

## Il secondo messaggero cAMP e la regolazione della funzione cardiaca: ruolo dell'adenilato ciclasi

### The second cAMP messenger and cardiac function regulation: the role of adenylate cyclase

#### Summary

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is the second messenger synthesized by adenylate cyclase (AC) in response to  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ AR) stimulation. In normal conditions, cAMP plays an important role in regulating several cardiovascular functions, including heart rate and contractility. Several abnormalities in  $\beta$ -adrenergic signal transduction have been identified in heart failure and they are thought to be linked to the decrease in cardiac contractility. Different mechanisms have been considered responsible for these alterations, including desensitization/down-regulation of  $\beta$ ARs and decreases in AC5/AC6 levels, the major cardiac AC isoforms. Recently, several experimental studies have been performed on transgenic animals to clarify the role of the different AC isoforms in normal conditions and during the development of left ventricular dysfunction. This review describes the results of the latest experiments based on the genetic manipulation of AC isoforms, and the new possible therapeutic strategies for treating heart failure which arise from them.

Capretti G, Franzone A, Schiattarella GG, et al. The second cAMP messenger and cardiac function regulation: the role of adenylate cyclase. *Trends Med* 2009; 9(3):129-136.

© 2009 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

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

Cattedra di Cardiologia, Dipartimento di Medicina Clinica, Scienze Cardiovascolari ed Immunologiche, Università Federico II, Napoli

 **Giovanni Esposito**

Cattedra di Cardiologia  
Dipartimento di Medicina Clinica,  
Scienze Cardiovascolari ed  
Immunologiche  
Università Federico II  
Via Pansini 5  
80131 Napoli  
Tel: +39 081 746 2216  
Fax: +39 081 746 2223  
Email: [espogiov@unina.it](mailto:espogiov@unina.it)

I recettori beta-adrenergici ( $\beta$ AR) sono i principali modulatori della funzione cardiaca mediante l'aumento dei livelli citoplasmatici del secondo messaggero adenosina monofosfato ciclica (cAMP)<sup>1</sup>. I recettori  $\beta$ -adrenergici, attivati dalle catecolamine, inducono un cambiamento conformazionale e l'attivazione delle proteine G con stimolazione dell'enzima adenilato ciclasi (AC) che determina un aumento della sintesi di cAMP (figura 1)<sup>2-4</sup>. Nei cardiomiociti, il cAMP regola molteplici funzioni cellulari tra cui la contrazione e la frequenza cardiaca attraverso la proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA) ed i suoi substrati, come i canali del  $Ca^{++}$  tipo-L<sup>5</sup>, i recettori della rianodina tipo 2 (RyR2)<sup>6,7</sup>, il fosfolambano (PLN)<sup>8</sup>, la troponi-

na I<sup>9</sup>, la proteina C che lega la miosina cardiaca e l'inibitore della proteina fosfatasi 1 (PP1)<sup>10</sup>. La regolazione di queste proteine da parte della PKA porta ad un aumento del  $Ca^{++}$  all'interno della cellula in risposta all'attivazione adrenergica.

Numerosi studi condotti nell'uomo ed in diversi modelli animali hanno dimostrato che nell'insufficienza cardiaca si sviluppano importanti cambiamenti della segnalazione  $\beta$ -adrenergica, quali la down-regolazione dei  $\beta$ AR<sup>11,12</sup>, ed alterazioni del pathway del cAMP<sup>13</sup> che sono causati almeno in parte da una riduzione dei livelli dell'AC. Diversi studi, infatti, hanno dimostrato che i livelli delle isoforme AC5 e AC6, che sono quelle maggiormente espresse a livello cardiaco, sono ridotte nel-

