

Università degli Studi della Calabria

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

Settore Disciplinare BIO/09

*Ruolo del citoscheletro actinico nell' effetto inotropo
negativo indotto dai peptidi CgA-derivati nel cuore di
Anguilla anguilla e Rana Esculenta*

Dott.^{ssa} Cristina ADAMO

Coordinatore e docente Tutor
Prof. Bruno TOTA

Anno Accademico 2005/2006

“L’aspirazione alla verità è più preziosa del suo raggiungimento.”
G.E. Lessing

A mio marito

Indice

Premessa e scopo.....	pag. 1
Summary	pag. 4
Sommario	pag. 6
Introduzione	pag. 8
1. Le Cromogranine.....	pag. 9
2. Le Vasostatine.....	pag. 15
3. Il citoscheletro.....	pag. 20
3.1 I Microtubuli.....	pag. 23
3.2 I Filamenti intermedi.....	pag. 26
3.3 I Microfilamenti.....	pag. 29
3.4 Proteine motrici.....	pag. 34
Materiali e metodi	pag. 38
1. Animali.....	pag. 39
2. Procedura d'isolamento.....	pag. 39
3. Apparato di perfusione.....	pag. 42
4. Soluzione fisiologica.....	pag. 45

5. Misura e calcolo dei parametri cardiaci	pag. 45
6. Condizioni basali di perfusione	pag. 47
7. Composti chimici.	pag. 48
8. Protocolli sperimentali.	pag. 49
8.1 Curva dose-effetto.	pag. 49
8.2 Effetti dei peptidi CgA-derivati in presenza di altre sostanze.	pag. 49
9. Inibitori della dinamica citoscheletrica utilizzati e siti d'azione specifici.	pag. 51
10. Analisi statistica	pag. 55
Risultati	pag. 56
1. Effetti della Citocalasina-D, del BDM, della W7 e della Wortmannin sulla performance meccanica in condizioni basali.	pag. 57
2. Effetti della Citocalasina-D, del BDM, della W7 e della Wortmannin sull'azione cardiosoppressiva esercitata dai frammenti CgA-derivati.	pag. 61
Discussione	pag. 68
 Scheda di approfondimento	
La Wortmannin come inibitore della cascata PI3K-Akt-eNOS.	pag. 78

Bibliografia pag. 84

Premessa e scopo

La Cromogranina A (CgA), ampiamente distribuita a livello dei granuli secretori del sistema neuroendocrino diffuso, è il precursore di una serie di peptidi, dotati di importanti attività biologiche soprattutto in rapporto al ruolo inibitorio che essi esercitano in diversi processi omeostatici (Helle e Angeletti 1994).

Dal taglio proteolitico in corrispondenza del primo e secondo paio di residui aminoacidici basici derivano i frammenti naturali N-terminali quali la Vasostatina 1 (VS-1) o CGA₁₋₇₆ e la Vasostatina 2 (VS-2) o CGA₁₋₁₁₃, noti per la loro attività vasoinibitoria (Aardal e Helle 1992).

Al pari dei vasi anche il cuore è un organo target di questi peptidi. Studi recenti hanno infatti evidenziato 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., 2005; Mazza et al., 2006). In particolare, nel cuore isolato e perfuso di *Anguilla anguilla* e *Rana esculenta* le VSs inducono effetti inotropi negativi attraverso un meccanismo d'azione che coinvolge i canali al Ca²⁺ e al K⁺ (Corti et al., 2002; Imbrogno et al., 2004). Tuttavia, a differenza di quanto osservato nella rana, nel teleosteo *Anguilla anguilla* l'inotropismo negativo indotto dalle VSs è mediato dalle proteine Gi/o, dalla cascata di trasduzione ossido nitrico (NO)-GMPc-

proteina chinasi-G (PKG), dal sistema adrenergico e colinergico e dall'Endotelio Endocardico (Imbrogno et al., 2004).

In letteratura non ci sono dati circa l'esistenza di recettori specifici per i peptidi derivati dalla CgA. E' stato suggerito che le VSs potrebbero attivare cascate di trasduzione dei segnali inter- e/o intracellulari attraverso un meccanismo d'azione aspecifico, basato per esempio su perturbazioni della membrana cellulare (Lugardon et al., 2000; Maget-Dana et al., 2002) che potrebbero essere dovute ad interazioni dei peptidi con fosfolipidi di membrana (Bloise et al., 2006).

Partendo da queste osservazioni e considerando il fatto che diverse proteine regolatorie sono inserite ed, in molti casi, fisicamente legati al network citoscheletrico, scopo di questa ricerca è stato quello di fornire ulteriori chiarimenti sul meccanismo d'azione con cui tali peptidi esercitano la loro azione cardiotropica indagando, tramite l'utilizzo dei classici preparati di cuore isolato e perfuso di anguilla e rana, il ruolo del citoscheletro nella modulazione della performance cardiaca indotta dai frammenti CgA-derivati.

Summary

Vasostatins (VSs), i.e. the main biologically active peptides generated by the proteolytic processing of Chromogranin A (CgA) N-terminus, exert a negative inotropism in vertebrate hearts. Here, using isolated working eel (*Anguilla anguilla*) and frog (*Rana esculenta*) heart preparations, we have studied the role of cytoskeleton in the VSs-mediated inotropic response. In both eel and frog hearts, VSs-mediated-negative inotropy was abolished by treatment with inhibitors of cytoskeleton reorganization, such as Cytochalasin-D (eel: 10nM; frog: 1nM), an inhibitor of actin polymerisation, Wortmannin (0.01 nM) an inhibitor of phosphatidil-inositolo 3-kinasi (PI3K), Butanedione 2-monoxime (BDM) (eel: 100 nM; frog: 10 nM), an antagonist of myosin ATP-ase, and N-(6-aminohexil)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) (eel: 100 nM; frog: 1 nM), a calmodulin antagonist. The results demonstrate that changes in cytoskeletal dynamics play a crucial role in the negative inotropic influence of VSs on eel and frog hearts.

Sommario

Le Vasostatine (VSs), peptidi biologicamente attivi derivanti dal processamento proteolitico dell'estremità N-terminale della Cromogranina A (CgA), esercitano effetti cardiosoppressivi nei vertebrati. In questo studio, tramite l'utilizzo dei classici preparati di cuore isolato e perfuso di anguilla (*Anguilla anguilla*) e rana (*Rana esculenta*), è stato analizzato il ruolo del citoscheletro nella risposta inotropica mediata dalle VSs. In entrambi i preparati l'inotropismo negativo indotto dalle VSs è stato abolito dal trattamento con inibitori del network citoscheletrico, come la Citocalasina-D (anguilla: 10nM; rana: 1nM), inibitore della polimerizzazione dell'actina, la Wortmannin (0.01 nM), inibitore della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K), il Butanedione 2-monoxime (BDM) (anguilla: 100 nM; rana 10 nM), antagonista della miosina ATP-asi, e lo N-(6-aminoheksil)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) (anguilla: 100 nM; rana: 1 nM), antagonista della calmodulina. Questi risultati hanno dimostrato che cambiamenti nella dinamica citoscheletrica svolgono un ruolo cruciale negli effetti inotropici negativi indotti dalle VSs sui cuori di anguilla e rana.

Introduzione

1. Le Cromogranine

Le cromogranine costituiscono una famiglia di glicoproteine acide localizzate nella matrice dei granuli densi “secretori” dei tessuti neuronali e neuroendocrini di mammiferi (Eiden et al., 1987; Huttner et al., 1991; Winkler e 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 pur essendo il prodotto di geni distinti (Benedum et al., 1986; Helmann et al., 1988; Martens 1988; Fischer-Colbrie 1990; Ischia et al., 1997) posseggono proprietà comuni, come l’abbondanza di residui aminoacidici “acidi” e la presenza di coppie di aminoacidi con residui basici, potenziali siti di taglio post-trascrizionale (Smith e Winkler, 1967).

La più importante di tutte le cromogranine, in considerazione delle sue caratteristiche biologiche e della sua utilità clinica, è la Cromogranina A (CgA), descritta per la prima volta nel 1965 da Banks e Helle. Studi successivi hanno dimostrato che la CgA, originariamente isolata nei granuli cromaffini della midollare del surrene e co-secreta con le catecolamine (Banks e Helle, 1965; Helle 1966; Blaschko et al., 1967; Smith e Kirshner 1967; Smith e Winkler 1967; O’ Connor e Frigon 1984), presenta una

distribuzione ben più complessa, essendo contenuta anche nell'ipofisi (25%) (O'Connor 1983; Serck-Hanssen e O'Connor 1984), nel pancreas endocrino (5%) (Ehrhart et al., 1986; Yoshie et al., 1987), nel tratto gastro-intestinale (5%) (Quian et al., 1988) e nelle rimanenti ghiandole endocrine (1%) (Cohn et al., 1982; O'Connor et al., 1983).

Nel genoma umano la CgA viene codificata da 8 esoni separati, appartenenti al cromosoma 14. La sua espressione è peraltro caratterizzata dalla co-espressione di ormoni polipeptidici o neurotrasmettitori cellula-specifici, indice del fatto che il gene della CgA è in grado di rispondere ad un'ampia varietà di segnali modulatori che portano all'espressione della molecola in molteplici famiglie cellulari (Wu et al., 1991; Drees e Hamilton 1994).

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 nelle 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 di questa proteina (Helle 1990; D'Este et al., 1994; Winkler e Fischer-Colbrie 1992; Peterson et al., 1987; Helle e Angeletti 1994).

Nei mammiferi la CgA circola nel plasma a concentrazione pari a 1-4 nanomolare; 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).

Le funzioni biologiche della CgA non sono ancora del tutto chiare, tuttavia, in relazione alla sua abbondanza ed alla sua ubiquitaria distribuzione nei tessuti neuro-endocrini, la CgA sembrerebbe coinvolta in molteplici attività biologiche intra ed extra-cellulari (Hutton et al., 1987; Rosa et al., 1985; Natori e Huttner 1996). A tal proposito è ben noto, a livello intracellulare, il coinvolgimento di questa proteina nei meccanismi di accumulo intragranulare delle catecolamine e nello smistamento delle stesse (Helle et al., 2001), nonché il ruolo da essa svolto nella biogenesi dei granuli secretori (Iacangelo e Eiden 1995; Kim et al., 2001), agendo sui geni coinvolti in tale processo, soprattutto a livello post-trascrizionale. E' stato osservato, infatti, che una soppressione della produzione della CgA

provoca la scomparsa delle proteine dei granuli secretori, ma non degli mRNA che codificano i geni da essa regolati (Kim et al., 2003).

A livello extracellulare la CgA possiede una importante funzione di tipo pro-ormonale, dimostrata e basata sull'identificazione di potenziali siti di clivaggio a livello della struttura primaria della molecola (Metz-Boutigue et al., 1993). Dalla CgA, originano, infatti, in seguito a eventi proteolitici, peptidi dotati di importanti attività biologiche, come la pancreastatina (CgA₂₄₀₋₂₈₈), la parastatina (CgA₃₄₇₋₄₁₉), la catestatina (CgA₃₄₄₋₃₆₄) e le vasostatine (CgA₁₋₇₆, CgA₁₋₁₁₃) (Helle e Angeletti 1994). Tali eventi proteolitici avvengono principalmente a livello di 10 siti di-basici distribuiti lungo tutta la sequenza aminoacidica; tuttavia, è stato dimostrato che il processo proteolitico ricorrente avviene soprattutto a livello delle estremità N- e C-terminale della molecola (Metz-Boutigue et al., 1993). 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 peptidi strutturalmente differenti aventi funzione esocrina, paracrina ed endocrina (Eiden 1987; Huttner e Benedum 1987).

La degradazione della CgA avviene in maniera tessuto-specifica con possibili, importanti, differenze fra i frammenti molecolari prodotti e

rilevabili a livello dei vari tessuti e del circolo ematico (Watkinson et al., 1991)

La Fig. 1 schematizza la sequenza della CgA bovina e dei peptidi naturali e sintetici da essa derivati.

Cromogranina-A

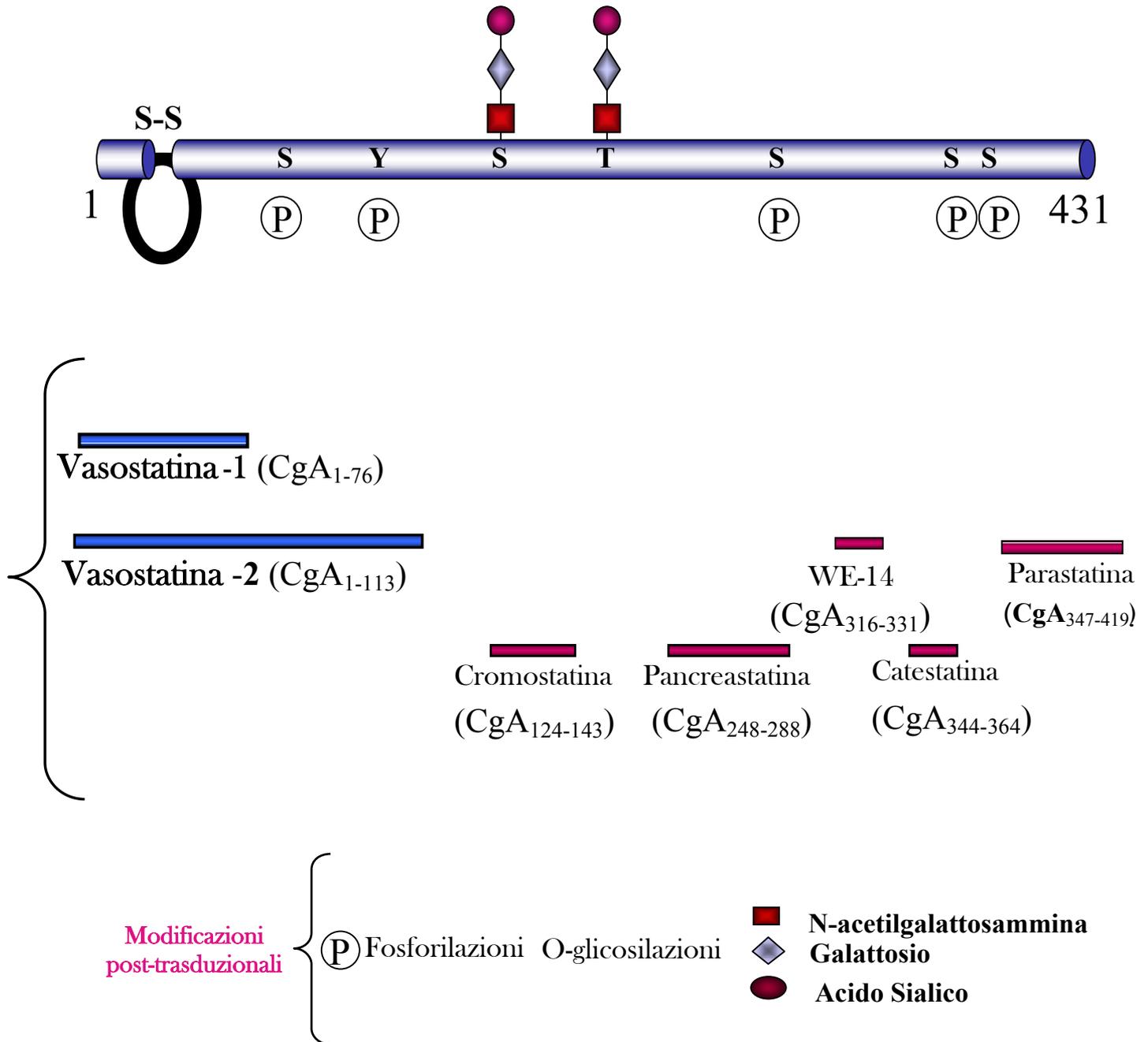


Fig. 1. Rappresentazione schematica della sequenza della CgA bovina e dei peptidi naturali e sintetici da essa derivati (modificata da Metz-Boutigue et al., 1993).

2. Le Vasostatine

La conservazione del dominio N-terminale della CgA nel corso dell'evoluzione suggerisce l'importanza biologica dei frammenti CgA-derivati in cui tale regione è presente, come ad esempio le “vasostatine” (VSs) il cui nome riflette l'effetto inibitorio indotto sulla costrizione di vasi sanguigni isolati in diverse specie di mammiferi compreso l'uomo (Aardal e Helle 1992; Aardal et al., 1993).

Le diverse forme di VSs comprendono: la Vasostatina-1 (CgA₁₋₇₆, VS-1), che corrisponde al più alto dominio di CgA conservato tra i vertebrati, la Vasostatina-2 (CgA₁₋₁₁₃, VS-2) derivante dalla scissione del legame petidico al secondo sito di-basico, e peptidi come la CgA₁₋₄₀, la CgA₄₇₋₆₆ (cromofungina) e la CgA₆₇₋₇₆ (Metz-Boutigue et al., 2000), generati fisiologicamente in diversi tessuti endocrini.

Alla VS-1 sono state attribuite numerose funzioni. In aggiunta, infatti, alla ben nota funzione autocrina, come evidenziato per esempio nelle cellule paratiroidi bovine (Russel et al., 1994; Angeletti et al., 1996, 1997), sono stati suggeriti anche effetti paracrini ed endocrini, in particolare nei vasi sanguigni in intimo contatto con i siti di rilascio delle terminazioni sinaptiche (Liang et al., 1996) ed in quelli principalmente esposti ai pro-ormoni ematici (O'Connor e Bernstein 1984; Cryer et al., 1991). La sua

presenza nei fluidi infiammatori e nelle secrezioni delle cellule immunitarie, come i neutrofili polimorfonucleati (PMN) (Corti et al., 1997), ha suggerito il ruolo importante che questo frammento gioca nell'immunità innata. 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).

Le VSs regolano anche l'adesione cellulare (Gasparri et al., 1997; Ratti et al., 2000), azione favorita dalla presenza nella struttura primaria di motivi leganti le integrine e molecole adesive come la fibronectina, la vitronectina e il collagene (Roulahti e Pierschbeker 1986). A livello dei residui 43-45 della VS-1 è presente, infatti, la sequenza tripeptidica RGD (Arg-Gly-Asp) (Di Felice et al., 2006), spesso presente nelle proteine della matrice extracellulare quale sito di riconoscimento di molte integrine con il loro ligando. Tali proprietà pro-adesive sono risultate importanti per il rimodellamento e la riparazione del miocardio (Corti et al., 2000).

Le VSs sono state proposte quali ottimi candidati come peptidi regolatori del sistema vascolare. Studi effettuati da Helle e collaboratori (Helle e Angeletti 1994; Helle et al., 2001) hanno suggerito che le VSs possono agire come importanti regolatori omeostatici del tono vascolare e del flusso sanguigno, in grado di contrastare le influenze adrenergiche

esercitate sul sistema cardio-vascolare, particolarmente in condizioni di stress (Helle e Angeletti 1994). E' ben noto che il cuore è un importante bersaglio sia dell'attività nervosa simpatica che delle catecolamine circolanti su cui in condizioni di stress convergono, amplificati, altri stimoli eccitatori (per es. angiotensina). La scoperta, inoltre, che elevati livelli di CgA, in pazienti affetti da insufficienza cardiaca, sono un indice di mortalità e gravità della malattia sottolinea l'importanza delle VSs nell'omeostasi cardio-circolatoria (Ceconi et al., 2002).

Negli ultimi anni, in assenza di dati circa le azioni delle VSs sul cuore, il gruppo di ricerca del laboratorio di Fisiologia d'Organo, del Dipartimento di Biologia Cellulare (UNICAL), ha studiato gli effetti delle VSs sulla performance cardiaca *"in vitro"* in tre gruppi di vertebrati: pesci, anfibi e mammiferi (Imbrogno et al., 2004; Corti et al., 2004; Tota et al., 2004; Cerra et al., 2005; Mazza et al., 2006). Tali ricerche hanno dimostrato che il cuore è un importante bersaglio per le VSs, suggerendo il ruolo di possibili modulatori cardio-inibitori, capaci di proteggere il cuore da intense stimolazioni come nella risposta da stress (Tota et al., 2004). Tali peptidi esercitano, infatti, in condizioni basali effetti inotropi negativi e antagonizzano l'incremento della contrattilità indotto dalla stimolazione

adrenergica, sicché sono state definite anche come cardiostatine (Corti et al., 2002; Imbrogno et al., 2004; Tota et al., 2004; Mazza et al., 2006).

