

Komórkowe drogi przekazywania sygnałów w przerostie i niewydolności serca

Cellular signal transduction pathways in cardiac hypertrophy and heart failure

Bohdan Lewartowski, Urszula Mackiewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie

Przerost i niewydolność serca cechują się głębokimi zmianami ekspresji i funkcji szeregu białek komórkowych, będącymi przyczyną zaburzeń rytmu i hemodynamiki. Są one inicjowane przez wzrost obciążenia serca, wyczuwany przez mechanoreceptory komórkowe oraz przez aktywację chemoreceptorów błonowych miocytów i fibroblastów przez ciała czynne. W niniejszej pracy przedstawiono budowę i funkcję komórkowych molekularnych szlaków przekazujących informację generowaną przez receptory do jądra komórkowego, gdzie powoduje ona modyfikację ekspresji genów kodujących komórkowe białka. W szczególności przedstawiono strukturę i funkcję dysków Z i integrzyn pełniących funkcję mechanoreceptorów, szlak kalcyneuryny/NFAT, szlaki MAP-kinaz (kinaz aktywowanych przez mitogeny) oraz szlaki aktywowane przez receptory angiotensynowe AT1: szlaki kinazy proteinowej C (PKC), szlaku kinazy AKT/mTOR oraz szlaku EGRF/ERK1,2.

Przedstawiono również czynnościowe powiązania pomiędzy tymi szlakami oraz wyniki prac poświęconych ich roli w inicjowaniu przerostu i niewydolności serca.

Słowa kluczowe: przerost serca, niewydolność serca, komórkowe szlaki przekazywania sygnałów

Abstract

Cardiac hypertrophy and heart failure are characterized by significant changes of expression and function of many proteins. These changes are responsible for arrhythmias and haemodynamic disturbances. They are initiated by increased cardiac load, detected by cellular mechanoreceptors, and by activation of sarcolemmal chemoreceptors in myocytes and fibroblasts. In the present paper the authors describe the structure and function of molecular cellular pathways for transmission of the information generated by receptors to the nucleus, where it modifies the expression of genes coding for cellular proteins.

The authors describe in detail: structure and function of Z-discs and integrins working as mechanoreceptors, calcineurin/NFAT pathways, MAP kinases pathways, pathway activated by AT1 receptors: protein kinase C pathways, AKT/mTOR kinase pathway and EGRF/ERK1,2 pathway. Functional relationships between pathways mentioned and the results of studies analysing their role in cardiac hypertrophy and heart failure are also presented.

Key words: cardiac hypertrophy, heart failure, cellular signal transduction pathways

Kardiologia Polska 2006; 64: 10 (supl. 6): 591–600

Wstęp

Przerost i niewydolność serca należą do najważniejszych przyczyn „sercowych” zgonów. Ich leczenie wy-

maga dokładnej znajomości zaburzeń fenotypu miocytów i fibroblastów serca, występujących w jego przerostie i niewydolności oraz mechanizmu odpowiedzialnych za nie zmian ekspresji genów.

Adres do korespondencji:

Bohdan Lewartowski, Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel.: +48 22 569 38 40, faks: +48 22 569 37 12, e-mail: blew@cmkp.edu.pl

Zmiany fenotypu w przeroście i niewydolności serca polegają na poziomie komórkowym na zaburzeniach ekspresji i czynności wielu białek ogólnie określanych jako cofnięcie się do fenotypu płodowego. Najważniejsze zaburzenia w miocytach to pobudzenie ekspresji peptydów natriuretycznych (ANP i BNP), pobudzenie ekspresji i zmiana ilościowego stosunku izoform α - i β -miozyny (na korzyść β), zmniejszenie ekspresji i/lub przewodności kanałów potasowych K_1 , K_r , K_{TO} i in., zmniejszenie ekspresji koneksyny, tj. białka kanałów zwanych koneksonami, zapewniających elektryczny kontakt między komórkami, oraz zaburzenia ekspresji i czynności białek komórkowego obiegu Ca^{2+} . Zmniejszenie ekspresji, a co za tym idzie przewodności kanałów potasowych i koneksyny jest wraz z nadekspresją wymiennika Na^+/Ca^{2+} (NCX) ważnym mechanizmem zaburzeń rytmu w przerosłym i niewydolnym sercu. Zaburzenia ekspresji i aktywności wapniowej ATP-azy siateczki sarkoplazmatycznej (SERCA2a) oraz nadekspresja wymiennika Na^+/Ca^{2+} (NCX) w połączeniu z nadmierną przewodnością kanałów wapniowych siateczki (receptorów rianodynowych – RyRs) są przyczyną zmniejszenia siły i spowolnienia kinetyki skurczu i rozkurczu miocytów mięśnia sercowego i wpływają na zmniejszenie jego kurczliwości. Ponadto w niewydolności serca dochodzi do zaburzeń ekspresji i funkcji receptorów adrenergicznych β_1 i β_2 .

W fibroblastach dochodzi do pobudzenia syntezy nadmiernych ilości fizjologicznego, a później patologicznego kolagenu, fibronektyny i innych białek macierzy pozakomórkowej. Prowadzi to do zwłóknienia mięśnia sercowego, zaburzenia przestrzennego uporządkowania miocytów i ostatecznie do rozstrzeni komory, czyli przemodelowania narządowego. Odgrywa ono nie mniejszą rolę w rozwoju niewydolności serca niż przemodelowanie komórkowe, a w niektórych modelach nawet decydującą.

Dokładniejsze informacje o zmianach fenotypu komórkowego i przemodelowaniu narządowym serca Czytelnik znajdzie w bieżących pracach poglądowych [1–3] i rozdziałach w opracowaniach monograficznych [4, 5].

Zmiany fenotypu są skutkiem przeprogramowania ekspresji genów kodujących, wymienione powyżej (i inne), białka komórek serca pod wpływem patogenicznych bodźców. Przerost i niewydolność serca występują w przebiegu chorób powodujących zwiększone obciążenie miocytów; mogą również być uwarunkowane genetycznie. W nadciśnieniu tętniczym serce poddane jest stale zwiększonemu obciążeniu następczemu. Zwiększenie obciążenia następczego i wstępnego występuje również w wadach serca. W niewydolności wieńcowej, a zwłaszcza w zawale, przeżywające miocyty generują siły kompensujące ubytek ginących miocytów, a więc obciążenie pojedynczego miocytu również ulega zwiększeniu. Te mechaniczne bodźce działają na mechanore-

ceptory komórki. Ich pobudzenie uruchamia wydzielenie z miocytów czynników autokrynych i parakrynych (np. angiotensyny II) oraz aktywuje kaskadowe molekularne szlaki przekazywania sygnałów o obciążeniu do genomu komórkowego, w wyniku czego następują zmiany ekspresji genów kodujących, wymienione powyżej (i ewentualnie inne), białka i zmiany syntezy białek.

