

Università degli Studi di Napoli Federico II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN Scienze Cardiovascolari e Gerontologiche

XXIX Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI DI DOTTORATO

**EFFETTI DELLA TERAPIA CON METOPROLOLO E SFINGOSINA 1
FOSFATO IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI SCOMPENSO CARDIACO
POST-ISCHEMICO**

Tutor/Relatore

Ch.mo Prof.

Nicola Ferrara

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nicola Ferrara', with a stylized flourish at the end.

Candidata

Dr.ssa Maria Loreta D'Amico

ABSTRACT

Un evento patologico chiave nello Scompenso Cardiaco (SC) è la disregolazione dei recettori β adrenergici cardiaci (β AR) conseguenza dell'iperattivazione da parte delle catecolammine. I beta bloccanti hanno effetti terapeutici nei pazienti con SC in quanto impediscono l'ulteriore down-regulation recettoriale. Sono comunque necessari ulteriori studi per approfondire al meglio i meccanismi d'azione di questa classe di farmaci. Inoltre è stato dimostrato che in corso di SC si assiste alla disregolazione del sistema recettoriale della sfingosina1fosfato (S1P), un fosfolipide bioattivo con effetti cardioprotettivi, nonostante i livelli circolanti di tale fosfolipide siano ridotti. È noto che in corso di scompenso, l'iperattivazione dei recettori β adrenergici cardiaci, da parte delle catecolammine, porta anche ad una downregulation del recettore di tipo 1 della S1P, favorendo la progressione della patologia. Il cross-talk tra questi due sistemi recettoriali sembra essere orchestrato da GRK2, che rappresenta il principale regolatore di questa interazione. Nel presente studio abbiamo osservato che il Metoprololo, β bloccante selettivo per il recettore β_1 , è in grado di prevenire la disfunzione del signaling della S1P rallentando la progressione dello scompenso cardiaco. Quindi è possibile ipotizzare che parte degli effetti benefici mediati dai beta bloccanti siano dovuti al miglioramento del signaling della S1P.

INTRODUZIONE

Lo scompenso cardiaco (SC) è una sindrome clinica complessa caratterizzata da anomalie strutturali e funzionali che determinano un'incapacità del cuore di fornire ossigeno in quantità adeguate alle richieste metaboliche dell'organismo⁽¹⁾. Tale patologia rappresenta una delle principali cause di mortalità e morbilità a livello mondiale^(2,3). Lo SC costituisce un importante problema di salute pubblica in continua crescita con una prevalenza stimata tra lo 0,4 e il 2%. In Italia circa 2 milioni di pazienti sono affetti da SC e più di un terzo di questi necessita in media di un ricovero ospedaliero annuale comportando un costo pari a circa l'1-2% della spesa sanitaria nazionale⁽⁴⁾.

In corso di SC si assiste ad un'iperattività del sistema nervoso simpatico (SNS) con un'ipersecrezione di norepinefrina (NE). È noto che l'aumento della concentrazione di NE all'interno dello spazio sinaptico è dovuta sia all'incremento del rilascio che alla riduzione del reuptake a livello delle terminazioni nervose del SNS. L'aumento delle catecolamine determina una disfunzione dei recettori β adrenergici (β AR), riducendone sia la densità di membrana (downregulation) che la funzione (desensibilizzazione)⁽⁵⁾. L'iperattivazione adrenergica, nelle fasi iniziali della patologia rappresenta un importante meccanismo compensatorio, che garantisce un'adeguata contrattilità cardiaca^(6,7), ma a lungo termine comporta un peggioramento della patologia riducendo la riserva inotropica e peggiorando il rimodellamento del cuore scompensato⁽⁶⁾.

Dal punto di vista molecolare, questi recettori fanno parte dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR) e nei mammiferi sono stati identificati nove sottotipi: tre α 1, tre α 2 e tre β (β 1, β 2, β 3)⁽¹⁷⁾. Il recettore β 1 rappresenta il sottotipo predominante a livello cardiaco (80%), mentre i sottotipi β 2 e β 3 sono espressi in minor quantità⁽¹⁶⁾. I recettori β 1AR sono presenti fisiologicamente sulla membrana plasmatica dei

cardiomiociti con una struttura a 7 α eliche transmembrana. Tali recettori sono accoppiati mediante la proteina G stimolatoria (Gs) all'enzima adenilato ciclasi, che grazie all'interazione con degli effettori a valle porta ad un aumento della contrattilità dei cardiomiociti⁽⁸⁾. In condizioni patologiche l'attivazione cronica di questi recettori produce effetti tossici a livello cardiaco^(9,10), inducendo un aumento dell'apoptosi e della fibrosi miocardica⁽¹¹⁾.

Nello SC l'iperattività del SNS è responsabile anche dell'aumento dei livelli cardiaci della G-protein coupled receptor kinase 2 (GRK2), che è coinvolta nei processi di downregulation e desensibilizzazione dei β AR a livello cardiaco^(7,13).

GRK2 è una proteina citoplasmatica ad attività serin-treonin-chinasica che, fosforilando i recettori accoppiati a proteine G, tra cui i β AR, ne inibisce il signaling^(7,12). La famiglia delle GRK è formata da 7 membri (GRK 1-7), di cui GRK2, GRK3, GRK5 sono espresse ubiquitariamente, mentre GRK2 è l'isoforma più abbondante nel cuore⁽¹³⁾.

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che GRK2 può rappresentare un importante target terapeutico nello scompenso cardiaco,^(7,13) in quanto la sua inibizione, resa possibile dalla creazione di un peptide inibitorio chiamato BARK-ct, porta alla normalizzazione del sistema recettoriale dei β AR cardiaci contribuendo così al miglioramento della funzione del cuore^(13,15). BARK-ct è formato dagli ultimi 194 aminoacidi della porzione C-terminale di GRK2 e comprende il dominio responsabile dell'interazione tra la chinasi e la subunità $\beta\gamma$ delle proteine G, ma non quello con attività chinasica. Il peptide inibisce in maniera competitiva la traslocazione di GRK2 antagonizzando la disfunzione dei β AR GRK2-mediata^(18,19). Un solido pilastro della terapia per lo SC è rappresentato dall'utilizzo dei β -bloccanti. Questa strategia terapeutica mira a bloccare i processi di downregulation e desensibilizzazione mediati da GRK2, con conseguente riduzione dei livelli della

chinasi, in questo modo si ha il ripristino del funzionamento di questo sistema recettoriale. Tale terapia ha portato ad un incremento dell'aspettativa di vita e ad un miglioramento della sintomatologia dei pazienti⁽¹⁴⁾.

Purtroppo non tutti i pazienti rispondono in maniera favorevole a questo trattamento farmacologico, quindi è necessario approfondire i meccanismi molecolari che contribuiscono allo sviluppo e alla progressione della patologia per identificare nuovi target terapeutici e indagare se i diversi beta bloccanti possano avere ulteriori meccanismi di azione che spieghino le differenze nella risposta a tale farmaci.

Molto interesse vi è nell'interazione tra il sistema β recettoriale e altri sistemi recettoriali. Dati sperimentali hanno dimostrato che durante lo SC si verifica anche una disregolazione del recettore di tipo 1 della sfingosina1fosfato (S1PR1). Tale recettore è un GPCR espresso nel cuore e media l'effetto cardioprotettivo della S1P, e sembra essere strettamente legato al signaling del β 1AR^(20,21).

