Válasz Dr. Végh Ágnes egyetemi tanár, az MTA doktora, opponensi bírálatára

Szeretném megköszönni Végh Ágnes Professzor Asszonynak doktori értekezésem bírálatát, értékes kérdéseit, valamint, hogy pozitívan nyilatkozott eddigi munkámról.

A feltett kérdésekre válaszaim a következők:

1. kérdés

Opponensem észrevétele jogos, az adrenomedullin (AM) és az endothelin-1 (ET-1) inotrop hatását bemutató 5. ábrán tévesen 0.3 nmol/L szerepel az AM alacsonyabb dózisaként. Ugyanakkor, magában a szövegben, valamint az ábra magyarázatában helyesen 0.03 nmol/L-t tüntettem fel.

Bírálóm kérdése az általunk vizsgált kardiokinek pozitív inotrop hatásának tartósságára vonatkozott: vajon mi ennek a jelenségnek a magyarázata és az esetleges jelentősége? Izolált szívpreparátumon a β-adrenerg receptor (β-AR) agonisták gyorsan kialakuló és lecsengő effektusától eltérően a vizsgált kardiokinek kontraktilitást fokozó hatása lassan épült fel, ugyanakkor tartósnak bizonyult. Ahhoz, hogy az effektus hosszabb távon is fennmaradjon, két feltételnek kell teljesülnie. Szükséges egyrészt, hogy a ligand tartósan aktiválja a megfelelő disztális intracelluláris jelátvivőket, másrészt a szív elégséges energetikai tartalékkal rendelkezzen és/vagy a kontrakciós erő fokozódása energetikailag előnyös módon valósuljon meg. A jelátviteli utak aktivációjának időbeliségét részleteiben az apelin esetében tártuk fel. Újabb eredményeink szerint az egyes jelátvivők eltérő aktivációs mintázattal rendelkeznek: a PKCε-t korai, átmeneti aktiváció jellemezte (5 perc), míg az ERK1/2 tartósan aktiválódott (5-20 perc), függetlenül a PKCε-tól. Kimutattuk továbbá, hogy mindkét jelátvivő farmakológiai gátlása jelentősen gyengítette a peptid inotrop hatásának mind a kezdeti, mind a plató fázisát (Perjés és mtsai, 2014). Mások adatai szerint az apelin az ERK1/2 enzimet részben G-proteintől függő (G_i), részben G-proteintől független mechanizmusok révén (β-arrestin) aktiválja (Scimia és mtsai, 2012; Ceraudo és mtsai, 2014). Izgalmas kérdés, hogy ezen mechanizmusok közül mely járul hozzá az apelin inotrop hatásának kialakulásához. Az energetikai szempontot tekintve, az ET-1 és az AM esetében leírták, hogy a szívizom oxigénfogyasztásának lényeges növelése nélkül képesek fokozni a kontrakciós erőt (Takeuchi és mtsai, 2001; Nagaya és mtsai, 2002). E megfigyelés alapvető jelentőséggel bír a megfelelő energetikai tartalékok hiányában működő, hanyatló pumpafunkciójú szív támogatását tekintve, felvetve, 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).

