



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SEIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXV

Tesi di Dottorato di Ricerca

RUOLO DEL CANALE HCN4 NEL SISTEMA DELLA
CONDUZIONE CARDIACA

Dottorando: Dott. Sheng Liu

Matricola: R08851

Tutor: Prof. Mirko Baruscotti
Dipartimento di Bioscienze

Cordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2012-2013

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutte le persone che in vari modi e in diversi momenti hanno contribuito allo sviluppo di questo mio lavoro di tesi.

Innanzitutto il Prof. Mirko Baruscotti per avermi offerto questa occasione e per la sua disponibilità

Un ringraziamento anche ai Prof. Dario DiFrancesco, Dott. Andrea Barbuti, Stefano Micheloni, Dott.sse Annalisa Bucchi, Raffaella Milanese, Stefania Coco di cui ho apprezzato la disponibilità, l'amicizia e la professionalità a tutti i miei compagni e tutti i miei amici dell'università

che mi ha accompagnato tutta la mia vita in Italia..

Infine, un grazie particolare a mia moglie Yanyan ed un grazie significativo alla mia famiglia che mi ha sempre sostenuto ed incoraggiato durante la mia carriera universitaria.

Graze a tutti.

Abstract

Cardiac pacemaking is generated and modulated by the coordinated action of several processes. In mammals heart rhythm originates from specialized myocytes of the sinoatrial node (SAN) due to the presence of the spontaneous diastolic depolarization. The I_f (“funny” or pacemaker) current, whose molecular constituents are the Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated (HCN) channels, and mainly HCN4, is considered to play the most important role for the maintenance of cardiac automaticity.

Most of the data on the role of this current were collected by *in vitro* experiments and only recently initial data on the role of I_f in intact animal have become available in our laboratory thanks to the knockout mouse technology, applied to the *Hcn4* gene. We therefore set to further investigate the role of the HCN4 channels in the adult by creating a transgenic mouse line in which the *Hcn4* gene can be deleted in a conditional and inducible manner, using the Cre/LoxP system.

We recorded a reduced contribution of the I_f current evaluated *in vivo* by telemetric ECG recordings, and *in vitro* by single cell electrophysiology.

In our *ci*-HCN4 knockout mice, deletion of HCN4 consistently leads the progressive development of severe bradycardia (~50% reduction) and AV block which always progressed to heart arrest and death of the animals in about 5 days; in control mice the same experiments did not result any rate modification or premature death.

In *ci*HCN4-KO animals the residual I_f was also sensitive to β -AR modulation, and the permanence of rate response to β -AR stimulation was observed both *in vivo* and *in vitro*, but the β -AR response of *ci*HCN4-KO animals was not able to reach the maximum value. Similar results were obtained by means of pharmacologic selective block using the I_f -specific reducing agent Ivabradine.

The finding that If removal leads to AV conduction block was novel and the exact role of the If current in this context still requires careful analysis and understanding. We therefore set to carry out an initial evaluation of the electrical properties of single cells isolated from ciHCN4-KO AVN and compare them to those of wild type AVN cells: cells isolated from ciHCN4-KO AV nodes showed a decrease in the If current density, and normal kinetics.

In conclusion our results indicate that the functional presence of the HCN4 protein in the SAN and AVN of adult mice is required to maintain the heart rate to levels compatible with life.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 IL CUORE	1
1.1.1 La struttura del cuore.....	1
1.1.2 la funzione del cuore	2
1.1.3 Il sistema di conduzione cardiaco	3
1.1.4 Proprietà delle cellule pacemaker senoatriali del cuore	6
1.2 LA CORRENTE I_f	7
1.3 I CANALI HCN	8
1.3.1 La struttura dei canali HCN	8
1.3.2 Le funzioni dei canali HCN	9
1.3.3 Distribuzione tissutale dei canali HCN	9
1.4 I_f e coinvolgimento nella modulazione autonoma della frequenza cardiaca	10
1.5 Farmacologia della corrente I_f	12
1.6 Nodo atrioventricolare	14
1.6.1 La classificazione del blocco atrioventricolare	16
2 SCOPO DEL LAVORO	18
3 MATERIALI E METODI	19
3.1 COLONIA DI TOPI $HCN4^{lox/lox}; Cre$	19
3.1.1 Modello di topo knockout condizionale cardiaco e inducibile per il gene HCN4	19
3.2 GENOTYPING.....	22
3.2.1 Estrazione del DNA genomico.....	22
3.2.2.PCR	23
3.3 Impianto telemetrico	25
3.4 ISOLAMENTO NODO ATRIO VENTRICOLARE	26
3.5 ELETTRIFISIOLOGIA	27
3.5.1 Setup sperimentale	28
3.5.2 Protocolli	28
4. RISULTATI	31

4.1 L'eliminazione del gene HCN4 mediante la procedura di knockout condizionale cardiaco ed inducibile nell'animale adulto induce lo sviluppo di bradicardia e blocco della conduzione atriventricolare.....	31
4.1.1 Effetti del KO genico di HCN4 sulla risposta cronotropa β -adrenergica.	35
4.2 Ruolo della corrente If nel contesto dell'attività autoritmica delle cellule atrioventricolari isolate da topi HCN4 ^{lox/lox; Cre} knockout.	37
4.3 Identificazione dell'effetto del bloccante selettivo Ivabradina nei topi ciHCN4-KO e WT	44
5 DISCUSSIONE	46
6 BIBLIOGRAFIA	51

1. INTRODUZIONE

1.1 IL CUORE

1.1.1 La struttura del cuore

Il cuore è costituito da tessuto muscolare striato di tipo cardiaco e da tessuto connettivale che forma lo scheletro del cuore.

La parete del cuore è formata da tessuto muscolare striato (miocardio) rivestita all'esterno da epicardio e all'interno da endocardio (Figura 1.).

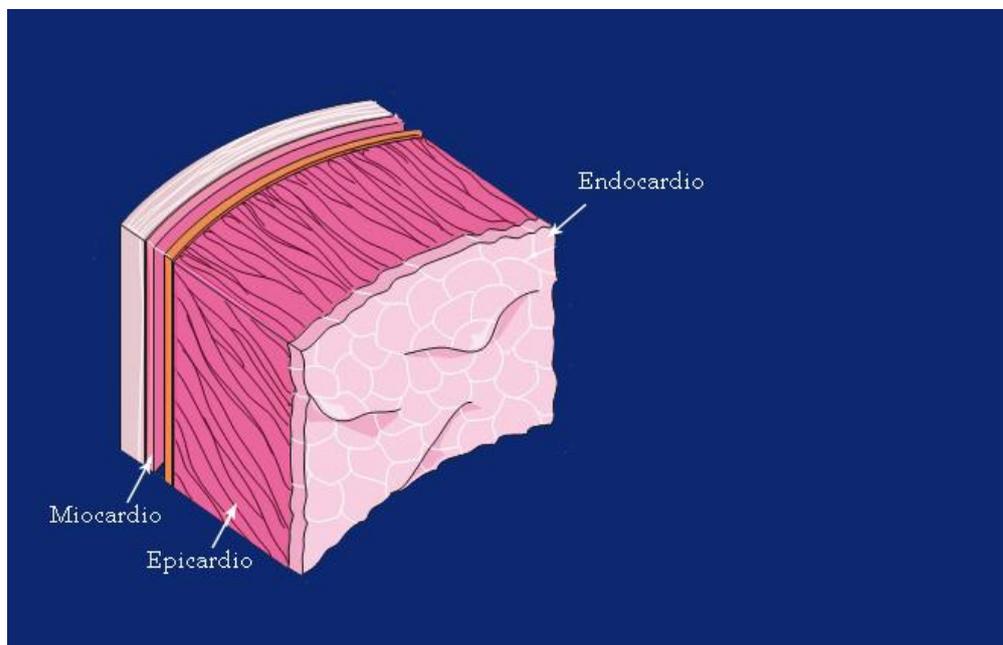


Figura 1. Rappresentazione del parete del cuore umano

Il cuore presenta due cavità a destra, l'atrio e il ventricolo destro e due a sinistra, l'atrio e il ventricolo sinistro. Gli atri sono separati tra loro dal setto interatriale ed i ventricoli dal setto interventricolare. Gli atri ricevono rispettivamente il sangue dalla circolazione polmonare e sistemica; il sangue passa poi nelle due camere inferiori, i ventricoli, che, contraendosi, inviano il sangue a tutti i distretti corporei e ai polmoni (Figura 2).

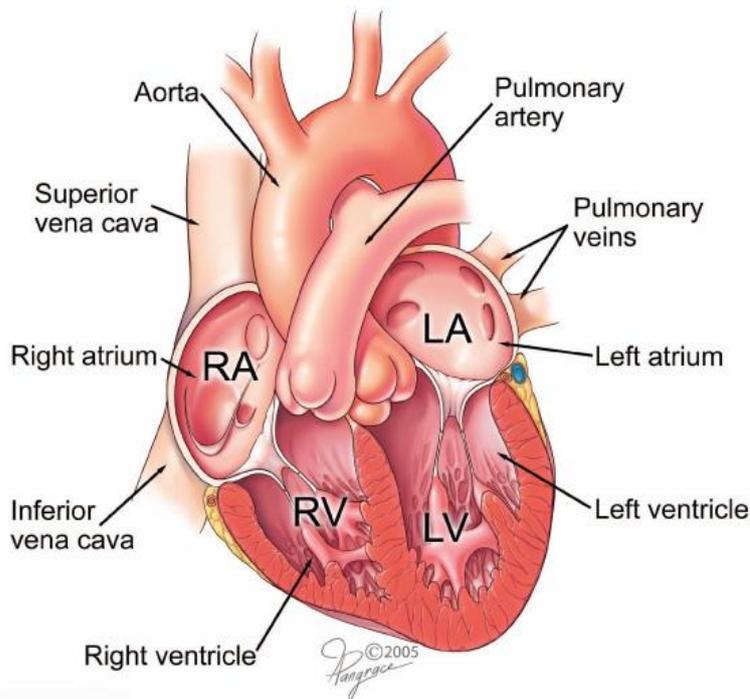


Figura 2. Rappresentazione di una sezione longitudinale del cuore umano

1.1.2 la funzione del cuore

Il cuore è l'organo centrale dell'apparato circolatorio e funge da pompa capace di produrre una pressione sufficiente per permettere la circolazione del sangue.

La funzione contrattile degli atri permette il riempimento diastolico e la forza di contrazione ventricolare permette di spingere il sangue nelle arterie per farlo arrivare in tutti i tessuti. E' quindi evidente che la pressione che è generata dagli atri è inferiore rispetto alla quella ventricolare, soprattutto sinistra, per spingere il sangue in tutte le arterie.

Il cuore è un organo autoritmico e quindi l'innervazione non è necessaria per contrarsi. Infatti esiste un sistema per generare e condurre l'impulso che assicura che un'ordinata propagazione dell'eccitazione, prima negli atri e poi nei ventricoli, secondo una tempistica ed una distribuzione anatomica atta a far sì che il cuore svolga correttamente le sue funzioni di contrazione e dilatazione.

1.1.3 Il sistema di conduzione cardiaco

Il tessuto miocardico è formato da fibre muscolari striate (cardiomiociti) simili a quelle nel muscolo scheletrico ma con significative differenze. Le fibre miocardiche formano una rete o sincizio funzionale e, quando una cellula genera un potenziale d'azione, questo si propaga velocemente a tutto il miocardio. I cardiomiociti sono cellule eccitabili, infatti, in presenza di uno stimolo adeguato, sono capaci di generare e condurre potenziali d'azione e di generare forza contrattile.

Dal punto di vista fisiologico e funzionale è possibile suddividere il cuore in due distretti fondamentali: il miocardio di lavoro (miocardio comune) ed il tessuto di conduzione (miocardio specifico). Il miocardio comune sviluppa la forza contrattile del cuore, il miocardio di conduzione è invece responsabile della generazione e della propagazione dell'impulso nervoso a tutto il cuore.

L'apparato di conduzione è un sistema specializzato che genera e regola la frequenza del battito cardiaco permettendo che il cuore si contragga con regolarità autorimica (Figura 3).

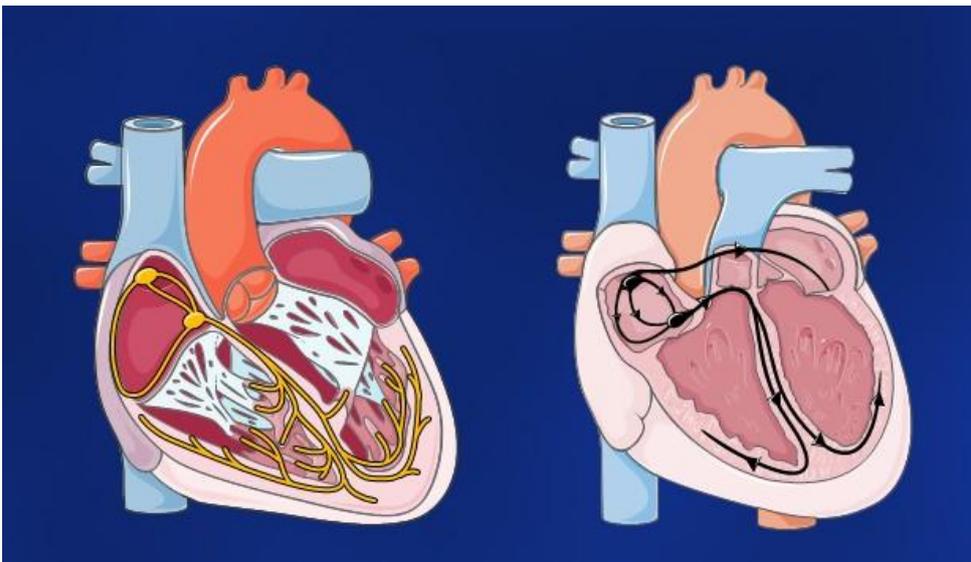


Figura 3. Rappresentazione del sistema di conduzione cardiaco in una sezione longitudinale del cuore umano. Le frecce nere indicano il propagazione dell'impulso elettrico.

Nei mammiferi il sistema di conduzione del cuore è formato da diverse parti.

(1) Nodo SenoAtriale (SAN): localizzato nel solco terminale della parete posteriore dell'atrio destro, sotto l'apertura della vena cava superiore.

Il SAN (Figura 4) costituisce il pacemaker primario del cuore in quanto è la zona caratterizzata dalla maggior frequenza di automatismo; da questa regione si generano spontaneamente potenziali d'azione (PA) che si propagano tramite il sistema di conduzione all'intero miocardio. Grazie a tale caratteristica, il cuore è in grado di contrarsi e dilatarsi spontaneamente e ritmicamente senza la presenza di stimoli nervosi. L'autoritmicità di contrazione corrisponde nell'uomo ad una frequenza media di circa 72 bpm.



Figura 4. Nodo Senoatriale (SAN) del topo

(2) Vie internodali anteriori, medie e posteriori: costituiscono zone di conduzione che devono condurre il segnale sia al tessuto atriale che al nodo atrioventricolare.

(3) Nodo AtrioVentricolare (AVN): situato nella parte posteriore destra del setto interatriale; è un importante componente del sistema di conduzione in quanto rappresenta l'unico punto di connessione elettrica tra atri e ventricoli e garantisce il ritardo del passaggio del segnale dagli atri ai ventricoli permettendo un'ordinata temporalità della meccanica cardiaca.

Una volta che l'impulso si è generato nel nodo senoatriale, esso si propaga velocemente (1m/s) agli atri, provocandone la contrazione e, attraverso le fibre internodali, il segnale viene trasmesso al nodo atrioventricolare. Durante la conduzione intranodale, l'onda di eccitazione subisce un leggero ritardo che permette un adeguato riempimento ventricolare e quindi un perfetto rendimento della pompa cardiaca. Un'altra importante funzione del nodo atrioventricolare è quella di permettere che l'impulso cardiaco si propaghi unidirezionalmente.

(4) Fascio di His: costituito da un complesso di fibre che partono dal nodo atrioventricolare e decorrono nella parete membranosa del setto interventricolare; a livello del setto interventricolare il fascio di His si biforca in due branche, una che procede verso il ventricolo destro e l'altra verso il ventricolo sinistro. I rami delle diverse branche si estendono verso l'apice dei ventricoli con fini diramazioni denominate fibre del Purkinje, che propagano l'impulso alla massa cardiaca ventricolare, la cui velocità di conduzione è molto rapida (2.4 m/s).

Nei casi patologici in cui il SAN non è capace di svolgere la sua funzione di pacemaker autonomo, i ventricoli di solito continuano a battere ad una frequenza inferiore (tra 40 e 60 bpm) che origina da autorimicitt àectopica ventricolare.

E' importante ricordare che il SAN non rappresenta l'unica regione del cuore dotata di una propria capacità autorimica, ma anche altri distretti del sistema di conduzione (in particolare modo il nodo AV) sono capaci di generare l'impulso autoritmico, tuttavia con una frequenza inferiore rispetto al SAN. Tale fenomeno viene denominato ritmo 'non sinusale'. L'attività di questi pacemaker non sinusali è presente però solo in casi patologici. Un ritmo 'non sinusale' rappresenta quindi un meccanismo di protezione nelle patologie del nodo del seno o della conduzione atrioventricolare.

