

***PEPTIDERGIC REGULATION OF CARDIAC CONTRACTILITY: ROLE OF  
PROLACTIN-RELEASING PEPTIDE AND ENDOTHELIN-1***

Ph.D. thesis

by

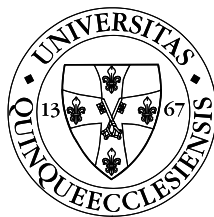
Attila Kónyi M.D.

Supervisor:

István Szokodi, M.D., Ph.D.

Program Leader:

Erzsébet Róth, M.D., Ph.D, DSc



University of Pécs, Medical Faculty

Heart Institute, Department of Interventional Cardiology

Doctoral School of Medical Sciences

2010

## Introduction

The major function of cardiomyocytes is to maintain the cardiac contraction-relaxation cycle. The contractile function of the heart is regulated by a number of acute and long-term mechanisms. Recently novel peptidergic mechanisms have been implicated in the acute and long-term regulation of cardiac contractility. These peptides (e.g. adrenomedullin, apelin), act via guanine nucleotide-binding regulatory (G) protein-coupled receptors (GPCRs), which represent the largest family of cell surface receptors and of all protein families. GPCRs are one of the most important modulators of organism function. They play a key role in cellular signaling pathways that regulate many basic physiological processes.. GPCRs are responsible for recognition and transduction of messages from the external environment of organisms or of cells within the body. GPCRs are the targets of a wide variety of ligands. GPCRs consist of a single protein chain that crosses the membrane seven times (seven transmembrane proteins-7 TM), they share a conserved core structure with extracellular amino termini (N-terminal tail), intracellular carboxyl termini (C-terminal tail), and seven transmembrane helices, which are connected by three extracellular and three intracellular loops (*Salazar NC, et al., 2007*). The human genome encompasses more than 800 GPCRs, which probably represents the largest of all the gene families. GPCRs originally started as “orphan” because their transmitters were unknown. The discovery of their specific transmitters (deorphanizing these receptors) was prime importance to understand their function. During the last 20 years most of them were matched with their ligands using numerous different strategies. Today, one estimates that the number of GPCRs is over 800, of which more than half are olfactory GPCRs, and approximately 367 “non-odorant” receptors exist in humans (*Levoye et al. 2008*). Of these, over 100 GPCRs are still „orphan”, whose cognate ligands and their physiological roles have not yet been identified. Functional studies have implicated several recently paired peptide ligands in the regulation of cardiovascular homeostasis, including apelin, ghrelin, urotensin II, urocortins motilin, neuromedin U, sphingosine-1-phosphate and nociceptin. The G-protein coupled receptors are a large superfamily, among others the  $\beta$ -adrenergic,  $\alpha$ -adrenergic, muscarinic, angiotensin, adenosine, cardiac opioid receptors belong to GPCRs. It is quite possible that many (if not all) of these neurohumoral signaling systems play crucial roles, not only in regulating cardiac performance, but also in orchestrating cardiac growth. The last twenty years it was demonstrated that numerous peptides had role in the regulation of cardiac contractility. For example in 1998 it was described that *adrenomedullin* at lower doses may enhance contractility via cAMP-independent mechanisms, and at higher doses, stimulate cAMP formation and induce the positive inotropic effect. In 1998 Tatemoto et al. discovered *apelin* as an endogenous peptide ligand for the apelin-angiotension receptor-like 1 (APJ), which receptor originally identified by *O’Dowd et al. in 1993*. In 1998 a new bioactive peptide was identified from bovine hypothalamic tissue as a potential ligand of G-protein-coupled receptor 10 (GPR 10). As this peptide can stimulate the release of prolactin from anterior pituitary cells, it was named prolactin releasing peptide (PrRP). It is well established that PrRP plays role in the regulation of the central stress response, feeding behaviour and sleep regulation. Specific I<sup>125</sup>-PrRP binding sites were described in the rat. Intracerebro-ventricular administration of PrRP resulted in significantly increased mean arterial blood pressure in conscious, unrestrained rats. It was also demonstrated that Ir-PrRP could be found in the plasma, but the source of circulating peptide remains unknown. Based on these results, one can

anticipate that PrRP may have an important role in the regulation of cardiovascular homeostasis, however, it has not been addressed so far.

### ***PKC $\alpha$ as a novel negative regulator of contractility***

PKC comprises a multigene family of related serine/threonine kinases that sit at the crossroads of many signal transduction pathways and are implicated in a wide range of GPCR and other growth factor-dependent cellular responses including cell proliferation, differentiation and apoptosis. PKC isoforms in the myocardium are involved in numerous cellular processes including regulation of cytosolic [Ca<sup>2+</sup>], myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity, and contractility of cardiac muscle cells. The loss of contractility that accompanies heart failure is also associated with an increase in PKC $\alpha$  protein content and activity. Moreover, growing body of evidence suggest that PKC $\alpha$  acts as a critical regulator of myocardial contractility. Braz et al. have reported that cardiac-restricted deletion of *PKC $\alpha$*  gene results in increased cardiac contractility, whereas transgenic overexpression of the molecule leads to ventricular dysfunction. Hypercontractility induced by *PKC $\alpha$*  gene deletion protected against pressure overload-induced heart failure and dilated cardiomyopathy associated with deletion of the *muscle lim protein (MLP)* gene in the mouse (Braz JC. et al., 2004). In agreement, long-term pharmacological inhibition of PKC $\alpha$  with Ro-31-8220 in *MLP*<sup>-/-</sup> mice dramatically improved left ventricular function. Mechanistically, PKC $\alpha$  directly phosphorylates inhibitor-1, resulting in greater protein phosphatase type 1 (PP1) activity, which in turn leads to greater phospholamban dephosphorylation and less activity of the SERCA2 pump. Less SERCA2 activity reduces SR Ca<sup>2+</sup> load, leading to reduced Ca<sup>2+</sup> release during systole, hence reduced contractility. Alternatively, PKC $\alpha$  appears to directly phosphorylate key contractile proteins, leading to reduced force production in isolated, skinned myocytes (Belin RJ . et al., 2007). Although PKC $\alpha$  is emerging as a crucial negative modulator of cardiac function, its role in the acute regulation of contractility in a physiological milieu is unclear.

### ***Mitogen-activated protein kinases as novel modulators of cardiac contractility***

The evolutionarily conserved mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily occupies a central position in intracellular signal transduction in all eukaryotic cells. The members of the classic MAPK family have been implicated in the regulation of diverse cellular processes from cell growth and proliferation to apoptosis. The ERK1/2 pathway is activated mainly by growth stimuli (GPCR agonists, receptor tyrosine kinases), JNK and p38-MAPK are called stress-activated kinases because of their selective responses to physical, chemical and physiological stressors, and the BMK is implicated in both growth and stress signaling. Initially, p38-MAPK signaling was considered to promote cardiomyocyte hypertrophy in response to GPCR agonists (e.g. angiotensin II and ET-1) in cultured neonatal cardiomyocytes. Prolonged inhibition of p38-MAPK activity in mice expressing dominant negative mutants of MKK3 or MKK6 enhanced further pressure overload-induced cardiac hypertrophy, suggesting an inhibitory function of p38-MAPK on cardiac growth response.

Accumulating data suggest that p38-MAPK is directly involved in the regulation of cardiac contractility. Persistent activation of p38-MAPK signaling in mice with cardiac-specific expression of MKK3bE or MKK6bE was associated with compromised left ventricular systolic and diastolic function. In adult rat cardiomyocytes, activation of p38-MAPK by adenoviral gene transfer of MKK3bE resulted in a significant reduction in contractility. Though chronic modulation of p38-MAPK activity clearly affects

cardiac performance, the involvement of p38-MAPK signaling in the physiological control of cardiac contractility is less clear. In contrast to the MEK3/6-p38-MAPK pathway, ample evidence indicate that activation of the MEK1/2-ERK1/2 pathway represents a pivotal protective mechanism in the heart. ERK1/2 signaling has been reported to confer cardioprotection in vivo against ischemia-reperfusion injury. *Erk2*<sup>+/-</sup> gene-targeted mice showed an increase in infarct area, enhanced apoptotic cell death and reduced left ventricular performance. On the contrary, mice with cardiac-specific overexpression of a constitutively active MAPK kinase 1 (MEK1), the upstream regulator of ERK1/2, were significantly protected from ischemia-reperfusion injury, moreover, MEK1 transgenic mice were reported to develop mild concentric left ventricular hypertrophy associated with enhanced cardiac function without signs of decompensation over time. Though systolic function is clearly affected in these transgenic models, it has not yet been established if ERK1/2 can directly modulate cardiac contractility.

## **1. Aims**

- 1.1 To study the functional significance of PrRP in the myocardium by characterizing its direct effects on cardiac contractility.
- 1.2 To characterize the underlying signaling mechanisms of the cardiac effects of PrRP in the intact rat heart.
- 1.3 To characterize the role of ERK1/2 and the potential upstream regulators and downstream effectors in the regulation of cardiac contractility stimulated by ET-1 in the intact rat heart.
- 1.4 To characterize the role of p38-MAPK and the potential upstream regulators and downstream effectors in the regulation of cardiac contractility stimulated by ET-1 in the intact rat heart.

## **2. ROLE OF PROLACTIN RELEASING PEPTIDE IN THE REGULATION OF CARDIAC CONTRACTILITY**

### **3.1 Backgrounds**

PrRP, the endogenous ligand for the orphan GPCR, hGR3/GPR10 (*Hinuma S. et al., 1998*), has been recently implicated in the central control of cardiovascular function. Microinjection of PrRP into the most caudal ventrolateral medulla oblongata, recognized as the caudal pressor area, elicited dose dependent increases in mean arterial pressure, heart rate, and renal sympathetic nerve activity (*Horiuchi J. et al., 2002*). Specific PrRP binding sites have been found in a number of rat peripheral tissues, with the highest level of binding present in the heart (*Satoh F. et al., 2000*), suggesting that the peptide may play a role in the regulation of cardiac function, however, to date there is no information available regarding the functional significance of PrRP in the myocardium.

### **3.2 Materials and methods**

Drugs used were PrRP-31 (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany); dobutamine (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, Mo); calyculin A, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), okadaic acid, and Ro32-0432 (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK). All protocols were reviewed and approved by the Animal Use and Care Committees of University of Oulu and University of Pécs. Cardiac function was

assessed *ex vivo* in an established isolated rat heart preparation (*Szokodi I. et al., 1998; 2002*). Hearts of male 7-week-old Sprague-Dawley rats (body weight: 260±31 g, n=138) were excised rapidly (wet left ventricular weight: 0.71± 0.13 g), and mounted on a Langendorff perfusion system (LF-01, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary). The hearts were perfused with a modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer. Hearts were perfused at a constant flow rate of 5.5 mL/min with a peristaltic pump (Minipuls 3, model 312, Gilson, Villiers, France). Heart rate was maintained constant (305±1 beats per minute) by atrial pacing using a Grass stimulator (model S88, Grass Instruments, West Warwick, RI) (11 V, 0.5 ms). Contractile force (apicobasal displacement) was obtained by connecting a force displacement transducer (FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI) to the apex of the heart at an initial preload stretch of 2 g. Perfusion pressure reflecting coronary vascular resistance was measured by a pressure transducer (model MP-15, Micron Instruments, Los Angeles, Calif) situated on a side arm of the aortic cannula.

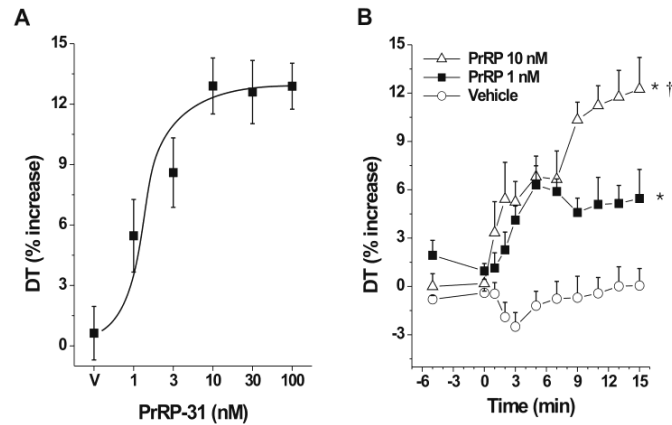
### **3.3. Experimental design**

A 40-minute equilibration period and a 5-minute control period were followed by addition of various drugs to the perfusate for 15 minutes. Initially, we determined the concentration-dependent effect of PrRP-31 (1 to 100 nM) on cardiac contractility. Next, we compared the effect of PrRP to the maximal response to the  $\beta$ -adrenergic agonist dobutamine (10  $\mu$ M). For signal transduction studies, the concentrations of IBMX (10  $\mu$ M) and Ro32-0432 (100 nM) were selected because these concentrations have been demonstrated to suppress the activity of phosphodiesterases (*Bian JS. et al., 2000*) and PKC $\alpha$  (*Hambleton M. et al., 2006*), respectively. Calyculin A blocks both protein phosphatase type 1 (PP1) and type 2A (PP2A) at the dose of 1 nM, whereas 10 nM okadaic acid inhibits only PP2A activity (*Herzig S. et al., 2000*). At the end of the experiments, the left ventricles were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 C° until assayed. Left ventricular tissue was homogenized in lysis buffer containing of 20 mM Tris, (pH 7.5), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, supplemented with 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ g/mL leupeptin, 10  $\mu$ g/mL aprotinin, 2  $\mu$ g/mL pepstatin, 2 mM benzamidine, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 20 mM NaF. Samples (30  $\mu$ g) were loaded onto SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Western blotting was performed with antibodies specific for phospho(Ser16)-phospholamban (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif) and p38 (Cell Signaling Technology Inc., Hitchin, Hertfordshire, UK).

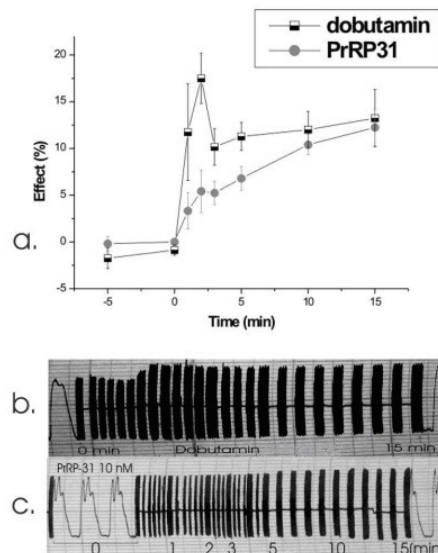
## **3.4. Results**

### **3.4.1. Effect of PrRP on cardiac contractility**

The intracoronary administration of PrRP (1 to 100 nM) for 15 minutes induced a dose-dependent slowly developing positive inotropic effect in the isolated rat heart preparation (Figure 1A). Maximal response to PrRP was observed at the concentration of 10 nM. As shown in Figure 1B, the elevation of developed tension in response to PrRP was gradual and the maximal response occurred approximately at 15 minutes. The time course of the effect of PrRP was markedly different from the rapidly developing, but short-lived effect of the  $\beta$ -adrenergic receptor agonist dobutamine (250 nM) (Figure 2).



**Figure 1. A:** Effect of PrRP-31 (1 to 100 nM) on developed tension (DT) in isolated perfused rat hearts. **B:** Time course of the inotropic effect of PrRP-31. Results are expressed as a percent change versus baseline values. Data were analyzed by 2-way repeated-measures ANOVA followed by multiple comparisons with the Bonferroni post hoc test and are reported as mean±SEM (n=4-6 for each group). \*P<0.05, †P<0.001 vs. control and PrRP (1 nM).



**Figure 2. A:** Dobutamine (250 nM) has short-lived, rapidly developing inotropic effect in contrast to the slowly developing effect of PrRP (10 nM). Data are reported as mean±SEM (n=4-6 for each group). **B and C:** Original recordings of changes in developed tension (DT) in response to dobutamine and PrRP-31.

### 3.4.2. cAMP and PrRP signaling

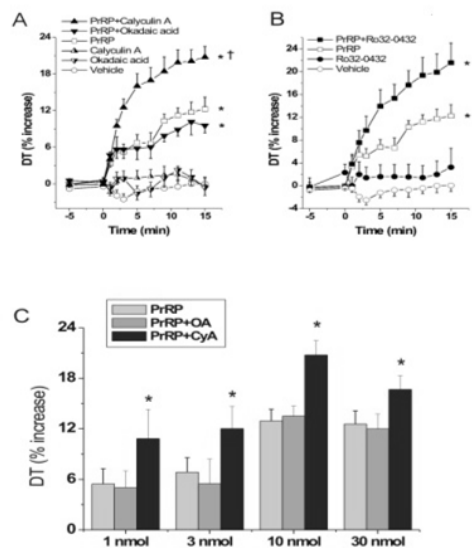
To assess the involvement of the cAMP-PKA pathway in PrRP signaling, we tested whether inhibition of cAMP catabolism by a non-selective phosphodiesterase inhibitor, IBMX, can augment the inotropic action of PrRP. The effect of PrRP (10 nM) on contractility was not affected by IBMX (10 μM) (P=NS), whereas phosphodiesterase inhibition markedly enhanced the inotropic response to dobutamine (250 nM) (P<0.001). These data suggest that PrRP increases contractile force via cAMP-independent mechanisms.