Tali studi hanno inoltre evidenziato aspetti di uniformità e di diversità, in relazione alle diverse specie di vertebrati considerate, nel meccanismo d'azione delle VSs. Infatti, sia nel cuore isolato e perfuso di *Anguilla anguilla* che di *Rana esculenta* l'effetto inotropo negativo indotto dalle VSs coinvolge i canali al Ca^{2+} e al K^{+} (Corti et al., 2002; Imbrogno et al., 2004). Tuttavia, a differenza di quanto osservato nella rana, nel teleosteo *Anguilla anguilla* l'inotropismo negativo indotto dalle VSs coinvolge le proteine Gi/o, la cascata di trasduzione NO-cGMP-PKG, il sistema adrenergico e colinergico, e l'Endotelio Endocardico (Imbrogno et al., 2004).

Sebbene siti di legame specifici di membrana sono stati osservati per la CgA_{1-40} nelle cellule paratiroidi bovine (Russell et al. 1994) e nelle cellule muscolari lisce di aorta bovina (Angeletti et al. 1994), attualmente non esistono dati che evidenziano l'esistenza di recettori specifici per le VSs (Helle et al., 2001).

E' riportato che le VSs potrebbero attivare pathways di trasduzione dei segnali inter- e /o intracellulari attraverso la perturbazione della membrana cellulare a seguito dell'interazione della porzione lipofila del

peptide con domini presenti sul bilayer lipidico. Tale meccanismo è stato ipotizzato per spiegare l'attività antifungina e antibatterica propria della VS-1 e dei frammenti da essa derivati come la cromofungina CGA₄₇₋₆₆ (Lugardon et al., 2001) e il peptide CgA₁₋₄₀ (Maget-Dana et al., 2002). Recentemente, è stato dimostrato che la VS-1 è in grado di interagire con fosfolipidi di membrana, in modo particolare con la fosfatidilserina, suggerendo che le VSs potrebbero attivare vie di trasduzione del segnale intracellulari con modalità indipendenti dal recettore (Bloise et al., 2006).

Le nostre ricerche sono attualmente indirizzate ad esplorare se tale azione cardiotropica coinvolge meccanismi mediati da recettori o interazioni con proteine inter- e /o intracellulari. Considerando il fatto che diverse proteine regolatorie sono inserite ed in molti casi fisicamente legati al network citoscheletrico, siamo andati ad indagare il ruolo del citoscheletro nella modulazione della performance cardiaca indotta dai frammenti CGA-derivati, nel cuore isolato e perfuso di *Anguilla anguilla* e *Rana esculenta*.

Prima di entrare nel merito dei risultati sarà fornita una sintetica rassegna dell'organizzazione strutturale citoscheletrica di una tipica cellula eucariota con particolare riferimento al citoscheletro actinico.

3. Il citoscheletro

Il citoscheletro è una complessa trama fibrillare diffusa in tutto il citoplasma, costituita da tre componenti di natura proteica: i microtubuli, i filamenti intermedi ed i microfilamenti che si distinguono anzitutto per il loro spessore; i microtubuli hanno un diametro di circa 25 nm, i filamenti intermedi di circa 7 nm ed i microfilamenti di circa 10 nm (Bershadsky e Vasiliev 1988) (Fig. 2).

Il citoscheletro svolge molteplici funzioni che si estendono a gran parte della vita cellulare: a partire dalla primaria *funzione strutturale*, di costituire cioè all'interno della cellula un'impalcatura (più o meno flessibile) dalla quale dipendono in ogni momento la forma stessa della cellula e la disposizione degli organuli al suo interno, fino alla guida ed al controllo di ogni *funzione motoria* che la cellula sia in grado di mettere in atto (Watson 1991).

La duplicità funzionale (statica e dinamica) del citoscheletro trova riscontro nelle diverse caratteristiche dei filamenti che lo costituiscono. Le funzioni di sostegno sono prevalentemente affidate ai filamenti intermedi, mentre le funzioni dinamiche si avvalgono principalmente dei microfilamenti e dei microtubuli, anche se tutti e tre i tipi di filamenti

possono partecipare all'una o all'altra funzione (Wang et al., 1993; Maniatis et al., 1997).

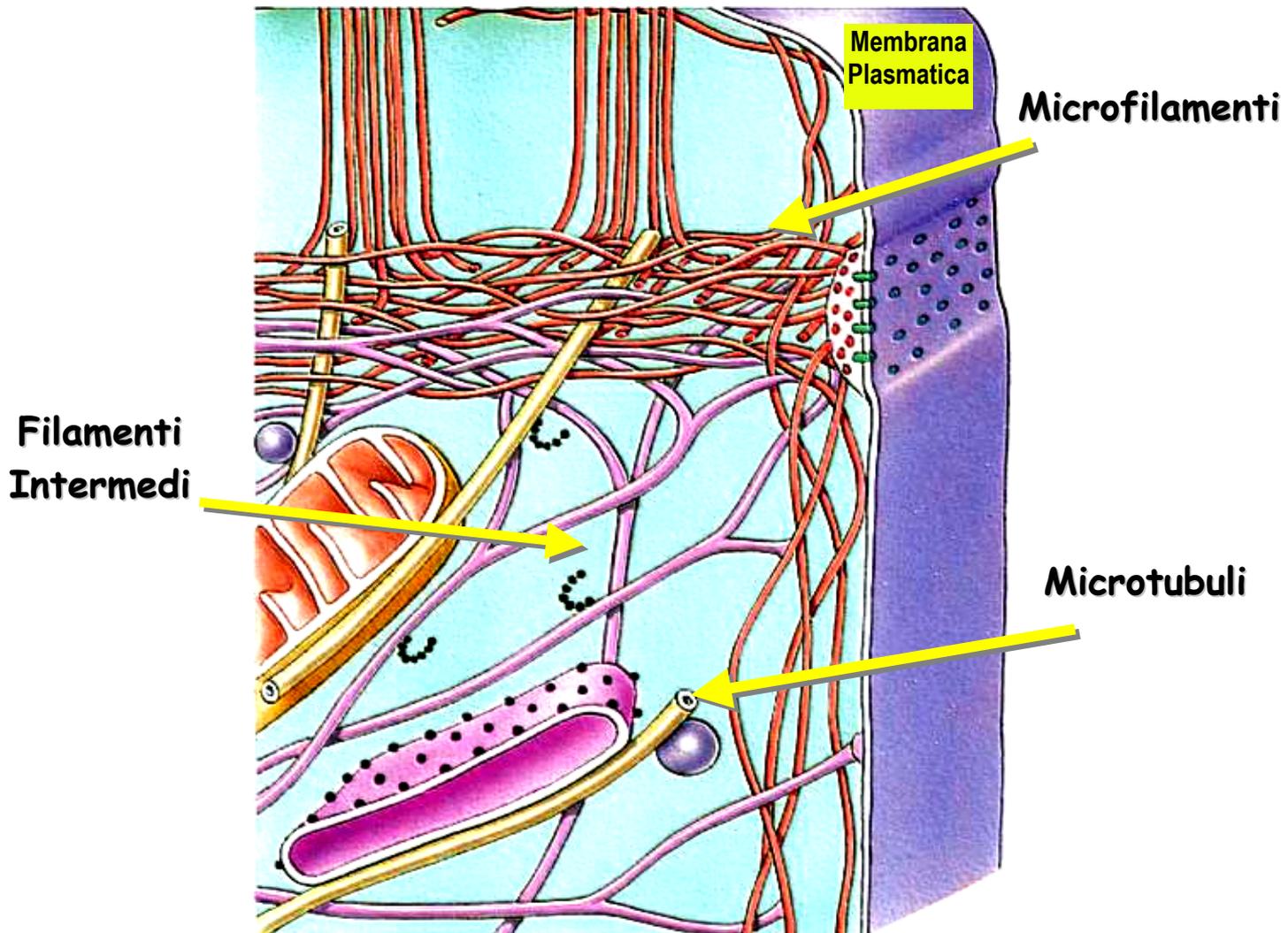


Fig. 2. Rappresentazione schematica della complessa rete tridimensionale citoscheletrica comprendente strutture filamentose di natura proteica quali microtubuli, filamenti intermedi e microfilamenti.

3.1 I microtubuli

I microtubuli sono strutture tubulari cave, di natura polimerica, la cui parete è formata dalla giustapposizione, a gradini successivi, di due monomeri proteici: l' α - e β -tubulina, accoppiati a formare un eterodimero detto *tubulina*. L'ordinata sequenza di una α -tubulina e di una β -tubulina, in senso longitudinale, permette di riconoscere, nella parete di un microtubulo, 13 protofilamenti lineari (Goldstein e Entman 1979; Rappaport e Samuel 1988) (Fig. 3). L'aggiunta di ciascun monomero è potenziata dall'idrolisi del GTP; sia la α - che la β -tubulina legano il GTP ma è la forma legata alla β -tubulina che viene idrolizzata (Rasenik et al., 1990). Oltre al GTP la tubulina lega anche proteine a cui è stato dato il nome di MAPs (microtubule-associated proteins), che regolano *in vivo* la polimerizzazione dei microtubuli (Olmsted 1986; Sato et al., 1997) e mediano le interazioni di questi con altre strutture cellulari (filamenti, organelli e membrane) (Cunningham et al., 1997). Del gran numero di MAPs che sono state isolate, alcune sono distribuite nella maggior parte delle cellule, altre, invece, vengono solo espresse in tipi cellulari specifici, un esempio è la MAP4 che predomina a livello del muscolo cardiaco (Olmsted 1986; Sato et al., 1997). Una classe di MAPs di particolare interesse funzionale è costituita dai cosiddetti “motori microtubulari” ai

quali appartengono la Chinesina, la Dineina citoplasmatica e la Dinamina (Liao e Gundersen 1988). La Chinesina è in grado di usare l'energia dell'ATP per spostarsi verso l'estremità "+" del microtubulo (trascinando con se gli organelli ad essa ancorati), la Dineina citoplasmatica svolge la stessa funzione ma in direzione opposta, mentre la Dinamina induce lo scivolamento attivo di un microtubulo sull'altro (Bananis et al., 2000). Il significato funzionale dei microtubuli non è ancora del tutto noto, molte osservazioni fanno ritenere che essi, oltre a costituire un apparato citoscheletrico per il mantenimento della forma cellulare, rappresentano un sistema microcircolatorio per il trasporto di molecole intracellulari. I microtubuli, infatti, raggruppandosi in modo da formare dei binari immersi nella matrice citoplasmatica, costituiscono delle strutture transitorie capaci di dirigere e di orientare gli spostamenti endocellulari di particelle o molecole (Rogers e Gelfand 2000).

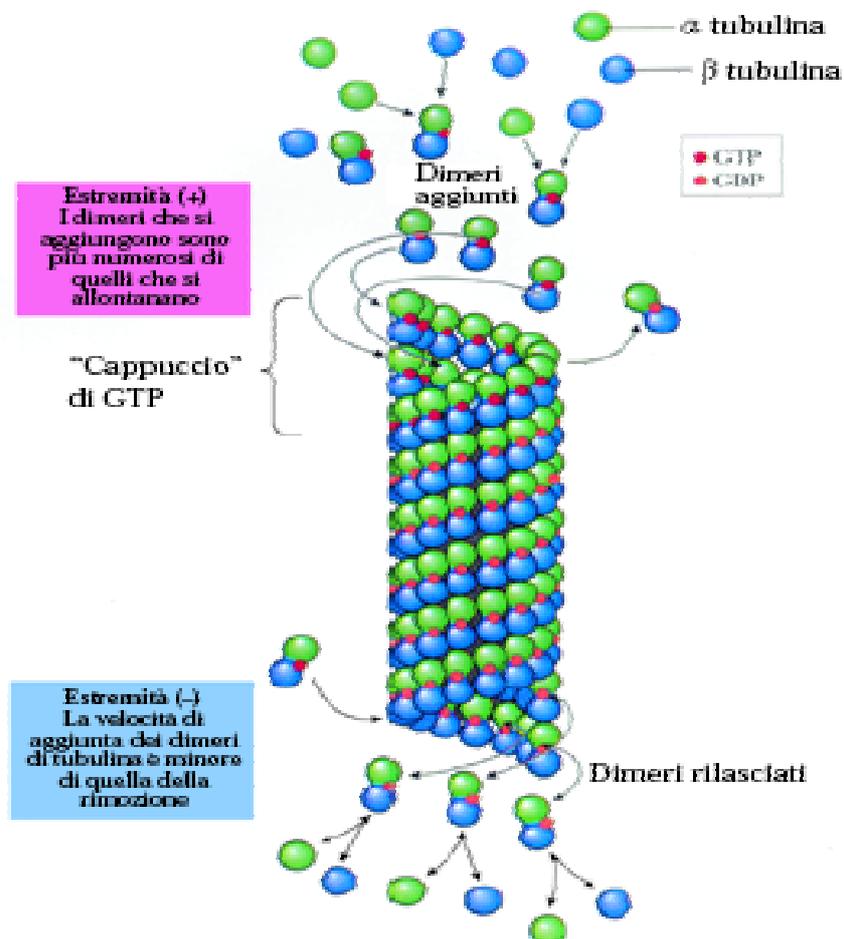


Fig. 3. Ogni protofilamento è costituito da due diverse varianti di tubulina: la tubulina α e β polimerizzate in successione lineare. I protofilamenti sono affiancati in modo leggermente sfalsato, per cui non sono disposti in registro.

3.2 I filamenti intermedi

I filamenti intermedi formano nella maggior parte delle cellule una trama reticolare che si presenta più fitta attorno al nucleo e da qui si estende alla periferia del citoplasma. La trama dei filamenti intermedi è particolarmente sviluppata nelle cellule destinate a mantenere stabile o a modificare solo lentamente la propria forma, ed è praticamente assente nelle prime fasi dello sviluppo embrionale (Traub 1995).

A differenza dei microtubuli e dei microfilamenti, che sono costituiti dall'unione di proteine globulari rapidamente polimerizzate e depolimerizzate nella cellula, i filamenti intermedi sono costituiti dall'aggregazione di monomeri filamentosi che mette capo a strutture filamentose più stabili.

I filamenti intermedi sono molto diversificati per composizione e caratteri, e sono presenti nelle cellule dei diversi tessuti in una quantità che varia a seconda delle esigenze meccaniche. Nel folto gruppo di proteine che possono costituire i filamenti intermedi figurano le *cheratine* delle cellule epiteliali, la *vimentina* dei fibroblasti, delle cellule endoteliali e dei leucociti, la *desmina* delle cellule muscolari, nonché le *proteine dei neurofilamenti* che strutturano gli assoni ed i prolungamenti delle cellule nervose (Capetanaki 2002; Benes et al., 2006; Xiao et al., 2006).

Nonostante le profonde diversità nelle loro strutture primarie, le proteine costitutive dei filamenti intermedi vengono edificate secondo un'ordine che è pressoché uguale in tutte le cellule. Al livello più elementare i monomeri proteici si organizzano a coppie parallele formando dei dimeri “*coiled coil*” composti da due α -eliche avvolte tra loro a spirale (Fuchs e Cleveland 1988). Le subunità lineari che ne risultano si associano poi tra loro, con una disposizione testa-coda, formando lunghissime file destinate a raggrupparsi a coppie antiparallele dette *protofilamenti*. Dall'associazione di queste coppie a due a due si formano le *protofibrille*, mentre l'aggregazione di quattro protofibrille produce il definitivo *filamento intermedio* (Goldman et al., 1996) (Fig. 4).

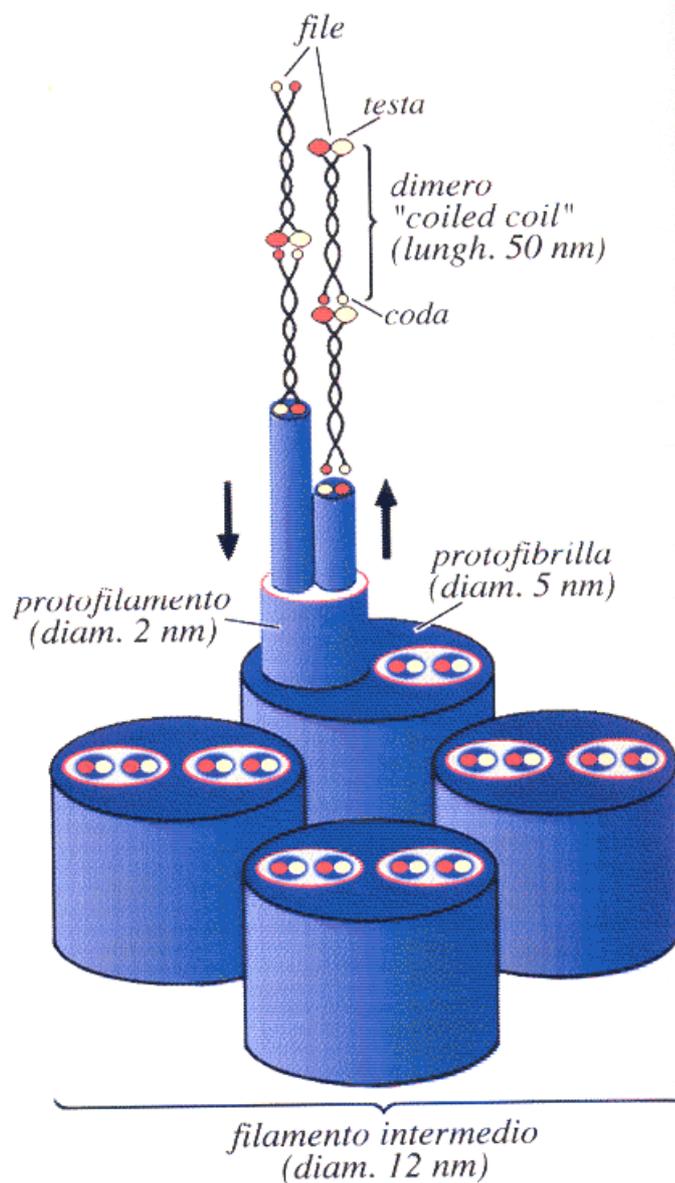


Fig. 4 . Modello strutturale di un filamento intermedio.

3.3 I microfilamenti

I microfilamenti sono polimeri di actina, la proteina più diffusa nelle cellule eucariotiche. La struttura molecolare dell'actina, in forma di monomero (G-actina), è foggata “a pera” con una porzione basale più espansa detta “barbed”, cioè dentata, ed una porzione apicale più ristretta detta “pointed”, cioè appuntita. I monomeri actinici liberi tendono a congiungersi tra loro secondo un andamento elicoidale fino a formare polimeri filamentosi di grande lunghezza (F-actina) (Narita et al., 2006). Ogni microfilamento è costituito dall'avvolgimento a spirale di due filamenti di F-actina e la dissimmetria strutturale dei monomeri fa sì che anche un intero microfilamento actinico sia strutturalmente “polarizzato”, con un'estremità “barbed” (+) ed un'estremità “pointed” (-). L'accrescimento (o assemblaggio) di un microfilamento actinico avviene per addizione di monomeri alla sua estremità “+”, detta infatti di accrescimento, e richiede il legame dei monomeri con l'ATP. Le estremità “barbed” sono particolarmente reattive non solo per sostenere l'accrescimento del microfilamento stesso, ma anche per stabilire attacchi dei microfilamenti tra di loro o per ancorarli alle membrane cellulari (plasmatica o degli organuli) sulle quali i microfilamenti possono operare in vario modo (Fig. 5A). La depolarizzazione della F-actina avviene invece per distacco dei monomeri

all'estremità "-", probabilmente quando i monomeri si aprono e si liberano dell'ADP legato nel "sito" nucleosidico (Bershadsky e Vasiliev 1988; Schliwa 1987).

