sia tessuto che specie specifico (Curry et al., 1991; Watkinson et al., 1991). Di

conseguenza, come molti pro-ormoni e pro-neuropeptidi, la CGA, rilasciata nei tessuti ed in circolo, viene rapidamente processata dalle pro-ormone convertasi (PC1/3 e PC2) (Halban e Irminger 1994; Seidah e Chretien 1999), che la scindono in frammenti strutturalmente differenti (Eiden .1987; Huttner e Benedum 1987).

Cromogranina-

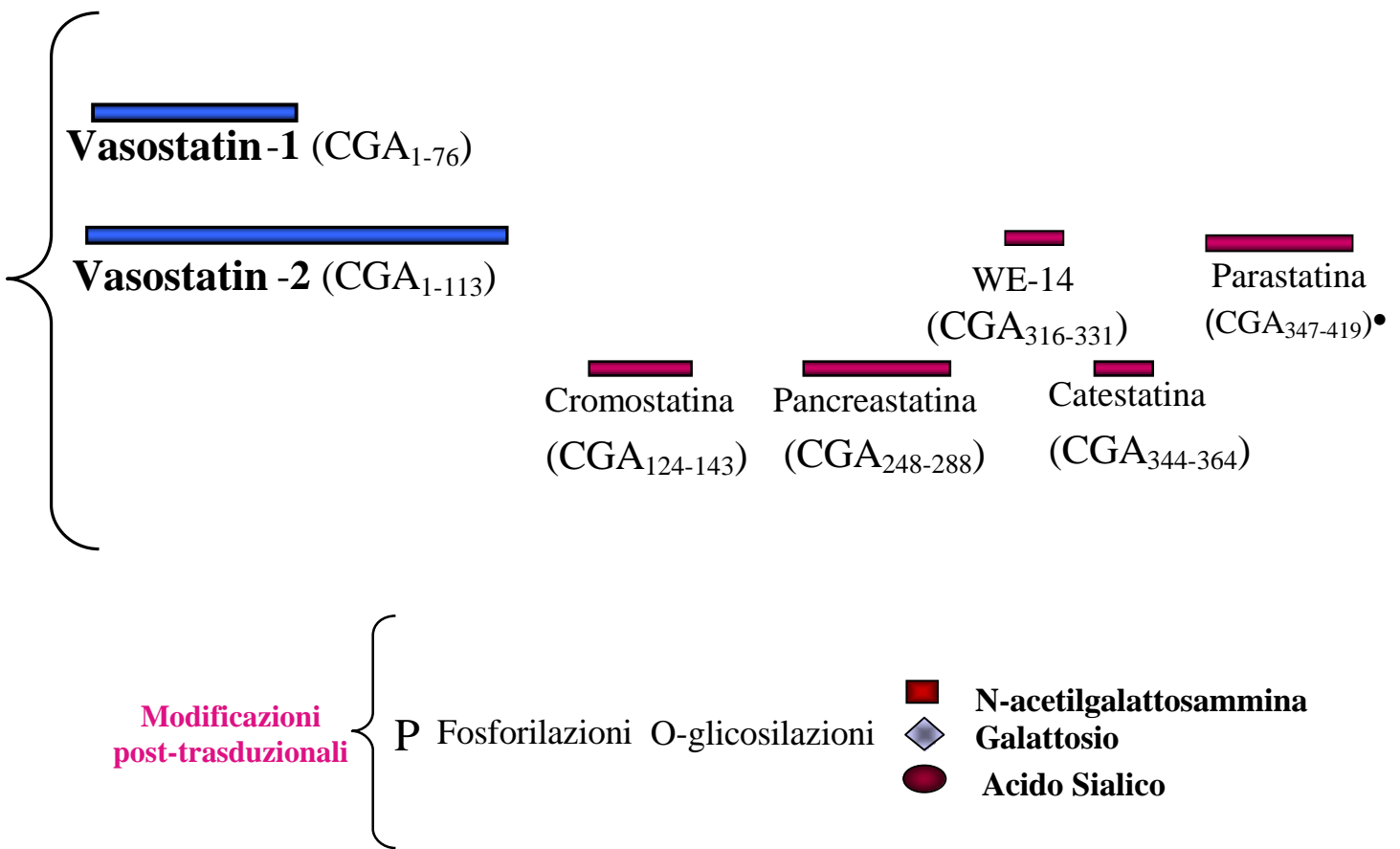
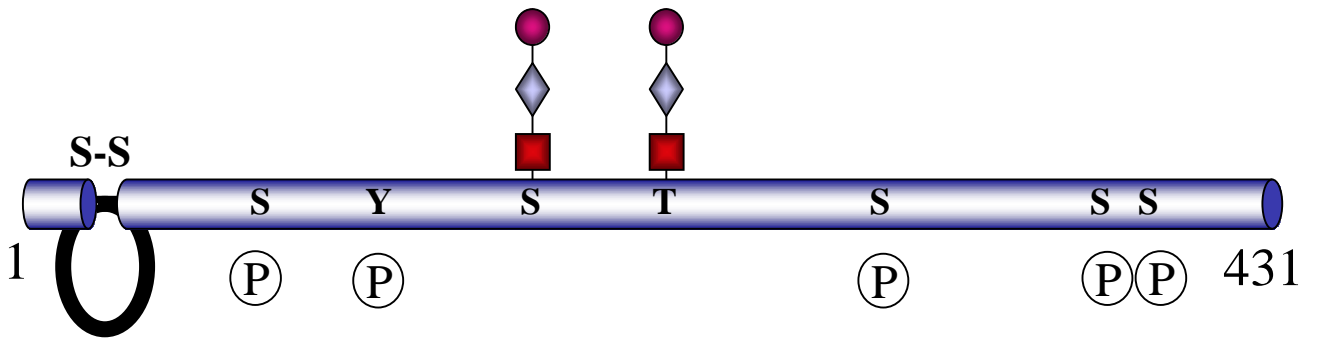


Fig. 2. Rappresentazione schematica della sequenza della CGA bovina e dei peptidi naturali e sintetici da essa derivati (modificata da Metz-Boutigue et al., 1993).

2. Le Vasostatine

I peptidi N-terminali CGA_{1-76} e CGA_{1-113} vengono chiamati rispettivamente con il termine di Vasostatina 1 (VS-1) e di Vasostatina 2 (VS-2) a causa della loro attività vasosoppressiva sui vasi sanguigni isolati umani (Aardal e Helle, 1992; Aardal et al., 1993). La VS-1 corrisponde al dominio della CGA maggiormente conservato fra vertebrati quali l'uomo (Konecki et al., 1987), il maiale (Iacangelo e Okayama, 1988), il ratto (Parmer et al., 1989) e il cavallo (Sato et al., 2000). La VS-2 deriva dal clivaggio della seconda coppia di residui aminoacidici basici del dominio N-terminale della CGA sia dell'uomo che degli animali domestici (Hutton et al., 1987). Fra le diverse forme di Vasostatine (VSs) generate nella matrice dei granuli cromaffini e rilasciate con le catecolammine, oltre alla VS-1 e VS-2, sono prodotti piccoli peptidi come CGA_{1-40} , CGA_{4-16} , CGA_{4-57} , CGA_{47-66} e CGA_{67-76} (Metz-Boutigue et al., 1993).

Sulla base delle loro attività vasoinibitoria (Aardal e Helle, 1992; Angeletti et al., 1994), le VSs sono state postulate come molecole stabilizzatrici dell'omeostasi cardio-circolatoria, proteggendo il sistema vascolare da intensi stimoli eccitatori come quelli che si osservano in risposte da stress (Helle and Angeletti, 1998). Questi peptidi inibiscono

la contrazione vascolare evocata nei preparati di segmenti di vena safena umana sia dall'elevata concentrazione di ioni potassio che da agonisti come la noradrenalina e l'endotelina (Aardal e Helle, 1992).

Evidenze sperimentali suggeriscono che la VS agisce come un peptide regolatore multifunzionale, che esercita effetti inibitori nella via autocrina, paracrina e nel meccanismo endocrino. I loro effetti dipendono dalla concentrazione del peptide presente sia in situ che nelle cellule e nei tessuti bersaglio (Helle et al., 2001). In aggiunta alla funzione autocrina svolta a livello delle cellule paratiroidi (Angeletti et al., 1996, 2000), è stato suggerito il ruolo importante che questo frammento gioca nell'immunità innata a causa della sua presenza nei fluidi infiammatori e nelle secrezioni delle cellule immunitarie, come i neutrofilii polimorfonucleati (PMN) (Corti et al., 1997). La VS-1 possiede, infatti, una spiccata attività antibatterica e antifungina che costituisce una prima e immediata risposta protettiva contro un attacco patogeno (Lugardon et al., 2000). La VS, inoltre, modula l'interazione proadesiva dei fibroblasti (Gasparri et al., 1997; Ratti et al., 2000) attraverso la regione 47-78, contenente una struttura ad α -elica anfipatica seguita da una sequenza aminoacidica simile a quella dell'ezrin-radixin-moesin (ERM). Tale regione potrebbe essere responsabile dell'interazione con la membrana

cellulare e con l'ezzin, rappresentando un nuovo meccanismo di regolazione per l'adesione cellulare (Dondossola et al., 2007). In più, la VS è candidata come regolatore omeostatico del sistema cardiovascolare. Difatti, essa controbilancia le risposte indotte da stress circolatorio ed, attraverso una riduzione del tono del muscolo liscio vasale, mantiene costante il flusso di sangue in un determinato distretto (Helle e Angeletti 1994; Helle et al., 2001).

Recentemente, sono stati documentati gli effetti cardiosoppressivi dei peptidi N-terminali derivati dalla CGA nel cuore dei vertebrati (Tota et al., 2004). In particolare, nei preparati cardiaci di anguilla e di rana si è mostrato che tali peptidi esercitano un effetto inotropo negativo e aboliscono l'effetto inotropo positivo β -adrenergico (Corti et al., 2002; Tota et al., 2004). Nel cuore isolato e perfuso di ratto secondo *Langendorff*, la VS-1 umana (hrVS-1) esercita un effetto inotropo (Cerra et 2006) e lusitropico (Pieroni et al., 2007) negativo in condizioni basali indipendente dalla reattività coronaria, e contrasta l'inotropismo e il lusiropismo positivo β -adrenergico-dipendente. In particolare, la hrVS-1 blocca la stimolazione β -adrenergica con un antagonismo di tipo non competitivo (Cerra et al., 2006).

L'analisi struttura-funzione ha rivelato anche l'importanza funzionale e l'alta conservazione filogenetica dei domini CGA₁₋₄₀ e CGA₇₋₅₇, sia nell'indurre l'effetto inotropo negativo che nel contrastare la stimolazione β -adrenergica (Corti et al., 2002; Imbrogno et al., 2004).

Un recente studio condotto da Cappello e collaboratori (2007) ha dimostrato, nel cuore di ratto, che l'effetto inotropo negativo intotto dalla hrVS-1 coinvolge la cascata trasduzionale dell'NO, fornendo nuove informazioni sul meccanismo d'azione di questo peptide CGA-derivato. Tale coinvolgimento suggerisce la possibilità che la hrVS-1 esercita un'azione protettiva. Infatti, il blocco di eNOS in presenza della hrVS-1 abolisce l'effetto protettivo. Nello stesso lavoro è stata riportata l'implicazione del recettore dell'adenosina A1 come secondo pathway nella protezione cardiaca della hrVS-1. Infatti, dati di letteratura mostrano che l'attivazione del recettore per l'adenosina A1, e la conseguente attivazione della proteina chinasi C (PKC), possono innescare il preconditionamento (Yellow e Downey 2003). Tuttavia, i dati mostrano che il blocco dell'eNOS e della PKC in presenza della hrVS-1 previene gli effetti di un infarto di lieve entità, mentre il blocco del recettore dell'adenosina A1 inibisce solo parzialmente questo effetto protettivo.

Nel cuore di ratto, la CGA è immagazzinata nei granuli secretori delle cellule mioendocrine atriali con il peptide natriuretico atriale (Steiner et al., 1990) e nelle cellule delle fibre del Purkinje del sistema di conduzione, sia dell'atrio che del ventricolo di ratto (Weiergraber et al, 2000). Alla luce di questi dati presenti in letteratura si supporta l'ipotesi di un ruolo paracrino/autocrino intracardiaco dei peptidi CGA-derivati.

Recentemente Glattard e collaboratori (2006) hanno caratterizzato nel cuore di ratto quattro peptidi endogeni N-terminali CGA-derivati: CGA₄₋₁₁₃, CGA₁₋₁₂₄, CGA₁₋₁₃₅ e CGA₁₋₁₉₉ e hanno identificato il sito per il loro processamento post traslazionale (Fig. 3).

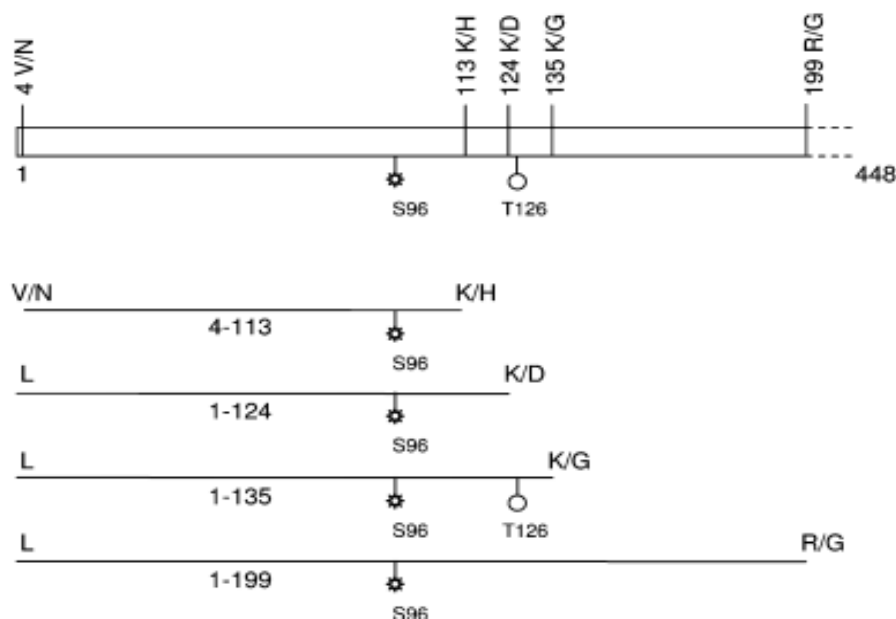


Fig. 3. Rappresentazione schematica dei frammenti N-terminali della CGA di ratto.

In particolare, queste modificazioni post traslazionale 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) e di altri peptidi intragranulari come enchelitina derivata dalla proencefalina-A (Goumon 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 in parte nel meccanismo redox all'interno dei granuli (Sirimanne e May, 1995). Alcuni di questi frammenti possono anche originare in seguito a processi extracellulari, come riportato per la CGA nella midollare del surrene (Yanaihara et al., 1998).

La CGA di ratto è una proteina acida di 448 aminoacidi con un punto isolettrico di 4.5-5, contenente un ponte disolfuro e numerosi residui monobasici (Kornfeld e Kornfeld, 1985) e dibasici, che potrebbero rappresentare dei potenziali siti di clivaggio per gli enzimi proteolitici subtilisin-like e trypsin-like inclusi la PC1/3, la PC2, la PC4 e la PC5/6

(Kaplan et al., 2002; Beinfeld, 1998). Nel cuore di ratto, la PC1/3, la PC2 e la carboxipeptidasi H/E potrebbero essere coinvolte nel processo della maturazione della CGA. Metz-Boutigue e collaboratori (1993) hanno precedentemente caratterizzato il processamento della CGA nei granuli cromaffini della midollare del surrene bovina, in particolare hanno mostrato l'inizio del processamento delle proteine che originano sia dall'estremità N- che C-terminale. Fra i frammenti generati, il peptide CGA₁₋₇₆ rappresenta il maggiore prodotto del processamento proteolitico nella midollare del surrene (Metz-Boutigue et al., 1993; Beaubien et al., 1995), mentre il primo prodotto del clivaggio dell'estremità N-terminale della CGA di ratto è la β -granina (rCGA₁₋₁₂₈), corrispondente alla VS-2, poiché manca il primo sito di basico (McVicar et al., 1991; Dress et al., 1991; Hutton et al., 1988). I frammenti della CGA sono probabilmente secreti dai cardiomiociti, il processamento extracellulare potrebbe avvenire dopo la secrezione, come è stato mostrato per la CGA e la proencefalina-A secrete dalle cellule cromaffini (Metz-Boutigue et al., 1993; Goumon et al., 2000). La presenza delle proteasi extracellulari sia sulle membrane dei cardiomiociti che nella matrice extracellulare suggerisce che il processamento extracellulare può avvenire in modo simile a quello proposto per l'angiotensina II (Jan Danser e Sarris, 2002).

Alla luce di quanto esposto, la nostra ricerca è indirizzata ad investigare gli effetti del frammento CGA₁₋₆₄ di ratto nel cuore isolato di ratto e perfuso secondo *Langendorff* sia in condizioni basali che dopo stimolazione adrenergica, e il suo possibile meccanismo d'azione, analizzando anche l'importanza della struttura terziaria nell'attività del peptide. Da uno studio condotto da Metz-Boutigue e collaboratori (1993) è emerso l'esistenza di un sito dibasico in posizione 64-65 che, comparato con la hCGA1-76, rappresenta un putativo sito di clivaggio. E' stato quindi ipotizzato che nel cuore di ratto il peptide prodotto corrispondente alla hCGA1-76, sia il frammento 1-64 (rCGA₁₋₆₄).

Materiali e metodi

1. Modello sperimentale

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

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

I vantaggi sostanziali di questo modello consistono nella possibilità di valutare gli effetti cardio-vascolari diretti di numerose sostanze in termini di funzione contrattile, di attività elettrica e di funzione metabolica; nella possibilità di eseguire studi di dosaggio dei farmaci in modo rapido e con esatto controllo delle concentrazioni; nella possibilità di sospendere la somministrazione della sostanza in esame intercambiando i fluidi di perfusione (Sutherland e Hearse 2000). Inoltre, il preparato permette di indurre ischemia regionale, o totale, e di condurre studi sulla risposta cardiaca in seguito a variazioni del flusso coronarico, sulla reattività vascolare, sulla funzionalità dell'endotelio e del muscolo liscio (Sutherland e Hearse 2000).

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 "Morini s.p.a." (Bologna, Italia).

Al loro arrivo, al fine di consentire un completo recupero dallo stress conseguente al trasporto, gli animali vengono 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 vengono alimentati *ad libitum* e sono sacrificati entro venti giorni dal loro arrivo.

3. 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. 4).

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

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

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

APPARATO DI PERFUSIONE DEL CUORE DI RATTO SECONDO LANGENDORFF

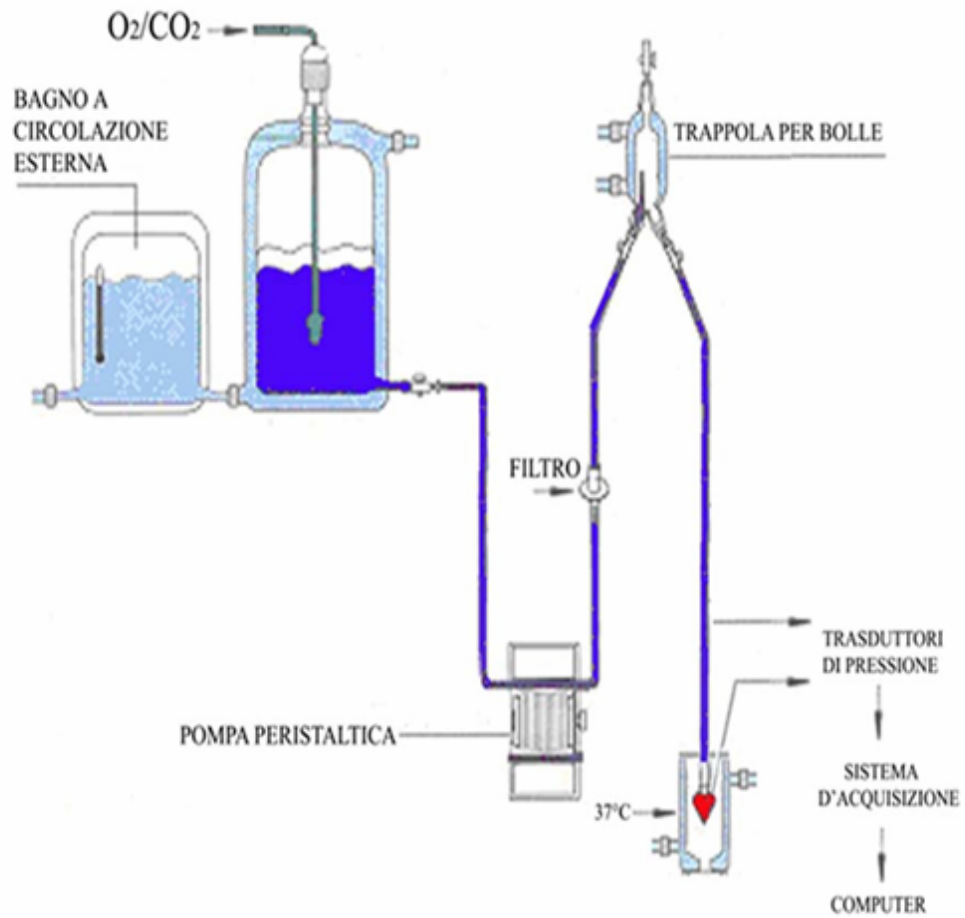


Fig. 4. Rappresentazione schematica dell'apparato di per fusione

4. 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, così, aperto attraverso un taglio bilaterale lungo il margine inferiore dalle ultime alle prime costole e la gabbia toracica viene sollevata esponendo il cuore. L'organo è espantato dopo recisione dell'aorta, della vena cava e dei vasi polmonari, per essere subito immerso in un *beker* contenente la soluzione di perfusione, mantenuta a 4°C al fine di evitare danni ischemici (Hearse et al., 2000). Successivamente, l'aorta viene incannulata per iniziare la perfusione retrograda a flusso costante. Generalmente, con la pratica, l'intervallo di tempo che intercorre tra l'espanto e l'incannulazione non supera i 30 secondi (Galinaes et al., 1990).

