

Válasz Dr. Papp Zoltán egyetemi tanár, az MTA doktora, opponensi bírálatára

Szeretném megköszönni Papp Zoltán Professzor Úrnak doktori értekezésem pozitív bírálatát és értékes kérdéseit.

A feltett kérdésekre válaszaim a következők:

1. kérdés

Opponensem kérdései a koszorúér-keringés és a szívizom-kontraktilitás esetleges interakcióira vonatkoztak. Izolált egérszíven, a Gregg-effektus hatásmechanizmusát vizsgáló kísérleteinkben a koronáriaáramlás 2 mL/percről 5 mL/percre történő emelése során a perfúziós nyomás 32 ± 1 Hgmm-ről 99 ± 5 Hgmm-re nőtt, miközben a kontrakciós erő $80 \pm 12\%$ -kal fokozódott (az értekezés 53B. ábrája). Kimutattuk, hogy az endothelin-1 (ET-1) ET_A -receptorainak gátlása $\approx 60\%$ -kal csökkentette az áramlás fokozására adott kontraktilis választ (az értekezés 54B. ábrája), ami arra utal, hogy feltehetőleg az endotheliumból felszabaduló endogén ET-1 jelentős szerepet játszik a Gregg-effektus kiváltásában. Ehhez viszonyítva az állandó koronáriaáramlás mellett végzett kísérleteinkben a kardiokinek minimális hatást gyakoroltak a koszorúér-tónusra, miközben jelentős mértékben fokozták a kamrai kontraktilitást. Az adrenomedullin (AM) és az apelin enyhe vazodilatációt okozott, míg az ET-1 enyhe vazokonstriktor hatást váltott ki, a PrRP nem befolyásolta a perfúziós nyomást. Fontos megjegyezni, hogy az egyes alkalmazott farmakológiai gátlószerek kontraktilitásra illetve értónusra kifejtett hatásainak elemzésekor nem találtunk konzisztens változásokat. Az inhibitorok zöme jelentősen csökkentette/növelte a kardiokinek inotrop hatását, míg a vaszkuláris effektusok nem módosultak. Bizonyos kísérletekben ennek az ellenkezőjét tapasztaltuk, például az ET-1 kontraktilitást növelő hatását nem befolyásolta a PLC–PKC kaskád gátlása, míg a peptid által kiváltott vazokonstriktio szignifikánsan csökkent (Szokodi és mtsai, 2008). Más kísérleteinkben az ET-1 pozitív inotrop hatását markánsan, egymással összevethető mértékben fokozta az NO-szintetáz illetve a p38-MAPK gátlása, ugyanakkor csak az előbbi növelte szignifikánsan a peptid vazokonstriktor effektusát (Kinnunen és mtsai, 2000; Szokodi és mtsai, 2008). Megjegyzendő továbbá, hogy az NO-szintetáz gátlása eltérő dinamikával befolyásolta a kontraktilitást (Kinnunen és mtsai, 2000) és a vaszkuláris tónust (Kinnunen és mtsai, 2001), emiatt valószínűtlen, hogy a kontraktilitásra kifejtett hatás másodlagosan, a perfúziós nyomás változása miatt (Gregg-hatás) lépett volna fel.

Kísérleteinkben nem vizsgáltuk, hogy a kardiokinek esetlegesen befolyásolják-e az ödéma képződést izolált szíveken.

Nem ismerjük a pontos okát annak, hogy az apelin hatás felépülésének dinamikája mi miatt tér el izolált szíven illetve izolált sejteken. Felmerült bennünk, hogy izolált szíven az apelin effektusa az érendothelium és a szívizomsejtek interakciója révén jön létre. Ezen szcenárió szerint, az apelin hatására, az endotheliumból felszabaduló egyes faktorok, váltják ki a szívizomsejtek kontraktilitásának fokozódását. Számos potenciális mediátor szerepét vizsgáltuk, mint az ET-1, az angiotenzin II és az NO, azonban e faktorok nem vesznek részt az apelin inotrop hatásának közvetítésében (Szokodi és mtsai, 2002).