1.1.4 Proprietà delle cellule pacemaker senoatriali del cuore

Il nodo senoatriale (SAN) costituisce quindi il pacemaker primario del cuore e le cellule che lo compongono sono considerate un'orologio della contrazione autoritmica cardiaca (DiFrancesco al., 2010). Le cellule senoatriali possiedono un apparato contrattile poco sviluppato e non presentano striature (Figura 5) in quanto la loro funzione è quella di generare l'eccitazione elettrica. Tali cellule sono quindi responsabili della generazione dei potenziali d'azione autoritmici che presentano la caratteristica fase di depolarizzazione spontanea lenta. Questa fase di depolarizzazione diastolica lenta è invece assente nelle cellule atriali e ventricolari (cellule di lavoro) che mantengono in fase diastolica un potenziale di riposo stabile (Baruscotti et al., 2004) (Figura 6)



Figura 5. Rappresentazione della cellula senoatriale

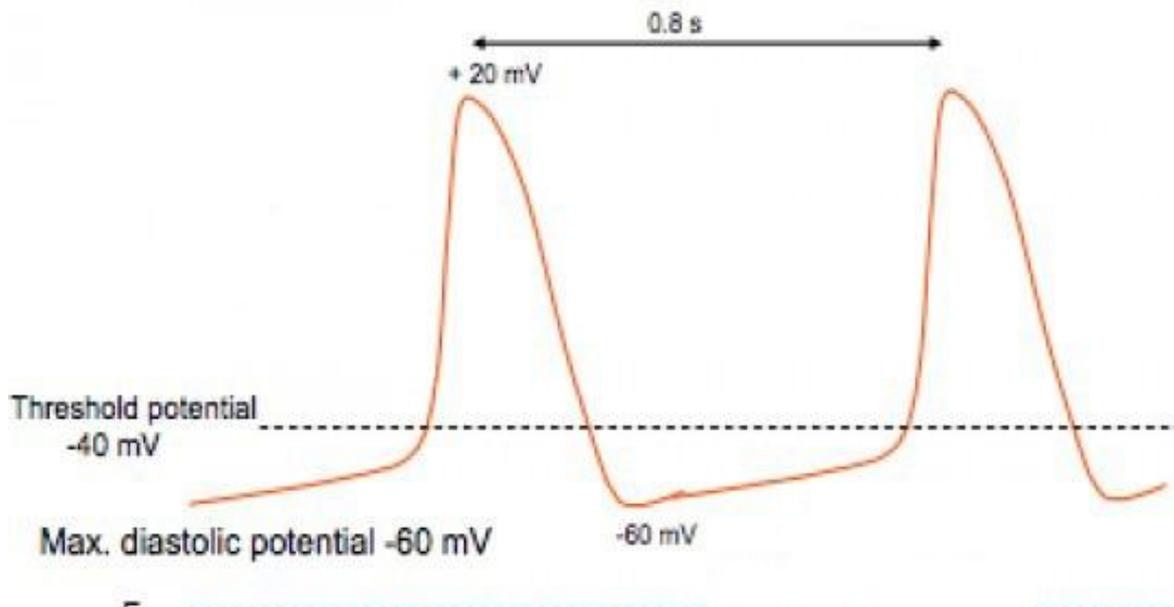


Figura 6. Rappresentazione del potenziale d'azione della cellula SAN

1.2 LA CORRENTE I_f

Quando la fase di ripolarizzazione del potenziale d'azione raggiunge un valore di circa $-40/-45$ mV, si entra nel range di attivazione del canale pacemaker (funny) che è un canale cationico misto permeabile al sodio e al potassio voltaggio e tempo dipendente con un potenziale di inversioni di Nernst intorno ai -15 mV (Figura 7). Tale corrente è stata denominata I funny (I_f) proprio perchè al contrario delle correnti normali essa si attiva in iperpolarizzazione.

La corrente I_f è stata inizialmente descritta a livello delle fibre del Purkinje (DiFrancesco, 1984; DiFrancesco, 1981) e successivamente identificata anche in altri distretti cardiaci (il nodo senoatriale e il nodo atrioventricolare) e neuronali (Santoro et al., 1997, Gauss et al., 1998; Ludwig et al., 1998).

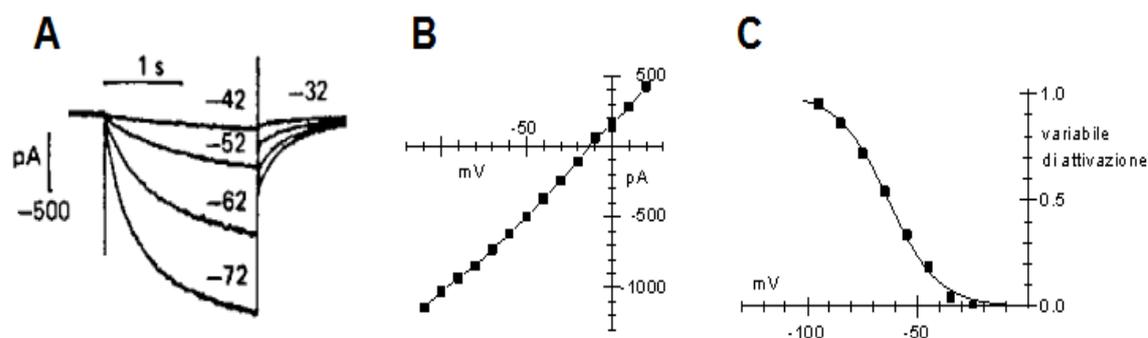


Figura 7. Rappresentazione della cinetica della corrente funny

1.3 I CANALI HCN HCN

L'individuazione dei costituenti molecolari dei canali pacemaker è avvenuta all'incirca negli anni 90. Essi appartengono alla famiglia dei canali di K^+ ed in particolare alla sottofamiglia dei canali HCN (Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated channels), canali a 6 segmenti transmembrana, regolati sia dal voltaggio che dai nucleotidi ciclici. Esistono 4 isoforme di canali HCN (1-4) (Santoro et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Moosmang et al., 1999; Seifert et al., 1999; Shi et al., 1999; Demontis et al., 2002); tali isoforme sono altamente conservate e presentano un'elevata omologia nelle regioni transmembranarie S1—6 e nel CNBD, mentre divergono nelle regioni C- ed N-terminale.

1.3.1 La struttura dei canali HCN

I canali HCN sono strutture complesse tetrameriche (Ulens et al., 2001; Chen et al., 2001), costituite da quattro subunità che si organizzano a formare un poro centrale (Ludwig et al., 1998; Ludwig et al., 1999; Santoro et al., 1998; Seifert et al., 1999). Ogni subunità è costituita da 6 segmenti transmembrana (S1-S6) (Figura 8): il segmento S4, essendo carico positivamente, è il sensore del voltaggio; il loop tra i segmenti S5 e S6 forma la regione del poro e presenta una particolare sequenza aminoacidica, GYG, che è la caratteristica tipica dei canali di K^+ in quanto è la determinante della selettività a tale ione (Biel et al., 2009; Baruscotti et al., 2010). Nei canali HCN, a valle della sequenza GYG, sono presenti una serie di amminoacidi differenti rispetto ai canali di potassio (due residui carichi positivamente e una istidina in più) che sono stati dimostrati essere responsabili della permeabilità elevata al sodio (Kaupp et al., 2001; Lu et al., 2001).

L'estremità C-terminale è invece responsabile della modulazione da parte del sistema nervoso, in essa è infatti presente una sequenza detta Cyclic Nucleotide Binding Domain (CNBD) che permette il legame diretto da parte dei nucleotidi ciclici (Gauss et al., 1998; Ludwig et al., 1999).

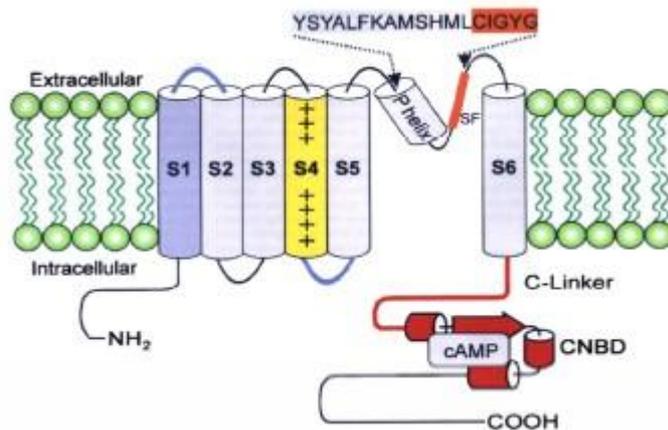


Figura 8. Struttura di una singola subunità del canale HCN4; S4 rappresenta il sensore del voltaggio; S5, S6 e il loop che li collega formano il poro; la regione CNBD situata al C-terminale è il sito di legame per i nucleotidi ciclici (AMPc) (Biel et al., 2002).

1.3.2 Le funzioni dei canali HCN

Le isoforme di canali HCN sono caratterizzate da differenti cinetiche di attivazione e deattivazione e da una diversa sensibilità ai nucleotidi ciclici (Clapham, 1998). Tra le 4 isoforme, HCN1 presenta la cinetica più rapida, mentre HCN4 è l'isoforma che presenta la cinetica più lenta (Altomare et al., 2001; Viscomi et al., 2001; Kaupp et al., 2001). Per quanto riguarda la modulazione da nucleotidi ciclici, le isoforme HCN2 e HCN4 sono più sensibili al cAMP, mentre HCN1 mostra una modulabilità quasi nulla (Moroni et al., 2001; Biel et al., 2002).

1.3.3 Distribuzione tissutale dei canali HCN

L'isoforma HCN1 è espressa abbondantemente nel cervello, in particolare nella neocorteccia, nella regione CA1 dell'ippocampo e in alcune cellule del cervelletto; mentre a livello cardiaco è espressa a livello basso nel nodo SA (non in tutte le specie), e nelle fibre del Purkinje.

Il canale HCN2 è stato individuato nel cervello (ippocampo, corteccia cerebrale, bulbo olfattorio, amigdala e talamo); nel cuore è particolarmente espresso a livello degli atri e dei ventricoli (Shi et al., 1999).

HCN3 costituisce l'isoforma più rara ed quasi esclusivamente presente nel cervello; recentemente è stata trovata anche nel ventricolo di murino (Mistrik et al., 2005).

HCN4 rappresenta l'isoforma maggiormente espressa nel SAN dove costituisce più di 80% dell'RNA messaggero totale degli HCN. La sua presenza è stata descritta anche nel cervello.

1.4 I_f e coinvolgimento nella modulazione autonoma della frequenza cardiaca

Il cuore adatta la sua attività alle richieste dell'organismo ed è finemente regolato dal sistema nervoso autonomo e dal sistema ormonale.

Il sistema nervoso autonomo esplica la sua regolazione attraverso le vie simpatiche e parasimpatiche che agiscono in modo antagonista. Le fibre post-gangliari simpatiche utilizzano come neurotrasmettitore l'adrenalina e la noradrenalina, mentre le fibre parasimpatiche utilizzano l'acetilcolina. A livello cardiaco l'adrenalina si lega a recettori α - e β -adrenergici e l'acetilcolina a recettori muscarinici. Entrambe i recettori sono proteine a sette eliche transmembrana accoppiate a proteine G trimeriche. Le proteine G hanno come target l'adenilato ciclasi che è responsabile della sintesi del cAMP, quindi si agiscono la produzione del secondo messaggero (Figura 9.).

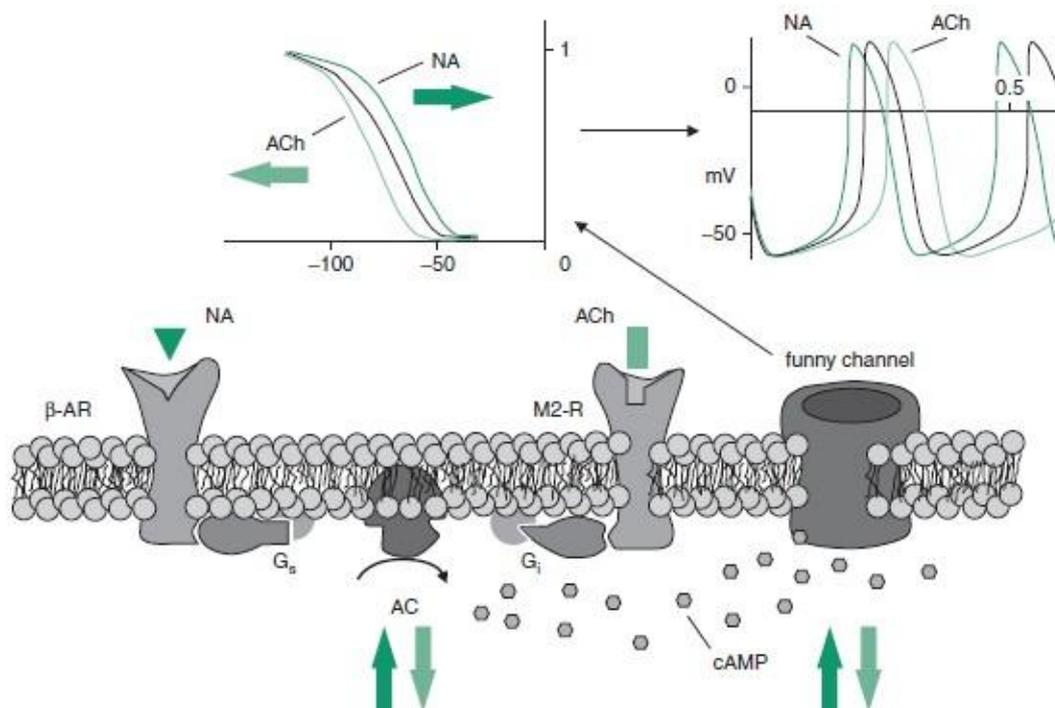


Figura 9. **Modulazione del canale funny da parte del cAMP.** Nei pannelli superiori sono mostrate gli effetti della modulazione autonoma sulla voltaggio dipendenza della corrente I_f (sinistra) e sulla frequenza spontanea di potenziali d'azione delle cellule senoatriali. In basso sono mostrate le vie di trasduzione del segnale accoppiate al recettore β -adrenergico e al recettore muscarinico che determinano la variazione dei livelli di cAMP e, di conseguenza, la modulazione del canale pacemaker. ACh, acetilcolina; NA, Noradrenalina; AC, adenilato-ciclastasi, G_i , G-proteina inibitoria; G_s , G-Proteina stimolatoria (DiFrancesco et al., 2007)

I canali pacemaker sono sensibili al cAMP, in modo indipendente dai processi fosforilativi (DiFrancesco et al., 1991; DiFrancesco 1993): vi è infatti un legame diretto del cAMP al canale che porta ad un aumento della probabilità di apertura del canale stesso mediato da uno spostamento della curva di attivazione verso valori più positivi.

L'azione simpatica e quella parasimpatica hanno effetto contrario. I recettori adrenergici interagiscono con proteine G stimolatorie (G_s) che attivano l'adenilato ciclastasi, mentre i recettori muscarinici interagiscono con proteine G inibitorie (G_i) che hanno effetto opposto. Infatti quando l'adrenalina o la noradrenalina attivano i propri recettori, ciò induce un aumento del cAMP intracellulare con conseguente maggior attivazione dei canali HCN. Il processo contrario si verifica invece con l'attivazione acetilcolina-dipendente del recettore muscarinico; in questo caso si verifica infatti una diminuzione del cAMP ed una minor

attivazione dei canali HCN (Brown et al., 1979; Difrancesco et al., 1994; Mangoni et al., 2008).

L'aumento della probabilità di apertura dei canali HCN determina un aumento della corrente I_f con la conseguente accelerazione della fase di depolarizzazione diastolica lenta e aumento della frequenza dei potenziali d'azione.

Esiste anche una regolazione ormonale, i principali ormoni coinvolti sono: catecolamine, liberate dalle cellule della midollare del surrene, angiotensina, aldosterone e ormone antidiuretico, componenti di un complesso sistema di regolazione cardiovascolare e renale, ed il peptide natriuretico atriale, prodotto dalle cellule muscolari cardiache dell'atrio destro in caso di alti valori di pressione e riempimento (Gloss et al., 2008; Hara et al., 1997; Magyar et al., 1995).

1.5 Farmacologia della corrente I_f

I bloccanti ionici inibiscono il flusso degli ioni attraverso i pori dei canali. L'esistenza di un bloccante specifico permette la dissezione farmacologica del contributo di tale canale durante l'attività elettrica cellulare. I bloccanti assumono quindi una duplice importanza in quanto permettono di indagare la fisiologia di base del canale sia gli aspetti farmacologici di potenziale utilizzo terapeutico. I canali I_f sono quindi importanti target farmacologici in quanto un loro blocco selettivo permette di diminuire la frequenza cardiaca, senza indurre effetti collaterali indesiderati.

Tra i vari bloccanti identificati si ricordano Alinidina, Falipamil, Zatebradina, Cilobradina, ma solo l'ivabradina ha raggiunto l'utilizzo terapeutico.

Ivabradina (Figura 10)

L'ivabradina (3-(3-(((7S)-3,4-dimethoxybicyclo[4,2,0]octa-1,3,5-trien-7-yl)methyl)methylamino)propyl)-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dimethoxy-2H-3-benzazepin-2-one, hydrochloride, Figura 9) (Servier, Francia) è una molecola in grado di indurre parziale inibizione dei canali "funny" e quindi di diminuire la frequenza cardiaca;

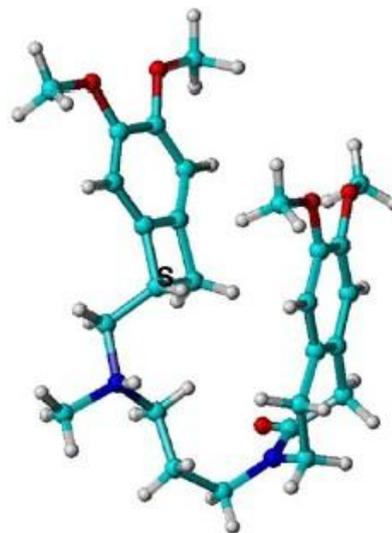
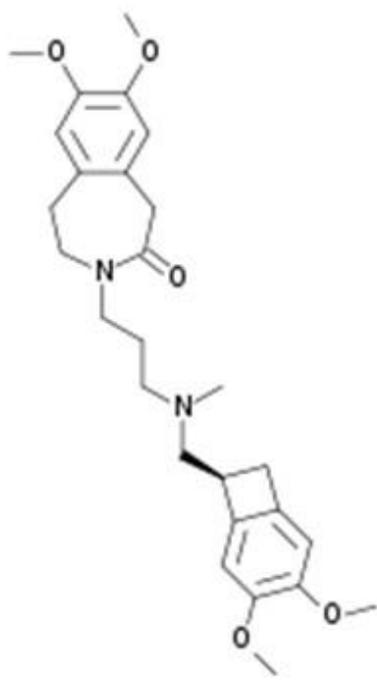
questo farmaco è oggi utilizzato in molti paesi europei nel trattamento dell'*angina pectoris* (DiFrancesco et al., 2004; Borer et al., 2003; Tardif et al., 2005; Ruzyllo et al., 2007; Lopez-Bescos, 2007; Baruscotti et al., 2005).