Quando si modifica l'equilibrio tra i due processi contrapposti di polimerizzazione e di depolimerizzazione dei monomeri di actina ai loro estremi, i microfilamenti subiscono variazioni di lunghezza anche molto rapide, generando nell'edificio cellulare deformazioni e spostamenti delle strutture cui esse sono ancorati. Tali moti per sola variazione di lunghezza dei microfilamenti sono presenti soprattutto nella corteccia del citoscheletro; i microfilamenti, infatti, sono diffusi in tutto il citoplasma, ma si trovano più addensati alla periferia delle cellule, dove, al di sotto della membrana plasmatica contribuiscono a formare lo strato corticale. A questo livello i filamenti actinici sono ancorati in particolari regioni della membrana plasmatica indicati col nome di *contatti focali* (Wang et al., 1993; Maniotis et al., 1997).

Tramite l'intervento di un gruppo di proteine appartenenti alla famiglia delle integrine viene stabilita una connessione meccanica con le strutture contigue nello spazio extracellulare (Ingber 1991; Maniotis et al., 1997). Le integrine, recettori eterodimerici composti da due subunità glicoproteiche, α e β , possiedono, infatti, un ampio dominio

extracitoplasmatico, una regione transmembrana ed una corta porzione intracitoplasmatica che interagisce con i filamenti di actina. Tuttavia, il collegamento fra microfilamenti ed il dominio citoplasmatico delle integrine è solitamente indiretto, essendo mediato da particolari proteine di attacco multiplo come talina, vinculina e α -actinina (Borg et al., 2000) (Fig. 5B). L'analisi di integrine ricombinanti ha evidenziato che entrambe le subunità α e β sono importanti nel determinare la specificità di legame con le molecole della matrice extracellulare, mentre solo la porzione intracellulare della subunità β interagisce con elementi del citoscheletro (Solowska 1989).

Nella forma di microfilamenti, quindi, l'actina si lega ed interagisce con una grande varietà di proteine, dette genericamente “actin binding proteins” (ABP), che le conferiscono la capacità di svolgere funzioni diversificate (Borg et al., 2000; Samuel et al., 2000).

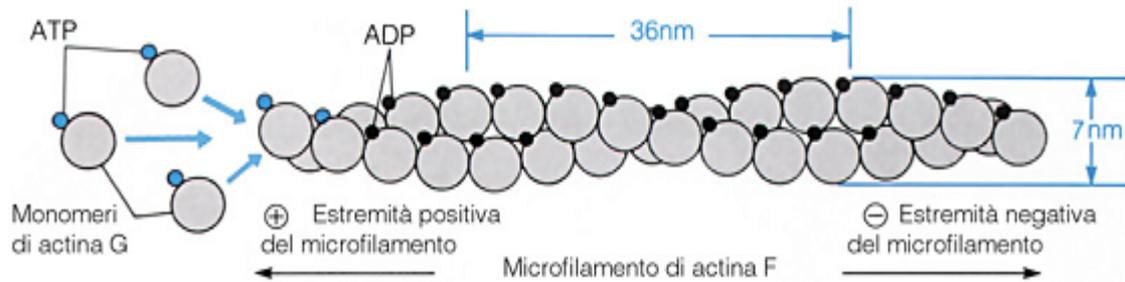
Nell'assemblaggio del citoscheletro actinico svolgono anche un ruolo di primaria importanza alcune proteine dotate di attività “GTP-asi”, le GTP-asi Rac e Rho. Uno dei meccanismi con cui questi enzimi espletano questa funzione consiste nell'attivazione dell'enzima fosfatidil-inositolo 4-fosfato 5-chinasi che porta alla formazione di fosfatidil-inositolo 4,5 difosfato (PIP₂), il quale promuove la polimerizzazione dei filamenti di

actina e quindi l'organizzazione del citoscheletro (Gilmore e Burridge 1996).

La dinamica del reticolo corticale di actina è regolata da segnali che provengono dall'ambiente esterno alla cellula ed agiscono su recettori specifici della membrana plasmatica, con la conseguente produzione, tramite il gioco delle proteine G, di secondi messaggeri intracellulari. In questo senso la regolazione della componente actinica del citoscheletro fa parte integrante dei sistemi di *trasduzione del segnale* operanti nella membrana plasmatica (Zigmond 1996).

La caratteristica distribuzione intracellulare dei microfilamenti ha fatto prospettare l'ipotesi che essi formino un sistema contrattile ubiquitario responsabile di molte attività cellulari.

A



B

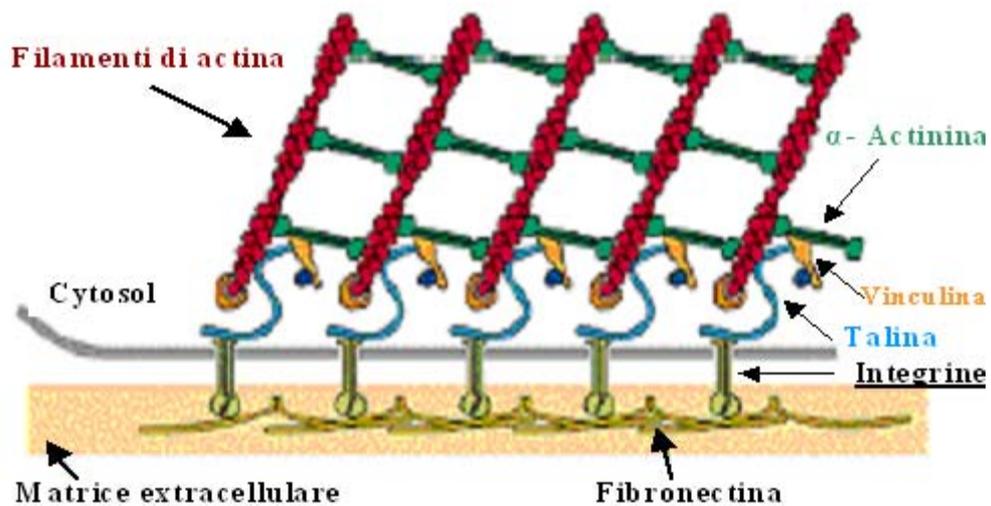


Fig. 5. (A) Processo di polimerizzazione dell'actina in cui l'assemblaggio dei monomeri di actina procede all'estremità (+) del microfilamento e richiede il legame con l'ATP. **(B)** Interazione, a livello della corteccia citoscheletrica, fra microfilamenti ed il dominio citoplasmatico delle integrine, mediata da proteine intermedie quali talina, vinculina e α -actinina (Borg et al., 2000).

3.4 Proteine motrici

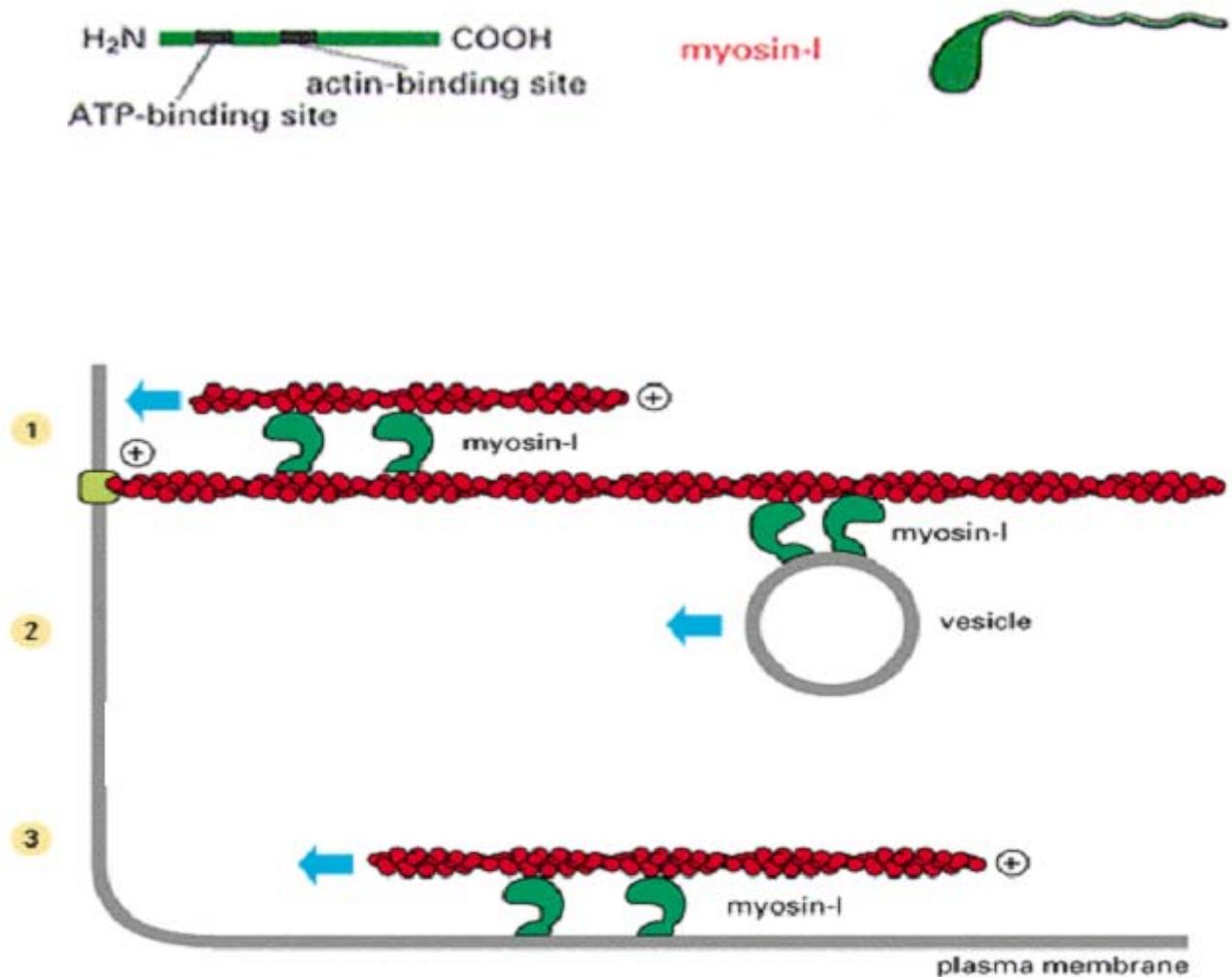
Appartenenti al citoscheletro possono essere considerate anche quelle proteine che svolgendo una funzione basilare negli apparati motori delle cellule, sono spesso indicate come “proteine motrici”. Stretta è infatti la connessione funzionale degli apparati motori delle cellule con le formazioni citoscheletriche, in quanto strettamente correlate all'interno della cellula sono le funzioni statiche e le funzioni dinamiche (Brown 1999). Alla classe delle proteine motrici appartengono le miosine, le dineine e le kinesine, il cui ruolo, anche se diversificato, è fondamentalmente legato alla loro capacità di trarre dall'idrolisi enzimatica dell'ATP (o del GTP), energia convertibile in effetto meccanico (Lillie e Brown 1992; Brown 1999).

I filamenti di actina sono atti a fungere da “rotaia” per le molecole di miosina, il cui moto è diretto verso l'estremità “barbed” del microfilamento. Esistono differenti tipi di miosine (Berg et al., 2001), quella principalmente coinvolta negli spostamenti endocellulari è la miosina di tipo I strutturalmente caratterizzata da una corta “coda” flessibile, che permette l'attacco alle strutture cellulari che devono essere mosse, e da una singola “testa” globulare deputata al legame con i filamenti di actina (Pollard et al., 1991). La testa della miosina ha un'attività ATP-asi in grado di scindere l'ATP e conseguentemente di modificare l'estensione del fascio acto-

miosinico nel suo insieme. Quando due filamenti di actina con polarità opposta si trovano ad interagire con le molecole di miosina, le teste di quest'ultime sono in grado di "slittare" sull'actina in conseguenza delle modificazioni indotte dall'idrolisi di ATP (Titus 2006) (Fig. 6).

L'ATP viene idrolizzato da una ATPasi "chinasi" che a sua volta viene attivata dalla Calmodulina (CaM), proteina citosolica di 149 aminoacidi, presente in grande quantità all'interno della cellula. La calmodulina presenta quattro siti di legame per il calcio con il quale forma il complesso Ca^{2+}/CaM , un importante regolatore intracellulare (Desrivieres et al., 2002). Quando gli ioni calcio si legano alla calmodulina, questa subisce un cambiamento conformazionale che la rende capace di legarsi ad altre proteine attivandole (Fig. 7).

Oltre ad essere coinvolta nella regolazione delle associazioni actina-miosina, la calmodulina interviene anche nel regolare le associazioni actina-actina e fra i filamenti di actina e la membrana plasmatica (Clare et al., 1993; James et al., 1995).



From The Art of MBoC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.

Fig. 6. Rappresentazione schematica della struttura e del modo di operare della miosina I. La breve coda della molecola di miosina costituisce un dominio capace di legare o filamenti di actina o membrane. Ciò permette al dominio della testa di muovere un filamento di actina rispetto ad un altro. Si noti che il dominio della testa “cammina” verso l’estremità “+” del filamento di actina al quale è associato.

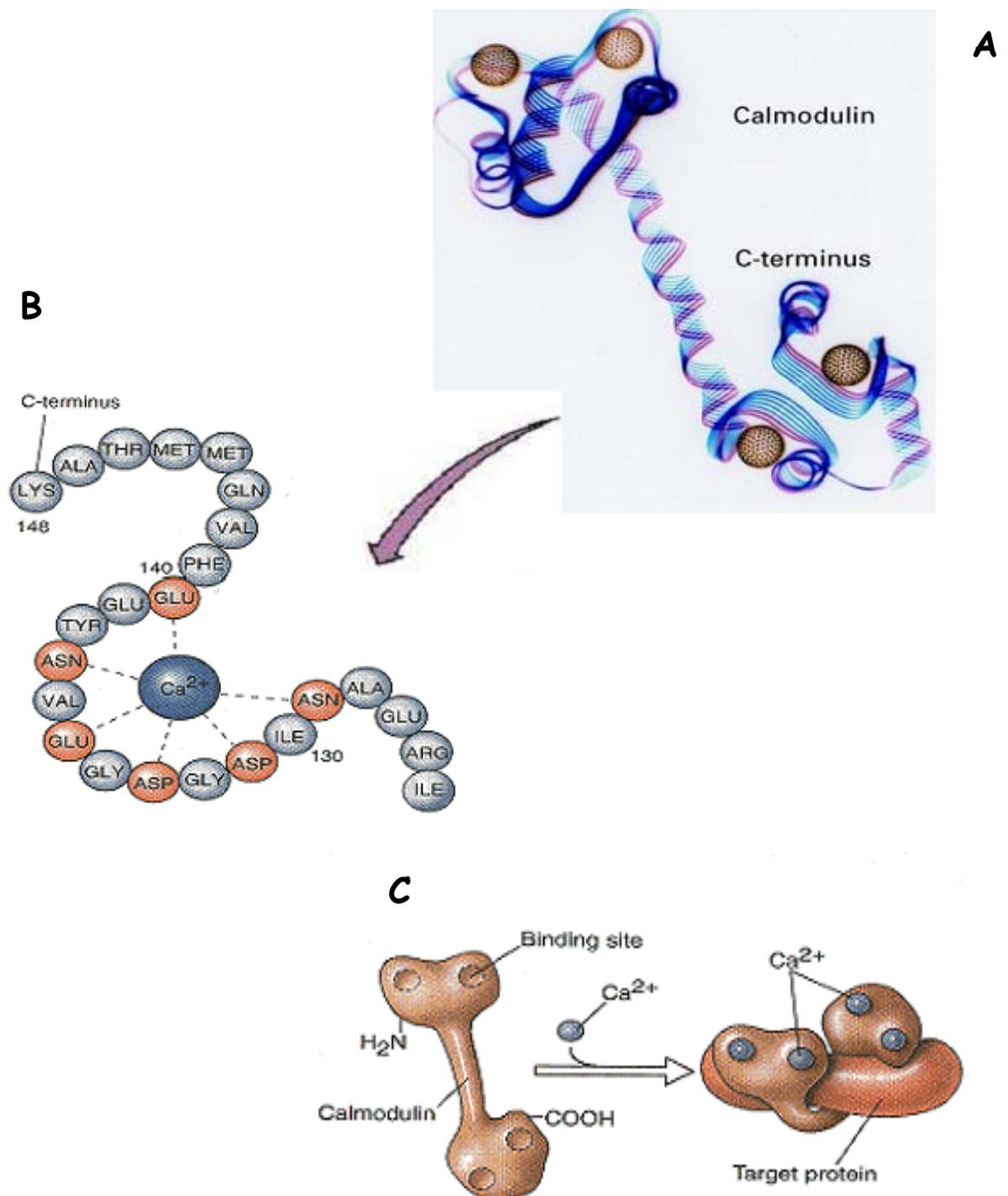


Fig. 7. (A) Sequenza aminoacidica del sito di legame per il calcio situato all'estremità C-terminale della calmodulina. (B) Modello di una molecola di calmodulina a cui sono legati quattro ioni calcio. (C) Rappresentazione schematica della variazione conformazionale indotta dal legame del calcio alla calmodulina. Quando tutti e quattro i siti di legame per il calcio sono occupati, la calmodulina subisce un cambiamento della struttura terziaria.

Materiali e Metodi

1. Animali

Sono stati utilizzati esemplari di *Anguilla anguilla*, del peso medio di 83.5 ± 3.3 g (media \pm ES) e di *Rana Esculenta*, del peso medio di 17.472 ± 0.622 g (media \pm ES).

Entrambe le specie sono state fornite da un vivaio locale e mantenute a digiuno in vasche contenenti acqua dolce circolante continuamente areata e filtrata, a temperatura ambiente (18-20°C). Gli animali sono stati sacrificati entro sette giorni dall'arrivo in laboratorio.

2. Procedura di isolamento

Anguilla anguilla

Prima di procedere alla dissezione, le anguille sono state anestetizzate per circa 15 minuti in acqua e benzocaina disciolta ad una concentrazione di circa 0.2 g/l.

L'isolamento è stato effettuato mediante uno stereo-microscopio ed il preparato è stato mantenuto costantemente idratato con soluzione fisiologica.

Dopo aver aperto ventralmente l'animale lungo la linea longitudinale mediana, all'altezza delle pinne pettorali, sono stati asportati la muscolatura ventrale, il pericardio e i legamenti che uniscono quest'ultimo al cuore.

Sono stati, quindi, effettuati due tagli, il primo in corrispondenza dell'aorta, ad una distanza di circa 2 mm dalla sua origine dal bulbo, ed il secondo a livello del seno venoso, dopo i quali è stata possibile la completa rimozione del cuore.

Successivamente il cuore è stato posto in una capsula di Petri contenente la soluzione fisiologica ed in cui erano temporaneamente fissate due cannule tali da poter essere inserite l'una nel seno venoso (cannula d'input), l'altra nell'aorta (cannula d'output).

Al termine della procedura di isolamento, che ha richiesto circa 15 minuti, il cuore è stato collegato all'apparato di perfusione.

Rana Esculenta

Le rane sono state decapitate, despinalizzate e fissate su una apposita base da dissezione su ghiaccio; l'isolamento è stato effettuato con l'aiuto di uno stereomicroscopio. L'animale è stato aperto ventralmente praticando una incisione a T sulla cute e tagliando i muscoli sottostanti e lo sterno in modo da scoprire completamente il cuore avvolto dal pericardio; dopo aver liberato il cuore da quest'ultimo si è passati a legare ed incannulare i vasi. Dapprima è stato legato l'arco aortico destro per poi tagliarlo a monte del nodo; spostando lateralmente il cuore sono state messe in evidenza le

precave destra e sinistra che sono state legate e tagliate; anche la vena polmonare è stata legata e tagliata prima della biforcazione. A questo punto è stato possibile incannulare il tronco aortico sinistro e il seno venoso mediante l'utilizzo di cannule di polietilene. Il cuore così isolato è stato collegato all'apparato di perfusione.

