

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A humán szívizom kontraktilitását befolyásoló celluláris és
molekuláris folyamatok tanulmányozása**

Dr. Molnár Andrea



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2010**

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés	3
2.1. A szívizom kontraktilitás alapjai	3
2.2. Szívelégtelenség.....	4
2.3. A szívizom kontraktilitás szabályozásának molekuláris mechanizmusai	14
3. Célkitűzések.....	20
4. Módszerek	21
4.1. Etikai vonatkozások	21
4.2. A miokardiális sejtek sérülésének markerei szívelégtelenségben	21
4.3. A protein kináz C (PKC) szerepe a humán miokardium kontraktilitásában	25
4.4. Statisztikai módszerek.....	35
5. Eredmények	36
5.1. Oxidatív károsodások kimutatása szívelégtelenségben.....	36
5.2. Az oxidatív hatások következményeinek vizsgálata.....	37
5.3. Protein kináz C szerepe a humán miokardiális kontraktilitásban	42
5.4. PKC izoenzimek expressziója humán szívizomsejtekben.....	48
5.5. Humán miokardiális fehérjék in vitro foszforilációja PKC-vel.....	48
5.6. PKC α intracelluláris target fehérjéinek kimutatása	49
5.7. Ca ²⁺ -függő cTnI és PKC α kölcsönhatás (kötődés)	51
5.8. PKC α és cTnI együttes előfordulásának (kolokalizáció) kimutatása humán kamrai izomzatban.....	52
6. Megbeszélés.....	53
7. Összefoglalás.....	62
8. Tudományos eredmények hasznosíthatósága.....	63
9. Irodalom.....	64
9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	64
9.2. Saját publikációk jegyzéke	82
10. Köszönetnyilvánítás	85
11. Bekötött publikációk	86

1. Rövidítések jegyzéke

AIF: apoptózis indukáló faktor

β -ARK: béta-adrenerg receptorkináz

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CARD: caspase activity recruitment domain

cTnI: cardiális troponin I

DNPH: dihidrofenilhidrozon

DISC: death initiation signal complex, sejthalált kiváltó jelátviteli komplex

ECL: felerősített kemilumineszcencia

F_o : Ca^{2+} -aktivált maximális erő

$F_{passzív}$: passzív erő

MDA: malondialdehyd

MHC: miozin nehéz lánc

NADH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid

NADPH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NO: nitrogén monoxid

NOS: nitrogén monoxid szintáz

NYHA: New York Heart Association

PAR: poli-(ADP-ribóz)

PARP-1: poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1

pCa: Ca^{2+} koncentráció 10-es alapú negatív logaritmusa

pCa₅₀: félmaximális erő létrejöttéhez szükséges pCa érték

PKA: protein kináz A

PKC: protein kináz C

PLC: foszfolipáz C

PMA: forbol-mirisztil-acetát

RACK: receptors for activated C-kinase

RCD: reactive carbonyl derivatives

RICK: receptors for inactivated C-kinase

ROS: reactive oxygen species

SEM: mintaközép hibája

SOD: szuperoxid-dizmutáz

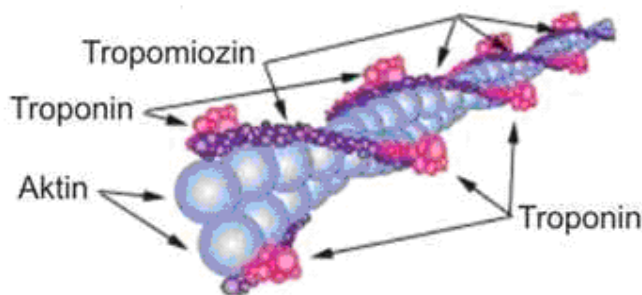
TNF: tumornekrózis faktor

2. Bevezetés

2.1. A szívizom kontraktilitás alapjai

A kontraktilis rendszer vékony és vastag filamentumokból, a vékony filamentumok regulatórikus rendszeréből és citoskeletális komponensekből épül fel. Mikroszkóp alatt kivehető, hogy a filamentumok a szívizomsejtekben egymáshoz viszonyítva meghatározott helyzetben találhatók (Huxley és Niedergerke, 1954). Működési egysége a szomszédos Z-vonalak között található szarkomer. A Z-vonalban helyezkednek el a horgonyzó fehérjék, ahol a citoskeletális filamentumok kapcsolódnak az aktin filamentumokhoz (Frank és munkatársai, 2006). A vastag filamentumok miozinból épülnek fel, amelyek képesek az ATP-ben tárolt kémiai energiát térszerkezeti átalakulásokon keresztül mechanikai munkává alakítani, és így az aktin filamentum mentén előrehaladó mozgást végezni. A miozin több alegységből felépülő fehérje, melynek N-terminálisán helyezkedik el a globularis feji régió, amely aktivitásához köthető az aktin és az ATP ciklikus kötése, a kapcsolódó α -helikális „nyak”, mely erőgenerálás során az emelőkar funkcióját látja el és a C-terminalis α -helikális „farok” amely a miozin dimerizációja során coiled-coil szerkezetet képezve lehetővé teszi a miozin filamentum kialakulását. Ezen kívül minden miozin fejhez két miozin könnyű lánc asszociálódik. A vékony filamentumokat az aktin és a regulatórikus fehérjék, a tropomiozin és a troponin komplex alkotják. Az aktin filamentumok kettős lánc G-aktinből polimerizálódik. A tropomiozin is kettős alfa-helix protein láncból épül fel, amelyek a vékony filamentum hosszában futnak. Az aktin szálak által alkotott hosszanti árokba simuló tropomiozin úgy helyezkedik el, hogy minden hetedik G-aktin egységenként ismétlődve található troponin komplexhez kapcsolódik (Ebashi és munkatársai, 1974) (1. ábra). Amikor az izom relaxált állapotban van, a tropomiozin molekula fedi az aktin molekulák miozinkötő helyeit, ezért ekkor a vékony miofilamentum nem tud kölcsönhatásba kerülni a vastag miofilamentummal. Az izom kontrakció kezdetén a tropomiozint a troponin elmozdítja a helyéről, és így lehetővé válik az aktin és a miozin kölcsönhatása. A troponin komplexet a troponin C (TnC), troponin T (TnT) és a troponin I (TnI) fehérjék 1:1:1 arányban alkotják. A TnT a tropomiozin kötő alegység, a TnI a komplex gátló alegysége, mely az aktinhez kapcsolódva helyben tartja a TnT-tropomiozin komplexet (Zot és Potter, 1987). A kalcium ionokat a TnC képes megkötni, ami által az aktin-miozin komplex kialakulását regulálja (Palmer és Kentish, 1994). A szívizom kontrakciója az intracelluláris fehérjékhez tartósan nem asszociált, úgynevezett „szabad” Ca^{2+} koncentráció változásainak függvénye, melyet a rövidülésre képes kontraktilis

fehérje rendszer alakít át erővé (Solaro és munkatársai, 1971; Zot és Potter, 1987). A kalcium ionokat a TnC képes megkötni, ami által az aktin-miozin komplex kialakulását regulálja (Palmer és Kentish, 1994). A szisztole alatt felszabaduló Ca^{2+} az extracelluláris térből és a szarkoplazmatikus retikulum (SR) raktáraiból származik. A troponin-kalcium komplex a troponin és tropomiozin helyzetváltozását eredményezi az aktin filamentumon, melynek következtében az aktin miozinkötőhelyei szabaddá válnak. A folyamat végeredményeképpen a vékony filamentumok elcsúsznak a vastag filamentumokon (sliding mechanizmus) és létrejön a kontrakció. A relaxáció során a Ca^{2+} a troponin C-ről disszociál, visszaáll a troponin C eredeti konformációja, és ismét blokkolódik az aktin felszínén a keresztkötések kialakításához szükséges felület (Sonnenblick, 1968).



1. ábra A vékony filamentumot az aktin, a tropomiozin és a troponin komplex alkotja

2.2. Szívelégtelenség

A szívelégtelenség világszerte jelentős, rohamosan növekvő társadalom-egészségügyi problémát jelent. A betegség a felnőtt lakosság 1-2 %-át érinti, az ötéves halálozási rátája meghaladja az 50 %-ot. A Framingham Study adatai alapján az éves incidencia az életkor előrehaladtával fokozatosan növekszik: 35-65 év között 3, míg 65-94 év között 10 megbetegedés fordul elő évente, 1000 lakosra vonatkoztatva (Palmer és Kentish, 1994). Az elmúlt évtizedek terápiás sikerei ellenére a szívelégtelenség mortalitása napjainkban is a közepes malignitású daganatos betegségek halálozásának felel meg.

A szívelégtelenség összetett tünetcsoport, ami a szív pumpatevékenységét gátló strukturális vagy működési rendellenességek hatására alakul ki. A szívelégtelenség felosztása történhet fellépésének időbeli jellegzetességei (akut, krónikus), a pumpafunkció károsodása

(szisztolés, diasztolés), a dominálón érintett szívfél, a perctérfogat, a tünetek súlyossága és az etiológia alapján.

A bal kamra megromlott szisztolés funkciójával járó forma a szisztolés szívelégtelenség, amely az esetek körülbelül 60-65%-ában mutatható ki. A krónikus szívelégtelenség másik, típusos megjelenési formája a diasztolés szívelégtelenség, amikor a szisztolés balkamra-funkció megtartott (az ejekciós frakció több mint 40%), a nem vagy alig tágult bal kamra, a koncentrikus hipertrófia és a diasztolés működési zavar kimutathatók (Zile és munkatársai, 2004). Ez a forma hipertóniás, illetve diabeteses betegek, elsősorban nők körében a leggyakoribb. A kórkép molekuláris háttere, hogy egy myofilamentális struktúrfehérje, a titin merevebbik, izoformájának az expressziója növekszik a rugalmasabb, izoforma rovására. Az is felmerült, hogy diasztolés szívelégtelenségben csökken a kontraktilis fehérjék foszforiláltsága (LeWinter, 2004). Mind etiológiáját, mind kezelését tekintve teljességgel külön formának tartjuk az akut szívelégtelenséget.

Számos betegség vezethet a szívizom összehúzódó erejének csökkenéséhez. A leggyakoribb kórok a szív saját vérellátásának útjában álló akadály, vagyis a koszorúerek szűkülete. Ebben a folyamatban nagy szerepet játszik a magas vérnyomás, cukorbetegség. Egy másik gyakori betegségecsoport, mely a szív munkáját megnöveli, a szívbillentyűk hibás működéséből adódik. Mérgezés, kardiotoxikus gyógyszerek, alkohol is előidézői lehetnek a szívizom károsodásának. Vírusfertőzések (pl. HIV fertőzés) is okozhatnak szívelégtelenséghez vezető szívizomgyulladást, de anyagcsere-betegségek (pl. kezeletlen pajzsmirigy-túlműködés, vérszegénység) is előidézhetik.

Mindenesetre, a szívelégtelenség patomechanizmusának hátterében számos tényező áll. Kialakulásában a szívizom kóros átépülése, a nem megfelelő szerkezetű kontraktilis fehérjék megjelenése, a kalcium felszabadító és -szekvesztráló folyamatok megváltozása, kalciumforgalommal szoros kapcsolatban álló protein kináz C megváltozott izoforma aránya, a kontraktilis rendszer kalcium érzékenységének és/vagy kalcium ionra adott válaszkészségének módosulása, a neurohumorális rendszer aktivációja, citokinek fokozott termelődése, az endothel kóros működése, az oxidatív és nitrozatív károsodások mellett a sejthalálnak is szerepe van (Édes, 2000, Douglas és Mann 1999).

Míg korábban a hemodinamikai koncepció volt uralkodó, napjainkra a hangsúly áttevődött a neurohormonális rendszer szerepére. A neurohormonok célszervek sejteinek felszínén található specifikus receptorokhoz kötődnek és ennek hatására intracelluláris jelátviteli utak aktiválódnak. Ezek egyrészt azonnali sejtválaszokat hoznak létre, másrészt

hosszabb távon sejtproliferációs, differenciálódási és apoptotikus folyamatokat szabályoznak, amelyeknek végső közös eredménye a megnövekedett fehérjeszintézis és a következményes, szövettanilag is kimutatható hipertrófia, amely a remodeling néven is ismert folyamatok egyik alapvető megjelenése.

A krónikus szívelégtelenség patofiziológiájában a szívizomsérülés okozta ellenregulációs mechanizmus legfontosabb vazokonstriktor elemei a fokozott szimpatikus idegrendszeri aktivitás, a renin-angiotenzin-aldoszteron-tengely fokozott tónusa. A tartós szimpatikus aktivitás azonban a szívizomsejtek károsodását idézi elő, a béta-1 receptorok down-regulálódnak, amely a szimpatikus ingerre adott válaszkészség, tehát a terhelhetőség csökkenésében nyilvánul meg. A keringésben felszaporodó angiotenzin-II az AT1 receptorokon keresztül hatva fokozza a vazokonstriktiót (afterload növekedés), fokozza az aldoszteron szekréciót, és ezen keresztül nátrium-retenciót, mely volumenexpanzióhoz vezet (preload növekedés). A miokardiumban lokálisan termelődő angiotenzin-II fokozza a miociták apoptózisát, hipertrófiáját, és az aldoszteronhoz hasonlóan intersticialis fibrózist indukál. A szívelégtelenségben egyéb neurohormonális rendszerek is részt vesznek. Ezek közül a vazokonstriktorok közé tartoznak az arginin-vazopresszin rendszer, az endotél termelte endothelin-1, a neuropeptid-y. Vazodilatátor hatású az atrialis natriureticus peptid, agyi típusú natriureticus peptid, az endotélből felszabaduló nitrogén-monoxid, a kallikrein-kinin rendszer és a citokinek. A szívelégtelenség progressziója során az egyensúly a két rendszer között megbomlik, és a vazokonstriktió válik dominánssá. A szívelégtelenség gyógyszeres kezelése ezen káros neuroendokrin aktiváció (maladaptáció) befolyásolására irányul (Mark, 1995).

A miofibrilláris fehérjék szívelégtelenség kapcsán kialakuló változásai régóta intenzív kutatás tárgyát képezik. Ismert, hogy előrehaladott szívelégtelenségben a kontraktilis apparátus miozin ATPáz aktivitása csökken. Kis állatokban (egér, patkány) a gyors (α) miozin nehéz lánc (MHC) izoenzim típus helyett fokozódik a lassú (β) MHC expressziója (Mercadier és munkatársai, 1981). Következményként a kontraktilis filamentumok működése ugyan gazdaságosabbá válik, ennek azonban az ára, hogy csökken a kontrakció sebessége (V_{max}). A kis emlősöknél leírt miozin izoenzim váltás (switch) humán szívizomban valószínűleg csak kisebb mértékben kap szerepet (az eleve meglévő β -MHC dominancia miatt). A miokardium ökonomikusabb „üzemmódra” való beállása azonban a humán szívre is jellemző. Valószínűsítik, hogy itt a főtáls troponin T és a pitvari miozin könnyű lánc balkamrai izomzatban történő expressziója is hozzájárulhat a fentebb leírt eltérésekhez (Anderson és

munkatársai, 1991). Mindezen eredmények mellett is elmondható ugyanakkor, hogy a humán krónikus szívelégtelenség során kialakuló miofibrilláris fehérje eltérések csak részben tekinthetők tisztázottnak.

Az oxidatív stressz elmélet (vagy szabad gyök teória) jelenleg az egyik legelfogadottabb magyarázat arra, hogy a szívelégtelenség hogyan vezet progresszív sejtkárosodáshoz a biokémiai mechanizmusok szintjén. Ezen elmélet szerint a kardiovaszkuláris funkció beszűkülése a miokardiumban és a koronária-érrendszerben fokozatosan felhalmozódó irreverzibilis oxidatív károsodások következményének tulajdonítható, melyeket reaktív oxigén- és nitrogéngyökök okoznak (Mariani és munkatársai, 2005).

2.2.1. Szabadgyökök termelődése

A szabadgyököknek alapvetően két csoportja van, az oxigén eredetű (ROS) és a nitrogén eredetű (RNI) szabadgyökök. Oxigén eredetűek a szuperoxid gyök (O_2^-), az aktív hidroxil gyök ($OH\bullet$), a hidroperoxil gyök (OH_2^-), a peroxil gyök (RO_2^-), az alkoxil gyök ($RO\bullet$), a szinglet oxigén (1O_2) és az ózon (O_3) (Cheeseman és Slater, 1993). A nitrogén eredetű szabadgyökök közé a nitrogén monoxid ($NO\bullet$), a nitrogén dioxid (NO_2^-), a peroxinitrit ($ONOO$) és az alkil peroxinitritek ($ROONO$) tartoznak (Gutteridge, 1995; Halliwell és Whiteman, 2004).

Mindezek mellett vannak olyan molekulák is, amelyek ugyan nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal, mégis reaktívak, képesek kapcsolatba lépni más molekulákkal, például a hidrogén peroxid (H_2O_2) és a hipoklórsav ($HOCl$) (Halliwell és Gutteridge, 1986).

Szabadgyökök keletkeznek fiziológias körülmények között is az emberi szervezetben a mitokondriális oxidatív metabolizmus, a mikroszomális drogmetabolizáló enzimrendszer, a prosztaglandin szintézis, a konstitutív és az indukálható NO-szintáz aktivitása, a monocita-macrophag rendszer képviselőinek oxigéntől függő élő mechanizmusai, a peroxisomális hidrogén-peroxid autooxidációja és a lipidperoxidáció során. Ennek megfelelően hypoxiában, hyperoxiában és normális oxigéntenzió mellett is keletkezhetnek reaktív oxigén szabad gyökök (Fridovich, 1986; Sies és Murphy, 1991).

