

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



**Ivana Karlovská**

**Signální systém adenylylcyklázy v normálním a selhávajícím myokardu**

The adenylyl cyclase signaling system in normal and failing myocardium

**Bakalářská práce**

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, .....

Podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho pomoc a čas, který mi věnoval při tvorbě této práce. Také děkuji svým rodičům a sourozencům za podporu a povzbuzení.

## Abstrakt

Tato práce popisuje signální systém adenylycyklázy, který hraje klíčovou úlohu v modulaci srdečního rytmu a síly kontrakce. Na počátku dráhy jsou membránově vázané adrenergní receptory spřažené s G proteiny, které aktivují membránový enzym adenylycyklázu. Adenylycykláza pak produkuje sekundární posly přeměnou ATP na cAMP. V selhávajícím srdci dochází k různým změnám v této dráze. Nejvýraznějšími změnami prochází  $\beta$ -adrenergní receptory, ale k určitým změnám dochází i na úrovni adenylycyklázy a G proteinů. Většina změn je spojena s dlouhodobě vysokými hladinami katecholaminů, zejména noradrenalinu, jehož škodlivé efekty se snaží zvrátit některá léčiva. Tradičními léky jsou blokátory  $\beta$ -adrenergních receptorů. Pro farmakoterapeutické účely však přicházejí v úvahu také nové léky zaměřené na adenylycyklázu.

Klíčová slova: Adenylycykláza, adrenergní receptory, adrenergní signalizace, srdce, srdeční selhání

## Abstract

This bachelor thesis describes a signal pathway of adenylyl cyclase, which plays a key role in the modulation of heart rate and force of contraction. This pathway begins with membrane-bound  $\beta$ -adrenergic receptors that activate the enzyme adenylyl cyclase. Adenylyl cyclase produces second messengers by reverting ATP to cAMP. Several changes occur in this pathway in failing heart. The most striking changes occur in  $\beta$ -adrenergic receptors, but there are some changes on the level of adenylyl cyclase and G proteins as well. Most of these changes are related to chronic high levels of catecholamines, especially norepinephrine. Some medications try to reverse these adverse effects of norepinephrine.  $\beta$ -blockers are traditional drugs for treating heart failure. However, adenylyl cyclase may be also considered as potential target for pharmacotherapeutic interventions in the future.

Key words: Adenylyl cyclase, adrenergic receptors, adrenergic signaling, heart, heart failure

# Obsah

Seznam zkratk	2
1. Úvod	2
2. Signální kaskáda adenylylcyklázy	3
3. Adrenergní receptory	4
3.1. $\alpha$ -AR	4
3.2. $\beta$ -AR	5
3.2.1. Klasifikace $\beta$ -AR	5
3.2.2. $\beta_1$ -AR versus $\beta_2$ -AR	5
4. G proteiny	7
4.1. Klasifikace G-proteinů	7
5. Adenylylcykláza	8
5.1. Struktura membránově vázaných AC	9
5.2. Izoformy AC	10
5.2.1. Regulace izoform AC	10
5.2.2. Srdeční izoformy	11
6. cAMP a PKA a PDE	12
7. Srdeční selhání – příznaky a příčina	13
8. Změny v signálním systému	14
8.1. Změny v $\beta$ -adrenergní signalizaci	14
8.1.1. Krátkodobá desenzitizace	15
8.1.2. Dlouhodobá desenzitizace	17
8.2. $\beta$ -AR polymorfismus	17
8.3. Změny v $\alpha$ -adrenergní signalizaci	18
8.4. Změny na úrovni adenylylcyklázy	18
9. Léčba srdečního selhání	21
9.1. $\beta$ -blokátory	21
9.2. AC inhibitory	22
9.3. $\alpha_1$ -AR agonisté	23
10. Závěr	24

## Seznam zkratek

**ACE inhibitor** – inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu

**AKAP** – enzym kotvící kinázu A

**AMP** – adenosinmonofosfát

**AR** – adrenergní receptory

**ATP** – adenosintrifosfát

**CaMK II** – Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin dependentní proteinkináza

**cAMP** – cyklický adenosinmonofosfát

**cGMP** – cyklický guanosinmonofosfát

**CRT** – srdeční resynchronizační terapie

**DAG** – diacylglycerol

**ERK** – kináza regulovaná extracelulárním signálem

**GPCR** – receptory spřažené s G proteiny

**GRK** – kináza receptorů spřažených s G proteiny

**GTP** – guanosintrifosfát

**IP<sub>3</sub>** – inositoltrifosfát

**LDL** – lipoproteiny o nízké hustotě

**MANT** – 2'(3')-O-N-methylanthraniloyl

**MAPK** – mitogenem aktivovaná kináza

**MEK** – kináza mitogenem aktivované kinázy

**MnSOD** – manganová superoxiddismutáza

**mRNA** – messengerová ribonukleová kyselina

**NE** – noradrenalin

**PKA** – proteinkináza A

**PKC** – proteinkináza C

**PPi** – pyrofosfát

**SNP** – jednonukleotidový polymorfismus

**βARK** – kináza β-adrenergních receptorů

**PIP<sub>2</sub>** – fosfoinositol-bisfosfát

# 1. Úvod

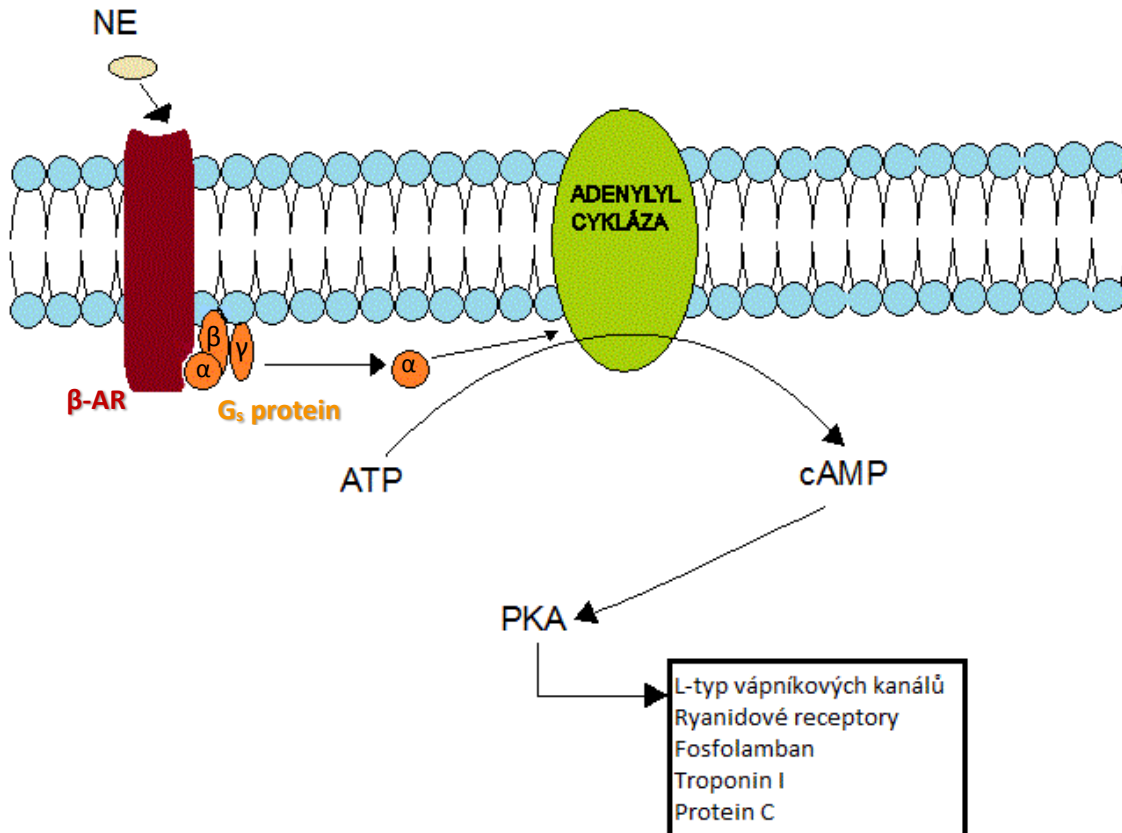
V dnešní době stoupá výskyt srdečních onemocnění, která mohou vyústit až do srdečního selhání. Jednou z hlavních příčin je současný životní styl, ve kterém je stres na denním pořádku a naopak dostatek pohybu a vyvážená strava spíše chybí. Tyto faktory často i v kombinaci s alkoholem či kouřením pak vedou k obezitě, zvýšení krevního tlaku, zvýšení LDL cholesterolu apod., a tím se výrazně zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a tedy i srdečního selhání. Kromě toho však může za vzestup pacientů s chronickým selháním také fakt, že se zlepšila léčba akutních poruch (například infarktu myokardu), a této chronické fáze se tak dožívá více lidí.

Při srdečním selhání dochází v těle k mnoha změnám. Zadržování vody a následná tvorba otoků je příklad jedné ze změn, na kterou jsou cílena různá léčiva. K zásadním změnám dochází v srdci kvůli zvýšenému výlevu katecholaminů. Ty jsou vyplavovány ve větší míře, aby podpořily funkci srdce, ale při dlouhodobém působení mají velmi škodlivé účinky. Adenylylcyklázový signální systém má klíčovou úlohu v řízení srdeční činnosti a chronickým vystavením vysokým hladinám katecholaminů dochází v tomto systému k řadě změn, které mají za následek výrazné zhoršení funkce srdce. Signálnímu systému adenylylcyklázy, jeho změnám při srdečním selhání a případnému využití jeho složek při cílené léčbě srdečního selhání se věnuje v této práci.



## 2. Signální kaskáda adenylylcyklázy

Základní funkcí adenylylcyklázového signálního systému je zprostředkování adekvátní odpovědi na extracelulární stimuly. Dráha začíná adrenergními receptory (Obrázek 1), které zachycují signální molekuly – katecholaminy. Po navázání změní konformaci a díky těsnému spřažení s příslušným G proteinem indukují konformační změnu i v jeho molekule (Ghanouni et al. 2001). Díky tomu je  $\alpha$  podjednotce G proteinu umožněno navázání GTP, čímž podjednotka ztratí afinitu k dimeru  $\beta\gamma$ , uvolní se, a může tak aktivovat adenylylcyklázu (AC). Aktivovaná adenylylcykláza přeměňuje ATP na druhého posla cAMP. cAMP se pak váže na regulační podjednotku proteinkinázy A a tím je umožněno odštěpení katalytické podjednotky, která fosforyluje proteiny nezbytné pro spřažení excitace a kontrakce myokardu (Bers 2002).