2. kérdés

Opponensem következő kérdései az AM overexpressziós munkánkkal kapcsolatosak. Az AM géntraszfert alkalmazó kísérleteink időpontjainak kiválasztásához munkacsoportunk korábbi eredményei nyújtottak támpontot. E szerint adenovírus vektor használata révén átmenetileg fokozható a cél gének expressziója a szívizomban: a maximum 3 napnál várható, 2 hétnél már nem észlelhető fokozott expresszió (Tenhunen és mtsai, 2006). Ezzel összhangban az AM génexpressziója a géntranszfert követő 3. napon 20.9-szeres ($P<0.001$), 1 hétnél 17.2-szeres ($P<0.001$) növekedést mutatott a kontrollhoz viszonyítva, majd 2 hét után visszatért a bazális szintre (az értekezés 7A. ábrája). Az echokardiográfiás vizsgálataink szerint a frakcionális rövidülés és az ejekciós frakció már a géntranszfert követő 1. napon szignifikánsan emelkedett. Ebben az időpontban valóban nem határoztuk meg az AM génexpresszió fokát, azonban a funkcionális eredményeink arra utalnak, hogy már ebben a fázisban is fokozott lehetett az AM kifejeződése. Fiziológiás viszonyok között végzett kísérleteinket követően arra kerestünk választ, hogy az AM intramiokardiális géntranszfere miként hat a patológiás szívre (angiotenzin II által indukált bal kamrai hipertrófia ill. infarktust követő bal kamrai remodelláció modelljében). A kiterjedt további vizsgálataink miatt kénytelenek voltunk korlátozni a fiziológiás viszonyok között folytatott kísérleteinket, így számos érdekes kérdés nyitott maradt.

In vivo körülmények között végzett echokardiográfiás vizsgálataink szerint az AM géntranszfert követően a frakcionális rövidülés 14%-kal ($P<0.05$), az ejekciós frakció 8%-kal ($P<0.05$) nőtt a LacZ kontrollhoz viszonyítva (az értekezés 8. ábrája), míg a szívfrekvencia nem változott (nem közölt adatok). Ezen mérsékelt változások megítélésekor figyelembe kell venni,

hogy jó balkamra-funkcióval rendelkező egészséges egyedek szisztolés funkciója volt fokozható a géntranszfer révén. Továbbá, az általunk észlelt növekedés összevethető mások eredményeivel: hasonló mértékben emelkedett a bazális szisztolés funkció példának okául a β_2-AR-ok (60-150-szeres) overexpresszióját követően (Liggett és mtsai, 2000), az inhibitor-1 fehérje (Pathak és mtsai, 2005) illetve az L-típusú Ca^{2+}-csatorna β2a-alegységének forszírozott miokardiális expressziója esetén (Zhang és mtsai, 2010).

3. kérdés

Bírálóm következő kérdése az AM hatásait közvetítő receptorokra vonatkozott. Vizsgálataink kezdetén tisztázatlan volt, hogy az AM milyen receptoron keresztül képes kiváltani a hatásait. Számos tanulmány szerint CGRP[8-37]-tel, egy CGRP-receptor antagonistával, az AM egyes biológiai hatásai kivédhetőek voltak (Eguchi és mtsai, 1994; Entzeroth és mtsai, 1995; Ikeda és mtsai, 1996), felvetve annak a lehetőségét, hogy az AM specifikus CGRP-receptorokon keresztül hat. Specifikus AM-receptorok után kutatva, a G-proteinhez kapcsolt receptorok működésének új paradigmáját ismerték fel. A CRLR (*"calcitonin receptor-like receptor"*) árvareceptor képes kötni mind az AM-t, mind a CGRP-t. A kötődés specificitását egy, a receptorhoz kapcsolódó, úgynevezett receptor aktivitást módosító fehérje (RAMP, *"receptor activity modifying protein"*) határozza meg. A CRLR/RAMP-1 komplex CGRP receptorként funkcionál, míg a CRLR és a RAMP-2 illetve a RAMP-3 kombinációjához specifikusan az AM képes kötődni (McLatchie és mtsai, 1998; Gibbons és mtsai, 2007). Továbbá, AM-receptorként működhet az L1 és az RDC-1 árvareceptor is (Kapas és mtsai, 1995a; Kapas és mtsai, 1995b; Hanze és mtsai, 1997; Autelitano, 1998). Vizsgálataink idején a szelektív AM-receptor antagonista AM[22-52] (Hay és mtsai, 2003) nem volt még elérhető, csupán a szelektív CGRP-receptor antagonista CGRP[8-37] hatását állt módunkban tesztelni. Utóbbi antagonista nem befolyásolta érdemben az AM pozitív inotrop hatását (az értekezés 6B. ábrája), mely alapján arra következtettünk, hogy az AM effektusa nem a CGRP-receptorok közvetítésével jön létre.