La cannula di perfusione aortica presenta un diametro esterno di 3 mm, per un cuore di ratto di 250 g, e può essere realizzata in vetro, plastica o acciaio inossidabile (Sutherland et al., 2000).

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 una legatura con del filo di seta (Sutherland et al., 2000).

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

Quando l'incannulazione è completata e la perfusione è cominciata, affinché il cuore si stabilizzi completamente sono richiesti almeno 10 minuti (Sutherland et al., 2000).

5. 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), che viene collocato nel ventricolo sinistro (Sutherland et al., 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 •L*), in modo da regolarne il volume.

I palloncini sono utilizzati solo se ad un volume di 80-100 •L generano una pressione inferiore a 3 mm Hg (Klebanov et al., 1997). Il loro volume viene aumentato con incrementi graduali di 20 •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 a causa di un'aumentata tendenza a sviluppare aritmie (Sutherland et al., 2000).

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

6. Perfusion 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 et al., 2000).

La soluzione di perfusione è il tampone bicarbonato di *Krebs-Henseleit* (*kHs*), modificato rispetto alla formulazione originaria nella concentrazione di ioni calcio, che è stata ridotta (Legssyer et al., 1997; Doring, 1990). La composizione completa del perfusato può essere schematizzata come segue:

Sostanza	concentrazione (nM)
NaCl	113
KCl	4,7
MgSO ₄ •7H ₂ O	1,2
CaCl ₂ •2H ₂ O	1,8
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Sodio piruvato	5
Glucosio	11
Mannitolo	1,1

Nella preparazione del tampone *Krebs-Henseleit* sono indispensabili alcuni accorgimenti che servono a garantirne un'adatta qualità. In particolare, bisogna aggiungere il componente calcio solo alla fine della procedura, per evitare la precipitazione dei suoi sali; è necessario filtrare la soluzione con membrane di cellulosa da 0,8 micron, per rimuovere possibili impurità; occorre mantenere il pH ad un valore ottimale di 7.4, attraverso la continua ossigenazione con una miscela di

O₂ (95%) + CO₂ (5%) sempre per impedire la precipitazione dei sali di calcio.

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

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

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

7. 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 4.2*, 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.

8. Parametri dell'attività cardiaca

Il sistema di acquisizione ed elaborazione è impostato in modo tale da calcolare in tempo reale particolari 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 secondo *Langendorff* possono essere distinti in tre classi dipendentemente dalla fase dell'attività cardiaca interessata (Fig.5).

1) parametri relativi all'attività sistolica:

- LVP (Left Ventricular Pressure, mmHg), rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- $+(LVdP/dt)_{max}$ (mmHg x s⁻¹), da qui in poi definito come V_{max} , 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), da qui in poi definita come V_{\min} , 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.

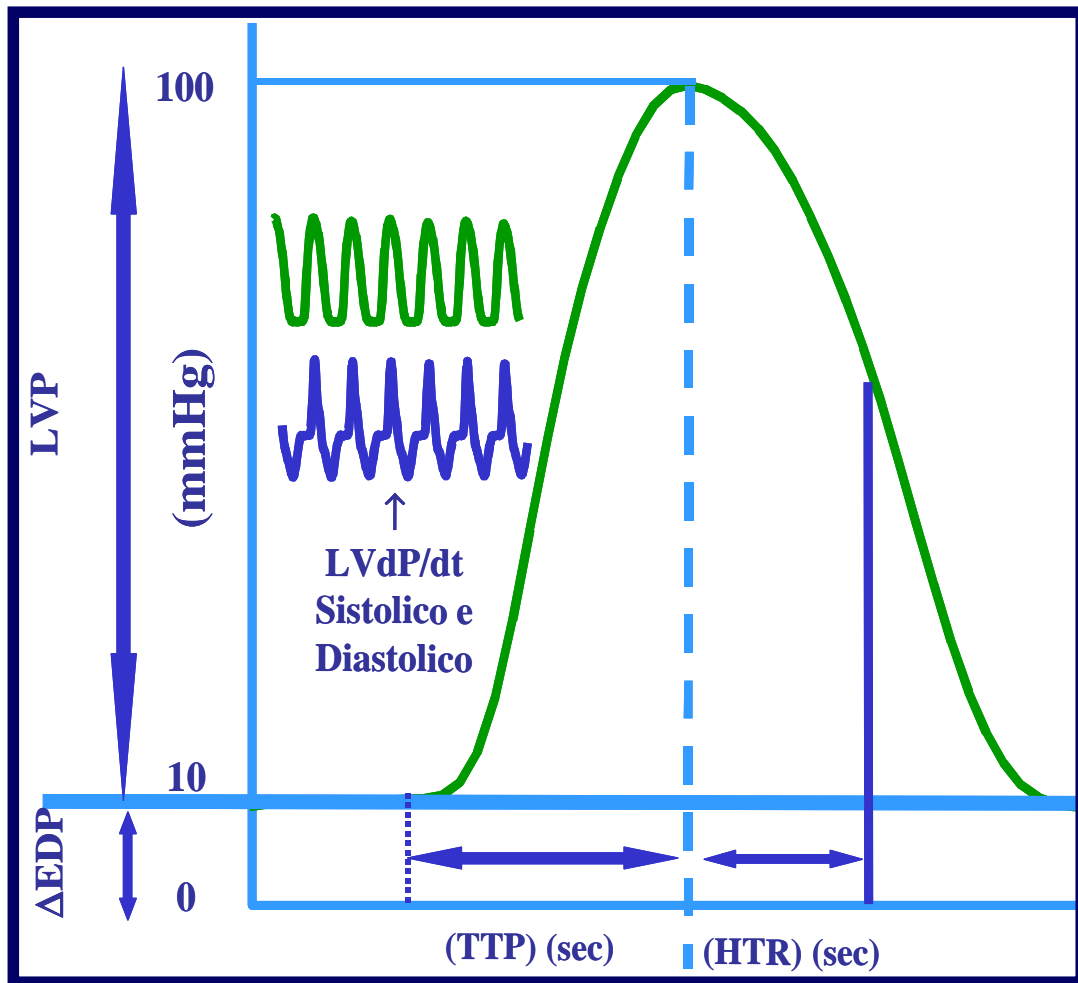


Fig. 5. Descrizione dei parametri emodinamici di base.

LVP= Pressione del Ventricolo Sinistro;

• LVEDP= Pressione Telediastolica

+ $(LVdP/dt)_{max}$ = Massima Velocità di Contrazione

- $(LVdP/dt)_{max}$ = Massima Velocità di Rilassamento

TTP= Tempo Contrazione Sistolica

HTR= Metà Tempo di Rilassamento

RPP= Lavoro (LVP x HR)

9. Protocolli sperimentali

9.1 Composti chimici

rCGA₁₋₆₄, Isoproterenolo (Iso), Endotelina-1 (ET-1), N^G-monomethyl-L-arginina (L-MNNA), [2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide] (PTIO), [1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one] (ODQ), KT5823, Wortmannin.

Tutte le sostanze sono state preparate sottoforma di soluzione madre in acqua bidistillata (l'ODQ e la Wortmannin in DMSO; il KT5823 in acetato di etile). Le soluzioni madre sono state successivamente diluite in ringer in modo da ottenere le concentrazioni utilizzate nei singoli esperimenti.

La rCGA₁₋₆₄ è cortesemente fornita dal Prof.ssa Marie-Hélène Metz-Boutigue dell'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale di Strusburgo (Francia).

Tutti gli altri composti sono forniti dalla *Sigma Chemical Company* (St. Louis, USA).

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

9.2 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.

9. 3 Curve dose-risposta del rCGA₁₋₆₄ con ponte disolfuro, rCGA₁₋₆₄ senza ponte disolfuro e rCGA₁₋₆₄ ossidato

Esperimenti preliminari, effettuati con rCGA₁₋₆₄ (S-S) alla concentrazione di 33 nM, hanno dimostrato che l'applicazione sul cuore di ratto isolato e perfuso secondo *Langendorff*, non provoca desensitizzazione, cioè una ridotta o mancata risposta all'azione della sostanza (dati non mostrati).

Alla luce di questa evidenza sono state effettuate curve dose-risposta. Dopo aver stabilizzato il preparato secondo le condizioni basali di perfusione, sul cuore sono state testate dosi crescenti (da 11 nM a 165 nM) di rCGA₁₋₆₄ con S-S, rCGA₁₋₆₄ senza S-S e rCGA₁₋₆₄ ossidato. Ciascuna concentrazione è stata somministrata per dieci minuti, al termine dei quali sono stati valutati gli effetti sui parametri emodinamici.

9. 4 Azione anti-adrenergica di rCGA₁₋₆₄ con S-S, rCGA₁₋₆₄ senza S-S e rCGA₁₋₆₄ ossidata.

Al fine di valutare l'azione anti-adrenergica dei tre frammenti di rCGA₁₋₆₄ con S-S (11, 33, 65 nM), o di rCGA₁₋₆₄ senza S-S (165 nM) o di rCGA₁₋₆₄ ossidato (165 nM) sono state realizzate curve dose-risposta perfondendo il cuore di ratto con concentrazioni crescenti di Iso (da 10⁻¹⁰ M a 10⁻⁶ M). Queste curve sono state successivamente confrontate con quelle ottenute dall'esposizione di altri preparati cardiaci alle stesse dosi crescenti di Iso addizionate, questa volta, a singole concentrazioni di rCGA₁₋₆₄ con S-S(11, 33, 65 nM), o di rCGA₁₋₆₄ senza S-S (165 nM) e rCGA₁₋₆₄ ossidata (165 nM).

9. 5 Effetti del rCGA1-64 S-S in presenza di Endotelia-1

Gli effetti della rCGA₁₋₆₄ (65 nM), sono stati valutati in presenza di ET-1 (1 nM). Tale sostanza è un peptide di 21 aminoacidi con proprietà vasocostrittrice prodotta dalle cellule endoteliali e controlla,

principalmente le funzioni cardiovascolari e respiratorie interagendo con il recettore EtA (Yanagisawa et al., 1988).

Il preparato, stabilizzato per 20min con *kHs*, è stato perfuso per 10 min con ET-1. Inseguito si è perfuso il preparato con soluzione fisiologica per riportare il cuore alle condizioni basali. Successivamente ciascun cuore è stato perfuso con *kHs* contenente una singola concentrazione di rCGA₁₋₆₄ con S-S (65 nM) da solo e poi rCGA₁₋₆₄ più l'ET-1(1 nM) per 10 min.

9. 6 Coinvolgimento delle proteine Gi/0

Per valutare il coinvolgimento delle proteine Gi/0 nel meccanismo d'azione di rCGA₁₋₆₄ con S-S, i cuori sono stati pretrattati per 60 min con *KHs* arricchito con la tossina della pertosse (PTx, 0.01 nM) e dopo sono stati esposti per 10 min a rCGA₁₋₆₄ con S-S (65 nM).

9.7 Coinvolgimento della PI3 chinasi

Per stabilire il coinvolgimento dell'attività dell'IP3 chinasi nel meccanismo d'azione del peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S, è stato utilizzato Wortmannin, un potente inibitore della IP3 chinasi. I preparati cardiaci sono stati perfusi con rCGA₁₋₆₄ (65 nM) per 10 min. Inseguito si è perfuso il preparato con soluzione fisiologica per riportare il cuore alle condizioni basali. In seguito, ciascun cuore è stato per fuso con *KHs* contenente Wortmannin (10 nM) per altri 10min. Successivamente i cuori sono stati esposti all'inibitore in presenza della rCGA₁₋₆₄ con S-S (65 nM).

9.10 Coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG

Per ottenere preliminari informazioni circa il coinvolgimento del pathway-NO sull'azione cardiotropica e sulla vasomotilità della rCGA₁₋₆₄, i preparati cardiaci sono stati stabilizzati per 20 min con *kHs*. Successivamente i preparati cardiaci sono stati per fusi con rCGA₁₋₆₄ (65 nM) per 10 min. Inseguito si è perfuso il preparato con soluzione fisiologica per riportare il cuore alle condizioni basali. In seguito, ciascun

cuore è stato perfuso con *KHs* contenente PTIO, L-NIO, ODQ, KT5823 per altri 10min. Successivamente i cuori sono stati esposti all'inibitore in presenza della rCGA₁₋₆₄ con S-S (65 nM).

10 Analisi statistica.

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

I parametri emodinamici ed i valori ad essi riferiti sono 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 in cui i tre tipi di rCGA₁₋₆₄ sono stati testati, si è avvalso dell'analisi della varianza *one-way ANOVA*, seguita dal *test di Duncan* e dal *test di Bonferroni*; le variazioni sono state considerate significative per $p < 0,05$.

Nel caso della curva dose-risposta dell'Iso riferita all'andamento del parametro LVP, quest'ultimo è stato espresso come percentuale: l'effetto massimo dell'Iso si è fatto coincidere con il valore 100% mentre la condizione basale con lo 0%.

Le curve dose-risposta sigmoidi dell'Iso da solo ed addizionato di rCGA₁₋₆₄ con S-S(11, 33, 65 nM), o di rCGA₁₋₆₄ senza S-S (165 nM) e rCGA₁₋₆₄ ossidata (165 nM) sono state elaborate mediante *GraphPad Prism 4.0* ed hanno consentito di estrapolare, per ogni curva, il logaritmo negativo della concentrazione di Iso capace di produrre il 50% dell'effetto (EC₅₀), da solo ed in presenza delle sostanze.

Risultati

1. Azione inotropica e lusitropica del rCGA₁₋₆₄.

Le curve dose-risposta di rCGA₁₋₆₄ con S-S, rCGA₁₋₆₄ senza S-S e rCGA₁₋₆₄ ossidato 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 modulatorio dei tre peptidi nei confronti del rilassamento e della contrattilità cardiaca. I risultati ottenuti dalle curve sono stati utilizzati per realizzare un confronto nell'attività delle tre molecole, allo scopo di correlare le modificazioni strutturali caratterizzanti i tre peptidi con eventuali variazioni dell'azione sui parametri emodinamici.

Esperimenti preliminari su preparati sottoposti a *time course* in presenza di sola soluzione *Krebs-Henseleit*, i cui parametri sono stati monitorati e misurati ogni 10 minuti, hanno dimostrato che la stabilità del preparato si mantiene per almeno 180 minuti (dati non mostrati). Inoltre, la somministrazione ripetuta di singole dosi dei tre peptidi (33 nM) ha provato l'assenza di fenomeni desensitizzanti ed ha mostrato che, in tutti e tre i casi, si evidenzia un effetto massimo a 5 minuti dall'applicazione che rimane stabile per 15-20 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 11 e 165 nM di ciascun peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S, rCGA₁₋₆₄ senza S-S e rCGA₁₋₆₄ ossidato. 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 con S-S induce un effetto inotropo negativo significativo da 33 a 165 nM. Sul lavoro cardiaco (RPP) e sulla massima velocità di contrazione ($(+LVdP/dt)_{max}$) il peptide esercita una riduzione significativa a partire da 65 nM, mentre non modifica la frequenza cardiaca (HR). Sulla pressione coronaria (CP) il peptide induce una vasodilatazione significativa a partire da 33 nM (Fig. 6; 7).

L'analisi riguardante l'azione lusitropica del peptide ha evidenziato che il peptide rCGA1-64 agisce anche sul rilassamento miocardico con un effetto lusitropico negativo. Tale effetto si esprime con una diminuzione sulla massima velocità di rilassamento ($(-LVdP/dt)_{min}$) significativa a partire da 65 nM. Inoltre, tal effetto lusitropico negativo è indicato anche dall'incremento del rapporto tra la massima velocità di contrazione e

quella di rilassamento (T/-t) significativo alle stesse dosi. Sull'HTR il peptide non ha apportato alcuna significativa modificazione (Fig. 8).

L'utilizzo del peptide senza S-S, invece, mostra un lieve effetto inotropo negativo dose-dipendente significativo da 65 a 165 nM, sulla RPP, sulla $+(LVdP/dt)_{max}$ e sulla CP, il peptide non ha apportato alcuna significativa modificazione (Fig. 9; 10).

L'analisi relativa ai parametri lusitropici non evidenzia alcuna modificazione al livello del T/t e HTR, mentre sulla $-(LVdP/dt)_{max}$ si osserva un lieve incremento significativo alle basse concentrazioni (Fig. 11).

La somministrazione del peptide ossidato non influenza LVP, RPP, $+(LVdP/dt)_{max}$ e la CP, mentre HR mostra un effetto cronotropo positivo significativo alle basse concentrazioni (Fig. 12; 13).

L'analisi connessa ai parametri lusitropico mostra che il peptide induce un lieve incremento della $-(LVdP/dt)_{max}$ significativo alle concentrazioni da 65 a 165 nM, mentre non sono stati modificati gli altri parametri testati (Fig. 14).

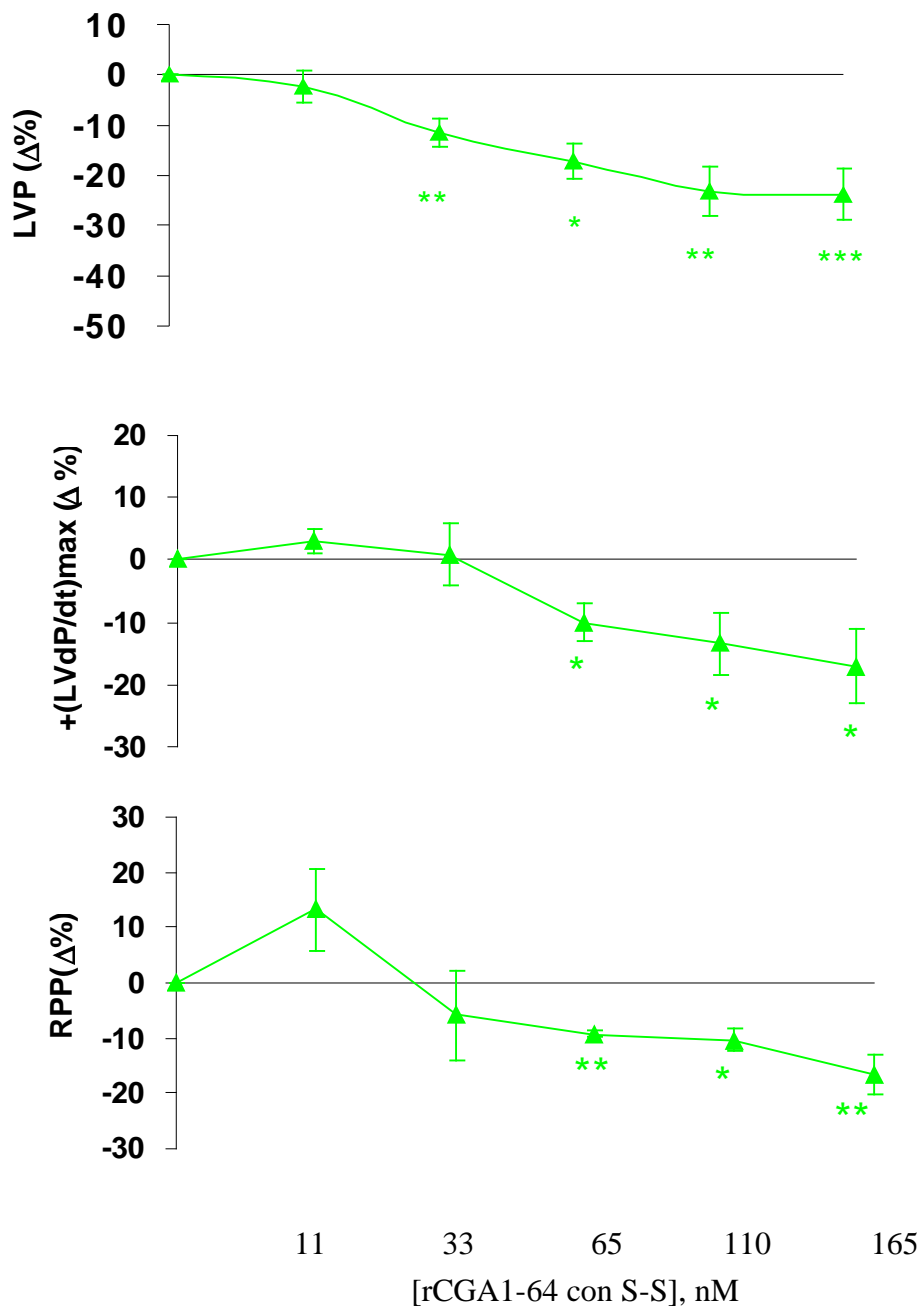


Fig. 6. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ con S-S (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri LVP, +(LVdP/dt)_{max} e RPP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01.

