

Universita' degli studi di Napoli, "Federico II"

Dottorato in Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

XXII ciclo, anno accademico 2009/2010

Direttore: Prof Gianni Marone

Insufficienza cardiaca ed insulino resistenza: Ruolo di GRK2

Candidato: Dr Michele Ciccarelli

Relatore: Prof. Bruno Trimarco

Sommario

Introduzione	pag 3
Metodi	pag 5
<i>Colture Cellulari</i>	pag 5
<i>Isolamento membrane cellulari da cardiomiociti</i>	pag 6
<i>Western Blot ed immunoprecipitati</i>	pag 6
<i>Vettori virali</i>	pag 6
Esperimenti in vivo	pag 6
<i>Animali</i>	pag 6
<i>Misurazione dei parametri cardiaci di volume e funzione mediante ecocardiografia</i>	pag 7
<i>Chirurgie</i>	pag 7
<i>Valutazione della captazione miocardica di glucosio mediante Tomografia ad emissione di Positroni (PET)</i>	pag 8
Risultati	pag 8
<i>Dimensione e funzione cardiaca in ratti e animali transgenici</i>	pag 8
<i>Captazione miocardica del 18-FDG in animali transgenici</i>	pag 9
<i>GRK2 e traslocazione di GLUT4-insulino dipendente</i>	pag 9
<i>Meccanismo inibitorio di GRK2 sul segnale insulinico</i>	pag 10
<i>Terapia genica dell'insulino resistenza durante insufficienza cardiaca post ischemica mediante AAV6βARKct</i>	pag 12
Discussione	pag 12
Bibliografia	pag 15
Figure	pag 19

Introduzione

L'Insufficienza Cardiaca, definita come l'incapacità del cuore a produrre una gittata sufficiente a soddisfare le esigenze metaboliche degli organi periferici, rappresenta lo stadio terminale di varie patologie cardiache tra cui la cardiopatia ischemica. L'iperattivazione del sistema neuroormonale, quali adrenergico (AR) e Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAA) rappresenta un evento cruciale nella fisiopatologia dello scompenso¹. E' noto che l'attivazione di questi meccanismi produce una iniziale fase di compensazione della funzione cardiaca ma che nel tempo risultano deleteri per la sopravvivenza cellulare. Studi su cavie e su pazienti hanno dimostrato come l'attivazione adrenergica produce apoptosi dei cardiomiociti e fibrosi interstiziale a danno del miocardio^{2, 3}. Questi eventi risultano nel processo di rimodellamento cardiaco, caratterizzato da dilatazione ventricolare e deterioramento della funzione contrattile⁴.

Di conseguenza, gli approcci terapeutici che hanno dimostrato di migliorare la prognosi dei pazienti affetti, si basano sull'antagonismo neuroormonale (β -bloccanti e Ace Inibitori ad esempio); tuttavia la mortalità per questa patologia rimane ancora molto alta⁵ e ulteriori studi sui meccanismi molecolari dello scompenso cardiaco sono necessari per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Recentemente si è osservato, in modelli animale ed umano di insufficienza cardiaca, un'alterata capacità del cuore di utilizzare metaboliti necessari alla produzione di ATP⁶⁻⁸, in particolare un ridotto utilizzo di glucosio ed un' aumentata captazione di acidi grassi⁹⁻¹².

Il glucosio presenta un metabolismo favorevole in quanto, a parità di molecole di ATP prodotte, richiede un minore consumo e quindi, una minore richiesta cellulare di O₂ rispetto agli acidi grassi¹³. Questa proprietà del glucosio è evidente in situazioni di stress sia fisiologiche come l'esercizio fisico che patologiche come l'ischemia, in cui il miocardio incrementa il proprio metabolismo glucidico¹⁴⁻¹⁶. Il cuore scompensato sembra invece perdere questa sua "plasticità" metabolica, intesa come capacità di modificare il proprio metabolismo a seconda delle condizioni, a cui consegue un'insufficiente produzione di ATP ed una maggiore richiesta di O₂¹⁷.

Studi realizzati mediante RMN con P-31 hanno evidenziato, in modelli di insufficienza cardiaca umana e murina, un depauperamento delle riserve energetiche del miocardio sia sotto forma di ATP che di fosfocreatina (PCr)¹⁸⁻²⁰.

Considerata la notevole domanda di energia da parte del miocardio per svolgere la propria funzione contrattile, il recupero del normale metabolismo energetico rappresenta un nuovo ed intrigante approccio per il trattamento dell'insufficienza cardiaca.

Animali transgenici con insulino-resistenza obesità correlata e topi knockout per il recettore dell'insulina sviluppano una insufficienza cardiaca dovuta ad un alterato metabolismo^{21, 22}, così come studi su pazienti diabetici hanno evidenziato una ridotta captazione di glucosio a favore di una aumentata estrazione di acidi grassi^{12, 23}.

L'insulino resistenza cardiaca rappresenta quindi, un possibile target terapeutico, essendone un meccanismo fisiopatologico riconosciuto²⁴.

I meccanismi alla base dell'insulino-resistenza cardiaca non sono ancora chiari, fra le ipotesi più rilevanti, essa appare strettamente correlata all'attivazione neurormonale²⁵. L'incremento delle catecolamine durante lo scompenso cardiaco produce, perdita e alterazione di proteine fondamentali nella regolazione del metabolismo cardiaco, incremento del tono vascolare e dei livelli di acidi grassi circolanti^{26, 27}. Quest'ultimi, a loro volta, inducono fosforilazione inibitoria del recettore dell'insulina mediante attivazione di PKC- β ²⁸.

Una particolare modificazione cellulare indotta dall'attivazione adrenergica è l'aumentata espressione della chinasi dei Recettori accoppiati a proteine G di tipo 2 (GRK2)²⁹⁻³¹. GRK2 è coinvolta nello spegnimento del segnale β adrenergico (β AR), attraverso meccanismi di desensibilizzazione e diminuzione della densità recettoriale³². I livelli di GRK2 appaiono direttamente correlati con la prognosi dello scompenso cardiaco³³ e diversi studi ne indicano il ruolo cruciale nella fisiopatologia dello scompenso³⁴. Recentemente è stato dimostrato come in adipociti ed epatociti GRK2 sia in grado di regolare il segnale insulinico, in particolare determinando riduzione del signalling intracellulare indotto dal legame dell'insulina con il suo recettore^{35, 36}. L'ipotesi di questo studio è che GRK2 può svolgere un ruolo nello sviluppo dell'insulino resistenza in presenza di insufficienza cardiaca, e rappresentare un possibile target terapeutico per il recupero del normale metabolismo cardiaco.

Metodi

Colture Cellulari.