### 3.4.3. Protein phosphatases and PrRP signaling

Reversible phosphorylation of key elements in the contractile machinery plays an important role in regulation of cardiac contractility. Protein kinase-dependent



phosphorylation processes are counterbalanced by dephosphorylating protein phosphatases. To study the contribution of protein phosphatases to PrRP signaling, we used calyculin A and okadaic acid as specific inhibitors. Calyculin A blocks both PP1 and PP2A at the dose of 1 nM, whereas 10 nM okadaic acid inhibits only PP2A activity (*Herzig S. et al., 2000*). When PrRP (10 nM) was infused in the presence of calyculin A, the inotropic effect of the peptide was markedly enhanced ( $P<0.001$ ) (*Figure 3A*). In contrast, okadaic acid failed to alter the response to PrRP ( $P=NS$ ). Notably, the inotropic actions of PrRP at various other doses (1 nM, 3 nM, and 30 nM) were influenced in a similar manner by the PP inhibitors. These data suggest that the inotropic effect of PrRP is suppressed by PP1 but not PP2A.



**Figure 3.** The inotropic effect of PrRP is suppressed by PP1 and PKC $\alpha$ . **A and B:** Effects of calyculin A (1 nM), a PP1/PP2A inhibitor, okadaic acid (10 nM), a PP2A inhibitor (A), and Ro32-0432 (100 nM), a PKC $\alpha$  inhibitor (B) on PrRP-induced (10 nM) inotropic response. Data are mean $\pm$ SEM ( $n=4-8$  for each group). \* $P<0.001$  vs control; † $P<0.001$  vs PrRP (10 nM) (2-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni post hoc test). **C:** The responses of different doses of PrRP with (and without) calyculin A (1 nM) and okadaic acid (10 nM).

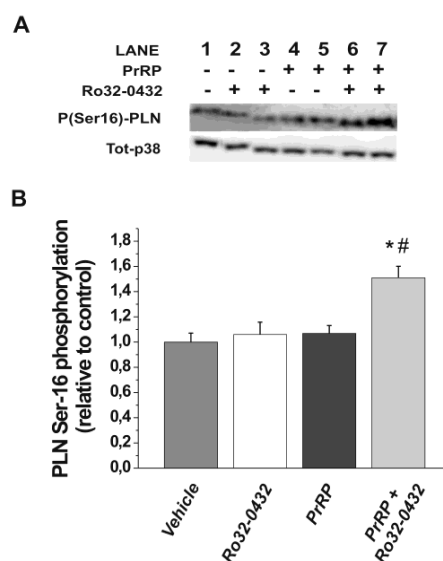
### 3.4.4. Protein kinase C $\alpha$ and PrRP signaling

Overexpression of PKC $\alpha$  in the heart depresses cardiac contractility by increasing PP1 activity (*Braz JC. et al., 2004*), therefore we examined whether PKC $\alpha$  modulates the PrRP-mediated increase in contractile function. As shown in *Figure 3B*, Ro32-0432 (100 nM), a PKC $\alpha$  inhibitor (*Hambleton M. et al., 2006*), significantly increased the inotropic response to PrRP ( $P<0.001$ ). PKC $\alpha$  overexpression has been shown to decrease the phosphorylation of phospholamban, the inhibitory protein for SERCA2a (*Braz JC. et al., 2004*). In agreement, PrRP significantly increased phospholamban phosphorylation at Ser-16 in the presence of Ro32-0432 ( $P<0.01$ ), although the peptide had no effect on its own (*Figure 4*). Our observations indicate that PKC $\alpha$  inhibition may augment the inotropic response to PrRP by enhancing phospholamban phosphorylation in the myocardium.

### 3.5. Conclusions

To our knowledge the present results provide the first evidence for the functional relevance of PrRP in the myocardium. Our data show that PrRP has a direct, dose-

dependent, slowly developing, positive inotropic effect in the intact rat heart. Since the inotropic effect of PrRP was modest, we have hypothesized that it may be suppressed by simultaneous activation of certain counter-regulatory mechanisms.



**Figure 4.** PrRP increases phospholamban (PLN) phosphorylation at Ser-16 in the presence of Ro32-0432. **A:** Representative Western blot analysis. p38 was used as the loading control. **B:** Results in bar graph are mean±SEM (n=3-4 for each group). \*P<0.05 vs control; #P<0.01 vs PrRP (1-way ANOVA with Bonferroni post hoc analysis).

Indeed, the cAMP-independent positive inotropic effect of PrRPs is suppressed by enhanced activity of PKC- $\alpha$  and PP1. Based on these findings, one can anticipate that PrRP may have a hitherto unrecognized role in the regulation of cardiovascular homeostasis.

### 3. ROLE OF ENDOTHELIN-1 IN THE REGULATION OF CARDIAC CONTRACTILITY

#### 4.1 Backgrounds

The members of the MAPK family, ERK1/2 and p38-MAPK, have been implicated in the development of various pathological states such as cardiac hypertrophy and heart failure by controlling cell growth and proliferation (*Bueno OF, Molkentin JD., 2002; Wang Y., 2007*). Cardiac-specific overexpression of a constitutively active MEK1, the upstream regulator of ERK1/2, stimulates concentric left ventricular hypertrophy without signs of progression toward heart failure (*Bueno OF. et al., 2000*). In contrast, prolonged inhibition of p38-MAPK activity in mice expressing dominant-negative mutants of MKK3 or MKK6, the proximal regulatory kinases of p38-MAPK, facilitates progressive left ventricular hypertrophy, leading to dilation and functional decompensation and suggesting an inhibitory function of p38-MAPK on cardiac growth response (*Braz JC. et al., 2003*). In contrast to pathological conditions, the role of MAPKs and EGFR in the regulation of physiological cellular processes in the intact myocardium is not yet well understood. ET-1 is a potent stimulator of cardiac contractility (*Krämer BK. et al., 1991; Wang H. et al., 2000; Chu L. et al., 2003;2004; Kinnunen P. et al., 2000*) acting mainly via the ET<sub>A</sub> GPCR subtype (*Takeuchi Y. et al.,*



2001; Piuhola J. et al., 2003; Zolk O. et al., 2004). Previous studies demonstrated that stimulation of cardiomyocytes with ET-1 produces a robust increase in ERK1/2, p38-MAPK, and EGFR phosphorylation (Bogoyevitch MA. et al., 1993; Sugden PH. et al., 2003; Asakura M. et al., 2002) to date, however, no information is available on whether these signaling pathways are involved in the inotropic response to ET-1. Therefore our objective was to characterize the role of ERK1/2 and p38-MAPK and the potential upstream regulators (eg, EGFR) and downstream effectors of MAPK signaling (eg, Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange, phospholamban) in the regulation of cardiac contractility stimulated by ET-1 in the intact rat heart.

## 4. 2. Materials and methods

Drugs used were ET-1 (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany); AG1478, GF-109203X (bisindolylmaleimide I), LY 294002, ML-7, phorbol 12-myristate 13-acetate, SB239063, U0126 and U-73122 (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK); zoniporide (generously supplied by Dr Ross Tracey, Pfizer Global Research and Development, Groton, Conn). Male 7-week-old Sprague-Dawley rats (n=112) were used. Hearts were excised rapidly, mounted on a Langendorff perfusion system (LF-01, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary), and perfused under constant-flow conditions as described earlier (chapter 3.2).

## 4.3. Experimental design

A 40-minute equilibration period and a 5-minute control period were followed by the addition of various drugs to the perfusate for 10 minutes. The concentrations of U0126 (1.5 µmol/L), SB239063 (3 µmol/L), U-73122 (100 nmol/L), GF-109203X (90 nmol/L), AG1478 (1 µmol/L), and zoniporide (1 µmol/L) were selected because they have been demonstrated to suppress ERK1/2 (Tenhunen O. et al., 2004), p38-MAPK (Tenhunen O. et al., 2004), phospholipase C (PLC), (Szokodi I. et al., 2002; Fulton D. et al., 1996) PKC, (Szokodi I. et al., 2002) and EGFR tyrosine kinase activity (Thomas WG. et al., 2002) and to inhibit Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-1 (NHE1), respectively (Szokodi I. et al., 2002; Knight DR. et al., 2001). At the end of the experiments, the LVs were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until assayed.

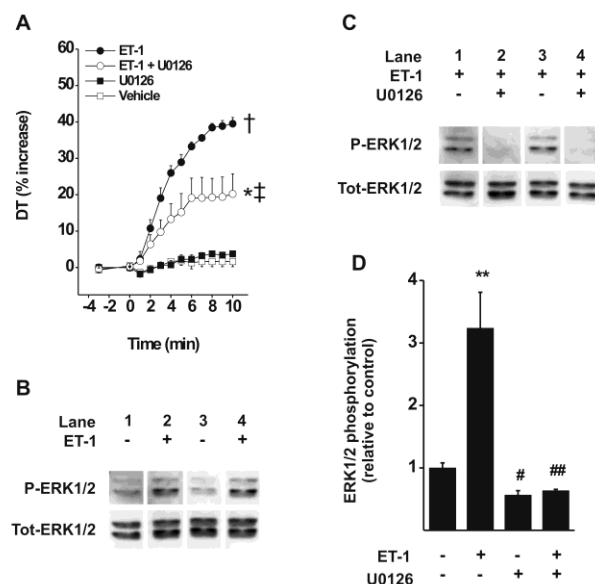
## 4.4. Results

### 4.4.1. Role of ERK1/2 in the Regulation of Cardiac Contractility

In the isolated perfused rat heart preparation, intracoronary infusion of ET-1 (1 nmol/L) for 10 minutes increased developed tension by 40±2% (Figure 5A), which corresponds to the maximal response based on our previous results (Szokodi I. et al., 2002; Kinnunen P. et al., 2000). To determine ERK1/2 activation under our experimental conditions, Western blotting was performed. In agreement with earlier data obtained in cultured neonatal cardiac myocytes (Bogoyevitch MA. et al., 1993; 1994) administration of ET-1 (1 nmol/L) for 10 minutes increased phospho-ERK1/2 levels in isolated perfused adult rat hearts (Figure 5B). To examine whether activation of ERK1/2 contributes to the positive inotropic action of ET-1, we assessed the effect of U0126, which is a potent specific inhibitor of MEK1/2, the upstream regulator of ERK1/2. Administration of U0126 (1.5 µmol/L) significantly reduced the levels of phospho-ERK1/2 in the ET-1-stimulated LVs (Figure 5C and 5D), and U0126 significantly attenuated the inotropic response to ET-1, (P<0.001; Figure 5A). Infusion of U0126 alone had no effect on contractile force (P=1.0; Figure 5A).

#### 4.4.2. Upstream Activators of ERK1/2 Regulating Cardiac Contractility

To study the activation of PKC in the adult rat heart, the translocation of PKC isoforms between cytosolic and particulate fraction was determined. In response to ET-1 infusion, no consistent increases in the translocation of PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , or PKC $\epsilon$  into the particulate fraction were seen in Western analysis. To assess the contribution of PKC to the effects of ET-1, we used the specific PKC inhibitor GF-109203X (*Szokodi I. et al., 2002*). Infusion of GF-109203X (90 nMol/L) had no effect on the ET-1-stimulated increase in phospho-ERK1/2 levels.



**Figure 5.** ERK1/2 signaling is required for the ET-1-mediated increase in contractility. **A:** In isolated rat hearts, infusion of ET-1 (1 nM) for 10 minutes increased developed tension (DT), and U0126 (1.5  $\mu$ M), an MEK1/2 inhibitor, attenuated ET-1-enhanced contractility. Results are expressed as a percentage change versus baseline values. **B through D:** Western blot analysis of ERK1/2 phosphorylation in left ventricles. ET-1 increased phospho-ERK1/2 (P-ERK1/2) levels (B and D), and U0126 abolished ET-1-induced ERK1/2 phosphorylation (C and D). Results in the bar graph are expressed as the ratio of phospho-ERK1/2 and total (Tot) ERK1/2. Data were analyzed by 2-way and 1-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test and are reported as mean $\pm$ SEM ( $n=4$  for each group). \*\* $P<0.01$  vs control; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs ET-1.

Moreover, GF-109203X did not alter ET-1-enhanced contractility ( $P=1.0$ ). In addition, we studied the role of PLC, the upstream activator of PKC. In agreement with the observation obtained using the PKC inhibitor, the potent PLC inhibitor U-7312213 (100 nmol/L) (*Fulton D. et al., 1996; Szokodi I. et al., 2002*) failed to alter the positive inotropic effect of ET-1 ( $P=1.0$ ). These data suggest that ET-1 increases contractile force through a PLC-PKC-independent pathway. Recent studies suggest that GPCR agonists can promote the growth of cardiomyocytes via transactivation of EGFR with subsequent activation of MAPKs (*Thomas WG. et al., 2002*). To examine whether ET-1 transactivates the EGFR, EGFR phosphorylation was measured by immunoprecipitation with anti-EGFR antibody followed by immunoblotting of immunoprecipitates with antiphosphotyrosine antibody. ET-1 increased total tyrosine phosphorylation of EGFR in the left ventricles, indicating EGFR transactivation. ET-1-induced EGFR tyrosine phosphorylation was abolished by AG1478 (1  $\mu$ mol/L), a specific EGFR tyrosine kinase inhibitor. (*Bogoyevitch MA. et al., 1994*) Moreover, AG1478 significantly reduced ET-1-induced ERK1/2 phosphorylation, suggesting that

EGFR transactivation is required for the activation of the ERK1/2 cascade. Furthermore, in the presence of AG1478, the inotropic response to ET-1 was significantly suppressed, the maximal reduction being 46% ( $P < 0.001$ ). Infusion of AG1478 alone had no effect on developed tension ( $P = 1.0$ ).

#### **4.4.3. Downstream Targets of ERK1/2 Regulating Cardiac Contractility**

Several lines of evidence suggest that the sarcolemmal NHE1 is a pivotal mediator of the positive inotropic effect of ET-1 (Krämer BK. *et al.*, 1991). Accordingly, zoniporide (Szokodi I. *et al.*, 2002; Knight DR. *et al.*, 2001) (1  $\mu$ M), a potent and selective inhibitor of NHE1, attenuated the ET-1-induced inotropic response by 57% under our experimental conditions ( $P < 0.001$ ), whereas zoniporide alone had no effect on cardiac contractility ( $P = 1.0$ ; Figure 6A). Previously, it has been shown that ERK1/2 and one of its downstream effectors, p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK), can phosphorylate and activate NHE1 in response to ET-1 in cardiac myocytes. (Moor AN. *et al.*, 1999) As shown in Figure 6B, ET-1 increased the phospho-p90RSK levels in the membrane fraction. Importantly, both U0126 and AG1478 significantly attenuated ET-1-induced phosphorylation of p90RSK (Figure 6C and 6D), suggesting that p90RSK-mediated activation of NHE1 may be the downstream target of the EGFR-ERK1/2 pathway.

#### **4.4.4. Role of p38-MAPK in the Regulation of Cardiac Contractility**

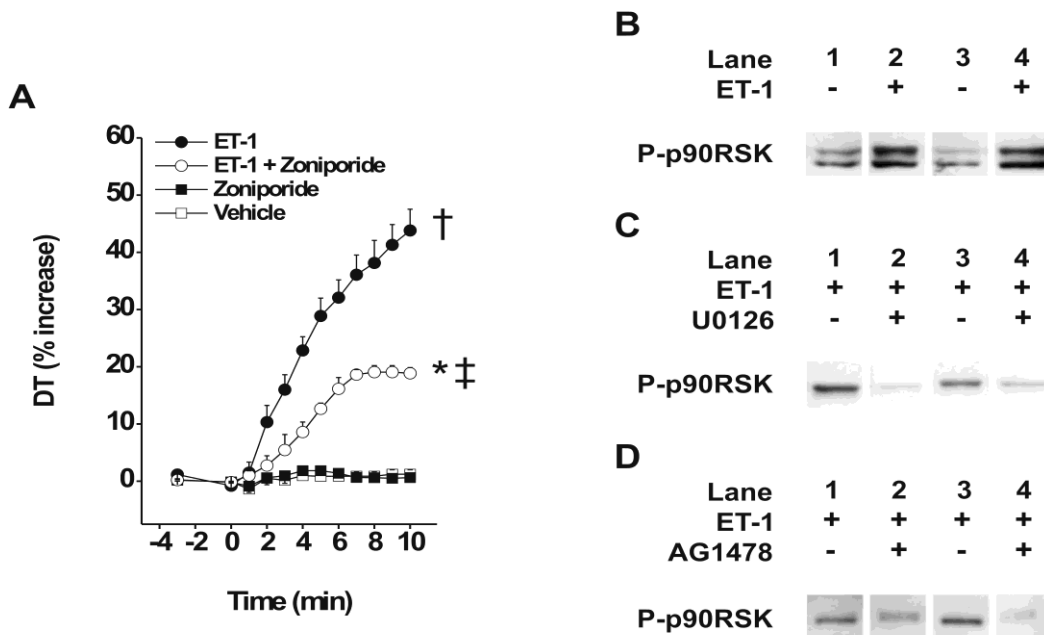
Previously, ET-1 has been shown to produce a robust increase in p38-MAPK phosphorylation in primary cultures of cardiac myocytes. (Clerk A. *et al.*, 1998) In agreement, ET-1 infusion for 10 minutes increased phospho-p38-MAPK levels in isolated perfused adult rat hearts. To assess the involvement of p38-MAPK in the positive inotropic effect of ET-1, we used a novel potent inhibitor, SB239063 (Tenhunen O. *et al.*, 2004) The ET-1-induced increase in p38-MAPK activity in the LV was abolished by SB239063 (3 $\mu$ M). Interestingly, administration of SB239063 augmented the ET-1-induced inotropic response maximally by 42% ( $P < 0.05$ ). Infusion of SB239063 alone had no effect on developed tension ( $P = 1.0$ ).

