



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

Scuola di Dottorato in Scienze per la Salute

XXVII CICLO

SSD:MED 03

**STUDIO DEL RUOLO DELLA
FOSFODIESTERASI 5 NELLA
MODULAZIONE DELLA FREQUENZA
DI CONTRAZIONE**

Coordinatore di dottorato:

Prof. Guido Grasso

**Dottoranda: Marisa Cornacchione
Matricola: 146121**

TUTOR: Prof. Silvio Garofalo

INDICE

| | |
|--|--------|
| 1. INTRODUZIONE | pag. 4 |
| 1.1. Anatomia e fisiologia del cuore | pag. 4 |
| 1.2. Il sistema β -Adrenergico | pag.13 |
| 1.3. Le Fosfodiesterasi | pag.21 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | pag.32 |
| 3. MATERIALI E METODI | pag.34 |
| 3.1 Modelli murini utilizzati | pag.34 |
| 3.2 Colture primarie | pag.35 |
| 3.3 Analisi della frequenza di contrazione | pag.37 |
| 3.4 Trattamenti farmacologici | pag.38 |
| 3.5 Misurazione dei transienti di Ca^{2+} | pag.38 |
| 3.6 Analisi dei biosensori cAMP e cGMP | pag.39 |
| 3.7 Estrazione mRNA e RT-PCR | pag.39 |
| 3.8 Immunofluorescenza | pag.40 |
| 3.9 Immunoprecipitazione | pag.41 |
| 3.10 Analisi statistica | pag.41 |
| 4. RISULTATI | pag.42 |
| 4.1 Espressione delle fosfodiesterasi nel cuore e nei cardiomiociti in coltura | pag.42 |
| 4.2 La PDE5 modula la frequenza di contrazione dei cardiomiociti neonatali in seguito a stimolazione β -AR | pag.44 |

| | |
|---|--------|
| 4.3 L'effetto cronotropo negativo del Sildenafil viene mediato dalla PDE2 | pag.47 |
| 4.4 L'aploinsufficienza della PDE2 previene gli effetti dell'inibizione della PDE5 sulla frequenza di contrazione | pag.51 |
| 4.5. Il Sildenafil modula specifici pool di cAMP | pag.54 |
| 4.6 L'effetto cronotropo negativo del sildenafil non viene mediato dalla PKG | pag.59 |
| 5. DISCUSSIONE | pag.61 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | pag.69 |

1. INTRODUZIONE

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL CUORE

STRUTTURA DEL CUORE

Il cuore è un organo muscolare cavo sostenuto e avvolto all' interno di un sacco fibroso denominato *pericardio*, contenuto nella cavità toracica. La forma e le dimensioni del pericardio corrispondono a quelle del cuore, che può spostarsi liberamente al suo interno coerentemente con i cambiamenti volumetrici del sangue.

È possibile suddividere il cuore in due cavità indipendenti, cuore destro dove circola sangue venoso e cuore sinistro dove circola sangue arterioso. Ciascuna di queste cavità è costituita da una parte superiore a pareti sottili, l'*atrio*, e da una parte inferiore, il *ventricolo*, a pareti più spesse. La parte destra e sinistra del cuore sono separate tra loro da un setto longitudinale, che impedisce il mescolamento di sangue tra i due lati, la porzione del setto che separa gli atri viene chiamata interatriale mentre in corrispondenza dei ventricoli interventricolare. Ciascun atrio comunica con il ventricolo corrispondente per mezzo di specifiche valvole e attraverso un' ampia apertura, l'orifizio atrio-ventricolare. Le cavità atriali hanno una forma molto irregolare e una parete sottile e liscia, la parete superiore dell'atrio destro presenta l'orifizio di sbocco della vena cava superiore, mentre nella parete posteriore l'orifizio della vena cava inferiore e inferiormente l'orifizio del seno coronarico. I ventricoli hanno una forma a cono, le cui basi presentano due orifici larghi e di forma circolare, chiamati orifizio atrioventricolare e orifizio arterioso. Tutti questi orifici sono provvisti di valvole la cui funzione è quella di regolare il flusso di sangue all'interno del cuore. L'apertura e la chiusura delle valvole è interamente legata alle variazioni pressorie intracardiache, non esiste infatti alcun tipo di controllo nervoso o muscolare sull'attività delle valvole, che sono dunque semplicemente “spinte” dal flusso stesso

del sangue. Il principale compito delle valvole cardiache è quello di impedire, il reflusso del sangue verso gli atri durante la fase sistolica o "contrazione ventricolare" (valvole tricuspide e bicuspide) o verso i ventricoli durante la fase diastolica o "rilasciamento ventricolare" (valvole semilunari) (Stanfield C.L. & German V.J., 2009) (Fig.1).

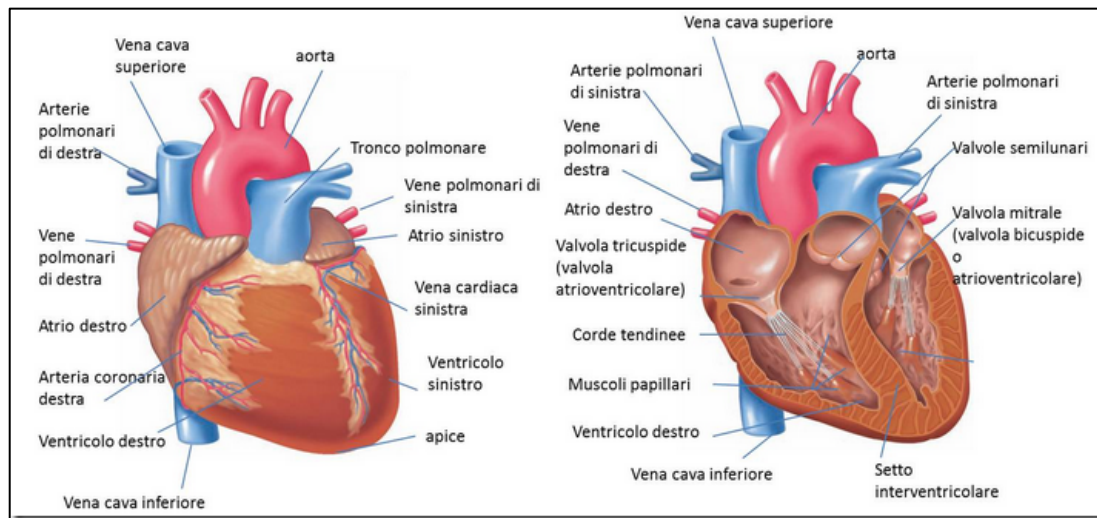


Fig.1 Anatomia del cuore. Rappresentazione longitudinale del cuore umano in cui sono visibili i due atri e i due ventricoli

Osservando il cuore da un punto di vista istologico è possibile distinguere tre tuniche distinte che, dall'interno all'esterno prendono il nome di *endocardio*, *miocardio* e *epicardio* (Fig.2). L'endocardio è una sottile membrana traslucida e biancastra che riveste internamente tutte le cavità cardiache e le superfici valvolari. Si definisce endocardio parietale lo strato che riveste le cavità cardiache; esso è composto da uno strato superficiale di natura endoteliale e da una lamina propria, connessa a sua volta con il tessuto sottostante per mezzo di una lamina di connettivo sottoendocardico. Viene invece indicato come endocardio valvolare lo strato che va a costituire le valvole atrioventricolari e le valvole semilunari. L'epicardio è in realtà formato dal foglietto viscerale del pericardio sieroso, che aderisce esternamente al miocardio.

Quest'ultimo, costituisce la parete più spessa del cuore, ed è formato da un muscolo striato involontario organizzato in modo da formare due strutture fra loro indipendenti, uno per gli atri e uno per i ventricoli, separati dall'interposizione dello scheletro fibroso del cuore, al quale sono ancorate lamine di tessuto muscolare. Il miocardio che forma le pareti del cuore è detto miocardio comune, consiste di fasci intrecciati di fibre muscolari cardiache disposte a spirale attorno alla periferia del cuore. Lo si distingue dal miocardio specifico di conduzione formato da cellule miocardiche, che hanno perso le loro proprietà contrattili acquisendo in modo specifico funzioni di autoeccitabilità e conducibilità. (Gartner L.P. & Hiatt J.L., 2002)

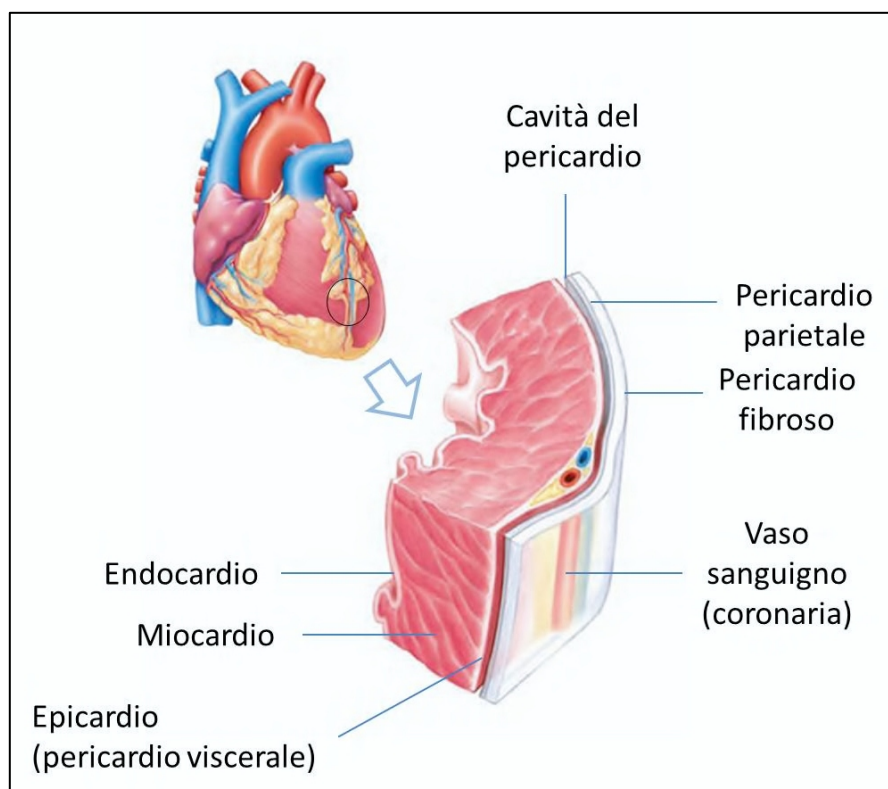


Fig.2 Istologia del cuore. Dall'interno verso l'esterno si osservano: endocardio, miocardio e epicardio

CONTRAZIONE MUSCOLARE CARDIACA

Come per le cellule muscolari scheletriche, le principali strutture intracellulari delle cellule muscolari cardiache, sono le *miofibrille*, fasci di proteine contrattili, organizzate in unità funzionali, definite sarcomeri, che sono responsabili della contrazione. Ciascuna miofibrilla è composta da diversi tipi di proteine: la *miosina* e l'*actina*, che sono proteine di natura contrattile, la *tropomiosina* e la *troponina* che sono invece proteine di natura regolatoria, e diverse proteine accessorie. Ciascuna molecola di miosina è composta da due catene pesanti identiche e da due paia di catene leggere. L'actina costituisce invece i filamenti sottili della miofibrilla, si tratta di un polimero di subunità globulari di G-actina, con un sito di legame specifico per una testa di miosina. La contrazione del miocardio si verifica attraverso lo stesso meccanismo di scorrimento dei filamenti che si ha nel muscolo scheletrico. All'interno delle miofibrille, filamenti spessi di miosina e filamenti sottili di actina, sono parzialmente sovrapposti e la contrazione del sarcomero fa sì che slittino l'una sull'altra. La forza che spinge i filamenti di actina è dovuta al movimento dei ponti trasversali della miosina che spingono i filamenti di actina verso il centro del sarcomero. Ogni testa della molecola di miosina presenta due siti di legame, uno per l'actina e uno per la molecola di ATP. In seguito all'esposizione degli specifici siti di legame sul filamento di actina, una molecola di ATP lega la miosina cambiandone l'affinità per l'actina, che viene così rilasciata. Il sito legante i nucleotidi sulla testa della miosina, circonda la molecola di ATP e lo idrolizza ad ADP e fosfato inorganico (Pi) che rimangono legati alla miosina. L'energia rilasciata dalla reazione di idrolisi induce una rotazione della molecola di miosina che è così in grado di prendere contatto con una nuova molecola di G-actina in posizione più arretrata a quella precedente. Tutto il processo, ripetuto molte volte durante la contrazione, è

ottenuto tramite la partecipazione delle proteine regolatrici, troponina e tropomiosina, associate ai filamenti sottili di actina. La tropomiosina è presente nelle miofibrille come polimero allungato che avvolge i filamenti di actina, bloccando parzialmente i siti di legame per la miosina, mentre la troponina è la proteina legante il calcio intracellulare proveniente dal reticolo sarcoplasmatico, è costituita da un complesso di tre polipeptidi globulari, TnT che lega l'intera molecola di troponina alla tropomiosina, TnC che ha un'elevate affinità per il calcio e TnI che si lega all'actina impedendone l'interazione con la miosina. All'inizio della contrazione, la subunità TnC lega reversibilmente il Ca^{2+} producendo l'allontanamento della subunità TnI dal complesso, sbloccando in questo modo i siti di legame per la miosina (Fig.3).

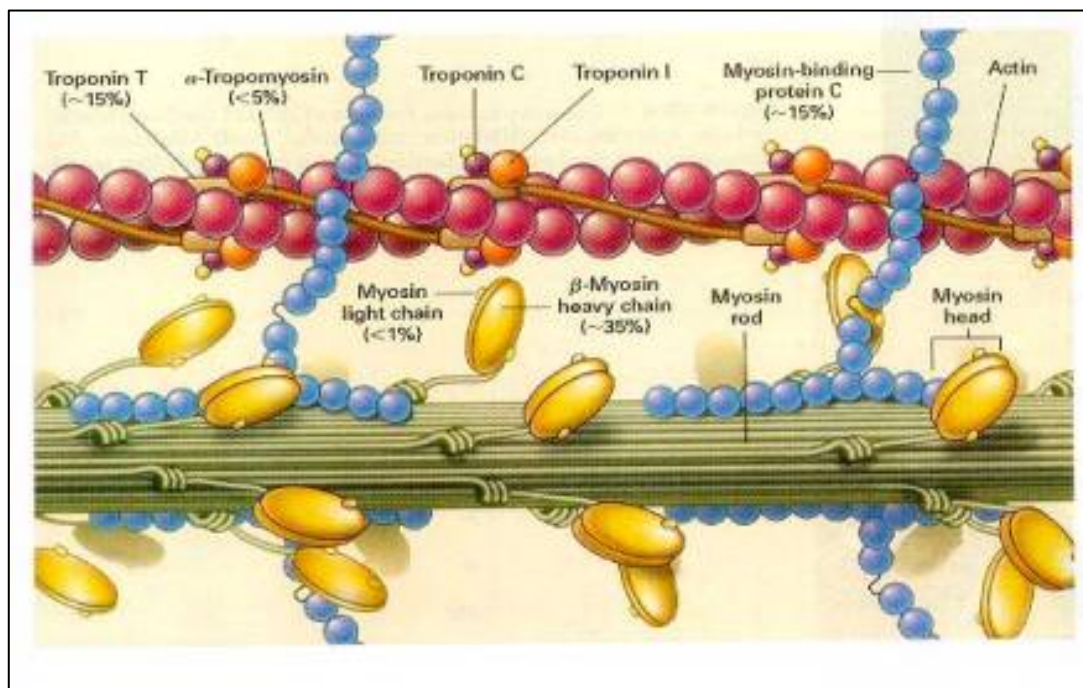


Fig.3 Sarcomero. La contrazione avviene tramite l'interazione tra le proteine contrattili

FISIOLOGIA DELLA CONTRAZIONE CARDIACA

La fondamentale differenza tra il muscolo scheletrico e il cardiaco sta nel fatto che quest'ultimo possiede una ritmicità intrinseca, è capace di contrarsi spontaneamente. Il battito cardiaco insorge nelle cellule muscolari specializzate del *nodo seno-atriale*, una struttura cilindrica, situata tra la vena cava superiore e l'atrio destro. Il nodo senoatriale è innervato da molte fibre del sistema nervoso autonomo, ovvero sia dal sistema nervoso (orto)simpatico, in particolare da nervi provenienti dal midollo spinale, attraverso i nervi toracici T1-4, e del sistema nervoso parasimpatico, in particolare da nervi provenienti dal nervo vago. Il potenziale di membrana di riposo delle cellule del nodo seno atriale è di appena -60 mV, ed è chiamato potenziale pace-maker, o pre-potenziale e va a diminuire progressivamente, fino a raggiunge la soglia di attivazione di canali Ca^{2+} *HVA* (*high-voltage activated*, attivazione che avviene a potenziali > -40 mV nelle cellule nodali) esso evoca un potenziale d'azione, che dà origine al successivo battito cardiaco. Per potenziale d'azione si intende la curva che descrive le variazioni che subisce il potenziale elettrico esistente all'interno di ogni singola cellula, in relazioni alle fasi del ciclo cardiaco (Fig.4).

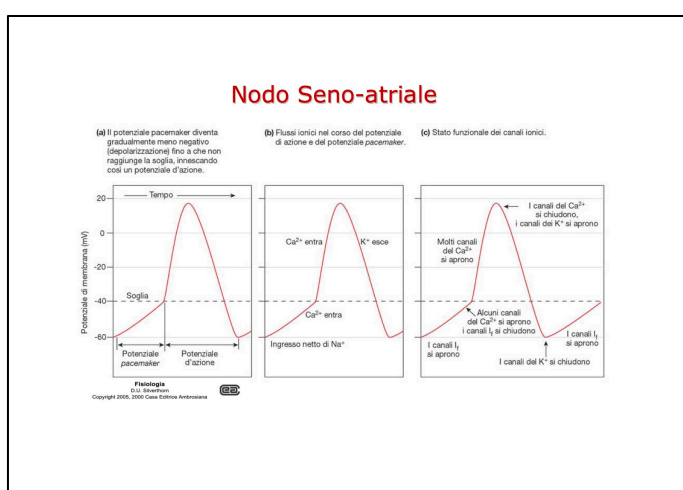


Fig.4 *Potenziale di membrana. Basi ioniche del potenziale Pacemaker e del potenziale d'azione nelle cellule del nodo seno atriale*

Il meccanismo ionico che sta alla base del potenziale d'azione nelle cellule del nodo seno-atriale è completamente diverso da quello che si osserva nei neuroni: nelle cellule del nodo, infatti, la fase depolarizzante del potenziale d'azione è sostenuta da ioni Ca^{2+} , e non da ioni Na^+ , mentre la ripolarizzazione avviene con meccanismi analoghi nei due casi. In queste cellule dunque, non appena il potenziale pace-maker raggiunge la soglia, si innesca un meccanismo a feedback positivo (equivalente al ciclo di Hodgkin nei neuroni) che sostiene la depolarizzazione della cellula. Le cellule del nodo seno atriale hanno quindi la proprietà di depolarizzarsi spontaneamente e a intervalli regolari, con una frequenza che è determinata principalmente da due fattori, ovvero, dall'attività del sistema nervoso autonomo e dalle richieste emodinamiche dell'organismo. L'impulso sorto a livello del nodo seno atriale si diffonde negli atri fino a raggiungere il *nodo atrio ventricolare* (A-V). La funzione del nodo (A-V) è quella di permettere il passaggio del PA dagli atri ai ventricoli, rallentandone la propagazione. Questo rallentamento è fondamentale per consentire alla contrazione atriale di completarsi, prima che inizi quella dei ventricoli. Superando il nodo atrio ventricolare, l'impulso prosegue attraverso i fasci di His, le sue due branche e il sistema di Purkinje. Il fascio di His ha origine dal nodo A-V e percorrendo il setto interventricolare raggiunge la sua struttura muscolare dove hanno origine le branche. In prossimità dell'apice dei due ventricoli, branca destra e branca sinistra si suddividono in molti fascetti, che danno origine ad una fitta rete di fibre, andando a costituire il sistema di Purkinje. Le *fibre del Purkinje* sono la parte terminale del sistema di conduzione del cuore; si tratta di cellule cardiache con conducibilità maggiore dei comuni miocardiociti, che penetrano nel miocardio ventricolare attraversando i muscoli papillari e la parete laterale dei ventricoli. L'attività emodinamica del cuore può considerarsi ottimale quando la contrazione

atriale e ventricolare si susseguono, infatti, non appena l'impulso elettrico partito dal nodo senoatriale arriva ai ventricoli, il cuore batte ed il sangue scorre raggiungendo tutte le parti del corpo (Randall D. et al., 1999) (Fig.5).

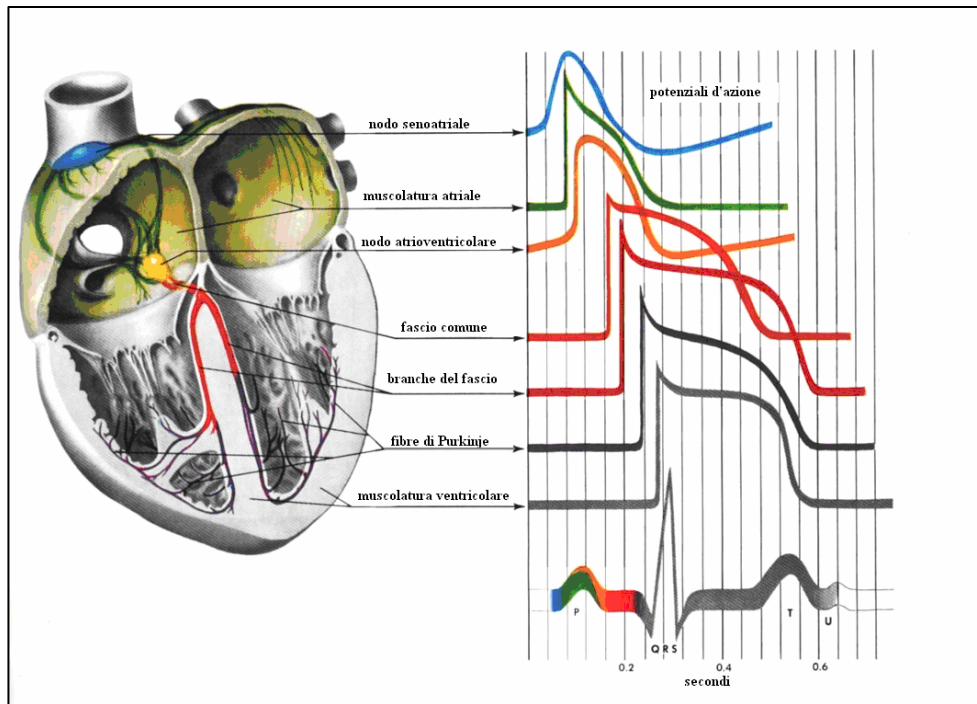


Fig.5 Conduzione elettrica del cuore Schema della distribuzione dei potenziali d'azione nei diversi distretti cardiaci.