Szigorúan szabályozott védekező mechanizmusok biztosítják azt, hogy ezek az élettani folyamatok bizonyos keretek között, a sejtstruktúrák károsodása nélkül menjenek végbe. Léteznek az oxigén szabad gyökök kóros felszaporodását megakadályozó

enzimrendszerek, így a szuperoxid-dizmutázok (SOD-ok), a kataláz, a peroxidáz, a glutation-S-transzferáz és a különféle reduktázok. Az enzimek tevékenységét kiegészítik az antioxidáns, scavengerkapacitással rendelkező vitaminok (C, A, E, K); a kofaktorok; a tiol-, foszfor-, amin-, poliamintartalmú vegyületek; a fenolok, kinolonok, az ubidekarenon; a flavonoidok, poliének; a glükóz, az urát, a bilirubin stb. (Beyer, 1990; Halliwell, 1987; Mortensen, 1993; Pryor, 1982; Slater, 1984). Ezenkívül számos nyomelem is (szelén, mangán, réz, cink) fontos szerepet tölt be a redox egyensúly fenntartásában (Bollag, 1983). Az albumin, a cöruoplazmin, a transzferrin és a tetramer SOD az extracelluláris tér védelmét biztosítja. Ezzel összhangban, szívelégtelenségben szenvedő betegekben összefüggést találtak a szívelégtelenség klinikai stádiumai és az antioxidánsok és oxidánsok szintje között: A NYHA (New York Heart Association) III stádiumban lévő betegekben szignifikánsan alacsonyabb A vitamin, E vitamin és lutein szinteket, míg magasabb malondialdehid értékeket mértek, mint a NYHA II. állapotban lévő betegekben (Polidori és munkatársai, 2002).

Ha a szabadgyökök mennyisége megnő (akár az elimináló folyamatok hatékonyságának csökkenése, akár a termelődés fokozódása miatt), akkor DNS, fehérje és lipid károsodások következhetnek be. A károsodott molekulák eltakarításában enzimatis hibajavító mechanizmusok szolgáltatnak védelmet. Így a károsodott DNS eliminálásában exonukleázok, endonukleázok vesznek részt, míg a károsodott fehérjéket proteázok, peptidázok bontják le. A módosított lipideket foszfolipázok, glutationperoxidáz, transzferázok, reduktázok alakítják át kevésbé toxikus formákká (Fridovich, 1986).

Amennyiben az élettani kontrollmechanizmusok alól kiszabadulnak és kórosan felszaporodnak a szabadgyökök, oxidatív stresszről beszélünk. A szabadgyökök főként a szabad funkciós csoporttal rendelkező peptideket, polipeptideket és fehérjéket támadják meg. Ennek következtében a molekulák kémiai szerkezete megváltozik, az enzimfunkcióval rendelkező fehérjék inaktívvá válnak, a kóros lipidperoxidációs folyamatok a sejtmembrán permeabilitásának megváltozásához vezetnek, a nukleinsavak károsodása pedig a DNS láncok törésén keresztül apoptózist vált ki (Beckman és munkatársai, 1990; Bors és munkatársai, 1990).

A szabadgyökök alapvetően befolyásolják a kardiovaszkuláris rendszer funkcióit, mind fiziológiás, mind kóros állapotokban. A nitrogén monoxid szabadgyök (NO) termelődésének felfedezése és kardiovaszkuláris szabályozó szerepének felismerése alapjaiban változtatta meg nézeteinket a vérkeringés szabályozásáról. A konstitutív NO szintázok (cNOS) által termelt NO főként fiziológiás szerepet játszik, biológiai életideje is viszonylag hosszú (másodpercekben mérhető), ezért ezt a molekulát a szervezet másodlagos

hírvivőnek, vagyis biológiai jelzések közvetítőjének használja fel a szív és érrendszerben, és az idegrendszer számos területén is. A NO biológiai szerepeinek felismerése az utóbbi évtized egyik legfontosabb felfedezése volt, amelyért 1998-ban három amerikai kutató Nobel-díjat kapott (Ignarro és munkatársai, 2002). Számos szív- és érrendszeri betegség patogenezisében a nitrogén monoxid egyes káros melléktermékei (pl. a peroxinitrit, amely a NO és a szuperoxid gyök reakciójából származik), fontos szerepet játszanak. A peroxinitrit több aminosav oxidatív módosítására képes, ami enzimek és ioncsatornák inaktiválódásához vezethet. A peroxinitrit által kiváltott nitrálódás tirozin és triptofán oldalláncokon történik. A reakcióban képződő nitrotirozint az *in vivo* termelődő peroxinitrit indikátorának tekintik (Szabo, 2003).

A szakirodalomban adatokkal rendelkezünk a peroxinitrit miofibrilláris mechanikát károsító hatásáról is. Szívizomsejt tenyészetekben megfigyelték a peroxinitrit kontraktilis funkciót csökkentő hatását (Ishida és munkatársai, 1996). Korábban laboratóriumunkban folyó humán izolált szívizomsejteken végzett kísérletekben peroxinitrit hatására a Ca^{2+} -aktivált erő csökkenését tapasztalták (Borbély és munkatársai, 2005). Ezen kísérletekben a Z-vonalakban elhelyezkedő fehérje, az α -actinin fokozott nitrotirozínilációját figyelték meg, mely ezáltal hozzájárulhat a kontraktilis funkció romlásához fokozott peroxinitrit termeléssel járó állapotokban. Igazolták, hogy a peroxinitrit-indukált szerkezeti és funkcionális változások a miokardiális fehérjékben létrejövő nitrotirozin oldalláncok mennyiségével összefüggést mutatnak. Peroxinitrittel vagy citokinekkal kezelt patkány dolgozó szív preparátumokon csökkent a szívizomzat ATP felhasználása, amely alapján a peroxinitrit kontraktilis funkcióra kifejtett közvetlen hatása feltételezhető. Kimutatták, hogy iszkémiás-reperfúziós károsodásban megemelkedik a NO szintje, mely mivel a peroxinitrit keletkezésének egyik fő meghatározója, a peroxinitrit mennyiségét is megnövelheti. Az eddigi kísérletes eredmények alapján megállapítható, hogy a peroxinitrit által kiváltott nitrotirozin-oldallánc képződés nem csak egyetlen célfehérje károsodását jelenti.

A fehérjék oxidatív módosulásait (a fentebb részletezett nitrálódással szemben) általában a H_2O_2 indítja el. A fehérjék oxidálódása számos hatással járhat:

1. A fehérjék fragmentációjához vezető oxidálódás.
2. Fehérje-fehérje keresztkötések kialakulása.
3. Az aminosav oldalláncok oxidációja.
4. Reaktív karbonil származékok (RCD) keletkezése.

A szabadgyökök támadásának a fehérjék minden aminosav maradéka ki van téve. A fehérjék oxidatív módosulása fémionok által katalizált folyamat. Az aminosavak közül az

arginin, lizin, prolin, aszparagin és glutamin oxidatív módosulása eredményezi a RCD kialakulását, amit kísérletesen dihidrofenilhidrazonnal (DNPH) lehet kimutatni (Nakamura és Goto, 1996). Habár a karboniláció elkerülhetetlen fiziológias következmény az aerob szervezetekben, gyakran használt markere a szabad gyökök okozta fehérjekárosodásoknak is.

A kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának hátterében gyakran áll ateroszklerózis és a hipertenzió. Ezekben a kórfolyamatokban fontos szerepe van a szabadgyököknek, mint ahogy a szív- és érrendszeri betegségek rizikófaktora (diabetes, elhízás, dohányzás) is fokozott szabadgyök képződéssel járnak. Számos tanulmány foglalkozik a kardiovaszkuláris betegségek és az oxidatív stressz kapcsolatával, például érrelmeszesedésben (Harrison és munkatársai, 2003), akut és krónikus koszorúér szindrómákban (Valgimigli és munkatársai, 2003), hipertenzióban (Taniyama és Griendling, 2003), szívelégtelenségben (Berry és Hare, 2004; Ferrari és munkatársai, 2004), diabetes szívszövődményeiben (Pennathur és Heinecke, 2004), érkárosodásban és krónikus veseelégtelenségben (Himmelfarb és munkatársai, 2002).

Bizonyították a szívizomsejteket érő oxidatív stressz kontraktilis funkcióra kifejtett káros hatását is, és vizsgálták ennek szerteágazó molekuláris hátterét (Dhalla és munkatársai, 2000; Singal és munkatársai, 1998). Így például a szívizomsejtekben H_2O_2 hozzáadása után csökkent alfa-aktin, troponin I, miozin könnyű lánc 2, és kreatin kináz M izoformáját kódoló mRNS szint figyelhető meg (Waring és munkatársai, 2001). Számos szarkoplazmatikus retikulum fehérje képződése is zavart szenved H_2O_2 jelenlétében, valamint több csatorna és receptor is károsul, így például a Ca^{2+} -csatornák, ryanodin-receptorok, valamint a Ca^{2+} -pumpa ATP-áz (Dhalla és munkatársai, 2000).

2.2.2. Sejthalál: nekrozis - apoptózis

A sejthalált morfológiai jellemzői szerint alapvetően két csoportba szokás sorolni: az apoptózis során a sejt jellemzően zsugorodik, citoplazma kitüremkedések jelennek meg, a kromatin kondenzálódik, fragmentálódik, de a sejttartalom membránokkal történő határoltsága nem sérül. Ezzel szemben nekrozis során a sejt duzzad és a lipid-membránok sérülése folytán a sejttartalom egy része kiszabadul a sejtek közötti térbe. Az apoptotikus sejt maradványait a makrofágok vagy parenchymasejtek bekebelezik, lebontják, anélkül, hogy a sejtalkotórészek a környezetbe kerülnének. Ezért a nekrotikus sejtekkel ellentétben az apoptózis nem vált ki gyulladást, bár a fagocitáló sejteket aktiválhatja, és így az immunrendszert stimulálhatja. Feltételezések szerint az apoptózis és a nekrozis bekövetkeztét

az határozza meg, hogy a sejtben a sejtpusztulás programjához elegendő ATP áll-e rendelkezésre. Ha igen, akkor apoptózis következik be; a sejtmembrán és a sejtorganelumok egy ideig még működőképeseek, míg ha nem áll elegendő ATP rendelkezésre, akkor a sejtek nekrozissal halnak el. Fontos azonban szem előtt tartani azt is, hogy a két sejthalálforma nem különíthető el teljesen egymástól, hanem valójában egy folyamat két végpontjának tekinthetjük azokat.

Az apoptózis alapvető molekuláris mechanizmusa viszonylag jól ismert. Apoptózis során általában aktiválódnak a kaspázoknak nevezett proteáz család tagjai, amelyek célfehérjéik hasításával beindítják a sejt morfológiai átalakulását (Nicholson és Thornberry, 1997; Palmer és Kentish, 1994; Stennicke és Salvesen, 1999). A kaspázok aktiválódási körülményei alapján két alapvető útvonalat lehet megkülönböztetni: a külső jelút során, plazmamembrán receptorokon (halálreceptor) keresztül történik a kaspáz aktiválódás; míg a belső jelút során egy citoplazmatikus fehérjekomplex, az úgynevezett apoptoszóma kialakulása segíti elő a kaspáz aktiválódást. A belső jelút legfontosabb szabályozó elemei a mitokondriummal állnak szoros kapcsolatban (Dorn, 2008).

2.2.2.1. Halálreceptor út

A halálreceptorok az evolúció legmagasabb szintjén jelennek meg. A halálligandok olyan citokinek amelyek specifikus receptorokkal összekapcsolódva elindítják az apoptózishoz vezető jelátviteli utat. A halálreceptorok és a halálligandok fontos szerepet játszanak a szöveti homeosztázis fenntartásában. A halálreceptorok transzmembrán receptorok, melyek a TNF-receptor családba tartoznak. A fehérjecsalád elsőként felfedezett tagja a tumornekrozis faktor (TNF). Legtöbbjükben található egy homológ citoplazmatikus fehérjerész (haláldomén), ezen keresztül közvetítik az apoptotikus jelet a sejt belseje felé (Gruss és Dower, 1995). A halálreceptor-halálligand kötődést követően kialakuló sejthalált kiváltó jelátviteli komplex (DISC) hatására aktiválódhatnak az iniciátor kaspázok (kaspáz-2, -8, -10), melyek továbbíthatják az apoptotikus jelet az effektor kaspázok felé (Dorn, 2008).

2.2.2.2. Kaspázok

A kaspázok legfontosabb tulajdonságaikat nevükben rejtik, az enzimes család tagjai ugyanis kivétel nélkül P1 aszpartát specifikus cisztein proteázok (Caspase = cystein-

dependent **aspartate-specific protease**) (Palmer és Kentish, 1994; Stennicke és Salvesen, 1999). Az eddig azonosított 14 emlős kaszpáz szerepe sokféle, részt vesznek az apoptózisban iniciátorként és effektorként egyaránt, valamint a gyulladási folyamatokban. Szekvenciaelemzésekből és biokémiai tesztek alapján a kaszpázokat két nagy családba sorolják:

- 1.) gyulladási folyamatokban szerepet játszó (kaspáz-1, -4, -5, -11, -13) és
- 2.) apoptotikus folyamatokban szereplők (kaspáz-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10, -12).

A kaszpázok aminosav szerkezete hasonló (Nicholson és Thornberry, 1997). A haláldoménnel, illetve a kaszpáz aktiváló doménnel (CARD) rendelkező szabályozó fehérjék segítik az aktiválódásukat. A kaszpáz enzimeknek eltérő a hasítási szekvenciája, ezzel magyarázható, hogy a sejt legkülönbözőbb fehérjéit képesek hasítani, hozzájárulva így a sejtalkotók lebomlásához, a sejt apoptotikus testekre való széteséséhez. A szubsztrátok között találunk DNS lebomlás gátlót (ICAD) (Enari és munkatársai, 1998), a Bcl-2 család antiapoptotikus tagjait (Cheng és munkatársai, 1997), szerkezeti fehérjéket (laminok, gelsolin) (Kothakota és munkatársai, 1997) és kinázokat (FAK, PAK2, DNS-PK). Ez mind hozzájárul a sejtalkotók degradálásához és a sejt apoptotikus testekre való széteséséhez. A kaszpázok működésének szabályozása más proteolitikus rendszerekéhez hasonlóan meglehetősen komplex, tartalmaz szabályozó proteázokat, kofaktorokat, visszajelzéseket, küszöbértékeket. Összességében mindenesetre elmondható, hogy a kaszpázok proenzim formában termelődnek és aktiválásukhoz proteolitikus hasítás szükséges, továbbá, hogy a működésüket gátlófehérjék függeszthetik (Richter és Duckett, 2000) fel.

2.2.2.3. Az apoptózis mitokondriális útja

A mitokondrium, mint energiatermelő központ, nélkülözhetetlen szerepet játszik az eukarióta sejtek életében, de a halálában is fontos szerephez juthat. Egyesek szerint a mitokondrium a sejt Pandora-szelencéje (Brenner és Kroemer, 2000), mivel olyan fehérjéket tartalmaz, melyek a citoplazmába kerülve elindítói, sokszor elengedhetetlen résztvevői lehetnek az apoptotikus folyamatnak. Ezek között a fehérjék között található például a prokaspázok, az apoptózis indukáló faktor (AIF), az adenilát-cikláz 2, vagy például a légzési láncban is résztvevő citokrom-c (amely kaszpáz aktivátor is egyben), a Smac/Diablo (nemrég felfedezett kaszpáz koaktivátor) és néhány hősokk fehérje (Hsp10, Hsp60). E fehérjék a citoplazmába kerülését pedig más, például a Bcl-2 családba tartozó mitokondriális fehérjék szabályozhatják, serkenthetik vagy gátolhatják. A mitokondriális membrán

permeabilitásának fokozódása szükséges az apoptózist kiváltó fehérjék kiszabadulásához, és ettől függ, hogy a programozott sejthalál mitokondriális útja elindul-e vagy sem. Ezekben a folyamatokban a proapoptotikus jelek a mitokondriumban összegződnek, az energiakrízisnek megfelelő változások indulnak meg, melyek a sejtlégzés sebességének változásától az energiatermelés csökkenésén át egészen a mitokondrium pusztulásáig terjedhetnek (Kirshenbaum, 1998). Az utóbbi években megismert mitokondriális apoptózis szignál során a citokróm c és az apoptózis indukáló faktor (AIF) kiszabadul a két membrán közti térből, ami úgy lehetséges, hogy a mitokondriális transzmembrán potenciál összeomlik és az úgynevezett mitokondriális transition pore complex megnyílik (Crompton, 1999). A mitokondriumból kikerülő citokróm-c, a citoplazmában az apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1-gyel (APAF-1), valamint a dATP-vel vagy az ATP-vel és a prokaspáz-9-cel együtt alkotja az apoptoszómát. Ennek az enzimkomplexnek a feladata a prokaspáz-9 aktiválása és ezen keresztül a kaspáz kaszkád elindítása.