2. kérdés

Bírálóm következő kérdése arra vonatkozott, hogy az AM overexpresszió esetében tapasztalt $PKC\epsilon$ és $PKC\delta$ transzlokáció reprodukálható-e exogén AM adását követően. Első megközelítésben 30 perces AM infúzió után vizsgáltuk izolált szívek bal kamrai szövetmintáin a PKC izoformák transzlokációját, azonban nem tapasztaltunk konzisztens változást egyik izoforma esetében sem (nem közölt eredmények). Az AM-hoz hasonlóan, az exogén apelin inotrop effektusát is erőteljesen csökkentette a farmakológiai PKC gátlás izolált szíven. Egy módosított extrakciós eljárás használata mellett, apelin hatására szignifikáns $PKC\epsilon$ transzlokációt detektáltunk egy korai időpontban (5 perc), azonban tartósabb apelin stimulációt követően (10 perc) már nem volt ez az effektus észlelhető (Perjés és mtsai, 2014). Ezen eredmények fényében az exogén AM hatását a PKC aktivációra a jövőben több időpontban kívánjuk vizsgálni, a fokozottabb érzékenységgű módszer használata mellett.

3. kérdés

Opponensem következő kérdése arra irányult, hogy mi magyarázhatja azt az észlelésünket, hogy az apelin izoproterenolhoz viszonyított inotrop hatása eltérő volt izolált szíveken és izolált szívizomsejteken. Kísérleti körülményeink között, izolált patkányszív-preparátumon a β -adrenerg receptor (β -AR) agonista izoproterenol maximálisan $\approx 70\%$ -kal fokozta a kontraktilitást, mely összevethető a mások által tapasztalt ≈ 50 - 100% -os növekedéssel (Hare és mtsai, 1998; Liu és Hoffman, 2002; MacDonnell és mtsai, 2005; González és mtsai, 2008). Izolált felnőtt patkány szívizomsejteken végzett kísérleteinkben a β -AR válasz jelentősen nagyobb volt, $\approx 150\%$ -os növekedést láttunk, mely szintén azonos tartományba esett a mások által leírt ≈ 130 - 200% -os növekedéssel (Leblais és mtsai, 2004; Stangherlin és mtsai, 2011). Ezen megfigyelések alapján elmondható, hogy egyazon stimulus esetén is markáns különbségek észlelhetők az eltérő kísérleti körülményeknek köszönhetően (Isd. a modell komplexitása [egyedi sejt vs. multicelluláris preparátum], a stimuláció frekvenciája [30-60 vs. 300-390 ütés/perc], az előterhelés foka [előterheléstől mentes vs. előterheléstől függő összehúzódás], etc). Vizsgálatainkban, intakt szíven az apelin csúcshatása $\approx 70\%$ -a volt a β -AR válasznak, míg izolált szívizomsejteken ezen érték $\approx 25\%$ -ot tett ki. Ezen aránytalanság kapcsán két tényezőt kívánok kiemelni. Egyrészt, korábban leírták, hogy az apelinreceptor expressziója jelentősen downregulálódik sejtenyészetben, 24 óra elteltével $>90\%$ -os csökkenés észlelhető (Scimia és mtsai, 2012). Mivel a szívizomsejtek izolációját követően 8 órán belül hajtottuk végre a kísérleteket, elképzelhető, hogy már ebben a korai időpontban is alacsonyabb az apelinreceptor expressziója, mely korlátozhatja a peptid inotrop hatását. Másrészt, a két stimulus alapvetően eltérő mechanizmus révén fokozza a kontraktilitást - a β -AR agonisták intracelluláris Ca^{2+} -tranzienseket növelő hatásával szemben az apelin esetében a Ca^{2+} -érzékenyítés dominál -, ily módon várható, hogy a kísérleti elrendezésből fakadó különbségek eltérő mértékben befolyásolhatják e folyamatokat. Izolált patkányszív-preparátumon alacsony végdiasztolés nyomás mellett (1-5 Hgmm) a $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ kontraktilitási index hasonló volt apelin jelenlétében illetve hiányában. A bal kamrai végdiasztolés nyomás 10 illetve 15 Hgmm-re történő emelésekor jelentősen magasabbnak adódott a $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ az apelinrel kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva (az értekezés 23. ábrája). Eredményeink arra utalnak, hogy az apelin a Starling-görbe felszálló szakaszának felső tartományában hatékonyabban képes fokozni a kontrakciós erőt. Amennyiben a mechanikai terhelés foka alapvető meghatározója az apelin hatásának, érthető, hogy az előterheléstől mentes összehúzódást végző izolált szívizomsejteken eltérő választ tapasztalhatunk.