Piu in dettaglio, a livello cellulare, i cardiomiociti si ramificano e si collegano con le cellule adiacenti tramite le loro estremità per formare una rete complessa. Le giunzioni cellulari sono formate da regioni specializzate, i dischi intercalari, costituite da membrane interdigitate collegate da desmosomi e da giunzioni comunicanti (gap junctions) in grado di connettere elettricamente le cellule cardiache. Attraverso le gap junctions, le onde di depolarizzazione possono diffondere rapidamente da una cellula all'altra, facendo sì che le cellule cardiache si contraggano quasi simultaneamente (Fig.6).

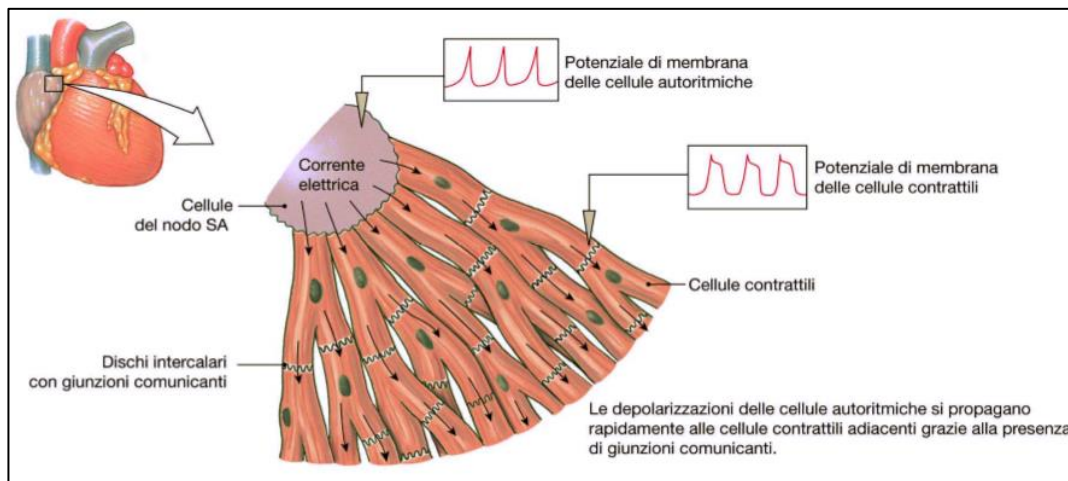


Fig.6 Conduzione elettrica nei cardiomiociti. La comunicazione elettrica nel cuore si diffonde rapidamente alle cellule adiacenti attraverso le gap junction (o giunzioni comunicanti) nei dischi intercalari

Quando un potenziale d'azione raggiunge una cellula miocardica, esso si diffonde lungo il sarcolemma e i tubuli T, più grandi e maggiormente ramificati rispetto alle cellule del muscolo scheletrico, promuovendo l'apertura dei canali voltaggio-dipendenti per il Ca^{2+} presenti nella membrana cellulare. Attraverso questi canali, il Ca^{2+} extracellulare entra nella cellula e stimola l'apertura dei recettori-canali per la rianodina (RyR) presenti nel reticolo sarcoplasmatico. In seguito all'apertura di questi canali, il Ca^{2+} intracellulare, accumulato nel reticolo sarcoplasmatico, fluisce nel citoplasma e diffonde verso gli elementi contrattili del sarcomero, costituendo circa il 90% del Ca^{2+} necessario per la contrazione muscolare (Bers D.M., 2002). Successivamente il reticolo sarcoplasmatico, mediante una pompa ionica che consuma ATP, riprende ad accumulare attivamente Ca^{++} , riducendone la concentrazione a livello delle miofibrille.

1.2 SISTEMA β ADRENERGICO

SISTEMA NERVOSO AUTONOMO E FUNZIONALITÀ CARDIACA

Il sistema nervoso vegetativo o autonomo (SNA) è quell'insieme di cellule e fibre che controllando quelle funzioni non soggette al controllo volontario. Il SNA regola costantemente la funzione cardiaca, vascolare, viscerale e ghiandolare, mediante l'attivazione e inibizione di due porzioni anatomicamente e funzionalmente distinte, ma sinergiche: il sistema nervoso simpatico o ortosimpatico (SNS) ed il sistema parasimpatico (SPS), in grado di generare effetti opposti, eccitatori o inibitori, sugli organi bersaglio.

L'attività cardiaca viene finemente regolata dal SNA, in particolare il nodo senoatriale, in quanto sede di generazione dell'impulso, è il sito di regolazione della frequenza cardiaca. Esso è infatti riccamente innervato dalle terminazioni nervose che esercitano una grande varietà di effetti cardiovascolari, tra cui l'accelerazione della frequenza cardiaca (effetto cronotropo positivo, predisponendo ad aritmie), aumento della contrattilità cardiaca (effetto inotropo positivo), accelerazione del rilassamento cardiaco (effetto lusinotropo positivo), e una vasocostrizione da parte del sistema Simpatico. Tutti questi effetti mirano ad aumentare le prestazioni cardiache per preparare e abilitare la cosiddetta risposta "combatti o scappa", che predispone il corpo, e in questo caso il cuore, ad affrontare momenti critici che richiedono un'attività fisica rapida ed intensa. Al contrario, il sistema nervoso parasimpatico, è un sistema che consente all'organismo di rigenerarsi dopo attività particolarmente impegnative, stimola le attività viscerali ed è il responsabile dello stato noto come "fermati e riposa" e nel caso del cuore, rallenta la frequenza cardiaca (bradicardia) attraverso impulsi del nervo vago, con un minimo o nessun effetto sulla contrattilità cardiaca. In realtà, qualsiasi risposta del SNA non prevede mai l'abolizione

dell'attività di una delle due branche, ma, piuttosto il raggiungimento di un punto di equilibrio adeguato alla natura ed all'intensità dello stimolo. I neuroni del SNA trasmettono i loro messaggi agli altri neuroni ed agli organi effettori attraverso la liberazione di alcuni mediatori chimici o neurotrasmettitori. Tutti i neuroni preganglionari liberano acetilcolina (ACh), la quale si lega ai recettori nicotinici esposti sulla membrana dei neuroni postganglionari. Questi ultimi, invece, utilizzano un neurotrasmettitore differente a seconda che appartengano all'una o all'altra branca del SNA. Infatti, i neuroni postganglionari parasimpatici rilasciano ACh, il cui messaggio è condotto dai recettori muscarinici, una serie di recettori metabotropici (legati a proteine G) presenti nelle diverse isoforme (M1-M5) sugli organi bersaglio. L'attivazione dei recettori muscarinici determina un immediata bradicardia dovuta essenzialmente ad una iperpolarizzazione del potenziale di membrana, in questo modo il potenziale pace-maker impiega molto più tempo per raggiungere la soglia, e l'intervallo tra i battiti aumenta (Randall D. et al, 1999) (Fig.7).

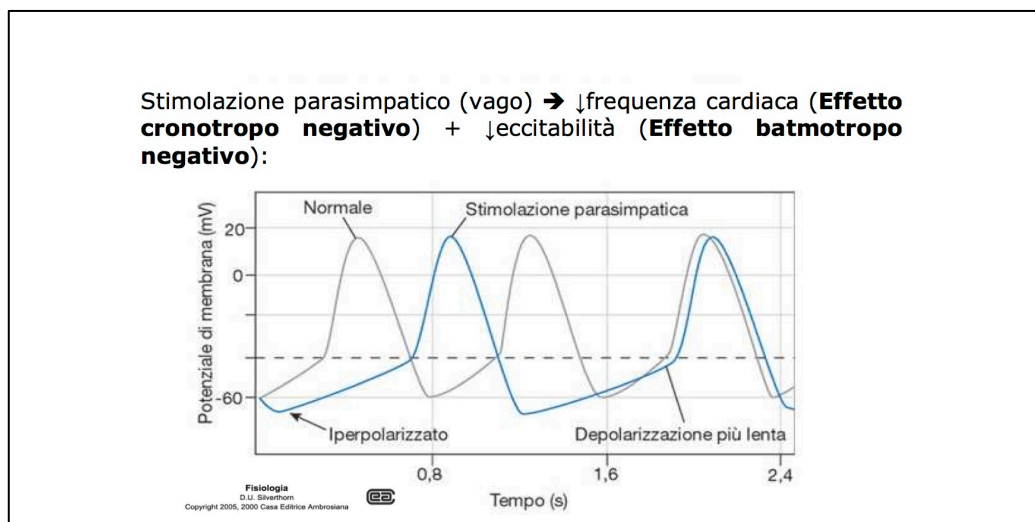


Fig.7 Stimolazione parasimpatica. Determina un rallentamento della frequenza cardiaca.

Contrariamente al meccanismo d'azione delle fibre parasimpatiche, i terminali del nervo simpatico agiscono rilasciando catecolamine, come la noradrenalina che lega i recettori di membrana beta adrenergici, e il risultato di questa interazione consiste in un aumento della frequenza di scarica delle cellule del nodo sensoriale (Fig.8). Le catecolamine, non solo aumentano la frequenza di contrazione del cuore (effetto cronotropico) ma aumentano anche la forza della contrattazione cardiaca (azione inotropica). In sintesi, il cuore adatta la propria gettata in risposta alle esigenze metaboliche dell'organismo, soprattutto attraverso una variazione della frequenza di contrazione. (Randall D. et al. 1999)

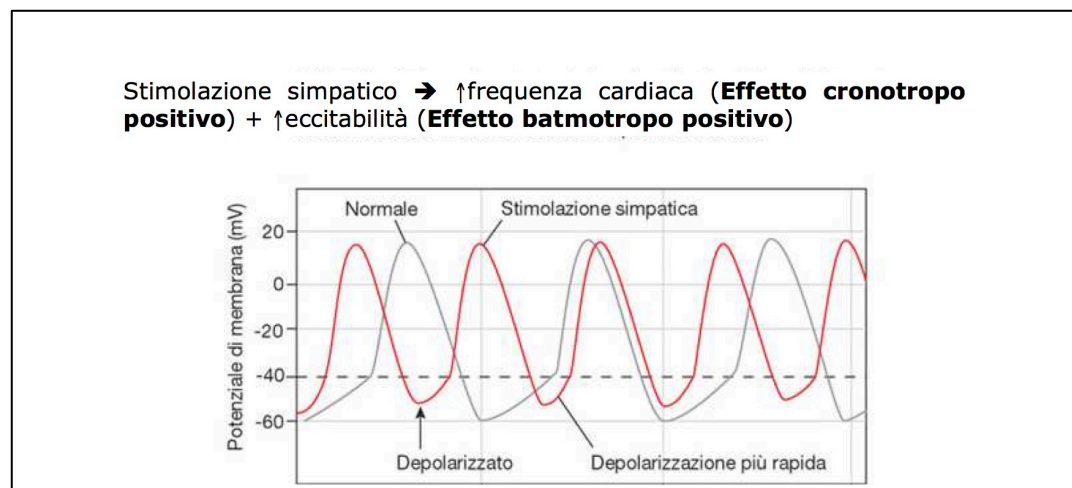


Fig.8 Stimolazione simpatica. Determina un aumento della frequenza cardiaca.

RECETTORI B-ADRENERGICI

La contrattilità miocardica è principalmente regolata dal sistema β -adrenergico. I recettori β adrenergici, sono recettori a sette domini transmembranari, associate sul versante citoplasmatico a proteine G (GPCR) eterotrimeriche (Rohrer D.K. et al., 1999). E' attraverso l'interazione con queste proteine che i recettori adrenergici esercitano i propri effetti, poichè trasducono il segnale all'interno della cellula. Questi recettori fanno parte di un ampia famiglia di proteine integrali di membrana, costituiti da 7 domini ad α -elica, con l'estremità glicosilata N-terminale disposta sul

lato extracellulare che contiene un sito di legame per il neurotrasmettitore e un dominio intracitoplasmatico che prende contatto con proteine G. Le proteine G sono proteine eterotrimeriche ad attività GTPasica formate da subunità α , β , γ . Nella forma inattiva, la subunità α lega il GDP ed è associata strettamente al complesso formato dalle subunità β e γ . Quando attivata dall'interazione con il recettore, la subunità α subisce un cambiamento conformazionale che ne provoca il distacco dal complesso $\beta\gamma$ e lo scambio del GDP, ad esso già legato, con una molecola di GTP. In questo modo tale subunità diventa attiva e può interagire con secondi messaggeri che sono ioni o sostanze la cui concentrazione varia drasticamente in risposta all'attivazione recettoriale e che sono in grado di legarsi a substrati specifici modificandone la funzione (Kiriakis H et al., 2008). Questi secondi messaggeri modulano l'attività dei sistemi effettori finali (solitamente chinasi) capaci di modificare la funzione di altri substrati (Rasmussen S.G. et al., 2011). La subunità α non resta nella conformazione attiva per molto tempo, in virtù della sua attività GTPasica intrinseca, che stacca rapidamente il gruppo fosfato terminale dal GTP, trasformandolo in GDP. (Saucerman J.J. & McCulloch A.D. et al., 2006) (Fig 9).

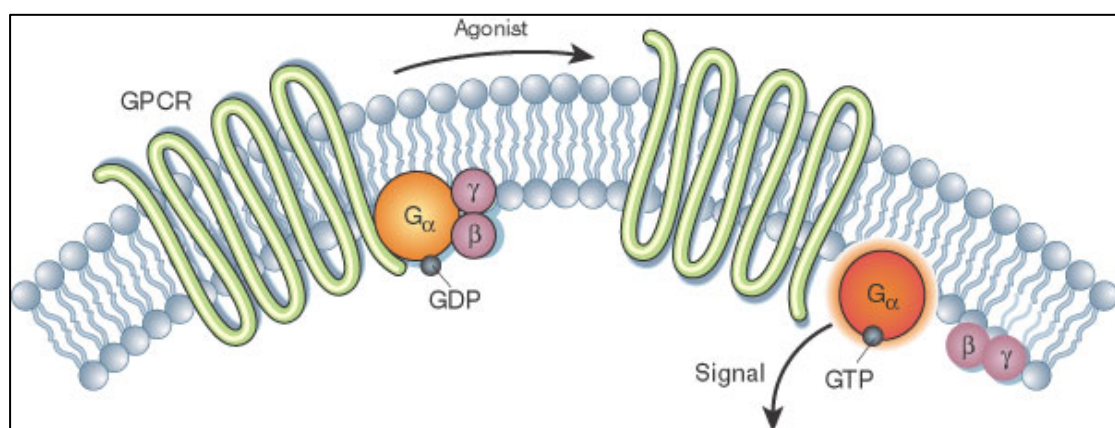


Fig.9 Recettori accoppiati a proteine G. Quando la molecola che porta l'informazione (ligando) lega il GPCR, viene promosso lo scambio di GDP con GTP nella subunità alfa della proteina G trimerica attivandola e permettendone l'interazione con un effettore

L'adrenalina e la noradrenalina legano e attivano i recettori β_1 e β_2 , coinvolti nell'effetto inotropo e cronotropo positivo nel cuore (*Devic E. et al., 2001; Woo A.Y. & Xiao R.P., 2012*). Il recettore β_1 è il recettore predominante, infatti, rappresenta circa l'80% dei recettori β -adrenergici che popolano il tessuto cardiaco. L'interazione tra il recettore β -adrenergico attivato e la proteina Gs determina un cambiamento del nucleotide di guanina: la guanosina trifosfato (GTP) si lega alla subunità α della Proteina Gs. Quindi il complesso subunità α -GTP si separa dal complesso delle subunità β e γ e attiva la Adenilato Ciclasi (AC), un enzima che causa la conversione di una molecola di adenosina trifosfato (ATP) in adenosina monofosfato ciclico (cAMP), che lega la subunità regolatoria della protein chinasi (PKA). La PKA è un enzima omotetramericco costituito da due subunità con funzione regolatoria, e da due subunità dotate di attività catalitica, in grado di dissociarsi in seguito ad attivazione dell'enzima (*Saucerman J.J. et al., 2006*). Nei cardiomiociti sono state individuate due isoforme di PKA, PKA-RI e PKA-RII, localizzate in differenti compartimenti subcellulari (*Stangherlin A. et al., 2011*). Le due subunità con attività catalitica della PKA sono in grado di fosforilare numerosi substrati quali la troponina I, i canali del Ca^{2+} di tipo L e il fosfolambano, una proteina integrale di membrana che regola la pompa Ca^{2+} nel muscolo cardiaco. I principali effetti di queste fosforilazioni sono l'aumento della frequenza cardiaca (effetto cronotropo positivo), della forza di contrazione (effetto inotropo positivo) e della velocità di rilassamento del cuore (effetto lusitropico positivo) (*Zheng M. et al., 2004*).

Nonostante il ruolo dominante del pathway Gs/AC/AMPC, i recettori β_2 ARs, oltre alle Gs, sono in grado di accoppiarsi anche alle protein Gi (inibitoria). L'interazione del recettore β_2 con la Gi porta all'attivazione del pathway $\text{G}\alpha_i$ - $\text{G}\beta\gamma$ -PI3K-Akt che, contrasta la segnalazione Gs-AC- cAMP-PKA. La stimolazione cronica dei recettori

β -adrenergici ha effetti opposti sul destino dei cardiomiociti: i recettori β_1 inducono ipertrofia miocardica e apoptosi attivando la Chinasi II Ca^{2+} -calmodulina dipendente (CaMK II) e non il classico pathway cAMP/PKA. Diversamente i recettori β_2 promuovono la sopravvivenza cellulare attraverso il segnale $\text{Gi-G}\beta\gamma$ - PI3K-Akt esplicando così un ruolo protettivo nei confronti del cuore (*Woo A.Y. & Xiao R.P., 2012*).

Il terzo tipo di recettore β -adrenergico è il β_3 -AR. Recenti studi hanno dimostrato che la stimolazione dei β_3 -AR, contrariamente agli altri tipi di recettori β -adrenergici, è in grado di portare ad una attenuazione della contrattilità cardiaca (Fig.10) (*Rozec B. & Gauthier C., 2006; Lee D.I. et al. 2010*). Infatti, nei cardiomiociti ottenuti dai ventricoli il recettore β_3 è associato ad una proteina G_i legata all'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) la cui attivazione induce la produzione di ossido nitrico (NO). La generazione di NO porta all'attivazione di una guanilato ciclasi solubile, e ad un successivo incremento del secondo messaggero guanosin monofosfato ciclico (cGMP). L'aumento del cGMP causa l'attivazione di diverse proteine tra cui la protein chinasi G (PKG), che diminuisce la corrente del calcio transmembranario, mediante la regolazione di specifici canali di tipo L. Recentemente è stato dimostrato che l'attivazione della PKG stimola il regolatore delle proteine G, RGS2, questa GTPasi protegge il muscolo cardiaco dallo stress causato dalla pressione alta, ed è in grado di inibire alcune proteine (es. le proteine G che mediano la risposta dei recettori α -adrenergici) implicate nelle vie di segnalazione intracellulari che portano all'istaurarsi dell'ipertrofia cardiaca (*Takimoto E. et al., 2009; Heineke J. et al., 2003*). Tra i substrati del cGMP troviamo anche la fosfodiesterasi PDE2, la cui attivazione determina un aumento dell'idrolisi di cAMP, portando di conseguenza ad una diminuzione dei livelli di Ca^{2+} intracellulare. Inoltre l'ossido nitrico può regolare

la funzione cardiaca anche in modo cGMP indipendente, tramite modificazioni covalenti di proteine, come la citocromo ossidasi C, la creatina fosfochinasi o i canali del calcio di tipo L (Tsai E.J. & Kass D.A. et al., 2009).

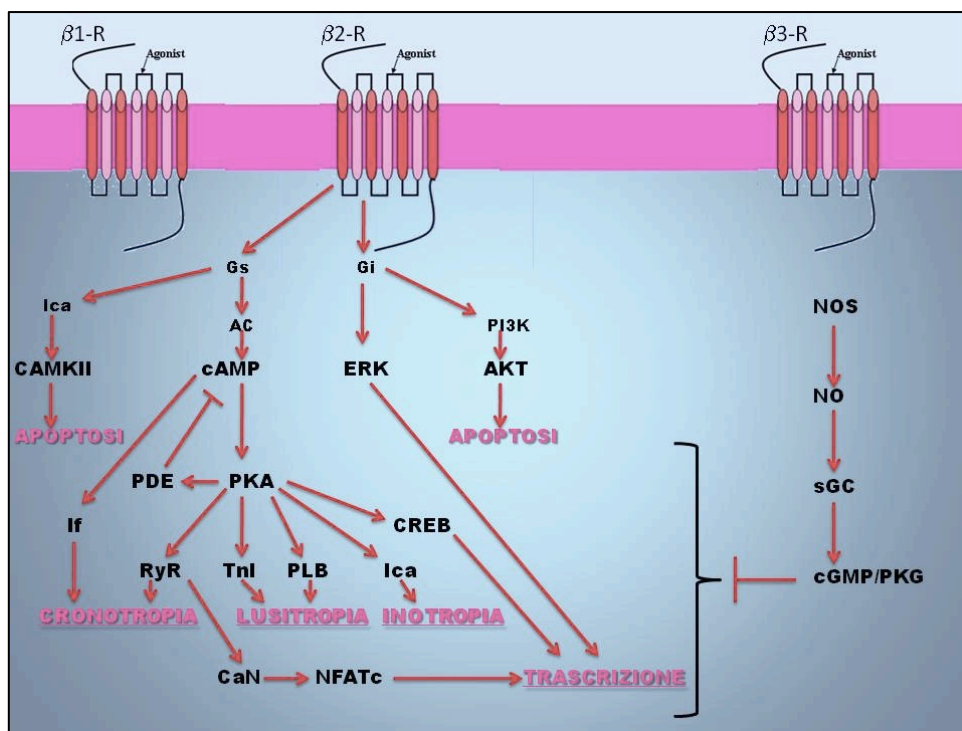


Fig.10 Rappresentazione schematica delle principali vie di segnalazione del sistema beta-adrenergico.