Gli esperimenti *in vitro* sono stati eseguiti su colture di cardiomiociti isolati da cuore adulto di ratto (ARVM). In breve, gli animali sono stati sacrificati mediante overdose di barbiturico, il cuore prelevato e connesso ad un sistema di perfusione Langerdoff. La digestione con Collegenasi di tipo II (1mg/ml, Worthington) e' stata eseguita ad un flusso di 4,5 ml/min per 13 min circa. Le cellule isolate sono state messe in coltura con MEM (Sigma Aldrich, 500 ml) contenente FBS al 5% e BDM 1% a 37°C, 95% CO₂, 5% O₂, dopo un' ora il mezzo e' stato rimosso e sostituito con MEM contenente BDM e BSA 0,1% .

In alcuni esperimenti le cellule sono state infettate con ADGFP, ADGRK2, ed ADGRK2DN overnight.

Isolamento membrane cellulari da Cardiomiociti

Le cellule sono state omogenate in 0.5 ml di Mouse Heart Lysis Buffer (MLB, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml each leupeptin and aprotinin). Frazione nucleare e cellule intatte sono state rimosse mediante centrifugazione (1,000 × g, 5 min), il sopranatante ottenuto e' stato ulteriormente centrifugato per separare frazione citosolica e membrane cellulari (38,000 × g per 1 H). Il pellet ottenuto (membrane) e' stato risospeso in lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and 2 µg/ml di aprotinin e leupeptin) mentre il sovranatante e' stato utilizzato come frazione citosolica. La concentrazione proteica e' stata calcolata mediante saggio proteico con Bradford (Biorad).

Preparazione western blot ed immunoprecipitati.

ARVMs sono state stimulate a 37°C con l'agonista β AR isoproterenolo (ISO, 10 nM) o Insulina (Ins, 10 nM) a vari tempi. Alla fine della stimolazione, le cellule sono state messe su ghiaccio e lisate in RIPA/SDS buffer [50mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1%NP-40, 0,25% deoxycholate, 9,4mg/50ml sodium orthovanadate, 20% sodium dodecyl sulphate]. La concentrazione proteica e' stata determinata mediante saggio BCA (Pierce). IRS1 e GRK2 sono stati immunoprecipitati dagli estratti totali utilizzando i corrispondenti Anticorpi primari e proteine A/G coniugate con agarosio. I campioni ottenuti sono stati posti su un rotator overnight a 4°C e poi centrifugati 12,000×g per 18 sec. Gli immunoprecipitati sono stati lavati con lysis buffer (3 volte) e risospesi 1× SDS gel loading buffer, lisati totali o immunoprecipitati sono stati corsi su Tris/Gly gel 10% e trasferiti su filtro di nitrocellulosa. IRS1 totale, pIRS1 ser 307 e Tyr 612, AKT totale, pAKT ser 473 sono stati visualizzati utilizzando anticorpi primari specifici diluiti 1:1000, seguito da incubazione con anticorpi secondari mouse o rabbit (1:5000). Le membrane sono state alla fine scannerizzate ed i risultati quantificati mediante programma specifico (Lycor).

Vettori virali utilizzati nello studio.

Alcuni esperimenti in vitro sono stati condotti inducendo, in colture cellulari, overespressione di GRK2 wild type bovino (GRK2wt) e del suo mutante difettivo per l'attivita' chinastica (GRK2DN) mediante adenovirus.

Per la terapia genica su ratti sono stati utilizzati virus adeno-associati tipo 6 (AAV6) codificanti per la green fluorescent protein (GFP) o per la porzione carbossiterminale di GRK2 (β ARKct)

Esperimenti in vivo

Animali

In questo studio sono stati utilizzati ratti Sprague/Dawley dell'eta di 12 settimane e topi C57/Bl6 dell'eta' di 8 settimane. Gli studi su animali sono stati eseguiti presso la Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA. I protocolli sugli studi su animali sono stati rivisti e approvati dalla commissione etica della Thomas Jefferson University.

Misurazione dei parametri cardiaci di volume e funzione mediante ecocardiografia.

Gli animali sono stati anestetizzati come sopra descritto. Utilizzando una sonda 10Mhz (Vevo, scanhead 770, Visualsonic), immagini del miocardio in MB-mode sono state utilizzate per la misurazione dei parametri volumetrici (volume ventricolare sinistro telediastolico-sistolico (LVDd-LVDs, mm)) e funzionali (frazione di eiezione (EF, %) e frazione di accorciamento (FS, %)).

Tali parametri sono stati misurati prima e dopo le chirurgie, a 3 e 6 settimane dalla induzione di infarto del miocardio.

Chirurgie

Gli animali sono stati anestetizzati con isofluorano (5% v/v per l'induzione seguita da 2% v/v), intubati e il torace aperto mediante sternotomia mediana. In Ratti Sprague/Dawley e' stata indotta insufficienza cardiaca post ischemica mediante necrosi della parete anterolaterale del ventricolo sinistro. Il ventricolo sinistro e' stato esposto, ed applicato sulla superficie anterolaterale una sonda precedentemente congelata in azoto liquido. Sono state praticate tre applicazioni di un minuto a distanza di un minuto tra ognuna. Successivamente, nelle aree circostanti la necrosi, sono state eseguite 3 iniezioni intramiocardiche di una soluzione (200 μ l) contenente AAV6GFP o AAV6 β ARKct). Quindi, il torace e' stato richiuso mediante suture e l'animale estubato previa interruzione dell'isofluorano.

Topi C57/B16 e transgenici con overespressione di GRK2 (BK12) sono stati sottoposti a legatura del ramo discendente anteriore della coronaria sinistra, determinando necrosi della parete antero-laterale del ventricolo sinistro.

Valutazione della captazione miocardica di glucosio mediante Tomografia ad emissione di Positroni (PET)

La captazione miocardica di glucosio e' stata valutata mediante PET. Tale metodica e' stata eseguita presso la Small Animal Molecular Imaging Facility della Thomas Jefferson University. Per valutare la captazione di glucosio, abbiamo utilizzato F-18 Fluorodeossiglucosio (F-18), un radioisotopo ad emissione di positroni con un emivita di 109 minuti. Agli animali e' stato rimosso il cibo per 2 ore prima della procedura per normalizzare i livelli di insulina e glucosio, quindi anestetizzati con isofluorano (5% v/v per l'induzione seguita da 2% v/v). Un prelievo di sangue dalla vena caudale e' stato eseguito per misurare i livelli di glucosio ed insulina, quindi dalla stessa vena abbiamo proceduto alla iniezione di 1 μ Ci di F-18. La temperatura corporea degli animali e' stata mantenuta costante (37 +/- 2 °C) mediante una lampada posta a distanza di un metro. La temperatura corporea e' stata monitorata mediante sistema ad infrarossi. Durante la procedura gli animali sono stati osservati per valutare la presenza di segni vitali e la profondita' dell'anestesia. La captazione del glucosio e' stata misurata ogni 5 minuti per 120 minuti totali ed e' stata valutata utilizzando le immagini PET, disegnando un area di interesse (ROI) in corrispondenza del miocardio. I valori ottenuti (SUV) sono stati corretti per il peso dell'animale e i livelli di glucosio ematico secondo la formula: concentrazione ematica glucosio (mmol/L)*SUV/5.55.