Le principali caratteristiche del blocco selettivo Ivabradina del canale I_f sono seguenti (Figura 10B):

- 1) Il blocco avviene solo dal lato intracellulare
- 2) Il blocco avviene solo se il canale si apre (open channel block)
- 3) Il blocco è uso- e corrente- dipendente (Bucchi et al., 2006).
- 4)

Numerose evidenze sperimentali indicano che il trattamento con Ivabradina non modifica significativamente l'intervallo QT e contrattilità miocardica.

Gli effetti collaterali osservati sono limitati a piccoli disturbi visivi in un'esigua minoranza dei pazienti; tale disturbo è dovuto alla presenza di canali HCN1 nella retina (DiFrancesco et al., 2004).



(+) S 16257
Ivabradine

A

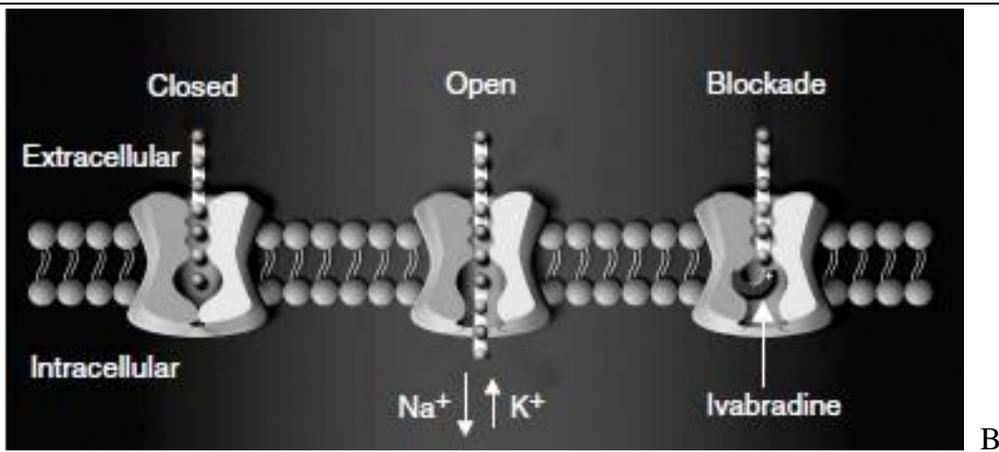


Figura 10. Struttura dell'Ivabradina (A) (Vilaine ,2006); e le caratteristiche principali del blocco selettivo (B) (DiFrancesco et al., 2007)

1.6 Nodo atrioventricolare

Il nodo AV venne originalmente identificato Sunao Tawara nel 1906 e la sua prima descrizione fu in termini di una rete cellulare densa connessa al fascio di His. Il nodo AV è limitato dal triangolo di Koch, una regione localizzata alla base dell'atrio destro, delimitata dal seno coronarico (CS), dal tendine di Todaro (tT) e dal setto della valvola tricuspide (TV) (Figura 11). Nell'uomo adulto il nodo AV ha dimensioni medie di 15 x 10 x 3 mm (l x w x h). Anatomicamente è possibile suddividere il nodo AV in tre regioni funzionalmente distinte:

- regione AN (atrio-nodale), zona di transizione tra l'atrio e la restante parte del nodo;
- regione N (nodale), zona centrale del nodo AV;
- regione NH (nodale-His), zona in cui le fibre nodali si continuano gradualmente con il fascio di His, che costituisce la regione iniziale del sistema specializzato di conduzione dei ventricoli (Munk et al, 1996).

Più precisamente si possono riconoscere un fascio nodale inferiore (LNB) e un nodo compatto (CN).

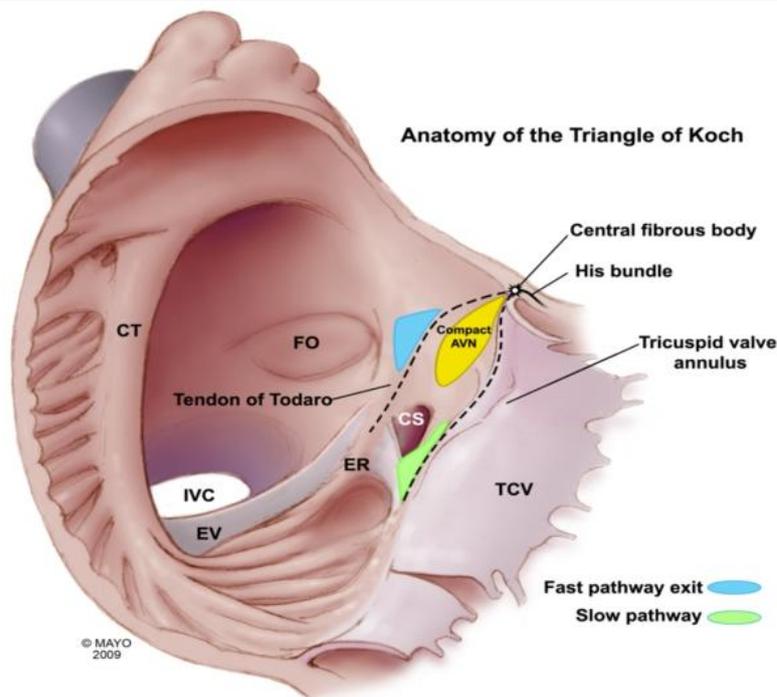


Figura 11. Localizzazione anatomica del nodo AV: CT, crista terminalis; IVC, vena cava inferiore; CS, seno coronarico; FO, fossa ovalis; EV, valvola di Eustachio; TVC, valvola tricuspid; ER, cresta di Eustachio; AVN, nodo AV. (Macedo et al., 2010)

Analisi citoistologiche identificano nel nodo AV 2 tipologie cellulari principali: le cellule ovoid (Figura 12A) e le cellule rod (Figura 12B). Le cellule ovoid sono di dimensioni piccole e allungate; sono localizzate nel nodo compatto (CN) senza però una disposizione precisa. Morfologicamente le cellule ovoid assomigliano alle cellule affusolate del nodo SA e dal punto di vista elettrico sembra che la maggior parte di queste cellule sia caratterizzata sia dalla presenza di correnti I_f e I_{CaL} , sia da attività spontanea (Munk et al., 1996; 33. Yuill et al., 2002).

Le cellule rod sono invece maggiormente presenti nel fascio nodale inferiore (LNB); appaiono più lunghe e hanno una disposizione ordinata e parallela tra di loro. In generale sia la presenza di corrente I_f sia l'autorimità sono scarse se non del tutto assenti (Hancox et al., 1993; Munk et al., 1996).

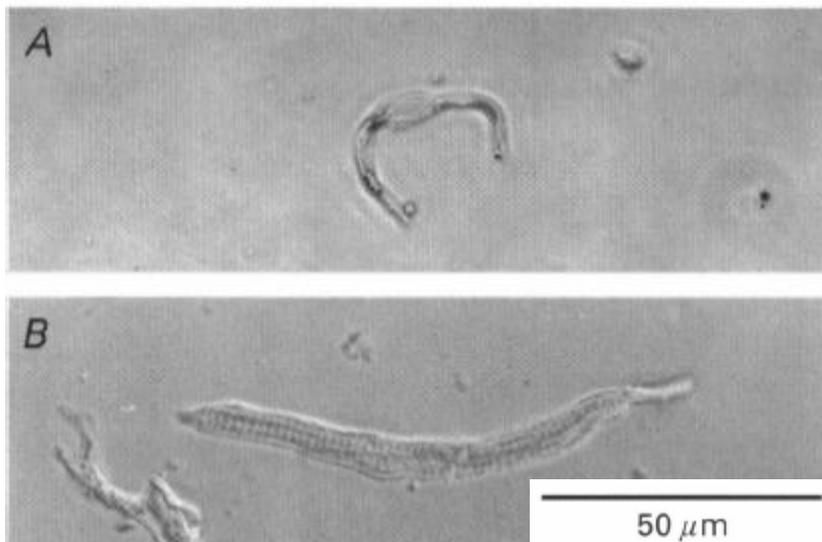


Figura 12. Morfologia delle cellule tipiche del nodo AV.

L'immagine A raffigura una cellula ovoid, caratterizzata da minori dimensioni e da una forma simile a quella delle cellule del nodo SA. L'immagine B è riferita a una cellula rod, che presenta dimensioni maggiori e una forma più allungata.

Se isolato dal resto del tessuto cardiaco il nodo AV presenta autoritmicità. In condizioni fisiologiche d'organo tale ritmicità è soppressa a causa dell'overdrive senoatriale. La precisa localizzazione del punto di insorgenza dell'attività pacemaker è stata identificata nel Nodo Compatto grazie a studi di mappatura ottica basati sull'uso di molecole fluorescenti voltaggio-dipendenti. Questa metodica permette infatti di registrare contemporaneamente l'attività elettrica da molteplici punti all'interno di un preparato. L'identificazione della regione del nodo compatto conferma le previsioni basate sulla presenza di cellule ovoid e di elevata espressione dei canali f (isoforma HCN4) (Kurian et al., 2010).

1.6.1 La classificazione del blocco atrioventricolare

Poiché nei dati sperimentali che verranno presentati si parlerà di blocchi atrioventricolari propongo qui di seguito una breve spiegazione.

- Il blocco AV di primo grado è caratterizzato da una frequenza cardiaca normale, ma un intervallo P-Q superiore a 0,2 s (in un uomo sano questo tratto dura circa 0,16 s). Questa patologia è dovuta ad una rallentata conduzione AV.

- Il blocco AV di secondo grado comporta un rallentamento più importante, che allunga la durata dell'intervallo P-R da 0,25 a 0,45 s. I potenziali d'azione che arrivano al nodo AV non sempre riescono ad oltrepassarlo e può capitare che la frequenza degli atri sia maggiore rispetto a quella dei ventricoli; si può quindi instaurare il ritmo 2:1, se la frequenza atriale è doppia di quella ventricolare, o i ritmi 3:1, 3:2 e così via. Questo fenomeno permette di proteggere i ventricoli da un'eccessiva frequenza di contrazioni, che potrebbero determinare un riempimento non adeguato dei ventricoli stessi. Ciò è importante ad esempio nel caso della fibrillazione atriale, una delle aritmie più comuni nell'uomo: il nodo AV protegge il cuore limitando il numero di impulsi trasmessi ai ventricoli. Gli impulsi prematuri vengono bloccati dal nodo AV e allungano la refrattarietà delle sue cellule, impedendo la trasmissione dell'impulso successivo (Yuill et al., 2002).

- Il blocco AV di terzo grado è definito anche completo, e si verifica quando l'intervallo P-R supera una durata di 0,35 – 0,45 s. Le onde P sono completamente dissociate dai complessi QRST e il cuore non pompa sangue per un periodo che va dai 5 ai 30 s, e riprende a battere quando insorge automatismo in alcune zone ventricolari. Nell'uomo il blocco completo causa una frequenza idiopatica di 25-30 battiti/min, originata da qualche focolaio ectopico ventricolare.

2 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del progetto è

- 1) Verificare il ruolo della corrente I_f nel contesto dell'attività cronotropa in topi $HCN4^{lox/lox; Cre}$ freely-moving.
- 2) Verificare il ruolo della corrente I_f nel contesto dell'attività autoritmica delle cellule atrioventricolari isolate da topi $HCN4^{lox/lox; Cre}$ knockout.
- 3) Verificare l'effetto cronotropo negativo del bloccante selettivo Ivabradina nei topi $HCN4^{lox/lox; Cre}$ KO e WT.

3 MATERIALI E METODI

3.1 COLONIA DI TOPI HCN4^{lox/lox; Cre}

I topi utilizzati sono alloggiati nello stabulario dell'Università degli Studi di Milano in via Celoria 26 (Figura 13).

Le procedure che abbiamo messo in pratica sono conformi alla regolamentazione sull'uso degli animali da laboratorio, stabilita dalle direttive Europee (86/609/CEE) e Statali (D.L. 116/1992) e alle indicazioni contenute nel *Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington DC, 1996).

Gli animali sono stabulati rispettando precise condizioni di temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidità, acqua e cibo sono forniti *ad libitum*.



Figura 13. Ambiente dello stabulario dell'Università degli Studi di Milano in via Celoria 26

3.1.1 Modello di topo knockout condizionale cardiaco e inducibile per il gene HCN4

Il modello sperimentale che viene utilizzato è un topo knockout condizionale ed inducibile per il gene Hcn4 ((Baruscotti et al., 2011). La strategia utilizzata per la preparazione dei topi KO si basa sul processo di ricombinazione sequenza-specifico Cre-loxP ottenuto dall'incrocio di 2 linee di topi transgenici.

La preparazione prevede l'utilizzo di due linee di topi: topi Cre (o $MCM^{+/-}$) e topi $Hcn4^{loxP/loxP}$. Nel genoma dei topi Cre è stata inserita a valle del promotore dell' α -miosina cardiaca la sequenza codificante per la proteina Cre-ricombinasi fusa ad entrambe le estremità alle sequenze codificanti due recettori per gli estrogeni modificati ($MCM^{+/-}$) (Figura 14).

In questo modo si ottiene una linea murina in cui tutte le cellule cardiache esprimono la Cre ricombinasi fusa ai recettori degli estrogeni; pertanto la proteina Cre è presente, ma in una forma inattiva. L'attivazione è inducibile somministrando un agonista estrogeno (tamoxifen) che, legandosi ai siti recettoriali, rimuove l'azione inibitoria sulla Cre ricombinasi.

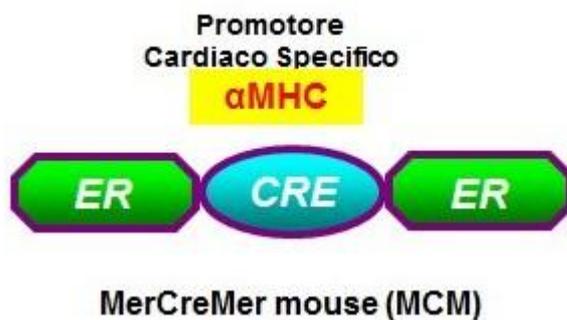


Figura 14. Modello del topo trasgenico MerCreMer (Sohal et al., 2001)

Questa linea di è stata gentilmente concessa dal Dr. Dawinder (Ubrecht Lab) e sono stati generati dal gruppo del Dr. Molkenkin (Sohal *et al.* 2001 *Circ Res*, vol 89). La seconda linea di topi ($Hcn4^{loxP/loxP}$) è invece stata ingegnerizzata inserendo ai lati dell'esone 2 di entrambi gli alleli del gene HCN4 due sequenze di riconoscimento (siti loxP) per la ricombinasi sito-specifica Cre. (Figura 15).

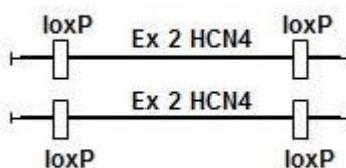


Figura 15. Modello del topo trasgenico LoxP

Incrociando topi $Hcn4^{lox/lox}$ con topi MerCreMer (si ottiene la Cre ricombinasi) in modo avere i topi ibridati ($Hcn4^{lox+/-, Cre+/-}$), poi l'incrocio delle due linee di topi ($Hcn4^{lox/lox}$; $Hcn4^{lox+/-, Cre+/-}$) (Figura 14) ha permesso di ottenere una linea di topi che presenta sia la Cre ricombinasi sotto il promotore cardiaco specifico α -miosina che gli alleli $Hcn4^{lox/lox}$; Cre affiancati dai siti loxP (Figura 16).

si continua l'incrocio tra i topi $Hcn4^{lox+/-, Cre+/-}$ e i topi $Hcn4^{lox/lox}$ per ottenere la colonia murina.

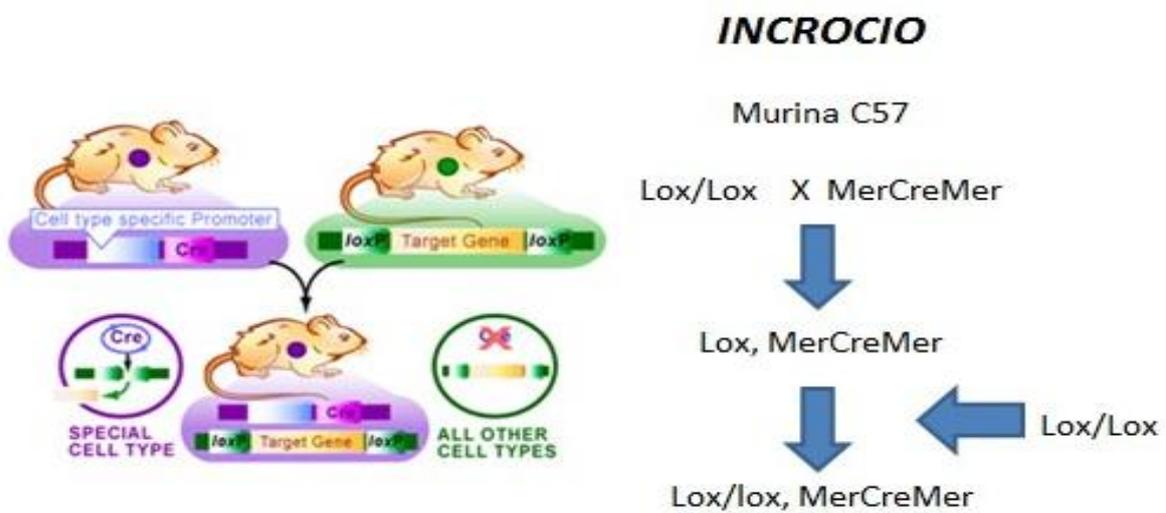


Figura 16. Generazione del Topo $Hcn4^{lox/lox}; Cre$

Il sistema Cre-loxP è stato utilizzato con successo in numerosi casi per lo studio del ruolo di diverse proteine. Nella descrizione del progetto il topo $Hcn4^{lox/lox}; Cre$ (anche chiamato $loxP^{+/+}; MCM^{+/-}$) sarà spesso identificato per semplicità con la definizione generica di topo HCN4 knockout (KO) anche se l'effettiva eliminazione del gene avviene solo dopo induzione con tamoxifen (Figura 17).