2.2.2.4. PARP-1

Egy másik fontos, oxidánsok által kiváltott, sejtkárosodáshoz vezető folyamat a sejtmagban elhelyezkedő, poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) aktivációjával kapcsolatos. A PARP-1 a DNS kötő enzimek családjának tagja, a sejtmagban és a mitokondriumban helyezkedik el számos sejt típusban, így a szívizomsejtekben is. Az aktivált PARP-1 a NAD^+ -ot hasítja, nikotinamid és ADP-ribóz jön létre. Az enzim ADP-ribóz alegységeket polimerizál a sejtmagban lévő fehérjékre, hisztonokra és a PARP-1 enzimre magára. A PARP-1 enzim aktivációját a szabadgyökök és oxidánsok kiváltotta DNS károsodás váltja ki. Toxikus anyagok, genotoxikus, vagy citotoxikus drogok, az ionizáló sugárzás, valamint nitrogén-monoxid és szuperoxid anion keletkezésével járó folyamatok a kiváltói a DNS szál törésnek (Szabo, 2003). A DNS-károsodás súlyosságától függően különböző intracelluláris reakcióutakat indít be. Enyhe fokú DNS-sérülés esetében a PARP-1 DNS-repair enzimként működve a keletkezett sérülés kijavítását, a genom integritását, a sejt túlélését segíti elő. Súlyos DNS-károsodás viszont nagymértékű PARP-1 aktivációt vált ki, amely egy óriási energiaigényű metabolikus ciklust indít be a sejtben. A folyamat rövid idő alatt kimeríti a sejt teljes NAD^+ - és ATP-készletét, lelassítja a glikolízis folyamatát és a mitokondriális légzést, végül a sejt funkciózavarához, majd elhalásához vezet.

A PARP-1 enzim túlzott aktivációját leírták többek között szívizom infarktus (Thiemermann és munkatársai, 1997), iszkémia-reperfúzió (Szabo és Bahrle, 2005),

szívelégtelenség (de Boer és munkatársai, 2000) és szívtranszplantáció (Szabo és munkatársai, 2002b) eseteiben. Korábbi tanulmányokban bizonyítást nyert, hogy a cukorbeteg állatok és emberek szívizomszövetében és érfalában a poli(ADP-ribozil)ált fehérjék mennyisége emelkedett, valamint károsodott a pumpafunkció (Pacher és munkatársai, 2002b). Állatkísérletekben a PARP enzim specifikus gátlószereivel csökkenteni lehetett a károsodás során elhalt szívizomterület nagyságát, a szövetkárosodás mértékét (Pacher és munkatársai, 2002b; Szabo és munkatársai, 2004b).

Újabb tanulmányok kimutatták, hogy a PARP-1 képes aktiválni a DNS-fragmentáció bizonyos effektorait is. Ezen eredmények szerint szívizom sejtekben és érfali sejtekben a PARP-1 irányítja az apoptózis-indukáló faktor (AIF) mitokondriumból sejtmagba történő transzlokációját (Xiao és munkatársai, 2005). Az oxidoreduktáz aktivitással rendelkező AIF hatására mitokondrium membrán depolarizáció, citokróm-c-kiszabadulás, a sejtmagban a kromatin kondenzációja, valamint a plazmamembrán foszfatidilszerinjeinek a külső liprétegbe vándorlása tapasztalható. E folyamat élettani jelentősége abban rejlik, hogy a kijavíthatatlan DNS-károsodást elszenvedett sejtek ezzel a mechanizmussal biztonságosan eliminálódhatnak. Fontos megjegyezni, hogy az AIF kaszpáz- és Bcl-2-függetlenül vált ki apoptózist.

2.3. A szívizom kontraktilitás szabályozásának molekuláris mechanizmusai

2.3.1. Frank-Starling mechanizmus

1895-ben, illetve 1915-ben írták le Frank és Starling az úgynevezett „szívtörvényt” (Zimmer, 2002), melynek lényege, hogy a fokozott igényekhez (növekvő vénás visszaáramlás) a bal kamra a végdiasztolés térfogat növekedésével válaszol, ami a megnövekedett nyugalmi rost hosszúság miatt erőteljesebb kontrakciókat (nagyobb verőtérfogatot) eredményez. Ez végeredményben növeli a perctérfogatot és így a szív mintegy alkalmazkodik a megnövekedett igényekhez. Ugyanakkor a bal kamra alkalmazkodóképessége korlátozott, mivel a nyugalmi rost hosszúság növekedése csak egy optimális pontig (2,2 μm -es szarkomerhossz) biztosítja a kontrakciós erő növekedését. Ezen érték felett a bal kamra tágulata mintegy “passzív” folyamattá válik és inkább káros a szívizom adaptációja szempontjából. A Frank–Starling mechanizmus szabályozásában

kitüntetett szerepet kap a vastag filamentumokat a szarkomer Z-lemezéhez rögzítő titin, mely fontos szerepet játszik a szarkomer szerkezeti integritásának fenntartásában és a relaxált izom megnyújtásakor kifejlődő passzív erő szabályozásában. Emellett az aktin és miozin alkototta filamentumok közti oldalirányú tér („lateral spacing”) nyújtás hatására bekövetkező csökkenését is feltételezik a jelenség hátterében. Ezen mechanizmusok szabályozzák az aktin és miozin közti átfedő terület nagyságát, ezáltal a kereszthidak számát, valamint fokozzák a troponin C kalciumérzékenységet, következményesen a kontrakciós erőt. A szarkomeren belül hosszfüggést biztosító fehérjerendszer működése ma még nem kellően ismert.

2.3.2. Béta adrenerg szabályozás

A β - és α -adrenerg rendszer működése között lényeges eltérések tapasztalhatók. Az $\alpha 1$ -adrenoreceptorok ingerülete simaizom-kontrakciót, illetve vazokonstriktiót vált ki, a szívizomban pedig enyhe pozitív inotrop hatást fejt ki, sejtnövekedést és hipertrófiát eredményez. A $\beta 2$ -receptorok által mediált adrenerg válasz eredményeként simaizomrelaxáció, illetve vazodilatáció jön létre.

A $\beta 1$ -adrenerg receptorok ingerülete a szívizomban pozitív inotrop és chronotrop hatást, sejtnövekedést, hipertrófiát, a vesék juxtaglomerularis apparátusából pedig reninfelszabadulást vált ki. A $\beta 2$ -receptor sűrűsége a normál kamraizomzatban körülbelül harmada a béta-1 receptor mennyiségének. A $\beta 2$ -receptorrendszer miokardiális hatása és szabályozása hasonló a $\beta 1$ receptorokhoz. Ugyanakkor a normál miokardiumban, egyszerűen a $\beta 2$ -receptorok alacsonyabb sűrűsége miatt szerepük kevésbé lényeges a kontraktilitás növelése szempontjából. Ugyanez a helyzet az $\alpha 1$ -adrenerg receptorokkal, amelyek kontraktilitást növelő szerepe a normál humán miokardiumban alig mérhető.

A szív sejtjeinek sejt felszíni adrenerg receptorai a G-fehérjéken keresztül szabályozzák a szívritmust, a szívizom kontraktilitását és a szívizomsejtek méretét. Az $\alpha 1$ adrenerg receptor G_q , míg a β adrenerg receptorok a G_s GTP-kötő fehérjét képesek aktiválni, valamint a $\beta 2$ -adrenerg receptor a G_i fehérjével is kapcsol. A G_s az adenil-cikláz aktiválásán keresztül, a cAMP-termelést fokozva, a cAMP-függő protein kinázt (PKA) stimulálja, és ezáltal éri el célmolekuláit (Schaub és munkatársai, 2006). A G_q -fehérje esetében a kaszkád első lépése a foszfolipáz C (PLC) aktiválása, majd az inozitol-triszfoszfát és a diacil-glicerol mint másodlagos hírvivők termelése, végül a protein kináz C (PKC) aktiválása történik. Ezek a másodlagos hírvivők aktiválják a sejt mag transzkripciós faktorait, melyek végső soron a

szív adaptációs válaszában következtében szívizomhipertrofia, fibrózis, főtális gének expressziója által nyilvánulnak meg (Anversa és munkatársai, 1992; Liew és Dzau, 2004). A kinázok katalitikus alegysége számos fehérjét foszforilál. A szívizom-hipertrofia szempontjából mindegyik említett receptor gátlása előnyös hatású, kísérletesen és klinikailag egyaránt. A hipertrofiához vezető végső közös utat mindkét esetben a mitogén aktiválta proteinkinázok (MAPK) hatása alkotja. A hipertrofiás válasz lényege, hogy a miocita mérete megnő, a szarkomer reorganizálódik, és főtális gének expresszálódnak (Dorn és Force, 2005).

A szimpatikus aktivációnak patogenetikai és progressziót előidéző szerepe van szinte valamennyi kardiovaszkuláris kórképben, így a krónikus szívelégtelenségben is. A magas katekolamin szint egyúttal a β 1-receptorok deszenzibilizálódását, a receptorszám (sűrűség) csökkenését eredményezi (Fowler és munkatársai, 1986). Az α 1-receptorok abszolút sűrűsége, hasonlóan a β 2-receptorokhoz nem csökken a szívelégtelenség kialakulásával. Szívelégtelenségben tehát a szívizom legfontosabb inotrop szabályozó mechanizmusa (β 1-receptorok) válik elégtelenné és a kontraktilitás szabályozását részben egyéb, kevésbé hatékony rendszerek veszik át (β 2- és α 1-receptorok). Ennek a patológiás folyamatnak a magyarázatára több elmélet szolgál, amelyek közül a legfontosabb a receptorfehérje foszforilációja a β -adrenerg receptorkináz (β -ARK) által. A foszforiláció szétkapcsolja a receptorfehérjét a G-proteinektől és az adenil-cikláztól, ami miatt a rendszer funkcionálisan inaktiválódik (Ungerer és munkatársai, 1993). Végül endocitózis segítségével a receptorstruktúra eltűnik a membrán felszínéről. A működőképes kalciumcsatornák megnövekedett száma okozta fokozott aktivitás hatására transzgénikus állatmodellekben a β -receptorok deszenzitivációja alakul ki, változatlan receptorszám mellett (Muth és munkatársai, 1999). Ez a jelenség egy kalciumfüggő β -receptor-inaktiválási folyamatra utal. Párhuzamosan ezzel együtt csökken a stimulálás során keletkező cAMP mennyisége, illetve kórosan emelkedik a gátló jellegű G-protein szintje, ami befolyásolhatja a receptorok funkcióját (Dorn és Force, 2005). Ennek a túlaktivált neuroendokrin rendszernek a gátlásán alapul a szívelégtelenség terápiája.

2.3.3. Protein kináz C - függő szabályozás

A protein kináz C izoenzimcsalád a szerin/treonin kinázok egyik képviselője. A mai napig legalább 11 különböző PKC izoenzimet azonosítottak, melyeket szerkezeti jellegzetességeik, valamint aktivációs mechanizmusaik alapján négy nagyobb csoportba

sorolhatunk. A „klasszikus” csoportba (cPKC) 4 izoenzim tartozik: a PKC α , β I, β II és γ . Ezen izoenzimek közös jellemzője, hogy kalcium- és diacil-glicerol- (DAG), illetve annak exogen megfelelőjeként működő forbolészter-dependensek, vagyis aktiválásukhoz ezen anyagokat kofaktorként igénylik. A második csoportba a nem kalcium függő PKC δ , ϵ , η , θ izoenzimek tartoznak, melyeket szokás „novel” PKC-nek is (nPKC) nevezni. Közös jellemzőjük, hogy forbol-észter jelenlétében, kalcium nélkül is maximálisan aktiválhatóak. Harmadik csoportba az „atípusos” (aPKC) izoenzimek sorolhatók, melyek közé a PKC ζ és λ 1 izoenzimek tartoznak, melyek aktiválásukhoz sem kalciumot, sem forbol-észtert nem igényelnek. Végezetül külön csoportba sorolható a PKC μ , mely mind aktivációját mind szerkezetét tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.

A PKC aktivitásának egy fontos szabályozója *in vivo* az enzim és szubsztrátjainak sejten belüli eloszlása. Immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy a különböző izoenzimek eltérő sejten belüli kompartmentekben találhatóak. Számos olyan fehérjét azonosítottak, amelyek kötődnek a PKC-hez, s ezen kötőfehérjék közül több az enzim szubsztrátja is lehet. Ahhoz, hogy a PKC a másodlagos hírvivők koncentrációjának változására hatékony választ adjon és szubsztrátjaihoz könnyen hozzáférjen, megfelelő sejten belüli lokalizáció szükséges. A PKC szabályozó doménjéhez kötődő fehérjék egyik fontos csoportját a RACK (Receptors for Activated C-Kinase) fehérjék alkotják (Mochly-Rosen, 1995; Mochly-Rosen és Gordon, 1998). Ezek az enzim aktív konformációját stabilizálják, csak az aktivált PKC enzimhez kötődnek, de maguk nem szubsztrátjai az enzimnek.

Az emberi szervezetnek nincs olyan sejtípusa amely ne rendelkezne valamely PKC izoformával. Fontos tény ugyanakkor, hogy nem mindegyik izoenzim található meg minden sejtípustban, azaz a PKC izoenzimek a szervezetben az adott speciesre, szövetre, sejtre jellemző megoszlást és mintázatot hoznak létre. Ebből fakadóan a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok széles skáláját képesek befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak a sejtek proliferációjának és differenciációjának szabályozásában, az apoptózis folyamatában, a szervezet védekező mechanizmusaiban, mediátorok szintézisében, miofibrilláris kontraktilitás szabályozásában. A humán szívizomban 6 izoforma azonosítható, PKC α , β I/ β II, δ , ϵ , η , és λ 1 (Sodha és munkatársai, 2008). Krónikus szívelégtelenség kapcsán ismert a kalcium függő izoformák, PKC α , β I és β II szelektív upregulációja (Bowling és munkatársai, 1999; Wang és munkatársai, 2003).

Az utóbbi időben egyre több bizonyíték szól amellet, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is különbözhet egymástól. Bebizonyosodott emellet az is, hogy egy adott

sejtválasz kialakításában a különböző izoenzimek nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk sokszor ellentétesnek adódhat. Ezen megállapítás egyik kiváló példája, hogy *in vivo* és *in vitro* iszkémia indukált szívizom károsodás során izolált szívizomsejtekből, perfundált szívben és transzgénikus egér modellben egyaránt ellentétes a PKC δ és PKC ϵ hatása. A PKC δ aktiváció a szívizom károsodás mértékét fokozza, ugyanakkor a PKC ϵ a kardioprotekció kialakulásáért felelős. Ezen túlmenően, kísérletes eredmények és a klinikai megfigyelések szerint a hipertrófiás program fenntartásáért PKC δ és ϵ mediálta mechanizmusok egyaránt felelősek (Chen és munkatársai, 2001). Ezen hatások hátterében minden valószínűség szerint a különböző PKC izoenzimek egyedi szerepe és eltérő sejten belüli lokalizációja (targeting) áll.

A krónikus szívelégtelenség területén folytatott korábbi vizsgálatok számos sejtszintű szignalizációs útvonal érintettségét igazolták. A hipertrófiás transzformáció szempontjából kitüntetett jelentőségűnek tűnnek azok a kapcsolatok, melyek a szarkolemma angiotenzin II, endotelin és katekolaminok G-fehérje-kapcsolt receptorain keresztül az intracelluláris foszfolipáz C és PKC izoenzimek aktiválásán át közvetítenek szignálokat. Nem világos azonban, hogy az aktivált PKC rendszer milyen szerepet játszik a kontraktilis fehérjerendszer foszforilációjában, és az hogyan hat az elégtelen funkciójú miokardium kontraktilis mechanikájára. Annak ellenére, hogy számos PKC izoenzim expresszálódik például patkány szívizomban, kalcium kezelés hatására csak PKC α transzlokációja figyelhető meg a citoszólból a kontraktilis rendszerhez, mely feltételezi a PKC α kiemelkedő szerepét a kalcium-dependens miofibrilláris-kontraktilitás szabályozásában. A miofibrilláris rendszer Ca-érzékenységre vonatkozó adatok is ellentmondásosak, változatlan (Noland és munkatársai, 1995), csökkent (Burkart és munkatársai, 2003; Sakthivel és munkatársai, 2005) és/vagy növekedett (Pi és munkatársai, 2003) Ca-érzékenységről számolnak be szívelégtelenségben.

Nincs összhang abban sem, hogy az intracelluláris foszforilációs folyamatok mely strukturális fehérjéket érintik, ezek milyen módon viszonyulnak a megváltozott miofibrilláris funkcióhoz. *In vitro* kísérletekben bebizonyosodott, hogy a troponin I (TnI), a troponinT (TnT), a miozin könnyűlánc-2 (MLC-2) és kardiális miozin-kötő C fehérje (cMyBP-C) egyaránt szubsztrátjai a PKC-nek (Noland és munkatársai, 1989; Noland, Jr. és munkatársai, 1996; Noland, Jr. és Kuo, 1993). Továbbá, a speciális TnI foszforilációs helyein kívül (Ser 43/45, Thr144) a PKC képes a PKA Ser 23/24 pozícióban levő foszforilációs helyét is foszforilálni (Noland és munkatársai, 1995; Noland, Jr. és munkatársai, 1996). A molekula PKC-mediált foszforilációja rágcsálókban csökkenti a miozin ATPáz aktivitását és a

maximális erőt. Egerekben megfigyelték PKC ϵ aktivációját szívelégtelenségben valamint szívizom hipertrófiában, PKC α -dependens TnI foszforilációt és a foszforilált TnI molekula transzlokációját a kontraktilis rendszerhez (Rybin és Steinberg, 1994).

3. Célkitűzések

Munkánk során az alábbi két témakör köré csoportosítottuk kérdéseinket:

1. A protein kináz C szerepe a humán miokardium kontraktilitásában

Az iszkémia/reperfúziót követő kontraktilis változásokban milyen szereppel bírnak a PKC izoenzimek?

2. A miokardiális sejtek sérülésének markerei szívelégtelenségben

Szívelégtelenségben megfigyelhető-e reaktív oxigén vagy nitrogén gyökök megjelenése?