*Obrázek 1: Signální systém adenylylcyklázy*

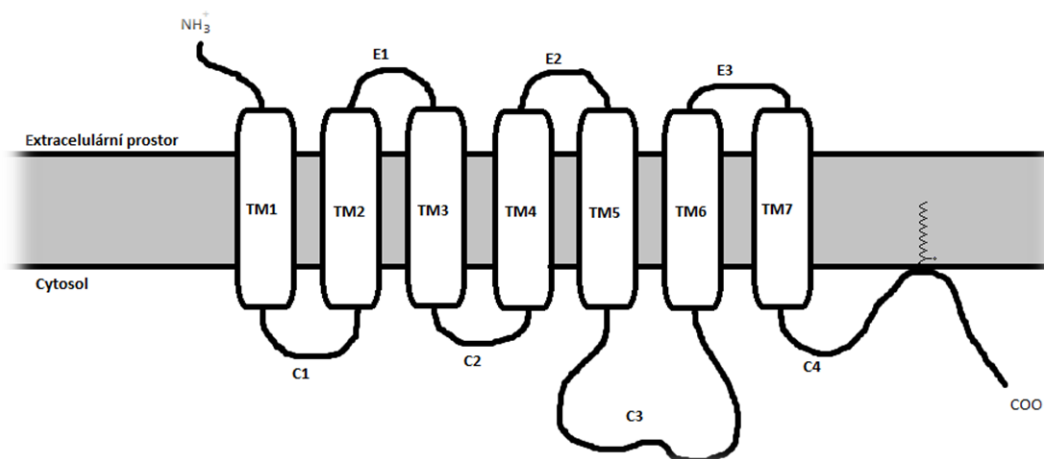
NE – noradrenalin;  $\beta$ -AR –  $\beta$ -adrenergní receptor; PKA – proteinkináza A

(upraveno podle: <http://www.bioscience.org/2007/v12/af/2077/fig3.jpg>)

### 3. Adrenergní receptory

Rozlišujeme  $\alpha$ - a  $\beta$ -adrenergní receptory (AR). Ty mají různou aminokyselinovou sekvenci, odlišné signální kaskády a jiné druhé posly. Oba typy adrenergických receptorů patří do velké skupiny receptorů spřažených s G proteiny (Obrázek 2). GPCR se vyznačují podobnou strukturou charakterizovanou přítomností 7 transmembránových úseků složených z 20-24 aminokyselin uspořádaných do  $\alpha$  helixů, dále mají tři cytosolické a tři extracelulární úseky (Albert a Litman 1978). C-konec je orientován dovnitř buňky a N-konec je extracelulárně (Hargrave a Fong 1977).

Identifikováno bylo přes 800 lidských receptorů spřažených s G proteiny (Fredriksson et al. 2003).



*Obrázek 2: Obecná struktura GPCR*

TM – transmembránové úseky; C – cytosolické úseky; E – extracelulární úseky

(upraveno podle: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:GPCR.png>)

#### 3.1. $\alpha$ -AR

$\alpha$ -Adrenergní receptory jsou spřažené hlavně s G proteiny třídy Gq/11 (Wu et al. 1992), které aktivují fosfolipázu C nebo A<sub>2</sub>, případně se spřahují také s Gs a Gi/o proteiny (Eason et al. 1992) nebo mohou přímo ovlivňovat vápníkové kanály (Minneman 1988).  $\alpha$ -AR vyvolávají pozitivní ionotropní efekt přes fosfolipázu C, která katalyzuje vznik druhých poslů IP<sub>3</sub>, DAG.  $\alpha$ -AR jsou přes MAPK (mitogen-activated protein kinase) také spojeny s regulací růstu buňky (Hu et al.

1999). Tyto kinázy fosforylují další proteiny, zejména transkripční faktory, které mají vliv na růst buňky.

Původně se  $\alpha$ -AR dělily pouze na  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ , tyto receptory však vykazují daleko vyšší heterogenitu, takže dnes známe minimálně 3 podtypy  $\alpha_1$ -AR (1A, AB, 1D) a 3 podtypy  $\alpha_2$ -AR (2A, 2B, 2C) (Piascik a Perez 2001). Jednotlivé podtypy těchto receptorů se liší například efektivitou, se kterou se spřahují s různými signálními dráhami nebo tkáňovou distribucí. V srdci se nachází hlavně  $\alpha_{1A}$ - a  $\alpha_{1B}$ -AR, zatímco  $\alpha_{1D}$ -AR je dominantním typem především v koronárních arteriích (Jensen et al. 2009).

$\alpha_1$ -AR se nacházejí v pravé i levé srdeční komoře, avšak v nižším počtu než  $\beta$ -AR.  $\alpha_2$ -AR se vyskytují pravděpodobně převážně v pravých srdečních síních na presynaptické membráně, kde inhibují výlev katecholaminů (Berthelsen a Pettinger 1977; Rump et al. 1995).

## 3.2. $\beta$ -AR

Na počátku nejmocnějšího mechanismu, díky kterému může srdce rychle odpovídat na aktuální potřeby organismu, stojí  $\beta$ -adrenergní receptory.

### 3.2.1. Klasifikace $\beta$ -AR

Známe tři podtypy  $\beta$ -AR v srdci, jsou jimi  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - a  $\beta_3$ -AR. Stimulace  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR vede ke zvýšení ionotropie, lusitropie a chronotropie (Xiao a Lakatta 1993).  $\beta_3$ -AR jsou pouze minoritní složkou a jejich funkce není zcela známá. Při stimulaci  $\beta_3$ -AR v komorách lidského srdce se snižuje síla kontrakce pomocí mechanismů závislých na  $G_i$ , ačkoliv při zvýšené expresi  $\beta_3$ -AR se síla kontrakce naopak zvýšila (Xiang a Kobilka 2003). Navíc zřejmě mohou mít  $\beta_3$ -AR úlohu při metabolismu a také při diabetu (Widén et al. 1995).

### 3.2.2. $\beta_1$ -AR versus $\beta_2$ -AR

$\beta_1$ -AR mají ve zdravém dospělém srdci převahu nad  $\beta_2$ -AR, ale poměr mezi nimi je u různých druhů různý. Tyto receptory jsou spřažené výhradně s  $G_s$  proteiny, na rozdíl od  $\beta_2$ -AR, které jsou spřaženy nejen s  $G_s$  proteiny, ale také s  $G_i$  proteiny (Xiao a Lakatta 1995)

U těchto receptorů byly pozorovány odlišné účinky na život buněk. Zatímco  $\beta_1$ -AR mohou indukovat apoptózu,  $\beta_2$ -AR mají díky spřažení s Gi proteiny antiapoptotické účinky (Communal et al. 1999). Také jejich účinky na růst buňky se zdály být opačné. Stimulací  $\beta_1$ -AR vzniká hypertrofie myocytů (Schäfer et al. 2000),  $\beta_2$ -AR však měly hypertrofiím naopak zabraňovat. Tyto závěry však byly později vyvráceny. Dřívější studie totiž sledovaly mladé buňky in vitro, ale při použití transgenických myší bylo zjištěno, že u starších buněk vede také stimulace  $\beta_2$ -AR k rozvoji kardiomyopatií a k apoptóze (Du et al. 2000).

Vznik hypertrofie není závislý na klasické dráze s cAMP a PKA, ale je nutná jiná signální dráha a aktivace tyrozinkinázy a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dependentní kinázy II (CaMK II) (Zheng et al. 2004). Existuje také souvislost vzniku hypertrofie se spřažením  $\alpha_{1A}$ -AR s Gq proteinem (Mende et al. 1998).

GPCR obecně existují ve dvou stavech: inaktivovaném a aktivovaném. Do aktivovaného stavu se dostávají po navázání ligandu, mohou se však aktivovat i spontánně bez přítomnosti ligandu. Rovnováha mezi těmito dvěma stavy určuje hodnotu bazální aktivace receptoru.  $\beta_2$ -AR mají díky své struktuře relativně vysokou bazální aktivitu (Rasmussen et al. 2007) a jejich konformace tak můžou být funkčně odlišné v závislosti na tom, jestli byl receptor aktivován ligandem nebo spontánně. Naopak  $\beta_1$ -AR vykazují velmi slabou nebo vůbec žádnou spontánní aktivitu (Zhou et al. 2000).

Některé studie ukazují, že stimulace přes  $\beta_2$ -AR v mnoha savčích myokardiocytech specificky ovlivňuje sarkolemální  $\text{Ca}^{2+}$  pumpu L-typu bez aktivace ostatních regulačních proteinů (Xiao et al. 1994). Zdá se totiž, že  $\beta_2$ -AR mohou působit jiným mechanismem než přes signální kaskádu s cAMP, díky čemuž se zvyšuje vápníkový proud a amplituda kontrakce bez navyšování hladin cAMP (Xiao et al. 1994). Na druhou stranu další experimenty ukázaly, že na rozdíl od jiných savců, v pravých lidských srdečních síních zvyšuje  $\beta_2$ -AR stimulace intracelulární cAMP a PKA-dependentní fosforylaci regulačních proteinů (fosfolamban, troponin I, C protein) podobně, jako je tomu u  $\beta_1$ -AR stimulace (Kaumann et al. 1996). Kromě toho při signalizaci přes  $\beta_2$ -AR nehrozí vznik  $\text{Ca}^{2+}$  oscilací, které mohou vést k arytmiím, případně až k náhlému úmrtí. Naopak stimulace  $\beta_1$ -AR může iniciovat vznik spontánních oscilací vápníku v diastole, které poté mohou vyvolávat spontánní kontraktlní vlny (Xiao a Lakatta 1993).

## 4. G proteiny

G proteiny, proteiny vázající guanosinové nukleotidy, jsou trimerní proteiny, které fungují jako přenašeče mnohých stimulů z vnějšího prostředí buňky dovnitř buňky (Freissmuth et al. 1989). V srdci přenášejí G proteiny signál například z  $\beta$ -adrenergických receptorů a aktivují adenylcyklázu. Jsou složeny ze tří podjednotek: největší je  $\alpha$  podjednotka,  $\beta$  a  $\gamma$  vytvářejí stabilní heterodimer.

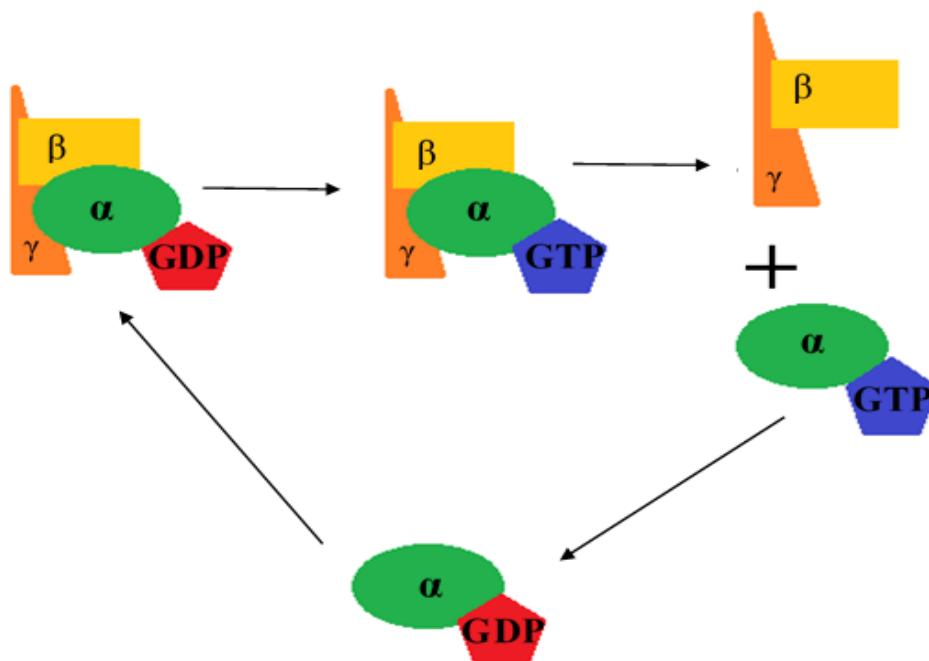
$\alpha$  podjednotka má GTPázovou aktivitu a je příbuzná malým monomerním G proteinům, které se také účastní velkého množství regulačních funkcí v buňce. Při přijetí signálu se na molekule G proteinu indukuje konformační změna, která umožní  $\alpha$  podjednotce uvolnit GDP a nahradit ho GTP (Obrázek 3). Podjednotka s navázaným GTP má malou afinitu k  $\beta\gamma$ , a tak se uvolní od  $\beta\gamma$  a aktivuje membránově vázanou adenylcyklázu. Po chvíli díky svojí GTPázové aktivitě  $\alpha$  podjednotka rozštěpí navázané GTP na GDP a fosfát, čímž se  $\alpha$  podjednotka "vypne", je ukončen přenos signálu a  $\alpha$  podjednotka má opět vysokou afinitu k  $\beta\gamma$  a může tak opět vzniknout heterotrimer.

Podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$  se drží pohromadě a pomocí lipidických modifikací jsou připevněny k plazmatické membráně. Nejenom že zprostředkovávají kontakt s receptorem, ale také mohou aktivovat různé signální kaskády a efektorové proteiny. Například adenylcyklázu mohou aktivovat (AC typu 2, 4, 7) nebo inhibovat (AC typu 1, 5, 6), (Tang a Gilman 1991), (Bayewitch et al. 1998). Podjednotky  $G\beta\gamma$  také ovlivňují dovnitř usměrňující draslíkové kanály (Huang et al. 1995).

### 4.1. Klasifikace G proteinů

Rodina G proteinů je složena ze dvou hlavních typů. Ty, které stimulují aktivitu adenylcyklázy ( $G_s$ ) a ty, které její funkci inhibují ( $G_i$ ). Existují však i další typy G proteinů, jako například  $G_o$ ,  $G_h$  a nebo  $G_q$ , jejichž funkce není primárně spojena s adenylcyklázou. I  $G_q$  proteiny jsou však nepřímo zapojeny do regulace AC, protože jejich působením je aktivována fosfolipáza C, která rozštěpí  $PIP_2$  na  $IP_3$  a DAG.  $IP_3$  se pak váže na  $IP_3$  receptor na sarkoplazmatickém retikulu a uvolňuje tak do cytosolu vápenaté kationty, které se následně váží na kalmodulin a proteinkinázu C, která může ovlivňovat AC (Schulze a Buchwalow 1998).

Gs proteiny aktivují adenylylcyklázu přijetím signálu od  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -adrenergních receptorů. Kromě toho také zprostředkovávají modulaci napěťově ovládaných iontových kanálů (Huang et al. 1995).



*Obrázek 3: Aktivační cyklus G proteinu*

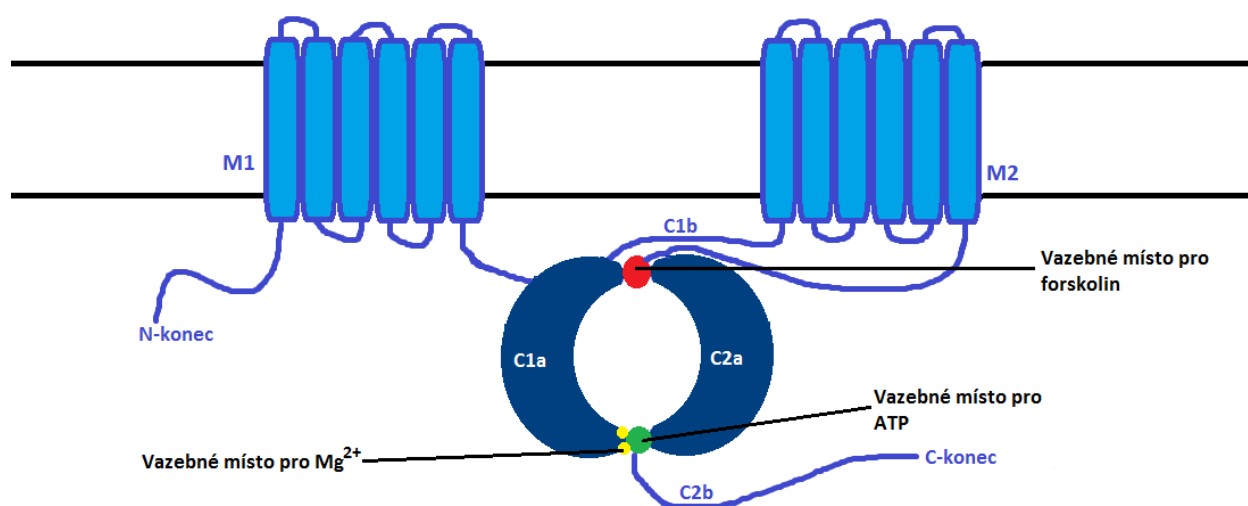
$\alpha$  podjednotka  $G_i$  proteinů může inhibovat vybrané izoformy AC, AC3 a částečně AC1, ale především izoformy AC5 a AC6, vyskytující se v srdci jako hlavní izoformy tohoto enzymu (Chen a Iyengar 1993). Ostatní izoformy jsou k  $G_i\alpha$  necitlivé.  $G_i\alpha$  se váže na adenylylcyklázu do štěrbin v C1 doméně (analogicky k vazebnému místu pro  $G_s\alpha$  na C2 doméně), (Dessauer et al. 1998; Tesmer et al. 1997).

## 5. Adenylylcykláza

Adenylylcykláza je membránově vázaný enzym, je to ATP-pyrofosfát lyáza, která přeměňuje ATP na cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP) a pyrofosfát (PPi). Molekulová hmotnost savčích adenylylcykláz se pohybuje v rozmezí 110 – 120 kDa (Schulze a Buchwalow 1998). Je to

efektorová molekula adrenergní signalizace, která hraje klíčovou roli ve schopnosti srdce reagovat na potřeby těla zvýšením kontraktility, srdeční relaxace a diastolické funkce levé komory srdeční. Nachází se většinou na cytoplazmatické membráně buňky, ale některé experimenty poukázaly na možnou lokalizaci AC i na membráně sarkoplazmatického retikula (Fujimoto a Ogawa 1982).

Známe 9 genů kódujících membránově vázané AC a jeden gen pro solubilní AC. Membránově vázané AC hrají důležitou roli v buněčné odpovědi na extracelulární signály. Jsou regulované trimerními G proteiny. Solubilní forma AC je přímo aktivována vápníkem a buněčnými metabolity a ATP a její funkce je zřejmě v roli intracelulárního metabolického senzoru (Buck et al. 1999).



**Obrázek 4:** Struktura membránově vázané adenylylcyklázy

(upraveno podle: Pierre et al. 2009)

### 5.1. Struktura membránově vázaných AC

Struktura membránově vázaných AC (Obrázek 4) se skládá z N-konce, dvou repetitivních transmembránových domén a z cytoplazmatické domény (Krupinski et al. 1989). Transmembránová část je tvořena 12 hydrofobními helixy uspořádanými do dvou setů po šesti helixech, které jsou odděleny velkou hydrofilní cytoplazmatickou doménou. Tato hydrofilní doména je tvořena dvěma intracelulárními laloky, označovanými jako C1 a C2. Části cytoplazmatických domén (C1a a C2a) jsou homologní a tvoří vazebné a katalytické místo pro nukleotidy, tzv. P-site. Tyto části jsou tvořené asi 230 aminokyselinami, které jsou až z 50% stejné. Oblast vázající fosfát obsahuje ionty

kovů, většinou  $Mg^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$ . Oblast, kam se váže purinový kruh, obsahuje vodíkový můstek důležitý pro správné připojení adenosinu (Wang et al. 2007). N-konec proteinu a C-konce C1 a C2 domén jsou velmi variabilní a liší se u jednotlivých izoform i u různých druhů.

Struktura katalytického místa AC je důležitá z farmaceutického hlediska, protože může být cílem kompetitivních (MANT) nebo nekompetitivních (P-site) inhibitorů. Ve vazebných místech hrají důležitou roli některé aminokyselinové zbytky. Podílejí se jak na upevnění vazby, tak na katalytické aktivitě. Na C1 doméně v P-smyčce (vazebné místo pro trifosfát) je tak například důležitá NH skupina threoninu (v pozici 401), která slouží při navázání trifosfátu jako donor vodíku. Nepochybně jsou zde ionty kovů, nejčastěji hořečnaté nebo manganaté kationty. Přes van der Waalsovy interakce se vazby účastní také izoleucin (397) a alanin (385). Vazebné místo pro purinový kruh obsahuje aminokyselinové zbytky, účastníci se elektrostatických interakcí a zbytky s amidovými skupinami, které se účastní tvorby vodíkových můstků (Wang et al. 2007).

## 5.2. Izoformy AC

Každá izoforma AC je charakterizována různými biochemickými vlastnostmi a tkáňovou distribucí (Iyengar 1993). V srdci je tak důležitá AC5, která je inhibována již mikromolárními koncentracemi vápníku (Katsushika et al. 1992), zatímco například v nervové tkáni jsou hlavními izoformami kalmodulin-senzitivní AC1 a AC8 (Mollner a Pfeuffer 1988). Dále byly jednotlivým izoformám přisouzeny některé konkrétní účely, například AC1 a AC8 jsou exprimovány hlavně v mozku a jejich předpokládaná funkce je v učení a paměti (Xia et al. 1993; Wang et al. 2003), AC3 je produkována především v čichovém epitelu a její funkcí je tedy zprostředkování informace přenášené odoranty (Bakalyar a Reed 1990).

### 5.2.1. Regulace izoform AC

Savčí izoformy AC se více nebo méně odlišují v aminokyselinovém složení, mají každá unikátní způsob regulace a tradičně jsou rozdělovány do čtyř skupin (Tabulka 1), (shrnutí v Hanoune a Defer 2001). Všechny izoformy jsou aktivovány  $\alpha$  podjednotkou Gs proteinu a většinou také forskolinem (rostlinný extrakt používaný v tradiční medicíně, který přímo stimuluje adenylcyklázu). Inhibovány jsou P-site inhibitory a velkými, nefyziologickými koncentracemi vápníku, který kompetuje s  $Mg^{2+}$  v aktivním místě. Další látky již nejsou tak jednoznačné.



Podjednotka  $G\beta\gamma$  (Tang a Gilman 1991) působí stimulačně na skupinu 2 (AC typu 4, 2, 7), ale inhibičně na AC5 a AC1. Podobně proteinkináza C stimuluje AC7 a AC2, ale inhibuje AC6.

**Tabulka 1:** Regulace a tkáňová distribuce izoform AC

(upraveno z: Pavan et al. 2009)

Izoforma	Skupina	Aktivátory	Inhibitory	Tkáňová distribuce
AC1	1	$G\alpha$ , FSK, $Ca^{2+}/CaM$	$G_i\alpha$ , $G\beta\gamma$ , CaM kináza IV, P-site analogy	mozek, rohovka
AC3			CaM kináza II, P-site analogy	čichové neurony, mozek
AC8			P-site analogy	mozek
AC2	2	$G\alpha$ , FSK, $G\beta\gamma$ , PKC	P-site analogy	mozek, čichový bulbus
AC4		$G\alpha$ , FSK, $G\beta\gamma$ , PKC		ledviny, mozek, játra
AC7		$G\alpha$ , FSK, $G\beta\gamma$		plíce, srdce, ledviny, slezina
AC5	3	$G\alpha$ , FSK, PKC a PKC $\zeta$	$G_i\alpha$ , $G\beta\gamma$ , PKA, $Ca^{2+}$ , P-site analogy	mozek, srdce
AC6		$G\alpha$ , FSK	$G_i\alpha$ , PKA, PKC, $Ca^{2+}$ , P-site analogy	srdce, mozek, ledviny, varle, játra
AC9	4	$G\alpha$	Calcineurin, P-site analogy	kosterní svaly, mozek, plíce, játra

### 5.2.2. Srdeční izoformy

V srdci jsou hlavními izoformami AC5 a AC6 (Katsushika et al. 1992). V nižší míře však byly v srdečních komorách nalezeny všechny izoformy s výjimkou AC1 a AC8, které jsou exprimovány pouze v sinoatriálním uzlu (Mattick et al. 2007).

