

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Bakalářská práce

**Enzymy metabolismu katecholaminů u experimentální hypertenze**  
**The enzymes of catecholamine metabolism in experimental hypertension**

**Anna Loučková**

Školitel: RNDr. Jaroslav Kuneš, DrSc.

Školitel specialista: Ing. Michaela Kadlecová, Ph.D.

Praha, 2011

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, 5. května 2011

Děkuji svému školiteli RNDr. Jaroslavu Kunešovi, DrSc. a Ing. Michaele Kadlecové, Ph.D. za odborné konzultace a pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a povzbuzení.

## **Abstrakt**

Katecholaminy dopamin, noradrenalin a adrenalin se významně podílejí na regulaci krevního tlaku. Nejdůležitější enzymy účastníci se jejich metabolismu jsou tyrosinhydroxyláza, DOPAdekarboxyláza, dopamin- $\beta$ -hydroxyláza a fenyletanolamin-N-metyltransferáza. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o těchto enzymech, se zaměřením na jejich význam v procesu rozvoje esenciální hypertenze. Ke studiu hypertenze se z důvodů praktických i etických často používají experimentální modely. Nejvíce poznatků bylo získáno na spontánně hypertenzních potkanech, kvůli jejich podobnosti s lidskou esenciální hypertenzí. Metabolismus katecholaminů se u spontánně hypertenzního potkana liší od normotenzních kontrol v mnoha ohledech. Primární příčinu tohoto typu hypertenze se od kompenzačních reakcí zatím nepodařilo rozlišit. Nicméně některými zásahy lze dosáhnout zabránění vzniku nebo alespoň zpomalení rozvoje onemocnění. Tyto poznatky mohou pomoci při hledání nových způsobů léčby lidské hypertenze.

**Klíčová slova:** hypertenze, katecholaminy, tyrosinhydroxyláza, DOPAdekarboxyláza, dopamin- $\beta$ -hydroxyláza, fenyletanolamin-N-metyltransferáza, spontánně hypertenzní potkan.

## **Abstract**

Catecholamines dopamine, norepinephrine and epinephrine are significantly involved in regulation of blood pressure. The most important enzymes participating in their metabolism are tyrosin hydroxylase, DOPA decarboxylase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase. This thesis summarizes current knowledge about these enzymes, focusing on their role in the development of essential hypertension. Experimental models are often used in the study of hypertension because of their practical and ethic reasons. Most findings were obtained in spontaneously hypertensive rats, due to their similarity to human essential hypertension. Metabolism of catecholamines in spontaneously hypertensive rat differs in many aspects from that of normotensive controls. The primary cause of this type of hypertension has not yet been distinguished from compensatory responses. However, prevention or slow-down the disease-development process can be achieved by various interventions. This information may help to identify new treatments for human hypertension.

**Keywords:** hypertension, catecholamines, tyrosine hydroxylase, DOPA decarboxylase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase, phenylethanolamine N-methyltransferase, spontaneously hypertensive rat.

## Seznam zkratek

AP1	aktivátorový protein 1
AP2	aktivátorový protein 2
ARE	androgen response element
CRE	cAMP response element
Ddc	DOPAdekarboxyláza
D $\beta$ H	dopamin- $\beta$ -hydroxyláza
Egr1	protein časně růstové odpovědi 1
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem
GRE	glucocorticoid response element
L-DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
NGF	nervový růstový faktor
Pnmt	fenyletanolamin-N-metyltransferáza
SHR	spontánně hypertenzní potkan
Sp1	protein specificity 1
Sry	pohlaví určující oblast na chromozomu Y
Th	tyrosinhydroxyláza
TK	tlak krve
WKY	Wistar Kyoto potkan
YY1	Yin Yang protein 1

## Obsah

1.	ÚVOD.....	- 6 -
2.	HYPERTENZE.....	- 7 -
2.1	DEFINICE HYPERTENZE.....	- 7 -
2.2	KLASIFIKACE HYPERTENZE .....	- 7 -
2.3	RIZIKOVÉ FAKTORY .....	- 8 -
2.3.1	INTERAKCE FAKTORŮ GENETICKÝCH A FAKTORŮ VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ .....	- 8 -
3.	EXPERIMENTÁLNÍ HYPERTENZE .....	- 10 -
3.1	MODEL Y EXPERIMENTÁLNÍ HYPERTENZE .....	- 10 -
3.1.1	SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍ POTKAN (SHR) .....	- 11 -
3.1.2	DAHLŮV POTKAN CITLIVÝ A NECITLIVÝ KE ZVÝŠENÉMU PŘÍJMU SOLI.....	- 11 -
3.1.3	DALŠÍ MODEL Y EXPERIMENTÁLNÍ HYPERTENZE .....	- 11 -
3.2	METODY MĚŘENÍ KREVNÍHO TLAKU U EXPERIMENTÁLNÍCH ZVÍŘAT .....	- 12 -
4.	METABOLIZMUS KATECHOLAMINŮ .....	- 13 -
4.1	TYROSINHYDROXYLÁZA .....	- 13 -
4.1.1	FOSFORYLACE A DEFOSFORYLACE TYROSINHYDROXYLÁZY .....	- 14 -
4.1.2	INHIBICE TYROSINHYDROXYLÁZY .....	- 15 -
4.1.3	REGULACE TRANSKRIPCE TYROSINHYDROXYLÁZY .....	- 15 -
4.1.4	POLYMORFIZMY TYROSINHYDROXYLÁZY .....	- 16 -
4.1.5	TYROSINHYDROXYLÁZA U SHR.....	- 17 -
4.2	DOPA DEKARBOXYLÁZA .....	- 19 -
4.2.1	DOPAMINERGNÍ SYSTÉM U EXPERIMENTÁLNÍ HYPERTENZE.....	- 20 -
4.3	DOPAMIN-B-HYDROXYLÁZA .....	- 20 -
4.3.1	TRANSKRIPCE DOPAMIN-B-HYDROXYLÁZY .....	- 21 -
4.3.2	POLYMORFIZMY DOPAMIN-B-HYDROXYLÁZA .....	- 22 -
4.3.3	DBH U SHR.....	- 23 -
4.4	FENYLETANOLAMIN-N-METYLTRANSFERÁZA .....	- 23 -
4.5	REGULACE TRANSKRIPCE FENYLETANOLAMIN-N-METYLTRANSFERÁZY .....	- 24 -
4.6	POLYMORFIZMY FENYLETANOLAMIN-N-METYLTRANSFERÁZY .....	- 25 -
4.7	FENYLETANOLAMIN-N-METYLTRANSFERÁZA U SHR .....	- 25 -
5.	ZÁVĚR .....	- 26 -
6.	LITERATURA.....	- 28 -

## 1. Úvod

Hypertenze je významným rizikovým faktorem pro řadu kardiovaskulárních chorob, jako jsou například ateroskleróza a cévní mozková příhoda. Studie ukazují, že chronickým zvýšením krevního tlaku trpí 20-50 % dospělých obyvatel průmyslově rozvinutých zemí. Ačkoli velká část hypertenzních pacientů je léčena, u dvou třetin hypertoniků není dosaženo spolehlivé kontroly krevního tlaku. Cílem experimentálního výzkumu je prevence hypertenze, tedy omezení jejího výskytu v populaci, což v první řadě vyžaduje nalezení primární příčiny vzniku onemocnění. K tomuto účelu jsou využívány modely s genetickou nebo indukovanou formou hypertenze.

Existuje celá řada faktorů, které mají při vzniku a rozvoji hypertenze významnou roli: genetické faktory, autonomní nervový systém, endotel cévní stěny atd. Který z těchto faktorů je ale klíčový? Je velmi obtížné nalézt odpověď na tuto otázku, protože vzestup tlaku krve (TK) je pomalý a pozvolný, zatímco spouštěcí faktor nemusí být zjevný v důsledku četných kompenzačních reakcí organismu. V současnosti existuje velké množství klinických a experimentálních poznatků, které se týkají patofyziologických mechanismů vedoucích k chronickému zvýšení krevního tlaku. Zásadním momentem pro patofyziologii, diagnostiku i léčbu hypertenze se tedy stává definice příčiny a důsledku.

Tato práce je zaměřená na význam katecholaminů (dopaminu, noradrenalinu a adrenalinu), jež představují skupinu neurotransmiterů a hormonů, které se v organismu účastní mnoha endokrinních a metabolických pochodů a velmi významně se podílí na regulaci TK. Pozměněná transkripce nebo regulace enzymů účastnících se jejich syntézy by mohla být příčinou vzniku hypertenze. Změny v aktivitě jednotlivých enzymů se ale liší v různých tkáních i mezi hypertenzními jedinci. Přesné pochopení metabolismu katecholaminů je nezbytné pro objasnění funkcí a dysfunkcí tohoto systému ve fyziologických i patologických situacích.

## 2. Hypertenze

### 2.1 Definice hypertenze

Dle doporučení České společnosti pro hypertenzi: „Za arteriální hypertenzi označujeme opakované zvýšení TK > 140/90 mm Hg naměřené minimálně při dvou různých návštěvách“ (Widimský et al., 2008). Tyto hraniční hodnoty byly zavedeny v souvislosti se zjištěním, že u osob s TK vyšším než tyto hodnoty, se při léčbě antihypertenzivy výrazně snižuje riziko úmrtí na kardiovaskulární onemocnění (Zicha and Kunes, 2003).

### 2.2 Klasifikace hypertenze

Hypertenzi můžeme dělit podle závažnosti v závislosti na naměřeném TK bez antihypertenzivní léčby. Jednotlivé typy systolicko-diastolické hypertenze i s hraničními hodnotami jsou uvedeny v Tab. 1. Pokud u jednoho pacienta naměříme systolickou a diastolickou hodnotu, které nemůžeme zařadit do stejné kategorie, považujeme za směrodatnou tu, která patří do kategorie vyšší (Widimský et al., 2008).

Kategorie	Systolický tlak	Diastolický tlak
Optimální	< 120	< 80
Normální	120 - 129	80 - 84
Vysoký normální	130 - 139	85 - 89
Hypertenze 1.stupně	140 - 159	90 - 99
Hypertenze 2.stupně	160 - 179	100 - 109
Hypertenze 3.stupně	≥ 180	≥ 110

Tab.1: Klasifikace jednotlivých kategorií krevního tlaku (v mm Hg) (Widimský et al., 2008)

Obecně dělíme hypertenzi na primární (esenciální) a sekundární. U sekundární hypertenze, která tvoří pouze asi 10 % všech případů, je známá příčina vzniku. Jedná se např. o postižení ledvinných tepen, renálního parenchymu nebo o poruchu endokrinního systému. Důvod vzniku hypertenze primární nebyl prozatím objasněn (Zicha and Kunes, 2003).

Další možné dělení hypertenze vychází ze stupně poškození orgánů. Pro první stadium je charakteristické prosté zvýšení krevního tlaku bez orgánových změn. Ve druhém stadiu jsou známky orgánového poškození, ale jejich funkce není výrazně narušena. Ve třetím stadiu se těžší orgánové poškození projevuje kardiovaskulárním nebo renálním onemocněním (např. mozková příhoda) (Widimský et al., 2008).

## 2.3 Rizikové faktory

Na vzniku a rozvoji hypertenze se podílí řada faktorů genetických, o čemž svědčí např. rodinný výskyt hypertenze. Význam dědičnosti pro vznik hypertenze potvrzují i studie v různých populacích, případně u různých etnik žijících na stejném území. V současnosti se odhaduje, že genetická výbava se podílí na variabilitě TK asi z 30-60 %. Intenzivně jsou zkoumány polymorfizmy genů, které se účastní regulace TK – tzv. kandidátní geny (shrnutí v Petřková, 2002).

Genetická predispozice je v průběhu života ovlivňována vnějšími faktory, mezi nejzávažnější patří nedostatek pohybu s následnou nadváhou, nadměrná konzumace alkoholu, kouření, stres a zvýšený přívod tuků a soli (shrnutí v Zicha and Kunes, 2003).

### 2.3.1 Interakce faktorů genetických a faktorů vnějšího prostředí

Jak již bylo zmíněno, esenciální hypertenze je komplexní onemocnění vyvíjející se v důsledku interakcí faktorů genetických s faktory vnějšího prostředí. Lze si představit, že se tato nemoc rozvíjí jako důsledek „chyb“ v kaskádě molekulárních, biochemických a genetických procesů, které řídí TK. Ačkoli jednotlivé chyby mohou být méně závažné, dohromady mají dostatečný potenciál, aby v jejich důsledku vznikla hypertenze.