La S1P è un lipide plasmatico coinvolto nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare che, a livello cardiaco, sembra avere un ruolo protettivo favorendo l'angiogenesi.

I livelli della S1P nella cellula sono regolati dall'attivazione di due enzimi: sfingosina chinasi (SPK) e sfingosina1fosfato liasi.

La sfingosina chinasi catalizza la conversione della sfingosina in S1P che rappresenta la forma biologicamente attiva.

Tale enzima ha due isoforme: l'isoforma 1 presente prevalentemente nel cuore, ha una localizzazione citosolica e in seguito a differenti stimoli (ormoni o citochine) viene fosforilata e traslocata a livello della membrana plasmatica. La traslocazione è necessaria per attivare le vie di segnalazione per la crescita e sopravvivenza cellulare^(22,23). L'isoforma 2 è localizzata nelle membrane interne e promuove l'apoptosi cellulare⁽²⁴⁾.

La sfingosina1fosfato liasi è un enzima presente nel reticolo endoplasmatico⁽²⁵⁾ e catalizza la reazione irreversibile della scissione della sfingosina1fosfato in fosfoetanolamina e palmitaldeide.

Gli enzimi responsabili della formazione della S1P si trovano sia all'interno della cellula sia nello spazio extracellulare, infatti possono essere traslocati in membrana o addirittura secreti. La sintesi extracellulare di questo fosfolipide è, quindi, possibile anche grazie alla presenza al di fuori della cellula dei due substrati (SP e ATP) necessari alla SPK1. La S1P, una volta generata può agire all'interno della cellula come secondo messaggero o può essere secreto e stimolare specifici recettori in maniera autocrina o paracrina.

La S1P, quando agisce da secondo messaggero è in grado di mobilizzare il calcio intracellulare attraverso una via indipendente dall' inositolo trifosfato (IP3)⁽²⁶⁾, e di attivare vie di segnalazione come ERK/MAPK che stimolano la proliferazione proteggono le cellule dall'apoptosi.

La S1P extracellulare esplica la sua azione legandosi a specifici recettori associati a proteine G. Esistono cinque sottotipi recettoriali (S1P1-5), le isoforme 1,2,3 sono ampiamente espresse in vari tessuti mentre le isoforme 4 e 5 si trovano nelle cellule, nel tessuto ematopoietico e nel sistema nervoso centrale⁽²⁷⁾. Il S1PR1 fa parte della famiglia dei GPCR e, in particolare, si associa solo alla proteina G inibitoria (Gi), mentre gli altri sottotipi recettoriali possono essere accoppiati a diverse proteine G. Anche questa classe recettoriale è regolata da GRK2^(28,29) e risulta desensibilizzata in corso di SC.

Le proteine Gi sono in grado di attivare la via di segnalazione sia di ERK che è implicata nella proliferazione cellulare, sia di PI3K e Akt che favoriscono la sopravvivenza e la crescita cellulare prevenendo l'apoptosi.

Recentemente è stato dimostrato che i recettori β_1 adrenergici vanno incontro a down-regulation in seguito a stimolazione con sfingosina1fosfato, mentre la downregulation del S1PR1 può essere indotta dall'isoproterenolo (ISO) (agonista β adrenergico)⁽²⁰⁾. Questo cross-talk recettoriale ha anche una rilevanza fisiologica in quanto questi recettori interagiscono e mostrano una reciproca downregulation in un modello sperimentale di scompenso cardiaco post-ischemico⁽²⁰⁾. L'interazione tra questi due sistemi recettoriali sembra essere orchestrata da GRK2 che è responsabile della cross-internalizzazione, in quanto regola il signaling di entrambi i recettori mediante fosforilazione. La concomitante down-regulation del S1PR1 e del recettore adrenergico β_1 sembra avere effetti negativi sul cuore, in particolare in corso di SC dove entrambi i sistemi recettoriali sono down-regolati.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare, mediante esperimenti sia in vitro che in vivo, gli effetti della terapia combinata con β -bloccante β_1 selettivo con S1P.

MATERIALI E METODI

Agonisti e inibitori

S1P è stato acquistato da Cayman Chemicals (26993-30-6 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); ISO è stato acquistato dalla Sigma (I6504 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Meto è stato acquistato da Sigma (M5391- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Culture cellulari

I cardiomiociti neonatali ventricolari di ratto (NRVM) sono stati isolati dai cuori di ratti anziani come precedentemente descritto ⁽³⁵⁾. Le cellule HEK293 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection e sono state mantenute in DMEM supplementato con 10% FBS, 200 mg/ml di L-glutamina, 100 unità/ml di penicillina e 100ug / ml di streptomicina.

Trasfezione cellulare

Le cellule HEK293 sono state trasfettate con 1 mg di cDNA codificante per S1PR1 coniugato con GFP (S1PR1-GFP) e con 1 mg di cDNA codificante per la WT β 1AR-Flag. Tutte le trasfezioni sono state eseguite utilizzando Lipofectamine® 2000 reattivo secondo le istruzioni del produttore (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Western Blot

Le cellule (NRVM) sono state lisate in RIPA buffer con inibitori delle fosfatasi (PhosSTOP-Roche, Indianapolis, IN, USA) e proteasi (Complete-Roche, Indianapolis, IN, USA). I campioni di proteine sono stati separati tramite SDS-PAGE al 4-20% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), e successivamente

trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (BioRad Laboratories, Richmond, California, Stati Uniti d'America). Dopo l'incubazione overnight con l' anticorpo primario a 4 °C, le proteine sono state rilevate mediante l'utilizzo di anticorpi secondari marcati con Alexa Fluor 680 (1: 5.000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) o IRDye 800CW (1: 5.000; Rockland Inc. Limerick , PA, USA), in seguito abbiamo visualizzato le proteine con un imager LI-COR infrarossi (Odissea, LI-COR, Lincoln, Nebraska, Stati Uniti d'America), e l'analisi densitometrica quantitativa è stata effettuata utilizzando la versione Odyssey 1.2 del software di imaging a raggi infrarossi. Sono stati valutati i livelli di proteina di: S1PR1 (Y080010, ABM.Inc, Richmond, BC, Canada; 1: 1.000), SphK1 (sc-48825, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; 1: 1.000) e GAPDH (SC-32233, 6C5, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, 1: 2.000).

Isolamento delle proteine di membrana

Le proteine di membrana sono state isolate da campioni di ventricolo sinistro e da NRVM utilizzando un buffer di omogeneizzazione (0,25 M di saccarosio, 10 mM Tris-HCl a pH 7.4), 1mM EDTA con gli inibitori della proteasi (cOmplete™-Roche, Indianapolis, IN, USA). Successivamente, i lisati sono stati sonicati e centrifugati per 15 min a 4 ° C a 2.000 rpm. Il surnatante è stato quindi centrifugato a 54.000 rpm per 30 minuti a 4 ° C. Il pellet è stato lavato due volte utilizzando il buffer di omogeneizzazione e centrifugato di nuovo alla stessa velocità. il pellet lavato è stato poi risospeso in PBS con 0,5% Triton-X 100. Il lisato finale è stato utilizzato per western blotting o conservato a -80 ° C.