4. kérdés

Opponensem következő kérdése a Ca^{2+}-háztartás és a PKC jelátvitel kapcsolatára vonatkozott az AM esetében. Az AM hatását az intracelluláris Ca^{2+}-homeosztázisra indirekt módon vizsgáltuk. Az L-típusú Ca^{2+}-csatornák és a SERCA működésének farmakológiai gátlása mérsékelten gyengítette csupán az AM inotrop hatását (az értekezés 11A. és 12C. ábrája). Ez felveti, hogy az ET-1 és az α_{1A}-AR-agonisták mintájára, az AM csak kis mértékben hat az intracelluláris Ca^{2+}-tranziensekre, a hatásában a Ca^{2+}-érzékenyítés dominálhat. Fontos kiemelni, hogy kísérleteinkben a PKC-inhibitorok lényegesen erőteljesebben csökkentették az AM effektusát, mint az L-típusú Ca^{2+}-csatornák vagy a SERCA farmakológiai gátlása. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy habár a PKCε, az AM overexpresszió hatására aktiválódó PKC izoforma, potenciálisan fokozhatja az L-típusú Ca^{2+}-csatornák foszforilációját és növelheti az I_{Ca}-ot (Kamp és Hell, 2000; He és mtsai, 2000; O-Uchi és mtsai, 2008), feltehetőleg azonban további érdemi sejten belüli célpontokkal is rendelkezik. Számos adat utal arra, hogy a PKCε a miofilamentumok Ca^{2+}-érzékenységét fokozva képes növelni a kontrakciós erőt (Takeishi és mtsai, 2000). Felvetették, hogy a PKC direkt (Venema és mtsai, 1993) illetve indirekt módon (Chan és mtsai, 2008), a miozin könnyű lánc kináz révén, fokozhatja a miozin könnyű lánc (MLC) foszforilációját, mely a miofilamentumok Ca^{2+}-érzékenységének növekedéséhez vezet (Kamm és Stull, 2011). Az MLC foszforiláció foka a szívizomban sokkal lassabb kinetikával változik a vázizommal illetve a simaizommal összevetve (Kamm és Stull, 2011). Mivel az AM inotrop effektusa hasonló lassú ütemben épül fel, felvetődik, hogy a peptid hatásában szerepet játszhat az MLC foszforiláció fokozódása. Az apelin inotrop hatásának az esetében, mely számos ponton mutat hasonlóságot az AM effektusával, ezen hipotézist alátámasztó eredményeket kaptunk a közelmúltban (Perjés és mtsai, 2014).

5. kérdés

Bírálóm kérdése arra irányult, hogy az apelin milyen jelátviteli utakra hatva képes fokozni a kamrai kontraktilitást szívelégtelenség állapotában, illetve ezen mechanizmusok mennyiben térnek el a normál szívek esetében azonosítottaktól. Jelenleg nem ismert, hogy az apelin milyen jelpályák aktivációja révén képes javítani a kamrafunkciót szívelégtelenségben. Egészséges szíveken nyert

újabb adataink szerint, a PLC−PKC kaszkád mellett, fontos szerepet játszik az ERK1/2 és a miozin könnyű lánc kináz aktivációja is a peptid inotrop hatásának közvetítésében (Perjés és mtsai, 2014). Reményeink szerint, jövőbeli vizsgálataink választ adnak arra, hogy az apelin milyen mechanizmusok segítségével képes enyhíteni a szív szisztolés funkciózavarát.