4. kérdés

Bírálom következő kérdését az apelin potenciális Ca^{2+} -érzékenyítő hatása kapcsán tette fel. Izolált szívizomsejteken végzett kísérleteinkben a Ca^{2+} -érzékenység kvantitatív változását direkt nem vizsgáltuk. Ugyanakkor e mechanizmus fontosságát támasztják alá legújabb adataink is, intakt szíven az apelin pozitív inotrop hatását jelentősen csökkentette a miozin könnyű lánc kináz farmakológiai gátlása (Perjés és mtsai, 2014), mely kináz ismert módon növeli a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységét (Kamm és Stull, 2011).

5. kérdés

Mi lehet az oka, hogy egyes kardiokinek esetében ellentmondásos eredmények születtek a kontraktilitásra gyakorolt hatásukat tekintve? Az AM esetében találkozhatunk a legváltozatosabb megfigyelésekkel az irodalomban. Izolált patkányszív-modellen tett észleléseinkkel (Szokodi és mtsai, 1996; Szokodi és mtsai, 1998; Kinnunen és mtsai, 2000; Szokodi és mtsai, 2002) összhangban, az AM fokozta a kontraktilitást izolált patkány papilláris izmon (Ihara és mtsai, 2000), valamint humán pitvari és kamrai trabekulákon (Bisping és mtsai, 2007). Ugyanakkor, a peptid patkány eredetű izolált szívizomsejteken kettős hatást váltott ki, a kezdeti kontraktilitás fokozódást negatív inotrop hatás követte hosszabb inkubáció (>1 óra) során (Mittra és mtsai, 2004; Mittra és Bourreau, 2006). Nyúl (Ikenouchi és mtsai, 1997) és humán eredetű izolált kamrai szívizomsejteken (Mukherjee és mtsai, 2002) az AM csökkentette a kontrakciós erőt. Továbbá, egyes tanulmányokban az AM nem befolyásolta a kontraktilitást (Stangl és mtsai, 2000; Saetrum Opgaard és mtsai, 2000). A negatív eredmények kapcsán megjegyzendő, hogy a peptid természetű anyagokkal folytatott kísérletek esetében nagyfokú körültekintést igényel a feloldásuk, tárolásuk, illetve oldatban tartásuk a perfúzió/szuperfúzió során, mivel könnyen degradálódhatnak, kitapadhatnak a hidrofób felületekhez, etc (Livesey és Nicholls, 2012), ami fals negatív

