

# Nuovi concetti nella segnalazione $\beta$ -adrenergica: prospettive terapeutiche per lo scompenso cardiaco

Gabriele Giacomo Schiattarella, Cinzia Perrino, Giuseppe Gargiulo, Sabato Sorrentino, Anna Franzone, Giuliana Capretti, Giovanni Esposito, Massimo Chiariello

*Cattedra di Cardiologia, Dipartimento Universitario di Medicina Clinica, Scienze Cardiovascolari ed Immunologiche, Università degli Studi "Federico II", Napoli*

**Key words:**

Adrenergic receptors;  
Heart failure;  
Molecular biology.

Heart failure is a common and complex clinical syndrome characterized by progressive ventricular dilatation, depressed contractile function and premature death. Abnormalities in the  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ AR) signaling such as  $\beta$ AR down-regulation and desensitization are hallmarks of heart failure. Results from previous studies suggest that chronic  $\beta$ AR dysfunction in the failing heart is maladaptive and contributes to the deterioration in cardiac function.

In this review we will discuss a number of recent studies on  $\beta$ AR signaling and addressing the role of phosphoinositide-3 kinase (PI3K) in the development of  $\beta$ AR dysfunction and the progression of heart failure. Novel possible strategies to ameliorate cardiac dysfunction in heart failure through the competitive inhibition of PI3K are also described.

(G Ital Cardiol 2010; 11 (3): 221-228)

© 2010 AIM Publishing Srl

Ricevuto il 20 gennaio 2009; nuova stesura l'8 aprile 2009; accettato il 5 maggio 2009.

**Per la corrispondenza:**

Dr.ssa Cinzia Perrino

*Cattedra di Cardiologia  
Università degli Studi  
"Federico II"*

*Via S. Pansini, 5  
80131 Napoli*

*E-mail: perrino@unina.it*

## Introduzione

I recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR) appartengono ad un'ampia classe di recettori transmembrana caratterizzati da una struttura con sette regioni idrofobiche che attraversano la membrana plasmatica (7 *trans-membrane receptors*, 7TMR)<sup>1</sup>. Come per gli altri membri di questa famiglia di recettori, i più conosciuti effetti intracellulari dei  $\beta$ AR sono mediati dall'attivazione di effettori mediante le proteine G. Queste ultime sono composte da tre diverse subunità polipeptidiche:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . La catena  $\alpha$  lega e idrolizza il nucleotide guanosina trifosfato (GTP); in seguito all'idrolisi del GTP la subunità  $\alpha$  stimola ( $G_{\alpha s}$ ) o inibisce ( $G_{\alpha i}$ ) altre molecole effettrici quali l'adenilato ciclasi (AC). Le catene  $\beta$  e  $\gamma$  formano il complesso  $G_{\beta\gamma}$  che ancora le proteine G alla membrana plasmatica. Nella forma inattiva, le proteine G esistono come trimero con il nucleotide guanosina difosfato (GDP) legato alla subunità  $\alpha$ . Dopo il legame dell'agonista al recettore si verifica l'attivazione della proteina G, con la sostituzione del GDP con GTP e la dissociazione delle subunità  $\beta\gamma$  ed  $\alpha$ <sup>1</sup>. La stimolazione dell'AC da parte della subunità  $\alpha$  determina un aumento della sintesi di adenosinmonofosfato ciclico (cAMP). Il cAMP attiva allostericamente la proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA), la quale esplica i molteplici effetti intracellulari della stimolazione  $\beta$ -adrenergica fosforilando numerosi substrati intracellulari. In particolare, i canali del  $Ca^{++}$  tipo L, i recet-

tori della rianodina, il fosfolambano, la troponina I, la proteina C che lega la miosina cardiaca sono alcuni dei substrati della PKA responsabili degli effetti inotropo, cronotropo e dromotropo positivi clinicamente evidenti nella stimolazione con farmaci  $\beta$ -agonisti.

## Meccanismi di regolazione della segnalazione $\beta$ -adrenergica

Data la rilevanza biologica di questi recettori, non è sorprendente che si siano evoluti dei complessi meccanismi per regolare il segnale da essi generato. Nell'ordine di secondi o minuti dall'inizio della stimolazione, si verifica un rapido calo della responsività dei  $\beta$ AR. Tale fenomeno, indicato come desensibilizzazione, dipende dalla rapida fosforilazione del recettore e dal suo disaccoppiamento dalle proteine G. Un meccanismo più lento per ridurre il segnale  $\beta$ -adrenergico (ore o giorni) consiste nella down-regolazione<sup>1</sup>. In questo caso, una riduzione della sintesi del recettore, una destabilizzazione del rispettivo mRNA ed un incremento della degradazione del recettore stesso esitano in una netta diminuzione del numero dei recettori sulla superficie cellulare<sup>2,3</sup>.

I processi di desensibilizzazione e down-regolazione iniziano con la fosforilazione del recettore, che può essere mediata da una famiglia di chinasi specifiche per i 7TMR (chiamate *G-protein coupled receptors kinases*, GRK), o da chinasi attivate da secondi messaggeri (co-

**Chiave di Lettura**

**Ragionevoli certezze.** I farmaci  $\beta$ -bloccanti rappresentano una insostituibile categoria terapeutica per il miglioramento della qualità e della durata di vita di pazienti affetti da scompenso cardiaco. Numerosi studi hanno dimostrato che la normalizzazione del segnale  $\beta$ -adrenergico in diversi modelli sperimentali e con diverse strategie molecolari migliora costantemente la disfunzione ventricolare sinistra e riduce la mortalità nello scompenso cardiaco.

**Questioni aperte.** Gli effetti della terapia con  $\beta$ -bloccanti sulla biologia molecolare della segnalazione  $\beta$ -adrenergica nello scompenso cardiaco sono uno degli aspetti più interessanti ed al tempo stesso controversi in questa area di ricerca. In realtà, molti aspetti di questa segnalazione intracellulare sono ancora sconosciuti, e ciò rende la problematica ancora più aperta. I risultati più recenti suggeriscono che l'inibizione del rimodellamento molecolare possa rappresentare, in futuro, un'adeguata strategia terapeutica per lo scompenso cardiaco.