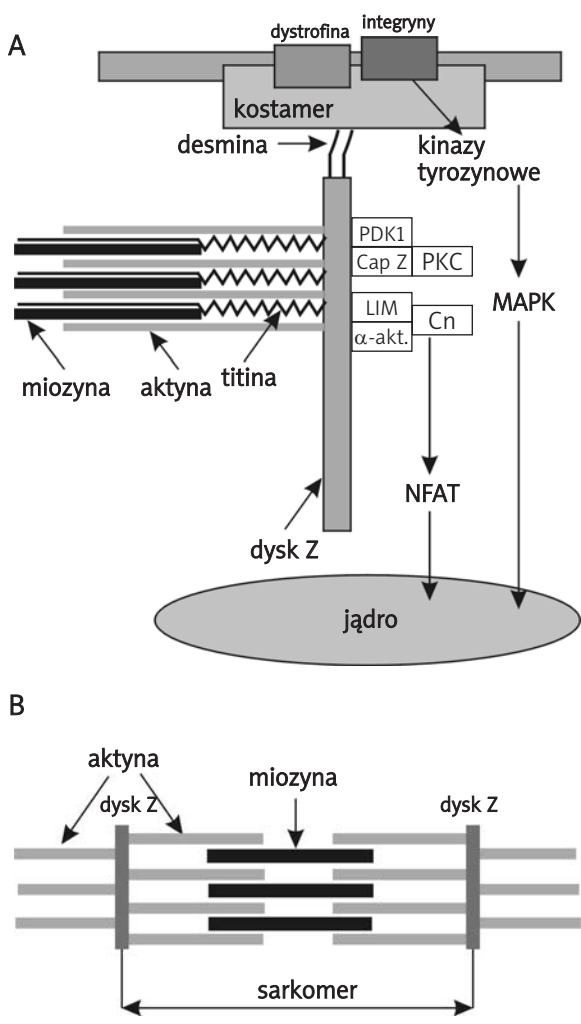
Kaskadowe przekazywanie sygnałów pomiędzy cząsteczkami tworzącymi szlaki od mechanoreceptorów do jądra komórkowego odbywa się głównie na dwa sposoby: (1) poprzez bezpośrednie oddziaływanie na siebie cząsteczek białek (*protein-protein interaction*) oraz (2) przez fosforylację cząsteczek białek przez enzymy kinazy białkowej lub ich defosforylację przez enzymy fosfatazy.

Takich równoległych szlaków jest w miocytach i fibroblastach serca wiele. Każdy z nich jest aktywowany w inny sposób, a ponadto oddziałują one nawzajem na siebie pobudzająco lub hamująco, tworząc skomplikowaną sieć. Mimo trudności w ich badaniu wykonano już w tej dziedzinie ogromną pracę i nagromadzono bardzo wiele wyników, zawartych w rozlicznych publikacjach, nie zawsze dających się spójnie interpretować. Celem niniejszego opracowania jest próba całościowego przedstawienia układu dróg sygnalizacyjnych w przeroście i niewydolności serca w sposób na tyle uporządkowany, aby było ono dostępne dla Czytelników niezajmujących się tymi zagadnieniami na co dzień.

Mimo dążenia do uproszczeń niezbędne było przedstawienie wielu ogniw poszczególnych szlaków noszących często niebydło zrozumiałe nazwy i oznaczanych ich skrótami. Nazwy te najczęściej pochodzą od pierwotnie odkrytej funkcji danego enzymu czy receptora. Większość z nich ma jednak wiele funkcji w zależności od ich różnej lokalizacji w komórce. Wobec tego pierwotne nazwy poszczególnych enzymów często nie mają nic wspólnego z ich funkcją w systemach sygnalizacyjnych opisywanych w tej pracy. Np. kinaza syntazy glikogenu (*glycogen synthase kinase* – GSK) pełni również bardzo ważną funkcję inhibitora przerostu mięśnia sercowego m.in. poprzez fosforylację NFAT (patrz podrozdział *Szlak kalcyneuryny*). Mimo tych trudności opanowanie pojęciowe przedstawionych systemów sygnalizacyjnych jest niezbędne dla osób zajmujących się fizjologią, patologią i klinią chorób serca, gdyż wszystkie obecnie publikowane prace dotyczące badań nad przerostem i niewydolnością serca na poziomie komórkowym odwołują się do nich.

Mechanoreceptory komórkowe

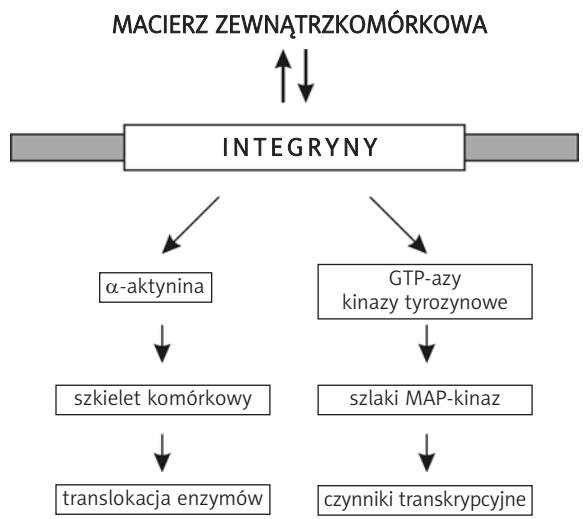
Miocyty posiadają struktury pozwalające im na percepcję napięcia generowanego przez daną komórkę i napięcia powstającego w macierzy zewnątrzkomórkowej. Strukturami percepcji napięcia powstającego w przestrzeni pozamiocytarnej są kostamery sarkolemy, a własnego napięcia miocytu – dyski Z sarkomerów.



Rycina 1. Kostamer i dysk Z sarkomeru jako komórkowe mechanoreceptory (czujniki napięcia). **A** – kalcineuryna (Cn); LIM, α -aktynina – białka wiążące Cn z dyskiem Z; PDK1 i PKC – kinazy białkowe; Cap Z – białko wiążące kompleks kinaz z dyskiem Z; MAPK – kaskada kinaz aktywowanych przez mitogeny; NFAT – jądrowy czynnik aktywowanych limfocytów T. **B** – schemat sarkomeru

Kostamery

Kostamery są kluczowymi strukturami transmisji informacji o siłach rozwijanych w przestrzeni pozakomórkowej do genomu miocytów i fibroblastów serca. Są one skupiskami białek inkorporowanych do błony komórkowej w bezpośredniej bliskości dysków Z sarkomerów (rycina 1A). W ich skład wchodzi m.in. α -aktynina (która jest również ważnym składnikiem dysku Z), talina, winkulina, ankyryna, β -integryny i dystrofina. Za-

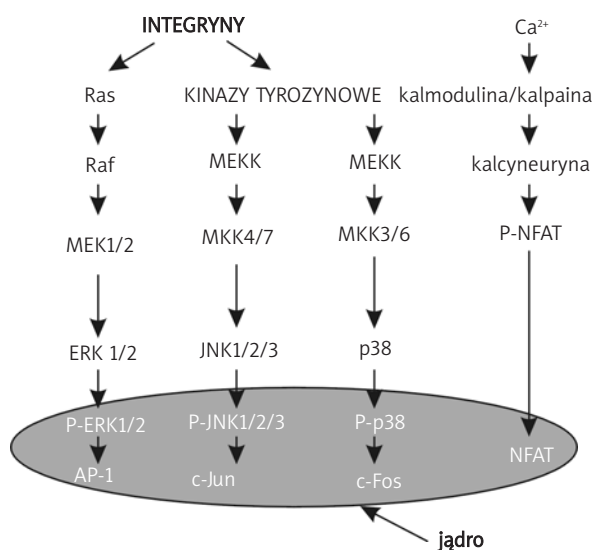


Rycina 2. Rola integryn w inicjowaniu przemodelowania szkieletu komórkowego i aktywacji MAP-kinaz (kinaz aktywowanych przez mitogeny). Dokładne objaśnienia w tekście (rozdział *Integryny*)

sadniczą rolę w przekazywaniu informacji o obciążeniu odgrywają integryny.