Microscopia confocale

Le HEK293 che esprimono il S1PR1-GFP e β 1AR-Flag sono stati visualizzate come precedentemente descritto (20,35,31). Le cellule sono state lavate tre volte in PBS freddo e fissati in PFA al 3% per 10 min e permeabilizzate con Triton-X 100 al 0.2% per 2 minuti. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con BSA all' 1% per 30 minuti poi incubate con un anti-Flag (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, 1: 200) diluito in BSA all'1%. Successivamente, le cellule sono state incubate con il rispettivo anticorpo secondario: un anticorpo monoclonale mouse per rivelare il Flag-tag (Alexa Fluor 647, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1: 200). Per visualizzare le immagini abbiamo utilizzato un microscopio confocale a scansione Zeiss 510 laser e per analizzarle abbiamo utilizzato un software LSM 510.

Infarto del miocardio

I topi anestetizzati, sono stati intubati e ventilati meccanicamente; l'anestesia è stata mantenuta utilizzando una miscela di isoflurano al 2% (v/v) e ossigeno. L'infarto del miocardio è stato ottenuto mediante la legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore, come descritto in precedenza⁽³⁰⁾. Negli animali sham operati non è stata effettuata alcuna legatura, il topo è stato semplicemente esposto ad apertura del torace per creare in esso una situazione di stress chirurgico in modo tale da normalizzare i risultati. Sette giorni dopo l'induzione dell'infarto del miocardio, i topi sono stati divisi in modo casuale in uno dei seguenti gruppi: infartuati (MI), infartuati trattati con Metoprololo (MI + Meto), infartuati tratti con S1P (MI + S1P) e infartuati trattati con Metoprololo più S1P (MI + Meto / S1P).

Meto è stato somministrato in acqua (250 mg/Kg /die), mentre S1P è stato sciolto in PBS ed è stato continuamente infuso per via sottocutanea in topi tramite un mini pompa osmotica (Alzet, DURECT Co., Cupertino, USA).

Ecocardiografia

La valutazione ecocardiografica è stata eseguita al basale, a 7 giorni e a 4 settimane dall'operazione chirurgica utilizzato per valutare la struttura e la funzione cardiaca ed eseguito utilizzando il sistema VisualSonics Vevo 2100 VisualSonics, (Toronto, Ontario, Canada) come precedentemente descritto ⁽³⁵⁾.

Estrazione di RNA e Real Time PCR

L'RNA è stato isolato dai NRVM e da campioni di LV con Trizol (Life Technologies, USA) seguendo le istruzioni dell'azienda di produzione. La Real-time PCR è stata eseguita in duplicato su un sistema CFX96 Real-Time PCR (BioRad Lab USA.) utilizzando il SYBR green mix (BioRad Lab USA.) e primer specifici per:

CTGF

(FWD-5'-GGAAGACACATTTGGCCCAG-3';
Rev-5'-TAGGTGTCCGGATGCACTTT-3');

Col1

(FWD-5'-TAGAAAGAACCCTGCTCGCA-3';
Rev-5'-CGGCTGTATGAGTTCTTCGC-3')

Col3

(FWD-5'-ATGAGGAGCCACTAGACTGC-3';
Rev-5'GGTCACCATTTCTCCCAGGA-3').

I livelli di espressione di CTGF, COL1A2 e Col3 sono stati normalizzati per l'rRNA 18S. La specificità dei prodotti di PCR è stata confermata tramite curva di melting ed elettroforesi su gel.

Istologia

I campioni sono stati fissati in formaldeide al 4% ed inclusi in paraffina. Dopo deparaffinizzazione e riidratazione, sono state preparate sezioni di 5 micron di spessore, montate su vetrini e colorate con Sirius red in acido picrico al'1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per rilevare la fibrosi interstiziale. La percentuale di fibrosi è stata quantificata usando il software ImageJ. Tutte le sezioni sono state esaminate al microscopio e le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale.

Tunnel Staining

La colorazione con il terminal-transferase-mediated dUTP Nick End Labelling (TUNEL) è stata eseguita su sezioni di ventricolo sinistro (4 micron) fisse in paraffina o su cellule in coltura utilizzando un kit commerciale (Roche, Indianapolis, IN, USA). Il test è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore. Tutte le sezioni e le cellule sono state esaminate al microscopio e le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale. Sono stati acquisiti Cinque/sei campi per ogni campioni.

Test Elisa

I livelli circolanti della S1P sono stati misurati utilizzando un kit commerciale (Echelon), secondo le istruzioni del produttore. Sono stati raccolti circa 1 ml di sangue da topi e 5 ml da pazienti. Poi il sangue è stato centrifugato a 2.000 rpm a 15°C per 15 minuti e 25 µl di siero sono stati utilizzati per il test ELISA.

Analisi statistiche

I dati sono espressi come media \pm errore standard. La significatività statistica è stata determinata da un test t-Student o tramite il test esatto di Mann-Whitney quando il numero dei campioni era inferiore a 10. Per confronti multipli è stato effettuato il “test one-way ANOVA” seguita da analisi post hoc di “Bonferroni”. Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6. La significatività statistica è stata accettata con un valore di $p < 0,05$.

RISULTATI

Il metoprololo impedisce la downregulation del S1PR1 indotta dall'azione dell'ISO.

Dato che l'ISO, agonista dei β AR, è in grado di indurre la downregulation e la desensibilizzazione del S1PR1, bloccandone così il signaling cardioprotettivo, in un primo set di esperimenti siamo andati ad indagare se il blocco selettivo del β 1AR, ottenuto tramite l'utilizzo del metoprololo (MET) avesse effetti sulla reciproca downregulation β 1AR-S1PR1. A tale fine abbiamo inizialmente trattato i cardiomiociti neonatali ventricolari di ratto (NRVM) con ISO ed S1P. Entrambi i trattamenti hanno indotto una downregulation del S1PR1 (FIG.1A). Successivamente abbiamo pretrattato i NRVM con MET (10 μ M) per 30 minuti e poi stimolato con ISO (1 μ M) o con S1P (250nM) per altri 30 minuti. Abbiamo osservato che il pretrattamento con MET impediva l'internalizzazione del S1PR1 ISO-mediata. Tale pretrattamento non aveva però alcun effetto sull'internalizzazione indotta da S1P. Per confermare questo dato abbiamo ripetuto lo stesso set di esperimenti utilizzando come linea cellulare le HEK293 overesprimenti sia il recettore β 1AR-flaggato che S1PR1 marcato con GFP per verificare l'internalizzazione del S1PR1 (FIG. 1B). In linea con i dati ottenuti nei NRVM, al microscopio confocale abbiamo osservato che sia l'ISO che la S1P inducevano una massiva internalizzazione del S1PR1, mentre il METO preveniva la downregulation indotta dall'ISO (FIG. 1C). Complessivamente questi primi dati indicano che i β -bloccanti selettivi per il β 1AR prevengono la downregulation del S1PR1 β 1-dipendente in vitro.

Sia il METO che la S1P migliorano la contrattilità e prevengono il rimodellamento del ventricolo sinistro dopo infarto del miocardio.

Per supportare i dati in vitro abbiamo utilizzato un modello sperimentale di infarto del miocardio (MI) in quanto, nel cuore infartuato, sia il β 1AR che il S1PR1, sono down regolati⁽²⁰⁾.

