



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra - DiBEST

Scuola di dottorato "Life Sciences"

Dottorato di Ricerca in "Biologia Animale"

(XXVI ciclo)

Settore scientifico disciplinare Bio/09

***Ruolo di GPER sulla funzione cardiovascolare
in condizioni di ipertensione:
caratterizzazione fisiologica del recettore
in Ratti Spontaneamente Ipertesi (SHR)***

Direttore

Prof. Marcello Canonaco

Supervisore

Dott. Tommaso Angelone

Supervisore esterno

Prof. Marcello Maggiolini

Coordinatore

Prof.ssa Maria Carmela Cerra

Dottoranda

Dott.ssa Ernestina Marianna De Francesco

Anno Accademico 2012/2013

Indice

❖ Summary	i
❖ Premessa.....	ii
❖ Capitolo primo: “Introduzione”	1
1.1 Patologie cardiovascolari: l’ipertensione arteriosa	1
1.2 Azioni degli estrogeni sul sistema cardiovascolare	4
1.3 I recettori estrogenici: ER e GPER	8
1.3.1 Il recettore estrogenico (ER)	8
1.3.2 Il recettore estrogenico GPR30/GPER	15
1.4 Il fattore di trascrizione HIF-1	18
1.5 Il fattore di crescita del tessuto connettivo CTGF	20
1.6 Scopo della tesi	22
❖ Capitolo secondo: “Materiali e metodi”	23
2.1 Metodica Langendorff	23
2.1.1 Animali	23
2.1.2 Apparato di perfusione.....	24
2.1.3 Dissezione, isolamento e incannulazione del cuore	25
2.1.4 Misurazione dell’attività contrattile del cuore	26
2.1.5 Perfusione e composizione del perfusato	27
2.1.6 Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri	28
2.1.7 Parametri dell’attività cardiaca	28

2.2 Estrazione dell'RNA e RT Real-Time PCR	30
2.3 Western blotting	31
Protocolli sperimentali	32
2.4 Sostanze chimiche	32
2.4.1 Cuore isolato	32
2.4.2 Estrazione dell'RNA e RT Real-time PCR	33
2.4.3 Western blotting	33
2.5 Condizioni basali di perfusione	34
2.6 Curve dose-risposta di G-1	34
2.7 Preparati stimolati in presenza di G-15	35
2.8 Coinvolgimento di eNOS	35
2.9 Preparati stimolati dall'ipossia	35
3 Analisi statistica	35
❖ Capitolo terzo: “Risultati”	36
3.1 L'espressione di GPER è maggiore nei ventricoli di ratto SHR rispetto ai ventricoli di ratto WKY	36
3.2 GPER media effetti inotropi e lusitropi negativi nei ratti WKY e SHR	39
3.3 Meccanismi trasduzionali coinvolti negli effetti indotti da G-1	43
3.4 L'espressione di HIF-1 α e CTGF è maggiore nei cuori di ratto SHR rispetto ai cuori di ratto WKY	45
3.5 L'ipossia induce l'espressione di HIF-1 α , GPER e CTGF nei cuori di ratto WKY	46
3.6 Il <i>pathway</i> trasduzionale GPER/eNOS regola l'espressione di HIF-1 α e CTGF	48
❖ Capitolo quarto: “Discussione”	50

❖ Capitolo quinto: “Conclusioni e prospettive”	54
❖ Bibliografia	56

Summary

Estrogens promote beneficial effects in the cardiovascular system mainly through the estrogen receptor (ER) α and ER β , which act as ligand-gated transcription factors. Recently, the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) has been implicated in the estrogenic signaling in diverse tissues, including the cardiovascular system. In this study, we demonstrate that left ventricles of male Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) express higher levels of GPER compared to normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats. In addition, we show that the selective GPER agonist G-1 induces negative inotropic and lusitropic effects to a higher extent in isolated and Langendorff perfused hearts of male SHR compared to WKY rats. These cardiotropic effects elicited by G-1 involved the GPER/eNOS transduction signaling, as determined by using the GPER antagonist G-15 and the eNOS inhibitor L-NIO. Similarly, the G-1 induced activation of ERK1/2, AKT, GSK3 β , c-Jun and eNOS was abrogated by G-15, while L-NIO prevented only the eNOS phosphorylation. In hypoxic Langendorff perfused WKY rat heart preparations, we also found an increased expression of GPER along with that of the hypoxic mediator HIF-1 α and the fibrotic marker CTGF. Interestingly, G-15 and L-NIO prevented the ability of G-1 to down-regulate the expression of both HIF-1 α and CTGF, which were found expressed to a higher extent in SHR compared to WKY rat hearts. Collectively, the present study provides novel data into the potential role played by GPER in hypertensive disease on the basis of its involvement in myocardial inotropism and lusitropism as well as the expression of the apoptotic HIF-1 α and fibrotic CTGF factors. Hence, GPER may be considered as a useful target in the treatment of some cardiac dysfunctions associated with stressful conditions like the essential hypertension.

Premessa

Gli estrogeni sono ormoni steroidei ubiquitari coinvolti nella regolazione di importanti azioni biologiche di crescita e differenziazione in numerosi tessuti bersaglio (1). Nelle donne in età fertile, la produzione fisiologica di estrogeni garantisce un'evidente attività di protezione nei confronti dell'apparato cardiovascolare, grazie alla capacità di tali ormoni di regolare una varietà di fattori sistemici e circolatori. Nonostante diversi studi documentino che le azioni mitogene esercitate dagli estrogeni svolgono un ruolo critico nell'eziopatogenesi e nella progressione di alcuni tumori come quello mammario e ovarico (2,3), il 17 β -estradiolo (E2) è frequentemente utilizzato nelle donne in età post-menopausale con ridotte concentrazioni ormonali per prevenire e trattare alcuni tipi di patologie che colpiscono il distretto cardiovascolare, in virtù delle sue azioni cardioprotettive (4). Gli estrogeni esercitano i loro effetti biologici principalmente mediante in legame al recettore estrogenico (ER) α e β , fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari, caratterizzati da una struttura altamente conservata e da meccanismi comuni nell'induzione della trascrizione genica (5). Oltre al classico ER, negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato in diversi modelli sperimentali che gli estrogeni possono esercitare azioni alternative di tipo rapido interagendo con recettori localizzati a livello della membrana plasmatica; fra questi un crescente interesse è rivolto verso il recettore orfano accoppiato a proteina G GPR30, anche denominato GPER (6-8). GPER è una proteina di 38kDa strutturalmente non correlata al recettore steroideo ER che presenta la tipica struttura eptaelica di un recettore accoppiato a proteine G. GPER è espresso in diversi tessuti responsivi agli estrogeni ed è coinvolto negli effetti rapidi indotti dalla stimolazione ad opera di estrogeni e composti ad attività simil-estrogenica (7, 9-19). L'attivazione di GPER può determinare mobilitazione di Ca⁺⁺, generazione di nitrossido, attivazione delle ERK/MAPK, ma anche cambiamenti nell'espressione genica (9-19). Inoltre, GPER rappresenta uno dei fattori coinvolti nelle risposte adattative all'ipossia in diversi contesti cellulari (20,21). L'ipossia, cioè la riduzione dell'apporto di O₂ di circa il 7% osservata rispetto ai tessuti sani e ben vascolarizzati, è una caratteristica comune delle patologie cardiovascolari, infatti essa

svolge un ruolo cruciale nella patogenesi di due tra le più gravi malattie per l'uomo come l'infarto del miocardio e l'ictus (22). Le risposte all'ipossia sono mediate dal fattore di trascrizione HIF-1, formato dalla subunità beta, costitutivamente espressa e dalla subunità alfa, espressa in funzione della tensione di ossigeno (23). In condizioni di ridotta tensione di ossigeno, HIF-1 α è stabilizzato, si accumula, trasloca nel nucleo e dimerizza con la subunità HIF-1 β , formando il complesso HIF-1 trascrizionalmente attivo che lega elementi responsivi all'ipossia (Hypoxia responsive elements) HREs presenti nella regione promoter di geni target (24). Abbiamo recentemente dimostrato che HIF-1 α regola l'espressione di GPER in condizioni di stress quali la ridotta tensione di ossigeno in cellule tumorali mammarie e nei cardiomiociti (20). Oltre a rappresentare un importante fattore nella risposta all'ipossia, GPER è coinvolto nella mediazione degli effetti degli estrogeni anche a livello cardiovascolare (25), laddove tale recettore, in collaborazione con il classico ER, partecipa alla regolazione delle risposte inotropiche e lusitropiche negative indotte dall'estradiolo in ratti maschi (26). È stato inoltre recentemente proposto un ruolo per GPER nella regolazione della pressione arteriosa e nella prevenzione di disfunzioni diastoliche associate ad ipertensione in ratti femmine mREN2Lewis affette da ipertensione (27) e in ratti femmine in cui l'ipertensione è stata indotta da un'alimentazione ricca in sali (28). Tuttavia, il potenziale ruolo svolto da GPER nell'ipertensione essenziale e nel rimodellamento cardiaco non è stato ancora completamente caratterizzato. Pertanto, scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare il ruolo svolto da GPER nella regolazione cardiovascolare in condizioni fisiopatologiche, utilizzando come modelli di studio i ratti normotesi (WKY) e ipertesi (SHR). L'attenzione è stata poi focalizzata sulle vie del segnale innescate dall'attivazione di GPER, sul suo attivatore trascrizionale HIF-1 α e sul suo target molecolare CTGF (fattore di crescita del tessuto connettivo), al fine di identificare nuovi meccanismi da considerare nel trattamento farmacologico dell'ipertensione primaria.

Capitolo Primo

Introduzione

1.1 Patologie cardiovascolari: l'ipertensione arteriosa

Le patologie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità in tutto il mondo (29). È stato stimato che negli Stati Uniti un terzo della popolazione adulta è affetto da malattie cardiovascolari e a partire dai quarantanni il rischio di sviluppare tali patologie è pari al 49% per gli uomini e al 32% per le donne (30). Nonostante i progressi effettuati nei trattamenti farmacologici e chirurgici abbiano consentito di ridurre la mortalità da patologie cardiovascolari, il rischio di presentare ulteriori eventi cardiaci, tra cui l'angina instabile e l'infarto del miocardio, rimane sostanzialmente invariato (29). Pertanto, la spesa economica globale per le patologie cardiovascolari si assesta solo negli Stati Uniti a centootto bilioni di dollari ogni anno, che comprendono i costi dovuti ai servizi sanitari, ai trattamenti farmacologici e alla mancata produttività (31). Per queste ragioni, l'identificazione dei fattori coinvolti nell'insorgenza delle malattie cardiovascolari rappresenta un valido strumento non solo nella prevenzione ma anche nel trattamento dei pazienti affetti da queste patologie. A tale riguardo, studi condotti attraverso la meta-analisi di osservazioni epidemiologiche hanno consentito di dimostrare una relazione lineare tra i livelli di pressione arteriosa (PA) e il rischio di eventi cardio e cerebro-vascolari, per valori di PA superiori ai 115/70 mmHg (32). Inoltre, i dati provenienti da 61 studi effettuati su un milione di individui non affetti inizialmente da patologie cardiovascolari hanno dimostrato una mortalità raddoppiata dovuta ad infarto del miocardio per ogni incremento di pressione sistolica pari a 20-mmHg e per ogni incremento di pressione diastolica pari a 10 mmHg (33). Estendendo ulteriormente queste osservazioni, l'analisi sistematica dei dati provenienti da 146 *trial* sul trattamento dell'ipertensione ha consentito di stimare che la

riduzione di 10 mmHg di pressione sistolica e 5 mmHg di pressione diastolica sono in grado di ridurre del 20% le malattie coronariche in un anno (34).

L'ipertensione arteriosa è convenzionalmente definita come la persistenza di valori di pressione arteriosa (PA) di almeno 140/90 mmHg (35), in corrispondenza dei quali il paziente presenta un rischio di sviluppare malattie cardiovascolari correlate all'ipertensione abbastanza elevato, tanto da meritare un trattamento farmacologico mirato (36) (tabella 1.1).

Nazione	% ipertesi diagnosticati	% ipertesi trattati	% valori ottimali
USA	69,3	52,5	54,5
Canada	63,2	36,4	47,3
Inghilterra	35,8	24,4	40,3
Italia	51,8	32	28,1
Germania	36,5	26,1	29,9
Svezia	48	26,2	21
Spagna	38,9	26,8	18,7

Tabella 1.1 Schematizzazione delle percentuali di popolazione normotesa, ipertesa e sottoposta a trattamento antipertensivo in Europa, Canada e USA

L'ipertensione arteriosa si verifica quando si altera la relazione tra la gittata cardiaca e le resistenze periferiche totali, determinando una de-regolazione dei livelli di PA di cui sono responsabili una varietà di fattori di natura genetica, ambientale e demografica. L'ipertensione primitiva o essenziale ha un'eziologia ignota, tuttavia è improbabile che le diverse alterazioni emodinamiche e fisiopatologiche che la caratterizzano derivino da una singola causa. Infatti, in questa patologia giocano un ruolo chiave diversi fattori ambientali (apporto esogeno di Na⁺, obesità, stress) e ormonali, che sembrano agire soltanto in persone geneticamente predisposte. A causa della stretta correlazione fra pressione arteriosa ed eventi cardiovascolari sfavorevoli, il JNC7 (*Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*) e le Linee Guida ESC-ESH 2007/2009 (*European Society of Cardiology-*

European Society of Hypertension, Guidelines Committee, 2007) raccomandano una PA inferiore a 140/90 mmHg nei pazienti ipertesi senza altre patologie in atto, e di PA inferiore a 130-135/80-85 mmHg nei pazienti con 3 o più fattori di rischio cardiovascolare o affetti da diabete mellito, sindrome metabolica, danno d'organo, malattia cardiovascolare o renale conclamata. Considerata l'elevata incidenza epidemiologica dell'ipertensione essenziale e delle patologie ad essa correlate, risulta fondamentale la comprensione dei meccanismi coinvolti nella sua regolazione e dei fattori in grado di promuovere un'efficace protezione cardiovascolare dallo stress pressorio, quale quella offerta dagli ormoni estrogenici e in particolare dal 17 β -estradiolo (E2). In tale contesto, numerosi studi di natura epidemiologica hanno suggerito un differente controllo della PA tra individui di sesso maschile e individui di sesso femminile (37) (Fig. 1.1).

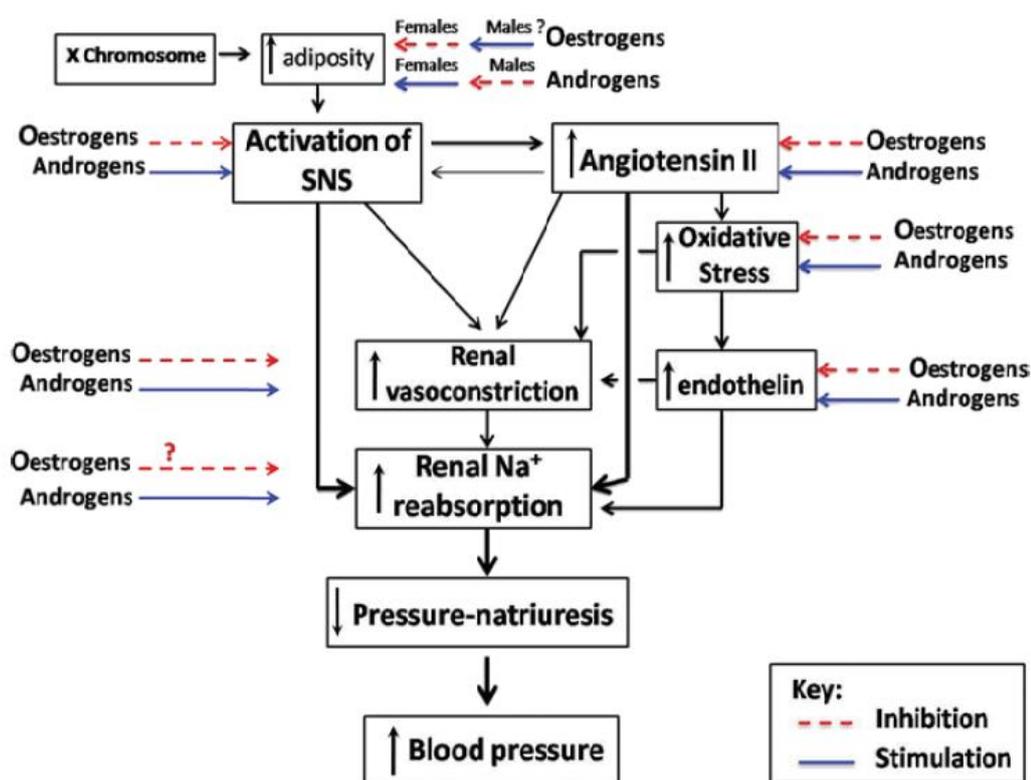


Fig. 1.1 Schema esemplificativo dei probabili meccanismi alla base degli effetti regolatori genetici e ormonali alla base del controllo della PA nei due sessi.

In particolare, in ratti normotesi, il trattamento cronico con il noto agente ipertensivante angiotensina II (AngII) determina un incremento della pressione arteriosa maggiore nei maschi rispetto alle femmine (38). Inoltre, i ratti maschi rispondono con un maggiore

incremento della pressione arteriosa se alimentati con una dieta ricca in sali (38). I meccanismi alla base del differente controllo della PA tra i due sessi non sono ancora stati completamente chiariti, tuttavia sembrano essere coinvolti fattori sia di natura ormonale che genetica, i quali agiscono a più livelli per regolare la PA (Fig. 1.1) (37). È stato difatti dimostrato che gli estrogeni possono partecipare alla regolazione della pressione arteriosa e possono indurre globali effetti protettivi a livello cardiovascolare.

1.2 Azioni degli estrogeni sul sistema cardiovascolare

Gli estrogeni sono i più importanti ormoni sessuali femminili ed esercitano azioni fisiologiche fondamentali per la crescita e la differenziazione di diversi tessuti bersaglio (1). Vengono sintetizzati nelle cellule della granulosa delle ovaie nelle donne e nelle cellule del Sertoli negli uomini. Il 17β -estradiolo (E2) rappresenta il più abbondante estrogeno prodotto nelle donne in età pre-menopausale, mentre l'estrone è prevalentemente prodotto nel periodo post-menopausale e i livelli di estriolo sono maggiormente incrementati durante la gravidanza.

Oltre ad essere i principali protagonisti dell'attività funzionale dell'apparato riproduttivo femminile (39), gli estrogeni svolgono diverse azioni anche su altri organi e apparati:

- favoriscono lo sviluppo del sistema scheletrico e riducono il rischio di fratture ossee, in quanto responsabili della chiusura delle epifisi; aumentano il rilascio di vitamina D nel rene e riducono la velocità di riassorbimento osseo, antagonizzando gli effetti del paratormone (PTH) (40);
- mantengono intatte le normali strutture della pelle (41);
- aumentano la sintesi epatica di proteine di legame e di trasporto (42);
- hanno azione neuroprotettiva e influenzano alcuni centri regolatori del cervello, come il centro di controllo della temperatura corporea (43);
- hanno importanti effetti cardioprotettivi (44).

La sintesi di E2, il più importante rappresentante di questa classe di ormoni, avviene a partire dal colesterolo (Figura 1.2). Questo viene trasformato in androstenedione, attraverso una serie di tappe catalizzate da enzimi specifici, nelle cellule tecali dell'ovaio, per poi essere trasportato all'interno delle cellule granulose, dove è presente l'enzima aromatasi. Questa proteina microsomiale, appartenente alla superfamiglia dei citocromi P-450, trasforma l'androstenedione in estrone, successivamente convertito in E2 ad opera

dell'enzima 17 β -idrossisteroide deidrogenasi (Figura 1.2). Infatti, l'aromatasi rappresenta uno dei principali bersagli nel trattamento dei tumori estrogeno responsivi in quanto è anche in grado di catalizzare la reazione di aromatizzazione del testosterone per sintetizzare E2 (45).

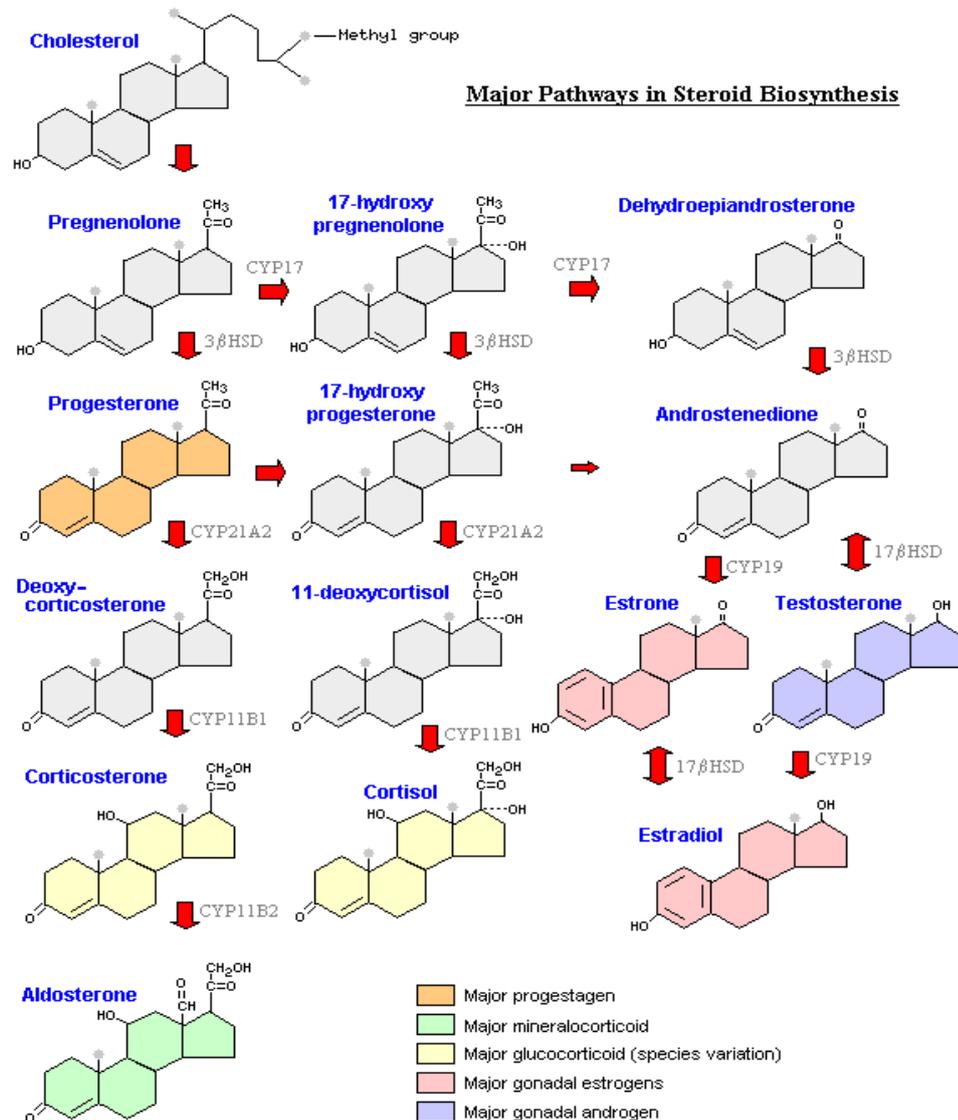


Fig. 1.2 Schema esemplificativo della via biosintetica degli estrogeni

Considerevoli evidenze sperimentali sia in modelli animali che umani hanno rivelato l'importanza degli estrogeni nella fisiologia cardiovascolare (4). In particolare, dati clinici ed epidemiologici hanno consentito di caratterizzare come protettivo il ruolo dell'E2 sia a livello cardiaco che vascolare (4), grazie alla capacità di tale ormone di esercitare effetti

benefici sul metabolismo lipidico, di ridurre lo stress ossidativo, di favorire azioni fibrinolitiche (46-48) e di ridurre le aritmie ventricolari e l'area infartuale (46-48). In particolare, gli estrogeni possono esercitare azioni dirette e specifiche sul cuore e sulle cellule della parete vascolare, oppure azioni indirette che coinvolgono il metabolismo dei lipidi, il processo della coagulazione e la regolazione di proteine vasoattive (46,50).