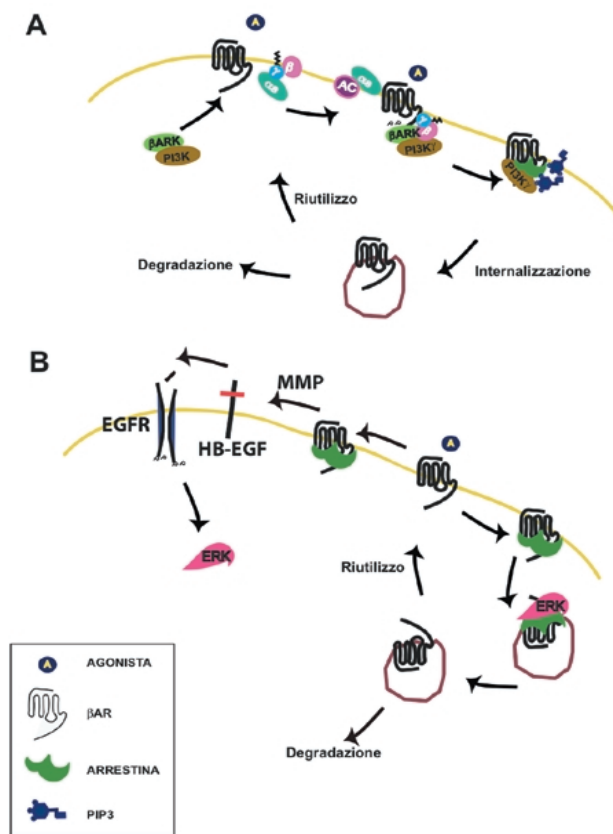
**Le ipotesi.** I recettori  $\beta$ -adrenergici possono essere considerati dei sensori precoci di stress cardiaco. Recentemente, la migliore comprensione delle vie di segnalazione a partenza dai recettori  $\beta$ -adrenergici in modelli animali di ipertrofia ventricolare sinistra e scompenso cardiaco ha evidenziato la possibilità di mettere in atto nuove strategie terapeutiche in tali patologie, quali l'inibizione della proteina chinasi  $\beta$ ARK1 o della fosfoinositolo 3-chinasi. Questi trattamenti, potenzialmente complementari e sinergici con la terapia  $\beta$ -bloccante, potrebbero significativamente migliorare la prognosi di pazienti affetti da scompenso cardiaco.

me PKA o la proteina chinasi C). GRK2, anche conosciuta come  $\beta$ ARK1, è la GRK più abbondantemente espressa nel cuore<sup>4,5</sup>. Il legame di  $\beta$ ARK1 citosolica alle subunità  $G\beta\gamma$  delle proteine G eterotrimeriche attivate facilita la traslocazione di  $\beta$ ARK1 sulla membrana plasmatica dove essa può fosforilare il recettore legato all'agonista (Figura 1A). Numerosi studi hanno chiarito il ruolo di  $\beta$ ARK1 nello sviluppo e nella progressione della disfunzione ventricolare sinistra e non saranno discussi qui<sup>1,7</sup>. Studi recenti hanno dimostrato che  $\beta$ ARK1 interagisce nel citoplasma con l'enzima fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K) mediante il dominio fosfochinasi (PIK) di PI3K, formando uno stabile complesso che viene traslocato in prossimità del  $\beta$ AR dopo prolungata stimolazione adrenergica<sup>8-10</sup>. In prossimità del  $\beta$ AR, l'attività chinasi di PI3K svolge un ruolo importante nel processo di internalizzazione del recettore<sup>10</sup> (Figura 1A).

**Nuovi paradigmi nella segnalazione dei recettori con 7 domini transmembrana**

La fosforilazione del  $\beta$ AR determina il suo distacco dall'associata proteina G ed aumenta la sua affinità per una proteina citosolica conosciuta come  $\beta$ -arrestina<sup>1</sup>. Una volta legata al recettore, la  $\beta$ -arrestina impedisce l'attivazione delle proteine G e promuove il trasporto all'interno della cellula (endocitosi) del recettore attivato<sup>11</sup>. Pur essendo stata considerata per anni semplicemente una proteina coinvolta nell'interruzione del segnale  $\beta$ -adrenergico, studi recenti hanno dimostrato che la  $\beta$ -arrestina, una volta legata al recettore, agisce anche come assemblatore multi-

proteico (Figura 1B), promuovendo l'ancoraggio di altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale quali le proteine chinasi attivate dai mitogeni ERK<sup>12-15</sup> (Figura 1B). Per altri membri della famiglia dei 7TMR, quale il recettore dell'angiotensina II di tipo 1A, è stato chiaramente dimostrato che in seguito ad una prima, rapida attivazione di ERK dipendente dalla stimolazione del recettore si verifica una seconda ondata di attivazione di ERK che è indipendente dalle proteine G<sup>16</sup> e richiede la  $\beta$ -arrestina e l'attività di GRK5 e 6<sup>17</sup>. Questi studi suggeriscono un nuovo



**Figura 1. A:** tradizionale segnalazione  $\beta$ -adrenergica dipendente dalle proteine G. Lo schema rappresenta la segnalazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR) mediante le proteine G. In seguito al legame dell'agonista, i  $\beta$ AR attivano le proteine G, provocandone la dissociazione in subunità  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$ , in grado di attivare a loro volta molecole effettrici quali l'adenilato ciclasi (AC). La prolungata stimolazione di questo sistema attiva dei meccanismi per interrompere il segnale. Nel cuore, il principale meccanismo di desensibilizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico consiste nella sua fosforilazione da parte della proteina chinasi  $\beta$ ARK1. In condizioni basali,  $\beta$ ARK1 forma un complesso citoplasmatico con la proteina fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K). In seguito alla prolungata stimolazione con agonista, il complesso  $\beta$ ARK1/PI3K lega le subunità  $G\beta\gamma$  e viene traslocato in prossimità del  $\beta$ AR. La fosforilazione del  $\beta$ AR da parte di  $\beta$ ARK1 consente il legame della  $\beta$ -arrestina, che impedisce l'interazione del recettore con le proteine G e facilita la sua internalizzazione. Tale processo richiede inoltre la presenza di PI3K e la generazione di D-3 fosfoinositidi (PIP3) in prossimità del  $\beta$ AR. Una volta internalizzati, i  $\beta$ AR possono essere defosforilati nelle vescicole endocitiche e da qui possono ritornare alla membrana plasmatica, oppure essere avviati alla degradazione lisosomiale. **B:** segnalazione  $\beta$ -adrenergica indipendente dalle proteine G. Oltre a consentire l'internalizzazione del  $\beta$ AR, la  $\beta$ -arrestina agisce come assemblatore multiproteico, promuovendo: a) l'ancoraggio e l'attivazione diretta di un pool citoplasmatico della proteina chinasi ERK o b) l'attivazione di metalloproteasi (MMP) con rilascio del fattore secretorio heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) e la conseguente transattivazione dei recettori tirosin-chinasi quali il recettore dell'EGF (EGFR).

paradigma secondo cui la stimolazione dei 7TMR attiva i tradizionali segnali dipendenti dalle proteine G (Figura 1A), l'attivazione di GRK e dalla  $\beta$ -arrestina ma quest'ultima, oltre a desensibilizzare il sistema, attiva diverse vie di trasduzione del segnale (Figura 1B). Infatti, in contrasto con il vecchio paradigma secondo cui i segnali dei 7TMR erano separati da quelli di altri recettori, numerosi studi ormai dimostrano molteplici meccanismi di connessione molecolare mediati dalla  $\beta$ -arrestina tra i 7TMR ed i recettori tirosino-chinasici quali il recettore per l'*epidermal growth factor* (EGFR) (Figura 1B). Secondo tali studi, la stimolazione dei 7TMR e della  $\beta$ -arrestina transattiva anche altri recettori appartenenti ad altre famiglie e pertanto caratterizzati da diversi meccanismi di segnalazione<sup>11,13</sup>.