COMPARTIMENTALIZZAZIONE DELLA RISPOSTA BETA-ADRENERGICA

Sebbene entrambe le vie di segnalazione dei recettori adrenergici β1 e β2 siano accoppiate all'attivazione dell'adenilato ciclasi, l'efficienza con cui tale associazione ha luogo e con cui è promosso l'aumento di contrattilità differisce tra i due recettori. Una spiegazione della differente risposta mostrata dai due recettori è fornita dal fenomeno della compartimentalizzazione dei recettori beta-adrenergici in microdomini, definiti caveolae, contenenti specifiche proteine con attività catalitica e proteine “scaffold” (Xiang Y. et al. 2002; Steinberg S.F., 2004). In particolar modo, la localizzazione subcellulare del recettore β1 risulta redistribuita tra la superficie cellulare caveolare e non-caveolare, nonché a livello delle strutture membranose

citoplasmatiche, mentre il recettore $\beta 2$ è presente esclusivamente al livello dei domini caveolari. Il recettore $\beta 1$, una volta attivato, è mantenuto al livello della superficie cellulare. Al contrario il sottotipo $\beta 2$, in seguito a stimolazione con un agonista, è rapidamente internalizzato, per consentirne la desensibilizzazione, attraverso la specifica interazione con la proteina G inibitoria (Gi) (Xiang Y. et al., 2002; Xiang Y. & Kobilka D.A., 2003). Inoltre il recettore $\beta 1$ è in grado di attivare esclusivamente la via di segnalazione Gs/cAMP classica, mentre il recettore $\beta 2$ attiva sia la via di segnalazione stimolatoria Gs sia quella inibitoria Gi-dipendente. La stimolazione del recettore $\beta 2$ risulta così in una peculiare risposta bifasica, caratterizzata da un iniziale aumento del ritmo di contrazione, a cui fa seguito una prolungata fase di riduzione della stessa (Xiang Y. & Kobilka D.A., 2003). Infine un'ulteriore compartimentalizzazione si osserva negli effettori della via classica Gs/cAMP. Infatti diversi studi hanno da tempo dimostrato come la PKA risulti strettamente associata a compartimenti subcellulari ben definiti, attraverso la presenza di proteine AKAP, un'ampia famiglia di proteine con in comune la capacità di legare e immobilizzare la PKA (Wong W. & Scott D.J., 2004). L'ancoraggio della PKA alle AKAP è ottenuto tramite interazione, tra una regione anfipatica ad α - elica di 14-18 aa sulle AKAP, e una porzione altamente idrofobica, dovuta alla presenza di domini dimerizzati e localizzata nella regione N-terminale della subunità R della PKA (Qin F. et al. 2013; Kinderman F.S. et al., 2006).

1.3 FOSFODIESTERASI

Le fosfodiesterasi (PDE) sono enzimi che idrolizzano i nucleotidi ciclici (cGMP e cAMP). Queste proteine costituiscono una superfamiglia di varie isoforme che differiscono per il substrato, la distribuzione tissutale, le proprietà biochimiche, e la sensibilità agli inibitori chimici. Ad oggi si conoscono circa una ventina di geni, che generano più di novanta diverse isoforme di PDE (Verde I. et al. 1999). Tutte queste varianti sono state identificate e raggruppate in undici famiglie (PDE1-PDE11), basandosi sulla similarità delle sequenze aminoacidiche, il tipo di regolazione ed la specificità del substrato (cGMP e/o cAMP) (Miller C.L. & Yan C., 2010). Le fosfodiesterasi sono costituite da una catena polipeptidica, contenente un dominio catalitico C-terminale, di circa 270 residui aminoacidici, di cui circa il 20-25% è conservato negli isozimi appartenenti alle diverse subfamiglie e un dominio regolatorio N-terminale, con un'unica sequenza aminoacidica per ogni subfamiglia di PDE, in cui sono contenuti i siti di legame per specifici regolatori dell'attività enzimatica (Ca²⁺/calmodulina, cGMP e inibitori sintetici delle PDE), il sito di fosforilazione da parte delle chinasi e domini di ancoraggio alla membrana (Osadchii O.E., 2007). Nel cuore, sono state descritte sette diverse famiglie di PDE: 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 9 (Fig.11).

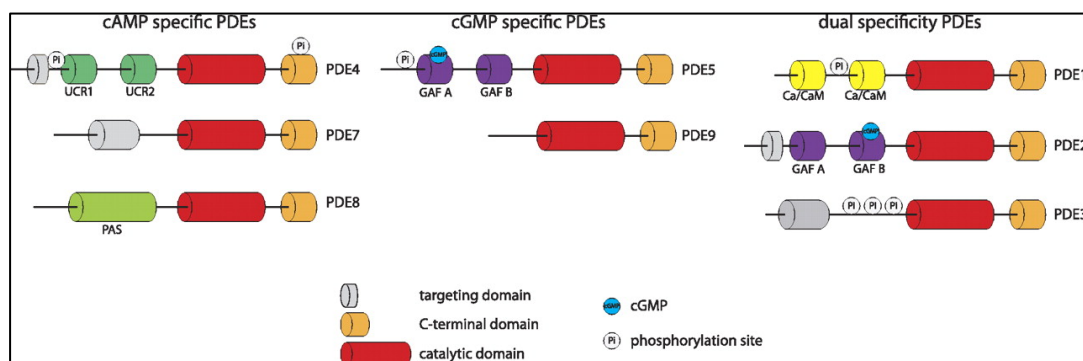


Fig.11 Fosfodiesterasi. Rappresentazione schematica della struttura delle fosfodiesterasi.

Le PDE1, 2 e 3 possono idrolizzare sia il cAMP sia il cGMP, le PDE4 e 8 idrolizzano selettivamente il cAMP, mentre la PDE5 e la PDE9 degradano specificamente il cGMP. Nel tessuto muscolare cardiaco è presente una costante interazione tra le vie di segnalazione promosse dai due nucleotidi ciclici, al quale partecipano attivamente anche le fosfodiesterasi (Fig. 8). In particolar modo, il cGMP agisce come regolatore dell'attività idrolitica delle PDE cAMP-specifiche, facendo sì che la sua concentrazione intracellulare possa influenzare quella del cAMP. Il meccanismo tramite il quale ha luogo questa regolazione è mediato dall'inibizione, da parte del GMP ciclico, delle fosfodiesterasi della famiglia 3, e probabilmente della famiglia 1, e dall'attivazione della PDE2 (Conti M. et al., 2007) (Fig.12).

Il contributo relativo di ciascuna famiglia delle PDE può variare in base alla specie animale, alla fase di sviluppo embrionale, alla tipologia cellulare, e al tipo di stress che agisce sul cuore. Alterazione dell'attività e/o espressione delle PDEs sono state osservate in diversi tipi di patologie cardiache (Zaccolo M. & Movsesian M.A., 2007).

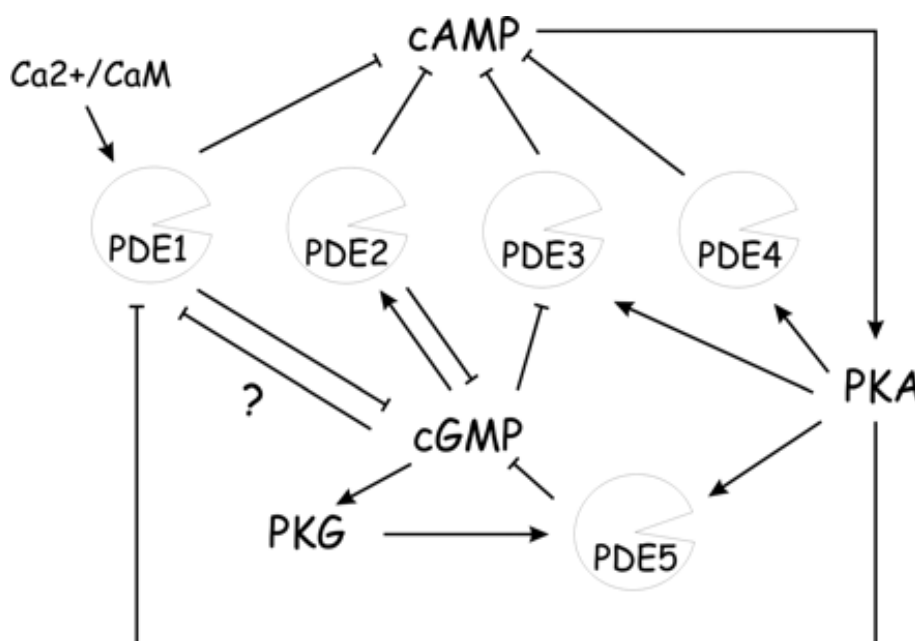


Fig.12 Rappresentazione schematica delle interconnessioni regolative tra le fosfodiesterasi e i due nucleotidi ciclici.

PDE1

Si tratta di una famiglia di fosfodiesterasi con tre isoforme, PDE1A, PDE1B e PDE1C, che a loro volta possono presentare diverse varianti (*Zaccolo M. & Movsesian M.A. 2007*). Questi sottotipi presentano un'affinità simile per il cGMP, ma si differenziano per quanto riguarda l'interazione nei confronti del cAMP: la PDE1A ha l'affinità minore, seguita poi dalla PDE1B con affinità intermedia ed infine la PDE1C con affinità più elevata.

La PDE1 è l'unica tra le fosfodiesterasi ad essere stimolata dal Ca^{2+} e dalla calmodulina, al contrario, questa attivazione viene meno se la PDE1 subisce una fosforilazione da parte della PKA. La regione terminale NH_2 contiene, infatti, un dominio di legame $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ e un sito di regolazione fosfodiesterasico, mentre nell'estremità COOH terminale è presente un dominio catalitico ben conservato.

Recenti studi hanno messo in evidenza come nel miocardio umano il cGMP possa andare ad inibire l'attività d'idrolisi della PDE1 nei confronti del cAMP (*Zaccolo M. & Movsesian M.A., 2007*). La PDE1 rappresenta la fosfodiesterasi maggiormente implicata nell'attività d'idrolisi del cGMP, anche se non è ancora stata caratterizzata quale tra le tre isoforme sia preposta a tale attività.

Tutte e tre le isoforme delle PDE1 sono state associate a diversi processi biologici e una grande varietà di espressione è stata osservata nelle diverse specie. L'espressione del mRNA e/o attività della PDE1A è stata descritta nel tessuto muscolare liscio e cardiaco di diverse specie tra cui l'uomo (*Miller C.L. & Yan C., 2010*). Inoltre, sembra che l'espressione di questa proteina sia significativamente aumentata in seguito all'ipertrofia indotta mediante trattamenti con Angiotensina II (Ang II) o Isoproterenolo (ISO). Per quanto riguarda invece l'isoforma PDE1C, questa è

altamente espressa nei cardiomiociti umani e murini, e va a localizzarsi lungo le linee Z e M (*Miller C.L. & Yan C., 2010*). Tuttavia, non si sono osservati cambiamenti significativi dei livelli della proteina PDE1C in un modello murino sottoposto a rimodellamento cardiaco. Infine l'espressione della PDE1B nel cuore normale sembra essere molto bassa o non rilevabile.

Questi risultati dimostrano che alcuni isoenzimi della PDE1 potrebbero svolgere un ruolo importante nella patogenesi di alcune patologie cardiache. Tuttavia, la mancanza di inibitori specifici per le PDE1 risulta un fattore limitante negli approcci sperimentali ed il fatto che l'attività di questi enzimi dipenda fortemente dalle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} rende più complesso lo studio del loro ruolo nei cardiomiociti (*Miller C.L. & Yan C., 2010*).

PDE2

La PDE2 si esprime nei miociti atriali e ventricolari, sia negli anfibi e sia nei mammiferi (*Miller C.L. & Yan C., 2010*).

Attualmente sono state identificate tre isoforme, PDE2A1, PDE2A2 e PDE2A3 che si differenziano tra loro nella regione amino-terminale.

Nei cardiomiociti la PDE2 è stata trovata nel citoplasma, associata al sarcolemma, alla membrana del reticolo sarcoplasmatico, al Golgi e all'involucro nucleare. Questa fosfodiesterasi è in grado di idrolizzare con un'alta affinità sia il cAMP che il cGMP. Nella sua struttura proteica sono presenti due domini regolatori denominati GAF, posti all'estremità N-terminale, su cui si può legare il cGMP, stimolando l'attività catalitica specifica per il cAMP per cui, tramite tali meccanismi di attivazione, gli stimoli che causano un aumento intracellulare del cGMP possono attenuare il segnale del cAMP (*Miller C.L. & Yan C., 2010*). Questa interazione tra le due vie di

segnalazione del cGMP e del cAMP, determinato dalla PDE2 ha importanti risvolti fisiologici. Ad esempio, nei miociti ventricolari di rana e nei miociti atriali umani, si è osservato come il cGMP sia in grado di diminuire la stimolazione dei canali del Ca^{2+} di tipo L mediata dai β -agonisti, tramite l'attivazione della PDE2, che a sua volta determina l'idrolisi del cAMP.

Il contributo della PDE2 nella regolazione del cAMP risulta particolarmente selettivo, infatti, questa fosfodiesterasi non è in grado di bloccare l'aumento intracellulare del cAMP, in risposta a forskilin, che va ad attivare direttamente l'adenilato ciclasi. Invece tale PDE2 va a bloccare l'aumento di cAMP indotto dagli agonisti dei recettori β -adrenergici (*Zaccolo M. & Movsesian M.A., 2007*).

Il meccanismo con cui la noradrenalina attiva la PDE2 avviene, almeno in parte, mediante l'attivazione dei recettori adrenergici di tipo β_3 con conseguente attivazione di eNOS, che genera NO, il quale a sua volta va a stimolare la sintesi del cGMP, che successivamente attiva la PDE2, per l'idrolisi del cAMP. L'effetto selettivo della PDE2 sul cAMP generato da β -agonisti suggerisce che questa fosfodiesterasi sia fortemente associata ai recettori β -adrenergici, in modo tale che l'attività della PDE2 sia altamente compartimentalizzata ad un pool limitato di cAMP all'interno della cellula. Il modo con cui le catecolamine inducono un aumento dell'cAMP e contemporaneamente attivano le PDE2 per poter poi idrolizzare l'cAMP potrebbe essere una strategia per proteggere il cuore da un'eccessiva attivazione del sistema β -adrenergico. L'attivazione della PDE2 da parte del cGMP e il conseguente incremento dell'idrolisi dell' cAMP può avvenire attraverso due vie: nella prima la guanilato ciclasi solubile può essere attivata da NO generato da tutte e tre le isoforme di NOS, nella seconda, il cGMP può essere sintetizzato dall'attivazione dei recettori per peptidi natriuretici che hanno attività guanilato ciclasi. Questi meccanismi

possono contribuire all'effetto ionotropo negativo e attenuare l'incremento del cAMP che è stato osservato in associazione con l'aumento intracellulare di cGMP. Da questa prospettiva, inibitori selettivi della PDE2 potrebbero diventare un nuovo potenziale approccio per il trattamento dei cuori che presentano uno scompenso.

D'altra parte sia l'NO che i peptidi natriuretici, esercitano effetti anti ipertrofici sul cuore, che sono stati attribuiti almeno in parte all'attivazione del sistema cGMP-PKG, che ha effetti inibitori sui canali del Ca^{2+} di tipo L. Tuttavia, non è ancora noto se l'attivazione della PDE2 mediata dal cGMP e la conseguente degradazione del cAMP contribuiscono agli effetti anti ipertrofici

PDE3

La PDE3 è la fosfodiesterasi il cui ruolo nel cuore è stato meglio caratterizzato, grazie all'uso degli inibitori di questo enzima come agenti terapeutici nel trattamento dello scompenso cardiaco. I membri della famiglia PDE3 sono in grado di idrolizzare il cAMP e il cGMP con un'alta affinità (*Zaccolo M. & Movsesian M.A., 2007*). Nel cuore umano sono state identificate tre isoforme, che derivano dal gene PDE3A (PDE3A1/2/3). Le loro sequenze aminoacidiche sono identiche, tranne che nella porzione N-terminale, in cui sono presenti domini che sembrano coinvolti nella localizzazione cellulare specifica di ciascuna isoforma (*Zaccolo M. & Movsesian M.A., 2007*). La regione N-terminale oltre ad avere una diversa lunghezza, nelle varie isoforme presenta anche dei siti che ne permettono l'attivazione mediante fosforilazione. L'isoforma PDE3A1 è stata osservata esclusivamente nelle frazioni microsomiali del miocardio umano. Essa contiene due domini di localizzazione intracellulare, NHR1 (neuralized homology repeat 1) e NHR2 (neuralized homology repeat 2). NHR1 consiste in un'ansa idrofobica che si inserisce nella membrana

intracellulare, mentre NHR2 sembra localizzare l'enzima tramite interazione proteina-proteina. In questa isoforma è stato inoltre individuato anche un sito per la fosforilazione e attivazione da parte della PKB e un secondo sito per la fosforilazione e attivazione da parte della PKA. PDE3A2 è stata individuata sia nella frazione microsomiale, sia in quella citosolica, manca del dominio NHR1 e probabilmente anche del sito per la PKB, ma presenta il dominio NHR2 e il sito per la fosforilazione della PKA. PDE3A3 è distribuzione è principalmente citoplasmatica, manca sia dei due domini (NHR1-NHR2), sia dei siti fosforilativi. Tutte e tre le isoforme contengono una regione catalitica al C-terminale, e sono identiche per quel che riguarda l'attività catalitica e la sensibilità al cGMP (*Zaccolo M. & Movsesian M.A., 2007*). Nel cuore di topo sono invece presenti due isoforme, la PDE3A1 e la PDE3B1, che derivano rispettivamente dai geni PDE3A e PDE3B. In queste isoforme la sequenza NH1 è più lunga nella PDE3B1 che nella PDE3A1, e la sequenza aminoacidica tra le due isoforme differisce all'N-terminale, mentre le strutture dei loro domini sono simili (*Zaccolo M., & Movsesian M.A., 2007*). Per molto tempo si è ritenuto che la PDE3A fosse l'isoforma maggiormente attiva nel miocardio, tuttavia un recente studio ha dimostrato che PDE3B fa parte con PI3K γ di un complesso macromolecolare che è fondamentale per la regolazione locale dell'omeostasi del cAMP e potrebbero svolgere un ruolo importante nella regolazione della funzione cardiaca. Gli inibitori delle PDE3 aumentano i livelli di cAMP nel muscolo cardiaco, determinando un aumento del tasso e dell'entità dello sviluppo della contrazione e del rilassamento (*Miller C.L. & Yan C., 2010*). Nella muscolatura vascolare liscia, l'aumento di cAMP tramite l'inibizione delle PDE3 riduce la resistenza vascolare ed aumenta il flusso sanguigno coronarico (*Miller C.L. & Yan C., 2010*). Le PDE3 sono in grado di controllare la contrattilità cardiaca mediante fosforilazione cAMP

dipendente dei canali voltaggio dipendenti per il calcio (VGCC) che favoriscono l'ingresso di Ca^{2+} nei cardiomiociti. Infatti l'inibizione delle PDE3 da parte del cGMP aumenta la corrente di calcio (I_{Ca}) stimolata dal cAMP nei miociti umani isolati dall'uomo (*Rao Y.J. & Xi L., 2009*). Quindi gli inibitori della PDE3 quasi certamente producono i loro effetti inotropi sui cardiomiociti attraverso la stimolazione di I_{Ca} , regolando la fosforilazione del VGCC tramite il meccanismo cAMP-PKA dipendente. Queste azioni ionotropiche positive e vasodilatatorie giustificano l'uso clinico degli inibitori PDE3 per il trattamento acuto dello scompenso cardiaco cronico (CHF) (*Rao Y.J. & Xi L., 2009*).

PDE4

La PDE4 comprende una grande famiglia di enzimi che idrolizzano specificamente il cAMP e con un'alta affinità. Attualmente sono stati identificati quattro geni della PDE4 (PDE4A, B, C e D) che codificano per più di 20 varianti (*Miller C.L. & Yan C., 2010*). Le isoforme delle PDE4 sono suddivise in enzimi che hanno una forma lunga, o forma corta o forme super-corte in base alla presenza o assenza di diversi domini. Tutti i membri di questa famiglia hanno una regione all'estremità amino terminale altamente conservata contenente siti di fosforilazione per diverse chinasi. Questa famiglia di fosfodiesterasi è coinvolta in numerosi processi cellulari tra cui la regolazione della segnalazione β -adrenergica e la compartimentalizzazione del segnale del cAMP (*Rao Y.J. & Xi L., 2009*). Durante il processo di desensibilizzazione dei recettori β_2 -adrenergici l'adattatore citoplasmatico β -arrestina recluta l'isoforma PDE4D, cAMP specifica, alla membrana plasmatica, dove può regolare l'accoppiamento dei recettori con le proteine G. Secondo questo modello, il legame delle catecolamine ai β_2 -AR può indurre un aumento della degradazione del cAMP,

in un compartimento subcellulare localizzata in prossimità del recettore. In un recente lavoro si è inoltre evidenziato che la PDE4 svolga un ruolo importante sulla frequenza di contrazione regolata dai β -adrenergici in vitro, su culture di cardiomiociti di topi neonatali (*Xiang Y. et al., 2005*), in particolare gli autori hanno dimostrato che la PDE4D è in grado di regolare selettivamente il segnale proveniente dai β_2 -AR, pur avendo poco o nessun effetto per quanto riguarda i recettori β_1 -AR. Questi dati sottolineano il ruolo critico nella regolazione subcellulare dell'cAMP.