Amennyiben igen, ezek aktiválják-e az apoptózis mitokondriális kaszpáz függő vagy kaszpáz független útvonalát?

4. Módszerek

4.1. Etikai vonatkozások

Humán szívizom minták feldolgozása a World Medical Assosiation által kiadott Helsinki Deklarációnak megfelelően történt. A kísérletek végrehajtását a Magyar Egészségügyi Minisztérium (No. 323- 8/2005-1018EKU) és a Debreceni Egyetem Tudományos Tanács Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (No. DEOEC RKEB/IKEB 2553-2006) is jóváhagyta.

4.2. A miokardiális sejtek sérülésének markerei szívelégtelenségben

4.2.1. Szívizom biopsziák

A kísérletek során felhasznált humán bal kamrai szívizom minták egyrészt dilatatív kardiomiopátiában szenvedő, Battista műtéten átesett betegekből (NYHA IV), másrészt 18 és 56 év közötti, férfi és női agyhalál állapotában levő szervdonorokból származtak (1. táblázat). A halál oka baleset vagy szubarachnoidális vérzés miatt bekövetkező cerebrális kontúzió és vérzés volt. A szív pulmonális és aorta billentyű-homograft készítése céljából lett eltávolítva. A graftok készítéséhez fel nem használt bal kamrai miokardiumot kapta meg laboratóriumunk. A donorok kardiális megbetegedésben nem szenvedtek, és egyedül rövid idejű dobutamin és diuretikum kezelésben részesültek. A mintákat kardioplégiás oldatban (110 mM NaCl, 16 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 1,2 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃; pH 7,4) szállították 4 °C-on, majd cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk, és felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

Esetszám	Státusz	Diagnózis	Kor	Nem	Gyógyszeres terápia
1	NYHA IV	ISZB	40	♀	diuretikum, ASA, Dob., Dop., III. osztályú antiaritmiás szer, Na- heparin,
2	NYHA IV	HCM	49	♂	ACEI, BB, OAC
3	NYHA IV	DCM	54	♂	digoxin, ACEI, BB, diuretikum
4	NYHA IV	ISZB	49	♀	ACEI, CCB, OAC, BB, diuretikum
5	NYHA IV	DCM	50	♂	ACEI, OAC, BB, diuretikum, III. osztályú antiaritmiás szer
6	NYHA IV	ISZB	48	♀	ACEI, BB, nitrát, diuretikum
7	NYHA IV	DCM	49	♂	digoxin, OAC, diuretikum
8	NYHA IV	DCM	49	♂	OAC, diuretikum
1	Donor	RIND	46	♂	diuretikum, dobutamin, dopamin
2	Donor	apoplexia cerebri	56	♂	dobutamin, dopamin
3	Donor	SAV	18	♀	dobutamin, dopamin
4	Donor	SAV	37	♀	nincs adat
5	Donor	apoplexia cerebri	39	♀	dobutamin, dopamin

1. táblázat. A vizsgálatba bevont egyének adatai.

NYHA: New York Heart Association stádiumok; ISZB: iszkémiás szívbetegség; DCM: dilatatív kardiomiopátia; HCM: hipertrófiás kardiomiopátia; RIND: reverzibilis iszkémiás neurológiai defektus; SAV: szubarachnoidális vérzés; ACEI: angiotenzin konvertáz enzimgátló; CCB: kalcium csatorna-blokkoló; BB: béta-blokkoló; OAC: orális antikoaguláns; ASA: acetil-szalicilsav

4.2.2. Szívizom homogenizátum

A szívizom mintákat -80 °C-ról kivéve relaxáló oldatban olvasztottuk fel (1 mM szabad Mg^{2+} , 145 mM KCl, 2 mM EGTA, 4 mM ATP, 10 mM imidazol; pH 7,0). A mintákból a kontraktilitás mérésekhez szükséges szívizomsejteket mechanikusan izoláltuk. A kardiomiocitákat tartalmazó szuszpenziót 5 percig 0,5%-os triton-X-100-zal (relaxáló oldatban) kezeltük. A triton kezelés eredményeként a sejtek membránrendszerei átjárhatóvá váltak, vagyis „kémiaailag nyúzott” szívizomsejteket nyertünk, és így lehetőség nyílt a miofibrilláris funkciók kontrollált intracelluláris körülmények között történő vizsgálatára. A preparátumokat ezt követően 3-szor mostuk és centrifugáltuk egy percig 1000 rpm-en a triton-X-100 eltávolítása céljából. Az így nyert izolált, permeabilizált kardiomiocitákat szilikon ragasztóval egy érzékeny erőmérőhöz és egy piezoelektromos motorhoz rögzítettük. Továbbá a biokémiai kísérleteinkben ugyanilyen módon előállított izolált, permeabilizált szívizomsejteket tartalmazó homogenizátumokat használtuk.

4.2.3. Immunhisztokémia

Az acetonban fixált szöveteket paraffinba ágyaztuk és 5 μ m vastag metszeteket készítettünk (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). A deparaffinált metszeteket 0,3% hidrogénperoxiddal kezeltük, hogy az endogén peroxidáz aktivitást gátoljuk. A metszeteket 1,5% normál kecske szérummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) szobahőmérsékleten blokkoltuk 1 órán keresztül, majd 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át 1:100 hígításban PAR és AIF ellenes nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges antitesttel (mindkettő Calbiochem, San Diego, CA, USA). Ezt követően fajspecifikus biotinizált szekunder antitesttel (1:200), és ABC reagenssel (mindkettő Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubáltuk a metszeteket. A peroxidáz aktivitást DAB kromogénnel (DAB substrate kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) detektáltuk, majd Gill's hematoxylinnal (Accustain; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) végeztünk háttérfestést. A negatív kontrollként szolgáló metszeteket nem inkubáltuk elsődleges antitesttel.

4.2.4. Western immunoblot

4.2.4.1. Poli-ADP riboziláció vizsgálata

A miofibrilláris fehérjék Poli-ADP ribozilációjának mértékét izolált permeabilizált szívizomsejteket tartalmazó homogenizátumból határoztuk meg. A homogenizátumot SDS-mintapufferben (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 10 percig főztük. A fehérje koncentrációt dot blot módszerrel ellenőriztük, majd 20 µg protein homogenizátumot vittünk fel 10%-os gradiens gélre (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). A molekulásúly szerint szétválasztott fehérjéket 1%-os tejporban blokkoltuk 1 óráig, majd az 1%-os tej-PBS-ben hígított elsődleges PAR ellenes antitesttel (1:10 000; Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA) inkubáltuk. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (1:10 000; Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA) inkubáltuk. A jeleket felerősített chemilumineszcencia (ECL) (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA, USA) segítségével autoradiographiás filmen (Primax RTG-B) vizualizáltuk. A filmekken kapott sötét sávok reprezentálták a poli-ADP ribozilált fehérjéket.

4.2.4.2. Fehérjék karboniláltságának vizsgálata

A 4.2.2. pontban leírtaknak megfelelően szívizom izolálást végeztünk, azzal a különbséggel, hogy izoláló oldat helyett RIPA-puffert használtunk (1% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 0,5% Na-deoxikolat (Reanal Finechemical, Budapest, Hungary), 0,1% Na-dodecilszulfát (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 2 v/v% protein inhibitor koktél (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 0.5 mM PMSF (Fluka, Buchs, Switzerland), and 1 mM benzamidine-hidroklorid hidrát (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)). A frakciók fehérjetartalmát BioRad Protein Assay-vel határoztuk meg. A fehérjeoldalláncok karboniláltságának vizsgálatát OXYBLOT kittel (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) végeztük. A meghatározás során az elektroforézist és transzfert követően a módosult (karbonilált) oldalláncokat először dinitrofenilhidrazinnal (DNPH) reagáltattuk, majd DNPH-ra specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk. Ezt követően hagyományos immunoblot metodikával mutattuk ki a karbonilált fehérjéket.

4.2.4.3. A minták PARP-1, kaszpáz-9 és nitrotirozin oldallánc tartalmának vizsgálata

A PARP-1 és kaszpáz-9 jelenlétét 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézist, a donor illetve beteg mintákban meglevő, valamint a peroxinitrit kezelés (10-500 μM) hatására a miofibilláris fehérjékben létrejövő nitrotirozin oldalláncok képződését 5-20%-os SDS-poliakrilamid grádiens-gél elektroforézisét követően Western-immunoblottal vizsgáltuk. Mintánként 15-30 μg proteint választottunk el az elektroforézis során. A membrán szabad kötőhelyeit 1%-os sovány tejporthalmazó PBS-ben (tej-PBS) 1 óráig blokkoltuk, majd 1%-os tej-PBS-ben hígított megfelelő elsődleges (PARP-1 (1:10 000, Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA), kaszpáz-9 (1:1 000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), nitrotirozin oldallánc (1:10 000, Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA) felismerő) antitesttel inkubáltuk. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos biotinált (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), vagy torna-peroxidáz kapcsolt antitesttel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) inkubáltuk, végül az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA, USA) tettük láthatóvá.

4.3. A protein kináz C (PKC) szerepe a humán miokardium kontraktilitásában

4.3.1. PKC és troponin I kimutatása immunhisztokémiával

A humán szívizom mintákból -20°C -on kryostatban készítettünk 10 μm -es metszeteket, melyeket 5 percre hideg acetona helyezve fixáltunk. A fixált metszeteket PBS-ben mostuk szobahőmérsékleten, majd 1 órán át kecske szérum albumint tartalmazó blokkoló oldatban blokkoltuk. A metszeteket PKC α ellenes nyúlban termeltetett elsődleges antitesttel (1:100, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), majd FITC-konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes antitesttel (1:100, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) inkubáltuk. A TnI vizualizálására TnI ellenes egérben termeltetett elsődleges antitesttel (clone 22B11, 1:100, Research Diagnostics Laboratories Inc., Louisville, TN, USA) inkubáltuk a metszeteket, melyeket végül egy háromlépéses sztreptavidin-biotin komplex alapú (1:100, JacksonLaboratories, Bar Harbor, ME, USA) immunhisztokémiai eljárás segítségével festettük meg.

4.3.2. Biokémiai módszerek

A vizsgált kontraktilis változások biokémiai hátterének tisztázásához többféle módszert alkalmaztunk. A miofibrilláris fehérjék *in vitro* foszforilációjával és Western blot analízisével az egyes fehérjék szintjén bekövetkező változásokat detektáltuk. A mechanikai és biokémiai méréseinkből származó adatok megbízható összevethetősége érdekében hasonló kísérleti körülmények (hőmérséklet, inkubációk időtartama) megteremtésére törekedtünk a különböző módszerek alkalmazása során. Továbbá a mechanikai és biokémiai kísérleteinkben ugyanolyan módon előállított izolált, permeabilizált szívizomsejteket tartalmazó homogenizátumot használtuk.

4.3.2.1. Humán szívizomsejtek „rekonstrukciója”

Az izolált, permeabilizált kardiomiocitákhoz visszaadtuk az izolálás során eltávolított citoszólt ~1 mg miocita protein/ml koncentrációt beállítva. Az aktivációk során a „rekonstruált”, szívizomsejteket 10 (erőmérések) illetve 30 (biokémiai módszerek) percreg inkubáltuk forbol-mirisztin-acetát (PMA, PKC aktivátor; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), GF 109207X (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) és Gö 6976 (Calbiochem, San Diego, CA, USA; PKC inhibitorok, valamennyit 10 μ M koncentrációban) jelenlétében vagy hiányában. A különböző biokémiai mérések során sejteket 3 alkalommal mostuk 450 μ l izoláló oldattal (centrifugálás: 1000 rpm, 2 perc), az inkubáció során alkalmazott kalcium és PMA koncentrációt is figyelembe véve. Ezt követően a homogenizátumot 5 percreg főztük 60 μ l SDS-mintapufferrel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), majd 30 μ l mintát felhasználva molekulásúly szerint SDS-elektroforézissel szétválasztottuk és Western immunoblottal detektáltuk a fehérjéket.

4.3.2.2. *In vitro* foszforiláció

A humán szívizom homogenizátumokat feleslegben alkalmazott rekombináns PKA, PKC α , γ , δ , ϵ és η (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA) izoenzimekkel 60 percreg 37°C-on inkubáltuk 10 mM magnézium és 100 μ M [γ -³²P] ATP (ICN, Costa Mesa, CA, USA) jelenlétében HEPES pufferben. A rekombináns PKC izoenzimek kináz aktivitásának mérésére 1 mg/ml hiszton III (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) szubsztrátot alkalmaztunk. A foszforiláció autoradiográfiával történő kimutatásához a reakciót hideg (jégben hűtött)

aceton hozzáadásával állítottuk le. Az elegyet 10 percig jégen tartottuk, majd a kicsapódott fehérjét centrifugálással választottuk el. A csapadékot 50 µl SDS mintapufferrel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 5 percig forraltuk, majd a fehérjét SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel elválasztottuk. A géleket ezután Coomassie festékkel festettük. A fehérjékbe épült ^{32}P -t a gélek szárítását követően autoradiográfiával detektáltuk.

Ezzel párhuzamosan 5 µl mintát P81 foszfo cellulóz papírra (Whatmann, Fairfield, NJ, USA) cseppentettünk. A szubsztrátfehérjékbe épült ^{32}P mennyiségét a papírok 0,5% -os foszforsavas mosása (3x5 perc) és acetonnal történő szárítása után TriCarb (PerkinElmer Life Science Inc., Waltham, MA, USA) szcintillációs számlálóban határoztuk meg.

4.3.3. Western immunoblot

A 4.2.2. pontban leírtaknak megfelelően szívizom homogenizátumot izoláltuk, azzal a különbséggel, hogy izoláló oldat helyett RIPA-puffert használtunk (1% Igepal CA-630, 0,5% Na-deoxikolat, 0,1% Na-dodecilszulfát, 2 v/v% protein inhibitor koktél; pH 7,4). A frakciók fehérjetartalmát BCA assay-vel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) határoztuk meg, BSA standard alapján, és azt 4 mg/ml-re állítottuk be RIPA hozzáadásával. A homogenizátumot SDS-mintapufferben (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 10 percig főztük. Minden mintából 50 µg protein homogenizátumot, illetve kontrollként humán rekombináns PKC izoenzimeket (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) vittünk fel 10%-os gradiens gélre (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A molekulásúly szerint szétválasztott fehérjét 1%-os tejporban blokkoltuk 1 óráig, majd az 1%-os tej-PBS-ben hígított elsődleges PKC α (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA, hígítás 1:5 000) PKC δ és PKC ϵ (mindkettő Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, hígítás 1:1 000)) ellenes antitesttel inkubáltuk. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA, hígítás 1:50 000) inkubáltuk. A jeleket felerősített chemiluminescencia (ECL) (PerkinElmer Life Science Inc., Waltham, MA, USA) segítségével autoradiographiás filmen (Primax RTG-B) vizualizáltuk. A kapott jel intenzitása arányos a membránon levő fehérje mennyiségével.

4.3.4. PKC izoenzimek transzlokációja

A membránrendszerüktől megfosztott szívizomsejtekhez visszaadtuk a citoszólt (1 mg/ml, 450 µl/cső) és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk kalcium jelenlétében (5 mM) vagy hiányában, valamint forbol-mirisztát-acetát (PMA, 10 µM; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) jelenlétében vagy hiányában. A sejteket 3 alkalommal mostuk izoláló oldattal (centrifugálás: 1000 rpm, 2 perc), az inkubáció során alkalmazott kalcium és PMA koncentrációt is figyelembe véve. Ezt követően a mintákat 5 percig főztük 60 µl SDS-mintapufferrel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) majd 30 µl mintából a PKC α , β 1, δ és ϵ fehérjék mennyiségét határoztuk meg. A fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált másodlagos antitesteket és ECL módszert alkalmaztunk. A sávok intenzitását ImageJ software felhasználásával mértük, az értékeket OD-ben határoztuk meg.

4.3.5. Citoszól szabad kalcium koncentrációjának meghatározása

A kísérletekben célunk annak meghatározása volt, hogy a mechanikai mérésekben alkalmazott kezelések során a szabad kalcium koncentrációkat hogyan befolyásolja a citoszol szolubilizálása során használt oldat. Ebben az oldatban (relaxáló oldat) ugyanis a citoszolikus fehérjék mellett 2 mM EGTA is volt, ami természetesen módosította a szabad kalcium koncentrációt. A transzlokáció kalcium függése kapcsán ezért erőfeszítéseket tettünk annak érdekében, hogy a transzlokáció során alkalmazott kalcium kezelések során a szabad kalcium koncentrációt meghatározzuk. Ennek érdekében a kezeléseket Fluo-3 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) fluoreszcens kalcium indikátor jelenlétében is elvégeztük és a kapott fluoreszcencia értékeket egy kalibrációs görbe (Fluo-3 fluoreszcencia ismert szabad kalcium tartalmú oldatokban) alapján értékeltük. A fluoreszcencia intenzitásokat fluorescence plate reader (BMG NOVOstar fluorescent plate reader) használatával 10 és 30 perces inkubációs idővel 520 nm-en detektáltuk. Így kerültek mérés alapján meghatározásra a 19. ábra B panelén látható kalcium-függési ábra X-tengelyének értékei. Az eredmények és a kalibrációs görbe értékelése Microsoft Excel és a Graphpad Prism software segítségével történt.