Genetická informace je naprogramovaná, aby docházelo k její expresi v jednotlivých stádiích ontogenetického vývoje. Expresie určité části genomu by měla být v souhře se současnou expresí mnoha dalších genů, měla by být přiměřená fyziologickým požadavkům vyvíjejícího se organismu a přizpůsobit se vnějším faktorům, které jsou pro toto stadium vývoje specifické.

Existuje několik možností, jak může prostředí ovlivňovat genetické predispozice hypertenze. První možností je, že exprese abnormální genetické informace vede k minimálním změnám v nezralém organismu, ale během pozdějšího dospívání se tyto změny pod vlivem prostředí vyvinou v očividné onemocnění. Podmínky prostředí také mohou ovlivnit vývoj organismu ještě před expresí abnormální genetické informace, takže citlivost jedince k jejím škodlivým efektům je pozměněná. Za třetí, primární genová abnormalita může být spící (silent), dokud její exprese není vyvolaná vnitřními nebo vnějšími faktory. Expresie primární genové abnormality tedy může probíhat již brzy v ontogenezi, ale vyvolané změny zůstanou skryté, dokud z nich exogenní nebo endogenní faktory neudělají součást patogenních mechanismů nemoci.

Míra vlivu faktorů prostředí na genovou expresi v průběhu ontogeneze není konstantní. Existují kritické vývojové periody, které jsou charakteristické výjimečnou citlivostí organismu k vnitřním nebo vnějším podnětům. Tyto kritické periody obvykle splývají s obdobími

intenzivních vývojových procesů, kdy probíhají základní strukturní a funkční změny jednotlivých systémů organismu. Změny jsou obvykle nevratné, takže pokud organismus vstoupí do dalšího vývojového stadia, může již pouze kompenzovat chyby, k nimž došlo v předchozím období. Znalost přesného věku, kdy je organismus citlivý k určitým faktorům, je důležitá pro farmakologické zásahy i pro genovou terapii kardiovaskulárních chorob.

Dalo by se očekávat, že vliv prostředí na genetickou informaci je realizován přes poškození DNA, tedy přes genové mutace. Nicméně existují meioticky a mitoticky dědičné změny, které nejsou kódovány v samotné sekvenci DNA, jedná se o tzv. epigenetickou dědičnost. Na epigenetické dědičnosti se podílí např. DNA metylace, jejíž význam v dlouhodobé modulaci genové exprese byl objeven např. u rozvoje glukózové rezistence, diabetu typu II a kardiovaskulárních poruch u jedinců s nízkou porodní hmotností (shrnutí v Kunes and Zicha, 2006).

### 3. Experimentální hypertenze

Hypertenze je velmi závažné a současně velmi rozšířené onemocnění, jehož léčba vychází celosvětově na stovky milionů dolarů za rok. Z těchto důvodů je jejímu výzkumu věnována velká pozornost. Vývojem nové účinnější léčby se zabývá především klinický výzkum. Experimentální výzkum se snaží nalézt primární příčiny vzniku hypertenze a přispět tím k účinné prevenci.

Tím, že výše TK je ovlivňována mnoha genetickými faktory (je tzv. polygenní) a také faktory prostředí, je její studium velmi komplikované. Výzkum na lidských modelech není příliš vhodný především proto, že lidská populace je outbrední (každý jedinec je geneticky odlišný). Další nevýhodou je dlouhá reprodukční doba, pomalý rozvoj nemoci i některé etické problémy, které znemožňují používání klasických genetických metod a odběr vzorků některých tkání.

Výhodné je použití inbredních zvířecích modelů, ačkoli to má také některá omezení a žádný zvířecí model neodpovídá zcela přesně příslušné formě lidské hypertenze. Mezi jejich hlavní výhody patří dostupnost, možnost standardizace experimentálních podmínek a také rychlost a reprodukovatelnost rozvoje hypertenze. Obzvláště významné jsou genetické modely, protože umožňují zkoumat interakce mezi faktory genetickými a faktory vnějšího prostředí (shrnutí v Kunes and Zicha, 2002).

Při hledání genetických determinant komplexních nemocí se používají dva základní přístupy: metoda „kandidátních genů“ a metoda pozičního klonování. První metoda zkoumá stupeň polymorfizmu genů zodpovědných za variabilitu TK u nemocných a kontrol. Pokud je zjištěna pozitivní asociace (u nemocných se polymorfizmus vyskytuje častěji), tak se určuje hodnota relativního rizika (kolikrát častější je výskyt nemoci u jedince s polymorfizmem ve srovnání s jedinci, kteří polymorfizmus nemají). U metody pozičního klonování jsou využívány polymorfní značky, pomocí kterých jsou hledány oblasti obsahující geny vnímavosti k danému onemocnění. Poté se v okolí daného specifického znaku hledají geny, které by svou funkcí mohly přispívat ke vzniku onemocnění. Nakonec se zjišťuje funkční souvislost genu a onemocnění (shrnutí v Petřková, 2002).

#### 3.1 Modely experimentální hypertenze

Pro svou dostupnost a pro jednoduchost měření hemodynamických parametrů se nejpoužívanějším modelovým organismem experimentální hypertenze stal laboratorní potkan. Hlavní pokusné modely byly vyvinuty, aby umožnily studium jednotlivých patogenních mechanismů hypertenze. Modely dělíme na dvě základní skupiny: s indukovanou hypertenzí (u normotenzních jedinců je dosaženo změny TK operačním zákrokem nebo farmakologicky)

a s genetickou poruchou (hypertenze se rozvíjí postupně během života buď spontánně, nebo po stimulaci vnějším podnětem).

Indukovaná forma hypertenze vyvolaná podnětem působícím na dospělého jedince se posuzuje jako soubor kompenzačních reakcí na daný podnět. Po odstranění podnětu se TK často vrací do normálních hodnot. Naproti tomu podnět působící na jedince s neukončeným vývojem může způsobit nevratné změny, takže i po odstranění hypertenzního podnětu zůstává TK zvýšený (shrnutí v Kunes and Zicha, 2002).

### **3.1.1 Spontánně hypertenzní potkan (SHR)**

Tento kmen vznikl na univerzitě v Kyotu, pro první křížení byli použiti potkani kmene Wistar (WKY): samec vykazující stálý vysoký TK 150-175 mmHg a samice s lehce nadprůměrným TK 130-140 mmHg. Během několika generací hodnota TK u dvacetitýdenních zvířat přesáhla 180 mmHg. Hypertenze je v případě tohoto kmene způsobena zvýšenou periferní rezistencí, která je nejprve vyvolána neurogenní vazokonstrikcí a posléze udržována strukturálními změnami cév. Kromě základní varianty tohoto kmene byly vyšlechtěny i další podkmeny, které vykazují například velkou náchylnost k mozkové příhodě. SHR je dnes nejpoužívanějším kmenem díky své podobnosti s lidskou esenciální hypertenzí. Jako normotenzní kontrola je používán kmen WKY (shrnutí v Kunes and Zicha, 2002).

### **3.1.2 Dahlův potkan citlivý a necitlivý ke zvýšenému příjmu soli**

Tento kmen byl vyšlechtěn v USA z kmene Sprague-Dawley. Selektivně byli kříženi potkani citliví a potkani rezistentní k rozvoji hypertenze na dietě s vysokým obsahem soli (8% NaCl). U citlivých zvířat se na vysokosolné dietě rozvíjí hypertenze, zatímco u rezistentních jedinců ani extrémní dávky soli hypertenzi nevyvolávají. Tento model se používá pro studium solné hypertenze (shrnutí v Kunes and Zicha, 2002).

### **3.1.3 Další modely experimentální hypertenze**

Existují i další, méně používané, kmeny, které se mezi sebou liší v účasti genetických faktorů, aktivitě vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů, iontovém transportu atd. Například geneticky hypertenzní potkan vyšlechtěný na Novém Zélandu je velmi podobný SHR kmeni, ale liší se od něj pozvolným vzestupem TK v průběhu křížení. Pražský hypertriglyceridemický potkan má kromě vysokého TK i vyšší plazmatickou hladinu triglyceridů, kyseliny močové a volných mastných kyselin. Podobně lyonský hypertenzní potkan vykazuje zvýšenou hladinu triglyceridů a cholesterolu. Münsterský spontánně hypertenzní potkan má narušený metabolismus sodíku, vápníku a hořčíku. U milánského i pražského

hypertenzního potkana hrají důležitou roli ve vzniku hypertenze ledviny (shrnuto v Kunes and Zicha, 2002).

### 3.2 Metody měření krevního tlaku u experimentálních zvířat

Sledování TK a srdeční frekvence u experimentálních modelů je velmi důležitou částí studia patofyziologie a genetiky hypertenze. K tomuto účelu se používá široká škála metod, což poněkud komplikuje srovnání výsledků pocházejících z různých laboratoří. Základní dělení použitých metod měření TK souvisí s tím, zda je TK měřen přímo v cévním řečišti a nebo nepřímo pomocí okluzní manžety a příslušného snímače.

Nejpoužívanější neinvazivní technikou je snímání pulzové vlny na ocase nebo zadní končetině, kde jsou artérie stlačovány okluzní manžetou a tlak v manžetě je monitorován. Systolický tlak se odečítá v okamžiku, kdy se při poklesu tlaku v manžetě objeví pulzová vlna. Novější přístroje umožňují i zjištění tlaku diastolického. Nevýhodou je, že tato metoda vyvolává u netrénovaných zvířat stres, jenž by mohl ovlivnit naměřené hodnoty. Dalším omezením je skutečnost, že při teplotě nižší než 39 °C není ocas potkana dobře prokrven, což způsobuje potíže s detekcí pulzové vlny. Z tohoto důvodu musí být zvířata před měřením předeřívána. Použití této metody je výhodné v tom, že je možné ji využívat pro dlouhodobá sledování změn TK v průběhu celého života zvířete.

Mezi invazivní techniky patří chronická katetrizace, kdy se do a. carotis nebo a. femoralis zavádí heparinem naplněná kanyla vhodné velikosti. Kanyla je opatřena uzávěrem a vyvedena tak, aby si její konec zvíře nemohlo ukousnout. Již po 24 hodinách zotavování může být jedinec napojen na elektronický snímač TK. Měření je zaznamenáváno zapisovačem nebo převedeno do počítače. Tato metoda je vhodná pro souvislé měření změn TK po několik dnů, navíc dává informaci i o tepové frekvenci. Bohužel při použití této metody dochází k úhynu části zvířat v důsledku operace. Další komplikací je ucpávání kanyly sraženou krví.

Nejlepším způsobem sledování TK a tepové frekvence u volně se pohybujících zvířat je telemetrie. Tato metoda využívá obdobný princip jako ostatní invazivní techniky s tím rozdílem, že tlakový snímač funguje zároveň jako vysílač a je umístěn v dutině břišní. TK je měřen katetrem v břišní aortě. Zavedení představuje poměrně velký operační zákrok a zotavení zvířat trvá minimálně sedm dní. Zařízení pro snímání signálu spojené s počítačem je v podložce, na níž je umístěna chovná nádoba. Pro dlouhodobé měření u nedospělých jedinců se tato metoda nedá použít. Tato technika je v porovnání s ostatními metodami poměrně drahá, nicméně poskytuje zcela fyziologické hodnoty TK (shrnuto v Kunes and Zicha, 2002).