Nella transattivazione dell'EGFR da parte dei  $\beta$ AR sono stati recentemente ipotizzati e descritti numerosi meccanismi, tra cui la secrezione autocrina di ligandi dell'EGFR quali l'*heparin-binding EGF* (HB-EGF) mediata dall'attivazione dipendente da Src delle metalloproteasi<sup>18</sup> (Figura 1B). La stimolazione dell'EGFR da parte dell'HB-EGF promuove l'internalizzazione dell'EGFR e genera una cascata di segnali intracellulari con l'attivazione delle chinasi Raf, MEK, ed ERK, promovendo effetti mitogenici ed antiapoptotici<sup>19</sup>. In particolare, la segnalazione intracellulare mediata dalla chinasi ERK è stata diffusamente studiata per rivelare la transattivazione dell'EGFR da parte dei 7TMR. Numerosi sono gli effetti antiapoptotici della chinasi ERK, mediati dalla fosforilazione del fattore BAD, della caspasi 9, del fattore proapoptotico Bim e dall'attivazione di proteine coinvolte nella replicazione del DNA, nella trascrizione e trasduzione<sup>19</sup>.

Recenti studi sperimentali hanno dimostrato che la transattivazione dell'EGFR mediata dai  $\beta$ AR *in vivo* svolge un ruolo protettivo nel cuore sottoposto a iperstimolazione adrenergica come in condizioni di scompenso cardiaco<sup>20</sup>. È noto, infatti, che l'attivazione prolungata dei  $\beta$ AR da parte delle catecolamine promuove la down-regolazione del  $\beta$ AR ed il rimodellamento patologico. Tuttavia, topi transgenici con iperespressione di un  $\beta$ 1AR mutante incapace di promuovere l'attivazione delle  $\beta$ -arrestine e la transattivazione dell'EGFR mostrano più marcata disfunzione ventricolare dopo sovraccarico di catecolamine<sup>20</sup>. Inoltre, topi *wild-type* trattati con un inibitore selettivo dell'EGFR mostrano un simile decadimento della funzione ventricolare sinistra dopo sovraccarico di catecolamine<sup>20</sup>. Questi risultati suggeriscono che la segnalazione mediata dalla  $\beta$ -arrestina esercita un ruolo cardioprotettivo in queste condizioni sperimentali e che tali effetti sono mediati dalla transattivazione dell'EGFR.

Nonostante la scoperta della transattivazione dei recettori tirosino-chinasici quali l'EGFR sia molto interessante, numerosi aspetti di questa segnalazione sono ancora poco conosciuti. Soprattutto, non è ancora chiaro se la transattivazione dell'EGFR mediata da diversi 7TMR abbia effetti simili. Studi recenti hanno infatti dimostrato che l'inibizione della transattivazione dell'EGFR da parte dell'angiotensina II in topi geneticamente modificati riduce alcuni aspetti dell'ipertrofia patologica indotta dall'angiotensina stessa<sup>21</sup>. Una possibile spiegazione di tali risultati può essere identificata nella complessità della famiglia dei recettori dell'EGF, costituita da 12 ligandi e da 4 recettori. Alcuni membri di tale famiglia, come l'EGFR-2 umano, svolgono un ruolo cardioprotettivo, poiché pazienti sottoposti a protocolli chemioterapici con Herceptin, un anticorpo anti-HER2 umanizzato, svi-

lupano cardiomiopatia<sup>22</sup>. Inoltre, la delezione genetica condizionale di EGFR-2 nel cuore adulto murino determina cardiopatia dilatativa<sup>23</sup>. Anche se l'EGFR-2 può essere potenzialmente transattivato dall'angiotensina II, altri membri della famiglia degli EGFR, probabilmente EGFR-1, potrebbero essere coinvolti nello sviluppo di ipertrofia patologica.

Anche se ulteriori studi sono ovviamente necessari per definire i meccanismi precisi della transattivazione dell'EGFR da parte dei  $\beta$ AR, questi risultati hanno importanti implicazioni terapeutiche per pazienti affetti da scompenso cardiaco. Attualmente, i  $\beta$ -bloccanti rappresentano un cardine fondamentale della terapia di tali pazienti. Il presupposto fondamentale per l'utilizzo di  $\beta$ -bloccanti nella pratica clinica si basa sull'assunto che l'iperstimolazione dei  $\beta$ AR, delle proteine G e della PKA eserciti un effetto cardiotossico. Tuttavia, questi recenti dati sperimentali indicano che tra i segnali molecolari attivati dall'iperstimolazione adrenergica ve ne sono alcuni (per esempio la  $\beta$ -arrestina) che oltre a desensibilizzare il sistema a loro volta attivano segnali protettivi. Ulteriori studi hanno infatti recentemente dimostrato che il carvedilolo, uno dei  $\beta$ -bloccanti più efficaci nel trattamento dello scompenso cardiaco<sup>24-26</sup>, attiva la segnalazione mediata dalla  $\beta$ -arrestina<sup>26</sup> anche se induce debolmente quella dipendente dalle proteine G<sup>27</sup>. Pertanto, secondo tali studi, il farmaco ideale dovrebbe produrre nel  $\beta$ AR una conformazione tridimensionale tale da poter inibire l'attivazione delle proteine G ma contemporaneamente preservare la segnalazione mediata dalla  $\beta$ -arrestina<sup>20,27</sup>. Tale molecola potrebbe ulteriormente migliorare la funzione cardiaca e la sopravvivenza nello scompenso cardiaco rispetto ai "classici" farmaci attualmente in uso nella pratica clinica.