Integryny

Integryny są glikoproteinami stanowiącymi bezpośrednio ogniwo pomiędzy strukturami macierzy zewnątrzkomórkowej a układami wewnątrzkomórkowymi [6]. Jest to złożona rodzina przezbłonowych receptorów niekwalencyjnie złożonych z podjednostek α (120–180 kDa) i β (90–110 kD). Każda podjednostka posiada dużą domenę zewnątrzkomórkową (700–1100 aminokwasów), pojedynczy odcinek przezbłonowy i domenę wewnątrzkomórkową (20–60 aminokwasów). Ligandami macierzy zewnątrzkomórkowej integryn są fibronektyna, kolagen, laminina, VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) i in. Dzięki połączeniom z tymi białkami zewnątrzkomórkowa domena jest odkształcana przez rozwijane w środowisku miocytu siły. Ta zmiana konformacji jest przenoszona do domeny wewnątrzkomórkowej, która łączy się z podbłonowymi enzymami, przez co może aktywować szlaki sygnalizacyjne (rycina 2). Ponadto łączy się ona z włóknienkami niesarkomerowej aktyny, łączącymi kostamery przez dyski Z z sarkolemą. W ten sposób integryny łączą szkielet komórkowy z macierzą zewnątrzkomórkową. Przemodelowanie szkieletu komórkowego ma zasadnicze znaczenie dla formowania szlaków sygnalizacyjnych, gdyż powoduje kierowanie białek (enzymów) do odpowiednich strate-



Rycina 3. Trzy odgałęzienia szlaków przekazywania sygnałów MAP-kinaz oraz szlak kalcyneuryny. Końcowe kinazy odgałęzień: ERK1/2, JNK1/2/3 oraz p38 po ich fosforylacji przez, odpowiednio, kinazy MEK1/2, MKK4/7 oraz MKK3/6 ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie fosforylują czynniki transkrypcyjne AP-1, c-Jun i c-Fos. Kalcyneuryna aktywowana przez Ca^{2+} za pośrednictwem kalmoduliny lub kapainy defosforyluje czynnik transkrypcyjny P-NFAT (ufosforylowany NFAT), który ulega wtedy translokacji do jądra komórkowego, gdzie wpływa na ekspresję szeregu genów. Ras – GTP-aza; Raf – kinaza białkowa

gicznych przestrzeni komórkowych. Ekspresja integrzyn zachodzi we wszystkich komórkach mięśnia sercowego, przede wszystkim w miocytach i fibroblastach. Ich ekspresja zostaje nasilona pod wpływem bodźców mechanicznych. Aktywowane przez mechaniczne bodźce integryny aktywują początkowe ogniwa sygnalizacyjne (rycina 2), wśród których do głównych zaliczane są małe GTP-azy, jak Rho i Rac, a następnie kinazy tyrozynowe, takie jak pp125, FAK (*Focal Adhesion Kinase*) i Pyk2 (*FAK related kinases*). Stanowią one początkowe ogniwa szlaków kinaz białkowych PKC i ERK.

W sercu integryny odgrywają bardzo ważną rolę w inicjowaniu przerostu miocytów oraz w pobudzaniu fibroblastów do rozplemu i wzmożonej produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej [6].

Dyski Z

Dysk Z odgranicza (i łączy ze sobą) poszczególne sarkomery. Ta pozycja lokuje go na skrzyżowaniu dróg od-

działania bodźców mechanicznych pochodzących z 2 źródeł: napięcia generowanego przez 2 otaczające go sarkomery (rycina 1B) oraz napięć generowanych w przestrzeni pozakomórkowej przetworzonych w biochemiczną informację przekazywaną za pośrednictwem odpowiedniego kostameru (rycina 1A). Dysk Z jest więc niejako predestynowany do odgrywania zasadniczej roli w fizjologicznej i patologicznej regulacji właściwości miocytów przez bodźce mechaniczne [7]. Zakotwiczone są w nim m.in. nici aktyny, które są obok miozyny zasadniczym elementem sarkomeru generującym skurczowe napięcie. Napięcie to oddziałuje więc z obu stron na prążek Z, który stanowi jakby wewnątrzkomórkowe ściągno. Tak więc połączenia aktyny z dyskiem Z mogą tworzyć mechanizm komórkowej percepcji napięcia generowanego przez sarkomer, zwłaszcza że zlokalizowanych jest w nim szereg białek będących ogniwami szlaków sygnalizacyjnych. Do białek tych należy przede wszystkim kinaza białkowa C (PKC), kalcyneuryna i jej substrat NFAT oraz PDK1. Białkiem kotwiczącym PKC w dysku Z jest CapZ (*actin capping protein*), które również wiąże i zakotwicza w nim nitki aktyny. Białkami kotwiczącymi kalcyneuryny są α -aktylina i LIM [7].

Szlak kalcyneuryny

Szlak kalcyneuryny (Cn) jest jedną z lepiej poznanych wewnątrzkomórkowych dróg sygnalizacyjnych. Jej udział w aktywacji przerostu i niewydolności serca jest dobrze udokumentowany. Nadekspresję i/lub aktywację kalcyneuryny stwierdzono w licznych zwierzęcych modelach przerostu i niewydolności oraz w warunkach klinicznych u ludzi [8–10]. U chorych z obstruktywną kardiomiopatią przerostową lub zwężeniem lewego ujścia tętniczego z przerostem serca stwierdzono wzrost aktywności enzymatycznej Cn odpowiednio do 163% i 275% kontroli. Towarzyszył mu wzrost ekspresji białka (podjednostki katalitycznej) odpowiednio do 178% i 151% kontroli [9]. W innej pracy stwierdzono w sercach pacjentów z idiopatyczną kardiomiopatią rozstrzeniową 80-procentowy wzrost aktywności enzymatycznej Cn, jak również zwiększoną translokację NFAT do jąder komórkowych [10].

Cn jest fosfatazą serynowo-treoninową, zwaną fosfatazą PP2B, a ostatnio także fosfatazą PP3. Głównym jej substratem jest czynnik transkrypcyjny aktywowanych limfocytów T (*Nuclear Factor of Activated T cells* – NFAT). NFAT w wyniku defosforylacji przez kalcyneurynę ulega translokacji do jądra komórkowego i tam aktywuje program transkrypcji genów (rycina 3).

Cn składa się z podjednostki katalitycznej (CnA) i podjednostki regulatorowej (CnB) (rycina 4A). CnA posiada poza domeną katalityczną trzy domeny niekatalityczne: wiążącą CnB, wiążącą kalmodulinę i autosupresyjną, hamującą aktywność centrum enzymatycznego.