#### 4. Metabolismus katecholaminů

Katecholaminy jsou deriváty katecholu (1,2-dihydroxybenzenu) obsahující aminovou skupinu. Patří mezi ně dopamin, adrenalin a noradrenalin, v organismu slouží jako hormony a neuromediátory. Syntéza jednotlivých katecholaminů vychází z aminokyseliny tyrosinu a zahrnuje následující kroky:

1. hydroxylace tyrosinu tyrosinhydroxylázou (Th) za vzniku 3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA)
2. dekarboxylace L-DOPA za vzniku dopaminu pomocí enzymu DOPAdekarboxylázy (Ddc)
3. hydroxylace dopaminu dopamin- $\beta$ -hydroxylázou (D $\beta$ H) za vzniku noradrenalinu
4. metylace aminoskupiny noradrenalinu fenyletanolamin-N-metyltransferázou (Pnmt) za vzniku adrenalinu

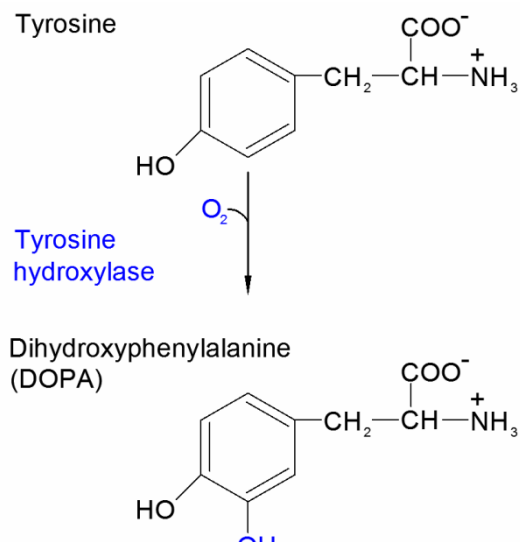


Obr. 1: Schéma syntézy katecholaminů

Různé buňky organismu mohou produkovat jednotlivé katecholaminy v závislosti na tom, jakou mají enzymatickou výbavu. Adrenalin a noradrenalin vznikají především v dřeni nadledvin. V některých částech mozku je produkován dopamin (např. v substantia nigra), zatímco v jiných oblastech je syntetizován především noradrenalin (shrnuje ve Voet and Voetová, 1995).

##### 4.1 Tyrosinhydroxyláza

Th je počátečním enzymem biosyntézy katecholaminů, který specificky katalyzuje přeměnu L-tyrosinu na L-DOPA adicí hydroxylové skupiny. Ke svému fungování vyžaduje přítomnost kyslíku, Fe<sup>2+</sup> a kofaktoru biopterinu (Nagatsu et al., 1964). Strukturně je Th homotetramer, jehož podjednotky mají přibližně 60 kDa (Mockus et al., 1998). Studie ukazují, že tento enzym existuje v cytoplazmatické i membránově vázané formě (Kuhn et al., 1990).



Obr. 2: Hydroxylace tyrosinu za vzniku L-DOPA (Purves et al., 2001)

Ve srovnání s ostatními enzymy, které se účastní syntézy katecholaminů, aktivita Th je o tři řády nižší. Jakožto limitující faktor této dráhy, je ideálním cílem pro regulaci celého systému (Nagatsu et al., 1964).

#### **4.1.1 Fosforylace a defosforylace tyrosinhydroxylázy**

Th je substrátem pro mnoho buněčných proteinkináz, jako akceptory fosfátů byly identifikovány seriny 8, 19, 31 a 40. Nicméně fyziologické podněty indukují fosforylaci pouze u serinů 19, 31 a 40 (Haycock, 1990). Th může být fosforylovaná cAMP-dependentní proteinkinázou (Yamauchi and Fujisawa, 1979), kalmodulin-dependentní proteinkinázou II (Itagaki et al., 1999), kinázami regulovanými extracelulárním signálem ERK I a ERK II (Haycock et al., 1992), mitogeny a stresem aktivovanou proteinkinázou 1, p38 regulovanou kinázou (Toska et al., 2002) a cyklin-dependentní kinázou 5 (Moy and Tsai, 2004). Bylo zjištěno, že v hovězích chromafinních buňkách a v PC12 (buněčná linie odvozená od nádoru nadledvin) buňkách je Th různě fosforylována v odpověď na četné agonisty jako je například acetylcholin, cAMP, epidermální růstový faktor atd (shrnuto v Campbell et al., 1986). Regulace Th je tedy komplexní.

Enzymem, který fosforyluje serin 19 je kalmodulin-dependentní proteinkináza II. K aktivaci Th tímto způsobem nestačí pouze kináza a kalmodulin, ale je nutná i přítomnost „proteinového aktivátoru“, proteinu z rodiny 14-3-3 (Itagaki et al., 1999). Proteiny z této skupiny se účastní buněčné signalizace, kontroly buněčného cyklu, regulace transkripce i dalších procesů v různých organizmech a tkáních (shrnuto v Aitken, 2006). Společným strukturálním rysem 14-3-3 proteinové rodiny je C-terminální doména obsahující množství kyselých aminokyselin. Tato doména může interagovat s fosforylovanou formou Th a tím zprostředkovává dlouhodobou regulaci biosyntézy katecholaminů (Ichimura et al., 1988). Z některých studií vyplývá, že 14-3-3 proteiny mohou ovlivňovat také lokalizaci Th (Halskau et al., 2009). Funkcí fosforylace serinu 19 není pouze umožnění interakce Th s 14-3-3 proteiny, ale tato modifikace také zesiluje fosforylaci serinu 40 (Bobrovskaya et al., 2004).

Nejlépe prozkoumaným způsobem regulace Th je fosforylace serinu 40 cAMP-dependentní proteinkinázou. Fosforylací Th, na které je navázaný katecholamin, dojde k desetinásobnému zvýšení maximální rychlosti reakce. Fosforylace Th bez katecholaminu zvýšení rychlosti nezpůsobuje. Skutečný efekt se nejspíš odvíjí od poměru obou počátečních forem enzymu a ten závisí na množství katecholaminů přítomných v buňce (Daubner et al., 1992).

Serin 31 je fosforylován kinázami ERK I a ERK II, které jsou regulované fosforylací serinového nebo threoninového zbytku ve svém řetězci. V PC12 buňkách může být aktivita ERK

stimulována mnoha různými podněty, např. aktivací muskarinového receptoru, purinergního P2 receptoru, receptoru pro nervový růstový faktor (NGF) a bradykininového receptoru. Navzdory rozmanitosti účinných ligandů, existují pouze dvě intracelární signální dráhy, které zajišťují aktivaci ERK – NGF-stimulovaná dráha a dráha začínající aktivací proteinkinázy C (Haycock et al., 1992). Aktivace Th fosforylací serinu 31 proteinkinázou ERK je zanedbatelná ve srovnání s mnohonásobným zvýšením aktivity Th cAMP-dependentní proteinkinázou. Význam této modifikace může spočívat spíše v zesílení fosforylace (Lehmann et al., 2006) nebo pozměnění účinku fosforylace serinu 40.

Defosforylace Th je katalyzována výhradně fosfatázou typu 2A (Leal et al., 2002). Aktivátorem této fosfatázy je protein alfa-synuklein (Peng et al., 2005), který se účastní také recyklace dopaminergních váček. Vliv alfa-synukleinu na Th může zahrnovat i jiné mechanismy než jen regulaci fosforylace, jelikož byla prokázána i jeho přímá interakce s Th a také s „proteinovým aktivátorem“.

Experimenty ukazují, že fosforylace a defosforylace Th je velmi významnou součástí regulace syntézy katecholaminů. Naše znalosti této problematiky jsou obsáhlé, ale některé otázky ještě musí být zodpovězeny. Známe již všechny kinázy a fosfatázy, které se podílejí na modulaci Th v odpovědi na fyziologické podněty? Proč jsou některá místa fosforylována jen s malou účinností? Jaký je *in situ* a *in vivo* rozsah fosforylace serinu 31 a 40 u Th bez nebo s navázaným katecholaminem? Jaký je *in situ* a *in vivo* rozsah a mechanismus aktivace Th fosforylací serinu 31?

#### **4.1.2 Inhibice tyrosinhydroxylázy**

Th je inhibována katecholaminy a to jejich přímou vazbou k iontu železa v aktivním místě enzymu (Andersson et al., 1988). Tato inhibice je kompetitivní vzhledem k tetrahydrobiopterinovému kofaktoru a bylo prokázáno, že kofaktor může přímo vytěsnit dopamin z aktivního místa enzymu. Fosforylace Th na serinu 40 způsobí dramatické snížení vazebné afinity pro katecholaminy (Almås et al., 1992). Aktivace enzymu fosforylací serinu 40 a jeho inaktivace vazbou katecholaminů jsou související jevy a je pravděpodobné, že mají význam v regulačních mechanismech *in vivo*.

#### **4.1.3 Regulace transkripce tyrosinhydroxylázy**

Lidská Th mRNA existuje v několika izoformách. Jako první byly objeveny mRNA lišící se přítomností 12 (typ 2), 81 (typ 3) nebo 93 (typ 4) nukleotidů mezi devadesátým a devadesátýmprvním nukleotidem v mRNA typu 1. Tyto varianty vznikají alternativním sestřihem prvního a druhého exonu (Kobayashi et al., 1988). Další nalezená izoforma lidské Th

postrádá exon 3 (Bodeau-Péan et al., 1999), který se účastní regulace inhibičního efektu katecholaminů skrze fosforylaci serinů 31 a 40. Jinému typu mRNA pro lidskou Th chybí exon 4 (Ohye et al., 2001), což způsobuje posun čtecího rámce. Translace této mRNA je předčasně ukončena na stop kodonu vzniklém v místě pro aminokyselinu 147.

Protože role Th v biosyntéze katecholaminů je klíčová, je pro katecholaminergní buňky nezbytné regulovat nejen její aktivitu, ale i rozsah její exprese v souladu s nejrůznějšími podněty. Například při stresu vyvolaném imobilizací bylo u Sprague-Dawley potkanů nejprve naměřeno zvýšení koncentrace Th mRNA ve dřeni nadledvin. Nejvyšší, sedminásobná, koncentrace byla zjištěna 3 hodiny po ukončení stresových podnětů, poté hladina mRNA začala klesat a do 24 hodin se vrátila na normální úroveň (Kvetnansky et al., 2004). Pokud byla zvířata stresu vystavována opakovaně, došlo k významně nižšímu vzestupu Th mRNA v porovnání s jednorázovou imobilizací, ale také došlo k ustanovení permanentně zvýšené hladiny této mRNA.

Mutační údaje naznačují, že pro bazální (nestimulovanou) expresi Th je nezbytný cAMP response element (CRE) a element vázající aktivátorový protein 1 (AP1) (Trocmé et al., 1998). Oba tyto faktory se účastní také transkripce v odpověď na nejrůznější podněty, jako je např. cAMP, vápník, depolarizace nebo hypoxie. Důležitým regulačním mechanismem je existence většího počtu CRE-vazebných proteinů, které navíc mohou být modifikovány fosforylací (Lewis-Tuffin et al., 2004).

Dlouho nebylo jasné, jakým mechanismem na transkripci Th genu působí glukokortikoidy. U několika druhů obratlovců byla nalezena homologie ke známému glucocorticoid response elementu (GRE), ale žádný z nich se neukázal být funkčním. Teprve v roce 2001 byla objevena funkční GRE sekvence v 5' přílehlé oblasti genu pro myši Th (Hagerty et al., 2001). Nedávno byl v promotoru genu pro potkaní Th nalezen sedminukleotidový úsek, který je zásadní pro glukokortikoidovou transkripční regulaci. Zajímavé je, že tato sekvence nemá žádnou podobnost s klasickým GRE, ale velmi se podobá AP1 vazebnému motivu (Rani et al., 2009).

Znalost promotorových regulačních elementů a faktorů je značná. Nedostatečně objasněná ale zůstává integrace jednotlivých regulačních modifikací, která dokáže spustit expresi specifickou pro konkrétní buněčný typ i pro aktuální podmínky prostředí.

#### **4.1.4 Polymorfizmy tyrosinhydroxylázy**

V intronu 1 genu pro lidskou Th se nachází (TCAT)<sub>n</sub> tetranukleotidová repetice (Zhang et al., 2004). Odlišná frekvence (TCAT)<sub>n</sub> je dávana do souvislosti nejen s hypertenzí, ale i s dalšími chorobami jako je např. schizofrenie. Nižší výskyt alely (TCAT)<sub>9</sub> byl zjištěn u normotenzních

jedinců (Sharma et al., 1998). Koncentrace noradrenalinu v plazmě byla významně zvýšená u jedinců s alelou (TCAT)<sub>9</sub> a naopak snižená u těch s alelou (TCAT)<sub>7</sub> (Wei et al., 1997), což naznačuje spojitost těchto alel s vysokou nebo nízkou dráždivostí noradrenergického nervového systému. (TCAT)<sub>n</sub> motiv může vázat transkripční faktory jako je např. zinc finger protein 191 (Albanèse et al., 2001) a může fungovat jako transkripční enhancer. Nicméně efekty tohoto předpokládaného enhanceru zatím nejsou dostatečně prozkoumány: fúzí s heterologním promotorem (thymidinkinázy) zřejmě transkripci aktivují (Meloni et al., 1998), zatímco fúzí s homologním promotorem (tyrosinhydroxylázy) transkripci reprimují a to v závislosti na délce (TCAT)<sub>n</sub> (Albanèse et al., 2001).