I valori ottenuti sono espressi in mg/ml/min. La procedura e' stata eseguita a tre giorni dalla chirurgia, 3 e 6 settimane. Al termine dello studio gli animali sono stati sacrificati ed i cuori prelevati per la valutazione biochimica.

Risultati

Dimensione e funzione cardiaca in ratti e topi transgenici

Gli animali BK12 ed NLC non presentavano differenze significative nella funzione e dimensione cardiache in assenza di MI. A tre giorni dall'induzione di MI, BK12 ed NLC presentano una riduzione della EF rispetto ai controlli non infartuati (Sham BK12-NLC) ma non abbiamo osservato significative differenze tra i due gruppi in presenza di MI.

A tre settimane e' possibile osservare una lieve dilatazione cardiaca ed un peggioramento della funzione ventricolare sinistra nei BK12 ed NLC post MI rispetto agli Sham ma senza significative differenze tra i due gruppi post-MI. Significative differenze tra BK12 ed NLC sono osservabili a 6 e 12 settimane dall'infarto, sia per la funzione ventricolare sinistra che per volumetria cardiaca (Fig 1A,B).

Nei Ratti post-MI AAV6GFP ed AAV6 β ARKct si osserva una riduzione della funzione ventricolare sinistra a tre giorni e tre settimane post-MI rispetto agli sham, senza significative differenze tra i due gruppi. Negli animali AAV6 β ARKct abbiamo osservato una migliore EF ed una minore dilatazione cardiaca rispetto agli AAV6GFP a 6 e 12 settimane dall'infarto (Fig 1C,D).

Captazione miocardica del 18-F in animali transgenici

La capacità del miocardio di estrarre glucosio è stata valutata mediante PET in topi BK12 e NLC. Entrambi i gruppi di animali non presentano differenze significative nella captazione miocardica di glucosio in assenza di malattia cardiaca (Figura 2A). L'insufficienza cardiaca post ischemica produce negli NLC un progressiva alterazione della captazione di glucosio con una significativa riduzione osservabile a partire dalla sesta settimana dall'induzione di MI (Figura 2B); tale riduzione risulta, tuttavia, anticipata nei BK12, essendo significativa già a partire dalla terza settimana dall'infarto (Figura 2C).

GRK2 e traslocazione di GLUT4-insulino dipendente.

L'insulina induce la traslocazione di GLUT4 a livello della membrana plasmatica, incrementandone la densità e di conseguenza la capacità della cellula di accumulare glucosio. Come osservato in Figura 3A, sia l'insulina che la stimolazione β -adrenergica con iso produce incremento di GLUT4 sulla membrana. Tuttavia la stimolazione con entrambi gli agonisti non produce un effetto di sommazione, risultando paragonabile a quella con solo iso (Fig 3A). La possibilità che la stimolazione β -adrenergica riduca il segnale insulinico intracellulare è supportata dalla ridotta fosforilazione di AKT in ser473 aprendo all'ipotesi di una via come comune tra i due signalling o dall'induzione di un

meccanismo da parte del sistema β -adrenergico in grado di inibire il segnale intracellulare dell'insulina. E' noto che la stimolazione dei cardiomiociti con ISO produce traslocazione di GRK2 sulla membrana che ha la funzione di "spegnere" il segnale β -adrenergico mediante fosforilazione del recettore e successivo legame con β -arrestina, che ne impedisce l'accoppiamento con proteina Gs. Questo meccanismo è confermato dai risultati di questo studio (Fig 3B), ma, sorprendentemente, anche la stimolazione con ins è in grado di indurre traslocazione di GRK2 sulla membrana (Fig 3C). La possibilità che GRK2 sia in grado di indurre insulino resistenza nei cardiomiociti è stata valutata mediante overespressione intracellulare di GRK2 (Fig 4A-C).

La capacità dell'ins di indurre traslocazione di GLUT4 rimane intatta in presenza di ADGFP, ma risulta inibita quando le cellule vengono infettate con ADGRK2. Allo stesso modo anche la fosforilazione di AKT risulta inibita.

Meccanismo inibitorio di GRK2 sul segnale insulinico.

Diversi meccanismi, attraverso cui GRK2 e' in grado di influenzare il segnale insulinico, sono stati dimostrati e descritti in vari sistemi cellulari.

GRK2 e' una serina/treonina chinasi ma possiede anche importanti domini di legame localizzati nelle porzioni ammino e carbossiterminale. Il dominio RGS, localizzato nella porzione amminoterminale, e' in grado di legare e sequestrare molecole come $G\alpha q/G_{11}$ ³⁷, mentre il dominio Pleckstrin-homology (PH) consente GRK2 di ancorarsi alla membrana cellulare mediante legame con la subunita' $\beta\gamma$ della proteina G³⁸.

Olefsky et al, hanno dimostato come GRK2 sia in grado di indurre inibizione del segnale indotto dall'insulina, in adipociti, mediante legame con $G\alpha q/G_{11}$ ^{36, 39}, riducendo l'attivazione di Akt e conseguentemente la captazione di glucosio indotta dall'insulina, mentre Liu et al hanno osservato come l'interazione diretta di GRK2 e Akt, aumentata in condizioni patologiche associate a disfunzione endoteliale, produce una ridotta produzione di NO⁴⁰.

Si puo' quindi ipotizzare che GRK2 sia in grado di produrre una inibizione del segnale mediante legame e sequestro di molecole chiave della via di trasduzione del segnale intracellulare attivata dall'insulina come $G\alpha q/G_{11}$ e/o Akt.

Tuttavia tali meccanismi non sembrano sussistere nei cardomiciti, in quanto entrambe le interazioni non risultano evidenziabili nei nostri risultati (dati non mostrati).

Un altro meccanismo ipotizzabile e' che l'attivita' chinasi di GRK2 sia la principale responsabile dell' insulina resistenza cardiaca. E' stato dimostrato come il knock-down di GRK2 all'interno di epatociti, mediante siRNA, induce una piu' elevata fosforilazione in tirosina di IRS1 indotta dall'insulina e una ridotta fosforilazione dei residui di serina, determinando un potenziamento netto del segnale all'interno della cellula³⁵.

Nei nostri esperimenti abbiamo in particolare valutato la fosforilazione di IRS1 in ser307 che e' stata dimostrata indurre una riduzione del legame di IRS1 con il recettore dell'insulina⁴¹. Abbiamo osservato come l'insulina di per se' sia in grado di indurre la fosforazione di ser307, producendo un fenomeno di feedback autoinibitorio, che tuttavia risulta potenziato in presenza di un'overespressione di GRK2, sia di base che dopo stimolazione con ins (Fig 5A-B).

