

Università degli Studi di Napoli Federico II

Dottorato di Ricerca in

Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

XXV Ciclo



Tesi di Dottorato

**GRK2 svolge un ruolo cruciale nella regolazione della funzione
endoteliale *in vivo* ed *in vitro* attraverso la modulazione del
signaling del recettore β_2 -adrenergico**

Tutor

Ch.mo

Prof. Dario Leosco

Candidata

Dott.ssa Daniela Liccardo

Anno accademico 2011/2012

INDICE

Introduzione	Pag. 3
Metodi	Pag. 7
<i>Modello animale di ischemia periferica</i>	Pag. 8
<i>Binding recettoriale dei recettori beta adrenergici</i>	Pag. 8
<i>Colture Cellulari</i>	Pag. 9
<i>Costrutti adenovirali</i>	Pag. 9
<i>Infezioni adenovirali in vitro</i>	Pag. 9
<i>Wound-Healing assay</i>	Pag. 10
<i>Saggio di proliferazione mediante incorporazione di BrdU</i>	Pag. 10
<i>Immunoblot</i>	Pag. 11
<i>Microscopia confocale</i>	Pag. 11
<i>In vivo gene delivery</i>	Pag. 12
<i>Analisi del flusso ematico</i>	Pag. 12
<i>Istologia</i>	Pag. 13
<i>Analisi Statistiche</i>	Pag. 14
Risultati	Pag. 15

<i>I livelli di espressione di GRK2 aumentano in risposta all'ischemia.....</i>	Pag. 16
<i>GRK2 regola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali.....</i>	Pag. 16
<i>GRK2 regola la funzione dei recettori β2AR nelle cellule endoteliali in vitro..</i>	Pag. 17
<i>GRK2 modula il signaling dei β2AR nelle cellule endoteliali in vitro.....</i>	Pag. 18
<i>La modulazione di GRK2 in un modello animale di ischemia periferica.....</i>	Pag. 19
Discussione.....	Pag. 22
Bibliografia.....	Pag. 26
Legenda alle Figure.....	Pag. 32
Figura 1.....	Pag. 37
Figura 2.....	Pag. 38
Figura 3.....	Pag. 39
Figura 4.....	Pag. 40
Figura 5.....	Pag. 41
Figura 6.....	Pag. 42

INTRODUZIONE

L'angiogenesi è un processo biologico che permette la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti (1). In condizioni fisiologiche l'angiogenesi avviene durante lo sviluppo embrionale, la gravidanza, il ciclo ovarico o può riattivarsi in diverse condizioni patologiche inclusa l'ischemia, l'infiammazione, i tumori, e le retinopatie diabetiche (2-3).

La formazione di nuovi vasi è regolata dall'attivazione, proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali (EC) (4). Un ruolo cruciale nella regolazione di tali fenomeni è svolto dal recettore beta 2 adrenergico (β_2 AR), il sottotipo beta adrenergico maggiormente espresso in tali cellule (5). In particolare le catecolammine, prodotte anche dalle stesse cellule endoteliali attivano il recettore β_2 AR in maniera autocrina/paracrina inducendo una risposta angiogenica Akt-dipendente.(6-7).

Studi recenti hanno dimostrato che in seguito ad ischemia periferica l'angiogenesi indotta dall'ipossia è riattivata al fine di compensare al ridotto apporto ematico (8) ma risulta comunque diminuita ed inadeguata a preservare l'integrità e la funzionalità tissutale. La riduzione della risposta angiogenica in seguito ad ischemia è correlata almeno in parte alla ridotta densità di membrana del recettore β_2 AR nelle cellule endoteliali. A tal proposito il ripristino dei livelli membranali di β_2 AR rappresenta un probabile e nuovo approccio terapeutico per migliorare la rivascolarizzazione post ischemica (9). Difatti in modelli animali di scompenso cardiaco, una condizione patologica caratterizzata dalla disfunzione dei recettori beta adrenergici, è stato dimostrato che l'overespressione del β_2 AR produce importanti effetti protettivi attraverso l'attivazione dei meccanismi molecolari proangiogenici che incrementano la perfusione e migliorano la funzione ed il rimodellamento cardiaco (10). Inoltre, in un

modello sperimentale di ischemia periferica la terapia genica con adenovirus codificante per il recettore β_2 AR aumenta la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali migliorando l'angiogenesi indotta dall'ischemia (9).

Il ruolo del recettore β_2 AR nel controllo dell'angiogenesi in seguito ad ischemia periferica, è stato recentemente dimostrato in animali knockout per tale recettore i quali presentano una ridotta neovascolarizzazione post ischemica che risulta ripristinata in seguito all'iniezione intravasale di adenovirus codificante per il β_2 AR (11).

Nel cuore è stato ampiamente dimostrato come la chinasi 2 dei recettori accoppiati alle proteine G (GRK2) abbia un ruolo molecolare centrale nella regolazione dei recettori beta adrenergici (β AR) e nella modulazione della funzione cardiaca *in vivo* (12-13). In particolare GRK2 fosforila in maniera specifica i recettori attivati dall'agonista inducendone desensibilizzazione e downregulation (14). Inoltre nello scompenso cardiaco, l'aumentata espressione/attività di GRK2 porta al disaccoppiamento dei β AR e alla riduzione della funzione diastolica e sistolica ventricolare (15). E' noto inoltre che la modulazione dell'espressione/attività di GRK2 mediante il peptide inibitore β ARKct, è in grado di migliorare la risposta cardiaca all'ischemia. In particolare β ARKct inibisce la traslocazione in membrana di GRK2 endogena incrementando la densità recettoriale dei β AR e favorendo il signaling procontrattile Gs/PKA mediato (16).

Ad oggi non è stato ancora chiarito il meccanismo alla base della disfunzione dei recettori β_2 AR in corso di ischemia periferica, pertanto lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare se la chinasi GRK2 possa avere un ruolo nel'alterazione della funzione del β_2 AR nelle cellule endoteliali e se la modulazione dell'espressione/attività

di questa chinasi *in vivo* ed *in vitro* possa migliorare la funzione recettoriale e quindi l'angiogenesi post ischemica.

METODI

Il protocollo di studio è stato disegnato in accordo con “The guide for care and use of laboratory animals” del “National Institutes of health” (NIH Publication No 85-23, rivised 1996) ed è stato approvato dal “Comitato etico per l’utilizzo degli animali nella ricerca” del nostro istituto.

Modello animale di ischemia periferica

L’ischemia periferica è stata indotta in ratti maschi adulti Wistar Kyoto (300 gr.) mediante recisione dell’arteria femorale comune sinistra. Ratti adulti di 12 mesi (n=5) sono stati anestetizzati con una miscela di ketamina (50mg/kg) e xilazina (0.5 mg/Kg), l’arteria femorale è stata isolata mediante una incisione chirurgica a livello della porzione centrale dell’arto posteriore sinistro e legata in due punti. Successivamente la porzione compresa tra la legatura prossimale e quella distale è stata escissa. Quindici giorni dopo la chirurgia, è stato valutato il trofismo dell’arto ischemico in tutti gli animali operati (ratti con ischemia periferica, IP). Gli animali Sham operati sono stati sottoposti alla stessa procedura senza legatura ed escissione dell’artera femorale comune sinistra (Sham, n=5).

Binding recettoriale dei recettori beta adrenergici

Le membrane plasmatiche sono state ottenute dai muscoli scheletrici espianati come precedentemente descritto (17). Le frazioni membranali sono state utilizzate per studi di legame di radioligandi per i recettori β AR usando il ligando antagonista non selettivo [125I]-Cyanopindololo (125I-CYP) come precedentemente descritto (18) e

l'antagonista β_2 AR selettivo, ICI 118,551 (ICI). I dati sono stati analizzati mediante il programma GraphPad Prism.

