

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE
XVII Ciclo – 2002 - 2006
COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE**

TESI DI DOTTORATO

**L’anione nitrossile migliora la funzione cardiaca
mediante la sua azione diretta sul Calcium cycling del
reticolo sarcoplasmatico**

**TUTORE
Chiar.mo
Prof. Massimo Chiariello**

**CANDIDATO
Dr. Carlo Gabriele Tocchetti**

INTRODUZIONE

Una popolazione di circa 5 milioni di persone negli Stati Uniti è affetta da scompenso cardiaco congestizio, con una mortalità annua di circa il 20%. Più della metà dei pazienti presenta funzione cardiaca depressa, e mentre un miglioramento della funzione di pompa porta senz'altro a grandissimi benefici, come mostrato dai casi di trapianto cardiaco, lo sviluppo di un'adeguata terapia farmacologica risulta spesso problematica¹. La maggior parte degli agenti inotropi ad oggi agiscono mediante l'attivazione del pathway adenosina monofosfato ciclico-proteina kinasi A (cAMP/PKA) per stimolare l'ingresso di Calcio e quindi aumentare la contrattilità. Purtroppo questo approccio non è adeguatamente efficace nello scompenso, a causa della down-regolazione del signaling β -adrenergico², ed in situazioni di cronicità questo tipo di trattamento è legato a tossicità e ad incremento della mortalità.

Recentemente abbiamo riportato che i donatori di anione nitrossile (HNO), il prodotto della riduzione di un elettrone dell'ossido nitrico (NO)³, posseggono nuovi effetti cardiovascolari differenti da quelli dell'NO. In cuori intatti *in vivo* il Sale di Angeli (AS), un donatore di HNO, migliora la funzione in maniera del tutto indipendente dal β -blocco o dalla β -stimolazione, e senza alcuna modifica dei livelli di guanosina-monofosfato ciclico (cGMP)^{4:5}. Diversamente dalla maggior parte degli agenti inotropi oggi in uso, i donatori di HNO hanno effetti simili in cuori normali e scompensati⁵. La loro capacità combinata di aumentare la funzione cardiaca e al contempo di ridurre le pressioni venose ne ha suggerito una potenziale utilità come trattamento dello scompenso cardiaco.

I meccanismi sottostanti l'azione cardiaca dell'HNO restano finora sconosciuti. HNO può stimolare canali ionici quali il recettore di NMDA^{6;7}. Recenti dati suggeriscono che può anche attivare il recettore della rianodina nella muscolatura scheletrica⁸. Oggi si crede che HNO possa reagire con specifici gruppi tiolici⁹, in particolare con quelli carichi negativamente. Questi tioli sono presenti in numerose proteine coinvolte nel cycling del Calcio, quali i canali di rilascio del Calcio del reticolo sarcoplasmatico (SR)¹⁰, la pompa del Calcio dell'SR (SERCA2a), e possibilmente il fosfolambano (PLB)¹¹. Quindi abbiamo ipotizzato che HNO abbia un'azione diretta sulle cellule muscolari cardiache, e direttamente possa migliorare la contrazione e il rilasciamento mediante un aumento del *cycling* del Calcio. I nostri risultati supportano un miglioramento della ricaptazione del Calcio e del suo rilascio da parte dell'SR, indipendente dai pathways di cAMP/PKA o cGMP/PKG, ma piuttosto da mettere in relazione con modifiche dei tioli intracellulari.

MATERIALI E METODI

Reagenti

Il Sale di Angeli (AS, $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) ci è stato generosamente fornito dal laboratorio del dr. Jon M. Fukuto (UCLA). Le soluzioni stock di AS (100 mM) sono state preparate al momento degli esperimenti dissolvendo AS in NaOH 10 mM. DEA/NO è stato acquistato dalla Calbiochem (San Diego, CA, USA). Indo 1-AM è stato acquistato dalla Molecular Probes Inc-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). ODQ è stato ottenuto dalla Tocris (Ellisville, MO, USA). Tutti gli altri composti sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA; Milano, Italia).

Misura della contrattilità e dei transienti del Calcio in cardiomiociti isolati da ventricoli di topo

Topi wild type di 2-4 mesi di età sono stati anestetizzati con pentobarbital sodico intraperitoneale (100 mg/kg/ip). Il cuore veniva subito rimosso dal torace e l'aorta perfusa in modo retrogrado a pressione costante (100 cm H_2O circa) a 37°C per circa 3 minuti con una soluzione priva di calcio contenente (in mM): 120 NaCl, 5.4 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 20 NaHCO_3 , 1.6 MgCl_2 ; e glucosio (1 mg/ml), 2,3-butanedione monoxime (BDM, 1 mg/ml), e taurina (0.628 mg/ml), cui è stata continuamente aggiunta una soluzione gassosa di 95% O_2 -5% CO_2 . Al fine di ridurre contaminazione batterica e virale, il sistema per la perfusione è stato sempre lavato con etanolo 70% e poi lavato 3 volte con acqua distillata sterile prima di incannulare l'aorta. La digestione enzimatica

veniva iniziata aggiungendo collagenasi di tipo 2 (Worthington Biochemical Co., 299 U/mg) 0.9 mg/ml e proteasi tipo XIV (Sigma Chemical Co.) 0.05 mg/ml alla soluzione di perfusione. Dopo circa 9-10 minuti complessivi veniva rimosso il ventricolo sinistro e sminuzzato in piccoli pezzi nella stessa soluzione enzimatica. Tale soluzione contenente i miociti veniva filtrata in un filtro da 150 μm e centrifugata a 500 rpm per 30 sec. Il pellet veniva subito risospeso nella soluzione di isolamento con l'aggiunta di 125 μM Ca^{2+} e albumina di siero bovino (5 mg/ml). Per circa 10 minuti i miociti precipitavano per gravità e, rimosso il sovrantante, venivano risospesi in soluzione Tyrode (in mM: 140 NaCl, 10 HEPES, 1 MgCl_2 , 5 KCl; e glucosio, 1 mg/ml) con l'aggiunta di 250 μM Ca^{2+} . Al termine dei vari lavaggi il pellet di miociti veniva risospeso in 1 mM Ca^{2+} . Tutte le soluzioni sono state preparate con pH 7.4.

Le cellule venivano visualizzate in una camera di stimolazione (Warner instruments) mediante un microscopio a fluorescenza (Diaphot 200; Nikon Inc.) durante *field stimulation* (0.5 Hz). I miociti inclusi nello studio sono stati selezionati in base a criteri morfologici e funzionali ben condificati¹⁴. Le cellule sono state trattate con Tyrode, ed ogni intervento farmacologico prevedeva sempre lo stesso buffer. La lunghezza del sarcomero è stata misurata in tempo reale tramite la trasformata di Fourier (IonOptix MyoCam, CCCD100M). L'ampiezza della contrazione è espressa come % della lunghezza del sarcomero a riposo. La cinetica della contrazione è stata quantificata misurando il tempo al picco dell'accorciamento e il tempo dal picco al 50% del rilasciamento.

Modifiche nella corrente intracellulare del calcio (Ca_i) sono state misurate tramite la fluorescenza dell'indicatore di Calcio fluo-4-AM (Molecular Probes 20 μ M per 30 min), e i transienti del Calcio sono stati misurati durante field stimulation (0.5 Hz) nella soluzione di per fusione mediante microscopia a scansione laser confocale (LSM 510, Carl Zeiss).

Misurazione dei transienti del calcio e del contenuto sarcoplasmatico di calcio in cardiomiociti ventricolari di ratto

Abbiamo isolato cardiomiociti ventricolari di ratto secondo il protocollo seguente. L'enzima usato per la dissociazione del tessuto consisteva di Liberase Blendzyme 3 o 4 (13-20 unità/cuore), a volte con aggiunta di 5-10 unità di Dispasi II (entrambe acquistate da Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). I miociti ventricolari sono stati quindi piastrati su camerette di perfusione, il cui fondo di vetro era stato precedentemente trattato con laminina di topo (Invitrogen, Carlsbad, CA). La soluzione standard Tyrode usata in tutti gli esperimenti conteneva (in mM): NaCl 140, KCl 4, $MgCl_2$ 1, glucosio 10, HEPES 5, e $CaCl_2$ 1, pH 7.4. Quindi abbiamo applicato ai cardiomiociti Indo-1/AM 6 μ M per 25 minuti, e successivamente li abbiamo perfusi per almeno 30 minuti per permettere la de-esterificazione del marcatore. Alcune cellule sono state pre-trattate con AS 0.5 mM (1 mM in alcuni esperimenti con la caffeina), lavate e poi trattate con Indo 1/AM. La concentrazione della soluzione stock di AS è stata verificata mediante assorbanza a 250 nm. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a temperatura ambiente (23-25°C) con *field stimulation*. I transienti del Calcio sono stati registrati con Clampex 8.0 e i dati analizzati con Clampfit.

Imaging mediante l'utilizzo di FRET

Colture primarie di cardiomiociti ventricolari da ratti Sprague-Dawley di 1-3 gg. (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) sono state preparate secondo Dostal et al.¹³. L'analisi mediante FRET è stata eseguita come descritto in precedenza¹⁴.

Sonde fluorescenti per la microscopia *two photon* e acquisizione dell'immagine

Il marcatore fluorescente cationico potenziometrico tetrametilrodamina metil estere (TMRM) è stato usato per monitorare modifiche in $\Delta\Psi_m$ come descritto in precedenza¹⁵. La produzione di GSB, l'addotto fluorescente del glutatione, dalla reazione del monoclorobimane (MCB, permeabile nella cellula) col glutatione ridotto (GSH), catalizzata dalla glutatione S-transferasi, è stata usata per misurare i livelli intracellulari di glutatione. La piastra contenente i cardiomiociti veniva equilibrata a 37°C senza restrizioni all'accesso di ossigeno atmosferico su un microscopio Nikon E600FN. Poi, le cellule venivano incubate con TMRM 100 nM e MCB 50 μ M per almeno 20 min. Le immagini sono state registrate usando un microscopio a scansione laser (Bio-Rad MRC-1024MP) con eccitazione a 740 nm (Tsunami Ti:Sa laser, Spectra-Physics). L'emissione rossa di TMRE veniva acquisita a 605 ± 25 nm, e la fluorescenza blu del GSB veniva acquisita alla sua massima emissione (480 nm). Le immagini sono state analizzate offline mediante ImageJ software (Wayne Rasband, NIH).