6. kérdés

Opponensem következő kérdése a PrRP pozitív inotrop hatását közvetítő jelátviteli mechanizmusokra vonatkozott. Erőfeszítéseink dacára, nem sikerült még azonosítanunk ezeket a mechanizmusokat. Biokémiai módszerekkel számos jelátviteli molekula aktivitását vizsgáltuk - mint a PKCε, az ERK1/2, a p38-MAPK, és az Akt -, azonban PrRP adását követően egyik jelpálya esetében sem találtunk konzisztens változást. A hatás farmakológiai úton történő karakterizálása kevés reménnyel kecsegtetett, feltételezve az effektus összetett mivoltát (azaz az alkalmazandó inhibitorok révén csupán részleges gátlás érhető el), valamint ismerve a PrRP szerény mértékű inotrop hatását. Ily módon kénytelenek voltunk megelégedni a PrRP effektusát ellensúlyozó mechanizmusok feltérképezésével, melyeket részletesen tárgyaltam az értekezésemben.

7. kérdés

Opponensem megjegyzése helytálló, a PMA rövidítés a forbol-12-mirisztát-13-acetátot takarja, sajnálatosan nem szerepeltettem a Rövidítések jegyzékében.

Bírálóm következő kérdése a MAPK útvonalak szelektív befolyásolásának lehetőségére vonatkozott. E kérdés kapcsán fontos hangsúlyozni, hogy ez az evolúció során nagymértékben konzerválódott jelátviteli rendszer központi helyet foglal el az eukarióta sejtek alapvető életfolyamatainak - mint a növekedés, a proliferáció, a differenciálódás és a sejttúlélés - szabályozásában. Jelentős tudományos érdeklődés övezi a MAPK-ok patofiziológiai szerepének felderítését a szívben (Rose és mtsai, 2010). Nyitott kérdés, hogy ezen mechanizmusok mi módon aknázhatóak ki a szívbetegségek terápiájaként a sokrétű hatásaik fényében.

Eredményeink felvetik, hogy fiziológiás viszonyok között a p38-MAPK dinamikus, átmeneti, mérsékelt aktivációja védő szerepet tölthet be a szívben a túlzott inotrop stimulusok ellensúlyozása révén. A p38α-MAPK, az MKK3 illetve az MKK6 domináns negatív mutáns változatát kifejező egerekben a miokardiális p38-MAPK jelátvitel krónikus gátlása során feltehetőleg elvész ez a védő mechanizmus, mely hozzájárulhat a transzgénikus modellekben a szívelégtelenség spontán kifejlődéséhez (Braz és mtsai, 2003). Ugyanakkor, a p38-MAPK hosszan fennálló, jelentős aktivációja patológiásnak tűnik, a romló kontraktilitás révén szintén szívelégtelenséghez vezethet, mint azt az MKK3bE vagy az MKK6bE szívizom-specifikus expressziója (Liao és mtsai, 2001) illetve a DUSP1/4 génhiányos egerek (*Dusp1/4*$^{-/-}$, *"dual-specificity phosphatase 1/4"*) (Auger-Messier és mtsai, 2013) esetén tapasztalták. A közelmúltban publikált eredményeink szerint, a p38-MAPK izoformái közül a p38α-MAPK játszik szerepet a kontraktilitás regulációjában. Izolált felnőtt egér kamrai szívizomsejteken a p38α-MAPK gátlása fokozta a PLN foszforilációját, a SERCA működését, és következményesen a kontraktilitást (Kaikkonen és mtsai, 2014). Eredményeink felvetik, hogy a p38α-MAPK szelektív gátlása javíthatja a szisztolés és a diasztolés funkciót szívelégtelenség állapotában. Fontos megjegyezni, hogy a kontraktilitásra gyakorolt hatása mellett, a p38-MAPK aktivációja egyéb mechanizmusok - mint az apoptózis és a fibrózis elősegítése - révén is hozzájárulhat a szívelégtelenség kialakulásához illetve progressziójához (Rose és mtsai, 2010). Szívelégtelenség preklinikai modelljeiben a p38-MAPK farmakológiai gátlása előnyösnek tűnt (Liu és mtsai, 2005; Kyoi 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 szérum szintjét a 2 hetes kezelés során (Newby és mtsai, 2014).