## Meccanismi molecolari della disfunzione dei recettori $\beta$ -adrenergici nel cuore umano

È ben noto che cuori scompensati umani sono caratterizzati da estese anomalie della segnalazione dei  $\beta$ AR<sup>28</sup>. La riduzione della gittata cardiaca e della perfusione tissutale in condizioni di scompenso cardiaco induce l'attivazione riflessa del sistema nervoso autonomo. Il conseguente cronico incremento dei livelli di catecolamine circolanti è il maggiore responsabile delle estese anomalie del sistema adrenergico nei cuori scompensati, che includono una significativa riduzione della capacità dei  $\beta_1$ AR e dei  $\beta_2$ AR di attivare le rispettive proteine G e una selettiva down-regolazione dei  $\beta_1$ AR<sup>28</sup>.

È importante sottolineare che l'iperstimolazione adrenergica nello scompenso cardiaco è influenzata dalla modulazione presinaptica del rilascio di noradrenalina dai terminali nervosi. Infatti, in cuori sani i recettori presinaptici  $\alpha_2$ -adrenergici ( $\alpha_2$ AR), attivando le proteine G inibitorie (Gi), riducono il rilascio di noradrenalina dai terminali nervosi. In condizioni di scompenso cardiaco, tale effetto sembra essere ridotto<sup>29</sup>. Individui con mutazioni del recettore  $\alpha_2$ AR determinanti una sua perdita di funzione mostrano una ridotta capacità di ridurre il rilascio di noradrenalina ed una maggiore severità dello scompenso cardiaco<sup>30</sup>. Anche se lo studio della modulazione presinaptica della segnalazione adrenergica rappresenta un'importante ed interessante area di ricerca, in questa revisione discuteremo esclusivamente gli effetti della modulazione post-sinaptica della stimolazione  $\beta$ -adrenergica sulla funzione cardiaca.

La down-regolazione e la desensibilizzazione dei  $\beta_1$ AR nei cardiomiociti di cuori umani scompensati sono attribuite, in ampia parte, alla rapida attivazione di  $\beta$ ARK1<sup>31</sup>. Studi recenti hanno inoltre dimostrato un significativo incremento dell'attività dell'isoforma  $\gamma$  di PI3K in cuori scompensati umani<sup>32</sup> confermando, come precedentemente descritto in diversi modelli animali di ipertrofia ventricolare sinistra e scompenso cardiaco, che l'attivazione di tale isoforma di PI3K in prossimità del  $\beta$ AR svolge un ruolo importante nel processo di internalizzazione del recettore<sup>10,33</sup>.

Per lungo tempo è stato ritenuto che il processo di internalizzazione dei  $\beta$ AR conducesse inesorabilmente alla degradazione recettoriale. Tuttavia, studi recenti dimostrano che i TMR possono rapidamente recuperare la loro capacità di rispondere ai ligandi attraverso un processo di ri-sensibilizzazione che è stato dimostrato richiedere l'internalizzazione in compartimenti intracellulari dove l'ambiente acido consente la defosforilazione del recettore<sup>6</sup> (Figura 1A).

È stato recentemente dimostrato che i pazienti affetti da scompenso cardiaco presentano un numero totale di  $\beta$ AR cardiaci simile a quello dei soggetti sani (Figura 2A); tuttavia, in presenza di una marcata disfunzione ventricolare sinistra i  $\beta$ AR mostrano una distribuzione prevalentemente intracellulare in endosomi precoci e tardivi<sup>34</sup> (Figura 2B). In seguito ad *unloading* ventricolare per l'impianto di dispositivi di assistenza ventricolare sinistra (*left ventricular assist device*, LVAD), un'ampia quota di questa riserva intracellulare di  $\beta$ AR riacquista la responsività alla stimolazione con  $\beta$ -agonista e recupera la localizzazione sulla membrana extracellulare (Figura 2B e 2C)<sup>34</sup>. I meccanismi molecolari precisi mediante cui l'impianto di LVAD promuove questo "traffico intracellulare inverso" dei  $\beta$ AR sono ancora poco chiari. Poiché dopo l'impianto di LVAD il miglioramento della segnalazione  $\beta$ -adrenergica si associa ad una riduzione dell'attività di PI3K $\gamma$  è stato proposto che questo enzima possa svolgere un ruolo importante in tale processo<sup>35</sup>.

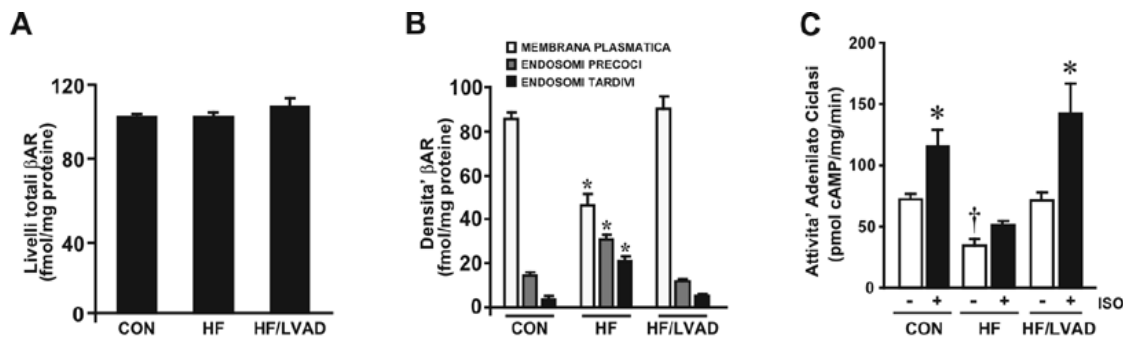
Sebbene non sia noto il tempo di persistenza dei  $\beta$ AR negli endosomi precoci o tardivi prima della degradazione, è postulabile che strategie molecolari in grado di ripristinare il traffico intracellulare dei recettori possano esercitare un effetto positivo sulla contrattilità cardiaca *in vivo*. A differenza di terapie che aumentano la segnalazione  $\beta$ -

adrenergica direttamente o indirettamente, quali ad esempio la stimolazione con  $\beta$ -agonisti o il trattamento con inibitori della fosfodiesterasi e che sono state dimostrate inefficaci nel trattamento di lunga durata dello scompenso cardiaco<sup>36,37</sup>, molecole in grado di promuovere con maggiore rapidità la defosforilazione dei recettori e la loro ri-esposizione a livello della membrana plasmatica potrebbero consentire di normalizzare la funzione  $\beta$ -recettoriale e di alterare la storia naturale dello scompenso cardiaco con un meccanismo simile a quello esercitato dai farmaci  $\beta$ -bloccanti<sup>38-41</sup>. Infatti, numerose evidenze sperimentali indicano come il principale effetto della terapia con  $\beta$ -bloccanti nello scompenso cardiaco sia quello di normalizzare i livelli di  $\beta$ AR sulla membrana plasmatica e la loro funzionalità in risposta all'agonista<sup>38-41</sup>.