A tale riguardo è stato dimostrato che gli estrogeni sono in grado di migliorare il profilo dei lipidi ematici, contrastando l'insorgenza dell'aterosclerosi, attraverso la normalizzazione dei livelli di colesterolo totale, l'aumento del colesterolo HDL (*high density lipoprotein*) e moderatamente dei trigliceridi e la riduzione del colesterolo LDL (*low density lipoprotein*) e della lipoproteina (a) (42). Oltre a regolare le concentrazioni plasmatiche dei lipidi, gli estrogeni sono in grado di modulare l'espressione dell'enzima chiave per la sintesi del colesterolo endogeno HMG-CoA reduttasi (3-idrossi-3-metilglutaril-CoA reduttasi) e dei recettori epatici delle LDL (42). Gli estrogeni sono molto utili nel contrastare l'aterosclerosi non solo grazie agli effetti mediati sul metabolismo lipidico, ma anche per la loro capacità di inibire l'espressione di molecole di adesione VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 da parte dei leucociti e dunque la loro interazione con i recettori endoteliali (50). Infatti l'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare e la loro migrazione nella tonaca intima è uno degli *step* principali nella formazione della placca aterosclerotica.

L'E2 ha anche rilevanti effetti protettivi sullo stress cellulare grazie alle sue note azioni antiossidanti (51), difatti deficit estrogenici nelle donne in menopausa sono responsabili dell'incremento dello stress ossidativo (51).

Fra le altre azioni protettive, gli estrogeni regolano la contrattilità, riducono il danno cardiaco da ischemia e riperfusione (I/R), prevengono l'ipertrofia cardiaca e regolano il tono vascolare (52-53). In particolare, nelle donne in post-menopausa la somministrazione di preparati estrogenici riduce la concentrazione plasmatica di renina e dell'enzima di conversione dell'angiotensina (54); è ridotta anche l'espressione del recettore AT1 per l'angiotensina II (55). E2 è anche un agente vasodilatatore capace di incrementare la produzione di ossido nitrico (NO), attraverso l'attivazione della nitrossido sintasi endoteliale (eNOS) (56), complesso enzimatico che catalizza la conversione dell'arginina in citrullina con formazione di NO. Inoltre, E2 può anche determinare un incremento

rapido dei livelli di NO a causa della sua capacità di incrementare i livelli di Ca^{2+} intracellulare, un importante cofattore dell'eNOS.

Gli estrogeni sono anche in grado di down-regolare l'espressione dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), contribuendo ad attenuare la sintesi di AngII, mentre E2 incrementa la sintesi di ACE2, l'enzima prevalentemente responsabile della sintesi del peptide ad azione vasodilatatoria Angiotensina (1-7) (57).

Aggiungiamo, inoltre, che l'effetto vasodilatatore degli estrogeni può prescindere dalla presenza dell'endotelio: sulle cellule muscolari lisce, E2 attiva i canali del potassio Ca^{2+} -dipendenti e, a concentrazioni elevate, è anche in grado di inibire i canali del calcio di tipo L, favorendo così il rilassamento vascolare (58,59). Come conseguenza degli effetti degli estrogeni sulla parete vascolare, la pressione arteriosa è inferiore nelle donne in premenopausa rispetto agli uomini, mentre con l'insorgere della menopausa la percentuale di casi di ipertensione è superiore nelle donne (60). È stato ampiamente riportato come l'effetto cardioprotettivo globale esercitato dagli estrogeni coinvolge non solo i cardiomiociti e la componente endoteliale, ma anche le cellule staminali cardiache; in particolare gli estrogeni giocano un ruolo fondamentale nella sopravvivenza delle cellule staminali e nella riparazione del danno cardiaco grazie al reclutamento di progenitori endoteliali derivati dal midollo osseo (61-63).

Gli effetti cardioprotettivi degli estrogeni sono in contrasto con quelli esercitati dagli androgeni, che nel genere femminile incrementano la mortalità cardiovascolare sia in condizioni fisiologiche che patologiche (64). Recenti studi di fisiologia integrata e biologia cellulare e molecolare hanno riconosciuto un rilevante ruolo per E2 nella fisiologia maschile e in particolare nell'omeostasi ossea, pituitaria, così come nella regolazione della funzione cardiovascolare (65,66). Anche in questo caso, la molteplicità degli effetti indotti dagli estrogeni nell'uomo comprende sia azioni cardiache che vascolari. In particolare, negli uomini in giovane età, l'inibizione dell'aromatasi determina un'alterata vasodilatazione dell'arteria brachiale (67), mentre l'assenza del recettore estrogenico (ER) α induce anomalie della vasodilatazione endoteliale e calcificazione dell'arteria coronarica (68,69). A conferma di ciò, simili effetti vascolari sono stati osservati anche in tipi *knockout* per l'aromatasi, in cui l'assenza di E2 ha determinato un'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente (70). È interessante sottolineare che l'infusione intracoronarica di E2 è in grado di attenuare la vasocostrizione coronarica indotta

dall'endotelina 1 (ET-1) (69); inoltre, negli uomini che presentano una variante genetica di ER α in cui si ha un'alterazione nei siti di legame per i fattori di trascrizione, si osserva un più elevato rischio di sviluppare infarto del miocardio (71). Occorre riportare anche che nel cuore di ratto maschio, il trattamento con E2 determina importanti azioni stabilizzanti come l'inotropismo e il lusitropismo negativi (26,72), due componenti cruciali del ciclo cardiaco, il cui corretto susseguirsi determina un'efficace attività meccanica del cuore. In tale contesto, la determinazione dei meccanismi molecolari attraverso cui gli estrogeni possono influenzare la meccanica contrattile cardiaca sia in condizioni fisiologiche che patologiche rappresenta un importante passo verso la comprensione delle azioni cardioprotettive esercitate da questi ormoni e verso l'individuazione di nuovi target terapeutici.

1.3 I recettori estrogenici: ER e GPER

1.3.1 Il recettore estrogenico (ER)

Gli estrogeni esercitano i loro molteplici effetti biologici attraverso due isoforme del recettore estrogenico (ER), ER α e ER β , che presentano azioni biologiche e distribuzioni tissutali distinte (5,73), ma sono in grado di legare gli estrogeni con la stessa affinità. Il gene ER α , localizzato sul cromosoma umano 6, codifica per una proteina costituita da 595 amminoacidi, con un peso molecolare di 66 KDa (74). Il gene ER β è posto sul cromosoma 14 e codifica per una proteina di 485 amminoacidi con un peso molecolare di 54 KDa (75-76). ER α è prevalentemente espresso nella mammella, nell'utero, nella cervice uterina e nella vagina (77). ER β è localizzato soprattutto nelle ovaie, nella prostata, nei testicoli, nella milza, nel polmone, nell'ipotalamo e nel timo (77-79).

A livello cardiovascolare entrambe le isoforme di ER mediano gli effetti cardioprotettivi esercitati dagli estrogeni: infatti sia ER α che ER β coinvolti nelle azioni inotropiche e lusitropiche negative indotte da E2 nel cuore di ratto maschio (26,72); tuttavia, ER α sembra prevalentemente essere coinvolto nella prevenzione della disfunzione endoteliale in corso di I/R, grazie alla sua azione specifica sui cardiomiociti, cellule endoteliali, cellule infiammatorie e cellule staminali (80). ER β è invece in grado di regolare il rimodellamento e ridurre l'ipertrofia cardiaca (81,82). ER è un fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari, caratterizzati da una struttura altamente conservata e da meccanismi comuni nell'induzione della trascrizione genica (5). Come tutti i recettori

per gli steroidi, ER presenta una struttura modulare caratterizzata dalla presenza di sei domini funzionali (A→F) indipendenti, ciascuno dei quali è responsabile dell'attivazione trascrizionale, del legame al DNA, della localizzazione e del trasporto nucleare, del legame con il ligando e della dimerizzazione recettoriale (83):

- **Il dominio di transattivazione amino-terminale (N-terminale) (regioni A/B):** è coinvolto negli eventi di interazione proteina-proteina e di attivazione della trascrizione dei geni target. Questo dominio contiene il sito con funzione di attivazione 1 (Activation function site 1, AF-1) e numerosi siti di fosforilazione (84-85). Il sito AF-1 lega, direttamente o attraverso una serie di co-attivatori/co-repressori, alcune delle proteine coinvolte nel processo di attivazione della trascrizione. Sebbene l'attivazione della trascrizione può avvenire anche quando AF-1 è legato esclusivamente al dominio di legame al DNA (DNA Binding Domain, DBD), l'attivazione completa della trascrizione avviene solo quando il sito AF-1 si trova vicino al sito AF-2, localizzato nel dominio di legame del ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD) (86). I siti AF-1 di ER α e ER β hanno scarsa omologia di sequenza aminoacidica.

- **Il dominio di legame al DNA (DNA Binding Domain, DBD) (regione C):** è coinvolto nel processo di dimerizzazione del recettore e nel legame a specifiche sequenze di DNA responsive agli estrogeni (*Estrogen Responsive Elements*, ERE). La sequenza aminoacidica di questo dominio è molto conservata nelle due isoforme recettoriali. Il dominio di legame al DNA ha una struttura tridimensionale globulare e contiene due α -eliche perpendicolari ad una terza (Fig. 1.3).

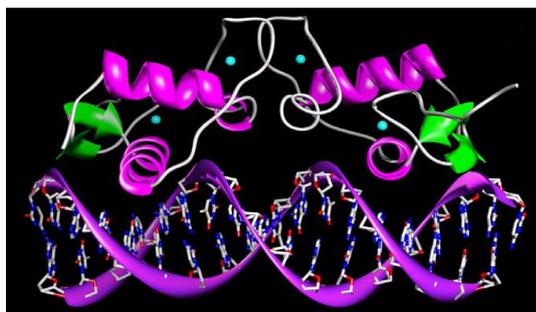


Figura 1.3 Rappresentazione tridimensionale dei DBD dell'omodimero, formato da due molecole recettoriali, legati al DNA. Le α -eliche e i β -foglietti del DBD sono rappresentati in magenta e verde, rispettivamente. Il recettore interpone una di queste α -eliche nel solco maggiore del DNA (rappresentato in viola) e arriva a sfiorare le basi azotate (rappresentate come bastoncini colorati diversamente a seconda del tipo di atomo), riconoscendo specifiche sequenze di DNA. Gli atomi di zinco sono rappresentati come sfere azzurre.

Queste 3 α -eliche racchiudono il core idrofobico del dominio e le due α -eliche perpendicolari formano due dita, stabilizzate dallo zinco, che legano il DNA (Figura 1.3). Il dominio di interazione con il DNA, inoltre, può essere diviso in due sub-domini: uno prossimale (P-box), coinvolto nella ricognizione del DNA, e uno distale (D-box), coinvolto nella dimerizzazione, DNA dipendente, di due molecole di recettore attivato dal ligando (86,87);

- **Il dominio “cerniera” (regione D):** presenta una serie di siti di acetilazione e la sequenza aminoacidica di questa regione varia molto nelle due isoforme di ER (1);
- **Il dominio carbossi-terminale (C-terminale) (regioni E/F):** contiene il dominio d'interazione con il ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD), il dominio AF-2 (*Activation function domain 2*) che ha un ruolo fondamentale nell'attivazione della trascrizione in seguito all'interazione con AF-1, il dominio di omo- ed etero-dimerizzazione e parte della regione di localizzazione nucleare. Questo dominio è, inoltre, coinvolto nel legame con le *Heat-shock proteins* (Hsp 70 e 90), proteine che hanno la funzione di mantenere il recettore in forma inattiva nel citoplasma quando questo non interagisce con il ligando (88). La struttura tridimensionale del LBD è costituita da una serie di α -eliche (H1-H11) che formano una struttura molecolare a forma di cuneo, con una cavità delle dimensioni opportune per consentire l'alloggiamento del ligando. All'esterno di questa struttura si trovano un foglietto β e un'altra α -elica (H12), che è necessaria per l'attivazione del recettore in seguito all'interazione con il ligando e contiene la sequenza critica per il funzionamento di AF-2. La sequenza aminoacidica del LBD è altamente conservata in entrambe le isoforme del recettore, perciò gli estrogeni sono in grado di legare ER α e ER β con identica affinità (89,90). ER α e ER β mostrano un'elevata omologia nella sequenza aminoacidica del DBD (91), mentre differiscono apprezzabilmente nel dominio N-terminale e nel dominio E (sito di legame del ligando) (92) (Fig. 1.3). Queste differenze suggeriscono che i due recettori potrebbero avere funzioni distinte, in termini di regolazione della trascrizione genica e di risposte biologiche, contribuendo alle azioni selettive del 17 β -estradiolo in diversi tessuti target.

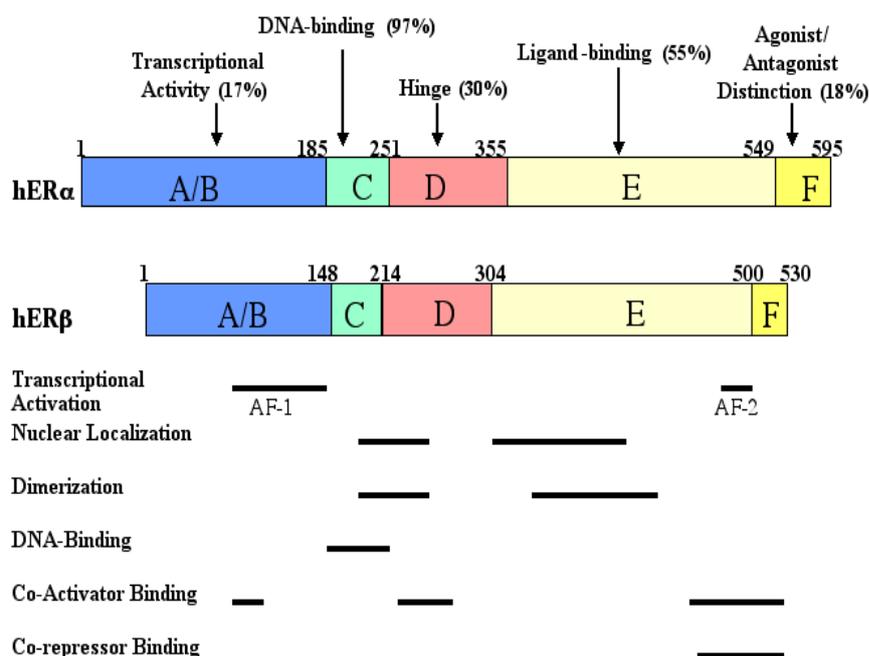


Fig. 1.4 I due sottotipi di ER, ER α e ER β , mostrano elevata omologia nel DBD, mentre presentano omologia inferiore nell'LBD. Queste differenze potrebbero essere in parte responsabili della specificità nel legame a diversi ligandi.

I segnali estrogenici sono mediati da ER attraverso l'attivazione di molteplici *pathways* trasduzionali che culminano nella regolazione dell'attività trascrizionale di geni target. ER modula la trascrizione genica attraverso meccanismi nucleari genomici ERE-dipendenti ed ERE-indipendenti, ma anche attraverso meccanismi extranucleari non genomici. La regolazione della trascrizione genica ad opera di ER può, inoltre, risultare non solo dall'azione di un agonista recettoriale, ma anche dall'attivazione di sistemi di segnale ad opera di fattori di crescita (93).

Infatti, l'interazione tra *pathways* indica che i meccanismi di trasduzione dei segnali estrogenici, genomico e non genomico, non sono mutuamente esclusivi (94), suggerendo l'esistenza di un *cross talk* funzionale tra estrogeni e fattori di crescita (Fig. 1.5).

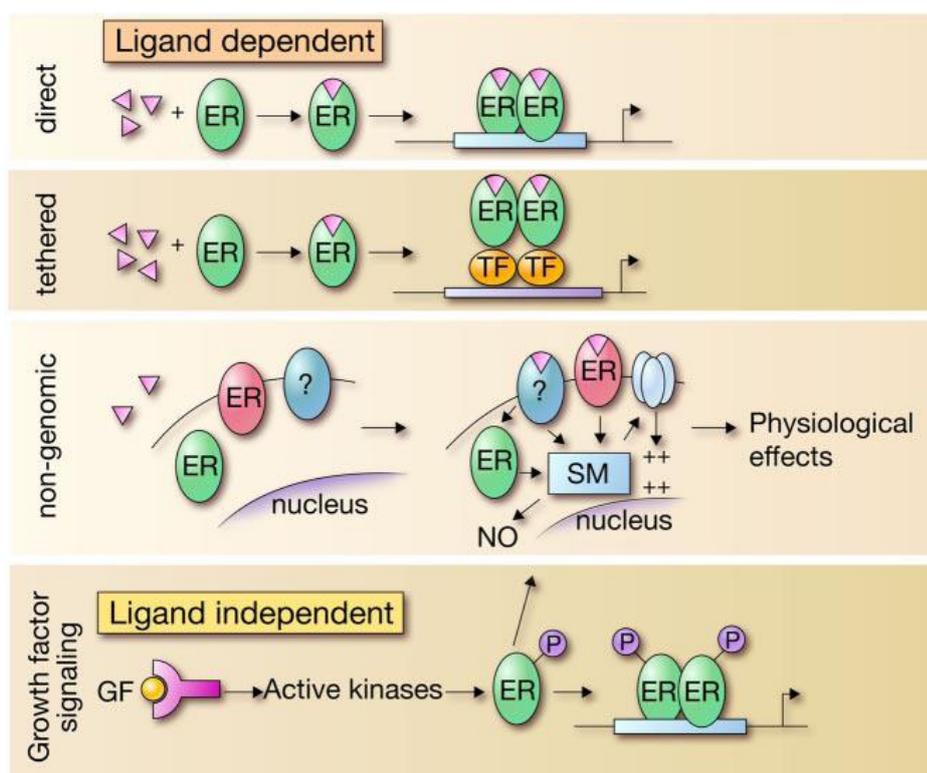


Figura 1.5 Meccanismi di attivazione del recettore estrogenico

Poiché il recettore estrogenico appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari, come tutti i recettori steroidei è localizzato in forma inattiva nel citoplasma sotto forma di eterooligomero, costituito da due molecole di recettore e due molecole delle *Heat shock proteins* (Hsp90, Hsp70, Hsp56). Tali proteine mantengono il recettore in forma inattiva, lo preservano dall'azione degradativa delle proteasi citosoliche e sono coinvolte nel trasporto del recettore dai siti citoplasmatici ai siti nucleari, mediante interazione con proteine della rete microtubulare (95). Secondo il classico meccanismo d'azione genomico, il legame di ER con il ligando naturale 17β -estradiolo induce il distacco del recettore dalle Hsps. Il complesso E2-ER forma degli omodimeri e trasloca nel nucleo, dove prende contatto con specifiche sequenze ERE, localizzate nella regione *promoter* dei geni estrogeno-resposivi. Tali sequenze, altamente conservate nella famiglia dei recettori nucleari, sono palindromi costituite da 13 paia di basi (5'-GGGTCA_nnnTGACC-3'), di cui 5 sono complementari e separate da un centro di simmetria costituito da 3 nucleotidi variabili (96). L'interazione del complesso E2-ER con le sequenze ERE determina l'avvio dell'attività trascrizionale

(Fig. 1.6), la cui modulazione richiede sia interazioni funzionali tra molecole recettoriali, sia interazioni con altri fattori di trascrizione (97).

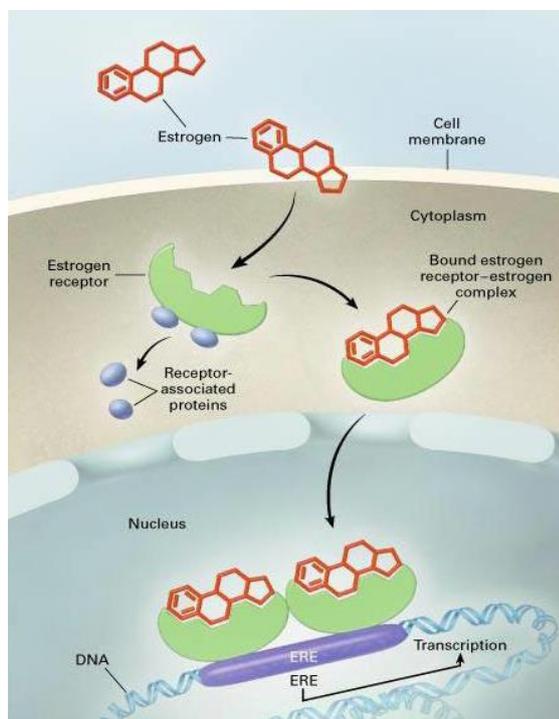


Figura 1.6 Illustrazione del classico meccanismo genomico attraverso cui gli estrogeni attivano la trascrizione genica

L'attività trascrizionale di ER dipende, infatti, dal reclutamento di specifici cofattori (98), la cui entità di stimolazione o inibizione rispetto al recettore è determinata, innanzitutto, dalla natura del ligando. Numerosi studi indicano che molecole ad attività coattivatoria aumentano la capacità del recettore di attivare la trascrizione genica, agendo da “ponte molecolare” tra il ER e l'apparato trascrizionale della cellula (84). La stimolazione della trascrizione genica ad opera di coattivatori avviene quando questi vengono reclutati, in seguito all'interazione tra il complesso E2-ER e le sequenze ERE. Queste osservazioni, unitamente ai dati ottenuti dallo studio delle proprietà di sequenze ERE naturali e sintetiche con differenti sequenze nucleotidiche, suggeriscono che tali sequenze agiscano da effettori allosterici di ER, modulando l'affinità di legame del recettore, la sua conformazione e, in ultima analisi, l'attività trascrizionale (99). ER può stimolare la trascrizione genica anche secondo un meccanismo genomico non classico, ERE-indipendente, che non prevede il legame diretto del complesso ormone-recettore al DNA. È, infatti, noto che circa un terzo dei geni umani regolati dai ERs non contiene sequenze

ERE. In tal caso, ER agisce modulando la funzione di altre classi di fattori di trascrizione attraverso interazioni proteina-proteina che avvengono all'interno del nucleo (99).

Tipici esempi di azioni genomiche non classiche ERE-indipendenti sono rappresentati dall'attivazione della trascrizione di geni quali c-fos, cicline, recettore per le lipoproteine a bassa densità (LDL) (100,101). Tali geni sono attivamente trascritti in seguito all'interazione di ER con i fattori di trascrizione AP-1, SP-1, NF- κ B; questa interazione sembra stabilizzare l'associazione del fattore di trascrizione con le sequenze nucleotidiche, anche in assenza di un legame diretto tra ER e DNA. Entrambi i meccanismi d'azione, ERE-dipendente ed ERE-indipendente, culminano nel reclutamento di coattivatori e componenti del complesso di iniziazione della trascrizione, con conseguente attivazione della trascrizione di geni *target* (100).