Gli animali sono stati suddivisi in cinque gruppi di studio: sham-operati, infartuati trattati con placebo (controllo), infartuati trattati con MET (250mg/kg/g), infartuati trattati con S1P (10 μ M), infartuati trattati con MET+S1P. Tutte le misurazione ecocardiografiche sono state eseguite prima di indurre l'infarto del miocardio, a una e a quattro settimana dopo l'operazione chirurgica (FIG. 2A). Alla fine della quarta settimana le analisi ecocardiografiche hanno rilevato, come atteso, una forte riduzione della frazione di eiezione e una dilatazione del ventricolo sinistro nei topi infartuati di controllo rispetto a topi sham. Tuttavia, la somministrazione di MET migliorava la contrattilità e riduceva la dilatazione del ventricolo sinistro rispetto ai topo infartuati non trattati.

Allo stesso modo il trattamento con S1P aumentava la frazione di eiezione e riduceva il diametro del ventricolo sinistro rispetto al gruppo infartuato di controllo. Tuttavia l'entità di questi effetti era significativamente inferiore rispetto a quella associata al gruppo trattato con METO. Sebbene la co-somministrazione di MET e S1P era perfettamente compatibile non abbiamo osservato alcun effetto additivo tra queste due terapie, non avendo avuto nè un ulteriore miglioramento della frazione di eiezione né un ulteriore riduzione della dilatazione del ventricolo sinistro rispetto ai topi trattati o solo con METO o solo con S1P (FIG 2B). Come atteso l'azione di METO da solo o in combinazione con S1P riduce la frequenza cardiaca, fenomeno che non si osservava in seguito alla sola somministrazione della S1P (FIG. 2B).

L'infart size (misurate alla fine dello studio) era simile in tutti i gruppi di studio (FIG. 3A-B).

Effetti del METO e della S1P sulla fibrosi ed apoptosi cardiaca dopo infarto del miocardio.

L'apoptosi e la fibrosi cardiaca sono due meccanismi chiave del rimodellamento cardiaco^(32,33). Per tanto siamo andati a valutare l'effetto del METO e della S1P su questi due importanti aspetti del rimodellamento. Come atteso abbiamo osservato un aumento dell'apoptosi e un aumento della fibrosi nei topi infartuati di controllo rispetto al gruppo sham (FIG.3C-4). Parallelamente si è osservato anche un aumento dell'espressione dell'mRNA del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), del collagene di tipo 1 (COL 1) e del collagene di tipo 3 (COL3) (FIG.5). Il trattamento con METO risultava in una riduzione sia della fibrosi che dell'apoptosi cardiaca. Differentemente il trattamento con S1P mostrava effetti favorevoli solo sull'apoptosi ma non sulla fibrosi. Inoltre il trattamento combinato METO+S1P non induce ad un miglioramento ulteriore rispetto alla sola terapia con METO né sulla fibrosi né apoptosi cardiaca. L'assenza di un effetto additivo alla terapia con METO e S1P ci ha spinti ad approfondire questo aspetto. Siamo andati dunque a misurare i livelli sierici della S1P in tutti i nostri gruppi di studio. Abbiamo così osservato che i livelli di questo lipide erano fortemente ridotti dopo infarto del miocardio, (confrontando gli animali infartuati di controllo con gli sham). Il trattamento con METO era in grado di ripristinare i livelli fisiologici della S1P. Come atteso la somministrazione della S1P da sola o in combinazione con METO determinava una normalizzazione dei livelli circolanti della S1P (FIG.6A). E' importante sottolineare che il ripristino dei livelli circolanti della S1P era accompagnato dal ripristino dei livelli di sfingosinalchinasi, enzima responsabile della produzione della S1P. Infatti la

produzione del lipide era fortemente ridotta nei cuori dei topi sottoposti ad infarto del miocardio (FIG.6B).

Il trattamento cronico con METO incrementa i livelli circolanti della S1P in pazienti affetti da scompenso cardiaco.

Dal punto di vista clinico siamo andati a studiare se il trattamento con METO influenzava i livelli circolanti della S1P in pazienti scompensati. Abbiamo, pertanto studiato pazienti con scompenso cardiaco in terapia con β bloccanti β 1selettivi e pazienti scompensati non trattati con beta bloccante, ed in questi pazienti abbiamo eseguito un saggio ELISA per andare a valutare i livelli circolanti della S1P. Da questa indagine è emerso che i pazienti scompensati trattati con β bloccanti β 1selettivi avevano un significativo aumento dei livelli della S1P rispetto alla popolazione di pazienti scompensati ma non in terapia con β bloccante (FIG.7).

DISCUSSIONE

Una caratteristica peculiare dello scompenso cardiaco è rappresentata dalla perdita di densità dei β AR e dalla disfunzione del signaling dovuta all'iperattivazione di tali recettori da parte delle catecolamine⁽³⁶⁾. L'iperattivazione recettoriale induce un aumento dei livelli di GRK2 che a sua volta fosforila i recettori rendendoli disfunzionanti, clinicamente questo dato si traduce in una perdita della riserva inotropa^(34,35). L'inibizione di GRK2 è ben nota avere effetti terapeutici nell'insufficienza cardiaca, inducendo una resensibilizzazione dei recettori β adrenergici cardiaci ed un miglioramento della contrattilità basale^(13,15).

In corso di SC si assiste anche alla disfunzione del S1PR1 nonostante i livelli del suo ligando naturale, la S1P, siano ridotti. Tale sistema recettoriale, in condizioni fisiologiche induce una serie di effetti cardioprotettivi stimolando l'angiogenesi, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Il recettore appartiene alla famiglia dei GPCR, la stessa dei recettori β adrenergici ed è regolato anch'esso da GRK2. È stato dimostrato che i recettori β 1 adrenergici vanno incontro a downregulation in seguito a stimolazione con S1P, mentre la downregulation del S1PR1 può essere indotta dall'ISO (agonista β adrenergico). Tale interazione tra i due sistemi recettoriali, avviene anche in vivo, infatti in cuori di topi, i sistemi recettoriali mostrano una reciproca downregulation in seguito a stimolazione con ISO o con agonista del S1PR1. L'interazione è orchestrata da GRK2 che rappresenta la molecola chiave affinché si verifichi tale cross-internalizzazione, essendo in grado di regolare il signaling di entrambi i recettori mediante fosforilazione.

L'utilizzo dei β bloccanti rimane un approccio all'avanguardia per il trattamento dello scompenso cardiaco sia in fase acuta che cronica, indipendentemente dall'eziologia ischemica o non ischemica. Tale trattamento previene l'azione tossica delle catecolamine e l'ulteriore down-regulation dei β AR nel cuore scompensato, con conseguente riduzione della mortalità dovuta all'infarto del miocardio⁽³⁷⁾.

I β 1-bloccanti sono una classe eterogenea di farmaci, e alcuni di essi sembrano attenuare la progressione dello SC attraverso meccanismi di re-sensibilizzazione dei

β AR e di prevenzione dei danni indotti dalle catecolamine. Approfondire i meccanismi che sono alla base degli effetti benefici di questi farmaci potrebbe aiutare la personalizzazione della terapia nei pazienti con SC.