### Segnalazione $\beta$ -adrenergica e nuove strategie terapeutiche per lo scompenso cardiaco

Diverse linee di evidenza dimostrano che le anomalie del sistema  $\beta$ -adrenergico sono strettamente correlate alla disfunzione contrattile dei cardiomiociti. In primo luogo, la disfunzione dei  $\beta$ AR rappresenta un evento estremamente precoce nella risposta cardiaca ad uno stimolo patologico, che precede lo sviluppo di conclamata disfunzione ventricolare sinistra<sup>42,43</sup>. Inoltre, la normalizzazione del segnale dei  $\beta$ AR attraverso diverse strategie in differenti modelli animali migliora in maniera consistente la funzione dei cardiomiociti, ritarda la progressione verso lo scompenso cardiaco e riduce la mortalità<sup>1,34,44</sup>.

Considerate queste premesse, al fine di incrementare le conoscenze circa la regolazione della segnalazione  $\beta$ -adrenergica, abbiamo recentemente dimostrato che l'attività di PI3K in prossimità dei  $\beta$ AR ricopre un ruolo fondamentale nel processo di internalizzazione recettoriale<sup>35,45</sup>. In seguito alla stimolazione con agonista, PI3K raggiunge la membrana plasmatica perché forma un complesso con  $\beta$ ARK1<sup>9</sup> (Figura 1A). L'iperpressione di forme catalitiche inattive di PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma_{inact}$ ) o semplicemente del dominio di PI3K responsabile del legame a  $\beta$ ARK1 (PIK), spiazzano competitivamente PI3K da  $\beta$ ARK1 impedendone la lo-



**Figura 2.** Distribuzione dei recettori  $\beta$ -adrenergici in cuori umani normali e scompensati. A: gli istogrammi mostrano i livelli totali dei recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR) nei cuori di controlli sani (CON) e nei cuori scompensati prima (HF) e dopo l'impianto di un dispositivo di assistenza ventricolare sinistra (LVAD; HF/LVAD, differenze tra i diversi gruppi non significative). B: livelli di  $\beta$ AR nelle membrane plasmatiche (barre bianche), endosomi precoci (barre grigie) ed endosomi tardivi (barre nere) nei cuori CON, HF e HF/LVAD (\* $p < 0.01$  vs corrispondente CON o HF/LVAD). C: attività dell'adenilato ciclasi in condizioni basali (barre bianche) e dopo stimolazione con isoproterenolo (ISO, 1  $\mu$ M, barre nere) in cuori CON ed in cuori scompensati prima (HF) e dopo impianto di LVAD (HF/LVAD, \* $p < 0.01$  per ISO vs corrispondenti basali; † $p < 0.01$  HF vs CON o HF/LVAD). cAMP = adenosinmonofosfato ciclico.

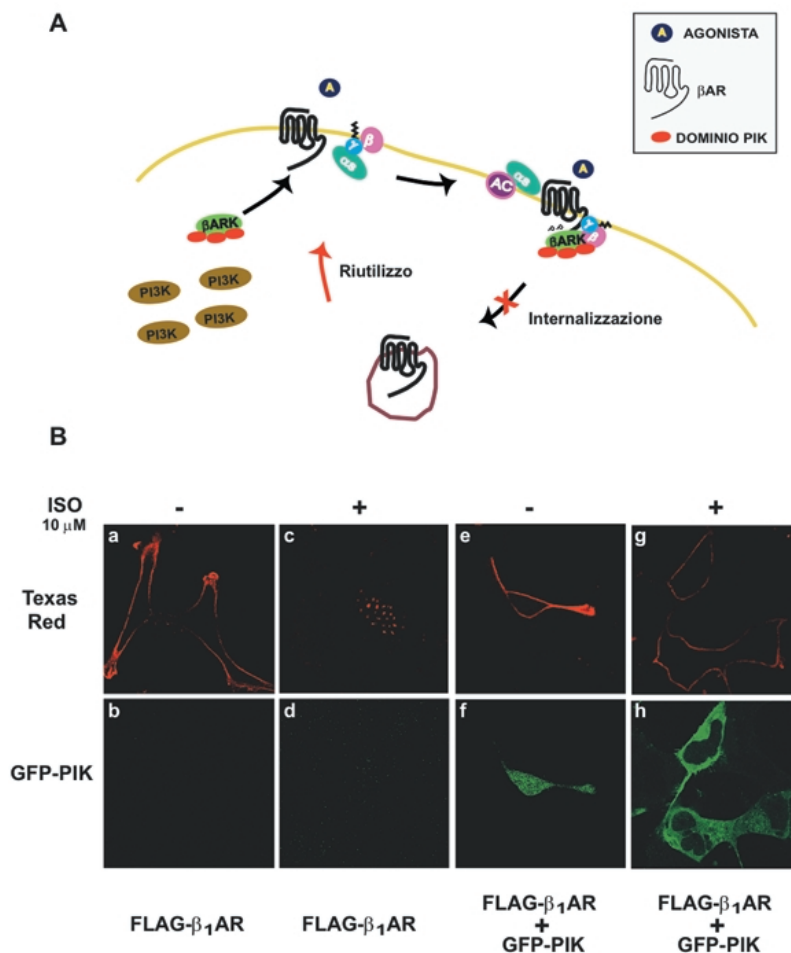


calizzazione sulla membrana plasmatica e riducendo quindi l'attività di PI3K in prossimità del  $\beta$ AR<sup>33</sup> (Figura 3A). Tale inibizione riduce marcatamente l'internalizzazione del  $\beta$ AR in seguito alla stimolazione con agonista (Figura 3B).