4.3.6. Gel-overlay assay PKC α -kötő fehérjék kimutatására

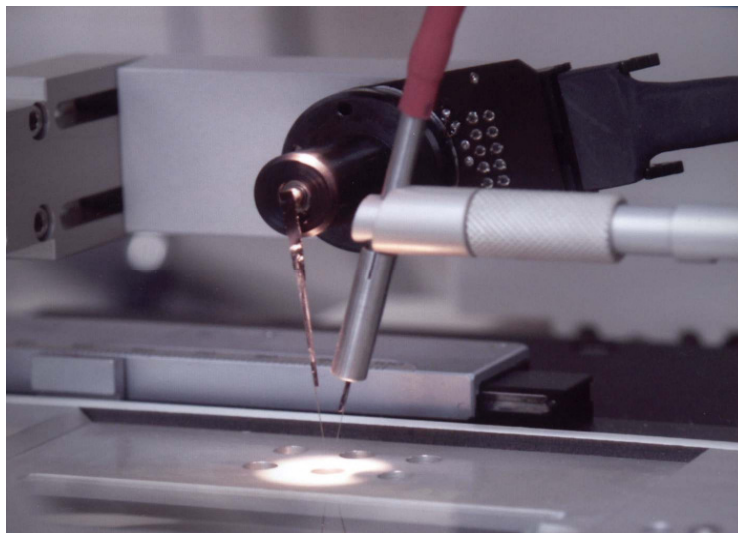
Az izolált, permeabilizált kardiomiocitákat SDS-mintapufferben főztük, nitrocellulóz membránra cseppentettük. A membránok blokkolását követően 2 órán át inkubáltuk azokat 1%-os tej-TBS-ben 2 μ g/ml tisztított, rekombináns PKC α (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 10 μ M forbol-mirisztil-acetát (PMA, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) és 5 mM Ca²⁺ jelenlétében. A kontroll membránokhoz nem adtunk tisztított, rekombináns PKC α -t. A membránokat 3 alkalommal mostuk 5 mM Ca²⁺-mal kiegészített TBS-ben, majd PKC α ellenes elsődleges antitesttel inkubáltuk (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA, hígítás 1:20 000). A rPKC α -kötő fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált másodlagos antitesteket és ECL módszert alkalmaztunk.

4.3.7. Rekombináns humán PKC α in vitro kötődésének vizsgálata rekombináns kardiális TnI-hez és troponin komplexhez

Rekombináns, tisztított PKC α -t (0,1 μ g, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) inkubáltunk rekombináns, tisztított TnI (0.1 μ g/ml TnI) és rekonstruált troponin komplex (0.3 μ g/ml, 1:1:1 sztöchiometriai arányban TnI:TnC:TnT) molekulákkal Ca²⁺ jelenlétében (5 mM) és hiányban szobahőmérsékleten 2 órán át. A TnI és a Tn komplex immunprecipitációjához a homogenizátumokat 30 μ l protein A sepharose CL-4B gyanta (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) jelenlétében szobahőmérsékleten 60 percig 1 μ g anti-TnI antitesttel (Research Diagnostics Laboratories Inc., Louisville, TN, USA) vagy kontrollként ugyanilyen mennyiségű egér IgG-vel (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) inkubáltuk. A gyantához kötött komplexeket 5 alkalommal mostuk immunprecipitációs pufferrel (centrifugálás: 1800 rpm, 1 perc), az inkubálásnak megfelelő kalcium jelenlétében. Ezt követően az immunkomplexeket tartalmazó üledékeket 10 percig főztük SDS-mintapufferrel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), majd a minták egyik feléből a TnI fehérjék mennyiségét határoztuk meg, másik feléből az immunprecipitáció hatékonyságát ellenőriztük. A fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált streptavidint és ECL módszert alkalmaztunk.

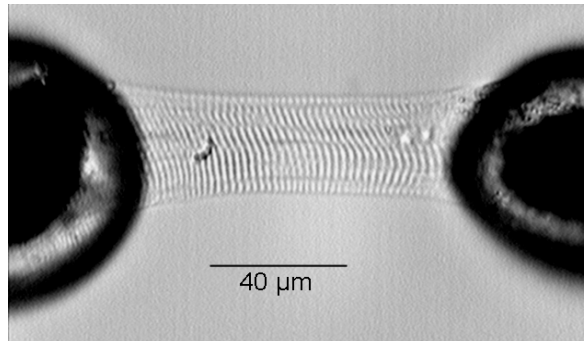
4.3.8. Mechanikai mérések izolált szívműködéseken

Az izolált, permeabilizált kardiomiocitákat szilikon ragasztóval (Dow Corning, Midland, USA) egy érzékeny erőmérőhöz (Sensonor, Horten, Norway) és egy piezoelektromos motorhoz (Aurora Scientific Inc., Aurora, Canada) rögzítettük (2., 3. ábra).



2. ábra. Az izolált szívműködések rögzítése az erőmérő rendszerhez

Az izolált szívműködést egyik végét olyan rovartüdőhöz ragasztottuk, mely egy érzékeny erőmérő toldaléka (jobb oldal), másik végét ugyanilyen módszerrel egy piezoelektromos motorhoz (bal oldal) rögzítettük. A tűk mozgását elektromotoros mikromanipulátorokkal illetve a motor számítógépes vezérlésével valósítottuk meg. A szívműködést övező oldatok cseréjét a tárgyasztal oldalirányú mozgatása révén értük el, melynek során a preparátumot az egyik kis volumenű oldatcseppből (kb. 55 μ l) a másikba vittük át. A mérőkád folyamatos hűtésével biztosítottuk a mérésekhez szükséges hőmérsékletet.



3. ábra. Izolált és membránrendszerétől megfosztott szívizomsejt

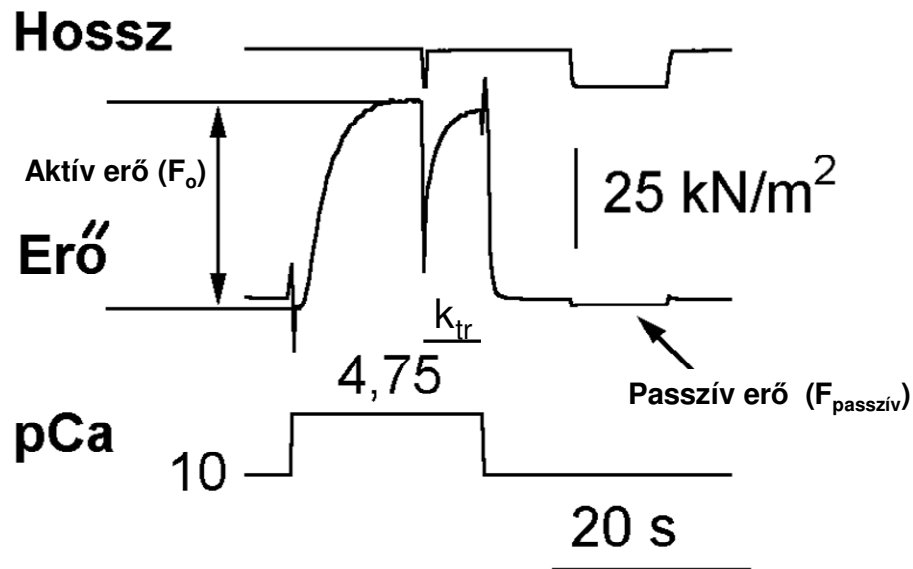
A vizsgálni kívánt izolált kardiomiocitát invertáló mikroszkóp tárgyasztalán szilikon ragasztóval a két vékony rozsdamentes acéltűhöz ragasztottuk. Az átlagos szarkomerhosszt relaxáló oldatban 2,2 μm-re állítottuk.

A szívizomsejtek a tritonos (detergenses) kezelést követően elvesztik membránrendszerüket és természetesen fiziológiai tulajdonságaik jelentős részét is. Ennek ellenére ezen preparátumok jól mérhető kontraktilis tulajdonságokkal rendelkeznek és így a szívizomkontrakció miofibrilláris szintjén jó modellnek tekinthetők. Hangsúlyozzuk, hogy ebben a tekintetben a membránfosztott jelleg szükséges a kísérletek elvégzéséhez, hiszen a miofibrilláris kalcium-kiváltott kontrakció mérése során a kalcium penetranciáját, a steady state kalcium koncentráció beállítását biztosítani kell. Összefoglalva tehát a preparátum a mifibrilláris kontraktilitás mérésére alkalmas, erre elfogadott rendszer, azonban az adatok értékelése során figyelembe kell venni, hogy a fiziológiás kontrakcióban a membránokon keresztüli kalcium áramlás alapvető.

A sejtek membránrendszerének eltávolítását egyébként a kontraktilitás mérés technikája is szükségessé teszi, amennyiben a membránrendszerrel rendelkező sejtek az erőmérő rendszeren nem rögzíthetőek. A rögzítés ugyanis két rovartú között akváriumragasztóval történik. A ragasztás során pedig a sejtek nemcsak elveszítik membrán integritásukat, hanem rosszul tapadva a rovartúkhöz nagyobb összehúzódások esetén onnan le is válnak.

A mérésekhez szükséges relaxáló és aktiváló oldatok összetételét számítógépes program (Fabiato és Fabiato, 1979) szerint határoztuk meg. A kiindulási relaxáló és aktiváló oldatok Ca^{2+} -koncentrációja pCa (Ca^{2+} -koncentráció 10-es alapú negatív logaritmus) 10 és pCa 4,75 volt. A pCa 4,75 értéknél kisebb Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló oldatokat ezen

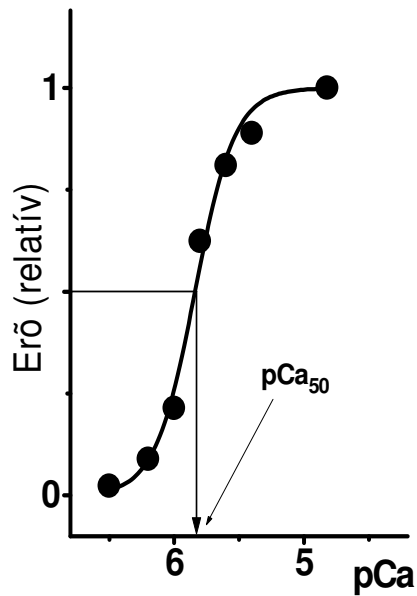
kiindulási oldatok elegyítésével állítottuk elő. A szívizomsejtek Ca^{2+} -kontraktúráit izometriás körülmények között 15°C -on mértük. A sejtek aktiválása előtt a sarcomerek átlagos hosszát a mikroszkóphoz kapcsolt számítógépes videojel feldolgozó rendszer segítségével $2,2\ \mu\text{m}$ -re állítottuk be. A mérések során a szívizomsejt relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átvitelét a kontraktilis erő fokozódása követte (4. ábra). A maximális Ca^{2+} aktivált erő kifejlődése után egy úgynevezett „release-restretch” manővert végeztünk, melynek során a sejtet eredeti hosszának 20%-ával megrövidítettük, majd ezt követően visszaállítottuk a kiindulási hosszát. Ezt a mérőrendszer az előzetesen beállított protokoll szerint az elektromágneses motorhoz rögzített rovartű mozgatásával hajtotta végre. Az igen nagysebességű, 20 ms alatt kivitelezett, hossz-változtatás során a kialakult aktin-miozin keresztkötések döntő többsége felszakadt, majd azok újból felépültek. Ezt az eseményt a regisztrátumon a kontraktilis erő megszűnése, majd annak gyors regenerációja kísérte. Az erő regenerációjának üteme elsősorban az aktin-miozin ciklus sebességétől függött, melyet a k_{tr} paraméterrel jellemeztünk. A k_{tr} paramétert az erő görbék „release-restretch” manővert követő részének illesztésével lehetett becsülni. Az izometriás csúcserőt, mely az aktív (F_o) és passzív ($F_{passzív}$) komponensek összege, a gyors rövidüléssel párhuzamos hirtelen erőcsökkenésből határoztuk meg. Ezt követően a relaxáló oldatban kivitelezett, lényegesen hosszabb ideig tartó „release-restretch” manőver révén a sejt passzív erőkomponensét mértük (4. ábra).



4. ábra. Kontraktilis paraméterek mérése egyetlen szívizomsejten

A fenti reprezentatív kísérlet során a Ca^{2+} -kontraktúrákat a szívizomsejt relaxáló oldatból ($p\text{Ca } 10$) magas Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatba ($p\text{Ca } 4,75$) történő átvitelével idéztük elő. Az aktiváció alatti gyors hosszváltozást („release-retch” manőver) a kontraktilis erő megszűnése, majd gyors regenerációja kísérte. A relaxáló oldatban végrehajtott hosszváltoztatás révén a sejt passzív feszítettségét ítéltük meg.

Az izometriás erőmérés során a kialakult maximális feszülést mind analóg módon, mind digitális jelek formájában egyedi fejlesztésű komputer program segítségével regisztráltuk. Az ASCII formátumú mérési eredményeket egyesével olvastuk be az Origin grafikus program erre a célra definiált adatfeldolgozó rutinjába. A beolvasott adatokat grafikusán megjelenítettük. A kontraktúra amplitudóját különböző, egyre csökkenő Ca^{2+} -koncentrációjú ($p\text{Ca } 4,75 - p\text{Ca } 7,0$) aktiváló oldatokban határoztuk meg. Ezek segítségével szerkesztettük meg a sejtre jellemző Ca^{2+} -érzékenységi görbét. A félmaximális erőt eredményező Ca^{2+} -koncentráció, az úgynevezett $p\text{Ca}_{50}$ érték, a Ca^{2+} -érzékenységet önmagában jellemző számadat (5. ábra).



5. ábra. Az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenységének mérése egyetlen szívizomsejten

Az aktivációk során kialakuló aktív erőt a Ca^{2+} -koncentráció (pCa) függvényében ábrázolva minden egyes sejtnek megszerkesztettük a Ca^{2+} -érzékenységi görbéjét. A félmaksimalis erő létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} -koncentráció (pCa_{50}) a sejt Ca^{2+} -érzékenységét közvetlenül jellemző adat.

4.3.9. PKC aktiváló és gátló ágensek hatásának tanulmányozása mechanikai mérőrendszeren

A különböző kontraktilis paramétereket kontroll körülmények között, PKC aktiváló és gátló szerek alkalmazása előtt, és ezek alkalmazását követően is meghatároztuk. Kísérleteinkben PKC aktiváló szerként kalciumot, PMA-t (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), gátlószerként GF 109207X-t (LC Laboratories, Woburn, MA, USA; nem szelektív PKC inhibitor) és Gö 6976-t (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA; szelektív Ca-dependens PKC α és β I inhibitor) használtunk. Az inkubációs idő 10 perc volt. További kísérleteinkben ezen szerek alkalmazásával tanulmányoztuk a kontraktilis változásokat (Ca^{2+} -érzékenység, aktin-miozin ciklus sebessége). Ehhez kontroll körülmények között felvett Ca^{2+} -erő összefüggés meghatározását követően, 10 μM PMA és 10 μM GF 109207X illetve 10 μM Gö 6976 koncentrációk mellett inkubáltuk a preparátumokat. Majd ismételt Ca^{2+} -erő összefüggés felvételét követően ezek hatását egy második Ca^{2+} -erő összefüggés

regisztrálásával vizsgáltuk. Sajnos, ezen anyagokkal (GF 109207X illetve Gö 6976) szívizomsejtek vonatkozásában (különösen membránrendszerüktől megfosztott sejtek esetében) semmilyen tapasztalat sem áll rendelkezésre. Ennek megfelelően az alkalmazott dózisok kiválasztásánál célunk az érintett enzimrendszerek nagy valószínűséggel történő gátlása volt. Ilyen körülmények között az alkalmazott PKC gátló kezelések esetében a PKC gátlása valószínűleg teljes volt, azonban további enzimek (pl. miozin könnyűlánc kináz) gátlása sem kizárható. A rendszerbe az endogén PKC molekulákat a felülúszó (citoszol) visszaadásával biztosítottuk.

4.4. Statisztikai módszerek

A nyert adatokat Microsoft Excel program segítségével táblázatos formában rendeztük. Az ábrákat és az illesztéseket részben az Origin (MicroCal Software Inc., Piscataway, NJ, USA), részben a Graph Pad program segítségével készítettük el. A disszertációban bemutatott adatokat átlag \pm SEM formában tüntettük fel. Az egyes kísérletekhez tartozó elemszámot a megfelelő ábrák alatt tüntettük fel. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a Student-féle t -próba (ugyanazon sejten végzett kísérletek esetében páros, egyéb esetekben páratlan próbát használva) eredményeként a kapott p érték kisebb volt 0,05-nél.

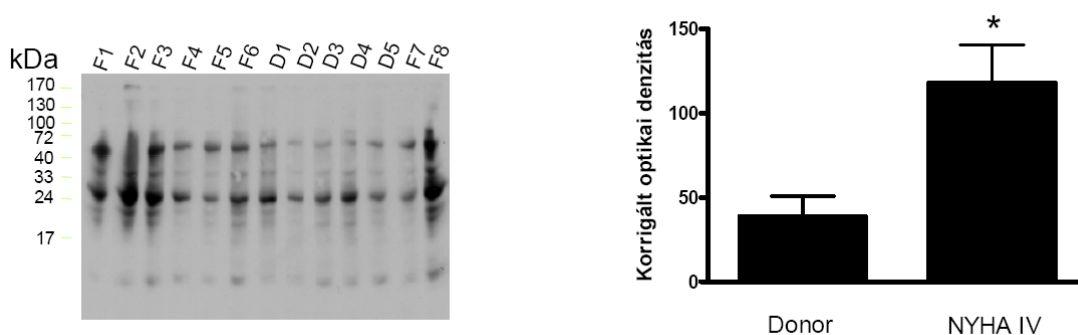
A Western immunoblot során az egyes minták fehérjemennyiségét -ellenőrzésképpen - Ponceau-vörös festés után denzitometriás analízissel hasonlítottuk össze. Az eredményeket 4-10 független kísérlet elvégzése alapján kvantitáltuk. Az értékeket átlag \pm S.E.M. formában fejeztük ki. A különbségeket a Student-féle t -próba segítségével $P < 0,05$ -es szignifikancia szint mellett tekintettük szignifikánsnak.