Nel presente lavoro, ci siamo concentrati sul β 1AR e S1PR1, due distinti GPCR altamente espressi nel cuore il cui cross-talk sembra avere importanti ripercussioni fisiopatologiche⁽²⁰⁾. Infatti, in un modello sperimentale di SC, dove è presente una significativa riduzione dei livelli di S1P e un aumento della secrezione di catecolamine, abbiamo scoperto che l'iperstimolazione dei β 1AR porta ad un danneggiamento del signaling di S1PR1⁽²⁰⁾. Pertanto, in questo studio, abbiamo testato se tra i vari effetti benefici dei β bloccanti β 1selettivi c'era anche il ripristino del signaling cardio protettivo della S1P. Gli esperimenti condotti in vitro hanno dimostrato che il pre-trattamento con METO dei cardiomiociti annullava la down-regulation del S1PR1 indotta dall'ISO, mentre non aveva nessun effetto sull'internalizzazione mediata da S1P, confermando così che l'attivazione del β 1AR potrebbe portare a una transattivazione del S1PR1. Ci siamo poi avvalsi di un modello sperimentale di scompenso cardiaco post ischemico. Abbiamo così osservato che il trattamento con METO migliora la funzione ventricolare sinistra e impedisce la progressione del rimodellamento maladattativo. Tale trattamento ripristina, almeno in parte, anche il signaling della S1P con la conseguente significativa riduzione dell'apoptosi e della fibrosi cardiaca. L'azione protettiva del trattamento farmacologico è stata confermata dal fatto che la combinazione di S1P+METO ha avuto effetti benefici simili a quelli esercitati dal solo METO ma non presentava effetti additivi. Abbiamo osservato che la somministrazione cronica del β bloccante β 1selettivo era sufficiente a ripristinare i livelli circolanti della S1P notevolmente ridotti dopo infarto del miocardio. L'aumento della biodisponibilità del lipide, nel siero dei topi infartuati trattati con METO, era accoppiato da un aumento

dell'espressione di SphK1 nel cuore. È da notare che l'aumento di S1P era sovrapponibile a quello ottenuto dalla terapia diretta con S1P nei topi post-MI. Nel loro insieme questi dati spiegano perché il trattamento combinato di S1P+METO non aveva effetti aggiuntivi o sinergici e indica che il signaling cardiaco di SpkK1/S1P è influenzato dallo stato di attivazione dei β 1AR. I nostri dati forniscono, non solo nuovi aspetti meccanicistici sugli effetti benefici di β 1-bloccanti, ma sottolineano anche le ripercussioni funzionali negative della perdita del signaling di S1P/S1PR1 a livello cardiaco in seguito all'iperstimolazione dei β 1AR dopo danno ischemico. In sostanza, il presente studio rappresenta un importante avanzamento dei nostri precedenti dati nei quali si mostrava che l'attivazione del signaling di S1PR1 aveva un effetto cardioprotettivo in seguito ad insulto ischemico^(38,39).

I nostri dati umani che mostrano un aumento dei livelli circolanti della S1P nei pazienti con SC trattati con β bloccante β 1 selettivo rispetto a pazienti non trattati con β bloccante, non solo supportano i dati ottenuti nelle cellule e negli animali da esperimento ma aprono alla possibilità che l'attivazione del signaling della S1P indotta dal β bloccante sia funzionale anche nell'uomo.

La scoperta di questo nuovo meccanismo di protezione innescato da β bloccanti β 1selettivi, come il METO, ci permette di fare un passo avanti nel comprendere meglio la fisiopatologia dello scompenso cardiaco e ci aiuta anche a spiegare perché questi farmaci sono così efficaci nel prevenire o attenuare la progressione della malattia cardiaca in un'ampia popolazione di pazienti, offrendo indizi iniziali per comprendere meglio il motivo per cui alcuni individui rispondono meno, o per niente a questo tipo di terapia.

FIGURE

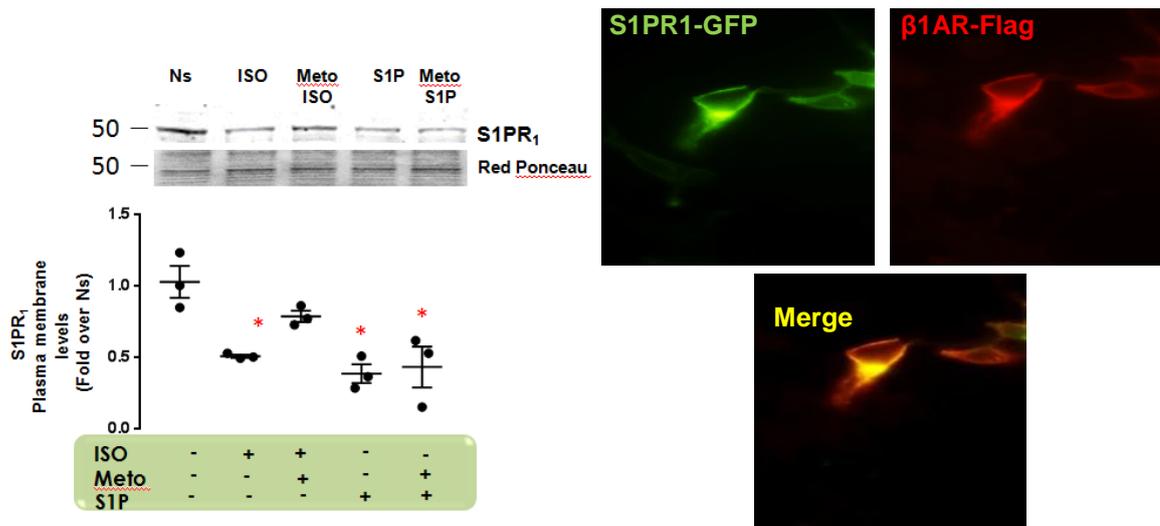


Figura 1A) Immunoblot rappresentativo (pannello sinistra) e analisi quantitativa densitometrica dei livelli di S1PR1 su membrane estratte da NRVM. Le cellule sono state stimulate con ISO (1 mM) o S1P (250 nM) per 30 minuti, cellule di controllo non sono state stimulate (Ns). Prima della stimolazione con ISO o S1P un gruppo di cellule è stato pre-trattato con METO (10 μ M) per 30 minuti. La colorazione Rosso Ponceau è stata utilizzata come normalizzatore. *, $P < 0,05$ vs Ns

Figura 1B) Nel pannello di destra viene mostrata la co-espressione di β 1AR-Flag (rosso) e S1PR1-GFP (verde) in cellule HEK293