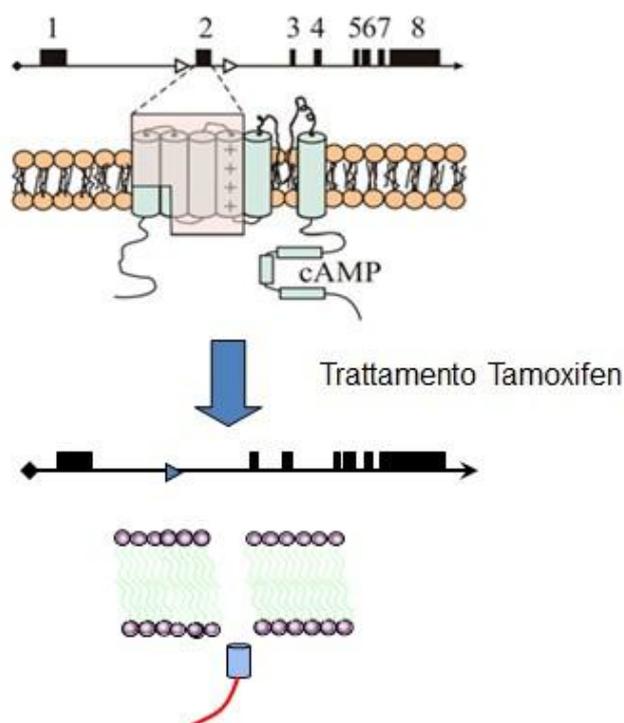


Figura17 Rappresentazione del processo KO: Nei topi $LoxP^{+/+} MCM^{+/-}$ la rimozione dell'esone 2 (in alto, i triangoli bianchi indicano i siti loxP) elimina i segmenti S1, S2, S3, S4 e parte del loop S4-S5 (in basso, area ombreggiata). La delezione inoltre induce un frame-shift che porta alla formazione di un codone di stop prematuro nel loop S5-S6.

3.2 GENOTYPING

Il *genotyping* è un protocollo sperimentale che permette di stabilire il genotipo dell'animale di partenza; le fasi da cui è composto sono: estrazione di DNA genomico da un campione di tessuto dell'animale, PCR (*Polimerase Chain Reaction*) ed elettroforesi su gel.

3.2.1 Estrazione del DNA genomico

I cuccioli di topo sono stati genotipizzati a circa 10/12 giorni di vita al fine di identificare le caratteristiche genetiche dei topi. Ogni topo è stato identificato da un codice alfa-numerico costituito da una o più lettere (ad esempio A oppure AA); animali di cucciolate diverse sono caratterizzati da lettere diverse, seguendo l'ordine alfabetico (AA, AB, AC...).

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita utilizzando il kit commerciale *Puregen Blood Core Kit B* (Quiagen).

- (1) Si procede al prelievo di un pezzo di tessuto (solitamente un pezzo di coda della lunghezza di circa 5 mm), e alla sua conservazione alla temperatura di -20 °C in un tubo *Eppendorf*[®] da 1,5 ml, sterile e opportunamente segnato con lo stesso codice dell'animale.
- (2) Il protocollo prevede la digestione *overnight* a 55 °C del campione di tessuto in una soluzione contenente *Cell Lysis Buffer (Quiagen)* e proteinasi K (concentrazione di 20 mg/ml).
- (3) Il secondo giorno si procede alla precipitazione della componente proteica utilizzando la *Protein Precipitation Solution seguita da centrifugazione a 13000 g per 3 minuti*. Quindi la soluzione è divisa in 2 parti nelle *Eppendorf*: un precipitato contenete le proteine e un surnatante con il DNA di interesse.
- (4) Il surnatante viene trasferito in una nuova *Eppendorf* contenete Isopropanolo la cui funzione è quella di intercalarsi tra le eliche del DNA ed estrarre le molecole d'acqua e garantire la precipitazione del DNA. Le *Eppendorf* vengono centrifugate per 1 minuto a 13000 g.
- (5) Il surnatante viene eliminato e il pellet di DNA viene lavato con etanolo al 70%.
- (6) Dopo un'ulteriore centrifugata di un minuto a 13000 g, il surnatante viene eliminato e le *Eppendorf* vengono asciugate sotto cappa, in modo da favorire l'evaporazione dell'etanolo.
- (7) Il DNA viene quindi risospeso in 50 µl di acqua *milli-Q (Millipore)*.
- (8) I campioni vengono incubati a 65 °C per 30 minuti a temperatura ambiente per 3 ore.
- (9) La soluzione con il DNA interesse viene infine quantificata allo spettrofotometro (*Amersham Biosciences*) e portata alla concentrazione 0.1 µg/µl.

3.2.2.PCR

I DNA estratti vengono eseguiti una PCR in modo distinguere e selezionare i genotipi dei cuccioli.

La PCR (Polimerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione di frammenti di DNA di limitate quantità. Nel nostro genotyping si esegue quindi una PCR in modo amplificare DNA e poter poi riconoscere nei diversi cuccioli la presenza o meno della Cre-ricombinasi (genotipo MerCreMer^{+/-}) e dei siti loxP (genotipo Hcn4^{loxP/loxP}).

La PCR si compone di fasi diverse: denaturazione, annealing, allungamento e terminazione del ciclo.

Per il genotyping dei nostri topi è stata eseguita una PCR con i seguenti 4 primer:

- primer loxP forward: GGCTTTAGCTCCATCTTGATTCTG;
- primer loxP reverse: CTAGAGAGCCAGTGTGAGACATGC;
- primer MCM forward: GTCTGACTAGGTGTGTCCTTCT;
- primer MCM reverse: CGTCCTCCTGCTGGTATAG.

Condizioni di PCR:

- 5 minuti 95 °C (1 ciclo)
 - 40 secondi 95 °C
 - 40 secondi 60 °C
 - 40 secondi 72 °C
 - 10 minuti 72 °C (1 ciclo)
- } (30 cicli)

La mix per la PCR contiene i seguenti reagenti:

- DNA (0,1µg/µl);
- dNTPs (2 mM);
- buffer 10X;
- primer loxP forward (1µM);
- primer loxP reverse (1µM);
- primer MCM forward (2µM);
- primer MCM reverse (2µM);
- Taq polimerasi (5 U/µl);
- *Milli-Q (Millipore)* fino ad arrivare al volume di 20 µl.

Bande attese: 141 bp wild type; 341 bp loxP.

Bande attese: nessuna wild type; 410 bp MCM.(Figura 18)

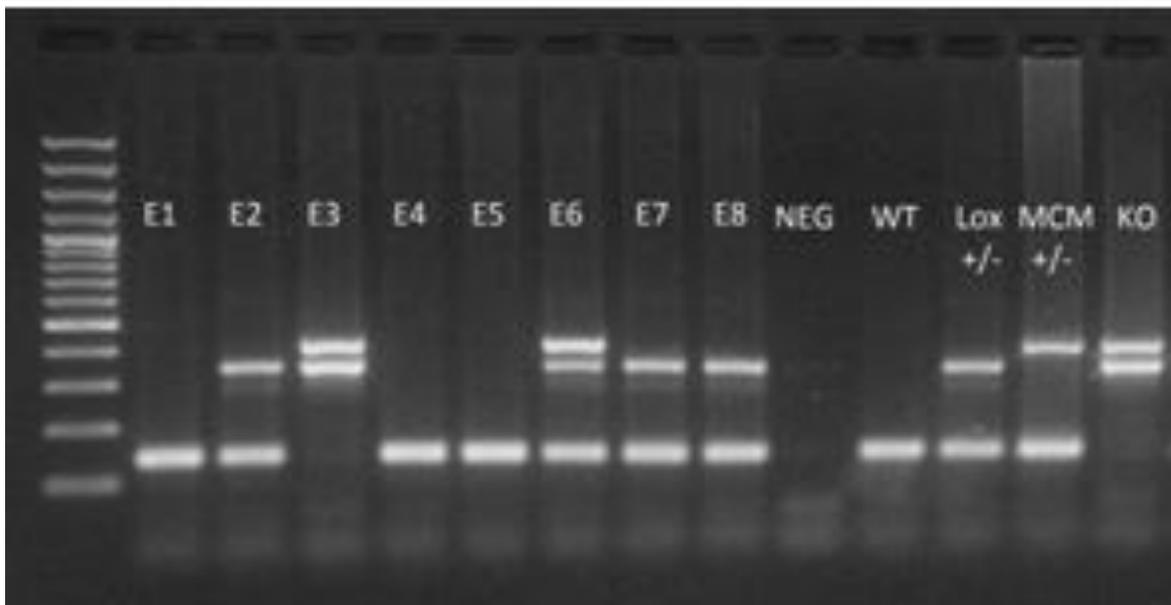


Figura 18. Esempio di elettroforesi su gel di agarosio per l'analisi dei prodotti di PCR. E1-E6 prodotti di PCR ottenuti da 6 topi diversi; NEG, controllo negativo; WT, LoxP +/-, MCM +/-, KO. Il WT presenta un'unica banda a 141 bp; LoxP^{+/-} hanno due bande a 341 e 141 bp, MCM^{+/-} due bande a 410 e 141 bp, KO: 410 e 341.

I prodotti di PCR vengono in seguito fatti migrare su gel di agarosio (1%) e un esempio dei risultati ottenuti è riportata in figura 18; individui wild-type presentano una sola banda della dimensione di 141 bp (E1, E4, E5); topi LoxP^{+/-} presentano due bande, rispettivamente a 341 e 141 bp (E2, E7, E8).

Per quanto riguarda il transgene MCM, presenta una banda a 410 bp. Quindi, analizzando il gel, si può affermare che E6 ha genotipo LoxP^{+/-}; MCM^{+/-}, mentre E3 possiede il genotipo di nostro interesse (LoxP^{+/+}; MCM^{+/-}).

3.3 Impianto telemetrico

I di topi, sia controllo wild type che transgenici Hcn4^{lox/lox;Cre}, sono stati operati per effettuare l'impianto di un apparecchio di registrazione radiotelemetrica.

Le linee guida per l'impianto dell'apparecchiatura radiotelemetrica (TA10ETA-F20, Data Sciences International) sono descritte in Sgoifo et al.,1996. Tale procedura viene di seguito descritta:

Anestesia: l'animale viene anestetizzato con una iniezione intraperitoneale di una soluzione con tiletamina e zolazepam ad una dose di 30 mg/kg.

Operazione d'impianto: Dopo la tricotomia e disinfezione dell'addome, si esegue una laparotomia ed il trasmettitore (TA10ETA-F20, Data Sciences International) è inserito nella cavità peritoneale. Un elettrodo (rosso) è fissato alla superficie dorsale del processo xifoideo, mentre l'altro elettrodo (bianco) viene inserito immediatamente nella cavità sotto il muscolo sternocleidomastoideo, creando un tunnel sottocutaneo lungo il collo e fissato allo stesso muscolo.

Terminata l'operazione l'animale viene mantenuto caldo e sotto controllo visivo per circa 6 ore in un'apposita gabbia di ricovero prima di riposizionarlo nella propria gabbia.

Dopo l'operazione viene somministrata gentamicina 0.01 mg/ml per via intraperitoneale e un antidolorifico (meloxicam 10 mg/kg S.C./24 hr per 3 gg). Prima di qualsiasi intervento successivo, gli animali sono lasciati recuperare per almeno 10-12 gg.

Metodo di osservazione e di analisi dei dati ottenuti dalla radiotelemetria:

L'impianto del sistema telemetrico di registrazione dell'attività cardiaca permette un monitoraggio continuo. Il telemetro viene acceso e spento attraverso un telecomando magnetico. I dati trasmessi dal telemetro vengono acquisiti online da un PC tramite la ricevitore.

Lo sperimentatore controlla periodicamente (almeno 3 volte al giorno) sia il profilo elettrocardiografico che lo stato di salute complessivo dell'animale.

Alla fine dell'esperimento, gli animali vengono immediatamente soppressi.

I dati acquisiti vengono analizzati tramite il software *Origin pro 8.0 (Microcal)* e *Clampfit (Molecular device)*.

3.4 ISOLAMENTO NODO ATRIO VENTRICOLARE

I topi sono stati sacrificati attraverso dislocazione cervicale previa anestesia con *Isofluorano* (2-3%). Dopo la rimozione dal torace, il cuore viene immerso e conservato in una soluzione fisiologica (Tyrode, in mM: NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, D-Glucosio 5.5, Hepes

NaOH 5, pH 7.4, 37 °C) addizionata di eparinaal fine di evitare la formazione di coaguli ematici. L'isolamento del nodo AV è stato eseguito con uno stereomicroscopio utilizzando come punti di repere il seno coronarico (CS), il setto ventricolare destro (RV) e la valvola tricuspide (TV). Una volta isolato, il nodo AV tagliato in 3-4 piccoli pezzi che poi sono stati trattati con la metodica di isolamento cellulare. Tale metodica è del tutto simile a quella utilizzata per l'isolamento della cellule dal nodo senoatriale. Innanzitutto il tessuto viene "lavato" con una soluzione priva di ioni calcio per favorire la rottura dei legami intracellulari (in mM: NaCl 140, KCl 5.4, MgCl₂ 0.5, KH₂PO₄ 1.4, taurina 50, Hepes-NaOH 5, D-glucosio 5.5 (pH 6.9). I pezzettini di tessuto sono stati poi esposti ad una soluzione enzimatica contenente collagenasi, elastasi e proteasi (in mM: NaCl 140, KCl 5.4, MgCl₂ 0.5, KH₂PO₄ 1.2, Hepes NaOH 5, taurina 50, D-Glucosio 5.5, albumina 1 mg/ml, CaCl₂ 200 mM, collagenasi 260 U/ml, elastasi 7 U/ml, proteasi 2.05 U/ml, 37 °C) per un tempo compreso tra i 25 e i 30 minuti. Successivamente a questo trattamento si è poi proceduto alla rimozione della presenza enzimatica mediante 3 lavaggi in una soluzione ad alto potassio (in mM: KCl, 20; KOH, 80; albumina 1mg/ml, acido glutammico, 70; acido β-idrossibutirrico, 10; KH₂PO₄, 10; taurina, 10; HepesKOH, 10; EGTA KOH, 0.1; pH 7.4); la presenza di alto potassio permette di mantenere le cellule in uno stato quiescente. La stessa soluzione è stata anche utilizzata come medium in cui è stata effettuata un'agitazione meccanica per un tempo di circa 5-10 min a 37 °C che ha permesso di ottenere singole cellule.

3.5 ELETTROFISIOLOGIA

Prima di procedere con gli esperimenti di elettrofisiologia è stato necessario riadattare gradualmente le cellule alla concentrazione extracellulare fisiologica di CaCl₂ aggiungendo volumi crescenti delle seguenti soluzioni:

- soluzione 5 composta da 13 ml di Tyrode e albumina 1 mg/ml;
- soluzione 6: NaCl 10 mM, CaCl₂ 1,8 mM.

Partendo da un volume di 3ml, le soluzioni vengono aggiunte ogni 4 minuti secondo lo schema seguente:

- 72 µl soluzione 6
- 153,6 µl soluzione 6;

- 354 µl soluzione 5;
- 1,2 ml soluzione 5;
- 4,2 ml soluzione 5.

Una volta pronte, le cellule vengono posizionate su una Petri da 35 mm e conservate ad una temperatura di 4 °C in attesa di procedere con analisi elettrofisiologica.

Le misurazioni elettrofisiologiche sono infine state effettuate in una soluzione di controllo (Tyrode) addizionato con BaCl₂ 1 mM e MnCl₂ 2 mM in quanto tali ioni permettono di eliminare le correnti contaminanti di K⁺ e Ca²⁺. La metodica impiegata per lo studio delle correnti è quella del whole-cell patch-clamp. Gli esperimenti sono stati condotti ad una temperatura di 35.0 ± 0.5 °C.

Le registrazioni sono state effettuate utilizzando elettrodi in vetro borosilicato con una resistenza di circa 4 MΩ, riempiti con una soluzione intracellulare (in mM: aspartato di potassio 130, NaCl 10, EGTA KOH 1, HEPES KOH 5, MgCl₂ 0.5, Na-ATP 2, fosfocreatina 5, Na-GTP 0.1, pH 7.2).

3.5.1 Setup sperimentale

L'unità di elettrofisiologia è costituita da un microscopio ad inversione (*Axiinvert S100*) posizionato su un tavolo antivibrante al fine di eliminare le vibrazioni meccaniche. La schermatura da interferenze elettriche è assicurata dalla presenza di una gabbia di Faraday. I segnali sono stati registrati utilizzando un'unità di elettrofisiologia costituita da un amplificatore *Axopatch 200B* (*Axon Instruments*) e dalla *Digidata[®] 1440A* (*Axon Instruments*).

3.5.2 Protocolli

Il software utilizzato per l'elaborazione dei protocolli di voltaggio imposti alla cellula era *pClamp 10.1* (*Axon Instruments*) e l'analisi e l'elaborazione grafica dei dati sono state effettuate mediante i programmi *ClampFit 10.1* (*Axon Instruments*) e *OriginPro 8* (*OriginLab*).

I protocolli utilizzati sono stati i seguenti:

- misurazione della capacità Per registrare la corrente capacitiva viene applicato un protocollo costituito da un singolo gradino iperpolarizzante di 10 mV di ampiezza (da -35 a -45 mV) della durata di 30 ms (Figura 19). A questi voltaggi infatti non vi è presenza di correnti ioniche attraverso canali e quindi l'unica corrente che fluisce è data dalla somma delle correnti capacitive più eventuali correnti di leakage.