Intakt patkányszíven nyert újabb eredményeink szerint, az ET-1 mellett az apelin (Perjés és mtsai, 2014) és az AM pozitív inotrop hatásának közvetítésében is fontos szereppel bír az ERK1/2 aktiváció (nem közölt adatok). Általánosan elfogadott, hogy a MEK1/2–ERK1/2 jelátviteli rendszer alapvető szerepet tölt be a szívizom stresszel szembeni adaptációjában (Bueno és Molkentin, 2002; Rose és mtsai, 2010). Az iszkémia-reperfúzió okozta károsodást az ERK1/2 aktiváció az apoptózis csökkentése révén enyhíti *in vivo* (Lips és mtsai, 2004). Továbbá, a MEK1/2–ERK1/2 jelpálya aktivitása határozza meg, hogy a szívizomsejtekben az egyes ingerek hatására

koncentrikus vagy excentrikus hipertrófia alakul ki. Az aktivált MEK1 szívizom-specifikus overexpressziója mérsékelt fokú koncentrikus bal kamrai hipertrófiát és fokozott pumpafunkciót eredményez, az állatok hosszú távon sem mutatnak szívelégtelenségre utaló jeleket (Bueno és mtsai, 2000). Ezzel szemben, ERK1/2 aktiváció hiányában, tartós bal kamrai nyomásterhelés hatására markáns excentrikus hipertrófia jön létre, melyhez súlyos szívelégtelenség társul (Kehat és mtsai, 2011). Eredményeink felvetik, hogy az ERK1/2 aktiváció fontos kapcsot jelenthet a kontraktilitás és a szívizomsejtek növekedési programja között: amennyiben a mechanikai túlterhelést nem követi megfelelő ERK1/2 aktiváció és következményesen elmarad a kontrakciós erő fokozódása, e kompenzációs mechanizmus hiányában, aránytalanul fokozódhat a kamrai falfeszülés, ami excentrikus hipertrófia kialakulásához vezethet. Az ERK1/2 jelátvitel aktivációja - a kontrakciós erő fokozása, az apoptózis és az excentrikus hipertrófia gátlása révén - új utakat nyithat a szívelégtelenség kezelésében. Jelenleg nem ismertek olyan kis molekulatömegű gyógyszerjelöltek, melyek szelektíven képesek aktiválni a MEK1/2–ERK1/2 jelpályát. Mivel a MEK1/2–ERK1/2 kaszkád 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 jelpálya 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.

Opponensem következő kérdése arra irányult, hogy hipertrófiás szíveken az ET-1/ET_A-receptor rendszer aktivációja következtében fokozódott-e a vaszkuláris tónus? Azonos koronáriaáramlás mellett (5.8 mL/g/perc) szignifikánsan magasabbnak adódott a perfúziós nyomás a hipertóniás dupla transzgénikus patkányok szívén a normotenzív kontrollokhoz viszonyítva (54±2 és 30±1 Hgmm, $P<0.001$). Az ET_A/ET_B-receptor-gátló bosentan 30 perces infúziója egyik csoportban sem befolyásolta érdemben a koszorúerek tónusát. Eredményeink arra utalnak, hogy a lokális ET-1 a vizsgálatunk fázisában nem játszik érdemi szerepet a fokozott értónus fenntartásában.

8. kérdés

Opponensem észrevétele jogos, az értekezés 51B. ábráján “ET-1 + 5HD” helyett “ET-1 + Apo” felirat szerepel helytelenül, elnézést kérek a figyelmetlenségemért.