Visualizzazione di Ca^{2+} sparks spontanei e misura della loro frequenza

Cardiomiociti isolati da topo sono stati incubati con l'indicatore del calcio fluo-4/AM (Molecular Probes, 20 μM per 30 minuti). Immagini confocali sono state acquisite usando un microscopio confocale a scansione laser (LSMS10, Carl Zeiss), con un obiettivo ad immersione in olio Zeiss Plan-Neofluor 40 x (NA=1.3). Il fluo 4/AM veniva eccitato da un laser ad argon (488 nm), e la fluorescenza veniva misurata a >505 nm. Le immagini sono state prese con la linea di scansione parallela alla *long axis* del miocita. Ogni immagine consisteva di 512 scansioni lineari ottenute ad intervalli di 1.92 ms, con 512 pixels a 0.10 μm di separazione. Per l'analisi digitale dell'immagine ci siamo avvalsi di programmi scritti in Interactive Data Language (IDL) e un algoritmo modificato per la visualizzazione degli *sparks*¹⁶.

Single channel recording dei RyR2 in bilayers lipidici planari

La registrazione di singoli RyR2 in bilayers lipidici planari è stata effettuata come descritto¹⁷. In breve, un bilayer fosfolipidico di PE:PS (dissolto 1:1 in n-decano a 20 mg/ml) è stato formato attraverso una apertura di circa 300 μm di diametro. La camera *cis* (900 μl) era il lato del controllo del voltaggio connesso alla testa di un amplificatore Axopatch 200 A, mentre la camera *trans* (800 μl) era virtualmente messa a terra. Entrambe le camere sono state inizialmente riempite con 50 mM di cesio metansulfonato e 10 mM di Tris/hepes pH 7.2. Dopo la formazione del bilayer, il cesio metansulfonato veniva innalzato a 300 mM dal lato *cis* e venivano aggiunti tra i 100 e i 200 μg di vescicole di SR cardiaco di topo. Dopo la visualizzazione delle aperture del canale, il cesio nella camera *trans* veniva innalzato a 300 mM per annullare il gradiente chimico. I

dati del singolo canale sono stati raccolti a voltaggi fissi (-30 mV) per 2-5 min. L'attività del canale è stata registrata con una acquisizione a 16-bit basata su VCR. I segnali sono stati analizzati con un filtro Bessel a 8 poli e ad una frequenza di campionamento di 1.5-2 kHz. I dati sono stati acquisiti e analizzati con software e hardware Axon Instruments (pClamp v8.0, interfaccia Digidata 200 AD/DA).

Misura dell'assorbimento di Calcio ATP-dipendente da parte di vescicole di SR da cuori di topo

Vescicole microsomiali cardiache crude contenente SR frammentato sono state preparate come descritto in precedenza¹⁸. Cuori da topi C57BL/6 sono stati immersi in una soluzione salina 0.9% in ghiaccio, ripuliti da tessuto atriale e connettivo, e pesati. Una volta sminuzzati completamente, sono stati omogeneizzati in NaHCO₃ 10mM con un omogenizzatore Polytron, e le vescicole di SR sono state separate da miofilamenti, mitocondri e membrane nucleari da differenti centrifugazioni a 8500 e 45000g. Le vescicole di SR, risospese in saccarosio 0.25 M + MOPS 10mM, pH 7.0, sono state congelate e conservate in azoto liquido prima di essere utilizzate. Venti minuti prima della misurazione del riassorbimento di Calcio, le vescicole cardiache di SR (ad una concentrazione di 1 mg/ml) sono state esposte a AS 250 µM. Dopo la diluizione delle membrane di SR in buffer per la misura del riassorbimento di Calcio, sono state visualizzate modifiche nella cinetica dovute a AS/HNO con un ritardo di circa 15 minuti, e queste restavano in effetto per tutta la durata dell'esperimento (45-60 min). Le vescicole con le membrane di SR (0.4 mg/ml), risospese in un mezzo contenente 100mM KCl, 1mM MgCl₂, 50µM di arsenazo III, 5mM di sodio azide, e 20 mM di MOPS, pH

7.4, sono state mescolate ad un egual volume di mezzo identico contenente 1 mM Na_2ATP a 24°C in un apparato *stopped-flow* (Applied Photophysics, Ltd.). La concentrazione totale di calcio nel mezzo di riassorbimento era di $0.5 \mu\text{M}$, portando ad una concentrazione di calcio libero in equilibrio col complesso Calcio-arsenazo III di $0.2 \mu\text{M}$ ($K_A=3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). La modifica della concentrazione di calcio e' stata monitorizzata ad intervalli di 0.1 sec usando uno spettrofotometro a singolo raggio UV-VIS (AVIV, Modello 14DS), con un settaggio monocromatico a 650 nm. La modifica del segnale dovuta alla dispersione di luce delle vescicole e' stata valutata da misure separate condotte sotto identiche condizioni alla lunghezza d'onda isosbastica di 693 nm. L'aggiunta di AS ($250 \mu\text{M}$) al mezzo di incubazione non aveva alcun effetto sulle caratteristiche dello spettro di arsenazo III o sulla sua risposta al calcio. I parametri cinetici e termodinamici della ricaptazione di calcio sono stati valutati adattando i segnali *stopped-flow* a delle funzioni mono e bi-esponenziali, utilizzando la regressione non-lineare.

RISULTATI

Per valutare se HNO abbia una azione diretta sulla funzione miocitaria, abbiamo esposto miociti isolati di topo adulto (C57BL/6) al Sale di Angeli (AS, da 10^{-6} a 10^{-3} M), d'accordo con le concentrazioni utilizzate *in vivo*^{4,5}. La contrattilità miocitaria aumentava in maniera dose-dipendente (Fig 1A, 1B), raggiungendo circa il 100% a 0.5 e 1 mM ($p < 0.00005$). Il tasso di rilasciamento dei miociti anche migliorava del 10-20% (Fig 1C, $p < 0.05$). Queste modifiche raggiungevano un plateau dopo circa 10-15 min, ed erano reversibili per concentrazioni non superiori a 500 μ M fino a 15 minuti dopo la sospensione dell'AS (Fig 1A). Contrariamente all'HNO, DEA/NO [sodio 2-(N, N-dietilamino)-diazenolato-2-ossido] induceva una leggera depressione inotropica a basse dosi, e minime modifiche a dosi più alte (Fig 1B).

A pH fisiologico, AS si decompone in HNO e nitriti. Quindi abbiamo testato se i nitriti possano contribuire agli effetti osservati. La decomposizione di AS in un mezzo identico e alla stessa temperatura rispetto agli studi coi miociti portava ad un 25% di nitriti dopo circa 1000 sec (16 min). Identici risultati si ottenevano con AS 0.1-1 mM. Questo significava che al momento degli studi funzionali erano presenti 25-250 μ M di NO_2^- . Comunque, un'esposizione diretta dei miociti a questi livelli di NO_2^- (e a dosi maggiori e minori) non aveva effetti sull'accorciamento dei sarcomeri.

Gli agenti che allo stesso tempo incrementano la contrattilità miocitaria e accelerano il rilasciamento sono spesso legati all'aumento di cAMP intracellulare, e alla successiva attivazione della proteina chinasi A (PKA)¹⁹. Per valutare se questo sia il caso anche per AS/HNO, abbiamo realizzato una visualizzazione in tempo reale del cAMP su cardiomiociti neonatali di ratto trasfettati con una sonda FRET per il cAMP¹⁴. Dopo

esposizione ad AS 1mM, il segnale FRET era immodificato ($0.3\% \pm 0.1\%$, $n=23$, $p=NS$), mentre la successiva applicazione di norepinefrina ($10 \mu\text{M}$) o dell'inibitore delle fosfodiesterasi IBMX ($100 \mu\text{M}$) aumentava tale segnale del 12% ($p < 10^{-6}$, Fig 2A). Il pre-trattamento dei cardiomiociti di topo adulto con l'inibitore di PKA Rp-CPT-cAMPs ($100 \mu\text{M}$, Fig 2B) non alterava l'incremento inotropo dell'HNO.

La stimolazione della contrattilità dovuta a AS/HNO era anche indipendente da cGMP/PKG. La pre-incubazione con ODQ ($10 \mu\text{M} \times 30 \text{ min}$), l'inibitore della guanilato ciclasi solubile (sGC), preveniva l'effetto inotropo negativo indotto da DEA/NO, ma non aveva alcun impatto sull'effetto di AS/HNO. Il pre-trattamento con un inibitore di PKG (Rp-8Br-cGMPs, $10 \mu\text{M}$) preveniva l'effetto inotropo negativo di DEA/NO, convertendolo in una modesta risposta positiva, mentre non aveva alcun impatto sull'inotropismo HNO-mediato (Fig 2C).

I donatori di NO esercitano un effetto negativo sulla stimolazione β -adrenergica *in vitro* ed *in vivo*²⁰, mentre in precedenza avevamo trovato l'opposto per i donatori di HNO in cuori intatti⁵. Abbiamo confermato questa osservazione anche nei cardiomiociti. Le cellule trattate con isoproterenolo (ISO, 2.5 nM) mostravano un incremento del $100 \pm 27\%$ a livello dell'accorciamento dei sarcomeri ($p=0.002$, $n=30$). Questo effetto veniva marcatamente attenuato dalla co-infusione di DEA/NO 0.25 mM , mentre la co-infusione di AS 0.5 mM raddoppiava l'effetto dell'ISO da solo (Fig 2D). Quindi HNO agisce in parallelo al *pathway* β -adrenergico.