3. Apparato di perfusione

L'apparato di perfusione del cuore di rana e del cuore dei pesci, schematizzati in Fig. 8, è costituito da una pompa peristaltica, da una camera di perfusione nella quale viene alloggiato il cuore, e da due serbatoi, uno d'ingresso e uno d'uscita.

La camera di perfusione è rappresentata da un contenitore di plexiglass di sezione rettangolare che presenta tre vie di comunicazione con l'esterno: una via d'ingresso collegata alla cannula inserita nel seno venoso, una via d'uscita collegata alla cannula inserita nel bulbo, ed una terza via che permette di misurare la pressione interna della camera. Il ringer, o soluzione di perfusione, all'interno della camera ricopre interamente il cuore per evitarne la disidratazione.

Il ringer contenuto in un serbatoio esterno, da cui è prelevato per mezzo della pompa peristaltica, attraverso il serbatoio di ingresso raggiunge la cannula inserita nel seno venoso; il perfusato, pompato dal cuore, si raccoglie nel serbatoio d'uscita.

Le differenze di altezza tra il livello del liquido di perfusione nei serbatoi d'ingresso e di uscita e quello nella camera costituiscono rispettivamente le pressioni di ingresso e di uscita dalle quali dipendono il

precarico ed il postcarico, che rappresentano i due principali parametri che influenzano la performance cardiaca *in vitro*.

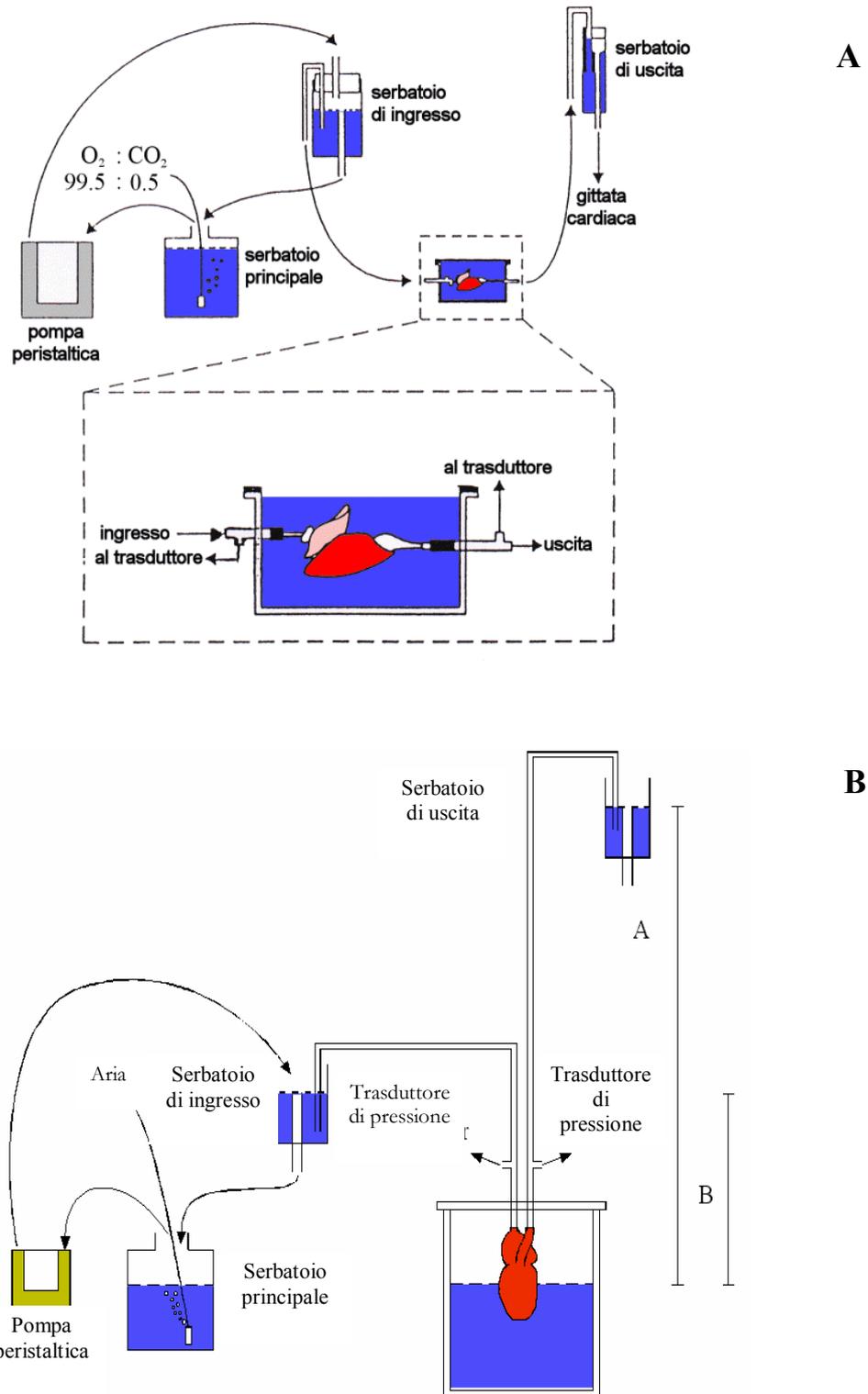


Fig. 8. Schema dell'apparato di perfusione del cuore di anguilla (A) e di rana (B).

4. Soluzione fisiologica

La soluzione fisiologica di perfusione in *Rana Esculenta* è stata preparata secondo la seguente composizione: NaCl (6.6 g/l), KCl (0.186 g/l), CaCl₂ (0.11 g/l), Na₂HPO₄ (0.475 g/l), NaH₂PO₄ (0.1 g/l), Glucosio (1.009 g/l); tale soluzione è stata continuamente areata tramite una pompa ad aria ed il pH mantenuto al valore di 7.2. In *Anguilla anguilla*, la composizione della soluzione fisiologica è stata: NaCl (6.68 g/l), KCl (0.15 g/l), KH₂PO₄ (0.05 g/l), MgSO₄ (0.35 g/l), (NH₄)₂SO₄ (0.05 g/l), Na₂HPO₄ (0.227 g/l), Glucosio (1 g/l), CaCl₂ (0.14 g/l) (Imbrogno et al., 2001). Il ringer è stato gassificato con una miscela costituita da O₂ e CO₂ in percentuale del 95.5: 0.5 % e stabilizzato ad un valore di pH compreso tra 7.7 e 7.9 con circa 1g/l di NaHCO₃.

5. Misura e calcolo dei parametri cardiaci

Il precarico e il postcarico, definiti rispettivamente come valori medi delle pressioni d'ingresso e d'uscita, sono stati registrati per mezzo di due trasduttori di pressione MP-20D (Micron Instruments, Simi Valley, CA, USA), collegati con rispettivi apparecchi di registrazione Unirecord 7050 (Ugo Basile, Comerio, Italia). I trasduttori sono stati connessi a bracci laterali delle cannule d'ingresso e d'uscita. I valori delle pressioni così

misurati sono stati corretti con un fattore che tiene conto della resistenza delle cannule ed espresse in kPa.

La *frequenza cardiaca* (HR) è stata ricavata dai tracciati di pressione ed espressa in battiti al minuto (batt/min). La *gittata cardiaca* (CO) è stata determinata mediante misurazione del volume del perfusato raccolto in un minuto nel serbatoio di uscita; i valori sono stati poi corretti tenendo conto della densità del ringer ed espressi come misure di volume (ml/min/Kg). La *pressione massima* (Pmax) è stata ricavata dai tracciati di pressione, misurando la distanza in mm che intercorre tra lo zero e il picco massimo e moltiplicando il valore ottenuto per il valore di conversione dello strumento. La *pressione minima* (Pmin) è stata ricavata dai tracciati di pressione, misurando la distanza in mm che intercorre tra lo zero e il picco minimo e moltiplicando il valore ottenuto per il valore di conversione dello strumento. La *pressione media* (Pmedia) è stata ottenuta dai seguenti calcoli: $\frac{2}{3}$ pressione minima + $\frac{1}{3}$ pressione massima. Il *volume sistolico* espresso in ml/Kg (Stroke Volume = CO/HR) è stato usato come indice della performance ventricolare; cambiamenti nello SV sono stati considerati effetti inotropi. Il *lavoro ventricolare* [Stroke Work = (postcarico-precarico) x SV/Peso ventricolare] è stato utilizzato come indice di funzionalità sistolica.

6. Condizioni basali di perfusione

La perfusione è stata avviata, in condizioni basali, per un periodo di circa 15-20 minuti, necessari per permettere la stabilizzazione della performance cardiaca. I cuori che non si sono stabilizzati entro 15-20 minuti dall'inizio della perfusione sono stati scartati. I cuori isolati sono stati stabilizzati alle seguenti condizioni basali:

- in *Rana Esculenta* la pressione d'ingresso è stata regolata in modo da ottenere un valore di gittata cardiaca pari a 110 ml/min/Kg comparabile a quello *in vivo* in condizioni fisiologiche di riposo; la pressione di uscita è stata mantenuta al valore fisso di 3.92 kPa, corrispondente ad un'altezza del serbatoio pari a 40 cm di H₂O rispetto al livello del liquido nella camera di perfusione;
- in *Anguilla anguilla* è stato scelto un precarico tale da indurre una gittata cardiaca di 10-12 ml/min/kg di peso corporeo (Davie et al., 1992), un postcarico diastolico pari a 3 kPa, corrispondente ad un'altezza del serbatoio pari a 30 cm di H₂O rispetto al livello del liquido nella camera di perfusione.

I parametri cardiaci sono stati registrati per tutto il periodo della perfusione e il flusso è stato misurato ad intervalli di cinque minuti.

L'elettrostimolazione dei cuori è stata utilizzata al fine di poter distinguere l'azione cronotropa (variazione del battito cardiaco) ed inotropica (variazione della forza contrattile sistolica) di diverse sostanze a differenti condizioni sperimentali. L'elettrostimolazione è stata effettuata tramite un elettrostimolatore LE 12006.

7. Composti chimici

Vasostatina-1 (VS-1), Cromogranina-A₇₋₅₇ (CgA₇₋₅₇), 2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM), Wortmannin, Citocalasina-D, N-(6-aminoheptil)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7), Isoproterenolo (ISO), Acetilcolina (ACh).

Tutte le sostanze sono state preparate sotto forma di soluzione madre in acqua bidistillata (la Citocalasina-D è stata preparata in etanolo; il BDM e la Wortmannin in DMSO). Le soluzioni madre sono state successivamente diluite in ringer in modo da ottenere le concentrazioni utilizzate nei singoli esperimenti.

La VS-1 ed il peptide CgA₇₋₅₇ sono stati cortesemente forniti dal Dr. Angelo Corti dell'Istituto S. Raffaele di Milano. Il BDM, la Wortmannin e la W7 sono stati forniti da Calbiochem (Milano). ISO, ACh e Citocalasina-D sono stati forniti dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Gli esperimenti con Citocalasina-D, Wortmannin e W7 sono stati effettuati utilizzando un apparato modificato in modo da proteggere la sostanza dalla luce ed evitarne la degradazione.

8. Protocolli sperimentali

8.1 Curva dose-effetto

Negli esperimenti in cui sono stati esaminati gli effetti della Citocalasina-D, BDM, Wortmannin e W7 a diverse concentrazioni, si è proceduto nel seguente modo: dopo aver avviato la perfusione con il mezzo di controllo per stabilizzare il cuore alle condizioni basali, sono state somministrate dosi crescenti delle singole sostanze. Gli effetti sui parametri cardiaci sono stati determinati dopo 20 minuti dalla somministrazione della singola dose della sostanza in esame.

8.2 Effetti dei peptidi CgA-derivati in presenza di altre sostanze

Attraverso esperimenti preliminari abbiamo dimostrato l'identità qualitativa dei risultati ottenuti con la VS-1 che con il peptide CGA₇₋₅₇, pertanto, poiché quest'ultimo peptide è di più facile reperibilità, molti degli esperimenti condotti sulla rana sono stati effettuati utilizzando questo frammento.

Gli effetti della VS-1 e del peptide CgA₇₋₅₇ sono stati valutati dopo pretrattamento rispettivamente con: Citocalasina-D, BDM, Wortmannin e W7. In tutti i casi, dopo aver rilevato i parametri di base, è stata somministrata la sostanza da testare per un tempo di circa 20 minuti; quindi la perfusione è stata continuata con la sostanza testata (sempre alla stessa concentrazione) insieme al peptide, per un uguale periodo di tempo.

In un altro set di esperimenti sono stati testati gli effetti dell'ISO e dell'ACh dopo trattamento con Citocalasina-D.

9. Inibitori della dinamica citoscheletrica utilizzati e siti d'azione specifici

- ✓ **Citocalasina-D**, inibitore specifico della polimerizzazione dell'actina, impedisce l'addizione dei monomeri di actina G, legandosi all'estremità terminale “+” dei microfilamenti dove l'aggiunta dei monomeri avviene velocemente e contribuisce all'allungamento del filamento (Calaghan et al., 2000) (Fig. 9 A).
- ✓ **BDM**, inibitore non competitivo della miosina-ATPasi ed in particolare della miosina di tipo non muscolare, che agisce stabilizzando il complesso Miosina-ADP (Yagi et al., 1992; Zhao et al., 1995). I microfilamenti di actina scorrono l'uno sull'altro tramite interazioni con molecole di miosina, che ne determinano lo scorrimento grazie all'attività ATPasica localizzata a livello delle loro teste. Le molecole miosiniche sono inoltre richieste per il mantenimento e il coordinamento del citoscheletro actinico con quello microtubulare (Fig. 9 B).
- ✓ **W7**, inibitore della calmodulina, proteina accessoria fondamentale nella regolazione del riarrangiamento citoscheletrico (Wang et al., 2000). Tale proteina è, infatti, coinvolta nella regolazione delle associazioni actina-miosina,

actina-actina ed in *in* interviene anche nel regolare le associazioni fra i filamenti di actina e la membrana plasmatica (Clare et al., 1993; James et al., 1995) (Fig. 10 A).

- ✓ **Wortmannin**, 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, responsabile anche della riorganizzazione del citoscheletro (Kjeken et al., 2001) (Fig. 10 B).

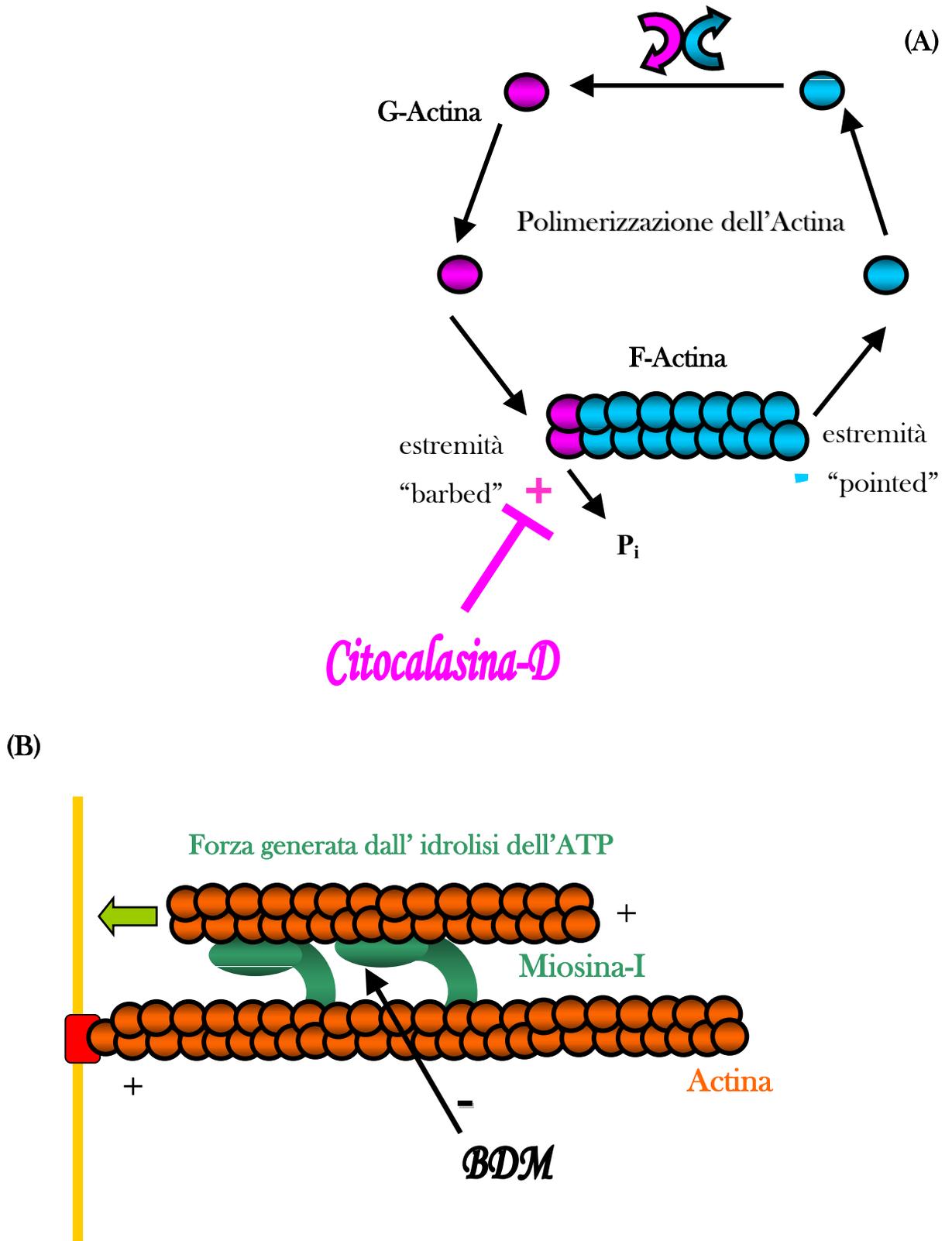
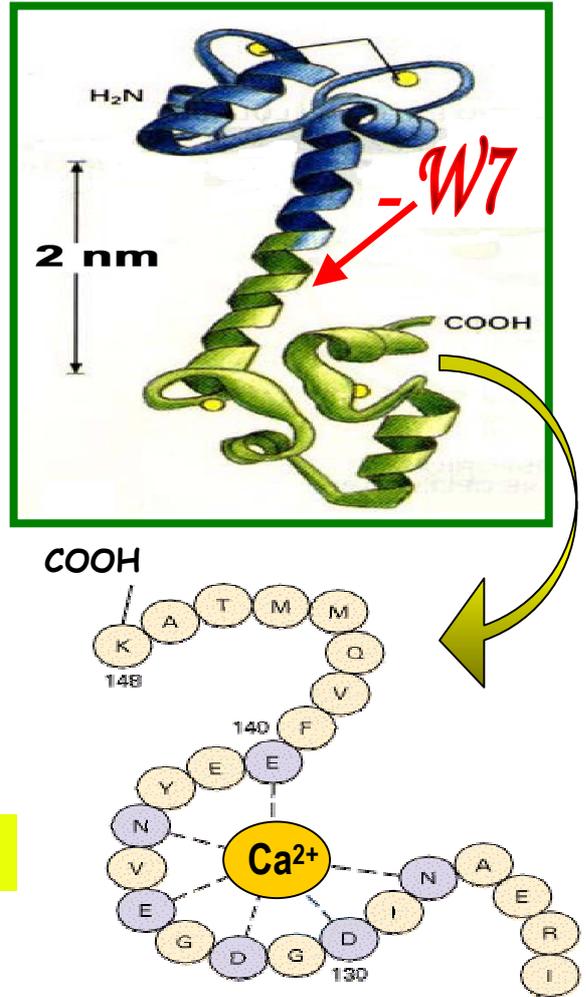


Fig. 9. Siti target della Citocalasina-D (A) e del BDM (B)

Calmodulina

(A)



(B)

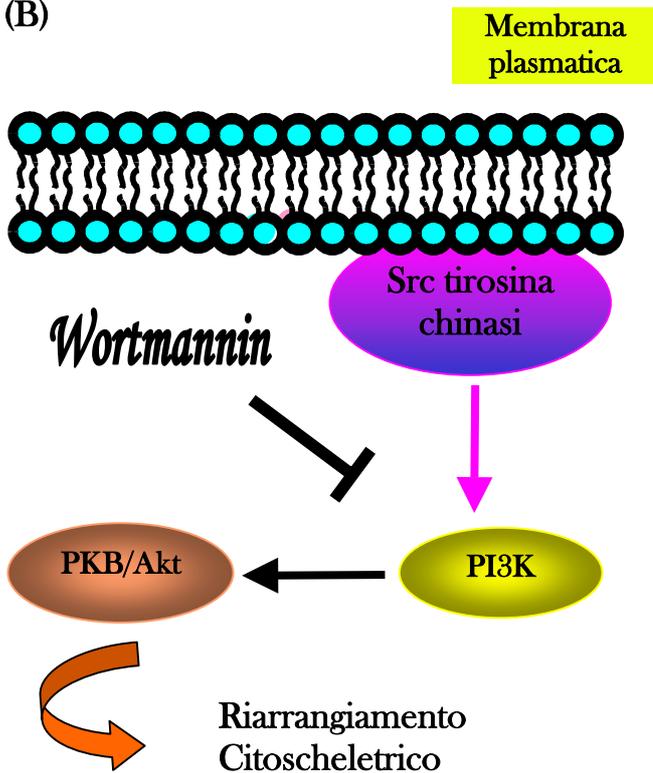


Fig. 10. Siti target della W7 (A) e della Wortmannin (B)

10. Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati espressi come media \pm ES delle variazioni percentuali dei singoli esperimenti rispetto ai valori di controllo. Ogni preparato è stato trattato con una singola concentrazione della sostanza in esame. Poiché ciascun cuore ha rappresentato il controllo di se stesso, la significatività statistica delle differenze, tra la condizione test (cioè in presenza della sostanza) ed il controllo, è stata determinata mediante il test del t-Student per campioni appaiati ($p < 0.05$). Il confronto fra gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA, la significatività è stata determinata con il test di Duncan ($\$=p < 0.05$)

I risultati sono stati espressi in termini percentuali, tuttavia, la significatività degli effetti è stata valutata esclusivamente sui valori assoluti.