V kódující oblasti genu pro lidskou Th bylo nalezeno nejméně 14 jednonuleotidových polymorfizmů, ale jen dva z nich mají významné zastoupení minoritní alely v populaci a pouze jeden způsobuje změnu aminokyselinové sekvence. Jedná se o Val81-Met záměnu, nicméně nebyla zjištěna spojitost tohoto polymorfizmu s hladinou katecholaminů ani se změnami TK v odpovědi na stres (Rao et al., 2007).

V blízké promotorové oblasti se nachází minimálně 10 jednonukleotidových polymorfizmů, minoritní alela čtyř z nich (C-824T, G-801C, A-581G, a G-494A) se vyskytuje u více než 10 % populace. Významný vliv na sekreci katecholaminů i na stresovou odpověď TK mají polymorfizmy C-824T a A-581G. Minoritní alely -824T a -581G nejsou pouhými statistickými prediktory, ale jsou příčinou změny transkripční účinnosti Th genu (Zhang et al., 2010).

#### **4.1.5 Tyrosinhydroxyláza u SHR**

Ačkoli je dobře prokázán význam dřene nadledvin v rozvoji hypertenze u SHR, studie týkající se aktivity Th v této tkáni dávají protichůdné výsledky. Důvodem rozporuplných dat může být volba odlišných normotenzních kontrol, nebo genetické změny v SHR kmeni během inbredního křížení v odlišných chovných stanicích.

V některých experimentech byla zjištěna snížená aktivita Th ve dřeni nadledvin SHR ve srovnání se stejně starými WKY (Moura et al., 2005). Navíc toto snížení enzymatické aktivity nebylo v přímém spojení se změnami TK, protože bylo přítomné před vznikem, v průběhu rozvoje i po ustanovení hypertenze. Paralelně s nižší aktivitou Th byl naměřen i nižší obsah katecholaminů ve dřeni nadledvin, ale plazmatická koncentrace adrenalinu byla srovnatelná u obou kmenů. Tento rozpor by mohl být způsoben zvýšenou sekrecí katecholaminů v dřeni nadledvin SHR (Lim et al., 2002). Hladina noradrenalinu v plazmě byla zvýšená u všech SHR jedinců, včetně pětítýdenních pre-hypertenzních, což je v souladu s předpokládanou zvýšenou aktivitou periferního sympatického systému (Moura et al., 2005). Je možné, že vysoká hladina

noradrenalinu v plazmě je příčinou inhibice Th v dřeni nadledvin. Proč ale tato zpětná vazba funguje v dřeni nadledvin a nefunguje v nervových zakončeních sympatiku? Vysvětlením může být tkáňově specifické zastoupení jednotlivých typů adrenergických receptorů, které ovlivňují syntézu a uvolňování katecholaminů.

Nicméně jiné studie ukazují, že hladina adrenalinu v dřeni nadledvin SHR je podstatně vyšší než u normotenzních WKY. Toto platí pro jedince každého věku, jedinou výjimkou jsou zvířata stará čtyři týdny (Maemura et al., 1982). V dřeni nadledvin SHR byla zjištěna vyšší exprese Th mRNA i vyšší aktivita Th než u WKY (Kumai et al., 1994). Obdobně zvýšená exprese Th mRNA byla stanovena i ve dvou různých typech katecholaminergních neuronů v mozku SHR, což naznačuje, že míra up-regulace u SHR není tkáňově specifická (Reja et al., 2002a).

Použitím antisense oligonukleotidů cílených proti Th mRNA bylo dosaženo snížení exprese Th ve dřeni nadledvin, snížení hladiny katecholaminů a také snížení TK u SHR. Naproti tomu u kontrolních WKY byla snížená exprese Th i hladina katecholaminů, ale výše TK zůstala nezměněná. Je možné, že snížená aktivita Th byla u WKY vykompenzována jinými regulačními mechanismy (Kumai et al., 2001). Tyto poznatky naznačují, že by Th antisense oligonukleotidy mohly sloužit jako účinná léčba některých typů hypertenze.

V mozku třítydenních SHR byla oproti stejně starým normotenzním WKY zjištěna vyšší exprese i aktivita Th a zároveň zvýšená hladina katecholaminů. Podáváním klonidinu, agonisty alfa<sub>2</sub>-adrenergního receptoru, bylo u SHR dosaženo snížení aktivity Th i hladiny katecholaminů v mozku, naopak zvýšení aktivity Th a hladiny katecholaminů ve dřeni nadledvin a dále snížení hladiny noradrenalinu v plazmě. U takto léčených jedinců nedošlo k rozvoji hypertenze. U kontrolních WKY potkanů klonidin také snížil množství noradrenalinu v plazmě, ale neměl žádný efekt na aktivitu Th a obsah katecholaminů v obou zkoumaných tkáních (Moura et al., 2009). Toto zjištění napovídá, že aktivita a exprese Th v mozku a dřeni nadledvin může být řízena nejen změnami hladiny noradrenalinu, ale i jinými mechanismy, které také signalizují změny v aktivitě sympatického systému.

Pohlaví určující oblast na chromozomu Y (Sry) má u SHR kmene spojitost se zvýšeným TK (Ely et al., 1993). Tento transkripční faktor zvyšuje aktivitu Th promotoru v transfekovaných PC12 buňkách. Vložení Sry DNA z SHR do dřene nadledvin WKY vede ke zvýšení TK o 30 mmHg, ke zvýšení plazmatické hladiny noradrenalinu a zvýšení Th aktivity ve dřeni nadledvin (Ely et al., 2007). Nicméně Sry je exprimován v několika různých tkáních, které mohou mít vliv na výši TK, takže je možné, že ovlivňuje TK několika různými mechanismy. Jsou zapotřebí další studie, které odhalí expresní a sekvenční odlišnost Sry genu u SHR a WKY a s konečnou platností potvrdí, že Sry je skutečně hypertenzivním lokusem na chromozomu Y.

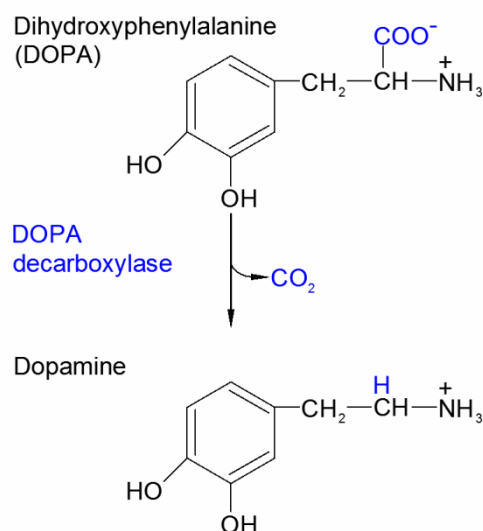
Zdá se, že výše TK, stejně jako aktivita a exprese Th, má u SHR kmene spojitost také s androgeny. Kastrace čtyřtýdenních SHR samců zpomaluje rozvoj hypertenze, podávání testosteronu tento účinek ruší. U kastrovaných zvířat byla zjištěna snížená hladina katecholaminů, Th mRNA i Th aktivita ve dřeni nadledvin v porovnání s kontrolami i s kastrovanými zvířaty, kterým byl podáván testosteron. U WKY kmene nebyl zaznamenán výrazný rozdíl v hodnotách TK ani v ostatních parametrech mezi kontrolami, kastrovanými zvířaty a kastrovanými zvířaty, kterým byl podáván testosteron (Kumai et al., 1995). Testosteron hraje významnou roli v regulaci transkripce některých genů prostřednictvím vazby androgenního receptoru k androgen respons elementu (ARE) (Parker, 1990), je tedy možné, že tímto způsobem se účastní i regulace exprese Th. V promotoru pro lidskou Th již ARE sekvence byla nalezena, ale zdá se, že zprostředkovává pouze část regulace Th androgeny (Jeong et al., 2006). Je možné, že androgeny mohou expresi Th ovlivňovat i přes jiné než klasické ARE sekvence, nebo nepřímo přes další, zatím neidentifikované proteiny.

#### 4.2 DOPAdekarboxyláza

Ddc katalyzuje odstranění karboxylové skupiny z L-DOPA za vzniku dopaminu. Ve svém katalytickém místě obsahuje pyridoxalfosfát a ve většině případů funguje jako dimer s molekulovou hmotností přibližně 100 kDa (Siow and Dakshinamurti, 1990).

Ddc se nachází nejen v katecholaminergních a serotoninergních neuronech, ale i v nenervových tkáních jako jsou např. ledviny a játra. Bylo zjištěno, že v nervových a nenervových tkáních je Ddc kódována odlišnými mRNA (Krieger et al., 1991), což je způsobeno existencí dvou různých, tkáňově specifických promotorů a alternativním sestřihem (Albert et al., 1992). Různé mRNA jsou možným vysvětlením selektivního nenervového (např. ledvinového) defektu Ddc.

Syntéza dopaminu v nervové a nenervové tkáni se liší i v dalším ohledu. Neurony exprimují Th, Ddc i DβH, takže tyrosin je přeměněn na L-DOPA, dále na dopamin a poté na noradrenalin. Naproti tomu v ledvinovém proximálním tubulu není exprimována Th a DβH, ale pouze Ddc. L-DOPA je tedy přenášena transportérem aminokyselin do buněk proximálního tubulu, kde je měněna na dopamin. Příjem sodíku zvyšuje vstup L-DOPA do buněk, aktivitu Ddc a tím i syntézu dopaminu, který není v proximálním tubulu skladován, ale je transportován ven



Obr. 3: Dekarboxylace L-DOPA za vzniku dopaminu (Purves et al., 2001)

přes apikální i basolaterální membránu . Zde působí přes některý z pěti známých typů receptorů (shrnutí v Zeng et al., 2007).

Lokálně a na inervaci nezávisle produkován dopamin hraje důležitou roli v regulaci TK (shrnutí v Hussain and Lokhandwala, 2003). Dopamin působí jednak vazodilatačně na cévy, čímž mění průtok krve ledvinami. Zadruhé zvyšuje transport iontů v ledvinách a trávicím traktu. Abnormální metabolismus sodíku je často doprovázen hypertenzí, snížená renální syntéza a/nebo sekrece dopaminu je pravděpodobně součástí patogeneze esenciální hypertenze u některých lidí (shrnutí v Kuchel and Kuchel, 1991). Sůl-senzitivní hypertenzní jedinci nezvyšují renální produkci dopaminu v odpověď na zvýšený příjem soli (Damasceno et al., 1999), což je způsobeno zhoršeným renálním transportem L-DOPA do buněk a zároveň nedostatečnou přeměnou L-DOPA na dopamin. Nicméně v některých případech esenciální hypertenze je hladina dopaminu a jeho metabolitů v moči naopak zvýšená (Saito et al., 1986). U těchto jedinců je pravděpodobně zasažena jiná část periferního dopaminergního systému.

#### **4.2.1 Dopaminergní systém u experimentální hypertenze**

U SHR byla zjištěna normální nebo spíš zvýšená renální hladina dopaminu v počátečním stadiu hypertenze, kdy je exkrece sodíku močí snížena v porovnání s WKY (Racz et al., 1985). Příčinou poruchy exkrece sodíku (a možná i hypertenze) u SHR není nedostatečná aktivita Ddc, ale defekt v D<sub>1</sub> receptoru pro dopamin (Jose et al., 1996), který vede k narušení regulace sodíkové pumpy a Na/H antiporteru v proximálním tubulu.

Dahlovi potkani citliví ke zvýšenému příjmu soli vykazují sníženou syntézu dopaminu v ledvinách (Sakamoto et al., 1994) a nedostatečnou natriuretickou a diuretickou odpověď při zvýšeném příjmu sodíku. Mimo to u nich byl zjištěn také defekt v D<sub>1</sub> receptoru pro dopamin v proximálním tubulu (Ohbu et al., 1995).

Další příčinou vzniku hypertenze může být defekt v D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> nebo D<sub>5</sub> receptoru pro dopamin, jak bylo prokázáno studiemi na knock-out myších (shrnutí v Zeng et al., 2007).