Molteplici studi hanno evidenziato che E2 è in grado di esercitare anche azioni extranucleari non genomiche. Tali effetti, infatti, sono troppo rapidi per essere compatibili con la sintesi di RNA e di proteine, dal momento che si verificano entro pochi minuti dalla somministrazione dell'ormone; avvengono in cellule in cui la sintesi di RNA e proteine è assente, come gli spermatozoi, così come in presenza di inibitori della trascrizione o della sintesi proteica; possono essere riprodotti usando ormoni legati covalentemente a molecole impermeabili alla membrana cellulare (102). Questi effetti non trascrizionali degli estrogeni comprendono la regolazione del flusso cellulare di Ca^{2+} , la modulazione del contenuto citoplasmatico di cAMP, cGMP, IP3, NO (103) e la modulazione di recettori associati a proteine G (104). Inoltre, E2 attiva protein chinasi come PKA, PKB, PKC, la chinasi Ca^{2+} /Calmodulina-dipendente (CAMK), MAP chinasi (MAPK) e tirosin-chinasi. L'attivazione di queste proteine provoca la fosforilazione di substrati a valle, tra cui fattori di trascrizione e co-attivatori, che possono regolare la trascrizione genica in maniera ERE-indipendente (105). Queste azioni sembrano essere mediate da una sottopopolazione del recettore estrogenico localizzata a livello della membrana plasmatica e sembrano coinvolgere una serie di molecole, localizzate anch'esse a livello membranario come proteine G, Src, Ras e Raf (106). A tale riguardo, occorre riportare che meccanismi di palmitoilazione di ER α sul residuo cisteinico 447 possono determinare l'ancoraggio del recettore alla membrana plasmatica in corrispondenza delle caveole; l'attivazione di queste sottopopolazioni membranarie di ER può innescare il segnale della fosfatidilinositolo-3 chinasi (106) e la successiva fosforilazione di eNOS (107). Inoltre, alcuni fattori di

crescita, come l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) possono, attivando il proprio recettore, indurre la fosforilazione del recettore estrogenico nucleare a livello del residuo di Serina118 (Ser118), causandone l'attivazione in maniera ligando-indipendente (108); tali osservazioni suggeriscono che l'interazione funzionale tra cascate contigue di segnali mediate da recettori per ormoni e recettori per fattori di crescita contribuisca in maniera rilevante alla risposta biologica finale.

1.3.2 Il recettore estrogenico GPR30/GPER

È ormai noto che, oltre al classico meccanismo genomico, molte delle azioni mediate dagli estrogeni avvengono attraverso l'attivazione di proteine recettoriali localizzate a livello della membrana plasmatica. Molteplici evidenze sperimentali indicano che, in alcuni tipi cellulari, le azioni estrogeniche rapide avvengono grazie all'attivazione di recettori accoppiati a proteine G (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCRs) (109). I GPCRs sono costituiti da un'unica catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica e trasducono i segnali intracellulari attraverso l'interazione con proteine G eterotrimeriche, costituite da tre subunità (α , β e γ) con attività GTPasica. Quando il recettore interagisce con il proprio ligando, la subunità α si dissocia dal complesso $\beta\gamma$ e regola l'attività di canali ionici e di enzimi associati alla membrana plasmatica (adenilato ciclasi, fosfolipasi C) che generano secondi messaggeri (cAMP, inositolo trifosfato, Ca^{2+}). Il complesso $\beta\gamma$, invece, agisce andando ad attivare altre protein chinasi coinvolte in cascate di segnali intracellulari.

Nell'ambito dei GPCRs, il recettore denominato GPR30/GPER (111-113), è stato ampiamente coinvolto nella mediazione degli effetti rapidi indotti dagli estrogeni attraverso l'attivazione di vie di trasduzione del segnale alternative al classico ER (6). GPER è una proteina di 38kDa di recente identificazione (111) che presenta la tipica struttura eptaelica di un recettore accoppiato a proteine G, con un sito di clivaggio all'estremità ammino-terminale e un dominio carbossi-terminale intracellulare. Questo recettore è ampiamente distribuito in tessuti responsivi agli estrogeni come cuore e vasi sanguigni, fegato, intestino, placenta, cervello e ovaio. Inoltre, GPER risulta espresso in molte cellule tumorali quali quelle mammarie, ovariche ed endometriali, suggerendo un suo coinvolgimento nel mediare gli effetti non genomici degli estrogeni in queste cellule (113-115).

Numerosi studi sono stati condotti per comprendere l'esatta localizzazione intracellulare di GPER: a seconda del contesto cellulare, GPER è stato localizzato sia a livello della membrana plasmatica (16,18,116) che del reticolo endoplasmatico (17). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che in fibroblasti associati al tumore mammario (CAFs) GPER è localizzato a livello nucleare (117), suggerendo che tale fattore possa avere un ruolo nella regolazione della trascrizione genica.

E2 è in grado di legare con elevata affinità e stereospecificità GPER, che tuttavia rimane un recettore orfano (18). La sintesi di un composto in grado di legare e attivare selettivamente GPER, denominato G-1 (118), ha consentito di caratterizzare il ruolo svolto da tale recettore in condizioni fisiopatologiche, distinguendo le risposte biologiche mediate da GPER in maniera indipendente dal classico ER.

GPER è in grado di mediare i segnali rapidi indotti dagli estrogeni e da composti con attività simil-estrogenica attivando una proteina Gs a cui è associato. L'attivazione di questa proteina innesca un meccanismo di trasduzione del segnale a cascata che inizia con la sintesi di cAMP da parte dell'adenilato ciclasi e prosegue con una serie di eventi di fosforilazione che portano all'attivazione di bersagli quali le MAP chinasi (MAPKs) (119). Tuttavia è stato recentemente dimostrato che, in maniera dipendente dal contesto sperimentale, le azioni mediate da GPER possono essere bloccate in presenza di inibitori farmacologici della G α i, suggerendo che le proteine G inibitorie possano essere associate all'attivazione di GPER in dipendenza del contesto cellulare analizzato. La trasduzione del segnale estrogenico attraverso GPER si colloca nel contesto di networks intracellulari di segnali interdipendenti, attraverso cui ormoni steroidei, fattori di crescita e composti ad attività simil-estrogenica, sono in grado di promuovere eventi fisiologici e patologici rilevanti. Infatti, la stimolazione di GPER determina l'attivazione di metalloproteinasi della matrice (MMP), responsabili della liberazione di peptidi a struttura EGF simile (*Heparin-binding EGF-like growth factor*, HB-EGF) con conseguente attivazione di EGFR (6,16) (Figura 1.7). L'attivazione del pathway trasduzionale dell'EGFR coinvolge GPER ed innesca una serie di eventi rapidi di fosforilazione a livello di alcune proteine cellulari. I bersagli principali di questi eventi fosforilativi sono delle proteine serina/treonina chinasi che, attivate in seguito a fosforilazione, sono in grado a loro volta di fosforilare altre proteine bersaglio su specifici residui di serina e treonina. L'attività fosforilativa di queste proteine, chiamate MAP chinasi (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), è

responsabile della regolazione di importanti processi biologici, quali l'espressione genica, il metabolismo, la proliferazione, la morte programmata, la sopravvivenza e la motilità cellulare.

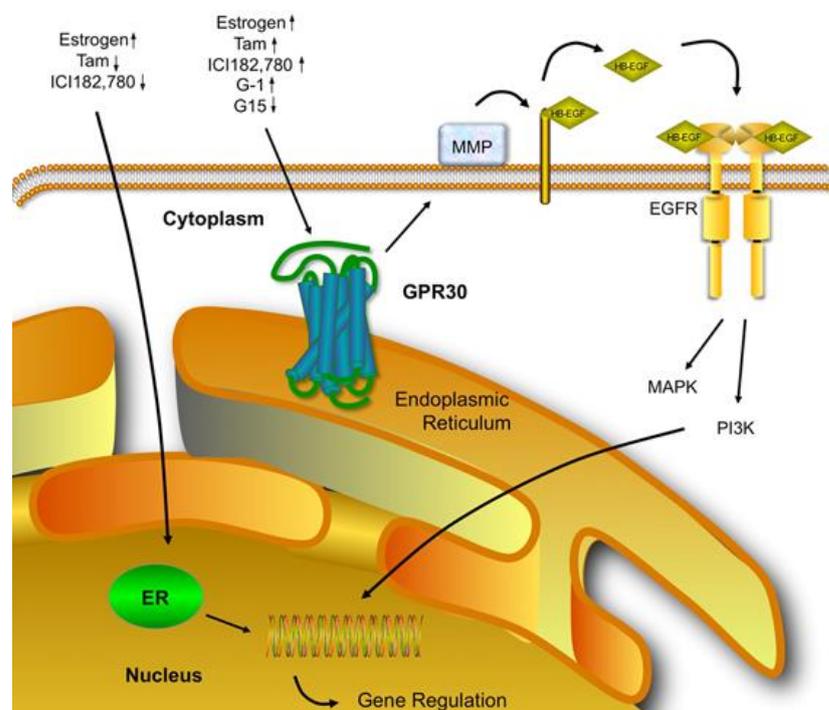


Figura 1.7 Meccanismi di trasduzione del segnale estrogenico attraverso GPER

Le molecole in grado di legare GPER entrano nella cellula e attivano il recettore localizzato principalmente sul reticolo endoplasmatico. L'attivazione del recettore e della proteina G ad esso associata causa l'attivazione delle metalloproteinasi della matrice che operano il clivaggio di pro peptidi a struttura EGF simile (pro HB-EGF) rilasciando HB-EGF. Tali fattori determinano la transattivazione di EGFR, dunque l'attivazione di diversi segnali a valle, tra cui la PI3K e le MAPK. Questi eventi intracellulari possono condurre all'attivazione di proteine nucleari coinvolte nella regolazione della trascrizione genica. Nella figura è anche mostrato il classico meccanismo di trasduzione del segnale ER-dipendente.

Fra queste proteine con attività chinasi, le ERK1/2, caratterizzate dai classici siti di fosforilazione responsabili dell'attivazione e della trasduzione del segnale (Tyr 185 e Thr 183), rivestono un ruolo di primaria importanza in quanto coinvolte, in particolar modo, nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. Entrambe le isoforme, in condizioni di riposo, sono localizzate nel citoplasma, ancorate a MEK, una proteina chinasi che ha la funzione di mantenere le ERK in forma inattiva quando è defosforilata; quando essa viene fosforilata da altre proteine a monte determina, attraverso eventi fosforilativi, l'attivazione delle ERK che traslocano nel nucleo, dove regolano l'espressione di una serie di fattori trascrizionali (120).

È stato recentemente dimostrato come l'attivazione del *pathway* trasduzionale GPER/ERK nel cuore di ratto maschio converge sull'attivazione di eNOS, enzima ampiamente riconosciuto come mediatore di azioni rilassanti a livello cardiovascolare (26).

Questo dato, insieme all'evidenza che GPER è espresso nel cuore di ratto e nel cuore dell'uomo, suggerisce che tale recettore possa mediare gli effetti protettivi esercitati dagli estrogeni sul sistema cardiovascolare. In merito a ciò, abbiamo recentemente dimostrato che GPER è coinvolto negli effetti benefici indotti dagli estrogeni sul cuore di ratto, poiché tale recettore è in grado di regolare, insieme al classico ER, le azioni di inotropismo e lusitropismo negativi osservati in seguito alla somministrazione di E2 (26,72). Ulteriori studi hanno dimostrato che l'attivazione di GPER indotta dal suo agonista selettivo G-1 è in grado di attenuare il rimodellamento cardiaco e le disfunzioni diastoliche associate al danno ipertensivo (28). Questo ruolo protettivo esercitato da GPER nella regolazione della pressione arteriosa è confermato dall'evidenza che la somministrazione di G-1 riduce la pressione arteriosa media nei ratti normotesi (121) e la pressione sistolica in ratti femmine mRen2 Lewis (27).

Inoltre è stato messo in luce il ruolo cruciale svolto dall'attivazione di GPER nell'inibizione della permeabilità dei pori mitocondriali (122), evento essenziale nella morte cellulare dopo ischemia. Ad ulteriore conferma del ruolo svolto da GPER nel sistema cardiovascolare, abbiamo recentemente dimostrato che esso rappresenta un importante fattore coinvolto nelle risposte adattative allo stress ipossico in diversi contesti cellulari e, in particolare, nei cardiomiociti (20). Per questi motivi GPER sta emergendo come nuovo potenziale target terapeutico nelle malattie cardiovascolari.

1.4 Il fattore di trascrizione HIF-1 α

Uno dei principali fattori coinvolti nella regolazione dell'espressione di GPER è HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), una proteina altamente conservata che agisce da fattore trascrizionale innescando una serie di risposte biologiche volte all'adattamento cellulare a vari tipi di stress, come lo stress ipossico e ossidativo (23). A tale riguardo, occorre riportare che l'ipossia è una caratteristica di diverse condizioni patologiche e in particolare dell'ipertensione arteriosa (a cui è strettamente associata), dell'infarto del miocardio e dell'ictus (22). HIF-1 agisce in concerto con altri mediatori riprogrammando il

metabolismo, la glicolisi, la sintesi proteica, l'eritropoiesi, la progressione e la sopravvivenza cellulare (23). HIF-1 è un fattore eterodimerico composto da una subunità α , espressa in funzione della tensione di ossigeno intracellulare e da una subunità β , costitutivamente espressa. In condizioni normossiche HIF-1 α viene degradato rapidamente tramite idrossilazione da parte dell'enzima prolil-4-idrossilasi, enzima che agisce da vero e proprio sensore dell'ossigeno cellulare. In queste condizioni, il fattore VHL si lega a HIF-1 α idrossilato e attiva un complesso di proteine responsabili dell'ubiquitinazione e successiva degradazione proteasomica di HIF-1 α (Fig. 1.8).

In condizioni ipossiche l'enzima prolil-4-idrossilasi viene inattivato, pertanto HIF-1 α viene rapidamente stabilizzato e trasportato nel nucleo (Fig. 1.8), dove, interagendo con HIF-1 β attiva la trascrizione dei suoi geni bersaglio interagendo con specifiche sequenze (HRE, Hypoxia Responsive Elements) localizzate nei promotori di tali geni (24) (Fig. 1.8). HIF-1 α è richiesto nel processo di embriogenesi, in quanto gioca un ruolo centrale nell'omeostasi dell'ossigeno, tuttavia tale fattore è overespresso in una serie di condizioni patologiche tra cui le patologie cardiovascolari e i tumori solidi (123). Occorre ricordare, inoltre, che se da un lato la stimolazione ipossica per brevi periodi può scatenare meccanismi di sopravvivenza cellulare mediati da HIF-1 α (20), dall'altro l'ipossia severa o prolungata può condurre alla morte cellulare attraverso l'attivazione del meccanismo apoptotico (124,125). In ciò HIF-1 α gioca un ruolo chiave, poiché induce stabilizzazione, iperespressione e traslocazione di proteine ad attività proapoptotica. Appare dunque evidente come l'ipossia e altri fenomeni di stress ad essa associati quali l'ipertensione arteriosa possano determinare l'attivazione delle cascate apoptotiche contribuendo alla degenerazione cardiaca e alla progressione verso l'infarto (126). Considerando che HIF-1 α induce l'espressione di alcuni geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare, ma anche nella morte cellulare programmata, riveste un ruolo chiave la comprensione delle correlazioni che intercorrono tra i diversi effetti biologici a cui può dar luogo tale fattore di trascrizione, in particolar modo in ambito cardiovascolare. La recente evidenza che GPER rappresenta uno dei nuovi target molecolari dell'azione dell'ipossia mediata da HIF-1 nei cardiomiociti murini, lascia immaginare che il pathway trasduzionale HIF-1 α /GPER rappresenti un importante regolatore della funzione cardiovascolare in condizioni di stress.

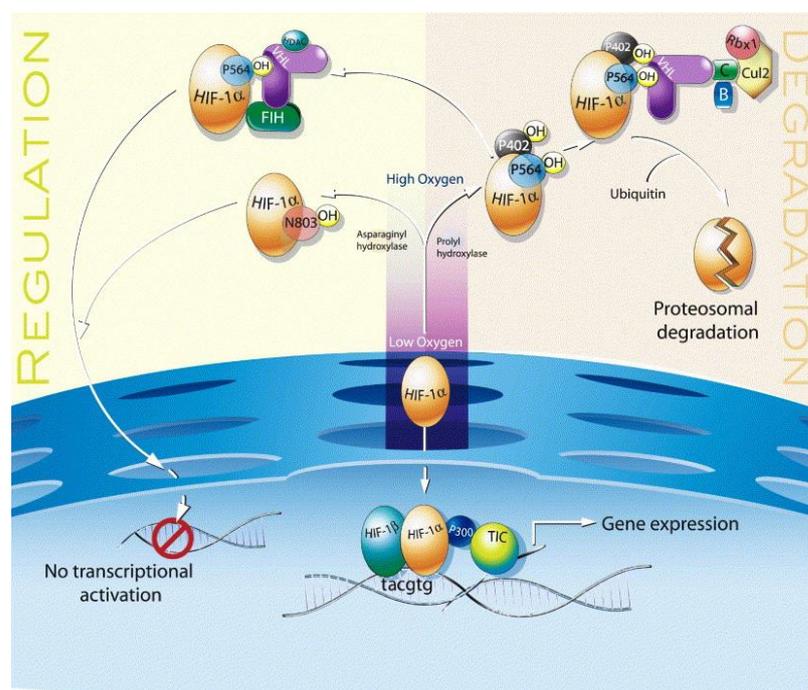


Fig. 1.8 Schematizzazione dei meccanismi di stabilizzazione, degradazione e modulazione dell'espressione genica da parte di HIF-1

1.5 Il fattore di crescita del tessuto connettivo CTGF

Tra i target molecolari condivisi da HIF-1 e GPER, riveste un ruolo importante il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF, CCN2), un fattore fibrotico overespresso in diverse patologie cardiovascolari come l'ipertensione (127-129). CTGF è una proteina della matrice cellulare ricca di residui cisteinici appartenente alla famiglia dei CCN (acronimo dei 3 membri Connective tissue growth factor, Cysteine rich protein-61 e Nephroblastoma over-expressed protein) (130,131); ha un peso molecolare di 36-38 kDa ed è costituita da 349 amminoacidi. La nota azione fibrotica mediata da CTGF è strettamente correlata all'azione del TGF β (Transforming growth factor- β), con cui può anche agire in sinergia (127,132-134). L'espressione di CTGF può essere indotta da diversi stimoli pro-fibrotici quali angiotensina, endotelina e trombina ed è associata ad aumento della proliferazione cellulare e della produzione di matrice. CTGF gioca un ruolo fondamentale nella riparazione delle ferite, infatti risulta essere over-espresso durante le lesioni tissutali e in diverse malattie fibrotiche come fibrosi cardiaca, renale, polmonare e cirrosi epatica (135-136). Nel tessuto cardiaco sono presenti elevati livelli di CTGF nel periodo seguente ad

infarto miocardico (137), durante l'ipertensione e in condizioni di insufficienza cardiaca (138), può essere dunque considerato mediatore e marker di fibrosi tissutale. Difatti, in modelli animali in cui viene inibita l'espressione della proteina CTGF si osserva il blocco del processo di fibrogenesi. Al contrario, topi transgenici che esprimono elevati livelli di CTGF sviluppano uno spontaneo fenotipo fibrotico caratterizzato soprattutto da ispessimento del derma (139,140). Il gene che codifica per CTGF è localizzato sul cromosoma 6, ed è costituito da una sequenza segnale che codifica per un peptide N-terminale costituito da 37 amminoacidi, necessario per la secrezione della proteina, (127,131,141,) e da 4 domini, essenziali per la funzione biologica (142). Attraverso questi quattro domini CTGF è in grado di legare diverse molecole, come integrine e proteoglicani che fungono da veri e propri recettori capaci di mediare i segnali mitogeni e di adesione in risposta a fattori di crescita come l'endotelina 1 e TGF β (143) e a stimoli di diversa natura quali ridotta tensione di ossigeno e deformazioni bio-meccaniche. I principali domini strutturali della proteina CTGF sono:

- IGFBP (Insuline-like growth factor binding protein-like domain);
- VWC (von Willebrand factor type C domain);
- TSP-1 (Trombospondin repeat 1);
- CT (cistein knot C-terminal domain).

Il dominio I, la cui sequenza amminoacidica presenta un elevato grado di omologia con il dominio N-terminale delle proteine IGFR (insulin-like growth factor receptor) (130), è in grado di legare con elevata affinità il fattore di crescita insulino simile (IGF) controllandone il trasporto, la localizzazione e il metabolismo, esercitando, quindi, un ruolo nella regolazione del ciclo, proliferazione, differenziazione, morte cellulare, trasporto di glucosio e di amminoacidi e secrezione di neurotrasmettitori (144). Il dominio II conferisce a CTGF la capacità di legare alcuni fattori di crescita come BMP (Bone Morphogenic Protein) (131-133), proteina che regola la morfologia dell'osso e il Trasforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1). Inoltre entrambi i domini mediano il differenziamento dei fibroblasti e la sintesi di collagene. Il dominio III consente l'interazione con il recettore per le lipoproteine a bassa densità (LRP) e integrine dominio IV contiene siti sia per l'integrina che per l'eparina (145-148); essendo capace di legare integrine, eparine e proteine della matrice extracellulare, uno dei ruoli principali che riveste CTGF è quello di mediare l'adesione delle cellule alla ECM e di rimodellare la stessa

matrice, oltre che inibire l'apoptosi cellulare (149), inoltre grazie alla presenza di questo dominio e del dominio III, CTGF è in grado di interagire con il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e quindi di regolare l'angiogenesi (150). Per quanto riguarda la regolazione dell'espressione di CTGF, è stato ampiamente dimostrato come in diversi contesti cellulari tumorali gli estrogeni, attivando GPER, siano in grado di regolare l'espressione di CTGF. Inoltre, HIF-1 rappresenta uno dei principali regolatori trascrizionali di CTGF in condizioni di ipossia. A tale riguardo, abbiamo evidenziato l'esistenza di un cross-talk funzionale tra HIF-1 α e GPER, in grado di regolare l'espressione di CTGF nei miocardiociti esposti a bassa tensione di ossigeno. Tali osservazioni lasciano emergere che il pathway trasduzionale HIF-1 α /GPER/CTGF rappresenti un'importante via del segnale attivata in seguito a stress ipossico nelle cellule cardiache.

1.6 Scopo della tesi

Poiché un crescente interesse è rivolto verso la caratterizzazione del ruolo svolto da GPER in ambito cardiovascolare, scopo del presente studio è stato quello di valutare l'azione mediata da GPER nella regolazione della funzione cardiovascolare in condizioni fisiopatologiche. A tal fine sono stati utilizzati ratti spontaneamente ipertesi (SHR) e normotesi (WKY) in cui è stata valutata l'espressione e funzione di GPER, del mediatore ipossico HIF-1 α e del fattore fibrotico CTGF. Sono state altresì caratterizzate le cascate del segnale innescate in risposta all'attivazione di GPER a livello cardiaco, al fine di estendere le attuali conoscenze sulla capacità di GPER di mediare effetti cardioprotettivi in condizioni di stress quali l'ipertensione arteriosa.

Capitolo Secondo

Materiali e metodi

2.1 Metodica Langendorff

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il preparato di cuore di ratto isolato e perfuso secondo la metodica Langendorff. Si tratta di una metodica relativamente semplice che, grazie alle condizioni di perfusione che riflettono molto da vicino l'emodinamica cardiaca dell'animale *in vivo*, si presta agevolmente a studi di tipo fisio-farmacologici. I vantaggi sostanziali di questo modello consistono nella possibilità di valutare gli effetti cardiovascolari diretti di numerose sostanze in termini di funzione contrattile, di attività elettrica e di funzione metabolica; nella possibilità di eseguire studi di dosaggio dei farmaci in modo rapido e con esatto controllo delle concentrazioni; nella possibilità di sospendere la somministrazione della sostanza in esame intercambiando i fluidi di perfusione (151). Inoltre, il preparato permette di indurre ischemia regionale, o totale, e di condurre studi sulla risposta cardiaca in seguito a variazioni del flusso coronarico, sulla reattività vascolare, sulla funzionalità dell'endotelio e del muscolo liscio (151).