HNO ha come bersaglio i gruppi tiolici presenti su determinate proteine⁹. Per testare quale interazione potrebbe essere alla base dell'effetto contrattile a livello cellulare, abbiamo aumentato i tioli intracellulari incubando i miociti con un estere

derivato dal GSH permeabile alle cellule (GSH ethyl ester in soluzione Tyrode, 4 mM per 3 ore). Abbiamo ipotizzato che arricchendo il contenuto intracellulare di tioli possa aumentare la probabilità di intrappolare HNO prima che questo raggiunga critici residui tiolici relativi all'accoppiamento elettro-meccanico. Il pre-trattamento con GSH aumentava i livelli intracellulari di tioli ($6 \pm 1.5\%$ a.u. in fluorescenza vs controlli, $n=40$, $p < 0.05$), determinati mediante il saggio di fluorescenza della produzione del GSH S-bimane, visualizzabile mediante microscopia *two photon*. Le cellule pre-trattate sono state poi esposte ad AS 0.5 mM, e la risposta contrattile era sostanzialmente diminuita ($57 \pm 19\%$; $p=0.02$ vs base, $p=0.05$ vs AS da solo; Fig 2E). Questi dati supportano il ruolo dei gruppi SH come bersaglio di HNO per la sua funzione inotropica.

Di seguito, abbiamo esaminato il Ca^{2+} *cycling* in cardiomiociti di topo e ratto adulti. Le cellule sono state esposte prima ad AS per 5-10 min, quindi lavate e incubate con Indo-1 o Fluo-4 per 20 min. Il pre-trattamento con AS era necessario perché il composto reagiva con gli indicatori di calcio, alterandone le proprietà fluorescenti. Nel topo, l'ampiezza del transiente del calcio visualizzato con immagine a scansione confocale incrementava del 40% con AS 0.5 mM ($n=27$, $p < 0.001$; Fig 3A e 3B), il tempo al picco era prolungato (Fig 3C), mentre il tempo di decadimento era accorciato (Fig 3D). La fluorescenza basale (F_0) era immutata dal pre-trattamento con AS (Fig 3E). Risultati simili sono stati ottenuti in miociti di ratto (con Indo-1) per l'ampiezza del transiente del calcio (Fig 4A e 4B) e del tempo di decadimento (Fig 4C). L'aumento in ampiezza non era accompagnato da un aumento dei livelli diastolici di calcio (ratio $405/485 = 0.239 \pm 0.006$ (controlli) vs 0.243 ± 0.008 (AS); $p = \text{NS}$; Fig 3A e 4A). Una applicazione rapida di caffeina (10 mM per 10 sec) rilascia improvvisamente tutto il

calcio dall'SR, e il conseguente decadimento dell'influsso di calcio $[Ca^{2+}]_i$ è mediato sostanzialmente dallo scambiatore Na/Ca (NCX). L'ampiezza e il tau del decadimento del transiente del calcio indotto dalla caffeina indicano che HNO non altera il contenuto sarcoplasmatico di calcio (Fig 4F) o la funzione dell'NCX ($\tau = 2.0 \pm 0.4$ vs 2.2 ± 0.3 s, Fig 4E). Questi risultati indicano che l'aumento del declino dell'influsso di calcio era dovuto ad aumento dell'attività Ca^{2+} -ATPasica dell'SR, e che l'aumento dell'ampiezza del transiente del calcio in seguito ad HNO era dovuto ad un aumento della frazione di rilascio di Ca^{2+} dall'SR (Fig 4D) senza aumento del contenuto sarcoplasmatico di calcio (Fig 4F).

Considerato dunque l'aumento della ricaptazione e del rilascio di Ca^{2+} dall'SR, senza un incremento netto del contenuto totale di Ca^{2+} nell'SR, abbiamo quindi esaminato gli effetti diretti di HNO sul canale di rilascio di Ca^{2+} sensibile alla rianodina (RyR2). In miociti intatti, AS aumentava la probabilità di apertura, come evidenziato dall'aumento della frequenza dei Ca^{2+} *sparks*, valutato mediante microscopia confocale a scansione lineare (Fig 5A), in modo dose-dipendente (Fig 5B; un incremento di 18 volte nella frequenza degli *sparks* con AS 1 mM, $n=10-24$, $p<0.001$). Per contro, DEA/NO non aveva effetto sulla generazione degli *sparks* (Fig 5C). L'ampiezza del singolo *spark*, il tempo di picco, e l'ampiezza spaziale non erano alterati da AS, indicando quindi un effetto primario sull'attivazione dei RyR2. La deplezione dei depositi di Ca^{2+} dell'SR mediante esposizione alla thapsigargin (10 μ M, 30 min) o alla rianodina (10 μ M) aboliva i Ca^{2+} *sparks* in cellule di controllo e in cellule trattate con AS 0.5 mM. L'effetto dell'HNO sui Ca^{2+} *sparks* era redox sensibile. La preincubazione delle cellule con GSH (4 mM per 3 ore) prima dell'infusione di AS preveniva l'aumento della frequenza degli

sparks (Fig 5D), indicando che l'aumento della concentrazione intracellulare di tioli era efficace nel bloccare l'azione di HNO.

Per testare ulteriormente se HNO interagisce con le proteine formanti il complesso del RyR2 per incrementarne la probabilità di apertura, sono stati espressi RyR2 purificati ricostituiti in bilayers lipidici planari, e l'attività è stata registrata allo *steady-state* con o senza AS. La soluzione *cis* (citoplasmica) conteneva 10 μM di calcio attivante e le registrazioni venivano effettuate tenendo il potenziale positivo a 30 mV. AS (da 0.1 a 1 mM) produceva un rapido incremento dose-dipendente nella frequenza e nel tempo medio di apertura degli eventi, senza alterare la conduttanza unitaria del canale (Fig 5E). La probabilità di apertura del canale (P_o) aumentava da una media di 0.16 ± 0.03 senza AS a 0.46 ± 0.07 quando AS 0.3 mM veniva aggiunto al lato citoplasmatico del canale ($n=4$). Questo effetto era reversibile dopo addizione di DTT 2 mM (0.11 ± 0.04). Questi dati sono suggestivi di un'interazione diretta HNO-RyR2, probabilmente dovuta ad una reazione reversibile con i gruppi tiolici nella proteina.

Abbiamo quindi valutato se HNO incrementi direttamente il riassorbimento di Ca^{2+} nell'SR, studiando i suoi effetti su vescicole di membrane di SR isolate da cuori di topo. Vescicole microsomiali crude di SR sono state incubate con AS 250 μM prima della misura del riassorbimento di Ca^{2+} ATP-dipendente con mescolamento *stopped flow* a 24°C. È stato usato Arsenazo III per monitorizzare la rimozione del calcio dal compartimento extra-vescicolare. Il *time-course* dell'accumulo di Ca^{2+} monitorizzato a 650 nm era bifasico (Fig 6A), riflettendo probabilmente differenti gruppi di vescicole associate alle frazioni pesanti e leggere di SR²¹. L'incubazione con AS 250 μM per 15 min aumentava l'attività della fase rapida (0.047 vs 0.64 s^{-1} ; $p < 0.05$) e della fase lenta

(0.069 vs 0.136 s⁻¹; p<0.0005; n=6) del riassorbimento (Fig 6B, Tabella 1), senza effetto sul riassorbimento totale del calcio (Tabella 1). Il riassorbimento di calcio veniva abolito dalla pre-incubazione con thapsigargin 10 μM, mentre esposizione allo ionoforo A23187 (5 μg/mg di proteine di SR) diminuiva il riassorbimento di Ca²⁺ di circa il 50% (Fig 6E). I segnali *stopped flow* acquisiti alla lunghezza isosbastica di 693 nm erano anche essi bifasici (Fig 6C e 6D). Il decremento dell'assorbanza a 693 nm, rappresentante della diffusione della luminosità associata al sequestro di Ca²⁺ e al rigonfiamento osmotico delle vescicole, veniva sottratto al segnale a 650 nm prima dell'analisi. Dopo la sottrazione, l'accumulo di Ca²⁺ mostrava un *time-course* monofasico, col 90% del riassorbimento che si verificava nei primi 20 secondi (Fig 6F e 6G). Esposizione ad AS incrementava la costante del tasso di riassorbimento di Ca²⁺ del 104% sulla base di un'analisi esponenziale del segnale a 650-693 nm (0.1563 s⁻¹ vs 0.3204 s⁻¹; p<0.0005; n=6; Fig 6H, pannello di sinistra). La differenza tra il riassorbimento di calcio totale all'equilibrio prima e dopo esposizione ad AS non era significativa (Fig 6H, pannello a destra; p=NS; n=6), indicando che l'attivazione da parte di HNO incrementa l'efficienza catalitica della pompa del calcio senza modificarne l'efficienza termodinamica. L'aumento della funzione di SERCA2a, e l'inalterato riassorbimento netto di calcio nell'SR in questi esperimenti sono consistenti con l'accelerazione del decadimento dei transienti del calcio che si ottiene con AS nei miociti isolati (Fig 4C-F e Fig 5).

DISCUSSIONE

In condizioni fisiologiche, la forza contrattile cardiaca e il tasso di decadimento della forza sono aumentati da meccanismi associati al *pathway* cAMP/PKA che portano all'aumento dell'influsso di calcio per stimolare i miofilamenti, e al riassorbimento di calcio per facilitare il rilasciamento. Purtroppo un'alterazione del signaling cAMP/PKA può contribuire al rimodellamento e allo scompenso. Terapie che agiscono su questi pathways si sono in genere mostrate poco efficaci per un trattamento a lungo termine dello scompenso cardiaco. Con questo studio dimostriamo che HNO agisce con un meccanismo molto diverso sulla cellula muscolare cardiaca, aumentando la contrattilità e accelerando il rilasciamento in maniera indipendente da cAMP/PKA, ma piuttosto tramite un aumento del transiente del calcio dovuto ad un incremento sia del riassorbimento che del rilascio di calcio dall'SR. Questi effetti, che in un certo modo si controbilanciano, probabilmente spiegano il mancato aumento del calcio diastolico, e il contenuto non variato di calcio nell'SR. Per di più questo effetto è redox sensibile, e reversibile, ed è molto dissimile dagli effetti prodotti da NO.