#### **4.4.5. Cross-Talk Between p38-MAPK and ERK1/2 Signaling**

Inhibition of p38-MAPK by SB239063 had no effect on ET-1-induced ERK1/2 phosphorylation. Similarly, administration of U0126 did not affect phospho-p38-MAPK levels. Interestingly, AG1478 significantly reduced ET-1-induced increases in left ventricular levels of phospho-p38-MAPK in addition to its effect on ERK1/2 phosphorylation. These data suggest that no direct cross-talk exists between ERK1/2 and p38-MAPK signaling. Moreover, EGFR transactivation appears to be involved in the activation of both pathways.

#### **4.4.6. Downstream targets of p38-MAPK regulating cardiac contractility**

Phospholamban is a crucial regulator of cardiac contractility. In its dephosphorylated state, phospholamban binds to and inhibits the activity of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA-2a). Phosphorylation of phospholamban on Ser-16 relieves SERCA-2a inhibition and enhances  $Ca^{2+}$  reuptake into the

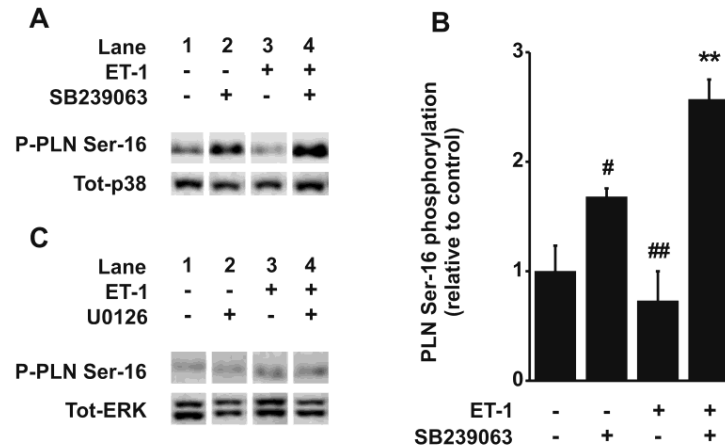


**Figure 6.** NHE1 is involved in the inotropic response to ET-1. **A:** Zoniporide (1  $\mu$ M), an NHE1 inhibitor, attenuated the ET-1- induced increase in contractility. Data are mean $\pm$ SEM ( $n=4-6$  for each group). A significant treatment-by-time interaction ( $P<0.001$ ) was found among the groups (2-way repeated measures ANOVA). \* $P<0.01$ , † $P<0.001$  vs control and U0126; ‡ $P<0.001$  vs ET-1 (Bonferroni posthoc analysis). **B through D:** Western blot analysis for p90RSK phosphorylation (P-p90RSK) in left ventricles. ET-1 increased phospho-p90RSK levels in the membrane fraction (B), which was prevented by U0126 (C) and AG1478 (D). DT indicates developed tension; P, phospho-.

sarcoplasmic reticulum, leading to increased contractility (MacLennan DH. et al, 2003). ET-1 significantly increased phospholamban phosphorylation at Ser-16 in the presence of SB239063, although the peptide had no effect on its own (Figure 7A and 7B). Infusion of SB239063 alone did not increase phospholamban phosphorylation significantly ( $P=0.115$ ; Figure 7B). In addition, U0126 failed to alter the phosphorylation of phospholamban (Figure 7C). These results suggest that p38-MAPK inhibition may enhance the inotropic response to ET-1 by augmenting phospholamban phosphorylation in the myocardium.

#### 4.5. Conclusion

We present evidence for the functional importance of ERK1/2 and p38-MAPK in the acute regulation of cardiac contractility in the intact adult rat heart. Our results reveal that MAPKs play opposing roles in that the ERK1/2-mediated positive inotropic response to ET-1 is counterbalanced by simultaneous activation of p38-MAPK. EGFR may act as the upstream regulator and the p90RSK-NHE1 pathway as the downstream effector of ERK signaling. Moreover, p38-MAPK activation may suppress contractility by dephosphorylating phospholamban.



**Figure 7.** p38-MAPK signaling regulates phospholamban phosphorylation (PLN). **A:** Western blot analysis shows that ET-1 increased phospholamban phosphorylation at Ser-16 in the presence of the p38-MAPK inhibitor SB239063 (3  $\mu$ M). **B:** Results in the bar graph are mean $\pm$ SEM (n=3-5 for each group). \*\*P<0.01 vs control; #P<0.05, and ##P<0.01 vs ET-1 plus SB239063 (1-way ANOVA with Bonferroni post hoc analysis). **C:** U0126 (1.5  $\mu$ M) failed to alter phosphorylation of phospholamban. Tot indicates total; P, phospho-.

## 4. DISCUSSION

### 5.1. Functional importance of PrRP in the myocardium

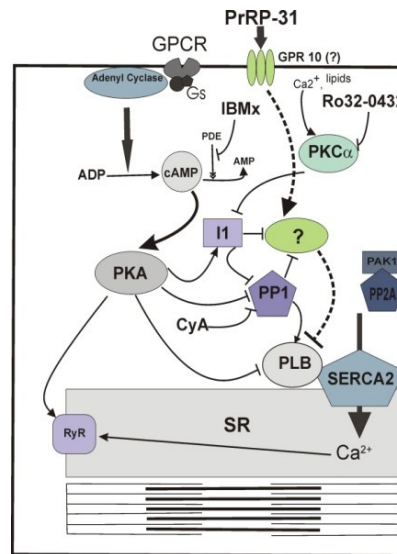
To our knowledge the present results provide the first evidence for the functional significance of PrRP in the myocardium. Our data show that PrRP has a direct, dose-dependent, slowly developing, positive inotropic effect in the intact rat heart. Since the inotropic effect of PrRP was modest, we have hypothesized that it may be suppressed by simultaneous activation of certain counter-regulatory mechanisms. The positive inotropic effect of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor agonist dobutamine was strikingly enhanced by the non-selective phosphodiesterase inhibitor IBMX. In contrast, IBMX failed to augment the contractile effect of PrRP, ruling out the involvement of phosphodiesterases. Moreover, these data argue against a role for the adenylyl cyclase-cAMP-PKA pathway in mediating the inotropic effect of the peptide.

PP1, PP2A and PP2B (calcineurin) are the major serine/threonine phosphatases in the myocardium (*Herzig S., Neumann J., 2000*). High doses of PP inhibitors such as okadaic acid, calyculin A can increase the positive inotropic state by promoting the phosphorylation of phospholamban, troponin I, and myosin light chain without any change in cAMP levels (*Gupta RC. et al., 2002*). In the present study, low doses of calyculin A and okadaic acid had no effect on baseline contractility. Inhibiting PP1 and PP2A activity by calyculin A significantly augmented the inotropic response to PrRP, whereas PP2A inhibition by okadaic acid had no effect. Thus, our results indicate that activation of PP1 but not PP2A can counterbalance the inotropic effect of PrRP.

Although PKC $\alpha$  is emerging as a crucial negative modulator of cardiac function, its role in the acute regulation of contractility in a physiological milieu is unclear. Of particular importance was our finding that Ro32-0432, a PKC $\alpha$  inhibitor (*Hambleton M. et al., 2006*), significantly augmented the inotropic effect of PrRP, implying that activation of PKC $\alpha$  provides a negative feedback to the PrRP-mediated inotropic response. Moreover, our results showed that PrRP promoted the phosphorylation of phospholamban at Ser-16 in the presence of PKC $\alpha$  inhibition. Our data are in



agreement with previous observations that PKC $\alpha$  overexpression decreases the phosphorylation of phospholamban by increasing PP1 activity (*Braz JC. et al., 2004*). Phosphorylation of phospholamban relieves SERCA2a inhibition and enhances Ca<sup>2+</sup> reuptake into the sarcoplasmic reticulum thereby increasing contractility (*MacLennan D., Kranias E., 2003*). Further experiments are needed to clarify whether PrRP modulates myofilament function. Taken together, our results suggest that the cAMP-independent inotropic response to PrRP is suppressed by concurrent activation of PKC $\alpha$  and PP1 leading to dephosphorylation of phospholamban (*Figure 8*). Moreover, these findings raise the possibility that activation of PKC $\alpha$  may have a universal homeostatic function by counterbalancing excess inotropic stimulation in the heart.



**Figure 8.** Putative signaling mechanisms of PrRP in the heart. Stimulation of GPR10 by PrRP evokes a cAMP-independent inotropic response, which is suppressed by concurrent activation of PKC $\alpha$  and PP1 leading to dephosphorylation of phospholamban.

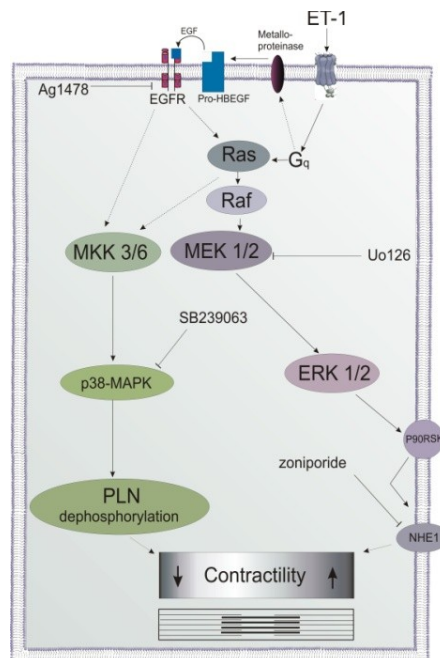
## 5.2. Functional importance of ERK1/2 and p38-MAPK signaling in the acute regulation of cardiac contractility

Our data indicate that PKC is unlikely to mediate the inotropic effect of ET-1 in the intact adult rat heart. GF-109203X, a specific PKC inhibitor, did not attenuate the inotropic response to ET-1, although it markedly reduced the inotropic effect of PMA. Furthermore, pharmacological inhibition of PLC, the upstream regulator of PKC, also failed to alter the inotropic action of ET-1. Of note, GF-109203X and U-73122 significantly attenuated the modest vasoconstrictor effect of ET-1, in line with previous observations (*McNair LL. et al., 2004*), indicating that the inhibitors were effective in our experimental system. In the present study, the GPCR agonist ET-1 produced a rapid increase in left ventricular phospho-ERK1/2 levels, and inhibition of ERK1/2 activation by U0126, a potent MEK1/2 inhibitor, markedly attenuated the ET-1-induced increase in contractile force in the intact rat heart. Hence, our results demonstrate a novel function for MEK1-ERK1/2 signaling whereby it regulates myocardial contractility in addition to influencing cell growth and survival (*Figure 9*). Recent advances indicate that EGFR transactivation is an important pathway that links GPCRs and ERK1/2 activation (*Thomas WG. et al., 2002*). Although some studies have demonstrated the functional importance of the HB-EGF-EGFR pathway in hypertrophic and developmental growth processes, the relationship between EGFR signaling and cardiac contractility remains unknown. In our experiments, ET-1 increased total tyrosine



phosphorylation of EGFR. However, inhibition of EGFR transactivation by the specific EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 was accompanied by significant attenuation of the ET-1-induced increase in phospho-ERK1/2 levels and the inotropic response to ET-1. Thus, the present data define a previously unrecognized role for EGFR in the regulation of myocardial contractility, acting as a proximal component of MEK1/2-ERK1/2 signaling (*Figure 9*). Previous studies suggest that activation of sarcolemmal NHE1 contributes, at least in part, to the positive inotropic effect of ET-1 (*Krämer BK. et al., 1991; Wang H. et al., 2000; Takeuchi Y. et al., 2001; Chu L. et al., 2003; Zolk O. et al., 2004*). Stimulation of NHE1 can lead to intracellular alkalinization and sensitization of cardiac myofilaments to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . On the other hand, NHE1-mediated accumulation of intracellular  $\text{Na}^+$  can indirectly promote a rise in intracellular levels of  $\text{Ca}^{2+}$  via a reverse-mode  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger (*Kentish JC. 1999; Aiello EA. et al., 2005*). In agreement with previous findings, our data showed that zoniporide, a highly selective inhibitor of NHE1, attenuated the inotropic response to ET-1. Maekawa et al have reported recently that expression of a dominant-negative p90RSK abolished oxidative stress-induced activation of NHE1 in cardiomyocytes, providing evidence for the essential role of p90RSK in the regulation of NHE1 activity (*Maekawa N. et al., 2006*). In the present study, ET-1 increased phospho-p90RSK levels in the membrane fraction, and both AG1478 and U0126 attenuated it. Therefore, it is conceivable that membrane-associated p90RSK can mediate the effect of ET-1 on NHE1 activity (*Figure 9*). The finding that ~40% of the ET-1-induced positive inotropic effect remained unaffected after inhibition of the EGFR-ERK1/2-NHE1 pathway indicates the existence of additional signaling mechanisms. Phosphoinositide 3-kinase plays an important role in the positive inotropic effect of insulin (*von Lewinski D. et al., 2005*). However, our preliminary results showed that inhibition of phosphoinositide 3-kinase by LY 294002 (3  $\mu\text{M}$ ) had no effect on ET-1-enhanced contractility ( $45.2 \pm 5.4\%$  versus  $49.7 \pm 5\%$ , ET-1 with and without LY 294002;  $n=5$ ;  $P=1.0$ ). In contrast, ML-7 (1  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of myosin light-chain kinase, significantly reduced the inotropic effect of ET-1 ( $20.7 \pm 1.7\%$  versus  $43.8 \pm 3.7\%$ , ET-1 with and without ML-7;  $n=5$ ;  $P<0.001$ ). These results are in line with previous findings (*Andersen GO. et al., 2002; Chu L. Endoh M., 2004*) and suggest that myosin light-chain kinase is an important mediator of the inotropic effect of ET-1. p38-MAPK signaling has been supposed long to be associated with various pathological conditions in the heart such as hypertrophy, extracellular matrix remodeling and cardiac decompensation [Wang Y, *Circulation.* 2007;116:1413-1423]. However, less information is available regarding the role of p38-MAPK in the regulation of physiological cellular processes in the myocardium. In the present study, ET-1 rapidly increased the activity of p38-MAPK in the intact adult rat heart, and inhibition of the enzyme by its potent inhibitor SB239063 markedly augmented the inotropic response to ET-1, whereas the inhibitor alone failed to alter baseline contractility. These data imply that p38-MAPK has no direct negative effect on contractility in unstressed adult ventricular myocardium, whereas physiological activation of p38-MAPK provides a negative feedback to the ET-1-mediated inotropic response (*Figure 9*). Previously, it has been suggested that p38-MAPK suppresses ERK1/2 signaling by a mechanism involving protein phosphatases in cardiomyocytes (*Liu Q., Hofmann PA. 2004*). However, our results showed that inhibition of p38-MAPK could not further augment ET-1-induced ERK1/2 phosphorylation, ruling out the existence of direct cross-talk between the ERK1/2 and p38-MAPK pathways in the intact heart. Previous observations suggest that p38-MAPK activation may lead to dephosphorylation of phospholamban, a crucial regulator of cardiac contractility. Liu

and Hofmann have shown that adenosine A1 receptor activation can blunt  $\beta$ -adrenergic-stimulated phospholamban phosphorylation in a p38-MAPK-sensitive manner (Liu Q, Hofmann PA. 2004). Of particular importance was our finding that ET-1 promoted the phosphorylation of phospholamban at Ser-16 in the presence of p38-MAPK inhibition. Phosphorylation of phospholamban relieves SERCA2a inhibition and enhances  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake into the sarcoplasmic reticulum. On subsequent beats, contractility is increased in proportion to the elevation in the size of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  store and the resulting increase in  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum (MacLennan DH, Kranias EG, 2003). Therefore, it is tempting to speculate that p38-MAPK may limit increases in contractility via dephosphorylation of phospholamban in the myocardium. Chronic activation of p38 $\alpha$ -MAPK in transgenic MKK6bE hearts has been reported to depress sarcomeric function in association with decreased phosphorylation of  $\alpha$ -tropomyosin and troponin I (Vahebi S. et al, 2007). Further experiments are required to elucidate whether p38-MAPK can modulate myofilament function in the acute setting. Taken together, in the normal heart, the dynamic transient activation of p38-MAPK may have an important homeostatic function by counterbalancing excess inotropic stimulation (Figure 20). Loss of this cardioprotective mechanism during chronic suppression of p38-MAPK signaling may be a pathogenic factor in the progression of heart failure in mice expressing dominant negative mutants of MKK3 or MKK6 (Braz JC. et al, 2003). On the contrary, substantial persistent activation of p38-MAPK signaling also may contribute to the evolution of heart failure by impairing myocardial contractility such as in mice with cardiac-specific expression of MKK3bE or MKK6bE (Liao P. et al, 2001). Therefore, cardiac function may be improved by normalization of upregulated p38-MAPK activity in the diseased heart.