Risultati

1. Effetti della Citocalasina-D, del BDM, della W7 e della Wortmannin sulla performance meccanica in condizioni basali.

Il citoscheletro è una complessa trama fibrillare la cui integrità è importante in vari processi biologici (Rogers and Gelfand 2000). Nella prima parte di questa ricerca sono stati indagati gli effetti dei vari inibitori del network citoscheletrico sulla performance meccanica di base dei cuori di *Anguilla anguilla* e *Rana esculenta*.

Utilizzando i classici preparati di cuore isolato e perfuso di anguilla e rana, sono state generate le curve dose-effetto, a concentrazioni comprese tra 0.001 nM e 1000 nM, della Citocalasina-D (inibitore specifico della polimerizzazione dell'actina), del BDM (inibitore non competitivo della miosina-ATPasi), della W7 (inibitore della calmodulina) e della Wortmannin (inibitore della PI3K), (Calaghan et al., 2000; Zhao et al., 1995; Wang et al., 2000; Kjekken et al., 2001) (Tab. 1).

Nel cuore di anguilla la Citocalasina-D ha ridotto significativamente la performance cardiaca di base alla concentrazione di 100 nM, mentre BDM, W7 e Wortmannin hanno mostrato un trend negativo tuttavia non significativo. Nel preparato di cuore di rana tutti gli inibitori utilizzati hanno indotto un decremento significativo del volume sistolico (SV). In

particolare, la Citocalasina-D e la W7 hanno determinato un effetto inotropo negativo significativo a partire dalla concentrazione di 10 nM, il BDM dalla concentrazione di 100 nM e la Wortmannin dalla concentrazione di 0,1 nM (Fig. 11 e 12)

Al fine di escludere possibili influenze sull'inotropismo dovute a variazioni del cronotropismo, tutti gli esperimenti sono stati condotti su cuori elettrostimolati.

INIBITORI CITOSCHELETRICI	AZIONE
Citocalasina-D	Inibizione della polimerizzazione dell'actina
Butanedione 2-monoxime (BDM)	Inibizione della Miosina ATP-asi
N-(6-aminoheksil)-5-cloro-1-naphtalenesulfonamide (W7)	Inibizione della Calmodulina
Wortmannin	Inibizione della PI3-K

Tab.1

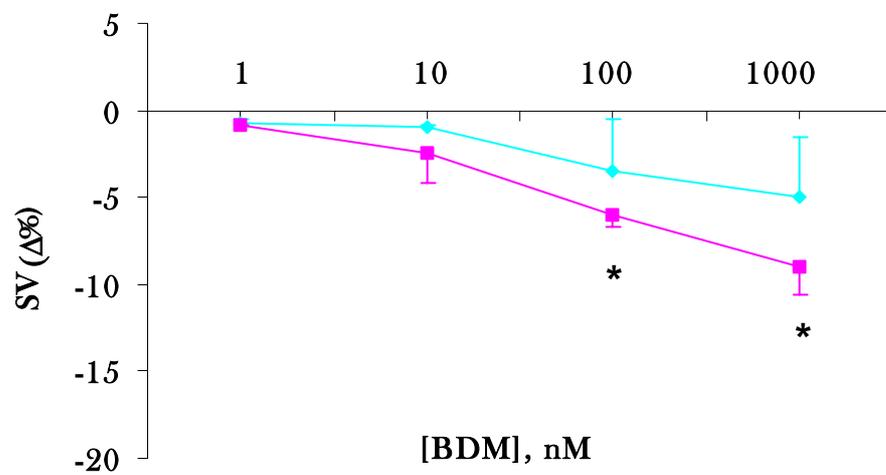
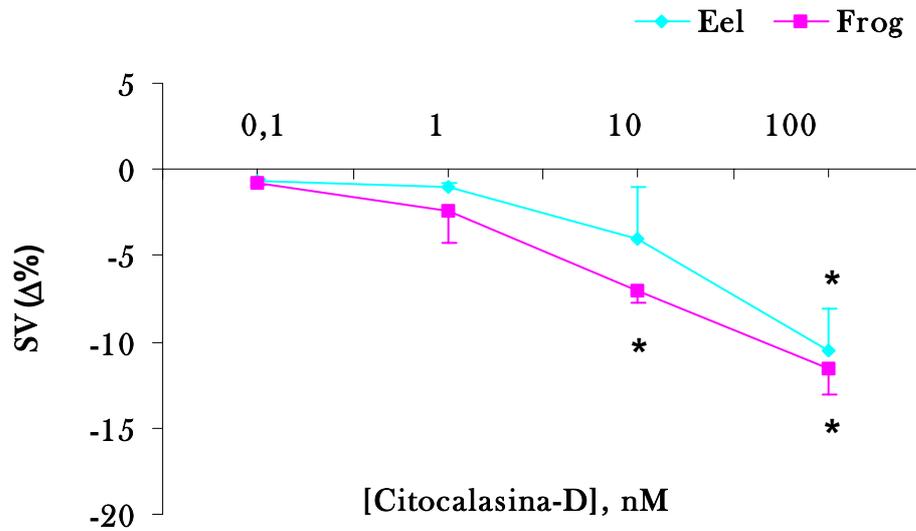


Fig. 11. Curva dose-effetto della Citocalasina-D e del BDM sul volume sistolico del cuore isolato e perfuso di anguilla e rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard ($n=4-5$). Gli asterischi indicano variazioni significative rispetto ai valori di controllo ($*=p<0.05$). Le differenze statistiche sono state determinate mediante il test del *t*-Student per campioni appaiati.

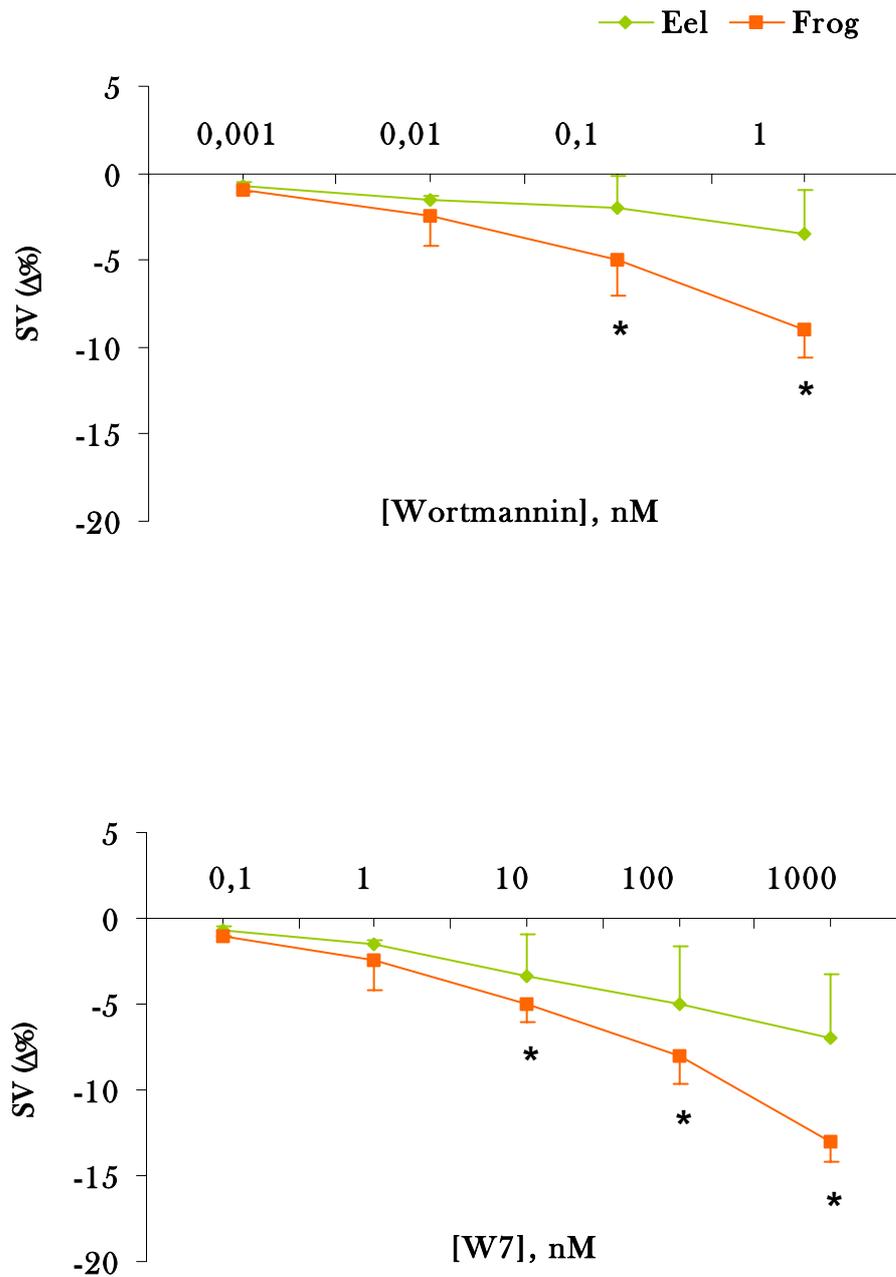


Fig. 12. Curva dose-effetto della Wortmannin e della W7 sul volume sistolico del cuore isolato e perfuso di anguilla e rana. I dati rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=4-5). Gli asterischi indicano variazioni significative rispetto ai valori di controllo (*=p<0.05). Le differenze statistiche sono state determinate mediante il test del t-Student per campioni appaiati.

2. Effetti della Citocalasina-D, del BDM, della W7 e della Wortmannin sull'azione cardiosoppressiva esercitata dai frammenti CgA-derivati.

Nell'indagare l'effetto degli inibitori del citoscheletro sull'azione cardio-soppressiva esercitata dai frammenti peptidici CgA-derivati, ciascun inibitore è stato testato nel range di concentrazione tale da non modificare la performance cardiaca di base, compatibile, cioè, con l'integrità funzionale dell'apparato contrattile dei miocardiociti.

Il trattamento con Citocalasina-D ha abolito l'effetto inotropo negativo della VS-1 in anguilla alla concentrazione di 10 nM, e della CGA₇₋₅₇ in rana alla concentrazione di 1 nM, come indicato dalla riduzione del volume sistolico (SV) e del lavoro cardiaco (SW); mentre non ha modificato l'effetto dei peptidi CgA-derivati a concentrazioni più basse (anguilla: 1 nM; rana: 0.1 nM) (Fig. 13).

Parallelamente sono stati condotti esperimenti per testare se la Citocalasina-D influenza le tipiche risposte colinergiche e adrenergiche, indotte nei nostri preparati, rispettivamente, da agonisti quali Acetilcolina (ACh) e Isoproterenolo (ISO). In entrambi i preparati la Citocalasina-D (10 nM anguilla; 1 nM rana) non ha modificato la risposta inotropica negativa

evocata dall'ACh; mentre nella rana non ha alterato l'effetto inotropo positivo indotto dall' ISO (Fig. 14). Tali risultati suggeriscono che una destabilizzazione del citoscheletro actinico non influenza le classiche risposte adrenergiche e colinergiche.

Le concentrazioni minime efficaci del BDM e della W7 sono risultate dipendenti dalla specie utilizzata. Infatti, mentre nel preparato di anguilla il trattamento con BDM e W7 ha abolito l'effetto cardio-soppressivo esercitato dai frammenti peptidici alla concentrazione di 100 nM, nella rana tale effetto è stato bloccato dal BDM alla concentrazione di 10 nM e dalla W7 alla concentrazione di 1nM (Fig. 15 e 16).

Infine, il trattamento con la Wortmannin, ha abolito l'azione cardio-inibitoria esercitata dai frammenti peptidici, alla concentrazione di 0.01 nM in entrambi i preparati (Fig. 17)

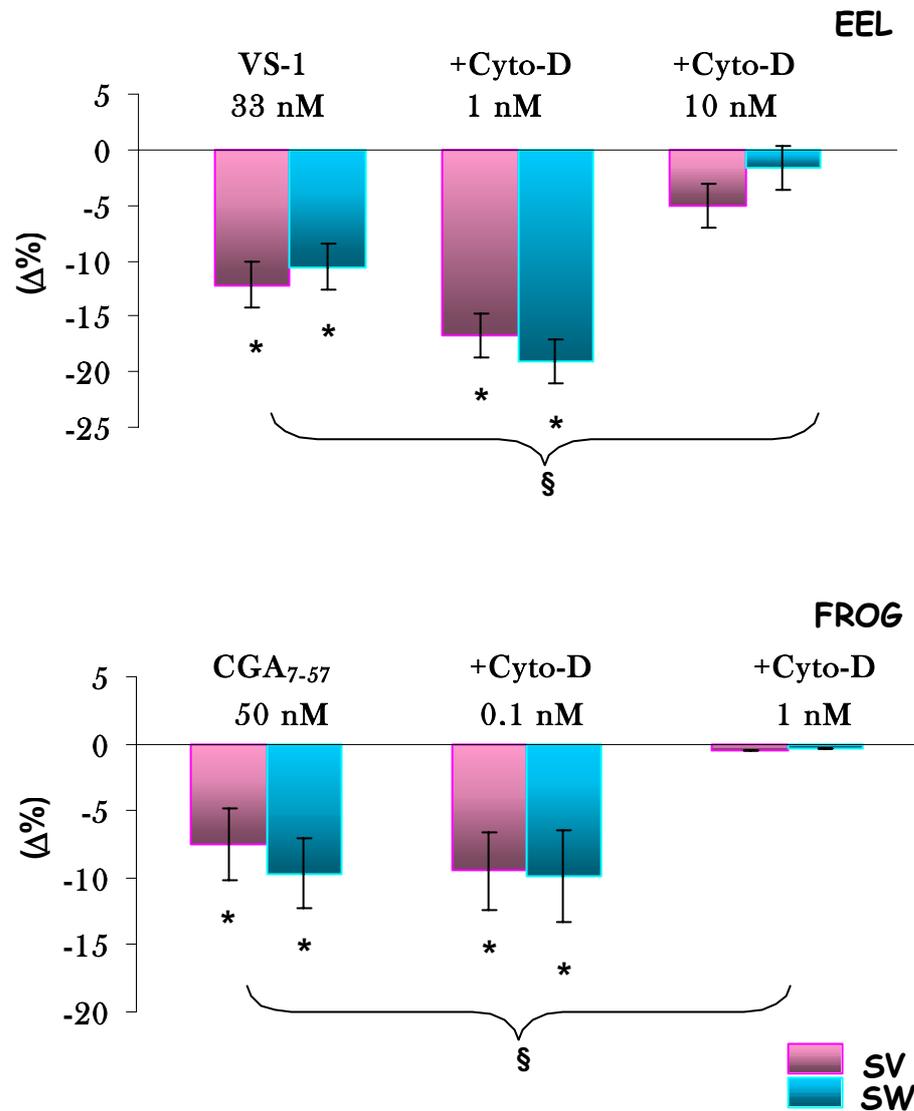


Fig. 13. Effetti dei peptidi CGA-derivati prima e dopo trattamento con Citocalasina-D sul volume sistolico e lavoro cardiaco del cuore isolato e perfuso di anguilla e rana. Gli istogrammi rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard ($n=4-5$). Gli asterischi indicano variazioni significative rispetto ai valori di controllo ($*=p<0.05$). Le differenze statistiche sono state determinate mediante il test del t-Student per campioni appaiati. Il confronto fra gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA, la significatività determinata con il test di Duncan (§= $p<0.05$)

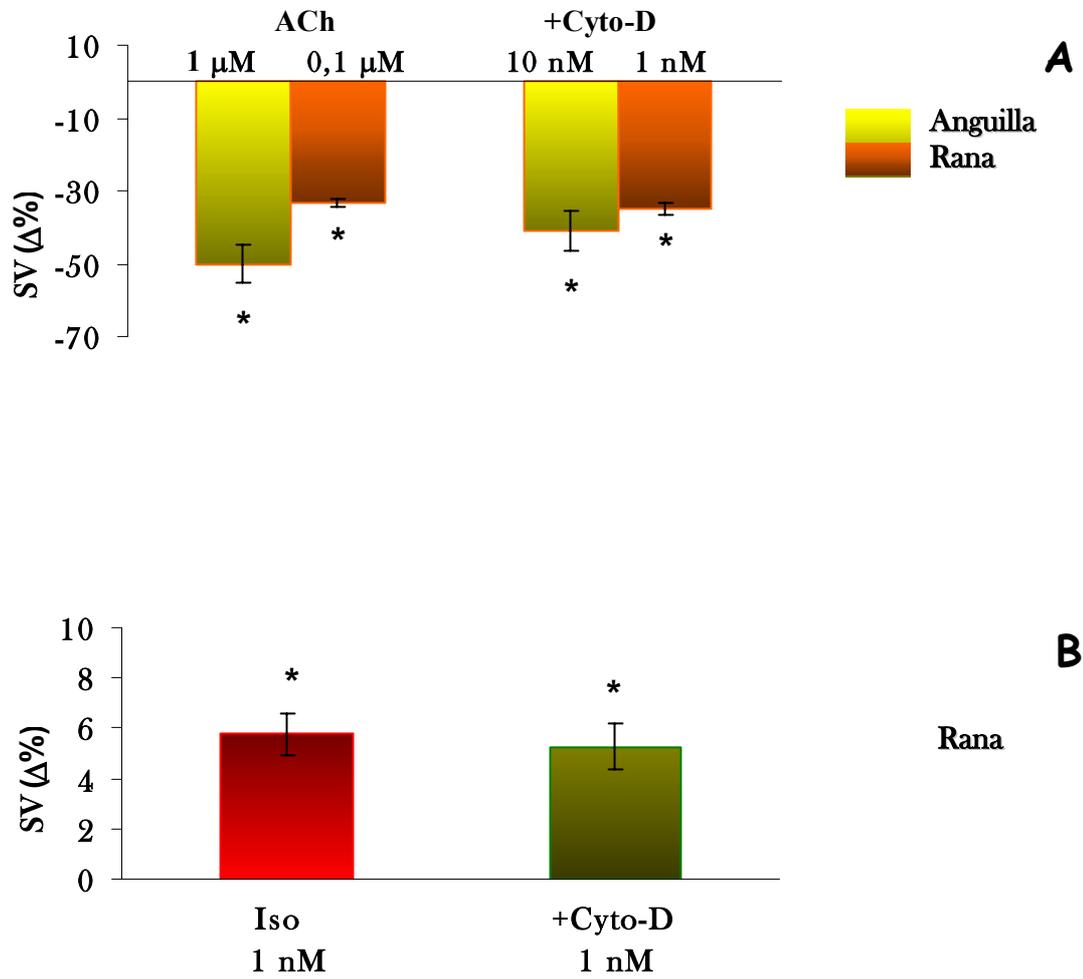


Fig. 14. (A) Effetto dell'Acetilcolina prima e dopo trattamento con Citocalasina-D sul volume sistolico del cuore isolato e perfuso di anguilla e rana. (B) effetto dell'Isoproterenolo (1nM) prima e dopo trattamento con Citocalasina-D (10nM) sul volume sistolico del cuore isolato e perfuso di rana. Gli istogrammi rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=4-5). Gli asterischi indicano variazioni significative rispetto ai valori di controllo (*=p<0.05). Le differenze statistiche sono state determinate mediante il test del *t*-student per campioni appaiati