Un aumento del rilascio di calcio dall'SR senza alterazione del contenuto totale di calcio sarcoplasmatico suggerisce che HNO agisce modificando la funzione dei RyR2, piuttosto che inducendo una perdita dovuta all'incremento dei depositi di calcio dell'SR²². Questi effetti sono piuttosto diversi da quelli esercitati da donatori di NO, dai β -agonisti e dalla caffeina. Alcuni studi hanno riportato che i donatori di NO stimolano^{23;24} o inibiscono i RyR2²⁵, ma non alterano la frequenza di base dei Ca^{2+} sparks²⁶. I β -agonisti stimolano la probabilità di apertura dei RyR2 tramite fosforilazione PKA-mediata²⁷, e la frequenza dei Ca^{2+} sparks può aumentare a causa di questo

meccanismo e di un'ulteriore fosforilazione del PLB, che incrementa il contenuto di Ca^{2+} nell'SR²⁸. In topi transgenici sovra-esprimenti il recettore β_2 umano, i Ca^{2+} sparks sono più grandi e più frequenti rispetto alle cellule di animali non-transgenici, nonostante un contenuto basale di calcio citosolico e nell'SR simile ai controlli²⁸. Questo suggerisce che l'attivazione β -mediata del *pathway* cAMP/PKA non solo altera la sensibilità dei RyR2 al calcio, ma anche l'inattivazione dei RyR2 legata al rilascio di calcio²⁹, modificando potenzialmente la stabilità dell'SR. In contrasto, HNO aumenta la frequenza degli sparks senza alterare le caratteristiche individuali degli stessi, e senza un impatto negativo sulla loro stabilità. L'azione di HNO sui RyR2 è anche differente da quella della caffeina, che aumenta la frequenza del rilascio spontaneo di calcio, un effetto che persiste perfino dopo discontinuazione del composto³⁰, portando ad una significativa caduta del contenuto sarcoplasmatico di Ca^{2+} .

L'effetto proprio dell'HNO sui RyR2 può essere dovuto alla sua chimica tiofilica^{3,9}. Gli effetti di HNO potevano essere rapidamente revertiti da equivalenti riducenti, suggerendo una competizione simultanea per l'HNO tra tioli liberi e residui tiolici sui RyR2. I dati che mostrano come un incremento del 6% nel GSH intracellulare inibisca il 57% dell'azione dell'HNO sull'accorciamento dei sarcomeri suggeriscono che HNO ha per bersaglio residui tiolici selettivi piuttosto che una interazione generalizzata⁹. Per l'identificazione di questi specifici bersagli c'è bisogno di un'analisi sub-proteomica delle modifiche delle cisteine, con mutagenesi dei siti specifici per confermare l'importanza funzionale di particolari siti-bersaglio. L'azione selettiva tiofilica di HNO^3 potrebbe suggerire che questa è una molecola coinvolta nel signaling *in vivo*^{31,32}, sebbene

al momento questa sia una pura speculazione, giacché oggi non sono disponibili metodi per misurarne la sintesi *in vivo*.

Per sostenere l'inotropismo cardiaco in presenza dell'aumento del rilascio frazionale di calcio dai RyR2 in presenza di HNO, la velocità del riassorbimento di calcio nell'SR dovrebbe aumentare durante il rilasciamento³³. Quest'ultimo processo è rallentato nello scompenso, e i recenti tentativi di stimolarlo mediante modulazione genica (ad es. manipolazione del PLB^{34;35} o aumento dell'espressione di SERCA2a³⁶) evidenziano l'interesse terapeutico di questi meccanismi. L'aumento del riassorbimento di calcio da parte di HNO sia nei miociti che nelle vescicole di SR isolate supportano un'azione diretta su SERCA2a. Il meccanismo resta sconosciuto, ma potrebbe coinvolgere un'azione diretta di HNO su SERCA2a, o un rilascio dell'inibizione che il PLB esercita sullo stesso SERCA2a³⁷.

Sebbene non abbiamo valutato se HNO alteri la fosforilazione di varie proteine coinvolte nell'accoppiamento elettro-meccanico (RyR2, PLB) come meccanismo inotropo, molte evidenze suggeriscono che tali modifiche sono improbabili e/o separate dalla modulazione di HNO. Innanzi tutto, l'inibizione di PKG e PKA non aveva alcun effetto sull'inotropismo di HNO. Punto secondo, HNO non alterava i livelli di cAMP. Punto terzo, gli effetti di HNO erano rapidamente reversibili con l'aggiunta di agenti riducenti, e tale fenomeno non sarebbe stato osservato se il meccanismo principale fosse stato la fosforilazione. Punto quarto, gli studi sui RyR2 sono stati effettuati in membrane ricostituite senza chinasi a stimolare la fosforilazione, e le risposte in questo preparato erano particolarmente in concordanza con quelle osservate coi Ca^{2+} *sparks* nelle cellule

intatte. Infine, la risposta inotropica di HNO nei miociti era additiva a quella dei β -agonisti, suggerendo che HNO e i β -agonisti agiscono su pathways paralleli.

I nostri dati forniscono importanti sviluppi rispetto ai nostri precedenti studi su animali *in vivo*^{4,5} che per primi avevano dimostrato come i donatori di HNO possano migliorare la funzione cardiaca nello scompenso, indipendentemente dal β -blocco, e in modo additivo rispetto ai β -agonisti. Studi iniziali avevano dapprima suggerito un possibile ruolo di HNO nello stimolare il rilascio di *calcitonin gene related peptide* (CGRP)⁴, ma studi successivi hanno confermato questo che questo effetto era simpatico-stimolatore, inibito dai β -bloccanti, e non mediato da effetti diretti del CGRP sul miocita³⁸. Questi nostri dati rivelano un meccanismo diretto all'aumento del Ca^{2+} *cycling* dei cardiomiociti. Però le modifiche del Ca^{2+} *handling* non sono i soli meccanismi responsabili dell'effetto inotropo, dal momento che altri recenti dati provenienti dal nostro laboratorio hanno mostrato che HNO è anche capace di aumentare la forza massima attivata dal calcio senza alterarne i livelli diastolici in trabecole isolate di ratto. Pertanto, HNO può anche agire come un sensibilizzatore del miofilamento al calcio a livelli sistolici di calcio³⁹. Questo fattore sembrerebbe agire in concerto con l'aumento del Ca^{2+} *cycling* osservato in questo nostro studio.

Dobbiamo annotare alcune limitazioni di questo studio. Innanzi tutto, abbiamo studiato cellule da cuori sani, e gli effetti osservati potrebbero non necessariamente essere gli stessi per i miociti da cuori scompensati. Comunque, in precedenti studi *in vivo*, abbiamo visto la stessa efficacia dell'HNO sulla funzione cardiaca in cuori normali e scompensati⁵. In secondo luogo, non abbiamo esaminato l'accoppiamento tra la corrente dei canali del calcio di tipo L e l'attivazione dei RyR2, né abbiamo determinato se lo

stesso canale di tipo L sia alterato da HNO. Comunque, l'aumento del riassorbimento e del rilascio di Ca^{2+} da parte dell'SR è stato dimostrato nell'SR isolato e nei RyR2 ricostituiti, modelli in cui l'interazione tra canali di tipo L e SR non sarebbe rilevante. Riguardo tale attivazione, l'assenza di modifiche nel calcio estruso tramite NCX e nel contenuto totale di Ca^{2+} nell'SR suggerisce che la corrente attraverso il canale di tipo L non venga alterata.

Questi nostri dati suggeriscono un interessante potenziale per l'uso dei donatori di HNO nel trattamento della funzione cardiaca depressa, particolarmente alla luce del precedente lavoro che ha confermato l'efficacia di HNO anche *in vivo* in modelli di scompenso in grandi animali. Mentre un agente che incrementasse il rilascio di Ca^{2+} dall'SR potrebbe far preoccupare per la sua potenziale pro-aritmogenicità⁴⁰, la maniera con cui HNO ottiene il suo effetto è assolutamente nuovo, e tali potrebbero essere le sue conseguenze. E' importante sottolineare come i nostri dati mostrano un aumento del rilascio frazionale di calcio, controbilanciato da un miglioramento del riassorbimento, cosicché il contenuto di Ca^{2+} nell'SR e i livelli diastolici di Ca^{2+} siano immutati.

In futuro ci sarà senz'altro bisogno di esaminare le risposte di HNO in miociti da cuori scompensati, di studi di esposizione a più lungo termine, e infine di studi clinici per provare l'efficacia di HNO e la sua sicurezza per il trattamento di cuori scompensati, ma i nostri dati costituiscono un buon punto di partenza per tali ulteriori investigazioni.

Table 1. Effetti di AS/HNO sui parametri della cinetica del riassorbimento di Ca^{2+} da parte di vescicole cardiache di SR

650 nm	(-AS)	(+AS)	p
k_1	0.4717 ± 0.0419	0.6402 ± 0.0898	<0.05
k_2	0.0696 ± 0.078	0.1362 ± 0.0120	<0.0005 (n=6)
A_1+A_2	0.006395 ± 0.0005	0.005696 ± 0.0006	N.S.
693 nm	(-AS)	(+AS)	p
k_1	0.4669 ± 0.0167	0.6326 ± 0.0418	<0.05 (n=4)
k_2	0.0398 ± 0.0020	0.0753 ± 0.0070	0.011
A_1+A_2	0.0051 ± 0.0004	0.0046 ± 0.0008	N.S.
650-693 nm	(-AS)	(+AS)	p
K	0.1563 ± 0.0204	0.3204 ± 0.0244	<.0005 (n=6)
A	0.00257 ± 0.0003	0.00202 ± 0.0004	N.S.

k_1 = costante del tasso della fase rapida di riassorbimento di Ca^{2+} ; k_2 = costante del tasso della fase lenta del riassorbimento di Ca^{2+} ; A_1 = ampiezza della fase rapida del riassorbimento di Ca^{2+} ; A_2 = ampiezza della fase lenta del riassorbimento di Ca^{2+} ; k e A = costante e ampiezza del riassorbimento di Ca^{2+} per il segnale a 650-693 nm, rispettivamente.

LEGGENDE DELLE FIGURE

Fig.1. HNO migliora la contrattilità e il rilasciamento in cardiomiociti ventricolari isolati.

A) Effetto di AS/HNO sull'accorciamento dei sarcomeri in cardiomiociti isolati di topo.

B) Effetto dose-risposta di AS/HNO e DEA/NO sull'accorciamento dei sarcomeri. *: $p < 0.001$ vs controlli; †: $p < 0.01$ vs controlli; ‡: $p < 0.00005$ vs controlli. **C)** Effetti di AS/HNO sul rilasciamento dei miociti (tempo al 50% del rilasciamento). \$: $p < 0.05$ vs controlli.

Fig.2. Gli effetti di AS/HNO sulla funzione miocitaria sono indipendenti da cAMP e cGMP, ma modulati dal contenuto intra-cellulare di tioli.