**Figure 9.** The novel theory of signaling mechanisms activated by ET-1. MAPKs play opposing roles in that the ERK1/2-mediated positive inotropic response to ET-1 is counterbalanced by simultaneous activation of p38-MAPK. EGFR may act as the upstream regulator and the p90RSK-NHE1 pathway as the downstream effector of ERK signaling. Moreover, p38-MAPK activation may suppress contractility by dephosphorylating phospholamban (PLN), the inhibitory protein for the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump (SERCA).

## 6. NOVEL FINDINGS

1. We present the first evidence for the functional significance of PrRP, a putative ligand for the GPR10 orphan receptor in the heart.
2. We have shown that PrRP has a direct, dose-dependent, slowly developing, positive inotropic effect.
3. Our results suggest that the cAMP-independent inotropic response to PrRP is suppressed by concurrent activation of PKC $\alpha$  and PP1 leading to dephosphorylation of phospholamban.
4. We present evidence for the functional importance of ERK1/2 and p38-MAPK in the acute regulation of cardiac contractility in the intact adult rat heart.
5. Our results demonstrate that MAPKs play opposing roles in that the ERK1/2-mediated positive inotropic response to ET-1 is counterbalanced by simultaneous activation of p38-MAPK.
6. We have shown that EGFR may act as the upstream regulator and the p90RSK-NHE1 pathway as the downstream effector of ERK signaling.
7. Our data indicate that p38-MAPK activation may suppress contractility by dephosphorylating phospholamban, the inhibitory protein for the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in the intact heart.

*A KONTRAKTILITÁS PEPTIDERG SZABÁLYOZÁSA: A PROLAKTIN-  
RELEASING PEPTID ÉS AZ ENDOTHELIN-1 SZEREPE*

Ph.D. tézis

Írta:

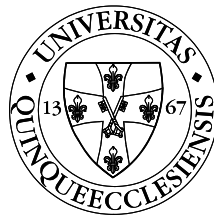
Dr. Kónyi Attila.

Témavezető:

Dr. Szokodi István, Ph.D.

Programvezető:

Prof. Dr. Róth Erzsébet



Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ, Orvostudományi Kar

Szívgyógyászati Klinika

Intervencionális Kardiológiai Osztály

2010

## 1. Bevezetés

A kardiomiociták fő feladata a kontrakció-relaxáció fenntartása. A szívizom kontraktilitását számos rövid és hosszú távú reguláló mechanizmus szabályozza. Az elmúlt években új, a kontraktilitás szabályozásában szerepet játszó peptidreg szabályozó mechanizmusok kerültek felismerésre. Ezen peptidek (adrenomedullin, apelin stb.) hatásukat a guanin nucleotid-kötő reguláló (G) proteinhez kapcsolt receptorokon (GPCR) keresztül fejtik ki, mely receptorok a legnagyobb családját képezik a sejtfelszíni receptoroknak. A GPCR-ok az egyik legfontosabb modulátorai a szervezetben végbemenő élettani folyamatoknak. Kulcs szerepük van a sejtszintű szignál mechanizmusokban, a külvilágból, vagy a szervezeten belüli sejtek felől érkező ingerek felismerésében, továbbításában. Számos ligand kapcsolódik hozzájuk. A GPCR-ok egy protein láncból állnak, mely lánc hétszer keresztezi a sejtmembránt (seven transmembrane proteins-7 TM), tartalmaz egy mag struktúrát extracelluláris aminos csoport véggel (N-terminal tail) és intracelluláris karboxyl-csoport véggel (C-terminal tail). 7 transmembrán spirálból áll, mely 3 extracelluláris, 3 intracelluláris hurkot képez (*Salazar NC, et al., 2007*).

Az emberi genom több mint 800 G proteinhez kapcsolt receptort kódol, talán a legnagyobb gén családot jelenti ez az emberi DNS-ben. A GPCR-ok kezdetben ún. „árva” receptorok voltak, mivel transmitterük ismeretlen volt. A specifikus transmitterek felfedezése (deorfanizáció) jelentette az első fontos lépést funkciójuk megismerése felé. Az elmúlt 20 év alatt különféle technológiákkal a legtöbb GPCR-t sikerült a megfelelő, specifikus ligandjával összekapcsolni. Manapság úgy tartják, hogy a GPCR-ok száma meghaladja a 800-at, melyeknek több mint a fele az olfaktorikus rendszerben található, és kb. 367 található az emberi szervezetben, amely nem kapcsolódik a szaglórendszerhez (*Levoye et al. 2008*). Ezek közül, mintegy 100 GPCR még „árva”, azaz specifikus ligandja, valamint fiziológiás szerepe még nem ismert.

Az elmúlt időszakban párosított peptid ligandok között számosról derült ki, hogy szerepe lehet a kardiovaszkuláris homeosztázis szabályozásában (apelin, ghrelin, urotensin II, urocortin, motilin, neuromedin U, sphingosine-1-foszfát és nociceptin). A G-proteinhez kötött receptor családdhoz tartozik többek között a  $\beta$ -adrenerg, az  $\alpha$ -adrenerg, a muszkarin, angiotenzin, adenozin, valamint a kardiális opioid receptorok. Nagyon valószínű, hogy ezen neurohormonális szignál rendszerek közül sok (ha nem az összes) fontos szerepet játszik nemcsak a kontraktilitás szabályozásában, hanem a szívizomsejtek növekedésének regulálásában is. 1998-ban leírásra került (*Szokodi I. et al., 1996; 1998; Sato A. et al, 1997*), hogy az adrenomedullin a cAMP rendszertől függetlenül, alacsony dózisban is képes fokozni a kontraktilitást. Ugyanebben az évben Tatemoto és munkatársai felfedezték az apelint, mely endogén ligandja az *O'Dowd* és munkatársai által 1993-ban leírt APJ (apelin-angiotensin receptor-like 1) receptornak.

Szintén 1998-ban került felfedezésre egy marha hipotalamusz szövetkultúrából izolált új bioaktív fehérje, mely a GPR 10 (G-protein-coupled receptor 10) receptor lehetséges ligandjaként került leírásra. Mivel ez a fehérje képes stimulálni a prolaktin kibocsátást a hipofízis anterior sejtjeiből, ezért prolaktin releasing peptidnek (PrRP) nevezték el. Hamar kiderült, hogy ezen fehérje több fiziológiás folyamatban is szerepet játszik, úgymint a centrális stressz válaszban, a táplálkozás, alvás regulációjában. Specifikus I<sup>125</sup>-PrRP kötő helyek kerültek patkány szövetekben leírásra. Intracerebro-ventrikularis adagolása során szignifikánsan emelkedett artériás középnyomást észleltek altatott patkányokban. Szintén igazolásra került, hogy a plazmában keringő Ir-PrRP található, de a keringő peptid forrását igazolni nem tudták. Ezen adatok alapján sokan úgy gondolják,

hogy a prolactin releasing peptidnek fontos szerepe lehet a kardiovaszkuláris homeosztázis fenntartásában, szabályozásában, azonban mindez idáig ez a tézis bizonyítást nem nyert.

### ***PKC $\alpha$ , mint új negatív regulátora a kontraktilitásnak***

A protein kináz C (PKC)- ami a szerin/treonin kinázok családjába tartozik- fontos csomópontja számos jelátviteli útnak. A PKC izoenzimeket számos GPCR, illetve növekedési faktor képes aktiválni, és alapvető szerepet játszanak a sejtproliferáció, differenciálódás és az apoptózis szabályozásában. A miokardiumban található PKC izoformák számos sejtszintű folyamatban vesznek részt, például a Ca<sup>2+</sup> szenzitivitás, és a kontraktilitás szabályozásában. Braz és munkatársai közlése alapján ismert, hogy a *PKC $\alpha$*  gén hiányos állapot fokozott szívizom kontraktilitást, míg az enzim transzgenikus overexpressziója kamra diszfunkciót idéz elő. A hiperkontraktilitás, melyet a *PKC $\alpha$*  gén hiányos állapot indukál, képes kivédeni a nyomástúlterhelés miatt kialakuló szívelégtelenséget és a MLP (muscle lim protein) gén hiányos dilatatív kardiomyopathiát egerekben (*Braz J.C. et al., 2004*). Ezzel összhangban a PKC $\alpha$  hosszútávú farmakológiai gátlása Ro-31-8220 antagonistával *MLP*<sup>-/-</sup> egerekben drámaian javítja a balkamra funkciót. A PKC $\alpha$  negatív inotrop hatása az inhibitor-1 fehérje foszforillálásával, ezáltal a protein foszfatáz 1 (PP1) fokozott aktivitásával, valamint következményes megnövekedett foszfolamban defoszforilációval ezáltal SERCA2 aktivitás csökkenéssel magyarázható. A csökkent SERCA2 aktivitás miatt redukálódik a szarkoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup> felvétele, ezáltal csökkent a Ca<sup>2+</sup> kibocsátás a systole alatt, romlik a kontraktilitás. Más, izolált miocitákban végzett vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a PKC $\alpha$  direkt módon képes foszforillálni a kulcsszerepet játszó kontraktilis fehérjéket, ezáltal okozva csökkent összehúzóerőt (*Belin R.J. et al., 2007*). Bár egyre több adat bizonyítja, hogy a PKC $\alpha$  egy negatív modulátora a szívizom funkciónak, fiziológias körülmények között, az akut regulációban betöltött szerepe még nem ismert.

### ***Mitogén aktiválta protein kináz (MAPK), mint a szívizom kontraktilitás új modulátora***

A mitogén aktiválta protein kináz család minden eukarióta sejtben központi szerepet tölt be az intracelluláris jelátviteli folyamatban. A klasszikus MAPK család olyan fontos sejtszintű folyamatokat regulál, mint a sejt növekedés, proliferáció, apoptózis. Az ERK1/2 szignál út főképp a növekedési stimulusok (GPCR agonisták, tirozin kináz receptorok), a JNK és p38-MAPK pedig a fizikai, kémiai stresszorok hatására aktiválódik. A BMK mind a növekedési, mind stressz szignálokra aktiválódhat. Kezdetben a p38-MAPK jelátviteli útról úgy gondolták, hogy fokozza kardiomiociták hipertrofiáját, a GPCR agonistákra (angiotenzin II, endotelin 1) adott válaszreakcióként neonatális kardiomiocita szövetkultúrában. Egerekben a p38-MAPK prolongált gátlását követően nyomás túlterhelés hatására hipertrofia indukálódik, mely azt sugallja, hogy a p38-MAPK-nak negatív modulátor szerepe van a kardiális növekedési válaszban. Az adatok elemzése azt mutatja, hogy a p38-MAPK-nak direkt hatása lehet a kontraktilitás szabályozásában. Egerekben a p38-MAPK jelátviteli út folyamatos aktiválása a MKK3bE vagy MKK6bE kardiospecifikus expressziójával rontja mind systolés, mind a diasztolés funkciót. Patkány kardiomiocitákban az MKK3bE adenovírus gén transzfere által aktivált p38-MAPK szignifikáns kontraktilitás redukciót hoz létre. Bár a p38-MAPK aktivitás krónikus modulációja jól ismert módon befolyásolja a szívizom teljesítményét, a p38-MAPK jelátviteli rendszer szerepe a kontraktilitás fiziológiai szabályozásában, még korántsem egyértelmű. Szemben a MEK3/6-p38-MAPK jelátviteli úttal, a MEK1/2-



ERK1/2 szignál sarkalatos pontja a szívben található protektív mechanizmusoknak. ERK1/2 szignál útvonal az ischemia-reperfúziós károsodás kivédésében játszik fontos szerepet. Az *Erk2<sup>+/-</sup>* génállományú egér kiterjedtebb infarktus területet, növekedett apoptotikus sejtelhalást és csökkent balkamra funkciót mutat. Ezzel szemben, olyan egér, melyben kardio-specifikus overexpresszió miatt következményesen aktivált a MAPK kináz 1 (MEK1)- mely az ERK1/2 megelőző regulátora- szignifikánsan védettebb az ischaemia-reperfúzió okozta károsodástól, sőt a MEK 1 transzgenikus egér esetén növekedett balkamra funkciót észleltek, enyhe fokú koncentrikus balkamra hipertrófiával, melyet dekompenzációs jelek nem kísértek. Bár ezen transzgenikus modellek egyértelműen befolyásolják a systolés funkciót, az, hogy az ERK1/2 direkt képes e szabályozni a kontraktilitást, még nem bizonyított.

## 2. Célkitűzések

- 2.1. Vizsgálatunk célja volt, megállapítani a PrRP funkcionális szerepét a miokardiumban, karakterizálva a peptid direkt szívizom kontraktilitásra gyakorolt hatását.
- 2.2. Megállapítani a PrRP kardiális hatásaiért felelős alapvető szignál mechanizmusokat intakt patkány szívben.
- 2.3. Karakterizálni az ERK1/2 kontraktilitás szabályozásában betöltött szerepét ET-1 hatásban, intakt patkány szívben, valamint jellemezni a lehetséges megelőző regulátorokat és disztális effektorokat.
- 2.4. Igazolni a p38-MAPK szerepét a kontraktilitás szabályozásában, ET-1 stimulálta intakt patkány szívben, és jellemezni a lehetséges megelőző regulátorokat és disztális effektorokat.

## 3. A PROLAKTIN RELEASING PEPTID SZEREPE A KONTRAKTILITÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN

### 3.1 Bevezetés

A prolaktin releasing peptidről, mely a hGR3/GPR10 receptor endogén ligandja (*Hinuma S. et al., 1998*), mostanában egyre több adat jelent meg, miszerint szerepet játszhat a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában. PrRP-nek a kaudális, ventrolaterális nyúltvelői területekre történő mikroinjekciója dózis dependens artériás középnyomás emelkedést, szívfrekvencia növekedést, valamint a renális szimpatikus idegrendszer aktivitás fokozódását idézi elő (*Horiuchi J. et al., 2002*). Számos patkány szövetben sikerült specifikus PrRP kötőhelyeket kimutatni, legnagyobb mennyiségben a miokardiumban, mely azt a feltételezést veti fel, hogy a peptidnek szerepe lehet a kardiovaszkuláris szabályozásban, bár ez idáig egyértelmű bizonyíték nincs a PrRP miokardiumban betöltött szerepéről.

### 3.2 Anyagok és metodika

Felhasznált gyógyszerek: PrRP-31 (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany); dobutamin (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, Mo); calyculin A, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), okadaic acid, and Ro32-0432 (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK). Az összes vizsgálati protokollt áttekintette és engedélyezte az Oului Egyetem és a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Bizottsága. A szívizom funkció vizsgálatát ex vivo izolált szív preparátumokon végeztük (*Szokodi I. et al., 1998; 2002*). A szíveket hím, 7 hetes Sprague-Dawley patkányokból izoláltuk (testsúly: 260±31 g, n=138), gyors kimetszést végeztünk (balkamra súly: 0.71± 0.13 g), majd felhelyeztük Langendorff

perfúziós rendszerre (LF-01, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary). A szíveket módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferrel perfundáltuk. Konstans áramlást biztosítottunk (5.5 mL/min) perisztaltikus pumpa segítségével (Minipuls 3, modell 312, Gilson, Villiers, France). Atriális elektród segítségével ingereltük a szíveket, konstans frekvenciával (305±1/ min) Grass stimulátor segítségével (S88, Grass Instruments, West Warwick, RI) (11 V, 0.5 ms). A kontraktilis erőt (apikobazális elmozdulás) erőmérő segítségével rögzítettük (FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI), az erőmérő horgát a balkamra csúcsába pozicionáltuk, a kezdeti előterhelés 2 g volt. A perfúziós nyomást nyomásmérő transducerrel mértük (MP-15, Micron Instruments, Los Angeles, Calif), a nyomásmérő kanült az aorta kanülbe vezettük.