AC5 a AC6 jsou zařazovány do skupiny 3. Obě izoformy jsou (jako všechny ostatní) aktivovány  $G\alpha$  a fosforskolinem. AC5 je aktivována navíc některými formami PKC. Inhibují je  $G_i\alpha$ , PKA, P-site inhibitory. Na rozdíl od většiny izoform jsou tyto dvě inhibovány již nízkými (mikromolárními) koncentracemi vápníku, AC5 je inhibována i  $G\beta\gamma$  podjednotkou a AC6 navíc také fosforylací zprostředkovanou PKC (Guillou et al. 1999).

Pro správnou funkci srdce jsou důležité také AC izoformy 1 a 8. Jsou exprimovány v síních a v sino-atriálním uzlu, kde regulují L-typ vápníkových kanálů na plazmatické membráně. Na rozdíl

od ostatních izoforem jsou vápníkem stimulovány a hrají roli při regulaci pacemakingu (Collins a Terrar 2012; Mattick et al. 2007).

## 6. cAMP a PKA a PDE

Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát je druhý posel, důležitý v mnoha biologických pochodech, zejména v přenosu signálu. V adrenergní signalizaci zajišťuje aktivaci efektorového enzymu proteinkinázy A (PKA). PKA pak fosforyluje další proteiny důležité pro spojení excitace a kontrakce srdce – L-typ  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, ryanodinové receptory, fosfolamban, troponin I a protein C vázající myozin. Fosforylace vápníkových kanálů se uskutečňuje ve spolupráci s kotvícím proteinem AKAP (Gao et al. 1997) a způsobuje vyšší vtok vápníkových kationtů ze sarkoplazmatického retikula. Ryanodinové receptory představují další typ vápníkových kanálů, které se podílí na zvýšení přísunu vápníku do buňky, ačkoliv na jejich aktivaci se nepodílí jenom PKA, ale také CaMK II (Wehrens et al. 2004). Fosforylovaný fosfolamban zvyšuje sekvestraci vápníku zpět do sarkoplazmatického retikula pomocí vápníkové SERCA2 pumpy na SR, čímž se urychluje srdeční relaxace. Relaxaci napomáhá i fosforylace troponinu I, který urychluje disociaci vápníku z myofilament.

PKA je důležitá také pro negativní zpětnovazebnou regulaci. Dokáže fosforylovat  $\beta$ -AR, čímž způsobuje jejich desenzitizaci (Liggett et al. 1989). PKA reguluje také adenylycyklázu, fosforyluje AC5 na serinu blízko konce C1b domény, čímž snižuje její katalytickou aktivitu (Iwami et al. 1995). U dalších forem adenylycyklázy se v rámci regulace uplatňuje PKC a to jak pozitivně, tak negativně.

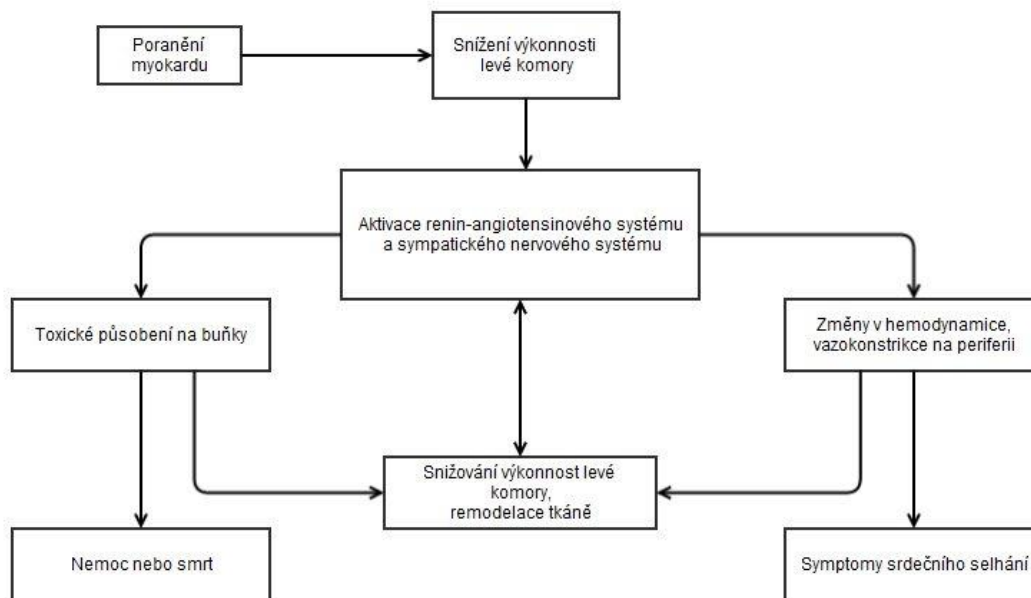
Hladina cAMP v buňce je závislá na rovnováze jeho tvorby adenylycyklázou a degradace pomocí fosfodiesterázy (PDE), která hydrolyzuje cAMP na 5'AMP. Fosfodiesterázy jsou rozděleny do 11 rodin, které se odlišují různými způsoby regulace a afinitou pro substrát cGMP nebo cAMP (Conti a Beavo 2007). V srdci se vyskytuje několik PDE, z nichž nejdůležitější úlohu hrají PDE2 a PDE3. Při zvýšených hladinách cAMP je však klíčovou formou PDE4 (Mika et al. 2013).

## 7. Srdeční selhání – příznaky a příčina

Srdeční selhání je časté onemocnění, které vzniká nejčastěji jako následek ischemické choroby srdeční a kardiomyopatie. Příčinou však mohou být i jiné kardiovaskulární choroby, například chlopenní vady nebo hypertenze. Tato porucha postihuje především starší osoby, více muže než ženy (Strömberg a Mårtensson 2003).

Příznaky jsou různé podle typu srdečního selhání. Je-li postižena pravá část srdce, objevují se otoky dolních končetin, zvyšování hmotnosti, trávicí potíže, bolest v pravém podžebří (způsobená tlakem zvětšených překrvených jater). Při postižení levé části srdce se krev hromadí v plicích a způsobuje otok plic, který ztěžuje pacientovi dýchání při námaze a později i v klidu. U obou typů srdečního selhání se zhoršuje funkce ledvin a pacient pocítuje únavu a sníženou výkonnost kvůli špatnému prokrvení kosterních svalů. Časté jsou také poruchy srdečního rytmu, které jsou vnímány jako bušení srdce, závratě, a někdy vedou až ke krátkodobým poruchám vědomí.

Společným znakem srdečního selhání, nezávisle na etiologii onemocnění, je remodelace myokardu doprovázená narušením čerpací funkce srdce, které tak nedokáže zásobit celé tělo krví podle jeho aktuálních potřeb. Aby tělo tuto srdeční neschopnost vykompenzovalo, aktivuje několik kompenzačních mechanismů (Obrázek 5). Patří mezi ně například renin-angiotensinový systém, který pomáhá zadržovat  $\text{Na}^+$  ionty a vodu, kontrahuje cévy a tak zvyšuje krevní tlak. Dále soustředí minutový srdeční objem do vitálně důležitých orgánů (na úkor ostatních). Nejdůležitějším kompenzačním mechanismem je aktivace sympato-adrenálního systému, při kterém se zvyšuje výlev katecholaminů v srdci a tím se zvyšuje srdeční tempo a kontrakce. Toto řešení má však pozitivní účinek pouze krátkodobě. Dlouhodobé vystavení katecholaminům je pro buňky toxické a vede k remodelacím buněk, hypertrofiím, nekróze či apoptóze. K zabránění škodlivým adrenergním účinkům si muselo tělo vyvinout další ochranný mechanismus, jímž je  $\beta$ -adrenergní desenzitizace (Eschenhagen 2008). Dříve byla desenzitizace považována za hlavní příčinu srdečního selhání, později se však ukázalo, že jde právě o ochranný mechanismus (Faulx et al. 2005; Liggett et al. 2008). Proto při srdečním selhání pozorujeme změny v  $\beta$ -adrenergní signalizaci, především na počátku signální dráhy – u  $\beta$ -adrenergních receptorů.



*Obrázek 5: Neurohormonální hypotéza vzniku srdečního selhání*

(Upraveno z: Lamba a Abraham 2000)

## 8. Změny v signálním systému

### 8.1. Změny v $\beta$ -adrenergní signalizaci

Aktivita adrenergního systému je zvýšená již brzy v rozvoji srdečního selhání (Rundqvist et al. 1997). Studie dysfunkcí levé srdeční komory prokázaly 35% navýšení koncentrace noradrenalinu v plazmě u jedinců s asymptomatickou dysfunkcí levé komory ve srovnání se zdravými kontrolami (Francis et al. 1990). V těchto raných fázích rozvoje onemocnění hraje zvýšení adrenergní aktivace kompenzační roli, přes  $\beta$ -AR se podporuje a zvyšuje srdeční tempo a kontrakce. Mimo srdce působí noradrenalin také v cévách, kde navozuje vazokonstrikci, čímž zvyšuje krevní tlak. Kontrahují se také žíly a tím se zlepšuje žilní návrat a plnění srdce (Ra 1990).

Každá ze tří hlavních molekul  $\beta$ -adrenergní signální dráhy ( $\beta$ -AR, Gs, AC) je potenciálním místem pro modifikaci během procesu desenzitizace. Nejvíce studií se však zabývá změnami v  $\beta$ -AR. Desenzitizace  $\beta$ -AR může být navozena fosforylací proteinkinázou A, v tom případě

hovoříme o desenzitizaci heterologní. Když je receptor fosforylován  $\beta$ -AR kinázou, potom jde o receptorově specifickou, homologní desenzitizaci, která se týká pouze aktivovaných receptorů.

Jsou-li změny v  $\beta$ -AR vratné a projevují se již po krátké době, jedná se o krátkodobou desenzitizaci. Ta zahrnuje fosforylaci  $\beta$ -AR proteinkinázou A a GRK (G protein-coupled receptor kinase). Plného rozvoje dosahuje krátkodobá desenzitizace již po 30-ti minutách po vystavení agonistovi. Normální funkce  $\beta$ -AR se obnoví krátce po odstranění agonisty. Dlouhodobá desenzitizace se projevuje až po několika hodinách a zahrnuje změny na úrovni mRNA (Engelhardt et al. 1996). Navrácení do původního stavu vyžaduje syntézu nových proteinů a může tak trvat až několik dní.

Při srdečním selhání se snižuje hustota  $\beta_1$ -AR. V normálním myokardu je procentuální poměr  $\beta_1$ -AR ku  $\beta_2$ -AR zhruba 80:20 (Bristow et al. 1986), v selhávajícím myokardu se však poměr snižuje až na 60:40. Platí, že úbytek  $\beta_1$ -AR koreluje se stupněm srdečního selhání, takže ve vážně selhávajícím myokardu představuje úbytek asi 53 – 67% (Fowler et al. 1986).