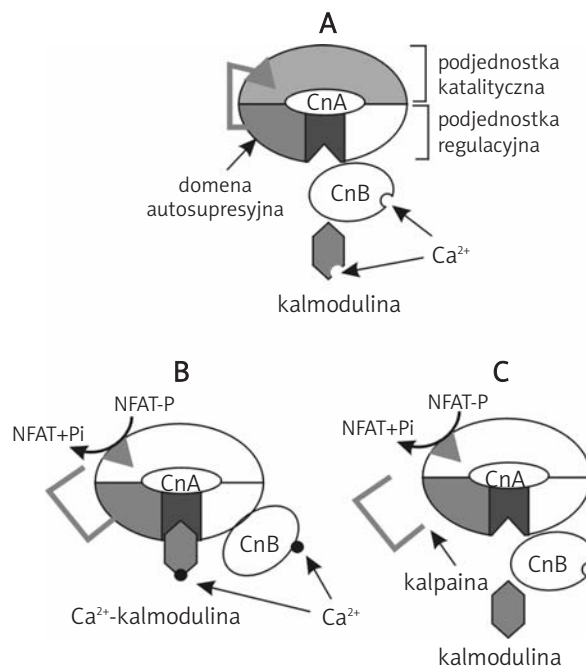
CnB posiada domenę wiążącą Ca^{2+} . Nieuwapniona CnB blokuje domenę CnA wiążącą kalmodulinę [9, 11]. Kalcyneuryna jest enzymem wapniozależnym, reagującym zwiększeniem aktywności na długotrwałe wzrosty komórkowego stężenia Ca^{2+} [12].

Wapń aktywuje kalcyneurynę w 2 mechanizmach. W pierwszym z nich kalcyneuryna B (CnB) wiąże Ca^{2+} , w wyniku czego zmienia ona swoje położenie w stosunku do CnA, odstawiając jej domenę wiążącą uwapnioną kalmodulinę. Związanie kalmoduliny zmienia z kolei konformację domeny autosupresyjnej, która odblokuje centrum katalityczne. Umożliwia to defosforylację NFAT i jego translokację do jądra komórkowego (rycina 4B). W drugim mechanizmie jony Ca^{2+} aktywują proteazę zwaną kalpainą. Aktywowana kalpaina przecina kalcyneurynę w taki sposób, że odłącza od niej C-koniec zawierający domenę autosupresyjną. W ten sposób powstaje stale aktywna forma kalcyneuryny (rycina 4C). Ostatnio wykazano, że do jądra komórkowego może wnikać nie tylko defosforylowany NFAT, ale również obie formy aktywowanej kalcyneuryny. Kalcyneuryna o pełnej długości, aktywowana przez kalmodulinę, może przemieszczać się przez błonę jądrową w obie strony. Kalcyneuryna aktywowana przez kalpainę pozostaje w jądrze, uniemożliwiając refosforylację znajdującego się w nim NFAT i jego przemieszczenie do sarkoplazmy. W ten sposób proces indukcji przerostu zostaje podtrzymany. Zjawisko to występuje zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w niewydolnych sercach ludzkich [11].

Kalcyneuryna rozmieszczona jest w kilku kompartmentach komórkowych: związana z dyskiem Z, pod sarkolemą (w kawołach), w sarkoplazmie i w jądrze. W dysku Z kalcyneuryna jest zakotwiczona za pomocą białka LIM i α -aktyliny. Lokalizacja w dysku Z, który pełni funkcje receptora napięcia komórkowego, może ułatwiać aktywację kalcyneuryny również przez bliskość pęcherzyków końcowych SR, której RyRs uwalniają Ca^{2+} . Rzeczywiście zahamowanie ekspresji LIM u transgenicjnych myszy zapobiega aktywacji CnA w odpowiedzi na zawał [13]. Kalcyneuryna zlokalizowana w domenach podbłonowych jest związana z ATP-azą wapniową sarkolemy (*Plasmalemmal Ca^{2+} ATP-ase* – PMCA), usuwającą Ca^{2+} z komórki, to jest m.in. ze środowiska Cn. Tak więc aktywność PMCA może regulować aktywność kalcyneuryny [14]. Ostatnio stwierdziliśmy, że po eksperymentalnym zawale serca u szczura szybkość transportu Ca^{2+} przez PMCA spada [15], co może być jednym z czynników aktywujących kalcyneurynę.

Endogenna regulacja aktywności kalcyneuryny

Aktywność kalcyneuryny jest również modulowana przez szereg czynników endogennych, z których naj-



Rycina 4. Budowa i regulacja aktywności kalcyneuryny. **A** – forma nieaktywna kalcyneuryny. Przy niskim stężeniu Ca^{2+} domena autosupresyjna blokuje centrum enzymatyczne podjednostki katalitycznej kalcyneuryny A (CnA), a kalcyneuryna B (CnB) blokuje domenę CnA, wiążącą kalmodulinę. **B** – forma aktywna kalcyneuryny. Przy podwyższonym stężeniu Ca^{2+} wiąże się on z kalmoduliną oraz z CnB. Wiązanie Ca^{2+} z CnB umożliwia wiązanie Ca^{2+} -kalmoduliny z domeną CnA, co powoduje odblokowanie centrum enzymatycznego CnA i defosforylację NFAT. **C** – aktywowana przez wzrost stężenia Ca^{2+} kalpaina odtrawia fragment domeny autosupresyjnej CnA, odblokowując jej centrum enzymatyczne

ważniejsze z punktu widzenia tematyki niniejszego opracowania to MCIP1 (*modulatory calcineurin interacting protein*) i kinaza syntazy glikogenu (GSK-3 β).

MCIP1 wiąże się z podjednostką CnA i hamuje jej aktywność. U młodych myszy nadekspresja MCIP1 powoduje pewne zmniejszenie serca, natomiast u myszy dorosłych powoduje ona hamowanie odpowiedzi hipertroficjnych. Sugeruje to, że aktywacja szlaku Cn odgrywa jakąś rolę w fizjologicznym wzroście serca u młodych zwierząt, natomiast u zwierząt dorosłych jest co najmniej jednym z mechanizmów patologicznego przerostu. Cn pobudza ekspresję MCIP1, co być może jest mechanizmem kontrolnym ograniczającym jej aktywność.

GSK-3 β blokuje szlak Cn przez bezpośrednią fosforylację NFAT, co hamuje jego translokację do jądra komórkowego oraz powoduje jego wyjście z jądra komórkowego [16]. GSK-3 β hamuje na tej drodze odpowiedzi hipetroficzne, ale pobudza ekspresję czynników natriuretycznych [17, 18].

Farmakologiczne blokowanie szlaku kalcyneuryny

Aktywność Cn jest blokowana przez związki immunosupresyjne – cyklosporynę A i FK-506 (takrolimus). Oba te czynniki hamują przerost serca spowodowany aktywacją Cn, jednakże wywołują ogólnoustrojowe niekorzystne zmiany spowodowane ich działaniem toksycznym.

Przedstawione powyżej wyniki sugerują, że aktywacja szlaku Cn występuje w modelach doświadczalnych i w warunkach klinicznych w sercach ludzkich i że odgrywa ona kluczową rolę w indukowaniu przerostu miocytów i uruchomieniu programu fenotypu płodowego.