Colture Cellulari

Cellule endoteliali di aorta bovina (BAEC, Lonza, Basel, DE) sono state tenute nel mezzo di coltura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) con siero fetale bovino (FBS) 10%, 200mg/ml L-Glutamina, 100 unita/ml penicillina e 100 unità/ml streptomicina (mezzo completo) a 37°C in un atmosfera di CO₂ al 5%. Per tutti gli esperimenti, le BAEC non sono mai state utilizzate oltre il 14° passaggio.

Costrutti adenovirali

Per gli esperimenti *in vivo* ed *in vitro* sono stati utilizzati costrutti adenovirali codificanti per l'intera proteina GRK2 bovina (Ad-GRK2) o solo per l'estremità C-terminale costituita da 194 amminoacidi, denominata β ARKct (Ad- β ARKct). Un adenovirus codificante per la proteina *green fluorescent protein* (GFP) (Ad-GFP) è stato inoltre usato come controllo dell'infezione virale.

Infezioni adenovirali in vitro

Cellule BAEC, (confluenza 50-60%), sono state infettate con adenovirus codificante per GRK2, β ARKct o GFP (MOI= 100 pfu/cell) per 4 ore a 37%. Le cellule sono state incubate in mezzo completo fresco per ulteriori 24 h prima di procedere ai successivi esperimenti.

Wound-Healing assay

Il saggio *wound-healing assay* è stato eseguito in piastre 12-well per colture cellulari. Dopo 24 ore dalle infezioni adenovirali le cellule sono state parzialmente rimosse eseguendo un taglio del monostrato con un puntale sterile per pipette (100µl). Successivamente le cellule sono state lavate con PBS e riposte in mezzo di coltura DMEM + FBS 2% in presenza o meno dell'agonista β_2 AR selettivo, fenoterolo (fenoterolo idrobromide, Sigma Aldrich,USA) 10µM e successivamente fissate in paraformaldeide 3,7%. In seguito alla fissazione le cellule sono state colorate con crystal violet 0,1%. ed osservate mediante l' utilizzo di un microscopio invertito Nikon TE2000-U connesso ad una fotocamera Nikon. Da ogni immagine acquisita è stata quantificata la migrazione cellulare misurando la distanza tra le estremità del taglio in 10 punti scelti casualmente utilizzando il software ImageJ. I dati ottenuti sono stati normalizzati rispetto all'ampiezza del taglio delle cellule di controllo fissate subito dopo la rimozione meccanica di cellule dal monostrato.

Saggio di proliferazione mediante incorporazione di BrdU

Un'analisi quantitativa della sintesi di Dna è stata eseguita utilizzando il kit ELISA 5-bromo-2'-deossiuridina (Roche,USA) secondo le istruzioni. Brevemente, dopo 24 h dall'infezione virale, BrdU è stata aggiunta al mezzo ad una concentrazione finale di 10µM, e le cellule sono state incubate per 6 o 24 h. Il nuovo DNA sintetizzato con BrdU è stato quantificato mediante un saggio colorimetrico. La quota di cellule proliferanti è rappresentato dai livelli di incorporazione di BrdU che sono direttamente

correlati all'intensità del colore e ai valori di assorbanza rilevati alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Immunoblot

I campioni di cellule e di muscolo scheletrico sono stati lisati in RIPA buffer con inibitori di fosfatasi e di proteasi (Roche,USA). In tutti i lisati la concentrazione proteica è stata quantificata mediante un saggio colorimetrico e rilevata alla lunghezza d'onda di 750 nm (Bio-Rad, USA). Mediante western blotting sono stati valutati i livelli proteici di GRK2 (ab anti-GRK2, Santa Cruz Biotechnology, Inc. ,USA 1:1000), β_2 AR (ab anti- β_2 AR EMD Millipore Corporation, Billerica, MA,USA 1:1000) phospho β_2 AR (ab anti- phospho β_2 AR, Santa Cruz Biotechnology, Inc. ,USA 1:1000), GFP (ab anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology, Inc. ,USA 1:1000) e GAPDH (ab anti-GAPDH EMD Millipore Corporation, Billerica, MA,USA 1:1000) utilizzando anticorpi secondari HRP-coniugati (Amersham Life Sciences Inc.). La chemiluminescenza è stata acquisita e quantificata mediante il sistema di acquisizione Chemidoc, Bio-Rad, USA. Ogni esperimento e quantizzazione densitometrica è stato ripetuto almeno tre volte.

Microscopia confocale

Per gli studi di microscopia confocale, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 3% in PBS pH 7.4 e successivamente lavate in PBS per tre volte. Le cellule sono state in seguito incubate con un anticorpo anti- β_2 AR (Cruz Biotechnology, Inc. ,USA 1:200) in BSA 1% ed in seguito con un anticorpo secondario Texas Red coniugato 1:200 (Sigma, USA). La visualizzazione è stata eseguita mediante un microscopio confocale a

scansione laser (Zeiss 510 confocal laser scanning microscope) ad una lunghezza d'onda di 568 nm (Cy3) e l'espressione della proteina GFP è stata visualizzata ad una lunghezza d'onda di 488 nm (GFP). I dati di fluorescenza sono stati analizzati attraverso il software LSM 510. Ogni esperimento è stato ripetuto separatamente almeno tre volte.

In vivo gene delivery

Ratti maschi adulti Wistar Kyoto sono stati anestetizzati con una miscela di ketamina (50mg/kg) e xilazina (0.5 mg/Kg) ed in seguito l'arteria femorale sinistra è stata isolata e rimossa. In quattro gruppi di ratti è stato inserito un catetere nella porzione distale dal taglio attraverso il quale è stato iniettata una soluzione contenente 10^{11} tvp di un adenovirus codificante per GRK2 (n=7), β ARKct (n=7), o per GFP (n=7), od un veicolo (soluzione salina, n=7). Dopo 30 minuti le soluzioni contenenti i virus sono state rimosse. Un gruppo di animali, sottoposto alla procedura chirurgica ma non alla recisione dell'arteria femorale (sham, n=7) è stato inserito nello studio. Con questa tecnica si assicura l'espressione transgenica adenovirale nelle cellule endoteliali.

Analisi del flusso ematico

Il flusso sanguigno nell'arteria tibiale posteriore dell'arto ischemico e non ischemico è stato valutato mediante ultrasound (US) Doppler (Visual Sonic VeVo 770 system) precedentemente, immediatamente dopo e a 3, 7, 10 e 15 giorni dalla chirurgia. I dati sono espressi come rapporto tra i valori di flusso dell'arto ischemico/arto non ischemico. Quindici giorni dopo l'intervento chirurgico la perfusione è stata anche saggiata con la metodica delle dyed beads come precedentemente descritto (19).

Istologia

Campioni di tessuto sono stati prelevati e fissati in formalina per almeno 24 ore ed inclusi in paraffina in seguito a disidratazione in alcol a concentrazioni crescenti. Per le valutazioni istochimiche sono state utilizzate fette di tessuto dello spessore di 5µm. Le analisi immunoistochimiche (metodo avidina-biotina-perossidasi complex/diamminobenzidine, ABC/DAB; Thermo scientific, Pierce protein research, Rockford, IL, USA) sono state eseguite utilizzando l' anticorpo policlonale anti-GRK2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. ,USA 1:200). Le sezioni sono state infine contrastate con ematossilina. I controlli negativi (Bianco) sono stati ottenuti in assenza di anticorpo primario.

La densità capillare è stata valutata utilizzando lectina biotinilata di *Bandeiraea simplicifolia* (Sigma, St. Louis, MO) ed il sistema di amplificazione del segnale con Tiramide (TSA-Biotin System Kit, Perkin Elmer Life Sciences, MA). Il segnale specifico di legame alle cellule endoteliali dei capillari è stato rivelato mediante Streptavidina-Perossidasi coniugata ed il substrato DAB. Tutte le sezioni istologiche sono state esaminate con un microscopio ottico (Leitz, Diaplan) e le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale (Digital JVC, TK-C1380).