2.1.1 Animali

Nel presente studio sono stati utilizzati ratti maschi e femmine Wistar Kyoto (WKY) e ratti spontaneamente ipertesi (Spontaneously Hypertensive Rats, SHR) (Harlan Laboratories s.r.l., Udine, Italia), del peso di 450-500g e di 20 settimane di età. Al loro arrivo, al fine di consentire un completo recupero dallo stress conseguente al trasporto, gli animali sono stati stabulati per almeno quattro giorni in un ambiente climatizzato, con temperatura costante di circa 25°C, illuminato artificialmente per cicli di 12 ore consecutive. Inoltre, i ratti sono stati alimentati ad libitum e sacrificati entro massimo venti giorni dal loro arrivo.

Gli esperimenti, autorizzati dal Ministero della Sanità (Roma, Italia) e regolati dal decreto legislativo n. 85-23 del 1996, sono stati supervisionati e controllati dal comitato etico del Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della nutrizione (Università della Calabria). I procedimenti chirurgici sono stati realizzati in condizioni di anestesia e sono stati adottati tutti gli accorgimenti per ridurre al minimo la sofferenza dell'animale. All'inizio di ogni esperimento, la pressione arteriosa dei ratti WKY e SHR è stata determinata secondo il metodo *tail cuff* e i valori registrati sono riportati nella tabella 2.1.

	Diastolic BP	Systolic BP
WKY	85,5 ± 4,5 mmHg	127,5 ± 5,4 mmHg
SHR	124,3 ± 6,2 mmHg	181,9 ± 7,9 mmHg

Tabella 2.1 Valori di pressione sistolica e diastolica registrati nei ratti WKY e SHR prima di ogni esperimento

2.1.2 Apparato di perfusione

La metodica Langendorff si avvale di un apparato costituito da un serbatoio, contenente la soluzione di perfusione Krebs-Henseleit, una pompa peristaltica, una trappola per bolle, un bagno termoregolatore ed un sistema di acquisizione dati con interfaccia McLab (2.1) (Fig. 2.1). Uno stimolatore bipolare (Panlab LE 12106), il cui elettrodo viene posizionato a livello dell'atrio destro del cuore, impostato in modo da dettare una frequenza di stimolazione di 340 battiti al minuto, ad un voltaggio di 10 V per una durata di 2 ms, è usato nel corso di esperimenti che richiedono una frequenza costante. La pompa peristaltica ha il compito di prelevare la soluzione dal serbatoio e di spingerla, attraverso una serie di tubi, nella trappola per bolle, la quale evita la formazione di emboli che potrebbero danneggiare il cuore e falsare il risultato degli esperimenti. Il perfusato raggiunge quindi il cuore attraverso una cannula inserita direttamente nell'aorta. La temperatura ideale di perfusione (37-37,5°C) viene mantenuta da un sistema di termostatazione che controlla tutti i serbatoi contenenti la soluzione fisiologica, la camera che contiene il cuore ed i vari tubi che compongono l'apparato (151). La costanza della temperatura è garantita da un bagno termoregolatore a circolazione esterna, capace di evitare cadute di temperatura lungo l'intero apparato (151). L'apparato è dotato anche di

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

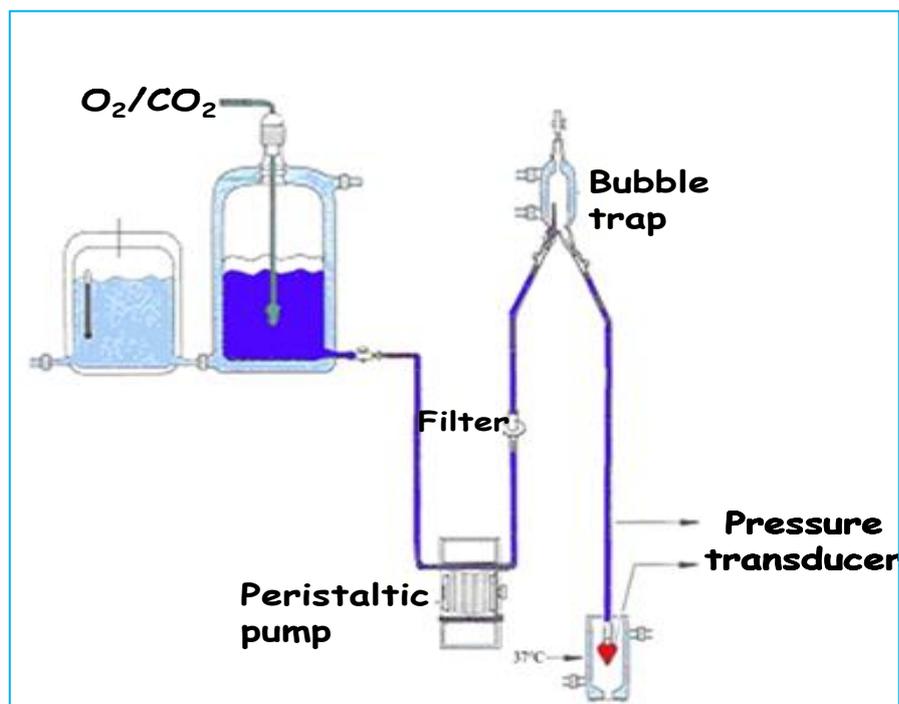


Fig. 2.1 Rappresentazione schematica dell'apparato di perfusione

2.1.3 Dissezione, isolamento ed incannulazione del cuore

Prima di procedere all'isolamento del cuore, l'animale viene anestetizzato mediante iniezione intraperitoneale di carbammato di etile (2g/Kg). Dopo aver verificato la completa assenza di riflessi nell'animale, si effettua un'incisione trans-addominale che consente di evidenziare la cavità toracica; il torace viene, così, aperto attraverso un taglio bilaterale lungo il margine inferiore dalle ultime alle prime costole e la gabbia toracica viene sollevata esponendo il cuore. L'organo è espantato dopo recisione dell'aorta, della vena cava e dei vasi polmonari, per essere subito immerso in un *beaker* contenente la soluzione di perfusione, mantenuta a $4^\circ C$, al fine di evitare danni ischemici (151). Successivamente, l'aorta viene incannulata per iniziare la perfusione retrograda (Fig. 2.2) a flusso costante; generalmente, con la pratica, l'intervallo di tempo che intercorre tra l'espanto e l'incannulazione non supera i 30 secondi (151). La cannula di perfusione aortica presenta un diametro esterno di 1,8 mm, per il cuore di un ratto di 250 g, e può essere realizzata in

vetro, plastica o acciaio inossidabile (151). Per ridurre al minimo la possibilità che si formino bolle al momento dell'incannulazione, la soluzione di perfusione viene opportunamente fatta gocciolare dalla cannula già prima che il cuore venga collegato attraverso l'aorta e fissato mediante una legatura con filo di seta (151).

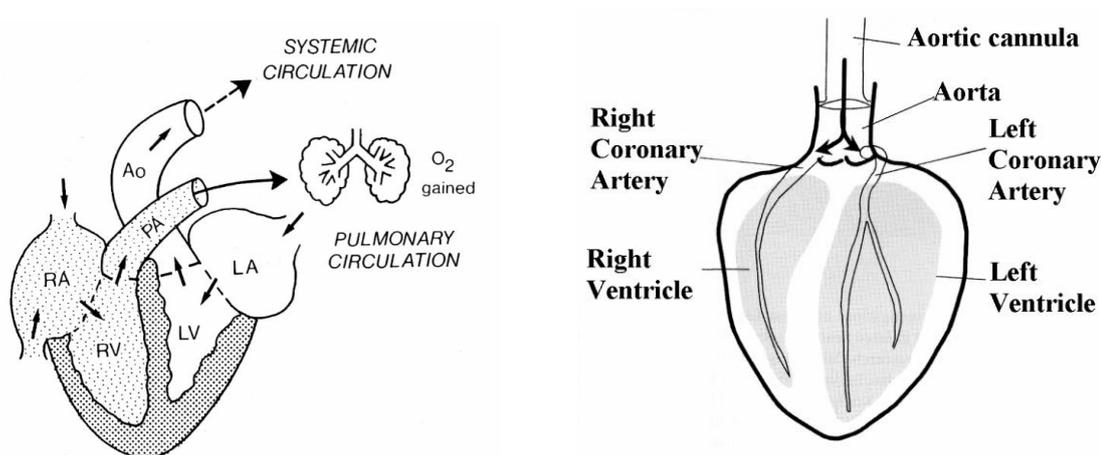


Fig. 2.2 Circolazione normale e circolazione retrograda nel cuore isolato e perfuso secondo la metodica Langendorff, in cui la soluzione di perfusione entra nel cuore attraverso l'aorta. RA, atrio destro; RV, ventricolo destro; PA, arteria polmonare; LA, atrio sinistro; LV, ventricolo sinistro; Ao, aorta; O₂, ossigeno.

Dopo aver saldamente fissato il cuore, viene praticata una piccola incisione a livello dell'arteria polmonare, che potrebbe essere accidentalmente legata durante l'incannulazione, in modo da facilitare un adeguato drenaggio (151); inoltre, per prevenire l'accumulo di perfusato nel ventricolo sinistro, viene effettuato nell'apice ventricolare un piccolo foro mediante l'ausilio di un ago. Quando l'incannulazione è completata e la perfusione è cominciata, affinché il cuore si stabilizzi completamente sono richiesti almeno 10 minuti (151).

2.1.4 Misurazione dell'attività contrattile del cuore

Nel corso dell'esperimento, sia per ottenere informazioni circa l'azione delle sostanze testate, sia per monitorare la stabilità del cuore e riscontrare eventuali aritmie, vengono costantemente misurati particolari parametri dell'attività cardiaca. Di fondamentale importanza è la valutazione dell'attività contrattile, la cui misurazione prevede l'utilizzo di un palloncino in lattice, collegato ad un trasduttore di pressione (Modello BLPR, cod 18700), che viene collocato nel ventricolo sinistro (151). L'atrio sinistro viene rimosso per

facilitare l'inserimento del palloncino nella cavità ventricolare attraverso la valvola mitrale; una volta posizionato, esso viene gonfiato con acqua distillata mediante una microsiringa (Hamilton 250 μL), in modo da regolarne il volume. I palloncini sono utilizzati solo se ad un volume di 80-100 μL generano una pressione inferiore a 3 mm Hg (151). Il loro volume viene aumentato con incrementi graduali di 20 μL , finché la pressione generata raggiunge un plateau, di circa 5 mm Hg, corrispondente al lavoro isovolumetrico del cuore (152). Volumi eccessivi potrebbero compromettere il tessuto cardiaco, inducendo ischemia e rendendo instabile il preparato a causa di un'aumentata tendenza a sviluppare aritmie (153). Quando tutti questi passaggi sono completati, il cuore viene chiuso in una camera mantenuta a 37°C dal bagno termostato.

2.1.5 Perfusion e composizione del perfusato

Nella metodica di Langendorff la perfusione è condotta in senso retrogrado a flusso costante di 10-13,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ per grammo di cuore fresco (154,155); in questo modo, la valvola aortica viene chiusa forzatamente ed il fluido di perfusione, attraverso le coronarie, perfonde l'intera massa cardiaca e drena, mediante il seno coronario, nell'atrio destro (153). La soluzione di perfusione è un tampone bicarbonato, detto Krebs-Henseleit, modificato rispetto alla formulazione originaria nella concentrazione di ioni calcio, che è stata ridotta (154,155). La composizione completa del perfusato può essere schematizzata come segue (mM): NaCl 113, KCl 4.7, NaHCO_3 25, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.8, KH_2PO_4 1.2, glucosio 11, mannitolo 1.1, Na-piruvato 5. Nella preparazione del tampone Krebs-Henseleit sono indispensabili alcuni accorgimenti che servono a garantirne un'adatta qualità. In particolare, bisogna aggiungere il componente calcio solo alla fine della procedura, per evitare la precipitazione dei suoi sali; è necessario filtrare la soluzione con membrane di cellulosa da 0,8 micron, per rimuovere possibili impurità; occorre mantenere il pH ad un valore ottimale di 7.4, attraverso la continua ossigenazione con una miscela di O_2 (95%) + CO_2 (5%) sempre per impedire la precipitazione dei sali di calcio. Il continuo rifornimento di O_2 è, inoltre, indispensabile a supportare il normale metabolismo tissutale, per mantenere il gradiente trans-membrana e per garantire la funzione contrattile cardiaca (153). Dal punto di vista metabolico, il cuore perfuso utilizza il glucosio come unico substrato energetico per sopperire alla mancanza degli acidi grassi che, sebbene *in vivo* siano la sorgente primaria di energia, non possono essere utilizzati nel preparato sia perchè

sono insolubili in acqua sia perchè danno effetti schiumogeni se sottoposti all'azione di gas (153). Alla soluzione di perfusione possono, poi, essere aggiunte le sostanze che si desidera testare.

2.1.6 Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri

L'acquisizione dei dati relativi agli esperimenti avviene attraverso un sistema McLab collegato ad un computer che elabora i dati attraverso un software Chart 6, li registra sull'hard disk e li visualizza graficamente in tempo reale sul monitor. L'interfaccia McLab utilizzata è un sistema collegato a due trasduttori di pressione e ad una sonda di temperatura: il primo trasduttore, collegato al palloncino, permette di registrare la pressione del ventricolo sinistro; il secondo trasduttore permette di misurare la pressione coronarica; il terzo canale è connesso ad una termocoppia che consente di monitorare la temperatura durante tutto il corso dell'esperimento. I trasduttori di pressione vengono calibrati prima dell'inizio di ogni esperimento utilizzando un manometro a mercurio che permette di impostare sul computer un range fisiologico di valori di pressione in mmHg. Il sistema di acquisizione simula un registratore su carta che, secondo la velocità di scorrimento impostata, permette di visualizzare singoli momenti dell'esperimento o il percorso sperimentale per intero.

2.1.7 Parametri dell'attività cardiaca

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

1) parametri relativi all'attività sistolica:

- LVP (Left Ventricular Pressure, mmHg), rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- $+LV(dP/dt)_{max}$ (mmHg \times s⁻¹), indica la massima velocità di contrazione ventricolare;
- TTP (Time To Peak, ms), rappresenta il tempo necessario a raggiungere il picco di

contrazione sistolica isovolumetrica;

- HR (Heart Rate, battiti x min^{-1}), rappresenta la frequenza cardiaca;
- RPP (Rate Pressure Product, $\text{mmHg} \times \text{battiti} \times \text{min}^{-1}$), pari al prodotto tra LVP ed HR, rappresenta un indice del lavoro cardiaco;

2) parametri relativi al recupero diastolico:

- LVEDP (Left Ventricular End Diastolic Pressure, $\text{mmHg} \times \text{s}^{-1}$), è la pressione telediastolica sviluppata dal ventricolo sinistro;
- $-\text{LV}(dP/dt)\text{max}$ ($\text{mmHg} \times \text{s}^{-1}$), indica la massima velocità di rilassamento ventricolare;
- HTR (Half Time Relaxation, ms), indica la metà del tempo necessario al ventricolo sinistro per il completo recupero diastolico;
- T/t è dato dal rapporto tra $+\text{LV}(dP/dt)\text{max}$ e $-\text{LV}(dP/dt)\text{max}$;

3) parametri relativi alla funzionalità coronarica:

- CP (Coronary Pressure, mmHg), è la pressione dei vasi coronarici.

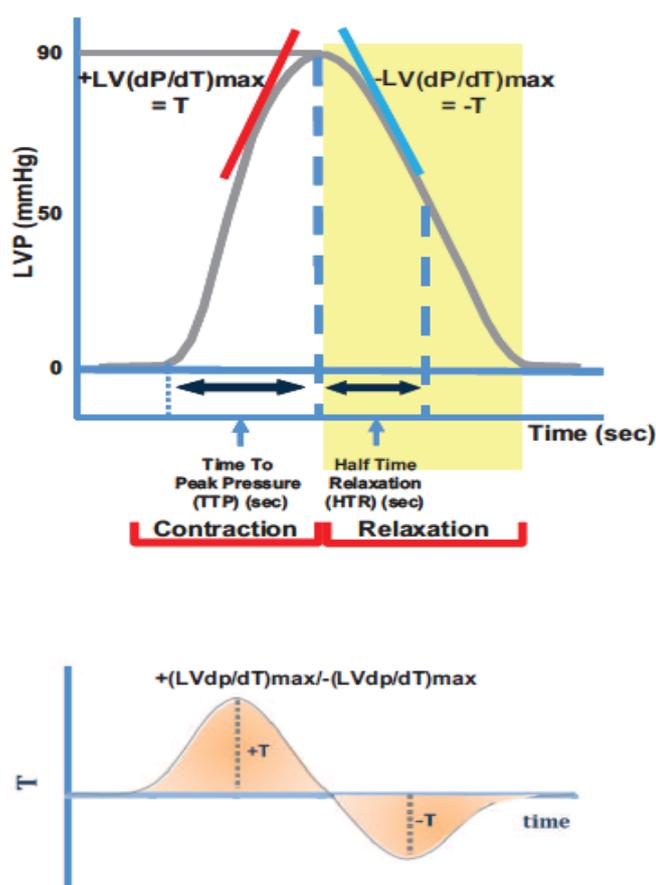


Fig. 2.3 Rappresentazione grafica dei parametri emodinamici valutabili mediante il sistema di acquisizione dati PowerLab nella metodica Langendorff

2.2 Estrazione dell'RNA e RT Real-time PCR

Al fine di valutare l'espressione cardiaca di specifici geni, ciascun frammento di tessuto ventricolare sinistro di ratti WKY e SHR è stato sottoposto ad omogenizzazione in ghiaccio in presenza di una soluzione monobasica difenolo guanidina isotiocianato che permette di isolare l'RNA totale da cellule e tessuti conservandone l'integrità. (TRIZOL, Life Technologies, Milano, Italia). L'mRNA ottenuto è stato dosato spettrofotometricamente e la sua qualità è stata verificata tramite elettroforesi su gel contenente bromuro di etidio: solo campioni non degradati che presentano chiare bande 18S e 28S sono stati usati per gli studi di espressione genica. Successivamente, l'mRNA è stato convertito in cDNA, da utilizzare per la reazione di PCR, utilizzando l'enzima Trascrittasi Inversa (Reverse transcriptase, RT) M-MLV (200 U) (Life Technologies, Milano, Italia) secondo le istruzioni della casa produttrice. Per la valutazione dell'espressione genica è stata utilizzata la tecnica della Real-Time PCR impiegando Step One (TM) sequence detection system (Applied Biosystems Inc, Milano, Italy). La tecnica da noi utilizzata prevede l'utilizzo di agenti intercalanti che si legano alla doppia elica del DNA ed, emettendo fluorescenza, permettono di seguire l'andamento della reazione e quindi l'incremento di molecole di acidi nucleici in tempo reale. Grazie ad opportuni raggi laser che eccitano il colorante intercalante Sybr Green, ad una specifica lunghezza d'onda e in determinate fasi del processo, è possibile misurare la fluorescenza emessa, la quale sarà direttamente proporzionale alla quantità di acido nucleico a cui è associato il Sybr Green. I saggi sono stati eseguiti in triplicato, secondo le istruzioni della ditta produttrice, ed i valori misurati sono stati usati per calcolare i livelli d'espressione, utilizzando il metodo comparativo $\Delta\Delta Ct$. I primers specifici per ogni gene d'interesse sono stati disegnati utilizzando il software Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems Inc, Milano, Italia) e le sequenze sono riportate nella Tabella 2.2. I livelli di espressione genica sono stati normalizzati rispetto all'espressione di un calibratore interno che è stato designato essere il campione WKY. I risultati finali sono stati espressi come n-volte di differenze nell'espressione genica relativa all'rRNA 18S e al calibratore interno. Per il calcolo è stato utilizzato il metodo $\Delta\Delta Ct$, come segue: $n\text{-fold} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{campione}} - \Delta Ct_{\text{calibratore}})}$. I valori di ΔCt di ciascun campione e del calibratore sono stati determinati sottraendo il valore di medio di Ct dell'rRNA 18S dal valore medio di Ct dei vari geni analizzati.

2.3 Western blotting

Al fine di valutare l'espressione cardiaca di specifiche proteine, ciascun frammento di ventricolo sinistro di ratti WKY e SHR è stato omogenato in ghiaccio in presenza di un reagente di lisi, il RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) contenente inibitori delle proteasi, (1mmol/L aprotinina, 20mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride e 200mmol/L sodium orthovanadate); successivamente l'omogenato è stato centrifugato a 13000 rpm per 10 min a 4°C al fine di rimuovere eventuali detriti per poi recuperare il sovranatante contenente le proteine. Il dosaggio delle proteine totali è stato eseguito mediante valutazione colorimetrica con il metodo di Bradford, utilizzando come standard una curva ottenuta dalla densità ottica dell'albumina sierica (BSA) a diverse concentrazioni partendo da una soluzione di 1mg/ml. A 50 µL di lisato proteico, diluito 1:10, viene aggiunto 1 ml di reattivo di Bradford e la soluzione così ottenuta è letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda λ di 595 nm. Il metodo di Bradford si basa sulla osservazione che il massimo di assorbanza di una soluzione di Comassie Brilliant Blue G250 si sposta da 465 a 595 nm in seguito al legame con le proteine. La quantità di colorante legato dipende dal contenuto di aminoacidi basici nelle proteine in soluzione. Aliquote di lisato cellulare aventi la stessa quantità di proteine totali sono state sottoposte a separazione elettroforetica mediante tecnica riducente SDS-PAGE su gel di poliacrilammide a diversa percentuale. L'SDS conferisce un involucro negativo che permetterà la loro separazione solo per peso molecolare e non per carica elettrica netta posseduta, facendo in modo che, sotto l'azione del campo elettrico applicato, tutte le proteine migrino verso il polo positivo. Al lisato proteico è stato aggiunto in rapporto 1:1 il buffer Laemmli per permettere la rottura di eventuali ponti di solfuro presenti nelle molecole. A questo punto si effettua una bollitura di 5 minuti e si caricano i campioni con un marker a peso molecolare noto sul gel di poliacrilammide. Il tutto è immerso in un buffer di corsa contenente glicina (TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 e SDS 0.1%). La corsa elettroforetica è stata condotta applicando una differenza di potenziale di 90 V per circa due ore a temperatura ambiente. Dopo la corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa mediante trasferimento con camera MINI-TRANSBLOT in buffer di trasferimento a basso contenuto salino (TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 e SDS 0.1%, Metanolo 20%). Il gel e la membrana sono stati disposti in modo da un "sandwich" all'interno di una camera formata da due elettrodi paralleli: in questo sistema il foglio di

nitrocellulosa si verrà a trovare tra l'anodo e il gel. Il trasferimento delle proteine è stato favorito dall'applicazione di una differenza di potenziale di circa 60V per 2 h a 4°C. L'effettivo trasferimento delle proteine sulla membrana è stato controllato immergendo per 2-3 min il foglio di nitrocellulosa in una soluzione di Red Poinceau. Successivamente la membrana è stata posta in una soluzione di milk non-fat in TBST 1X (TrisHCl 100 mM pH 7.5, NaCl 1 M, Tween 20 all'1%) per 1 h a temperatura ambiente in modo da bloccare tutti i siti aspecifici di interazione idrofobica. Dopo un breve lavaggio con buffer TBS 1X, il filtro di nitrocellulosa è stato incubato overnight con l'anticorpo primario specifico per la proteina da analizzare. Successivamente la soluzione con l'anticorpo primario è stata rimossa e la membrana sottoposta a tre lavaggi di 10 min ognuno con TBST 1X. In seguito la membrana è incubata per 1h con anticorpo secondario in TBST 1% e milk non-fat al 5% in grado di riconoscere la porzione costante della IgG utilizzata come anticorpo primario coniugato con la perossidasi di rafano. A questo punto la membrana è stata nuovamente lavata con TBST 1X e sottoposta a tecnica di immunorilevazione mediante l'utilizzo del Kit ECL System in chemiluminescenza. L'enzima perossidasi, coniugato all'anticorpo secondario, è in grado di catalizzare in condizioni basiche l'ossidazione del luminolo, un substrato chemiluminescente. Il luminolo passando attraverso uno stato eccitato emette una certa quantità di luce che può essere visualizzata esponendo il filtro trattato ad una lastra fotografica (Hyperfilm ECL).