A) Sinistra: Cinetica dello sviluppo di cAMP registrato mediante metodica FRET in un singolo cardiomiocita neonatale di ratto (vedi inserto) dopo infusione di AS (1mM), seguito da norepinefrina (NE, 10 μ M), ed infine dopo infusione dell'inibitore ad ampio spettro delle fosfodiesterasi IBMX (100 μ M). Il grafico mostra la media del segnale FRET sull'intera cellula. I dati riasuntivi sono mostrati a destra. *: $p < 10^{-6}$ vs controlli. **B)** L'inibizione di PKA con 100 μ M Rp-CPT-cAMPs attenua l'azione inotropica di ISO, ma non quella di HNO. **C)** L'inibizione della GC (con ODQ) o di PKG (con Rp-8Br-cGMPs) attenua gli effetti di NO, ma non quelli di HNO. **D)** NO ha un impatto negativo sulla contrattilità allo stesso tempo aumentata da uno stimolo β -adrenergico, mentre gli effetti di HNO sono additivi. **E)** Il pre-trattamento con l'estere del GSH permeabile nelle cellule riduce l'effetto inotropo elicitato da AS/HNO. †: $p < 0.05$ vs controlli.

Fig.3. Aumento dei transienti del Ca^{2+} da parte di HNO in cardiomiociti isolati di topo.

A) Immagini confocali a scansione lineare dei transienti del Ca^{2+} in cardiomiociti murini di controllo e trattati con AS (0.5 mM). Le cellule sono state incubate con l'indicatore di Ca^{2+} fluo-4 (20 μM per 20 min). Risultati medi dell'ampiezza del transiente del Ca^{2+} ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$, **B**), del tempo di incremento (tempo al picco, **C**), del tempo dal picco al 50% del rilasciamento (T50, **D**), e della fluorescenza basale (**E**); n=27-28 cellule da 3 cuori per ciascun punto. *: $p < 0.001$ vs controlli; † $p < 0.01$ vs controlli; ‡ $p < 0.05$ vs controlli.

Fig.4. Aumento dei transienti del Ca^{2+} e della frazione di rilascio del Ca^{2+} dall'SR in cardiomiociti di ratto.

A) Tracce rappresentative, transienti del Ca^{2+} in miociti di ratto non trattati (Ctr) e pre-trattati con AS (AS). **B,C**) Risultati medi per l'ampiezza dei transienti del Ca^{2+} e il τ del decadimento dei transienti del Ca^{2+} (n=30-31 cellule da 4 cuori). **D-F**) Contenuto di Ca^{2+} dell'SR misurato mediante applicazione rapida di Caffèina 10 mM (n=11-14 cellule da 6 cuori). **D**, Ampiezza del singolo battito diviso per l'ampiezza del battito elicito dalla Caffèina espresso in % (frazione di rilascio di Ca^{2+} dall'SR). **E**) Flussi di rimozione di Ca^{2+} secondo la formula $1/\tau_{\text{twitch}} = 1/\tau_{\text{NCX}} + 1/\tau_{\text{SR}}$; τ_{NCX} è il τ del decadimento di Ca^{2+} in presenza di Caffèina; il contributo relativo dell'SR aumentava dall'87.6% in Ctr al 91.3% in cellule pre-trattate con AS, e il contributo relativo dell'NCX diminuiva dal 12.4% all'8.7%, rispettivamente. Il contenuto totale dell'SR era invariato (**F**). Tutti i dati rappresentano media \pm SEM; *: $p < 0.05$ vs Ctr.

Fig.5. AS/HNO aumenta la funzione dei RyR2 in maniera redox-sensibile.

A) Immagini a scansione lineare dei Ca^{2+} sparks in cardiomiociti di topo in condizioni di controllo e a concentrazioni crescenti di AS/HNO. **B)** Effetto dose-dipendente di AS/HNO sulla frequenza dei Ca^{2+} sparks (* $p < 0.001$ vs controlli). **C)** Effetto neutro di DEA/NO sulla frequenza dei Ca^{2+} sparks. **D)** Il pre-trattamento con GSH abolisce l'incremento della frequenza dei Ca^{2+} sparks indotto da AS. **E)** Tracce rappresentative di registrazioni *single channel* in RyR2 di cardiomiociti di topo. RyR2 cardiaci sono stati ricostituiti in bilayers lipidici planari e attivati da $3 \mu\text{M}$ (cis) di Ca^{2+} citosolico. Dall'alto verso il basso, registrazioni di RyR2 in condizioni di controllo e dopo esposizioni a concentrazioni crescenti di AS/HNO, che mostrano un incremento dose-dipendente di P_o a dosi crescenti di AS/HNO. Nella traccia in basso, l'incremento indotto da AS nella probabilità di apertura dei RyR2 viene quasi completamente revertito dall'aggiunta dell'agente riducente DTT dal lato citosolico.

Fig.6. HNO aumenta il riassorbimento di Ca^{2+} ATP-dipendente in vescicole di SR di topo.

A & B) Registrazioni rappresentative *stopped-flow* di accumulo attivo di Ca^{2+} monitorizzato da arsenazo III a 650 nm in assenza (-AS) e in presenza di $250 \mu\text{M}$ AS (+AS). La deflessione verso il basso del segnale rappresenta il riassorbimento di Ca^{2+} dal mezzo extravescicolare. La lettura dell'assorbanza iniziale sull'asse delle y è stata normalizzata a zero sottraendo l'assorbanza a $t = 0$ per ogni lettura dell'assorbanza. La curva solida passante per i vari punti rappresenta la migliore approssimazione dei dati ad una equazione bi-esponenziale. **C & D)** Modifiche rappresentative nella dispersione della

luce misurate mediante mescolamento alla lunghezza d'onda isosbestica di 693 nm in assenza (-AS) e in presenza di 250 μM AS (+AS). Le condizioni della reazione erano identiche a quelle in A & B sopra. **E)** Registrazioni rappresentative *stopped-flow* dell'accumulo attivo di Ca^{2+} monitorato a 650 nm in assenza (controllo) e in presenza dello ionoforo di Ca^{2+} (A23187). **F & G)** *Time-course* rappresentativo del riassorbimento attivo di Ca^{2+} in vescicole di SR determinato dalla sottrazione di una traccia *stopped-flow* acquisita a 693 nm da una traccia acquisita a 650 nm ($\Delta\text{Abs } 650\text{nm} - \Delta\text{Abs } 693 \text{ nm}$). Le tracce sono state normalizzate, come descritto sopra, prima della sottrazione. **H)** Effetti di AS/HNO sull'attività (pannello di sinistra) del riassorbimento di Ca^{2+} (s^{-1}) e (pannello a destra) riassorbimento totale di Ca^{2+} valutato dalla sottrazione del segnale 650-693 nm.

BIBLIOGRAFIA

1. Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res*. 2003;92:350-358.
2. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005;111:2837-2849.
3. Fukuto JM, Bartberger MD, Dutton AS, Paolucci N, Wink DA, Houk KN. The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): the neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:790-801.
4. Paolucci N, Saavedra WF, Miranda KM, Martignani C, Isoda T, Hare JM, Espey MG, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA, Kass DA. Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10463-10468.
5. Paolucci N, Katori T, Champion HC, St John ME, Miranda KM, Fukuto JM, Wink DA, Kass DA. Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5537-5542.
6. Colton CA, Gbadegesin M, Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Vicini S. Nitroxyl anion regulation of the NMDA receptor. *J Neurochem*. 2001;78:1126-1134.

7. Kim WK, Choi YB, Rayudu PV, Das P, Asaad W, Arnelle DR, Stamler JS, Lipton SA. Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻. *Neuron*. 1999;24:461-469.
8. Cheong E, Tumbev V, Abramson J, Salama G, Stoyanovsky DA. Nitroxyl triggers Ca²⁺ release from skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum by oxidizing ryanodine receptors. *Cell Calcium*. 2005;37:87-96.
9. Lopez BE, Rodriguez CE, Pribadi M, Cook NM, Shinyashiki M, Fukuto JM. Inhibition of yeast glycolysis by nitroxyl (HNO): mechanism of HNO toxicity and implications to HNO biology. *Arch Biochem Biophys*. 2005;442:140-148.
10. Hidalgo C, Donoso P, Carrasco MA. The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors? *IUBMB Life*. 2005;57:315-322.
11. Chen Z, Akin BL, Stokes DL, Jones LR. Cross-linking of C-terminal residues of phospholamban to the Ca²⁺ pump of cardiac sarcoplasmic reticulum to probe spatial and functional interactions within the transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2006;281:14163-14172.
12. Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolocci N, Houslay MD, Zaccolo M. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res*. 2006;98:226-234.

13. Bassani RA, Bers DM. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:1335-1347.
14. Dostal DE, Rothblum KN, Conrad KM, Cooper GR, Baker KM. Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol.* 1992;263:C851-C863.
15. Cortassa S, Aon MA, Winslow RL, O'Rourke B. A mitochondrial oscillator dependent on reactive oxygen species. *Biophys J.* 2004;87:2060-2073.
16. Cheng H, Song LS, Shirokova N, Gonzalez A, Lakatta EG, Rios E, Stern MD. Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J.* 1999;76:606-617.
17. Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH. Abnormal Ca²⁺ release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res.* 2002;91:1015-1022.
18. Froehlich JP, Lakatta EG, Beard E, Spurgeon HA, Weisfeldt ML, Gerstenblith G. Studies of sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in young adult and aged rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10:427-438.
19. Miranda KM, Dutton AS, Ridnour LA, Foreman CA, Ford E, Paolocci N, Katori T, Tocchetti CG, Mancardi D, Thomas DD, Espey MG, Houk KN, Fukuto JM, Wink DA. Mechanism of aerobic decomposition of Angeli's salt (sodium trioxodinitrate) at physiological pH. *J Am Chem Soc.* 2005;127:722-731.

20. Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M, Lakatta EG. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res.* 1999;85:1092-1100.
21. Massion PB, Pelat M, Belge C, Balligand JL. Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005;142:144-150.
22. Antipenko A, Spielman AI, Kirchberger MA. Kinetic differences in the phospholamban-regulated calcium pump when studied in crude and purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Membr Biol.* 1999;167:257-265.
23. Kubalova Z, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Nishijima Y, Gyorke I, Terentyeva R, da Cunha DN, Sridhar A, Feldman DS, Hamlin RL, Carnes CA, Gyorke S. Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:14104-14109.
24. Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM, Salama G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium.* 1997;21:19-29.
25. Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* 1998;279:234-237.
26. Zahradnikova A, Minarovic I, Venema RC, Meszaros LG. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium.* 1997;22:447-454.

27. Ziolo MT, Katoh H, Bers DM. Positive and negative effects of nitric oxide on Ca²⁺ sparks: influence of beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H2295-H2303.
28. Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H. Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem*. 1995;270:2074-2081.
29. Zhou YY, Song LS, Lakatta EG, Xiao RP, Cheng H. Constitutive beta2-adrenergic signalling enhances sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling to augment contraction in mouse heart. *J Physiol*. 1999;521 Pt 2:351-361.
30. Sham JS, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H. Termination of Ca²⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:15096-15101.
31. Balasubramaniam R, Chawla S, Grace AA, Huang CL. Caffeine-induced arrhythmias in murine hearts parallel changes in cellular Ca²⁺ homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1584-H1593.
32. Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M. NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14492-14497.
33. Adak S, Wang Q, Stuehr DJ. Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase. Implications for mechanism. *J Biol Chem*. 2000;275:33554-33561.

34. Diaz ME, Graham HK, O'Neill SC, Trafford AW, Eisner DA. The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. *Cell Calcium*. 2005;38:391-396.
35. Rodriguez P, Kranias EG. Phospholamban: a key determinant of cardiac function and dysfunction. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98:1239-1243.
36. Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y, Minamisawa S, Date MO, Gu Y, Iwatate M, Li M, Wang L, Wilson JM, Wang Y, Ross J, Jr., Chien KR. Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med*. 2002;8:864-871.
37. del Monte F, Hajjar RJ, Harding SE. Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure. *Circ Res*. 2001;88:E66-E67.
38. Kirchberger MA, Tada M, Katz AM. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1974;249:6166-6173.
39. Katori T, Hoover DB, Ardell JL, Helm RH, Belardi DF, Tocchetti CG, Forfia PR, Kass DA, Paolocci N. Calcitonin gene-related peptide in vivo positive inotropy is attributable to regional sympatho-stimulation and is blunted in congestive heart failure. *Circ Res*. 2005;96:234-243.
40. Dai T, Tian Y, Tocchetti CG, Katori T, Kass DA, Paolocci N, Gao W. Nitroxyl (HNO) increases force development in rat cardiac muscle. *J Physiol*. (under revision)

41. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101:365-376.

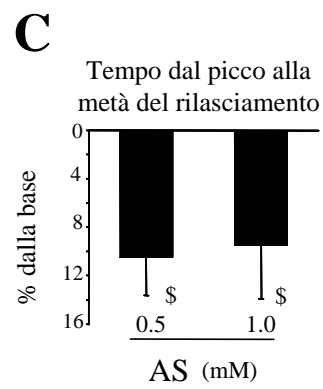
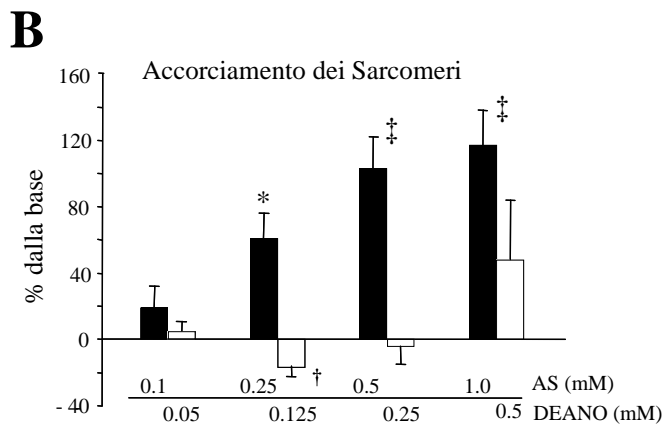
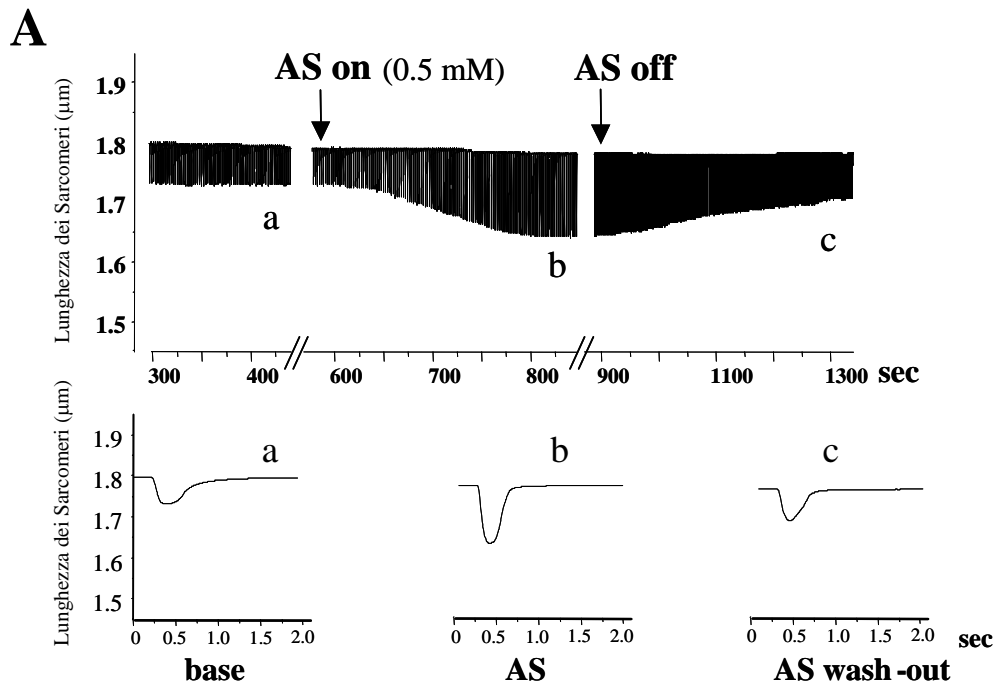


Figura-1 (Tocchetti)

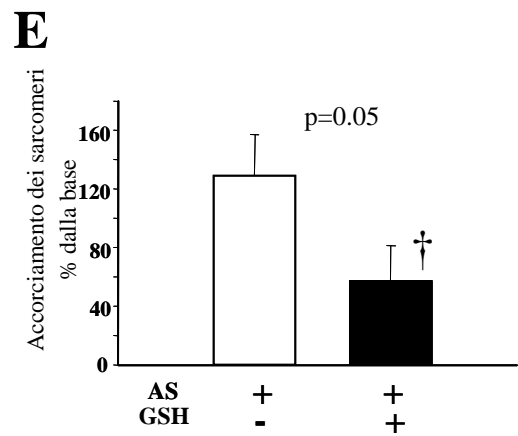
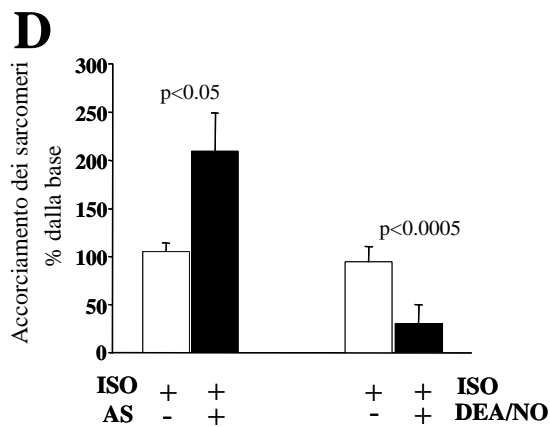
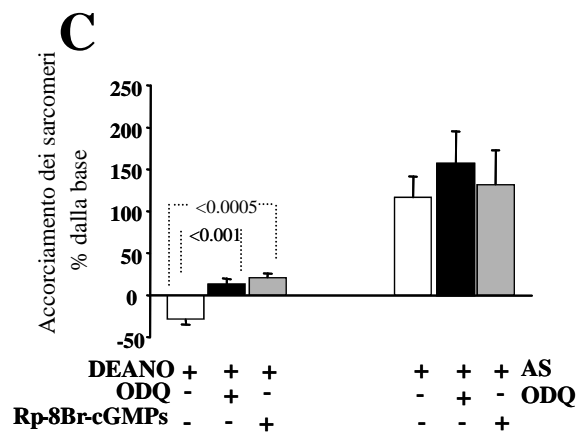
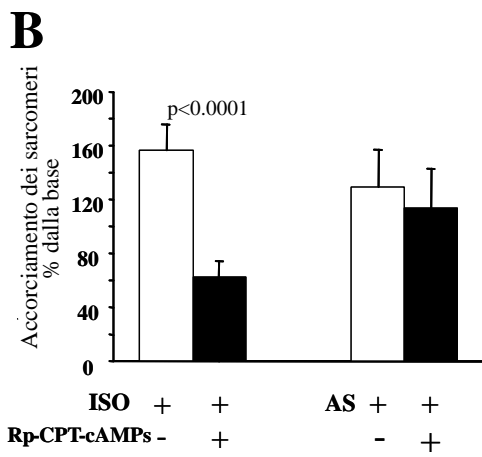
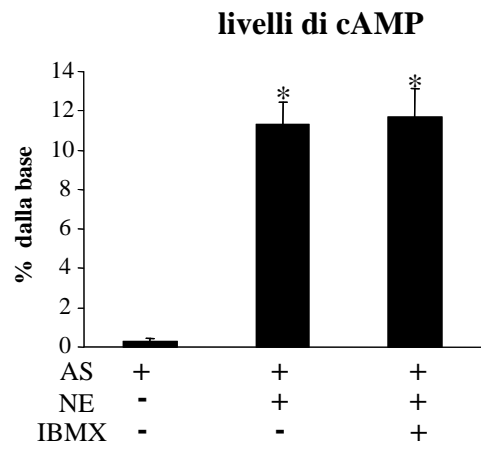
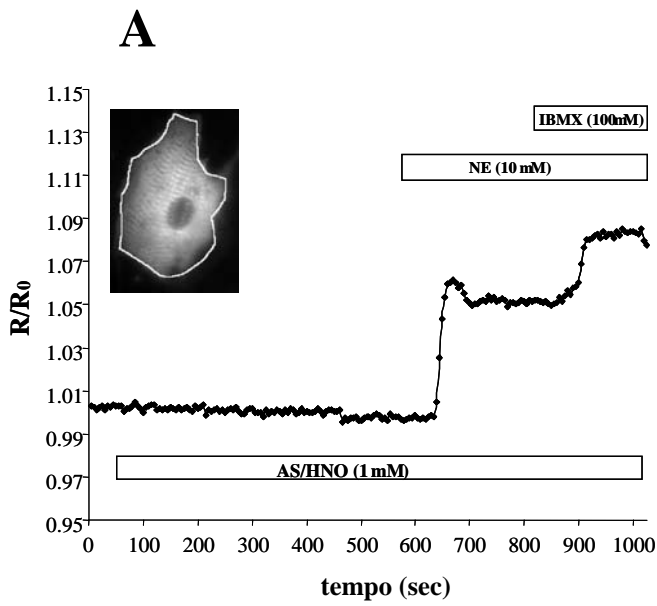