A conferma di questo risultato, lisati totali di cuori da topi BK12, MHC-CRE/GRK2flox ed NLC sono stati utilizzati per valutare la fosforilazione di IRS1 in ser307 in condizioni basali e dopo somministrazione di ins. I livelli di pIRS1ser307 risultano significativamente aumentati nei topi BK12 sia di base che dopo trattamento con ins rispetto agli NLC mentre nei topi MHC-CRE/GRK2flox tale fosforilazione appare significativamente ridotta (Fig 5C-D).

Per valutare se la fosforilazione in ser307 di IRS1 da parte di GRK2 determina anche un ridotto signaling intracellulare, abbiamo valutato la fosforilazione di IRS1 in Tyr612 e AKT in presenza di overespressione di GFP, GRK2wt e di GRK2DN in ARVM.

I nostri risultati evidenziano come GRK2wt riduce significativamente i livelli di fosforilazione in Tyr612 e di AKT, dopo stimolazione con ins, rispetto a GFP e GRK2DN (Fig 5E-F).

Riassumendo, questi dati indicano che il meccanismo inibitorio di GRK2 sul segnale insulinico e' dovuto alla sua attivita' chinasi ed in particolare attraverso fosforilazione in ser 307 di IRS1.

Terapia genica dell'insulino resistenza durante insufficienza cardiaca post ischemica mediante AAV6 β ARKct.

I risultati, *in vivo* e *in vitro*, precedentemente descritti dimostrano il ruolo di GRK2 nell'insulino resistenza cardiaca durante insufficienza cardiaca ed il possibile meccanismo molecolare attraverso cui, questa chinasi, interferisce con il segnale intracellulare attivato dall'insulina. Abbiamo quindi valutato la possibilita' di recuperare il normale fenotipo metabolico cardiaco utilizzando una manovra che sia in grado di competere con GRK2 e ridurre l'insulino resistenza cardiaca.

Le immagini PET in figura 7 evidenziano una riduzione della captazione di glucosio a livello cardiaco gia' a tre settimane dall'infarto miocardico nel gruppo di controllo AAV6GFP, quando ancora significative alterazioni della funzione e dei volumi cardiaci non sono evidenti. Al contrario, nel gruppo AAV6 β ARKct, la captazione di glucosio e' preservata, con livelli di estrazione di glucosio simili agli animali non infartuati. A sei settimane le immagini PET mostrano una severa dilatazione cardiaca negli animali trattati con AAV6GFP, mentre nel gruppo AAV6 β ARKct si osserva una preservata geometria cardiaca ed una migliore captazione di glucosio, seppur ridotta rispetto agli animali normali.

Discussione

La flessibilita' metabolica cardiaca, definita come la capacita' del miocardio di utilizzare diversi substrati metabolici a seconda delle condizioni fisiopatologiche, viene persa durante insufficienza cardiaca^{13, 18}. La presenza di tale fenomeno durante lo scompenso cardiaco e' confermata in vari modelli di patologia cardiaca, sia umana che animale, tuttavia l'importanza di un alterato metabolismo cardiaco nella progressione dello scompenso non e' ancora completamente chiaro, cosi come i meccanismi molecolari da cui dipende.

Questo lavoro evidenzia il ruolo svolto dall'insulino resistenza nella progressione dello scompenso.

I nostri dati *in vivo* dimostrano come la ridotta captazione del glucosio sia un fenomeno precoce dello scompenso, precedente ai fenomeni di rimodellamento cardiaco e ridotta funzione sistolica. Tale conclusione e' confermata dagli effetti prodotti dalla terapia

genica sul metabolismo, dove gli animali trattati con AAV6 β ARKct presentano un preservato metabolismo glucidico rispetto agli AAV6GFP già prima che si sviluppino differenze significative della funzione cardiaca tra i due gruppi.

Il ruolo svolto dall'insulino resistenza nella fisiopatologia e nella progressione dello scompenso, pone le basi per lo studio dei meccanismi molecolari alla base di tale fenomeno, necessari per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

I nostri studi si sono concentrati sul possibile ruolo svolto da GRK2 nello sviluppo dell'insulino resistenza cardiaca, in accordo al ruolo svolto da questa chinasi nell'insufficienza cardiaca ed alle recenti osservazioni di un effetto inibitorio sul signalling dell'insulina in vari sistemi cellulari.

Diversi studi hanno dimostrato che le funzioni intracellulari svolte da GRK2 vanno oltre la sua attività di Ser/Thr chinasi, grazie alla presenza di domini RGS e PH, rispettivamente collocati nelle porzioni amminotermine e carbossiterminale^{37, 38}.

Liu et al hanno dimostrato⁴⁰, in cellule endoteliali isolate dai sinusoidi epatici, che GRK2 è in grado di legare AKT prevenendone la fosforilazione. Tale interazione risulta incrementata in presenza di disfunzione endoteliale, con una conseguente ridotta attivazione di AKT. GRK2 sembra, inoltre, in grado di legare altre molecole coinvolte nelle segnalazioni dell'insulina, quali G α q/11^{36, 39}, inducendo insulino resistenza attraverso un meccanismo chinasi-indipendente. Tali meccanismi sono stati presi in considerazione nei nostri studi, ma non sono risultati riproducibili nel nostro sistema cellulare.

Una delle ipotesi più accreditate riguardante l'insulino resistenza cardiaca è che sia dovuta, almeno in parte, all'iperattivazione neuroormonale che si osserva durante scompenso cardiaco. Cipolletta et al⁴², hanno recentemente dimostrato che l'insulino resistenza indotta dalla stimolazione adrenergica, in HEK293, è mediata da GRK2 e che tale effetto è chinasi dipendente. Simili risultati sono stati osservati da Shahid et al³⁵, in cui il knockout di GRK2 in epatociti, mediante siRNA, incrementa la fosforilazione in Tyr e riduce quella in Ser di IRS1.

I nostri risultati *in vitro* si integrano perfettamente con queste ultime osservazioni, dimostrando che l'insulino resistenza cardiaca indotta da GRK2 è prevalentemente chinasi dipendente.

La capacita' di GRK2 di traslocare sulla membrane cellulari in seguito a stimolazione con ins e di ridurne attraverso fosforilazione il segnale intracellulare, cosi' come avviene per il segnale β -adrenergico, pone la questione di rivalutare e soprattutto di ampliare le funzioni svolte da questa molecola all'interno della cellula. In particolare, la capacita' di GRK2 di regolare il signalling intracellulare del sistema adrenergico, ed in generale dei recettori a sette domini transmembrana, si estende ai recettori ad attivita' tirosina chinasi come quello dell'insulina.

Non di meno, si puo' ascrivere a GRK2 una nuovo ruolo nella fisiopatologia dello scompenso cardiaco. Finora GRK2 e' stato considerato soprattutto per i fenomeni di desensitizzazione e riduzione della densita' dei recettori β adrenergici cardiaci che si verificano durante lo scompenso cardiaco, con conseguente riduzione della funzione ventricolare. I nostri dati evidenziano che tali fenomeni sono successivi all'alterazione del metabolismo cardiaco, di cui GRK2 appare esserne uno dei principali responsabili.