### 3.3. Kísérleti protokoll

40 perces ekvilibrációs és 5 perces kontroll periódust követően különféle gyógyszereket adagoltunk a perfundáló oldathoz 15 percen keresztül. Kezdetben a PrRP-31 kontraktilitásra kifejtett dózis dependens hatását vizsgáltuk (1-100 nM). Ezt követően összehasonlítottuk a PrRP-31 és a  $\beta$ -adrenerg agonista dobutamin (10  $\mu$ M) kontraktilitásra kifejtett hatását. A szignál mechanizmusok vizsgálata céljából 10  $\mu$ M IBMX-et és 100 nM Ro32-0432-t használtunk, mivel ezen dózisokkal igazoltan gátolható a foszfodiészteráz aktivitása (*Bian JS. et al., 2000*), illetve a PKC $\alpha$  aktivitása (*Hambleton M. et al., 2006*). A calyculin A 1 nM-os dózisban képes blokkolni mind a protein-foszfatáz 1-et (PP1) és a protein foszfatáz 2-t (PP2), míg az okadaik sav 10 nM dózisban csak a PP2A aktivitására hat (*Herzig S. et al., 2000*). A kísérletek befejeztével a balkamrát folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk, és -80 C°-on tároltuk a további feldolgozásig. A balkamrai szövetet lízissel homogenizáltuk (20 mM Tris, (pH 7.5), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ g/mL leupeptin, 10  $\mu$ g/mL aprotinin, 2  $\mu$ g/mL pepstatin, 2 mM benzamidin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) és 20 mM NaF), majd helyeztük SDS-PAGE-re, majd nitrocellulóz membránra. A Western blott vizsgálatokat specifikus foszfo(Ser16)-foszfolamban (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif) elleni ellenanyaggal végeztük.

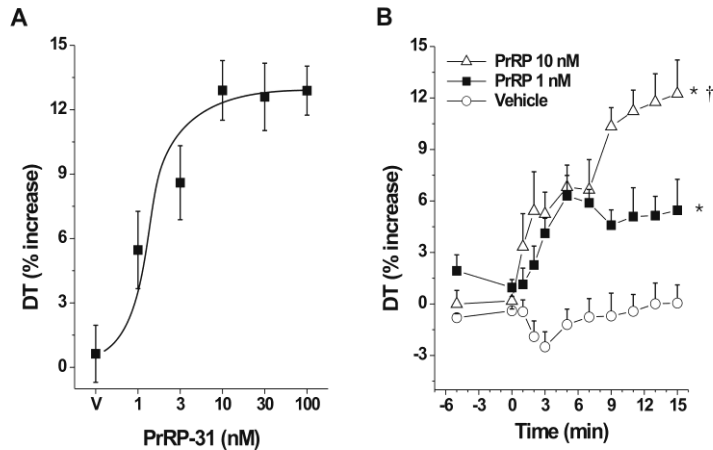
### 3.4. Eredmények

#### 3.4.1. A PrRP hatása a szívizom kontraktilitásra

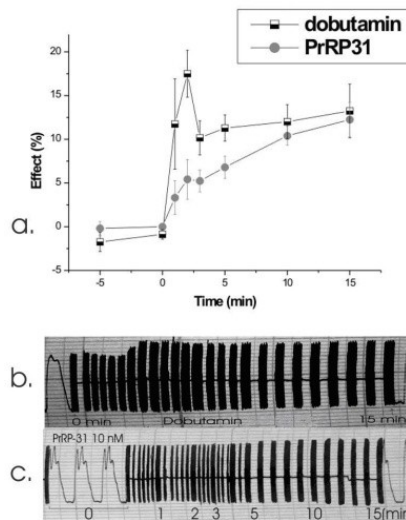
A PrRP-31 (1-100 nM) 15 perces intrakoronáriás adagolása lassan kialakuló, dózis függő pozitív inotrop hatást eredményezett izolált patkányszív preparátumon (1A Ábra). Maximális hatást a 10 nM-os PrRP dózisonál észleltük. Ahogy az 1B ábrán látható a kontraktilitás növekedés lépcsőzetesen alakul ki és a maximális hatás 15 perc körül látható. A PrRP által okozott kontrakciós erő fokozódás időbeni lefolyása teljesen eltérő az igen gyorsan kifejlődő, de rövidebb ideig tartó  $\beta$ -adrenerg agonista dobutamin (250 nM) hatásától (2. Ábra).

#### 3.4.2. cAMP és a PrRP szignál

Azért, hogy tisztázzuk a cAMP-PKA útvonal szerepét a PrRP jelátviteli rendszerében, azt vizsgáltuk, hogy a cAMP katabolizmusát gátló nem szelektív foszfodiészteráz gátló IBMX képes e a peptid inotrop hatását növelni. A PrRP (10 nM) kontraktilitásra gyakorolt hatását az IBMX (10  $\mu$ M) nem befolyásolta ( $P=NS$ ), pedig a foszfodiészteráz gátlás jelentősen növelte a dobutamin (250 nM) inotrop effektusát ( $P<0.001$ ).



**1. Ábra. A:** PrRP-31 hatása (1-100 nM) a kontrakciós erőre (DT) izolált, perfundált patkány szívben. **B:** A PrRP-31 hatásának időbeni lefutása. Az eredmények a kezdeti értékekhez viszonyított százalékos formában láthatóak. Az adatokat ANOVA (2-way repeated-measures) és ezt követően Bonferroni post hoc teszttel analizáltuk, a megjelenített adatok középérték  $\pm$ SEM ( $n=4-6$  minden csoportban) formában láthatók. \* $P<0.05$ , † $P<0.001$  vs. kontroll és PrRPP.



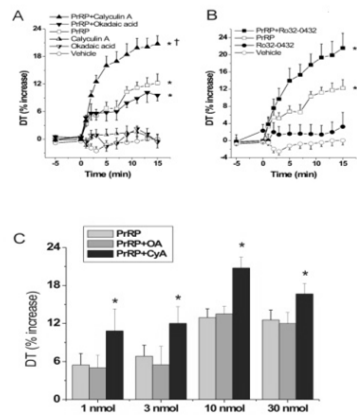
**2. Ábra. A:** A dobutamin (250 nM) hatás rövid életű, gyorsan kifejlődő, szemben a PrRP (10 nM) lassan kialakuló hatásával. A megjelenített adatok középérték  $\pm$ SEM ( $n=4-6$  minden csoportban) formában láthatók. **B és C:** eredeti regisztrátumok, melyek a kontraktilitás (DT) változását mutatják dobutamin és PrRP hatására.

Ezen adatok azt mutatják, hogy a PrRP kontraktilitás növelő hatása a cAMP úttól független mechanizmusokkal jön létre.

### 3.4.3. A protein foszfatázok és a PrRP signál

A reverzibilis foszforiláció kulcs momentuma a szívizom összehúzódásának, és nagyon fontos szerepe van a kontraktilitás szabályozásában. A protein kináz dependens foszforilációt a protein foszfatázok defoszforilációja ellensúlyozza. A protein foszfatázok PrRP szignál mechanizmusában játszott szerepének tisztázására specifikus inhibitorokat calyculin A-t, és okadaik savat használtunk. A calyculin A 1 nM-os dózisban képes blokkolni, mind a PP1-t és a PP2-t, míg az okadaik sav 10 nM-os dózisban csak a PP2-t blokkolja (Herzig S. et al., 2000). Amikor PrRP-t (10nM) adagoltunk calyculin A (1nM) jelenlétében, a peptid inotrop hatása jelentősen növekedett ( $P<0.001$ ) (3A Ábra). Ezzel

szemben az okadaik sav nem befolyásolta a peptid inotrop hatását ( $P=NS$ ). Kiemelendő, hogy a PP gátlás, több PrRP dózis esetén (1 nM, 3 nM, and 30 nM) is hasonló mértékű kontraktilitás fokozódást mutatott. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a PrRP inotrop hatása a PP1 által gátolt, de a folyamatra nincs hatása a PP2 gátlásnak.



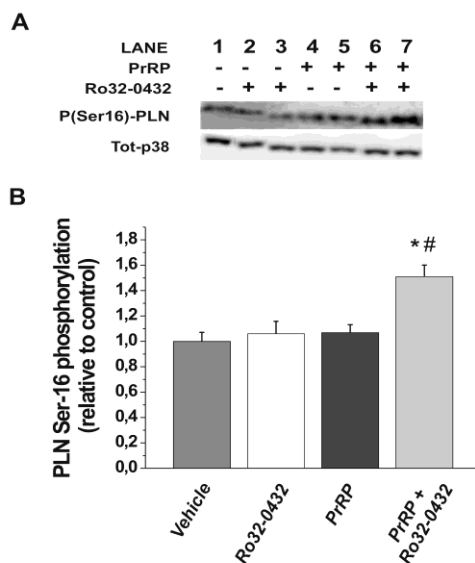
**3. Ábra** A PrRP inotrop hatása a PP1 és a PKC $\alpha$  által gátolt. **A és B:** A calyculin A (1 nM), mely egy PP1/PP2A inhibitor, okadaik sav (10 nM), mely PP2A inhibitor (A), és Ro32-0432 (100 nM), mely egy PKC $\alpha$  inhibitor (B) hatása a PrRP (10nM) által kiváltott inotrop effektusra. Az eredmények a középérték  $\pm$ SEM ( $n=4-8$  minden csoportban) formában láthatók. \* $P<0.001$  vs kontroll; † $P<0.001$  vs PrRP (10 nM) (2-way repeated-measures ANOVA, Bonferroni post hoc teszttel). **C:** különböző dózisu PrRP-re adott válasz calyculin A (1 nM) és okadaik sav(10 nM) jelenlétében.

### 3.4.4. Protein kinase C $\alpha$ és a PrRP szignál folyamatok

A PKC $\alpha$  overexpressziója a szívben a fokozott PP1 aktivitás miatt csökkent kontraktilitással jár (Braz JC. et al., 2004), emiatt kísérleteink további részében azt vizsgáltuk, hogy vajon a PKC $\alpha$  képes e modulálni a PrRP által mediált kontraktilis funkció javulást. Ahogy a 4. ábra B részében látható a Ro32-0432 (100 nM), mely egy PKC $\alpha$  inhibitor (Hambleton M. et al., 2006), szignifikáns mértékben képes növelni a PrRP inotrop effektusát ( $P<0.001$ ). A PKC $\alpha$  overexpressziója csökkenti a foszfolamban (PLN)-a SERCA2a inhibitor fehérjéjének- foszforilációját (Braz JC. et al., 2004). Ezzel összhangban a PrRP szignifikáns mértékben növeli a PLN foszforilációt a Ser-16 helyen Ro32-0432 jelenlétében ( $P<0.01$ ), míg önmagában ha a peptidet adagoljuk, abban az esetben nem növekszik a PLN foszforiláció mértéke (4. Ábra). A megfigyelésünk azt támasztja alá, hogy a PKC $\alpha$  gátlás képes növelni a PrRP inotrop hatását, azáltal, hogy a foszfolamban foszforilációt fokozza a miokardiumban.

### 3.5. Következtetések

Ismereteink szerint eredményeink az első bizonyítékok arra, hogy a PrRP-nek fontos funkcionális szerepe lehet a miokardiumban. Adataink azt mutatják, hogy a PrRP direkt, lassan kialakuló, dózis függő pozitív inotrop hatással bír intakt patkány szívben. Mivel az inotrop hatás önmagában enyhe fokú, azt feltételeztük, hogy bizonyos ellenreguláló folyamatok által supprimált lehet. Kísérleteink valóban igazolták, hogy a PrRP- a cAMP szignál útjától független- inotrop hatása, PKC- $\alpha$  és PP1 által bizonyos mértékben gátolt. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a PrRP ez idáig ismeretlen szerepet tölthet be a kardiovaszkuláris regulációban.



**4. Ábra.** Ro32-0432 jelenlétében a PrRP képes fokozni a PLN foszforilációt a Ser-16 helyen. **A:** Western blot analízis. p38 kontrollként alkalmazva. **B:** Eredmények az oszlop diagrammon, középérték $\pm$ SEM ( $n=3-4$  minden csoportban). \* $P<0.05$  vs kontroll; # $P<0.01$  vs PrRP (1-way ANOVA, Bonferroni post hoc analízissel).

## 4. AZ ENDOTHELIN-1 SZEREPE A KONTRAKTILITÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN

### 4.1 Bevezetés

A MAPK család tagjai, az ERK1/2 és a p38-MAPK számos patológiás folyamatban játszanak szerepet, úgymint a szívizom hipertrófia, szívelégtelenség, azáltal, hogy szabályozzák a sejtnövekedést, valamint a proliferációt (*Bueno OF, Molkentin JD., 2002; Wang Y., 2007*). A MEK-1 (mely az ERK1/2 megelőző regulátora) overexpressziója koncentrikus balkamra hipertrófiát okoz, anélkül, hogy a szívelégtelenségre utaló jelek megjelenjenek (*Bueno OF. et al., 2000*). Ezzel szemben egérben a p38-MAPK aktivitás prolongált gátlása a p38-MAPK proximális regulátor kinázainak az MKK3-nak és MKK6-nak domináns negatív mutánsai expresszáldásával progresszív kamrai hipertrófiát facilitál, kamra dilatációval és funkcionális dekompenzációval. Ez arra utal, hogy a p38-MAPK-nak gátló hatása lehet a kardiális sejtnövekedési válaszra (*Braz JC. et al., 2003*). Ezen patológiás állapotokkal ellentétben a mitogén aktiválta protein kinázoknak és az epidermális növekedési faktor receptornak (EGFR) a szerepe a fiziológiás celluláris folyamatok szabályozásában intakt miokardium esetén még nem tisztázott.

Az endothelin-1 (ET-1) jelentős mértékben képes növelni az ET<sub>A</sub> receptoron keresztül a kontraktilitást (*Krämer BK. et al., 1991; Wang H. et al., 2000; Chu L. et al., 2003;2004; Kinnunen P. et al., 2000*). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a kardiomiociták ET-1-gyel történő stimulációja jelentős mértékben fokozza az ERK1/2, p38-MAPK, és az EGFR foszforilációját (*Bogoyevitch MA. et al., 1993; Sugden PH. et al., 2003; Asakura M. et al., 2002*), de arra korábbi adatok nincsenek, hogy vajon ezen szignál utaknak szerepe van-e az ET-1 inotrop hatásának kialakításában. Ezért célunk a kísérleteink ezen részében az volt, hogy karakterizáljuk az ERK1/2 és p38-MAPK, a potenciális upstream regulátorok (pl: EGFR), és disztális effektorok (pl: Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-1, foszfolamban) szerepét az ET-1 által kiváltott kontraktilitás fokozódás regulációjában, intakt patkányszív esetén.



## 4.2. Anyagok és metodika

Felhasznált gyógyszerek: ET-1 (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany); AG1478, GF-109203X (bisindolylmaleimide I), LY 294002, ML-7, phorbol 12-myristate 13-acetate, SB239063, U0126 and U-73122 (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK); zoniporide (Tracey, Pfizer Global Research and Development, Groton, Conn). Hím 7 hetes Sprague-Dawley patkányt használtunk (n=112). A szíveket gyorsan eltávolítottuk az altatott állatokból, és Langendorff perfúziós rendszerre helyeztük (LF-01, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary), konstans áramlással perfundáltuk, ahogy korábban leírtuk (lásd: 3.2. fejezet)

## 4.3. Kísérleti protokoll

40 perces ekvilibrációs és 5 perces kontroll periódust követően különféle gyógyszereket adagoltunk a perfundáló oldathoz 10 percen keresztül. Az alkalmazott koncentrációk: U0126 (1.5  $\mu\text{mol/L}$ ), SB239063 (3  $\mu\text{mol/L}$ ), U-73122 (100 nmol/L), GF-109203X (90 nmol/L), AG1478 (1  $\mu\text{mol/L}$ ), és zoniporide (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (mivel irodalmi adatok alapján ezen dózisok gátolják az ERK1/2-t (*Tenhunen O. et al., 2004*), a p38-MAPK-t (*Tenhunen O. et al., 2004*), a fosfolipáz C-t (PLC), (*Szokodi I. et al., 2002; Fulton D. et al., 1996*), a PKC-t (*Szokodi I. et al., 2002*), az EGFR tirozin kinázt (*Thomas WG. et al., 2002*) és a Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-1-t (NHE1) (*Szokodi I. et al., 2002; Knight DR. et al., 2001*). A kísérletek befejeztével a mintákat folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk a további feldolgozásig.