Kaskada MAP-kinaz

Kaskada MAP-kinaz (kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny – *Mitogen Activated Protein kinases*) odgrywa istotną rolę w mechanizmach odpowiedzi komórek na zmianę warunków ich środowiska, np. w ich adaptacji do ischemii czy hipoksji. Odgrywa ona ważną, aczkolwiek nie do końca rozumianą rolę w indukcji przerostu serca i rozwoju jego niewydolności. W jej aktywacji w odpowiedzi na bodźce mechaniczne ważną rolę odgrywają integryny.

Kaskada MAP-kinaz posiada 3 równoległe odgałęzienia, z których każde ma ogniwo początkowe, aktywowane przez GTP-azy i kinazy tyrozynowe (patrz *Integryny*), ogniwa pośrednie oraz ogniwo końcowe fosforylujące białka efektorowe, tj. jądrowe czynniki transkrypcyjne. Odgałęzienia te są oznaczane symbolami ich końcowych ogniw: odgałęzienie kinaz regulowanych przez zewnętrzne sygnały (*external signal regulated kinases* – ERKs), odgałęzienie końcowych kinaz p38 oraz odgałęzienie końcowych kinaz JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*) (rycina 3).

Sygnalizacja przez odgałęzienie ERK jest inicjowana w błonie komórkowej przez białko Ras (GTP-aza), aktywowane przez integryny. Ras bezpośrednio łączy się z MAP-kinazą Raf, która następnie fosforyluje MAP-kinazy MEK1 i MEK2. MEK1/2 bezpośrednio fosforylują motyw TEY końcowych kinaz ERK1 i ERK2. Aktywowane kinazy ERK1/2 ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie aktywują czynnik transkrypcyjny AP-1.

Aktywacja odgałęzienia ERK ma dobrze udokumentowane działanie proprzerostowe oraz powoduje rozwój niewydolności serca [19].

Sygnalizacja przez odgałęzienie JNKs jest inicjowana przez aktywowane przez integryny GTP-azy i kinazy

tyrozynowe, które aktywują kinazy MEKK. MEKK aktywują kinazy MKK4 i MKK7, które fosforylują motyw TPY w kinazach JNKs. Kinazy JNKs fosforylują czynnik transkrypcyjny c-Jun. c-Jun wraz z czynnikiem c-Fos tworzą heterodimer AP-1, czynnik transkrypcyjny fosforylowany przez ERK1 i ERK2 (patrz wyżej).

Sygnalizacja przez odgałęzienie kinaz p38 jest aktywowana w błonie komórkowej przez MEKK, które fosforylują MKK3 i MKK6, bezpośrednio fosforylujące motyw TGY w kinazach p38 [19, 20]. W odróżnieniu od dobrze udokumentowanego proprzerostowego działania aktywacji odgałęzienia ERK, rola aktywacji kinaz p38 i JNKs w przeroście i niewydolności nie jest jasna, zaś różne prace dostarczają w tej kwestii często sprzecznych danych [19, 20]. Wcześniejsze badania wykonane na hodowlach komórek zdawały się wskazywać, że aktywacja tych odgałęzień indukuje przerost. Jednakże nowsze wyniki badań *in vivo*, polegających na aktywacji lub blokowaniu odnóg JNK lub p38, nie dawały wyników jednoznacznych co do ich roli w przeroście i niewydolności inicjowanych u zwierząt zwiększonym obciążeniem serca. Co więcej, JNKs oraz kinazy p38 fosforylując NFAT, hamują efekty aktywacji kalcyneuryny [19, 20]. Nadal jednak ukazują się prace, których wyniki potwierdzają istotny udział tych szlaków w mechanizmach przerostu, przynajmniej w niektórych modelach doświadczalnych [21]. Na przykład kinaza p38 α wydaje się odpowiedzialna za pobudzenie ekspresji wymiennika Na/Ca w przerostym i niewydolnym sercu [22]. Donoszono również, że transfekcja genem represyjnym c-Jun zapobiegała przerostowi serca i hamowała ekspresję genów BNF i patologicznego kolagenu I, III, i IV w odpowiedzi na podawaną szczyrom ATII. U szczurów z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym transfer genu represyjnego c-Jun hamował ekspresję patologicznego kolagenu I, III, i IV i powodował regresję przerostu [23], mimo że nie wpływał na ciśnienie krwi.

Jak się wydaje, przeważa opinia, że szlaki kinaz p38 i JNKs są fizjologicznie zaangażowane w regulację przerostu serc rosnących młodych zwierząt. Natomiast ich izolowana aktywacja nie wystarcza do indukcji przerostu i apoptozy, ale może modyfikować działanie innych czynników [19, 20].

Interakcja szlaku kalcyneuryny z innymi szlakami przekazywania sygnałów

Jak się wydaje, najważniejsza jest wzajemna zależność układu Cn–NFAT i szlaku Ras–MEK1–ERK1/2 (patrz *Kaskada MAP-kinaz*). Mianowicie aktywacja Ras–MEK1–ERK1/2 wspomaga Cn–NFAT, a aktywacja Cn–NFAT wspomaga efekty aktywacji Ras–MEK1–ERK1/2 [20]. Ta pierwsza interakcja jest wynikiem pobudzenia ekspresji genów zależnych od NFAT poprzez indukcję przez ERK1/2 aktywności Ap1, który jest niezbędnym partne-

rem działania NFAT. Aktywacja Cn powoduje osłabienie sygnalizacji p38 MAPK [24–26].

MEKK3 aktywuje szlak Cn–NFAT przez fosforylację *calcineurin-interacting protein*, a zablokowanie MEKK3 blokuje odpowiedź na angiotensynę II (ATII). ATII indukuje fosforylację MEKK3 [27]. Odgałęzienia JNK i p38 hamują sygnalizację Cn–NFAT przez fosforylację NFAT w jądrze komórkowym. Aktywacja tych odgałęzień hamuje, a blokowanie ułatwia odpowiedź przerostową [17].

Stwierdzono, że Cn jest aktywowana w beleczkach izolowanych z prawych komór eksplantowanych serc ludzkich przez agonistów receptorów sprzężonych z białkami $G\alpha_q/G\alpha_{11}$: endotelinę-1, ATII i urotensynę II (patrz następny podrozdział). Aktywacja Cn jest prawdopodobnie przyczynowo związana z aktywacją PKC, jednak nie bezpośrednio, lecz za pośrednictwem fosforylacji białek będących substratami Cn [28].

Szlaki aktywowane przez komórkowy układ renina–angiotensyna (RAS)

Kluczowymi ogniwami układu RAS, których ekspresja zachodzi w miocytach serca, są angiotensynogen, 3 enzymy konwertujące angiotensyny (*angiotensin converting enzymes* – ACE i ACE2 oraz chymaza) oraz receptory ATII: AT1 i AT2. Nie stwierdzono ekspresji reniny w miocytach. Jest ona pobierana z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, do której dociera z osocza krwi [29].

ACE, produkujący ATII z angiotensyny I, jest w zdrowym sercu zlokalizowany głównie w śródbłonku naczyniowym, natomiast jego ekspresja w normalnych, dojrziałych miocytach jest znikoma. Jednakże w przeroście i niewydolności serca stwierdza się wzmożenie jego ekspresji w miocytach wraz ze zwiększeniem ekspresji angiotensynogenu i receptorów AT1.