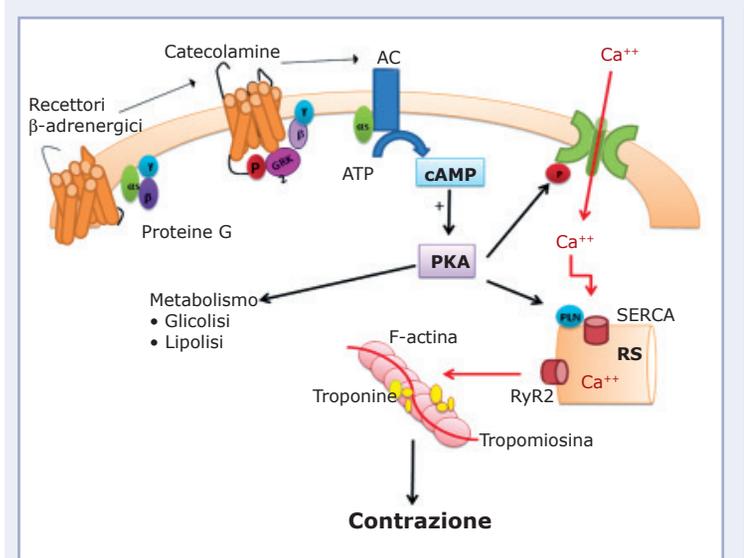
lo scompenso cardiaco<sup>14,15</sup>. Tale diminuzione causerebbe una riduzione dell'attività totale dell'AC<sup>16</sup>, e ciò potrebbe contribuire ad una riduzione dell'attività della PKA e della contrazione cardiaca. Se questa anomalia svolge un ruolo determinante nella disfunzione contrattile rimane ancora poco chiaro.

### Meccanismi di regolazione della funzione cardiaca in risposta alla stimolazione $\beta$ -adrenergica

L'attivazione del sistema nervoso simpatico avvia il piú potente stimolo per migliorare la gittata cardiaca, attraverso l'aumento della frequenza cardiaca e della forza di contrazione del ventricolo sinistro (figura 1). Il recettore  $\beta$ -adrenergico è una proteina che appartiene alla famiglia dei recettori a serpentina formati da sette eliche che attraversano la membrana plasmatica. Il legame delle catecolammine determina una modificazione conformazionale del recettore che va ad alterare la sua interazione con altre proteine della via di trasduzione del segnale, in particolare con le proteine G eterotrimeriche, che si separano in proteine  $G\alpha$  stimolatorie ( $G_s$ ) o inibitorie ( $G_i$ ) capaci di legare il GTP e proteine  $G\beta\gamma$  (figura 1). Quando il GTP si lega alle proteine  $G\alpha$ , si ha una stimolazione della sintesi di cAMP da parte dell'AC. Il contrario avviene in seguito all'attivazione delle proteine  $G_i$ .

L'AC catalizza la sintesi di cAMP a partire dall'adenosina trifosfato (ATP) ed è responsabile dell'aumento della concentrazione citosolica di

**Figura 1.** Segnalazione intracellulare mediata dai recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR). Schema rappresentativo degli eventi che si verificano in seguito all'attivazione dei  $\beta$ AR e responsabili della contrazione miocardica. Quando le catecolammine interagiscono con i  $\beta$ AR, si verificano modificazioni delle proteine G che inducono un'attivazione dell'AC e la formazione di cAMP; quest'ultimo attraverso la PKA stimola il metabolismo (a sinistra) e la fosforilazione di proteine coinvolte nella regolazione del  $Ca^{++}$  intracellulare (a destra), che è indispensabile per la contrazione dei cardiomiociti.



Abbreviazioni: GRK: chinasi di recettori accoppiati alle proteine G; AC: adenilato ciclasi; ATP: adenosina trifosfato; cAMP: adenosina monofosfato ciclico; PKA: proteina chinasi cAMP-dipendente; RS: reticolo sarcoplasmatico; SERCA:  $Ca^{++}$ -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico; PLN: fosfolambano; RyR2: recettore della rianodina di tipo 2.

cAMP. Il cAMP attiva allostericamente la PKA, che fosforila altre proteine bersaglio coinvolte nell'amplificazione del segnale (figura 1). In particolare, nelle cellule miocardiche, attraverso la PKA, il cAMP stimola il metabolismo (glicolisi, lipolisi), la fosforilazione delle proteine dei canali del  $Ca^{++}$  tipo-L, l'attivazione dei recettori RyR2, il PLN, la troponina I, la proteina C che lega la miosina cardiaca, e il PP1. La fosforilazione dei canali del  $Ca^{++}$  tipo-L localizzati sulla membrana plasmatica consente l'ingresso di ioni  $Ca^{++}$  attraverso il sarcolemma dei tubuli T. Questi ioni  $Ca^{++}$  attivano i RyR2 localizzati sulla membrana del reticolo