Possiamo speculare che il ruolo di GRK2 nella fisiopatologia dell'insufficienza cardiaca va ben oltre i fenomeni connessi con il depauperamento della gittata cardiaca e dei meccanismi di compensazione, ma connesso anche con piu' precoci fenomeni di modificazione molecolare ed adattamento metabolico.

La terapia genica con AAV6 β ARKct ha recentemente dimostrato in modelli animali, di essere un approccio efficace per il trattamento dell'insufficienza cardiaca post ischemica⁴³. Tuttavia questi dati si riferiscono ad un approccio piu' tardivo, quando i fenomeni di rimodellamento e di ridotta frazione di eiezione sono gia' evidenti.

I nostri dati evidenziano che un approccio precoce, successivo ad un evento ischemico, basato sulla modulazione dei livelli intracellulari e/o sulla inibizione della traslocazione di GRK2 sulla membrana, previene od almeno ritarda in maniera significativa la progressione dello scompenso cardiaco.

Approcci terapeutici gia' in uso, quali β -bloccanti, possono svolgere effetti benefici sul metabolismo cardiaco, tuttavia lo sviluppo di composti o approcci specifici, mirati a regolare l'attivita' o i livelli di GRK2, come dimostrato dalla terapia genica con AAV6 β ARKct, possono rappresentare un notevole progresso nella terapia e nella prognosi dell'insufficienza cardiaca.

Bibliografia

1. Francis GS. Neurohumoral mechanisms involved in congestive heart failure. *The American journal of cardiology*. Jan 11 1985;55(2):15A-21A.
2. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation*. Sep 29 1998;98(13):1329-1334.
3. Singh K, Communal C, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *Cardiovascular research*. Feb 2000;45(3):713-719.
4. Colucci WS, Sawyer DB, Singh K, Communal C. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. *Journal of cardiac failure*. Jun 2000;6(2 Suppl 1):1-7.
5. Braunwald E. The Denolin lecture. Congestive heart failure: a half century perspective. *European heart journal*. May 2001;22(10):825-836.
6. Horn M, Remkes H, Stromer H, Dienesch C, Neubauer S. Chronic phosphocreatine depletion by the creatine analogue beta-guanidinopropionate is associated with increased mortality and loss of ATP in rats after myocardial infarction. *Circulation*. Oct 9 2001;104(15):1844-1849.
7. Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, Pabst T, Ertl G, Hahn D, Ingwall JS, Kochsiek K. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. Oct 7 1997;96(7):2190-2196.
8. Neubauer S, Krahe T, Schindler R, Horn M, Hillenbrand H, Entzeroth C, Mader H, Kromer EP, Riegger GA, Lackner K, et al. ³¹P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure. *Circulation*. Dec 1992;86(6):1810-1818.
9. Kempainen J, Tsuchida H, Stolen K, Karlsson H, Bjornholm M, Heinonen OJ, Nuutila P, Krook A, Knuuti J, Zierath JR. Insulin signalling and resistance in patients with chronic heart failure. *The Journal of physiology*. Jul 1 2003;550(Pt 1):305-315.
10. Paolisso G, D'Amore A, Volpe C, Balbi V, Saccomanno F, Galzerano D, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism: clinical and experimental*. Nov 1994;43(11):1426-1429.
11. Paolisso G, Gambardella A, Galzerano D, D'Amore A, Rubino P, Verza M, Teasuro P, Varricchio M, D'Onofrio F. Total-body and myocardial substrate oxidation in congestive heart failure. *Metabolism: clinical and experimental*. Feb 1994;43(2):174-179.
12. Witteles RM, Tang WH, Jamali AH, Chu JW, Reaven GM, Fowler MB. Insulin resistance in idiopathic dilated cardiomyopathy: a possible etiologic link. *Journal of the American College of Cardiology*. Jul 7 2004;44(1):78-81.
13. Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular research*. Feb 15 2009;81(3):412-419.
14. Bittl JA, Ingwall JS. Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A ³¹P NMR magnetization transfer study. *The Journal of biological chemistry*. Mar 25 1985;260(6):3512-3517.

15. Taegtmeyer H, Wilson CR, Razeghi P, Sharma S. Metabolic energetics and genetics in the heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Jun 2005;1047:208-218.
16. Zhang J, Duncker DJ, Ya X, Zhang Y, Pavek T, Wei H, Merkle H, Ugurbil K, From AH, Bache RJ. Effect of left ventricular hypertrophy secondary to chronic pressure overload on transmural myocardial 2-deoxyglucose uptake. A ³¹P NMR spectroscopic study. *Circulation*. Sep 1 1995;92(5):1274-1283.
17. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *The New England journal of medicine*. Mar 15 2007;356(11):1140-1151.
18. Neubauer S, Horn M, Naumann A, Tian R, Hu K, Laser M, Friedrich J, Gaudron P, Schnackerz K, Ingwall JS, et al. Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. Mar 1995;95(3):1092-1100.
19. Conway MA, Allis J, Ouwerkerk R, Niioka T, Rajagopalan B, Radda GK. Detection of low phosphocreatine to ATP ratio in failing hypertrophied human myocardium by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Lancet*. Oct 19 1991;338(8773):973-976.
20. Hardy CJ, Weiss RG, Bottomley PA, Gerstenblith G. Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *American heart journal*. Sep 1991;122(3 Pt 1):795-801.
21. Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, Aziz S, Johnson JJ, Bugger H, Zaha VG, Abel ED. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes*. Oct 2007;56(10):2457-2466.
22. Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, Zaha VG, Ilkun O, Wright JJ, Mazumder PK, Palfreyman E, Tidwell TJ, Theobald H, Khalimonchuk O, Wayment B, Sheng X, Rodnick KJ, Centini R, Chen D, Litwin SE, Weimer BE, Abel ED. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation*. Mar 10 2009;119(9):1272-1283.
23. Taylor M, Wallhaus TR, Degrado TR, Russell DC, Stanko P, Nickles RJ, Stone CK. An evaluation of myocardial fatty acid and glucose uptake using PET with [¹⁸F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid and [¹⁸F]FDG in Patients with Congestive Heart Failure. *J Nucl Med*. Jan 2001;42(1):55-62.
24. Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation*. Jul 24 2007;116(4):434-448.
25. Suskin N, McKelvie RS, Burns RJ, Latini R, Pericak D, Probstfield J, Rouleau JL, Sigouin C, Solymoss CB, Tsuyuki R, White M, Yusuf S. Glucose and insulin abnormalities relate to functional capacity in patients with congestive heart failure. *European heart journal*. Aug 2000;21(16):1368-1375.
26. Kostis JB, Sanders M. The association of heart failure with insulin resistance and the development of type 2 diabetes. *American journal of hypertension*. May 2005;18(5 Pt 1):731-737.
27. Paolisso G, De Riu S, Marrazzo G, Verza M, Varricchio M, D'Onofrio F. Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic congestive heart failure. *Metabolism: clinical and experimental*. Sep 1991;40(9):972-977.

28. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes*. Jul 2002;51(7):2005-2011.
29. Harris CA, Chuang TT, Scorer CA. Expression of GRK2 is increased in the left ventricles of cardiomyopathic hamsters. *Basic research in cardiology*. Jul 2001;96(4):364-368.
30. Maurice JP, Shah AS, Kypson AP, Hata JA, White DC, Glower DD, Koch WJ. Molecular beta-adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit hearts after infarction. *The American journal of physiology*. Jun 1999;276(6 Pt 2):H1853-1860.
31. Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*. Feb 1993;87(2):454-463.
32. Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Cell*. Aug 13 1993;74(3):409-412.
33. Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, Koch WJ. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *European heart journal*. Sep 2005;26(17):1752-1758.
34. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. Jan 10 2002;415(6868):206-212.
35. Shahid G, Hussain T. GRK2 negatively regulates glycogen synthesis in mouse liver FL83B cells. *The Journal of biological chemistry*. Jul 13 2007;282(28):20612-20620.
36. Usui I, Imamura T, Satoh H, Huang J, Babendure JL, Hupfeld CJ, Olefsky JM. GRK2 is an endogenous protein inhibitor of the insulin signaling pathway for glucose transport stimulation. *The EMBO journal*. Jul 21 2004;23(14):2821-2829.
37. Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T. Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *The Journal of biological chemistry*. Nov 26 1999;274(48):34483-34492.
38. Stoffel RH, 3rd, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. *The Journal of membrane biology*. May 1 1997;157(1):1-8.
39. Usui I, Imamura T, Babendure JL, Satoh H, Lu JC, Hupfeld CJ, Olefsky JM. G protein-coupled receptor kinase 2 mediates endothelin-1-induced insulin resistance via the inhibition of both Galphaq/11 and insulin receptor substrate-1 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. Nov 2005;19(11):2760-2768.
40. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, Rockey DC. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nature medicine*. Sep 2005;11(9):952-958.
41. Morino K, Neschen S, Bilz S, Sono S, Tsigotis D, Reznick RM, Moore I, Nagai Y, Samuel V, Sebastian D, White M, Philbrick W, Shulman GI. Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes*. Oct 2008;57(10):2644-2651.

42. Cipolletta E, Campanile A, Santulli G, Sanzari E, Leosco D, Campiglia P, Trimarco B, Iaccarino G. The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta-adrenergic receptor-induced insulin resistance. *Cardiovascular research*. Dec 1 2009;84(3):407-415.
43. Rengo G, Lympelopoulos A, Zincarelli C, Donniacuo M, Soltys S, Rabinowitz JE, Koch WJ. Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation*. Jan 6 2009;119(1):89-98.