## 4.4. Eredmények

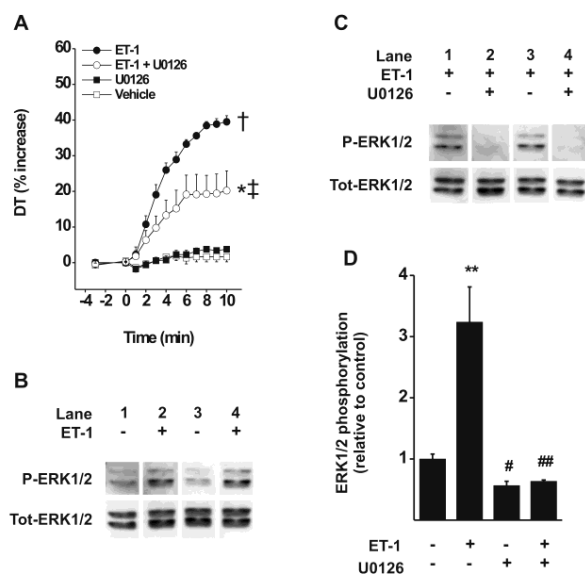
### 4.4.1. Az ERK1/2 szerepe a kontraktilitás szabályozásában

Izolált, perfundált patkányszív preparátumon az ET-1 10 perces ic. infúziója (1 nmol/L) a kontraktilitást 40 $\pm$ 2%-kal növelte (5A. Ábra), megfelelően a korábbi eredményeinknek (*Szokodi I. et al., 2002; Kinnunen P. et al., 2000*). Az ERK1/2 vizsgálatunkban fellépő aktivációjának igazolására Western blottokat készítettünk. A korábbi miocita neonatális szövetkultúrában végzett kísérletekkel összhangban (*Bogoyevitch MA. et al., 1993; 1994*) az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces infúziója növelte a foszfo-ERK1/2 szintet izolált, perfundált felnőtt patkány szívekben (5B Ábra). Igazolandó, hogy az ERK1/2 aktiváció hozzájárul az ET-1 inotrop hatásához, U0126-ot alkalmaztunk, mely az ERK1/2 megelőző regulátorának a MEK1/2-nek potens inhibitora. Az U0126 (1.5  $\mu\text{mol/L}$ ) infundálása szignifikánsan csökkentette az ET-1 inotrop hatását (5A Ábra,  $P < 0.001$ ), valamint a foszfo-ERK1/2 szintet az ET-1 által stimulált balkamrai szövetekben (5C és 5D Ábra). Az U0126 (1.5  $\mu\text{mol/L}$ ) infundálása viszont önmagában nincs hatással a kontraktilitásra (5A Ábra,  $P = 1.0$ )

### 4.4.2. Az ERK1/2 proximáli regulátorainak szerepe a kontraktilitás szabályozásában

A PKC felnőtt patkányszívben történő aktivációjának vizsgálatára a PKC izoformák citoszolikus és partikuláris transzlokációját határoztuk meg. ET-1 infúzió hatására nem találtunk konzisztens növekedést a partikuláris frakció irányába történő transzlokációban a PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , vagy PKC $\epsilon$  esetében a Western blot analízisek során. Hogy meghatározzuk, mennyiben járul hozzá a PKC az ET-1 hatásához, specifikus PKC inhibitorokat alkalmaztunk, a GF-109203X-t (*Szokodi I. et al., 2002*). A GF-109203X (90 nmol/L) infúziójának nem volt hatása az ET-1 által stimulált foszfo-ERK1/2 szintre, sőt nem befolyásolta az ET-1 által kiváltott kontraktilitás fokozódást sem ( $P = 1.0$ ).





**5. Ábra.** ERK1/2 szignál szükséges az ET-1 mediálta kontraktilitás növekedéshez. **A:** Izolált patkány szívben az ET-1 (1 nM) 10 perces infúziója növeli a kontraktilitást (DT), és az U0126 (1.5  $\mu$ M), ami egy MEK1/2 inhibitor, attenuálja az ET-1 hatását. Az eredmények a baseline értékek százalékában láthatóak. **B, C és D:** ERK 1/2 foszforiláció Western blot analízise. ET-1 növeli a foszfo-ERK1/2 (P-ERK1/2) szintet (**B és D**), és az U0126 gátolja ezt. (**C és D**). Az adatok analízise 2 utas és 1 utas ANOVA-val, és Bonferroni posthoc teszttel történt, az adatok középérték $\pm$ SEM (n=4 csoportonként) formában láthatók. \*\*P<0.01 vs kontroll; #P<0.05, ##P<0.01 vs ET-1.

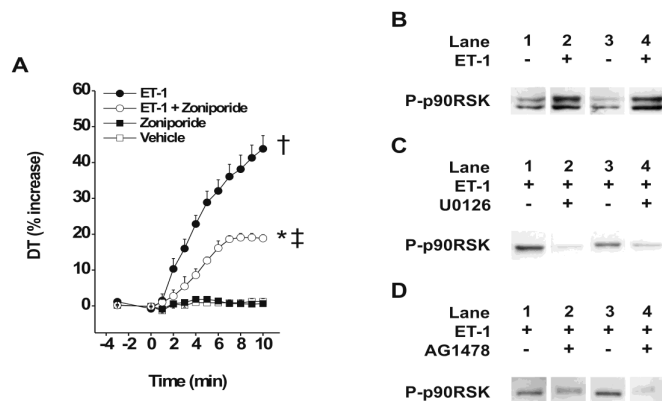
Ezen felül vizsgáltuk a PKC megelőző aktivátorának, a PLC-nek a szerepét is. A PKC inhibitorhoz hasonlóan a potens PLC gátló U-7312213 (100 nmol/L) (Fulton D. et al., 1996; Szokodi I. et al., 2002) sem volt képes befolyásolni az ET-1 hatását (P=1.0). Ezen adatok azt mutatják, hogy az ET-1 kontraktilitás fokozó hatása PLC-PKC független szignál útvonalon történik.

Egyes vizsgálatok azt sejtették, hogy a GPCR agonisták képesek a kardiomiocyták növekedését elősegíteni az EGFR transzaktiváción keresztül, következményes MAPK aktivációval (Thomas WG. et al., 2002). EGFR foszforilációt mértünk anti-EGFR antitest immunblottal, hogy vizsgáljuk vajon az ET-1 transzaktiválja-e az EGFR-t. Az ET-1 fokozta az EGFR totál tirozin foszforilációját, mely az EGFR transzaktivációra utal. Az ET-1 kiváltotta EGFR tirozin foszforiláció az EGFR tirozin kináz inhibitor AG1478-cal (1  $\mu$ mol/L) megszüntethető (Bogoyevitch MA. et al., 1994). Sőt az AG1478 szignifikáns mértékben csökkentette az ET-1 kiváltotta ERK1/2 foszforilációt, amely azt veti fel, hogy az EGFR transzaktiváció szükséges az ERK1/2 kaszkád aktivációjához. Továbbá AG1478 jelenlétében az ET-1 kiváltotta inotrop válasz szignifikáns mértékben szuprimálódott, a maximális csökkenés 46% volt (P<0.001).

#### 4.4.3. Az ERK1/2 által aktivált enzimek szerepe a kontraktilitás szabályozásában

A szarkolemmában található NHE1-ről több vizsgálat adata alapján felmerült, hogy alapvető szerepe lehet az ET-1 inotrop hatásának közvetítésében (Krämer BK. et al., 1991). Ennek megfelelően vizsgálatunkban zoniporidot alkalmaztunk (1  $\mu$ M), mely ismert potens és szelektív NHE1 inhibitor (Szokodi I. et al., 2002; Knight DR. et al., 2001). Kísérleteinkben a zoniporid szignifikáns mértékben, 57%-kal csökkentette az ET-1 inotrop hatását (P<0.001), míg önmagában adva nem volt hatással a kontrakciók erejére

( $P=1.0$ ; 6A *Ábra*). Korábban kimutatták, hogy az ERK1/2 és az egyik általa aktivált enzim a p90 riboszómális S6 kináz (p90RSK) képes foszforillálni és aktiválni ET-1 hatására a NHE1-t miocitákban (Moor AN. *et al.*, 1999). Amint a 7B ábrán látható az ET-1 fokozza a foszfo-p90RSK szintet a membrán frakcióban. Lényeges, hogy mind az U0126 és AG1478 szignifikáns mértékben csökkenti az ET-1 által kiváltott p90RSK foszforilációt (6C és 6D *Ábra*), mely azt veti fel, hogy a p90RSK-mediálta NHE1 aktiváció az EGFR-ERK1/2 szignál folyamat disztális része lehet.



**6. Ábra** NHE1 szerepet játszik az ET-1 által kiváltott inotrop hatásban. **A:** Zoniporid (1  $\mu\text{M}$ ), mely egy NHE1 inhibitor, csökkenti az ET-1- indukálta kontraktilitás fokozódást. Szignifikáns különbséget találtunk a 2 csoport között ( $P<0.001$ ) (2-way repeated measures ANOVA). \* $P<0.01$ , † $P<0.001$  vs kontroll és U0126; ‡ $P<0.001$  vs ET-1 (Bonferroni posthoc analízis). **B, C és D:** p90RSK foszforiláció Western blot analízise. ET-1 kiváltott foszfo-p90RSK szint a membrán frakcióban (B), mely U0126-tal (C) és AG1478-cal (D) kivédhető. DT: kontrakció növekedés; P, foszfo-

#### 4.4.4. A p38-MAPK szerepe a kontraktilitás szabályozásában

Korábban miocita szövetkultúrában kimutatták, hogy az ET-1 jelentős mértékű p38-MAPK foszforilációt indukál (Clerk A. *et al.*, 1998). Ennek megfelelően kísérleteinkben az ET-1 10 perces infúziója izolált, perfundált patkány szívben növelte a foszfo-p38-MAPK szintet. A p-38-MAPK szerepének tisztázására egy új, potens gátlószert, az SB239063-t használtuk (Tenhunen O. *et al.*, 2004). Az ET-1 indukálta p38-MAPK aktivitás SB239063-mal (3 $\mu\text{M}$ ) kivédhető, az SB239063 infúziója az ET-1 indukálta inotrop hatást maximálisan 42%-kal ( $P<0.05$ ) képes növelni, míg az inhibitor önmagában nincs hatással a kontraktilitásra ( $P=1.0$ ).

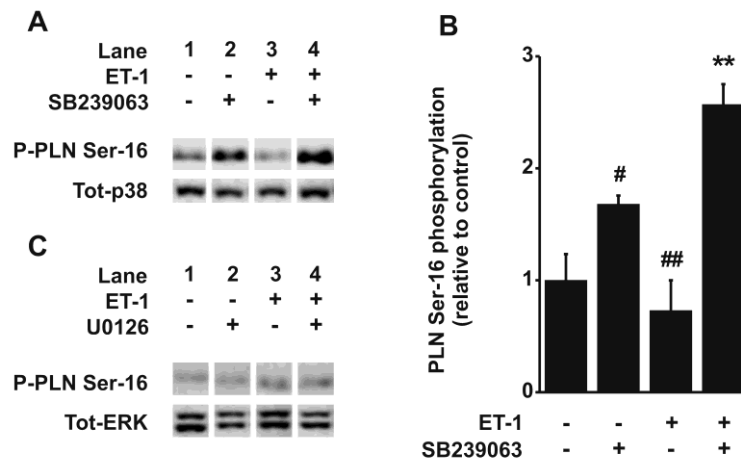
#### 4.4.5. A p38-MAPK és az ERK1/2 szignál út kapcsolódása

A p38-MAPK gátlása SB239063-mal nem befolyásolja az ET-1 indukálta ERK1/2 foszforilációt. Hasonlóan az U0126 nem hat a foszfo-p38-MAPK szintre. Viszont érdekes, hogy az AG1478 szignifikánsan csökkenti az ET-1 hatására kialakuló emelkedett foszfo-p38-MAPK szintet, amellelt, hogy az ERK1/2 foszforilációjára is hatással van. Ezen adatok azt sugallják, hogy nincs direkt kapcsolat az ERK1/2 és a p38-MAPK szignál útjában. Viszont az EGFR transzaktiváció úgy tűnik, mindkét útvonalra hatással van.

#### 4.4.6. A p38-MAPK cél fehérjéinek szerepe ját a kontraktilitás szabályozásában

A foszfolamban a kontraktilitás szabályozásának egyik alapköve. Defoszforillált állapotában magához köti és gátolja a sarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz (SERCA-2a) működését. A PLN Ser-16 helyen történő foszforillálása megszünteti a SERCA-2a

gátlását és fokozza a  $Ca^{2+}$  visszavételt a SR-ba, mely fokozott kontraktilitással jár (MacLennan DH. et al., 2003). Az ET-1 szignifikáns mértékben növeli a PLN foszforilációt a Ser-16 helyen SB239063 jelenlétében (7A Ábra). Az SB239063-nak ( $P=0.115$ ) és az U0126-nak önmagában nincs szignifikáns hatása a PLN foszforilációra (7B/C Ábra). Ezen adatok azt mutatják, hogy a p38-MAPK gátlása növelheti az Et-1 által indukált inotrop hatást, azáltal, hogy a PLN foszforiláció fokozódik a szívizomban.



**7. Ábra.** A p38-MAPK szignál szabályozza a PLN foszforilációt. **A:** A Western blot analízis igazolja, hogy a p38-MAPK gátló SB239063 (3  $\mu$ M) jelenlétében az ET-1 fokozza a PLN foszforilációt a Ser-16 helyen. **B:** Az eredmények oszlop diagrammon, középérték $\pm$ SEM ( $n=3-5$  minden csoportban). \*\* $P<0.01$  vs kontroll; # $P<0.05$ , és ## $P<0.01$  vs ET-1 + SB239063 (1-way ANOVA, Bonferroni post hoc analízissel). **C:** U0126 (1.5  $\mu$ M) nem befolyásolja a PLN foszforilációt. Tot= total; P, foszfo-.

#### 4.5. Konklúzió

Jelen vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az ERK1/2-nek és a p38-MAPK-nak fontos funkcionális szerepe van a kontraktilitás akut szabályozásában felnőtt patkányszívben. Eredményeink felfedték, hogy a MAPK-ok ellentétes szerepet játszanak, abban, hogy az ET-1, ERK1/2 által mediált pozitív inotrop hatása ellenregulálódik a szimultán p38-MAPK aktiváció által. Az EGFR a folyamat proximális regulátora lehet és a p90RSK–NHE1 útvonal a disztális effector szerepét töltheti be az ERK szignál folyamatában. A p38-MAPK aktiváció a kontraktilitást supprimálhatja a PLN defoszforilációjával.

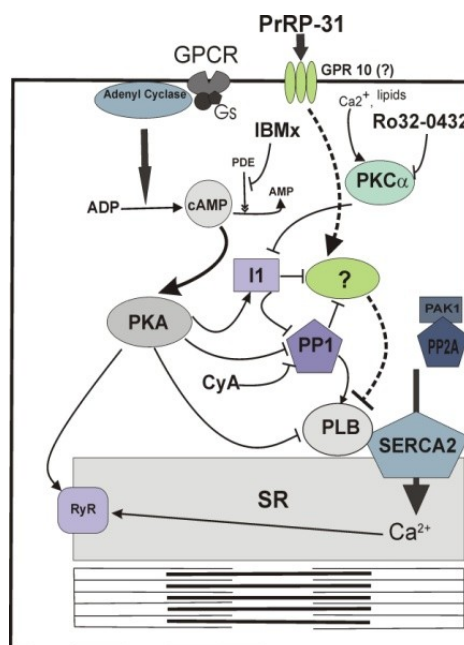
### 5. MEGBESZÉLÉS

#### 5.1. A PrRP funkcionális szerepe a miokardiumban

Ismereteink szerint jelen vizsgálatunk az első bizonyítéka annak, hogy a PrRP-nek fontos funkcionális szerepe lehet a miokardiumban. Adataink alapján a PrRP-nek direkt, lassan kifejlődő pozitív inotrop hatása van, intakt patkány szívből. Mivel a peptid inotrop hatása önmagában nem volt jelentős, ezért feltételeztük szimultán fellépő ellenreguláló folyamat jelenlétét. A  $\beta_1$ -adrenerg agonista dobutamin hatását jelentős mértékben lehet fokozni egyidejű non-szelektív foszfodiészteráz gátló IBMX infundálásával. Ezzel szemben a PrRP inotrop hatását nem befolyásolta az IBMX, ami azt mutatja, hogy a foszfodiészteráznak nincs szerepe a peptid szignál útvonalában, sőt azt támasztja alá, hogy nem az adenil-cikláz-cAMP útvonal mediálja a PrRP inotrop effektusát. A protein-foszfátáz 1, 2A és 2B (calcineurin) a legfontosabb szerin/treonin foszfátázok a miokardiumban (Herzig S., Neumann J., 2000). Nagy dózisban adott PP

gátló szerek, mint a calyculin A, vagy okadaik sav a PLN, a troponin I, valamint a miozin könnyűlánc foszforilációjának növelésével képesek az inotropiát fokozni anélkül, hogy a cAMP szintre hatással lennének (Gupta RC. et al., 2002). Kísérleteinkben alacsony dózisban alkalmaztunk PP inhibitorokat (calyculin A, okadaic sav), melyeknek így önmagukban nincs hatásuk a kontraktilitásra. A PP1 és PP2A calyculin A-val történő gátlása szignifikánsan növelte a PrRP inotrop effektusát, míg az okadaik sav esetén nem találtunk változást. Ezek alapján joggal feltételezhető, hogy a PrRP inotrop hatását ellenreguláló egyik folyamat a PP1 aktiváció, és nem a PP2A hatása.

A PKC $\alpha$ -val kapcsolatban már régóta felmerült, hogy a szívizom funkció negatív modulátora lehet, azonban fiziológias körülmények között, az akut szabályozásban betöltött szerepe nem ismert. Vizsgálataink egyik érdekes adata, hogy a Ro32-0432, ami egy PKC $\alpha$  inhibitor (Hambleton M. et al., 2006), szignifikáns mértékben növelte a PrRP inotrop hatását, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a PKC $\alpha$  aktivációja negatív feedback mechanizmusként működik a PrRP inotrop effektusa kapcsán. Emellett igazolódott, hogy PKC $\alpha$  gátlószer jelenlétében a PrRP szignifikáns mértékben növelte a PLN foszforilációját a szerin16 helyen. Ezen megfigyelésünk összhangban van azzal a korábban közölt adattal, miszerint a PKC $\alpha$  overexpressziója a PP1 aktivitás növelése révén csökkenti a PLN foszforilációját (Braz JC. et al., 2004). A PLN foszforiláció, mint ismert megszünteti a SERCA2a gátlását, ezáltal növekszik a Ca<sup>2+</sup> visszaáramlás a SR-ba, ezáltal növekszik a kontraktilitás (MacLennan D., Kranias E., 2003). További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a PrRP miképpen befolyásolja a miofilamentumok működését. Összességében azt mondhatjuk, hogy eredményeink alapján a PrRP cAMP-től független inotrop hatása PKC $\alpha$  és PP1 által gátolt, mely gátlás a PLN defoszforillált állapotához vezet (8. Ábra). Ezen felül megállapíthatjuk, hogy a PKC $\alpha$  aktivációja az általános homeosztázis fenntartásában is szerepet játszhat az excesszív inotrop hatások kivédése által.