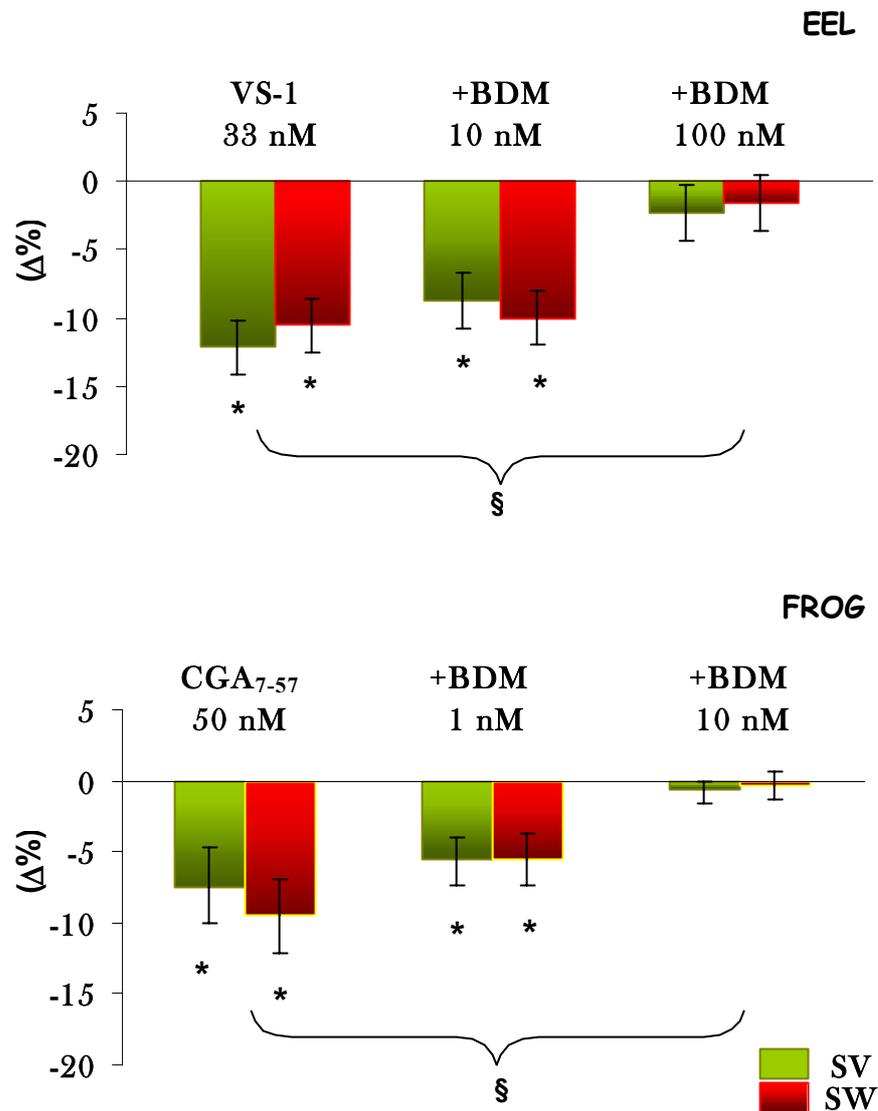


Fig. 15. Effetti dei peptidi CGA-derivati prima e dopo trattamento con BDM sul volume sistolico e lavoro cardiaco del cuore isolato e perfuso di anguilla e rana. Gli istogrammi rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard ($n=4$). Gli asterischi indicano variazioni significative rispetto ai valori di controllo ($*=p<0.05$). Le differenze statistiche sono state determinate mediante il test del t-Student per campioni appaiati. Il confronto fra gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA, la significatività determinata con il test di Duncan (§= $p<0.05$)

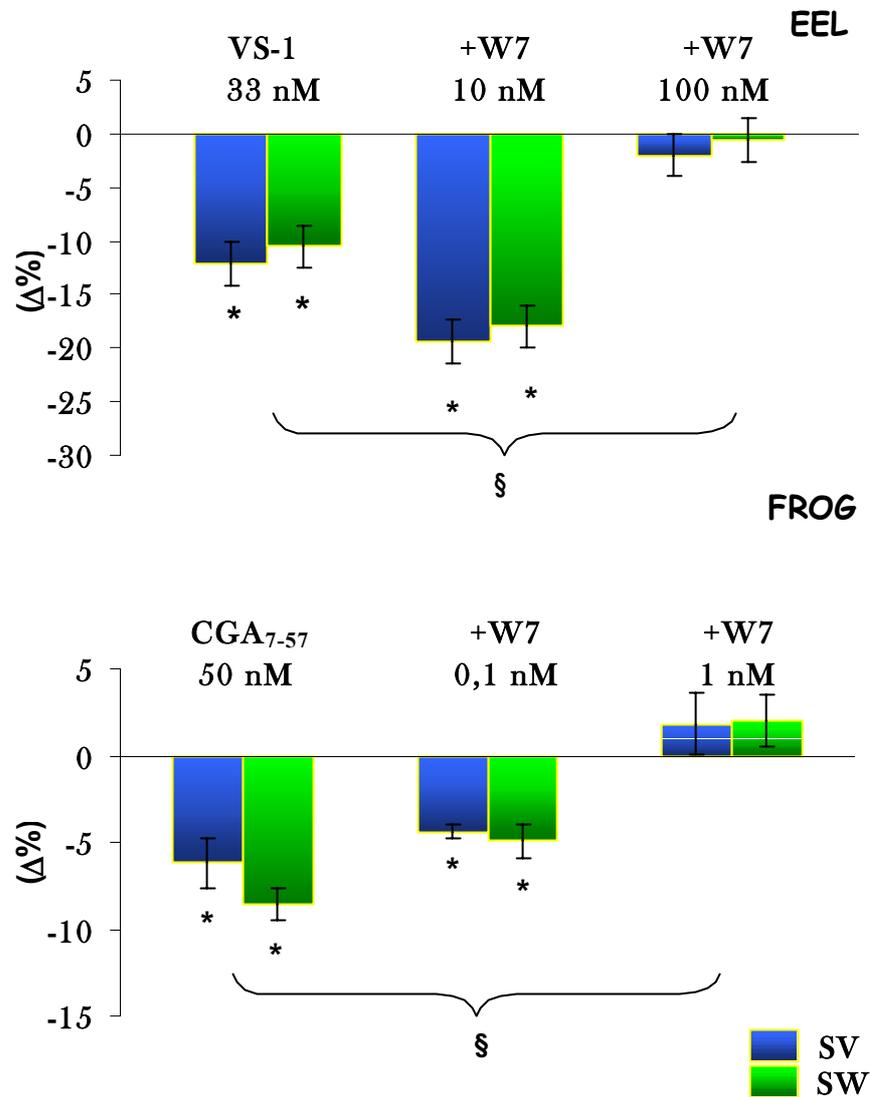


Fig. 16. Effetti dei peptidi CGA-derivati prima e dopo trattamento con W7 sul volume sistolico e lavoro cardiaco del cuore isolato e perfuso di anguilla e rana. Gli istogrammi rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=4). Gli asterischi indicano variazioni significative rispetto ai valori di controllo (*=p<0.05). Le differenze statistiche sono state determinate mediante il test del t-Student per campioni appaiati. Il confronto fra gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA, la significatività determinata con il test di Duncan (§=p< 0.05)

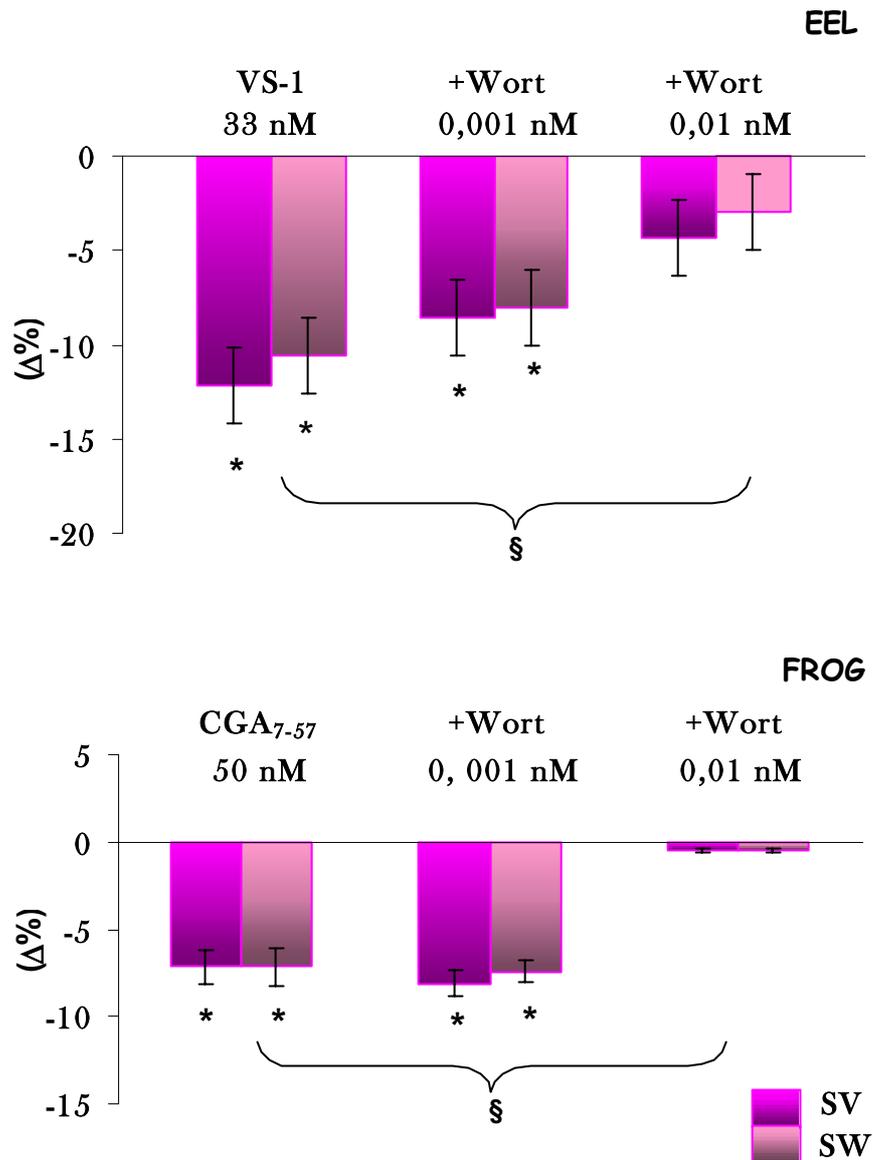


Fig. 17. Effetti dei peptidi CGA-derivati prima e dopo trattamento con Wortmannin sul volume sistolico e lavoro cardiaco del cuore isolato e perfuso di anguilla e rana. Gli istogrammi rappresentano i valori percentuali \pm l'errore standard (n=4). Gli asterischi indicano variazioni significative rispetto ai valori di controllo (*=p<0.05). Le differenze statistiche sono state determinate mediante il test del t-Student per campioni appaiati. Il confronto fra gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA, la significatività determinata con il test di Duncan (§=p< 0.05).

Discussione

Questo studio ha analizzato il ruolo del citoscheletro nella modulazione della performance cardiaca indotta dai frammenti peptidici CgA-derivati, nel preparato *in vitro* di cuore di *Anguilla anguilla* e *Rana esculenta*.

Il citoscheletro, complessa trama fibrillare citoplasmatica, fornisce un supporto strutturale e garantisce la compartimentalizzazione dei componenti cellulari. Esso gioca un ruolo fondamentale in vari processi biologici, quali, ad esempio, la sintesi proteica, il traffico intracellulare, il trasporto di organuli all'interno della cellula (Rogers and Gelfand, 2000), nonché la modulazione di vie di trasduzione del segnale (Rasnik et al., 1981; 1990; Janmey 1998; Gundersen e Cook, 1999; Katz, 2000) e di canali ionici quali quelli al Ca^{2+} , al Na^+ ed al K^+ (Rogers e Gelfand, 2000; Watson et al., 1992). Esso è coinvolto in diverse patologie cardiache che includono l'ipertrofia e l'infarto del miocardio (Ganote and Armstrong, 1993; Borg et al., 2000; Schaper and Kostin, 2000) ed è, inoltre, implicato nella regolazione funzionale della muscolatura liscia cardiaca e dei fibroblasti (Kamkin et al., 2001, 2003).

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno dimostrato che nei preparati di cuore isolato e perfuso di *Anguilla anguilla* e *Rana esculenta* in condizioni basali, il trattamento con inibitori della dinamica citoscheletrica

quali Citocalasina-D, BDM, Wortmannin e W7, inducono un decremento del volume sistolico, esercitando, in un range di concentrazione dell'ordine nanomolare, un azione cardiosoppressiva. Questi dati sono risultati in accordo con quanto riportato nei mammiferi. Per esempio, è stato osservato che il trattamento con Citocalasina-D riduce la contrattilità miocardica in cardiomiociti di ratto (Calaghan et al., 2004; Undrovinas e Maltsev 1998; Howarth et al., 1998), sebbene tale effetto sia stato attribuito ad una distruzione selettiva dei microfilamenti di actina per interazione della Citocalasina-D sia con l'actina citoscheletrica (Undrovinas e Maltsev, 1998) che con l'actina sarcomerica dei filamenti sottili (Calaghan et al., 2004; Howarth et al., 1998). A tal proposito è importante sottolineare che nel nostro studio, ciascun inibitore è stato testato in un range di concentrazione compatibile con l'integrità funzionale dell'apparato contrattile dei miocardiociti. In letteratura è riportato che gli effetti della Wortmannin sulla regolazione del calcio dipendono dal tipo cellulare considerato. Infatti, mentre in cellule muscolari lisce bovine la Wortmannin non influenza la corrente al calcio (Ethier e Madison 2002), in cellule muscolari scheletriche essa riduce la mobilitazione del calcio dal reticolo sarcoplasmatico, esercitando così un effetto inibitorio sull'accoppiamento eccitazione-contrazione (Hong et al., 1998). E' ben noto il ruolo della W7

come potente inibitore della contrazione muscolare sia scheletrica che cardiaca (per referenze vedi Adhikari e Wang 2004). Infine, studi condotti in fibre muscolari di rana (Rassier e Herzog 2004; Sun et al., 1995) e miofibrille di coniglio (Tesi et al., 2002) hanno evidenziato una riduzione della forza isometrica dipendente dal BDM.

I risultati di questa ricerca hanno evidenziato che il trattamento con Citocalasina-D, BDM, Wortmannin e W7 abolisce la risposta inotropica negativa indotta dai peptidi CgA-derivati. E' interessante notare che la Citocalasina-D, alla concentrazione utilizzata, non modifica le classiche risposte adrenergiche e colinergiche. Tali risultati sono in accordo con quanto riportato da Bloch e collaboratori (2001) i quali hanno dimostrato che in cardiomiociti embrionali di topo il trattamento con concentrazioni micromolari di Citocalasina-D non influenza la stimolazione della corrente al calcio, indotta dall'ISO. Gli stessi autori, tuttavia, hanno anche osservato che alle stesse dosi la Citocalasina-D blocca la classica risposta alla stimolazione colinergica. Ciò sembra contrastare con i risultati da noi ottenuti in cui la risposta inotropica indotta dall'ACh non risulta influenzata da concentrazioni nanomolari di Citocalasina-D. Questo potrebbe trovare spiegazione nella diversa concentrazione di inibitore utilizzata (nanomolare

o micromolare) o nel diverso arrangiamento spaziale delle componenti delle cascate trasduzionali in cardiomiociti embrionali e nel preparato di cuore intero, quale quello da noi utilizzato in questo studio.

In letteratura nulla è riportato circa l'eventuale interazione delle VSs con il citoscheletro, fatta eccezione per alcune osservazioni preliminari, condotte sui miocardiociti di ratto, che mostrano una polimerizzazione dell'actina dipendente dalla VS-1, e che suggeriscono un coinvolgimento del peptide nella modulazione del network dei microfilamenti actinici (Angelone et al., Latina 2004).

E' stato osservato, nelle cellule endoteliali dell'arteria polmonare e delle coronarie bovine, che la VS1 inibisce la fosforilazione della p38 MAP kinasi attivata dal fattore di necrosi tumorale (TNF α) (Blois et al, 2006). Poiché è ben noto che il TNF α induce riorganizzazione dell'actina citoscheletrica (Goldblum et al 1993), è lecito ipotizzare un meccanismo d'azione dei peptidi che ne preveda l'internalizzazione attraverso il citoscheletro. Questa assunzione è supportata dai presenti risultati che mostrano che il trattamento con Citocalasina-D, inibitore specifico della polimerizzazione dell'actina e con BDM, inibitore non competitivo della miosina ATPasi, abolisce l'azione cardioinibitoria delle VSs.

Attualmente non sono noti recettori o siti d'azione specifici per le VSs (Helle et al., 2001), sebbene domini di membrana specifici sono stati riportati per la CgA₁₋₄₀ e CgA₁₋₇₈ nelle cellule paratiroidee bovine (Russell et al. 1994) e nelle cellule muscolari lisce di aorta bovina (Angeletti et al. 1994). E' riportato che le VSs potrebbero attivare pathways di trasduzione dei segnali inter- e/o intracellulari attraverso una perturbazione della membrana cellulare a seguito dell'interazione della porzione lipofila del peptide con domini presenti sul bilayer lipidico. A livello strutturale, infatti, i domini idrofobici di tali frammenti peptidici conferiscono loro l'abilità a interagire con lo strato lipidico delle membrane e a penetrare all'interno della cellula (Lugardon et al., 2000; Maget-Dana et al., 2002; Metz-Boutigue et al., 2003). A tal proposito è stato recentemente dimostrato che la VS-1 è in grado di interagire con fosfolipidi di membrana come la fosfatidilserina (Bloise et al., 2006).