W stanie fizjologicznym ATII syntetyzowana w niewielkich ilościach w miocytach serca jest w nich magazynowana w postaci małych ziarnistości. Istnieje wiele danych pochodzących z badań eksperymentalnych i klinicznych, świadczących o zasadniczej roli „sercowej” ATII w przeroście i niewydolności serca. Bardzo przekonujących bezpośrednich dowodów dostarczyły klasyczne doświadczenia Sadoshimy i wsp. [30], wykonane na hodowlach miocytów na podłożach dających się rozciągać. Taki bodziec mechaniczny, będący odpowiednikiem zwiększonego obciążenia serca *in situ*, uruchamiał szereg reakcji typowych dla rozpoczynającego się przerostu: ekspresję *c-fos* i EGR-1, α -aktyny mięśni szkieletowych, i przedsiorkowego peptydu natriuretycznego oraz nasilenie syntezy białek mierzonej inkorporacją ^3H -fenylalaniny. Reakcje te były blokowane przez blokery receptora angiotensyny II (AT1). Rozciąganie hodowli powodowało wydzielenie ATII z miocytów do środowiska, przy czym nie stwierdzano nasilenia aktywności ACE, a pojawienie

się ATII w środowisku nie było hamowane przez bloker ACE. Tak więc bodziec mechaniczny powodował w tych doświadczeniach wydzielenie zmagazynowanej w miocytach ATII do środowiska i wiązanie jej z AT1, co uruchamiało reakcje typowe dla rozpoczynającego się przerostu. Podobne reakcje na nagłe przeciążenie ciśnieniem stwierdzono w sercu świni *in situ* [31]. W ciągu 30 min występowało uwolnienie ATII z ziarnistości w miocytach, a w ciągu 3–6 godz. występowało zwiększenie o 100% zawartości mRNA dla angiotensynogenu oraz pojawienie się nieoznaczalnego uprzednio mRNA dla ET1. W ciągu 24 godz. występowało znaczne zwiększenie nieoznaczalnej uprzednio ekspresji ACE i IGF-1. Wzrost ekspresji angiotensynogenu i ET1 był znoszony przez blokowanie receptorów AT1 lozartanem. Lozartan nie hamował wzrostu ekspresji ACE i IGF-1. Lozartan nie zapobiegał przerostowi, przejawiającemu się w ciągu 72 godz. znacznym zwiększeniem masy lewej komory. W sercach nietraktowanych lozartanem występowało adaptacyjne zwiększenie siły skurczu, w wyniku czego nie zwiększało się ciśnienie końcoworozkurczowe i objętość końcoworozkurczowa lewej komory. Lozartan blokował ten odczyn adaptacyjny, który prawdopodobnie zależał od ET1. Wyniki te wskazują, że również w sercu *in situ* najwcześniejszą reakcją na przeciążenie jest wyrzut prefabrykowanej ATII do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie łączy się ona z receptorem AT1, co zapoczątkowuje dalsze reakcje. Nie jest to jednak niezbędne dla inicjowania przerostu serca przez zwiększone obciążenie, gdyż może on być inicjowany przez równoległe działające inne szlaki (np. ERK1/2 i kalcyneuryny).

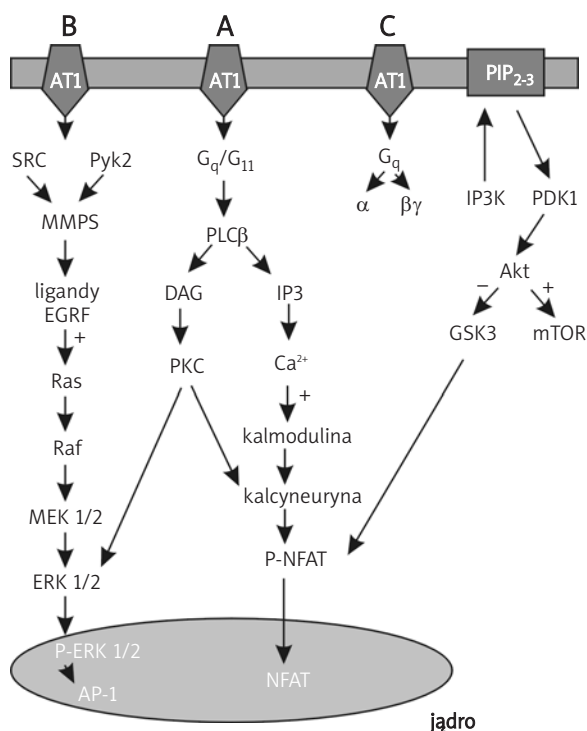
Receptory angiotensyny II, AT1

Przzerostowe działanie ATII jest wynikiem jej wiązania z receptorem AT1, którego ekspresja w przeroście i niewydolności serca jest nasiloną. Ponadto receptory AT1 mogą być aktywowane bez udziału ATII bezpośrednio lub pośrednio przez bodźce mechaniczne [32]. Mimo wielu dowodów na kluczowy udział ATII i jej receptorów AT1 w przeroście i niewydolności serca mechanizm ich działania nie jest w pełni rozumiany. Wydaje się, że mogą one wpływać na ekspresję białek bezpośrednio lub na kilku drogach zależnych lub niezależnych od białek G.

Działanie bezpośrednie polega na aktywacji kinazy guanylowej JAK, które powodują translokację do jądra komórkowego białek STAT, będących czynnikami transkrypcyjnymi.

Najwcześniej zbadana droga pośrednia to aktywacja fosfolipazy C β za pośrednictwem białek G $_q$ i G $_{11}$ (rycina 5). W wyniku dokonywanej przez nią hydrolizy fosfatydyloinozytoli błonowych powstaje trifosfoinozytol (IP3) oraz diacylglicerol (DAG).

Receptory IP3 (IP3R) siateczki endoplazmatycznej zlokalizowane są m.in. w miocytach komór serca



Rycina 5. Interakcja szlaków aktywowanych przez receptory angiotensynowe AT1 ze szlakami ERK i kalcyneuryny. **A** – receptor AT1 aktywuje za pośrednictwem białka G_q lub G_{11} izoformę β fosfolipazy C (PLC β). Produktami hydrolizy fosfoinozytoli błonowych (PIP $_2$) przez PLC β są diacylglicerol (DAG) i trifosforan inozytoli (IP3). DAG aktywuje kinazę białkową C, która aktywuje kinazy ERK1/2 i kalcyneurynę. IP3 aktywując swe receptory w siateczce sarkoplazmatycznej, powoduje wzrost rozkurczowego stężenia Ca^{2+} , który również aktywuje kalcyneurynę. **B** – Receptor AT1 aktywuje bezpośrednio kinazę tyrozynową SRC i kinazę Pyk2, które aktywują błonowe metaloproteiny (MMPs). W wyniku ich działania powstają ligandy aktywujące receptor nabłonkowy czynnika wzrostowego (EGFR), który aktywuje odgałęzienie ERK kaskady MAP-kinaz. **C** – podjednostki $\beta\gamma$ białka G_q aktywują kinazę IP3K, która fosforyluje błonowe fosfoinozytyle (PIP $_2$). Powoduje to translokację do sarkolemy i aktywację kinazy PDK1, która aktywuje kinazę Akt. Akt unieczynnia kinazę syntazy glikogenu (GSK-3), która fosforyluje NFAT, blokując szlak kalcyneuryny. Akt aktywuje również regulator translacji białek mTOR

w otoczce jądra komórkowego i zdają się otwierać do jego wnętrza. Receptory te tworzą kompleks z kalmoduliną i kinazą proteinową (CaMK II), zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny. Aktywacja IP3R powoduje wzrost stężenia Ca^{2+} w domenach otoczki jądrowej i aktywację CaMK II. CaMK II fosforyluje (i unieczynnia) deacetylazę histonową (HDAC), która hamuje związaną z przerostem transkrypcję genów. Fosforylowana HDAC opuszcza jądro, odblokowując w ten sposób proprzerostową transkrypcję genów [33]. Jest to najkrótsza droga oddziaływania receptorów AT1 na transkrypcję genów, podobna i równoległa do szlaku fosforylacji NFAT przez kalcyneurynę.