Per ogni animale dei diversi gruppi sperimentali sono state saggiate 5 sezioni di tessuto. Nell'analisi sono stati considerati i capillari di diametro compreso tra 5 e 15 µm. Per ogni sezione sono stati valutati 20 campi in cieco da due differenti operatori. Successivamente sono state calcolate le medie dei valori ottenuti dalle diverse misurazioni. I valori finali sono stati espressi come rapporto tra numero di capillari e miociti.

Analisi Statistiche

I dati sono stati espressi come medie \pm errore standard (SEM). Le comparazioni sono state eseguite secondo il test T o ANOVA, come appropriato. La correzione di Bonferroni è stata applicata quando sono state necessarie comparazioni multiple. I valori con $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

RISULTATI

I livelli di espressione di GRK2 aumentano in risposta all'ischemia

Nel cuore è noto come GRK2 regoli la funzione dei recettori β_2 AR; ad oggi nessun ruolo per questa chinasi è stato dimostrato in corso di ischemia periferica. Pertanto abbiamo indotto l'ischemia dell'arto posteriore in ratti Wistar Kyoto mediante resezione dell'arteria femorale comune sinistra. Quindici giorni dopo l'ischemia abbiamo analizzato i livelli proteici di GRK2 nell'arto ischemico mediante western blotting. Come mostrato in figura 1A, i livelli di GRK2 risultavano essere fortemente aumentati nei lisati ottenuti dagli animali con ischemia periferica rispetto ai gruppi Sham suggerendo un ruolo per tale chinasi in corso di ischemia. Successivamente abbiamo misurato la densità di membrana dei recettori β AR nell'arto ischemico. Gli animali ischemici mostravano una riduzione dei livelli membranali dei recettori β AR rispetto agli animali Sham (Fig. 1B). Tale riduzione era dovuta principalmente alla downregulation dei recettori β_2 AR, come mostrato in figura 1C.

GRK2 regola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali

Dato che i nostri risultati *in vivo* mostrano che GRK2 è upregolata in risposta all'ischemia dell'arto, abbiamo valutato se la modulazione dell'espressione/attività di GRK2 nelle cellule endoteliali (EC) *in vitro* inducesse effetti rilevanti sulla migrazione e/o proliferazione di tali cellule. A tale scopo, cellule endoteliali di aorta bovina (BAEC) sono state infettate con adenovirus (Ad) codificanti per GRK2 (Ad-GRK2) o β ARKct (Ad- β ARKct). Come controllo abbiamo utilizzato un gruppo di cellule infettato con Ad-GFP ed un gruppo non infettato (C), (Fig. 2A). La migrazione delle EC è stata valutata mediante il saggio wound healing scratch assay in presenza o meno

dell'agonista β_2 AR selettivo, Fenoterolo (10 μ M). In questo e nei successivi esperimenti *in vitro* il gruppo di controllo (CTR) è costituito dall'unione dei dati ottenuti dalle cellule infettate con Ad-GFP e dalle cellule non infettate in quanto non è stata osservata alcuna differenza tra i due gruppi. Come mostrato in figura 2B, in assenza di stimolo, l'overespressione di GRK2 risultava in una significativa riduzione della migrazione rispetto al controllo (CTR), mentre β ARKct aumentava la migrazione cellulare. Inoltre la stimolazione cronica con fenoterolo non produceva effetti rilevanti in termini di migrazione nelle cellule overesprimenti GRK2 rispetto alle cellule di controllo. Tuttavia la presenza di β ARKct portava ad un marcato aumento della migrazione in seguito alla stimolazione con fenoterolo (Fig. 2B). Al fine di testare gli effetti proliferativi del fenoterolo sulle EC è stato eseguito un saggio di incorporazione di BrdU dopo 6 o 24 ore di stimolazione selettiva del recettore β_2 AR (Fig. 2C). Tale saggio ha mostrato che nelle cellule overesprimenti GRK2 non si osservava alcun aumento di proliferazione se comparato alle cellule controllo che invece mostravano un significativo incremento. Tuttavia la presenza del peptide β ARKct aumentava ulteriormente la capacità proliferativa delle EC risultando quindi in una migliore risposta del recettore β_2 AR alla stimolazione con fenoterolo (Fig. 2C).

GRK2 regola la funzione dei recettori β_2 AR nelle cellule endoteliali in vitro

Dato che abbiamo dimostrato che GRK2 è in grado di modulare la funzione delle EC in presenza dell'agonista β_2 AR selettivo, abbiamo ipotizzato che tale chinasi possa avere un ruolo nella regolazione del recettore β_2 AR. Sulla base di questa ipotesi è stata valutata a livello molecolare l'attivazione del signaling β_2 AR in seguito alla

modulazione dell'espressione/attività di GRK2. Mediante esperimenti di microscopia confocale abbiamo osservato la localizzazione del recettore β_2AR in seguito alla stimolazione con fenoterolo (10 μ M) a 30 minuti e a 6 ore. La stimolazione con fenoterolo induceva una consistente internalizzazione con una localizzazione citoplasmatica del recettore sia nelle cellule di controllo che nelle cellule overesprimenti GRK2 (Fig. 3A-B) mentre l'espressione di $\beta ARKct$ preveniva l'internalizzazione recettoriale sia dopo 30 minuti che dopo 6 ore di stimolazione.

GRK2 modula il signaling dei β_2AR nelle cellule endoteliali in vitro

I livelli proteici di GRK2 e la fosforilazione GRK2-mediata dei recettori β_2AR ($p\beta_2AR$) sono stati definiti mediante western blotting dopo 30 minuti e dopo 6 h di stimolazione con fenoterolo. Inoltre è stata valutata l'attivazione di Akt ($pAkt$) in quanto questa chinasi ha un ruolo cruciale nel signaling pro-angiogenico indotto dal recettore β_2AR (20). Come mostrato in figura 4A, 30 minuti di stimolazione non portavano ad una significativa upregulation di GRK2 nelle cellule di controllo e nelle cellule esprimenti $\beta ARKct$. Mentre l'infezione con Ad-GRK2 produceva un'importante overespressione di questa chinasi. Nelle cellule non stimolate non si apprezzava inoltre alcuna differenza in termini di fosforilazione del recettore β_2AR e di Akt (Fig. 4B-C). In risposta alla stimolazione con fenoterolo, invece, le cellule di controllo mostravano un'incremento di fosforilazione di β_2AR che risultava ulteriormente aumentata nelle cellule overesprimenti GRK2 (fig4B). Nelle cellule esprimenti $\beta ARKct$, non si evidenziava una consistente fosforilazione recettoriale rispetto alle cellule non stimolate ed inoltre sia nelle cellule di controllo che nel gruppo $\beta ARKct$, Akt era altamente fosforilata, mentre

non si apprezzava attivazione di tale chinasi nelle cellule overesprimenti GRK2. Questi dati mostrano quindi che GRK2 è in grado di indurre una consistente downregulation dei recettori β_2 AR incidendo sul signaling proangiogenico. In seguito ad una stimolazione cronica di 6 ore i livelli di GRK2 risultavano fortemente aumentati nelle cellule di controllo (Fig. 4D) e inducevano una maggiore fosforilazione del recettori β_2 AR sia nelle cellule di controllo che nelle cellule GRK2. Parallelamente all'incremento della fosforilazione recettoriale si osservava una riduzione dell'attivazione di Akt (Fig. 4E). Diversamente le cellule esprimenti β ARKct mostravano un ridotto incremento sia dell'espressione di GRK2 che dei livelli di p β_2 AR rispetto ai controlli e alle cellule infettate con Ad-GRK2 (Fig. 4D-E), inoltre la presenza del peptide era in grado di preservare la funzione del recettore β_2 AR portando ad una consistente attivazione di Akt (Fig. 4F)