megfigyelésekhez vezethet. Az eltérő eredményeket áttekintve elmondható, hogy multicelluláris preparátumokon az AM döntően pozitív inotrop hatást váltott ki, míg negatív inotrop effektus elsősorban izolált szívizomsejteken volt észlelhető. Mindez a multicelluláris modellek és az izolált sejtek eltérő kísérleti körülményeinek a fontosságára hívja fel a figyelmet, mely kérdéskört már érintettem Bírálom 3. kérdésére adott válaszómban. Intramiokardiális AM géntranszfert követően a bal kamrai kontraktilitás *ex vivo* szignifikánsan magasabbnak adódott a kontrollokhöz képest magas végdiasztolés nyomás mellett (10-20 Hgmm), míg alacsonyabb végdiasztolés nyomás esetén (1-5 Hgmm) nem találtunk különbséget a két csoport között (az értekezés 9. ábrája). A peptid Frank-Starling-választ fokozó hatása rávilágít az előterhelés jelentőségére az AM inotrop effektusa szempontjából. Kiemelendő, hogy az *in vitro* és *ex vivo* modelleken nyert változatos eredményekkel szemben az *in vivo* adatok meglepően következetesek. Számos tanulmány vizsgálta az AM szisztémás infúziója során fellépő komplex hemodinamikai változásokat fiziológiás körülmények között. A patkányokon (He és mtsai, 1995), juhokon (Parkes, 1995; Parkes és May, 1997; Charles és mtsai, 1997) és kutyákon (Lainchbury és mtsai, 2000a) végzett kísérletek során csökkent a perifériás vaszkuláris rezisztencia, ezzel párhuzamosan nőtt a szívfrekvencia, a verővolumen és a perctérfogat. A humán klinikai vizsgálatok is hasonló eltérésekről számoltak be (Lainchbury és mtsai, 2000b; Nagaya és mtsai, 2000). Nagaya és mtsai nyomás-térfogat görbék analízise segítségével vizsgálták az AM direkt hatását a kontraktilitásra mérsékelt bal kamrai szisztolés funkciójú betegeken (EF: 40-50%). Eredményeik szerint a peptid fokozta a bal kamrai végszisztolés elastance-t, mely a kamrai kontraktilitás elő- és utóterheléstől független indexe (Nagaya és mtsai, 2002). Ezen adatok alapján az AM verővolumen növelő hatásához feltehetőleg mind az utóterhelés csökkenése, mind a kamrai kontraktilitás fokozódása hozzájárul. Összességében, az *ex vivo*, izolált szívpreparátumon nyert eredményeink jó korrelációt mutatnak a releváns *in vivo* modelleken tett megfigyelésekkel.

6. kérdés

Bírálom következő kérdése arra vonatkozott, hogy a vizsgált kardiokinek kontraktilitást fokozó hatásának mekkora az energiaigénye. Irodalmi adatok szerint, az ET-1 *ex vivo* jelentősen javította a kontraktilitás határfokát (Takeuchi és mtsai, 2001). Ezzel összefüggésben, az ET-1 szimultán volt képes fokozni a kontrakciós erőt és csökkenteni az aktomiozin ATPáz aktivitást *in vitro*. Figyelemre méltó módon, a kontrakciók határfoka a szarkomerhossz növelésével progresszív módon javult (McClellan és mtsai, 1996). Az AM esetében leírták, hogy mérsékelt csökkenést bal kamrai szisztolés funkciójú betegeken (EF: 40-50%) a peptid anélkül növelte a bal kamrai kontraktilitást (végszisztolés elastance-t), hogy érdemben fokozta volna a szívizom oxigénfogyasztását (Nagaya és mtsai, 2002). Nem ismert, hogy milyen sejtszintű folyamatok állhatnak az AM ezen kedvező hatásai mögött. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy *in vivo* az AM mind az elő-, mind az utóterhelést csökkentette, a kamrai falfeszülés következményes csökkenése előnyösen befolyásolhatta a szív oxigénfogyasztását. Mindez felveti, hogy ezen kardiokinek kevésbé merítik ki a szív metabolikus tartalékait, szemben a β -AR-agonistákkal illetve a foszfodiészteráz-gátlókkal, melyek a kontraktilitást csupán aránytalanul magas energiaráfordítás mellett képesek növelni (Dzimiri, 1999), mely különösen fontos a megfelelő energetikai tartalékok hiányában működő, hanyatló pumpafunkciójú szív esetében.