sarcoplasmatico e inducono il rilascio di una maggiore quantità di ioni  $Ca^{++}$  nel citosol, che determina un aumento della concentrazione di  $Ca^{++}$  e l'attivazione della troponina C. La troponina C, infatti, legando il  $Ca^{++}$ , induce un cambiamento sterico dell'intero complesso troponina-tropomiosina che consente alla tropomiosina di spostarsi per esporre i siti di legame dell'actina per la miosina. Tali fenomeni consentono la formazione di ponti trasversi e la contrazione. In altri termini, quando gli ioni  $Ca^{++}$  si legano alla troponina C, il complesso troponina-tropomiosina subisce un cambiamento conformazionale che determi-

na uno spostamento della troponina, consentendo alle teste di miosina di entrare in contatto con i siti di legarne sul filamento di actina. La PKA attiva in modo indiretto la troponina C attraverso l'aumento della concentrazione di  $Ca^{++}$ , e in modo diretto la troponina I che in seguito alla fosforilazione da parte della PKA determina la dissociazione del complesso  $Ca^{++}$ -troponina C.

Oltre ad attivare i canali del  $Ca^{++}$  tipo-L e la troponina I, la PKA è responsabile dell'attivazione della pompa SERCA localizzata sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico, normalmente inibita dal PLN. La fosforilazione del PLN da parte di PKA riduce l'inibizione della pompa SERCA e consente l'ingresso degli ioni  $Ca^{++}$  dal citosol al reticolo sarcoplasmatico, con conseguente riduzione della concentrazione di  $Ca^{++}$  durante la diastole. Gli ioni  $Ca^{++}$  inducono anche un incremento della scissione dell'ATP in adenosina difosfato (ADP) e fosforo inorganico (Pi). L'aumento dell'attività della ATPasi miosinica spiega l'incremento della contrazione, e il conseguente aumento dell'attivazione della troponina C spiega l'incremento del picco della forza di contrazione. La regolazione del  $Ca^{++}$  da parte dei cardiomiociti subisce delle alterazioni nello scompenso cardiaco<sup>17,18</sup>, e numerosi studi suggeriscono che le molecole coinvolte in questo meccanismo possono costituire importanti target per una futura terapia genica.

Una caratteristica importante dello scompenso cardiaco è l'alterazione del segnale  $\beta$ -adrenergico<sup>19</sup>. Negli ultimi

anni sono stati studiati diversi elementi coinvolti nella segnalazione  $\beta$ -adrenergica in relazione al ruolo che svolgono nella regolazione della normale funzione cardiaca e nello sviluppo dello scompenso cardiaco, e l'attenzione si è rivolta in particolare ai recettori  $\beta$ AR, alle proteine G e all'AC<sup>19</sup>. E' stato infatti dimostrato che nello scompenso cardiaco si verificano una riduzione della densità dei recettori  $\beta$ AR e della risposta alla stimolazione da parte di agonisti, una riduzione dei livelli di cAMP e dell'attività dell'AC<sup>13,20</sup>. Pertanto, sono stati condotti diversi studi sperimentali su modelli animali al fine di valutare gli effetti dell'overespressione degli elementi chiave della segnalazione  $\beta$ -adrenergica sulla funzione cardiaca e il loro ruolo nella progressione verso lo scompenso cardiaco. In questi studi è stato dimostrato che l'overespressione dei  $\beta$ AR e la loro persistente attivazione da parte di agonisti, come l'isoproterenolo, migliora inizialmente la funzione cardiaca aumentando la forza di contrazione del ventricolo sinistro e la frequenza cardiaca, ma determina a lungo andare alterazioni morfologiche e funzionali fino allo scompenso cardiaco<sup>21</sup>. L'overespressione delle proteine Gs ha effetti analoghi a quelli dell'overespressione dei  $\beta$ AR, perché determina inizialmente un aumento della forza di contrazione del ventricolo sinistro e della frequenza cardiaca, seguito però da una riduzione della funzione miocardica e dalla progressione verso lo scompenso cardiaco<sup>22</sup>. Una caratteristica comune dell'overespressione dei  $\beta$ AR e delle proteine G è l'au-

mento dei livelli di cAMP sia in condizioni basali che in seguito alla stimolazione adrenergica. I risultati di tali studi dimostrano, pertanto, che il potenziamento incontrollato della segnalazione  $\beta$ -adrenergica non è un'efficace strategia terapeutica per lo scompenso cardiaco. Infatti, anche studi clinici che hanno valutato gli effetti dell'aumento della stimolazione adrenergica e dei livelli di cAMP (in seguito a trattamento con dobutamina e inibitori di fosfodiesterasi) hanno dimostrato che tali strategie esercitano un effetto benefico solo in fase precoce e successivamente svolgono un ruolo deleterio<sup>23</sup>. In contrasto, studi clinici hanno dimostrato che i  $\beta$ -bloccanti, tra i più efficaci farmaci nello scompenso cardiaco, in realtà normalizzano la segnalazione  $\beta$ -adrenergica<sup>24,25</sup>. Recenti studi si sono quindi rivolti ad analizzare il ruolo dell'AC nello scompenso cardiaco, e in particolare gli effetti della ridotta o aumentata attività dell'enzima sulla struttura e sulla funzione cardiaca.