La modulazione di GRK2 in un modello animale di ischemia periferica

Avendo dimostrato per la prima volta che GRK2 è upregolata nell'arto ischemico e che la sua modulazione *in vitro* regola la funzione β_2 AR ed il suo signaling proangiogenico, abbiamo valutato gli effetti della modulazione di GRK2 sulla neovascolarizzazione in un modello animale di ischemia periferica. A questo scopo ratti Wistar Kyoto sono stati sottoposti ad ischemia periferica (n=28), nello studio sono stati inclusi inoltre 7 animali Sham. Al tempo dell'operazione gli animali sono stati randomizzati in 4 gruppi e ricevevano nell'arteria femorale sinistra adenovirus codificante per GRK2, β ARKct. Animali riceventi adenovirus codificante per GFP o un veicolo (soluzione salina) sono stati utilizzati come controllo. Il giorno seguente all'intervento chirurgico è stata

valutata la rivascolarizzazione dell'arto ischemico mediante US Doppler, tale analisi è stata ripetuta a più tempi per l'intera durata dello studio (Fig. 5A). Dopo 15 giorni dall'intervento chirurgico e dalla terapia genica, è stata verificata l'espressione adenovirale che risultava localizzata prevalentemente a livello endoteliale (Fig. 5B-C). Come mostrato in figura 6A subito dopo la resezione dell'arteria femorale si osservava l'interruzione della perfusione dell'arto che nell'arco dei 15 giorni risulta minimamente recuperata rispetto all'arto non ischemico. L'overespressione adenovirale di GRK2 peggiorava la rivascolarizzazione dell'arto ischemico mentre la presenza del peptide inibitore β ARKct ne migliorava la perfusione (Fig. 6A). Un risultato sovrapponibile a quanto osservato con US Doppler è stato ottenuto dall'analisi di vascolarizzazione dell'arto ischemico alla fine dello studio attraverso l'uso di Dyed Beads (Fig. 6B). In linea con questi dati le valutazioni istologiche ottenute sul muscolo scheletrico gastrocnemio rivelavano che l'ischemia dell'arto induceva la rarefazione della densità capillare nei gruppi ischemici di controllo, e che tale riduzione era accentuata nei gruppi riceventi Ad-GRK2 mentre la presenza di β ARKct ripristinava completamente la capillarizzazione dell'arto (Fig. 6C). Dato che abbiamo dimostrato che in seguito ad ischemia periferica β_2 AR è downregolato nell'arto ischemico e che GRK2 ha un ruolo cruciale nella regolazione della funzione di questo recettore abbiamo valutato se il miglioramento della perfusione e vascolarizzazione indotta da Ad- β ARKct potesse avvenire attraverso il ripristino della funzione del recettore β_2 AR. A questo scopo abbiamo saggiato la densità di membrana dei recettori β AR nell'arto ischemico (Fig. 6D) ed abbiamo osservato che l'utilizzo di adenovirus codificante per GRK2 riduceva ulteriormente la densità di membrana di tali recettori ed in maniera specifica dei

recettori β_2 AR (fig 6E), il sottotipo dei recettori beta adrenergici maggiormente espresso a livello vasale, mentre β ARKct ripristinava la densità plasmatica dei recettori β_2 AR preservandone la funzione in accordo con quanto osservato nei nostri esperimenti *in vitro*.

DISCUSSIONE

L'arteriopatia ostruttiva periferica (AOP), causate principalmente da aterosclerosi, rappresenta un problema che interessa il 10-15 % della popolazione adulta. In uno stato avanzato, l'AOP è caratterizzata da dolore a riposo e ulcerazione o gangrena dei tessuti ischemici, definita come Ischemia critica dell'arto (21) e può portare a difficoltà di deambulazione fino ad amputazione delle dita, dei piedi o dell'intero arto (22). La progressione verso l'ischemia periferica critica è principalmente dovuta ad una ridotta efficienza della rete di vasi collaterali la quale è strettamente dipendente dalla formazione di nuovi capillari da vasi preesistenti. Per questo motivo l'angiogenesi terapeutica risulta essere una strategia innovativa per il trattamento dei pazienti con AOP e la terapia genica è considerata un potenziale metodo per indurre angiogenesi in pazienti con patologie cardiovascolari di natura ischemica (23-28). Recentemente è stato dimostrato il ruolo cruciale del recettore β_2 AR nell'indurre angiogenesi *in vivo* e nel regolare la funzione endoteliale *in vitro* (29). In seguito ad ischemia periferica il recettore β_2 AR nel muscolo ischemico è downregolato e ad oggi non è stato descritto nessun meccanismo alla base della sua disfunzione.

E' noto che GRK2 ha un ruolo fondamentale nella regolazione della funzione dei recettori β_2 AR nella patofisiologia cardiaca (30), in particolare è stato dimostrato che le terapie che inibiscono questa chinasi risultano benefiche nelle patologie cardiache (31).

Nel presente studio abbiamo dimostrato che in risposta all'ischemia, indotta chirurgicamente in ratto mediante resezione dell'arteria femorale, i livelli di GRK2 risultano aumentati di circa due volte nell'arto ischemico ed inoltre la densità di membrana dei recettori β AR, ed in particolare dei β_2 AR è fortemente ridotta suggerendo per questa chinasi un'importante funzione nella fisiopatologia dell'ischemia periferica.

In vitro, inoltre, abbiamo osservato che l'overespressione di GRK2, indotta sia mediante stimolazione cronica con fenoterolo (agonista β_2 AR) che mediante infezione di cellule endoteliali con Ad-GRK2, riduce nettamente la migrazione e la proliferazione di tali cellule.

A livello molecolare la riduzione della funzione endoteliale dipendente dall'overespressione di GRK2 è accompagnata da una massiva internalizzazione e desensibilizzazione del recettore β_2 AR che determina l'inibizione del signaling pro-angiogenico Akt-dipendente. A tale riguardo l'utilizzo del peptide inibitorio β ARKct è in grado di prevenire gli effetti deleteri dovuti all'overespressione di GRK2 normalizzando/migliorando la funzione delle cellule endoteliali. Nello specifico β ARKct preserva la funzione recettoriale bloccando l'internalizzazione del recettore β_2 AR e favorendo così l'attivazione della chinasi Akt e la risposta migratoria e proliferativa.

I risultati ottenuti *in vitro* suggeriscono chiaramente che l'overespressione di GRK2 esercita effetti negativi sulla funzione endoteliale pertanto abbiamo valutato anche *in vivo* gli effetti della modulazione dell'espressione e dell'attività di GRK2 mediante terapia genica in un modello animale di ischemia periferica. I nostri dati dimostrano che il trattamento con Ad-GRK2, peggiora la rivascolarizzazione post ischemica dell'arto, la quale risulta pertanto inadeguata a compensare al ridotto apporto ematico. Tuttavia, l'inibizione terapeutica di GRK2 mediante Ad- β ARKct ripristina la funzione del recettore ed induce effetti benefici migliorando la risposta pro-angiogenica.

In conclusione il nostro studio dimostra per la prima volta che la chinasi GRK2 attraverso la modulazione dell'attivazione del recettore β_2 AR svolge un ruolo cruciale

nella regolazione della funzione endoteliale *in vivo* ed *in vitro* e la sua inibizione attraverso il peptide β ARKct, può rappresentare una valida strategia terapeutica per favorire la neoangiogenesi nelle patologie caratterizzate da una insufficiente vascolarizzazione come l'ischemia critica dell'arto.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Carmeliet P, Angiogenesis in life, disease and medicine *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
- 2) Melillo G, Scocianti M, Kovesdi I, Safi J Jr, Riccioni T, Capogrossi MC Gene therapy for collateral vessel development *Cardiovasc Res*. 1997 Sep;35(3):480-9.
- 3) Rafii S, Lyden D Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):702-12.
- 4) D'Amore PA, Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:453-64.
- 5) Howell RE, Albelda SM, Daise ML, Levine EM. Characterization of beta-adrenergic receptors in cultured human and bovine endothelial cells. *J Appl Physiol*. 1988 Sep;65(3):1251-7.
- 6) Sorriento D, Santulli G, Del Giudice C, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension*. 2012 Jul;60(1):129-36.
- 7) Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Cerullo V, Iovino GL, Paudice A, Elia A, Santulli G, Campanile A, Arcucci O, Pastore L, Salvatore F, Condorelli G, Trimarco B. AKT participates in endothelial dysfunction in hypertension. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2587-93.
- 8) Pugh CW, Ratcliffe PJ Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):677-84. Review.
- 9) Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Galasso G, Campanile A, Santulli G, Cipolletta E, Cerullo V, Cimini V, Altobelli GG, Piscione F, Priante O, Pastore L, Chiariello M, Salvatore F, Koch WJ, Trimarco B. Ischemic neoangiogenesis enhanced by beta2-

adrenergic receptor overexpression: a novel role for the endothelial adrenergic system. *Circ Res.* 2005 Nov 25;97(11):1182-9. Epub 2005 Oct 20.