#### **4.3 Dopamin-β-hydroxyláza**

DβH katalyzuje oxidativní hydroxylaci dopaminu na noradrenalin. Je to glykoprotein obsahující v katalytickém místě měď, který existuje v rozpustné i membránově vázané formě (Wallace et al., 1973). DβH funguje jako tetramer vzniklý ze dvou nekovalentně interagujících dimerů. Podjednotky v každém dimeru jsou vzájemně propojeny disulfidickými můstky (Robertson et al., 1994). Kromě mědi je pro fungování DβH zapotřebí ještě molekulární kyslík a kyselina askorbová (Huyghe and Klinman, 1991).

D $\beta$ H se nachází v chromafinných granulích dřeně nadledvin (Hörtnagl et al., 1972) a v synaptických váčcích adrenergních a noradrenergních neuronů (Hörtnagl and Winkler, 1969). V důsledku své lokalizace je D $\beta$ H vylévána do extracelulárního prostoru spolu s neuropřenašečem (Weinshilboum et al., 1971), takže se nachází v mozkomíšní tekutině i plazmě. Enzymatická aktivita D $\beta$ H v mozkomíšní tekutině odpovídá hladině tohoto proteinu (O'Connor et al., 1994) a z rodinných studií plyne, že faktory prostředí, jako např. stres a léky, ovlivňují aktivitu D $\beta$ H jen málo v porovnání s faktory genetickými (Weinshilboum et al., 1975).

Díky své nezastupitelné roli v syntéze katecholaminů a zároveň genetické determinaci, D $\beta$ H může hrát významnou roli v patogenezi hypertenze. Řada důkazů tomu nasvědčuje: deficiencie D $\beta$ H se projevuje hypotenzí (Swoap et al., 2004) a inhibice D $\beta$ H zmírňuje rozvoj hypertenze u SHR (Stanley et al., 1998).

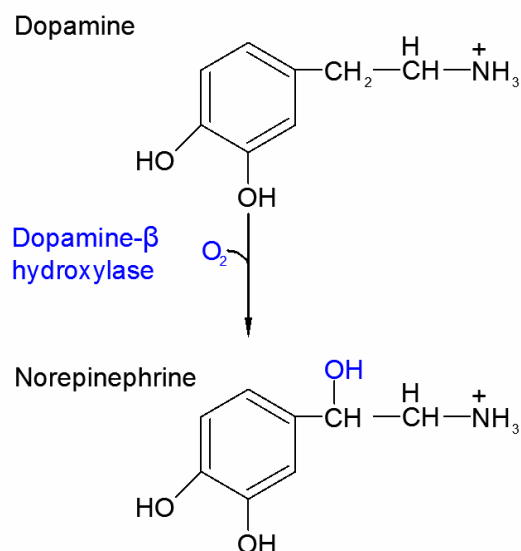
#### 4.3.1 Transkripce dopamin- $\beta$ -hydroxylázy

D $\beta$ H se vyskytuje ve dvou formách - rozpustné a membránově vázané. Oba typy jsou kódovány jednou mRNA a rozdíl mezi nimi vzniká až posttranslačně (Lewis and Asnani, 1992).

Charakteristický vzor exprese D $\beta$ H v nervovém systému napovídá, že tento gen se nachází pod kontrolou specifickou pro neurony a navíc pro konkrétní buněčný typ. Experimenty na transgenních myších ukázaly, že 5'přílehlá oblast D $\beta$ H genu může spouštět expresi reportérového genu v chromafinných buňkách dřeně nadledvin (Kobayashi et al., 1994).

Deleční a mutační analýzy odhalily, že upstream sekvence genu pro lidskou D $\beta$ H, která je dlouhá pouze 486 nukleotidů, může řídit expresi reportérového genu buněčně specifickým způsobem (Seo et al., 1996). Vzdálenější část této oblasti, tedy -486 až -263 párů bazí, má pravděpodobně buněčně specifickou umlčovací funkci, takže potlačuje promotorovou aktivitu v nenervových buňkách (Ishiguro et al., 1995). Proximální část této oblasti, -262 až +1 párů bazí, je dostačující a zároveň nepostradatelná pro vysokou aktivitu D $\beta$ H promotoru v D $\beta$ H pozitivních buňkách (Ishiguro et al., 1993; Seo et al., 1996).

Bylo zjištěno, že CRE sekvence je rozhodující pro bazální transkripci v buněčných liniích exprimujících D $\beta$ H (Ishiguro et al., 1993; Kim et al., 1994; Seo et al., 1996). CRE je součástí



Obr. 4: Hydroxylace dopaminu za vzniku noradrenalinu (Purves et al., 2001)

složitější promotorové struktury nacházející se v oblasti -185 až -150 párů bazí, která obsahuje další elementy jako je např. AP1 element, Yin Yang-1 protein (YY1) vazebný element, a dva hlavní motivy míst vázajících homeodoménu (homeodoména je běžný DNA vazebný strukturální motiv nacházející se u mnoha eukaryotických regulačních proteinů). Cílenou mutagenézí všech sekvenčních motivů bylo odhaleno, že CRE je nezbytný pro základní aktivitu promotoru ve všech buněčných liniích a YY1 vazebný element je multifunkční (Seo et al., 1996; Yang et al., 1998). Noradrenergně specifickou expresi D $\beta$ H genu zřejmě zajišťuje místo vázající homeodoménu (Yang et al., 1998). Jako další regulační elementy nacházející se v promotoru pro D $\beta$ H byly zjištěny místa vázající protein specificity 1 (Sp1), aktivátorový protein 2 (AP2) (Kim et al., 1998) a protein časné růstové odpovědi 1 (Egr1) (Cheng et al., 2008).

Expresí D $\beta$ H genu je modulována v odpověď na různé farmakologické i fyziologické podněty. Například během vystavení Sprague-Dawley potkanů imobilizačnímu stresu nebyla zjištěna změna koncentrace mRNA pro D $\beta$ H ve dřeni nadledvin. Více než dvojnásobná hladina byla naměřena teprve 3 hodiny po ukončení stresových podnětů, ale poté začala klesat a do 24 hodin se vrátila na normální úroveň (Kvetnansky et al., 2004). Při opakovaném stresu byl zjištěn obdobný vzestup hladiny mRNA jako při stresu jednorázovém, ale současně došlo k permanentnímu zvýšení koncentrace D $\beta$ H mRNA.

CAMP a jeho analogy působí na D $\beta$ H gen přes CRE a překvapivě i přes AP1 element (Kim et al., 1994; Swanson et al., 1998). Forbol ester zvyšuje aktivitu mnoha eukaryotických genů přes AP1 místo, D $\beta$ H gen je aktivován také, ale z experimentů plyne, že transkripční up-regulace se děje přes CRE a YY1 vazebný element (Ishiguro et al., 1998). Stimulace růstovými faktory, hormony a neurotransmitery indukuje expresi Egr1 genu, který za stejných podmínek způsobuje zvýšení aktivity promotoru pro Th a snížení aktivity promotoru pro D $\beta$ H gen (Cheng et al., 2008). Glukokortikoidy modulují expresi V-1 genu, který se účastní regulace exprese D $\beta$ H, Th i Ddc (Hiwatashi et al., 2002). Transkripce D $\beta$ H i Th genu je ovlivňována nikotinem. Odpověď D $\beta$ H na tuto stimulaci je citlivější a ukázalo se, že je i tkáňově specifická (Cheng et al., 2005).

Transkripce D $\beta$ H je komplexní a je regulovaná mnoha obecnými i buněčně specifickými transkripčními faktory. Z některých experimentů plyne, že v mnoha případech je koordinovaná s transkripcí Th i dalších genů účastnících se syntézy katecholaminů.

#### **4.3.2 Polymorfizmy dopamin- $\beta$ -hydroxyláza**

Sekvenováním lidského genu pro D $\beta$ H a jeho proximální promotorové oblasti bylo objeveno 71 polymorfizmů: 68 jednonukleotidových, 2 inserce/delece a 1 opakování (Chen et

al., 2010). Pouze u 18 jednonukleotidových polymorfizmů byla minoritní alela nalezena u více než 5 % jedinců. Inzerční/deleční a repetiční polymorfismus se vyskytoval velmi vzácně.

U několika polymorfizmů v oblasti promotoru byla zjištěna spojitost s výší TK. U C-970T polymorfizmu minoritní alela T předurčuje nižší DβH aktivitu, nižší sekreci katecholaminů a nižší TK. Polymorfismus C-2073T souvisí se zvýšením DβH sekrece, jehož důsledkem je zvýšení TK (Chen et al., 2011).

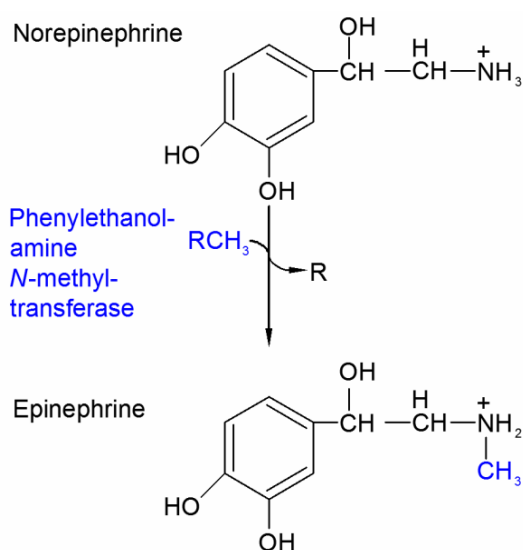
### 4.3.3 DβH u SHR

U šestitýdenních SHR byla zjištěna snížená exprese DβH genu, nižší aktivita DβH a zároveň zvýšený obsah dopaminu ve dřeni nadledvin. Hladina DβH transkriptu ve dřeni nadledvin pozitivně koreluje s enzymatickou aktivitou DβH v této tkáni, což napovídá, že pozorované rozdíly spočívají spíše v rozdílné expresi nebo stabilitě mRNA než v proteinové struktuře enzymu (Jirout et al., 2010). Hladina DβH mRNA ve dřeni nadledvin SHR je ze všech enzymů účastnících se syntézy katecholaminů nejnižší. Za limitující faktor syntézy katecholaminů bývá obvykle považována Th, ale Th mRNA je ve dřeni nadledvin SHR dvakrát více než DβH mRNA. Je tedy možné, že snížená aktivita DβH představuje „hrdlo lahve“ v syntéze katecholaminů, které způsobuje hromadění dopaminu (a nedostatek noradrenalinu) v adrenergických buňkách, což může přispívat k patogenezi hypertenze. U dospělých SHR potkanů je aktivita DβH ve dřeni nadledvin srovnatelná s kontrolami (Saavedra et al., 1978).

Nízká aktivita DβH u mladých SHR byla zjištěna i v mozku (Saavedra et al., 1978). Dopaminergní systém v mozku se účastní centrální regulace TK, takže zvýšení centrálního dopaminu může přispívat k rozvoji hypertenze. Naopak noradrenalin v některých částech mozku má inhibiční funkci na zvyšování TK. Jeho snížená koncentrace u SHR může mít také vliv na vznik a rozvoj hypertenze (Jirout et al., 2010).

### 4.4 Fenyletanolamin-N-metyltransferáza

Lidská Pnmt je monomerní nebo dimerní (Gee et al., 2005a) cytosolický (Cleary et al., 2005) enzym, který katalyzuje přeměnu noradrenalinu na adrenalin. Má velmi širokou substrátovou specifitu a ke svému fungování vyžaduje S-adenosyl-L-methionin jako donor metylu (Gee et al., 2005b; Martin et al., 2001). Nachází se především ve dřeni nadledvin (Axelrod, 1962) a v nižších koncentracích i v dalších



Obr. 5: Metylace noradrenalinu za vzniku adrenalinu (Purves et al., 2001)

tkáních, jako jsou např. mozek, svaly, atd (Kennedy et al., 1993; Saavedra et al., 1974).

#### 4.5 Regulace transkripce fenyletanolamin-N-metyltransferázy

Během embryonálního vývoje je exprese Pnmt v jednotlivých tkáních regulována pomocí alternativního sestřihu (Unsworth et al., 1999). Mohou vznikat dvě formy mRNA: první neobsahuje žádné introny, zatímco ve druhé zůstává zachován intron 2. Tento typ sestřihu je u obratlovců poměrně neobvyklý. Intron 2 obsahuje několik stop kodonů, takže je pravděpodobné, že translaci vzniká zkrácený, ikdyž možná funkční enzym.