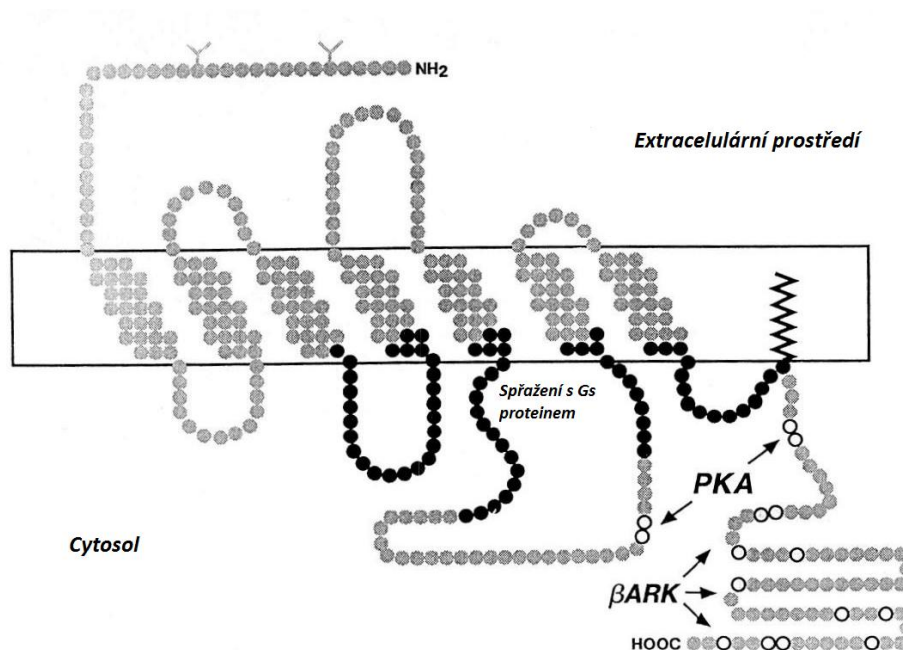
#### 8.1.1. Krátkodobá desenzitizace

Při krátkodobé desenzitizaci  $\beta$ -adrenergických receptorů dochází ke dvěma rozdílným dějům. Dochází k odpráhování  $\beta$ -AR od Gs proteinů (Vatner et al. 1989) a později k selektivní down-regulaci  $\beta_1$ -AR (Bristow et al. 1986).

Hlavním mechanismem, zajišťujícím rozpráhování od Gs proteinů a down-regulaci je fosforylace, které se účastní PKA a kináza receptorů spřažených s G proteiny, GRK2, zvaná také  $\beta$ ARK (Lefkowitz et al. 1990). Substrátem pro fosforylaci PKA je několik oblastí s opakujícími se zbytky aminokyselin argininu a serinu (Obrázek 6), které se vyskytují na třetí cytoplazmatické smyčce  $\beta$ -AR a v proximální části C-konce proteinu (Bouvier et al. 1988). Tyto oblasti jsou v bezprostřední blízkosti místa sloužícího pro spřažení s G proteiny a fosforylací alespoň jedné z oblastí se přidá silný náboj, který nedovolí interakci s G proteiny. Mezi oběma fosforylačními místy jsou funkční rozdíly. Zdá se, že pouze oblast na třetí cytoplazmatické smyčce je nezbytná v procesu desenzitizace (Bouvier et al. 1989).

$\beta$ ARK fosforyluje především receptory s navázanými agonisty a její fosforylační místo je na C-konci, který obsahuje hodně serinu a threoninu.  $\beta$ ARK je členem rodiny kináz, které fosforylují GPCR. Tyto kinázy jsou velmi odlišné od ostatních, pouze v katalytické doméně existuje 239

aminokyselin, které vykazují 33% shodu s PKA nebo PKC (Benovic et al. 1989). Ve všech ostatních částech jsou však kinázy značně odlišné, což ukazuje, že jde o různé kinázové rodiny.  $\beta$ ARK jsou důležité především ve tkáních, kde jsou receptory vystaveny vysokým hladinám katecholaminů, obzvlášť na nervových synapsích. Pro průběh desenzitizace je nutná kooperace obou kináz, PKA i  $\beta$ ARK (Lohse et al. 1990; Hausdorff et al. 1989).



**Obrázek 6:** Fosforylační místa na  $\beta$ -AR

(Převzato z: Hausdorf a Lefkovitz 1990)

Koncentrace i aktivita  $\beta$ ARK se v selhávajícím myokardu zvyšuje a nalezení jejích inhibitorů tak otevírá cestu dalším možnostem léčby srdečního selhání (Rengo et al. 2011).

Dalším faktorem, který je nutný pro desenzitizaci  $\beta$ -AR, je  $\beta$ -arrestin. Je to cytosolický protein, který se díky fosforylaci  $\beta$ -AR kinázy může navázat na receptor. Tím je zprostředkována internalizace receptoru, který je zabalen do klatrinového váčku a dále může být recyklován zpět na membránu anebo degradován. Kromě funkce v desenzitizaci  $\beta$ -AR má  $\beta$ -arrestin ještě další funkce. Nedávno bylo zjištěno, že  $\beta$ -arrestin může aktivovat signální dráhu nezávislou na G proteinech, například ERK kaskádu. Tato dráha bývá normálně aktivována tyrozinokinázovým receptorem, ale zdá se, že ji mohou aktivovat i některé GPCR, mezi něž patří i  $\beta$ -AR ( $\beta_1$ -AR (Noma et al. 2007) i  $\beta_2$ -AR (Shenoy et al. 2006)). Aktivace této signální kaskády má pravděpodobně

kardioprotektivní účinky a toho by mohlo být využito k vytvoření nového typu léků (Noma et al. 2007).

### 8.1.2. Dlouhodobá desenzitizace

Dlouhodobé vystavení buněk zvýšeným hladinám katecholaminů vede také ke změnám na úrovni mRNA  $\beta$ -AR. Projevy dlouhodobé desenzitizace jsou patrné na rozdíl od krátkodobých změn až po několika hodinách po vystavení agonistovi. Dochází ke snižování množství mRNA  $\beta$ -AR a hladiny těchto mRNA negativně korelují se stupněm srdečního selhání (Engelhardt et al. 1996). Nesnižuje se však exprese nových mRNA, ale spíše se snižuje stabilita vzniklých mRNA (Hadcock et al. 1989). Protein AUF1 se váže na úseky mRNA  $\beta$ -AR na 3' nepřekládaném konci, které jsou bohaté na adenin a uracil, a tím se snižuje stabilita daných mRNA (Huang et al. 1993). V selhávajícím srdci se protein AUF1 produkuje ve větší míře, v závislosti na  $\beta$ -AR agonistech (Pende et al. 1996).

## 8.2. $\beta$ -AR polymorfismus

$\beta$ -Adrenergní receptory jsou kódovány genem ADRB – ADRB1 (pro  $\beta_1$ -AR), ADRB2 (pro  $\beta_2$ -AR). U genu ADRB1 bylo popsáno 12 jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a z toho osm nesynonymních, které mají za následek výměnu aminokyselin. Dvě nejběžnější výměny aminokyselin jsou na pozici 49, kde je serin prohozen za glycin, a na pozici 389, kde se arginin zamění za glycin (Podlowski et al. 2000).

Gen pro  $\beta_2$ -AR, ADRB2, také vykazuje v lidské populaci vysoký polymorfismus. Nejběžnější polymorfismy se týkají aminokyselin na pozici 16 (arginin  $\rightarrow$  glycin), 27 (glutamin  $\rightarrow$  glutamát) (Green et al. 1994) a 164 (threonin  $\rightarrow$  izoleucin) (Green et al. 1993).

Vzhledem k tomu, že  $\beta$ -AR hrají důležitou roli v srdečním selhání, je pravděpodobné, že různé formy  $\beta$ -AR budou mít vliv na rozvoj nemoci. Některé SNP (polymorfismus Arg389Gly na  $\beta_1$ -AR) mají vliv na průběh onemocnění. Perez se svým výzkumným týmem zjistil pomocí modelu transgenních myší, že mladé myši s Arg389 měly ve srovnání s Gly389 zvýšenou funkci receptorů a vyšší výkonnost srdce (Perez et al. 2003). To se však změnilo se stářím a starší myši s Arg389 tak jevíly známky srdečního selhání, probíhala u nich abnormální exprese genů způsobujících

hypertrofii a naopak se snížila exprese AC a G $\alpha$  (Rochais et al. 2007). Zároveň však ani u jedné skupiny nebyl prokázán žádný vliv na přežívání pacientů (Liggett et al. 2006).

U jiných SNP se však ukázalo, že mohou mít vliv na mortalitu. Pacienti se Ser49 na  $\beta_1$ -AR mají vyšší riziko smrti ve srovnání s pacienty s Gly49, takže mutace vedoucí k výměně serinu za glycin tak zřejmě vede ke změně funkce receptoru, která může mít kardioprotektivní účinky (Börjesson et al. 2000).

Konkrétní vliv SNP na léčbu  $\beta$ -blokátory je někdy sporný – zatímco některé studie poukázaly na pozitivní vliv Arg389 na léčbu carvedilolem (Rochais et al. 2007), podle jiných neovlivňuje léčbu carvedilolem SNP na pozici 389 na  $\beta_1$ -AR, ale SNP na pozici 27 na  $\beta_2$ -AR (Metra et al. 2010).

### 8.3. Změny v $\alpha$ -adrenergní signalizaci

$\alpha$ -AR, na rozdíl od  $\beta$ -AR, nepodléhají desenzitizaci v selhávajícím myokardu (Bohm et al. 1988). Jejich koncentrace se během srdečního selhání téměř nemění, ale vzhledem k tomu, že  $\beta$ -AR při selhávání srdce ubývá, zvyšuje se podíl  $\alpha$ -AR na adrenergní signalizaci (Bristow et al. 1988) a  $\alpha_1$ -AR tak mohou v selhávajícím myokardu zvyšovat kontraktilitu stejně jako  $\beta$ -AR (Skomedal et al. 1997).

Bylo zjištěno, že aktivace  $\alpha_1$ -AR při srdečním selhání má protektivní účinky – indukuje vznik adaptivní hypertrofie, posiluje ionotropní odpověď a působí antiapoptoticky. Kromě toho také pomáhá proti ischemickému poškození srdce (Cleveland et al. 1996). Díky těmto prospěšným účinkům se zdají být  $\alpha$ -AR dalším slibným cílem léčby srdečního selhání.

### 8.4. Změny na úrovni adenylylcyklázy

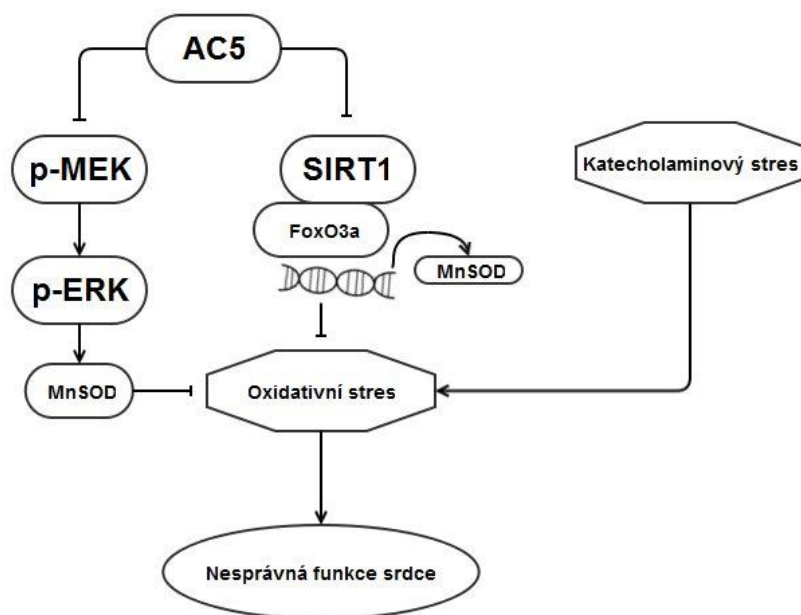
Ping s kolektivem (Ping et al. 1997) zkoumali změny aktivit a exprese AC při srdečním selhání. Při mírném srdečním selhání nepodstupuje exprese adenylylcyklázy žádné změny, pouze je AC méně aktivována v důsledku odpráhování  $\beta$ -AR od stimulačních G proteinů a také v důsledku up-regulace G $\beta$  proteinů (Böhm et al. 1992). V pozdějších fázích srdečního selhání již však dochází k větším změnám. Celková aktivita AC je podstatně snížena a změny se projevují i na úrovni mRNA – hladiny mRNA AC6 jsou nižší, ale exprese AC5 zůstává nezměněna (Ping et al. 1997).