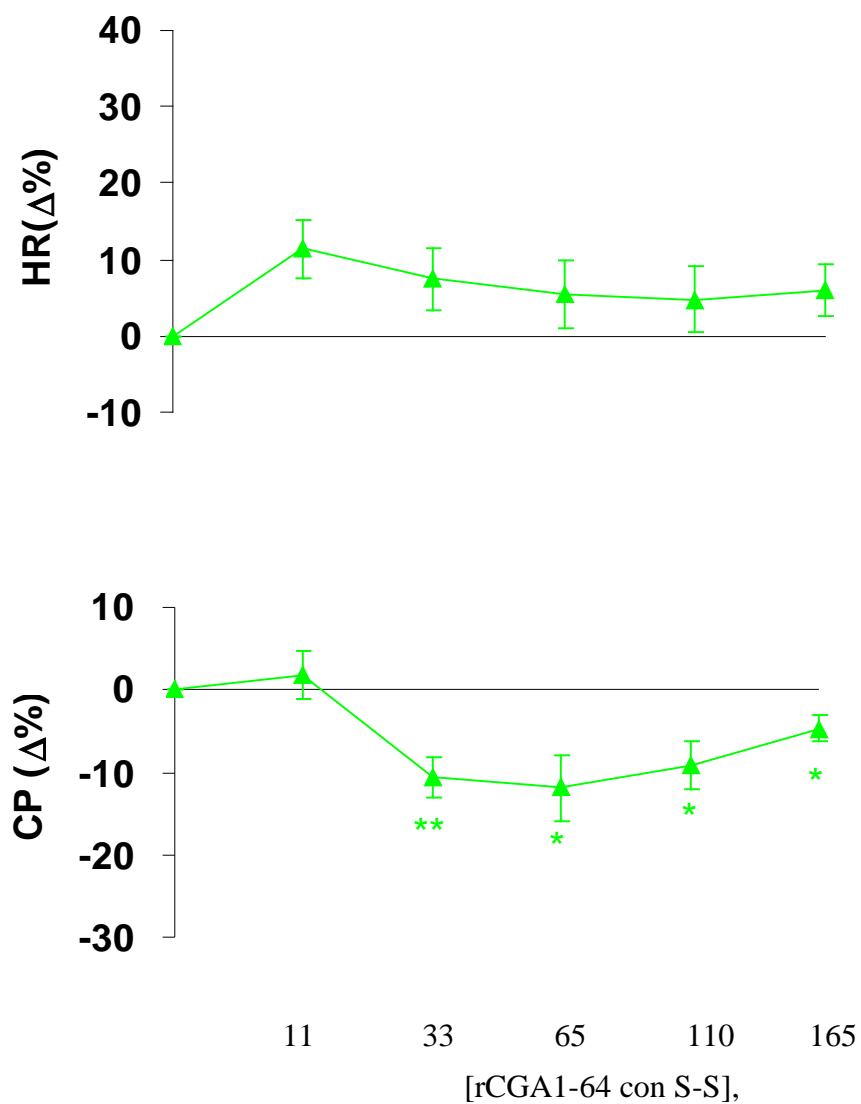


Fig. 7. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ con S-S (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri HR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= $p<0.05$, **= $p<0.01$.

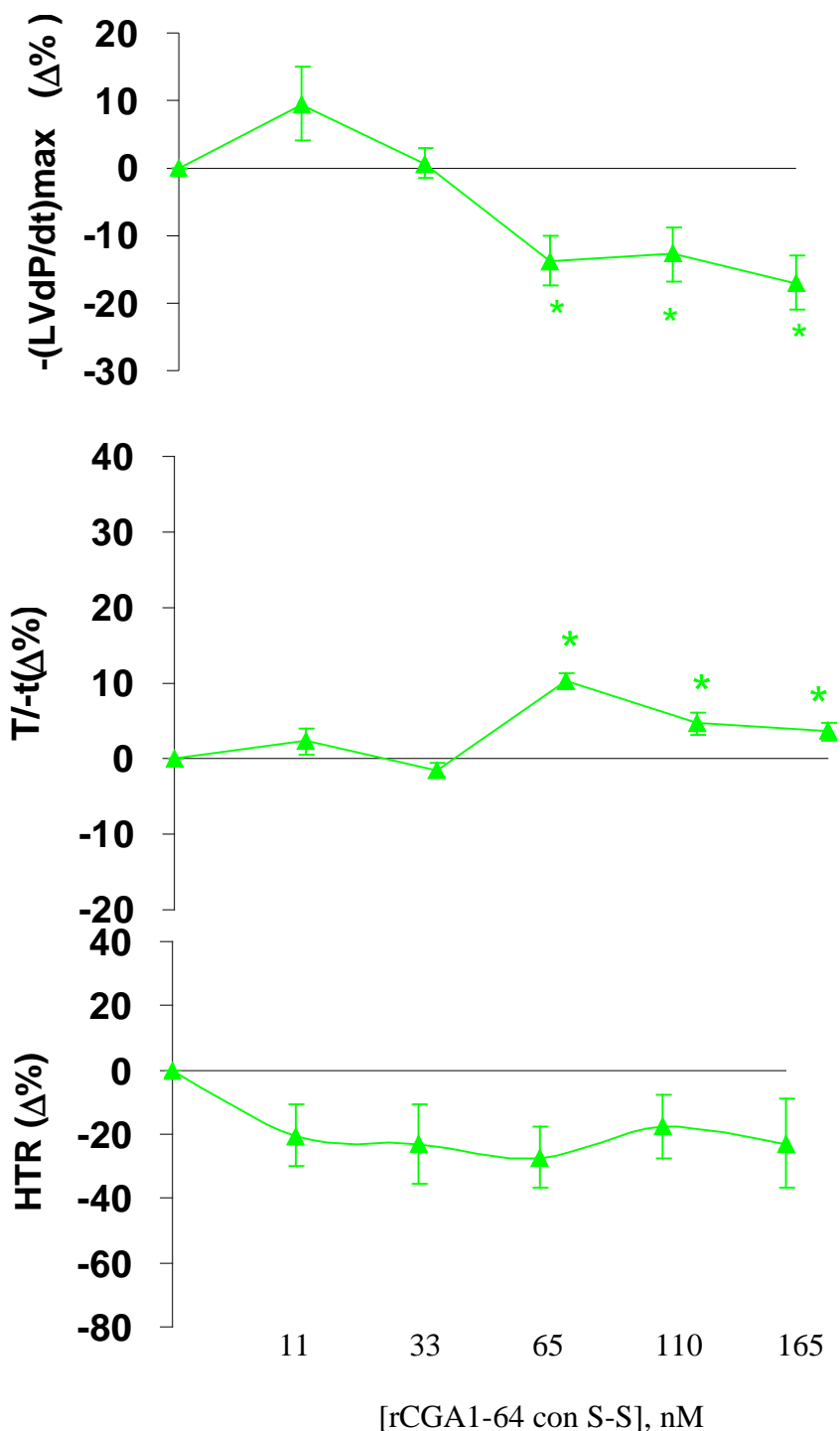


Fig. 8. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ con S-S (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri $-(LVdP/dt)_{max}$, T/-t e HTR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01.

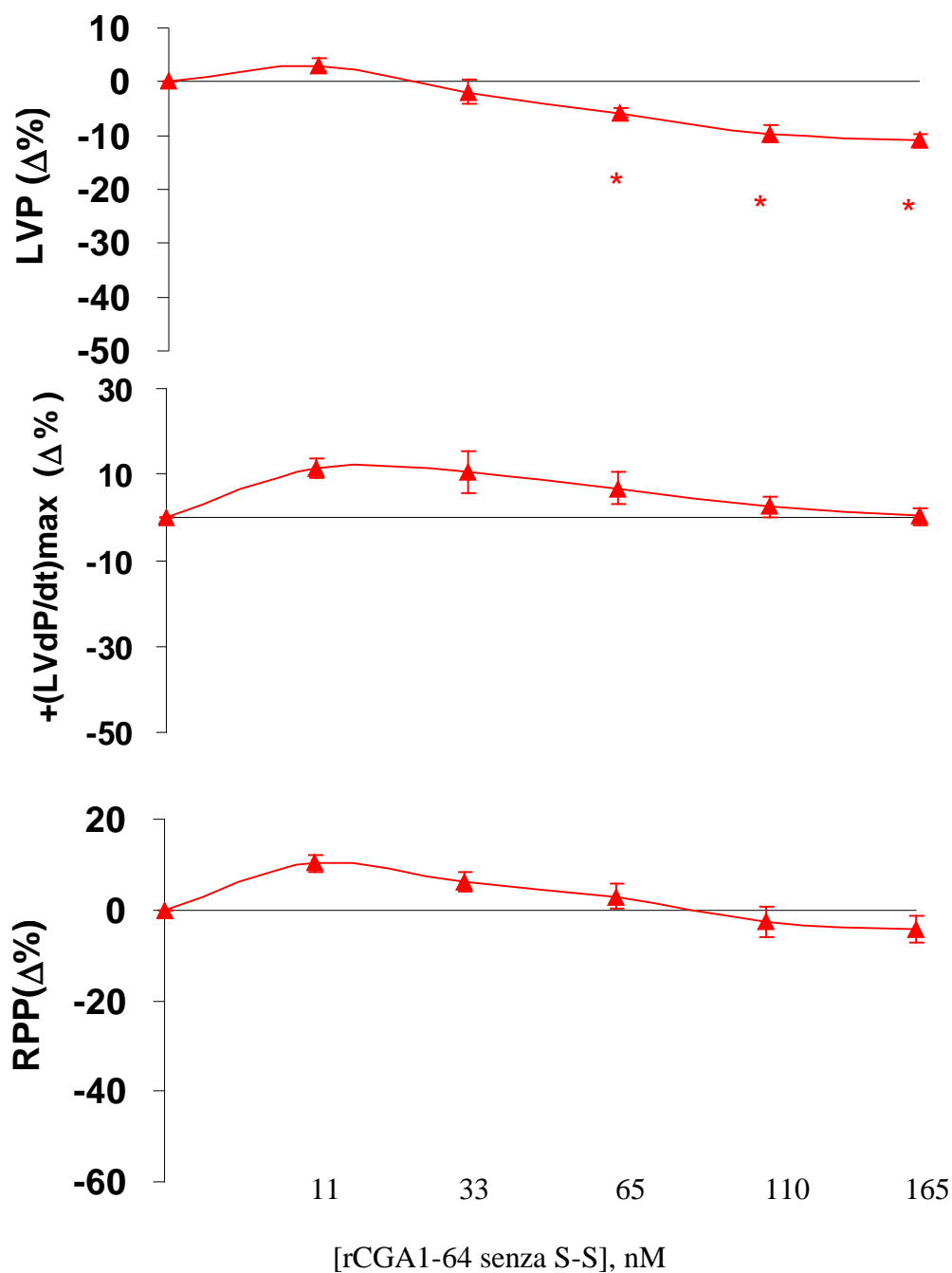


Fig. 9. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ senza S-S (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri LVP, $+(LVdP/dt)_{max}$ e RPP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= $p<0.05$, **= $p<0.01$.

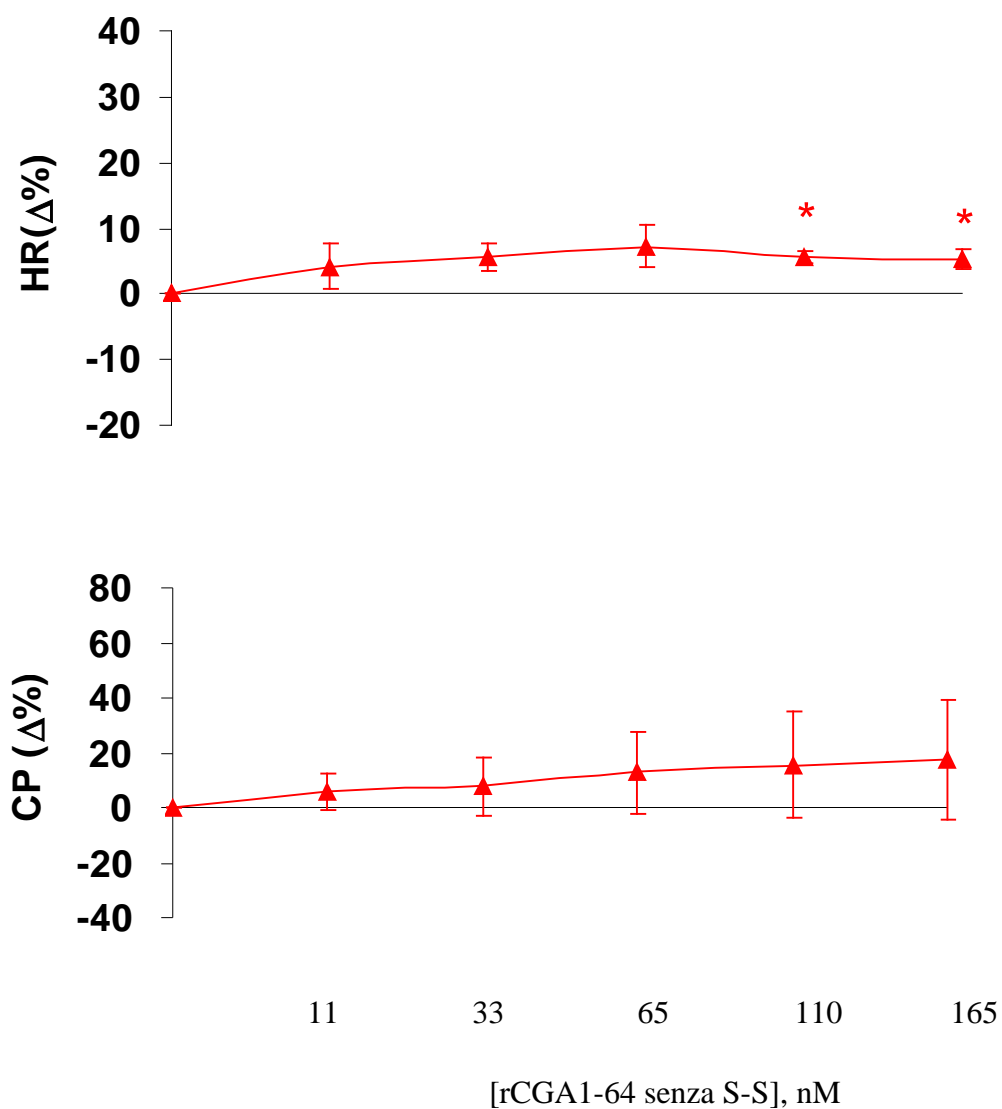


Fig. 10. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ senza S-S (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri HR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01.

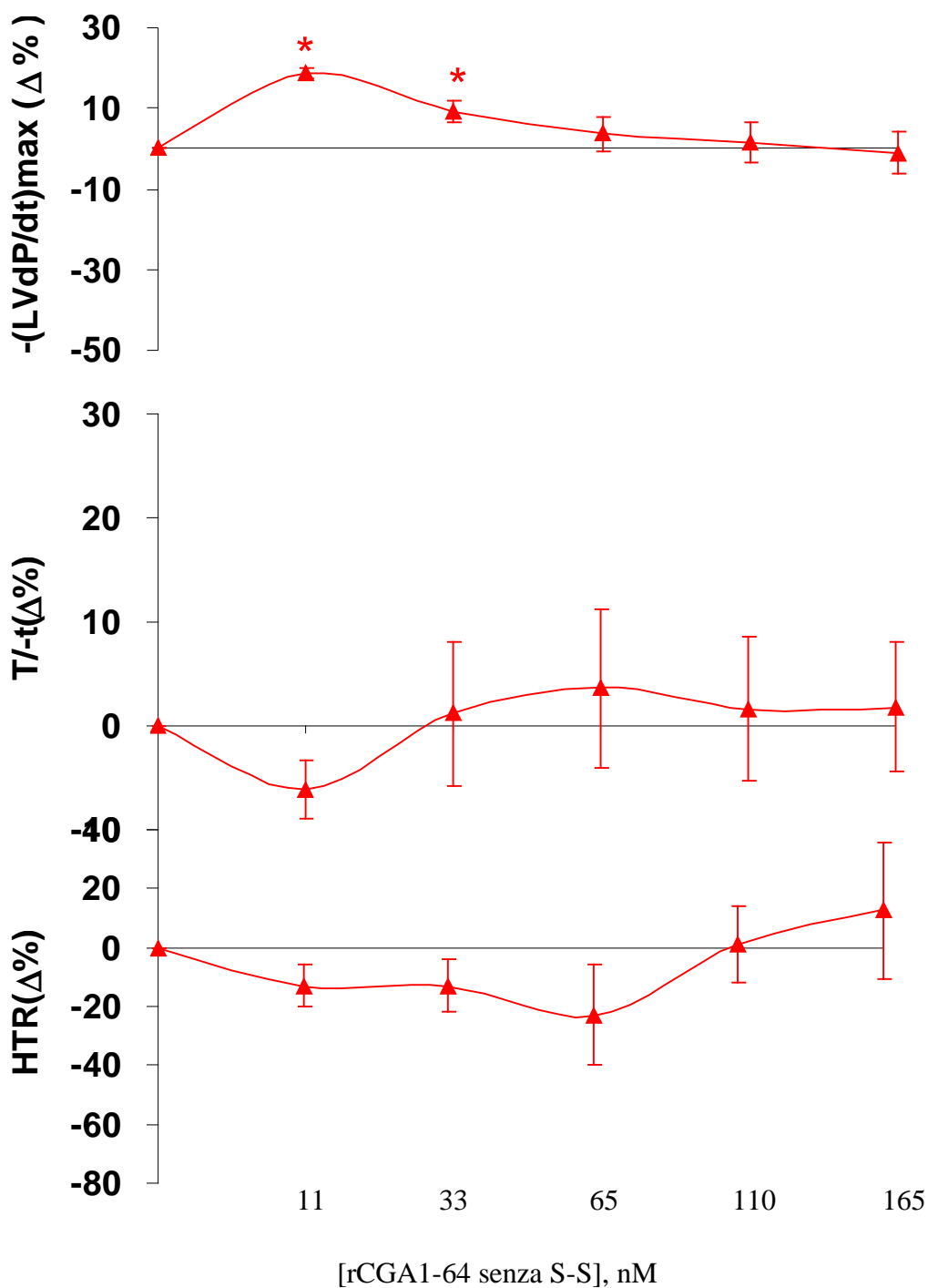


Fig. 11. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ senza S-S (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri $-(LVdP/dt)_{max}$, $T/-t$ e HTR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per $n=8$. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