Protocolli sperimentali

2.4 Sostanze chimiche

2.4.1 Cuore isolato

Gli esperimenti di perfusione sono stati effettuati utilizzando l'agonista selettivo sintetico di GPER, G-1 (1-[4-(6-bromobenzol[1,3]diodo-5yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro3H ciclopenta[c]quinolin-8yl] (MERK KGaA Francoforte, Germania). Per la perfusione dei cuori di ratto in condizioni ipossiche è stato utilizzato una soluzione KHs in cui è stata iniettata una miscela gassosa costituita da 50% O₂- 45% N₂- 5%CO₂. L'antagonista sintetico selettivo di GPER G-15 (3aS,4R,9bR)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-

3a,4,5,9b-3H-cyclopenta[c]quinoline è stato acquisito presso Tocris Bioscience (Bristol, Inghilterra). (L-NIO) inibitore selettivo della NOS endoteliale (eNOS) è stato ottenuto dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). Tutte le sostanze sono state preparate come soluzioni madre solubilizzate in DMSO. Le soluzioni madre sono state successivamente diluite in KHs in modo da ottenere le concentrazioni desiderate per i singoli esperimenti.

2.4.2 Estrazione dell'RNA e RT Real-time PCR

Trizol reagent e M-MLV Reverse Transcriptase sono stati ottenuti da Life technologies, (Milano, Italia). Step One (TM) sequence detection system è fornito da Applied Biosystems Inc (Milano, Italia). Per gli esperimenti di RT-PCR sono stati disegnati specifici primer (Tabella 2.2) per ogni gene d'interesse usando il software Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems Inc, Milano, Italia)

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
ER α	5'-AGGAGACTCGCTACTGTGCTG-3'	5'-ATCATGCCCACTTCGTAACAC-3'
ER β	5'-CACTGCACTTCCCAGGAGTCA-3'	5'-CACTGCACTTCCCAGGAGTCA-3'
GPER	5'-TCTACCTACCCTCCCGTGTGG-3'	5'-AGGCAGGAGAGGAAGAGAGC-3'
HIF-1 α	5'-AACAAACAGAATCTGTCCTCAAACC-3'	5'-CAGGTAATGGAGACATTGCCAG-3'
CTGF	5'-AAGACCTGTGGGATGGGC-3'	5'-TGGTGCAGCCAGAAAGCTC-3'
18S	5'-TTTGTGGTTTTTCGGAAGTGA-3'	5'-CGTTTATGGTCGGAAGTACGA-3'

Tabella 2.2

2.4.3 Western blotting

Hepes, NaCl, MgCl₂, EGTA, Glicerolo, Sodio-dodecil-solfato (SDS), Metanolo, Aprotinina, Na-orto-vanadato, PMS-F(Fenilmetilsulfunilfluoride), Poliossi-Etilen-Sorbitan-Monolaurato, Tween 20 (Sigma Aldrich, Milano, Italia), ECL-Kit (GE Healthcare), Hyperfilm ECL (Amersham), Carta Whatmann 3 mm, Bradford Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich), Mini Trans Blot (Biorad, Italy), Hybond-P Nitrocellulose (GE Healthcare), BenchMarkTM Pre-Stained Protein Ladder (Life Technologies, Milano, Italia), Albumina Sierica Bovina frazione V (BSA) (Sigma-Aldrich). Gli anticorpi primari

utilizzati sono: HIF-1 α (R&D Systems, Inc. Celbio, Milano, Italia), ER β (Serotec, Milano, Italia), ER α (F-10), GPER (N- 15), CTGF (L-20), p-ERK1/2 (E-4), ERK2 (C-14), p-c-Jun Ser 73, c-Jun (N), p-AKT1/2/3 Ser 473-R, p-GSK-3 β Ser 9, p-NOS3 Ser 1177, b-tubulin (H-235-2), AKT/ 1/2/3 (H-136), eNOS/NOS3 (B-5), GSK3 β (4E95) (Santa Cruz, DBA, Milano, Italia). Gli anticorpi primari sono stati riconosciuti mediante appositi anticorpi secondari anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat coniugati con perossidasi di rafano (Santa Cruz, DBA, Milano, Italia).

2.5 Condizioni basali di perfusione

Gli esperimenti, in accordo con i dati riportati in letteratura (154,155), sono stati condotti con perfusione retrograda a flusso costante. La performance cardiaca è stata stabilizzata in circa 15-20 minuti, mentre la durata dell'esperimento è stata determinata dal tipo di protocollo eseguito. Tutti gli esperimenti sono stati realizzati a valori costanti di pH (7,4) e di temperatura (37°C) e su ciascun cuore è stato testato un singolo protocollo per evitare fenomeni di desensitizzazione.

2.6 Curve dose-risposta di G-1

Esperimenti preliminari, effettuati con perfusioni di una singola dose di G-1 (1 nmol/L) hanno dimostrato che l'applicazione ripetuta di tale composto sul cuore di ratto isolato e perfuso secondo *Langendorff*, non provoca desensitizzazione, cioè una ridotta o mancata risposta all'azione della sostanza (dati non mostrati). Alla luce di questa evidenza, dopo aver stabilizzato il preparato, per ciascuna variante sono state effettuate curve dose-risposta, perfondendo il cuore dei ratti WKY e SHR con concentrazioni crescenti (da 1 pmol/L a 10 nmol/L) di G-1. Ciascuna concentrazione è stata somministrata per dieci minuti, al termine dei quali sono stati valutati gli effetti sui parametri emodinamici. Protocolli del tutto simili condotti su preparati elettrostimolati, al fine di discriminare gli effetti inotropi e lusitropici da quelli sulla frequenza, hanno confermato l'andamento dei parametri cardiaci ottenuto su cuori a ritmo spontaneo (dati non mostrati).

2.7 Preparati stimolati in presenza di G-15

Al fine di confermare che G-1 attiva specificamente GPER, i cuori di ratto WKY e SHR sono stati perfusi con G-15 (100 nmol/L) per 10 min e successivamente perfusi con concentrazioni crescenti di G-1 (da 1pmol/L a 10 nmol/L), in presenza di G-15 (100 nmol/L).

2.8 Coinvolgimento di eNOS

Al fine di verificare il coinvolgimento dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) negli effetti cardiaci mediati da G-1, i cuori di ratto WKY e SHR sono stati perfusi con L-NIO (10 μ mol/L) per 10 min e successivamente perfusi con concentrazioni crescenti di G-1 (da 1pmol/L a 10 nmol/L), in presenza di L-NIO (10 μ mol/L).

2.9 Preparati stimolati dall'ipossia

I cuori isolati sono stati connessi all'apparato Langendorff per la perfusione con una soluzione di Krebs-Henseleit in presenza di una miscela gassosa costituita da 50%O₂-45%N₂- 5%CO₂. La pressione ventricolare sinistra (LVP), la frequenza cardiaca (HR) e il flusso coronarico sono stati monitorati durante l'intera durata della perfusione. Al termine della perfusione, i ventricoli sono stati escissi e immediatamente processati per l'estrazione dell'RNA e delle proteine.

3 Analisi statistica

Al termine di ciascun esperimento, i dati ottenuti vengono elaborati tramite analisi statistica. I parametri emodinamici ed i valori ad essi riferiti sono espressi come medie \pm errore standard delle variazioni percentuali, rilevate nel corso degli esperimenti, rispetto ai valori di controllo. Poiché ogni cuore rappresenta il controllo di se stesso, la significatività statistica della variazione tra la condizione test (in presenza di sostanza) e la condizione basale di controllo è stata determinata mediante l'analisi *one way* ANOVA. Il confronto tra i gruppi, utile per individuare eventuali differenze significative tra le diverse condizioni sperimentali, è stato valutato mediante *one-way* ANOVA, seguita dal Bonferroni post-hoc test; le variazioni sono considerate significative per (\circ), (\bullet), (\square), (\blacksquare), (*), (§), (+) $p < 0,05$ (§).

Capitolo Terzo

Risultati

3.1 L'espressione di GPER è maggiore nei ventricoli di ratto SHR rispetto ai ventricoli di ratto WKY

Al fine di estendere le attuali conoscenze sul potenziale ruolo svolto da GPER nella mediazione di effetti cardiaci, abbiamo iniziato il nostro studio caratterizzando l'espressione dei recettori estrogenici nei ventricoli sinistri provenienti dai cuori di ratti maschi normotesi (WKY) ed ipertesi (SHR). A tal fine, ciascun cuore è stato perfuso con la soluzione Krebs-Henseleit (KHs) e successivamente i ventricoli sinistri sono stati processati al fine di estrarne l'RNA. Come mostrato in Figura 3.1, ER α risulta essere espresso in ugual misura nei ratti normotesi (WKY) rispetto ai ratti ipertesi (SHR), come valutato mediante Real-Time PCR (pannello A) e PCR semiquantitativa (dato non mostrato); anche ER β è espresso in maniera simile nei due gruppi sperimentali considerati (Fig. 3.1 pannello A). È invece interessante notare come i ventricoli sinistri dei ratti SHR mostrino un'augmentata espressione genica di GPER rispetto ai ratti WKY (Fig. 3.1 pannello A). Abbiamo successivamente confermato questo dato preliminare valutando l'espressione dei recettori estrogenici a livello proteico, utilizzando la tecnica del western blotting. Come mostrato nella Figura 3.1, i livelli proteici di ER α (pannello B) sono paragonabili sia nei ventricoli sinistri dei ratti WKY che nei cuori di SHR, così come quelli di ER β (pannello C). L'espressione proteica di GPER risulta invece significativamente incrementata nei cuori di ratto SHR rispetto ai cuori di ratto WKY (pannello C).

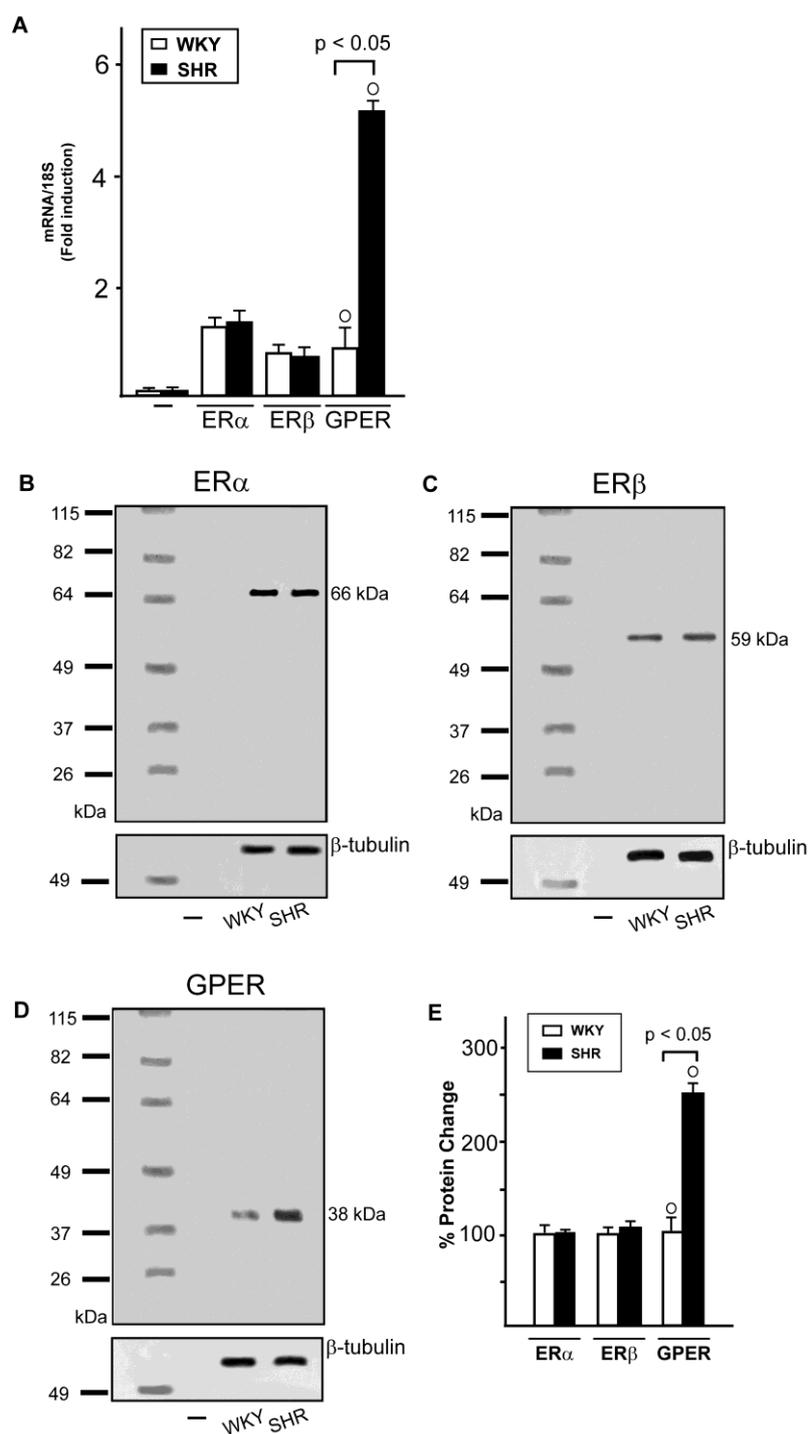


Fig. 3.1: (A) Espressione genica di ER α , ER β e GPER negli omogenati di ventricolo sinistro di ratto maschio WKY e SHR, valutata mediante Real-Time PCR e normalizzata rispetto all'espressione di 18S. (-) amplificazione in assenza di cDNA. Ogni dato rappresenta la media \pm SD di 5 esperimenti per ogni gruppo. (○) $p < 0.05$ per l'espressione in SHR rispetto a WKY. (B-D) Espressione proteica di ER α , ER β e GPER nei ventricoli sinistri di ratti maschi WKY e SHR. (-) buffer di lisi senza estratto proteico. Ogni dato rappresenta la media \pm SD di 5 diversi esperimenti. Il pannello laterale mostra l'analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati rispetto all'espressione della β -tubulina. (●),(○) $p < 0.05$ per l'espressione in SHR vs WKY.

Occorre sottolineare che la valutazione dell'espressione genica e proteica di ER α , ER β e GPER non ha mostrato alcuna variazione nelle preparazioni cardiache ottenute da ratti femmine WKY e SHR. In particolare, in questo modello sperimentale, i livelli di espressione di GPER risultano elevati già nei ratti normotesi (WKY) e non ulteriormente aumentati in condizioni di stress (ratti SHR) (Fig. 3.2). Tali risultati suggeriscono che l'incremento dell'espressione di GPER osservato nei ratti maschi SHR potrebbe rappresentare una risposta genere-specifica, sollevando interesse nei confronti dei diversi meccanismi alla base della regolazione dell'espressione di GPER tra ratti maschi e femmine.

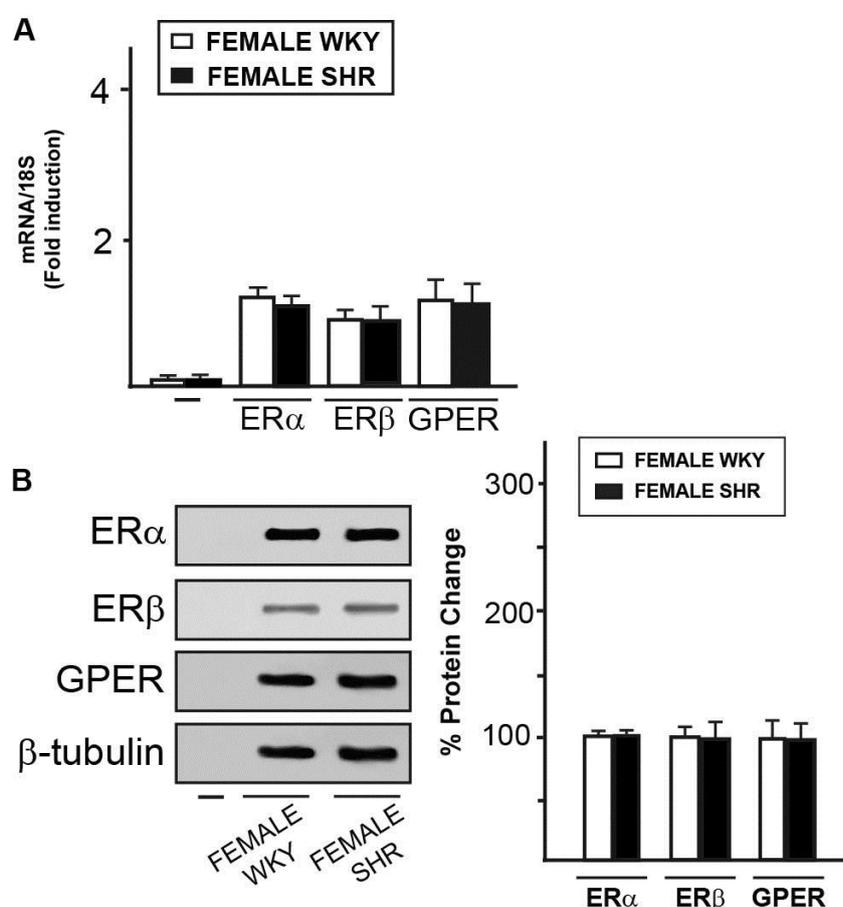


Fig. 3.2 (A) Espressione genica di ER α , ER β e GPER nei ventricoli sinistri di ratti femmine WKY e SHR, valutata mediante Real-Time PCR e normalizzata rispetto all'espressione di 18S. (-) amplificazione in assenza di cDNA. Ogni dato rappresenta una media \pm SD di 5 esperimenti per ogni gruppo. (B) Espressione proteica di ER α , ER β e GPER nei ventricoli sinistri di ratti femmine WKY e SHR. (-) buffer di lisi senza estratto proteico. Ogni dato rappresenta la media \pm SD di 5 diversi esperimenti. Il pannello laterale mostra l'analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati rispetto all'espressione della β -tubulina.

3.2 GPER media effetti inotropi e lusitropi negativi nei ratti WKY e SHR

Abbiamo successivamente valutato la capacità di GPER di regolare la meccanica contrattile cardiaca perfondendo i cuori di ratto WKY e SHR in presenza dell'agonista selettivo di GPER G-1 utilizzando l'apparato di perfusione di Langendorff. Esperimenti preliminari su preparati cardiaci in presenza della sola soluzione Krebs-Henseleit, i cui parametri sono stati misurati ogni 10 minuti, hanno dimostrato che la stabilità del preparato si mantiene per almeno 180 minuti (dati non mostrati).

Inoltre, la somministrazione ripetuta di singole concentrazioni di G-1 (1 nmol/L) ha consentito di verificare l'assenza di fenomeni desensitizzanti (dati non mostrati).

I parametri cardiaci dei ratti WKY e SHR, ottenuti dopo 20 minuti di equilibratura, sono riportati nelle tabelle 3.1 e 3.2.

LVP (mmHg)	HR (beats min ⁻¹)	EDVP (mmHg)	RPP (mmHg beats min ⁻¹)	+ (LVdP/dt) _{max} (mmHg s ⁻¹)	- (LVdP/dt) _{max} (mmHg s ⁻¹)	Time to peak (s)	HTR (s)	T/-t (mmHg s ⁻¹)	CP (mmHg)	Pressure perfusion (mmHg)
89±3	280±7	5-8	25±0.1 10 ⁴	2492±129	-1663±70	0.08±0.01	0.05±0.01	1.498±1.84	63±3	100

Tabella 3.1 Parametri cardiaci basali registrati nei ratti WKY

LVP (mmHg)	HR (beats min ⁻¹)	EDVP (mmHg)	RPP (mmHg beats min ⁻¹)	+ (LVdP/dt) _{max} (mmHg s ⁻¹)	- (LVdP/dt) _{max} (mmHg s ⁻¹)	Time to peak (s)	HTR (s)	T/-t (mmHg s ⁻¹)	CP (mmHg)	Pressure perfusion (mmHg)
106±4	330±12	5-8	3.5±0.5 10 ⁴	3290±109	-2595±54	0.12±0.01	0.07±0.01	1.2±1.65	110±8	100

Tabella 3.2 Parametri cardiaci basali registrati nei ratti SHR

Le curve dose-risposta sono state realizzate mediante la perfusione dei cuori di ratto WKY e SHR con soluzioni a diversa concentrazione di G-1 ed i parametri dell'attività cardiaca sono stati misurati dopo 10 minuti dalla somministrazione di ciascuna soluzione a diversa concentrazione (da 1 pmol/L a 10 nmol/L), poiché gli effetti indotti da G-1 rimangono stabili per circa 15-20 minuti.

Come evidenziato in figura 3.3 nei cuori di ratto WKY G-1 determina un effetto inotropo negativo dose-dipendente, rilevabile da una diminuzione significativa di LVP a partire da 1 pM, in assenza di variazioni del valore HR. G-1 riduce in maniera significativa anche $+(LVdP/dT)_{max}$ a partire da una concentrazione pari a 10 pmol/L. Nei cuori di ratto SHR, concentrazioni crescenti di G-1 determinano un rilevante effetto inotropo negativo, significativo a partire da 10 pmol/L (Fig. 3.3).

Inoltre, G-1 riduce i parametri di LVP (49%) e $+(LVdP/dt)_{max}$, rispettivamente del 49% e del 46% rispetto ai cuori perfusi con la sola soluzione KHs, raggiungendo un massimo alla concentrazione di 10 nmol/L. Accanto all'effetto sull'inotropismo, G-1 mostra anche un'azione lusitropa negativa, evidenziata dalla riduzione dose-dipendente del parametro $-(LVdP/dT)_{max}$ e dall'incremento del valore di T-t, senza modificare HR. I valori di pressione coronarica e LVEDP (indice di contrattura cardiaca) risultano invece non modificati in presenza del trattamento con G-1 (Fig. 3.3).