### Regolazione e ruolo delle isoforme dell' AC nel cuore

L'AC è l'enzima chiave nella sintesi del secondo messaggero cAMP in risposta alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica<sup>26</sup>. Tale enzima appartiene alla classe delle liasi e catalizza la reazione  $ATP = AMP\ 3',5'\text{-ciclivo} + \text{difosfato}$ . L'AC è una proteina integrale di membrana che attraversa dodici volte la membrana plasmatica; il sito attivo è rivolto verso il citosol della cellula e può essere suddiviso in varie regioni: N-terminale, C1a, C1b,

**Tabella 1.** Caratteristiche e distribuzione tissutale delle isoforme dell'adenilato ciclasi (AC).

	<b>Cromosoma</b>	<b>G<math>\alpha</math>s</b>	<b>G<math>\alpha</math>i</b>	<b>G<math>\beta</math><math>\gamma</math></b>	<b>Ca<math>^{++}</math></b>	<b>PKA</b>	<b>Distribuzione tissutale</b>	<b>Potenziale funzione</b>
<b>AC1</b>	7p12	V	X	X	X (CaM K IV) V (CaM)		Neuroni, midollare del surrene	LTP, memoria
<b>AC2</b>	5p15	V		V			Neuroni, muscolo scheletrico, cuore, polmoni	Plasticità sinaptica
<b>AC3</b>	2p22-24	V	X		X (CaM K II) V (CaM)		Cervello, pancreas, epitelio olfattivo, cuore	Stimolazione olfattiva
<b>AC4</b>	14q11.2	V		V			Cervello, cuore, reni, fegato, polmoni	
<b>AC5</b>	3q13.2-q21	V	X	X	X	X	Cuore, cervello, reni, polmoni, fegato	Dipendenza Alcolica
<b>AC6</b>	12q12-13	V	X	X	X	X	Ubiquitaria	Proliferazione cellulare
<b>AC7</b>	16q12-13	V		V			Cervello, piastrine	
<b>AC8</b>	8q24	V	X		V (CaM)		Cervello, polmoni	LTP
<b>AC9</b>	16p13.3	V	X		X (Calcineunina)		Cervello, muscolo scheletrico	

Abbreviazioni: **LTP**: long term potentiation; **CaM K**: proteina chinasi dipendente da Ca $^{++}$ / calmodulina.

C2a e C2b. I domini C1a e C2a formano un dimero catalitico a cui si lega l'ATP e viene convertito in cAMP.

Esistono nove geni che codificano per altrettante isoforme di AC nell'uomo: *ADCY1*, *ADCY2*, *ADCY3*, *ADCY4*, *ADCY5*, *ADCY6*, *ADCY7*, *ADCY8*, *ADCY9* (tabella 1)<sup>27-29</sup>.

Ogni isoforma di AC ha uno specifico pattern di distribuzione a livello di organi e tessuti, e di regolazione da parte delle proteine G o da parte del Ca $^{++}$ . Tutte le isoforme, infatti, vengono attivate in seguito al legame con la subunità  $\alpha$  delle proteine Gs, e inibite dalle proteine Gi. Le isoforme AC1, AC3 e AC8 sono stimulate dal Ca $^{++}$ /Calmodulina,

mentre le isoforme AC5 e AC6 sono inibite dal Ca $^{++}$  in modo indipendente dalla Calmodulina. Ogni isoforma però ha un'affinità per le proteine Gs e Gi diversa rispetto alle altre, e questo può spiegare le variazioni nella risposta del tessuto in seguito all'attivazione del recettore adrenergico.