**8. Ábra** A PrRP lehetséges szignál mechanizmusa szívizomsejtben. A GPR10 stimulációja -a PrRP által- kivált egy a cAMP-től független inotrop választ, mely egy szimultán aktiválódó ellenreguláló folyamatotokat indít el, a PKC $\alpha$  és PP1 aktiváció a PLN defoszforilációjához vezet.

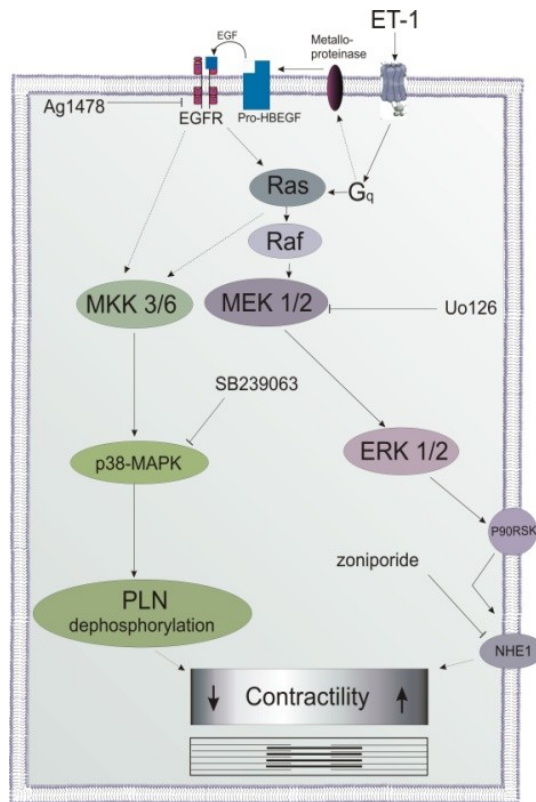
## 5.2. Az ERK1/2 és a p38-MAPK szignál szerepe a kontraktilitás akut regulációjában

Eredményeink azt mutatják, hogy az ET-1 inotrop hatását valószínűleg a PKC nem mediálja intakt patkány szívében. A specifikus PKC gátló GF-109203X nem befolyásolta az ET-1 kiváltotta inotrop hatást, bár a PMA inotrop effektusát jelentősen csökkentette. Továbbá a PLC- mely proximális regulátora a PKC-nak- gyógyszeres gátlása szintén nem befolyásolta az ET-1 kontraktilitás fokozó hatását. Megjegyzendő, hogy a GF-109203X és az U-73122 kísérleteinkben szignifikánsan gyengítette az ET-1 vazokonstriktor hatását más vizsgálatokkal összhangban (*McNair LL. et al., 2004*), ami azt mutatja, hogy a kísérleteinkben használt inhibitorok effektívek. Vizsgálatunkban a GPCR agonista ET-1 rapidan növelte a bal kamrai szövetben a foszfo-ERK1/2 szintet, és az ERK1/2 aktivációjának gátlása U0126-tal (mely egy potens MEK1/2 gátló) jelentősen csökkentette az ET-1 kiváltotta kontraktilitás növekedést intakt patkány szívében. Eredményeink bizonyították a MEK1-ERK1/2 szignál folyamat új funkcióját, miszerint a sejt növekedés és túlélés mellett szabályozza a szívizom kontraktilitást is (9. Ábra). Vizsgálataink rámutatnak arra is, hogy az EGFR transzaktiváció egy rendkívül fontos jelátviteli út, mely összeköti a GPCR és az ERK1/2 aktivációt (*Thomas WG. et al., 2002*). Bár néhány vizsgálat igazolta a HB-EGF-EGFR útvonal szerepét hipertrófiás modellekben, de az EGFR szignál és a kontraktilitás közötti kapcsolatra utaló adatokkal nem rendelkezünk. Kísérleteinkben az ET-1 növelte az EGFR tirozin foszforilációját. Az EGFR transzaktivációjának specifikus tirozin-kinázzal (AG1478) történő gátlása pedig együtt járt az ET-1 indukálta foszfo-ERK1/2 szint csökkenéssel és a csökkent ET-1 kiváltotta inotrop válasszal. Ezen adataink az EGFR, mint a MEK1/2-ERK1/2 szignál folyamat megelőző komponense, eddig nem ismert szerepét igazolják a miokardiális kontrakció regulációjában (10. Ábra). Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy a szarkolemmában lévő NHE1 aktivációja, ha csak részben is de részt vesz az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében (*Krämer BK. et al., 1991; Wang H. et al., 2000; Takeuchi Y. et al., 2001; Chu L. et al., 2003; Zolk O. et al., 2004*). Az NHE1 stimulációja intracelluláris alkalizációhoz és a miofilamentumok Ca<sup>2+</sup> szenzitizációjához vezet. Másrészt a NHE1 mediálta intracelluláris Na<sup>+</sup> akkumuláció indirekt módon növeli az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintet a reverz módban működő Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchangeren keresztül (*Kentish JC. 1999; Aiello EA. et al., 2005*). Ezzel összhangban eredményeink azt mutatják, hogy a zoniporide, mely egy erősen szelektív NHE1 inhibitor, csökkenteni képes az ET-1 indukálta kontraktilitás növekedést. Maekawa és munkatársai nemrég közölték, hogy a domináns negatív p90RSK mutáns expressziója megszünteti a az oxidatív stressz indukálta NHE1 aktivációt kardiomiocitákban, igazolva ezzel a p90RSK alapvető szerepét a NHE1 aktivitás szabályozásában (*Maekawa N. et al., 2006*). Jelen vizsgálatunkban az ET-1 növelte a foszfo-p90RSK szintet a membrán frakcióban, valamint mind az AG1478 és az U0126 is csökkentette azt. Ezért érthető, hogy a membránban található p90RSK az Nhe1-en keresztül képes mediálni az ET-1 hatását (10. Ábra). Emellett viszont azt találtuk, hogy mintegy 40%-a az ET-1 indukálta pozitív inotrop hatásnak az EGFR-ERK1/2-NHE1 jelátviteli út gátlása mellett is megmaradt, mely egyéb szignálút létét feltételezi. A foszfoinozítid 3-kináz az insulin pozitív inotrop szerepének kialakításában fontos szerepet játszik (*von Lewinski D. et al., 2005*). Kezdeti eredményeink viszont azt mutatják, hogy a foszfoinozítid 3-kináz gátlása LY 294002-vel (3 µM) nincs hatással az ET1 indukálta kontraktilitás növekedésre (45.2±5.4% v. 49.7±5%, ET-1 LY 294002-vel és nélkül; n=5; P=1.0). ezzel szemben az ML-7 (1 µM), mely egy miozin könnyű-lánc kináz inhibitor, szignifikáns mértékben csökkentette az ET-1 inotrop hatását (20.7±1.7% v. 43.8±3.7%, ET-1 ML-7-tel és nélkül; n=5; P<0.001). Ezek az eredmények összecsengenek



a korábbi adatokkal (*Andersen GO. et al., 2002; Chu L. Endoh M., 2004*) és azt sugallják, hogy a miozin könnyű-lánc kináz fontos szerepet játszik az ET-1 inotrop effektusában. A p38-MAPK jelátviteli út aktivációja számos kardiális patológiás állapotban szerepet játszik, úgymint a hipertrófia, remodelling, dekompenzáció (*Wang Y., et al 2007*). Viszont kevés adat áll rendelkezésre a p38-MAPK szerepéről a szívizomban fiziológiás kondíciók között. Jelen kísérleteinkben az ET-1 rapidan növelte a p38-MAPK aktivitást, és a gátlása SB239063-mal, mely potens inhibitora az enzimnek, erőteljesen növelte az ET-1 inotrop hatását, míg a gátlószernak önmagában nem volt hatása a kontraktilitásra. Ezen adatok azt is jelentik, hogy a p38-MAPK-nak nincs direkt negatív hatása a kontraktilitásra stressz mentes körülmények között, felnőtt miokardiumban, azonban fiziológiás aktivációja negatív feedback mechanizmusként működik ET-1 kiváltotta inotrop hatás esetén (10. Ábra). Korábban feltételezték, hogy a p38-MAPK a protein foszfatázok segítségével supprimálja az ERK1/2 szignál folyamatát kardiomiocitákban (*Liu Q., Hofmann PA. 2004*). Adataink azt mutatták, hogy a p38-MAPK gátlása nem növelte tovább az ET-1 kiváltotta ERK1/2 foszforilációt, kizárva ezáltal annak a lehetőségét, hogy direkt kapcsolat lenne az ERK1/2 és a p38-MAPK útvonal között intakt szívben. Korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a p38-MAPK aktiváció a PLN defoszforilációjához vezet. Liu és Hofmann kimutatták, hogy az adozin A1 receptor aktiváció tompítani képes a  $\beta$ -adrenerg stimulálta foszfolamban foszforilációt p38-MAPK szenzitív módban (*Liu Q., Hofmann PA. 2004*). A mi vizsgálatunkban az egyik fontos megfigyelés az volt, hogy az ET-1 a PLN foszforilációt növelte Ser-16 helyen p38-MAPK gátlás jelenlétében. A foszfolamban foszforiláció megszünteti a SERCA2a gátlását és fokozza a  $Ca^{2+}$  visszavételt a szarkoplazmatikus retikulumba. A szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  raktárának mennyisége alapján proporcionálisan növekszik a kontraktilitás (*MacLennan DH., Kranias EG., 2003*). Kézenfekvő magyarázat, hogy a p38-MAPK képes lehet a kontraktilitás növekedést limitálni a PLN defoszforilációjával. Transzgenikus MKK6bE szíveken a p38-MAPK krónikus aktivációja csökkent szarkomer funkcióval és  $\alpha$ -tropomiozin és troponin foszforiláció csökkenéssel jár (*Vahebi S. et al., 2007*). További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy vajon a p38-MAPK képes-e modulálni akutan a miofilamentum funkciót. Mindent összevetve, normál szívben a p38-MAPK dinamikus tranzienst aktivációjának igen jelentős funkciója lehet a homeosztázis fenntartásában, azáltal, hogy ellensúlyozza az excesszív inotrop stimulációt (9. Ábra). A p38-MAPK szignál krónikus szupressziója okán fellépő kardioprotektív mechanizmusok elvesztése patogenikus faktora lehet a szívelégtelenség fokozódásának MKK3 vagy MKK6 domináns negatív mutáns egerben (*Braz JC. et al., 2003*). Ezzel ellátben a p38-MAPK szignál jelentős perzisztens aktivációja szintén hozzájárulhat szívelégtelenség kifejlődéséhez a romló kontraktilitás miatt, mint egerek esetén MKK3bE vagy MKK6bE szívspecifikus expressziójával (*Liao P. et al., 2001*). Ezért a szívfunkció a p38-MAPK aktivitás upregulációjának normalizálódásával javulhat a károsodott szívben.





**9. Ábra** Az ET-1 kiváltotta szignál mechanizmus új teóriája. A MAPK-ok ellentétes szerepet játszanak azáltal, hogy az ET-1 ERK1/2 által mediálta pozitív inotrop hatását ellensúlyozzák a p38-MAPK szimultán aktiválásával. Az EGFR megelőző regulátor szerepét töltheti be és a p90RSK–NHE1 útvonal a disztális effektor lehet az ERK szignál folyamatában. Ezen felül a p38-MAPK aktiváció szuprimálhatja a kontraktilitást azáltal, hogy defoszforillálja a foszfolambant (PLN), mely a szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  pumpa gátló fehérjeje.

## 6. ÚJ EREDMÉNYEK

1. Elsőként igazoltuk a PrRP funkcionális szerepét, mely peptid a szívben található GPR10 „árva” receptor lehetséges ligandja.
2. Bemutattuk, hogy a PrRP-nek direkt, lassan kialakuló pozitív inotrop hatása van.
3. Vizsgálati eredményeink azt mutatták, hogy a PrRP cAMP független inotrop hatása a  $PKC\alpha$  és a PP1 szimultán aktivációja által szuprimált. Ezen ellenreguláló mechanizmusok a foszfolamban defoszforillációját okozzák.
4. Igazoltuk, hogy az ERK1/2-nek és a p38-MAPK-nak funkcionális szerepe van a kontraktilitás akut regulációjában intakt felnőtt patkány szívben.
5. Eredményeink azt mutatták, hogy a MAPK-ok ellentétes szerepet játszanak azáltal, hogy az ET-1 ERK1/2 által mediálta pozitív inotrop hatását ellensúlyozzák a p38-MAPK szimultán aktiválásával.
6. Bemutattuk, hogy az EGFR megelőző regulátorként, a p90RSK–NHE1 útvonal disztális effektorként szerepet játszik az ERK szignál folyamatában.
7. Adataink szerint a p38-MAPK aktiváció szuprimálhatja a kontraktilitást azáltal, hogy defoszforillálja a foszfolambant (PLN), mely a szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  pumpa gátló fehérjeje.

## 7. LIST OF ABBREVIATIONS/RÖVIDÍTÉSEK

|                |  |
|----------------|--|
| AC.....        | Adenylyl cyclase                                     |
| APJ.....       | Apelin receptor-angiotension receptor-like 1         |
| BMK.....       | Big mitogen-activated protein kinase                 |
| cAMP.....      | cyclic adenosine monophosphate                       |
| GFP.....       | Green fluorescent protein                            |
| DAG.....       | Diacylglycerol                                       |
| DT.....        | Developed tension                                    |
| EGFR.....      | Epidermal growth factor receptor                     |
| ERK1/2.....    | Extracellular signal-regulated protein kinase 1/2    |
| ET-1.....      | Endothelin-1   |
| GPCR.....      | G protein-coupled receptor                           |
| IBMX.....      | 3-Isobutyl-1- methylxanthine                         |
| IP3.....       | Inositol trisphosphate                               |
| JNK.....       | c-Jun N-terminal kinase                              |
| KACH.....      | Acetylcholine sensitive potassium channel            |
| LTD4.....      | Leukotriene D4                                       |
| MAPK .....     | Mitogen-activated protein kinase                     |
| MEK.....       | MAPK kinase 1  |
| MKK3.....      | MAPK kinase 3  |
| MKK6.....      | MAPK kinase 6  |
| MLP.....       | Muscle lim protein                                   |
| NHE1.....      | Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> exchanger-1          |
| NPAF.....      | Neuropeptide AF                                      |
| 5-oxo-ETE..... | 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid                |
| PDE.....       | Phosphodiesterase                                    |
| PLN.....       | Phospholamban  |
| PLC.....       | Phospholipase C                                      |
| PKA.....       | Protein kinase A                                     |
| PKC.....       | Protein kinase C                                     |
| nPKC.....      | Novel protein kinase C                               |
| PP.....        | Protein phosphatase                                  |
| PrRP.....      | Prolactin-releasing peptide                          |
| p90RSK.....    | p90 ribosomal S6 kinase                              |
| QRFP.....      | Pyroglutamylated arginine-phenylalanineamide peptide |
| RyR.....       | Ryanodine receptor                                   |
| SERCA.....     | Sarcoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase-2    |
| SR.....        | Sarcoplasmic reticulum                               |
| 7TMP.....      | Seven transmembrane protein                          |

## 8. PUBLICATIONS/ KÖZLEMÉNYEK

(Cumulative IF: publications: 26.759; with abstracts: 61.006)

### 8.1 PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS/ TÉZISHEZ TATOZÓ PUBLIKÁCIÓ

#### 8.1.1 Full papers/ Cikkek

*Szokodi I, Kerkelä R, Kubin AM, Sármán B, Pikkarainen S, Kónyi A, Horváth IG, Papp L, Tóth M, Skoumal R, Ruskoaho H. Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility. CIRCULATION. 2008; 118(16): 1651-1658. IF: 14.595*

*Kónyi A, Skoumal R, Kubin AM, Füredi G, Perjés A, Farkasfalvi K, Sárszegi Z, Horkay F, Horváth IG, Tóth M, Ruskoaho H, Szokodi I. Prolactin-releasing peptide regulates cardiac contractility. REGUL PEPT. 2010; 159(1-3):9-13. IF: 2.276*

#### 8.1.2. Abstracts/ Absztraktok

*Kónyi A, Skoumal R, Kubin A-M, Horváth I.G, Tóth M, Papp L, Ruskoaho H, Szokodi I. Prolactin-releasing peptide, the novel endogenous ligand of the orphan receptor GPR10, regulates cardiac contractility. American Heart Association. Scientific Sessions. Orlando, USA. 2007 (CIRCULATION. 2007;116(16):II 61) IF: 12.755*