Figura 1

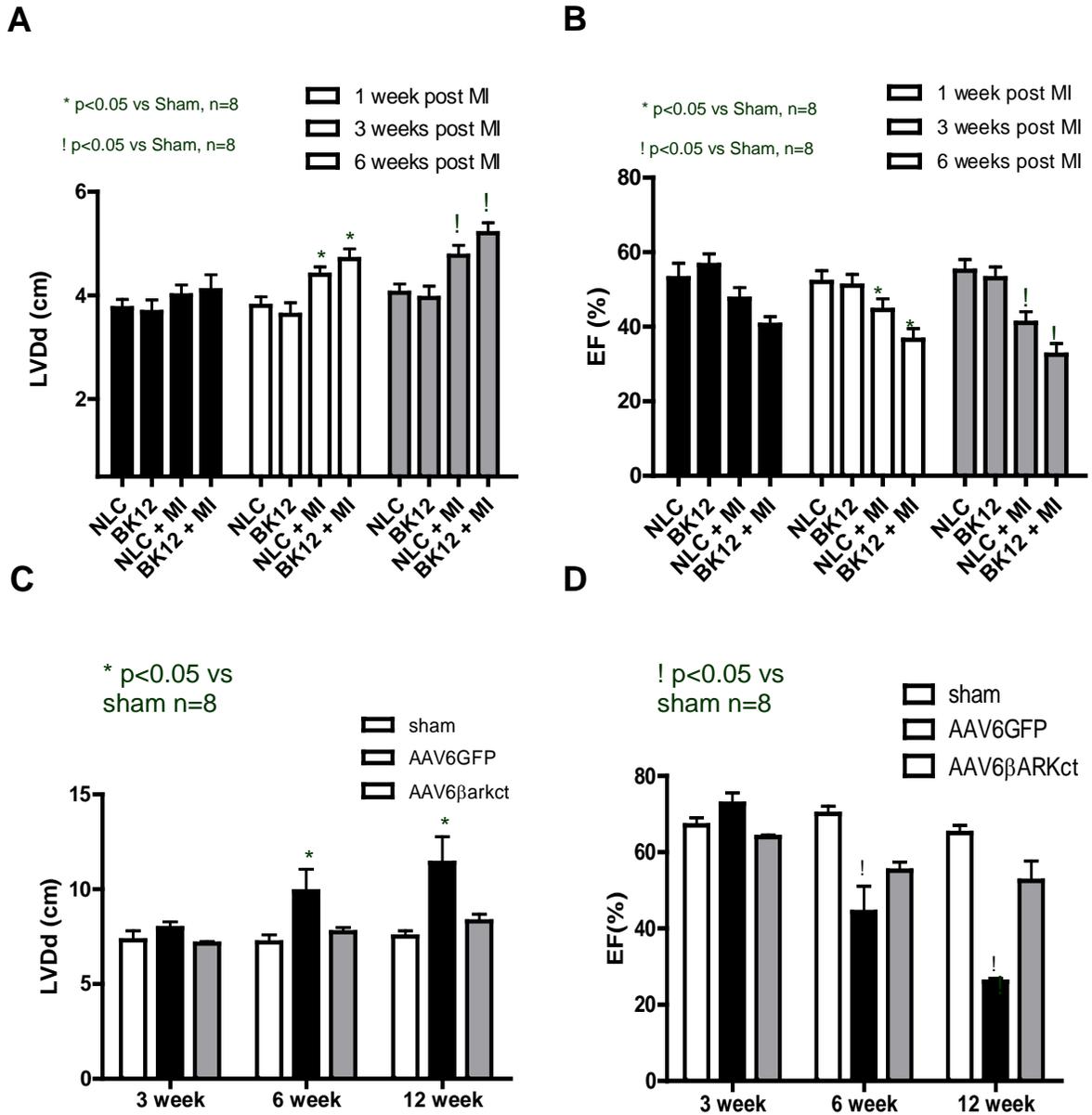


Figura 2

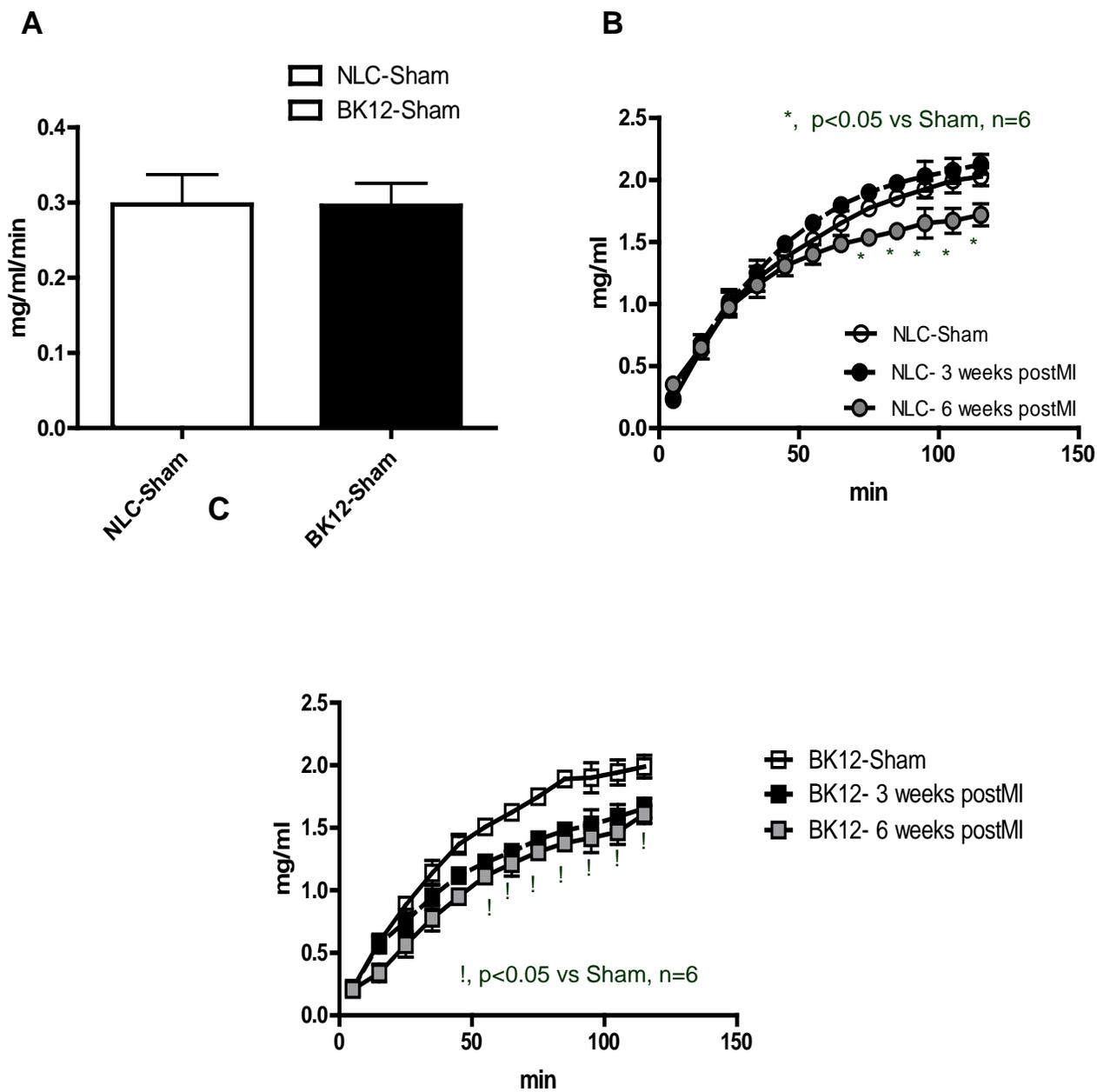
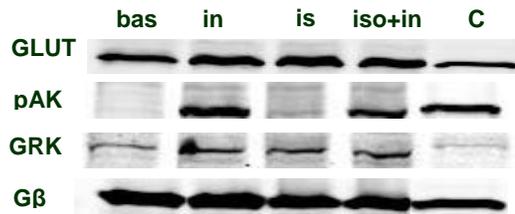
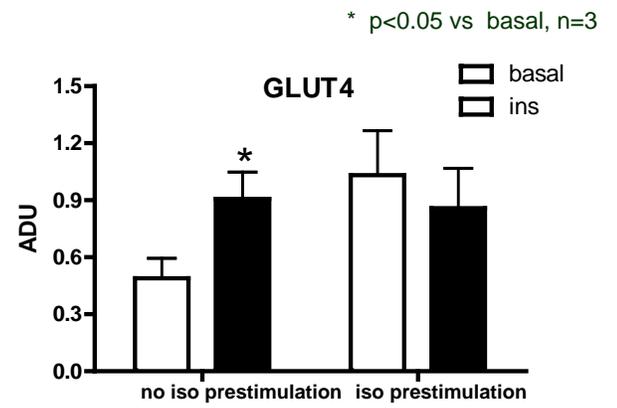