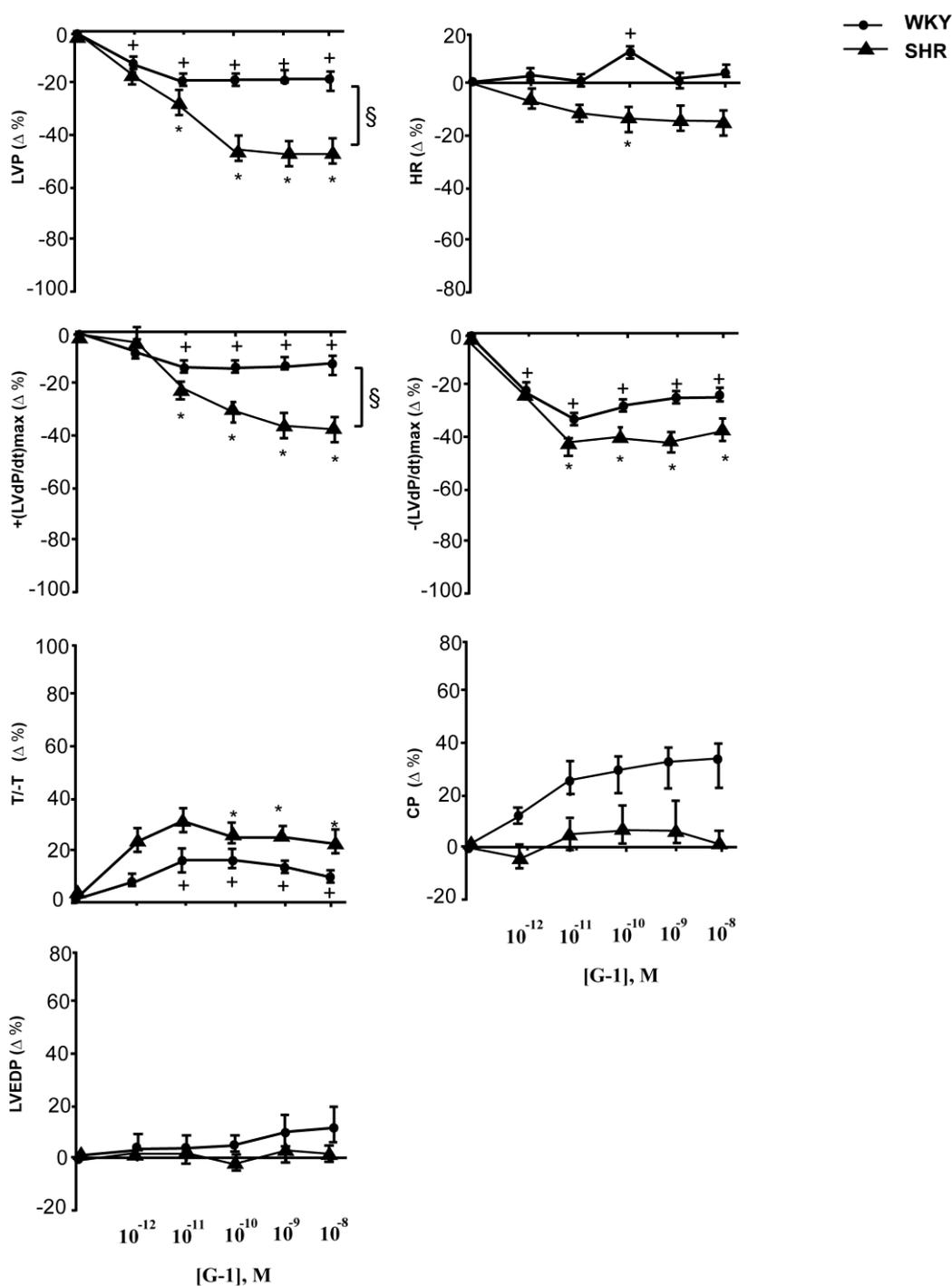


Fig. 3.3: Curve dose-risposta per G-1 (1 pmol/L -10 nmol/L) relative ai parametri inotropici (LVP e +(LVdP/dT)max), ai parametri lusitropici (T/-t e (LVdP/dT)max); a CP e LVEDP sui cuori di ratto isolati e perfusi con l'apparato Langendoff. Medie delle variazioni percentuali \pm SD, per n=5. I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm SD per n=5. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: (*), (+) indica $p < 0.05$. Per il confronto tra gruppi è stato utilizzato ANOVA, seguito da Bonferroni's Multiple Comparison Test, (§) $p < 0.05$.

Sulla base dei dati ottenuti, abbiamo successivamente voluto valutare se i livelli di espressione dei recettori estrogenici ER α , ER β e GPER potessero essere alterati dal trattamento dei cuori di ratto WKY e SHR con G-1. A tale scopo i cuori isolati dai ratti WKY e SHR sono stati perfusi attraverso l'apparato Langendorff con G-1 alla concentrazione di 1 nmol/L per 2 ore, successivamente omogenati e processati per l'estrazione dell'RNA e delle proteine. Come mostrato in figura 3.4 il trattamento con G-1 non modifica l'espressione dei recettori in esame a livello genico e proteico, suggerendo che gli effetti cardiaci indotti da G-1 non coinvolgono alterazioni dell'espressione di ER α , ER β e GPER.

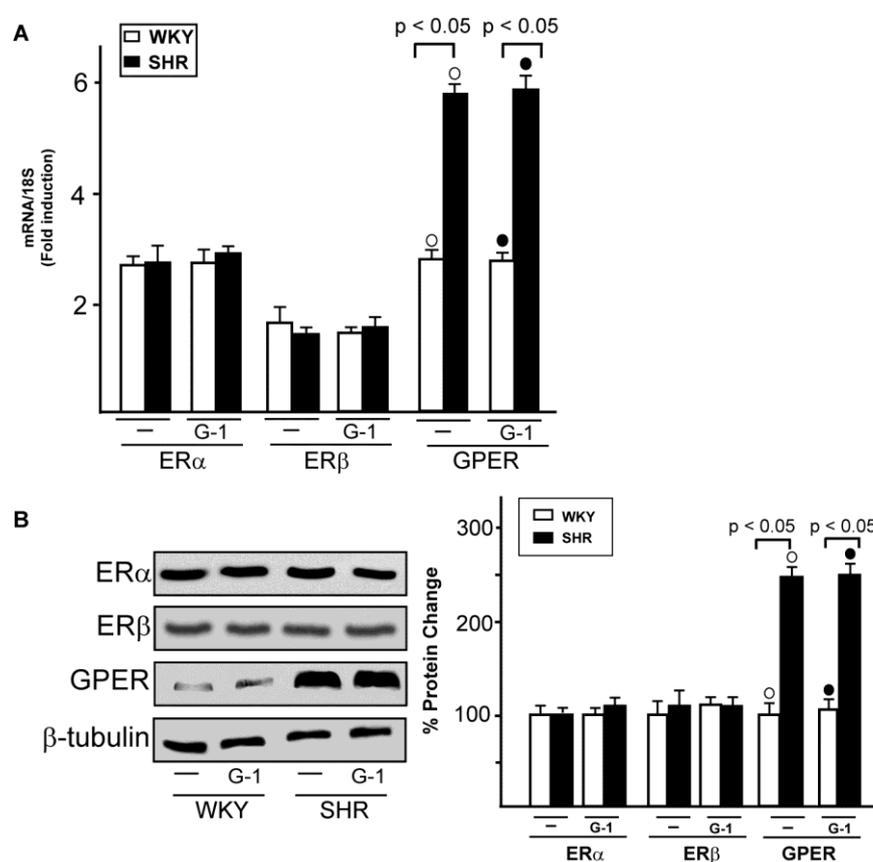


Fig. 3.4: (A) Espressione dell' mRNA di ER α , ER β e GPER negli omogenati dei ventricoli sinistri di ratti WKY e SHR, perfusi con G-1 (1nmol/L), valutata attraverso RT-PCR e normalizzata rispetto all'espressione di 18S. Ogni dato rappresenta una media \pm S.D. di 5 esperimenti per gruppo. (\circ), (\bullet) $p < 0.05$. (B) Espressione proteica di ER α , ER β e GPER nelle preparazioni dei ventricoli sinistri di ratti WKY e SHR, perfusi con G-1 (1nmol/L). Ogni dato rappresenta la media \pm SD di 5 diversi esperimenti. Il pannello laterale mostra l'analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati rispetto alla β -tubulina. (\bullet), (\circ) $p < 0.05$ per l'espressione in SHR vs WKY.

3.3 Meccanismi trasduzionali coinvolti negli effetti indotti da G-1

Poiché diversi studi hanno dimostrato che il *pathway* trasduzionale GPER/eNOS è coinvolto nella regolazione cardiaca e, in particolare, nelle azioni inotropiche negative indotte da indotta da G-1 (26), abbiamo perfuso i cuori di ratti WKY (Fig. 3.5) e SHR (dato non mostrato) con G-1 1nmol/L per 2 ore in presenza dell'antagonista selettivo di GPER G-15 (100 nmol/L) (B) e dell'inibitore selettivo di eNOS L-NIO (10 μ mol/L) (B). Come mostrato in figura 3.5, l'effetto inotropo e lusitropico (dato non mostrato) negativo indotto da G-1 è prevenuto dal pretrattamento con G-15 e L-NIO.

Tali dati suggeriscono che l'attivazione di GPER mediata da G-1 induce effetti cardiaci che coinvolgono l'attivazione dell'enzima eNOS, confermando il ruolo chiave svolto da tale enzima nella regolazione della meccanica contrattile cardiaca.

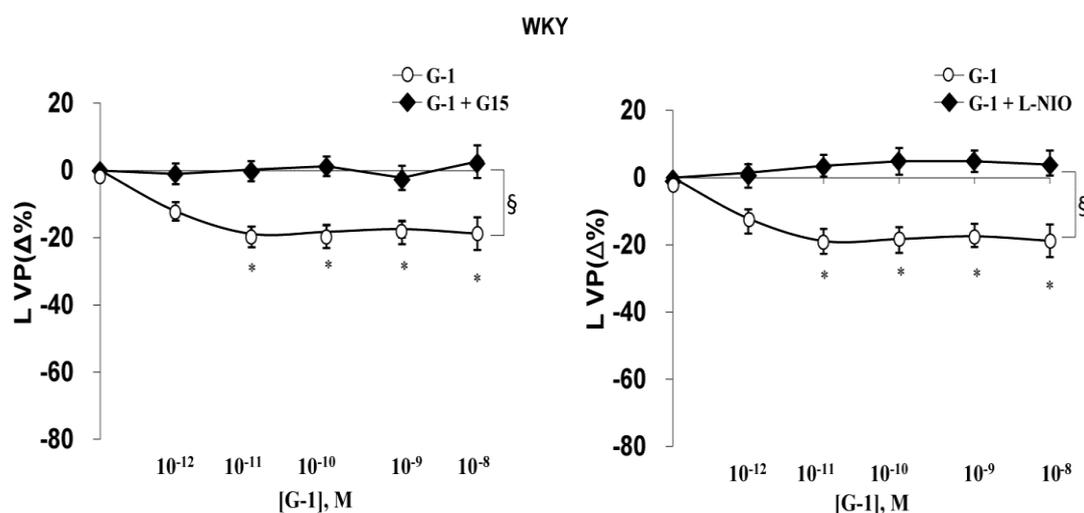


Fig. 3.5 Effetti sul parametro LVP nei cuori di ratto WKY isolati e perfusi secondo il metodo Langendorff in presenza di G-1 (1 pmol/L – 10 nmol/L) da solo e in combinazione con G-15 (100 nmol/L). Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: (*) indica $p < 0.05$. Il confronto tra i gruppi è stato effettuato mediante ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test (§) $p < 0.05$

Sulla base dei dati ottenuti e al fine di caratterizzare le vie del segnale attivate da GPER e individuare i meccanismi molecolari potenzialmente coinvolti negli effetti cardiaci mediati da tale recettore, abbiamo dapprima valutato la fosforilazione dell'enzima eNOS, uno dei principali *marker* della cardioprotezione (26).

Nei cuori di ratto WKY (Fig. 3.6 A) e SHR (Fig. 3.6 B), l'esposizione ad 1 nmol/L di G-1 induce l'attivazione di eNOS, che è abrogata dal pretrattamento con G-15 (100 nmol/L) e L-NIO (10µmol/L) (Fig. 3.6). Successivamente, abbiamo valutato la capacità di G-1 di promuovere la fosforilazione di alcuni noti trasduttori del segnale associati all'attivazione di GPER. Negli omogenati cardiaci di ratto WKY e SHR perfusi con G-1 si osserva la fosforilazione di ERK1/2, AKT, c-Jun and GSK3β; tali risposte molecolari sono prevenute in presenza del pretrattamento con G-15 ma non con L-NIO (Fig. 3.6 A,B). Questi dati indicano che il segnale mediato da GPER innesca l'attivazione di una rete di segnali tra cui le MAPK, AKT, c-JUN ed elementi cardioprotettivi del pathway RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) quali GSK3β, che culminano nell'attivazione a valle dell'eNOS.

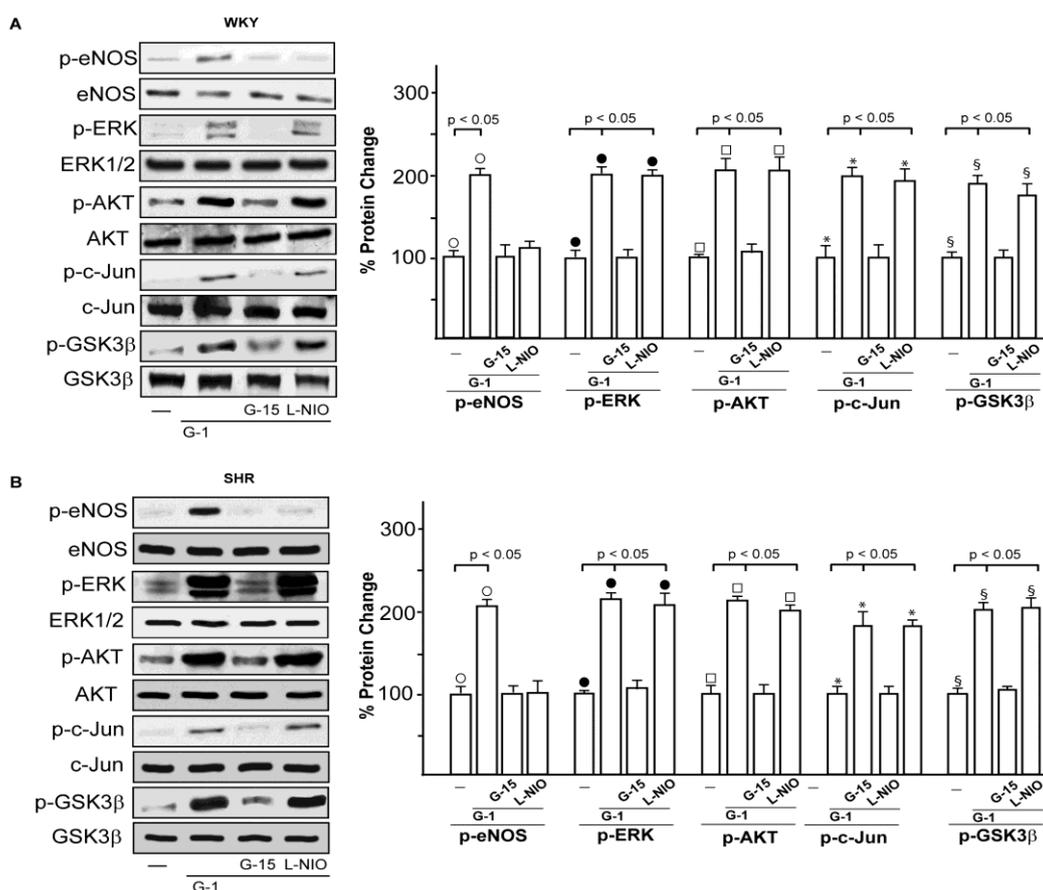


Fig 3.6: Fosforilazione di eNOS, ERK, AKT, c-Jun, and GSK3β negli omogenati di ventricolo sinistro ottenuto dai ratti WKY (A) e SHR (B) perfusi con veicolo (-), G-1 (1 nmol/L per 2h) da solo e in combinazione con G-15 (100 nmol/L per 1h) o L-NIO (10nmol/L per 1h). I livelli di espressione di ogni fosfo-proteina sono quantificati densitometricamente e normalizzati rispetto al livello di espressione proteica totale. Ogni dato rappresenta la media ± SD di 5 esperimenti. (○), (●), (□), (*), (§) p < 0.05.

3.4 L'espressione di HIF-1 α e CTGF è maggiore nei cuori di ratto SHR rispetto ai cuori di ratto WKY

Abbiamo recentemente dimostrato che in cardiomiociti murini e in cellule tumorali mammarie esposte ad ipossia, accanto all'up-regolazione di GPER, si verifica l'incremento dell'espressione del mediatore di ipossia HIF-1 α e del fattore fibrotico CTGF (20,156) e che GPER e CTGF sono geni target di HIF-1 α (20,156). Pertanto ci siamo chiesti se l'elevata espressione di GPER osservata nei cuori di SHR rispetto ai cuori di ratto WKY fosse accompagnata dall'up-regolazione di HIF-1 α e CTGF. Come mostrano i dati di Real-time PCR e western blotting riportati in figura 3.7, l'espressione genica e proteica di HIF-1 α e di CTGF risultano maggiori negli omogenati cardiaci di ratti ipertesi (SHR) rispetto ai ratti normotesi (WKY). Tali dati suggeriscono che in condizioni di stress dovuto ad ipertensione, si verifica un'attivazione della via del segnale HIF-1 α /GPER/CTGF *in vivo*, come precedentemente osservato in un differente sistema sperimentale sottoposto a stress ipossico (20,156).

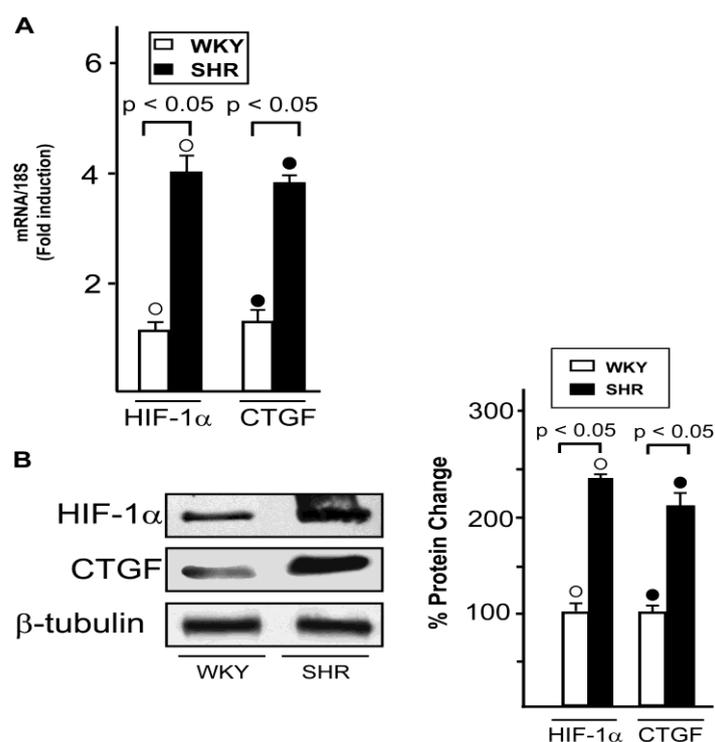


Fig. 3.7 (A) Valutazione dell'espressione dell'mRNA di HIF-1 α e CTGF nel tessuto ventricolare sinistro di ratti WKY e SHR, valutata mediante Real-Time PCR e normalizzazione rispetto all'espressione di 18S. Ogni dato rappresenta la media \pm SD di cinque esperimenti per ogni gruppo. (○), (●) $p < 0,05$ per l'espressione in SHR vs WKY. (B) Valutazione dell'espressione proteica di HIF-1 α e CTGF nel tessuto ventricolare sinistro di ratti WKY e SHR. Ogni dato rappresenta la media \pm SD di cinque diversi esperimenti. Il pannello laterale mostra l'analisi densitometrica dei livelli proteici di HIF-1 α e CTGF normalizzati rispetto alla β -tubulina. (●), (○) $p < 0,05$ per l'espressione in SHR vs WKY.

3.5 L'ipossia induce l'espressione di HIF-1 α , GPER e CTGF nei cuori di ratto WKY

Come precedentemente menzionato, nostri recenti studi hanno dimostrato che nei cardiomiociti murini HL-1 esposti a bassa tensione di ossigeno o trattati con l'agente ipossico mimetico CoCl₂ si verifica un aumento dell'espressione genica e proteica di HIF-1 α (20,156).

In tali condizioni, sia GPER che CTGF risultano essere geni target dell'azione innescata dall'ipossia e mediata da HIF-1 α . Pertanto, abbiamo voluto verificare se una condizione di stress quale la ridotta tensione di ossigeno potesse determinare un incremento dei livelli di espressione di HIF-1 α , GPER e CTGF nei cuori di ratto WKY.

A tal fine, i cuori di ratto WKY sono stati esposti a bassa tensione di ossigeno (50% di O₂) per 1h e successivamente il tessuto ventricolare sinistro di ciascun animale è stato omogenato e immediatamente processato per la valutazione dell'espressione genica e proteica mediante Real-Time PCR e western blotting rispettivamente.

Come mostrato in figura 3.8 nei cuori di ratto WKY esposti ad una ridotta tensione (50% di O₂) si verifica un aumento dei livelli di mRNA (pannello A) e proteina (pannello B) di HIF-1 α , GPER e CTGF, rispetto ai ratti WKY esposti ad una normale tensione di ossigeno (95% O₂).

Occorre riportare che una simile procedura sperimentale eseguita in cuori di SHR non ha evidenziato un'ulteriore up-regolazione dei geni in esame (dati non mostrati), probabilmente a causa degli elevati livelli di espressione di HIF-1 α , GPER e CTGF, già rilevabili prima dell'esposizione all'ipossia (Fig. 3.1).

Tali dati suggeriscono che in risposta alla bassa tensione di ossigeno il *pathway* trasduzionale HIF-1 α /GPER/CTGF sia attivo anche in un sistema *in vivo* come precedentemente osservato in un modello sperimentale differente *in vitro*.