- 10) Rengo G, Zincarelli C, Femminella GD, Liccardo D, Pagano G, de Lucia C, Altobelli GG, Cimini V, Ruggiero D, Perrone-Filardi P, Gao E, Ferrara N, Lymperopoulos A, Koch WJ, Leosco D. Myocardial $\beta(2)$ -adrenoceptor gene delivery promotes coordinated cardiac adaptive remodelling and angiogenesis in heart failure. *Br J Pharmacol.* 2012 Aug;166(8):2348-61.
- 11) Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Santulli G, Fusco A, Zhou RH, Eckhart AD, Peppel K, Koch WJ, Trimarco B, Iaccarino G. Impaired neoangiogenesis in β_2 -adrenoceptor gene-deficient mice: restoration by intravascular human β_2 -adrenoceptor gene transfer and role of NF κ B and CREB transcription factors. *Br J Pharmacol.* 2011 Feb;162(3):712-21.
- 12) Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, Lefkowitz RJ. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science.* 1995 Jun 2;268(5215):1350-3.
- 13) Akhter SA, Eckhart AD, Rockman HA, Shotwell K, Lefkowitz RJ, Koch WJ. In vivo inhibition of elevated myocardial beta-adrenergic receptor kinase activity in hybrid transgenic mice restores normal beta-adrenergic signaling and function. *Circulation.* 1999 Aug 10;100(6):648-53.
- 14) Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 May;83(9):2797-801.

- 15) Ungerer M, Böhm 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*. 1993 Feb;87(2):454-63.
- 16) 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*. 2009 Jan 6;119(1):89-98
- 17) Rengo G, Leosco D, Zincarelli C, Marchese M, Corbi G, Liccardo D, Filippelli A, Ferrara N, Lisanti MP, Koch WJ, Lympelopoulos A Adrenal GRK2 lowering is an underlying mechanism for the beneficial sympathetic effects of exercise training in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jun;298(6):H2032-8
- 18) Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG, Koch WJ. Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest*. 1998 Mar 15;101(6):1273-82.
- 19) Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Sanzari E, Golino L, De Lisa G, Zincarelli C, Fortunato F, Ciccarelli M, Cimini V, Altobelli GG, Piscione F, Galasso G, Trimarco B, Koch WJ, Rengo F. J Gerontol A Biol Sci Med Sci..Prior exercise improves age-dependent vascular endothelial growth factor downregulation and angiogenesis responses to hind-limb ischemia in old rats. 2007 May;62(5):471-80.(METODI)
- 20) Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis *Circ Res*. 2002 Jun 28;90(12):1243-50

- 21) Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, Jones DN. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg.* 1997 Sep;26(3):517-38.
- 22) Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;33(Suppl. 1):S1-S75.
- 23) Rajagopalan S, Mohler ER III., Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation.* 2003;108:1933–1938.
- 24) Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH, Smit AJ, van den Dungen JJ, Hooymans JM, Sluiter WJ, Tio RA, Quax PH, Gans RO, Dullaart RP, Hospers GA. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther.* 2006;17:683–691.
- 25) Grossman PM, Mendelsohn F, Henry TD, Hermiller JB, Litt M, Saucedo JF, Weiss RJ, Kandzari DE, Kleiman N, Anderson RD, Gottlieb D, Karlsberg R, Snell J, Rocha-Singh K. Results from a phase II multicenter, double-blind placebo-controlled study of Del-1 (VLTS-589) for intermittent claudication in subjects with peripheral arterial disease. *Am Heart J.* 2007;153:874–880.

- 26) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*. 2002;359:2053–2058.
- 27) Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E, Diehm C, Visona A, Capogrossi MC, Ferreira-Maldent N, Gallino A, Wyatt MG, Wijesinghe LD, Fusari M, Stephan D, Emmerich J, Pompilio G, Vermassen F, Pham E, Grek V, Coleman M, Meyer F. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol Ther*. 2008;16:972–978.
- 28) Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, Van Belle E. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet*. 2011;377:1929–1937.
- 29) Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Galasso G, Campanile A, Santulli G, Cipolletta E, Cerullo V, Cimini V, Altobelli GG, Piscione F, Priante O, Pastore L, Chiariello M, Salvatore F, Koch WJ, Trimarco B. Ischemic neoangiogenesis enhanced by beta2-adrenergic receptor overexpression: a novel role for the endothelial adrenergic system. *Circ Res*. 2005 Nov 25;97(11):1182-9
- 30) Huang ZM, Gold JI, Koch WJ. G protein-coupled receptor kinases in normal and failing myocardium. *Front Biosci*. 2011 Jun 1;16:3047-60
- 31) Lympelopoulos A, Rengo G, Koch WJ. GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new. *Curr Pharm Des*. 2012;18(2):186-91.

LEGENDA ALLE FIGURE

Figure 1

L'ischemia periferica induce l'upregulation di GRK2 e la downregulation del recettore β_2AR . (A) Immunoblot rappresentativi (pannello superiore) e analisi densitometrica (pannello inferiore) mostranti i livelli di GRK2 nei lisati ottenuti dal muscolo scheletrico ischemico (IP) rispetto a lisati ottenuti da animali Sham (incremento verso SHAM). GAPDH è stato utilizzato come controllo di caricamento. I grafici mostrano la densità di membrane dei recettori β -AR (B) e β_2AR (C) su membrane plasmatiche di muscolo scheletrico di animali ischemici (IP) e non ischemici (SHAM). * $p < 0.05$ vs SHAM

Figura 2

La modulazione di GRK2 regola la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali. Cellule endoteliali di aorta bovina sono state infettate con adenovirus codificanti per GRK2, GFP o $\beta ARKct$ e stimulate o meno (NS) con fenoterolo (FEN, 10 μM) per 6 ore. Il gruppo di controllo (CTR) è costituito dall'insieme dei dati ottenuti da cellule non infettate (C) o infettate con Ad-GFP in quanto non sono state osservate differenze tra i due gruppi. A) Immunoblot rappresentativi mostranti l'espressione adenovirale (Ab-antiGRK2 e Ab-antiGFP). GAPDH è stato utilizzato come controllo di caricamento. B) Immagini rappresentative della migrazione cellulare dopo 6 h di stimolazione con fenoterolo ottenute mediante wound-healing assay di cellule infettate con adenovirus codificante per GRK2, o $\beta ARKct$. Magnificazione x200. La riduzione dell'ampiezza della porzione priva di cellule nell'arco delle sei ore è stata calcolata da tre esperimenti differenti come percentuale rispetto all'ampiezza del tempo 0. * $p < 0.05$

vs CTR NS; # $p < 0.05$ vs GRK2 NS; Ω $p < 0.05$ vs CTR FEN ; \S $p < 0.05$ vs FEN. (pannello inferiore).C) Proliferazione delle cellule endoteliali infettate con adenovirus codificante per GRK2, or β ARKct o delle cellule di controllo (CTR), determinata mediante raggio di incorporazione di bromodeossiuridina in presenza o in assenza di fenoterolo (6h e 24 h). I risultati ottenuti sono espressi come percentuale di proliferazione rispetto alla cellule non stimolate. * $p < 0.05$ vs 0 h; # $p < 0.05$ vs 6h.