*Kónyi A, Skoumal R, Kerkela R, Kubin.A, Füredi G, Horváth I,Tóth M, Ruskoaho H, Szokodi I.: P38 mitogen-activated protein kinase regulates cardiac contractility via dephosphorylation of phospholamban in the isolated rat heart. Cardiologia Hungarica 2008; 38: B17.*

*Szokodi I, Kubin A, Skoumal R, Kónyi A, Gieszer B, Tóth M, Ruskoaho H. Endothelin-1 regulates cardiac contractility via NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the isolated rat heart. Cardiologia Hungarica 2007; 37: A29.*

*Kónyi A, Skoumal R, Kubin A, Horváth I, Papp L, Ruskoaho H, Szokodi I. Functional significance of prolactin releasing peptide (PrRP) in the rat heart. Cardiologia Hungarica 2007; 37: A21.*

### 8.2. OTHER PUBLICATIONS/ EGYÉB PUBLIKÁCIÓ

#### 8.2.1. Full papers/ Cikkek

*Vorobcsuk A, Kónyi A, Aradi D, Horváth IG, Ungi I, Louvard Y, Komócsi A. Transradial Versus Transfemoral Percutaneous Coronary Intervention in Acute Myocardial Infarction. Systematic Overview and Meta-Analysis. AM HEART J. 2009; 158(5):814-21. IF: 4.285*

*Aradi D, Kónyi A, Vorobcsuk A, Pintér T, Lenkey Z, Horváth IG, Komócsi A.: Low platelet disaggregation predicts poor response to 150 mg clopidogrel in patients with elevated platelet reactivity. ANGIOLOGY. 2008; 59(2):172-8. IF: 2.271*

*Komócsi A, Simor T, Tóth L, Szabados S, Mágel F, Pintér T, Aradi D, Kónyi A, Horváth IG, Papp L.* Magnetic resonance studies in management of adult cases with Bland-White-Garland syndrome. *INTERN J CARD.* 2007; 123 (1): E8-E11. **IF: 2,234**

*Komócsi A, Tahin T, Pintér T, Kónyi A, Habon L, Jáksó K, Horváth I, Papp L.* Koronária-intervención átesett betegek tromboticaaggregáció-gátló kezelése aggregometriás vizsgálatok fényében. *Cardiologica Hungarica* 2005; 35 : 1–6

*Hejmel L, Kónyi A, Horváth I, Papp L.* Az ischaemiás szívbetegség komplex invazív kezelése. *Cardiologica Hungarica* 2001/4: 4, 265-268

*Sárosi I, Debreczeni G., Mühl D., Kónyi A., Bogár L., Tekeres M., Tóth K., Habon T., Czopf L., Zámbo K., Schmidt E.,* Comperative assessment of verapamil and bisoprolol in the secondary prevention of myocardial infarction. *Cardiovasc Drug Ther* 1997; (11. Suppl.) **IF: 1.098**

*Sárosi I, Tekeres M., Debreczeni G., Kónyi A., Szabó A., Farkasfalvi K., Batthány I., Horváth L.* Életmentő thrombolysis- a kontraindikációk tükrében. *Orv. Hetil* 1997;138.49: 3105-3109

### **8.2.2. Abstracts/ Absztraktok**

*Aradi D, Kónyi A, Palinkas L, Berki T, Pinter T, Tahin T, Horvath I, Papp L, Komocsi A.* Efficacy of thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. (TCT2006) *Am J Cardiol* 2006; **98**:(8,Suppl.1)S200-S207 Abstract No. 517. **IF: 3.015**

*Aradi D., Pinter T, Kónyi A, Tahin T, Horvath I, Papp L, Komocsi A.* Efficacy of thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. (ESC 2006) *Eur H J* 2006;27(Suppl):750. Abstract NoP4558. **IF: 7.286**

*D. Aradi, T. Pinter, I. Horvath, A. Kónyi, A. Komocsi.* Low response to thienopyridine therapy after stent implantation is associated with the need for target vessel revascularization in elective but not in acute coronary syndrome patients. (ESC2007) *Eur Heart J Suppl.* 2007;28: 497-723. Abstract No. P4005. **IF: 7.286**

*Aradi D, Horváth I, Pintér T, Kónyi A, Komócsi A.* Low Platelet Disaggregation Predicts Impaired Response to High Maintenance Dose of Clopidogrel in Patients with High Post-Clopidogrel Platelet Reactivity. (TCT2008) *Am J Cardiol* 2008; 102(8): Suppl. Abstract No.: P45. **IF: 3.905**

*Komócsi A, Pintér T, Tahin T, Kónyi A, Habon L, Horváth I.* Enquiry for the causes of acute coronary stent thrombosis . *Cardiologia Hungarica* 2005; 35: A56.

*Pintér T, Kónyi A, Habon L, Tahin T, Horváth I, Komócsi A.* Impact of gender, diabetes and urgency to the efficacy of anti-platelet therapy after stent implantation. *Cardiologia Hungarica* 2005; 35: A58

*Kónyi A, Pintér T, Aradi D, Horváth I.* :Should fractional flow reserve be measured in all patients with CAD? *Cardiologia Hungarica* 2006; 36: A49.

Aradi D, Pintér T, Horváth I, Kovács E, Magyari B, **Kónyi A**, Komócsi A. The impact of diabetes mellitus on the efficacy of combined antiplatelet therapy after coronary stent implantation. *Cardiologia Hungarica* 2007; 37:A33

Pintér T, Aradi D, Magyari B, Kovács E, **Kónyi A**, Horváth I, Komócsi A. The role of aggregometry in patients with stent thrombosis. *Cardiologia Hungarica* 2007; 37: A49

Aradi D., Pintér T., **Kónyi A.**, Horváth I., Kovács E., Magyari B., Komócsi A. 150 mg maintenance dose of clopidogrel is effective in reducing the incidence of high residual platelet reactivity after percutaneous coronary intervention. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38:B36.

Magyari B., Horváth I., **Kónyi A.**, Komócsi A., Pintér T., Kovács E., Aradi D., Papp L.: Changes in the drug eluting stent utilization after the ESC 2006. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38: B61

Pintér T, Aradi D, Komócsi A, Kovács E, **Kónyi A**, Magyari B, Horváth I, Burzotta F, Dudek D: PIHRATE (Polish-Italian-Hungarian randomized thrombectomy trial) tanulmány eredményei. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38: B86.

Kovács E., Komócsi A., **Kónyi A.**, Pintér T., Aradi D., Magyari B., Horváth I.: Examination of the learning-curve effect of the on-site closure system on patients after coronary angiography from femoral approach. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38: B59

Komócsi A, Vorobcsuk A, Ungi I, Aradi D, Horváth IG, **Kónyi A.**: Transradial PCI in acute myocardial infarction – systematic review of literature and meta-analysis. *Cardiologia Hugarica* 2009; 39: A1.

### **8.2.3. Book/ Könyv**

Komócsi-Ungi-**Kónyi**. Szívkatéterezés artéria radialis behatolásból. Akadémiai Kiadó. 2009

## **9. REFERENCES/ IRODALOMJEGYZÉK**

-Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A, Deng A, Eichhorn J, Mahajan R, Agrawal R, Greve J, Robbins R, Patterson AJ, Bernstein D, Quertermous T. The endogenous peptide apelin potentially improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res.* 2005;65(1):73-82

-Bian JS, Zhang WM, Pei JM, Wong TM. The role of phosphodiesterase in mediating the effect of protein kinase C on cyclic AMP accumulation upon kappa-opioid receptor stimulation in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:1065-70.

-Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1994;269: 1110–1119.

-Böhm M, Brückner R, Schäfer H, Schmitz W, Scholz H. Inhibition of the effects of adenosine on force of contraction and the slow calcium inward current by pertussis toxin is associated with myocardial lesions. *Cardiovasc Res.* 1988 ;22(2):87-94.

-Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T,

- Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, Hewett TE, Molkentin JD. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest.* 2003;111:1475-1486.
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD. PKC $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity towards heart failure. *Nat Med.* 2004; 10:248-54.
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 2000;19:6341- 6350.)
- Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res.* 2002;91:776-781.
- Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell.* 1991;65(1):175-187.
- Bunzow, J.R. et al. (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336, 783-787.
- Civelli O, Nothacker H, Saito Y, Wang Z, Lin SH, Reinscheid RK. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 230-237.
- Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol.* 1998;142:523-535.
- Colecraft HM, Egamino JP, Sharma VK, Sheu S. Signaling mechanisms underlying muscarinic receptor-mediated increase in contraction rate in cultured heart cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(48):32158-66.
- Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 ; 31(8):1429-34.
- Dempsey, E.D., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., Messing, R.O. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279, L429-L438.
- Dougherty C, Barucha J, Schofield PR, Jacobson KA, Liang BT. Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A1 or A3 receptor. *FASEB J.* 1998; 12(15):1785-92.
- Douglass, J., Civelli, O., & Herbert, E. Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Ann Rev Biochem* 1984; 53, 665-715.
- duBell WH, Rogers TB. Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca<sup>2+</sup> current in mouse cardiac myocytes. *J Physiol.* 2004 ;556(Pt 1):79-93.
- Farkasfalvi K, Stagg MA, Coppen SR, Siedlecka U, Lee J, Soppa GK, Marczin N, Szokodi I, Yacoub MH, Terracciano CM. Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 15;357(4):889-95.
- Fleisch JH, Flacke W, Gillis RA.J. Nicotinic and muscarinic receptors in the cardiac sympathetic ganglia of the dog. *Pharmacol Exp Ther.* 1969; 168(1):106-15.
- Fulton D, McGiff JC, Quilley J. Role of phospholipase C and phospholipase A2 in the nitric oxide-induced vasodilator effect of bradykinin in the rat perfused heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278:518 -526.



- Giuliani S, Tramontana M, Lecci A, Maggi CA. Effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 1997 ;333(2-3):177-9.
- Hambleton M, Hahn H, Pleger ST, Kuhn MC, Klevitsky R, Carr AN, Kimball TF, Hewett TE, Dorn 2nd GW, Koch WJ, Molkentin JD. Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase C alpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation* 2006;114:574-82.
- Hambleton M, York A, Sargent MA, Kaiser RA, Lorenz JN, Robbins J, Molkentin JD. Inducible and myocyte-specific inhibition of PKCalpha enhances cardiac contractility and protects against infarction-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(6):H3768-71.
- Hartzell HC. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog Biophys Mol Biol.* 1988;52(3):165-247.
- Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 2000;80:173-210.
- Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature.* 1998;393:272-276
- Horiuchi J, Saigusa T, Sugiyama N, Kanba S, Nishida Y, Sato Y, Hinuma S, Arita J. Effects of prolactin-releasing peptide microinjection into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats. *Brain Res* 2002;958:201-209.
- Horn, F., Vriend, G. and Cohen, F.E. Collecting and harvesting biological data: the GPCR DB and Nuclear DB information systems. *Nucleic Acids Res.*, 2001; 29, 346-349.
- Johnsen DD, Kacimi R, Anderson BE, Thomas TA, Said S, Gerdes AM. Protein kinase C isozymes in hypertension and hypertrophy: insight from SHHF rat hearts. *Mol Cell Biochem.* 2005; 270: 63-69.
- Kinnunen P, Szokodi I, Nicholls MG, Ruskoaho H. Impact of NO on ET-1-and AM-induced inotropic responses: potentiation by combined administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:R569-R575.
- Knight DR, Smith AH, Flynn DM, MacAndrew JT, Ellery SS, Kong JX, Marala RB, Wester RT, Guzman-Perez A, Hill RJ, Magee WP, Tracey WR. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297: 254-259.
- Krämer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes: role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Circ Res.* 1991;68:269 -279.
- Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem.* 2000;74:34-41.
- Lefkowitz, R.J. and Shenoy, S.K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 2005; 308, 512-51
- Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Jockers R. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep.* 2006 ;7(11):1094-8.
- Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, Wang Y. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12283-12288.
- MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:566 -577.

- Maekawa N, Abe J, Shishido T, Itoh S, Ding B, Sharma VK, Sheu SS, Blaxall BC, Berk BC. Inhibiting p90 ribosomal S6 kinase prevents Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-mediated cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2006;113:2516–2523.
- Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Fujino M, Inoue K. Prolactin-releasing peptide as a novel stress mediator in the central nervous system. *Endocrinology*. 2001 May;142(5):2032-8.
- Matsumoto H, Murakami Y, Horikoshi Y, Noguchi J, Habata Y, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M. Distribution and characterization of immunoreactive prolactin-releasing peptide (PrRP) in rat tissue and plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257(2):264-8.
- Moor AN, Fliegel L. Protein kinase-mediated regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Biol Chem*. 1999; 274:22985–22992.
- Moravec CS, Reynolds EE, Stewart RW, Bond M. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 ;159(1): 14-8
- Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regul Pept*. 2003;114(2-3):71-7.
- Nakamura A, Fujita M, Shiomi H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia *Br J Pharmacol*. 1996 Feb;117(3):407-412.
- Nanmoku T, Takekoshi K, Fukuda T, Ishii K, Isobe K, Kawakami Y. Stimulation of catecholamine biosynthesis via the PKC pathway by prolactin-releasing peptide in PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Endocrinol*. 2005;186(1):233-9.
- Nishida K, Yamaguchi O, Hirotsu S, Hikoso S, Higuchi Y, Watanabe T, Takeda T, Osuka S, Morita T, Kondoh G, Uno Y, Kashiwase K, Taniike M, Nakai A, Matsumura Y, Miyazaki J, Sudo T, Hongo K, Kusakari Y, Kurihara S, Chien KR, Takeda J, Hori M, Otsu K. p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol*. 2004;24:10611–10620.
- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*. 1993; 136:355–360.
- Oh da, Y. Cellular and molecular biology of orphan G protein-coupled receptors. *Int. Rev. Cytol*. 2006; 252, 163–218
- Pihola J, Mäkinen M, Szokodi I, Ruskoaho H. Dual role of endothelin-1 via ETA and ETB receptors in regulation of cardiac contractile function in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285:H112–H118.
- Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkenin JD. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14074 –14079.
- Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*. 2005; 31(2):151-74.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92, 573– 585.
- Salazar NC, Chen J, Rockman HA. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(4):1006–1018.
- Samson WK, Resch ZT, Murphy TC. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res* 2000;858:19– 25.

- Satoh F, Smith DM, Gardiner JV, Mahmoodi M, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding sites in the rat-evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle. *Br J Pharmacol.* 2000; 129(8):1787-93.
- Solaro RJ. Multiplex kinase signaling modifies cardiac function at the level of sarcomeric proteins. *J Biol Chem.* 2008; 283(40):26829-33. Epub 2008 Jun 19.
- Sugden PH. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:871-886.
- Sumandea MP, Pyle WG, Kobayashi T, de Tombe PP, Solaro RJ. Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T. *J Biol Chem.* 2003; 278(37):35135-44.
- Sun B, Fujiwara K, Adachi S, Inoue K. Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regul Pept.* 2005;126 (1-2):27-33.
- Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piihola J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res.* 2002; 91:434-440.
- Szokodi, I., Kinnunen, P., Ruskoaho, H.: Inotropic effect of adrenomedullin in the isolated perfused rat heart. *Acta Physiol. Scand.* 1996.156, 151-152.
- Szokodi, I., Kinnunen, P., Tavi, P., Weckstrom, M., Toth, M., Ruskoaho, H. Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation* 1998; 97, 1062-1070.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251:471-476.
- Tenhunen O, Sárman B, Kerkelä R, Szokodi I, Papp L, Tóth M, Ruskoaho H. Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart. *J Biol Chem.* 2004;279: 24852-24860.
- Thomas WG, Brandenburger Y, Autelitano DJ, Pham T, Qian H, Hannan RD. Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res.* 2002;90:135-142.
- Vahebi S, Ota A, Li M, Warren CM, de Tombe PP, Wang Y, Solaro RJ. p38-MAPK induced dephosphorylation of alpha-tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity. *Circ Res.* 2007;100:408-415
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2003; 100, 4903-4908.
- Wang H, Sakurai K, Endoh M. Pharmacological analysis by HOE642 and KB-R9032 of the role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the endothelin-1-induced Ca<sup>2+</sup> signalling in rabbit ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 2000;131: 638-644.
- Wright SP, Doughty RN, Frampton CM, Gamble GD, Yandle TG, Richards AM. Plasma urocortin 1 in human heart failure. *Circ Heart Fail.* 2009; 2(5):465-71.
- Xiang Y, Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science.* 2003; 300(5625):1530-2.
- Zheng M, Zhang SJ, Zhu WZ, Ziman B, Kobilka B, Xiao RP.  $\beta_2$ -Adrenergic receptor-induced p38-MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by G<sub>i</sub> or G $\beta\gamma$  in adult mouse cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:40635-40640.
- Zolk O, Münzel F, Eschenhagen T. Effects of chronic endothelin-1 stimulation on cardiac myocyte contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286:H1248-H1257.