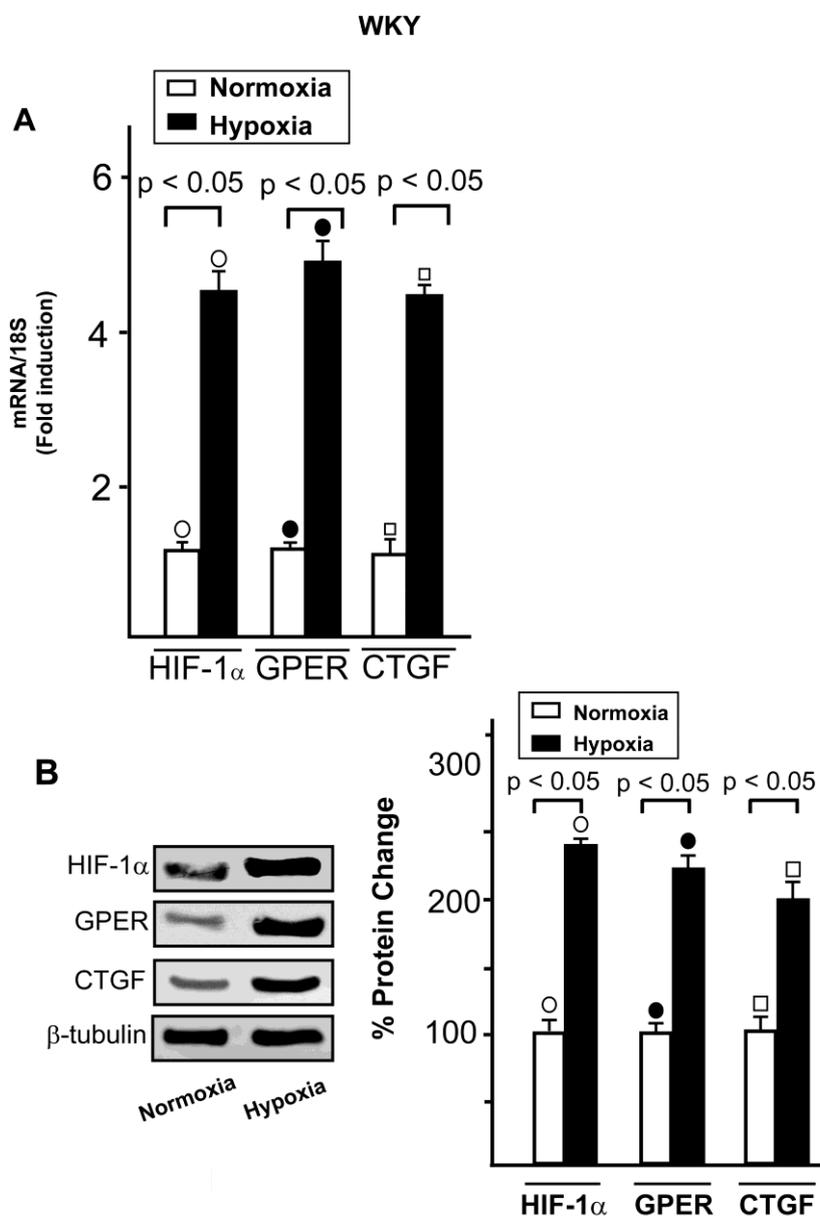
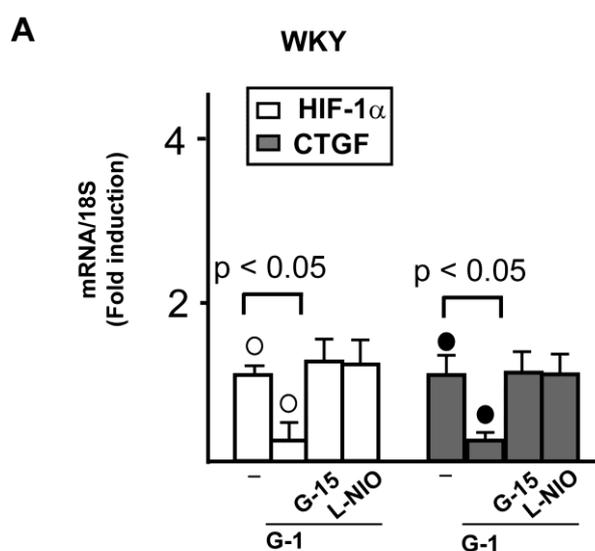


Fig. 3.8 (A) Valutazione dell'espressione dell'mRNA di HIF-1 α , GPER e CTGF nei ventricoli sinistri di ratti WKY in condizione di normossia ed ipossia (pO₂ 50% per 1h) e normalizzazione rispetto all'espressione di 18S. Ogni dato rappresenta la media \pm SD di cinque esperimenti. (○), (●), (□) p < 0,05 per l'espressione di preparazioni ipossiche vs preparazione normossiche. (B) Espressione proteica di HIF-1 α , GPER e CTGF nei ventricoli sinistri di ratti WKY in condizioni normossiche e ipossiche (pO₂ 50% per 1h). Ogni dato rappresenta la media \pm S.D. di cinque diversi esperimenti. Il pannello laterale mostra l'analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati rispetto alla β -tubulina. (○), (●), (□) p < 0,05 per l'espressione delle preparazioni ipossiche vs preparazioni normossiche.

3.6 Il pathway trasduzionale GPER/eNOS regola l'espressione di HIF-1 α e CTGF

Precedenti nostri studi hanno riportato che gli estrogeni sono in grado di regolare i livelli di espressione di HIF-1 α e CTGF in condizioni di ipossia (156). Inoltre abbiamo recentemente dimostrato che la stimolazione di GPER mediante il suo agonista selettivo G-1 determina importanti effetti cardiotropici mediati dall'attivazione dell'eNOS (26). Sulla base di tali osservazioni, abbiamo valutato se la via di trasduzione GPER/eNOS potesse regolare l'espressione di HIF-1 α e di CTGF nei modelli sperimentali da noi utilizzati. In cuori di ratto WKY (Fig. 3.9) e SHR (dato non mostrato), la perfusione con G-1 ha determinato la riduzione dell'espressione genica di HIF-1 α e di CTGF (Fig. 3.9 A), che è prevenuta in presenza del pretrattamento con G15 e L-NIO (Fig. 3.9 A), suggerendo che il pathway trasduzionale GPER/eNOS è coinvolto nella down-regolazione dell'espressione di HIF-1 α e CTGF indotta da G-1. Ad ulteriore conferma di questi dati, nei ratti WKY e SHR il trattamento con G-1 ha determinato la riduzione dell'espressione proteica di HIF-1 α e CTGF (Fig. 3.9 B). Complessivamente, i risultati riportati potrebbero includere l'up-regolazione di GPER tra le risposte biologiche a condizioni di stress come l'ipossia e l'ipertensione grazie alla capacità di tale recettore di regolare l'espressione di HIF-1 α e CTGF.



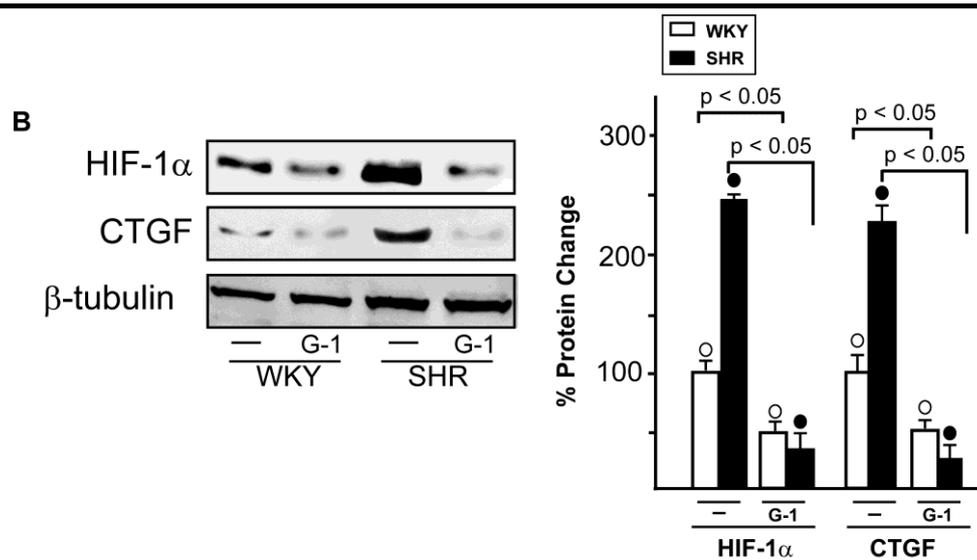


Fig. 3.9 (A) Valutazione dell'espressione dell'mRNA di HIF-1α e CTGF nei ventricoli sinistri di ratti WKY perfusi con veicolo (-), G-1 (1 nmol/L per 2h) da solo e in combinazione con G-15 (100 nmol/L per 1h) o L-NIO (10μmol/L per 1h). I risultati sono stati normalizzati in base all'espressione del gene 18S. Ogni dato rappresenta la media ± SD di cinque esperimenti per ogni gruppo. (○), (●) p < 0.05. (B) Valutazione dell'espressione proteica di HIF-1α e CTGF nei tessuti ventricolari di ratti WKY e SHR trattati con il veicolo (-) G-1 (1 nmol/L per 2h) da solo e in combinazione con G-15 (100 nmol/L per 1h) o L-NIO (10μmol/L per 1h). Ogni dato rappresenta la media ± S.D. di 5 diversi esperimenti. Il pannello laterale mostra l'analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati rispetto alla β-tubulina. (●), (○) p < 0.05

Capitolo Quarto

Discussione

Un crescente numero di studi ha dimostrato che il recettore accoppiato a proteina G GPER è coinvolto nella mediazione dei segnali attivati da estrogeni e composti correlati in diversi tessuti (6,8), tra cui il sistema cardiovascolare (7,25). Poiché GPER è fortemente espresso nel cuore dell'uomo e nel cuore di ratto (157), tale recettore potrebbe mediare le azioni cardioprotettive esercitate dagli estrogeni interagendo con il classico ER o attivando *pathway* trasduzionali che regolano importanti risposte biologiche indipendentemente da ER (26-28,158). Considerando che un grande interesse scientifico è rivolto verso la caratterizzazione del ruolo svolto da GPER nella fisiopatologia cardiaca, il presente studio ha permesso di fornire nuove evidenze sperimentali riguardanti i meccanismi attraverso cui GPER può influenzare l'attività cardiaca nei ratti spontaneamente ipertesi (SHR) che rappresentano un modello ampiamente utilizzato per lo studio dell'ipertensione arteriosa. I nostri risultati dimostrano che i livelli di espressione genica e proteica di GPER sono più elevati nei ventricoli sinistri di ratti maschi SHR rispetto ai ratti maschi normotesi (WKY). L'espressione di GPER risulta invece elevata negli omogenati cardiaci di ratti femmine WKY e non ulteriormente incrementati nelle preparazioni di ratti femmine SHR. Tale dato potrebbe indicare l'esistenza di una regolazione dell'espressione di GPER genere-specifica, che rappresenta un importante argomento da investigare in futuri studi.

Per quanto riguarda i livelli genici e proteici di ER α e ER β , sia nei ratti maschi che femmine WKY e SHR, non sono state rilevate differenze nei livelli di espressione di tali recettori, indicando che essi non vengono differenzialmente regolati in condizioni di stress ipertensivo.

Nei cuori di ratto isolati e perfusi secondo Langendorff, il ligando selettivo di GPER G-1 ha indotto una riduzione della contrattilità, come evidenziamto dal decremento dei parametri

LVP e $+(LVdP/dt)_{max}$. Tale effetto risulta più evidente nei ratti SHR rispetto ai ratti WKY ed è indipendente dal cronotropismo in entrambi i sistemi sperimentali analizzati. Accanto all'azione inotropica negativa osservata in seguito al trattamento con G-1, abbiamo evidenziato un'azione lusitropica negativa nei ratti WKY e SHR, indicata dalla riduzione del parametro $-(LVdP/dt)_{max}$ e dall'incremento di T/t. Nonostante i rilevanti effetti sulla meccanica cardiaca, il trattamento con G-1 non ha indotto alcuna variazione delle motilità coronarica, infatti è stata osservata solo una vasocostrizione non significativa nei ratti WKY. Sulla base di tali osservazioni, l'elevata espressione di GPER associata al marcato effetto cardiorepressivo evidenziato nei ratti SHR, potrebbe esercitare un ruolo protettivo nei confronti dello stress conseguente all'elevata pressione arteriosa. In accordo con questa osservazione, G-1 non ha modificato la pressione endo-diastolica, che rappresenta un importante indice di contrattura. Quindi, le risposte cardiache mediate da GPER potrebbero essere utili per prevenire e ritardare l'insorgenza di risposte compensatorie dannose quali l'ipertrofia cardiaca, che spesso precede l'infarto del miocardio (159,160). A tale riguardo, i nostri risultati sottolineano gli importanti effetti protettivi mediati dall'attivazione di GPER, in linea con precedenti studi che dimostrano l'abilità di G-1 di migliorare le disfunzioni diastoliche e ridurre l'ipertrofia ventricolare sinistra in un modello di cardiomiopatia ipertensiva indotta da un'alimentazione ricca in sali (28). Analogamente, è stato recentemente riportato che G-1 attenua le disfunzioni diastoliche e il rimodellamento del ventricolo sinistro in ratti mRen2.Lewis sottoposti ad ovariectomia, suggerendo che l'attivazione di GPER potrebbe mitigare gli effetti avversi dovuti alla mancanza di estrogeni e sul rimodellamento del ventricolo sinistro e sul danno diastolico (161).

Richiamando precedenti studi che collegano i segnali estrogenici con l'attivazione dell'eNOS (26,162), nel presente studio abbiamo dimostrato che il *pathway* trasduzionale GPER/eNOS è coinvolto nelle azioni inotropiche e lusitropiche negative indotte da G-1. In particolare, il pretrattamento con l'antagonista selettivo di GPER G-15 e l'inibitore di eNOS L-NIO ha abrogato le risposte cardiache indotte da G-1. Inoltre, abbiamo determinato che diverse cascade trasduzionali vengono attivate da G-1 a monte di eNOS, poiché il pretrattamento con G-15 ma non con L-NIO previene la fosforilazione di ERK1/2, AKT, GSK3 β e c-Jun. Questi nostri risultati sono in accordo diversi precedent lavori che hanno dimostrato il coinvolgimento delle vie del segnale eNOS/ERK e PI3K/AKT nelle azioni cardiache promosse da G-1 e mediate da GPER (26,121). Estendendo ulteriormente precedenti dati che

collegano l'attività di c-Jun con la produzione di NO (163), abbiamo anche dimostrato che GPER è coinvolto nell'attivazione di c-Jun, associata alla fosforilazione di eNOS. Inoltre, abbiamo evidenziato che la perfusione con G-1 induce anche l'attivazione di GSK3 β , un importante mediatore implicato nell'attivazione di meccanismi alla base della sopravvivenza cellulare (164,165). Collettivamente, i dati presentati in questo lavoro suggeriscono che G-1 innesca un network di segnali cardioprotettivi coinvolto nel *pathway* RISK (*reperfusion injury salvage kinase*) (166), che è attivato nel pre e post-condizionamento cardiaco sia ischemico che farmacologico (166-168).

Ampliando il nostro studio, abbiamo dimostrato che il mediatore di ipossia HIF-1 α e il fattore fibrotico CTGF, unitamente a GPER, sono maggiormente espressi negli omogenati di ventricolo sinistro di ratti SHR rispetto ai ratti WKY. Simili risposte geniche sono state evidenziate nei cuori di ratto WKY perfusi in condizioni ipossiche, suggerendo che in condizioni di stress ipertensivo o ipossico vengano innescate risposte biologiche che coinvolgono l'up-regolazione di GPER, HIF-1 α e CTGF. A tal riguardo, il ruolo di HIF-1 nell'adattamento cellulare allo stress ossidativo e conseguente ad una bassa tensione di ossigeno è ampiamente riconosciuto. Pertanto, i nostri risultati consentono di asserire che in condizioni di ipertensione e ipossia l'up-regolazione di GPER può essere inclusa tra i meccanismi biologici di tipo adattativo che intervengono in un microambiente sfavorevole. Occorre riportare che un *cross-talk* funzionale tra l'ipossia e l'ipertensione è stato ampiamente documentato, poiché le condizioni di bassa ossigenazione, che seguono l'ipertensione, inducono l'espressione e funzione di HIF-1 α (22). Inoltre, l'ipossia può generare uno stato di ipertensione attraverso diversi meccanismi mediati da HIF-1 α (169) e che determinano incremento dei livelli di catecolamine circolanti (170). L'attivazione di HIF-1 può anche promuovere la morte cellulare programmata in corso di ipossia prolungata, in maniera dipendente dal contesto sperimentale considerato (171,124-125), contribuendo pertanto alla degenerazione cardiaca e all'infarto del miocardio (172). È interessante sottolineare che NO è stato implicato nell'inibizione dell'attività ed espressione di HIF-1 (173-176). In linea con tali dati, i nostri risultati indicano che la via del segnale GPER/eNOS media la down-regolazione di HIF-1 α e del suo target fibrotico CTGF indotta da G-1, particolarmente nel modello di cuore di ratto iperteso. I risultati riportati nel presente studio lasciano emergere un importante ruolo per GPER nell'adattamento a condizioni di stress, in accordo con precedenti studi che hanno mostrato l'abilità di G-1 di ridurre l'area infartuale e

le disfunzioni post-ischemiche osservate in seguito a I/R (121). Oltre a ciò, G-1 è in grado di preservare la funzionalità miocardica se somministrato prima di una I/R globale, grazie alla sua capacità di ridurre l'infiammazione del miocardica (177), quindi, risulta evidente che l'azione cardioprotettiva mediata da GPER può coinvolgere molteplici meccanismi che necessitano di ulteriori chiarificazioni.

Nel presente studio sono stati utilizzati ratti maschi WKY e SHR che rappresentano un modello sperimentale unico, considerando che la loro esposizione agli estrogeni è molto bassa. Tale questione dovrebbe essere attentamente tenuta in considerazione dal momento che le funzioni mediate da GPER potrebbero essere regolate dagli estrogeni, rendendo quindi difficile l'interpretazione delle risposte biologiche. Inoltre, occorre ricordare che gli uomini e le donne in età post-menopausale presentano un rischio maggiore di sviluppare patologie cardiovascolari, rispetto alle donne in età pre-menopausale, che sono invece esposte ad elevati livelli di estrogeni. In ogni caso, ulteriori studi dovrebbero essere indirizzati verso la comprensione del potenziale ruolo cardioprotettivo mediato da GPER in presenza di un differente *milieu* ormonale.

Nostri precedenti studi hanno dimostrato che l'inibizione di ER α e ER β è in grado di prevenire gli effetti cardiovascolari benefici indotti da E2 e G-1 (26), suggerendo l'esistenza di un *cross-talk* funzionale tra ER e GPER. Sono state identificate diverse isoforme di ER α , denominate ER α 66kD, 46kD e 36kD, sebbene l'isoforma di 66kD sia stata ampiamente riconosciuta per il suo predominante ruolo nella mediazione del segnale estrogenico (178-179). G-1 è stato indicato come un attivatore dell'isoforma 36kD della proteina di ER α umana in cellule tumorali (180), evidenziando un possibile contributo di questo recettore nella mediazione delle risposte biologiche indotte da G-1. Tuttavia, simili evidenze non sono state riportate nel modello cuore di ratto, pertanto nel nostro sistema sperimentale l'attivazione di GPER indotta da G-1 rappresenta il meccanismo coinvolto negli effetti cardiaci osservati, come ulteriormente dimostrato utilizzando l'antagonista selettivo di GPER, G-15. Collettivamente, il presente studio fornisce nuove evidenze riguardanti il ruolo regolatorio svolto da GPER in condizioni di stress caratterizzate da un'alterata *performance* ventricolare.

Capitolo Quinto

Conclusioni e prospettive

Le informazioni ottenute nel presente lavoro di tesi hanno consentito di descrivere un importante ruolo per il recettore estrogenico GPER nella modulazione della *performance* cardiaca in condizioni di stress ipertensivo, che, come ampiamente riconosciuto, contribuisce fortemente allo sviluppo e progressione del danno cardiaco.

In particolare, l'up-regolazione dell'espressione cardiaca di GPER può rappresentare un importante meccanismo adattativo in risposta a condizioni di stress ipossico e ipertensivo, da caratterizzare ulteriormente in futuri studi.

I risultati da noi ottenuti consentono di annoverare GPER tra i nuovi *target* molecolari da considerare nel trattamento delle patologie cardiache, considerato il suo coinvolgimento nella regolazione dell'inotropismo e lusitropismo, due fattori fondamentali per una adeguata meccanica contrattile cardiaca. Il ruolo di GPER nella regolazione dell'espressione di fattori apoptotici e fibrotici quali HIF-1 α e CTGF apre la strada verso l'ulteriore caratterizzazione dei mediatori molecolari che contribuiscono alla sua azione cardioprotettiva e dei *pathway* intracellulari coinvolti. In particolare, l'attenzione focalizzata sul coinvolgimento dell'enzima eNOS nelle azioni inotrope e lusitrope negative mediate da GPER fornisce importanti indicazioni verso una futura definizione del ruolo svolto da NO negli effetti cardiaci indotti da G-1. In tale contesto, sarà interessante investigare il meccanismo molecolare attraverso cui GPER media la down-regolazione di HIF-1 α e CTGF, in collaborazione con eNOS.

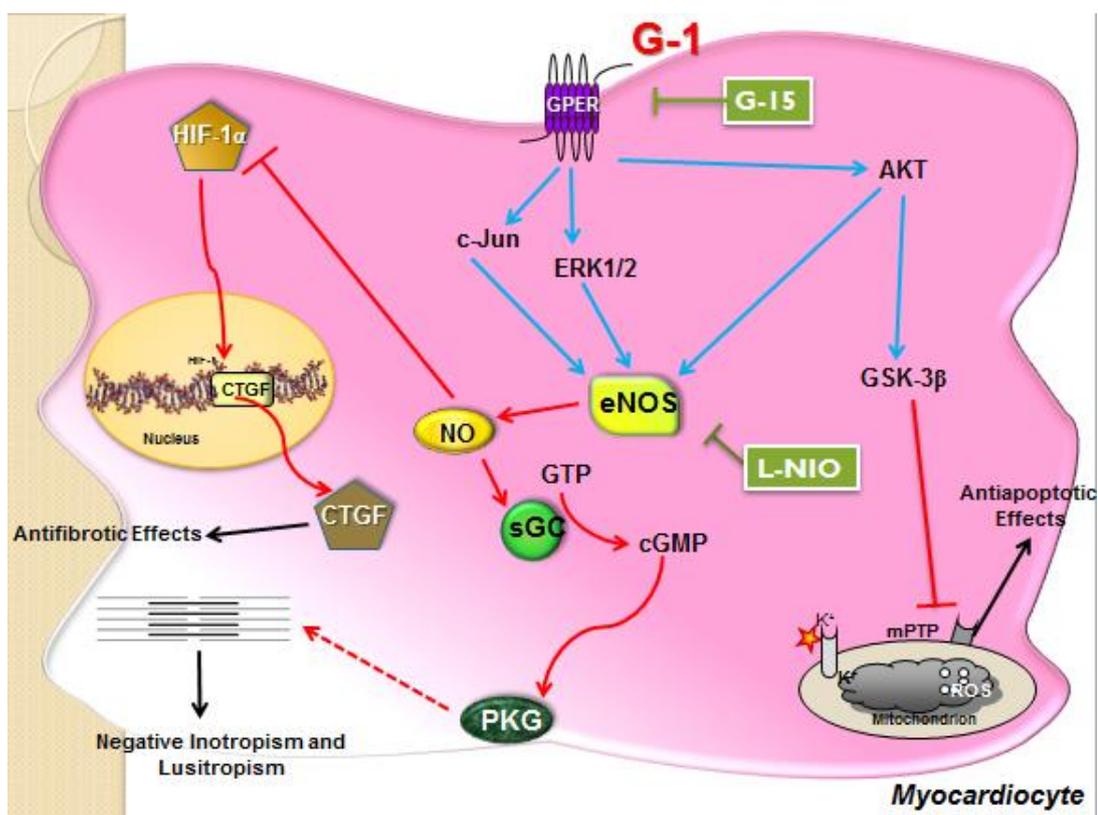
Nel presente lavoro abbiamo anche evidenziato il coinvolgimento di alcuni importanti elementi del *pathway* RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) in risposta all'attivazione di

GPER, suggerendo che tale via del segnale possa innescare ulteriori meccanismi di sopravvivenza da esplorare in successivi studi.

Infine, particolare attenzione è da riservare all'osservazione che l'incremento dell'espressione di GPER osservata nei ratti maschi ipertesi, non si ripropone nelle femmine, che invece presentano già elevati livelli di espressione recettoriale in presenza di una pressione arteriosa normale. Pertanto, l'incremento dell'espressione di GPER osservato nei ratti maschi SHR potrebbe rappresentare una risposta genere-specifica, che solleva particolare interesse in merito ai diversi meccanismi coinvolti nella regolazione dell'espressione di GPER tra ratti maschi e femmine.

Nel complesso i dati presentati in questo lavoro consentono di identificare in GPER un nuovo importante *target* capace di mediare risposte cruciali per la regolazione della funzionalità cardiaca sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Pertanto, i nostri risultati possono contribuire ad analizzare il potenziale terapeutico dei *pathway* di trasduzione GPER-dipendenti nelle patologie cardiache.