Glukokortikoidy jsou rozhodujícími regulátory Pnmt, ovlivňují její transkripci i proteolytickou degradaci (Wong et al., 1985; Wong et al., 1992; Wong et al., 1995) a to v průběhu adrenergní diferenciaci i v odpověď na stres (Serova et al., 1998). Působením dexametazonu, syntetického glukokortikoidu, na PC12 buňky se značně zvyšuje koncentrace Pnmt mRNA díky zesílení transkripce (Ebert et al., 1997), přesto ale není jasné, zda jsou glukokortikoidy nepostradatelné pro transkripční aktivitu Pnmt. Myši postrádající glukokortikoidový receptor neexprimují Pnmt ve dřeni nadledvin, ale jejich chromafinní buňky jsou jinak zdánlivě normální (Finotto et al., 1999).

Transkripční změny indukované glukokortikoidy jsou zprostředkované přes GRE v blízké 5'přilehlé oblasti promotoru Pnmt genu. Minimálně jedna GRE sekvence byla nalezena v promotoru Pnmt genu u různých savců (Morita et al., 1992; Tai et al., 2002). V potkaním Pnmt promotoru byla zjištěna GRE v pozici -513 párů bazí, ale ukázalo se, že v reakci na glukokortikoidy dokáže zvýšit transkripci Pnmt genu jen dvakrát (Ebert et al., 1998). Později byly objeveny další dvě GRE v pozici -759 a -773 párů bazí před počátkem transkripce, které společně dokáží zvýšit transkripci Pnmt genu až dvanáctkrát (Tai et al., 2002).

V pozici -653, -571 a -103 párů bazí se nacházejí AP2 vazebná místa (Ebert et al., 1998). Všechna jsou schopná vázat AP2, ale největší vliv na aktivaci exprese Pnmt má -571 místo. AP2 transkripční faktor je schopen stimulovat aktivitu Pnmt promotoru pouze v přítomnosti glukokortikoidů. Bez účasti glukokortikoidů má AP2 na transkripci Pnmt vliv negativní. AP2 vazebné místo v pozici -653 pravděpodobně samo o sobě není příliš významné pro aktivaci Pnmt promotoru, ale díky své malé vzdálenosti od GRE spolu tato místa mohou interagovat.

V promotoru Pnmt genu se také nachází dvě Egr1 vazebná místa, která aktivují transkripci a mohou interagovat s GRE i AP2 (Ebert et al., 1994). Egr1 zvyšuje transkripci Pnmt v důsledku stresu, hypoxie (Wong et al., 2004) a působení NGF (Tai et al., 2006). Další transkripční faktory účastníci se regulace Pnmt promotoru jsou Sp1 a myc-asociovaný zinc finger protein (Her et al., 1999).

#### **4.6 Polymorfizmy fenyletanolamin-N-metyltransferázy**

Osekvenování Pnmt genu a jeho promotoru odhalilo velmi nízkou sekvenční variabilitu u normotenzních i hypertenzních jedinců (Kepp et al., 2007). Toto zjištění je v souladu s velmi významnou rolí adrenalinu, produktu Pnmt, v regulaci metabolických a kardiovaskulárních funkcí organismu. Obdobné výsledky byly zjištěny i při srovnávacím sekvenování genu pro potkaní Pnmt u SHR náchylných k mozkové příhodě a normotenzních kmenů (Koike et al., 1995).

Zatím je popsána pouze jedna alela, která způsobuje významně nižší aktivitu enzymu ve srovnání s častější variantou. Záměna threoninu v pozici 98 za alanin se vzácně vyskytuje u Afroameričanů a vede k poklesu množství proteinu díky jeho zrychlené degradaci v proteozomu (Ji et al., 2005).

Regulační oblasti lidského Pnmt genu zatím nebyly podrobně studovány s výjimkou dvou jednonukleotidových polymorfizmů v promotorové oblasti. Nebyl zjištěn rozdíl mezi normotenzními a hypertenzními jedinci ve výskytu alel polymorfizmů v pozici -184 a -390 párů bazí. Nicméně heterozygotní stav těchto promotorových oblastí má spojitost s hypertenzí (Kepp et al., 2007). Je zajímavé, že v případě Alzheimerovy nemoci má heterozygotní stav obou těchto polymorfizmů protektivní účinky (Mann et al., 2001).

#### **4.7 Fenyletanolamin-N-metyltransferáza u SHR**

V části mozkového kmene, která se účastní kontroly krevního tlaku, byla u dospělých SHR naměřena zvýšená exprese Pnmt. Inhibice této oblasti, např. lokální injekcí neuroinhibičního léku muscimolu, u SHR snižuje krevní tlak, zatímco u WKY k žádné změně nedochází (Ito et al., 2000). Odlišnost reakce naznačuje, že změny exprese Pnmt v této oblasti mozku mohou souviset se vznikem hypertenze u SHR.

Ve dřeni nadledvin mladých SHR byla zjištěna snížená aktivita Pnmt od dvou do osmi týdnů věku ve srovnání se stejně starými WKY normotenzními zvířaty (Grobeck et al., 1982). Naopak u dospělých SHR je exprese Pnmt zvýšená (Reja et al., 2002b). Mimoto byla u SHR potkanů zjištěna zvýšená hladina mRNA pro transkripční faktory Egr1, Sp1 a glukokortikoidový receptor (Nguyen et al., 2009).

## 5. Závěr

Nejlépe prozkoumaným enzymem metabolismu katecholaminů je tyrosinhydroxyláza, jež je považována za limitující faktor celé syntetické dráhy. Aktivita Th je krátkodobě regulována fosforylací enzymu a dlouhodobě změnami transkripce. Ačkoli znalosti této problematiky jsou poměrně obsáhlé, nedostatečně objasněná zůstává především integrace jednotlivých regulačních modifikací *in vivo* v různých tkáních a za různých podmínek. U SHR kmene byla zjištěna pozměněná exprese i aktivita Th ve dřeni nadledvin a mozku. Ve dřeni nadledvin SHR zvířat je Th významně ovlivňována genem *Sry* a androgeny, což může vysvětlovat vyšší TK u samčího pohlaví. Jako velmi důležitý objev se jeví použití antisense oligonukleotidů cílených proti Th mRNA vedoucí ke snížení exprese Th, snížení hladiny katecholaminů a také snížení TK u SHR. Podobná léčba by mohla být účinná i u některých typů lidské hypertenze. V genu pro lidskou Th a v jeho promotorové oblasti byly nalezeny polymorfizmy, které jsou spojeny s metabolismem katecholaminů a TK. Toto zjištění nabízí nové strategie jak přistupovat k diagnóze a léčbě esenciální hypertenze.

DOPAdekarboxyláza je enzym, který přeměňuje L-DOPA na dopamin. Dopamin způsobuje vazodilataci a zvyšuje exkreci sodíku, což organismus chrání před vysokým TK. Různé abnormality v dopaminergní regulaci přispívají k jednotlivým formám hypertenze u lidských i zvířecích modelů. Ačkoli změna v regulaci *Ddc* může souviset s vysokým TK, daleko častější je defekt v některém z receptorů pro dopamin.

Dopamin- $\beta$ -hydroxyláza může díky své nezastupitelné roli v syntéze katecholaminů a genetické determinaci značně přispívat k patogenezi hypertenze. Transkripční regulace *D $\beta$ H* je komplexní a zahrnuje mnoho obecných i buněčně specifických transkripčních faktorů. V mnoha případech je koordinovaná s transkripcí Th. V mozku mladých SHR byla zjištěna nízká aktivita *D $\beta$ H*, což vede ke zvýšení koncentrace dopaminu a snížení koncentrace noradrenalinu. Tyto změny mohou v některých částech mozku ovlivňovat centrální regulaci TK. Ve dřeni nadledvin SHR je koncentrace *D $\beta$ H* poloviční ve srovnání s Th mRNA. Z tohoto důvodu by *D $\beta$ H* mohla být limitujícím faktorem syntézy adrenalinu a noradrenalinu, ačkoli doposud byla za limitující považována Th. Pokud je exprese *D $\beta$ H* opravdu „hrdlem lahve“ metabolismu katecholaminů u některých typů hypertenze, pak je nutné zjistit příčinu tohoto jevu. V promotoru genu pro lidskou *D $\beta$ H* byly nalezeny polymorfizmy, které mají spojitost se sekrecí katecholaminů a TK. Nicméně transkripce *D $\beta$ H* je regulována mnoha transkripčními faktory, takže exprese může být ovlivněna např. pozměněnou dostupností některého z nich.

Fenyletanolamin-N-metyltransferáza je posledním enzymem v syntéze adrenalinu. Její exprese je regulována součinností transkripčních faktorů a navíc alternativním sestřihem se zachováním intronu. U SHR se *Pnmt* nachází ve zvýšené koncentraci v části mozkového kmene

zodpovídající za regulaci TK. Aplikací neuroinhibitoru do této oblasti lze u SHR dosáhnout snížení TK. Ve dřeni dospělých SHR je exprese Pnmt také zvýšená, což je nejspíš důsledkem zvýšené hladiny mRNA pro transkripční faktory Egr1, Sp1 a glukokortikoidový receptor, které se účastní regulace aktivity Pnmt promotoru. Je tedy pravděpodobné, že zvýšená exprese těchto transkripčních faktorů způsobuje nadměrnou expresi Pnmt, což vede ke zvýšení syntézy adrenalinu, který následně ovlivňuje kardiovaskulární regulaci a TK. Tento sled dějů může být potenciálním molekulárním mechanismem vzniku hypertenze. V lidském i potkaním Pnmt genu bylo nalezeno jen velmi málo polymorfizmů, což je v souladu s klíčovou rolí adrenalinu v organismu. Dá se tedy usuzovat, že většina interindividuálních rozdílů v množství syntetizovaného adrenalinu není způsobena rozdíly v genu pro Pnmt. Expresní změny jsou spíš určeny souhrou hormonálních a nervových podnětů a také repertoárem regulačních transkripčních faktorů.

Je jisté, že metabolismus katecholaminů se u SHR kmene liší od normotenzních kontrol v mnoha ohledech. Bohužel zatím není možné jednoznačně určit, co je primární příčinou hypertenze a co pouze kompenzační reakcí. Nicméně některými zásahy lze dosáhnout zabránění nebo alespoň zpomalení rozvoje onemocnění.

Otázkou je, nakolik jsou výsledky experimentálního výzkumu využitelné v medicínské praxi. Lidská esenciální hypertenze i genetická hypertenze potkanů jsou si v mnoha ohledech podobné. Jsou to chronická, pomalu se vyvíjející onemocnění, která vznikají v důsledku vzájemného působení genetické predispozice a faktorů vnějšího prostředí. U obou druhů existují kritické vývojové periody a zásahy v těchto fázích vývoje mohou vést k významným změnám kardiovaskulárního fenotypu v pozdějším věku. Ne všechny poznatky pocházející z výzkumu na zvířatech lze převádět do klinické praxe, ale je jisté, že ontogenetické zákonitosti uplatňující se v patogenezi hypertenze u lidí a potkanů jsou obdobné.