9. kérdés

Bírálóm utolsó kérdése az általunk vizsgált kardiokinek lehetséges alkalmazhatóságára vonatkozott a szívelégtelenség kezelésében. Jelenlegi ismereteim alapján az apelint tartom a legigéretesebbnek ebből a szempontból. Szívelégtelenség preklinikai modelljeiben az apelin fokozta a bal kamrai kontraktilitást, csökkentette az elő- és utóterhelést, a hemodinamikai hatásokon túl, hosszabb távon mérsékelte a szívhipertrófiát, az apoptózist és az intersticiális fibrózist, valamint elősegítette az angiogenezist a miokardiumban (Perjés és mtsai, 2013). A preklinikai adatokkal összhangban, stabil krónikus szívelégtelen betegekben, a jelenleg elérhető optimális gyógyszeres kezelés mellett, az apelin akut intravénás infúziója kedvező hemodinamikai változásokat hozott létre (Japp és mtsai, 2010). Továbbá, szívelégtelen egyénekben elnyújtott, 6 órás apelin infúzió hatására, a kezelés időtartama alatt tartósan javult a balkamra-funkció, miközben az artériás középnyomás illetve a szívfrekvencia minimálisan változott csupán (Barnes és mtsai, 2013). Még nem rendelkezünk non-peptid apelinreceptor-agonistákkal, melyek alkalmazhatóak lennének hosszú távú kezelés céljából. Ugyanakkor felvetődik az apelin kezelés lehetősége akut szívelégtelenségben, rövid távú intravénás infúzió formájában. Az európai és észak-amerikai irányelvek az inotrop terápiát az akut szívelégtelenség szindróma alacsony perctérfogattal jellemezhető, alacsony szisztolés vérnyomással társuló verziójában ajánlják a szöveti hipoperfúzió javítása céljából. Definíciótól függően az akut szívelégtelen betegek 10-20%-a tartozik ezen csoportba, akik esetében rendkívül magas a halálozás és a rehospitalizáció aránya (McMurray és mtsai, 2012; Yancy és mtsai, 2013). A jelenleg széles körben elérhető inotrop szerek, mint a β-AR-agonisták és a foszfodiészteráz-gátlók, annak ellenére, hogy képesek javítani a hemodinamikai státuszt, növelik a mortalitást (Cuffe és mtsai, 2002; Felker és mtsai, 2003; Bayram és mtsai, 2005). Ebben a speciális betegcsoportban az ideális szernek oly módon kéne

fokoznia a perctérfogatot, hogy ne növekedjék a miokardium oxigénfogyasztása, ne társuljon hozzá a vérnyomás további csökkenése, a koronáriaperfúzió romlása, a miokardium apoptotikus illetve nekrotikus károsodása, ritmuszavarok, valamint a vesefunkció beszűkülése (De Luca és mtsai, 2008). A probléma komolyságát jelzi, hogy a számos kritériumnak megfelelő Ca^{2+}-érzékenyítő levosimendan, a REVIVE tanulmányok szerint, javította az akut szívelégtelen betegek tüneteit, azonban a <100 Hgmm-es kezdeti szisztolés vérnyomással rendelkezők között növelte a mortalitás kockázatát (Packer és mtsai, 2013). Az apelinnel folytatott, fent említett, első klinikai vizsgálatok (Japp és mtsai, 2010; Barnes és mtsai, 2013) alapján a kardiokin bizonyos elvárásoknak megfelelni látszik, a perctérfogat emelkedését nem követte hipotenzió illetve a szívfrekvencia növekedése, nem észleltek ritmuszavarokat, valamint preklinikai modelleken nyert adatok szerint a peptid kardioprotektív hatású (Wang és mtsai, 2013). Ugyanakkor tisztázandó többek között, hogy a kardiokin miként befolyásolja a szív oxigénigényét, a kamrai relaxációt, valamint a kamrafal tágulékonyságát. Kérdéses továbbá, hogy a rövid távú kezelés, a hemodinamikai változások mellett, képes-e hosszabb távon is jelentkező adaptációs folyamatokat kiváltani, mint a szívhipertrófia és az intersticiális fibrózis csökkentése, valamint az angiogenezis serkentése, melyek potenciálisan hozzájárulhatnak a magas mortalitás és rehospitalizáció csökkenéséhez ebben a rendkívül esendő betegcsoportban.