Figura 3

GRK2 regola l'internalizzazione del recettore β_2AR . Localizzazione cellulare del recettore beta 2 adrenergico nelle BAEC infettate con adenovirus codificanti per GRK2, o β ARKct e stimulate con fenoterolo (Fen) (10 μ M) per 30 min (pannello A) o 6 h.(pannello B). Cellule infettate non stimulate (NS) sono state utilizzate come controllo. Magnificazione 600X.

Figura 4

GRK2 modula l'attivazione ed il signalling del β_2AR . Cellule endoteliali di aorta bovina infettate con adenovirus codificanti per GRK2 o β ARKct e stimulate o meno con fenoterolo (Fen) (10 μ M) per 30 min(A-B-C) o per 6 h (D-E-F). Il gruppo di controllo è costituito da un pool di dati ottenuti da cellule non infettate o infettate con Ad-GFP in quanto non sono state osservate differenze tra i due gruppi. Immunblot rappresentativi (pannello superiore) e analisi densitometrica (pannello inferiore) mostrante i livelli proteici di (A-D) GRK2, (B-E) $p\beta_2AR$, (C-F) pAkt (incremento rispetto al gruppo CTR non stimolato). (A): * $p < 0.05$ vs tutti; (B): * $p < 0.05$ vs CTR non stimolato ; # $p < 0.05$ vs

tutti; (C): * $p < 0.05$ vs tutti; (D): * $p < 0.05$ vs CTR non stimolati; # * $p < 0.05$ vs tutti ; (E-F): * $p < 0.05$ vs CTR non stimolati; # $p < 0.05$ vs CTR FEN e GRK2 FEN.

Figure 5

Disegno di studio di gene delivery in vivo A) disegno di studio di 15 giorni di gene delivery in un modello animale di ischemia periferica. I ratti sono stati sottoposti a resezione dell'arteria femorale e distribuiti in quattro gruppi riceventi iniezione intravascolare di ad-GRK2, ad- β ARKct, Ad-GFP o una soluzione salina (SALINE). La perfusione dell'arto posteriore ischemico è stata valutata a più tempi per tutta la durata dello studio. B) Immunoblot rappresentativi dell'espressione proteica di β ARKct, GRK2 e GFP in lisati di muscolo scheletrico gastrocnemio di ratti ischemici e ratti SHAM sacrificati 15 giorni dopo l'induzione dell'ischemia e la terapia genica. I livelli proteici di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. C) Immagini rappresentative di saggi immunostochimici mostranti l'espressione di GRK2 e di β ARKct su sezioni di gastrocnemio di muscolo di ratti riceventi ad-GRK2 e Ad- β ARKct o soluzione salina (SALINE) Magnificazione 200X.

Figure 6

La terapia genica con adenovirus codificante per β ARKct migliora la neovascolarizzazione dell'arto ischemico.

A) la perfusione dell'arto posteriore è stata valutata nei quattro gruppi ischemici 12 h, 3, 7, 10 e 15 giorni dopo l'operazione chirurgica mediante US Doppler. I dati sono espressi come percentuale di perfusione dell'arto ischemico rispetto all'arto non ischemico.* $p < 0.005$ vs GFP e SALINE. B) Grafici mostranti la perfusione dell'arto

ischemico dei 4 gruppi con ischemia periferica mediante dyed beads assay 15 giorni dopo la terapia genica. I dati di perfusione sono espressi come rapporto percentuale tra la perfusione dell'arto ischemico verso il non ischemico di contenuto di dyed bead per milligrammo di tessuto muscolare. *p <0.05 versus SALINE e GFP. C) immagini rappresentative di densità capillare ottenuta mediante saggio istologico con Lectina Bandeiraea simplicifolia I (BS-I) nel muscolo ischemico. Magnificazione 200X (pannello superiore) e grafico mostrante il rapporto tra numero di capillari e numero di fibre muscolari nel muscolo ischemico dei diversi gruppi e nel muscolo degli animali sham di controllo (pannello inferiore) *p <0 .05 vs SHAM ; *p < 0.05 vs SALINE e GFP. Densità di membrana plasmatica dei β AR totali (D) e β_2 AR (E) nei muscoli scheletrici dei 4 gruppi ischemici, e dal gruppo SHAM a 15 giorni dopo la resezione dell'arteria femorale e la terapia genica. *p <0 .05 versus CTR, # p <0 .05 versus GFP e SALINE.