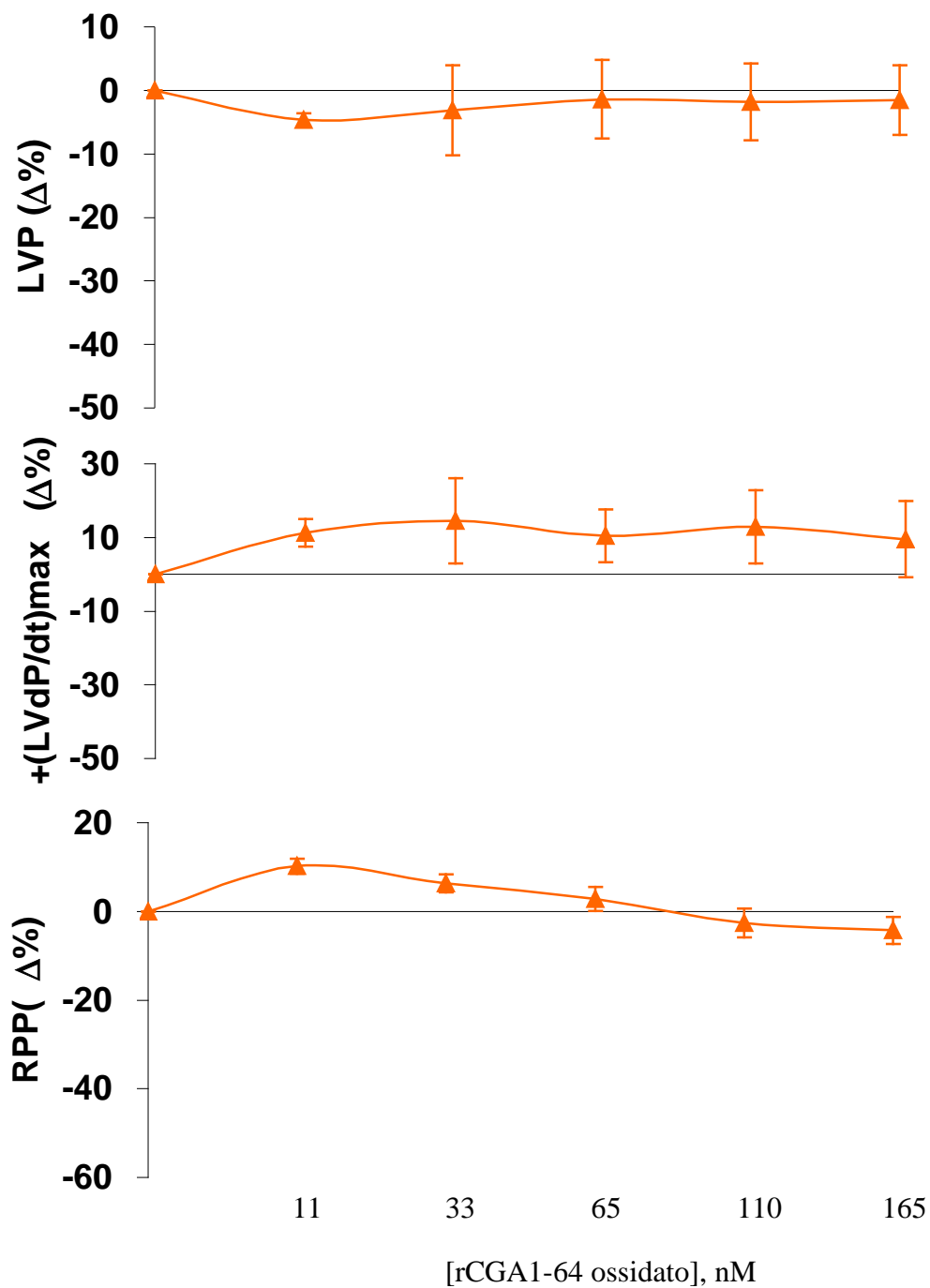


Fig. 12. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ ossidato (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri LVP, +(LVdP/dt)_{max} e RPP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01

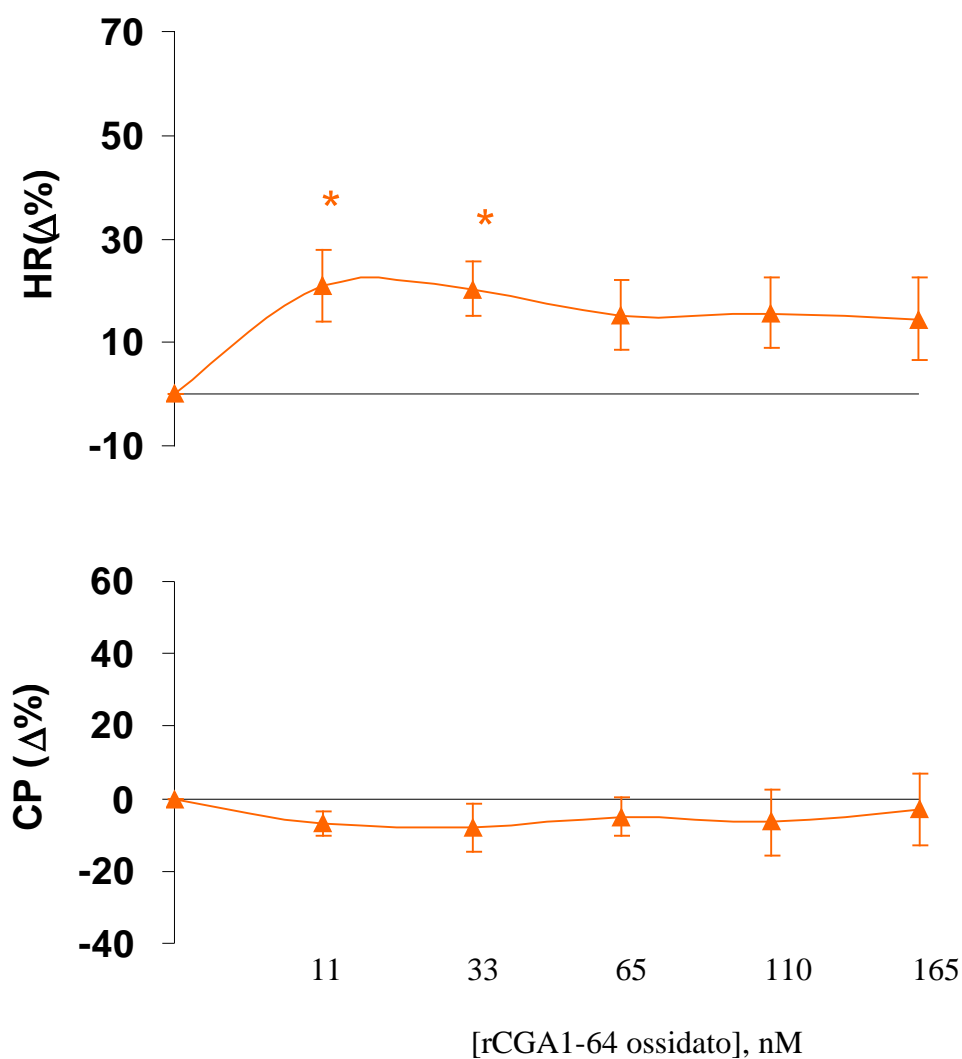


Fig. 13. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ ossidata (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri HR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01.

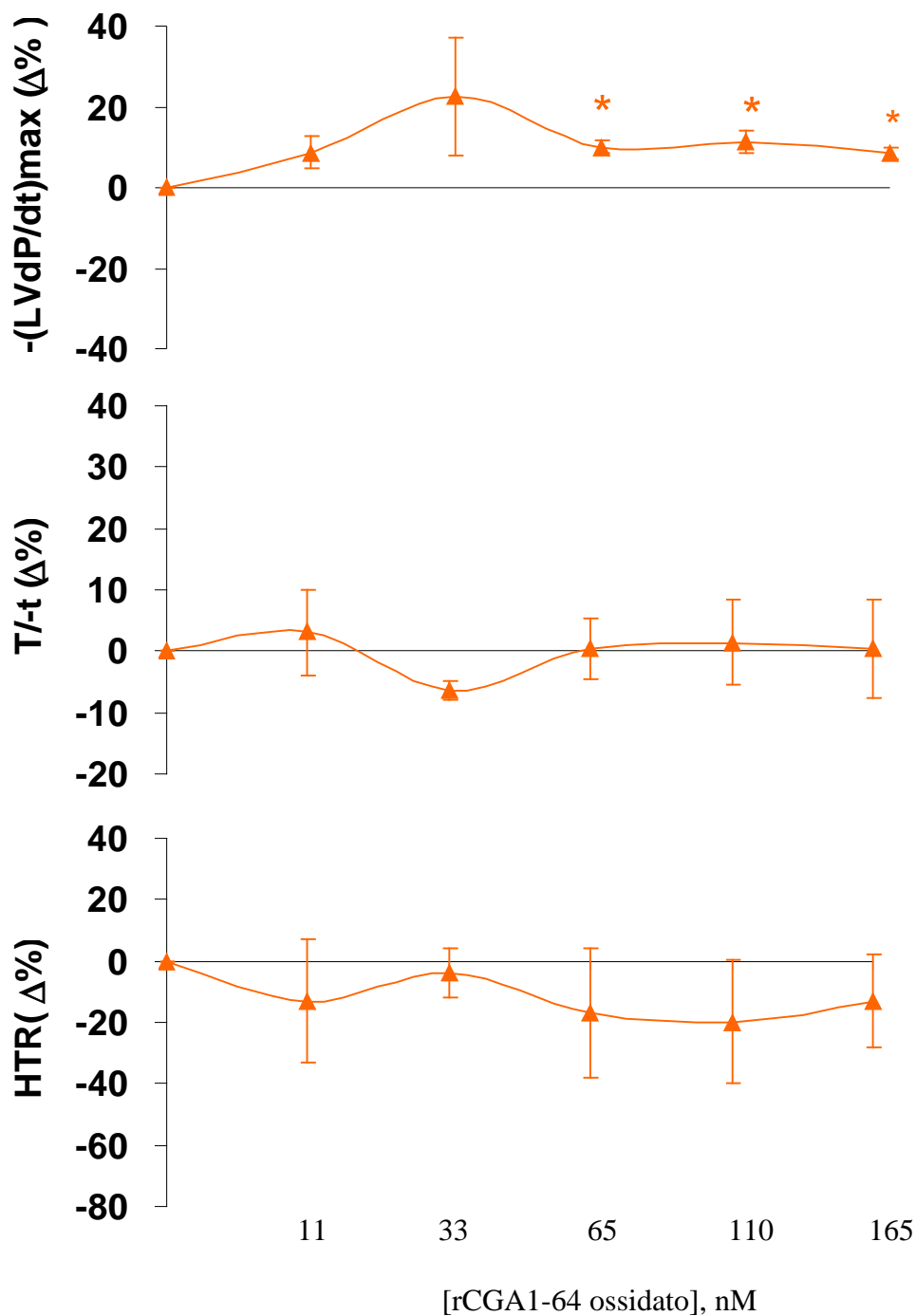


Fig. 14. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ ossidata (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri $-(LVdP/dt)_{max}$, T/-t e HTR. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01

2. Confronto del rCGA₁₋₆₄ con S-S con hrVS-1

Uno studio recente condotto da Cerra e collaboratori (2006) ha evidenziato che il peptide human recombinant CGA(1-76) (hrVS-1) esercita un effetto inotropo negativo in condizioni basali e contrasta l'inotropismo positivo β -adrenergico-dipendente. In particolare, la VS-1 blocca la stimolazione β -adrenergica con un antagonismo di tipo non competitivo.

Confrontando l'effetto del frammento di ratto rCGA₁₋₆₄ con S-S con quello osservato da hrVS-1 (CGA1-76), è apparso che i due peptidi hanno indotto un significativo inotropismo negativo, rilevabile dalla riduzione della LVP ed una altrettanto significativa riduzione dell'RPP e della $+(LVdP/dt)_{max}$ mentre non hanno determinato variazioni apprezzabili sulla HR. (Fig. 15;16).

Differenze sono state osservate solo a livello della pressione coronaria. Infatti sulla CP il peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S induce una vasodilatazione significativa da 33 a 165 nM, mentre la stessa non risulta influenzata da hrVS-1 a tutte le concentrazioni testate. La differenza tra le 2 curve è statisticamente significativa attraverso il test dell'ANOVA. (Fig. 16).

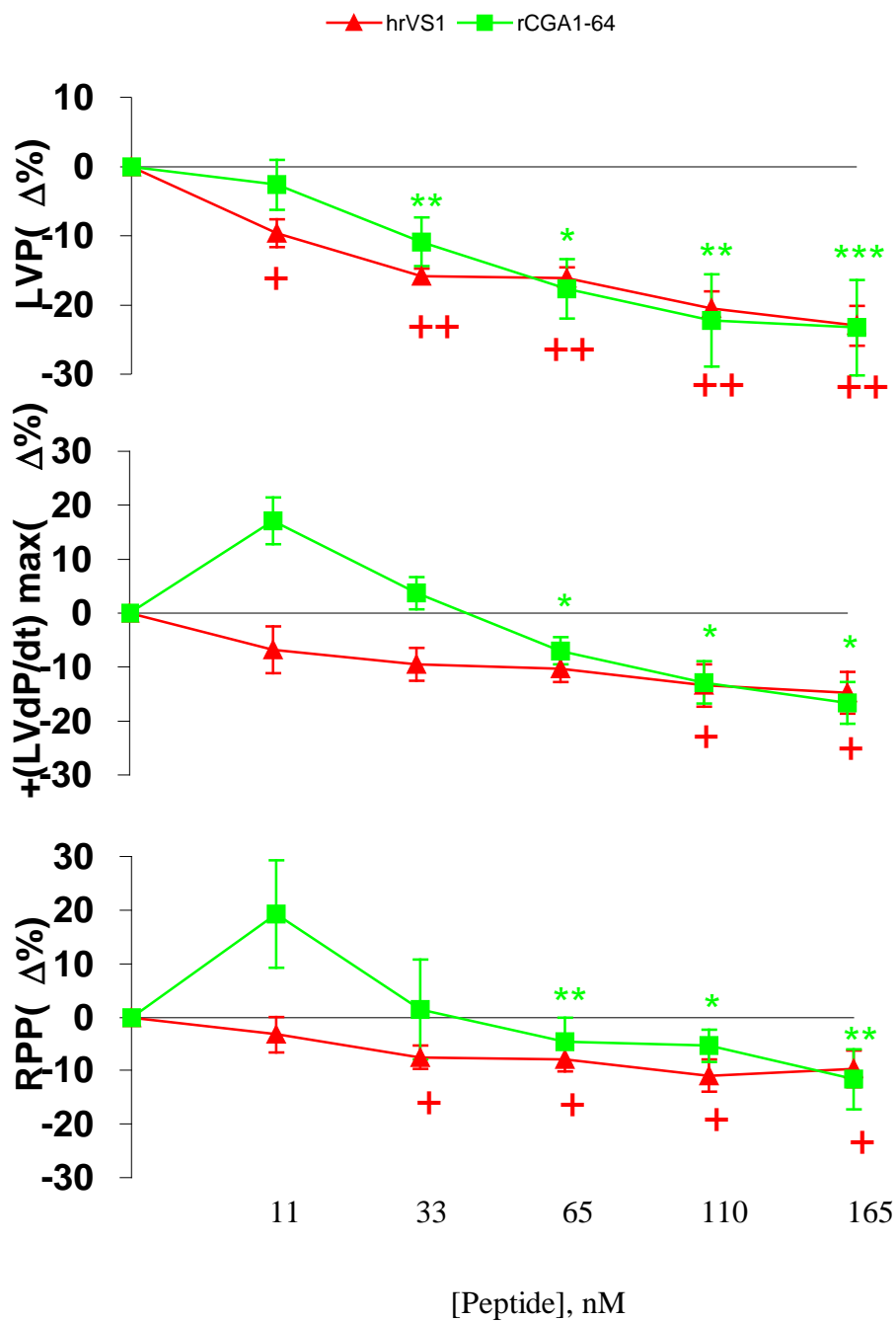


Fig. 15. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ con S-S e hrVS-1 (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri LVP, +(LVdP/dt)_{max} e RPP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Il confronto fra le curve è stato effettuato attraverso il test Anova a due vie ($\xi < 0.05$).

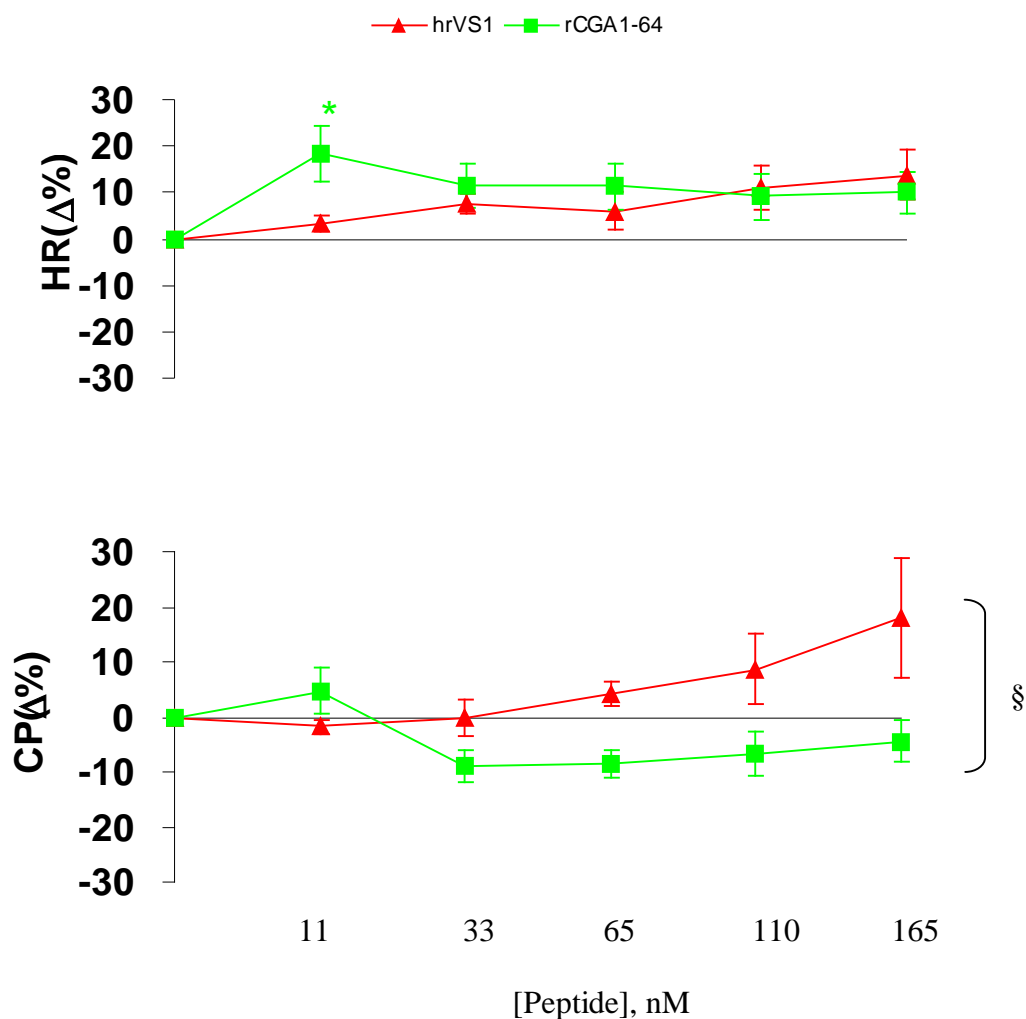


Fig. 16. Curve dose-risposta della rCGA₁₋₆₄ con S-S e hrVS-1 (da 11 a 165 nM) riferite ai parametri HR e CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra le curve è stato effettuato attraverso il test Anova a due vie (§<0.05).

3. Azione anti-adrenergica dei tre peptici

Al fine di valutare una possibile azione anti-adrenergica dei tre peptici, i preparati cardiaci sono stati perfusi con krebs contenente concentrazioni crescenti di Iso da solo e in combinazione con singole concentrazioni di rCGA₁₋₆₄ con S-S (11, 33 e 65 nM), rCGA₁₋₆₄ senza S-S (165 nM), rCGA₁₋₆₄ ossidato (165 nM). La successiva analisi della variazione percentuale di LVP ha consentito la determinazione della EC₅₀ in presenza di ciascuno dei tre peptidi alla dose utilizzata. Il valore (espresso come logM) della EC₅₀ per Iso da solo è -8.67 ± 0.3 ($r^2 = 0.84$), per Iso addizionato di rCGA₁₋₆₄ con 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 ($r^2 = 0.35$); per Iso insieme a rCGA₁₋₆₄ senza S-S (165 nM) è -8.44 ± 0.28 ($r^2 = 0.89$); insieme a rCGA₁₋₆₄ ossidato (165 nM) è -7.28 ± 0.22 ($r^2 = 0.91$).

Il test dell'ANOVA rivela un'interazione significativa fra l'ISO e i peptidi rCGA₁₋₆₄ (Fig. 17).