Végezetül szeretném ismételten megköszönni Professzor Asszonynak az értekezésem tanulmányozására fordított idejét, értékes bírálatát, szakértő kérdéseit. Köszönöm, hogy a nyilvános védés kitűzését javasolta. Egyúttal kérem Professzor Asszonyt válaszaim elfogadására.

2014. 07. 22.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Szokodi István
doktorjelölt

Referenciák

Auger-Messier M, Accornero F, Goonasekera SA, Bueno OF, Lorenz JN, van Berlo JH, Willette RN, Molkentin JD. Unrestrained p38 MAPK activation in Dusp1/4 double-null mice induces cardiomyopathy. *Circ Res*. 2013; 112: 48-56.

Autelitano DJ. Cardiac expression of genes encoding putative adrenomedullin/calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 250: 689-93.

Barnes GD, Alam S, Carter G, Pedersen CM, Lee KM, Hubbard TJ, Veitch S, Jeong H, White A, Cruden NL, Huson L, Japp AG, Newby DE. Sustained cardiovascular actions of APJ agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2013; 6: 482-91.

Bayram M, De Luca L, Massie MB, Gheorghiade M. Reassessment of dobutamine, dopamine, and milrinone in the management of acute heart failure syndromes. *Am J Cardiol*. 2005; 96: 47G-58G.

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, 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: 6341-50.

Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*. 2002; 91: 776-81.

Chan JY, Takeda M, Briggs LE, Graham ML, Lu JT, Horikoshi N, Weinberg EO, Aoki H, Sato N, Chien KR, Kasahara H. Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ Res*. 2008; 102: 571-80.

Ceraudo E, Galanth C, Carpentier E, Banegas-Font I, Schonegge AM, Alvear-Perez R, Iturrioz X, Bouvier M, Llorens-Cortes C. Biased signaling favoring Gi over β-arrestin promoted by an apelin fragment lacking the C-terminal phenylalanine. *J Biol Chem*. 2014 (in press).

Cheng H, Force T. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ Res*. 2010; 106: 21-34.

Cuffe MS, Califf RM, Adams KF Jr, Benza R, Bourge R, Colucci WS, Massie BM, O'Connor CM, Pina I, Quigg R, Silver MA, Gheorghiade M. Short-term intravenous milrinone for acute exacerbation of chronic heart failure: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002; 287: 1541-7.

De Luca L, Mebazaa A, Filippatos G, Parissis JT, Böhm M, Voors AA, Nieminen M, Zannad F, Rhodes A, El-Banayosy A, Dickstein K, Gheorghiade M. Overview of emerging pharmacologic agents for acute heart failure syndromes. *Eur J Heart Fail*. 2008; 10: 201-13.

Dzimiri N. Regulation of beta-adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev*. 1999; 51: 465-501.

Eguchi S, Hirata Y, Kano H, Sato K, Watanabe Y, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F. Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1994; 340: 226-30.

Entzeroth M, Doods HN, Wieland HA, Wienen W. Adrenomedullin mediates vasodilation via CGRP1 receptors. *Life Sci*. 1995; 56: 19-25.

Felker GM, Benza RL, Chandler AB, Leimberger JD, Cuffe MS, Califf RM, Gheorghiade M, O'Connor CM. Heart failure etiology and response to milrinone in decompensated heart failure: results from the OPTIME-CHF study. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 997-1003.

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.

Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron KM. Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol*. 2007; 21: 783-96.

Hanze J, Dittrich K, Dotsch J, Rascher W. Molecular cloning of a novel human receptor gene with homology to the rat adrenomedullin receptor and high expression in heart and immune system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 240: 183-188.