## 6. Literatura

- Aitken A (2006) 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**(3):162-172.
- Albanèse V, Biguet NF, Kiefer H, Bayard E, Mallet J and Meloni R (2001) Quantitative effects on gene silencing by allelic variation at a tetranucleotide microsatellite. *Hum Mol Genet* **10**(17):1785-1792.
- Albert VR, Lee MR, Bolden AH, Wurzbarger RJ and Aguanno A (1992) Distinct promoters direct neuronal and nonneuronal expression of rat aromatic L-amino acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24):12053-12057.
- Almås B, Le Bourdelles B, Flatmark T, Mallet J and Haavik J (1992) Regulation of recombinant human tyrosine hydroxylase isozymes by catecholamine binding and phosphorylation. Structure/activity studies and mechanistic implications. *Eur J Biochem* **209**(1):249-255.
- Andersson KK, Cox DD, Que L, Flatmark T and Haavik J (1988) Resonance Raman studies on the blue-green-colored bovine adrenal tyrosine 3-monooxygenase (tyrosine hydroxylase). Evidence that the feedback inhibitors adrenaline and noradrenaline are coordinated to iron. *J Biol Chem* **263**(35):18621-18626.
- Axelrod J (1962) Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *J Biol Chem* **237**:1657-1660.
- Bobrovskaya L, Dunkley PR and Dickson PW (2004) Phosphorylation of Ser19 increases both Ser40 phosphorylation and enzyme activity of tyrosine hydroxylase in intact cells. *J Neurochem* **90**(4):857-864.
- Bodeau-Péan S, Ravassard P, Neuner-Jehle M, Faucheux B, Mallet J and Dumas S (1999) A human tyrosine hydroxylase isoform associated with progressive supranuclear palsy shows altered enzymatic activity. *J Biol Chem* **274**(6):3469-3475.
- Campbell DG, Hardie DG and Vulliet PR (1986) Identification of four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem* **261**(23):10489-10492.
- Chen Y, Wen G, Rao F, Zhang K, Wang L, Rodriguez-Flores JL, Sanchez AP, Mahata M, Taupenot L, Sun P, Mahata SK, Tayo B, Schork NJ, Ziegler MG, Hamilton BA and O'Connor DT (2010) Human dopamine beta-hydroxylase (DBH) regulatory polymorphism that influences enzymatic activity, autonomic function, and blood pressure. *J Hypertens* **28**(1):76-86.
- Chen Y, Zhang K, Wen G, Rao F, Sanchez AP, Wang L, Rodriguez-Flores JL, Mahata M, Mahata SK, Waalen J, Ziegler MG, Hamilton BA and O'Connor DT (2011) Human dopamine  $\beta$ -hydroxylase promoter variant alters transcription in chromaffin cells, enzyme secretion, and blood pressure. *Am J Hypertens* **24**(1):24-32.
- Cheng SY, Glazkova D, Serova L and Sabban EL (2005) Effect of prolonged nicotine infusion on response of rat catecholamine biosynthetic enzymes to restraint and cold stress. *Pharmacol Biochem Behav* **82**(3):559-568.
- Cheng SY, Serova LI, Glazkova D and Sabban EL (2008) Regulation of rat dopamine beta-hydroxylase gene transcription by early growth response gene 1 (Egr1). *Brain Res* **1193**:1-11.
- Cleary S, Brouwers FM, Eisenhofer G, Pacak K, Christie DL, Lipski J, McNeil AR and Phillips JK (2005) Expression of the noradrenaline transporter and phenylethanolamine N-ethyltransferase in normal human adrenal gland and pheochromocytoma. *Cell Tissue Res* **322**(3):443-453.
- Damasceno A, Santos A, Serrão P, Caupers P, Soares-da-Silva P and Polónia J (1999) Deficiency of renal dopaminergic-dependent natriuretic response to acute sodium load in black salt-sensitive subjects in contrast to salt-resistant subjects. *J Hypertens* **17**(12 Pt 2):1995-2001.
- Daubner SC, Lauriano C, Haycock JW and Fitzpatrick PF (1992) Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J Biol Chem* **267**(18):12639-12646.

- Ebert SN, Balt SL, Hunter JP, Gashler A, Sukhatme V and Wong DL (1994) Egr-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *J Biol Chem* **269**(33):20885-20898.
- Ebert SN, Ficklin MB, Her S, Siddall BJ, Bell RA, Ganguly K, Morita K and Wong DL (1998) Glucocorticoid-dependent action of neural crest factor AP-2: stimulation of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression. *J Neurochem* **70**(6):2286-2295.
- Ebert SN, Lindley SE, Bengoechea TG, Bain D and Wong DL (1997) Adrenergic differentiation potential in PC12 cells: influence of sodium butyrate and dexamethasone. *Brain Res Mol Brain Res* **47**(1-2):24-30.
- Ely D, Milsted A, Bertram J, Ciotti M, Dunphy G and Turner ME (2007) Sry delivery to the adrenal medulla increases blood pressure and adrenal medullary tyrosine hydroxylase of normotensive WKY rats. *BMC Cardiovasc Disord* **7**:6.
- Ely DL, Daneshvar H, Turner ME, Johnson ML and Salisbury RL (1993) The hypertensive Y chromosome elevates blood pressure in F11 normotensive rats. *Hypertension* **21**(6 Pt 2):1071-1075.
- Finotto S, Krieglstein K, Schober A, Deimling F, Lindner K, Brühl B, Beier K, Metz J, Garcia-Ararras JE, Roig-Lopez JL, Monaghan P, Schmid W, Cole TJ, Kellendonk C, Tronche F, Schütz G and Unsicker K (1999) Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells. *Development* **126**(13):2935-2944.
- Gee CL, Nourse A, Hsin AY, Wu Q, Tyndall JD, Grunewald GL, McLeish MJ and Martin JL (2005a) Disulfide-linked dimers of human adrenaline synthesizing enzyme PNMT are catalytically active. *Biochim Biophys Acta* **1750**(1):82-92.
- Gee CL, Tyndall JD, Grunewald GL, Wu Q, McLeish MJ and Martin JL (2005b) Mode of binding of methyl acceptor substrates to the adrenaline-synthesizing enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase: implications for catalysis. *Biochemistry* **44**(51):16875-16885.
- Grobecker H, Saavedra JM and Weise VK (1982) Biosynthetic enzyme activities and catecholamines in adrenal glands of genetic and experimental hypertensive rats. *Circ Res* **50**(5):742-746.
- Hagerty T, Morgan WW, Elango N and Strong R (2001) Identification of a glucocorticoid-responsive element in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* **76**(3):825-834.
- Halskau Ø, Ying M, Baumann A, Kleppe R, Rodriguez-Larrea D, Almås B, Haavik J and Martinez A (2009) Three-way interaction between 14-3-3 proteins, the N-terminal region of tyrosine hydroxylase, and negatively charged membranes. *J Biol Chem* **284**(47):32758-32769.
- Haycock JW (1990) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. *J Biol Chem* **265**(20):11682-11691.
- Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH and Krebs EG (1992) ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6):2365-2369.
- Her S, Bell RA, Bloom AK, Siddall BJ and Wong DL (1999) Phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression. Sp1 and MAZ potential for tissue-specific expression. *J Biol Chem* **274**(13):8698-8707.
- Hiwatashi Y, Kurahashi Y, Hatada R, Ueno S, Honma T, Yanagihara N, Yanase H, Iwanaga T, Ohizumi Y and Yamakuni T (2002) Glucocorticoid inhibits expression of V-1, a catecholamine biosynthesis regulatory protein, in cultured adrenal medullary cells. *FEBS Lett* **528**(1-3):166-170.

- Hussain T and Lokhandwala MF (2003) Renal dopamine receptors and hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**(2):134-142.
- Huyghe BG and Klinman JP (1991) Activity of membranous dopamine beta-monooxygenase within chromaffin granule ghosts. Interaction with ascorbate. *J Biol Chem* **266**(18):11544-11550.
- Hörtnagl H and Winkler H (1969) Bovine splenic nerve: characterization of noradrenaline-containing vesicles and other cell organelles by density gradient centrifugation. *J Physiol* **205**(1):103-114.
- Hörtnagl H, Winkler H and Lochs H (1972) Membrane proteins of chromaffin granules, dopamine -hydroxylase, a major constituent. *Biochem J* **129**(1):187-195.
- Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R and Takahashi Y (1988) Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19):7084-7088.
- Ishiguro H, Kim KS and Joh TH (1995) Identification of a negative regulatory element in the 5'-flanking region of the human dopamine beta-hydroxylase gene. *Brain Res Mol Brain Res* **34**(2):251-261.
- Ishiguro H, Kim KT, Joh TH and Kim KS (1993) Neuron-specific expression of the human dopamine beta-hydroxylase gene requires both the cAMP-response element and a silencer region. *J Biol Chem* **268**(24):17987-17994.
- Ishiguro H, Yamada K, Ichino N and Nagatsu T (1998) Identification and characterization of a novel phorbol ester-responsive DNA sequence in the 5'-flanking region of the human dopamine beta-hydroxylase gene. *J Biol Chem* **273**(34):21941-21949.
- Itagaki C, Isobe T, Taoka M, Natsume T, Nomura N, Horigome T, Omata S, Ichinose H, Nagatsu T, Greene LA and Ichimura T (1999) Stimulus-coupled interaction of tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins. *Biochemistry* **38**(47):15673-15680.
- Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K and Sved AF (2000) Excitatory amino acids in the rostral ventrolateral medulla support blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**(1 Pt 2):413-417.
- Jeong H, Kim MS, Kwon J, Kim KS and Seol W (2006) Regulation of the transcriptional activity of the tyrosine hydroxylase gene by androgen receptor. *Neurosci Lett* **396**(1):57-61.
- Ji Y, Salavaggione OE, Wang L, Adjei AA, Eckloff B, Wieben ED and Weinshilboum RM (2005) Human phenylethanolamine N-methyltransferase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *J Neurochem* **95**(6):1766-1776.
- Jirout ML, Friese RS, Mahapatra NR, Mahata M, Taupenot L, Mahata SK, Kren V, Zídek V, Fischer J, Maatz H, Ziegler MG, Pravenec M, Hubner N, Aitman TJ, Schork NJ and O'Connor DT (2010) Genetic regulation of catecholamine synthesis, storage and secretion in the spontaneously hypertensive rat. *Hum Mol Genet* **19**(13):2567-2580.
- Jose PA, Eisner GM, Drago J, Carey RM and Felder RA (1996) Dopamine receptor signaling defects in spontaneous hypertension. *Am J Hypertens* **9**(4 Pt 1):400-405.
- Kennedy B, Elayan H and Ziegler MG (1993) Glucocorticoid induction of epinephrine synthesizing enzyme in rat skeletal muscle and insulin resistance. *J Clin Invest* **92**(1):303-307.
- Kepp K, Juhanson P, Kozich V, Ots M, Viigimaa M and Laan M (2007) Resequencing PNMT in European hypertensive and normotensive individuals: no common susceptibility variants for hypertension and purifying selection on intron 1. *BMC Med Genet* **8**:47.
- Kim HS, Seo H, Yang C, Brunet JF and Kim KS (1998) Noradrenergic-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites. *J Neurosci* **18**(20):8247-8260.
- Kim KS, Ishiguro H, Tinti C, Wagner J and Joh TH (1994) The cAMP-dependent protein kinase regulates transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J Neurosci* **14**(11 Pt 2):7200-7207.

- Kobayashi K, Kaneda N, Ichinose H, Kishi F, Nakazawa A, Kurosawa Y, Fujita K and Nagatsu T (1988) Structure of the human tyrosine hydroxylase gene: alternative splicing from a single gene accounts for generation of four mRNA types. *J Biochem* **103**(6):907-912.
- Kobayashi K, Morita S, Mizuguchi T, Sawada H, Yamada K, Nagatsu I, Fujita K and Nagatsu T (1994) Functional and high level expression of human dopamine beta-hydroxylase in transgenic mice. *J Biol Chem* **269**(47):29725-29731.
- Koike G, Jacob HJ, Krieger JE, Szpirer C, Hoehe MR, Horiuchi M and Dzau VJ (1995) Investigation of the phenylethanolamine N-methyltransferase gene as a candidate gene for hypertension. *Hypertension* **26**(4):595-601.
- Krieger M, Coge F, Gros F and Thibault J (1991) Different mRNAs code for dopa decarboxylase in tissues of neuronal and nonneuronal origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6):2161-2165.
- Kuchel OG and Kuchel GA (1991) Peripheral dopamine in pathophysiology of hypertension. Interaction with aging and lifestyle. *Hypertension* **18**(6):709-721.
- Kuhn DM, Arthur R, Yoon H and Sankaran K (1990) Tyrosine hydroxylase in secretory granules from bovine adrenal medulla. Evidence for an integral membrane form. *J Biol Chem* **265**(10):5780-5786.
- Kumai T, Tanaka M, Watanabe M and Kobayashi S (1994) Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* **65**(4):367-369.
- Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Nakura H and Kobayashi S (1995) Influence of androgen on tyrosine hydroxylase mRNA in adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **26**(1):208-212.
- Kumai T, Tateishi T, Tanaka M, Watanabe M, Shimizu H and Kobayashi S (2001) Tyrosine hydroxylase antisense gene therapy causes hypotensive effects in the spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **19**(10):1769-1773.
- Kunes J and Zicha J (2002) Experimentální modely hypertenze, in *Klinická patofyziologie hypertenze* (Souček M and Kára T eds) pp 28-36, Grada Publishing, Praha.
- Kunes J and Zicha J (2006) Developmental windows and environment as important factors in the expression of genetic information: a cardiovascular physiologist's view. *Clin Sci (Lond)* **111**(5):295-305.
- Kvetnansky R, Mícutková L, Rychkova N, Kubovčáková L, Mravec B, Filipenko M, Sabban EL and Krizanová O (2004) Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic ganglia of stressed rats. *Ann N Y Acad Sci* **1018**:356-369.
- Leal RB, Sim AT, Gonçalves CA and Dunkley PR (2002) Tyrosine hydroxylase dephosphorylation by protein phosphatase 2A in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Res* **27**(3):207-213.
- Lehmann IT, Bobrovskaya L, Gordon SL, Dunkley PR and Dickson PW (2006) Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. *J Biol Chem* **281**(26):17644-17651.
- Lewis EJ and Asnani LP (1992) Soluble and membrane-bound forms of dopamine beta-hydroxylase are encoded by the same mRNA. *J Biol Chem* **267**(1):494-500.
- Lewis-Tuffin LJ, Quinn PG and Chikaraishi DM (2004) Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus. *Mol Cell Neurosci* **25**(3):536-547.
- Lim DY, Jang SJ and Park DG (2002) Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton Autacoid Pharmacol* **22**(4):225-232.
- Maemura S, Niwa M and Ozaki M (1982) Characteristic alterations in adrenal catecholamine contents in SHR, SHRSP, and WKY during development of hypertension and stroke. *Jpn Heart J* **23**(4):593-602.