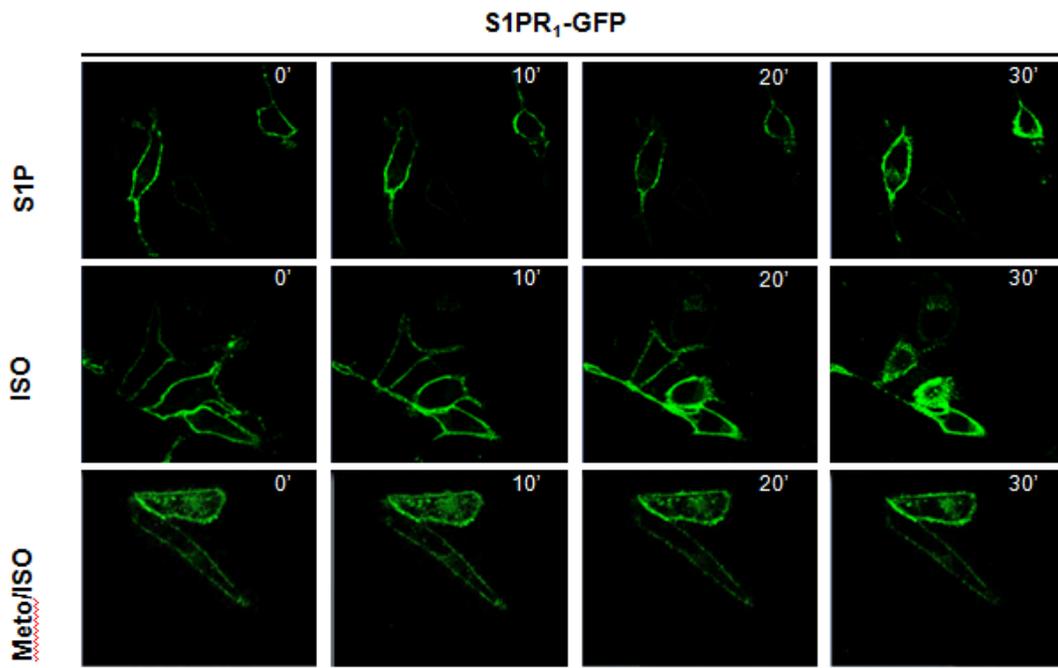


Figura 1C) Immagini rappresentative di immunofluorescenza (scala: 10 micron) di cellule HEK293 sulle quali è stato overespresso S1PR1-GFP (colore verde). S1PR1-GFP è internalizzato durante un time point da 0 a 30 minuti in cellule trattate con ISO (1 μ M) o

S1P (250 nM). Prima della stimolazione con ISO un gruppo di cellule è stato pre-trattato con METO (10 μ M) per 30 minuti.

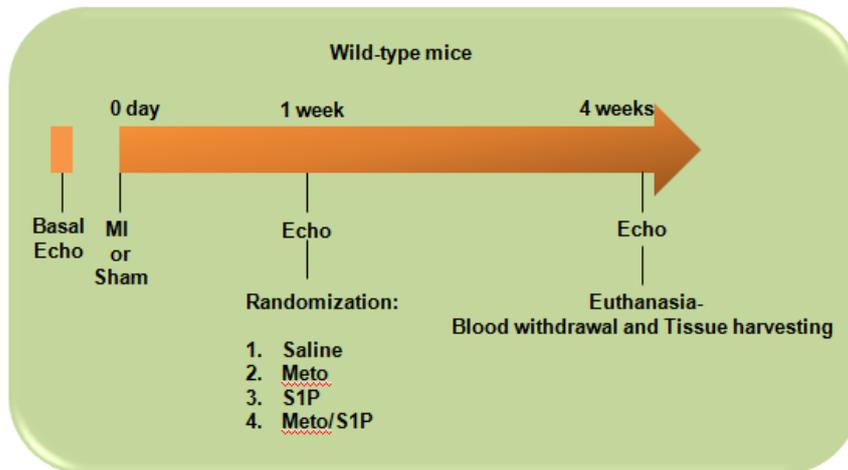


Figura 2A) Disegno dello studio. L'ecocardiografia basale è stata eseguita prima dell'induzione dell'infarto del miocardio e in seguito un gruppo di animali è stato sottoposto chirurgicamente ad infarto del miocardio. topi sham-operati sono stati utilizzati come controlli. Dopo 1 settimana dall'intervento, è stata ripetuta l'indagine ecocardiografica. I topi sono stati randomizzati alle varie braccia di trattamento per: MI (controlli), MI + Meto (250 mg / Kg / die), MI + S1P (10 μ M) e MI + Meto / S1P. Quattro settimane post-MI (3 settimane dopo il trattamento), è stata effettuata un'ultima ecocardiografia con successivo sacrificio degli animali per la raccolta dei tessuti.

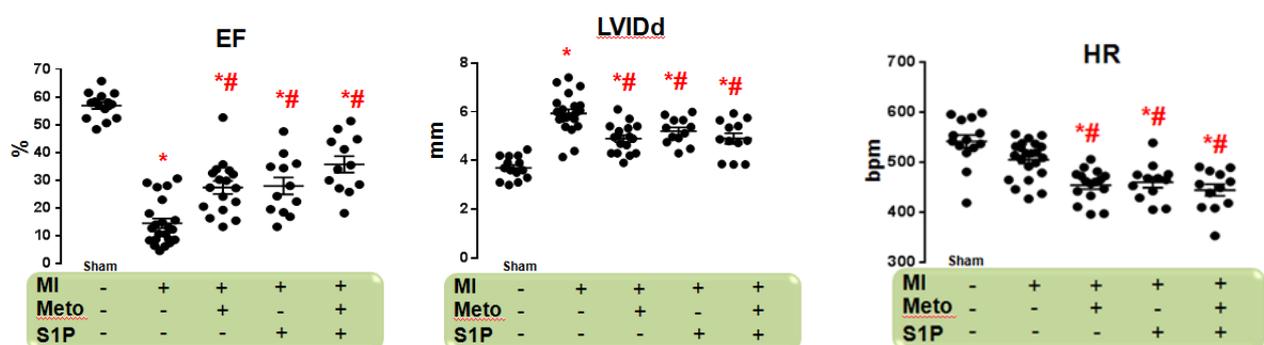


Figura 2B) Dot plot mostrano i dati dell'analisi ecocardiografica del Ventricolo Sinistro (LV). Al termine dello studio i parametri mostrati sono la Frazione di eiezione (EF,%) e il diametro interno in diastole del ventricolo sinistro (LVIDd). I gruppi di studio sono i seguenti: Sham, MI, MI + Meto, MI + S1P e MI + Meto / S1P.

*, P <0.05 vs Sham; #, P <0.05 vs MI.) Il dot plot di destra mostra l'analisi ecocardiografica della frequenza cardiaca (HR) di tutti i gruppi (Sham, MI, MI + Meto, MI + S1P e MI + Meto / S1P) *, P <0.05 vs Sham; #, P <0.05 vs MI.

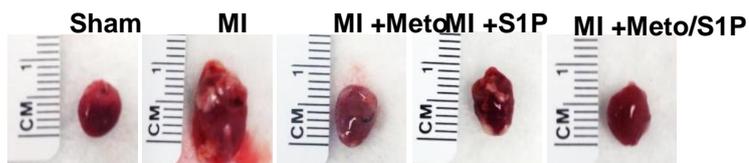


Figura 3A) Immagini rappresentative di cuori dei gruppi di studio Sham, MI, MI + Meto, MI + S1P e topi / S1P MI + Meto.

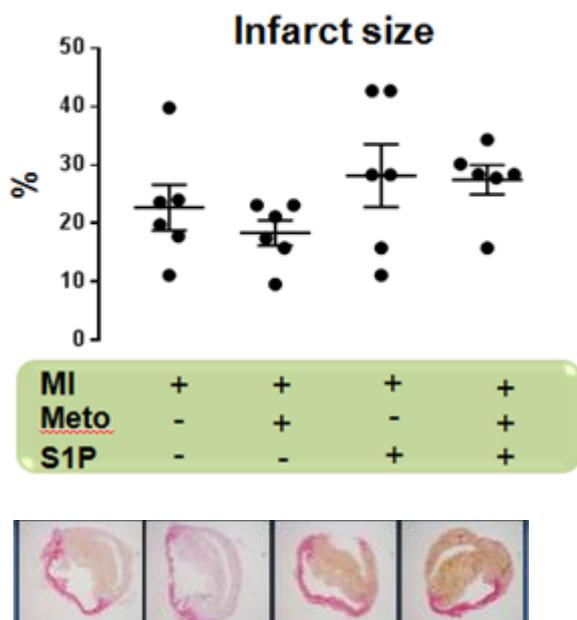


Figura 3B) Il dot plot mostra la percentuale di dimensioni dell'infarto (infarct size). Nel pannello in basso sono mostrate delle immagini rappresentative ottenute con la colorazione rossa picro-Sirius nei gruppi di studio MI, MI + Meto, MI + S1P e topi MI + Meto / S1P.