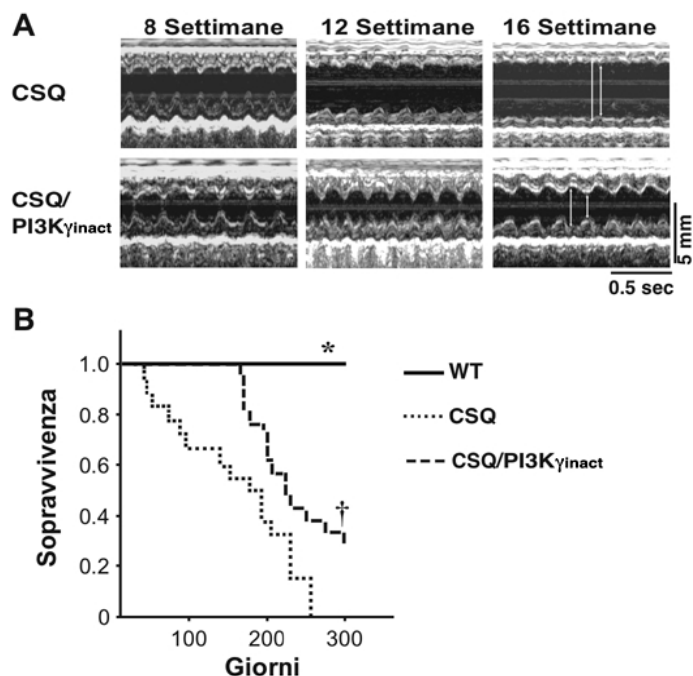
Numerosi esperimenti sono stati eseguiti per testare gli effetti dell'inibizione localizzata di PI3K sulla contrattilità cardiaca e sulla sopravvivenza in condizioni di scompenso cardiaco. Poiché la possibilità di rendere applicabili all'uomo i risultati degli studi sperimentali dipende anche dall'utilizzo di diversi modelli animali di patologie cardiache umane, topi transgenici iperesprimenti a livello cardiaco il mutante inattivo di PI3K ( $PI3K^{\gamma_{inact}}$ ) sono stati sottoposti a sovraccarico di pressione mediante bendaggio aortico ed hanno mostrato una ridotta progressione verso lo scompenso cardiaco rispetto ai topi *wild-type*<sup>46</sup>. Gli stessi animali sono stati successivamente incrociati con un modello murino di grave scompenso cardiaco indotto dall'iperpressione cardiospecifica della proteina calsequestrina (CSQ)<sup>47</sup>. Rispetto ai topi *wild-type*, i topi CSQ mostravano un significativo incremento dell'attività di PI3K, down-regolazione dei  $\beta$ AR ed una progressiva dilatazione/disfunzione ventricolare sinistra<sup>48</sup>.

Al contrario, i doppi topi transgenici CSQ/ $PI3K^{\gamma_{inact}}$  mostravano una significativa riduzione dell'attività di PI3K associata a  $\beta$ ARK1, la normalizzazione del *signaling* dei  $\beta$ AR ed una marcato miglioramento della funzione contrattile del ventricolo sinistro (Figura 4A) che si traduceva in un miglioramento della sopravvivenza cardiaca<sup>48</sup> (Figura 4B).

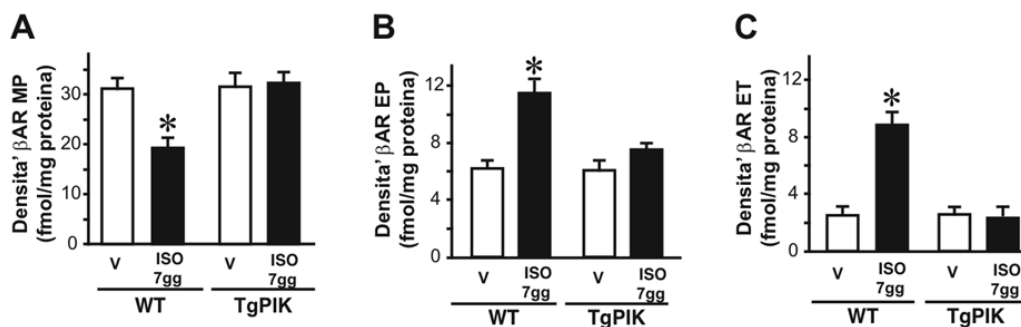
Studi recenti hanno inoltre suggerito che l'attività di PI3K possa essere coinvolta nel traffico intracellulare di  $\beta$ AR *in vivo*. Analogamente a quanto accade nello scompenso cardiaco umano, la cronica infusione di isoproterenolo in topi *wild-type* induce una rapida ri-distribuzione dei  $\beta$ AR nei compartimenti endosomiali<sup>32</sup> (Figura 5A). In topi transgenici iperesprimenti il dominio PIK di PI3K, la ri-distribuzione dei  $\beta$ AR negli endosomi precoci e tardivi era inibita nonostante la prolungata stimolazione con isoproterenolo, mostrando un normale numero di  $\beta$ AR a livello della membrana plasmatica<sup>32</sup> (Figura 5). Questi risultati indicano che la ridotta traslocazione in membrana plasmatica di PI3K per mezzo dell'iperespressione del dominio PIK altera i movimenti intracellulari dei  $\beta$ AR conseguenti alla prolungata stimolazione con l'agonista. L'effetto che ne



**Figura 3.** Lo spiazzamento competitivo della proteina fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K) dalla proteina chinasi  $\beta$ ARK1 previene l'internalizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico ( $\beta$ AR). A: dopo stimolazione adrenergica, il complesso citoplasmatico  $\beta$ ARK1/PI3K viene traslocato a livello della membrana plasmatica, dove PI3K induce la produzione di D-3 fosfoinositidi che regolano l'internalizzazione del recettore. L'iperespressione del dominio responsabile dell'interazione tra  $\beta$ ARK1 e PI3K (PIK) inibisce competitivamente il legame di PI3K a  $\beta$ ARK1. Ciò riduce l'attività di PI3K in membrana ed inibisce l'internalizzazione del  $\beta$ AR. B: microscopia confocale di cellule di sarcoma trasfettate con FLAG- $\beta_1$ AR e GFP-PIK e stimulate con isoproterenolo (ISO) 10  $\mu$ M per 10 min. In assenza di GFP-PIK (pannelli c e d), la stimolazione con ISO produce una marcata ri-distribuzione dei  $\beta$ AR negli aggregati cellulari. Questo effetto è completamente bloccato dall'iperespressione di GFP-PIK (pannelli g e h).



**Figura 4.** L'inibizione dell'enzima fosfoinositolo-3 chinasi  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) migliora la funzione cardiaca e la sopravvivenza in topi transgenici per la calsequestrina (CSQ). A: immagini ecocardiografiche rappresentative di topi con iperespressione cardiospecifica di CSQ da sola o insieme ad una forma cataliticamente inattiva di PI3K $\gamma$  (CSQ/PI3K $\gamma^{inact}$ ) a 8, 12 e 16 settimane di età. L'iperespressione PI3K $\gamma^{inact}$  migliora significativamente la funzione cardiaca in topi CSQ. B: curve di sopravvivenza Kaplan-Meier di topi wild-type (WT), topi CSQ e topi CSQ/PI3K $\gamma^{inact}$ . I topi CSQ mostrano una media di sopravvivenza di  $151.9 \pm 18.6$  giorni, i topi CSQ/PI3K $\gamma^{inact}$  raggiungono una età media di sopravvivenza di  $234.2 \pm 14.3$  giorni (\* $p < 0.001$  per WT vs CSQ o CSQ/PI3K $\gamma^{inact}$ ;  $^{\dagger}p < 0.001$  CSQ/PI3K $\gamma^{inact}$  vs CSQ, analisi Kaplan-Meier).