7. kérdés

Opponensem utolsó kérdése arra irányult, hogy a felismert intracelluláris jelátviteli utak közül mely tekinthető perspektivikusnak a kontraktilitás farmakológiai fokozása céljából. Megítélésem szerint a p38-MAPK és az ERK1/2 reménykeltő célpontok. A közelmúltban publikált eredményeink szerint, a p38-MAPK izoformái közül a p38 α -MAPK játszik szerepet a kontraktilitás regulációjában. Izolált felnőtt egér kamrai szívizomsejteken a p38 α -MAPK gátlás, az inhibitor-1 fehérje fokozott Thr-35 foszforilációja révén, fokozta a foszfolamban foszforilációját, a szarkoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáz (SERCA) működését, és következményesen a kontraktilitást (Kaikkonen és mtsai, 2014). Szívelégtelenség preklinikai nagyállat-modelljében az inhibitor-1 fehérje aktív változatának overexpressziója enyhítette a balkamra-funkció romlását (Fish és mtsai, 2013). A fázis 2 CUPID vizsgálatban (Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease) előrehaladott szívelégtelen betegek esetében alkalmazott intrakoronáriás SERCA2a géntranszfer javította a funkcionális állapotot, valamint jelentősen csökkentette a major kardiovaszkuláris események bekövetkeztének rizikóját (Jessup és mtsai, 2011). Tisztázásra vár,

hogy a p38 α -MAPK szelektív gátlása előnyösebb-e, mint a jelátvitel disztális komponenseinek (inhibitor-1 fehérje, SERCA) direkt aktivációja a szisztolés és a diasztolés funkció javítása céljából szívelégtelenség állapotában. Fontos megjegyezni továbbá, hogy a kontraktilitásra gyakorolt negatív hatása mellett, a p38-MAPK aktivációja egyéb mechanizmusok - mint az apoptózis és a fibrózis elősegítése - révén is hozzájárulhat a szívelégtelenség kialakulásához illetve további progressziójához (Rose és mtsai, 2010). Szívelégtelenség preklinikai modelljeiben a p38-MAPK farmakológiai gátlása csökkentette a bal kamrai remodellációt (Liu és mtsai, 2005; Kyoj és mtsai, 2006; Westermann és mtsai, 2006). A közelmúltban zárult le egy fázis 2 klinikai vizsgálat, melyben a p38-MAPK gátló losmapimod hatását vizsgálták nem ST-elevációs miokardiális infarktuson átesett betegekben. Első eredményeik szerint a losmapimod nem befolyásolta az infarktus méretét, ugyanakkor csökkentette a szívelégtelenség biomarkerének, a BNP szérumszintjét a 2 hetes kezelés során (Newby és mtsai, 2014). További vizsgálatokat igényel annak eldöntése, hogy a nem szelektív p38-MAPK gátláshoz viszonyítva a p38 α -MAPK szelektív gátlása mennyiben mutatkozik hatásosabbnak. Egyes megfigyelések ugyanakkor óvatosságra is intenek a p38-MAPK tartós gátlása kapcsán: a p38 α -MAPK, az MKK3 illetve az MKK6 domináns negatív mutáns változatát kifejező egerekben spontán fejlődött ki szívelégtelenség (Braz és mtsai, 2003). *Ex vivo* eredményeink felvetik, hogy fiziológias viszonyok között a p38-MAPK dinamikus, átmeneti, mérsékelt aktivációja védő szerepet tölthet be a szívben a túlzott inotrop stimulusokat ellensúlyozandó (az értekezés 47. ábrája), a miokardiális p38-MAPK jelátvitel krónikus gátlása során feltehetőleg elvesz ez a védő mechanizmus, mely hozzájárulhat a szívelégtelenség kialakulásához a fenti transzgenikus modellekben.