Inoltre, un'ulteriore conferma del ruolo svolto da questa PDE nella regolazione della frequenza di contrazione, si è avuta da studi condotti su topi geneticamente modificati privi della isoforma PDE4D (PDE4D^{-/-}), in cui si è osservato come tali animali sviluppano una cardiomiopatia progressiva e scompenso cardiaco accelerato dopo infarto del miocardico (MI). Questi effetti nei topi PDE4D^{-/-} sono stati attribuiti alla perdita dell'isoforma PDE4D3 dal complesso macromolecolare del recettore della rianodina (RyR2), che determina l'apertura dei canali Ca^{+2} contenuti nel reticolo sarcoplasmatico. La perdita di PDE4D3 nel complesso RyR2 porta a iperfosforilazione da parte della PKA del RyR2, alterando la funzione di tale recettore (*Lehnart S.E. et al., 2005*). La diminuzione dell'associazione della PDE4D3 con il macrocomplesso RyR2 e l'iperfosforilazione dalla PKA è stata osservata anche nello scompenso cardiaco umano. Inoltre, la PDE4D3 e un'altra isoforma della PDE4D, la PDE4D5, posseggono rispettivamente la capacità di legare mAKAP e β -arrestina, per il controllo degli cAMP locali coinvolti nella ipertrofia dei miociti e nella desensibilizzazione dei β_2 -AR (*Miller C.L. & Yan C., 2010*).

PDE5

È una proteina che idrolizza specificatamente il cGMP, ed è sintetizzata da un singolo gene (PDE5A), e nell'uomo se ne conoscono tre isoforme: PDE5A1, PDE5A2 e PDE5A3. Le prime due isoforme sono espresse in numerosi tessuti, mentre la PDE5A3 sembra essere espressa esclusivamente nella muscolatura liscia e nel tessuto cardiaco (*Kumar P. et al., 2009*). Le PDE5 differiscono tra loro per la regione N-terminale, ma tutte contengono due domini regolatori GAF di circa 120 aminoacidi (GAF-A e GAF-B) (*Rao Y.J. & Xi Y.L., 2009*). Inizialmente, si pensava che la PDE5 non fosse espressa nel miocardio, ma recenti studi hanno dimostrato la presenza nei cardiomiociti.

Il cGMP lega un dominio regolatorio GAF della PDE5, inducendo un cambiamento conformazionale nell'enzima che in tal modo diventa catabolicamente attivo per il cGMP (autoregolazione). L'inibizione della PDE5 ad opera di specifici inibitori quali il sildenafil o il tadalafil, determina un aumento dei livelli intracellulari di cGMP, promuovendo l'attivazione della protein chinasi G (PKG) e la conseguente attivazione di vari substrati, coinvolti nella contrattilità cardiaca, come la troponina I. Inoltre la fosforilazione della PDE5 (*Rybalkin S.D. et al., 2002*) da parte della PKG può indurre cambiamenti conformazionali e aumentare l'affinità di legame per il cGMP, in questo modo si ha un miglioramento dell'attività catalitica dell'enzima (*Zaccolo M. & Movsesian M.D., 2007*).

Recentemente, c'è stato un grande interesse nello studio degli effetti dell'inibizione della PDE5 nel cuore. Studi in modelli animali di ipertrofia cardiaca dimostrano che il sildenafil svolge un'azione diretta sulla cellula cardiaca, prevenendo o facendo tornare alla normalità l'ipertrofica del miocardio indotta dalla costrizione aortica (*Takimoto E. et al., 2005*). Tale effetto anti-ipertrofico è stato confermato in altre

forme di cardiomiopatia ipertrofica, quali ad esempio quelle indotte da delezione del gene della distrofina (*Khairallah M. et al., 2008*), da trattamento con doxorubicina (*Fisher P.W. et al., 2005*), o dalla ischemia miocardica (*Salloum F.N. et al., 2008*). Sulla base di tali dati è stato proposto che la classe di inibitori della PDE5 già presenti in clinica per il trattamento della disfunzione erettile, sildenafil, tadalafil e vardenafil, rappresentino un nuovo tipo di farmaci potenzialmente utili nel trattamento della insufficienza cardiaca (*Kass D.A. et al., 2007*).

Benché evidenze sperimentali indichino che gli effetti cardioprotettivi del sildenafil siano mediati almeno in parte da attivazione di PKG (*Das A. et al., 2008*), non ci sono ancora dati chiari sulle vie di segnalazione intracellulare che sono responsabili dell'effetto anti-ipertrofico del sildenafil.

PDE8

La PDE8 idrolizza specificamente il cAMP con un'alta affinità. Sono stati identificati due geni che codificano le due isoforme della PDE8 (PDE8A e 8B).

Studi recenti condotti su topi privi di tale enzima (PDE8A^{-/-}) hanno dimostrato che l'assenza di questa fosfodiesterasi causa un'alterazione dei recettori RyR e potenzia la risposta cellulare alla stimolazione β-adrenergica aumentando la corrente di Ca²⁺ dai canali di tipo-L (I_{Ca}) (*Miller C.L. & Yan C., 2010*).

PDE9

Questa fosfodiesterasi è espressa nel cervello e nel cuore. Tra tutte le PDE che idrolizzano il cGMP, questa sembra avere la maggior affinità per il secondo messaggero. Tuttavia, il suo ruolo rimane ancora in fase di studio. (*Tsai E.J. et al., 2009*).

2. SCOPO

La compartimentalizzazione dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e dell'attività della protein chinasi A (PKA), nelle cellule muscolari cardiache gioca un ruolo chiave nel mantenimento e nell'aumento della contrattilità, causata da una stimolazione del sistema nervoso simpatico. Nei cardiomiociti, l'attivazione dei recettori adrenergici porta ad un aumento della produzione di cAMP, che viene a sua volta contenuto dall'attività d'idrolisi da parte delle fosfodiesterasi (PDEs).

Negli ultimi dieci anni si sono susseguiti una serie di studi che hanno messo in evidenza come nei cardiomiociti vi sia un incremento dell'espressione della PDE5 in diverse condizioni patologiche (*Nagendran J. et al.2007;Takimoto E. et al.2005*).

L'inibizione farmacologica della PDE5 con il Sildenafil, si è dimostrata efficace nel contrastare l'ipertrofia cardiaca in diversi modelli sperimentali e dati incoraggianti stanno emergendo da sperimentazioni cliniche condotte su diverse forme di scompenso cardiaco (*Guazzi M. et al. 2011; Andersen A. et al. 2013*). Un recente studio, ha ad esempio evidenziato come la cardiomiopatia diabetica possa migliorare nei pazienti sottoposti ad un inibizione cronica della PDE5 attraverso un meccanismo di anti-rimodellamento indipendente da fattori vascolari, endoteliali o metabolici (*Giannetta E. et al. 2015*). Tuttavia, i meccanismi molecolari con cui il sildenafil agisce sull'omeostasi del cuore sono ancora in fase di investigazione. È noto che gli inibitori della PDE5, agiscono occupano il sito catalitico come pseudo substrati, bloccando l'attività esterasica e determinando un aumento intracellulare dei livelli di cGMP, con conseguente attivazione della PKG (*Francis S.H. et al. 2011*). L'effetto ionotropo negativo dell'inibizione della PDE5 dopo stimolazione beta-adrenergica è stata riportata in diverse specie (*Lee D.I. et al. 2010; Senzaki H. et al 2001*), incluso l'uomo (*Borlaug B.A. et al. 2005*). Tuttavia, l'effetto sulla

cronotropia non è stato ancora stato documentato a causa delle limitazioni intrinseche dei modelli sperimentali.

Lo scopo di questa tesi di dottorato, è stato quello di esaminare il ruolo dell'inibizione della PDE5A sull'aumento della frequenza di contrazione indotta in seguito ad una stimolazione dei recettori beta adrenergici. Questo studio è stato possibile grazie a saggi *in vitro*, usando come modello sperimentale cardiomiociti neonatali di origine murina, in grado di contrarsi in maniera autonoma e sincrona, su cui è stato possibile misurare la frequenza di contrazione, sfruttando anche un approccio farmaco-genetico combinato, basato sull' inibizione selettiva dell'attività e dei geni che codificano per i diversi recettori beta adrenergici e PDE

3. MATERIALI E METODI

3.1 MODELLI MURINI UTILIZZATI

I topi $\beta 1AR^{-/-}$, $\beta 2AR^{-/-}$ e $\beta 1\beta 2AR^{-/-}$ utilizzati in questo studio sono stati originariamente generati nel laboratorio del Dr. Rohrer e colleghi (Rohrer D.K. et al. 1999). I $\beta 2^{-/-}$ sono stati ottenuti e gentilmente donati dalla Dr. Elisabetta Mattei dell'Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare del CNR di Roma. I modelli murini $\beta 1/\beta 2^{-/-}$, sono stati acquistati presso la Jackson Laboratori Charles River (Wilmington, MA, USA), ed utilizzati per ottenere anche i $\beta 1AR^{-/-}$ mediante l'incrocio con topi C57BL/6.

I $Pde2^{-/-}$ sono stati generate da topi $Pde2^{+/-}$ (B6;129P2-Pde2a^{tm1Dgen}/H; EM:02366) acquistati dalla EMMA, UK. Dei 103 nuovi topi nati vivi e analizzati, è stato trovato solo un topo knockout, morto un giorno dopo la nascita (Tab.I).

| | | PDE2^{+/+} | PDE2^{+/-} | PDE2^{-/-} | Absorbed | Total |
|----------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|--------------|
| 14.5-15.5 dpc | Observed | 28 | 32 | 23 | 8 | 91 |
| | Predicted | 22.75 | 45.5 | 22.75 | | |
| 1-2 dpp | Observed | 38 | 65 | 1 | - | 103 |
| | Predicted | 25.75 | 51.5 | 25.75 | | |

Tab. I

GENOTIPIZZAZIONE

Per l'analisi del genotipo è stato estratto il DNA da frammenti di coda. Le code, una volta tagliate, sono state digerite in 4.5 μ l di proteinasi K (20 mg/ml) e 200 μ l di tail buffer (100mM Tris pH 8.0; 200mM NaCl; 5mM EDTA; 0.2% v/v SDS; H₂O). I campioni sono stati incubati per tutta la notte a 55 °C e poi centrifugati per 5 min a 13000 rpm (a temperatura ambiente). Raccolto il supernatante, sono stati aggiunti 200 μ l di isopropanolo assoluto (50/50 v/v di tail buffer e di isopropanolo) e i campioni sono stati nuovamente centrifugati per 5 min a 13000 rpm. Una volta eliminato il

supernatante, è stato effettuato un lavaggio del pellet con etanolo 70% v/v. I campioni sono stati risospesi in 500 µl di H₂O e incubati a 37 °C per 1 ora. Infine, da ogni campione sono stati prelevati 2 µl per eseguire la reazione di PCR.

Sequenze oligonucleotidiche dei primers utilizzati nelle reazioni di PCR (Tab.2):

| | PRIMER F | PRIMER R |
|-------|--------------------------------|--------------------------------|
| β1 | 5'-GACTTCCGCAAGGCTTTCCA-3' | 5'-AATCGCTGTCCACAGTGGTT-3' |
| β1Neo | 5'-GTGCCCTGAATGAACTGCAG-3' | 5'-GCATCAGCCATGATGGATAC-3' |
| β2 | 5'-TGATGTGTTGTGCGTCACAG-3' | 5'-CCTGGTTCGTGAAGAAGTCA-3' |
| PDE2 | 5'-CTGCCTGATGGTGAAGAAAGGCTA-3' | 5'-TGAGCAGACCCCTTATGGAAGGTG-3' |
| PDE2 | 5'-GGGCCAGCTCATTCTCCCACTCAT-3' | |

Tab.2

Questi studi sono stati condotti in modo conforme con la direttiva 2010/63 / UE del Parlamento Europeo sulla protezione degli animali utilizzati per scopi scientifici, e sono state condotte con l'approvazione del Comitato Etico della Sapienza e dal Ministero della Salute italiano.

3.2 COLTURE PRIMARIE

Per ottenere colture primarie di cardiomiociti, sono stati utilizzati topi neonatali di 1-2 giorni di vita, sacrificati seguendo procedure standard tali da arrecare loro la minor sofferenza possibile. I cuori sono stati asportati e rapidamente collocati in Hank's solution. E' stata effettuata la separazione degli atri dai ventricoli, e questi ultimi sono poi stati distrutti meccanicamente e successivamente digeriti, attraverso successive fasi di incubazione con la collagenasi di tipo II (100 µg/ml; Gibco-Life technology, CA, USA), pancreatina (900 µg/ml; Sigma, CA, USA) e ADS buffer (116 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 5.5 mmol/L glucose, 18 mmol/L Hepes pH 7.3, 0.9 mmol/L NaH₂PO₄, 0.4 mmol/L MgSO₄) a 37°C per 15 min. La digestione enzimatica è stata bloccata tramite aggiunta di 1 ml di siero bovino fetale (FBS, Gibco-Life technology, CA, USA). Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione e risospese in

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenente siero di cavallo (HS, Gibco-Life technology, CA, USA) al 10% v/v, FBS al 5% v/v e gentamicina (Sigma, CA, USA), in fine piastrate per 2 ore a 37°C per rimuovere i fibroblasti contaminanti. Le cellule ancora in sospensione sono state raccolte e ripiastrate in piastrine di coltura tissutale da 35-mm, precedentemente collagenate e contenenti DMEM, HS al 10% v/v, FBS al 5% v/v e gentamicina (Sigma, CA, USA). I cardiomiociti sono stati piastrati in modo da ottenere sincizi tridimensionali ad alta densità cellulare, in grado, dopo 72 ore di contrarsi in maniera autonoma e sincrona (Fig.13).

I cuori embrionali sono stati digeriti a 37°C per 15 minuti con collagenase di tipo II, pancreatina e ADS buffer; i cardiomiociti così ottenuti sono stati immediatamente piastrati in piastrine di coltura tissutale da 35-mm e i sincizi cellulari contrattili sono stati analizzati dopo 48 ore.

In tutte le condizioni, il terreno di coltura è stato cambiato ogni 24 ore e le cellule sono state mantenute in DMEM contenenti l'1% di BSA.

Fibroblasti Embrionali di Topo (MEF) sono stati preparati in accordo con i protocolli standard; gli embrioni sono stati sminuzzati e digeriti in 1.5ml di Tripsina / EDTA per 5 minuti e coltivati in DMEM, per essere poi utilizzati per l'analisi dell' RT-PCR.

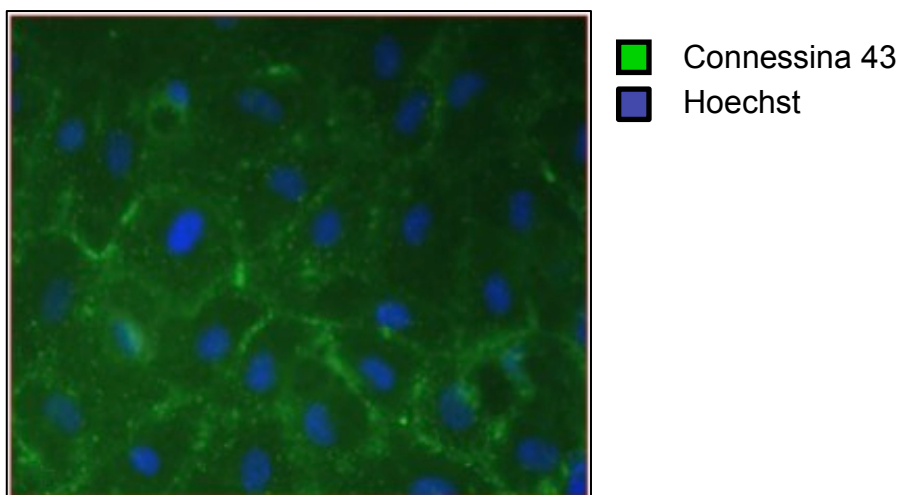


Fig.13 Coltura di cardiomiociti

3.3 ANALISI DELLA FREQUENZA DI CONTRAZIONE

Per le misurazioni della frequenza di contrazione dei cardiomiociti (CBA, cardiac beating assay), le cellule sono state analizzate dopo 3 giorni di coltura. Le piastrine contenenti i cardiomiociti sono state collocate su un apparato per il controllo della temperatura presente sul piatto di un microscopio invertito (Nikon, Tokyo, Japan) connesso ad una videocamera Progres C5. La frequenza di contrazione è stata acquisita ogni 3 minuti, attraverso video di 20 secondi, per una durata complessiva di 30 minuti. Il programma Video Spot Tracker (VTS) permette di scegliere, sul primo frame di ogni video acquisito, uno spot, definito poi “marker”, attraverso il quale, il software, analizza e registra le coordinate spazio-temporali (x,y,t) del marker selezionato. Le coordinate x e y sono espresse in pixel, mentre t è espresso in secondi. Con un algoritmo basato sul linguaggio di programmazione Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA), è stato possibile calcolare e tracciare lo spostamento dei marcatori tra i fotogrammi adiacenti al fine di calcolare la frequenza di contrazione (Fassina L. et al. 2011) (Fig.14). I risultati ottenuti sono stati poi graficati riportando i dati in delta battiti.

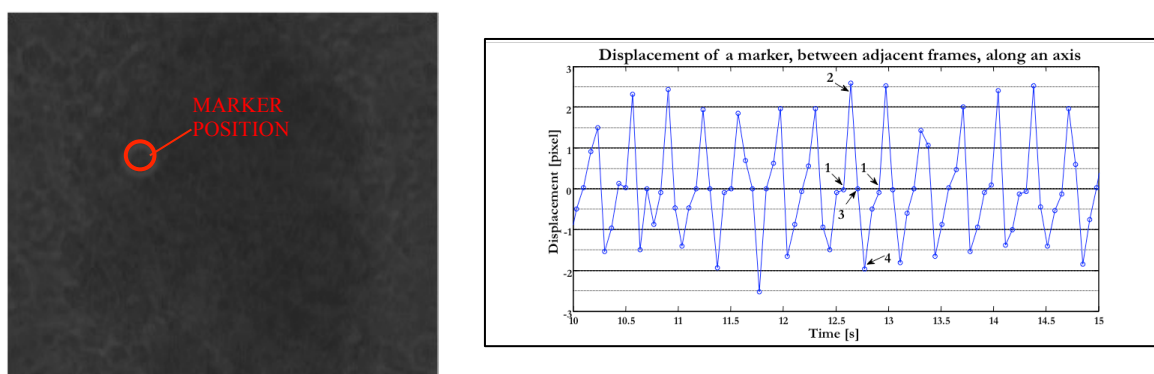


Figura 14 Sincizio cellulare utilizzato per la misura della frequenza di contrazione e un tipico tracciato in funzione del tempo

3.4 TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

Cardiomiociti sono stati trattati con le seguenti sostanze

β- agonista: da 1 nmol/L a 10 μmol/L Isoproterenolo (Sigma, CA, USA)

Inibitori della PDE5*: da 1 nmol/L a 1 μmol/L di *Sildenafil citrate* (Pfizer Central Research, Sandwich, Kent, UK) e 0.5 μmol/L *Tadalafil* (Merck, Germany).

Inibitore della PDE2*: 10 μmol/L erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (*EHNA*) (Calbiochem-Merck, Germany).

Inibitore della PDE3*: 10 μmol/L *Cilostamide* (Sigma, CA, USA)

Inibitore delle PDE*: 10 μmol/L *IBMX* (Sigma, CA, USA)

Inibitore della PKG*: 1nmol/L to 10 mmol/L *DT2* (Biolog, CA, USA).

Inibitore della Gi:** 1.0 mg/ml *Pertussis Toxin (PTX)*, Calbiochem, CA, USA)

Attivatore dell'adenilato ciclasi*: 10 μmol/L *Forskolin* (Sigma, CA, USA)

*Questi agenti sono stati aggiunti 10 minuti prima del trattamento con isoproterenolo e in questo frangente le cellule sono state conservate in un incubatore a 37°C .

**I cardiomiociti trattati con la PTX sono stati pretrattati per 3h.

3.5 MISURAZIONE DEI TRANSIENTI DI CA²⁺

Il Ca²⁺ intracellulare è stato misurato su colture primarie di cardiomiociti, ottenute come descritto in precedenza. Le cellule sono state lavate con PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ e incubate per 30 minuti con 5.4μmol/L fluo3-AM (Life Technologies) in terreno di coltura a 37°C. Dopo due lavaggi con soluzione di Hanks, i sincizi contrattili sono stati acquisiti a 37°C per 60 secondi con un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse Ti - S con OptoLED Lite e Cool Snap Camera (Photometrics). Il tempo di esposizione sequenziale è stato impostato sui 20ms. I livelli di Ca²⁺ intracellulare sono stati riportati in ΔF, ovvero come la differenza tra il massimo segnale di fluorescenza registrato e la fluorescenza corrispondente al basale. [ΔF: (F/F₀)].