IP3R o innej lokalizacji [34–36] mogą powodować wzrosty stężenia Ca^{2+} w ograniczonych domenach komórkowych, powodujące aktywację Cn.

DAG aktywuje grupę izoform kinazy proteinowej C (PKC), które ulegają translokacji przede wszystkim do błony komórkowej i dysków Z sarkomerów.

PKC występuje w 7 izoformach, z których 4 najważniejsze z punktu widzenia regulacji w przeroście i niewydolności serca to α , β , δ , ϵ . Tworzą one równoległe szlaki, które mogą się w pewnym stopniu kompensować, gdyż ich działanie w przeroście i niewydolności jest różne.

Stwierdzono nadekspresję PKC ϵ w przeroście, ale jej *knockout* lub zahamowanie translokacji prowadzi w przeroście indukowanym przez G_q do śmierci z powodu rozstrzeni komory i letalnej niewydolności serca. Odwrotnie – koekspresja G_q z peptydem aktywującym PKC ϵ i jej translokację hamowała przerost i poprawiała czynność serca [37]. Tak więc nadekspresja PKC ϵ w przeroście wydaje się mieć charakter kompensacyjny.

PKC α sama nie ma wpływu na przerost, ale zmniejsza kurczliwość mięśnia sercowego. Przewlekła aktywacja powodowała letalne kardiomiopatie w toku przerostu indukowanego G_q .

Aktywacja PKC β jest wystarczająca do produkcji przerostu. Może ona realizować swój proprzerostowy wpływ na kilku drogach. PKC β aktywuje PKD1. Razem tworzą kompleks, który zakotwicza się w prążku Z. Ponieważ PKD1 aktywuje Akt, PKC aktywuje w ten sposób mTOR, regulator syntezy protein, poprzez wpływ na biogenezę rybosomów i mechanizmy translacji (patrz szlak PI3K–Akt–mTOR) [35]. PKC aktywuje ponadto ERK1/2, a więc końcowe ogniwo tego odgałęzienia kaskady kinazowej, które inicjuje przerost [19]. Wreszcie PKC prawdopodobnie pośredniczy bezpośrednio lub pośrednio w aktywacji kalcyneuryny przez agonistów GPCRs: ATII, endotelinę-1 i urotensynę [28, 38]. Działanie PKC za pośrednictwem innych szlaków przekazywania informacji dobrze tłumaczy, dlaczego jej nadekspresja prowadzi do przerostu, ale nie jest ona niezbędna dla powstania przerostu np. indukowanego nadciśnieniem tętniczym. Szlaki indukujące ten prze-

rost mogą być aktywowane i bez udziału PKC, za pośrednictwem mechanoreceptorów komórkowych.

Druga droga zależna od białek G to szlak kinaz PI3K–Akt (rycina 5). Szlak ten jest aktywowany przez receptory wiążące się z białkami G_q i G_{11} (*G Proteins Coupling Receptors* – GPCR). Są to receptory ATII, receptory adrenergiczne α_1 , endoteliny i in. (rycina 5). Aktywacja GPCR powoduje oddysocjowanie podjednostek $\beta\gamma$ białek G_q i G_{11} od podjednostki α . Izoforma kinazy PI3K, p110, łączy się z podjednostkami $G\beta\gamma$, co powoduje jej translokację do błony komórkowej i kontaktuje ją z błonowymi fosfatydyloinozitolami (PIP2), które fosforyluje w pozycji 3. (PIP3). Prowadzi to do połączenia z nimi i aktywacji kinazy PDK1, która wtedy aktywuje kinazę Akt. Aktywacja Akt prowadzi do aktywacji mTOR (*mammalian target of rapamycine*), centralnego regulatora syntezy protein, poprzez jego wpływ na biogenezę rybosomów i aktywację mechanizmów translacji (rycina 5). Akt również fosforyluje i hamuje kinazę syntazy glikogenu (GSK-3 β). GSK-3 β jest stale aktywnym, nawet w niepobudzonych komórkach, czynnikiem antyprzerostowym. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu kluczowych mechanizmów translacji białek oraz fosforylacji szeregu czynników transkrypcyjnych, odgrywających ważną rolę w indukcji programu przerostu. Ufosforylowane czynniki (np. NFAT) nie mogą ulec translokacji do jądra komórkowego, ale mogą je opuścić [16]. Zahamowanie antyprzerostowej (anty-Cn–NFAT) aktywności GSK-3 β wpływa niekorzystnie na stan serca i przeżycie myszy ze zwężeniem aorty [16]. W ten sposób droga Akt pobudza zarówno syntezę białek, jak i modyfikuje transkrypcję genów przez hamowanie GSK-3 [39, 40].

Niezależny od białek G szlak AT1 to aktywacja przerostu miocytów na drodze interakcji swoistych sekwencji aminokwasowych (domen) białek receptorów AT1 i komórkowych cząsteczek sygnalizacyjnych (rycina 5). Sprowadza się ona do aktywacji EGFR (*epidermal growth factor receptor*), mobilizującego drogi sygnalizacyjne obejmujące ERK1/2 oraz PI3K–Akt i mTOR/S6-kinazę (rycina 3). Rozpoczyna się ona prawdopodobnie od aktywacji kinazy tyrozynowej SRC i kinazy Pyk2, które aktywują związane z sarkolemą metaloproteazy (MMPs). W wyniku aktywacji MMPs powstają ligandy EGRF, takie jak *Heparin-Binding EGF* (HBEGF)

Wpływ szlaków przekazywania sygnałów na apoptozę

Nasilenie apoptozy miocytów, powodujące ubytek populacji kurczących się komórek, jest jednym z czynników decydujących o przejściu od skompensowanego przerostu do niewydolności serca. Opisane powyżej szlaki przekazywania sygnałów wpływają na ten proces w różny sposób. Ze względu na złożoność tych szlaków i ich wzajemne oddziaływanie wyniki różnych prac do-

tyczących tego samego szlaku nie są jednoznaczne. Dlatego przytoczone poniżej informacje są wypadkową zaproponowaną przez Bainsa i Molentina [41] w ich pracy poglądowej. Aktywacja szlaku JNK daje w różnych komórkach i modelach doświadczalnych efekty zarówno pro-, jak i antyapoptotyczne. Według autorów przeważa jednak efekt proapoptotyczny. Aktywacja szlaku ERK1/2 działa bardziej zdecydowanie antyapoptotycznie, a więc osłonowo w stosunku do przerostowego serca. Aktywacja Cn w zasadzie działa antyapoptotycznie, aczkolwiek jej znaczna i długotrwała aktywacja może nasilać apoptozę. Aktywacja p38 MAPKs wydaje się zdecydowanie nasilać apoptozę, aczkolwiek istnieją pojedyncze prace o wynikach przeciwnych. Działanie poszczególnych izozymów PKC jest, podobnie jak w przypadku przerostu, różne. PKC δ działa raczej proapoptotycznie, podczas gdy PKC ϵ hamuje apoptozę. Nadekspresja lub aktywacja GSK-3 β nasila apoptozę [16].