Oltre che nelle proprietà biochimiche, vi è notevole diversità nella distribuzione delle varie isoforme di AC all'interno di organi e tessuti (tabella 1). Ogni singola cellula, infatti, esprime più isoforme di AC. Tuttavia, ogni tessuto possiede un'unica "miscela" di isoforme di AC, che lo differenzia dagli altri. L'eterogeneità

tra le isoforme di AC distingue questo enzima dagli altri componenti del signaling  $\beta$ -adrenergico, e in particolare dallo stesso recettore  $\beta$ AR e dalle proteine Gs, che mancano di tale diversità sia nel numero di isoforme espresse sia nel pattern di distribuzione all'interno dell'organismo.

Le isoforme più abbondantemente espresse nel cuore sono AC5 e AC6. Entrambe le isoforme cardiache possono essere inibite dalle proteine Gi, da basse concentrazioni di Ca $^{++}$  e dalla PKA<sup>30,31</sup>. La fosforilazione da parte di PKA inibisce l'attività dell'AC5 riducendo la velocità massima dell'enzima, mentre la fosforilazione dell'AC6 altera il sito di

**Tabella 2.** Effetti delle isoforme 5, 6 ed 8 dell'adenilato ciclasi (AC) sulla funzione cardiaca.

		Condizioni basali	Dopo stimolazione adrenergica
AC5	+	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invariata produzione di cAMP</li> <li>• Invariata frequenza cardiaca</li> <li>• Invariata funzione contrattile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invariata produzione di cAMP</li> <li>• Invariata frequenza cardiaca</li> <li>• Invariata risposta contrattile</li> </ul>
	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ridotta produzione di cAMP</li> <li>• Aumentata funzione contrattile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ridotta produzione di cAMP</li> <li>• Ridotta risposta contrattile</li> </ul>
AC6	+	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invariata produzione di cAMP</li> <li>• Invariata frequenza cardiaca</li> <li>• Invariata funzione contrattile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumentata produzione di cAMP</li> <li>• Aumentata frequenza cardiaca</li> <li>• Aumentata risposta contrattile</li> </ul>
	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invariata produzione di cAMP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ridotta produzione di cAMP</li> <li>• Ridotta risposta contrattile</li> </ul>
AC8	+	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumentata funzione cardiaca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invariata risposta contrattile</li> </ul>

Abbreviazioni: + : animali overesprimenti l'isoforma dell'enzima AC; - : animali knock-out per l'isoforma dell'enzima AC.

legame della subunità  $\alpha$  della proteina Gs, bloccando l'attività dell'enzima.

Nonostante queste due isoforme siano equivalenti alla nascita, con l'aumentare dell'età si osserva un aumento dell'isoforma AC5 e una riduzione dell'isoforma AC6<sup>32,33</sup>. Inoltre, è stato dimostrato che i livelli di AC6 si riducono nello scompenso cardiaco, mentre quelli di AC5 rimangono costanti<sup>15</sup>. Se questa regolazione gioca un ruolo causale nella disfunzione contrattile caratteristica dello scompenso cardiaco resta ancora poco chiaro.

Per studiare il ruolo delle differenti isoforme di AC nel cuore sono stati generati topi transgenici (tabella 2) overesprimenti le isoforme AC5 e AC6 nel cuore<sup>34-36</sup>, topi knockout per le isoforme AC5 e AC6<sup>37,38</sup>, e topi over-esprimenti l'isoforma AC8<sup>39-41</sup>, che, differenza di AC5 e AC6, è espressa essenzialmente nel cervello<sup>42,43</sup>. Questi studi hanno consentito di valutare gli effetti sulla struttura e sulla funzione cardiaca in vivo, che

sono risultati diversi a seconda dell'isoforma di AC analizzata, suggerendo quindi che la funzione cardiaca non dipende semplicemente dall'attività globale dell'AC e dai livelli di cAMP, ma che ciascuna isoforma di AC è responsabile di una differente azione nella regolazione della contrazione cardiaca.

A differenza di quanto accade negli animali overesprimenti i  $\beta$ AR e le proteine Gs, l'overespressione dell'AC6 a lungo andare non causa alterazioni né morfologiche né strutturali che portano allo sviluppo dello scompenso cardiaco. Nonostante l'aumentata espressione cardiaca dell'AC6, in questi animali il contenuto di cAMP, la frequenza cardiaca e la funzione contrattile restano invariati in condizioni basali, mentre aumentano in maniera significativa dopo stimolazione adrenergica, senza variazioni del numero dei  $\beta$ AR e delle proteine G. Questi dati indicano che i livelli di AC sono importanti per la regolazione del segnale  $\beta$ -adrenergico, e in particola-

re della capacità di generare il cAMP, e che l'aumento dell'AC, indipendentemente dal numero dei  $\beta$ AR e delle proteine G, contribuisce a modulare la risposta cardiaca alla stimolazione adrenergica<sup>36</sup>.