Figura 1

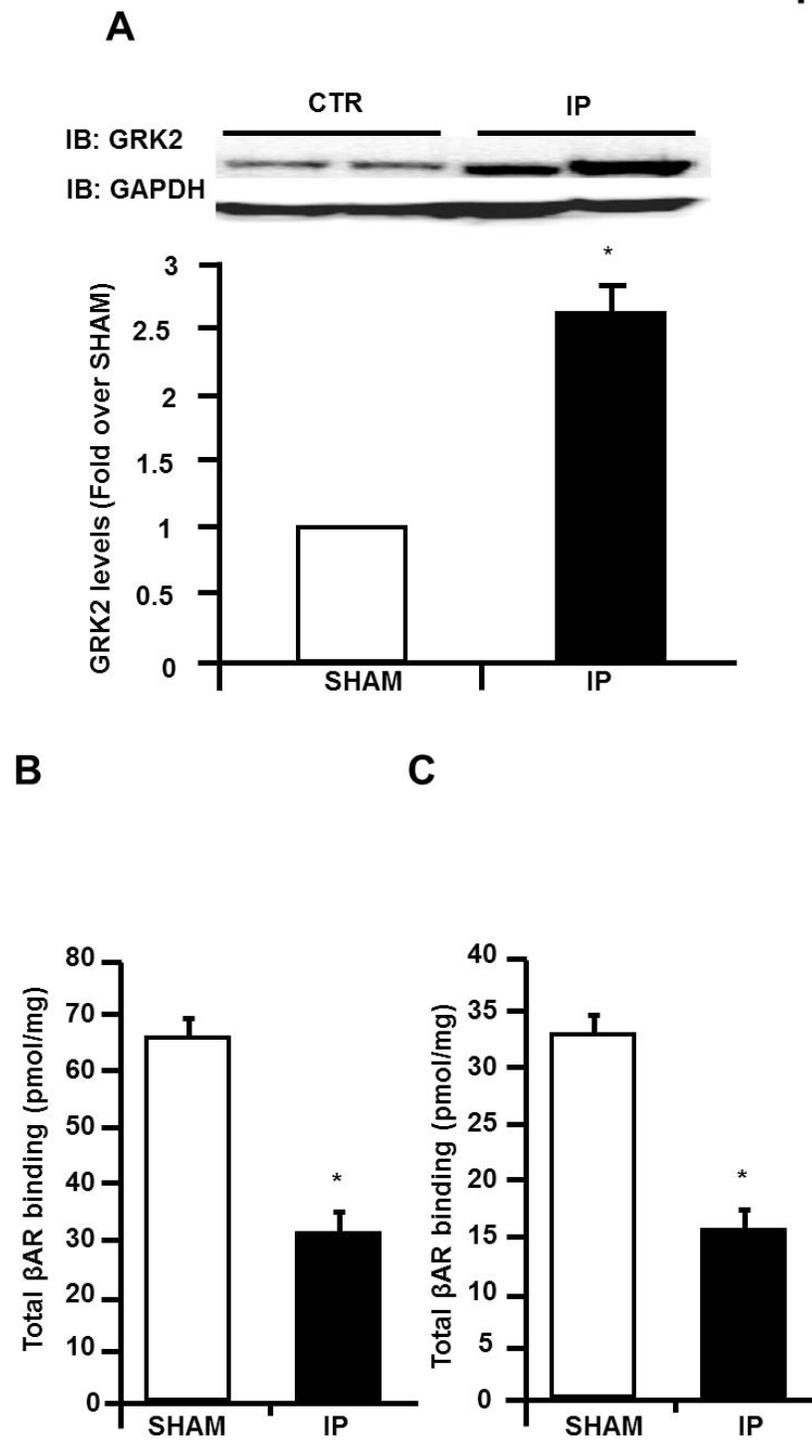


Figura 2

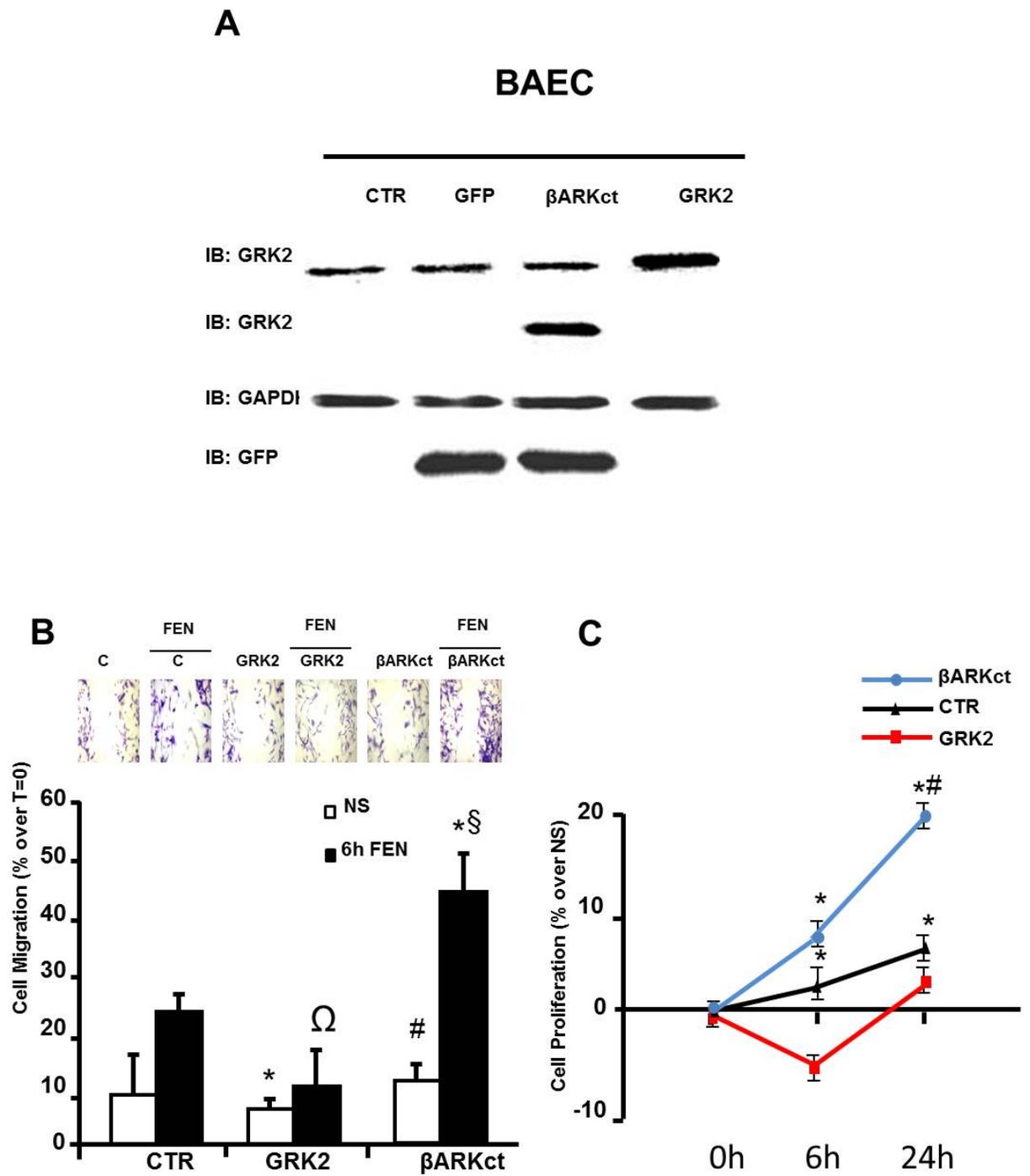


Figura 3

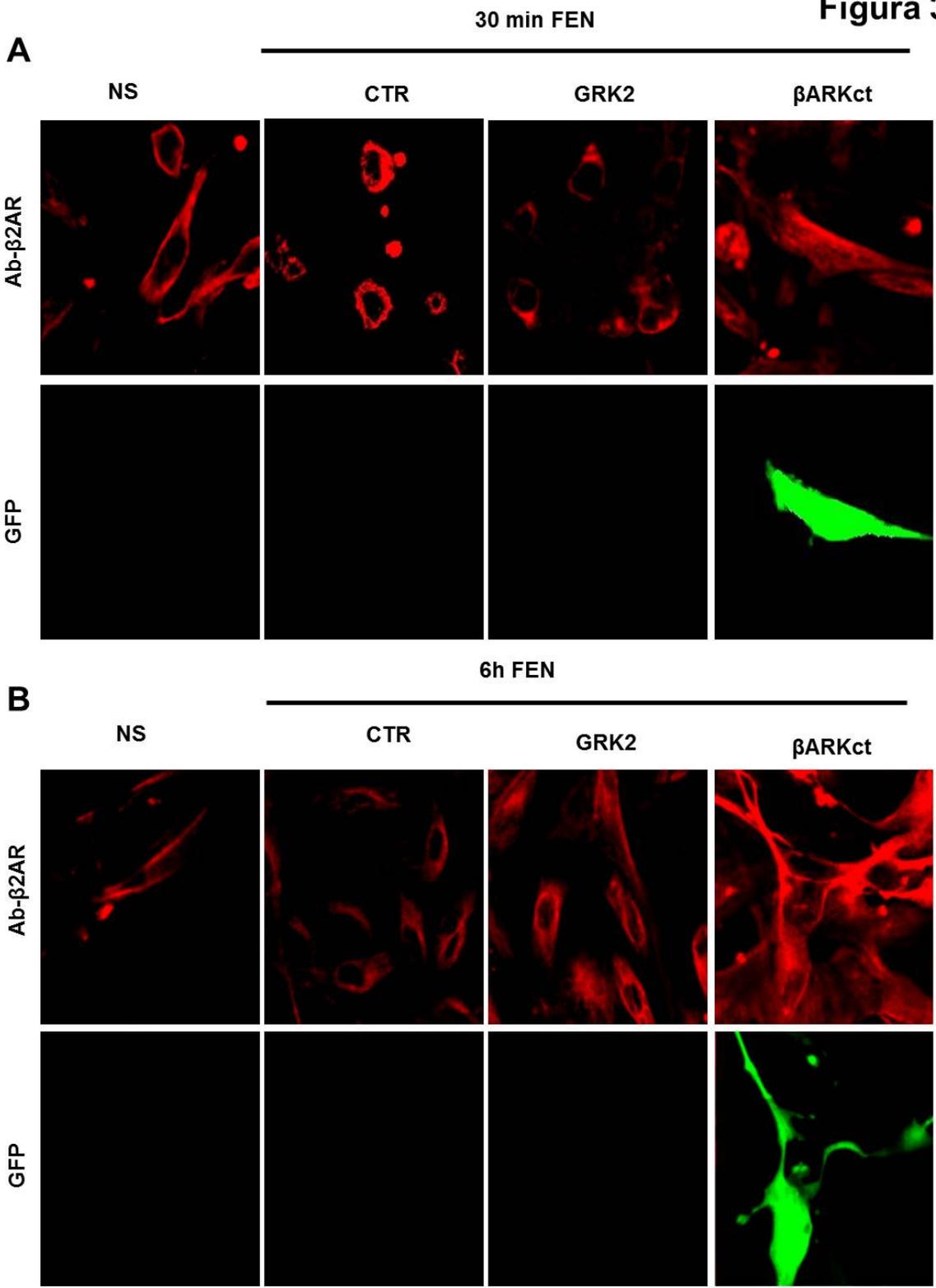