Figura-2 (Tocchetti)

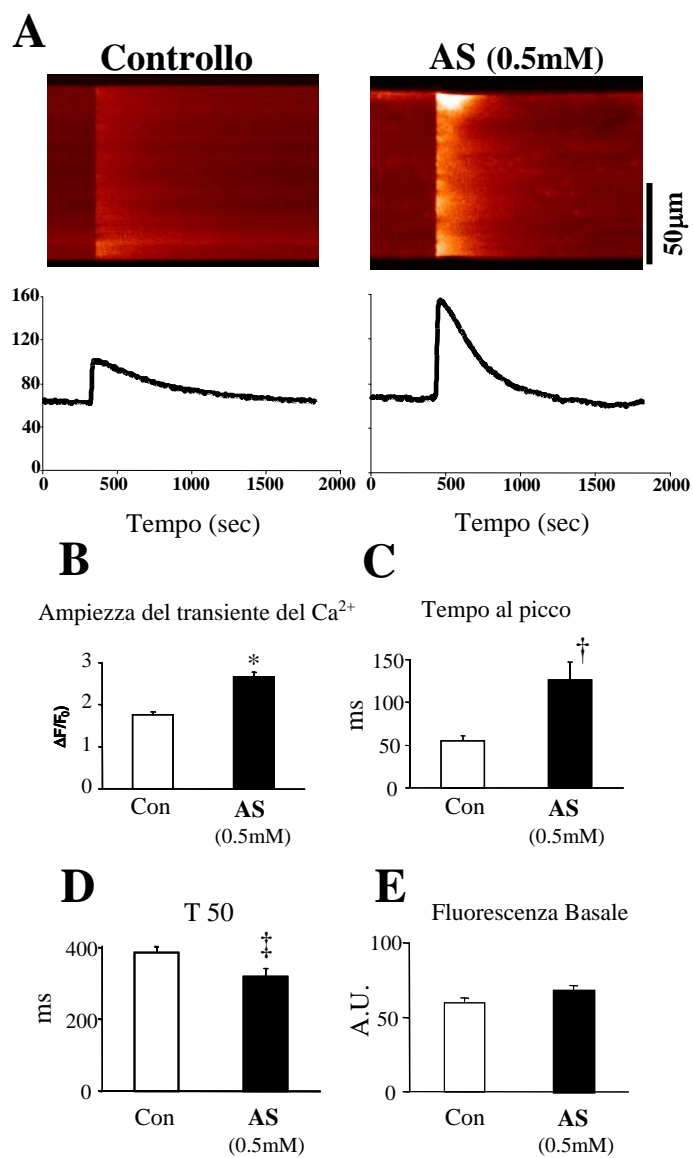


Figura-3 (Tocchetti)

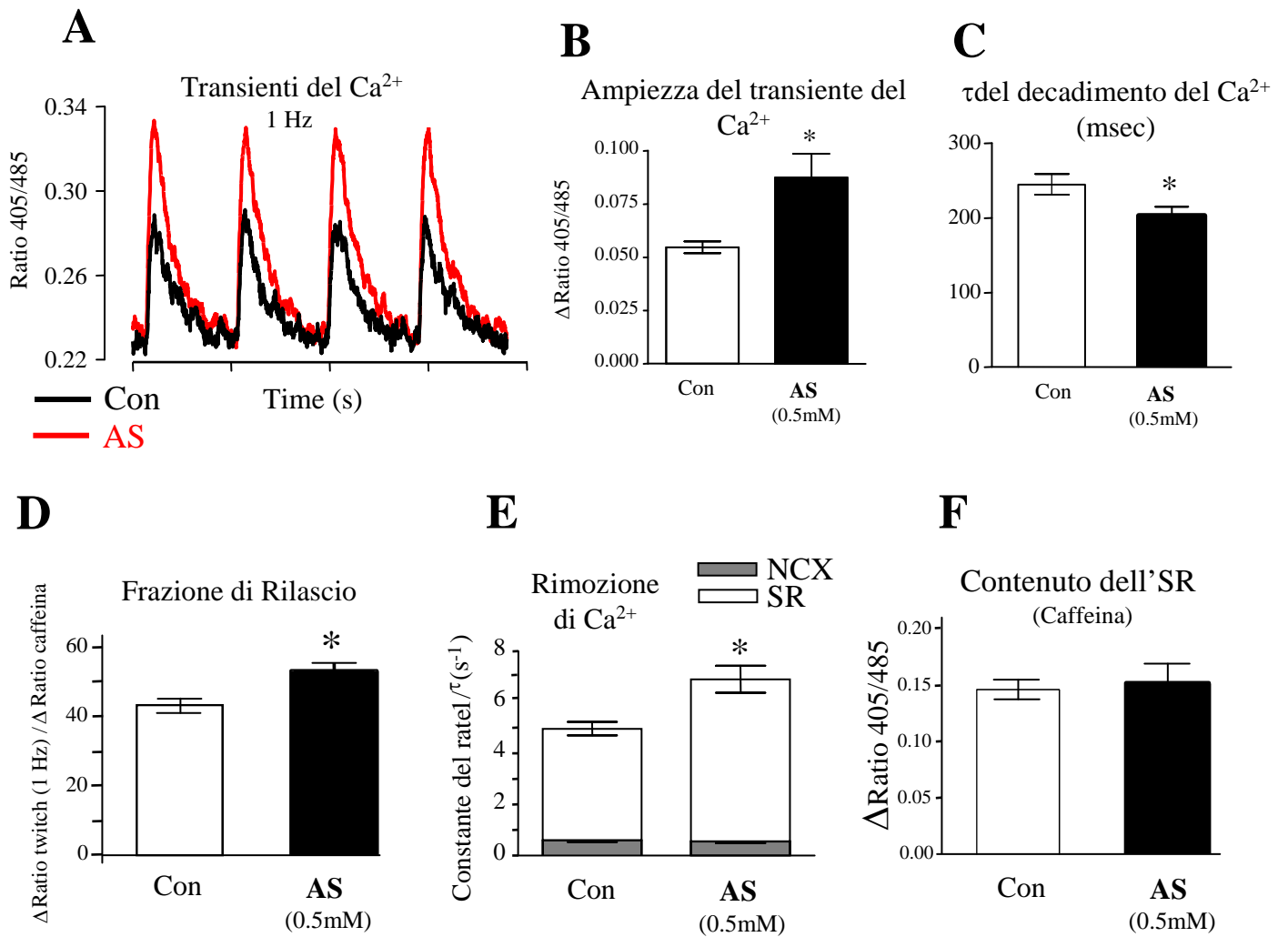


Figura-4 (Tocchetti)