3.6 ANALISI DEI BIOSENSORI cAMP E cGMP

L'espressione dei biosensori cGMP cGi500 e dell' cAMP ICUE3 nelle cellule cardiache è stata analizzata tramite FRET (*trasferimento di energia per risonanza*). I cardiomiociti in PBS con Ca^{2+} sono stati esaminati con un microscopio Zeiss Axiovert 200M, utilizzando un obiettivo ad immersione 40x/1.3 NA e una videocamera CCD. Per analizzare i risultati della fluorescenza è stato utilizzato un filtro di eccitazione di 420/20 uno specchio dicroico di 450 drlp (dichroic long pass) e due filtri di emissione (475/40 per il CFP e 535/25 per il YFP). Per l'acquisizione è stata utilizzata un'esposizione di 200ms per entrambi i canali e dalle immagini è stato eliminato il rumore di fondo. Il rapporto YFP/CFP è stato calcolato in base alla massima risposta ottenuta e i valori sono stati espressi in media \pm SD

3.7 ESTRAZIONE mRNA E RT-PCR

Per analizzare l'espressione delle PDE, tessuti e cellule sono stati omogenizzati in Trizol (Sigma, CA, USA) e l'RNA totale è stato estratto mediante l'aggiunta di cloroformio. L'RNA presente nella fase acquosa è stato recuperato e successivamente precipitato con isopropanolo. Dopo un lavaggio con etanolo 70% (V/V) l'RNA è stato risospeso in acqua e sono state preparate aliquote per valutarne la qualità e misurarne la concentrazione. Aliquote dei RNA sono state retro-trascritte in cDNA mediante l'enzima trascrittasi inversa e in presenza di nucleotidi e di oligodT (Invitrogen, CA, USA). La miscela è stata incubata a 37°C per 1 ora, poi l'enzima è inattivato a 70°C per 10 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato amplificato tramite PCR (Polymerase chain reaction). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite utilizzando il kit della Promega e il protocollo fornito dalla ditta produttrice. La reazione di RT-PCR è stata eseguita usando il termociclatore

BioRad T-100. Nella tabella 3 sono indicate le sequenze dei primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione. .

| PDE | PRIMER F | PRIMER R |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| PDE1A | CTAAAGATGACTGGAGGGATCTTCGGA | TGGAGAAAATGGAAGCCCTAATTCAGC |
| PDE1C | ATGGTTGGGCTGAGCTATCCACC | TGCTACTCCTGTCTTATAAAGGAGG |
| PDE2A | ACAGGCTTCTTCTGTGCCTC | TGATCTGAAGCTCAGGGATGT |
| PDE3A | GGACATTCCTTATCATAACAGAATC | TTGTCATCTGGCACGTGATAC |
| PDE3B | CAGTGAAAACGATCGCCTCT | TTGGAGTTTGCTAGTTGAGGA |
| PDE4A | GGCTGACCTGAAGACTATGG | TCACCCTGCTGGAAGAACTC |
| PDE4B | CAGCAGCTCATGACCCAGAT | CGTAAGGGGCCGATTATGT |
| PDE4D | GCCTCTGACTGTTATCATGCAC | TCCAAAGCGGGTGTAGAGAG |
| PDE5 | GTATGAGGCCCTGACCCAC | AGTTTGTACACGGGGAGGG |
| PDE9 | CTACGAGGAGCTGAAGCAGC | AGTTTGGAGGAGAATGGCCT |

Tab.3

3.8 IMMUNOFLUORESCENZA

Le colture di cardiomiociti sono state fissate con paraformaldeide 4% in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente; le cellule sono state poi bloccate con PBS/0.5% BSA/3% siero di cavallo, le cellule sono state incubate overnight con specifici anticorpi primari di coniglio anti-PDE5A (1:50; abcam 64179); di capra anti-PDE5A (1:30; sc-30459); di coniglio anti-PDE2A (1:50; abcam 125677); di coniglio anti-PDE3A (1:100; sc-20792); di topo anti-PDE1C (1:100; sc-376474) e successivamente con un anticorpo secondario coniugato ad una sonda fluorescente Alexa Fluor 568 and Alexa Fluor 488 (1:300; invitrogen) per 45 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono poi esaminati con un microscopio Nikon Eclipse Ti - S.

3.9 IMMUNOPRECIPITAZIONE

Cuori provenienti da topi neonatali o cardiomiociti sono omogenizzati con RIPA buffer (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L TrisHCl pH 7.6, 1% NP40, 0,5% Sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 10 mmol/L β -glicerophosphate, 1mmol/L DTT) contenenti fosfati e inibitori delle fosfatasi. Per l'analisi di immunoprecipitazione specifici anticorpi sono stati incubati con un mix di protein A e/o G-Sepharose beads (Sigma-Aldrich, CA, USA) in un buffer di lisi contenente 0.05% BSA per 60 min sotto costante agitazione a 4°C. Alla fine dell'incubazione, le beads sono state lavate con buffer di lisi e incubate per 90 minuti in agitazione a 4°C

Le proteine sono state separate su un gel all' 8% SDS-PAGE e trasferite su membrane PVDF (GE Healthcare, UK). Le membrane sono state incubate tutta la notte a 4°C con un anti-PDE5 (coniglio, 1:500) sc-32884; anti-PDE2A (coniglio, 1:500) sc-25565; anti-PDE3A (coniglio, 1:1000) sc-20792; anti-PDE1C (topo, 1:1000) sc-376474, tutte acquistate dalla Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA) e successivamente incubate con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano (Santa Cruz Bio., Texas, USA). I coniugati con la perossidasi sono stati rilevati mediante chemiluminescenza con un kit ECL (Santa Cruz Bio., Texas, USA). La densitometria è stata effettuata utilizzando Molecular Dynamics Densitometer e il software ImageJ.

3.10 ANALISI STATISTICA

I dati sono mostrati con valori della media \pm SD e le differenze significative sono state analizzate tramite t-test o two-way ANOVA test. Valori di $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

4. RISULTATI

4.1 ESPRESSIONE DELLE FOSFODIESTERASI NEL CUORE E NEI CARDIOMIOCITI IN CULTURA

Per validare il modello sperimentale utilizzato in questo progetto, esperimenti preliminari sono stati condotti per verificare se l'espressione delle fosfodiesterasi nel ventricolo *in vivo* è conservata anche *in vitro*, nei cardiomiociti in coltura.

mRNA estratto dal cuore di topi embrionali (9 dpc), fetali (17 dpc), neonatali (1-2 dpp) e adulti (3 mesi) è stato utilizzato per esaminare l'espressione delle diverse PDE mediante RT-PCR. Come mostrato in figura 15A e 15B, l'mRNA della PDE1A, 1C, 2A, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 5A, 7, 8 e 9 espresso nel tessuto cardiaco è presente anche nei cardiomiociti in coltura.

Risultato analogo è stato ottenuto anche tramite l'analisi delle proteine mediante western blot su lisati provenienti da cuori neonatali e cardiomiociti isolati. In figura 15C è riportata l'espressione proteica della PDE1C, PDE2A, PDE3A e PDE5A sia nel cuore murino e sia nelle cellule cardiache in coltura.

In un ulteriore esperimento effettuato mediante immunofluorescenza, è stata confermata l'espressione della PDE1C, PDE2A, PDE3A e PDE5A nelle cellule cardiache, localizzate principalmente nel citoplasma, nel sarcolemma e nei compartimenti perinucleari (Fig.15D). Nell'immunofluorescenza mostrata in figura 15E la PDE5A appare co-localizzata con la PDE2 sotto la membrana plasmatica e i compartimenti perinucleari, mentre nessuna chiara co-localizzazione è stata osservata con la PDE3, tranne che intorno al nucleo.

Questi dati confermano quanto sperato, ovvero che i cardiomiociti in coltura sono un buon modello per poter studiare gli effetti delle interazioni tra i nucleotidi ciclici e le fosfodiesterasi.

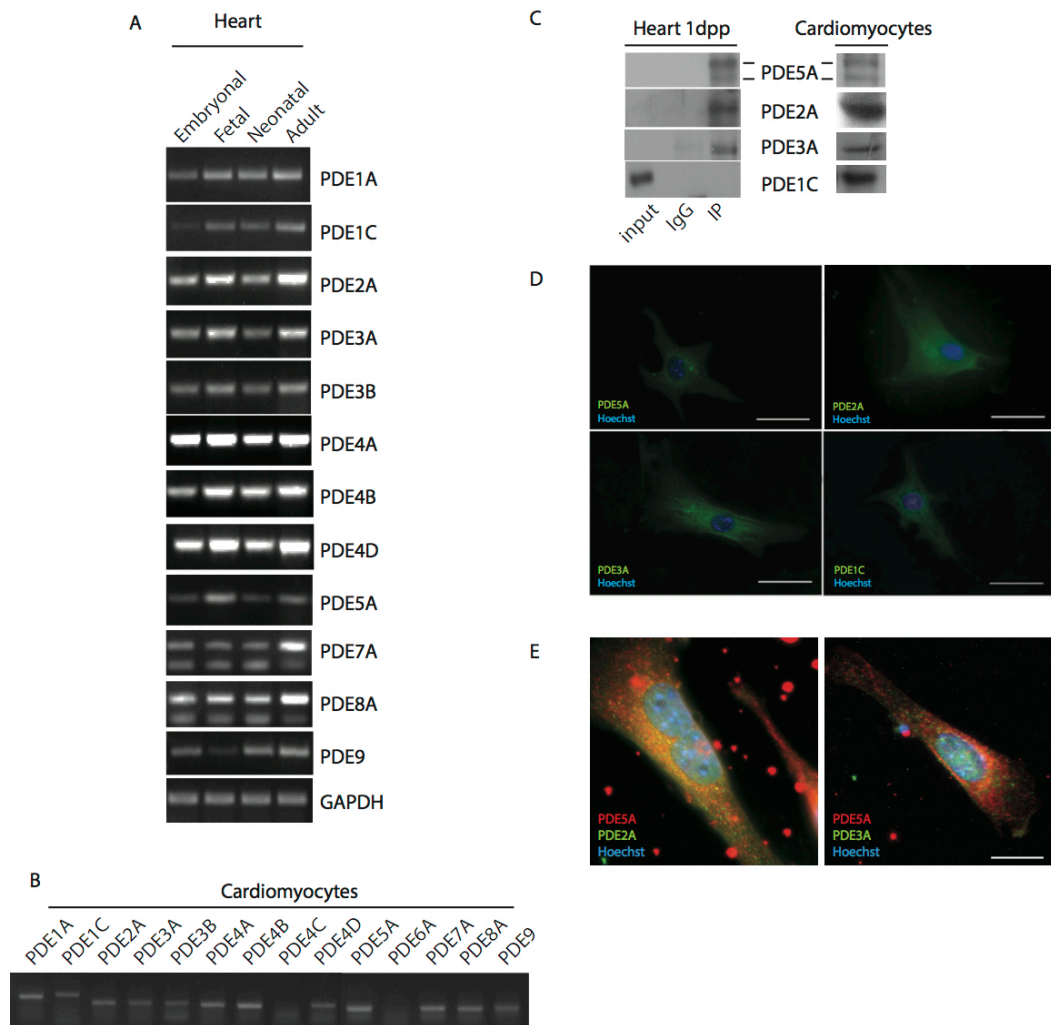


Figura 15. Espressione delle PDE nel cuore murino a diversi stadi di sviluppo e nei cardiomiociti in coltura. A, B) RT-PCR per l'espressione delle PDE nel cuore durante lo sviluppo (A) e nei cardiomiociti mantenuti in coltura per 48 h(B). C) Immunoprecipitazione e Western Blot mostrano l'espressione per le proteine PDE2A, 3A, 5A e 1C nei cuori di 1dpp e nei cardiomiociti isolati D) Immunofluorescenze per la PDE2A, 3A, 5A and 1C (verde) nei cardiomiociti isolati in coltura per 72 h. I Nuclei (Blu) sono state marcati con Hoechst 33342. (Barra di scala 30 μ m). E) Co-localizzazione della PDE5A (rossa) con la PDE2A (verde) o PDE3A (verde) nei cardiomiociti isolati. I Nuclei (Blu) sono state marcati con Hoechst 33342. (Barra di scala 45 μ m).

4.2 LA PDE5 MODULA LA FREQUENZA DI CONTRAZIONE DEI CARDIOMIOCITI NEONATALI IN SEGUITO A STIMOLAZIONE β -AR

I cardiomiociti neonatali in coltura hanno la capacità intrinseca di formare aggregati contrattili sui cui è stato possibile misurare la frequenza di contrazione; questo parametro è stato misurato al tempo zero (T0), prima dell'aggiunta delle sostanze in esame, e poi successivamente ogni 3 minuti per circa 30 minuti. L'analisi dei video ha poi permesso di misurare il numero di battiti del sincizio contrattile nell'unità di tempo.

Nei cardiomiociti provenienti da topi wild-type, la stimolazione dei recettori β -adrenergici con un β -agonista come l'Isoproterenolo (10 $\mu\text{mol/L}$), determina sin dai primi minuti di trattamento, un forte aumento della frequenza di contrazione, che tende a mantenersi stabile nel tempo (Fig.16A). Al contrario, il trattamento con Sildenafil (1 $\mu\text{mol/L}$, pretrattamento di 10 minuti), non sembra sortire nessun effetto sulla contrattilità, anche se, comparando questo dato con quello ottenuto da cellule non trattate si nota una moderata riduzione nella fase tardiva dell'analisi (Fig.16A). Tuttavia, quando la stimolazione adrenergica mediata dall'Isoproterenolo avviene in presenza del Sildenafil, si osserva una netta inibizione della risposta cardiaca al β -agonista (Fig.16A), infatti, dopo un iniziale incremento della frequenza di contrazione si ha una rapida e significativa diminuzione, fino a riportare la contrattilità ad un livello simile a quello basale.

Per valutare l'effettivo aumento dei livelli intracellulari di cGMP in seguito al pretrattamento con l'inibitore della PDE5, è stata utilizzata la FRET (Trasferimento di energia per risonanza), si tratta di una tecnica ottica che permette di misurare in tempo reale il flusso di molte molecole biologiche, tra cui i nucleotidi ciclici. I dati ottenuti (Fig.16B), confermano come il co-trattamento con Sildenafil e

Isopreterenolo, rispetto al solo β -agonista incrementi quasi del doppio i livelli intracellulari di cGMP.

Poiché alte dosi di sildenafil possono inibire anche la PDE1C, oltre che la PDE5 (*Lukowski R. et al., 2010*), è stata eseguita una curva dose-risposta per testare la più bassa concentrazione di Sildenafil in grado di smorzare l'effetto dell'Isoproterenolo sulla frequenza di contrazione. La figura 16C mostra come concentrazioni di Sildenafil sotto la EC50 per la PDE1C (da 1 a 10 nmol / L), conservino un'azione inibitoria verso l'Isoproterenolo (10 μ mol/L).

Inoltre, la curva dose-risposta per Isoproterenolo e Sildenafil in figura 16D, rivela che a partire da una concentrazione di 10 nmol/L, l'inibitore della PDE5 è in grado di inibire anche concentrazioni più basse del beta agonista (Fig.3C).

Nell'insieme questi risultati suggeriscono che la PDE5 ha un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta β -AR.

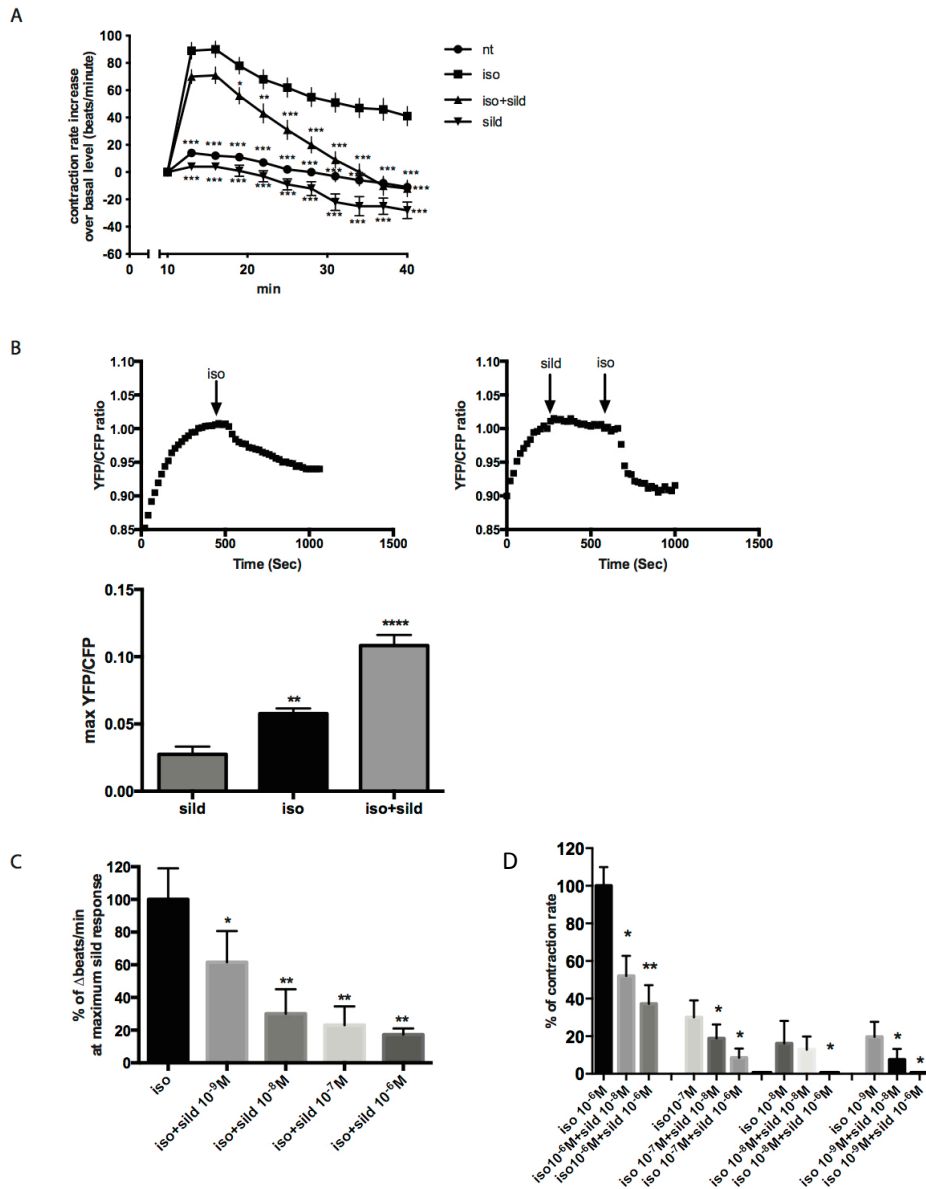


Figura 16. L'inibizione della PDE5 modula la risposta β -AR sulla frequenza di contrazione nei cardiomiociti neonatali. A) L'inibizione della PDE5 da parte di $1\mu\text{mol/L}$ di sildenafil diminuisce la frequenza di contrazione indotta da $10\mu\text{mol/L}$ di Iso nei cardiomiociti wild-type. I dati indicano la media \pm SE di 20 esperimenti; two-way ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. B) Cardiomiociti stimolati con $10\mu\text{mol/L}$ di Iso, $1\mu\text{mol/L}$ di Sild. I dati sono riportati in base al rapporto YFP/CFP, e rappresentano l'aumento intracellulare di cGMP sul cGi500 espresso nei cardiomiociti dopo stimolazione con Iso, con o senza pretrattamento con Sildenafil. I dati indicano la media \pm SE di 10 cellule da 5 diversi esperimenti; one-way ANOVA: ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.001$. C) Massimo effetto del sildenafil, misurato 25 min dopo il trattamento con ISO. I dati indicano la media \pm SE di 4 esperimenti. one-way ANOVA: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. D) Massimo aumento della frequenza di contrazione, dopo stimolazione con diverse dosi di ISO, con o senza Sildenafil. I dati indicano la media \pm SE di 4 esperimenti. one-way ANOVA: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

4.3 L'EFFETTO CRONOTROPO NEGATIVO DEL SILDENAFIL VIENE MEDIATO DALLA PDE2

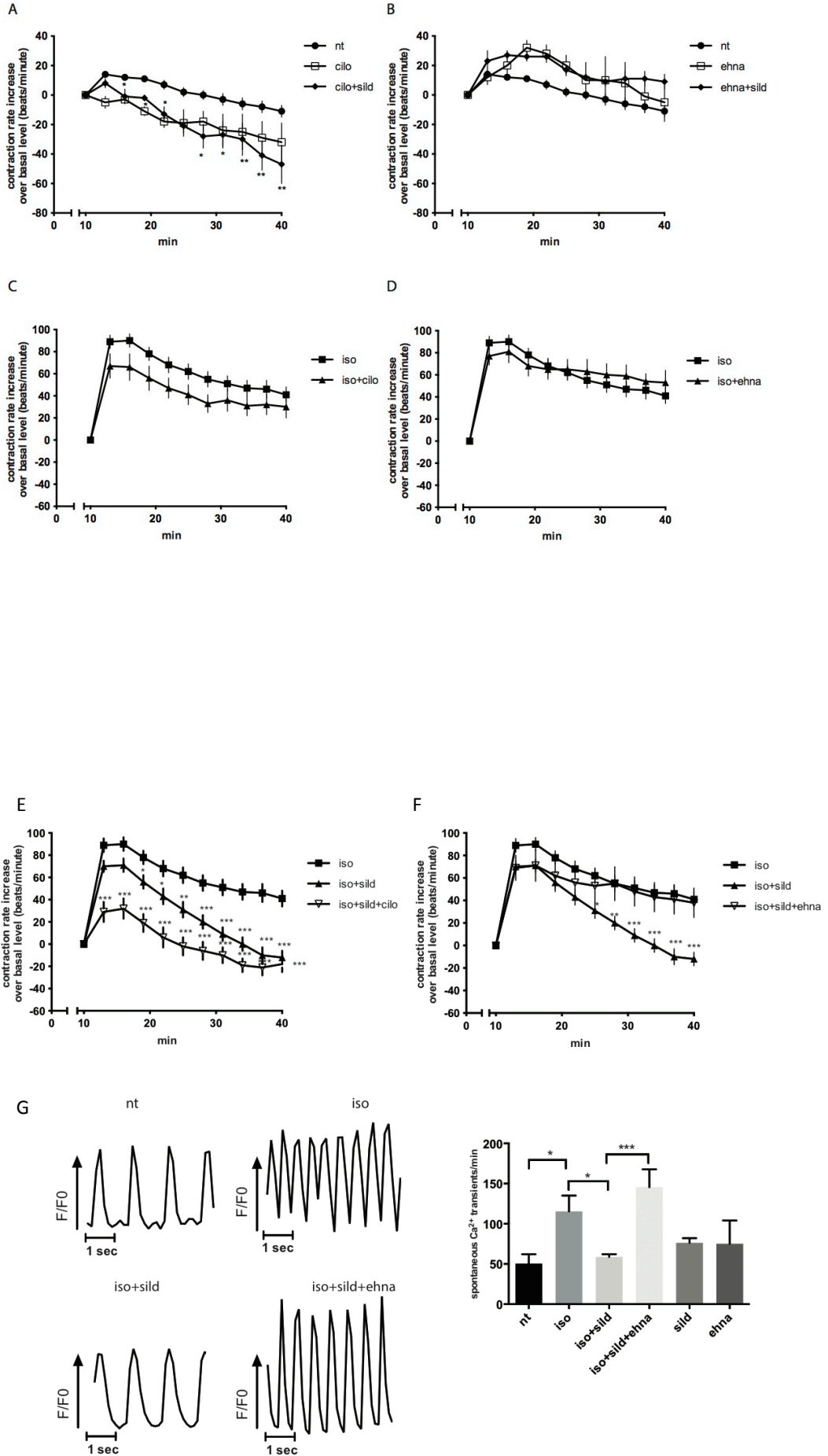
Per comprendere l'eventuale coinvolgimento di altre fosfodiesterasi nell'attenuazione dell'effetto cronotropo positivo a valle dell'inibizione della PDE5, è stata misurata la frequenza di contrazione anche in presenza di specifici inibitori per la PDE2 e la PDE3. Come già riportato in alcuni lavori (*Xiang Y. et al. 2005; De Arcangelis V. et al., 2008*), l'inibizione della PDE3 da parte del Cilostamide (10 μ M) non provoca nessun effetto sulla contrattilità basale (fig.17A) e tanto meno sull'aumento della frequenza di contrazione indotta dall'Isoproterenolo (Fig.17B). Tuttavia, il pretrattamento combinato dell'inibitore della PDE5 (1 μ M) con il cilostamide, prima della stimolazione β -adrenergica, porta ad una significativa riduzione sia del picco massimo (5-9 minuti) e sia del mantenimento della frequenza di contrazione (10-30 minuti) (fig.17E). In particolare, dopo una riduzione del $64 \pm 9\%$ del picco di contrazione associato alla stimolazione β -adrenergica, si osserva un graduale declino, che riporta la contrattilità ai livelli basali. L'effetto sinergico ottenuto dalla combinazione di questi due inibitori suggerisce che PDE5 e PDE3 fanno parte di due percorsi distinti che regolano in maniera indipendentemente la frequenza di contrazione cardiaca.