Le conseguenze dell'overespressione dell'AC6 in condizioni patologiche sono state valutate in diversi modelli di scompenso cardiaco, tra cui studi condotti su animali overesprimenti le proteine  $G\alpha_q$  che presentano una notevole riduzione della funzione cardiaca e dei livelli di cAMP, mimando quindi gli aspetti chiave dello scompenso cardiaco umano<sup>44</sup>. In questi animali, l'overespressione dell'AC6 determina un aumento della funzione cardiaca, della capacità di produrre cAMP, della risposta alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica<sup>34</sup> e un aumento della sopravvivenza<sup>45</sup>. L'overespressione dell'AC6 è stata valutata anche in altri modelli di scompenso cardiaco, come l'infarto miocardico acuto ottenuto mediante legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore, e i risul-

tati di questi studi sono stati analoghi a quelli ottenuti negli animali overesprimenti le proteine  $G\alpha_q$ <sup>46</sup>. Infatti, una settimana dopo l'intervento chirurgico, gli animali overesprimenti AC6 e sottoposti ad IMA mostravano una marcata riduzione della mortalità e dell'incidenza di blocco A-V rispetto agli animali del gruppo di controllo<sup>46</sup>.

L'importanza del ruolo svolto dall'isoforma AC6 nella funzione cardiaca è stata confermata anche in studi condotti su animali knockout per l'isoforma AC6. Nei cardiomiociti di questi animali, infatti, si ha una riduzione della produzione di cAMP in seguito alla stimolazione adrenergica ed una riduzione dell'attività della PKA, e quindi della fosforilazione del PLN e dell'attività della SERCA, che causano importanti alterazioni della regolazione del  $Ca^{++}$  e della funzione del ventricolo sinistro<sup>37</sup>. Collettivamente, questi dati suggeriscono che la AC6 potrebbe rappresentare un importante obiettivo terapeutico nello scompenso cardiaco, in particolare per aumentare la risposta alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica.

Studi condotti su topi overesprimenti l'isoforma AC5 hanno invece dimostrato che l'aumento dell'attività dell'AC5 non determina significative alterazioni della morfologia e della funzione contrattile cardiaca sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione adrenergica, e con il passare del tempo causa danni morfologici e funzionali del tessuto cardiaco fino alla cardiopatia dilatativa<sup>35</sup>. Al contrario, negli animali knockout per l'AC5 la delezione di questa isoforma è associata ad un

aumento della funzione contrattile basale del ventricolo sinistro, nonostante la riduzione dei livelli del cAMP<sup>38</sup>. I fattori che contribuiscono a questo fenomeno sono l'aumento dell'affinità della SERCA per il  $Ca^{++}$  e l'aumento della fosforilazione del PLN. Tuttavia, la delezione di AC5 è associata ad una ridotta risposta della contrattilità del ventricolo sinistro in seguito a stimolazione adrenergica, un effetto che non è associato a cambiamenti del numero dei  $\beta$ AR, ma ad una riduzione della quantità di proteine  $G\alpha_s$  e ad una ridotta capacità delle cellule di generare il cAMP<sup>38</sup>. Questi studi suggeriscono che la funzione contrattile basale non dipende solo dai livelli del cAMP, bensì da alterazioni di molecole coinvolte distalmente nella regolazione delle proteine contrattili da parte del  $Ca^{++}$ <sup>38</sup>. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che la delezione di AC5 comporta un aumento della sopravvivenza e limita la fisiologica riduzione della funzione cardiaca che si verifica in età avanzata<sup>47</sup>. La delezione di questa isoforma, inoltre, esercita un effetto protettivo nei riguardi dello stress causato da sovraccarico pressorio<sup>48</sup> e stimolazione cronica di catecolamine, e delle cardiopatie legate all'invecchiamento dovute a ipertrofia, fibrosi e apoptosi<sup>47</sup>.