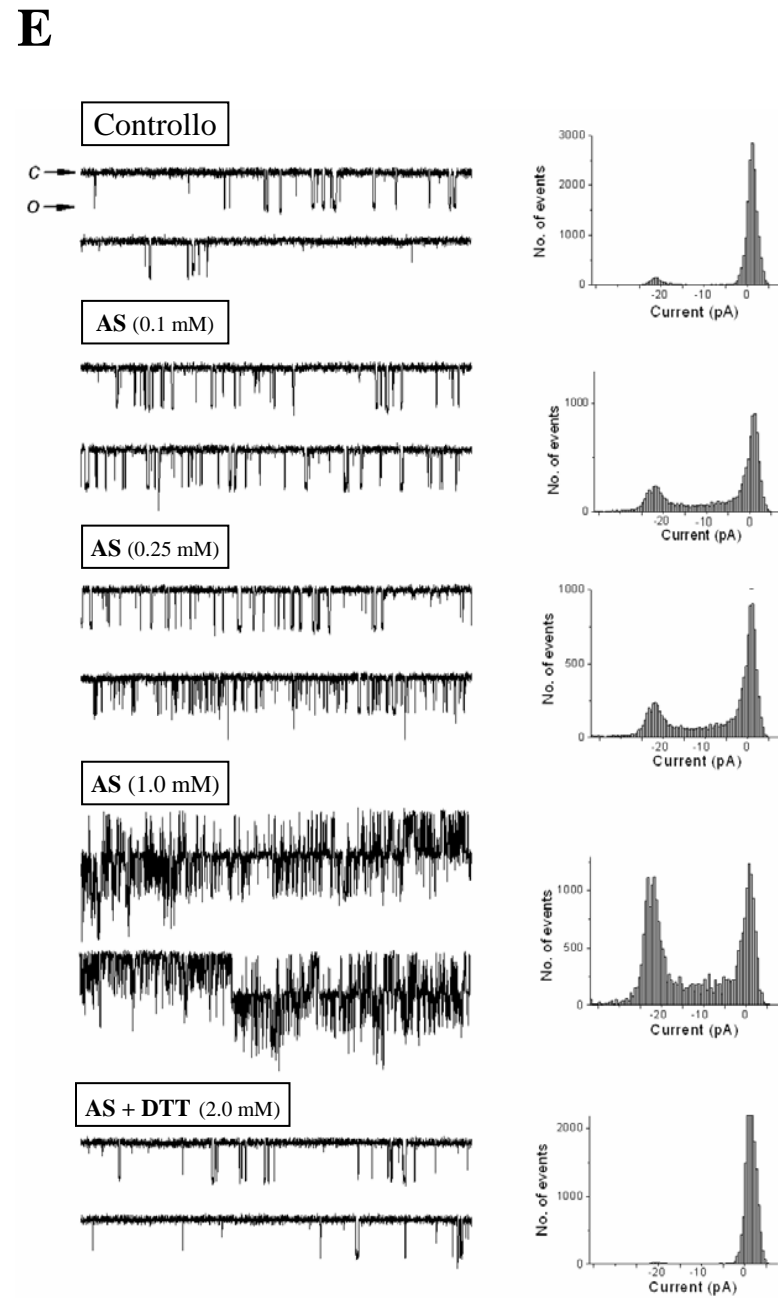
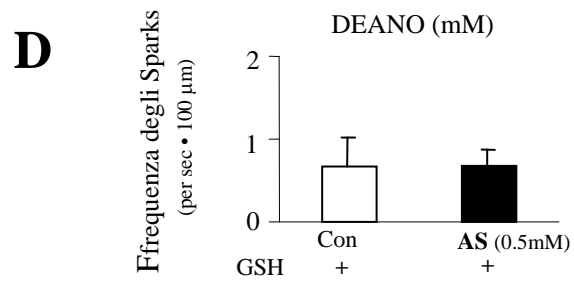
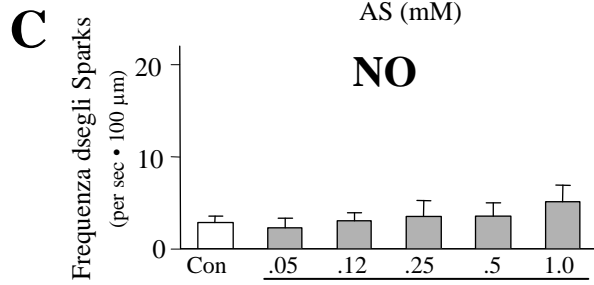
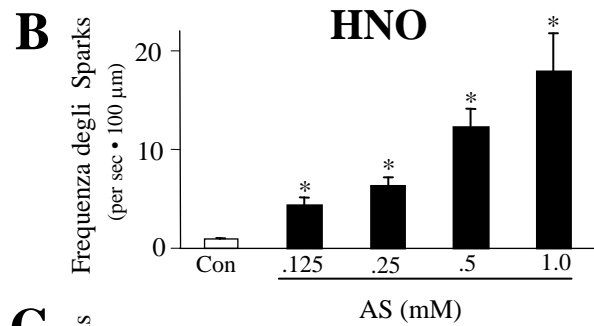
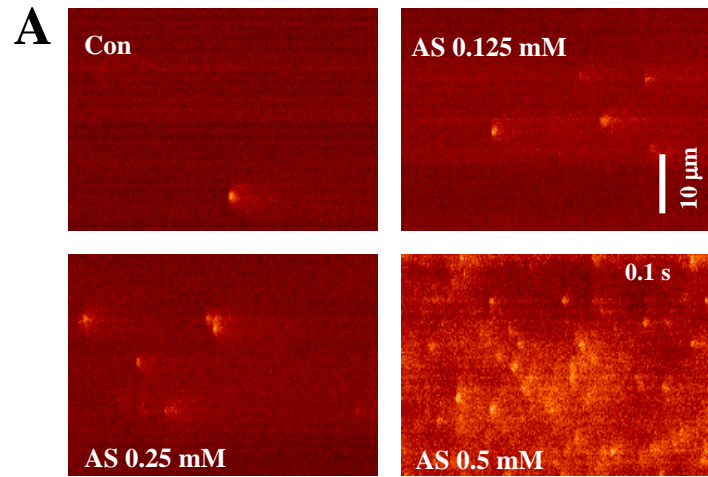
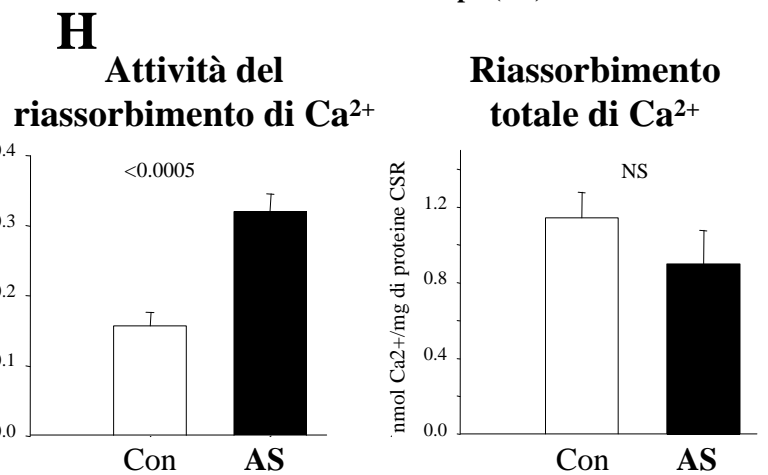
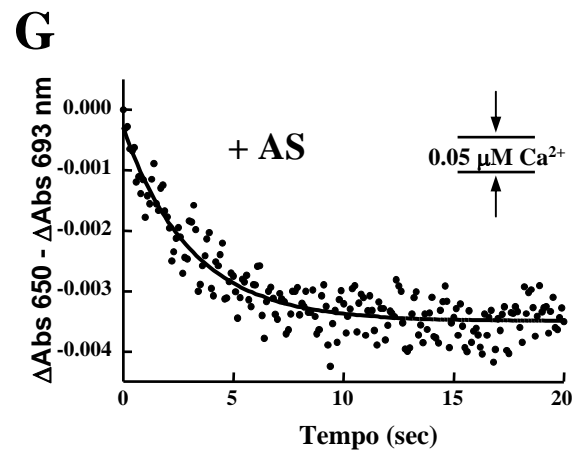
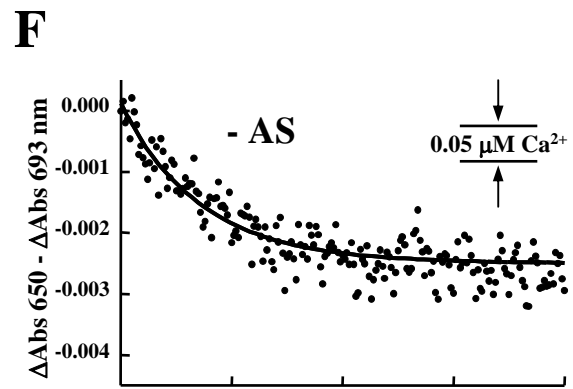
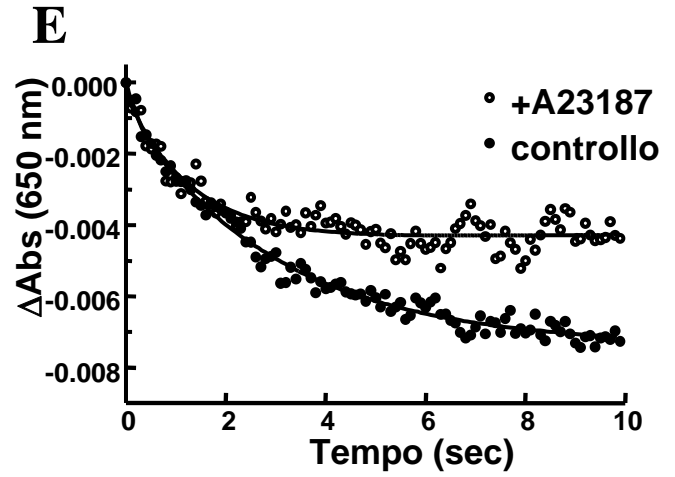
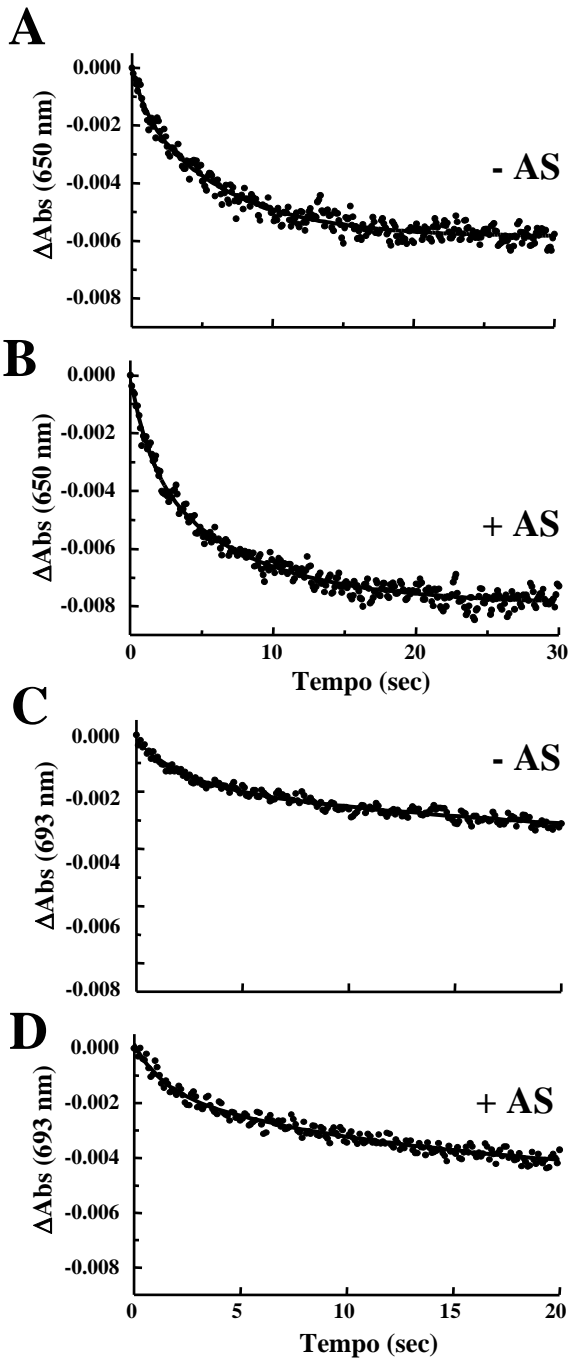


Fig.5 (Tocchetti)



Tocchetti Fig.6