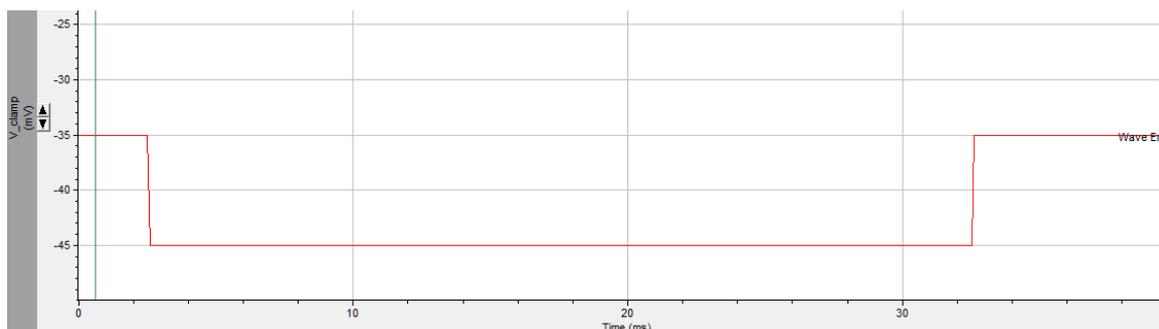


Figura 19. Protocollo di voltaggio utilizzato per registrare la corrente capacitiva.

misurazione della corrente I_f . In questo caso abbiamo utilizzato il protocollo mostrato in figura 21; la cellula viene mantenuta ad un potenziale di riposo di -35 mV e viene poi portata ad un potenziale test iperpolarizzante per 3 secondi, al termine del quale viene dato un gradino depolarizzante a +40 mV per 0.6 secondi. I potenziali test investigati erano: -65, -85, -105, -125 mV.

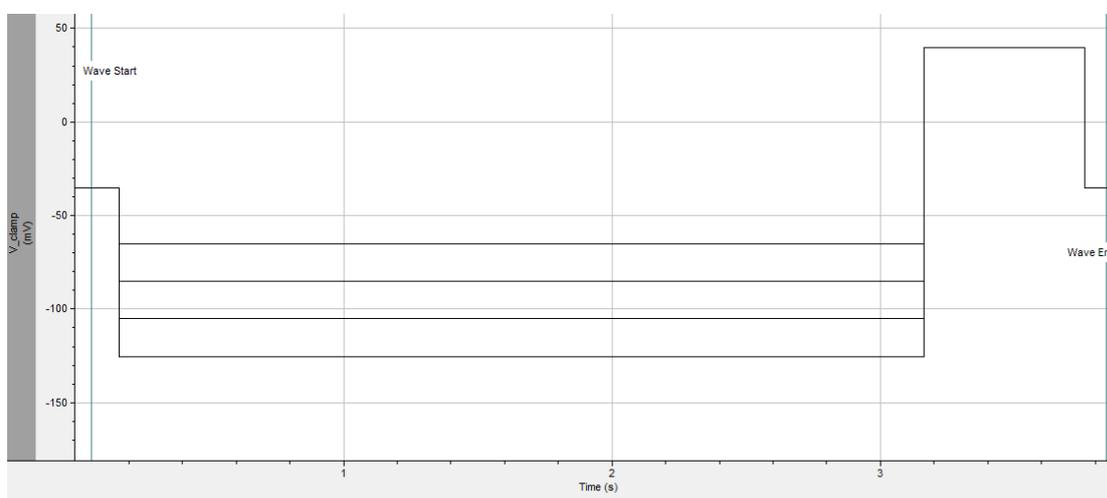


Figura 20. protocollo utilizzato per registrare la corrente I_f a diversi potenziali.

La densità di corrente è stata calcolata dividendo l'ampiezza della corrente I_f tempo-dipendente registrata ai diversi potenziali (in pA) per la capacità della cellula (in pF). La curva di attivazione della corrente I_f è stata ottenuta applicando 11 successivi gradini test iperpolarizzanti da -35 mV a -135 mV, ognuno seguito da un gradino iperpolarizzante a -120

mV (2.75 s) e da uno stimolo deattivante, depolarizzante a +10 mV (0.6 s). Il primo gradino test ha una durata di 10 secondi, mentre quelli successivi invece riducono questo tempo di 0.25 secondi. Il potenziale di holding era di -35 mV (Figura 21).

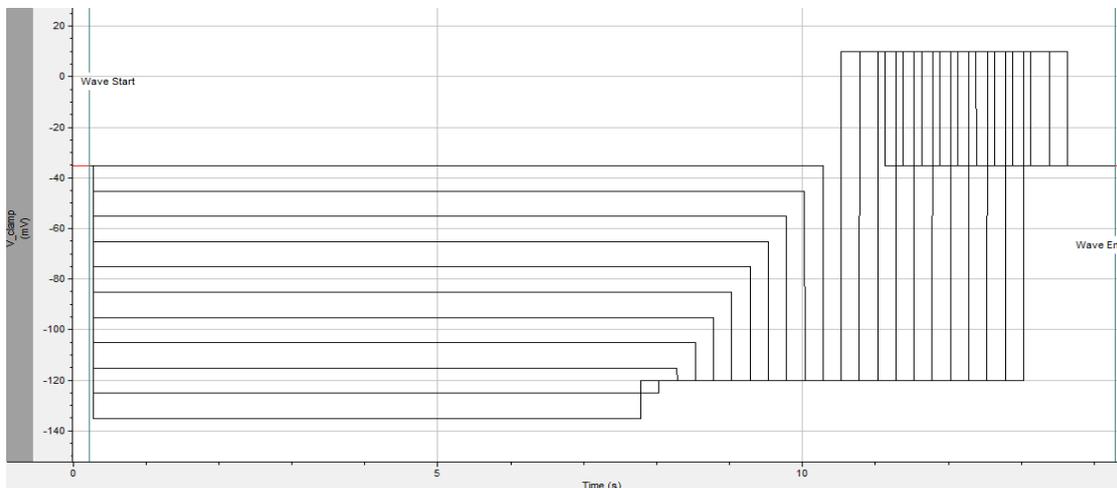


Figura 21. Protocollo di voltaggio utilizzato per costruire la curva di attivazione dei canali f.

I punti sperimentali necessari alla costruzione della curva di attivazione sono stati ricavati normalizzando le correnti registrate a -120 mV rispetto all'ampiezza massima. I punti ottenuti sono stati interpolati con l'equazione di Boltzmann: $y=1/(1+\exp((V-V_{1/2})/s))$, dove V indica il potenziale di registrazione, y la variabile di attivazione, $V_{1/2}$ il valore di voltaggio al quale metà dei canali sono attivati e s l'inverse slope factor della curva di attivazione.

4. RISULTATI

4.1 L'eliminazione del gene HCN4 mediante la procedura di knockout condizionale cardiaco ed inducibile nell'animale adulto induce lo sviluppo di bradicardia e blocco della conduzione atriventricolare.

In figura 22A sono presentati esempi di andamenti temporali della frequenza cardiaca registrati mediante elettrocardiografia radiotelemetrica in topi freely-moving. In particolare a sinistra si può osservare l'andamento temporale in topi di controllo mentre a destra quello di topi in cui è stato indotto il knockout genico (ciHCN4-KO).

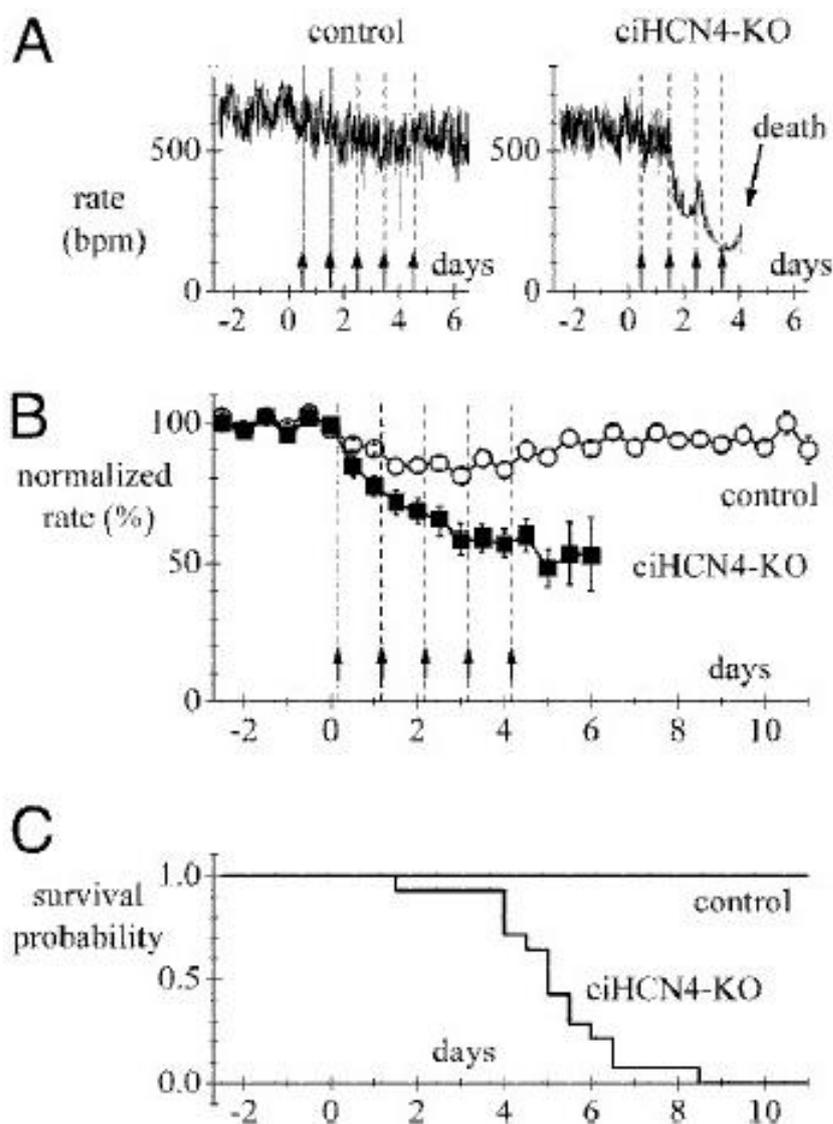


Figura 22. Il KO di HCN4 induce bradycardia profonda e morte dell'animale.

(A) Andamenti temporali della frequenza cardiaca in un topo freely moving di controllo (sinistra) e un topo ciHCN4-KO (destra). Il tempo convenzionalmente definito 0 sull'asse delle x corrisponde alle 8:00AM del giorno della prima iniezione di tamoxifene (Tam). (B) Andamento temporale medio delle frequenze cardiache di topi di controllo (n=14) e ciHCN4-KO (n=14) durante il trattamento Tam. Ogni punto rappresenta il valore medio delle frequenze registrate negli intervalli 8:00-10:00 AM e 8:00-10:00 PM. I valori sono poi stati normalizzati rispetto alla frequenza basale media registrata negli stessi periodi di tempo e calcolata nel periodo 2-5giorni prima dell'inizio del trattamento con Tam. (C) Curva di sopravvivenza Kaplan-Meier costruita sulla sopravvivenza dei topi utilizzati per costruire il grafico in B.

Nell'esempio mostrato in figura 23A, destra si può osservare come le iniezioni di TAM giornaliere (linee tratteggiate verticali) inducono nel topo ciHCN4-KO uno sviluppo progressivo della bradycardia (da circa 650 a circa 200 bpm) fino alla morte dopo la quarta

iniezione; mentre nel topo wild type (controllo) si assiste solo ad una diminuzione transiente del ritmo.

In figura 22B sono invece mostrati i dati medi della frequenza calcolati dalle 8 alle 10 e dalle 20 alle 22 su n=14 controlli e n=14 topi ciHCN4-KO. I valori di entrambe i gruppi sono stati normalizzati rispetto al valore di controllo, intendendo per controllo la condizione di frequenza che precedeva l'inizio del trattamento con tamoxifene. I valori di normalizzazione sono stati 584.3 ± 17 bpm per i topi ciHCN4-KO e di 545.5 ± 18.1 per i topi controllo.

Come si osserva facilmente dal grafico la frequenza media dei topi ciHCN4-KO è diminuita del 32.0% al giorno 2 (intendendo con giorno 0 il giorno di inizio trattamento) e del 47.1% al giorno 6. Risulta inoltre evidente che differenze significative della frequenza iniziano a comparire sin dal primo giorno di trattamento. Si noti che una parziale e temporanea riduzione del ritmo compare anche nei topi controlli e la spiegazione è probabilmente dovuta a qualche effetto spurio del trattamento estrogeno (He et al., 2003).

In figura 22C è mostrata la curva di sopravvivenza dove risulta chiaramente che tutti i topi ciHCN4-KO analizzati non sono vissuti oltre il 8-9 giorno; il valore medio della sopravvivenza è di 4.87 ± 0.42 giorni (n=14); nessun animal controllo è invece morto in tale periodo.

In figura 23A sono mostrate tracce di ECG registrate da un topo ciHCN4-KO a diverse fasi sperimentale: giorni 1, 4, 4.77 (questo valore corrisponde ad un'ora prima della morte). L'attenta osservazione delle tracce rivela che oltre allo sviluppo di bradicardia profonda, compare anche un prolungamento dell'intervallo PQ (intervallo tra onda P e Q del complesso QRS), che inizialmente si manifesta come semplice prolungamento (blocco di 1° grado che per poi evolve progressivamente verso blocchi più complessi (di 2° grado). Nel caso dei dati raccolti in figura 23B la prima evidenza di un blocco 2:1 è comparsa circa 7 minuti prima del blocco cardiaco completo. Il valore medio di comparsa di un blocco 2:1 è

stato calcolato in $4,50 \pm 0,30$ giorni ($n = 5$), mentre lo sviluppo temporale del prolungarsi dell'intervallo PQ è mostrato nella tabella in figura 24C.

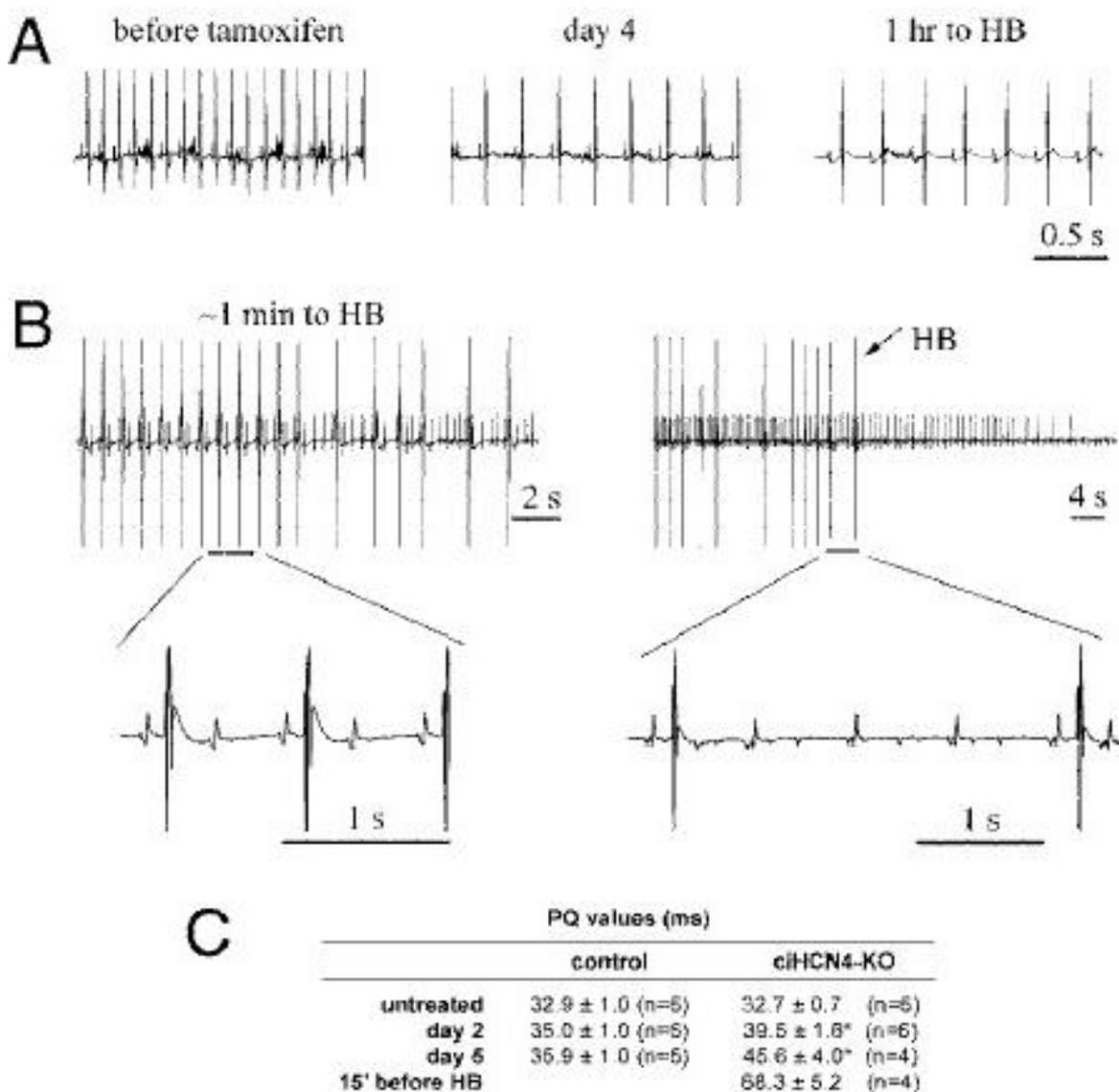


Figura 23. Sviluppo del blocco cardiaco (heart block, HB) in topi ciHCN4-KO.

(A) Tipico andamento elettrocardiografico rilevato in un topo ciHCN4-KO prima e durante varie fasi sperimentali: prima dell'iniezione Tam (452.4 ± 0.7 bpm), al 4 giorno (240.8 ± 1.3 bpm) e 1 ora prima della morte del topo (giorni 4.77, 210.2 ± 0.5 bpm). (B) Tracce registrate 1 minuto prima (sinistra) e durante (destra) il blocco cardiaco (HB). Si può chiaramente apprezzare la progressione dell'entità del blocco atrioventricolare. (C) Tabella degli intervalli PQ medi registrata a varie fasi del trattamento nei topi controllo nei topi ciHCN4-KO. (* $P < 0.05$ vs. day-matched control).