Questi risultati sono stati estesi e confermati tramite FRET, misurando i livelli intracellulari sia del cAMP e sia del cGMP (Fig.17H e 17I). Il Cilostamide, addizionato all' ISO e al Sildenafil non sembra avere effetti aggiuntivi sull'aumento intracellulare di cGMP (Fig.17H), ma sembra comunque ridurre ulteriormente i livelli di cAMP (Fig.17I).

L'utilizzo dell' [eritro-9-(2-idrossi-3-nonyl) adenina (EHNA)], un inibitore specifico della PDE2, da solo non sembra avere effetti sulla modulazione della frequenza di contrazione dei cardiomiociti (fig.17B). Analogamente l'EHNA non contrasta

l'effetto cronotropo positivo indotto dall'isoproterenolo (Fig.17D), ma al contrario risulta efficace nell'abolire l'effetto del sildenafil sul beta agonista, impedendo il ritorno della frequenza di contrazione al livello basale (Fig.17F).

Per confermare questo dato è stata analizzata la concentrazione di calcio all'interno dei cardiomiociti, poichè è noto che la frequenza di contrazione è una conseguenza del rilascio di calcio. La figura 17G mostra come il pretrattamento con il Sildenafil contrasti il rilascio di calcio indotto dall'Isoproterenolo sui cardiomiociti neonatali e analogamente a quanto osservato per la frequenza di contrazione, l'inibizione della PDE2 abolisce tale effetto. In conclusione, questi dati indicano che la PDE2 svolge un ruolo fondamentale sulla regolazione della frequenza di contrazione da parte del sildenafil.



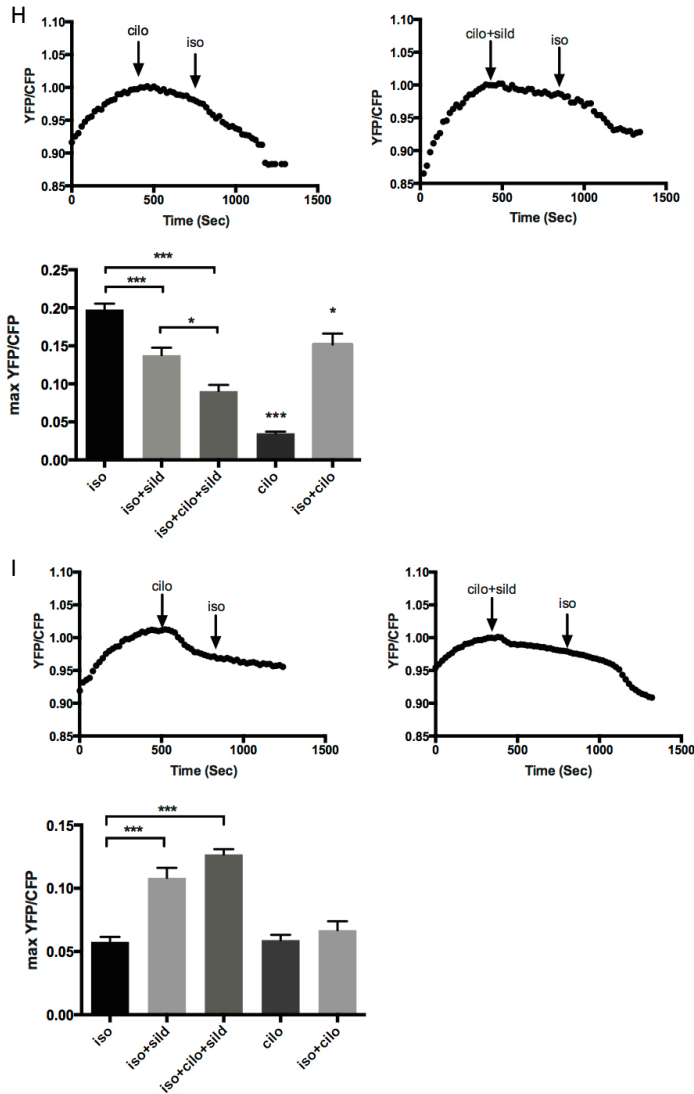
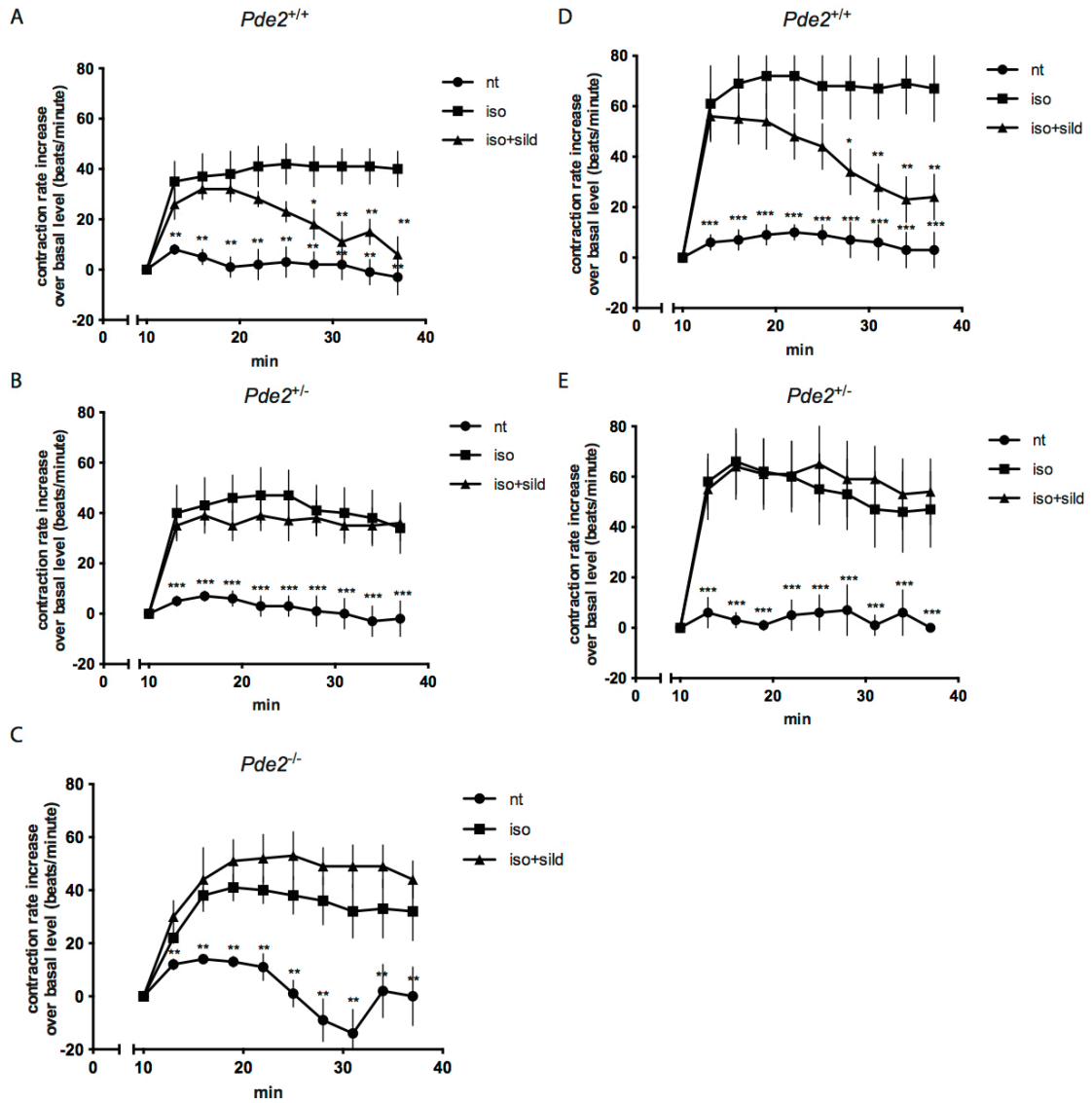


Figure 17. L'effetto cronotropo negativo indotto dal sildenafil sulla stimolazione β -adrenergica è mediato dalla pde2 A-B) Il saggio di contrattilità mostra l'andamento della frequenza di contrazione nelle cellule cardiache in presenza del cilostamide, inibitore specifico della PDE3 (10 μ mol/L) e dell'EHNA, inibitore specifico della PDE2 (10 μ mol/L), in presenza o assenza del Sildenafil. Nei cardiomiociti l'inibizione della PDE5 non sembra influenzare l'azione farmacologica del cilostamide ed EHNA sulla contrattilità basale. I dati indicano la media \pm SE di 8 esperimenti; two-way ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. C-D) Pretrattamenti con cilostamide (C) o EHNA (D) non alterano l'effetto cronotropo positivo indotto dall'isoproterenolo. I dati indicano la media \pm SE di 10 esperimenti. E) L'inibizione della PDE3 con 10 μ mol/L di cilostamide non contrasta l'inibizione del Sildenafil sull'Isoproterenolo. F) L'inibizione della PDE2 con 10 μ mol/L di EHNA contrasta l'effetto cronotropo negativo indotto dal Sildenafil sulla stimolazione β -AR. I dati indicano la media \pm SE di 10 esperimenti; two-way ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. G) Traccia rappresentativa dei transienti di calcio riportati in ΔF (F/F_0 , unità arbitraria) in funzione del tempo (5 secondi). La misurazione è stata effettuata per 1 minuto prima e dopo l'aggiunta di ISO. L'istogramma mostra la quantità di calcio rilasciata al minuto. I dati indicano la media \pm SE di 3 esperimenti; one-way ANOVA: * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$. H-I) Cardiomiociti stimolati con 10 μ mol/L di Iso, 1 μ mol/L di Sild. I e 10 μ mol/L di cilostamide, i dati sono riportati in base al rapporto YFP/CFP, e rappresentano il massimo aumento intracellulare per l' cAMP e per il cGMP rispettivamente per la sonda IUEC e cGi500 espressa nei cardiomiociti (B). I dati indicano la media \pm SE di $n=30$ cellule prese da 3 diversi esperimenti; one-way ANOVA: * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

4.4. L'APLOINSUFFICIENZA DELLA PDE2 PREVIENE GLI EFFETTI DELL'INIBIZIONE DELLA PDE5 SULLA FREQUENZA DI CONTRAZIONE

È noto che l'EHNA non è un bloccante selettivo per la PDE2, essendo anche in grado di inibire l'Adenosina deaminasi, quindi, per confermare il ruolo della PDE2 nel controllo della frequenza cardiaca è stata utilizzata una linea di topi knockout (PDE2-KO) (Stephenson D.T. et al., 2009). Poiché i PDE2-KO intorno ai E17.5 - E18.5 giorni di vita embrionale hanno un'elevata mortalità, sono state utilizzate colture cellulari provenienti da cuori embrionali di E14.5-E15.5. Analogamente a quanto osservato nelle colture neonatali di topi wt, il pretrattamento con sildenafil è in grado di ridurre l'effetto cronotropo positivo anche nei cardiomiociti provenienti da embrioni *Pde2*^{+/+} (Fig.18A). Al contrario, le analisi condotte su colture cellulari isolate da embrioni privi di uno o di entrambi gli alleli per la PDE2 (*Pde2*^{+/-} e *Pde2*^{-/-}), mostrano un mancato effetto del sildenafil nell'attenuare la frequenza di contrazioni in seguito a stimolazione β -AR (rispettivamente 7% per *Pde2*^{+/-} e 0% per *Pde2*^{-/-}), (Fig.18b-c), confermando i risultati già osservati con l'inibitore farmacologico (EHNA). Analisi condotte mediante RT-PCR e western blotting su cardiomiociti embrionali provenienti da topi PDE2^{+/-}, PDE2^{-/-} e Pde2^{+/+} ha permesso di escludere il coinvolgimento di un'alterazione della PDE5 nella regolazione della cronotropia (Fig.18F-G). I dati ottenuti sulla frequenza di contrazione sono stati poi ulteriormente confermati nelle colture di cardiomiociti *Pde2*^{+/+}, *Pde2*^{+/-} provenienti da topi neonatali (Fig.6D-E).

In sintesi, l'aploinsufficienza della PDE2 contrasta l'attenuazione dell'effetto cronotropo positivo da parte sildenafil, confermando che la PDE2 è fondamentale nella regolazione della frequenza cardiaca e che l'inibizione della PDE5 può modularne l'attività.



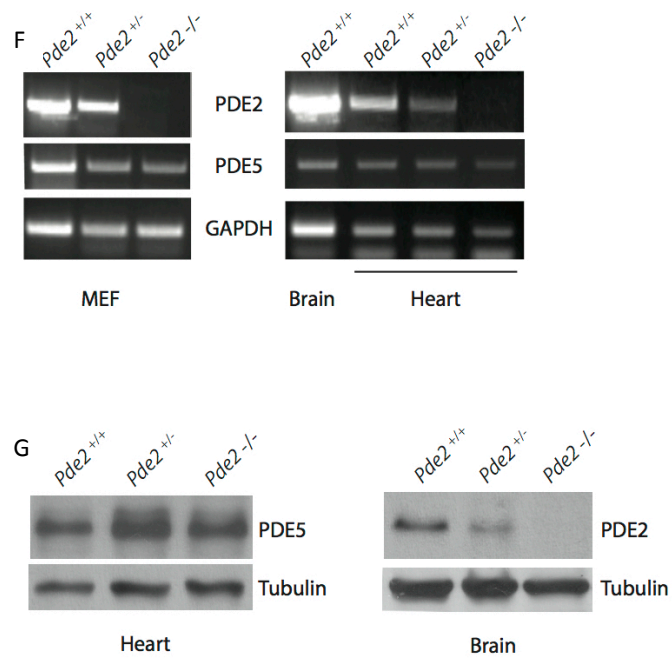


Figura 18. Il Sildenafil regola la frequenza di contrazione attraverso nei cardiomiociti embrionali e neonatali. A,B,C) nei cardiomiociti isolati da embrioni di E14.5-15.5 dpc l'inibizione della PDE5 diminuisce la frequenza di contrazione indotta da 10 $\mu\text{mol/L}$ di Iso nei $Pde2^{+/+}$ (A), ma non nei $Pde2^{+/-}$ (B) e nei $Pde2^{-/-}$ (C). I dati indicano la media \pm SE di 5 esperimenti; two-way ANOVA: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ e $***P < 0.001$. D,E) nei cardiomiociti neonatali, l'inibizione della PDE5 diminuisce la frequenza di contrazione indotta da 10 mmol/L di Iso nei $Pde2^{+/+}$ (D), ma non nei $Pde2^{+/-}$ (E). I dati indicano la media \pm SE di 10 esperimenti; two-way ANOVA: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$. (F) RT-PCR semiquantitativa per la PDE5, mostra livelli di mRNA simili nei $Pde2^{+/+}$, $Pde2^{+/-}$ e $Pde2^{-/-}$ MEF (pannello a sinistra) e cuori isolati da embrioni di E14.5 dpc (pannello a destra) (G) Western blotting mostra livelli simili di espressione per la PDE5 nei cuori embrionali dei $Pde2^{+/+}$, $Pde2^{+/-}$ e $Pde2^{-/-}$ E14.5 dpc.

4.5. IL SILDENAFIL MODULA SPECIFICI POOL DI cAMP

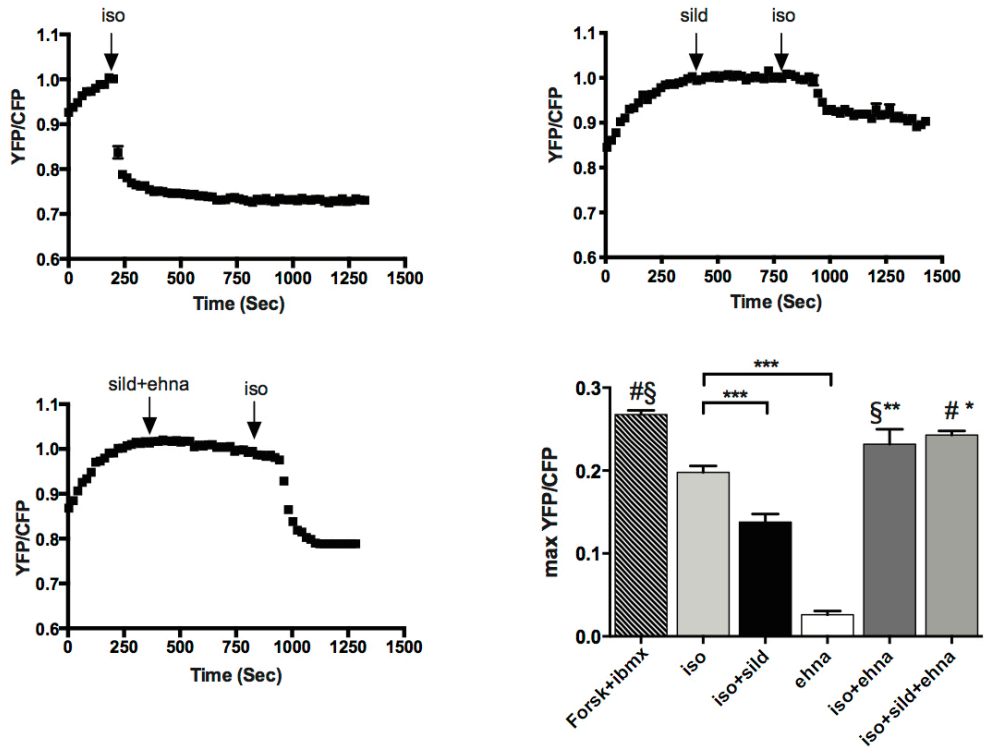
Mediante esperimenti condotti tramite FRET sono state misurate le variazioni di cAMP in risposta a Isoproterenolo, Sildenafil ed EHNA. L'inibizione della PDE5 riduce significativamente la risposta dell' cAMP all'isoproterenolo nei cardiomiociti neonatali (Fig.19A), tuttavia, questa modulazione viene meno in presenza di EHNA (fig.19A), confermando l'ipotesi del coinvolgimento della PDE2 nella riduzione dei livelli di cAMP.

Per dimostrare che l'effetto della PDE5 sia indirizzato esclusivamente verso il pool di cAMP legato ai recettori beta adrenergici, è stato utilizzato il Forskolin, un attivatore non recettoriale di cAMP. Dai risultati ottenuti, il sildenafil non sembra modulare questa via di segnalazione, poichè non ha effetti significativi sulla frequenza di contrazione (Fig.19B) o sui livelli intracellulari dei nucleotide ciclici (Fig.19d-e), indicando che l'inibizione della PDE5 da parte del Sildenafil, è in grado di regolare esclusivamente il pool di cAMP legato ai recettori beta adrenergici.

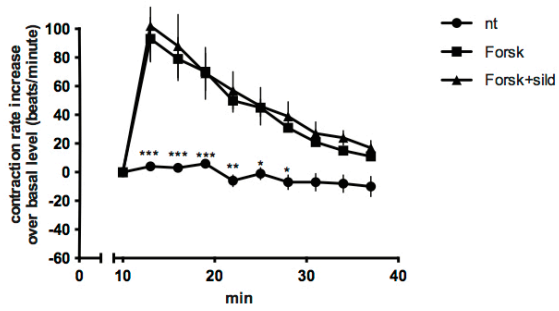
Considerata l'associazione del recettore β 2AR con la proteina G inibitoria (G_i), i cardiomiociti sono stati pre-trattati con la tossina della pertosse (PTX), uno specifico inibitore. L'inattivazione dalla G_i non modifica la frequenza di contrazione mediata dal recettore β 2AR dopo l'aggiunta del Sildenafil (Fig.18C), rafforzando l'ipotesi secondo cui, l'attenuazione dell'effetto cronotropo positivo sia dovuto ad una maggiore idrolisi dell'cAMP e non da una sua ridotta produzione.

Nell'insieme questi risultati, supportano l'ipotesi secondo cui, in seguito all'inibizione della PDE5, il cGMP è in grado di modulare la risposta β -adrenergica attraverso la PDE2. Al contrario la PDE3 sembra essere indipendente dalla PDE5 nella fase di mantenimento del battito, tuttavia sembrano agire insieme nel controllo della fase iniziale del picco di contrazione.