Sulla scorta dei nostri risultati non è possibile definire il tipo di legame tramite il quale le VSs interagiscono con il citoscheletro. Studi recenti condotti su miocardiociti di ratto adulto, hanno evidenziato, tramite l'utilizzo di VS-1 coniugata con oro, che il peptide si trova localizzato all'esterno della cellula, suggerendo una interazione con i componenti della matrice extracellulare (ECM) (Di Felice et al., 2006). Una ipotesi potrebbe

riguardare l'eventuale interazione delle VSs con le integrine. Il legame, infatti, tra il recettore integrinico ed il ligando extracellulare induce cambiamenti conformazionali nel complesso proteico che può così interagire con elementi del citoscheletro. Caratteristica importante di molte integrine (o probabilmente tutte) è che queste molecole vanno incontro a fenomeni di attivazione recettoriale; è ormai chiaro, infatti, che le integrine sono molto più di semplici proteine aventi funzione di "adesione cellulare" in quanto rappresentano dei veri e propri recettori capaci di trasdurre segnali intracellulari. A tale riguardo due domini putativi della VS-1 possono essere presi in considerazione per il loro ipotetico legame con la membrana o la ECM: un dominio con una netta carica positiva tra i residui 47-70 e la sequenza tripeptidica RGD (Arg-Gly-Asp) a livello dei residui 43-45 (Di Felice et al., 2006). Quest'ultimo dominio rappresenta il sito specifico di riconoscimento di molte integrine con il loro ligando.

Si potrebbe anche ipotizzare che le VSs inducano cascate intracellulari attraverso l'attivazione della cascata PI3K-Proteina chinasi B (Akt). Una attiva partecipazione di questa chinasi è stata ad esempio suggerita nelle vie di trasduzione dei segnali attivate dalle molecole integriniche; quest'ultime, infatti, interagiscono con molecole transmembrana e/o intracellulari dotate di attività tirosino-kinasica. Questi "enzimi attivati",

a loro volta, agiscono a valle attivando la PI3K, contribuendo così a propagare il segnale all'interno della cellula (Shattil e Brugge 1991). Sebbene il ruolo della Akt durante l'attivazione integrinica non sia ancora completamente chiaro, ben noto in letteratura è, invece, il suo intervento nella regolazione della NOS endoteliale (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) (per maggiori dettagli vedi scheda di approfondimento). A tal proposito, Gallo e collaboratori hanno recentemente osservato, in muscoli papillari di ratto, che l'effetto anti-adrenergico indotto dalla VS-1 è dovuto ad un rilascio endoteliale di NO dipendente dall'attivazione della PI3K e conseguente produzione di Akt (dati non pubblicati). Ciò risulta di particolare interesse in relazione al ruolo dello NO come mediatore dell'effetto cardiosoppressivo indotto dalla VS-1 in preparati di cuore isolato e perfuso di anguilla (Imbrogno et al., 2004). Si potrebbe ipotizzare, quindi, che nell'anguilla la VS-1 attivi la NOS, e di conseguenza la produzione di NO, tramite un meccanismo d'azione che prevede l'attivazione della Akt. Maniatis e collaboratori (2006) hanno ipotizzato un meccanismo molecolare alla base dell'attivazione della eNOS, che coinvolge una endocitosi mediata da caveole, siti di sequestro di molecole "segnale" tra cui

la eNOS (Balligand et al., 2000), e conseguente attivazione della cascata Src-PI3K-Akt. In questa prospettiva, il primo evento della cascata intracitoplasmatica indotta dalle VSs, responsabile dell'effetto cardiosoppressivo osservato, potrebbe essere rappresentato da una internalizzazione in strutture quali i caveosomi (endosomi contenenti caveolina-1) a livello di membrana (Pelkmans et al., 2001; Pelkmans e Helenius 2002; Upla et al., 2004).

I nostri dati non ci permettono di escludere comunque la presenza di recettori specifici per i peptidi CgA-derivati o una eventuale interazione con recettori "scavenger". Quest'ultimi rappresentano proteine integrali di membrana che mediano l'endocitosi di polianioni macromolecolari e che sono stati descritti e caratterizzati nell'endotelio endocardico di alcuni teleostei (Seternes 2001).

In conclusione, i dati presentati in questo lavoro hanno messo in evidenza che nel cuore di anguilla e di rana l'integrità del citoscheletro actinico è una condizione essenziale perché i peptidi CgA-derivati possano esercitare i loro effetti cardiosoppressivi.

Sebbene il meccanismo d'azione delle VSs rimane ancora da chiarire, tali dati rappresentano un ulteriore aspetto di uniformità nella

risposta a tali peptidi nel cuore delle due specie utilizzate, che potrebbero fornire la base per studi futuri mirati a delucidare i meccanismi d'azione molecolari di questi agenti cardioattivi. A tal proposito sarebbe interessante esplorare l'eventuale ruolo di proteine regolatrici dell'interazione membrana plasmatica-citoscheletro quali le Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) (Bretscher et al., 2000) e di fosfoproteine coinvolte nella comunicazione intercellulare, quali ad esempio le connesine (Sàez et al., 2003).

SCHEDA DI APPROFONDIMENTO

Cascata di trasduzione PI3K-Akt ed attivazione della eNOS

La fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) è un enzima localizzato al di sotto della membrana cellulare. Esso sintetizza Fosfatil Inositolo 3,4,5 tris-fosfato (PIP₃) che in quanto tale “arruola” sulla membrana cellulare, tramite fosforilazione, la proteina chinasi B (PKB), una Serina/Treonina Chinasi nota anche come Akt. La Akt è stata individuata in linfomi di cellule T di roditori come enzima codificato dall’RNA di un retrovirus, denominato AKT (Akute Trasforming), la cui controparte cellulare fu presto identificata nell’uomo e denominata PKB. Per essere completamente attiva la Akt richiede fosforilazione, oltre che dal PIP₃, anche da altre proteine chinasi (P-inositol Dipendent Kinase: PDK1 e PDK2). Il processo è transiente, poichè esiste una PIP₃-fosfatasi, che rimuove il fosfato dalla posizione 5, annullando il possibile “arruolamento” della proteina Akt (Hodgkinson et al., 2002).

Come ampiamente evidenziato la PKB o Akt è responsabile della riorganizzazione del citoscheletro (Kjeken et al., 2001; Del Turco e De Caterina 2003). Inoltre, poiché essa determina fosforilazione di una serie di substrati, è stato ipotizzato un suo importante ruolo in diverse cascate

trasduzionali. Ad esempio, essa gioca un ruolo fondamentale nel processo a cascata generato dall'insulina, attraverso una fosforilazione della glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3), nonché fosforila e attiva la S6 chinasi (S6K), enzima specifico per le subunità S-6 dei ribosomi, con conseguente incremento della sintesi proteica (Duchene et al., 2006). La Akt regola, inoltre, il ciclo cellulare attivando l'E2F, fattore di trascrizione di norma legato alla proteina retinoblastoma (Rb) (Chaussepied and Ginsberg 2004). L'attivazione di Akt determina anche un blocco dell'apoptosi (Vesely et al., 2006); infatti, è stato osservato che cellule esposte ai raggi UV e contemporaneamente attivate in Akt non entrano in apoptosi.

Nella Fig. 19 sono indicati alcuni meccanismi di attivazione della Akt e dei conseguenti effetti intracellulari.

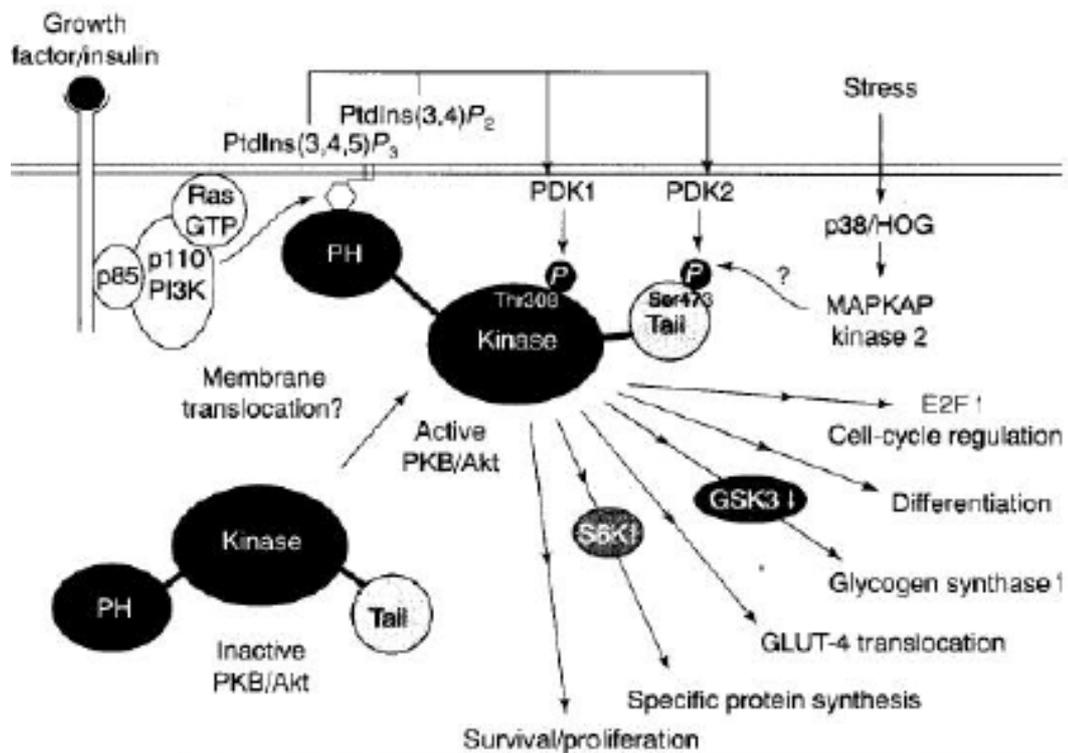


Fig.19. Meccanismi di attivazione della Akt e conseguenti effetti intracellulari.

Nella banca dati circa i possibili substrati della Akt è stata recentemente individuata l'isoforma endoteliale della NOS (eNOS), la quale viene attivata tramite fosforilazione del residuo di Ser 1179, cui consegue una maggiore affinità della eNOS per la calmodulina e aumento della produzione di NO (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999) (Fig. 19). E' stato riportato che l'insulina, il fattore di crescita insulino-simile (IGF-1), gli estrogeni e lo shear stress possono incrementare la produzione di NO da parte dell'endotelio senza aumentare i livelli di calcio intracellulari (Hartell et al., 2005; Shaul 2002); un meccanismo che

potrebbe trovare spiegazione in una fosforilazione della NOS da parte della Akt.

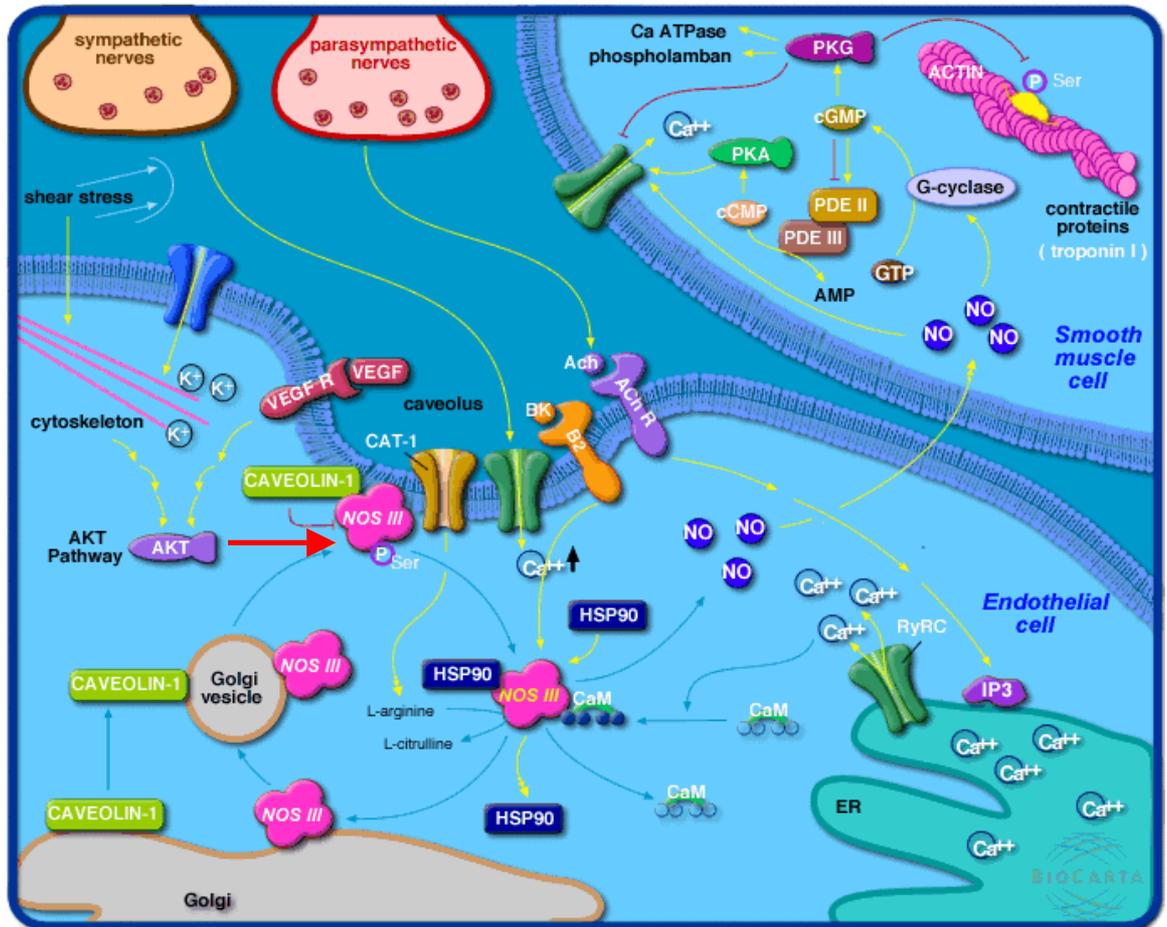


Fig. 19. Rappresentazione schematica delle vie di trasduzione del segnale che coinvolgono il sistema Akt-eNOS (Gramatikoff K., 2002).

E' bene noto che nei mammiferi lo NO, rilasciato dall'endotelio e/o prodotto direttamente dai cardiomiociti, è un importante mediatore di stimoli sia chimici che fisici all'interno della cellula (Kelly et al., 1996; Shash e McCarthy 2000). Ciò è stato ampiamente evidenziato anche nei vertebrati

non-mammiferi dal gruppo di ricerca di fisiologia cardiovascolare dell'Unical (Gattuso et al., 1999; 2002; Imbrogno et al., 2001; 2003; 2004). In particolare, Imbrogno e collaboratori (2001; 2003; 2004) hanno osservato che nel teleosteo *Anguilla anguilla* lo NO, media gli effetti inotropi indotti da fattori cardioattivi quali l'Acetilcolina, l'Angiotensina II e la VS-1. Inoltre, esso svolge un ruolo fondamentale nel favorire la risposta agli incrementi di precarico (Legge di Starling), sebbene il meccanismo specifico attraverso il quale l'aumento del precarico induce il rilascio di NO, nonché il suo specifico sito d'azione non siano ancora completamente chiari. Recentemente è stato suggerito che l'attivazione della eNOS indotta da stimoli meccanici avviene attraverso un pathway di trasduzione mediato dalla cascata tirosina chinasi-PI3K-Akt, che coinvolge le caveole di membrana e il citoscheletro (per referenze vedi Casadei and Sears, 2003; Maniatis et al., 2006). Si potrebbe quindi ipotizzare che anche nei preparati di cuore isolato e perfuso di anguilla, il rilascio di NO indotto dall'aumento del precarico e la conseguente modulazione della risposta di Starling, avvenga attraverso un meccanismo mediato dalla Akt.

Sebbene il coinvolgimento della Akt nei meccanismi d'azione attivati da stimoli meccanici e/o da fattori cardioattivi non sia ancora completamente chiaro, queste emergenti evidenze sottolineano il ruolo

chiave di questa proteina come fattore sul quale convergono, e da qui successivamente smistati, diversi segnali all'interno della cellula (vedi Fig. 19), fornendo un valido supporto per gli studi mirati a delucidare specifiche vie di trasduzione del segnale.

Bibliografia

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

Aardal S., Aardal N.P., Larsen T.H., Angeletti R.H., Stridsberg M., Taupenot L., Aunis D. and 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.

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.

Adhikari B.B. and Wang K. (2004). Interplay of troponin- and Myosin-based pathways of calcium activation in skeletal and cardiac muscle: the use of W7 as an inhibitor of thin filament activation. *Biophys. J.* **86**:359-370.

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., Zouheiry H., D' amico T., Russel J. (1997) Regulation of parathyroid by chromogranin A amino terminal peptides. In *Neurochemistry: Cellular, molecular and Clinical aspects* (Eds: Korf J, Teelken AW). Plenum Press. pp 583-588.

Angelone T., Goumon Y., Corti A., Cerra M.C., Tota B., Metz-Boutigue M.H. (2004) Role of Vasostatin-1 on Cytoskeletal modulation in rat cardiac myocytes. XI Congresso Nazionale della Società Italiana di Ricerche Cardiovascolari (S.I.R.C). Latina 23-25 Settembre

Balligand JL. (2000) Regulation of cardiac function by nitric oxide. *In Handbook of Experimental Pharmacology* **143** (Ed. B. Mayer), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 206-234.

- Bananis E., Murray J.W., Stockert R.J., Satir P., Wolkoff A.W. (2000)** Micotubule and motor-dependent endocytic vesicle sortine *in vitro*. *J. Cell. Biol.* 151: 179-186.
- Banks P. and Helle K.B. (1965)** The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem. J.* 97: 40c-41c.
- Benedum U.M., Baeuerle P.A., Konecki D.S., Frank R., Powell J., Mallet J., Huttner W.B. (1986)** The primary structure of bovine chromogranin A: a representative for a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO Journal* 5: 1495-1502.
- Benes P, Maceckova V, Zdrahal Z, Konecna H, Zahradnickova E, Muzik J, Smarda J. (2006).** Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation* 74:265-276.
- Berg J.S., Powell B.C., Cheney R.E. (2001)** A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* 12: 780-794.
- Bershadsky A. and Vasiliev J. (1988)** Cytoskeleton. New York: Plenum.
- Blaschko H., Comline R.S., Schneider F.H., Silver M., Smith A.D. (1967).** Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* 215: 58-59
- Bloch W., Fan Y., Han J., Xue S., Schoneberg T., Ji G., Lu Z.J., Walther M., Fassler R., Hescheler J., Fleischmann B.K. (2001)** Disruption of cytoskeletal integrity impairs Gi-mediated signaling due to displacement of Gi proteins. *J. Cell. Biol.* 154: 753-761.
- 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 phosphatidylethanolamine. *Reg Pept.* 134: 30-37.
- Blois A., Srebro B., Mandalà M., Corti A., Helle K.B, Serck-Hanssen G. (2006)** The Chromogranin A peptide vasostatin-I inhibits gap formation and signal transduction mediated by inflammatory agents in cultured bovine pulmonary and coronary arterial endothelial cells. *Reg Pept. In press*

- Borg T.K., Goldsmith E.C., Price R., Carver W., Terracio L., Samarel A.M. (2000).** Specialization at the Z line of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* **46**: 277-285.
- Bretscher A., Chambers D., Nguyen R., Reczek D. (2000)** ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**:113-143.
- Brown S. (1999)** Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu Rev Cell Biol.* **15**: 63-80.
- Calaghan S.C., Le Guennec J.Y., White E. (2004)** Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol.* **84**: 29-59.
- Calaghan S.C., White E., Bedut S., Le Guennec J.Y. (2000)** Cytochalasin D reduces Ca²⁺ sensitivity and maximum tension via interactions with myofilaments in skinned rat cardiac myocytes. *J Physiol.* **529**: 405-411.
- Capetanaki Y. (2002)** Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behaviour and function *Trends Cardiovasc. Med.* **12**: 339-348.
- Casadei B. and Sears C.E. (2003)** Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. *Progress in Biophys. Mol. Biol.* **82**: 67-80.
- 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.
- Chaussepied M. and Ginsberg D. (2004)** Transcriptional regulation of Akt activation by E2F. *Mol. Cell.* **16**: 831-837.