**Figura 5.** L'inibizione della proteina fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K) previene la redistribuzione dei recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR) nei compartimenti endosomiali. Densità dei  $\beta$ AR a livello della membrana plasmatica (MP, A), degli endosomi precoci (EP, B) ed endosomi tardivi (ET, C) in topi wild-type (WT) e topi transgenici con iperespressione cardiospecifica del dominio PIK (TgPIK) dopo 7 giorni di somministrazione di isoproterenolo (ISO, 3 mg/kg/die) o veicolo (V) mediante pompe osmotiche (\* $p < 0.0001$ , WT, ISO 7 giorni vs tutti).

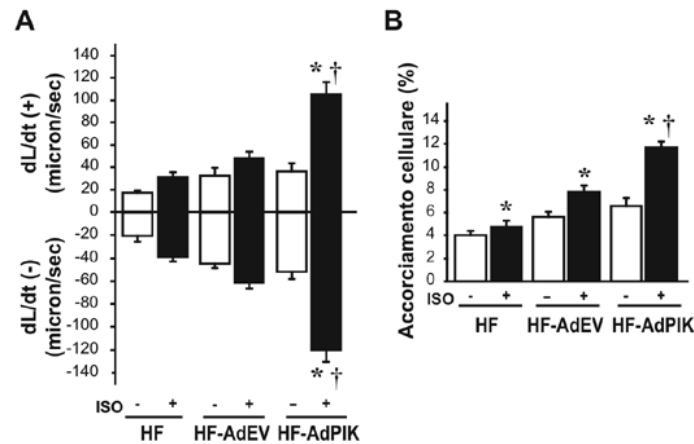
deriva è quello di preservare i normali livelli  $\beta$ AR in membrana e mantenere intatte le loro capacità di segnalazione.

Al fine di correggere le anomalie nel sistema dei  $\beta$ AR già presenti in condizioni di scompenso cardiaco, recentemente abbiamo iperespresso il dominio PIK in colture primarie di cardiomiociti umani scompensati<sup>32,35</sup>. In questi esperimenti lo spiazzamento competitivo di PI3K endogeno da  $\beta$ ARK1 risultava in un rapido miglioramento di molteplici parametri di contrattilità dei cardiomiociti scompensati fino a livelli normali<sup>32</sup> (Figura 6). Questi risultati suggeriscono che l'iperespressione di PIK possa cambiare il destino dei  $\beta$ AR stimolati dall'agonista e ridurre le anomalie dei  $\beta$ AR già presenti. Dal momento che la ri-sensitizzazione dei  $\beta$ AR ha mostrato di richiedere l'internalizzazio-

ne dei recettori in compartimenti intracellulari nei quali l'ambiente acido promuove la defosforilazione del recettore<sup>6</sup>, si può ipotizzare che l'inibizione mirata di PI3K sia in grado di accelerare il processo di defosforilazione e ritorno in membrana dei  $\beta$ AR. Per tali considerazioni, l'iperespressione del dominio PIK potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica nello scompenso cardiaco.

## Conclusioni

I  $\beta$ AR possono essere considerati dei sensori precoci di stress cardiaco. Recentemente, la migliore comprensione delle vie di segnalazione a partenza dai  $\beta$ AR in modelli ani-



**Figura 6.** Lo spiazzamento competitivo della proteina fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K) dalla proteina chinasi  $\beta$ ARK1 ripristina la funzione contrattile in cardiomiociti umani scompensati. A: analisi della velocità di rilascio ( $dL/dt$ , pannello superiore) e della velocità di accorciamento ( $dL/dt$ , pannello inferiore) in cardiomiociti umani scompensati sia in condizioni basali (barre bianche) sia dopo stimolazione con isoproterenolo (ISO)  $1 \mu\text{M}$  (barre nere), in presenza o assenza di infezione con adenovirus vuoti (AdEV) o codificanti per il dominio PIK (AdPIK,  $*p < 0.001$  per ISO vs rispettivo basale;  $\dagger p < 0.005$  per AdPIK ISO vs HF ISO e AdEV ISO). B: analisi della percentuale di contrattilità cellulare condotta sia in condizioni basali (barre bianche) sia dopo stimolazione con ISO  $1 \mu\text{M}$  (barre nere) in presenza o assenza di infezione con adenovirus vuoti (AdEV) o codificanti per il dominio PIK (AdPIK,  $*p < 0.001$  per ISO vs rispettivo basale;  $\dagger p < 0.005$  AdPIK ISO vs HF ISO e AdEV ISO).

mali di ipertrofia ventricolare sinistra e scompenso cardiaco ha evidenziato la possibilità di mettere in atto nuove strategie terapeutiche in tali patologie, quali l'inibizione di  $\beta$ ARK1 o PI3K. Questi trattamenti, potenzialmente complementari e sinergici con la terapia di  $\beta$ -bloccanti, potrebbero significativamente migliorare la prognosi di pazienti affetti da scompenso cardiaco.

## Riassunto

Lo scompenso cardiaco congestizio è una complessa sindrome clinica caratterizzata dalla progressiva dilatazione della camera ventricolare sinistra, depressa funzione contrattile e morte prematura. Anomalie della segnalazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR) caratterizzano diverse forme di scompenso cardiaco indipendentemente dall'eziologia. Una riduzione del numero di recettori disponibili per il legame con il ligando (down-regolazione) ed una ridotta risposta alla stimolazione da parte delle catecolamine dei recettori ancora presenti in membrana (desensibilizzazione) sono riscontrabili precocemente in risposta a diverse forme di sovraccarico cardiaco e tali anomalie sono ritenute importanti nella progressione dall'ipertrofia patologica allo scompenso cardiaco.

In questa rassegna sono discussi i risultati di recenti studi sulla biologia molecolare dei  $\beta$ AR e sul ruolo dell'enzima fosfoinositolo-3 chinasi (PI3K) nello sviluppo della disfunzione  $\beta$ -adrenergica. Inoltre, sono illustrate nuove possibili strategie molecolari per migliorare la contrattilità dei cardiomiociti mediante la modulazione dell'attività di PI3K.