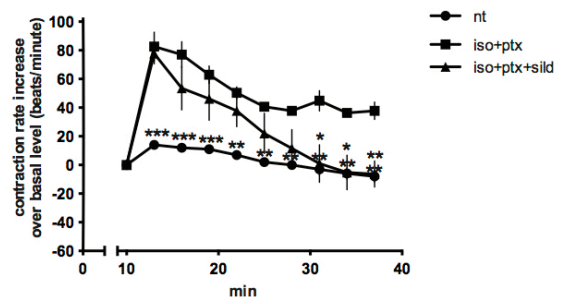
A



B



C



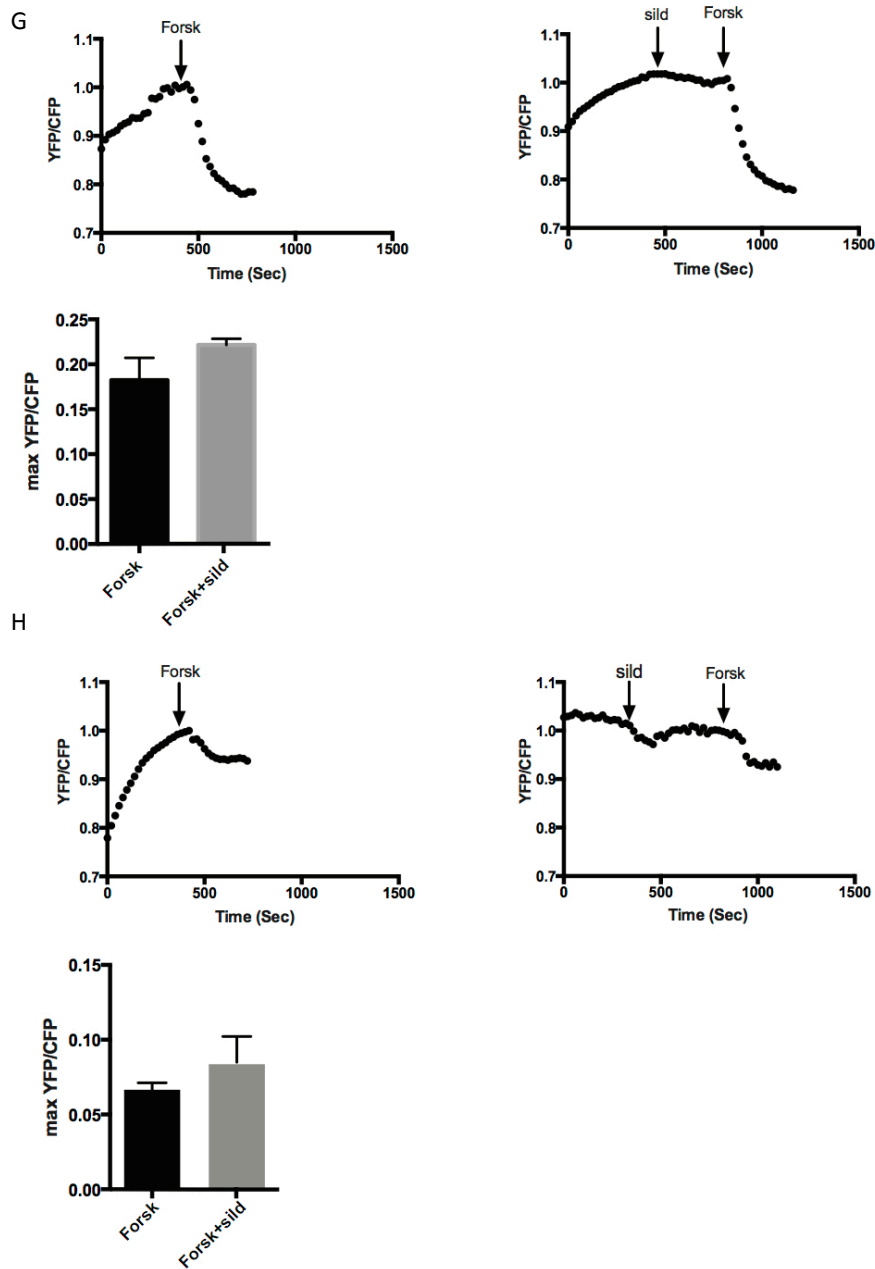


Figura 19. L'inibizione della PDE5 modula selettivamente il pool di cAMP regolato dai recettori b-adrenergici. A) la traccia rappresentativa della FRET mostra la massima risposta all'cAMP (il rapporto YFP/CFP diminuisce in corrispondenza di un aumento intracellulare di cAMP), dopo trattamento con Iso nei cardiomiociti si osserva un aumento dei livelli del cAMP che viene annullato in presenza di Sildenafil. L'EHNA reverte l'effetto del Sildenafil. Il Co-trattamento con IBMX+Forskolina mostra la massima risposta di saturazione per il cAMP.). I dati indicano la media \pm SE di 6 diversi esperimenti , one-way ANOVA * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. B) Il Sildenafil non ha effetti sull'aumento della frequenza di contrazione indotta dalla forskolina.). (C) Anche in presenza dell'inibitore della Gi il Sildenafil è in grado di modulare la risposta b-AR. I dati indicano la media \pm SE di 4 diversi esperimenti ;two-way ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. D-E) Quantificazione dei livelli di cAMP (D)e cGMP (E) tramite FRET su cardiomiociti trattati con Forskolina in presenza e/o assenza di Sildenafil. . I dati indicano la media \pm SE di 24 da 3 diversi esperimenti, , one-way ANOVA.

4.6 L'EFFETTO CRONOTROPO NEGATIVO DEL SILDENAFIL NON VIENE MEDIATO DALLA PKG

Per valutare il possibile ruolo della protein chinasi G (PKG) nella regolazione del sincizio contrattile a seguito della stimolazione con Isoproterenolo, è stato utilizzato il DT2 (10 μ M), un bloccante specifico per questa chinasi. La frequenza di contrazione delle cellule trattate esclusivamente con DT2 appare significativamente influenzata da questa inibizione, la velocità di contrazione subisce un graduale, ma sostanziale rallentamento rispetto al basale, che va però a migliorare in presenza di sildenafil (Fig.20A, DT2+sildenafil vs DT2, $p<0.05$ per ogni punto). Anche l'azione dell'isoproterenolo in assenza della PKG sembra essere nulla, infatti, l'effetto cronotropo positivo indotto del β agonista appare quasi del tutto inesistente (Fig. 20B). Interessante è osservare come a differenza di quanto osservato nei cardiomiociti trattati con EHNA e nei topi aploinsufficienti per il gene della PDE2, l'inibizione della PKG non contrasta l'azione del Sildenafil sulla frequenza di contrazione in presenza dell' Isoproterenolo (Fig.20C) (Iso+Sildenafil+DT2 vs Iso+Sildenafil, $p>0.05$ per ogni punto).

Gli esperimenti sono stati ripetuti anche utilizzando dosi diverse di DT2 (1nmol/L e 100nmol/L DT2 (Fig.6D)). Una riduzione della frequenza di contrazione DT2 dose-dipendente è stata osservata dopo stimolazione Isoproterenolo, ma nessuna dose dell'inibitore della PKG è stato in grado di ripristinare l'effetto cronotropo negativo del Sildenafil che, al contrario, è apparso potenziato dal co-trattamento con DT2.

Questi risultati indicano che probabilmente la PKG influenza direttamente la frequenza di contrazione ventricolare in condizioni basali o sotto l'azione dell'isoproterenolo, ma probabilmente non è direttamente coinvolta nei meccanismi molecolari indotti a valle dell'inibizione della PDE5.

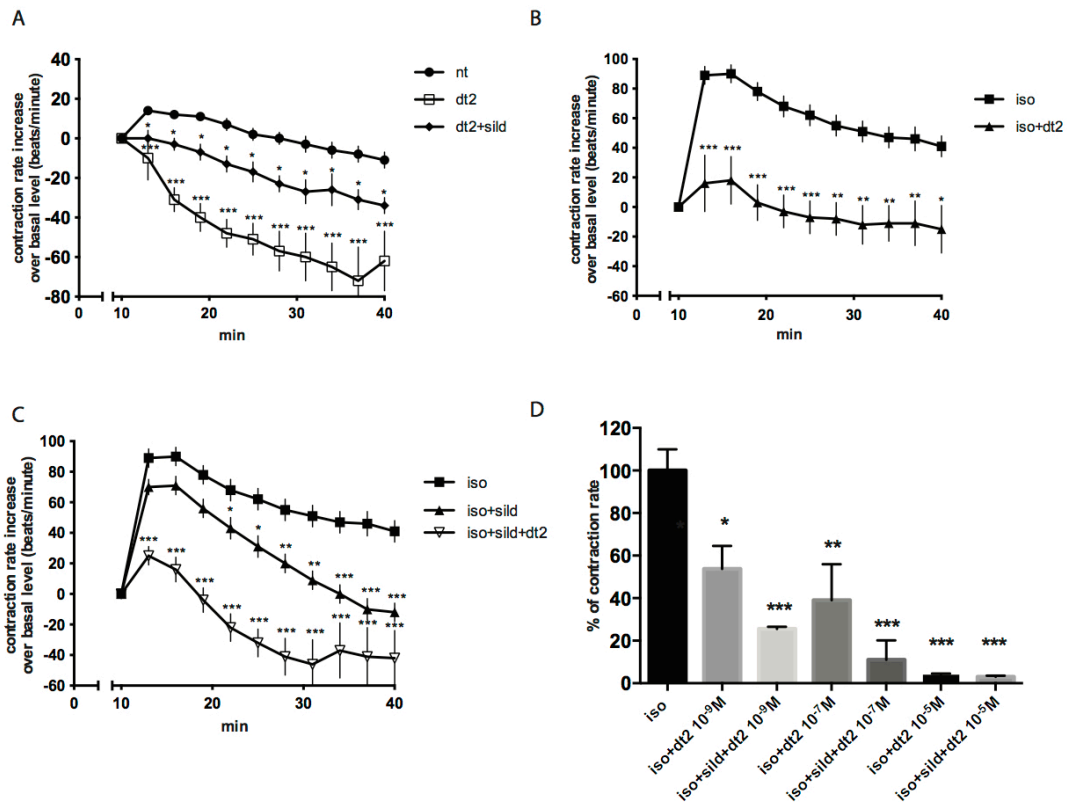


Figura 20. Effeto dell'inibizione della PKG sulla frequenza di contrazione. A) Pre-trattamento con 10 $\mu\text{mol/L}$ di DT2 diminuisce significativamente la frequenza di contrazione basale del sincizio contrattile e l'uso combinato con il Sildenafil è in grado di attenuare l'effetto cronotropo negativo. B) Il pretrattamento con DT2 previene l'effetto cronotropo positivo dell'isoproterenolo C) La contemporanea inibizione della PKG e della PDE5 inibiscono la stimolazione beta adrenergica da parte dell'Isoproterenolo. I dati indicano la media \pm SE di 6 diversi esperimenti ; one-way and two-way ANOVA test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. D) L'effetto dose risposta del DT2 e del DT2+sildenafil sulla frequenza di contrazione misurata 25 minuti dopo il trattamento con l'Isoproterenolo. One way-ANOVA usata per l'analisi statistica: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

4.7. LA VIA DI SEGNALAZIONE β 2-AR-DIPENDENTE È REGOLATA DALL'ATTIVITÀ DELLA PDE5.

La stimolazione dei recettori adrenergici β 1 e β 2, modula distinti pool di cAMP, la cui efficienza nel regolare la frequenza di contrazione differisce nettamente, (*Devic E. et al. 2011*). Per determinare il pool di cAMP modulato dal Sildenafil, sono stati utilizzati cardiomiociti isolati ottenuti da topi β 1AR $^{-/-}$, β 2AR $^{-/-}$ e β 1 β 2AR $^{-/-}$. In assenza del recettore β 1AR, il picco della frequenza di contrazione indotto dall'isoproterenolo appare significativamente ridotto, rispetto ai valori osservati nei cardiomiociti Wild type, ma tende comunque a mantenersi stabile nel tempo (Fig.21A). Dai trattamenti con il Sildenafil si osserva un'attenuazione significativamente della risposta all'isoproterenolo mediata dal recettore β 2AR, ma al contrario non sembra avere effetti sul β 1AR come si può osservare nei β 2AR $^{-/-}$ (Fig.21B) e tanto meno sul β 3AR come indicano i risultati ottenuti sui β 1 β 2AR $^{-/-}$ (Fig.21C). Inoltre trattamenti con l'inibitore della PDE2 ripristinano l'effetto beta bloccante del sildenafil sull'isoproterenolo nei β 1AR $^{-/-}$ ma non nei β 2AR $^{-/-}$ (Fig.21A-B). Per escludere la possibilità che gli effetti osservati sulla via di segnalazione del recettore β 2 da parte del Sildenafil siano causati da un'alterata espressione della PDE5 nei cardiomiociti β AR $^{-/-}$, l'mRNA e i livelli proteici della PDE5 sono stati misurati nei cuori dei topi β 1AR $^{-/-}$, così come nei β 2AR $^{-/-}$, nei β 1 β 2AR $^{-/-}$ e nei wild-type. Come si può osservare nella figura 21D, la quantità totale di PDE5 non subisce variazioni nel confronto tra i diversi genotipi.

Nell'insieme questi risultati suggeriscono che la PDE5 svolge un ruolo fondamentale nel modulare selettivamente la via di segnalazione a valle del recettore adrenergico β 2, dopo stimolazione con Isoproterenolo.

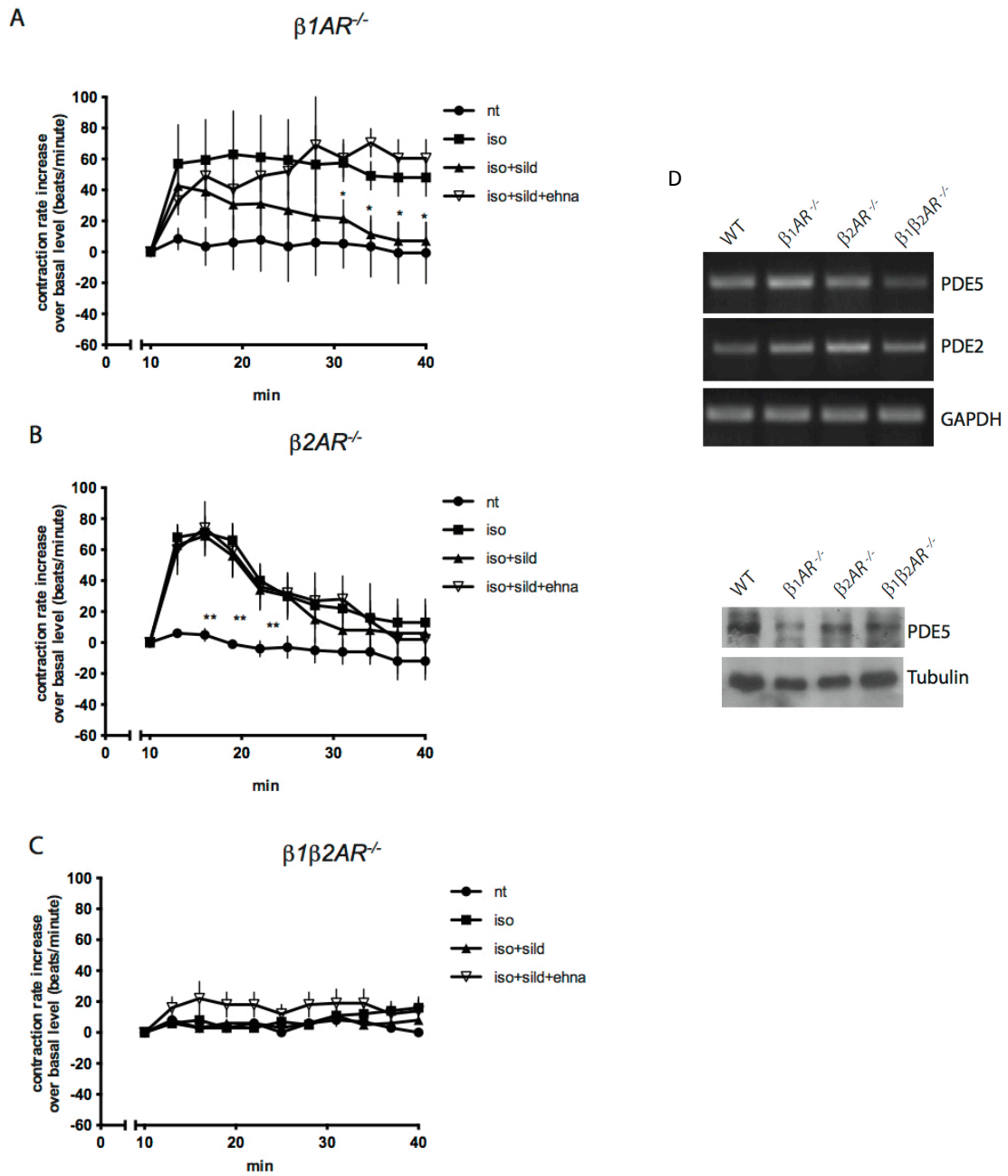


Figura 21. La PDE5 ha un ruolo fondamentale nel regolare la risposta del β_2AR dopo stimolazione con Iso nei cardiomiociti neonatali. A) L'inibizione della PDE5 diminuisce la frequenza di contrazione indotta da $10 \mu\text{mol/L}$ di Iso nei $\beta_1AR^{-/-}$ e questo effetto è poi abolito in presenza dell'inibitore della PDE2 con EHNA. B,C) L'inibizione della PDE5 non ha effetti sulla frequenza di contrazione, in risposta all'Iso $10 \mu\text{mol/L}$ nei cardiomiociti $\beta_2AR^{-/-}$ (B) o $\beta_1\beta_2AR^{-/-}$ (C). I dati indicano la media \pm SE di 4, 7 e 4 esperimenti, rispettivamente per $\beta_1AR^{-/-}$, $\beta_2AR^{-/-}$ e $\beta_1\beta_2AR^{-/-}$; two-way ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ (D) RT-PCR semiquantitativa e analisi di western blotting nei cuori neonatali dei topi $\beta_1AR^{-/-}$, $\beta_2AR^{-/-}$ e $\beta_1\beta_2AR^{-/-}$;

5. DISCUSSIONE

Recentemente la PDE5 ha suscitato grande interesse, tanto nella clinica quanto nella ricerca di base, grazie al suo coinvolgimento in numerose condizioni patologiche (*Zhang M. et al., 2010; Salloum F.N. et al., 2008*). Sebbene fino a pochi anni fa la sua espressione e la sua attività enzimatica nel miocardio siano state considerate poco significative dal punto di vista fisiologico (*Corbin J. et al., 2003*), diversi studi hanno recentemente dimostrato la presenza della PDE5, sia come trascritto che come prodotto proteico in miociti adulti isolati, ed è stato ipotizzato un effetto diretto di questa fosfodiesterasi sulla modulazione della contrattilità miocardica (*Takimoto E. et al., 2005*). Tuttavia, non tutti gli aspetti funzionali associati a questa via di segnalazione sono stati completamente chiariti, per tali motivi lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di indagare sul ruolo svolto della fosfodiesterasi 5 (PDE5) nella regolazione della frequenza di contrazione, mediata dai recettori β AR. È noto che nelle cellule cardiache sono espressi tutti e tre i recettori β AR e che ad ognuno di essi è associata una specifica via di segnalazione in grado di modulare la contrattilità nelle cellule cardiache (*Devic E. et al. 2001*). Per tali motivi, l'uso dei cardiomiociti neonatali come modello sperimentale può essere considerato un importante modello ex-vivo per lo studio della cronotropia. Coerentemente con quanto pubblicato in alcuni studi (*Devic E. et al. 2001; Xiang Y. et al. 2005; De Arcangelis V. et al. 2010*), anche la contrattilità dei cardiomiociti neonatali in coltura subisce una modulazione dose dipendente, da parte dell'Isoproterenolo (Fig.16D). Inoltre, l'aumento di cGMP che si osserva in seguito all'inibizione della stimolazione adrenergica con Sildenafil, fornisce un'informazione importante sul ruolo svolto da questo nucleotide ciclico nella

modulazione della frequenza di contrazione (Fig.16B). Al contrario, il Sildenafil da solo permette un accumulo marginale del cGMP, che sembra avere un effetto trascurabile sulla contrattilità basale, probabilmente a causa della bassa concentrazione di specifici pool di cAMP nelle condizioni di riposo. Il passo successivo è stato quello di utilizzare i cardiomiociti neonatali per comprendere come l'inibizione della PDE5 sia in grado di abolire la risposta β AR, ed in particolare di individuare chi tra PDE2, PDE3 e PKG fosse in grado di modulare questa risposta.

Tra tutte le fosfodiesterasi espresse nel cuore ed in grado di idrolizzare il cAMP, la PDE2 è l'unica che può essere attivata da un aumento della concentrazione del cGMP (Mongillo M et al., 2006; Mehel H et al., 2013; Gustafsson AB et al., 2002). Già in un lavoro di qualche anno fa, venne descritto il ruolo della PDE2 nella modulazione dell'interazione tra il cGMP e il cAMP, in grado di indurre un'attenuazione rapida e transitoria della risposta adrenergica (Zaccolo M. et al., 2007), principalmente attraverso una co-attivazione dell'ossido nitrico (NO) sintasi (Mongillo M. et al., 2006). In aggiunta a questi dati, di recente è stato descritto anche il ruolo della PDE2 in diverse patologie umane (Mehel H. et al., 2013). L'uso di un inibitore specifico della PDE2 (EHNA), e di modelli murini knockout e aploinsufficienti, mi hanno permesso di approfondire il ruolo svolto da questa fosfodiesterasi. Inibendo la PDE2, l'effetto cronotropo negativo indotto dal Sildenafil sulla stimolazione adrenergica viene abolito (Fig.17F), indicando che la PDE2 svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della via di segnalazione a valle dell'inibizione della PDE5. La capacità dell'EHNA di abolire l'effetto del Sildenafil può essere spiegata dall'aumento dei livelli di cAMP in seguito a stimolazione con Isoproterenolo, poichè viene inibita l'attività di idrolisi nei

confronti di questo nucleotide da parte della PDE2 (Fig.19A). L'attività della PDE2 sembra inoltre correlata esclusivamente all'attivazione dei recettori beta adrenergici, in quanto risulta inefficace nel bloccare l'aumento intracellulare dell cAMP indotto dalla forskolina, un farmaco responsabile dell'attivazione diretta dell'adenilato ciclasi intracellulare (Mongillo M. et al., 2006). I dati da me ottenuti, hanno confermato ed ampliato quanto appena detto, in quanto l'aumento del cAMP indotto dalla forskolina non appare modulato dal cGMP attraverso la PDE2 e che per tali motivi non è in grado di influenzare la frequenza di contrazione (Fig.19B). Inoltre, per chiarire ulteriormente i meccanismi a valle dell'interazione PDE5-PDE2, sono state fatte anche misurazioni sui transienti di calcio e anche questi risultati hanno evidenziato la capacità dell'EHNA di contrastare l'effetto del Sildenafil sull'Isoproterenolo (Fig.17G).