Figura 4

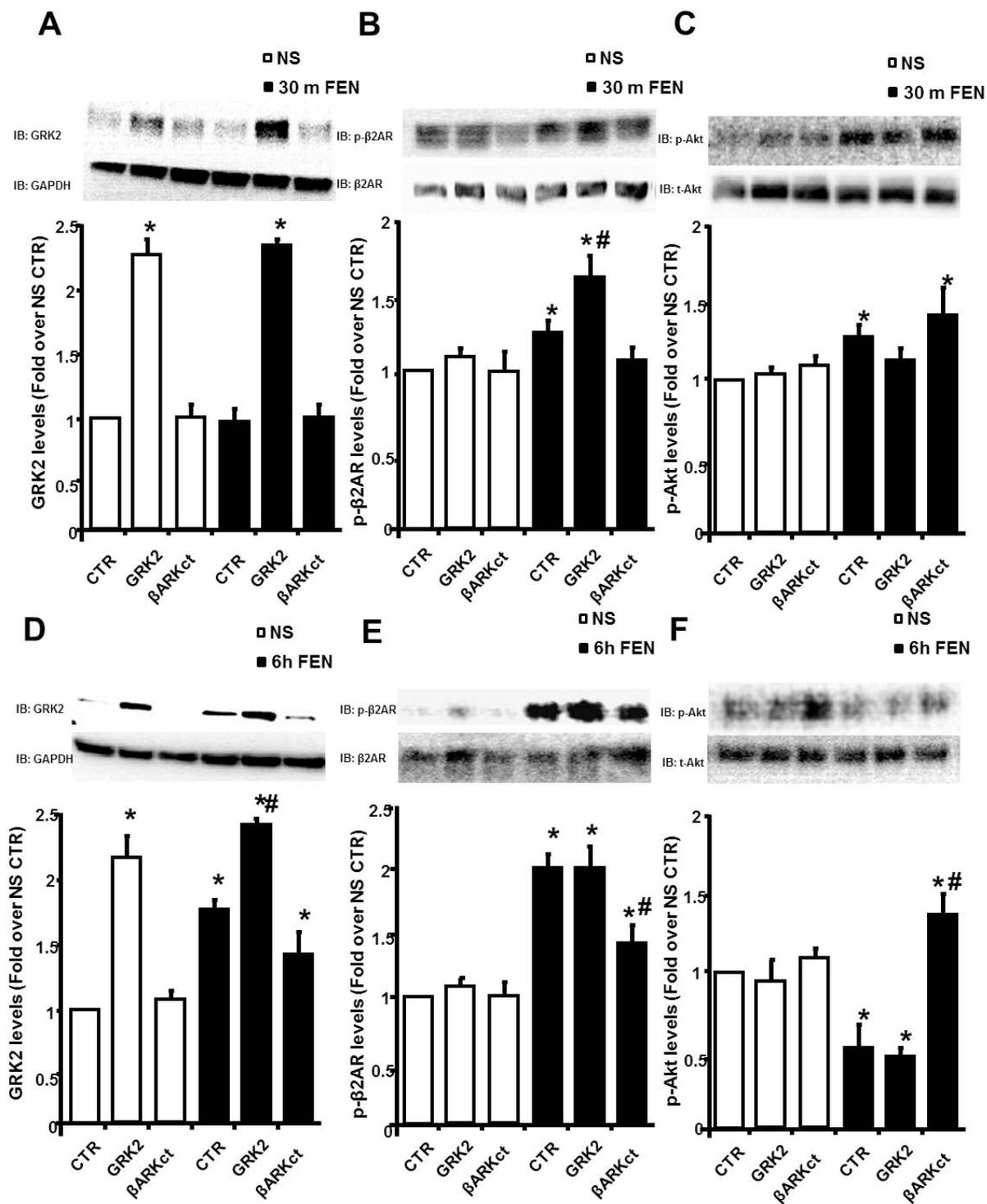


Figura 5

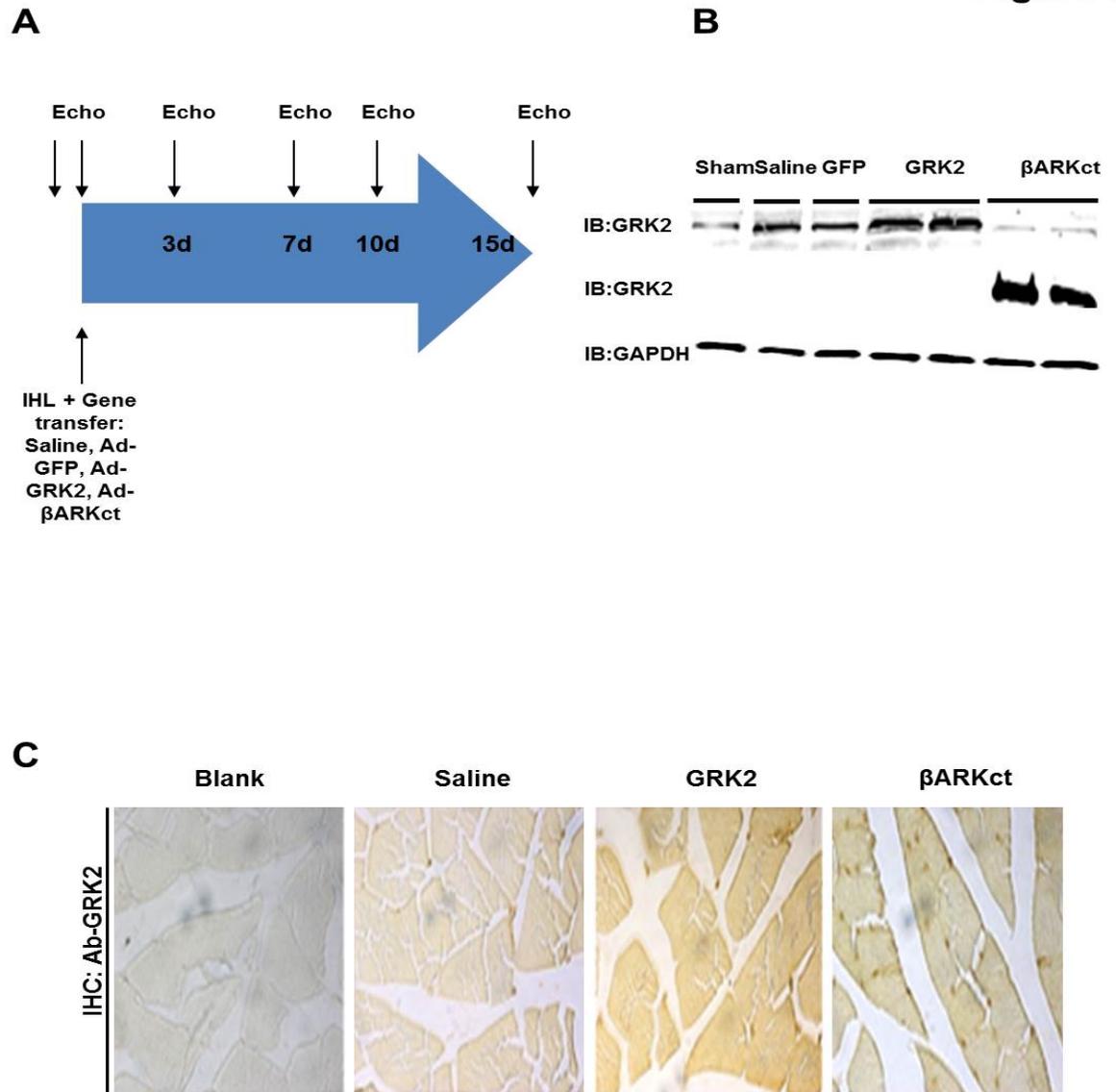


Figura 6