Tyto změny nejsou pro srdce výhodné. Ze studia transgenních myši vyplývá, že za stresových podmínek (například zvýšená stimulace noradrenalinu) vede nadprodukce AC5 ke snížení funkce levé komory, zvýšení hypertrofie a apoptózy a přispívá k rozvoji srdečního selhání (Lai et al. 2013). Škodlivé účinky AC5 jsou uskutečněny přes inhibici MEK/ERK cesty (Obrázek 7), což má za následek snížení exprese manganové superoxiddismutázy, čímž je narušen antioxidační systém a oxidační stres tak indukuje buněčnou smrt a vede k srdečním dysfunkcím (Lai et al. 2013). V této souvislosti je zajímavé zmínit zjištění, že za normálních, nestresových podmínek mohou mít transgenní myši naopak zlepšený základní srdeční rytmus a funkci levé komory (Tepe et al. 1999). Naopak myši s knock-outovanou AC5 vykazují lepší funkci levé komory a nižší výskyt apoptózy po chronické stimulaci katecholaminy (Okumura et al. 2007). Navíc kromě těchto účinků má odstranění (nebo inhibice) AC5 vliv také na dlouhověkost (Yan et al. 2007). Její inhibice tak poskytuje slibnou možnost terapeutického využití.

O AC6 se také uvažovalo v souvislosti s léčbou srdečního selhání a její účinky byly považovány za protektivní. Z různých studií je patrné, že zvýšená exprese AC6 vylepšuje srdeční funkci při srdeční ischemii a zabraňuje tvorbě geneticky indukovaných kardiomyopatií (Roth et al. 2002). Neporadí si však se všemi poruchami. Při tlakovém přetížení srdce nebyl pozorován žádný příznivý efekt, funkce levé komory se zhoršila a docházelo ke vzniku kardiomyopatií (Guellich et al. 2010).

Podle předchozích poznatků vedlo odstranění AC6 ke zhoršené funkci levé komory (Tang et al. 2008). V novějším výzkumu však byly škodlivé následky tlakového přetížení levé komory u myši s knock-outovanou AC6 výrazně redukovány (Tang et al. 2010).



*Obrázek 7: Regulace manganové superoxiddismutázy přes SIRT1/FoxO3a a přes MEK/ERK signální cestu*

MEK – kináza mitogenem aktivované kinázy; ERK – kinázy regulované extracelulárním signálem; MnSOD – manganová superoxiddismutáza

(upraveno z: Lai et al. 2013)

## 9. Léčba srdečního selhání

Prvním krokem při diagnóze srdečního selhání (nebo jeho hrozbě) by měla být úprava životního stylu a stravování – aktivní pohyb a vyvážená strava s omezením příjmu solí. Změna životního stylu často nestačí, ale dnes již máme k dispozici několik různých typů léků. Léky jsou zacíleny na různé mechanismy podílející se na rozvoji srdečního selhání, velmi často na členy  $\beta$ -adrenergní signální kaskády, především na  $\beta$  receptory. Kromě toho se v lékařské praxi používají také diuretika, vazodilátory, léky na blokování vápníkových kanálů nebo na snížení LDL cholesterolu. Hojně užívané jsou tzv. ACE inhibitory, které roztahují cévy a snižují hladiny angiotensinu II.

Kromě léků se může srdeční selhání léčit také operací. Operací je možné odstranit některé závady, které vedou k selhávání (operace chlopně, koronární by-pass), nebo ve vážných případech provést transplantaci srdce. V neposlední řadě může pacientům pomoci také implantace kardiostimulátoru pro resynchronizační terapii (CRT) nebo automatického defibrilátoru.

### 9.1. $\beta$ -blokátory

Hlavním úkolem  $\beta$ -blokátorů je předejít (nebo zvrátit) škodlivým účinkům způsobeným nadměrným vystavením buněk katecholaminům.  $\beta$ -blokátory představují skupinu různých antagonistů  $\beta$ -AR, které inaktivují receptor a tím zmírňují toxické účinky katecholaminů.

Krátce po podání  $\beta$ -blokátorů (cca do jednoho měsíce) se snižuje srdeční funkce (Ikram a Fitzpatrick 1981), ale při dlouhodobém působení vylepšují  $\beta$ -blokátory funkci myokardu, zabraňují rozvoji remodelace tkáně a potlačují hypertrofii (Hall et al. 1995). Některé  $\beta$ -blokátory mohou také odstranit abnormality, které vznikly v  $\beta$ -adrenergní signální dráze, například obnovit down-regulované  $\beta$ -AR (Waagstein et al. 1989).

$\beta$ -blokátory první generace (propranolol) byly prvními blokátory uvedenými do léčebné praxe a nerozlišovaly mezi  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR. Pro většinu pacientů však nebyly vhodné, protože způsobovaly vazokonstrikci a tím zvyšování krevního tlaku. Blokátory druhé generace (metoprolol) byly selektivní pro  $\beta_1$ -AR a svými účinky ovlivňovaly selektivně pouze srdce. Třetí generace blokátorů (bucindolol, carvedilol) má kromě samotné blokace receptorů navíc další farmaceutické vlastnosti, například vazodilatační nebo antioxidační účinky (Yue et al. 1992) a některé také snižují adrenergní aktivitu blokováním presynaptických  $\beta_2$ -AR (Gilbert et al. 1996).

První dvě třídy neměly téměř žádnou výhodu oproti ostatním léčivům (například ACE inhibitorům), to se ale změnilo s nástupem  $\beta$ -blokátorů s vasodilatační funkcí.

## 9.2. AC inhibitory

U inhibitorů adenylylcyklázy je důležité, aby byly specifické pro danou izoformu AC. Vzhledem k novým poznatkům (Tang et al. 2010) lze však uvažovat i o méně specifickém inhibitoru, který by nemusel rozlišovat mezi AC5 a AC6. Nutná je také orgánová selektivita, protože celkové odstranění AC5 způsobuje lokomoční poruchy (Iwamoto et al. 2003) nebo vede k horšímu vyrovnávání se se stresem (Kim a Han 2009).

Existují dvě hlavní třídy inhibitorů adenylylcyklázy. Jednu třídu tvoří tzv. P-site inhibitory, které jsou nekompetitivní a napodobují cAMP a PPi (Dessauer et al. 1999). Druhá třída je tvořena MANT-nukleotidy, které spolu s ATP kompetují o vazebné místo na AC (Gille a Seifert 2003). Kromě toho existují také alosterické nekompetitivní inhibitory, které se váží na regulační (diterpenovou) doménu (Erdorf et al. 2011).

### 9.2.1. P-site inhibitory

P-site inhibitory jsou výhodné z toho hlediska, že lépe inhibují aktivované AC – tedy spíše budou blokovat patologicky aktivní enzymy (Dessauer et al. 1999). Oproti MANT inhibitorům mají tu výhodu, že mohou bez problému projít přes plazmatickou membránu (Hübner et al. 2011).

Obecným problémem P-site inhibitorů je jejich nízká účinnost a špatná rozpustnost ve vodě, ačkoliv účinky některých inhibitorů jsou sporné. Podle výsledků jedné studie měl inhibitor vidarabine dobrou selektivitu k AC5 a jeho účinky byly zjevně přínosné (Iwatsubo et al. 2012). Naopak podle výsledků pozdější studie je vidarabine nedostatečně selektivní (Braeunig et al. 2013). Není však jasné, proč došlo k tak rozdílným výsledkům studií. Kromě toho mohou mít P-site inhibitory různé vedlejší účinky. Již zmíněný vidarabine je užíván také jako virostatikum, inhibuje DNA polymerázu a metabolismus purinů a může se projevovat cytotoxicky.

### 9.2.2. MANT-inhibitory

MANT-inhibitory jsou účinné kompetitivní nukleotidové inhibitory AC s N-methyl-anthranoyl (MANT) substituenty. MANT skupina se váže do konzervovaného hydrofobního místa

a brání tak membránovým AC přejít z otevřeného do zavřeného stavu (Hubner et al. 2011). Mají vysoký účinek a preferenčně působí na AC5 a AC6 (Gille et al. 2004).

### 9.3. $\alpha_1$ -AR agonisté

Dalším možným cílem terapie jsou  $\alpha_1$ -AR. Toto téma není zatím důkladně prozkoumáno a existuje zde hodně sporných otázek. Jedním z mnohých problémů je například fakt, že  $\alpha_1$ -AR kontrahují cévy a tak zvyšují krevní tlak.  $\alpha_1$ -AR jsou spojovány také se vznikem patologické hypertrofie. Zároveň se však ukazují i některé přínosné účinky, jak již bylo uvedeno v kapitole 9. Má-li mít léčba pomocí  $\alpha$ -agonistů naději na úspěch, musí se zaměřit hlavně na kardioselektivitu. Té by se dalo dosáhnout například selektivitou k podtypům  $\alpha_{1A}$ -AR nebo  $\alpha_{1B}$ -AR.

## 10. Závěr

Studium adenylylcyklázového signálního systému je důležité pro léčbu srdečního selhání. Posledních pár desetiletí přineslo výrazné zlepšení v chápání těchto mechanismů, odehrávajících se při selhávání myokardu, a díky tomu máme dnes k dispozici několik typů účinných léků. Mezi nejdůležitější léky, které prodloužily život tisícům pacientů, patří  $\beta$ -blokátory, které se ukázaly být velmi přínosné, zejména po objevení  $\beta$ -blokátorů s vazodilatační nebo antioxidační funkcí. I tak je zde však stále dostatek prostoru pro vylepšování stávajících léků nebo vývoj zcela nových léčiv. Velmi slibně vypadají například pokusy s inhibitory AC, ale potenciálních struktur, na které mohou být zacílena různá léčiva je daleko více. Jedním z dalších možných zaměření může být aktivace ERK kaskády, která má antioxidační účinky, nebo inhibice  $\beta$ ARK, která se podílí na desenzitizaci  $\beta$ -AR. Další výzkum by si zasloužil také vliv  $\beta$ -AR polymorfismu a jeho využití v genové terapii.