L'importanza del ruolo della PDE2 è stata ulteriormente confermata da esperimenti condotti su cardiomiociti contrattili ottenuti da topi *Pde2* wild-type, eterozigoti e knockout. A causa dell'alta letalità dei *Pde2*^{-/-} già a livello embrionale (Table I), (Stephenson DT et al. 2009) gli esperimenti sono stati condotti usando cardiomiociti provenienti da embrioni di 14.5-15.5 dpc (Liu W. et al.,1999). Nelle cellule cardiache in cui la PDE2 è completamente deleta, il Sildenafil non riesce a contrastare la risposta all'Iso (Fig.18B-C), indicando ancora una volta l'importanza di questa fosfodiesterasi nella modulazione della PDE5 in risposta al β AR. Inoltre, anche l'insufficienza per uno degli alleli della PDE2 è in grado di contrastare gli effetti dell'inibizione della PDE5 sulla frequenza di contrazione. (Fig.18E), quest'ultimo aspetto potrebbe essere clinicamente rilevante in quanto difetti genetici riguardanti la PDE2 potrebbero essere individuati in soggetti affetti da patologie

cardiache, e in futuro gli inibitori della PDE2 potrebbero venire utilizzati come terapia per compensare i deficit di cAMP a livello cardiaco.

Contrariamente a quanto osservato per la PDE2, esperimenti condotti usando l'inibitore della PDE3 mostrano come questa fosfodiesterasi sia importante nella regolazione della contrattilità basale (*Beca S. et al., 2013, Shakur Y. et al., 2001*), inoltre anche dopo il co-trattamento con isoproterenolo si osserva un'attenuazione della frequenza di contrazione (Fig.17C), causata da una diminuzione dei livelli di cAMP (Fig.17H). Alla luce di questi risultati, si potrebbe ipotizzare che il cilostamide, modificando i livelli di cGMP, possa indirettamente influenzare anche l'attività della PDE2. Infatti, durante la stimolazione adrenergica i livelli di cGMP aumentano in modo significativo in presenza di Cilostamide e Sildenafil (Fig.17I) (*Beca S. et al., 2013; Ahmad F. 2012*) Osservando nel complesso questi risultati, è possibile ipotizzare un sinergismo tra la PDE2 e le altre fosfodiesterasi coinvolte più o meno direttamente nell'idrolisi del cAMP dopo stimolazione con Isoproterenolo, ma per confermare questi dati, sono necessari ulteriori approfondimenti.

In uno studio condotto su singole fibre muscolari di topo adulto, il DT2, uno specifico inibitore della PKG, è in grado di contrastare l'effetto del sildenafil sull'accorciamento sarcomerico in seguito a stimolazione con Isoproterenolo (*Lee D.I. et al. 2010*). Basandomi su questi dati, ho effettuato esperimenti analoghi su cardiomiociti neonatali per esaminare gli effetti dell'inibizione della PKG sulla cronotropia. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa della frequenza di contrazione, sia in presenza che in assenza di Isoproterenolo (Fig.20A-B), probabilmente questo accade perché in assenza dell'attività della PKG, la PDE5 non viene attivata mediante fosforilazione sulla Ser 92, causando in questo modo una diminuzione dell'idrolisi del cGMP (*Castro L.R. et al., 2010*). Inoltre, gli

esperimenti condotti sui cardiomiociti neonatali, indicano che il DT2 non solo non contrasta l'effetto cronotropo negativo del sildenafil sulla stimolazione dell'Isoproterenolo (Fig.20C), ma al contrario coopera con l'inibitore della PDE5, come mostrato nella curva dose risposta per il DT2, dove l'inibitore per la PKG sembra essere efficace anche a concentrazioni molto basse, suggerendo una via di segnalazione indipendente. Risultati simili sono stati riportati anche sulle cellule atriali di coniglio, dove l'inibizione della PKG con KT-5823 determina una diminuzione degli effetti dell'Isoproterenolo sulla corrente di calcio associate ai canali di tipo L- (I_{Ca}) (Wang Y. et al., 2000; Vandecasteele G. et al., 2001).

Un altro possibile meccanismo attraverso cui il cGMP può controllare il cronotropismo è modificando l'iperpolarizzazione-attivazione della corrente I_f , che risulta sensibile alla stimolazione β -AR, come osservato nei cardiomiociti ventricolari provenienti da cuori ipertensivi di ratto (Cerbai E. et al., 1996) e da miocardio umano affetto da scompenso (Cerbai E. et al., 1997).

Già in uno studio di circa dieci anni fa, fu dimostrato un aumento della corrente I_f associate ai livelli intracellulari dei nucleotidi ciclici, indipendentemente dalla fosforilazione della PKG o dall'associazione con la proteina G_i (Lonardo G. et al., 2004). Casadei e i suoi collaboratori, in un interessante studio (Bryant S.M. et al., 2001) mostrarono come l'NO non può opporsi all'aumento di corrente I_f mediato dal cAMP nei cardiomiociti ventricolari adulti, provenienti da ratti ipertensivi, determinando un aumento dell'effetto aritmogeno del β -AR. Come il sildenafil possa influire sulla corrente I_f dei cardiomiociti ventricolari è ancora da investigare, i risultati ottenuti non permettono di escludere completamente il coinvolgimento della PKG sull'effetto cronotropo negativo mediato dal Sildenafil, ma mettono in evidenza una possibile nuova funzione della PKG sulla regolazione della frequenza

di contrazione basale e indotta dall'Isoproterenolo, almeno per quanto riguarda i topi neonatali.

Numerosi dati di letteratura dimostrano come la risposta beta-adrenergica sia funzionalmente compartimentalizzata all'interno della cellula, modulando distinti pool di cAMP (*Xiang Y. et al., 2005; Stangherlin A. et al., 2011; Gesellchen F. et al., 2011; Xiang Y.K., 2011*). Studi condotti tramite FRET nei cardiomiociti neonatali, hanno rilevato che il cAMP dopo una stimolazione β -adrenergica sembra essere racchiuso in microdomini nelle vicinanze dei tubuli-T e del reticolo sarcoplasmatico, e la sua diffusione viene marcatamente limitata dalla presenza delle fosfodiesterasi (*Zaccolo M. et al., 2002*).

Negli esperimenti condotti in questo lavoro, dopo stimolazione con Isoproterenolo, il Sildenafil è in grado di desensibilizzare i cardiomiociti nei topi knockout $\beta_1AR^{-/-}$, ma non nei $\beta_2AR^{-/-}$. Inoltre, mentre la stimolazione β_1AR produce un significativo aumento del cAMP che si propaga uniformemente in tutto il miocita, la stimolazione β_2AR porta ad un aumento molto minore di cAMP, che rimane confinato nei compartimenti subcellulari; questo può essere attribuito al fatto che a differenza del recettore β_1AR , il β_2AR dopo la stimolazione con il beta agonista è responsabile del mantenimento della frequenza di contrazione nella fase tardiva (*Xiang Y. et al., 2005*). Quindi, nell'insieme i dati ottenuti fanno supporre che l'inibizione della PDE5 agisca sulla frequenza di contrazione principalmente attraverso il recettore β_2AR e che la PDE2 agisca idrolizzando esclusivamente il pool cAMP associato a questo specifico recettore, rafforzando l'importanza attribuita alla compartimentazione della segnalazione adrenergica.

In aggiunta, l'effetto trascurabile della tossina della pertosse, permette di escludere il coinvolgimento della proteina G_i associate al recettore β_2AR , indicando ancora una

volta che l'attenuazione dell'effetto cronotropo a valle dell'inibizione della PDE5 sia dipendente dall'attivazione della PDE2.

Una limitazione in cui mi sono imbattuta in questo progetto, è che non mi è stato possibile testare direttamente l'impatto della PDE5 sulla risposta β -adrenergica poichè mutanti condizionali per questa fosfodiesterasi non sono stati ancora generati, tuttavia curve dose risposta e studi farmacologici supportano l'idea di un effetto specifico dell'attività della PDE5. Un'altra limitazione ha riguardato la PDE2 e/o PKG poichè non è stato possibile scindere del tutto il ruolo dell'attivazione a valle dell'inibizione con Sildenafil, a causa degli effetti significativi causati dal DT2 sulla contrattilità basale. Tuttavia, i risultati ottenuti, sono coerenti con il lavoro di Fischmeister, in cui nei cardiomiociti adulti viene descritta una regolazione negativa da parte della PKG nei confronti del cGMP prodotto dall'ossido nitrico (*Castro L.R. et al., 2010*).

Considerando i dati ottenuti possiamo dire che i cardiomiociti neonatali esprimono lo stesso meccanismo molecolare delle cellule adulte, tuttavia, è innegabile l'esistenza di alcune differenze funzionali. Tuttavia, i dati osservati sulla frequenza di contrazione, sono stati validati anche su cellule del nodo seno atriale, provenienti da topi adulti grazie ad una collaborazione con la Temple University in Pennsylvania. Inoltre, è stato interessante apprendere che in un lavoro pubblicato di recente, condotto su neuroni stimolati con Dopamina, viene descritta la modulazione tra il cAMP e il cGMP da parte della PDE2 e non dalla PKG, suggerendo che il meccanismo di regolazione individuato in questo mio lavoro potrebbe conservarsi anche in diverse tipologie cellulari (*Polito M. et al 2013*)

In conclusione, questo studio offre numerosi aspetti innovativi rispetto alla

letteratura di questo settore, a partire dal saggio funzionale che ha permesso di effettuare un'analisi farmacologica per individuare le vie di segnalazione a valle dell'inibizione della PDE5. Questa tecnica sperimentale ha consentito di valutare rapidi cambiamenti della frequenza di contrazione nei sincizi cellulari contrattili, rispecchiando le interazioni cellula-cellula dei cardiomiociti presenti nel cuore in toto e in comparazione con gli studi in vivo, il modello ex-vivo ha consentito di studiare la risposta cronotropa alle catecolamine senza subire l'influenza del sistema nervoso autonomo e del tessuto cardiaco di conduzione.

Concludendo, questo studio sulla cronotropia è coerente con i dati già descritti per l'ipertrofia e l'inotropismo in altri lavori, suggerendo che il Sildenafil potrebbe essere usato in un raggio d'azione farmacologico molto ampio (*Lee D.I. et al. 2012; Reffelmann T et al. 2009; Elrod J.W. 2007*). Per tali motivi, la capacità di attenuazione del sistema beta adrenergico da parte degli inibitori della PDE5 merita un'ulteriore indagine clinica.

6. BIOGRAFIA

Ahmad F, Degerman E, Manganiello VC. (2012) Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 signaling complexes. *Horm Metab Res.*;44:776-785.

Andersen A, Nielsen JM, Holmboe S, Vildbrad MD, Nielsen-Kudsk JE. (2013) The effects of cyclic guanylate cyclase stimulation on right ventricular hypertrophy and failure alone and in combination with phosphodiesterase-5 inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol.*;62:167-173

Beca S, Ahmad F, Shen W, Liu J, Makary S, Polidovitch N, Sun J, Hockman S, Chung YW, Movsesian M, Murphy E, Manganiello V, Backx PH. (2013) Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart. *Circ Res.*;112:289-297.

Bers DM. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling *Nature* 415: 198–205.

Borlaug BA, Melenovsky V, Marhin T, Fitzgerald P, Kass DA. (2005) Sildenafil inhibits beta-adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans. *Circulation.*;112:2642-2649.

Bryant SM, Sears CE, Rigg L, Terrar DA, Casadei B. (2001) Nitric oxide does not modulate the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.*;51:51-58.

Castro LR, Schittl J, Fischmeister R. (2010) Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circ Res.*;107:1232-1240.

Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. (1996) Occurrence and properties of the hyperpolarization-activated current I_f in ventricular myocytes from normotensive and hypertensive rats during aging. *Circulation.*;94:1674-1681.

Cerbai E, Pino R, Porciatti F, Sani G, Toscano M, Maccherini M, Giunti G, Mugelli A. (1997) Characterization of the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation.*;95:568-571.

Conti M, Beavo J. (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.*;76:481-511.

Corbin J. Et al (2003) Sildenafil citrate does not affect cardiac contractility in human or dog heart *Curr. Med. Res. Opin.* 19:747-752.

Das A1, Xi L, Kukreja RC. (2008) Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta. *J Biol Chem.* 24;283(43):29572-85

De Arcangelis, V, Soto D, Xiang Y. (2008) Phosphodiesterase 4 and phosphatase 2A differentially regulate cAMP/protein kinase a signaling for cardiac myocyte contraction under stimulation of beta1 adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.*;74:1453-1462

Devic E, Xiang Y, Gould D, Kobilka B. (2001) Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol.*;60:577-583.

Elrod JW, Greer JJ, Lefer DJ. (2007) Sildenafil-mediated acute cardioprotection is independent of the NO/cGMP pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*;292:H342-H347.

Fassina L, Di GA, Naro F, Monaco L, De Angelis MG, Magenes G. (2011) Video evaluation of the kinematics and dynamics of the beating cardiac syncytium: an alternative to the Langendorff method. *Int J Artif Organs.*;34:546-558.

Fisher P.W., Salloum F., Das A., Hyder H., Kukreja R.C. (2005) Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 111: 1601-10.

Francis SH, Blount MA, Corbin JD. (2011) Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev.*;91:651-690.

Fu Qin, Chen X, Xiang YK. (2013) Compartmentalization of β -adrenergic signals in cardiomyocytes. *Trends Cardiovasc Med.* 23(7):250-6.

Gartner L.P., Hiatt J.L. (2002) *Istologia*(ed. EDISES) capitolo 8.

Giannetta E, Isidori AM, Galea N, Carbone I, Mandosi E, Vizza CD, Naro F, Morano S, Fedele F, Lenzi A. (2012) Chronic Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. *Circulation.*;125:2323-2333

Gesellchen F, Stangherlin A, Surdo N, Terrin A, Zoccarato A, Zaccolo M. (2011) Measuring spatiotemporal dynamics of cyclic AMP signaling in real-time using FRET-based biosensors. *Methods Mol Biol.*;746:297-316.

Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. (2011) PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circ Heart Fail.*;4:8-17.

Gustafsson AB, Brunton LL. (2002) Attenuation of cAMP accumulation in adult rat cardiac fibroblasts by IL-1beta and NO: role of cGMP-stimulated PDE2. *Am J Physiol Cell Physiol.*;283:C463-C471.

Heineke J., Kempf T., Kraft T., Hilfiker A., Morawietz H., Scheubel R.J., Carboni P., Lohmann S.M., Drexler H., Wollert K.C (2003) Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation* 107: 1424-32.

Kass D.A. (2007) Hypertrophied right hearts get two for the price of one: can inhibiting phosphodiesterase type 5 also inhibit phosphodiesterase type 3? *Circulation* 116: 233-5.

Khairallah M., Khairallah R.J., Young M.E., Allen B.G., Gillis M.A., Danialou G., Deschepper C.F., Petrof B.J, Des Rosiers C. (2008) Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 7028-33

Kiriazis H, Wang K, Xu Q, Gao XM, Ming Z, Su Y, Moore XL, Lambert G, Gibbs ME, Dart AM, Du XJ. (2008) Knockout of beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 153:684-692.

Kumar P., Francis G.S., Tang W.W.H. (2009) Phosphodiesterase 5 inhibition in heart failure: mechanism and clinical implication. *Nat. Rev. Cardiol.* 6: 349-355

Lee DI, Vahebi S, Tocchetti CG, Barouch LA, Solaro RJ, Takimoto E, Kass DA. (2010) PDE5A suppression of acute beta-adrenergic activation requires modulation of myocyte beta-3 signaling coupled to PKG-mediated troponin I phosphorylation. *Basic Res Cardiol.*;105:337-347.

Lee DI, Kass DA. (2012) Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology* 27(4):248-58

Lehnart S.E., Wehrens X.H., Reiken S., Warriar S., Belevych A.E., Harvey R.D., Richter W., Jin S.L., Conti M., Marks A.R. (2005) Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123: 25-35.

Liu W, Yasui K, Arai A, Kamiya K, Cheng J, Kodama I, Toyama J. (1999) beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺-channel currents in early-stage embryonic mouse heart. *Am J Physiol.*;276:H608-H613.

Lonardo G, Cerbai E, Casini S, Giunti G, Bonacchi M, Battaglia F, Fiorani B, Stefano PL, Sani G, Mugelli A. (2004) Atrial natriuretic peptide modulates the hyperpolarization-activated current (I_f) in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res.*;63:528-536.

Lukowski R, Rybalkin SD, Loga F, Leiss V, Beavo JA, Hofmann F. (2010) Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;107:5646-5651.

Kinderman FS1, Kim C, von Daake S, Ma Y, Pham BQ, Spraggon G, Xuong NH, Jennings PA, Taylor SS. (2006) A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell.* 3;24(3):397-408.

Mehel H, Emons J, Vettel C, Wittkopper K, Seppelt D, Dewenter M, Lutz S, Sossalla S, Maier LS, Lechene P, Leroy J, Lefebvre F, Varin A, Eschenhagen T, Nattel S, Dobrev D, Zimmermann WH, Nikolaev VO, Vandecasteele G, Fischmeister R, El-Armouche A. (2013) Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts beta-Adrenergic Responses in Cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol.*;62:1596-1606.

Miller C.L., Yan C. (2010) Targeting cyclic nucleotide phosphodiesterase in the heart: therapeutic implications. *J. Cardiovasc. Trans. Res.* 3: 507-515.

Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolocci N, Houslay MD, Zaccolo M. (2006) Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res.*;98:226-234.

Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A, St AC, Webster L, Rebeyka IM, Ross DB, Light PE, Dyck JR, Michelakis ED. (2007) Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation.*;116:238-248.

Osadchii O.E. (2007) Cardiac hypertrophy induced by sustained β -adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail. Rev.* 12: 66-86.

Polito M, Klarenbeek J, Jalink K, Paupardin-Tritsch D, Vincent P, Castro LR. (2013) The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci.*;7:211.

Randall D., Burggren W., French K (1999) *Fisiologia animale: Meccanismi e adattamenti* Seconda edizione italiana condotta sulla quarta edizione americana (Zanichelli)

Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature.*;469:175-180.

Rao Y.J., Xi L. (2009) Piroval effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts. *Acta Pharmacol. Sin.* 30: 1-24.

Reffellmann T, Kloner RA. (2009) Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? *Cardiovasc Res.*;83:204-212.

- Rybalkin S.D., Ribalkina I.G., Feil R., Hofman F., Beavo J.A. (2002) Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 277:3310-7.
- Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK. (1999) Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem.*;274:16701-16708.
- Rozec B., Gauthier C. (2006) β 3- Adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Therap.* 111: 652-673
- Saucerman J.J., McCulloch A.D. (2006) Cardiac β -adrenergic signaling from subcellular microdomains to heart failure. *N.Y. Acad. Sci.* 1080. 348-361
- Salloum F.N., Chau V., Varma A., Hoke N.N., Toldo S., Biondi-Zoccai G.G., Crea F., Vetrovec G.W., Abbate A. (2008) Anakinra in experimental acute myocardial infarction--does dosage or duration of treatment matter? *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23: 129-35.
- Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM, Kass DA. (2001) Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J.*;15:1718-1726.
- Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V. (2001) Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*;66:241-277.
- Stanfield C.L., German W.J. (2009) Il sistema cardiovascolare: funzione cardiaca In: *Fisiologia cardiaca* (ed. EDISES) capitolo 13.
- Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, Terrin A, Fields LA, Berrera M, Surdo NC, Craig MA, Smith G, Hamilton G, Zaccolo M. (2011) cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes *Circ. Res* 108(8):929- 39.
- Steinberg SF J (2004) beta(2)-Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts *Mol Cell Cardiol.* 37(2):407-15.
- Stephenson DT, Coskran TM, Wilhelms MB, Adamowicz WO, O'Donnell MM, Muravnick KB, Menniti FS, Kleiman RJ, Morton D. (2009) Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem.*; 57: 933- 949.
- Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. (2005) Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med.*;11:214-222.

Tsai E.J., Kass D.A. (2009) Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol. Therap.* 122: 216-238.

Woo AY, Xiao RP. (2012) beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin.*;33:335-341.

Takimoto E., Koitabashi N., Hsu S., Ketner E.A., Zhang M., Nagayama T., Bedja D., Gabrielson K.L., Blanton R., Siderovski D.P., Mendelsohn M.E., Kass D.A. (2009) Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *J. Clin. Invest.* 119: 408-20.

Salloum FN, Abbate A, Das A, Houser JE, Mudrick I, Hoke NN, Roy SK, Brown WR, Prabhakar S (2008). Sildenafil (Viagra) Attenuates Ischemic Cardiomyopathy and Improves Left Ventricular Function *Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1398–H1406.

Xiang Y, Naro F, Zoudilova M, Jin SL, Conti M, Kobilka B. (2005) Phosphodiesterase 4D is required for beta2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;102:909-914.

Xiang Y, Kobilka BK. (2003) Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* 300(5625):1530-2.

Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B. (2002) Caveolar localization dictates physiologic signaling of β_2 -adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes *JBiol Chem* 277:34280-34286.

Xiang YK. (2011) Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. *Circ Res.*;109:231-244.

Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. (2001) Cyclic GMP regulation of the L-type Ca^{2+} channel current in human atrial myocytes. *J Physiol.*;533:329-340.

Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. (1999) Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.*;127:65-74.

Wang Y, Wagner MB, Joyner RW, Kumar R. (2000) cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells. *Cardiovasc Res.*;48:310-322.

Wong W1, Scott JD. (2004) AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(12):959-70

Zaccolo M., Movsesian M.A. (2007) cAMP and cGMP signaling cross-talk role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circulation Res.* 100: 1569-1578.

Zaccolo M, Pozzan T. (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*.;295:1711-1715.

Zhang M, Takimoto E, Hsu S, Lee D.I., Nagayama T., Danner T., Koitabashi N., Barth A.S., Bedja D., Gabrielson K.L., Wang Y., Kass A. (2010) Myocardial Remodeling is Controlled by Myocyte-targeted Gene Regulation of Phosphodiesterase Type-5 *J Am Coll Cardiol*. 56(24): 2021–2030.

Zheng M., Han Q.D., Xiao R.P. (2004) Distinct β -adrenergic receptor subtype in the heart and their pathophysiological relevance. *Acta Physiol. Sin*. 56. 1-15.