È importante notare che la bradicardia in sé non è responsabile della morte degli animali. Infatti nella parte destra della figura 23B si vede come, nonostante l'attività ventricolare sia completamente assente a causa del blocco cardiaco completo (HB) permane l'onda P,

segno di una ritmica attivita atriale. Questo comportamento è stato osservato in tutti i topi ciHCN-KO trattati (n=5).

L'analisi funzionale a livello cellulare del konckout di HCN4 è stata valutata misurando le proprietà della corrente I_f mediante la tecnica di patch clamp in cellule isolate dal SAN. Come si può vedere in figura 25 il trattamento con tamoxifene non modifica la corrente I_f nelle cellule isolate da topi di controllo. Al contrario, il trattamento con tamoxifen induce una sensibile riduzione della densità della corrente sia al giorno 2 che al giorno 5 nei topi ciHCN4-Ko (Figura 24).

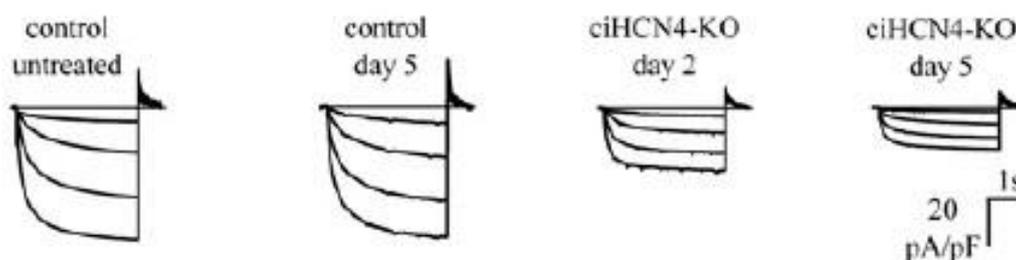


Figura 24. Tracce di corrente I_f .

Esempi di corrente I_f registrate durante gradini iperpolarizzanti da -65 a -125mV (-20mV intervallo, potenziale di holding = -35mV). Le cellule sono state isolate da topi controllo non sottoposti a tamoxifen (untreated) o al 5° giorno di trattamento (day 5) e da topi ciHCN4-KO dopo 2 (day 2) o dopo 5 (day 5) giorni di trattamento con tamoxifene.

4.1.1 Effetti del KO genico di HCN4 sulla risposta cronotropa β -adrenergica.

Un'ampia letteratura in vitro e su singole cellule senoatriali indica che la corrente I_f , mediata da HCN4, è un effettore fondamentale della modulazione simpatica β -adrenergica, pertanto abbiamo voluto analizzare le caratteristiche di tale modulazione in topi ciHCN-KO. E' infatti ipotizzabile che la parziale rimozione di tale corrente debba indurre una modificazione sostanziale di tale modulazione. Abbiamo quindi condotto analisi in parallelo sia su cellule senoatriali isolate che su topi freely moving.

Nell'animale intatto abbiamo utilizzato misure radiotelemetriche per verificare la risposta della frequenza cardiaca in seguito a stimolazione con isoproterenolo (Iso) nei topi controlli e ciHCN4-KO. Gli esperimenti sono stati condotti sia su topi controllo sia su topi

in cui il KO genico aveva raggiunto un livello ragguardevole; in quest'ultimo caso abbiamo infatti selezionato topi *ciHCN4-KO* in cui il trattamento con tamoxifene aveva ridotto la frequenza cardiaca ad un valore inferiore del 50% rispetto alla frequenza basale prima del trattamento.

La figura 25A mostra gli effetti di un' iniezione Iso (0.1mg/kg) su un topo di controllo e su un topo *ciHCN4-KO*. E' evidente che in entrambi i casi si verifica una sostanziale accelerazione del ritmo. I dati medi calcolati su 5 topi controllo e 7 topi *ciHCN4-KO* dimostrano che la variazione di frequenza non differisce sostanzialmente tra i due gruppi; ciò che invece differisce sostanzialmente è il valore della massima frequenza raggiungibile che è molto più elevato negli animali controllo. (Figura 25A).

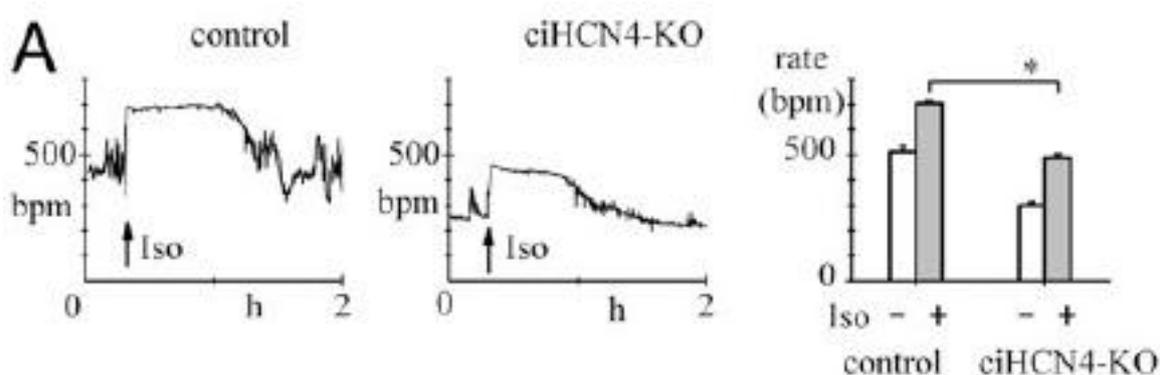


Figura 25A. Effetto dell'iniezione Iso 0.1mg/kg

Una più precisa definizione delle caratteristiche della risposta β -adrenergica è stata ottenuta mediante costruzione di una curva dose-risposta ottenuta durante sedazione dell'animale (Figura 26). In questo caso gli esperimenti sono stati condotti quando il processo di KO genico aveva raggiunto un valore tale per cui la frequenza cardiaca basale dell'animale non sedato era circa 200 bpm. Dati precedenti dimostrano che questo valore di frequenza corrisponde ad una riduzione della corrente I_f di circa il 70%. I dati ottenuti in questa condizione sperimentale indicano che la stimolazione β -adrenergica sembra cominciare ad avere un'efficacia modulatrice cronotropa a partire da 0.02 mg/kg, mentre nel topo controllo il valore soglia appare di 0.005. Questa differenza indica quindi una notevole perdita di sensibilità modulatrice nel topo KO. Abbiamo inoltre notato che in

condizioni di attivazione β -adrenergica massimale (0.5 mg/kg) la frequenza cardiaca media massima è 363 bpm (1 topo solo); ciò mette quindi in luce anche l'insorgenza di una forte riduzione di intensità modulatoria.

Questi dati sembrano quindi indicare che HCN4 rappresenta un target modulatorio essenziale della frequenza cardiaca sia per il controllo in condizioni di forte stimolazione simpatica sia per il controllo submassimale o di "fine tuning", un controllo cioè basato su minimi aggiustamenti della frequenza.

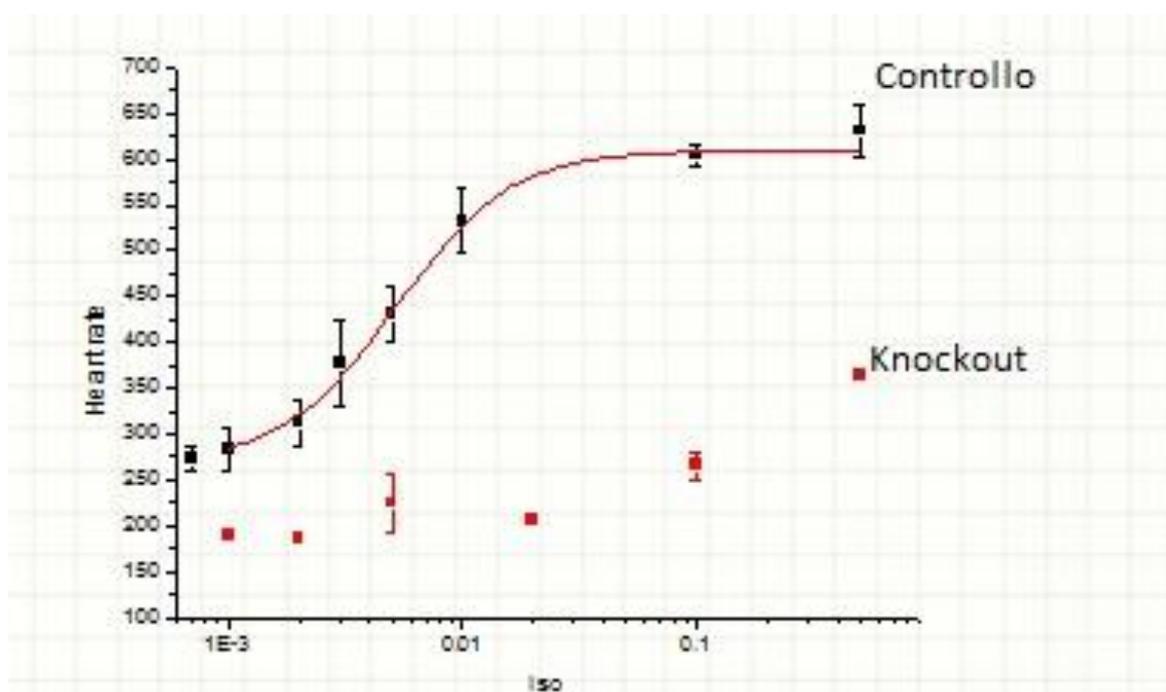


Figura 26. Curva dose-risposta Isoproterenolo nei topi di controllo e ci-HCN4 KO

N.test = 53, N.topi di controllo = 12

N.test = 13, N.topi di ciHCN-KO = 4

4.2 Ruolo della corrente I_f nel contesto dell'attività autoritmica delle cellule atrioventricolari isolate da topi $HCN4^{lox/lox; Cre}$ knockout.

Abbiamo poi proceduto a valutare gli effetti della delezione del gene *Hcn4* sulle proprietà della corrente I_f registrata da cellule atrioventricolari. Inizialmente ci siamo concentrati sulla caratterizzazione morfologica delle cellule e sullo studio della corrente I_f in topi controllo. Come è noto dalla letteratura (Munk et al., 1996, Merger et al., 2011, Yuill et al., 2002) il nodo AV è principalmente formato da due tipi cellulari: le cellule rod e le cellule ovoid che sono facilmente identificabili in base alle caratteristiche morfologiche. E infatti

noto che le rod, oltre ad avere dimensioni maggiori rispetto alle ovoid, presentano una forma più allungata. I nostri esperimenti hanno confermato questi dati di letteratura in quanto l'osservazione del nostro preparato al microscopio ha evidenziato la presenza dei due tipi cellulari ricercati, come mostrato in figura 27.

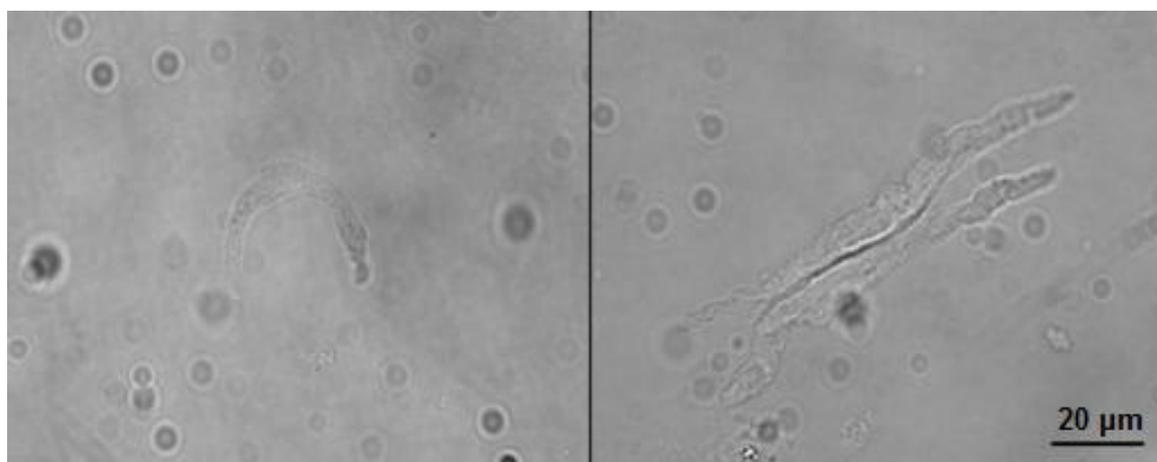


Figura 27. Differenze morfologiche tra cellule ovoid e rod: esempi di cellule ovoid (sinistra) e rod (destra) isolate da un topo controllo. Le cellule ovoid hanno dimensioni minori rispetto alle rod, che sono caratterizzate anche da una forma più allungata.

L'analisi delle capacità di queste cellule, ottenute mediante esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell, sono presentati in figura 28; cellule ovoid di controllo hanno una capacità media di 25.5 ± 2.9 pF (n=12), mentre le rod hanno una capacità media di 42.7 ± 3.2 pF (n=11); l'analisi statistica ha confermato una differenza significativa tra le capacità dei due tipi cellulari (Student T-test, P-value < 0,05); questi risultati sono in accordo con i dati presenti in letteratura (Munk et al., 1996; Merger et al., 2011; Yuill et al., 2002).

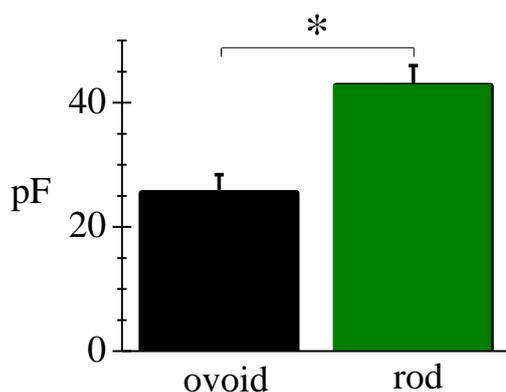


Figura 28. Le cellule ovoid hanno una capacità minore di quella delle cellule rod. Capacità medie delle cellule ovoid (nero) e rod (verde); *, $P < 0,05$ Student T-test.

Successivamente abbiamo valutato la presenza di differenze a livello della densità di corrente I_f tra cellule rod e ovoid. Come mostrato in figura 29, le cellule ovoid ($n=12$) hanno una densità media di corrente, misurata a -125 mV, pari a -31.8 ± 2.9 pA/pF, mentre le rod ($n=11$) hanno un valore medio di -16.8 ± 3.1 pA/pF. La differenza tra i due tipi cellulari è risultata statisticamente significativa (Student T-test, P -value $< 0,05$). Anche tali dati sono in accordo con evidenze di letteratura che riportano una maggior densità di corrente delle ovoid rispetto alle rod (Munk et al., 1996)

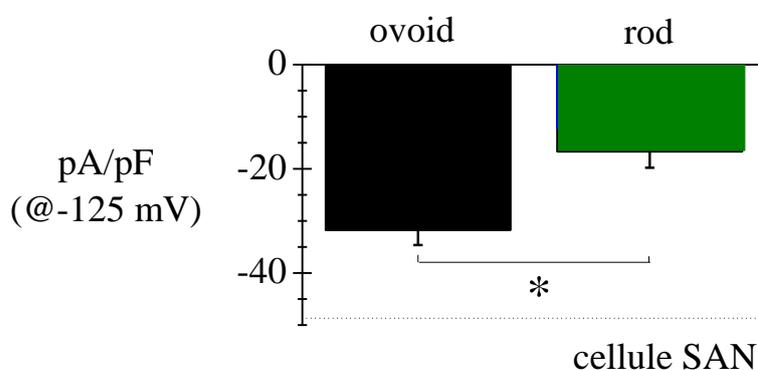


Figura 29. Le cellule ovoid hanno una maggior densità di corrente I_f rispetto alle rod. Densità di corrente media misurata a -125 mV in cellule ovoid (nero) e rod (verde) isolate da topi controllo; la linea tratteggiata indica il valore medio della densità di corrente misurata in cellule SAN (Baruscotti et al., 2011) *, $P < 0,05$ Student T-test.

Il confronto con le densità di corrente I_f con i valori da noi misurati per le cellule senoatriali indicano che sia le cellule rod che le cellule ovoid hanno densità inferiori (Baruscotti et al., 2011) e ciò è indicato dalla linea tratteggiata mostrata in figura 20. Dal

confronto emerge che nel nodo AV la densità di corrente è inferiore di circa il 40% nelle ovoid e del 65% nelle cellule rod.

Dopo aver quindi confermato che le cellule da noi isolate effettivamente corrispondono alle cellule atrioventricolari descritte in letteratura, abbiamo condotto degli esperimenti per studiare le conseguenze che la rimozione dei canali HCN4 può avere su queste caratteristiche.

Per prima cosa abbiamo valutato le capacità delle cellule ovoid e rod isolate da animali HCN4 KO sacrificati al quinto giorno di trattamento con il Tamoxifen. In figura 30 sono mostrati i risultati delle analisi che indicano come le cellule ovoid isolate da topi KO hanno una capacità media di $24,8 \pm 1,8$ pF (n=7) che non è statisticamente diversa da quella delle cellule ovoid isolate dai topi controllo ($25,5 \pm 2,9$ pF). Similmente le capacità delle cellule rod isolate da topo controllo e da topi knockout risultano simili con un valor medio di 38.1 ± 3.8 pF (n=6, KO) e di $42,7 \pm 3,2$ pF, n=6 controllo).