## Seznam literatury

- Albert a Litman** (1978). Independent structural domains in the membrane protein bovine rhodopsin. *Biochemistry*, 17(19), 3893–3900.
- Bakalyar a Reed** (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 250(4986), 1403–1406.
- Bayewitch, Avidor-reiss, Levy, Pfeuffer, Nevo, Simonds, Vogel** (1998). Inhibition of Adenylyl Cyclase Isoforms V and VI by Various G $\beta$  Subunits. *The FASEB Journal*, 12(11), 1019–25.
- Benovic, DeBlasi, Stone, Caron, Lefkowitz** (1989).  $\beta$ -Adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science*, 246(4927), 235–240.
- Bers** (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205.
- Berthelsen a Pettinger** (1977). A functional basis for classification of  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Life Sciences*, 21(5), 595–606.
- Bohm, Diet, Feiler, Kemkes, Erdmann** (1988).  $\alpha$ -Adrenoceptors and  $\alpha$ -Adrenoceptor-Mediated Positive Inotropic Effects in Failing Human Myocardium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 12(3)
- Böhm, Gierschik, Knorr, Larisch, Weismann, Erdmann** (1992). Desensitization of adenylyl cyclase and increase of Gi  $\alpha$  in cardiac hypertrophy due to acquired hypertension. *Hypertension*, 20(1), 103–112.
- Börjesson, Magnusson, Hjalmarsen, Andersson** (2000). A novel polymorphism in the gene coding for the  $\beta$ 1-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *European Heart Journal*, 21(22), 1853–1858.
- Bouvier, Collins, O'Dowd, Campbell, Blasi, Kobilka, MacGregor, Irons, Caron, Lefkowitz** (1989). Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16786–16792.
- Bouvier, Hausdorff, De Blasi, O'Dowd, Kobilka, Caron, Lefkowitz** (1988). Removal of phosphorylation sites from the  $\beta$ 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, 333(6171), 370–3.
- Braeunig, Schweda, Han, Seifert** (2013). Similarly Potent Inhibition of Adenylyl Cyclase by P-Site Inhibitors in Hearts from Wild Type and AC5 Knockout Mice. *PLoS ONE*, 8(7), e68009.
- Bristow, Ginsburg, Umans, Fowler, Minobe, Rasmussen, Zera, Menlove, Shah, Jamieson** (1986).  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta$ 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circulation Research*, 59(3), 297–309.
- Bristow, Minobe, Rasmussen, Hershberger, Hoffman** (1988). Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 247(3), 1039–1045.
- Buck, Sinclair, Schapal, Cann, Levin** (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1), 79–84.

- Chen a Iyenga** (1993). Inhibition of cloned adenylyl cyclases by mutant-activated Gi-alpha and specific suppression of type 2 adenylyl cyclase inhibition by phorbol ester treatment. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12253–12256.
- Cleveland, Wollmering, Meldrum, Rowland, Rehiring, Sheridan, Harken, Banerjee** (1996). Ischemic preconditioning in human and rat ventricle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 271(5), H1786–H1794.
- Collins a Terrar** (2012). Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases regulate the L-type Ca<sup>2+</sup> current in guinea-pig atrial myocytes. *The Journal of Physiology*, 590(8), 1881–1893.
- Communal, Singh, Sawyer, Colucci** (1999). Opposing Effects of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-Adrenergic Receptors on Cardiac Myocyte Apoptosis Role of a Pertussis Toxin–Sensitive G Protein. *Circulation*, 100(22), 2210–2212.
- Conti a Beavo** (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 481–511.
- Dessauer, Tesmer, Sprang, Gilman** (1998). Identification of a G $\alpha$  Binding Site on Type V Adenylyl Cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25831–25839.
- Dessauer, Tesmer, Sprang, Gilman** (1999). The interactions of adenylyl cyclases with P-site inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(5), 205–210.
- Du, Gao, Wang, Jennings, Woodcock, Dart** (2000). Age-dependent cardiomyopathy and heart failure phenotype in mice overexpressing  $\beta$ 2-adrenergic receptors in the heart. *Cardiovascular Research*, 48(3), 448–454.
- Eason, Kurose, Holt, Raymond, Liggett** (1992). Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22), 15795–15801.
- Engelhardt, Böhm, Erdmann, Lohse** (1996). Analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: Progressive reduction of  $\beta$ 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 27(1), 146–154.
- Erdorf, Mou, Seifert** (2011). Impact of divalent metal ions on regulation of adenylyl cyclase isoforms by forskolin analogs. *Biochemical Pharmacology*, 82(11), 1673–1681.
- Eschenhagen** (2008).  $\beta$ -adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nature Medicine*, 14(5), 485–7.
- Faulx, Ernsberger, Vatner D., Hoffman, Lewis, Strachan, Hoit** (2005). Strain-dependent  $\beta$ -adrenergic receptor function influences myocardial responses to isoproterenol stimulation in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(1), H30–6.
- Fowler, Laser, Hopkins, Minobe, Bristow** (1986). Assessment of the  $\beta$ -adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation*, 74(6), 1290–1302.
- Francis, Benedict, Johnstone, Kirlin, Nicklas, Liang, Kubo, Rudin-Toretsky, Yusuf** (1990). Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*, 82(5), 1724–1729.



- Fredriksson, Lagerström, Lundin, Schiöth** (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256–1272.
- Freissmuth, Casey, Gilman** (1989). G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J*, 3(10), 2125–2131.
- Fujimoto a Ogawa** (1982). Enzyme Cytochemical Study Of Rat Cardiac Muscle I. Adenylate Cyclase And Guanylate Cyclase. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 15(3), 325–337.
- Gao, Yatani, Dell’Acqua, Sako, Green, Dascal, Scott, Hosey** (1997). cAMP-Dependent Regulation of Cardiac L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Requires Membrane Targeting of PKA and Phosphorylation of Channel Subunits. *Neuron*, 19(1), 185–196.
- Ghanouni, Steenhuis, Farrens, Kobilka** (2001). Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 5997–6002.
- Gilbert, Abraham, Olsen, Hattler, White, Mealy, Larrabee, Bristow** (1996). Comparative Hemodynamic, Left Ventricular Functional, and Antiadrenergic Effects of Chronic Treatment With Metoprolol Versus Carvedilol in the Failing Heart. *Circulation*, 94(11), 2817–2825.
- Gille, Lushington, Mou, Doughty, Johnson, Seifert** (2004). Differential Inhibition of Adenylyl Cyclase Isoforms and Soluble Guanylyl Cyclase by Purine and Pyrimidine Nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19955–19969.
- Green, Cole, Jacinto, Innis, Liggett** (1993). A polymorphism of the human  $\beta$  2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(31), 23116–23121.
- Guellich, Gao, Hong, Yan, Wagner, Dhar, Ghaleh, Hittinger, Iwatsubo, Ishikawa, Vatner S., Vatner D.** (2010). Effects of cardiac overexpression of type 6 adenylyl cyclase affects on the response to chronic pressure overload. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(3), H707–H712.
- Guillou, Nakata, Cooper** (1999). Inhibition by Calcium of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35539–35545.
- Hadcock, Wang, Malbon** (1989). Agonist-induced destabilization of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 264(33), 19928–19933.
- Hall, Cigarroa, Marcoux, Risser, Grayburn, Eichhorn** (1995). Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with  $\beta$ -adrenergic blockade. *Journal of the American College of Cardiology*, 25(5), 1154–1161.
- Hanoune a Defer** (2001). Regulation and Role of Adenylyl Cyclase Isoforms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 145–174.
- Hargrave a Fong** (1977). The amino- and carboxyl-terminal sequence of bovine rhodopsin. *Journal of Supramolecular Structure*, 6(4), 559–70.
- Hausdorff, Bouvier, O’Dowd, Irons, Caron, Lefkowitz** (1989). Phosphorylation sites on two domains of the  $\beta$  2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 264(21), 12657–12665.

- Hausdorff, Caron, Lefkowitz** (1990). Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *The FASEB Journal*, 4(11), 2881–2889.
- Hu, Shi, Lin, Chen, Hoffman** (1999).  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptor Stimulation of Mitogenesis in Human Vascular Smooth Muscle Cells: Role of Tyrosine Protein Kinases and Calcium in Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(1), 28–37.
- Huang, Slesinger, Casey, Jan Y., Jan L.** (1995). Evidence that direct binding of  $G\beta\gamma$  to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channel is important for channel activation. *Neuron*, 15(5), 1133–1143.
- Huang, Tholanikunnel, Vakalopoulou, Malbon** (1993). The M(r) 35,000  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA-binding protein induced by agonists requires both an AUUUA pentamer and U-rich domains for RNA recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(34), 25769–25775.
- Hubner, Dixit, Mou, Lushington, Pinto, Gille, Geduhn, Konig, Sprang, Seifert** (2011). Structural Basis for the High-Affinity Inhibition of Mammalian Membranous Adenylyl Cyclase by 2',3'-O-(N-Methylanthraniloyl)-Inosine 5'-Triphosphate. *Molecular Pharmacology*, 80(1), 87–96.
- Hübner, Dizayee, Matthes, Seifert, Herzig** (2011). Effect of MANT-nucleotides on L-type calcium currents in murine cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(6), 573–583.
- Ikram a Fitzpatrick** (1981). Double-Blind Trial Of Chronic Oral B Blockade In Congestive Cardiomyopathy. *The Lancet*, 318(8245), 490–493.
- Iwami, Kawabe, Ebina, Cannon, Homcy, Ishikawa** (1995). Regulation of Adenylyl Cyclase by Protein Kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12481–12484.
- Iwamoto, Okumura, Iwatsubo, Kawabe, Ohtsu, Sakai, Hashimoto, Izumitani, Sango, Ajiki, Toya, Umemura, Goshima, Arai, Vatner, Ishikawa** (2003). Motor Dysfunction in Type 5 Adenylyl Cyclase-null Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16936–16940.
- Iwatsubo, Bravo, Uechi, Baljinnayam, Nakamura, Umemura, Lai, Gao, Yan, Zhao, Park, Qiu, Okumura, Iwatsubo, Vatner D., Vatner S., Ishikawa** (2012). Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 302(12), H2622–H2628.
- Iyengar** (1993). Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *The FASEB Journal*, 7(9), 768–775.
- Jensen, Swigart, DeMarco, Hoopes, Simpson** (2009). Alpha-1-Adrenergic Receptor Subtypes in Non-Failing and Failing Human Myocardium. *Circulation. Heart Failure*, 2(6), 654–663.
- Jensen, Swigart, Laden, DeMarco, Hoopes, Simpson** (2009). The Alpha-1D Is the Predominant Alpha-1-Adrenergic Receptor Subtype in Human Epicardial Coronary Arteries. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(13), 1137–1145.
- Katsushika, Chen, Kawabe, Nilakantan, Halnon, Homcy, Ishikawa** (1992). Cloning and characterization of a sixth adenylyl cyclase isoform: types V and VI constitute a subgroup within the mammalian adenylyl cyclase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), 8774–8778.