Dal momento che AC5 e AC6 sono le isoforme dominanti a livello cardiaco, gli studi sperimentali si sono indirizzati inizialmente ad esaminare gli effetti dell'overespressione di queste isoforme sulla funzione cardiaca. Tuttavia, non è stata esclusa la possibilità che l'espressione di

un'isoforma non cardiaca, come l'AC8, potesse migliorare la funzione cardiaca. Studi sperimentali condotti su modelli animali overesprimenti AC8 hanno dimostrato che l'overespressione cardiaca di questa isoforma è associata ad un notevole miglioramento della funzione cardiaca basale e che non determina a lungo andare conseguenze morfologiche e funzionali negative<sup>39-41</sup>. A differenza degli animali overesprimenti AC6, in cui la funzione cardiaca migliora in seguito alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica<sup>36</sup>, e degli animali overesprimenti AC5 in cui basalmente non si evidenzia alcun miglioramento, gli animali overesprimenti AC8 presentano un'aumentata funzione cardiaca in condizioni basali che non migliora ulteriormente in seguito a stimolazione adrenergica<sup>39-41</sup>. Pertanto, l'espressione cardiaca di AC8 potrebbe contribuire ad aumentare la funzione cardiaca anche quando c'è down-regolazione dei recettori  $\beta$ AR, come avviene nello scompenso cardiaco.

In uno studio recente condotto su animali overesprimenti AC5 e AC8 è stato dimostrato che le misure di funzione sistolica indipendenti dal carico rappresentano lo strumento più valido per individuare le differenze nella funzionalità cardiaca<sup>41</sup>. Attraverso l'analisi delle curve pressione-volume in tali animali è stato infatti possibile dimostrare che non solo gli animali overesprimenti AC8 ma anche quelli overesprimenti AC5 presentano un'aumentata funzione cardiaca in condizioni basali<sup>41</sup>. Tale proprietà si traduce in un aumento della capacità di eser-

cizio, che risulta maggiore negli animali AC8 rispetto agli animali AC5<sup>41</sup>.

## Conclusioni

Il cAMP è un importante mediatore cellulare coinvolto nella regolazione di numerosi aspetti della funzione cardiaca in risposta alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica. L'adenilato ciclasi è l'enzima chiave nella sintesi del cAMP. L'aumento dei livelli di cAMP porta all'attiva-

zione della proteina chinasi cAMP-dipendente PKA in grado di fosforilare diverse proteine bersaglio coinvolte nella modulazione della contrattilità dei cardiomiociti. Diversi studi condotti in modelli sperimentali di scompenso cardiaco hanno dimostrato che l'attività dell'AC è notevolmente ridotta in condizioni patologiche, suggerendo che anomalie della sintesi di cAMP potrebbero essere responsabili, almeno in parte,

della disfunzione contrattile del ventricolo sinistro.

Gli studi sperimentali su modelli animali riassunti in questa revisione suggeriscono che una maggiore comprensione degli effetti mediati dall'AC e delle funzioni delle singole isoforme dell'enzima potrebbero aiutare ad individuare nuovi bersagli terapeutici, in particolare nella regolazione delle funzioni cardiovascolari e nella gestione delle malattie cardiovascolari. **TiM**

## Bibliografia

1. **Movsesian MA.** Beta-adrenergic receptor agonists and cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: shifting the focus from inotropy to cyclic adenosine monophosphate. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:318-324.
2. **Cooper JA, Hill SJ, Alexander SP, et al.** Adenosine receptor-induced cyclic AMP generation and inhibition of 5-hydroxytryptamine release in human platelets. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 40:43-50.
3. **Hanoune J, Defer N.** Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:145-74.
4. **Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, et al.** Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 2001; 269 (1-2):13-25.
5. **Striessnig J.** Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem* 1999; 9:242-269.
6. **Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, et al.** Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg<sup>2+</sup> and phosphorylation. *Science* 1995;267(5206):1997-2000.
7. **Yoshida A, Takahashi M, Imagawa T, et al.** Phosphorylation of ryanodine receptors in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *J Biochem* 1992; 111:186-190.
8. **Simmerman HK, Jones LR.** Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 1998; 78:921-947.
9. **Zhang R, Zhao J, Potter JD.** Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca<sup>2+</sup> affinity of cardiac troponin C. *J Biol Chem* 1995; 270:30773-30780.
10. **Bers DM.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415:198-205.
11. **Post SR, Hammond HK, Insel PA.** Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:343-60.
12. **Keys JR, Koch WJ.** The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:13-30.
13. **Feldman MD, Copelas L, Gwathmey JK, et al.** Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 1987; 75:331-339.
14. **Ishikawa Y, Sorota S, Kiuchi K, et al.** Downregulation of adenylyl cyclase types V and VI mRNA levels in pacing-induced heart failure in dogs. *J Clin Invest* 1994; 93:2224-2229.
15. **Ping P, Anzai T, Gao M, Hammond HK.** Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 2):H707-H717.
16. **Reithmann C, Reber D, Kozlik-Feldmann R, et al.** A post-receptor defect of adenylyl cyclase in severely failing myocardium from children with congenital heart disease. *Eur J Pharmacol* 1997; 330:79-86.
17. **Bers DM.** Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:380-7.
18. **Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M.** Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115:556-564.
19. **Rockman HA, Koch WJ, Leffkowitz RJ.** Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002; 415:206-212.
20. **Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al.** Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307:205-211.
21. **Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, et al.** Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:7059-7064.
22. **Iwase M, Uechi M, Vatner DE, et al.** Cardiomyopathy induced