Hay DL, Howitt SG, Conner AC, Schindler M, Smith DM, Poyner DR. CL/RAMP2 and CL/RAMP3 produce pharmacologically distinct adrenomedullin receptors: a comparison of effects of adrenomedullin22–52, CGRP8–37 and BIBN4096BS. *Br J Pharmacol*. 2003; 140: 477-86.

He J, Pi Y, Walker J, Kamp T. Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type Ca currents by activation of PKC in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 2000; 524: 808-20.

Ikeda U, Kanbe T, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Adrenomedullin augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *Circulation*. 1996; 94: 2560-5.

Japp AG, Cruden NL, Barnes G, van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, Johnston NR, Denvir MA, Megson IL, Flapan AD, Newby DE. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2010; 121: 1818-27.

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. p38α 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.

Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res*. 2000; 87: 1095-102.

Kapas S, Catt KJ, Clark AJ. Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem*. 1995a; 270: 25344-7.

Kapas S, Clark AJ. Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995b; 217: 832-8.

Kehat I, Davis J, Tiburcy M, Accornero F, Saba-El-Leil MK, Maillet M, York AJ, Lorenz JN, Zimmermann WH, Meloche S, Molkentin JD. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ Res*. 2011; 108: 176-83.

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.

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: 12283-8.

Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW 2nd. Early and delayed consequences of β_2-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation*. 2000; 101: 1707-14.

Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouyssegur J, Pages G, De Windt LJ, Doevendans PA, Molkentin JD. MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*. 2004; 109: 1938-41.

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.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998; 393: 333-9.

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012; 33: 1787-847.

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.

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).

O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S. Interaction of alpha$_1$-adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca^{2+} channel. *Circ Res*. 2008; 102: 1378-88.

Packer M, Colucci W, Fisher L, Massie BM, Teerlink JR, Young J, Padley RJ, Thakkar R, Delgado-Herrera L, Salon J, Garratt C, Huang B, Sarapohja T; REVIVE Heart Failure Study Group. Effect of levosimendan on the short-term clinical course of patients with acutely decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol HF*. 2013; 1: 103-11.

Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res*. 2005; 96: 756-66.

Perjés Á, Farkasfalvi K, Ruskoaho H, Szokodi I. Apelin. In: Handbook of Biologically Active Peptides, ed. Kastin A, Academic Press, 2013; 1377-85.

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 Cε- 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.

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.

Takeishi Y, Ping P, Bolli R, Kirkpatrick DL, Hoit BD, Walsh RA. Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase Cε causes concentric cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2000; 86: 1218-23.

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.

Tenhunen O, Soini Y, Ilves M, Rysä J, Tuukkanen J, Serpi R, Pennanen H, Ruskoaho H, Leskinen H. p38 Kinase rescues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and anti-apoptotic mechanisms. *FASEB J*. 2006; 20: 1907-9.

Venema RC, Raynor RL, Noland TA, Kuo JF. Role of protein kinase C in the phosphorylation of cardiac myosin light chain 2. *Biochem J*. 1993; 294: 401-6.

Wang W, McKinnie SM, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabyeyev P, Das SK, Basu R, McLean B, Kandalam V, Penninger JM, Kassiri Z, Vederas JC, Murray AG, Oudit GY. Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000249.

Westermann D, Rutschow S, Van Linthout S, Linderer A, Bücker- 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.

WRITING COMMITTEE MEMBERS, Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013; 128: e240-327.

Zhang H, Chen X, Gao E, MacDonnell SM, Wang W, Kolpakov M, Nakayama H, Zhang X, Jaleel N, Harris DM, Li Y, Tang M, Berretta R, Leri A, Kajstura J, Sabri A, Koch WJ, Molkentin JD, Houser SR. Increasing cardiac contractility after myocardial infarction exacerbates cardiac injury and pump dysfunction. *Circ Res*. 2010; 107: 800-9.

Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014; 11: 385-400.