**Parole chiave:** Biologia molecolare; Recettori adrenergici; Scompenso cardiaco.

## Bibliografia

1. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002; 415: 206-12.  
Completa ed esaustiva rassegna sulla funzione dei recettori accoppiati a proteine G.
2. Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 1998; 273: 18677-80.
3. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 639-50.
4. Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 1998; 98: 1783-9.
5. Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1993; 268: 23735-8.
6. Perry SJ, Lefkowitz RJ. Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 130-8.
7. Tevaearai HT, Koch WJ. Molecular restoration of beta-adrenergic receptor signaling improves contractile function of failing hearts. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 252-6.
8. Naga Prasad SV, Barak LS, Rapacciuolo A, Caron MG, Rockman HA. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem* 2001; 276: 18953-9.
9. Naga Prasad SV, Esposito G, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J Biol Chem* 2000; 275: 4693-8.
10. Naga Prasad SV, Laporte SA, Chamberlain D, Caron MG, Barak L, Rockman HA. Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* 2002; 158: 563-75.
11. Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 190: 9-19.
12. Shenoy SK, McDonald PH, Kobout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 2001; 294: 1307-13.
13. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 2005; 308: 512-7.
14. Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2449-54.
15. Maudsley S, Pierce KL, Zamah AM, et al. The beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activa-

- tion via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 9572-80.
16. Wei H, Ahn S, Shenoy SK, et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10782-7.
  17. Kim J, Ahn S, Ren XR, et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1442-7.
  18. Prenzel N, Zwick E, Daub H, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999; 402: 884-8.
  19. Patel PA, Tilley DG, Rockman HA. Beta-arrestin-mediated signaling in the heart. *Circ J* 2008; 72: 1725-9.
  20. **Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, et al. Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* 2007; 117: 2445-58. Una compiuta evidenza sperimentale di come la transattivazione del recettore dell'epidermal growth factor da parte dei recettori  $\beta$ -adrenergici sia in grado di attivare meccanismi di cardioprotezione.**
  21. Zhai P, Galeotti J, Liu J, et al. An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2006; 99: 528-36.
  22. Grazette LP, Boecker W, Matsui T, et al. Inhibition of ErbB2 causes mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes: implications for herceptin-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 2231-8.
  23. Crone SA, Zhao YY, Fan L, et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2002; 8: 459-65.
  24. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *US Carvedilol Heart Failure Study Group. N Engl J Med* 1996; 334: 1349-55.
  25. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, et al, for the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344: 1651-8.
  26. Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, et al. A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 16657-62.
  27. Kim IM, Tilley DG, Chen J, et al. Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 14555-60.
  28. Bristow MR. Why does the myocardium fail? Insights from basic science. *Lancet* 1998; 352 (Suppl 1): S18-S114.
  29. Aggarwal A, Esler MD, Socratous F, Kaye DM. Evidence for functional presynaptic alpha-2 adrenoceptors and their down-regulation in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1246-51.
  30. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 1135-42.
  31. Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 1993; 87: 454-63.
  32. **Perrino C, Naga Prasad SV, Schroder JN, Hata JA, Milano C, Rockman HA. Restoration of beta-adrenergic receptor signaling and contractile function in heart failure by disruption of the betaARK1/phosphoinositide 3-kinase complex. *Circulation* 2005; 111: 2579-87. Elegante dimostrazione sperimentale di come l'attività della proteina fosfoinositolo 3-chinasi in prossimità dei recettori  $\beta$ -adrenergici ricopra un ruolo fondamentale nel processo di internalizzazione recettoriale.**
  33. Naga Prasad SV, Perrino C, Rockman HA. Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 206-12.
  34. Perrino C, Rockman HA. Reversal of cardiac remodeling by modulation of adrenergic receptors: a new frontier in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 2007; 22: 443-9.
  35. **Perrino C, Schroder JN, Lima B, et al. Dynamic regulation of phosphoinositide 3-kinase-gamma activity and beta-adrenergic receptor trafficking in end-stage human heart failure. *Circulation* 2007; 116: 2571-9. Dimostrazione del ruolo della proteina fosfoinositolo 3-chinasi e dell'alterazione dei meccanismi di segnalazione  $\beta$ -adrenergici nello scompenso cardiaco umano.**
  36. Packer M, Medina N, Yushak M. Hemodynamic and clinical limitations of long-term inotropic therapy with amrinone in patients with severe chronic heart failure. *Circulation* 1984; 70: 1038-47.
  37. Remme WJ. Inodilator therapy for heart failure. Early, late, or not at all? *Circulation* 1993; 87 (5 Suppl): IV97-IV107.
  38. Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, et al. Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation* 1996; 94: 2817-25.
  39. Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, Valentine HA, Ginsburg R, Fowler MB. Increased beta-receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1989; 79: 483-90.
  40. Sigmund M, Jakob H, Becker H, et al. Effects of metoprolol on myocardial beta-adrenoceptors and Gi alpha-proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 51: 127-32.
  41. Waagstein F, Caidahl K, Wallentin I, Bergh CH, Hjalmarson A. Long-term beta-blockade in dilated cardiomyopathy. Effects of short- and long-term metoprolol treatment followed by withdrawal and readministration of metoprolol. *Circulation* 1989; 80: 551-63.
  42. Cho MC, Rapacciuolo A, Koch WJ, Kobayashi Y, Jones LR, Rockman HA. Defective beta-adrenergic receptor signaling precedes the development of dilated cardiomyopathy in transgenic mice with calsequestrin overexpression. *J Biol Chem* 1999; 274: 22251-6.
  43. **Perrino C, Naga Prasad SV, Mao L, et al. Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest* 2006; 116: 1547-60. Completa dimostrazione sperimentale di come l'ipertrofia cardiaca da esercizio fisico e l'ipertrofia cardiaca da sovraccarico di pressione siano distinte dal punto di vista funzionale e molecolare.**
  44. Perrino C, Esposito G, Rockman HA. Defects in cardiomyocyte function: role of beta-adrenergic receptor dysfunction. *Panminerva Med* 2005; 47: 143-55.
  45. **Perrino C, Rockman HA, Chiariello M. Targeted inhibition of phosphoinositide 3-kinase activity as a novel strategy to normalize beta-adrenergic receptor function in heart failure. *Vascul Pharmacol* 2006; 45: 77-85. Completa recente rassegna su nuovi possibili target molecolari per la terapia dello scompenso cardiaco.**
  46. Nienaber JJ, Tachibana H, Naga Prasad SV, et al. Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure. *J Clin Invest* 2003; 112: 1067-79.
  47. Jordan BA, Trapaidze N, Gomes I, Nivarthi R, Devi LA. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 343-8.
  48. Perrino C, Naga Prasad SV, Patel M, Wolf MJ, Rockman HA. Targeted inhibition of beta-adrenergic receptor kinase-1-associated phosphoinositide-3 kinase activity preserves beta-adrenergic receptor signaling and prolongs survival in heart failure induced by calsequestrin overexpression. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1862-70.