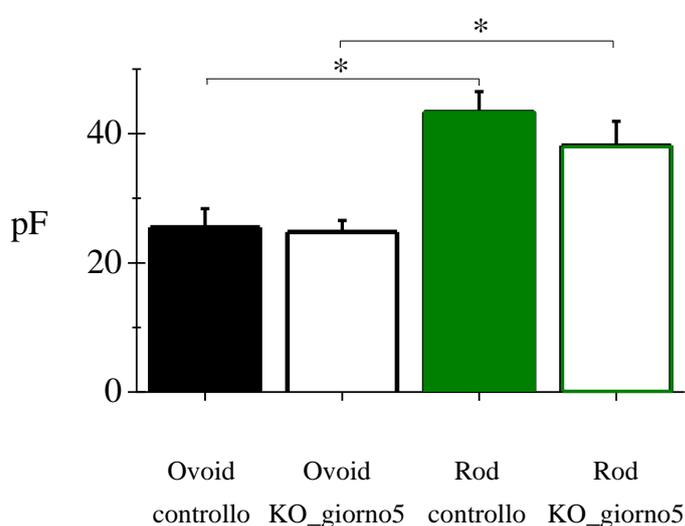


Figura 30. Il knockout del gene Hcn4 non altera le dimensioni delle cellule rod e ovoid. Valori medi di capacità delle cellule rod e ovoid di topi WT e KO. Considerando le cellule isolate da topi controllo e KO, compare una differenza significativa tra i due diversi tipi cellulari. *, $P < 0,05$ Student T-test. Invece non è presente differenza statistica tra le cellule ovoid controllo e KO e tra le cellule rod controllo e KO.

In figura 31A sono riportati esempi di tracce di corrente I_f registrate a diversi potenziali (-65, -85, -105 e -125 mV) in cellule ovoid (sinistra) e rod (destra) isolate da topi controllo e topi KO. Queste tracce mostrano chiaramente che la delezione del gene *Hcn4* provoca una riduzione dell'ampiezza della corrente I_f anche nelle cellule senoatriali sia rod che ovoid. La voltaggio dipendenza (curve tensione-corrente) delle cellule ovoid e rod è mostrata in figura 31B, e i valori relativi sono elencati in tabella 1. In entrambi i tipi cellulari e a tutti i potenziali considerati la corrente I_f registrata da topi KO è statisticamente minore di quella registrata da cellule isolate da topi controllo ($P < 0,05$ Student T-test). I valori di riduzione media osservati ai potenziali di -65 mV, -85 mV, -105 mV e -125 mV sono del 77%, 74%, 70%, 66% per le cellule ovoid e dell'80%, 68%, 63%, 67% per le cellule rod.

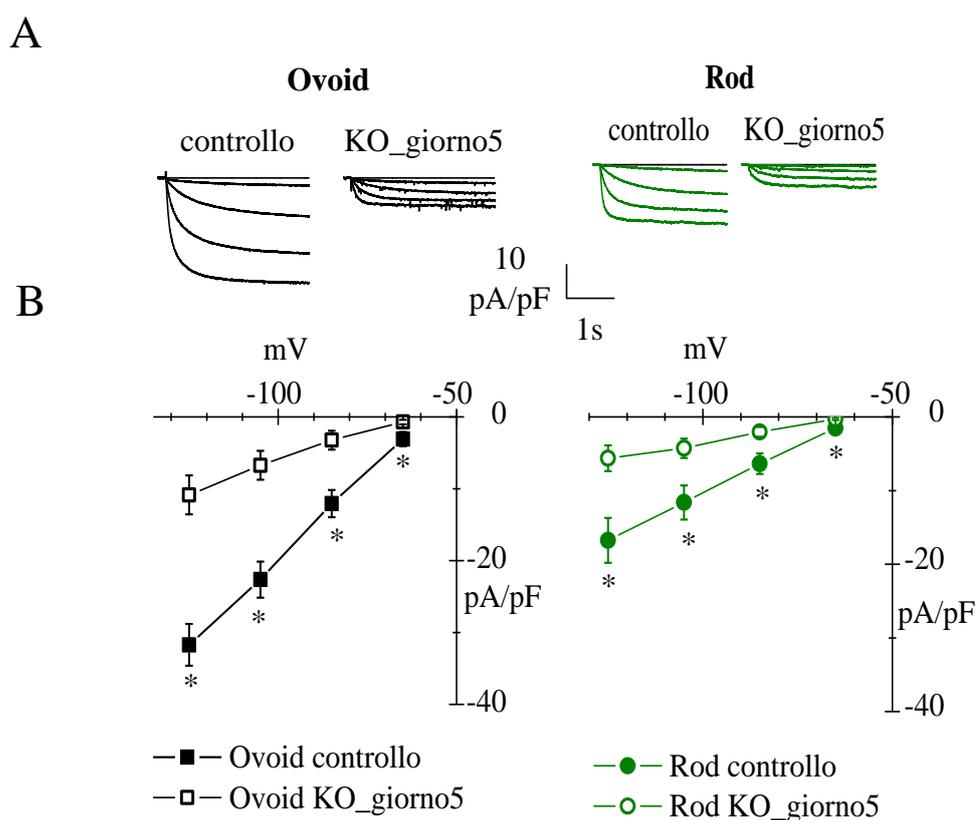


Figura 31. Il knockout del gene *Hcn4* porta ad una riduzione della corrente pacemaker I_f delle cellule del nodo atrioventricolare. A: tracce rappresentative di corrente I_f registrate a -65 mV, -85 mV, -105 mV, -125 mV. Le tracce sono state registrate da cellule ovoid (sinistra) e rod (destra) isolate da topi controllo e KO. B: curve corrente-voltaggio medie ottenute dagli stessi gruppi mostrati nel pannello A; nei topi KO la densità di corrente I_f si riduce significativamente in entrambi i tipi cellulari (*, $P < 0,05$, T-test).

Tabella 1. Valori medi delle densità di corrente ottenute per le cellule ovoid controllo, ovoid KO al quinto giorno di trattamento, rod controllo e rod KO al quinto giorno.

Potenziale	Ovoid controllo			Ovoid KO_giorno5		
	mV	pA/pF	SEM	n	pA/pF	SEM
-65	-3.1	1.0	11	-0.7	0.3	7
-85	-12.1	1.9	12	-3.2	1.3	6
-105	-22.6	2.5	12	-6.7	2.0	7
-125	-31.7	2.9	12	-10.9	2.7	7
Potenziale	Rod controllo			Rod KO_giorno5		
	mV	pA/pF	SEM	n	pA/pF	SEM
-65	-1.5	0.5	11	-0.3	0.1	5
-85	-6.3	1.4	11	-2.0	0.7	6
-105	-11.6	2.3	11	-4.3	1.3	6
-125	-16.8	3.1	11	-5.6	1.8	6

I dati chiaramente indicano che la densità di corrente si riduce in modo simile a tutti i potenziali e ciò conferma che la delezione del gene *Hcn4* ha come effetto la riduzione della conduttanza massima.

Come successiva analisi abbiamo valutato le proprietà cinetiche della corrente I_f analizzando le curve di attivazione in controllo e dopo rimozione dei canali HCN4; tale valutazione è stata condotta sia in cellule ovoid che in cellule rod. Come mostrato in figura 32 le curve di attivazione medie non risultano significativamente diverse ($P > 0,05$ Student T-test). In tabella 2 sono riportati i valori di $V_{1/2}$ (voltage di mezza attivazione) e s (inverse slope factor) delle curve medie, ottenuti interpolando i dati con l'equazione di Boltzmann.

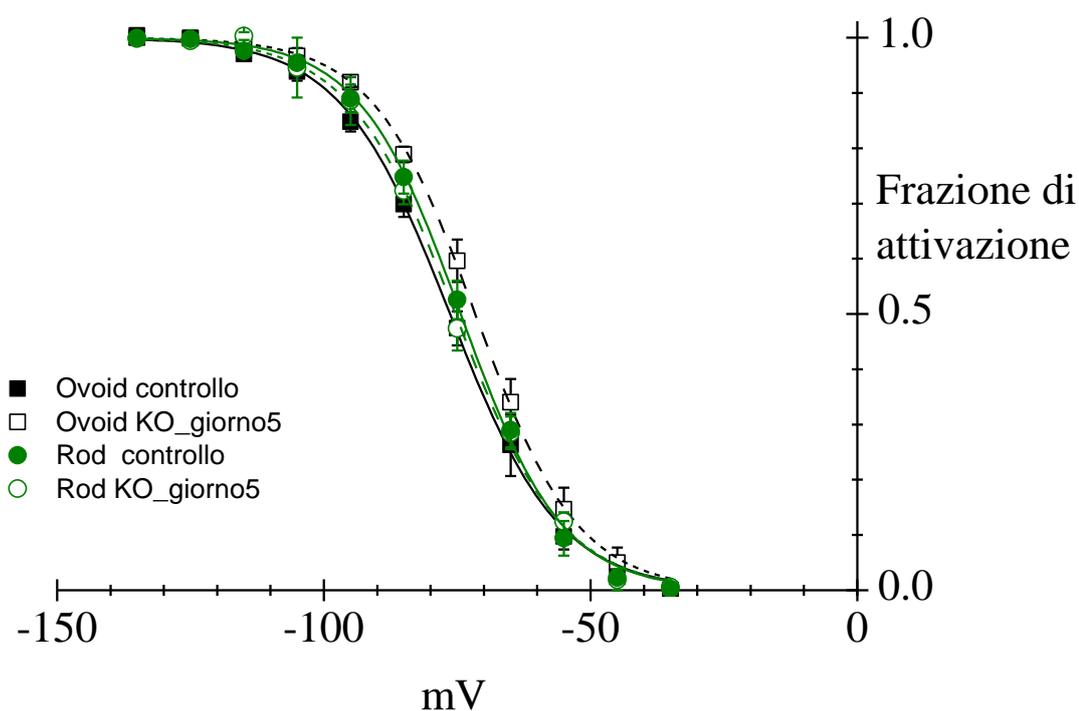


Figura 32. Il knockout del gene HCN4 non altera la voltaggio dipendenza della corrente pacemaker I_f atrioventricolare. Curve di attivazione medie della corrente I_f misurate in cellule ovoid controllo (■) e KO al quinto giorno di trattamento con il Tamoxifen (□), rod controllo (●) e KO (○); i punti sono stati interpolati con l'equazione di Boltzmann e i valori relativi al voltaggio di mezza attivazione ($V_{1/2}$) e all'inverse slope factor (s) sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2. Valori di potenziale di mezza attivazione ($V_{1/2}$) e inverse slope factor (s) relativi ai tipi cellulari in esame.

Cellula	n	$V_{1/2}$	s
Ovoid controllo	5	-76.3 mV	10.2 mV
Ovoid KO_giorno 5	3	-71.6 mV	9.6 mV
Rod controllo	4	-74.3 mV	9.5 mV
Rod KO_giorno 5	3	-75.3 mV	10.0 mV

La sostanziale identità della voltaggio dipendenza (Figura 32) e il fatto che la densità di corrente si riduce in modo simile a tutti i potenziali considerati (Figura 31) suggerisce che la diminuzione della corrente I_f nei topi HCN4 KO non è dovuta a modificazioni dei canali HCN4, ma ad una loro diminuita espressione.

4.3 Identificazione dell'effetto del bloccante selettivo Ivabradina nei topi *ciHCN4-KO* e WT
Abbiamo poi deciso di verificare la compatibilità dei dati ottenuti in condizione di KO di HCN4 con esperimenti in cui l'eliminazione del contributo della corrente pacemaker non veniva ottenuta per via genetica (KO genico), ma mediante dissezione farmacologica.

Per far ciò, abbiamo utilizzato un bloccante selettivo del canale HCN4 che è l'ivabradina. Esperimenti volti a valutare la durata dell'effetto dell'ivabradina indicano che l'ivabradina raggiunge un effetto stazionario in circa 40-60 minuti e permane poi abbastanza stabile per 6 ore.

Innanzitutto abbiamo verificato che in condizioni di controllo l'ivabradina (6 mg/kg) è in grado di abbassare la frequenza cardiaca da un valore controllo di 551.9 ± 44.5 bpm (n=6 tests, 2 topi) ad un valore di $281,3 \pm 8,8$ bpm (n=6 tests, 2 topi). mentre in assenza di ivabradina la stimolazione β -adrenergica (0.1 mg/kg) aumenta la frequenza fino ad un valore massimale saturante di 747.4 ± 4.8 bpm (n=8 tests, 2 topi) (Figura34).

Successivamente abbiamo valutato quale fosse l'effetto della stimolazione β -adrenergica (0.1mg/kg) in presenza di pretrattamento con ivabradina (Figura 33). In questo caso le frequenze medie erano 551.9 ± 44.5 bpm prima del trattamento con ivabradina, 281.3 ± 8.8 durante ivabradina e 564.7 ± 7.6 bpm (n=6 tests, 2 topi) in presenza di ivabradina + isoprenalina. In figura 33 è mostrato un tracciato illustrativo.

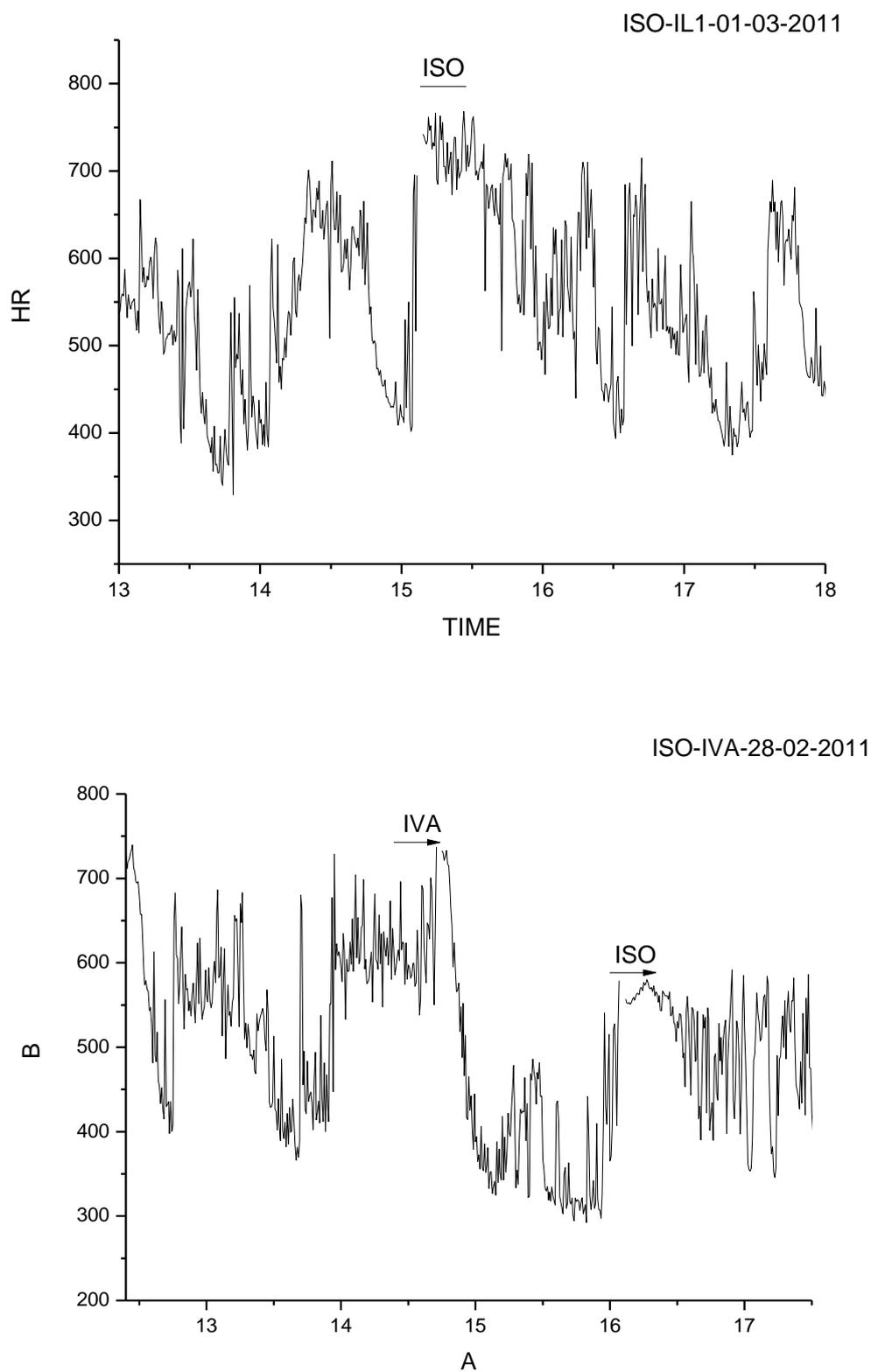


Figura 33. Regrazioni telemetriche elettrocardiografiche della frequenza cardiaca in un topo controllo stimolato con isoprenalina (ISO) prima e dopo ivabradina.

5 DISCUSSIONE

E' importante sottolineare che i nostri dati contrastano con altri dati in letteratura ottenuti su modelli murini knockout per HCN4. In particolare i modelli precedenti presentavano però la limitazione di non essere specifici cardiaci (Herrmann et al., 2007; Hoesl et al., 2008). In questi modelli il gene HCN4 è stato eliminato o in modo globale (Herrmann et al., 2007), utilizzando come promotore della Cre-ricombinasi un promotore ubiquitario, o in tutte le cellule in cui espressa la proteina HCN4 (Hoesl et al., 2008), utilizzando come promotore della Cre-ricombinasi il promotore di HCN4. In particolare in quest'ultimo caso la delezione di HCN4 avviene quindi anche oltre che nei cardiomiociti anche in neuroni centrali e periferici; per tal motivo diventa quindi difficile isolare l'effetto della rimozione diretta di HCN4 dal nodo SAN da quello indiretto mediato dal SNC e periferico.

E' stato proprio per evitare questi problemi che nel nostro studio abbiamo deciso di controllare l'espressione della Cre-ricombinasi mediante l'utilizzo del promotore della α -miosina cardiaca (α MHC) in quanto rappresenta un promotore esclusivamente attivo nelle cellule cardiache.

Gli esperimenti condotti sui modelli precedenti mostravano risultati notevolmente diversi dai nostri. In particolare in questi modelli murini l'eliminazione di HCN4 determinava la comparsa di pause sinusali ifrizzate a lunghi periodi di attività cardiaca a frequenza assolutamente normale (Herrmann et al., 2007; Hoesl et al., 2008). A livello cellulare invece ciò che veniva osservato da questi autori era che una larga frazione di cellule senoatriali (45-90%) erano caratterizzate da assenza di attività autoritmica. Per quanto riguarda i dati di corrente invece i dati della letteratura si allineano con i nostri in quanto la riduzione della corrente era evidente in tutte le cellule con valori medi di 77%, che quindi non differiscono dai nostri.