- Mann MB, Wu S, Rostamkhani M, Tourtellotte W, MacMurray J and Comings DE (2001) Phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) gene and early-onset Alzheimer disease. *Am J Med Genet* **105**(4):312-316.
- Martin JL, Begun J, McLeish MJ, Caine JM and Grunewald GL (2001) Getting the adrenaline going: crystal structure of the adrenaline-synthesizing enzyme PNMT. *Structure* **9**(10):977-985.
- Meloni R, Albanèse V, Ravassard P, Treilhou F and Mallet J (1998) A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro. *Hum Mol Genet* **7**(3):423-428.
- Mockus SM, Yohrling GJ and Vrana KE (1998) Tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase do not form heterotetramers. *J Mol Neurosci* **10**(1):45-51.
- Morita S, Kobayashi K, Hidaka H and Nagatsu T (1992) Organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding mouse phenylethanolamine N-methyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* **13**(4):313-319.
- Moura E, Afonso J, Serrão MP and Vieira-Coelho MA (2009) Effect of clonidine on tyrosine hydroxylase activity in the adrenal medulla and brain of spontaneously hypertensive rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **104**(2):113-121.
- Moura E, Pinho Costa PM, Moura D, Guimarães S and Vieira-Coelho MA (2005) Decreased tyrosine hydroxylase activity in the adrenals of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* **76**(25):2953-2964.
- Moy LY and Tsai LH (2004) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates serine 31 of tyrosine hydroxylase and regulates its stability. *J Biol Chem* **279**(52):54487-54493.
- Nagatsu T, Levitt M and Udenfriend S (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* **239**:2910-2917.
- Nguyen P, Peltsch H, de Wit J, Crispo J, Ubriaco G, Eibl J and Tai TC (2009) Regulation of the phenylethanolamine N-methyltransferase gene in the adrenal gland of the spontaneous hypertensive rat. *Neurosci Lett* **461**(3):280-284.
- O'Connor DT, Cervenka JH, Stone RA, Levine GL, Parmer RJ, Franco-Bourland RE, Madrazo I, Langlais PJ, Robertson D and Biaggioni I (1994) Dopamine beta-hydroxylase immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to central noradrenergic neuronal activity and variation in Parkinson's disease and congenital dopamine beta-hydroxylase deficiency. *Clin Sci (Lond)* **86**(2):149-158.
- Ohbu K, Kaskel FJ, Kinoshita S and Felder RA (1995) Dopamine-1 receptors in the proximal convoluted tubule of Dahl rats: defective coupling to adenylate cyclase. *Am J Physiol* **268**(1 Pt 2):R231-235.
- Ohye T, Ichinose H, Yoshizawa T, Kanazawa I and Nagatsu T (2001) A new splicing variant for human tyrosine hydroxylase in the adrenal medulla. *Neurosci Lett* **312**(3):157-160.
- Parker MG (1990) Mechanisms of action of steroid receptors in the regulation of gene transcription. *J Reprod Fertil* **88**(2):717-720.
- Peng X, Peng XM, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L and Perez RG (2005) Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci* **118**(Pt 15):3523-3530.
- Petřková J (2002) Genetika a esenciální hypertenze. *Interní Med* **5**:226-228.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO and Williams SM (2001) *Neuroscience*. Sinauer Associates, Sunderland (MA).
- Racz K, Kuchel O, Buu NT and Tenneson S (1985) Peripheral dopamine synthesis and metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* **57**(6):889-897.
- Rani CS, Elango N, Wang SS, Kobayashi K and Strong R (2009) Identification of an activator protein-1-like sequence as the glucocorticoid response element in the rat tyrosine hydroxylase gene. *Mol Pharmacol* **75**(3):589-598.
- Rao F, Zhang L, Wessel J, Zhang K, Wen G, Kennedy BP, Rana BK, Das M, Rodriguez-Flores JL, Smith DW, Cadman PE, Salem RM, Mahata SK, Schork NJ, Taupenot L, Ziegler MG

- and O'Connor DT (2007) Tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in catecholamine biosynthesis: discovery of common human genetic variants governing transcription, autonomic activity, and blood pressure in vivo. *Circulation* **116**(9):993-1006.
- Reja V, Goodchild AK, Phillips JK and Pilowsky PM (2002a) Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Auton Neurosci* **98**(1-2):79-84.
- Reja V, Goodchild AK and Pilowsky PM (2002b) Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR. *Hypertension* **40**(3):342-347.
- Robertson JG, Adams GW, Medzihradzky KF, Burlingame AL and Villafranca JJ (1994) Complete assignment of disulfide bonds in bovine dopamine beta-hydroxylase. *Biochemistry* **33**(38):11563-11575.
- Saavedra JM, Grobecker H and Axelrod J (1978) Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Circ Res* **42**(4):529-534.
- Saavedra JM, Palkovits M, Brownstein MJ and Axelrod J (1974) Localisation of phenylethanolamine N-methyl transferase in the rat brain nuclei. *Nature* **248**(450):695-696.
- Saito I, Takeshita E, Saruta T, Nagano S and Sekihara T (1986) Urinary dopamine excretion in normotensive subjects with or without family history of hypertension. *J Hypertens* **4**(1):57-60.
- Sakamoto T, Chen C and Lokhandwala MF (1994) Lack of renal dopamine production during acute volume expansion in Dahl salt-sensitive rats. *Clin Exp Hypertens* **16**(2):197-206.
- Seo H, Yang C, Kim HS and Kim KS (1996) Multiple protein factors interact with the cis-regulatory elements of the proximal promoter in a cell-specific manner and regulate transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J Neurosci* **16**(13):4102-4112.
- Serova L, Sabban EL, Zangen A, Overstreet DH and Yadid G (1998) Altered gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and stress response in rat genetic model of depression. *Brain Res Mol Brain Res* **63**(1):133-138.
- Sharma P, Hingorani A, Jia H, Ashby M, Hopper R, Clayton D and Brown MJ (1998) Positive association of tyrosine hydroxylase microsatellite marker to essential hypertension. *Hypertension* **32**(4):676-682.
- Siow YL and Dakshinamurti K (1990) Neuronal dopa decarboxylase. *Ann N Y Acad Sci* **585**:173-188.
- Stanley WC, Lee K, Johnson LG, Whiting RL, Eglen RM and Hegde SS (1998) Cardiovascular effects of nopicastat (RS-25560-197), a novel dopamine beta-hydroxylase inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**(6):963-970.
- Swanson DJ, Zellmer E and Lewis EJ (1998) AP1 proteins mediate the cAMP response of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J Biol Chem* **273**(37):24065-24074.
- Swoap SJ, Weinshenker D, Palmiter RD and Garber G (2004) Dbh(-/-) mice are hypotensive, have altered circadian rhythms, and have abnormal responses to dieting and stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**(1):R108-113.
- Tai TC, Claycomb R, Her S, Bloom AK and Wong DL (2002) Glucocorticoid responsiveness of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *Mol Pharmacol* **61**(6):1385-1392.
- Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R and Wong DL (2006) Nerve growth factor regulates adrenergic expression. *Mol Pharmacol* **70**(5):1792-1801.
- Toska K, Kleppe R, Armstrong CG, Morrice NA, Cohen P and Haavik J (2002) Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *J Neurochem* **83**(4):775-783.
- Trocme C, Sarkis C, Hermel JM, Duchateau R, Harrison S, Simonneau M, Al-Shawi R and Mallet J (1998) CRE and TRE sequences of the rat tyrosine hydroxylase promoter are required for TH basal expression in adult mice but not in the embryo. *Eur J Neurosci* **10**(2):508-521.

- Unsworth BR, Hayman GT, Carroll A and Lelkes PI (1999) Tissue-specific alternative mRNA splicing of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) during development by intron retention. *Int J Dev Neurosci* **17**(1):45-55.
- Voet D and Voetová J (1995) *Biochemie*. Victoria publishing, Praha.
- Wallace EF, Krantz MJ and Lovenberg W (1973) Dopamine-beta-hydroxylase: a tetrameric glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(8):2253-2255.
- Wei J, Ramchand CN and Hemmings GP (1997) Possible association of catecholamine turnover with the polymorphic (TCAT)<sub>n</sub> repeat in the first intron of the human tyrosine hydroxylase gene. *Life Sci* **61**(14):1341-1347.
- Weinshilboum RM, Schorott HG, Raymond FA, Weidman WH and Elveback LR (1975) Inheritance of very low serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet* **27**(5):573-585.
- Weinshilboum RM, Thoa NB, Johnson DG, Kopin IJ and Axelrod J (1971) Proportional release of norepinephrine and dopamine-β-hydroxylase from sympathetic nerves. *Science* **174**(16):1349-1351.
- Widimský Jj, Cífková R, Špinar J, Filipovský J, Grundmann M, Horký K, Linhart A, Monhart V, Rosolová H, Souček M, Vítovec J and Widimský Js (2008) Doporučení diagnostických a léčebných postupů u arteriální hypertenze - verze 2007. Doporučení České společnosti pro hypertenzi. *Vnitř Lék* **54**(1):101-118.
- Wong DL, Hayashi RJ and Ciaranello RD (1985) Regulation of biogenic amine methyltransferases by glucocorticoids via S-adenosylmethionine and its metabolizing enzymes, methionine adenosyltransferase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Brain Res* **330**(2):209-216.
- Wong DL, Lesage A, Siddall B and Funder JW (1992) Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in vivo. *FASEB J* **6**(14):3310-3315.
- Wong DL, Siddall B and Wang W (1995) Hormonal control of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase. Enzyme activity, the final critical pathway. *Neuropsychopharmacology* **13**(3):223-234.
- Wong DL, Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R and Kvetnansky R (2004) Genetic mechanisms for adrenergic control during stress. *Ann N Y Acad Sci* **1018**:387-397.
- Yamauchi T and Fujisawa H (1979) In vitro phosphorylation of bovine adrenal tyrosine hydroxylase by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **254**(2):503-507.
- Yang C, Kim HS, Seo H, Kim CH, Brunet JF and Kim KS (1998) Paired-like homeodomain proteins, Phox2a and Phox2b, are responsible for noradrenergic cell-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J Neurochem* **71**(5):1813-1826.
- Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM and Jose PA (2007) The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci (Lond)* **112**(12):583-597.
- Zhang K, Zhang L, Rao F, Brar B, Rodriguez-Flores JL, Taupenot L and O'Connor DT (2010) Human tyrosine hydroxylase natural genetic variation: delineation of functional transcriptional control motifs disrupted in the proximal promoter. *Circ Cardiovasc Genet* **3**(2):187-198.
- Zhang L, Rao F, Wessel J, Kennedy BP, Rana BK, Taupenot L, Lillie EO, Cockburn M, Schork NJ, Ziegler MG and O'Connor DT (2004) Functional allelic heterogeneity and pleiotropy of a repeat polymorphism in tyrosine hydroxylase: prediction of catecholamines and response to stress in twins. *Physiol Genomics* **19**(3):277-291.
- Zicha J and Kunes J (2003) Hypertenze, in *Patologická fyziologie srdce a cév* (Ošťádal B and Vízek M eds) pp 83-98, Karolinum, Praha.