5. Eredmények

5.1. Oxidatív károsodások kimutatása szívelégtelenségben

5.1.1. Fehérje oxidáció

Az *in vivo* fehérje oxidáció követésére az egyik széles körben alkalmazott, könnyen mérhető tulajdonság az aminosavak karbonilációjának kimutatása. Az aminosavak közül az arginin, lizin, prolin, aszparagin és glutamin oxidatív módosulása eredményezi a reaktív karbonil származékok kialakulását, amit dihidrofenilhidrazonnal (DNPH) lehet kimutatni. Méréseink alapján a kardiális fehérjék oldalláncainak karboniláltsága szívelégtelenségben 118.3 ± 22.3 OD (n=8), míg a donorokban 38.7 ± 12.1 OD (n=5) volt (6. ábra). Ezen adatok fokozott oxidatív stressz jelenlétére utaltak szívelégtelenségben.



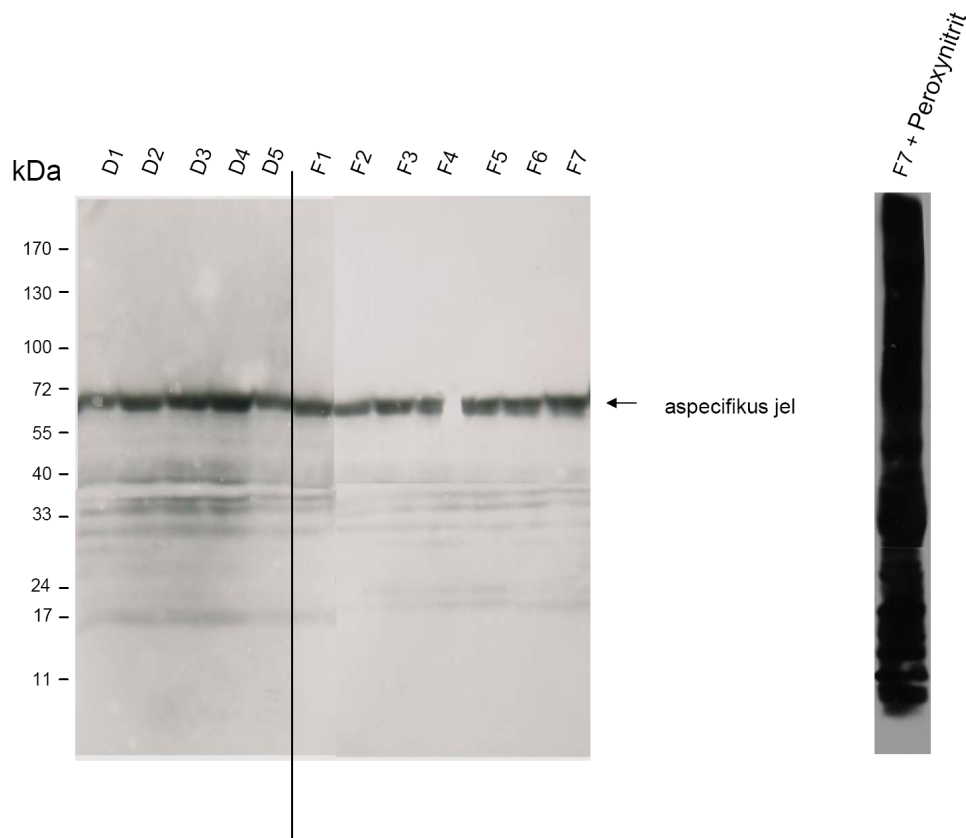
6. ábra karbonilált fehérjék kimutatása

Az SDS-poliakrilamid gélen elválasztott jelölt karbonilált fehérjéket immunoblottal mutattuk ki. A bal oldali képen az immunoblot analízist, míg a grafikonon annak értékelését láthatjuk (donor, n = 5; failing, n = 8; P = 0.02). Az értékelés során a csíkok optikai denzitását a háttérre korrigált értéként fejeztük ki.

5.1.2. Fehérje nitrálás

Az oxidatív stressz igen gyakran együtt jelentkezik nitrogén tartalmú szabadgyökök képződésével is. Jól ismert, hogy ezen esetekben szuperoxid anionból és nitrogén monoxidból peroxinitrit képződik, mely molekula képes a fehérjék (pl. alfa-aktinin) tirozin oldalláncainak nitrálására (Borbely és munkatársai, 2005). Szívelégtelen betegekből és a donorokból származó mintáinkban a nitrált fehérjék tekintetében nem találtunk különbséget. Ugyanakkor

az *in vitro* peroxinitrit kezelés hatására számos fehérjében is erőteljes nitrotirozin képződést detektáltunk, ami a kísérletes rendszerünk érzékenységét igazolta (7. ábra).



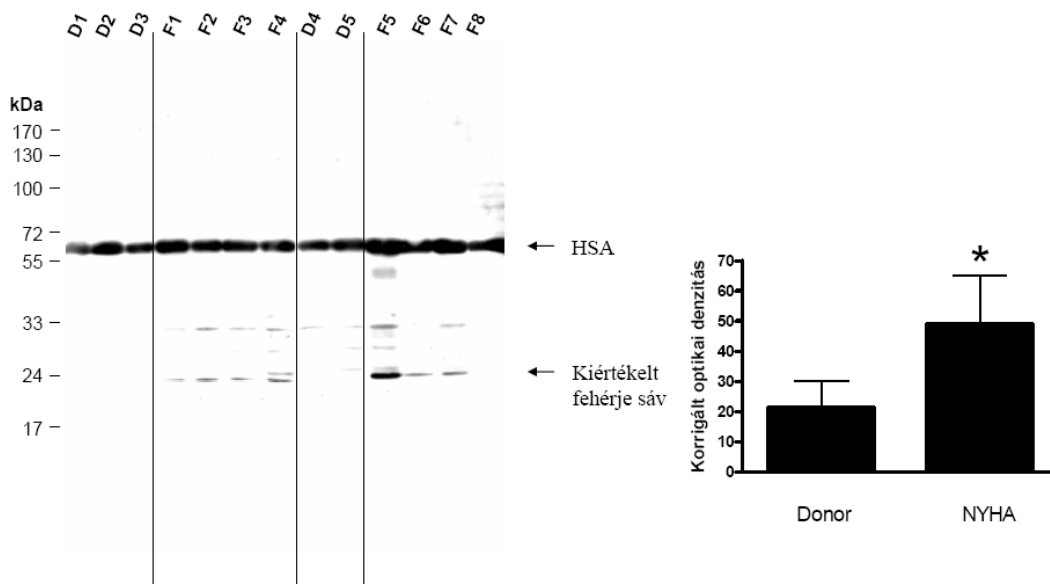
7. ábra Nitrotirozin oldalláncok kimutatása

A tirozin oldalláncok nitráltságára érzékeny immunoblot analízis eredményei láthatóak az ábrán. Bal oldalon a kezeletlen, míg jobb oldalon peroxinitrit (5 perc, 500 μ M) kezelt minták láthatóak.

5.2. Az oxidatív hatások következményeinek vizsgálata

5.2.1. Poli(ADP-ribóz)-polimeráz aktiváció

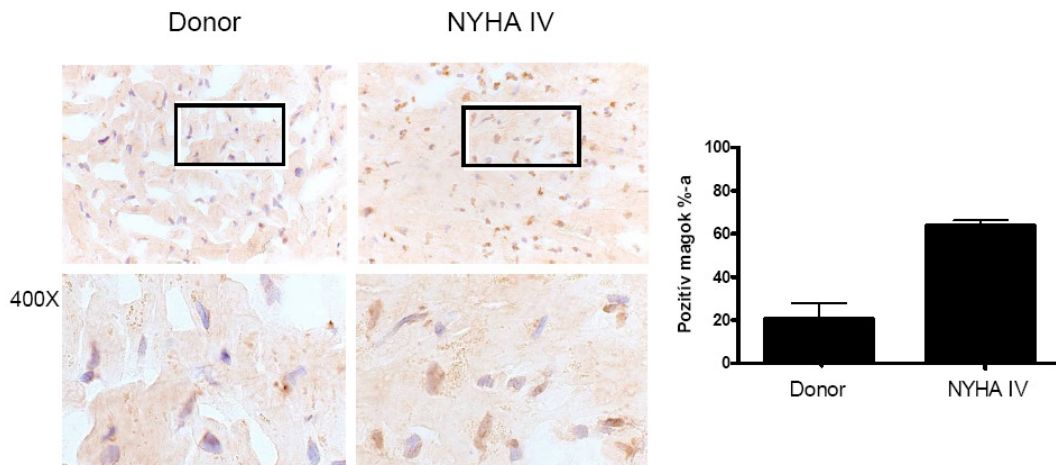
Az oxidatív stressz következtében kialakuló DNS-lánc-törések a legtöbb sejttípusban aktiválják a poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) enzimet. Az aktiváció következtében fokozódik az ADP-riboziláció mértéke. Az oxidatív hatásokkal összhangban poli(ADP-ribozilált) fehérjék mennyiségében mintegy 2,3-szeres növekedés volt megfigyelhető (8. ábra) a szívelégtelen betegek mintáiban ($49,0 \pm 16,2$, $n=8$) a donor mintákkal összevetésben ($21,4 \pm 8,8$, $n=5$, $P=0,005$).



8. ábra Poli(ADP-ribóz)polimeráz aktiváció

A poli(ADP-ribózilált) fehérjéket immunoblottal mutattuk ki. A bal oldalon az előhívott blotok láthatóak, míg a jobb oldali grafikonon az egyedi kísérletek eredményeinek értékelése látható.

Az immunfestési mintázat alapján a poli(ADP-ribózilált) fehérjék sejten belüli megoszlása egyértelműen a sejtmagra lokalizálódott a szívelégtelen betegek és a donorok szövetmintáinak metszetein. A PAR-pozitív sejtmagok aránya $20,8\% \pm 7,1\%$ volt a kontroll csoportban, szemben a szívelégtelen csoportban, ahol ez $64,0\% \pm 2,2\%$ volt. A növekedés 3,1-szeresnek adódott (9. ábra).

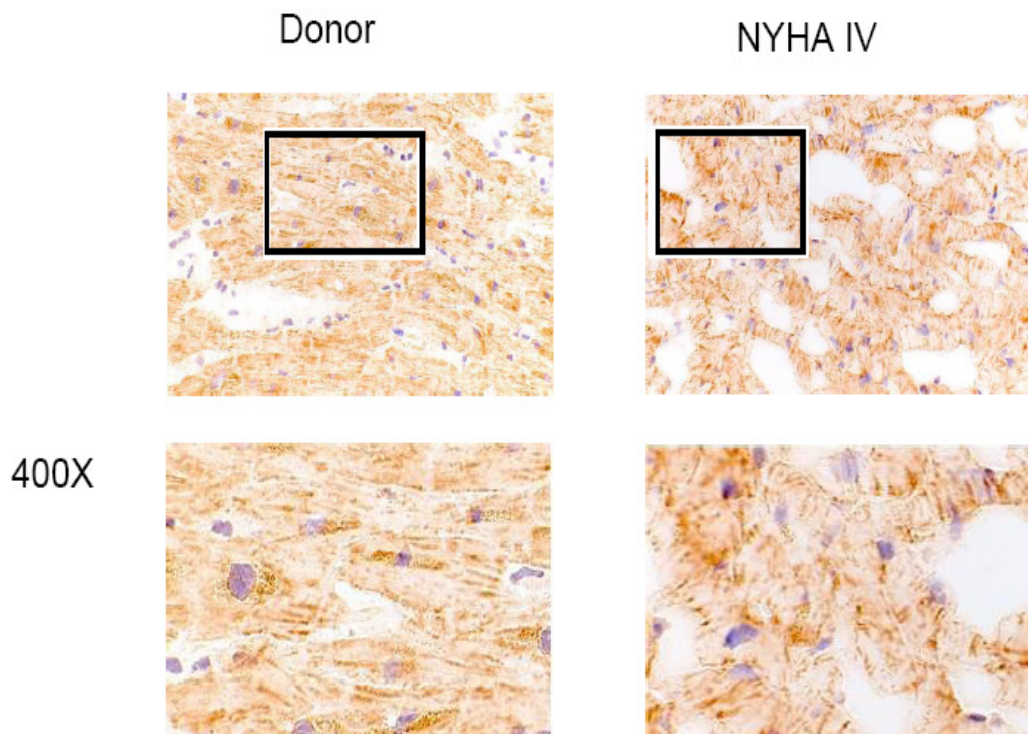


9. ábra A poli-ADP-ribozilált fehérjék szubcelluláris lokalizációja

A poli-ADP-ribozilált fehérjéket immunhisztokémiával mutattuk ki. Az ábra bal oldalán egy reprezentatív kép (barna színnel láthatóak a pozitív sejtmagok, míg a nem festődő sejtmagok lilák), a grafikonon az átlagolt értékek láthatóak.

5.2.2. AIF lokalizáció

Irodalmi adatok alapján kardiomiocitákban és érfali sejtekben a PARP aktiválódásának egyik következménye az apoptózis-indukáló faktor (AIF) mitokondriumból sejtmagba történő transzlokációja. Kísérleteink szerint azonban AIF kiáramlás a mitokondriumból sem donor, sem szívelégtelen szívizomzatban nem volt megfigyelhető immunhisztokémiai módszerrel (10. ábra).



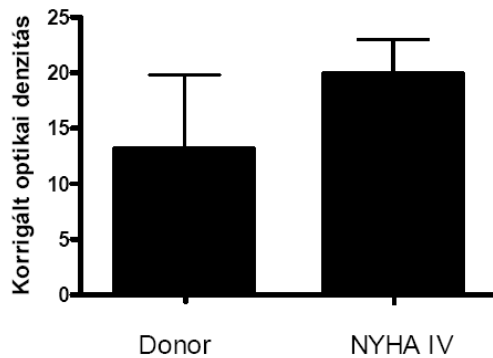
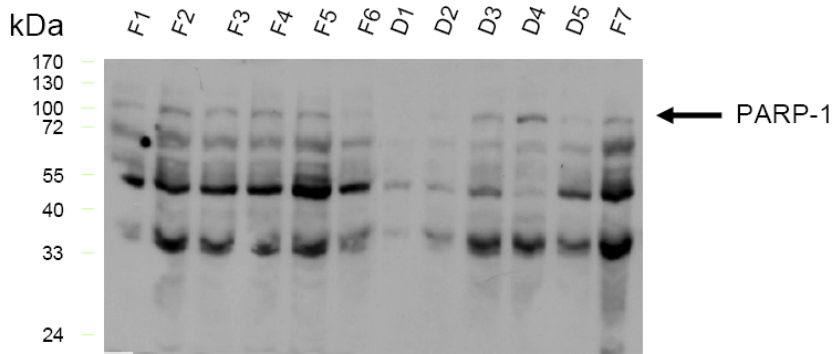
10. ábra AIF transzlokáció vizsgálata

Az AIF-et immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki. A diffúz, tűnő barna festődés mutatja az AIF lokalizációját a mitokondriumban a lila sejtmagokhoz képest.

5.2.3. PARP expresszió

A PARP-1 enzim által katalizált fokozott poli-ADP-riboziláció megvalósulhat az enzim katalitikus aktivitásának sokszorozódása, vagy expressziójának fokozódása révén.

A PARP-1 aktivitást a PARP-1 izoenzimet specifikusan felismerő ellenanyaggal, immunoblot kísérletekkel mutattuk ki teljes sejthomogenátumokon. Az immunoblot nem mutatott szignifikáns expressziónövekedést a szívelégtelen betegek mintáiban (11. ábra). Az aktív PARP-1 aránya a donorokban $13,1 \pm 6,7$ (n=5), míg szívelégtelenségben $19,9 \pm 3,1$ (n=7) volt, P=0,33. Ezen túlmenően azonban, az irodalmi adatokkal megegyezően mi is nagymértékű PARP-1 degradációt detektáltunk mind a donor, mind a szívelégtelen szívekben (11. ábra).

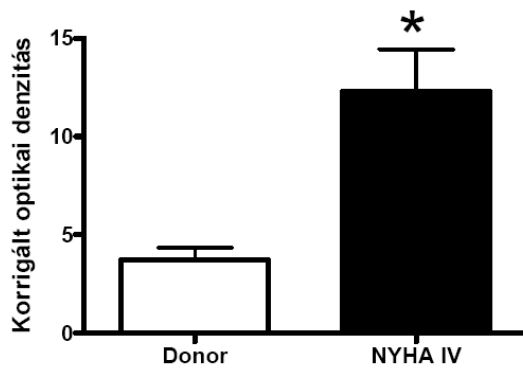
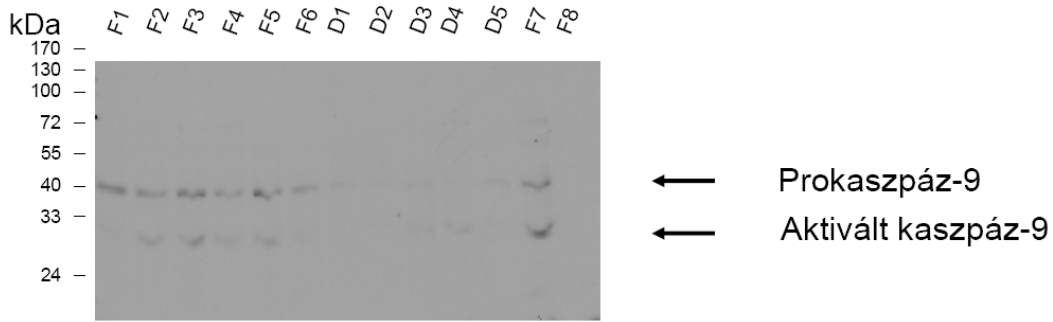


11. ábra PARP-1 expresszió

A PARP-1-et immunoblot technika segítségével mutattuk ki. Felül egy reprezentatív blot, míg alul az egyedi kísérletekből származó átlagolt értékek láthatóak. Az immunoblot nem mutatott szignifikáns expressziónövekedést a szívelégtelen betegek mintáiban.