- by cardiac Gs alpha overexpression. *Am J Physiol* 1997; 272(1 Pt 2):H585-H589.
23. **Stehlik J, Movsesian MA.** Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 and 5 as therapeutic agents in heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15:733-742.
  24. **Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, et al.** Increased beta-receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1989; 79:483-490.
  25. **Domanski MJ, Krause-Steinrauf H, Massie BM, et al.** A comparative analysis of the results from 4 trials of beta-blocker therapy for heart failure: BEST, CIBIS-II, MERIT-HF, and COPERNICUS. *J Card Fail* 2003; 9:354-363.
  26. **Ishikawa Y, Homcy CJ.** The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* 1997; 80:297-304.
  27. **Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, et al.** Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128(1-2):179-194.
  28. **Iyengar R.** Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 1993; 7:768-775.
  29. **Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG.** Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36:461-480.
  30. **Iwami G, Kawabe J, Ebina T, et al.** Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* 1995; 270:12481-12444.
  31. **Chen Y, Harry A, Li J, et al.** Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:14100-14104.
  32. **Tobise K, Ishikawa Y, Holmer SR, et al.** Changes in type VI adenylyl cyclase isoform expression correlate with a decreased capacity for cAMP generation in the aging ventricle. *Circ Res* 1994; 74:596-603.
  33. **Espinasse I, Iourgenko V, Defer N, et al.** Type V, but not type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1789-1795.
  34. **Roth DM, Gao MH, Lai NC, et al.** Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99:3099-3102.
  35. **Tepe NM, Liggett SB.** Transgenic replacement of type V adenylyl cyclase identifies a critical mechanism of beta-adrenergic receptor dysfunction in the G alpha q overexpressing mouse. *FEBS Lett* 1999; 458:236-240.
  36. **Gao MH, Lai NC, Roth DM, et al.** Adenylyl cyclase increases responsiveness to catecholamine stimulation in transgenic mice. *Circulation* 1999; 99:1618-1622.
  37. **Tang T, Gao MH, Lai NC, et al.** Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling. *Circulation* 2008; 117:61-69.
  38. **Tang T, Lai NC, Roth DM, et al.** Adenylyl cyclase type V deletion increases basal left ventricular function and reduces left ventricular contractile responsiveness to beta-adrenergic stimulation. *Basic Res Cardiol* 2006; 101:117-126.
  39. **Georget M, Mateo P, Vandecasteele G, et al.** Augmentation of cardiac contractility with no change in L-type Ca<sup>2+</sup> current in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J* 2002; 16:1636-1638.
  40. **Georget M, Mateo P, Vandecasteele G, et al.** Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J* 2003; 17:1380-1391.
  41. **Esposito G, Perrino C, Ozaki T, et al.** Increased myocardial contractility and enhanced exercise function in transgenic mice overexpressing either adenylyl cyclase 5 or 8. *Basic Res Cardiol* 2008; 103:22-30.
  42. **Cali JJ, Zwaagstra JC, Mons N, et al.** Type VIII adenylyl cyclase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J Biol Chem* 1994; 269:12190-12195.
  43. **Defer N, Marinx O, Stengel D, et al.** Molecular cloning of the human type VIII adenylyl cyclase. *FEBS Lett* 1994; 351:109-113.
  44. **D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, et al.** Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:8121-8126.
  45. **Roth DM, Bayat H, Drumm JD, et al.** Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation* 2002; 105:1989-1994.
  46. **Takahashi T, Tang T, Lai NC, et al.** Increased cardiac adenylyl cyclase expression is associated with increased survival after myocardial infarction. *Circulation* 2006; 114:388-396.
  47. **Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, et al.** Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* 2007; 130:247-258.
  48. **Okumura S, Takagi G, Kawabe J, et al.** Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:9986-9990.