Schema esemplificativo del meccanismo e azioni mediate da GPER e delle vie del segnale attivate

Bibliografia

1. **Ascenzi P, Bocedi A, Marino M** (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol. Aspects Med*; 27 Mol Aspects Med; 27(4):299-402.
2. **Henderson BE, Ross R & Bernstein L** (1988). Estrogens as a cause of human cancer. Richard and Linda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Research*; 48 246-253.
3. **Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L & Press MF** (1993). Estrogens, progestagens, normal breast cancer proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiology Reviews*; 15:17-35.
4. **Mendelsohn ME** (2002). Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol*; 89:12E-17E.
5. **Laudet V** (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol*; 19:207-226.
6. **Prossnitz ER, Maggiolini M** (2009). Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 308:32-38.
7. **Prossnitz ER, Barton M** (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 7: 715–726.
8. **Maggiolini M, Picard D** (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*; 204:105-114.
9. **Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Andò S** (2004). The G Protein-coupled Receptor GPR30 Mediates c-fos up-regulation by 17 β - Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem*; 279: 27008-27016.
10. **Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M** (2006). 17 β estradiol, genistein, and 4 hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein coupled-receptor GPR30. *Mol Pharmacol* 70: 1414-1423.
11. **Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M** (2006). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol*; 20: 631-646.
12. **Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Andò S, Maggiolini M** (2007). G protein coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*; 67: 1859-1866.

13. **Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D** (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J* 28: 523-532.
14. **Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, Maggiolini M** (2010). Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*; 320:162-170.
15. **Chimento A, Sirianni R, Delalande C, Silandre D, Bois C, et al.** (2010). 17 betaestradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Mol Cell Endocrinol*. 320: 136-144.
16. **Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr** (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*; 14:1649-1660.
17. **Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER** (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*; 307:1625-1630.
18. **Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J** (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*; 146:624-632.
19. **Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL** (1992). A new nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*; 131:1305-1312.
20. **Recchia AG, De Francesco EM, Vivacqua A, Sisci D, Panno ML** (2011). The G protein- coupled receptor 30 is upregulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*; 286:10773-10782.
21. **De Francesco EM, Lappano Rosamaria, Santolla MF, Marsico S, Caruso A, Maggiolini M** (2013). HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Res*; 15(4):R64.
22. **Lenihan CR, Taylor CT** (2013). The impact of hypoxia on cell death pathways. *Biochem Soc Trans*. 41(2):657-63.
23. **Semenza GL** (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*; 13:167-171.
24. **Semenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR** (2006). Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp*; 272: 2-8; discussion 8-14,33-36.
25. **Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M** (2011). The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascul Pharmacol*; 55:17-25
26. **Filice E, Recchia AG, Pellegrino D, Angelone T, Maggiolini M, et al.** (2009). A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17beta-estradiol in the male rat. *J Physiol Pharmacol*; 60:3-10.

27. **Lindsey SH, Cohen JA, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC** (2009). Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2.Lewis rats. *Endocrinology*; 150: 3753-3758.
28. **Jessup JA, Lindsey SH, Wang H, Chappell MC, Groban L** (2010). Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2.Lewis rats. *PLoS ONE*; 5: e15433 doi: 10.1371/journal.pone.0015433.
29. **Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al.** (2013). Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*; 127:(1)e6-e245.
30. **Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al.** (2010). Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*; 121:e46-e215.
31. **Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM et al.** (2012). Heart disease and stroke statistics-2012 update,” *Circulation*; 125:(1)e2-e220.
32. **Nogueira JB.** (2013). Hypertension, coronary heart disease and stroke: Should the blood pressure J-curve be a concern? *Rev Port Cardiol*; 32(2):139-44.
33. **Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration** (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*;360(9349):1903-13.
34. **Law MR, Morris JK, Wald NJ** (2009). Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*; 338:b1665. doi: 10.1136/bmj.b1665
35. **Daskalopoulou SS, Khan NA, Quinn RR, Ruzicka M, McKay DW, Hackam DG, Rabkin SW, Rabi DM, Gilbert RE, et al.** (2012). The 2012 Canadian hypertension education program recommendations for the management of hypertension: blood pressure measurement, diagnosis, assessment of risk, and therapy. *Can J Cardiol*; 28(3):270-87.
36. **Martell Claros N, Prieto Diaz MA** (2012). Why and when to begin pharmacological treatment with dual-therapy. *Semergen*; 38(7):445-51.
37. **Maranon R, Reckelhof JF** (2013). Sex and gender differences in control of blood pressure *Clin Sci (Lond)*;125(7):311-8.
38. **Xue B, Pamidimukkala J, Hay M** (2005). Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; 288:H2177-H2184.
39. **Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Yanes LL, Dorsett-Martin W, Reckelhoff JF** (2008). Hypertension. 51(4):1170-6. Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA (2004). Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *Am J Pharmacogenomics*. 2004;4(1):19-28.
40. **Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG** (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab*; doi: 10.1016/j.tem.2012.03.008.

41. **Verdier-Sévrain S, Bonté F, Gilcrest B** (2006). Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol*; 15(2):83-94.
42. **Szafran H, Smielak-Korombel W. Przegl Lek** (1998). The role of estrogens in hormonal regulation of lipid metabolism in women; 55(5):266-70.
43. **Kawasaki T, Chaudry IH** (2012). The effects of estrogen on various organs: therapeutic approach for sepsis, trauma, and reperfusion injury. Part 1: central nervous system, lung, and heart. *J Anesth*; 26(6):883-91. doi: 10.1007/s00540-012-1425-3.
44. **Mendelsohn ME** (2002). Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol*; 89:12E-17E.
45. **Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H. Bulun SE** (2008). Regulation of breast cancer associated aromatase promoters. *Cancer Lett.* doi:10.1016.
46. **Gorodeski GI, Yang T, Levy MN, Goldfarb J, Utian WH** (1998). Modulation of coronary vascular resistance in female rabbits by estrogen and progesterone. *J Soc Gynecol Invest*;5:197-202.
47. **Williams JK, Adams MR, Herrington DM, Clarkson TB** (1992). Short term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. *J Am Coll Cardiol*; 20:452-457.
48. **Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR.** Effect of estrogen on global myocardial ischemia/reperfusion injury in female rats (2000). *Am J Physiol*; 279:2766-H2775.
49. **Cignarella A, Paoletti R, Puglisi L** (2001). Direct effects of estrogen on the vessel wall. *Med Res*; 21:171-184.
50. **Caulin-Gasler T, Watson CA, Pardi R, Bender JR** (1996). Effect of 17 β -estradiol on cytochrome induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin. Investig*; 98:36-42.
51. **Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Fortepiani LA, Yanes LL, Reckelhoff JF** (2007). Sex differences in oxidative stress and the impact on blood pressure control and cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*; 34,:938-945
52. **Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S** (2009). Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 29(3):289-95. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.182279.
53. **Kolodgie FD, Farb A, Litovsky SH, Narula J, Jeffers LA, Lee SJ, Virmani R** (1997). Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat. *J Mol Cell Cardiol*; 29(9):2403-14.
54. **Schunkert H** (1997). Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)*; 75(11-12):867-75.
55. **Nickenig G, Böhm M** (1998). Interaction between insulin and AT1 receptor. Relevance for hypertension and arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol*; 93 Suppl 2:135-9.
56. **Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G. and Levin ER** (2005). Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors ER α and ER β . *J Biol Chem.* 280:19704-10.

-
57. **Ji H, Menini S, Zheng W, Pesce C, Wu X, Sandberg K** (2008). Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17 β -oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. *Exp. Physiol.*; 93:648-657.
 58. **Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE** (1996). Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca²⁺-dependent K⁺ channels” *Am Heart Association Circ Res*; 79(5):1024-30.
 59. **Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM** (1997). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca²⁺ uptake. *Circ Res.* 1997;81(2):242-8.
 60. **Vitale C, Fini M, Speziale G, Chierchia S** (2010). Gender differences in the cardiovascular effects of sex hormones. *Fundam Clin Pharmacol*; 24(6):675-85.
 61. **Nelson WD, Zenovich AG, Ott HC, Stolen C, Caron GJ, Panoskaltis-Mortari A Barnes SA 3rd, Xin X, Taylor DA** (2007). Sex-dependent attenuation of plaque growth after treatment with bone marrow mononuclear cells. *Circ Res*; 101:1319-1327.
 62. **Hamada H, Kim MK, Iwakura A, Ii M, Thorne T, Qin G, Asai J, Tsutsumi Y, Sekiguchi H, Silver M, Wecker A, Bord E, Zhu Y, Kishore R, Losordo DW** (2006). Estrogen receptor alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation*; 114:2261-2270.
 63. **Dawn B, Bolli R** (2006). Increasing evidence that estrogen is an important modulator of bone marrow-mediated cardiac repair after acute infarction. *Circulation*; 114:2203-2205.
 64. **Frantz S, Hu K, Widder J, Weckler B, et al.** (2007). Detrimental effects of testosterone on post myocardial infarction remodelling in female rats. *J Physiol Pharmacol*; 58(4):717-7277.
 65. **Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B** (2006). The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol*; 84: 93-109.
 66. **de Ronde W, Pols HA, van Leeuwen JP, de Jong FH** (2003). The importance of oestrogens in males. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 58:529-542.
 67. **Lew R, Komesaroff P, Williams M, Dawood T, Sudhir K** (2003). Endogenous estrogens influence endothelial function in young men. *Circ Res*; 93:1127-1133.
 68. **Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM** (1997). Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet*; 349:1146-1147.
 69. **Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP, Malloy MJ, Korach KS, Rubanyi GM** (1997). Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation*; 96:3774-3777.
 70. **Kimura M, Sudhir K, Jones M, Simpson E, Jefferis AM, Chin-Dusting JP** (2003). Impaired acetylcholine-induced release of nitric oxide in the aorta of male aromatase-

- knockout mice: regulation of nitric oxide production by endogenous sex hormones in males. *Circ Res*; 93:1267-1271.
71. **Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, Peter I, Schmid CH, Karas RH, Mendelsohn ME, Housman DE, Levy D** (2003). Association between estrogen receptor α gene variation and cardiovascular disease. *JAMA*; 290:2263-2270.
 72. **Filice E, Angelone T, De Francesco EM, Pellegrino D, Maggiolini M, Cerra MC** (2011). Crucial role of phospholamban phosphorylation and S-nitrosylation in the negative lusitropism induced by 17 β -estradiol in the male rat heart. *Cell Physiol Biochem*; 28:41-52.
 73. **Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA** (2005). Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β . *Endocr Rev*; 26: 465-478.
 74. **Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P and Chambon P** (1986). Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature*; 320:134-139,
 75. **Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M & Gustafsson JA** (1997). Human estrogen receptor β -gene structure, chromosome localization, expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 82:4258-4265.
 76. **Gustafsson JA** (1999). Estrogen receptor beta a new dimension in estrogen mechanism of action. *Endocr*; 163:379-383.
 77. **Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS** (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*; 138 (11):4613-21.
 78. **Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA** (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceeding of the national Academy of Science*, 93:5925-5930.
 79. **Katzenellenbogen BS and Korach KS** (1997). A new actor in the estrogen receptor drama-enter ER- β . *Endocrinol*; 138:861-862.
 80. **Murphy E** (2011). Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res*; 109:687-696.
 81. **Babiker FA, Lips D, Meyer R, Delvaux E, Zandberg P, Janssen B et al.** (2006). Estrogen receptor protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 26:1524-1530.
 82. **Piro M, Della Bona R, Abbate A, Biasucci LM, Crea F** (2010). Sex-related differences in myocardial remodeling. *J Am Coll Cardiol*; 55:1057-1065.
 83. **Peters GA, Khan SA** (1999). Estrogen Receptor Domains E and F: Role in Dimerization and Interaction with Coactivator RIP-140. *Molecular Endocrinology*; 13(2):286-296.

-
84. **Kumar R, Thompson EB** (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*; 17:1-10.
 85. **McInerney EM, Katzenellenbogen BS** (1996). Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J Biol Chem*; 271:24172-24178.
 86. **Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM, Moras D** (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res*; 2:353-359.
 87. **Gearhart MD, Holmbeck SMA, Evans RM, Dyson HJ, Wright PE** (2003). Monomeric complex of human orphan estrogen related receptor-2 with DNA: a pseudo-dimer interface mediates extended half-site recognition. *J Mol Biol*; 327:819-832.
 88. **Pearce ST, Jordan VC** (2004). The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*; 50:3-22.
 89. **Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M** (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. *Nature*; 389:753-758.
 90. **Chao EY, Collins JL, Gaillard S, Miller AB, Wang L, Orband-Miller LA, Nolte RT, Donnell DP, Willson TM, Zuercher WJ** (2006). Structure-guided synthesis of tamoxifen analogs with improved selectivity for the orphan ERR γ . *Bioorg Med Chem Lett*; 16:821-824.
 91. **Mosselman S, Polman J & Dijkema R** (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*; 392 49-53.
 92. **Hall JM, Couse JF, Korach KS** (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*; 276:36869-36872.
 93. **Berno V, Amazit L, Hinojos C, Zhong J, Mancini MG, Sharp ZD, Mancini MA** (2008). Activation of estrogen receptor- α by E2 or EGF Induces Temporally Distinct Patterns of Large-Scale Chromatin Modification and mRNA Transcription. *PLoS ONE*; 3(5):e2286.
 94. **Levin ER** (2005). Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Molecular Endocrinology*; 19:1951-1959.
 95. **Pratt WB** (1990). Interacton of hsp90 with steroid receptor mediate rapid cell signaling. *Science*; 307:1625-1630.
 96. **Beato M** (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*; 56:335-344.
 97. **McKenna NJ, O'Malley BW** (2001). Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann N Y Acad Sci*; 949:3-5.
 98. **Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE and Zhang J** (2004). Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors α and β by coactivators and corepressors. *Journal of Molecular Endocrinology*; 33:387-410.

-
99. **Björnström L, Sjöberg M** (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*; 19(4):833-42.
 100. **Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price Jr RH, Pestell RG, Kushner PJ** (2002). Opposing action of estrogen receptors α and β on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*; 277:24353-24360.
 101. **Simoncini T, Fornari L, Mannella P, Varone G, Caruso A, Liao JK, Genazzani AR** (2002). Novel non-transcriptional mechanism for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor α with phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Steroids*; 67:935-9.
 102. **Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, Komm B, Katzenellenbogen B and Katzenellenbogen BS** (2008). Nuclear and Extranuclear Pathway Inputs in the Regulation of Global Gene Expression by Estrogen Receptors *Molecular Endocrinology*; doi:10.1210/me.2008-0059.
 103. **Kelly MJ; Wagner EJ** (1999). Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab*; 10:369-74.
 104. **Coleman KM, Dutertre M, El-Gharbawy A, Rowan BG, Weigel NL, Smith CL** (2003). Mechanistic differences in activation of estrogen receptor- α (ER α) and ER β -dependent gene expression by AMP signaling pathway(s). *J Biol Chem*; 278 (15):12834-45.
 105. **Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP** (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*; 3:27-41.
 106. **Simoncini T, Hazefi-Moghdadam, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK** (2000). Interaction on oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*; 407:538-541.
 107. **Chambliss KL, Shaul PW**. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002; 23: 665-686.
 108. **Levin E.R** (2001). Genome and Hormones: Gender Differences in Physiology Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 91:1860-1867.
 109. **Luttrell LM** (2006). Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol*; 332:3-49.
 110. **Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ** (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*; 45:607-617.
 111. **Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J** (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*; 146:624-32.
 112. **Filardo EJ, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P** (2007). Activation of the Novel Estrogen Receptor G protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane. *Endocrinology*; 148: 3236-3245.

-
113. **Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ** (1996). Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 285-92.
114. **Takada Y, Kato S, Korengaga R, Ando J** (1997). Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*; 240:737-741.
115. **O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr, George SR** (1998). Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*; 47:310-13.
116. **Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y** (2006). G protein coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane *Biochem Biophys Res Commun*; 346 (3):904-910.
117. **Madeo A, Maggiolini M** (2010). Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17 β -Estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res*;70:6036-6046.
118. **Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER.** Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2006 Apr;2(4):207-12. Epub 2006 Mar 5.
119. **Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Bland KI** (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*; 16:70-8.
120. **Chang L, Karin M** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*; 410:37-40.
121. **Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanovic M, Brailoiu GC, Gao X, Mueller-Guerre L, Marjon NA, Gut A, Minotti R, Meyer MR, Amann K, Ammann E, Perez-Dominguez A, Genoni M, Clegg DJ, Dun NJ, Resta TC, Prossnitz ER, Barton M** (2009). Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res*; 104:288-291.
122. **Deschamps AM, Murphy E** (2009). Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 297:H1806-H1813.
123. **Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW** (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*; 59,5830-5835.
124. **Greijer AE, van der Wall E** (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*; 57:1009-14.
125. **Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C** (2002). Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):889-92.

-
126. **Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C Hickey R, Jovin IS, Pypaert M, Johnson RS, Giordano FJ.** (2008). Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol*; 28: 3790-3803.
127. **Shi-Wen X, Leask A, Abraham D** (2008). Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*; 19:133-44.
128. **Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M** (2003). Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*; 108:1499-505.
129. **Hermida N, López B, González A, Dotor J, Lasarte JJ, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, Díez J** (2009). A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*; 81(3):601-9.
130. **Bork P** (1993). The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*; 327:125-130.
131. **Brigstock DR** (1999). The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev*; 20(2):189-206.
132. **De Winter P, Leoni P, Abraham D** (2008). Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors*; 26:80-91.
133. **Leask A** (2009) Signaling in fibrosis: targeting the TGF beta, endothelin-1 and CCN2 axis in scleroderma. *Front Biosci (Elite Ed)*; 1:115-22120.
134. **Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T** (2007). New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep*; 9:136-143.
135. **Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, Doi M, Murakami T, Ninomiya Y, Takigawa M, Tsuji T** (1998). Increased expression of connective tissue growth factor in infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*; 30: 2411-2422.
136. **Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Oystein Andersen G, Andersson Y, Attramadal T, Attramadal H** (2004). Connective tissue growth factor- a novel mediator of angiotensin II stimulated cardiac fibroblasts activation in heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol*; 36:393-404.
137. **Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burrell LM** (2005). Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Histochem Cytochem*; 53(10):1245-56.
138. **Koitabashi N, Arai M, Kogure S, Niwano K, Watanabe A, Aoki Y, Maeno T, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M** (2007). Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension*; 49:1120-1127.

-
139. **Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR.** (1993). Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*; 4:637-645.
140. **Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B et al.** (1998). Connective tissue growth factor mRNA expression is up-regulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol*; 275:L365-71.
141. **Kubota S, Takigawa M** (2007). CCN. Family proteins and angiogenesis: from embryo to adulthood. *Angiogenesis*; 10:1-11.
142. **De Winter P, Leoni P, Abraham D** (2008). Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors*; 26:80-910.
143. **Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, Abraham DJ** (2009). Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal*; 3(2):89-94; doi: 10.1007/s12079-009-0037-7.
144. **Chen CC, Chen N, Lau LF** (2001). The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276:10443-10452.
145. **Lau LF, Lam SC** (1999): The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Experimental Cell Research*; 248(1):44-57
146. **Gao R, Brigstock DR** (2003). Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem*; 5;279(10):8848-55.
147. **Brigstock DR** (1999). The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev*; 20(2):189-206.
148. **Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR** (1996). Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol*; 107:404-411.
149. **Leask A, Abraham DJ** (2006). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*; 2006; 119:4803-10.
150. **Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y** (2001). Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J*; 16(2):219-21.
151. **Cerra MC, De Iuri L, Angelone T, Corti A, Tota** (2006). Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff perfused rat heart. *Basic Res Cardiol*; 101:43-52.
152. **Bartfly WJ, Dawood F, Wen WH, Lehotay DC, Hou D, Bartfly E, Lou X, Backx PH, Liu PP** (1999). Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc Res*; 43:892-900.

-
153. **Sutherland FJ, Hearse DJ** (2000). The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*; 41(6):613-27.7
154. **Legssyer AK, Hove-Madsen L, Hoerter J, Fischmeister R** (1997). Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca²⁺ current in the rat. *J Mol Cell Cardiol*; 29:579-591.
155. **Doring HJ** (1990). The Isolated perfused heart according to Langendorff technique function- application. *Physiol Bohemoslov*; 39:481-504.
156. **Lappano R, Recchia AG, De Francesco EM, Angelone T, Cerra MC, Picard D, Maggiolini M** (2011). The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. *PLoS ONE*; 6:e16631 doi: 10.1371/journal.pone.0016631.
157. **Patel VH, Chen J, Ramanjaneya M, Karteris E, Zachariades E, Thomas P, Been M, Randeve HS** (2010). G protein coupled estrogen receptor 1 expression in rat and human heart: Protective role during ischaemic stress. *Int J Mol Med*; 26:193-199.
158. **Delbeck M, Golz S, Vonk R, Janssen W, Hucho T, Isensee J, Schäfer S, Otto C** (2011). Impaired left ventricular cardiac function in male GPR30-deficient mice. *Mol Med Repor*; 4:37-40.
159. **Doggrell SA, Brown L** (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*; 39:89-105.
160. **Mitchell GF, Pfeffer JM, Pfeffer MA** (1997). The transition to failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*; 10:120S-126S.
161. **Wang H, Jessup JA, Lin MS, Chagas C, Lindsey SH, Groban L** (2012). Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodelling in oophorectomized mRen2.Lewis rats. *Cardiovasc Res*; 94:96-104.
162. **Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo D, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW**. (2001). Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitricoxide synthase through Galpha (i). *J Biol Chem*; 276:27071-27076.
163. **Park JH, Park M, Byun CJ, Jo I** (2012). c-Jun N-terminal kinase 2 phosphorylates endothelial nitric oxide synthase at serine 116 and regulates nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun*; 417:340-345.
164. **Bertrand J, Despeaux M, Joly S, Bourogaa E, Gallay N, Demur C, Bonneville P, Louache F, Maguer-Satta V, Vergnolle N, Payrastre B, Racaud-Sultan C** (2012). Sex differences in the GSK3 β -mediated survival of adherent leukemic progenitors. *Oncogene*; 31:694-705.
165. **Katoh M, Katoh M** (2006). Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3 β to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther*; 5:1059-1064.
166. **Hausenloy DJ, Yellon DM** (2007). Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*; 12:217-234.
167. **Schulman D, Latchman DS, Yellon D** (2002). Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 283:H1481-H1488.

-
168. **Penna C, Mancardi D, Raimondo S, Geuna S, Pagliaro P** (2008). The paradigm of postconditioning to protect the heart. *J Cell Mol Med*; 12:435-458.
169. **Czibik G** (2010). Complex role of the HIF system in cardiovascular biology. *J Mol Med (Berl)*; 88:1101-1111.
170. **Semenza GL, Prabhakar NR** (2007). HIF-1-dependent respiratory, cardiovascular, and redox responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal*; 9:1391-1396.
171. **Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F** (2005). Role of hypoxia inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 32:395-403.
172. **Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C, Hickey R, Jovin IS, Pypaert M, Johnson RS, Giordano FJ** (2008). Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol*; 28:3790-3803.
173. **Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y** (1998). Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:7368-7373.
174. **Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF** (1999). Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem*; 274:9038-9044.
175. **Adhikary G, Premkumar DR, Prabhakar NR** (2000). Dual influence of nitric oxide on gene regulation during hypoxia. *Adv Exp Med Biol*; 475:285-292.
176. **Ao Q, Huang L, Zhu P, Xiong M, Wang D** (2004). Inhibition of expression of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA by nitric oxide in hypoxic pulmonary hypertension rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*; 24:5-8.
177. **Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, Poynter JA, Meldrum DR** (2010). Signaling via GPR30 protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury. *Surgery*; 148: 436-443.
178. **Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach KS, Sonntag-Buck V, Gannon F** (2001). ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol*; 15:2064-2077.
179. **Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF** (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun*; 336:1023-7.
180. **Kang L, Zhang X, Xie Y, Tu Y, Wang D, Liu Z, Wang ZY** (2010). Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol Endocrinol*; 24:709-21.