- Kaumann, Sanders, Lynham, Bartel, Kuschel, Karczewski, Krause** (1996).  $\beta$ 2-Adrenoceptor activation by zinterol causes protein phosphorylation, contractile effects and relaxant effects through a cAMP pathway in human atrium. In R. Vetter & E.-G. Krause (Eds.), (pp. 113–123).
- Kim a Han** (2009). Mice lacking adenylyl cyclase-5 cope badly with repeated restraint stress. *Journal of Neuroscience Research*, 87(13), 2983–2993.
- Krupinski, Coussen, Bakalyar, Tang, Feinstein, Orth, Slaughter, Reed, Gilman** (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4912), 1558–1564.
- Lai, Yan, Gao, Hu, Ge, Davidow, Park, Bravo, Iwatsubo, Ishikawa, Auwerx, Sinclair, Vatner S., Vatner D.** (2013). Type 5 Adenylyl Cyclase Increases Oxidative Stress by Transcriptional Regulation of Manganese Superoxide Dismutase via the SIRT1/FoxO3a Pathway. *Circulation*, 127(16), 1692–1701.
- Lamba a Abraham** (2000). Alterations in Adrenergic Receptor Signaling in Heart Failure. *Heart Failure Reviews*, 5(1), 7–16.
- Lefkowitz, Hausdorff, Caron** (1990). Role of phosphorylation in desensitization of the  $\beta$ -adrenoceptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(5), 190–194
- Liggett, Bouvier, Hausdorff, O’Dowd, Caron, Lefkowitz** (1989). Altered patterns of agonist-stimulated cAMP accumulation in cells expressing mutant  $\beta$  2-adrenergic receptors lacking phosphorylation sites. *Molecular Pharmacology*, 36(4), 641–646.
- Liggett, Cresci, Kelly, Syed, Matkovich, Hahn, Divan, Martini, Sparks, Parekh, Koch, Kardia, Dorn** (2008). A GRK5 polymorphism that inhibits  $\beta$ -adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nature Medicine*, 14(5), 510–7.
- Liggett, Mialet-Perez, Thaneemit-Chen, Weber, Greene, Hodne, Nelson, Morrison, Domanski, Wagoner, Abraham, Anderson, Carlquist, Krause-Steinrauf, Lazzeroni, Port, Lavori, Bristow** (2006). A polymorphism within a conserved  $\beta$ 1-adrenergic receptor motif alters cardiac function and  $\beta$ -blocker response in human heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11288–11293.
- Lohse, Benovic, Caron, Lefkowitz.** (1990). Multiple pathways of rapid  $\beta$  2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3202–3211.
- Mattick, Parrington, Odia, Simpson, Collins, Terrar** (2007).  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated adenylyl cyclase isoform AC1 is preferentially expressed in guinea-pig sino-atrial node cells and modulates the If pacemaker current. *The Journal of Physiology*, 582(3), 1195–1203.
- Mende, Kagen, Cohen, Aramburu, Schoen, Neer** (1998). Transient cardiac expression of constitutively active  $\text{G}_{\alpha q}$  leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13893–13898.
- Metra, Covolo, Pezzali, Zacà, Bugatti, Lombardi, Bettari, Romeo, Gelatti, Giubbini, Donato, Dei Cas** (2010). Role of beta-adrenergic receptor gene polymorphisms in the long-term effects of beta-blockade with carvedilol in patients with chronic heart failure. *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 24(1), 49–60.

- Mika, Bobin, Pomérance, Lechêne, Westenbroek, Catterall, Leroy, Fischmeister** (2013). Differential regulation of cardiac excitation–contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovascular Research*, 100(2), 336–346.
- Minneman** (1988). Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca<sup>2+</sup>. *Pharmacological Reviews*, 40(2), 87–119.
- Mollner a Pfeuffer** (1988). Two different adenylyl cyclases in brain distinguished by monoclonal antibodies. *European Journal of Biochemistry*, 171(1-2), 265–271.
- Noma, Lemaire, Naga Prasad, Barki-Harrington, Tilley, Chen, Le Corvoisier, Violin, Wei, Lefkowitz, Rockman** (2007).  $\beta$ -Arrestin–mediated  $\beta$ 1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2445–2458.
- Okumura, Vatner, Kurotani, Bai, Gao, Yuan, Iwatsubo, Ulucan, Kawabe, Ghosh, Vatner, Ishikawa** (2007). Disruption of Type 5 Adenylyl Cyclase Enhances Desensitization of Cyclic Adenosine Monophosphate Signal and Increases Akt Signal With Chronic Catecholamine Stress. *Circulation*, 116(16), 1776–1783.
- Pavan, Biondi, Dalpiaz** (2009). Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discovery Today*, 14(19–20), 982–991.
- Pende, Tremmel, DeMaria, Blaxall, Minobe, Sherman, Bisognano, Bristow, Brewer, Port** (1996). Regulation of the mRNA-binding Protein AUF1 by Activation of the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Signal Transduction Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8493–8501.
- Perez, Rathz, Petrashevskaya, Hahn, Wagoner, Schwartz, Dorn, Liggett** (2003).  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nature Medicine*, 9(10), 1300–1305.
- Piascik a Perez** (2001).  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptors: New Insights and Directions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(2), 403–410.
- Pierre, Eschenhagen, Geisslinger, Scholich** (2009). Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(4), 321–335.
- Ping, Anzai, Gao, Hammond** (1997). Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 273(2), H707–H717.
- Podlowski, Wenzel, Luther, Müller, Bramlage, Baumann, Felix , Speer, Hetzer, Köpke, Hoehe, Wallukat** (2000).  $\beta$ 1-Adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy? *Journal of Molecular Medicine*, 78(2), 87–93.
- Ra** (1990). Sympathetic control of diastolic function in congestive heart failure. *Circulation*, 82(2 Suppl), I52–8.
- Rasmussen, Choi, Rosenbaum, Kobilka, Thian, Edwards, Burghammer, Ratnala, Sanishvili, Fischetti, Schertler, Weis, Kobilka** (2007). Crystal structure of the human  $\beta$ 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383–387.
- Rengo, Lymporopoulos, Leosco, Koch** (2011). GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(5), 785–792.

- Rochais, Vilardaga, Nikolaev, Bunemann, Lohse, Engelhardt** (2007). Real-time optical recording of  $\beta$ 1-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 229–235.
- Roth, Bayat, Drumm, Gao, Swaney, Ander, Hammond** (2002). Adenylyl Cyclase Increases Survival in Cardiomyopathy. *Circulation*, 105(16), 1989–1994.
- Rump, Bohmann, Schaible, Schöllhorn, Limberger** (1995).  $\alpha$ 2c-Adrenoceptor-modulated release of noradrenaline in human right atrium. *British Journal of Pharmacology*, 116(6), 2617–2624.
- Rundqvist, Elam, Bergmann-Sverrisdottir, Eisenhofer, Friberg** (1997). Increased Cardiac Adrenergic Drive Precedes Generalized Sympathetic Activation in Human Heart Failure. *Circulation*, 95(1), 169–175.
- Schäfer, Frischkopf, Taimor, Piper, Schlüter** (2000). Hypertrophic effect of selective  $\beta$ 1-adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279(2), C495–C503.
- Schulze a Buchwalow** (1998). Adenylyl cyclase in the heart: An enzymocytochemical and immunocytochemical approach. *Microscopy Research and Technique*, 40(6), 473–478.
- Shenoy, Drake, Nelson, Houtz, Xiao, Madabushi, Reiter, Premont, Lichtarge, Lefkowitz** (2006).  $\beta$ -Arrestin-dependent, G Protein-independent ERK1/2 Activation by the  $\beta$ 2 Adrenergic Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 1261–1273.
- Skomedal, Borthne, Aass, Geiran, Osnes** (1997). Comparison between Alpha-1 Adrenoceptor-Mediated and B Adrenoceptor-Mediated Inotropic Components Elicited by Norepinephrine in Failing Human Ventricular Muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(2), 721–729.
- Strömberg a Mårtensson** (2003). Gender differences in patients with heart failure. *European Journal of Cardiovascular Nursing: Journal of the Working Group on Cardiovascular Nursing of the European Society of Cardiology*, 2(1), 7–18.
- Tang, Gao, Lai, Firth, Takahashi, Guo, Yuan, Roth, Hammond** (2008). Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling. *Circulation*, 117(1), 61–9.
- Tang, Lai, Hammond, Roth, Yang, Guo, Gao** (2010). Adenylyl Cyclase 6 Deletion Reduces Left Ventricular Hypertrophy, Dilation, Dysfunction, and Fibrosis in Pressure-Overloaded Female Mice. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(14), 1476–1486.
- Tang a Gilman** (1991). Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein  $\beta$  gamma subunits. *Science*, 254(5037), 1500–1503.
- Tepe, Lorenz, Yatani, Dash, Kranias, Dorn, Liggett** (1999). Altering the Receptor–Effector Ratio by Transgenic Overexpression of Type V Adenylyl Cyclase: Enhanced Basal Catalytic Activity and Function without Increased Cardiomyocyte  $\beta$ -Adrenergic Signalling†. *Biochemistry*, 38(50), 16706–16713.
- Tesmer, Sunahara, Gilman, Sprang** (1997). Crystal Structure of the Catalytic Domains of Adenylyl Cyclase in a Complex with  $G\alpha \cdot GTP\gamma S$ . *Science*, 278(5345), 1907–1916.
- Vatner D., Vatner S., Nejima, Uemura, Susanni, Hintze, Homcy** (1989). Chronic norepinephrine elicits desensitization by uncoupling the  $\beta$ -receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(6), 1741–8.

- Waagstein, Caidahl, Wallentin, Bergh, Hjalmarson** (1989). Long-term  $\beta$ -blockade in dilated cardiomyopathy. Effects of short- and long-term metoprolol treatment followed by withdrawal and readministration of metoprolol. *Circulation*, 80(3), 551–563.
- Wang, Pineda, Chan, Wong, Muglia, Storm** (2003). Type 8 Adenylyl Cyclase Is Targeted to Excitatory Synapses and Required for Mossy Fiber Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 23(30), 9710–9718.
- Wang, Guo, Zhang, Wu, Seifert, Lushington** (2007). A conformational transition in the adenylyl cyclase catalytic site yields different binding modes for ribosyl-modified and unmodified nucleotide inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(8), 2993–3002.
- Wehrens, Lehnart, Reiken, Marks** (2004).  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circulation Research*, 94(6), e61–e70.
- Widén, Lehto, Kanninen, Walston, Shuldiner, Groop** (1995). Association of a Polymorphism in the  $\beta$ 3-Adrenergic–Receptor Gene with Features of the Insulin Resistance Syndrome in Finns. *New England Journal of Medicine*, 333(6), 348–352.
- Wu, Katz, Lee, Simon** (1992). Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 25798–25802.
- Xia, Choi, Wang, Blazynski, Storm** (1993). Type I Calmodulin-Sensitive Adenylyl Cyclase Is Neural Specific. *Journal of Neurochemistry*, 60(1), 305–311.
- Xiang a Kobilka** (2003). Myocyte Adrenoceptor Signaling Pathways. *Science*, 300(5625), 1530–1532.
- Xiao, Hohl, Altschuld, Jones, Livingston, Ziman, Tantini, Lakatta** (1994).  $\beta$  2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(29), 19151–19156.
- Xiao a Lakatta** (1995). Functional coupling of the  $\beta$  2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Molecular Pharmacology*, 47(2), 322–329.
- Xiao a Lakatta** (1993).  $\beta$  1-adrenoceptor stimulation and  $\beta$  2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  current in single rat ventricular cells. *Circulation Research*, 73(2), 286–300.
- Yan, Vatner, O'Connor, Ivessa, Ge, Chen, Hirotani, Ishikawa, Sadoshima, Vatner** (2007). Type 5 Adenylyl Cyclase Disruption Increases Longevity and Protects Against Stress. *Cell*, 130(2), 247–258.
- Yue, Cheng, Lysko, McKenna, Feuerstein, Gu, Lysko, Davis, Feuerstein** (1992). Carvedilol, a new vasodilator and  $\beta$  adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263(1), 92–98.
- Zheng, Han, Xiao** (2004). Distinct  $\beta$ -adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 56(1), 1–15.
- Zhou, Yang, Zhu, Zhang, Wang, Rohrer, Devic, Kobilka, Lakatta, Cheng, Xiao** (2000). Spontaneous Activation of  $\beta$ 2- but Not  $\beta$ 1-Adrenoceptors Expressed in Cardiac Myocytes from  $\beta$ 1 $\beta$ 2 Double Knockout Mice. *Molecular Pharmacology*, 58(5), 887–894.