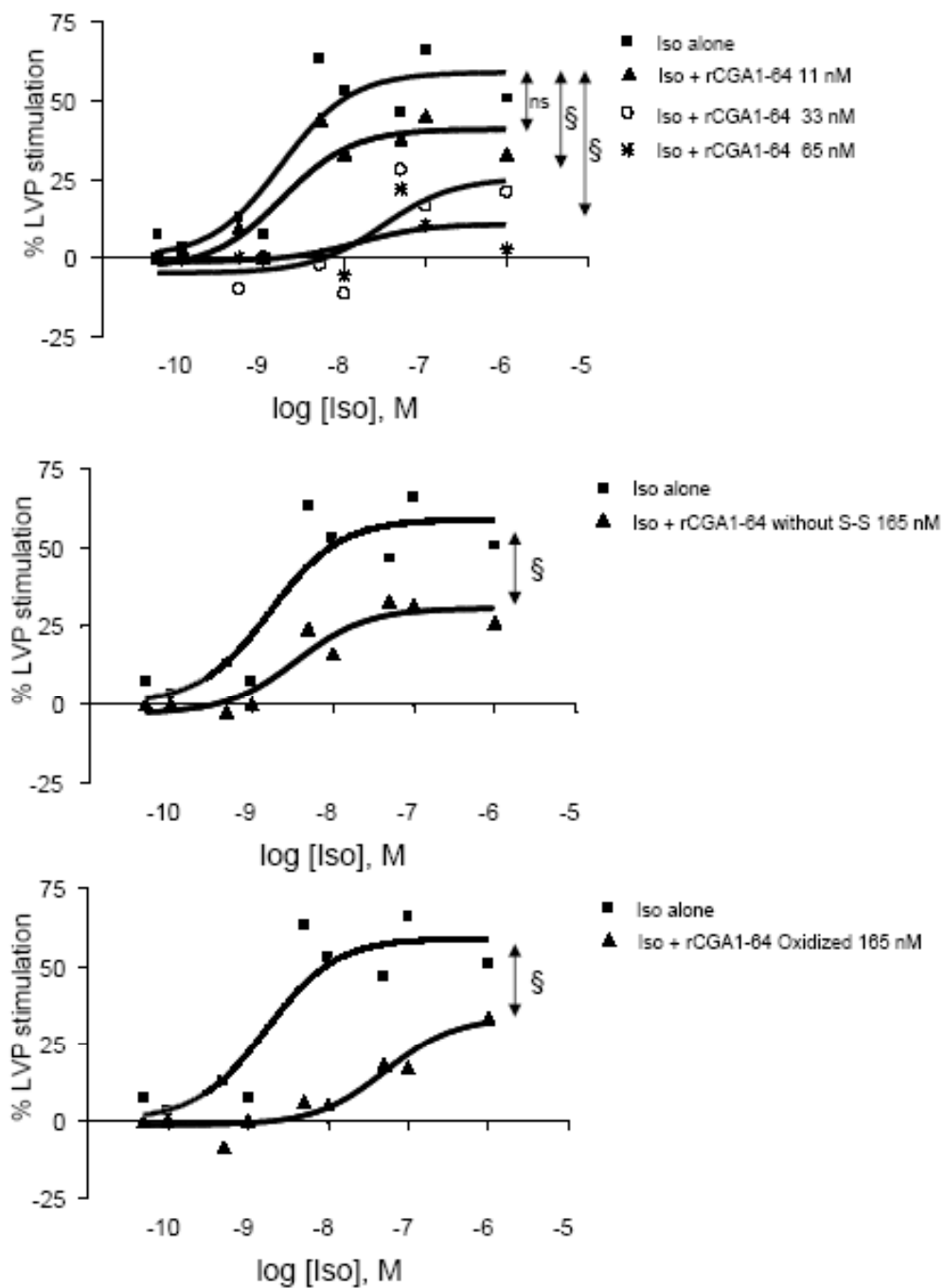


Fig. 17 Curve dose-effetto sigmoidi con stimolazione da Iso (da 10^{-10} a 10^{-6} M) da solo ed in presenza di singole concentrazioni di rCGA₁₋₆₄ con S-S (11, 33 e 65 nM), rCGA₁₋₆₄ senza S-S (165 nM) e rCGA₁₋₆₄ ossidato (165 nM). La contrattilità è stata espressa come percentuale di LVP.

4. Effetti del rCGA1-64 in presenza di Endotelina-1

L'ET-1 è un peptide di 21 aminoacidi con elevata attività vasocostrittrice, prodotto dall'endotelio vascolare in risposta ad una serie di fattori quali l'Angiotensina II o l'Insulina (Maemura et al., 1992). Inoltre, induce un effetto inotropo positivo in cuori isolati e perfusi di mammiferi (Brunner et al., 2006).

Per stabilire se il frammento rCGA₁₋₆₄ con S-S sia capace di contrastare gli effetti mediati dall'ET-1, i cuori sono stati perfusi con *kHs* contenente ET-1 da solo e in presenza di rCGA₁₋₆₄ con S-S a 65 nM. L'effetto positivo indotto dall'ET-1 sia sulla pressione del ventricolo sinistro che sull'indice del lavoro cardiaco è stato abolito dal peptide, mentre è stata ridotta significativamente la vasocostrizione coronarica (Fig. 18; 19).

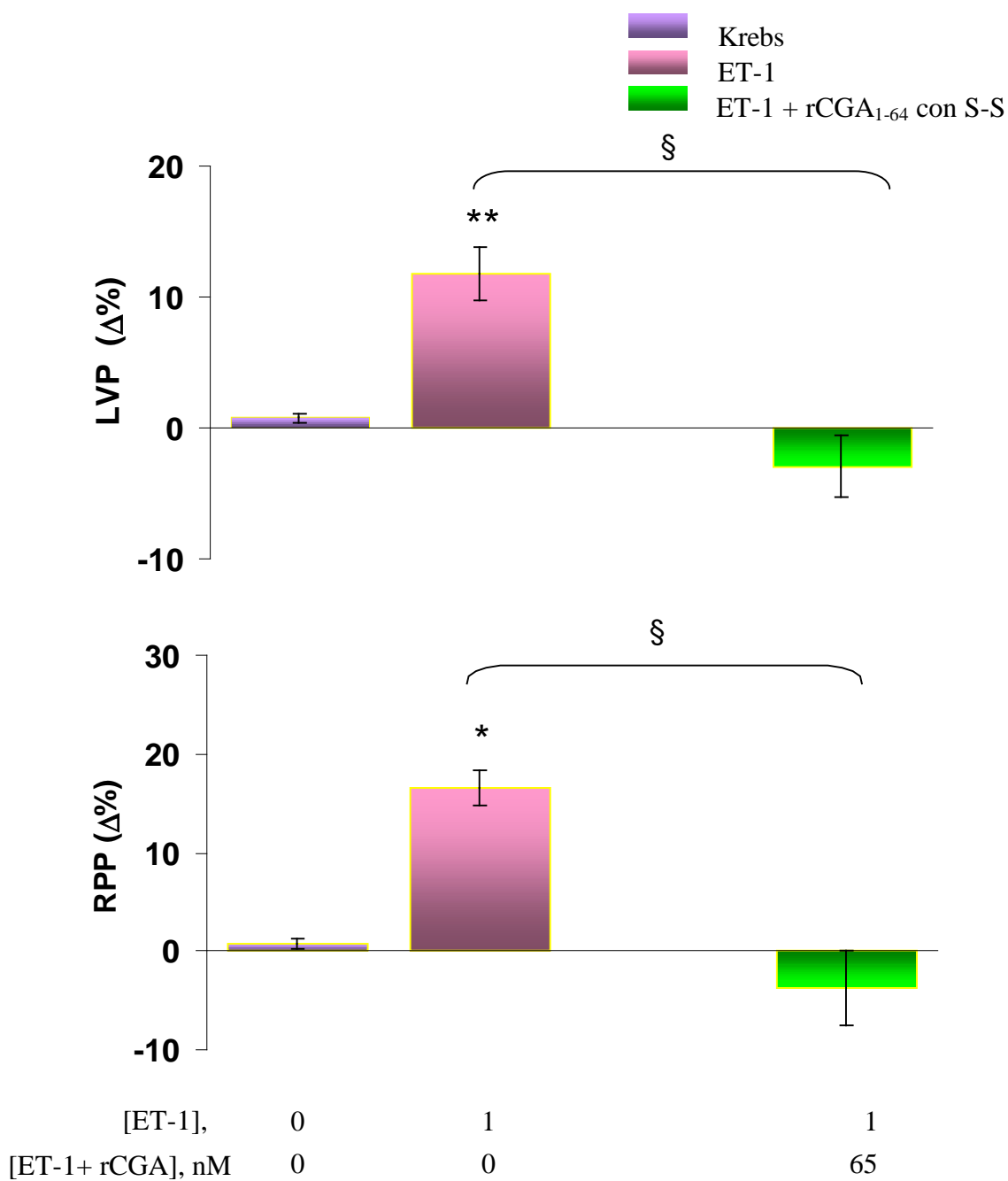


Fig. 18. Effetto dell'ET-1(1 nM) prima e dopo trattamento con della rCGA₁₋₆₄ con S-S sui parametri LVP, e RPP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *=p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova a due vie (§<0.05).

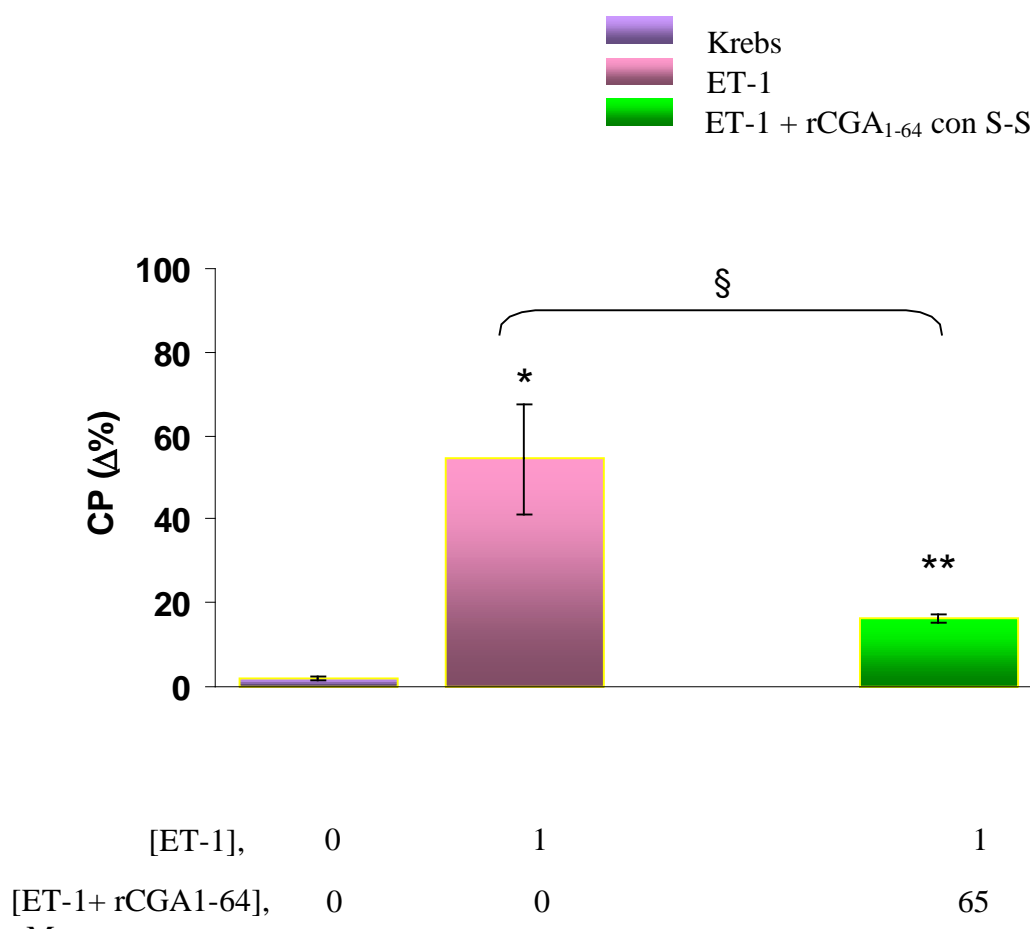


Fig.19. Effetto dell'ET-1(1 nM) prima e dopo trattamento con della rCGA₁₋₆₄ con S-S sui parametri CP. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova a due vie (§<0.05).

5. Coinvolgimento delle proteine Gi/0

Le proteine G sono molecole legate alla membrana plasmatica coinvolta nella traduzione di segnali dall'esterno all'interno della cellula. Alla famiglia delle proteine G appartengono le proteine Gi/G0, substrato della tossina della pertosse, che attraverso una ADP-ribosilazione della subunità α causa il disaccoppiamento della proteina con il recettore (Ui, 1990).

Il trattamento con la tossina della pertosse ha abolito l'effetto inotropo negativo mediato dal rCGA₁₋₆₄ con S-S sui parametri cardiaci LVP e $+(LVdP/dt)_{max}$ ed ha annullato la vasodilatazione indotta dal peptide CGA-derivato (Fig. 20; 21).

Dall'analisi connessa ai parametri lusitropico è emerso che la tossina della pertosse abolisce la riduzione mediata dal frammento sul parametro $-(LVdP/dt)_{max}$ (Fig. 21).

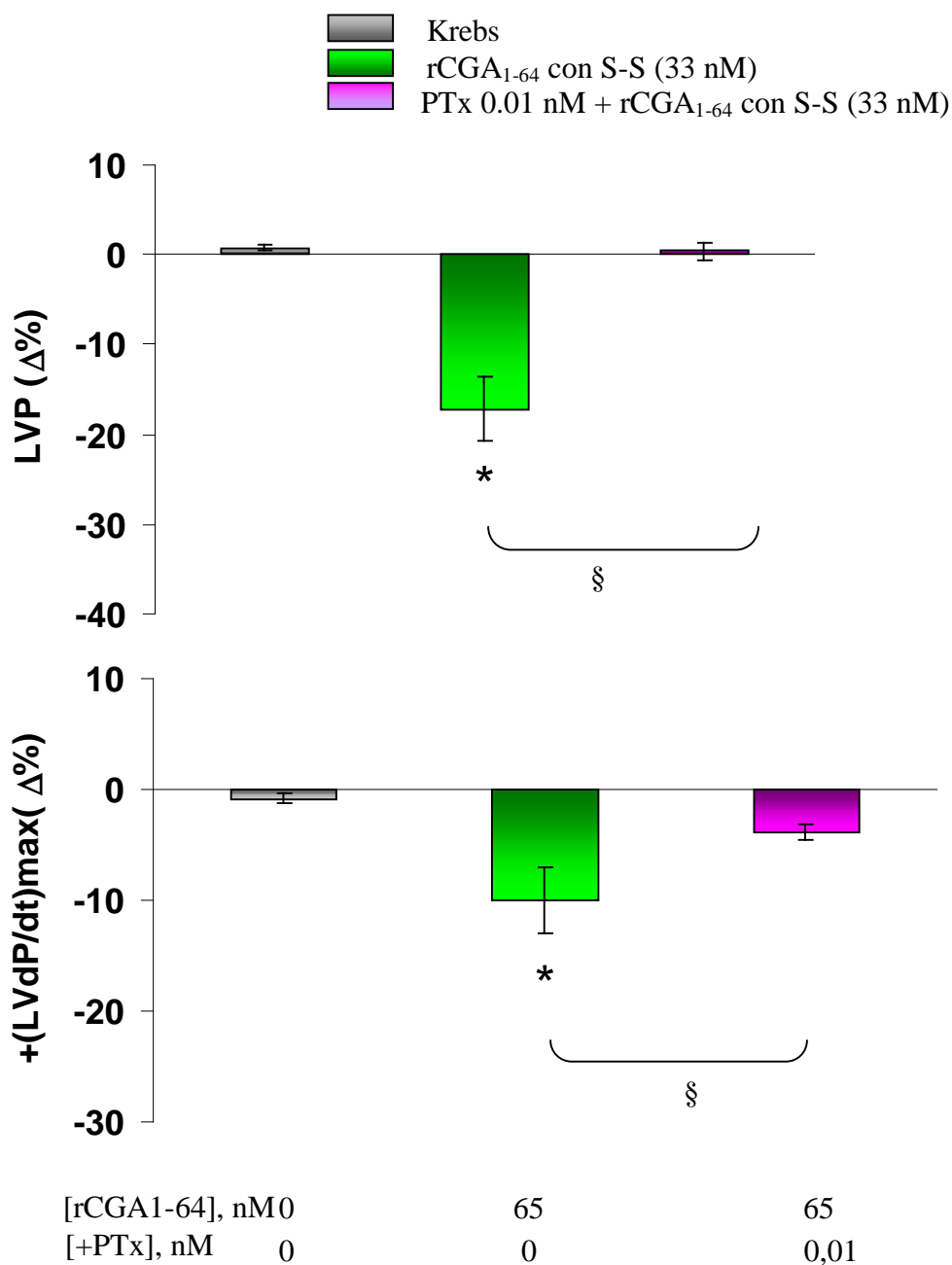


Fig. 20 Effetto della rCGA₁₋₆₄ con S-S) prima e dopo trattamento con la PTx(0.01 nM sui parametri LVP, e +(LVdP/dt)max. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova a due vie (§<0.05).

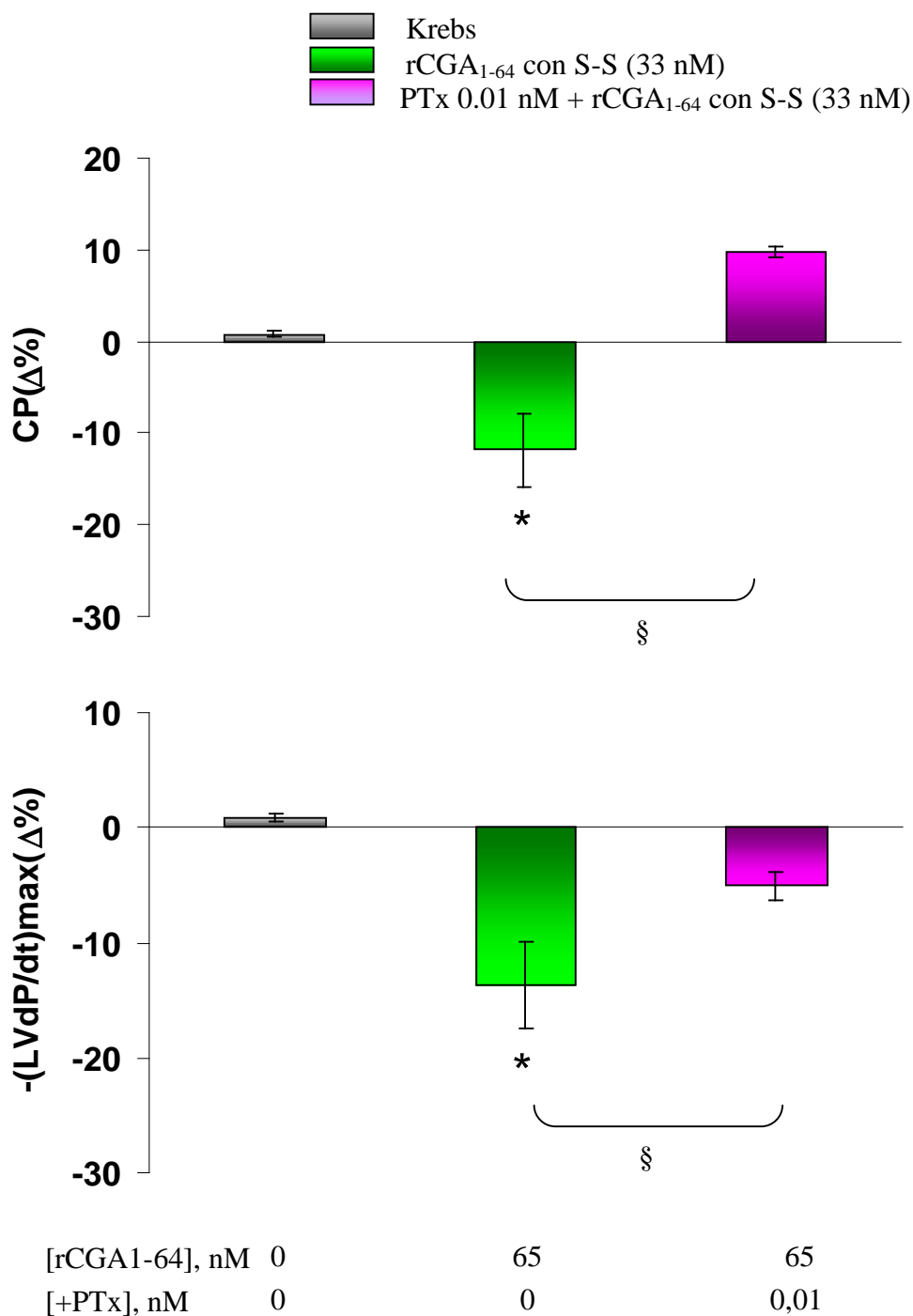


Fig. 21. Effetto della rCGA₁₋₆₄ con S-S) prima e dopo trattamento con la PTx(0.01 nM sui parametri CP, e -(LVdP/dt)max. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova a due vie (§<0.05).