Come indicato nella sezione Risultati il nostro modello invece porta ad una bradicardia profonda costante senza la comparsa di pause anomale e tale riduzione della frequenza caratterizza sia l'animale adulto che l'autoritmicità delle singole cellule senoatriali. Una

chiara spiegazione delle differenze osservate con i dati in letteratura appare non facilmente definibile e tuttavia l'osservazione che il nostro modello non risente delle possibili influenze/alterazioni indotte da afferenze neuronali rappresenta certamente un sistema più idoneo a valutare l'impatto di HCN4 sull'attività senoatriale cardiaca. E' poi importante notare che mentre i nostri risultati sono caratterizzati da una forte coerenza interna tra gli effetti a livello cellulare e quelli sull'animale *in toto*, tale coerenza sembra essere meno chiara per i modelli non specifici cardiaci dove l'assenza di attività senoatriale a livello cellulare non giustifica in modo evidente la presenza di pause nell'animale intatto.

Numerosi studi di letteratura evidenziavano che la corrente I_f svolge un ruolo essenziale nel contesto della modulazione cronotropa cardiaca operata dal sistema nervoso autonomo. Su questa base abbiamo quindi investigato come tale modulazione potesse essere modificata in presenza di knockout del gene HCN4. I dati indicano che gli animali ciHCN4-KO preservano la risposta alla stimolazione β -adrenergica in quanto l'accelerazione indotta da dosi massimali di Iso è simile sia nel topo WT che nel topo ciHCN4-KO; tuttavia la risposta del topo ciHCN4-KO (in termini di valore assoluto della frequenza cardiaca) non raggiunge il valore massimale che viene raggiunto nei topi controllo. Per verificare l'attendibilità dei dati ottenuti con il modello knockout, abbiamo eseguito esperimenti in cui l'eliminazione del contributo della corrente pacemaker avesse origine farmacologica mediante l'utilizzo del bloccante specifico Ivabradina. I dati indicano che anche in presenza di Ivabradina somministrata a topi controllo, la risposta β -adrenergica è alterata in modo simile a quanto osservato nel knockout. Complessivamente questi dati permettono pertanto di concludere che il canale HCN4 svolge un ruolo importante anche come target della modulazione β -adrenergica.

I dati del nostro studio indicano che il knockout di HCN4 induce uno sviluppo progressivo della bradicardia ma non si raggiunge mai l'abolizione della attività sia del nodo senoatriale (dati in ECG) che delle singole cellule SAN (patch-clamp current-clamp). Tale affermazione è esemplificata dall'osservazione che anche in presenza di arresto dell'attività ventricolare (Heart Block) vi è permanenza di una regolare attività atriale

(Figura 23C). L'arresto della attività ventricolare non è quindi inputabile ad un blocco elettrico del cuore in toto causato dallo spegnimento dell'attività senoatriale, ma è invece la conseguenza dell'alterata capacità funzionale del nodo AV di condurre l'impulso. In generale i dati indicano che il knockout del gene *Hcn4* determina comparsa di blocchi atrioventricolari di entità progressivamente crescente che, da un'iniziale allungamento dell'intervallo PQ (Figura 23C) arrivano fino a blocchi blocchi della conduzione di tipo 2:1, 3:1 e oltre che poi degenerano in blocco atrioventricolare completo. La mancata insorgenza di ritmi idioventricolari determina in seguito la morte imprevedibile degli animali per arresto cardiaco. Gli effetti del knock-out di *Hcn4* sono quindi molto marcati anche a livello del nodo AV e, soprattutto, sembrano suggerire un inaspettato ruolo di questi canali nella velocità ed efficacia di conduzione dell'impulso cardiaco attraverso il nodo atrioventricolare. Tale dato era inatteso ed è attualmente in attesa di una logica e coerente interpretazione. La presenza di canali HCN è infatti da sempre associata alla capacità delle cellule di produrre potenziali d'azione in modo spontaneo ma non esistono ad oggi evidenze che li leghino anche alla propagazione dell'impulso, proprietà normalmente attribuita all'attività dei canali di sodio e di calcio, alle gap-junctions e ad elementi strutturali (Bakker et al., 2010; Mezzano et al., 2012).

Abbiamo quindi intrapreso una ricerca proprio con lo scopo di identificare il legame esistente tra HCN4 e propagazione dell'impulso attraverso il nodo AV. Il modello sperimentale utilizzato è stato ovviamente il topo *ciHCN4-KO* condizionale (cardiaco) e inducibile. Come primo target ci siamo proposti di verificare se le cellule del nodo AV che eravamo in grado di isolare avessero le stesse proprietà e tipologie già descritte in letteratura. In particolare è riportato che nel nodo AV sono presenti due tipi cellulari, definiti rod e ovoid (Munk et al., 1996; Merger et al., 2011; Yuill et al., 2002). In prima battuta abbiamo quindi lavorato al fine di isolare in modo appropriato questi due tipi cellulari e di verificare che le loro proprietà fossero paragonabili a quelle già riportate in letteratura. Come atteso le cellule ovoid sono più piccole e affusolate, con una forma simile alle cellule senoatriali; viceversa, le rod sono caratterizzate da dimensioni maggiori e da una forma più allungata. Nel corso dei nostri esperimenti siamo riusciti ad isolare questi

due tipi cellulari (Figura 18). Tramite gli esperimenti di elettrofisiologia abbiamo confermato che le capacità medie ottenute nelle cellule ovoid ($25,5 \pm 2.9$ pF, Figura 28) e rod ($42,7 \pm 3,2$ pF, Figura 28) sono del tutto paragonabili ai valori presenti in letteratura (22-29 pF per le cellule ovoid; 40 pF per le cellule rod; Munk et al, 1996; Merger et al., 2011). Un'importante caratteristica delle cellule ovoid è quella di essere caratterizzate da una maggior densità di corrente I_f rispetto alle rod (Munk et al., 1996) ed i risultati da noi ottenuti confermano tale osservazione (Figura 29). In particolare la densità di corrente I_f misurata nelle cellule ovoid risulta essere circa il doppio di quella misurata nelle cellule rod (Figura 29, tabella 1). In letteratura è inoltre riportato che le cellule del nodo AV sono caratterizzate da densità di corrente I_f inferiore rispetto alle cellule del nodo SA (Munk et al., 1996, Merger et al., 2011). I nostri esperimenti (Figura 29) mostrano che le cellule ovoid e rod esprimono una densità di corrente I_f pari al 63% e al 33% rispetto a quella espressa nelle cellule senoatriali; questi valori sono del tutto paragonabili a quelli riportati in letteratura (65% e 22% per le cellule ovoid e rod; Munk et al., 1996). Questi risultati confermano quindi che i tipi cellulari da noi isolati dal nodo AV sono effettivamente cellule rod e ovoid e ci hanno quindi permesso di intraprendere esperimenti di analisi funzionale. In particolare ci siamo concentrati sulle conseguenze del processo di KO del gene *Hcn4* a livello delle cellule del nodo AV. Dal punto di vista morfologico le cellule isolate dai topi KO non hanno evidenziato alcuna differenza rispetto a quelle isolate dai topi controllo, così come dimostrato dai valori relativi alle capacità (Figura 30). Come atteso, abbiamo invece riscontrato nelle cellule isolate dai topi HCN4 KO una forte riduzione della corrente I_f (Figura 31). In particolare, in entrambi i tipi cellulari abbiamo osservato una riduzione della corrente di circa il 70%, valore del tutto simile a quello ottenuto precedentemente nelle cellule isolate dal nodo SA dello stesso modello murino (68.5 %). Il fatto che la proteina HCN4 non sia completamente eliminata nelle cellule atrioventricolari isolate dai topi HCN4 KO è in accordo con la presenza di una corrente residua misurabile nelle stesse cellule che presenta una dipendenza dal voltaggio uguale a quella della corrente I_f registrata dalle cellule isolate da topi controllo (Figura 31). Questi risultati sembrano quindi confermare che, in questo modello murino il processo di KO genico non sia completo.

In conclusione, il nostro modello murino inducibile condizionale ha evidenziato che la riduzione dei canali HCN4 causa bradicardia sinusale progressiva e arresto cardiaco dovuto dovuto a blocco della conduzione atrioventricolare.

6 BIBLIOGRAFIA

Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A, DiFrancesco D.

Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels.

J Gen Physiol. 2001 Jun;117(6):519-32.

Bakker ML, Moorman AF, Christoffels VM. (2010)

The atrioventricular node: origin, development, and genetic program

Trends Cardiovasc Med Jul;20(5):164-71

Baruscotti M, DiFrancesco D. Pacemaker channels.

Ann N Y Acad Sci. 2004 May;1015:111-21.

Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A (2010)

The cardiac pacemaker current.

J Mol Cell Cardiol. 2010 Jan;48(1):55-64 Review.

Baruscotti M, Bucchi A, Viscomi C, Mandelli G, Consalez G, Gneccchi-Rusconi T, Montano N, Casali KR, Micheloni S, Barbuti A, DiFrancesco D.

Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 25;108(4):1705-10.

Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D.

Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current.

Pharmacol Ther. 2005 Jul;107(1):59-79. Review

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X.

Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function.

Physiol Rev. 2009 Jul;89(3):847-85.

Biel M, Schneider A, Wahl C.

Cardiac HCN channels: structure, function and modulation.

Trends Cardiovasc Med. 2002 Jul;12(5):206-12.

Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G.

Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial.

Circulation. 2003;107(6):817-23.

Brown H, DiFrancesco D, Noble S.

Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters.

J Exp Biol. 1979 Aug;81:175-204.

Bucchi A, Tognati A, Milanese R, Baruscotti M, DiFrancesco D.

Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels.

J Physiol. 2006 Apr 15;572(Pt 2):335-46

Bucchi A, Barbuti A, DiFrancesco D, Baruscotti M. (2012)

Funny Current and Cardiac Rhythm: Insights from HCN Knockout and Transgenic Mouse Models

Front Physiol; 3:240. Epub 2012 Jul 2

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA.

Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide

J Gen Physiol May;117(5):491-504

Clapham DE.

Not so funny anymore: pacing channels are cloned.

Neuron. 1998 Jul;21(1):5-7. Review

Del Lungo M, Sartiani, L, Spinelli V et al. (2012)

Ventricular remodeling in a murine model of cardiac selective and inducible deletion of HCN4 gene

Cardiovascular research Volume: 93 Supplement: 1 Pages: S65-S65

Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D.

Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors.

J Physiol. 2002 Jul 1;542(Pt 1):89-97.

DiFrancesco D.

The role of the funny current in pacemaker activity

Circ Res. 2010 Feb 19;106(3):434-46.

DiFrancesco D.

Characterization of the pace-maker current kinetics in calf Purkinje fibres.

J Physiol. 1984 Mar;348:341-67.

DiFrancesco D.

Characterization of the pace-maker current kinetics in calf Purkinje fibres.

J Physiol. 1984 Mar;348:341-67.

DiFrancesco D.

A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres.

J Physiol. 1981 May;314:359-76.

DiFrancesco D, Borer JS.

The funny current: cellular basis for the control of heart rate.

Drugs. 2007;67 Suppl 2:15-24. Review.

DiFrancesco D, Tortora P.

Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP.

Nature. 1991 May 9;351(6322):145-7.

DiFrancesco D, Mangoni M

Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node.

J Physiol. 1994 Feb 1;474(3):473-82.

DiFrancesco D, Camm JA.

Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease.

Drugs. 2004;64(16):1757-65.

DiFrancesco D.

Pacemaker mechanisms in cardiac tissue.

Annu Rev Physiol. 1993;55:455-72. Review.

Gauss R, Seifert R, Kaupp UB.

Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm

Nature. 1998 Jun 11;393(6685):583-7.

Gloss B, Trost S, Bluhm W, Swanson E, Clark R, Winkfein R, Janzen K, Giles W, Chassande O, Samarut J, Dillmann W.

Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta.

Endocrinology. 2001 Feb;142(2):544-50.

Hara M, Liu YM, Zhen L, Cohen IS, Yu H, Danilo P Jr, Ogino K, Bilezikian JP, Rosen MR.

Positive chronotropic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are associated with increases in the current, I(f), and the slope of the pacemaker potential.

Circulation. 1997 Nov 18;96(10):3704-9.

Hancox JC, Levi AJ, Lee CO, Heap P.

A method for isolating rabbit atrioventricular node myocytes which retain normal morphology and function.

Am J Physiol. 1993 Aug;265(2 Pt 2):H755-66.

He J, Kargacin ME, Kargacin GJ, Ward CA.

Tamoxifen inhibits Na⁺ and K⁺ currents in rat ventricular myocytes.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Aug;285(2):H661-8.

Herrmann S, Stieber J, Stöckl G, Hofmann F, Ludwig A.
HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice.
EMBO J. 2007 Oct 31;26(21):4423-32.

Hoesl E, Stieber J, Herrmann S, Feil S, Tybl E, Hofmann F, Feil R, Ludwig A.
Tamoxifen-inducible gene deletion in the cardiac conduction system.
J Mol Cell Cardiol. 2008 Jul;45(1):62-9.

Kaupp UB, Seifert R.
Molecular diversity of pacemaker ion channels.
Annu Rev Physiol. 2001;63:235-57. Review.

Kurian T, Ambrosi C, Hucker W, Fedorov VV, Efimov IR.
Anatomy and electrophysiology of the human AV node.
Pacing Clin Electrophysiol. 2010 Jun 1;33(6):754-62.

Liu J, Noble PJ, Xiao G, Abdelrahman M, Dobrzynski H, Boyett MR, Lei M, Noble D. Role of pacemaking current in cardiac nodes: Insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 96 (2008) 294–304 Review

Lu Z, Klem AM, Ramu Y.
Ion conduction pore is conserved among potassium channels.
Nature. 2001 Oct 25;413(6858):809-13.

López-Bescós L, Filipova S, Martos R.
Long-term safety and efficacy of ivabradine in patients with chronic stable angina.
Cardiology. 2007;108(4):387-96.

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M.
A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels
Nature. 1998 Jun 11;393(6685):587-91.

Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M.
Structure and function of cardiac pacemaker channels.
Cell Physiol Biochem. 1999;9(4-5):179-86.

Magyar CE, Wang J, Azuma KK, McDonough AA.
Reciprocal regulation of cardiac Na-K-ATPase and Na/Ca exchanger: hypertension, thyroid hormone, development.
Am J Physiol. 1995 Sep;269(3 Pt 1):C675-82.

Mangoni ME, Nargeot J.

Genesis and regulation of the heart automaticity.

Physiol Rev. 2008 Jul;88(3):919-82. doi: 10.1152/physrev.00018.2007. Review.

Merger L, Mesirca P, Alig J, Torrente A, Dubel S, Engeland B, Kanani S, Fontanaud P, Striessnig J, Shin S, Isbrandt D, Emke H, Nargeot J, Mangoni ME. (2011)

Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells
Channels 5:4, 1-10

Mezzano V, Sheikh F. (2012)

Cell-cell junction remodeling in the heart: possible role in cardiac conduction system function and arrhythmias?

Life Sci. 2012 Feb 27;90(9-10):313-21.

Mistr k P, Mader R, Michalakakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M.

The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides.

J Biol Chem. 2005 Jul 22;280(29):27056-61.

Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A.

Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain.

Biol Chem. 1999 Jul-Aug;380(7-8):975-80.

Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D.

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f).

J Biol Chem. 2001 Aug 3;276(31):29233-41.

Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel and Shrier A. (1996)

Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node

Journal of Physiology 493.3, pp. 801-18

Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH

Arrhythmogenic Ion-Channel Remodeling in the Heart: Heart Failure, Myocardial Infarction, and Atrial Fibrillation

Physiol Rev. 2007 Apr;87(2):425-56.

Rocha A, Neves SA, Lopes ER, Mac êdo Vde O

Acute Chagas cardiopathy. A systematic study of the intracardiac excitatory-conduction and autonomic nervous systems in an autochthonous case in Acre.

Rev Soc Bras Med Trop. 1996 Jul-Aug;29(4):367-71.

Ruzylo W, Tendera M, Ford I, Fox KM.

Antianginal efficacy and safety of ivabradine compared with amlodipine in patients with stable effort angina pectoris: a 3-month randomised, double-blind, multicentre, noninferiority trial.

Drugs. 2007;67(3):393-405.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR.

Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain.

Cell. 1998 May 29;93(5):717-29.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR.

Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain.

Cell. 1998 May 29;93(5):717-29.

Seifert R, Wenzel-Seifert K, Gether U, Lam VT, Kobilka BK.

Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis.

Eur J Biochem. 1999 Mar;260(3):661-6.

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS.

Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues.

Circ Res. 1999 Jul 9;85(1):e1-6.

Sgoifo A, Stilli D, Medici D, Gallo P, Aimi B, Musso E.

Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats.

Physiol Behav. 1996 Dec;60(6):1397-401

Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, Molkentin JD.

Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein.

Circ Res. 2001 Jul 6;89(1):20-5.

Stieber J, Wieland K, Stöckl G, Ludwig A, Hofmann F. (2006)

Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors

Mol Pharmacol. Apr;69(4):1328-37

Tardif JC, Ford I, Tendera M, Bourassa MG, Fox K.

Efficacy of ivabradine, a new selective I(f) inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina.

Eur Heart J. 2005 Dec; 26(23):2529-36.

Ulens C, Tytgat J. (2001)

Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels.

J Biol Chem Mar;276(9):6069-72

Vilaine.J.P

The discovery of the selective If current inhibitor ivabradine A new therapeutic approach to ischemic heart disease

Pharmacological Research 53 (2006) 424–434

Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D.

C-terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels.

J Biol Chem. 2001 Aug 10;276(32):29930-4.

Yuill KH, Hancox JC.

Characteristics of single cells isolated from the atrioventricular node of the adult guinea-pig heart.

Pflugers Arch. 2002 Dec;445(3):311-20.