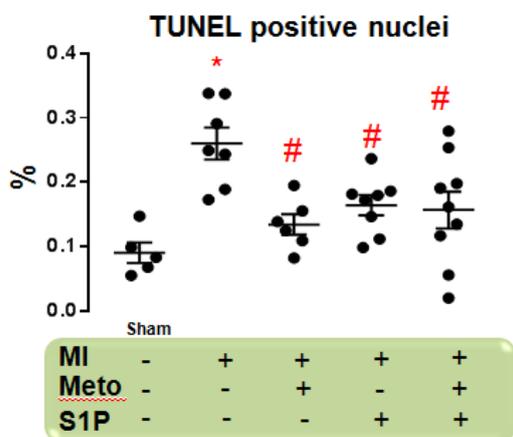


Figura 3C) Il Dot plot mostra la percentuale di apoptosi nei cuori dei gruppi Sham, MI, MI + Meto (250 mg /Kg /die), MI + S1P (10µM) e MI + Meto / S1P, ottenute tramite colorazione TUNEL. *, P <0.05 vs Sham; #, P <0.05 vs MI.

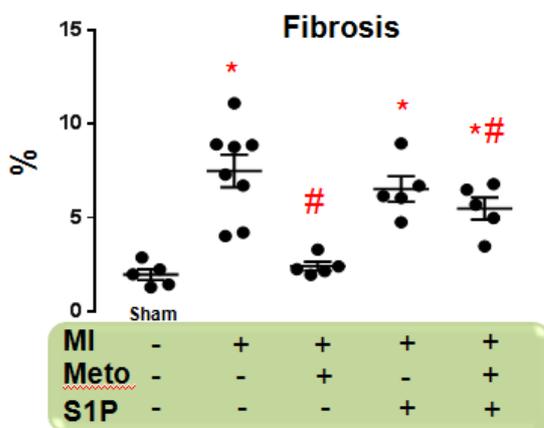
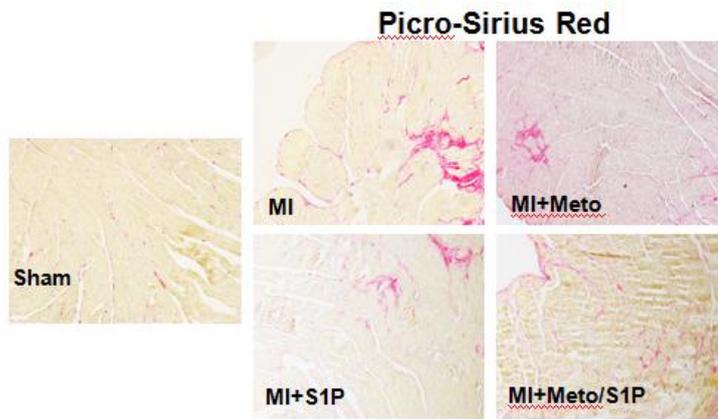


Figura 4) Immagini rappresentative della fibrosi cardiaca misurata tramite colorazione picro-Sirius Red (scale bar: 200 μ m) e i dati quantitativi che mostrano la percentuale di fibrosi cardiaca in tutti i gruppi di studio: Sham, MI, MI + Meto, MI + S1P e MI + Meto / S1P. *, $P < 0.05$ vs Sham; #, $P < 0.05$ vs MI.

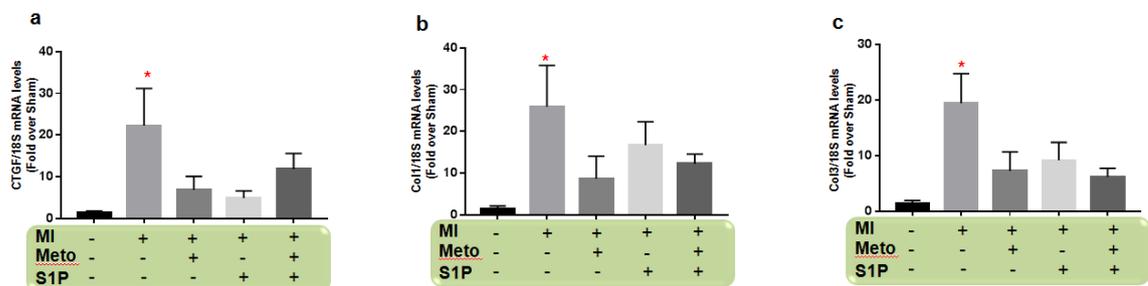


Figura 5) Grafico che mostra i risultati degli esperimenti di RT-PCR per misurare i livelli miocardici di mRNA di a) CTGF, b) Col1, c) Col3 in tutti i gruppi di studio: Sham, MI, MI + Meto, MI + S1P e MI + Meto / S1P. *, $P < 0.05$ vs Sham.

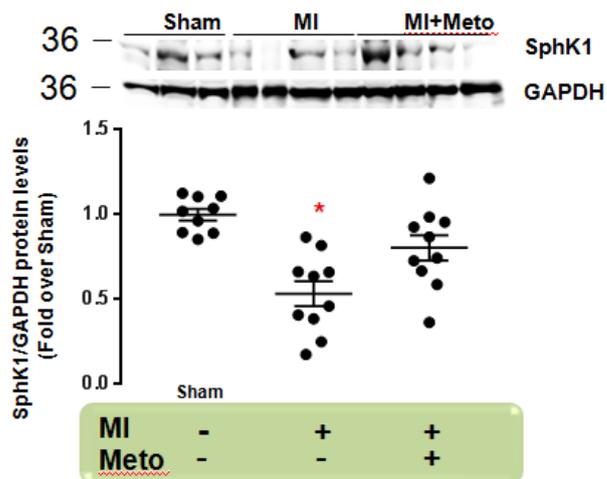


Figura 6A) Immunoblot rappresentativo e analisi quantitativa densitometrica di multipli esperimenti indipendenti per valutare i livelli della proteina SphK1 nei lisati cardiaci dei gruppi di studio. I livelli di proteine GAPDH sono stati usati come normalizzatore.
 *, P <0.05 vs Sham.

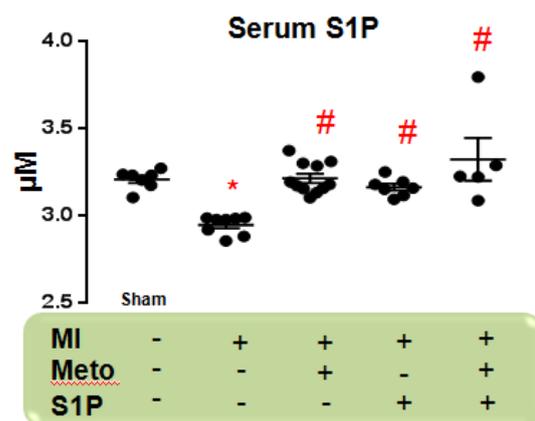


Figura 6B) livelli sierici di S1P determinati tramite test ELISA nei gruppi di studio (Sham, MI, MI + Meto, MI + S1P e MI + Meto / S1P). *, P <0.05 vs Sham; #, P <0.05 vs MI.