6. Coinvolgimento dell'PI3 chinasi sulla performance basale

La Wortmannin è un inibitore della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), enzima localizzato al di sotto della membrana cellulare, la cui stimolazione porta all'attivazione, tramite fosforilazione, della proteina chinasi B, anche nota come Akt (Kjeken et al., 2001). Diversi studi hanno testato l'influenza della wortmannin nella regolazione del calcio in una varietà di tipi di cellule con effetti differenti. Per esempio, nel muscolo scheletrico, la Wortmannin diminuisce la mobilità del calcio dal reticolo sarcoplasmatico ed esercita un'azione inibitoria nell'accoppiamento eccitazione-contrazione (Hong et al., 1998) (Fig. 22).

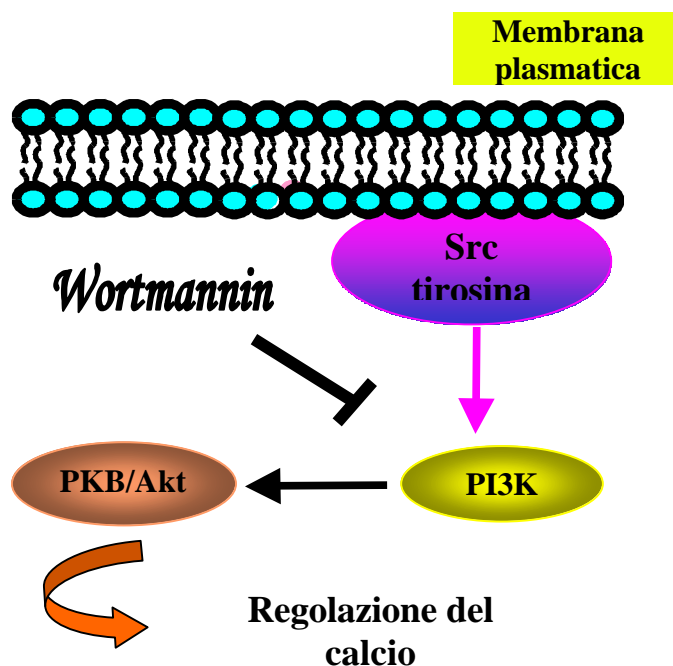


Fig. 22. Siti target della Wortmannin

Per accertare il coinvolgimento della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) nel meccanismo di trasduzione del peptide, i cuori sono stati perfusi con rCGA₁₋₆₄ con S-S da solo e in presenza di Wortmannin a 10 nM. Il pretrattamento con la Wortmannin ha determinato l'abolizione dell'effetto inotropo e la vasodilatazione mediata dal frammento (Fig. 23; 24) L'analisi della $-(LVdP/dt)_{max}$ ha rivelato l'abolizione della riduzione mediata dal peptide (Fig. 24).

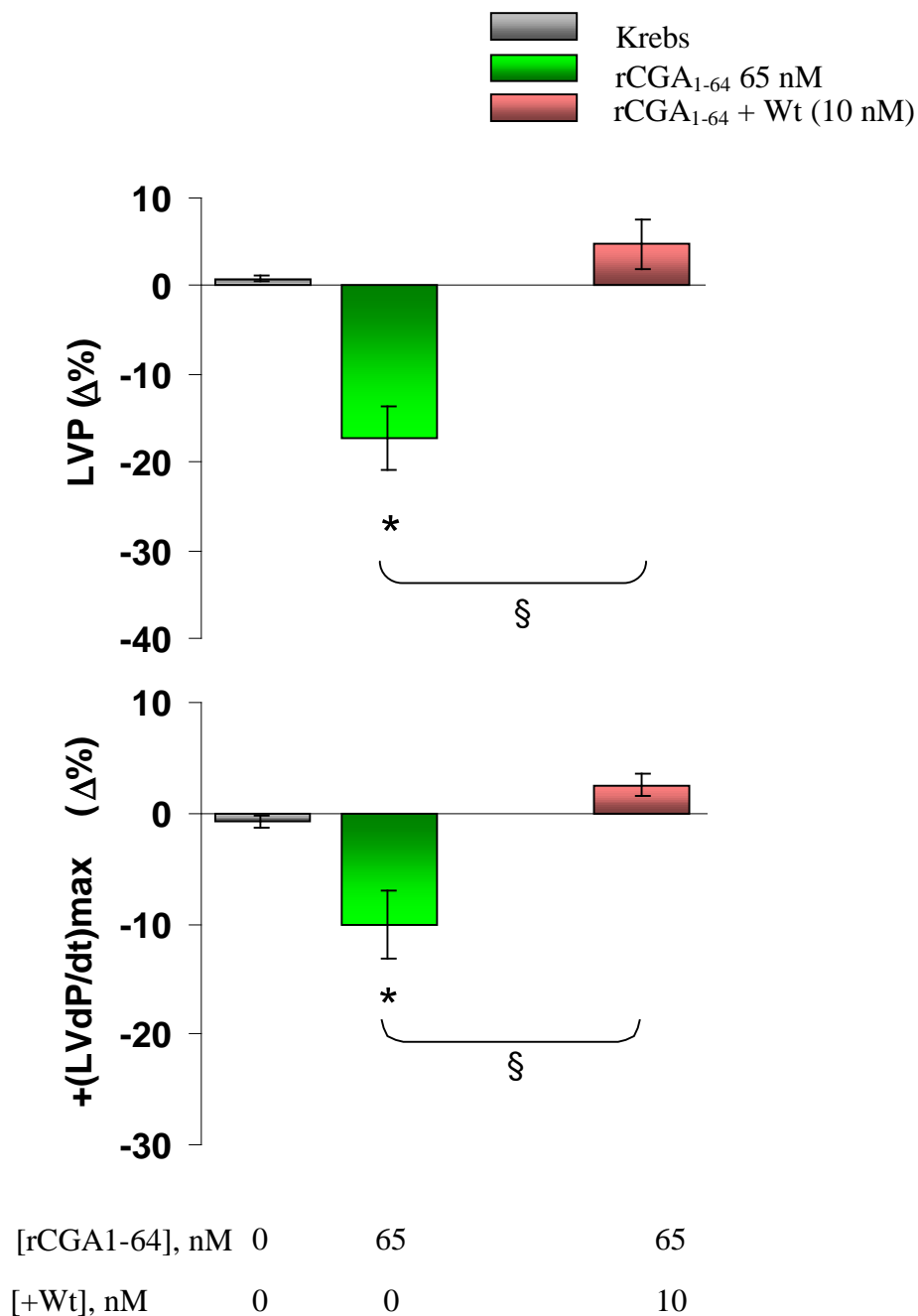
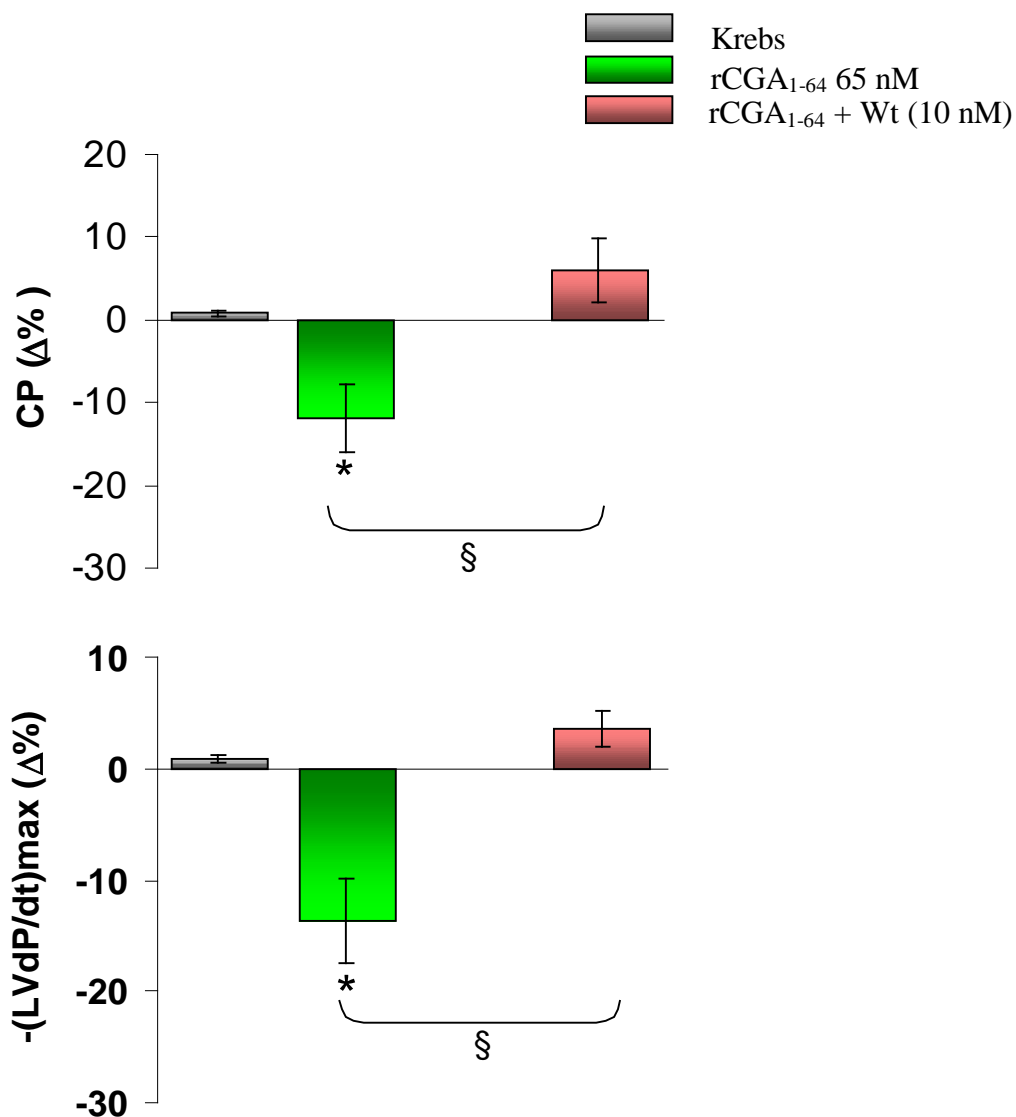


Fig.23. Effetto della rCGA₁₋₆₄ con S-S) prima e dopo trattamento con la Wortmannin (10 nM) sui parametri LVP, e +(LVdP/dt)max. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante lo Student's t-test: *= p<0.05, **=p<0.01. Il confronto fra i due gruppi è stato effettuato attraverso il test Anova a due vie (§<0.05).



[rCGA1-64], nM	0	65	65
[+Wt], nM	0	0	10

Fig. 24. Effetto della rCGA₁₋₆₄ con S-S prima e dopo trattamento con la Wortmannin (10 nM) sui parametri CP, 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 a due vie (§<0.05).

7. Coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG

L'ossido nitrico (NO), attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi e conseguente produzione di cGMP, è un importante mediatore dell'azione di diversi ormoni, nonché di segnali inter- e intracellulari e di tossine (Massion et al., 2003)(Fig. 25)

Per verificare l'effettivo coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG nell'azione cardiotropica mediata dal peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S i preparati cardiaci sono stati pretrattati con L-NIO (10 µM) con PTIO (10 µM), con ODQ (10 µM) e KT5823 (0.01 µM).

Il trattamento con L-NIO, un inibitore dell'ossido nitrico sintasi (NOS), ha abolito sia l'effetto inotropo negativo del peptide che la vasodilatazione indotta dal peptide di ratto. L'analisi della $-(LVdP/dt)_{max}$ ha mostrato l'abolizione della riduzione mediata dal frammento rCGA₁₋₆₄ con S-S (Fig. 26; 27)

Simili risultati sono stati ottenuti in presenza di PTIO, scavenger dell'NO, di ODQ, inibitore della guanilato ciclasi, e del KT5823, inibitore della PKG (Fig. 26; 27.)

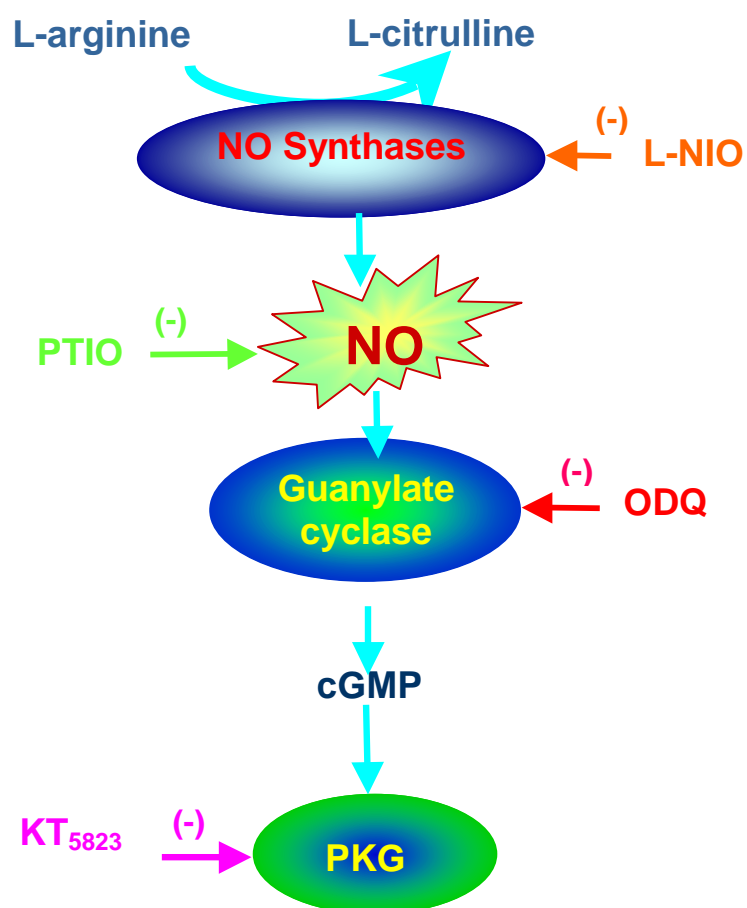


Fig. 25. Schema della cascata di trasduzione NO-cGMP-PKG con i relativi siti d'azione di inibizione e donatori.

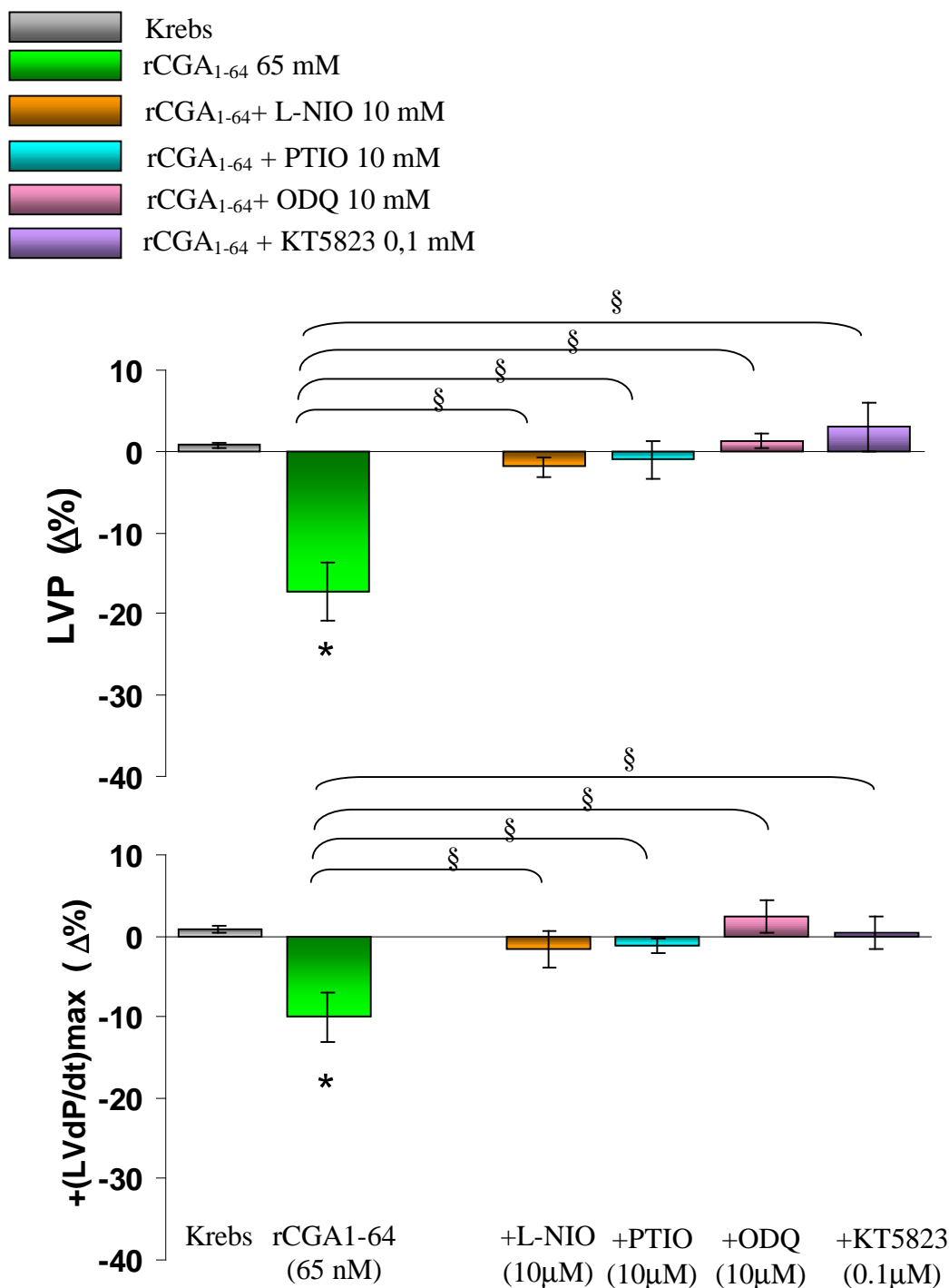


Fig.26. Effetto della rCGA₁₋₆₄ con S-S) prima e dopo trattamento con L-NIO (10μM), PTIO (10μM), ODQ(10μM) , KT5823 (0.1 μM) sui parametri LVP, e + (LVdP/dt)max. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali ± errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, 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 a due vie (§<0.05).

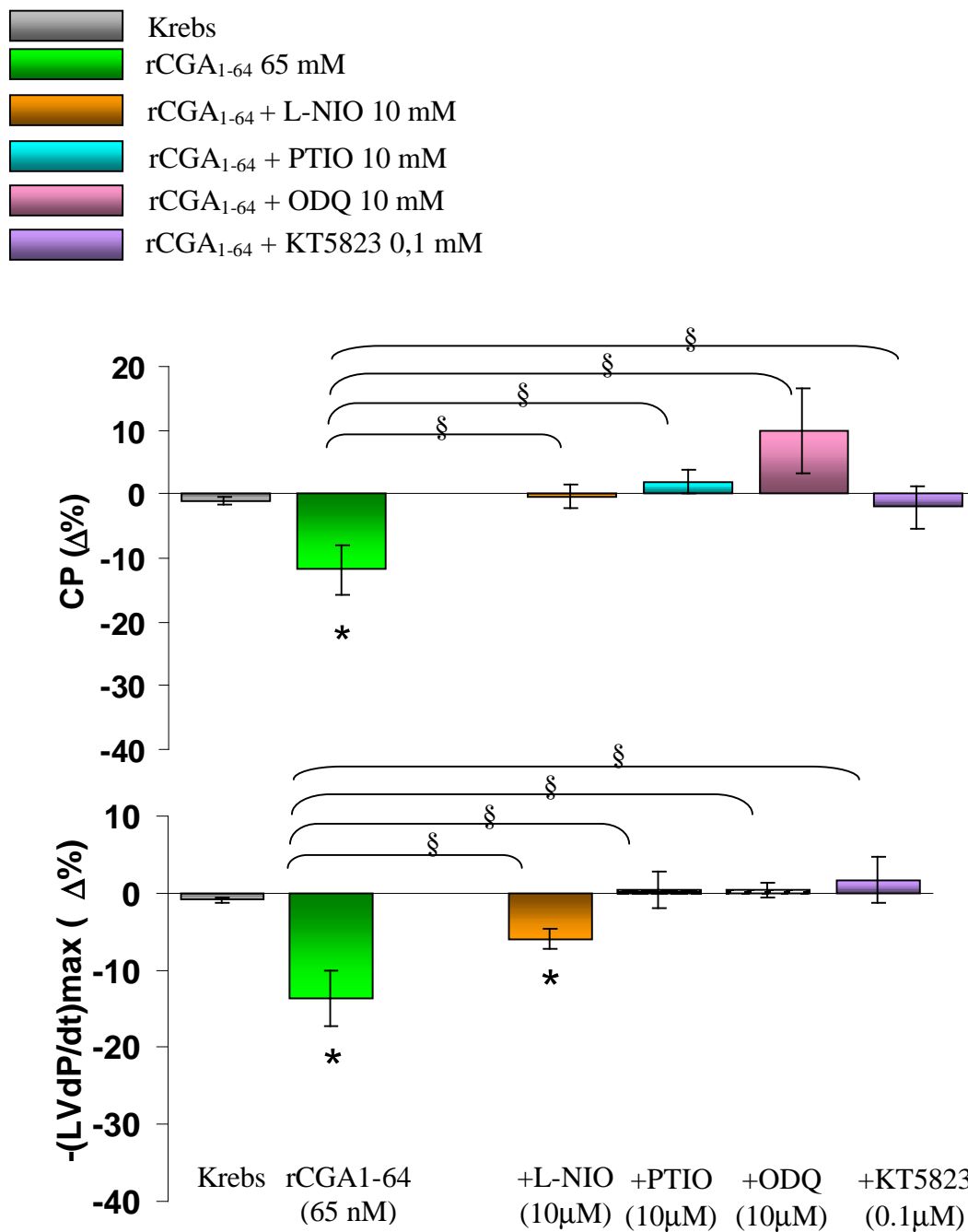


Fig. 27. Effetto della rCGA₁₋₆₄ con S-S prima e dopo trattamento con L-NIO (10 μM), PTIO (10 μM), ODQ (10 μM), KT5823 (0.1 μM) sui parametri CP, e -(LVdP/dt)max. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali ± errore standard, per n=8. Le variazioni significative, rispetto al controllo, 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 a due vie (§<0.05).