Figura 3

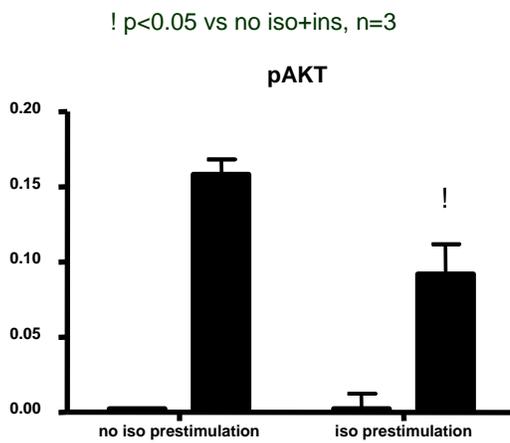
A



B



C



D

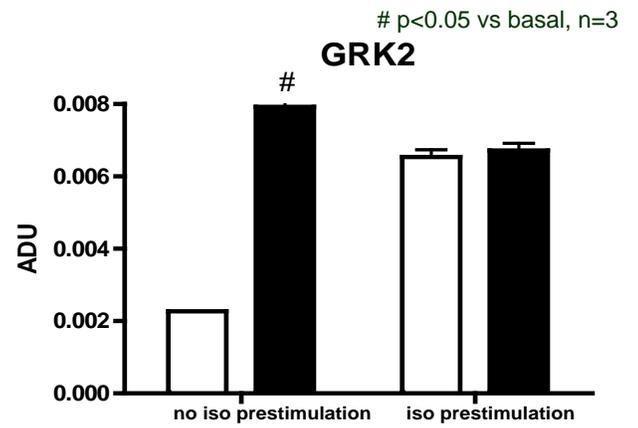
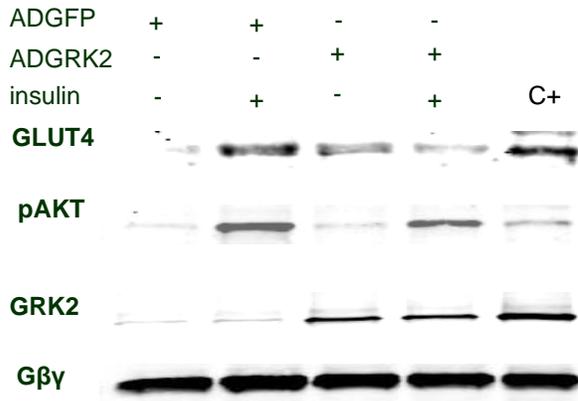
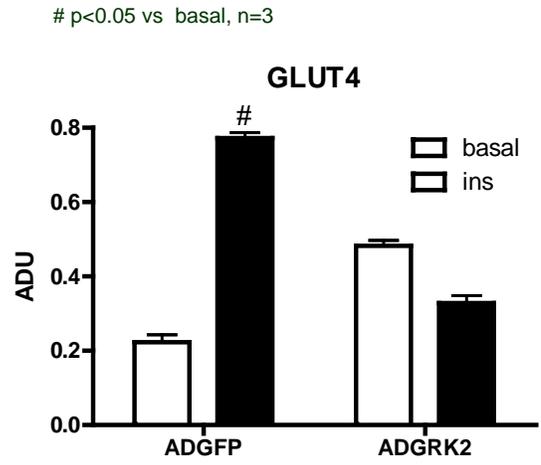


Figura 4

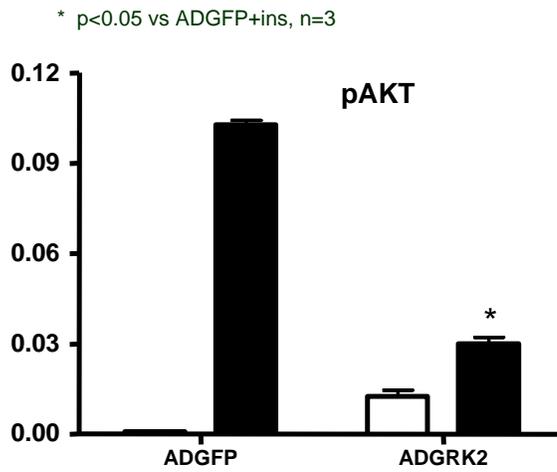
A



B



C



D

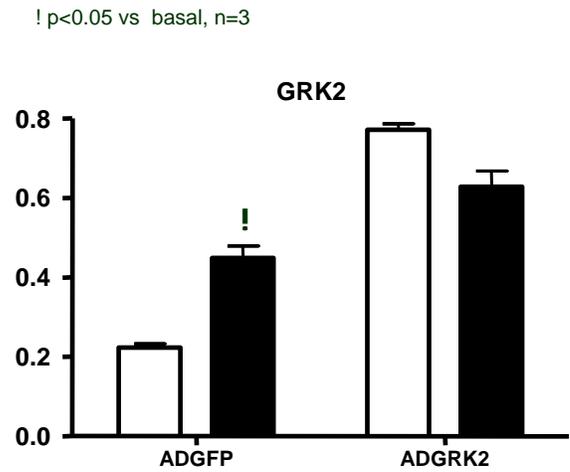


Figura 5

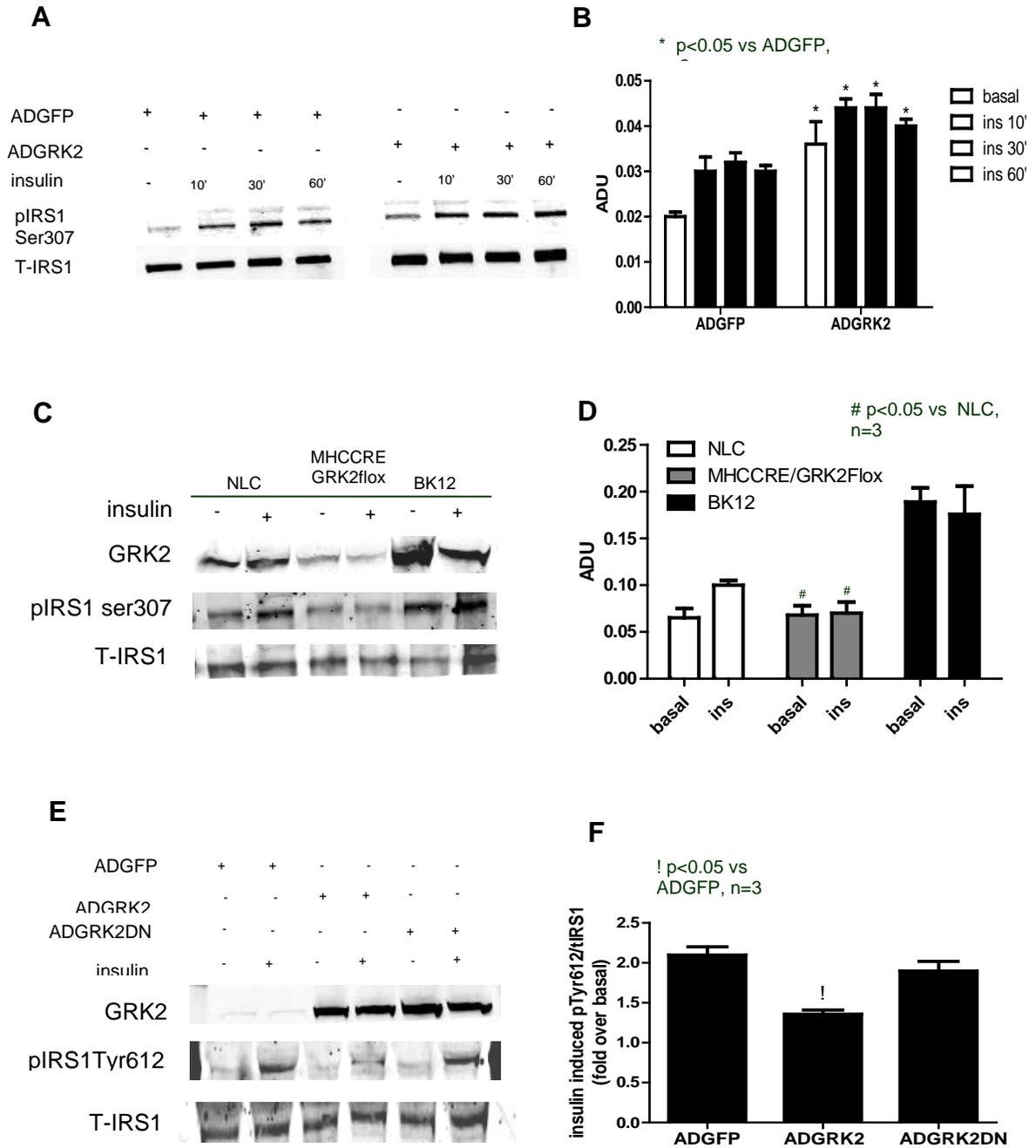


Figure 6