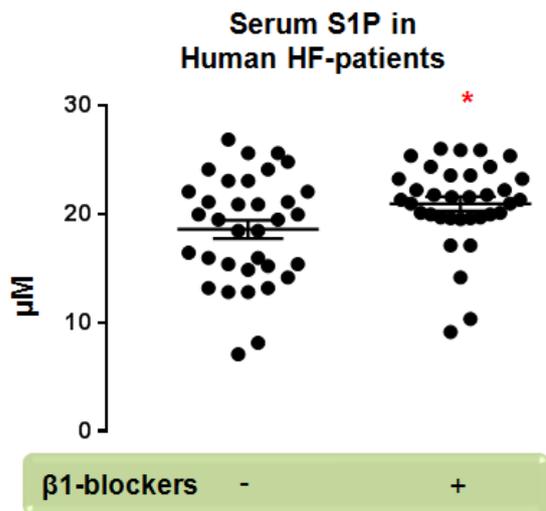


Figura 7) livelli sierici di S1P misurati mediante saggio ELISA in pazienti umani scompensati trattati e non con β bloccante β 1 selettivo. *, $P < 0.05$ vs HF.

BIBLIOGRAFIA

- 1) *Molecular mechanisms underlying adrenergic dysfunction in aging and heart failure: clinical and therapeutical implications.* G.D. Femminella, D. Leosco, L. Petraglia, R. Formisano, E. Attena, C. de Lucia, E. Allocca, E. Ratto, C. Silvestri, K. Komici, C. Zincarelli, D.F. Vitale, N. Ferrara. *G Gerontol* 2013;61:114-119.
- 2) *Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation.* Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. *Circulation* 2009;119:e391-e479.
- 3) *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012.* McMurray JV, Adamopoulos S, Anker SD, et al. *Eur Heart J* 2012;33:1787- 847.
- 4) *Epidemiology and risk factors for heart failure in the elderly.* Rengo F, Leosco D, Iacovoni A, Rengo G, Golino L, Borgia F, et al. *Ital Heart J* 2004 Dec;5 Suppl 10:9S-16S.
- 5) *GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure.* Rengo G, Lympelopoulos A, Leosco D, et al. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:785-92.
- 6) *Adrenal GRK2 up-regulation mediates sympathetic overdrive in heart failure.* Lympelopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, et al. *Nat Med* 2007;13:315-23.
- 7) *Future G proteincoupled receptor targets for treatment of heart failure.* Rengo G, Lympelopoulos A, Koch WJ *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2009;11:328-38.
- 8) *Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors.* Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Annu Rev Biochem* 1991;60:653-88.

- 9) *Identification of viable myocardium in patients with chronic coronary artery disease using rest-redistribution thallium-201 tomography: optimal image analysis.* Pace L, Perrone Filardi P, Mainenti PP, et al. J Nucl Med 1998;39:1869-74.
- 10) *Assessment of cardiac sympathetic activity by MIBG imaging in patients with heart failure: a clinical appraisal.* Perrone-Filardi P, Paolillo S, Dellegrottaglie S, et al. Heart 2011;97:1828-33.
- 11) *Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice.* Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:7059-64
- 12) *Seven-transmembrane receptors.* Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:639-50.
- 13) *beta-adrenergic receptor kinase in heart failure.* Petrofski JA, Koch WJ. The. J Mol Cell Cardiol 2003;35:1167-74.
- 14) *Pharmacological treatment of chronic heart failure.* Adorisio R, DeLuca L, Rossi J, Gheorghiadu M. Heart Fail Rev 2006; 11:109-23.
- 15) *Future g protein-coupled receptor targets for treatment of heart failure.* Rengo G, Lymperopoulos A, Koch WJ. Curr Treat Options Cardiovasc Med 2009;11:328-38.
- 16) *Beta-adrenoceptors in cardiac disease* Brodde OE. Pharmacol Ther 1993;60:405-30.
- 17) *International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors.* Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, et al. Pharmacol Rev 1994;46:121-36.
- 18) *Gene therapy in heart failure* Vinge LE, Raake PW, Koch WJ.. Circ Res 2008; 102:1458-70.

- 19) *The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase.* Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. J Biol Chem 1993;268:8256-60.
- 20) *β 1-adrenergic receptor and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) reciprocal downregulation influences cardiac hypertrophic response and progression to heart failure: protective role of S1PR1 cardiac gene therapy.* Cannavo, A., Rengo, G., Liccardo, D. et al Circulation.;128:1612-22 (2013).
- 21) *Sphingosine 1-phosphate signaling contributes to cardiac inflammation, dysfunction, and remodeling following myocardial infarction* Zhang, F., Xia, Y., Yan, W. et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol.;310:H250-61 (2016).
- 22) *Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling* Pitson SM, Xia P, Leclercq TM, Moretti PAB, Zebol JR, Lynn HE, Wattenberg BW, Vadas MA. (2005). J Exp Med, 201: 49-54.
- 23) *Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival.* Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S. (1999) J Cell Biol, 147: 545-58.
- 24) *SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism.* Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Milstien S, Spiegel S. (2005) J Biol Chem, 280: 37118-12.
- 25) *Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulumresident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol.* Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y. (2004) Biochem Biophys Res Commun, 325: 338-43.

- 26) *Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium* Ghosh TK, Bian J, Gill DL. (1994). *J Biol Chem*, 269: 22628-35.
- 27) *Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology* Brinkmann V. (2007). *Pharmacol Ther*, 115: 84-105.
- 28) *Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia.* Zhang J et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3150-8;2007.
- 29) *S1P1 receptor localization confers selectivity for Gi-mediated cAMP and contractile responses.* Means CK et al. *J Biol Chem* 283:11954-63;2008.
- 30) *Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart.* Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. *Cardiovasc Res* 2008 May 1;78(2):385-394.
- 31) *β 3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes.* García-Prieto, J., García-Ruiz, J.M., Sanz-Rosa, D., et al. *Basic Res Cardiol.*;109(4):422 (2014).
- 32) *Prothymosin alpha protects cardiomyocytes against ischemia-induced apoptosis via preservation of Akt activation.* Cannavo, A., Rengo, G., Liccardo, D., et al *Apoptosis.*;18:1252-61 (2013).
- 33) *Myocardial pathology induced by aldosterone is dependent on non-canonical activities of G protein-coupled receptor kinases.* Cannavo, A., Liccardo, D., Eguchi, A. et al. *Nat Commun.*;7:10877 (2012).

- 34) *Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice.* Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J Jr, Lefkowitz RJ, Koch WJ.
- 35) *GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure.* Rengo G, Lymperopoulos A, Leosco D, Koch WJ.
- 36) *Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts.* Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB.
- 37) *Targeting cardiac β -adrenergic signaling via GRK2 inhibition for heart failure therapy* Cannavo, A., Liccardo, D., Koch, W.J.. *Front Physiol.*;4:264 (2013).
- 38) *Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia* Zhang, J., Honbo, N., Goetzl, E.J., et al.. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;293: H3150-3158 (2007).
- 39) *Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium.* *Circulation.* Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., et al.;103:1649-55 (2001).