Discussione

1. Azione inotropica e lusitropica del rCGA₁₋₆₄

Nel presente lavoro di tesi abbiamo dimostrato che la rCGA₁₋₆₄ è in grado di indurre effetti inotropi e lusitropici negativi, nonché vasodilatazione coronaria. Tali effetti sono ottenuti in un ambito di concentrazioni nel range nanomolare, paragonabili ai valori fisiologici di 0.5-2 nM riscontrati per la CGA nel plasma umano (Ceconi et al., 2002). Inoltre, questo peptide è in grado di contrastare l'effetto stimolatorio proprio delle catecolamine e di sostanze vasoattive, quali l'ET-1, che diventano iperattivi soprattutto in condizioni di stress. Pertanto, rCGA₁₋₆₄ può essere proposto come un nuovo importante regolatore omeostatico del tono basale e del flusso sanguigno, proteggendo il cuore dall'eccessiva stimolazione adrenergica, che è alla base di varie patologie cardiache quali per esempio la cardiopatia ipertensiva.

L'analisi funzionale di questo peptide nasce da uno studio della sequenza di ratto della CGA, condotto da Metz-Boutigue e collaboratori (1993) in cui si è dimostrato l'esistenza di un sito dibasico in posizione 64-65. Esso rappresenterebbe il putativo sito di clivaggio dal quale si genererebbe un peptide corrispondente alla VS-1 umana (CGA1-76). Inoltre, Glattard e collaboratori (2006) hanno dimostrato che il cuore

stesso produce segmenti peptidici che contengono il frammento 1-64, suggerendo pertanto un ruolo autocrino/paracrino del peptide stesso.

Lo studio delle sequenze modificate del peptide, quali la sequenza del rCGA₁₋₆₄ senza ponte disolfuro e la sua forma ossidata sulle metionine, ha permesso di ottenere importanti informazioni sul rapporto struttura funzione. In particolare ciò ha rivelato l'importanza della struttura terziaria per l'azione cardiotropica del peptide. Tota e collaboratori (2003), utilizzando come biossay un preparato *in vitro* di cuore isolato e perfuso di rana (*Rana esculenta*), testando differenti frammenti di VS-1 bovini e di rana, quali ad esempio bCGA₁₋₄₀ con S-S, bCGA₇₋₅₇, bCGA₄₋₁₆, bCGA₄₋₁₆, fCGA₄₇₋₆₆, bCGA₄₇₋₆₆, hanno osservato l'importanza del ponte disolfuro nell'indurre l'effetto inotropo negativo dei frammenti con S-S. In particolare, essi hanno dimostrato come le differenze strutturali delle sequenze della VS-1 bovina e di rana siano in grado di modulare l'inotropismo nel miocardio di rana. Ciò ha enfatizzato l'alta conservazione filogenetica della sequenza della VS-1 ed ha messo in luce che i frammenti CGA₇₋₅₇ e CGA₁₋₄₀ con il ponte disolfuro intatto appaiono i più potenti nell'esercitare l'effetto inotropo negativo.

Ricerche precedenti effettuate da Cerra e collaboratori (2006) hanno dimostrato che la hrVS-1 (CGA₁₋₇₈) esercita un'azione

cardiotropica sul cuore di ratto, cioè esercita l'effetti inotropi e lusitropici in condizioni basali (Cerra et al., 2006; Pieroni et al., 2007). I dati ottenuti con la sequenza di ratto CGA₁₋₆₄, confrontati con quelli ottenuti con hrVS-1, dimostrano come la porzione N-terminale della CGA abbia importanti implicazioni biologiche sul cuore dei mammiferi.

Unitamente alla valutazione della contrattilità si è voluta investigare anche l'attività dei frammenti CGA-derivati di ratto sul lusitropismo cardiaco, cioè sul rilassamento del miocardio. Negli ultimi anni è stato sempre più affermato il fondamentale contributo del rilassamento diastolico nel corretto funzionamento del cuore come pompa. Infatti, alterazioni della fase diastolica possono precedere disfunzioni nella contrattilità e portare perfino allo scompenso cardiaco (Lorell, 1991). Il rilassamento del cuore 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 riduzione indotta dal peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S, della massima velocità di rilassamento $[-(LVdP/dt)_{max}]$

e di HTR, entrambi indici di una diminuita velocità di rilassamento, permette di includere tale frammento nelle sostanze capaci di indurre una modulazione negativa del lusitropismo. Tali dati sono in accordo con quanto riportato da Pieroni e collaboratori (2007) i quali hanno dimostrato nel cuore di ratto che la somministrazione di hrVS-1 induce un'azione lusitropica negativa.

E' di notevole interesse l'effetto che il frammento rCGA₁₋₆₄ con S-S esercita sulla pressione coronarica. Infatti, tale peptide, a differenza della leggera e non significativa vasocostrizione indotta dalla hrVS-1, esercita una evidente vasodilatazione, significativa già a 33 nM. Questo è in accordo con le osservazioni di Brekke e collaboratori (2000) i quali hanno evidenziato la capacità dilatatoria esercitata dal frammento CGA₁₋₄₀ sulle arterie coronariche bovine precontratte.

Alla luce di questi risultati, è possibile dedurre che il peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S presenta un'efficacia inotropa negativa simile alla hrVS-1 in condizioni basali. Esso inoltre induce effetti vasodilatatori sulle coronarie. Tale divergenza potrebbe essere dovuta alla presenza della coda di CGA 67-78 che potrebbe ostacolare l'azione sull'endotelio vasale, alla base dell'effetto vasodilatatorio.

2. Azione anti-adrenergica dei tre peptidi

Il principale sistema stimolatorio vascolare e cardiaco, è il sistema adrenergico, che diventa iperattivo nella classica sindrome da stress descritta da Hans Selye nel 1936. Elevate cascate eccitatorie, se lasciate incontrollate, potrebbero essere più deleterie dello stesso stress. Wortsman (2002) ha dimostrato in soggetti affetti da stress acuto, che i livelli sierici di adrenalina sono dell'ordine di 4.5×10^{-8} M e che soggetti con patologie cardiovascolari sono particolarmente suscettibili alla reazione potenzialmente letale dovuta alle catecolammine.

Il fatto che le catecolammine 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, ci ha indotti a studiare il possibile ruolo modulatore che i tre frammenti rCGA₁₋₆₄ esercitano sulla stimolazione adrenergica. L'effetto dei peptidi rCGA₁₋₆₄ è stato analizzato conducendo esperimenti di competizione. Le curve di competizione ottenute mediante l'esposizione a concentrazioni crescenti di Iso e singole concentrazioni di ognuna dei tre peptidi hanno dimostrato che tutti e tre i frammenti CGA₁₋₆₄ esercitano verso la stimolazione adrenergica un antagonismo non competitivo con la seguente scala di

potenza: rCGA₁₋₆₄ con S-S > rCGA₁₋₆₄ senza S-S e rCGA₁₋₆₄ nella forma ossidata.

Dai nostri risultati emerge che il peptide deve conservare integra la propria struttura terziaria per esplicare la propria azione antiadrenergica, e come tale effetto sia disgiunto dal meccanismo d'azione che sottende l'inotropismo basale, in quanto anche i frammenti modificati conservano un effetto contro la stimolazione Iso-dipendente, seppure con minore potenza.

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. Una simile azione non competitiva è stata dimostrata anche per la Catestatina, un frammento CGA-derivato corrispondente ai residui 352-372, la quale inibisce il recettore colinergico nicotinico coinvolto nel rilascio delle catecolammine dalle cellule cromaffini (Angelone et al., 2007).

Poiché non esiste in letteratura la dimostrazione diretta di un classico recettore di membrana per i frammenti della VSs, è stato proposto che questi peptidi esercitano i loro effetti attraverso l'interazione idrofobica fra specifici domini della loro sequenza e microdomini

specializzati di membrana con conseguente modulazione degli effettori cellulari (Lugardon et al., 2000; Maget-Dana et al., 2002). Ciò è suffragato dalla dimostrazione che la VS-1 interagisce con i fosfolipidi di membrana, in particolare con la fosfotidilserina (Blois et al., 2006).

Alla luce di queste osservazioni è possibile ipotizzare due meccanismi alla base dell'azione antiadrenergica propria dei peptidi VS-derivati. Una via potrebbe essere una modulazione allosterica del recettore β -adrenergico indipendentemente dal legame con il sito recettoriale; un'altra ipotesi potrebbe essere una down regulation dei segnali intracellulari attivati dal recettore stesso (Cerra et al., 2006).

Il coinvolgimento del sistema adrenergico nell'azione cardiosoppressiva delle VSs è stato riportato anche nei preparati cardiaci di anguilla ma non di rana (Imbrogno et al., 2004; Corti et al., 2004), indicando l'esistenza di differenti meccanismi specie-specifici.

3. Effetti del rCGA₁₋₆₄ S-S in presenza di Endotelina-1

L'endotelina-1 (ET-1) è un peptide di 21 amminoacidi prodotto dalle cellule endoteliali. Possiede attività vasocostrittrice e inotropa positiva (Yanagisawa et al., 1988). L'endotelina appartiene ad una famiglia costituita da tre isoforme diverse denominate: ET-1, ET-2 e ET-3 (Bloch et al., 1991). ET-1 è l'isoforma prodotta maggiormente dalle cellule endoteliali vascolari (Yanagisawa et al., 1988). ET-2 è associato con l'invasione e la crescita del tumore mammario umano (Grimshaw et al., 2002), mentre l'ET-3 è abbondante nel cervello (Matsumoto et al., 1989). L'ET esplica le sue azioni a livello vascolare e cardiaco in seguito al legame con due tipi di recettori denominati ETa e ETb (Douglas et al., 1992). E' noto che agendo sul recettore ETa induce proliferazione della muscolatura liscia vascolare ed ipertrofia miocardica, mentre, attivando il recettore ETb, causa vasodilatazione ed effetti antitrombotici ed antiproliferativi (Brunner et al., 2006).

I nostri risultati indicano che l'effetto inotropo positivo indotto dall'ET-1 è stato abolito dal peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S, mentre è stata ridotta significativamente la vasocostrizione coronaria ET-1 dipendente. Tali risultati evidenziano che il frammento CGA-derivato di ratto, corrispondente agli amminoacidi 1-64, è in grado di indurre una

vasodilatazione anche se i vasi sono precontratti. Ciò conferma che i peptidi delle VSs possono agire come importanti modulatori cardio-inibitori sia in condizioni basali che in presenza di stimolazione ET-dipendente.

Le nostre osservazioni concordano con quanto riportato in letteratura. Infatti, è noto che le VSs sono in grado di regolare la pressione sanguigna sia a livello arterioso che venoso, riducendo la vasocostrizione indotta da endotelina (Aardal e Helle, 1992; Angeletti et al., 1994). Questi effetti sono indipendenti dall'endotelio e dalla presenza di ioni calcio nel compartimento extracellulare (Aardal e Helle, 1992; Aardal et al., 1993).

4. Coinvolgimento delle proteine Gi/0

Le proteine G sono colocalizzate nelle caveole insieme ai recettori colinergici e adrenergici, ai canali al calcio e all'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), sono coinvolte in numerose cascate trasduzionali inibitorie innescate sia da stimoli chimici che fisici (Hare et al., 1998). Helle e collaboratori (2001) hanno osservato che l'inibizione dell'attività delle cellule paratiroidi da parte delle VSs era bloccata dal trattamento

con la tossina della pertosse (PTx), che disaccoppia il segnale di trasduzione tra diverse famiglie di recettori e le proteine Gi/G0.

I nostri esperimenti hanno evidenziato su preparati cardiaci di ratto secondo *Langendorff* che l'azione cardio-soppressiva esercitata dal frammento rCGA₁₋₆₄ con S-S è abolita dal trattamento con la tossina della pertosse, indicando un meccanismo di traduzione del segnale mediato da proteine G. Tali risultati sono in accordo con quanto riportato da Cappello e collaboratori (2007) i quali hanno dimostrato che nel preparato cardiaco di ratto l'effetto inotropo negativo indotto dalla hrVS-1 è bloccato dalla PTx. Imbrogno e collaboratori (2004) hanno inoltre dimostrato che anche nel preparato cardiaco di anguilla le proteine G sono coinvolte nell'azione cardioinibitoria della VS-1, mentre ciò non avviene nel preparato cardiaco di rana (Corti et al., 2004).

5. Coinvolgimento dell'PI3 chinasi sulla performance basale

La PI3K-Proteina chinasi B appartiene alla famiglia delle chinasi lipidiche che catalizza la fosforilazione in posizione 3 dei fosfoinositidi, una classe di fosfolipidi di membrana, generando i fosfoInositidi-trifosfati (PIP3) che sono importanti secondi messaggeri intracellulari. La PI3K gioca un importante ruolo in numerosi eventi fisiologici come la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'apoptosi e l'organizzazione del citoscheletro (Rameh, e Cantley, 1999; Cantley, 2002).

Al fine di verificare un eventuale coinvolgimento della PI3K nel meccanismo d'azione dei peptidi CGA-derivati, i preparati cardiaci di ratto sono stati trattati con Wortmannin. Il blocco della PI3K ha abolito l'inibizione cardiaca esercitata dal frammento rCGA1-64 con S-S

E' ben noto in letteratura che la PI3K interviene nella regolazione della eNOS, della quale induce attivazione tramite fosforilazione del residuo di Ser 1179, con conseguente produzione di NO (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). A tal proposito, Gallo e collaboratori (2007) hanno recentemente osservato, in muscoli papillari di ratto, che l'effetto anti-adrenergico esercitato dalla VS-1 è dovuto a un rilascio endoteliale di ossido nitrico (NO) dipendente dall'attivazione della PI3K. Ciò suggerisce

che la PI3K gioca un importante ruolo nell'effetto inotropo indotto dai peptidi VS-derivati.

6. Coinvolgimento del sistema NO-cGMP-PKG

L'ossido nitrico (NO) è un'ubiquitaria molecola segnale che media numerosissimi effetti fisiologici, quali la neurotrasmissione, l'inibizione dell'adesione e dell'aggregazione piastrinica, la proliferazione cellulare, la regolazione dell'attività citotossica del macrofago (Moncada et al., 1991; Radomski e Moncada, 1993; Vane, 1994). La biosintesi dello NO avviene principalmente attraverso la trasformazione dell'amminoacido L-arginina in L-citrullina catalizzata da una famiglia di enzimi, le ossido nitrico sintasi (NOSs) (Bredt et al., 1991).

Dai nostri dati è emerso che la riduzione sui parametri cardiaci LVP, $+(LVdP/dt)_{max}$, CP e $-(LVdP/dt)_{max}$ indotta dal peptide rCGA₁₋₆₄ con S-S è stata abolita da PTIO, uno scavenger dello NO, da L-NIO, un inibitore selettivo della eNOS, da ODQ e da KT5823, rispettivamente inibitori della guanilato ciclastasi solubile (sGC) e della proteina chinasi cGMP-dipendente (PKG). Questi risultati mostrano un chiaro

coinvolgimento del pathway NO-cGMP-PKG nell'effetto cardio-soppressivo indotto dal frammento CGA-derivato di ratto

Nel cuore il sistema NOS-NO-cGMP-PKG gioca un ruolo chiave nella mediazione di segnali intracardiaci specifici coinvolti nel controllo della performance contrattile. Nei miociti ventricolari di ratto, lo NO prodotto dalla NOS, agisce sulla sGC con conseguente aumento dei livelli intracellulari di cGMP e attivazione della PKG. Tale proteina fosforila, a livello degli elementi contrattili del sarcomero, la troponina I, riducendo l'affinità della troponina C per il calcio (Shah e McCarthy, 2000). Inoltre, l'attivazione della PKG induce la fosforilazione della subunità alfa-1 delle proteine $G_{i/o}$ riducendo la corrente di calcio rilasciata dai canali di tipo-L (Abi-Gerges et al., 2001). La conseguenza funzionale dell'attivazione di questa cascata trasduzionale è la riduzione della performance cardiaca.

I nostri risultati concordano con quanto riportato da Cappello e collaboratori (2007) i quali hanno dimostrato nel preparato cardiaco di ratto che l'effetto inotropo negativo indotto dalla hrVS-1 coinvolge l'attivazione della via di trasduzione NO-cGMP-PKG-dipendente. Pertanto è facile ipotizzare che l'effetto inotropo negativo esercitato dai frammenti N-terminali è influenzato dalla modulazione

dell'attività della NOS attraverso sia un diretto controllo della eNOS che attraverso la modulazione delle proteine $G_{i/o}$.

Studi condotti su preparato di cuore isolato e perfuso di anguilla hanno evidenziato, mediante l'inibizione selettiva delle vie di trasduzione NO-cGMP-PKG dipendenti, che l'attivazione di tale sistema è condizione necessaria affinché la VS-1 possa determinare la sua azione inotropa negativa (Imbrogno et al., 2004). Al contrario, Corti e collaboratori (2004) hanno dimostrato nel cuore avascolare di anfibio come l'azione cardiotropica della VS-1 non dipenda dall'attivazione di nessuna via coinvolta nel sistema dell'NO.

Questa diversità d'azione tra le diverse specie suggerisce che, nonostante i frammenti derivati dalle VSs esercitano la medesima azione cardioinibitoria sul cuore isolato e perfuso *in vitro*, il loro meccanismo d'azione è certamente specie-specifico.

Conclusione

Conclusione

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno dimostrato per la prima volta nel cuore di ratto che il frammento peptidico omologo CGA₁₋₆₄ svolge importanti effetti cardiosoppressivi sia in condizioni basali che sotto stimolazione adrenergica. Ciò conferma il possibile ruolo dei peptidi della famiglia delle vasostatine quali sostanze cardioattive ad azione endocrina/autocrina e paracrina sulla contrattilità miocardica. Tali effetti sono G_{i/o}, PI3K e NOS-cGMP-PKG dipendente.

L'utilizzo di peptidi di ratto modificati strutturalmente per l'assenza del ponte disolfuro e per l'ossidazione in posizione di tre residui di metionina ha fornito indicazioni di rilievo circa i rapporti struttura-funzione delle VS di ratto. I nostri risultati hanno confermato che il ponte disolfuro è di centrale importanza nell'indurre l'effetto cardiosoppressivo non solo in condizioni basali, ma anche in presenza di stimolazione sia adrenergica che ET-1 dipendente. Pertanto, sia dai nostri risultati che dai dati di letteratura è emerso che l'attività cardio-soppressiva dei frammenti derivati dalla VS-1 sembra confinata nei primi 64 aminoacidi del peptide. Inoltre, l'integrità del ponte disolfuro è fondamentale per le azioni cardio- e vaso-inibitorie.

Il confronto del frammento di ratto con il ponte disolfuro con hrVS-1 ha rivelato che il peptide rCGA₁₋₆₄ presenta anche un'azione

vasodilatatrice non evidenziata nella hrVS-1. Da ciò si può ipotizzare che l'assenza delle coda di aminoacidi del peptide faciliti l'interazione con specifici microdomini della membrana dell'endotelio coronario con conseguente risposta vasodilatatoria.