Általánosan elfogadott, hogy a MEK1/2-ERK1/2 jelátviteli rendszer alapvető szerepet tölt be a szívizom stresszel szembeni adaptációjában (Bueno és Molckentin, 2002; Rose és mtsai, 2010). Emellett, eredményeink azt bizonyították, hogy e jelátviteli rendszer részt vesz a szívizom-kontraktilitás szabályozásában is. Újabb megfigyeléseink szerint, az ET-1 mellett (az értekezés 47. ábrája) az apelin (Perjés és mtsai, 2014) és az AM pozitív inotrop hatásának közvetítésében is fontos szereppel bír a MEK1/2-ERK1/2 kaskád (nem közölt adatok). Mindez felveti, hogy az ERK1/2 jelátvitel aktivációja - a kontrakciós erő fokozása és a kardioprotektív hatásai révén - új lehetőséget jelenthet a szívelégtelenség kezelésében, a reverz remodelláció elősegítésében. Jelenleg nem ismertek olyan kis molekulatömegű gyógyszerjelöltek, melyek szelektíven képesek aktiválni a MEK1/2-ERK1/2 jelátviteli rendszer jelpályát. Itt jegyzendő meg, hogy a farmakológiai megközelítésen túl, a rendszeresen végzett, megfelelő intenzitású testmozgás kedvező szívhatásainak hátterében, az Akt és az AMPK mellett, az ERK1/2 átmeneti, periodikus aktivációja állhat (Maillet és mtsai, 2013). Másrészt, mivel a MEK1/2-ERK1/2 kaskád abnormális aktivációja jelentős szerepet játszik a karcinogenezisben, a gyógyszeripar ezen jelátvitelt specifikusan gátló szerek kifejlesztésére törekedett. Jelenleg is számos olyan klinikai tanulmány folyik, amelyben e jelátviteli rendszer egyes komponenseit gátló, kis molekulatömegű gyógyszerjelöltek hatékonyságát vizsgálják különböző daganatos betegségekben (Friday és Idjei, 2008; Cheng és Force, 2010; Zhao és Adjei, 2014). Eredményeink felvetik, hogy a MEK1/2-ERK1/2 jelátviteli út célzott gátlása ronthatja a szív pumpafunkcióját a daganatos betegek azon csoportjában, akik korábban szívinfarktuson estek át, hipertóniában illetve szívbillentyű-betegségben szenvednek.

A kérdések megválaszolása után még egyszer köszönöm Papp Zoltán Professzor Úr bírálatát és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását!

2014. 07. 22.

Tisztelettel és köszönettel:



Dr. Szokodi István
doktorjelölt

Referenciák

- Bisping E, Tenderich G, Barckhausen P, Stumme B, Bruns S, von Lewinski D, Pieske B. Atrial myocardium is the predominant inotropic target of adrenomedullin in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H3001-7.
- 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: 1475-86.
- Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res.* 2002; 91: 776-81.
- Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM, Cooper GJ, Coy DH, Jing NY, Nicholls MG. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of adrenomedullin in conscious sheep. *Am J Physiol.* 1997; 272: R2040-7.
- Cheng H, Force T. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ Res.* 2010; 106: 21-34.
- Dzimiri N. Regulation of beta-adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev.* 1999; 51: 465-501.
- Fish KM, Ladage D, Kawase Y, Karakikes I, Jeong D, Ly H, Ishikawa K, Hadri L, Tilemann L, Muller-Ehmsen J, Samulski RJ, Kranias EG, Hajjar RJ. AAV9.I-1c delivered via direct coronary infusion in a porcine model of heart failure improves contractility and mitigates adverse remodeling. *Circ Heart Fail.* 2013; 6: 310-7.
- Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 342-6.
- González DR, Fernández IC, Ordenes PP, Treuer AV, Eller G, Boric MP. Differential role of S-nitrosylation and the NO-cGMP-PKG pathway in cardiac contractility. *Nitric Oxide.* 2008; 18: 157-67.
- Hare JM, Kim B, Flavahan NA, Ricker KM, Peng X, Colman L, Weiss RG, Kass DA. Pertussis toxin-sensitive G proteins influence nitric oxide synthase III activity and protein levels in rat heart. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1424-31.
- He H, Bessho H, Fujisawa Y, Horiuchi K, Tomohiro A, Kita T, Aki Y, Kimura S, Tamaki T, Abe Y. Effects of a synthetic rat adrenomedullin on regional hemodynamics in rats. *Eur J Pharmacol.* 1995; 273: 209-14.
- Ihara T, Ikeda U, Tate Y, Ishibashi S, Shimada K. Positive inotropic effects of adrenomedullin on rat papillary muscle. *Eur J Pharmacol.* 2000; 390: 167-72.
- Ikenouchi H, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y. Negative inotropic effect of adrenomedullin in isolated adult rabbit cardiac ventricular myocytes. *Circulation.* 1997; 95: 2318-24.
- Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Dittrich H, Hajjar RJ. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 2011; 124: 304-13.
- Kaikkonen L, Magga J, Ronkainen VP, Koivisto E, Perjes Á, Chuprun JK, Vinge LE, Kilpiö T, Aro J, Ulvila J, Alakoski T, Bibb JA, Szokodi I, Koch WJ, Ruskoaho H, Kerkelä R. p38 α regulates SERCA2a function. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 67: 86-93.
- Kamm KE, Stull JT. Signaling to myosin regulatory light chain in sarcomeres. *J Biol Chem.* 2011; 286: 9941-7.
- 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: R569-75.
- Kinnunen P, Piuholta J, Ruskoaho H, Szokodi I. Adrenomedullin reverses the pressor response to endothelin-1 independently of nitric oxide in rat coronary circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H1178-83.
- Kyoi S, Otani H, Matsuhisa S, Akita Y, Tatsumi K, Enoki C, Fujiwara H, Imamura H, Kamihata H, Iwasaka T. Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 888-98.
- Lainchbury JG, Meyer DM, Jougasaki M, Burnett JC Jr, Redfield MM. Effects of adrenomedullin on load and myocardial performance in normal and heart-failure dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000a; 279: H1000-6.