5.2.4. Kaszpáz-9 aktiváció

Mintáinkban az iniciátor kaszpáz-9 aktivitását vizsgáltuk. Immunoblot jelölést végeztünk egy olyan anti-kaspáz-9 ellenanyaggal, ami a fehérje proformáját, és a proteolízis során keletkező aktív kaszpáz-9-t egyaránt felismeri (12. ábra). Az aktív kaszpáz-9 tekintetében nem volt különbség a két csoportban. A kontroll donor mintákhoz képest a szívelégtelen betegekből származó mintákban háromszorosára nőtt a proforma mennyisége. Az inaktív, prokaspáz aránya szívelégtelenségben $12,3 \pm 2,2$ (n=8), míg a donorokban $3,7 \pm 0,6$ (n=5) volt. Elmondhatjuk, hogy az oxidatív stressz az apoptózis kaszpáz függő mitokondriális útvonalát nem aktiválta.



12. ábra Kaszpáz-9 aktiváció

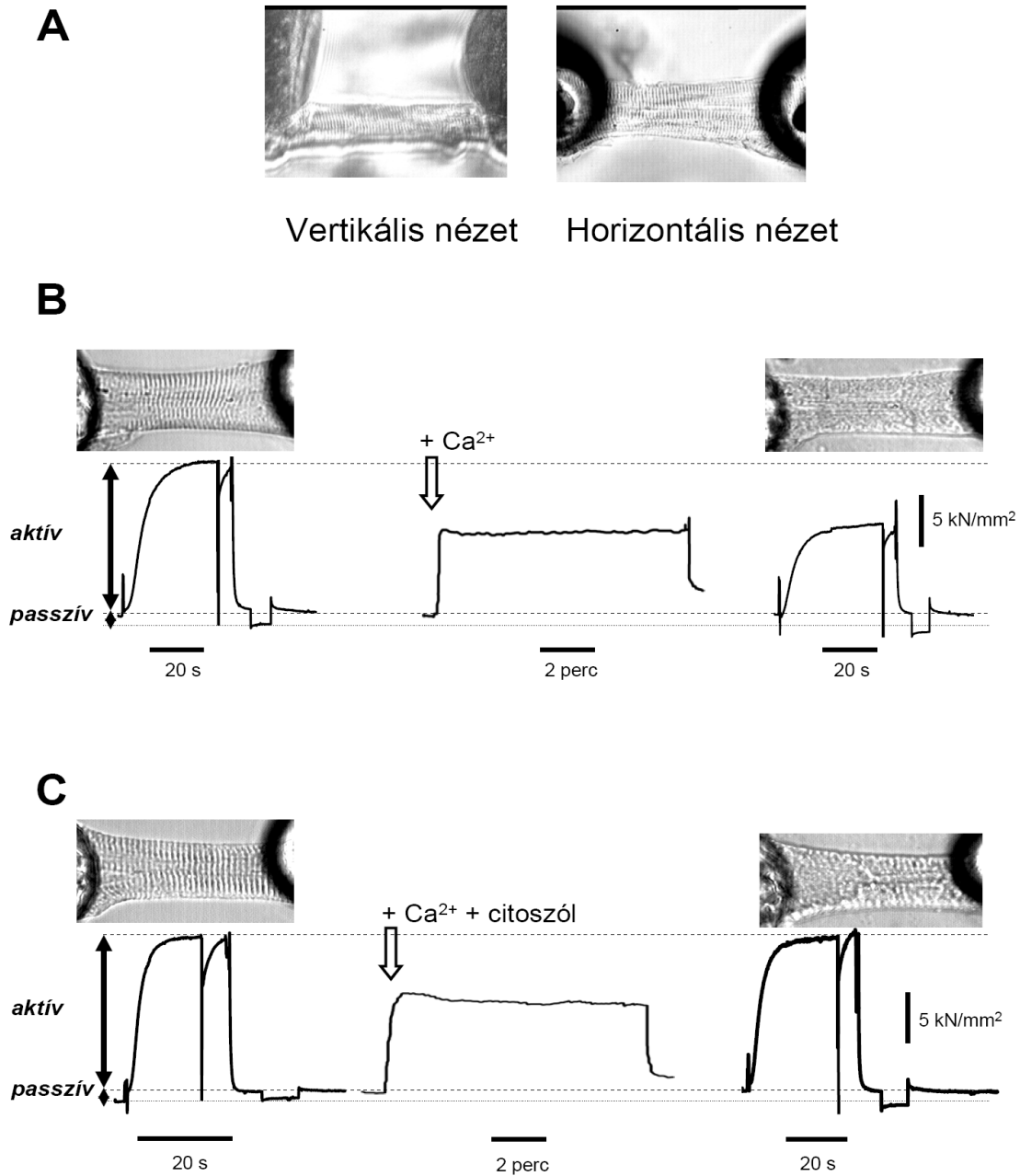
A szív mintákban a kaszpáz-9-et immunoblot technikával mutattuk ki. Felül egy reprezentatív blot, alul az átlagolt adatok láthatók. A kontroll donor mintákhoz képest a szívelégtelen betegekből származó mintákban háromszorosára nőtt az inaktív proforma mennyisége.

5.3. Protein kináz C szerepe a humán miokardiális kontraktilitásban

5.3.1. Endogén PKC által kifejttet hatás a humán kamrai szívműködés kalcium aktiválta kontraktilis erejére

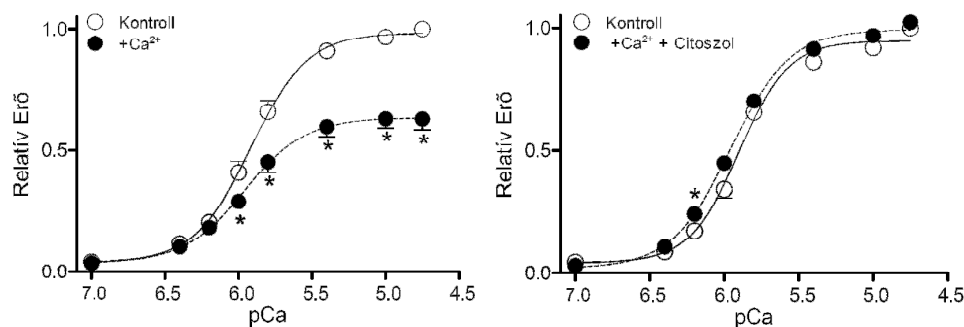
A permeabilizált humán kamrai szívműködősejteket félmaximális kontrakciót kiváltó Ca^{2+} koncentráció mellett (pCa 5,8; a kifejlődő aktív erő a maximum $62 \pm 1\%$ -a) inkubáltuk 2 percig. Ez a kezelés a maximális Ca^{2+} aktivált kontrakciós erő $37 \pm 5\%$ -os csökkenését eredményezte (n=6 kísérlet, 13B. és 14. ábrák). Ezzel szemben, a citoszól jelenlétében hasonló módon kezelt sejtek (kontrakciós erő az inkubáció alatt: a maximum $56 \pm 8\%$ -a) az erőcsökkenéstől teljes mértékben védettek voltak ($2 \pm 3\%$ -os erő növekedés a kezelés végére, n=5, 13C és 14. ábrák). A citoszól jelenlétében a szívműködősejtek rekonstrukciójának

paramétereit részletesen nem értékeltük. Kísérleteinkben megelégedtünk azzal, hogy a funkcionális mérések során az általunk alkalmazott rekonstrukciós eljárással a szívizom preparátum mechanikai tulajdonságai a fiziológias jelleghez váltak hasonlóvá. A továbbiakban csupán ezen modellrendszer elemeit tanulmányoztuk, a kontraktilis tulajdonságok megőrzésének mechanizmusait vizsgálva. A mechanikai változásokkal párhuzamosan a sejtek szerkezetében (harántcsíkolat) bekövetkező változásokat is rögzítettük. Mint az a 13. ábra képein látható, a fénymikroszkópos harántcsíkolat mindkét kezelést követően jelentősen elmosódott. A továbbiakban a citoszolikus fehérjék hozzájárulását vizsgáltuk. Az általános PKC aktiválószer PMA (10 perces kezelés) nem volt hatással sem a kontraktilis erőre, sem a citoszól mediált védelemre (15. ábra). PKC inhibitorok jelenlétében elvégezve a kísérleteket azt tapasztaltuk, hogy a citoszól mediált protekció mintegy harmadával csökkent (16. ábra). Mindemellett a GF 109203X nem mutatott hatást a 10 perces Ca^{2+} kontraktúra hiányában (a maximális erő $2\pm 3\%$ -os növekedése, $n=5$, lásd 1. táblázat).



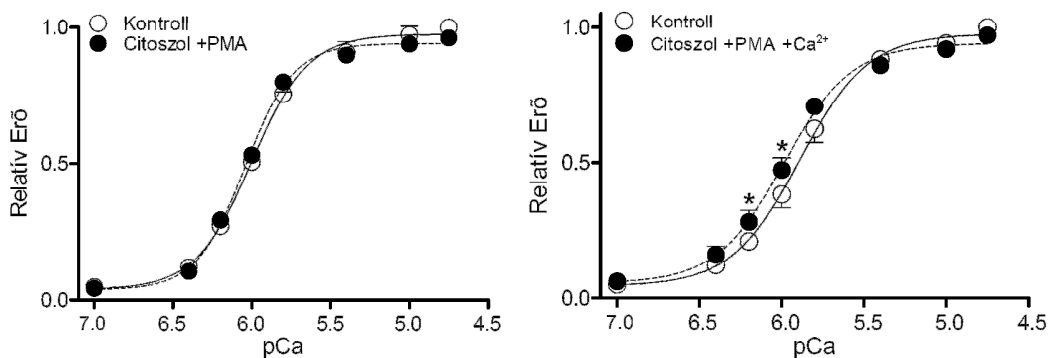
13. ábra Citoszól kezelés hatása a kontraktilis erőre

A vizsgálni kívánt izolált kardiomiocitát invertáló mikroszkóp tárgyasztalán szilikon ragasztóval a két vékony rozsdamentes acéltűhöz ragasztottuk (A panel). Az átlagos szarkomerhosszt relaxáló oldatban 2,2 μm -re állítottuk. A mechanikai tulajdonságokat ugyanazon a sejten Ca²⁺ kezelés előtt, közben és után mértük a citoszól frakció hiányában (B panel,) illetve jelenlétében (C panel).



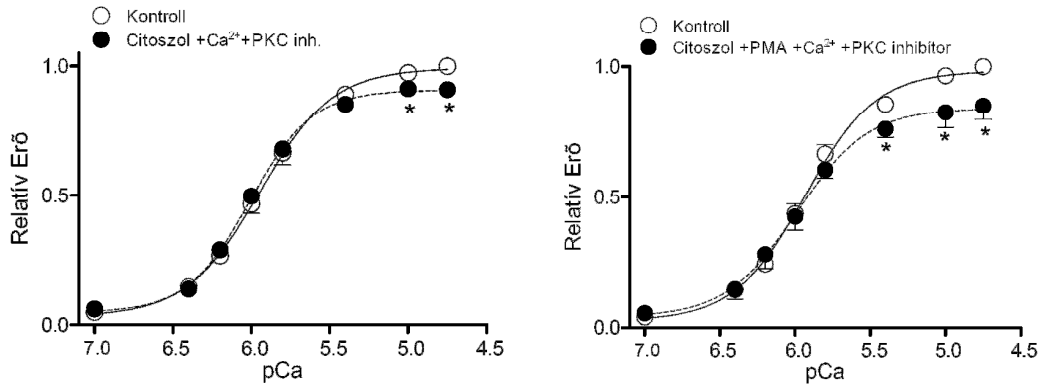
14. ábra Citoszol kezelés hatása a kontraktilis erőre: pCa-erő összefüggés

Az ábra bal oldalán Ca^{2+} jelenlétében ($n=6$), míg a jobb oldalán Ca^{2+} és citoszol ($n=5$) jelenlétében mért relatív Ca-erő értékeket tüntettük föl. (* $p<0,05$ vs. kontroll) A reperfüziót követő kalcium anyagcsere változást permeabilizált humán kamrai szívizomsejteken modellezve-a sejteket 2 percig inkubáltuk félmaximális kontrakciót kiváltó Ca^{2+} koncentráció mellett-látható a kontrakciós erő közel 40%-os csökkenése. Ezzel szemben, a citoszol jelenlétében hasonló módon kezelt sejtek az erőcsökkenéstől teljes mértékben védettek voltak.



15. ábra PKC szerepe a kontraktilis erő szabályozásában: aktiváció

Az előző ábránál leírtakhoz hasonló kísérletes körülmények között mért szubmaximális erő értékeket normalizáltuk a maximális erőértékekre. Az ábra bal oldalán a PKC aktivátor PMA hatása látható citoszol jelenlétében és Ca^{2+} hiányában ($n=5$, citoszol+PMA), a jobb oldalán pedig ($n=10$, citoszol+PMA+ Ca^{2+}) Ca^{2+} jelenlétében. (* $p<0,05$ vs. Kontroll). Az általános PKC aktiválószer PMA sem Ca^{2+} hiányában, sem jelenlétében (10 perces kezelés) nem volt hatással sem a kontraktilis erőre, sem a citoszol mediált védelemre.

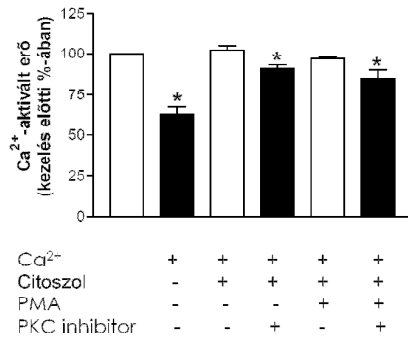


16. ábra PKC szerepe a kontraktilis erő szabályozásában: gátlás

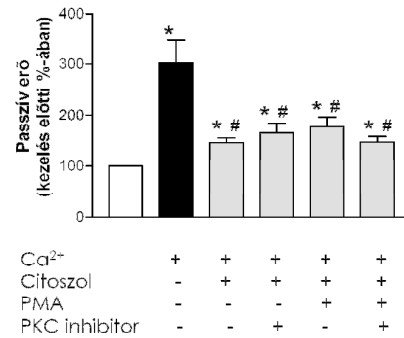
14. ábránál leírtakhoz hasonló kísérletes körülmények között mért szubmaximális erő értékeket normalizáltuk a maximális erőértékekre. Az ábra bal oldalán PKC inhibitor Gö-6976 (n=8) jobb oldalán a PKC inhibitor GF109203X (n=6) hatása látható (*p<0,05 vs. kontroll), azt tapasztaltuk, hogy a citoszól mediált protekció mintegy harmadával csökkent.

5.3.2. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek passzív feszülésére

Az izolált szívizomsejtek kalcium független passzív erejét 2,2 μ m szarkomerhosszon vizsgáltuk. Ellentétben a Ca²⁺ aktiválta maximális aktív erővel a humán kardiomiocitákban a passzív erő szignifikánsan magasabb értéket vett fel 1 mM Ca-ot tartalmazó oldattal végzett inkubáció hatására ($F_{\text{passzív}}$: 302 \pm 46%, p<0,05, n=6, 6.és 10. ábrák). A citoszól hozzáadása szignifikáns mértékben antagonizálta ezt a hatást ($F_{\text{passzív}}$: 146 \pm 9 %, p<0,05, n=5, 13. és 17. ábrák). Ugyanakkor kísérleteinket PKC aktivátor PMA és nem szelektív PKC inhibitor GF 109203, valamint Gö 6976 hozzáadásával megismételve sem Ca²⁺ jelenlétében, sem hiányában nem tapasztaltunk további változást a passzív erőben (17. ábra).



* P<0.05 a kontrollhoz képest



* P<0.05 a kontrollhoz képest

P<0.05 a Ca²⁺ kezeléshez képest

17. ábra. PKC szerepe a kontraktilis erő szabályozásában: statisztika

A maximális kontraktilis erő változása: az aktív feszülés a bal oldali, a passzív feszülés a jobb oldali oszlopdiagrammon van feltüntetve. (* $p < 0,05$ vs. kontroll), (# $p < 0,05$ vs. kalcium-kezelés). Bal oldali oszlopdiagrammon látható, hogy a citoszol mediálta védelem körülbelül 40 %-os, ennek egy része, kb 1/3-a köthető a PKC enzimekhez.

5.3.3. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek kalcium érzékenységére

A kontraktilis rendszer kalcium érzékenysége (pCa_{50}) és a Ca^{2+} -erő összefüggés meredekségére jellemző paraméter (nHill) nem változott szignifikánsan sem a PKC aktivációt (PMA) sem az inaktivációt (GF 109203 és Gö 6976) kiváltó kezeléseket követően (2. táblázat).