Interesujące jest, że aktywacja szlaków zdecydowanie inicjujących przerost, jak ERK1/2 lub Cn–NFAT, hamuje apoptozę, podczas gdy ta ostatnia jest nasilana przez aktywację JNK lub p38 i GSK-3 β , które nie pobudzają przerostu lub nawet go hamują.

Podsumowanie

Jak wynika z przedstawionego powyżej przeglądu, przekazywanie sygnałów o obciążeniu serca do genomu komórkowego jest procesem niezmiernie złożonym i nie do końca poznanym. Liczne równoległe i oddziałujące na siebie nawzajem szlaki tworzą system, w którym zaburzenia w jednej części mogą wpływać na pozostałe i być przez nie kompensowane. Stwarza to ogromne trudności zarówno w badaniach nad przekazywaniem sygnałów w przeroście i niewydolności serca, jak i może być przyczyną ograniczonej skuteczności metod terapeutycznych. Tym niemniej poznanie tego systemu sygnalizacyjnego jest konieczne i znajduje się obecnie w centrum uwagi wielu czołowych laboratoriów. Zajmuje również ważne miejsce w programach międzynarodowych zjazdów. Rosnące zainteresowanie tym zagadnieniem wynika z przekonania, że lepsze poznanie szlaków sygnalizacyjnych i opracowanie metod interwencji w ich funkcjonowanie otworzy drogę do nowych i skuteczniejszych metod terapii.

Piśmiennictwo

1. Lewartowski B, Mackiewicz U. Obieg wapnia w normalnym i niewydolnym sercu. Nowe perspektywy terapii. *Kardiologia Pol* 2004; 60: 149–53.
2. Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 69–98.
3. Yano M, Yamamoto T, Ikemoto N, et al. Abnormal ryanodine receptor in heart failure. *Pharmacology Ther* 2005; 3: 377–91.
4. Lewartowski B. Patofizjologia serca. In: Januszewicz W, Kokot F (ed.). *Interna*, Warszawa 2006; 1: 21–9.

5. Lewartowski B. Serce w nadciśnieniu tętniczym. In: Januszewicz A, Januszewicz W, Szczepańska-Sadowska E, Sznajderman M (ed.). *Nadciśnienie tętnicze*, Kraków 2004; 111–20.
6. Branaccio M, Hirsch E, Notte A, et al. Integrin signalling: The tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2006; 3: 422–33.
7. Pyle WG, Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res* 2004; 3: 296–304.
8. Wilkins BJ, Molkentin JD Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; 4: 1178–91.
9. Ritter O, Hack S, Schuh K, et al. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 2002; 19: 2265–9.
10. Diedrichs H, Chi M, Boelck B, et al. Increased regulatory activity of the calcineurin/NFAT pathway in human heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 1: 3–9.
11. Burkard N, Becher J, Heindl C, et al. Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation* 2005; 8: 1045–53.
12. Liu P, Huang C, Jia Z, et al. Non-catalytic domains of subunit A negatively regulate the activity of calcineurin. *Biochemie* 2005; 2: 215–21.
13. Heineke J, Reutten H, Willenbockel Ch, et al. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 5: 1655–60.
14. Bush MH, Pickard A, Rodrigues A, et al. The sarcolemmal calcium pump inhibits the calcineurin/NFAT pathway via interaction with the calcineurin A catalytic subunit. *J Biol Chem* 2005; 280: 29479–87.
15. Mackiewicz U, Mączewski M, Lewartowski B. The rate of Ca²⁺ transport by sarcolemmal Ca²⁺-ATPase decreases during heart remodeling after myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Biol* 2006; 40: 952 (abstract).
16. Hardt SE, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2004; 3: 500–9.
17. Fiedler B, Wollert KC. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2004; 3: 450–7.
18. Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem* 2003; 39: 36981–4.
19. Petrich BG, Wang Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 2: 50–5.
20. Molkentin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 2004; 3: 467–75.
21. Liu YH, Wang D, Rhaleb NE, et al. 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; 1: 74–81.
22. Xu L, Kappler CS, Menick DR. The role of p38 in the regulation of Na⁺-Ca²⁺ exchanger expression in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 5: 735–43.
23. Kim-Mitsuyama S, Izumi Y, Izumia M, et al. Dominant-negative c-Jun inhibits rat cardiac hypertrophy induced by angiotensin II and hypertension. *Gene Ther* 2006; 4: 328–35.
24. Sanna B, Bueno OF, Dai Y-S, et al. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 865–78.
25. Schluter KD, Wollert KC. Synchronization and integration of multiple hypertrophic pathways in the heart. *Cardiovasc Res* 2004; 3: 367–72.
26. Selvetella G, Hirsch E, Notte A, et al. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res* 2004; 3: 373–80.
27. Abbasi S, Su B, Kellems RE, et al. The essential role of MEK3 signalling in angiotensin II-induced calcineurin/nuclear factor of activated T-cells activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 36737–46.
28. Li J, Wang J, Russell FD, et al. Activation of calcineurin in human failing heart ventricle by endothelin-1, angiotensin II and urotensin II. *Brit J Pharmacol* 2005; 4: 432–40.
29. Jan Danser AH, Saris JJ. Prorenin uptake in the heart: a prerequisite for local angiotensin generation? *J Mol Cell Cardiol* 2002; 11: 63–1472.
30. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, et al. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993; 75: 977–84.
31. Amadeo Modesti PA, Zecchi-Orlandini S, Vanni S, et al. Release of preformed Ang II from myocytes mediates angiotensinogen and ET-1 gene overexpression in vivo via AT1 receptor. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 11: 1491–500.
32. Hunyady L, Turu G. The role of the AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy: angiotensin II receptor or stretch sensor? *Trends in Endocrinol Metab* 2004; 9: 405–7.
33. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, et al. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* 2006; 116: 675–82.
34. Lipp P, Laine M, Tovey SC, et al. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* 2000; 10: 939–42.
35. Verma A, Hirsch DJ, Snyder SH. Calcium pools mobilized by calcium or inositol 1,4,5-trisphosphate are differentially localized in rat heart and brain. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 621–31.
36. Mackenzie L, Roderick HL, Proven A, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the heart. *Biol Res* 2004; 4: 553–7.
37. Iwata M, Maturana A, Hoshijima M, et al. PKCepsilon-PKD1 signaling complex at Z-discs plays a pivotal role in the cardiac hypertrophy induced by G-protein coupling receptor agonists. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 4: 1105–13.
38. Pagliaro P, Penna C. Rethinking the renin-angiotensin system and its role in cardiovascular regulation. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 1: 77–87.
39. Dorn GW 2nd, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 2005; 3: 527–37.
40. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2004; 3: 403–13.
41. Baines CP, Molkentin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 1: 47–62.