- Lainchbury JG, Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000b; 85: 1016-20.
- Leblais V, Jo SH, Chakir K, Maltsev V, Zheng M, Crow MT, Wang W, Lakatta EG, Xiao RP. Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca²⁺ influx in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2004; 95: 1183-90.
- Liu Q, Hofmann PA. Antiadrenergic effects of adenosine A₁ receptor-mediated protein phosphatase 2a activation in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H1314-21.
- Liu YH, Wang D, Rhaleb NE, Yang XP, Xu J, Sankey SS, Rudolph AE, Carretero OA. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice with heart failure resulting from myocardial infarction. *J Card Fail.* 2005; 11: 74-81.
- Livesey JH, Nicholls MG. Stickiness to hydrophobic surfaces varies widely among peptides and proteins. *J Immunoassay Immunochem.* 2012; 33: 302-13.
- MacDonnell SM, Kubo H, Crabbe DL, Renna BF, Reger PO, Mohara J, Smithwick LA, Koch WJ, Houser SR, Libonati JR. Improved myocardial β -adrenergic responsiveness and signaling with exercise training in hypertension. *Circulation.* 2005; 111: 3420-8.
- Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14: 38-48.
- McClellan G, Weisberg A, Winegrad S. Effect of endothelin-1 on actomyosin ATPase activity: implications for the efficiency of contraction. *Circ Res.* 1996; 78: 1044-50.
- Mittra S, Hyvelin JM, Shan Q, Tang F, Bourreau JP. Role of cyclooxygenase in ventricular effects of adrenomedullin: is adrenomedullin a double-edged sword in sepsis? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1034-42.
- Mittra S, Bourreau JP. Gs and Gi coupling of adrenomedullin in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290: H1842-7.
- Mukherjee R, Multani MM, Sample JA, Dowdy KB, Zellner JL, Hoover DB, Spinale FG. Effects of adrenomedullin on human myocyte contractile function and beta-adrenergic response. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2002; 7: 235-40.
- Nagaya N, Goto Y, Satoh T, Sumida H, Kojima S, Miyatake K, Kangawa K. Intravenous adrenomedullin in myocardial function and energy metabolism in patients after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 39: 754-60.
- Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, Oya H, Kyotani S, Nakanishi N, Goto Y, Masuda Y, Miyatake K, Kangawa K. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2000; 101: 498-503.
- Newby LK, Marber MS, Melloni C, Sarov-Blat L, Aberle LH, Aylward PE, Cai G, de Winter RJ, Hamm CW, Heitner JF, Kim R, Lerman A, Patel MR, Tanguay JF, Lepore JJ, Al-Khalidi HR, Sprecher DL, Granger CB; on behalf of the SOLSTICE Investigators. Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: a randomised phase 2 trial. *Lancet.* 2014 (in press).
- Parkes DG. Cardiovascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Am J Physiol.* 1995; 268: H2574-8.
- Parkes DG, May CN. Direct cardiac and vascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Br J Pharmacol.* 1997; 120: 1179-85.
- Perjés Á, Skoumal R, Tenhunen O, Kónyi A, Simon M, Horváth IG, Kerkelä R, Ruskoaho H, Szokodi I. Apelin increases cardiac contractility via protein kinase C ϵ - and extracellular signal-regulated kinase-dependent mechanisms. *PLoS ONE.* 2014; 9: e93473.
- Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev.* 2010; 90: 1507-46.
- Saetrum Opgaard O, Hasbak P, de Vries R, Saxena PR, Edvinsson L. Positive inotropy mediated via CGRP receptors in isolated human myocardial trabeculae. *Eur J Pharmacol.* 2000; 397: 373-82.
- Scimia MC, Hurtado C, Ray S, Metzler S, Wei K, Wang J, Woods CE, Purcell NH, Catalucci D, Akasaka T, Bueno OF, Vlasuk GP, Kaliman P, Bodmer R, Smith LH, Ashley E, Mercola M, Brown JH, Ruiz-Lozano P. APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature.* 2012; 488: 394-8.

- Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, Terrin A, Fields LA, Berrera M, Surdo NC, Craig MA, Smith G, Hamilton G, Zaccolo M. cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2011; 108: 929-39.
- Stangl V, Dschietzig T, Bramlage P, et al. Adrenomedullin and myocardial contractility in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2000; 408: 83-9.
- Szokodi I, Kerkelä R, Kubin AM, Sárman 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: 1651-8.
- Szokodi I, Kinnunen P, Ruskoaho H. Inotropic effect of adrenomedullin in the isolated perfused rat heart. *Acta Physiol Scand.* 1996; 156: 151-2.
- Szokodi I, Kinnunen P, Tavi P, Weckström M, Tóth M, Ruskoaho H. Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation.* 1998; 97: 1062-70.
- Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuholta J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res.* 2002; 91: 434-40.
- Takeuchi Y, Kihara Y, Inagaki K, Yoneda T, Sasayama S. Endothelin-1 has a unique oxygen-saving effect by increasing contractile efficiency in the isolated rat heart. *Circulation.* 2001; 103: 1557-63.
- Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, Cheng H. Sustained β_1 -adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ. Res.* 2004; 95: 798-806.
- Westermann D, Rutschow S, Van Linthout S, Linderer A, Bucker-Gärtner C, Sobirey M, Riad A, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2006; 49: 2507-13.
- Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014; 11: 385-400.