- Clague M.J., Thorpe C., Jones A.T. (1995). Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of fluid phase endocytosis. *FEBS Lett.* **367**: 272-274.
- Clore G.M., Bax A., Ikura M., Gronenborn A.M. (1993) Structure of calmodulin-target peptide complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 838-845.
- Cohn D.V., Zangerle R., Fischer-Colbrie R., Chu L.L.L., Elting J.J., Hamilton J.W. and Winkler H. (1982) Similarity of secretory protein-I from parathyroid gland to chromogranin A, from adrenal medulla. *Proc.Natn.Acad. Sci., USA.* **79**: 6056-6059.
- 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., Mannarino C., Mazza R., Colombo B., Longhi R., Tota B. (2002) Vasostatins exert negative inotropism in the working heart of the frog. *Ann NY Acad Sci.* **971**:362-365
- 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.
- Cryer P.E., Wortman J., S.D., Nowak R.M., Deftos L.J. (1991) Plasma chromogranin A as a marker for sympathochromaffin activity in humans: *Am.J.Physiol.* **260**: E 243-246.
- Cunningham C.C., Leclerc N., Flanagan L.A., Lu M., Janmey P.A., Kosik K.S. (1997). Microtubule associated protein 2c reorganize both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. *J. Cell. Biol.* **136**: 845-857.

- 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.
- Davie P. S., Farrel A. P., Franklin C. E. (1992) Cardiac performance of an isolated eel heart: effects of hypoxia and responses to coronary artery perfusion. *J. Exp. Zool.* **262** : 113-121.
- Del Turco S. and De Caterina R. (2003) Biologia e fisiopatologia del fattore tissutale e sua rilevanza per la patologia cardiovascolare. *Ital. Heart J.* **4**.
- Desrivieres S., Cooke F.T., Morales-Johansson H., Parker P.J., Hall M.N. (2002). Calmodulin controls organization of the actin cytoskeleton via regulation of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.J.* **366**: 945-51.
- Di Felice V., Cappello F., Montalbano A., Ardizzone N., Campanella C., De Luca C., Amelio D., Tota B., Corti A., Zummo G. (2006) Human Recombinant Vasostatin 1 may interfere with cell-extracellular matrix interactions. *Ann N Y Acad Sci. In press*
- 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.
- Drees B.M. and Hamilton J.W (1994) Processing of chromogranin A by bovine parathyroid secretory granules: production and secretion of N-terminal fragments. *Endocrinology* **134**: 2057-2063.
- Duchene S., Metayer S., Audouin E., Bigot K., Dupont J., Tesseraud S. (2006) Refeeding and insulin activate the Akt/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. *Domest. Anim. Endocrinol. In press.*
- Ehrhart M., Grube D., Bader M-F. Aunis D. and Gratzl M. (1986) Chromogranin A in the pancreatic islet: cellular and subcellular distribution. *J. Histochem. Cytochem.* **36**: 467-472.

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

Ethier M.F and Madison J.M. (2002) LY294002, but not wortmannin, increases intracellular calcium transients in bovine and human airway smooth muscle cells. *Cell Calcium* **32**: 31-38.

Fischer-Colbrie R., Gutierrez J., Hsu C.M., Iacangelo A., Eiden L.E. (1990) Sequence analysis, tissue distribution and regulation by cell depolarization and second messengers of bovine secretogranin II (chromogranin C) mRNA. *J. Biochem. Chem.* **265**: 9208-9213.

Fuchs E. and Cleveland D.W. (1988) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*. **279**: 514-519.

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**.

Ganote C. and Armstrong S. (1993) Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Card. Res.* **27**:1387-1403.

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.

Gattuso A., Mazza R., Pellegrino D. Tota, B. (1999) Endocardial endothelium mediates luminal ACh-NO signalling in the isolated frog heart. *Am.J.Physiol.* **276**: 633-641.

Gattuso A., Mazza R., Imbrogno S., Sverdrup S., Tota, B., Nylund A. (2002) Cardiac performance in *Salmo salar* with infectious salmon anaemia (ISA): putative role of nitric oxide. *Dis Aquat. Org.* **52**: 11-20.

Gilmore A. and Burridge K. (1996) Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5bisphosphate. *Nature* **381**: 531-535.

- Goldblum S.E., Ding X., Campbell-Washington J. (1993)** TNF-alpha induces endothelial cell F-actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction. *Am J Physiol.* **264**: 894-905.
- Goldman R.D., Khuon S., Chou Y.H., Opal P., Steinert P.M. (1996)** The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell. Biol.* **134**: 971-983.
- Goldstein M.A. and Entman M.L. (1979)** Microtubules in mammalian heart muscle. *J. Cell. Biol.* **80**:183-195.
- Gramatikoff K. (2002).** Ossido nitrico e azioni fisiologiche nel sistema cardiovascolare. www.biocarta.com.
- Gundersen G.G. and Cook T.A. (1999)** Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 81-94.
- Halban F. and Irminger J.C. (1994)** Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* **299**: 1-18.
- Helle K.B (1966)** Some chemical and physical properties of the soluble fraction of bovine adrenalchromaffin granules. *Molec. Pharmacol.* **2**: 298-310.
- 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. (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.

- Helmann L.J., Ahn T.G., Levine M.A., Allison A., Cohen P.S., Cooper M.J., Israel M.A. (1988) Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA. *J. Biochem. Chem.* **263**: 11559-11563.
- Hodgkinson C.P., Sale E.M., Sale G.J. (2002) Characterization of PDK2 activity against protein kinase B gamma. *Biochem.* **41**: 10351-10359.
- Hohaus A., Person V., Behlke J., Schaper j., Morano J., Haase H. (2002) The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca²⁺ channels and the actin-based cytoskeleton. *FASEB J.* **16**:1205-1216.
- Hong S.J. and Chang C.C. (1998). Novel inhibition of contractility by wortmannin in skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* **124** (5):849-56.
- Howarth F.C., Boyett M.R., White E. (1998) Rapid effect of Cytochalasin-D on contraction and intracellular calcium in single rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* **436**: 804-806.
- Huttner W.B., Gerdes H.H, Rosa, P., (1991) The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 27-30.
- Huttner, W., and Benedum, U.M. (1987) Chromogranin A and pancreastatin. *Nature.* **325**:305.
- 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 Ca²⁺ - dependent endopeptidase and carboxy-peptidase. *Biochem. J.* **244**: 457-464.
- Iacangelo A. and Eiden L.E. (1995) Chromogranin A: current status as a precursor for bioactive peptides and a granulogenic/sorting factor in the regulated secretory pathway. *Regul. Pept.* **58**: 65-88.
- Imbrogno S., Angelone T., Corti, A., Adamo C., Helle K.B., Tota B. (2004). Influence of vasostatins, the Chromogranin A-derived peptides, on the working heart of the eel (*Anguilla anguilla*): negative inotropy and mechanism of action. *Gen. Comp. End.* **139**: 20-28.

- Imbrogno S., Cerra M.C., Tota, B. (2003)** Angiotensin II-induced inotropism requires an endocardial endothelium-nitric oxide mechanism in the *in-vitro* heart of *Anguilla anguilla*. *J.Exp.Biol.* **206**: 2675-2684.
- 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.
- Ingber D. (1991)** Integrins as mechanochemical transducers. *Curr.Opin. Cell. Biol.* **3**: 841-848.
- Ischia R., Lovisetti-Scamihorn P., Houge-Angeletti R., Wolkersdorfer M., Winkler H., Fischer-Colbrie R. (1997)** Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5HT 1B receptor antagonist activity. *J. Biochem. Chem.* **272**: 11657-11662.
- James P.H., Vorherr T., Carafoli E. (1995)** Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem. Sci.* **20**: 38-42.
- Janmey P.A. (1998)**. The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* **78**: 763-781.
- Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G. (2003)**. Ion selectivity of stretch-activated cation currents in mouse ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* **446** (2):220-231.
- Kamkin A., Kiseleva I., Wagner K.D., Scholz H., Theres H., Kazanski V., Lozinsky I., Gunther J., Isenberg G. (2001)**. Mechanically induced potentials in rat atrial fibroblasts depend on actin and tubulin polymerisation. *Pflügers Arch.* **442** :487-497.
- Katz A.M. (2000)** Cytoskeletal abnormalities in the failing heart: out on a LIM? *Circ.* **101**: 2672-2673.
- Kelly R.A., Balligan JL., Smith T. (1996)** Nitric Oxide and Cardiac Function. *Circ Res* **79**: 363-380.

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.

Liang F., Dillen L., Zhang X.Y., Cohen E.P., Angeletti R.H., Claeys M., De Potter W. P. (1996) Vasostatin, N-terminal products of chromogranin A, are released from the stimulated calf spleen. *Acta. Physiol. Scand.* 135: 23-30.

Liao G. and Gundersen G.G (1988) Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of deetyrosinated tubulin and vimentin. *J. Biol. Chem.* 273: 9797-9803.

Lillie S. and Brown S. (1992) Suppression of a myosin defect by a kinesin related gene. *Nature.* 356: 358-361.

Lugardon K., Chasserot-Golaz S., Kieffer A.E., Maget-Dana R., Nullans G., Kieffer B., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal Chromogranin A-(47-66)-derived peptides. *J.Biol.Chem.* 276: 35875-35882.

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.

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.

- Malan D., Gallo M.P., Bedendi I., Biasin C., Levi R.C., Alloatti G. (2003)** Microtubules mobility affects the modulation of L-type I(Ca) by muscarinic and beta-adrenergic agonists in guinea-pig cardiac myocytes. *J Mol Cell Card.* **35**: 195-206
- Maniatis N.A., Brovkovch V., Allen S.E., John T.A., Shajan N., Tiruppathi C., Vogel S.M., Skidgel R.A., Malik A.B., Minshall D. (2006)** Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circ. Res.* **99**: 870-877.
- Maniotis A.J., Chen C.S., Ingber D.E. (1997)** Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl.Acad. Sci.* **94**: 849-854.
- Martens G.J. (1988)** Cloning and sequence analysis of human pituitary cDNA encoding the novel polypeptide 7B2. *FEBS Letters* **234**: 160-164.
- Mazza R., Mannarino C., Imbrogno S., Barbieri S.F., Adamo C., Angelone T., Corti A., Tota B. (2006)** Crucial role of cytoskeleton reorganization in the negative inotropic effect of chromogranin A-derived peptides in eel and frog hearts. *Reg. Pept. In press*
- Mermall V., Post P.L., Mooseker M.S. (1998)** Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**: 527-533.
- Metz- Boutigue M.H., Lugardon K., Goumon Y., Raffner R., Strub J.M., Aunis D., (2000)** Antibacterial and antifungal peptides derived from chromogranins and proenkephalin-A. From structural to biological aspects". *Adv. Exp. Med. Biol.* **482**: 299-315.
- Metz-Boutigue M.H, Kieffer A.E., Goumon Y., Aunis D. (2003).** Innate immunity: involvement of new neuropeptides. *Trends Microbiol.* **11**(12): 585-92.
- 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.

Narita A, Takeda S, Yamashita A, Maeda Y. (2006) Related Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *EMBO J.*

Natori, S. and 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.

O'Connor and Frigon R.P. (1981) Chromogranin A, the major vesicle soluble protein. *J. Biol. Chem.* 259: 3237-3247.

O'Connor D.T. (1983) Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide producing endocrine glands. *Regul. Pept.* 6: 263.

O'Connor D.T. and Bernstein K. (1984) Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *New Engl. J. Med.* 311: 764-770.

O'Connor D.T., Burton D. Deftos I.J. (1983) Immunoreactive chromogranin A in diverse polypeptide hormone producing tumours and normal endocrine tissues. *J. Clin.Endocrinolog. Met.* 57: 1084-1086.

Olmsted J.B. (1986) Microtubule-associated proteins. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 2: 421-457.

Pelkmans L., Kartenbeck J., Helenius A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell. Biol.* 3: 473-483.

Pelkmans L. and Helenius A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3: 311-320.

- 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.
- Pollard T.D., Doberstein S.K., Zot H.G. (1991) Myosin-I. *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 653-681.
- Quian J., Hickey W.F. Angeletti R.H. (1988) Neuroendocrine cells in intestinal lamina propria. Detection with antibodies to chromogranin A. *J. Neuroimmunol.* **17** : 159-165.
- Rappaport L. and Samuel J.L. (1988) Microtubules in cardiac myocytes. *Int. Rev. Cyto.* **113**: 101-143.
- Rasenik M.M., Stein P.J., Bitensky M.W. (1981) The regulatory subunit of adenylate ciclase interacts with cytoskeletal components. *Nature* **294**: 560-562.
- Rasenik M.M., Wang N., Yan K. (1990) Specific association between tubulin and G proteins: participation of cytoskeletal elements in cellular signal transduction. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **24**: 381-386.
- Rassier D.E. and Herzog W. (2004). Active force inhibition and stretch-induced force enhancement in frog muscle treated with BDM. *J. Appl. Physiol.* **97**(4):1395-1400.
- 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.
- Rogers S.L., Gelfand V.I. (2000). Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* **12**:57-62.
- 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.

- Rouslahti E. and Pierschbacher M.D. (1986) Arg-Gly-Asp: aversatile cell recognition signal. *Cell* 44: 517-518.
- Russel J., Gee P., Liu S.M. Angeletti R.H. (1994) Inhibition of parathyroid hormone secretion by aminoterminal chromogranin peptides. *Endocrinol*. 135: 337-342.
- Saez J.C., Berthoud V.M., Branes M.C., Martinez A.D., Beyer E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*. 83(4):1359-1400.
- Samuel J-L., Corda S., Chassagne C., Rappaport L. (2000) The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Failure Rev*. 5: 239-250.
- Sato H., Nagai T., Kuppuswamy D., et al., (1997) Microtubule stabilization in pressare overload cardiac hypertrophy. *J. Cell. Biol*. 139: 963-973.
- Schliwa M. (1987) The Cytoskeleton: An Introductory Survey. Vienna: Sprinter-Verlag.
- Seidah N.G and Chretien M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generatine diverse bioactive polypeptides. *Brain Research* 848: 45-62.
- Serck-Hanssen G. and O' Connor D.T. (1984) Immunological identification and characterization of chromogranins coded by poly(A) mRNA from bovine adrenal medulla and pituitary gland and human phaeochromocytoma. *J. Biol. Chem*. 259: 11597-11600.
- Seternes T., Oynebraten I., Sorensen K. Smedsrod B. (2001) Specific endocytosis and catabolism in the scavenger endothelial cells of cod (*Gadus morhua L.*) generate high-energy metabolites. *J. Exp. Biol*. 204 : 1537-1546.
- Shah A.M. and MacCarthy P.A. (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther* 86: 49-86.
- Shaper J. and Kostin S. (2000). Preface: the cytoscheleton and associated proteins in hypertrophy and heart failure. *Heart Failure Rev*. 5:185.

Shattil and Brugge (1991) Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive function of platelets. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **3**: 869-879.

Smith W.J. and Kirshner N. (1967) A specific soluble protein from the catecholamine storage vesicles of bovine adrenal medulla. Purification and chemical characterization. *Mol. Pharmac.* **3**:52-62.

Smith W.J. and Winkler N. (1967) Purification and properties of an acidic protein from chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* **103**: 483-492.

Solowska J. Guan J.L Marcantonio E.E., Trevithick J.E Buck C.A., Hynes R.O. (1989) Expression of normal and mutant avian integrin subunits in rodent cells. *J.Cell.Biol.* **109**: 853-861.

Sun Y.B., Lou F., Edman K.A. (1995). The effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on the force-velocity relation in single muscle fibres of the frog. *Acta Physiol. Scand.* **153**: 325-34.

Tesi C., Colomo F., Piroddi N., Poggesi C. (2002). Characterization of the cross-bridge force-generating step using inorganic phosphate and BDM in myofibrils from rabbit skeletal muscles. *J. Physiol.* **541**: 187-99.

Titus MA. (2006) Myosin I and actin dynamics: the frogs weigh in. *Dev Cell.* **11**: 594-595.

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

Traub P. (1995) Intermediate filaments and gene regulation. *Physiol. Chem. Phys. Med.* **27**: 377-400.

Undrovinas A.J., and Maltsev V.A. (1998) Cytochalasin-D alters kinetics of Ca^{2+} transient in rat ventricular cardiomyocytes: an effect of altered actin cytoskeleton? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**: 1665-1770.

Upla P., Marjomaki V., Kankaanpaa P., Ivaska J., Hyypia T., Van Der Goot F.G., Heino J. (2004) Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 625-36.

- Vesely D.L., Hoffman B., Lieberman D.A. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling mediates interleukin-6 protection against p53-induced apoptosis in M1 myeloid leukemic cells. *Oncogene In press*.
- Wang N., Butler J.P., Ingber D.E. (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**: 1124-1127.
- Wang Y.G., Samarel A.M., Lipsius S.L. (2000 a) Laminin acts via beta 1 integrin signalling to alter cholinergic regulation of L-type Ca(2+) current in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* **526** :57-68.
- Wang Y.G., Samarel A.M., Lipsius S.L. (2000 b) Laminin binding to beta1-integrins selectively alters beta1- and beta2-adrenoceptor signalling in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* **527** :3-9.
- Watkinson A., Jonsson A.C., Davison M. et al. (1991) Heterogeneity of chromogranin-A derived peptides in bovine gut, pancreas and adrenal medulla. *Biochem. J.* **276**: 471-479.
- Watson A.J., Levine S., Donowitz M., Montrose M.H. (1992). Serum regulates Na⁺/H⁺ exchange in Caco-2 cells by a mechanism which is dependent on F-actin. *J. Biol. Chem.* **267**: 956-962
- Watson P.A.. (1991) Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *FASEB J.* **5**:2013-2019
- Winkler H. and Fischer-Colbrie R. (1992) The chromogranin A and B : the first 25 years and future perspectives. *Neurosc.* **49**: 479-528.
- Wu H.J., Rozansky D.J., Parmer R.J., Gill B.M., O'Connor D.T. (1991) Structure and function of the chromogranin A gene. *J. Biol. Chem.* **266**: 13130-13134.
- Wu H.J., Rozansky D.J., Parmer R.J., Gill B.M., O'Connor D.T. (1991) Structure and function of the chromogranin A gene. Clues to evolution and tissue specific expression. *J. Biol. Chem.* **266**:13130-13134.
- Xiao S., McLean J., Robertson J. 2006 Neuronal intermediate filaments and ALS: A new look at an old question. *Biochim Biophys Acta*.

- Yagi N., Takemori S., Watanabe m., Horiuti k., Amemiya Y. (1992) Effects of 2,3-Butanedione 2-monoxime on contraction of frog skeletal muscles: an X-ray diffraction study. *J.Muscle Res Cell Motil.* **13**: 153-160.
- 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. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.
- Yoshie S., Hagn C., Ehrhart M., Fischer-Colbrie R., Grube D., Winkler H. Gratzl M. (1987) Immunological characterization of chromogranins A and B and secretogranin II in bovine pancreatic islets. *Histochemistry.* **87**: 99-106.
- Zhao L., Naber N., Cooke R. (1995) Muscle cross-bridges bound to actin are disordered in the presence of 2,3-butanedione monoxime. *Biophys J.* **68**:1980-1990.
- Zigmond S.H. (1996) Signal transduction and actin filament organization. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**: 66-73.

Un sentito ringraziamento rivolgo al Ch.mo Prof. Bruno Tota per avermi consentito di svolgere questo lavoro di ricerca presso il Laboratorio di Fisiologia Organismale da lui diretto, nonché all'intero gruppo con cui ho condiviso in amicizia questi anni di dottorato.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.^{ssa} Sandra Imbrogno per il prezioso supporto scientifico, la sua disponibilità e le manifestazioni di stima ricevute nel corso di questi tre anni.