Alla luce di quanto detto, possiamo concludere affermando che il peptide rCGA₁₋₆₄ con ponte disolfuro intatto è attivo nel cuore di ratto nello stesso range di concentrazione della hrVS-1. Infatti, gli effetti inotropi e lusitropici negativi ottenuti con il frammento di ratto, avvalorano le azioni della hrVS-1 dimostrate nel precedente studio condotto da Cerra e collaboratore (2006), nel preparato cardiaco di ratto.

Bibliografia

Bibliografia

Aardal S., Helle K.B. (1992) The vaso-inhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. *Regul. Pept.* 41: 9-18.

Aardal S., Helle K.B., Elsayed S., Reed R.K., Serck-Hansen G. (1993) Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A., suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J. Neuroendocrinol.* 5: 105-112.

Aardal S., Aardal N.P., Larsen T.H., Angeletti R.H., Stridsberg M., Taupenot L., Aunis D., Helle K.B. (1996) Human pheochromocytoma: different patterns of catecholamines and chromogranins in the intact tumor, urine and serum in clinically unsuspected cases. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 56: 511-523.

Abi-Gerges N., Fischmeister R., Méry 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(Pt 1): 117-130.

Angeletti R.H., Aardal S., Serck-Hansen G., Gee P., Helle, K.B. (1994) Vaso-inhibitory activity of synthetic peptides from the amino terminus of chromogranin A. *Acta Physiol Scand.* 152: 11-19.

Angeletti R.H., Mints L., Aber C., Russel J. (1996) Determination of residues in chromogranin A (16-40) required for inhibition of parathyroid hormone secretion. *Endocrinol.* 137: 2918-2922.

Angeletti R.H., D'Amico T., Russell J. (2000) Regulation of parathyroid secretion. Chromogranins, chemokines, and calcium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 482: 217-223.

Arai M., Matsui H., Periasamy M. (1994) Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 74: 555-564.

Banks P., Helle K.B. (1965) The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem. J.* 97: 40c-41c.

Bartfly W.J., Dawood F., Wen W.H., Lehotay D.C., Hou D., Bartfly E., Lou X., Backx P.H., Liu P.P. (1999). Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc. Res.* **43**: 892-900.

Beaubien G., Schafer M.K., Weihe E., Dong W., Chretien M., Seidah N.G., Day R. (1995) The distinct gene expression of the pro-hormone convertases in the rat heart suggests potential substrates. *Cell Tissue Res.* **279(3)**: 539-549.

Beinfeld M.C. (1998) Prohormone and proneuropeptide processing. Recent progress and future challenges. *Endocrine.* **8(1)**: 1-5.

Bers D.M. (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res.* **87(4)**: 275-281.

Bloch K.D., Hong C.C., Eddy R.L., Shows T.B., Quertermous T. (1991) cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics.* **10(1)**: 236-242.

Blois A., Holmsen H., Martino G., Corti A., Metz-Boutigue M.H., Helle K.B. (2006) Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidyl-ethanolamine. *Reg Pept.* **134**: 30-37.

Brekke J.F., Kirkeleit J., Lugardon K., Helle K.B. (2000) Vasostatins. Dilators of bovine resistance arteries. *Adv Exp Med Biol.* **482**: 239-246.

Brunner F., Bras-Silva C., Cerdeira A.S., Leite-Moreira A.F. (2006) Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.* **111(2)**: 508-531.

Cantley L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* **296(5573)**: 1655-1657.

Cappello S., Angelone T., Tota B., Pagliaro P., Penna C., Rastaldo R., Corti A., Losano G., Cerra M.C. (2007) Human recombinant

chromogranin A-derived vasostatin-1 mimics preconditioning via an adenosine/nitric oxide signaling mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **293(1)**: H719-727.

Ceconi C., Ferrari R., Bachetti T., Opasich C., Volterrani M., Colombo B., Parrinello G., Corti A. (2002) Chromogranin A in heart failure: a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. *Eur. Heart J.* **23**: 967-974.

Cerra M.C., De Iuri L., Angelone T., Corti A., Tota B. (2005) Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Researc Cardiol.* **100**: 1-10.

Corti A., Sanchez L.P., Gasparri A., Curnis F., Longhi R., Brandazza A., Siccardi A.G., Sidoli A. (1997) Production and structure characterisation of recombinant chromogranin A N-terminal fragments (vasostatins) evidence of dimer-monomer equilibria. *Eur J Biochem.* **248**:692-699.

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

Corti A., Mannarino C., Mazza R., Colombo B., Longhi R., Tota B. (2002) Vasostatins exert negative inotropism in the working heart of the frog. *Ann N Y Acad Sci.* **971**:362-365

Corti A., Mannarino C., Mazza R., Angelone T., Longhi R., Tota B. (2004) Chromogranin A N-terminal fragments vasostatin-1 and the synthetic CGA 7-57 peptide act as cardiostatins on the isolated working frog heart. *Gen Comp Endocrinol.* **136**: 217-224.

Corti A., Pieroni M., Cimenti C.,Angelone T., Tota B., Curnis F., Colombo B., Russo M.A., Maseri A., Frustaci A. (2006) Chromogranin A in hypertrophic and dilated cardiomyopathies. International Workshop on Vasostatins and Chromogranin A-Derived Peptides”, Capri, Italy, September 2005.

Curry W.J., Johnston C.F., Hutton J.C., Arden S.D., Rutherford N.G., Shaw C., Buchanan K.D. (1991) The tissue distribution of rat chromogranin A-derived peptides: evidence for differential tissue processing from sequence specific antisera. *Histochemistry*. 96(6):531-538.

D'este L., Buffa R., Pelagi M., Siccardi A.G. Renda T. (1994) Immunohistochemical localization of chromogranin A and B in the endocrine cells of the alimentary tract of the green frog, *Rana esculenta*. *Cell.Tissue Res*. 277: 341-349.

De Tombe P.P. (1998) Altered contractile function in heart failure. *Cardiovasc Res*. 37(2): 367-380.

Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605.

Dondossola E., Gasparri A., Bachi A., Longhi R., Metz-Boutigue M.E., Tota B., Helle K.B., Curnis F., Corti A. (2007) Vasostatin-1 contains an ezrin-binding site that regulates cell adhesion. In press

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

Douglas S.A., Elliott J.D., Ohlstein E.H. (1992) Regional vasodilation to endothelin-1 is mediated by a non-ETA receptor subtype in the anaesthetized rat: effect of BQ-123 on systemic haemodynamic responses. *Eur J Pharmacol*. 221(2-3): 315-324.

Drees B.M., Rouse J., Johnson J., Hamilton J.W. (1991) Bovine parathyroid glands secrete a 26-kDa N-terminal fragment of chromogranin-A which inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology*. Dec; 129(6):3381-3387.

Eiden L.E. (1987) Is Chromogranin A prohormone? *Nature*. **325** (6102):301

Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A., Sessa W.C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**.

Galinanes M., Hearse D.J. (1990). Species differences in susceptibility to ischemic injury and responsiveness to myocardial protection. *Cardioscience*. **1**: 127-143.

Gallo M.P., Levi R., Ramella R., Brero A., Boero O., Tota B., Alloatti G. (2007) Endothelium-derived nitric oxide mediates the antiadrenergic effect of human vasostatin-1 in rat ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **292(6)**: H2906-2912.

Gasparri A., Sidoli A., Sanchez L.P., Longhi R., Siccardi A.G., Marchisio P.C. Corti A. (1997) Chromogranin A fragments modulate cell adhesion. Identification and characterization of a pro-adhesive domain. *J.Biol.Chem*. **272**: 20835-20843.

Glattard E., Angelone T., Strub J.M., Corti A., Aunis D., Tota B., Metz-Boutigue M.H., Goumon Y. (2006) Characterization of Natural Vasostatin-Containing Peptides in Rat Heart. *FEBS J*. **273 (14)**: 3311–3321.

Goumon Y., Strub J.M., Moniatte M., Nullans G., Poteur L., Hubert P., Van Dorselaer A., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (1996) The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur J Biochem*. **235(3)**: 516-525.

Goumon Y., Lugardon K., Gadroy P., Strub J.M., Welters I.D., Stefano G.B., Aunis D., 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(49)**: 38355-38362.

- Grimshaw M.J., Naylor S., Balkwill F.R. (2002)** Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol Cancer Ther.* **1(14)**: 1273-1281.
- Halban F., Irminger J.C. (1994)** Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* **299**: 1-18.
- Hare J.M., Kim B., Flavahan N.A., Richer 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.
- Hearse D.J., Sutherland F.J. (2001)** Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol. Res.* **41**: 597-603.
- Helle K.B. (1990)** Chromogranins: universal protein in secretory organelles from paramecium to man. *Neurochem. Int.* **17**: 165-175.
- Helle K.B. and Angeletti R.H. (1994)** Chromogranin A: a multipurpose prohormone? *Acta Physiol.Scand.* **152**: 1-10.
- Helle, K.B. and Angeletti, R.H. (1998)** Chromogranins as multifunctional prohormones: A role in protection against excessive responses to stress ? In Kanno, T., et al (Eds) : *The Adrenal Chromaffin Cell : Archetype and Exemplar of Cellular Signaling in Secretory Control*. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, pp 273-281.
- Helle K.B., Metz-Boutigue M.H., Aunis D. (2001)** Chromogranin A as a calcium-binding precursor for a multitude of regulatory peptides for immune, endocrine and metabolic system. *Curr. Med. Chem.* **1**: 119-140
- Helle K.B. (2004)** The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **79**: 769-794.
- Higgins D.G. (1994)** CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Mol Biol.* **25**:307-318.

Hong S.J. and Chang C.C. (1998). Novel inhibition of contractility by wortmannin in skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* **124** (5):849-856.

Huttner, W., and Benedum, U.M. (1987) Chromogranin A and pancreastatin. *Nature.* **325**:305.

Huttner W.B., Gerdes H.H, Rosa, P. (1991) The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 27-30.

Hutton J.C., Hansen F., Peshavaria M. (1987) Proteolytic processing of chromogranin-A in purified insulin granules. Formation of a 20 KDa N-terminal fragment (betagranin) by the concerted action of a Ca^{2+} - dependent endopeptidase and carboxy-peptidase. *Biochem. J.* **244**: 457-464.

Iacangelo A., Okayama H., Eiden L.E. (1988) Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA. *FEBS Lett.* **227(2)**: 115-121.

Imbrogno S., De Iuri L., Mazza R., Tota B. (2001) Nitric Oxide modulates cardiac performance in the heart of *Anguilla anguilla*. *J Exp Biol.* **204**: 1719-1727.

Imbrogno S., Angelone T., Corti, A., Adamo C., Helle K.B., Tota B. (2004) Influence of vasostatin, the Chromogranin A-derived peptides, on the working heart of the eel (*Anguilla anguilla*): negative inotropy and mechanism of action. *Gen. Comp. End.* **139**: 20-28.

Jan Danser A.H.; Sarris J.J. (2002) Prorenin uptake in the heart: a prerequisite for local angiotensin generation? *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Nov;34(11):1463-1472.

Kaplan A.P., Joseph K., Silverberg M. (2002) Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol.* **109**: 195–209.

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

- Kim T., Tao-Cheng J.H., Eiden L.E., Loh Y.P. (2003)** The role of Chromogranin A, and the control of secretory granule genesis and maturation. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **14**:56-57.
- Kjeken R., Mousavi S.A., Brech A., Griffiths G., Berg T. (2001)** Wortmannin-sensitive trafficking steps in the endocytic pathway in rat liver endothelial cells. *Biochem J.* **357** (2):497-503.
- Klebanov S., Herlihy J.T., Freeman G.L. (1997)** Effect of long-term food restriction on cardiac mechanism. *Am. J. Physiol.* **273**: H2333-2342.
- Konecki D.S., Benedum U.M., Gerdes H.H., Huttner W.B. (1987)** The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J Biol Chem.* **262**(35): 17026-17030.
- Kornfeld R., Kornfeld S. (1985)** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* **54**: 631-664.
- Legssyer A.K., Hove-Madsen L., Hoerter J., Fischmeister R. (1997)** Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca²⁺ current in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**: 579-591.
- Lorell B.H. (1991)** Significance of diastolic dysfunction of the heart. *Ann. Rev. Med.* **42**:411-436.
- Lugardon K., Raffner R., Goumon Y., Corti A., Delmas A., Bulet P., Aunis D., Metz-Boutigue M.-H. (2000)** Antibacterial and Antifungal Activities of Vasostatin-1, the N-terminal Fragment of Chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **275**:15.
- McVicar D.W., Li F., McCrady C.W., Merchant R.E. (1991)** A comparison of serum-free media for the support of in vitro mitogen-induced blastogenic expansion of cytolytic lymphocytes. *Cytotechnology.* **6**(2): 105-113.
- Maemura K., Kurihara H., Morita T., Oh-hashii Y., Yazaki Y. (1992)** Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology.* **38 Suppl 1**: 29-35.

- Maget-Dana R., Metz-Boutigue M.H., Helle K.B. (2002)** The N-terminal domain of chromogranin A (CgA1-40) interacts with monolayer of membrane lipids of fungal and mammalian compositions. *Ann N Y Acad Sci* **971**: 352-354.
- Massion P.B., Feron O., Dessy C., Balligand J.L. (2003)** Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.* **93(5)**: 388-398.
- Matsumoto H., Suzuki N., Onda H., Fujino M. (1989)** Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **164(1)**:74-80.
- Metz-Boutigue M.H., Angeletti R.H., Aunis, D. (1993)** Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem.* **217** : 247-257.
- Moncada S., Higgs E.A. (1991)** Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* **21(4)**: 361-374.
- Natori S., Huttner W.B. (1996)** Chromogranin B (secretogranin 1) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* **93**: 4431-4436.
- Nobels F.R., Kwekkeboom D.J., Bouillon R. et al. (1998)** Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours *Eur. J. Clin. Invest.* **28**: 431-440.
- Parmer R.J., Koop A.H., Handa M.T., O'Connor D.T. (1989)** Molecular cloning of chromogranin A from rat pheochromocytoma cells. *Hypertension.* **14(4)**: 435-444.
- Parmer R.J., Miles L.A. (1998)** Targeting of tissue plasminogen activator to the regulated pathway of secretion. *Trends Cardiovasc. Med.* **8**: 306-312.

Peterson J.B., Nelson D.L., Ling E. Hogue-Angeletti R.H. (1987) Chromogranin A like proteins in the secretory granules of a protozoan *Paramecium tetraurelia*. *J.Biol.Chem.* **263**: 17264-17267.

Pieroni M., Corti A., Tota B., Curnis F., Angelone T., Colombo B., Cerra M.C., Bellocchi F., Crea F., Maseri A. (2007) Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. *Eur Heart J.* **28(9)**: 1117-1127.

Radomski M.W., Moncada S. (1993) Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost.* **70(1)**: 36-41.

Rameh L. E., Cantley L.C., (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem.* **274(13)**: 8347-8350.

Ratti S., Curnis F., Longhi R., Colombo B., Gasparri A., Magni F., Manera E., Metz-Boutigue M.H., Corti A. (2000). Structure-activity relationships of chromogranin A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **275 (38)**:29257-29263.

Rosa P., Hille A., Lee T., Zanini A., De Camilli P., Huttner W.B (1985) The secretogranins I and II. Two tyrosine-sulphated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway. *J.Cell. Biol.* **101**: 1999-2011.

Sato F., Hasegawa T., Katayama Y., Iwanaga T., Yanaihara N., Kanno T., Ishida N. (2000) Molecular cloning of equine chromogranin A and its expression in endocrine and exocrine tissues. *J Vet Med Sci.* **62(9)**: 953-959.

Seidah N.G, Chretien M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generatine diverse bioactive polypeptides. *Brain Research* **848**: 45-62.

Shah A.M., MacCarthy P.A. (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol.Therapeutics.* **86**: 49-86.

Sirimanne S.R., May S.W. (1995) Interaction of nonconjugated olefinic substrate analogues with dopamine beta-monoxygenase: catalysis and mechanism-based inhibition. *Biochem J* **306** (1): 77–85.

Steiner H.J., Weiler R., Ludescher C., Schmid K.W., Winkler H. (1990) Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. *J Histochem Cytochem.* **38**(6):845-850.

Strub J.M., Garcia-Sablone P., Lonning K., Taupenot L., Hubert P., Van Dorsselaer A., Aunis D., Metz-Boutigue, M.H. (1995) Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla: identification of secretolytin, the endogenous 614-626 C-terminal fragment with antibacterial activity. *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. (1996) Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem.* **271**(45): 28533-28540.

Strub J.M., Sorokine O., Van Dorsselaer A., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (1997) Phosphorylation and O-glycosylation sites of bovine chromogranin A from adrenal medullary chromaffin granules and their relationship with biological activities. *J. Biol. Chem.* **272**: 11928–11936.

Sutherland F.J., Hearse D.J. (2000). The Isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol. Res.* **41**: 613-627.

Tota B., Mazza R., Angelone T., Nullans G., Metz-Boutigue M.H., Aunis D., Helle K.B. (2003) Peptides from the N-terminal domain of chromogranin A (vasostatins) exert negative inotropic effects in the isolated frog heart. *Regul Pept.* **114**(2-3): 123-130.

Tota B. , Imbrogno S., Mannarino C., Mazza R. (2004) Vasostatins and negative inotropy in vertebrate hearts. *Curr. Med. Chem.* **4**: 195-201.

Ui M. (1990) Pertussis toxin as valuable probe for G-protein involvement in signal transduction. In : Moss J, Vaughan M. (eds). ADP-ribosylation toxin and G protein : insight into signal transduction. *American Society for Microbiology Washington, DC*. pp 45-77.

Vane J.R. (1994) The Croonian Lecture, 1993. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **343(1304)**: 225-246.

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

Watkinson A., Jonsson A.C., Davison M. et al. (1991) Heterogeneity of chromogranin-A derived peptides in bovine gut, pancreas and adrenalmedulla. *Biochem. J*. **276**: 471-479.

Weiergraber M., Pereverzev A., Vajna R., Henry M., Schramm M., Nastainczyk W., Grabsch H., Schneider T. (2000) Immunodetection of alpha1E 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.

Winkler H. and Fischer-Colbrie R. (1992) The chromogranin A and B : the first 25 years and future perspectives. *Neurosc*. **49**: 479-528.

Wortzman J. (2002) Role of epinephrine in acute stress. *Endocrinol Metab Clin North Am*. **31(1)**: 79-106.

Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. **332(6163)**: 411-415.

Yanaihara N., Nishikawa Y., Hoshino M., Mochizuki T., Iguchi K., Nagasawa S., Jun L., Futai Y., Kanno T., Yanaihara H., Murai M., Yanaihara C. (1998) Evaluation of region specific radioimmunoassay for rat and human chromogranin A: measurement of immunoreactivity in

plasma, urine and saliva. In *The Adrenal Cell* (eds. T. Kanno, Y. Nakazato and K. Kumakura), pp. 305-313.

Yellow D.M., Downey J.M. (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* **83(4)**:1113-1151

Ringrazio, prima di tutti, il Ch.mo Prof. Bruno Tota, per avermi insegnato il rigore e la serenità necessari per questo tipo di lavoro e la prof.ssa Maria Carmela Cerra per la costante disponibilità e cortesia avute nei miei confronti; particolarmente preziose sono risultate le sue indicazioni e le aperture di ricerca, con le quali sono stata guidata nell'elaborazione di questa tesi.

Ringrazio il Dott. Tommaso Angelone per aver svolto il ruolo di "Consigliere Scientifico" durante la stesura del mio lavoro.

Grazie alla Dott.ssa Alfonsina Gattuso, Dott.ssa Rosa Mazza e Cinzia Mannarino, amiche e consulenti insostituibili, per avermi sempre aiutato ed incoraggiato soprattutto in occasione di alcuni momenti difficili.

Alla Dott.ssa Sandra Imbrogno, Dott. Filippo Garofalo, Dott.ssa Daniela Amelio e la Dott.ssa Daniela Pellegrino per la disponibilità e la gentilezza nei miei confronti.

Voglio ringraziare le mie "colleghe" dottorande del Farmaco-Biologico, Ammamaria ed Elisabetta, la cui compagnia ha reso più gradevoli questi anni di duro lavoro.

Un ringraziamento particolare va a Sandrina e Cristina per essermi state sempre vicine, per aver condiviso con me questa vita sregolata ed incerta e per aver sempre sopportato i miei momenti di sconforto.

Un grazie di cuore ai miei genitori, ad Anastasia, ai miei zii Stefano e Domenica e a Fabio che mi hanno premurosamente accudito e supportato sia materialmente, ma soprattutto moralmente nell'arco di tutta la mia carriera universitaria affrontando con me momenti particolarmente critici.