Kezelés	n	Aktív erő (kN/mm ²) kezelés előtt	Aktív erő (relatív) kezelés után	Passzív erő (kN/mm ²) kezelés előtt	Passzív erő (relatív) kezelés után	pCa50		Hill	
						kezelés előtt	kezelés után	kezelés előtt	kezelés után
+Ca ²⁺	6	24.17±3.79	63±5*	1.89±0.20	302±46*	5.92±0.04	5.97±0.03	2.06±0.12	1.94±0.34
Citoszol + Ca ²⁺	5	19.80±2.84	102±3	1.61±0.24	146±9*	5.89±0.02	5.97±0.02*	2.03±0.21	2.10±0.10
Citoszol + PMA	5	21.02±4.20	96±1	2.05±0.51	115±11	6.00±0.03	6.05±0.01	2.06±0.16	2.58±0.20
Citoszol + GF	5	25.96±4.72	102±3	1.56±0.41	92±6	5.96±0.06	6.03±0.04*	1.65±0.16	2.14±0.16*
Citoszol + PMA + Ca ²⁺	10	21.67±3.04	98±1	2.07±0.24	176±20*	5.90±0.04	6.04±0.05*	2.10±0.28	2.09±0.19
Citoszol + Ca ²⁺ + Gö	8	28.87±2.90	91±2*	2.57±0.57	165±19*	5.94±0.03	6.04±0.03*	1.82±0.20	1.97±0.13
Citoszol + PMA + Ca ²⁺ + GF	6	22.48±3.24	85±5*	2.58±0.23	147±11*	5.92±0.03	6.01±0.05*	1.84±0.12	2.08±0.29

2. táblázat. A kontraktilis paraméterek értékei

A kísérletek során meghatározott kontraktilitás értékek láthatók a táblázatban. Az aktív erő a Ca²⁺ hozzáadását követő kontraktilis erő fokozódást, a passzív erő a preparátum feszülését, a pCa50 a félmaximális kontraktilis erő növekedéshez szükséges Ca²⁺ koncentrációt, míg a Hill érték az adatok illesztése során kapott szigmoidális görbe meredekségét (a Ca²⁺ kötőhelyek közötti kooperativitást) jellemzi. Némely esetben az abszolút egység változását (a kezelés előtti érték százalékában) tüntettük fel. Az értékeket átlag±SEM értékben fejeztük ki.

5.4. PKC izoenzimek expressziója humán szívizomsejtekben

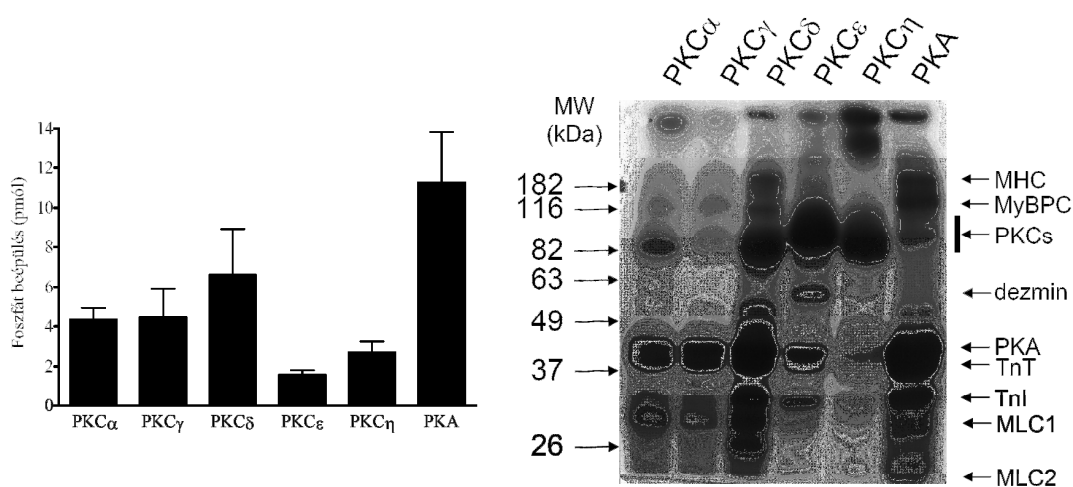
Három PKC izoforma expressziós szintjét (α , δ és ϵ) vizsgáltuk humán szívizom-homogenizátumokban immunoblot módszerrel, specifikus antitesteket alkalmazva.

Az elvégzett kísérletek igazolták, hogy a humán szívizomban legnagyobb mennyiségben előforduló izoforma, a PKC α expressziós szintje közel húszszor nagyobb, mint a vizsgált másik két izoformáé, a PKC deltáé és epszilóné (189 ±31, 7±3, 7±2 ng/mg, az említés sorrendjében).

5.5. Humán miokardiális fehérjék in vitro foszforilációja PKC-vel

Következő lépésben meghatároztuk rekombináns PKC felhasználásával a humán szívizom kontraktilis fehérjéinek foszforilálhatóságát és autoradiográfiával azonosítottuk a szubsztrátok molekulaméreteit. A kísérlet során feleslegben adtuk a preparátumokhoz az exogén rekombináns PKC izoenzimeket, így az endogén PKC-k aktivitása elhanyagolható volt. Erre bizonyíték az is, hogy az exogén PKC hozzáadása nélkül a foszforilációs

reakcióban ugyanilyen körülmények között nem tudtunk foszfát beépülést detektálni. Az izoenzimek közötti különbségek nemcsak az aktiváló kofaktorok iránti igényben, szöveti expresszióban, lokalizációban mutatkoznak meg, hanem az eltérő szubsztrátokban is. A Ca^{2+} -dependens PKC α és γ közel azonos aktivitást ($4,3 \pm 0,9$ és $4,4 \pm 2,1$ pmol/min) és szubsztrát specificitást mutatott, míg a Ca-független izoformák meglehetősen egyedi mintázattal bírtak. A PKC δ izoenzimnek volt a legnagyobb kináz aktivitása ($6,6 \pm 3,3$ pmol/min), és szelektíven foszforilált egy 26 kDa molekulatömegű fehérjét. Míg a PKC ϵ aktivitása adódott a legalacsonyabbnak ($1,6 \pm 0,3$ pmol/min), és ez a kináz egy 60 kDa molekulatömegű fehérjét foszforilált specifikusan. A PKC η által foszforilált két fehérje molekulamérete is eltérő, >200 kDa és 48 kDa volt (18. ábra).



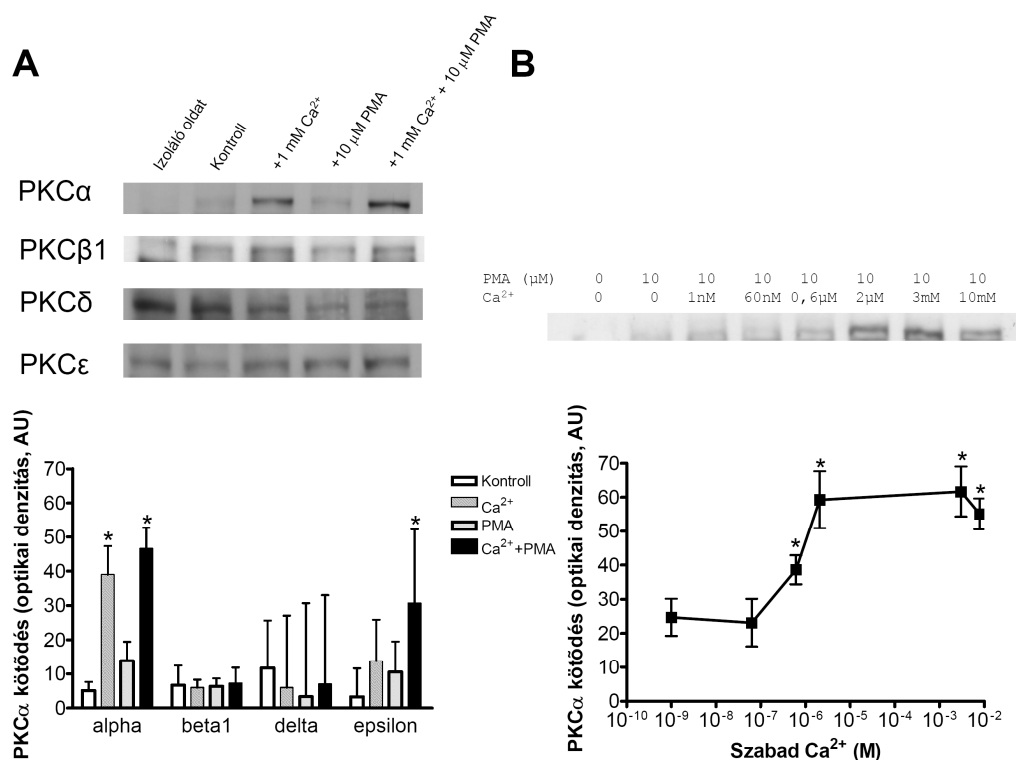
18. ábra Miokardiális fehérjék *in vitro* foszforilációja különböző PKC izoformákkal és PKA-val

Az oszlopdiagrammon a foszfát beépülés (aktivitás), míg az autoradiogrammon az SDS gélelektroforézissel elválasztott foszforilált fehérjék (fekete csíkok) láthatóak.

5.6. PKC α intracellularis target fehérjéinek kimutatása

Kísérleteinket endogén PKC α , β I, δ és ϵ izoformák citoszólból a kontraktilis fehérjékhez történő transzlokációjának vizsgálatával folytattuk. Kontroll körülmények között, Ca^{2+} hiányában az izoenzimeket túlnyomórészt a citoszólban lehetett kimutatni, csak csekély mértékű asszociáció volt megfigyelhető a PKC izoenzimek és a kontraktilis fehérje rendszer között (19A ábra). Ca^{2+} jelenlétében a PKC α kötődése a kontraktilis rendszerhez szelektíven nőtt (19A ábra). A széles körben használt diacil glicerol analóg PMA-nak egymagában nem

volt megfigyelhető szignifikáns hatása a PKC izoenzimek és a kontraktilis apparátus közti interakcióra. Ca^{2+} és PMA együttes jelenlétében PKC α és ϵ szignifikáns transzlokációja volt megfigyelhető. Eredményeink egyértelműen azt sugallják, hogy döntően a Ca^{2+} -nak van szerepe a PKC α transzlokációjának szabályozásában. A PKC α transzlokáció Ca-függésének vizsgálatakor a félmaximális aktivációhoz szükséges Ca^{2+} koncentráció (EC_{50}) $\text{EC}_{50}=645 \text{ nM}$ -nak adódott (19B ábra).

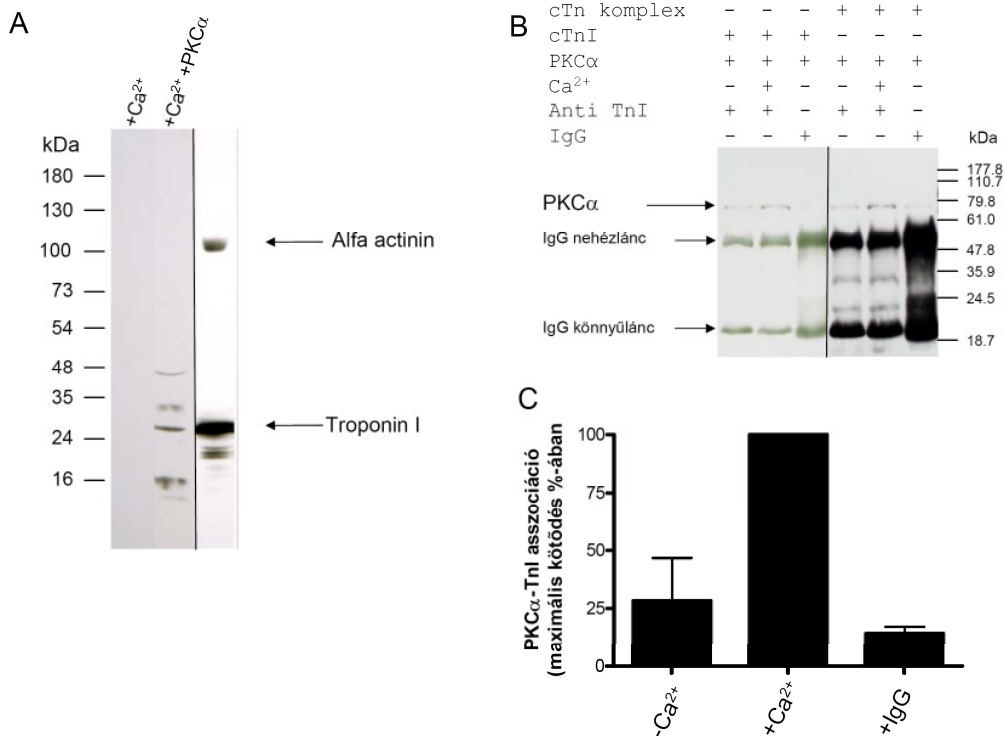


19. ábra PKC izoenzimek Ca^{2+} függő transzlokációja humán szívműsejtek citoszóljából a kontraktilis rendszerhez

Az A panelen látható sávok alapján a membránrendszerüktől megfosztott miociták kontraktilis rendszeréhez kötődő PKC izoenzimek mennyisége ítéhető meg. A Ca^{2+} -mentes közegben inkubált kontroll minta esetén halvány jelölődést látunk. Ca^{2+} hozzáadására a PKC α -nak megfelelő sáv intenzívításának mértéke fokozódik. A B panel felső részén látható, hogy a PKC α kontraktilis rendszerhez való asszociációjának jelentős Ca^{2+} -függése van. A 80 kDa molekulatömegű fehérjének megfelelő sáv intenzitása fokozódik a Ca^{2+} koncentráció növelésével.

5.7. Ca^{2+} -függő cTnI és PKC α kölcsönhatás (kötődés)

PKC α és lehetséges horgonyzó fehérjéit overlay assay-vel vizsgáltuk membránrendszerüktől megfosztott humán szívizomsejteken. A miofibrilláris rendszer öt fehérjéjét azonosítottuk lehetséges PKC α kötő fehérjének. Ezek közül az egyik motilitása a ~ 27 kDa tömegű TnI motilitásával egyezett meg (20A ábra). *In vitro* fehérjekötéses analízissel megállapítottuk, hogy a tisztított, rekombináns TnI és PKC α molekulák között Ca-dependens kölcsönhatás van (20B és 20C ábra). Ugyanakkor ezt a hatást nem befolyásolta az a tény, ha a TnI molekula Tn-komplexben (TnI:TnT:TnC aránya 1:1:1) szerepelt (20B ábra).

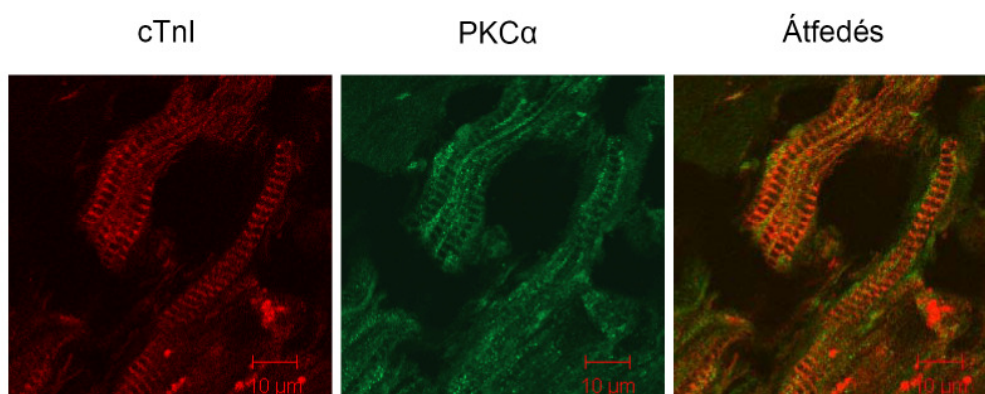


20. ábra Humán kardiális Tn I, mint PKC α kötő protein

A PKC α és potenciális horgonyzó fehérjéit overlay assay-vel vizsgáltuk membránrendszerüktől megfosztott humán szívizomsejteken. A miofibrilláris rendszer egyik PKC α kötő fehérjéje a ~ 27 kDa tömegű TnI-vel mozgott együtt (A panel). Immunprecipitációval kimutattuk, hogy a tisztított, rekombináns TnI és PKC α molekulák között Ca-függő kölcsönhatás van (B és C panel). Ugyanakkor ezt a hatást nem befolyásolta az a tény, ha a TnI molekula Tn-komplexben (TnI:TnT:TnC aránya 1:1:1) szerepelt (B panel).

5.8. PKC α és cTnI együttes előfordulásának (kolokalizáció) kimutatása humán kamrai izomzatban

Habár a PKC α többsége a citoszólban expreszálódik, ami megegyezik az alacsony kalcium koncentrációjú, nyugvó állapotú sejtekben megfigyelttel, a biokémiai eredményeinkkel összhangban az immunfluoreszcens felvételeken megfigyelhető PKC α és cTnI kolokalizáció is humán kamrai szövet mintákban (21. ábra).



21. ábra PKC alfa és cTnI együttes előfordulásának (kolokalizáció) kimutatása humán kamrai izomzatban

A TnI vörös, a PKC α zöld fluoreszcencens festékkel jelölt antitesttel került kimutatásra, míg az átlapolt kép esetében, a közös előfordulás helyén sárga színt kaptunk.

6. Megbeszélés

Egyre növekszik azoknak az experimentális és klinikai bizonyítékoknak a száma, melyek szerint az oxidatív stressz szerepet játszik a szív működés rendellenességei és a szívelégtelenség kialakulásában. A fokozott lipidperoxidációt jelző plazma malondialdehid (MDA) emelkedés kifejezett iszkémiás és nem-iszkémiás dilatatív cardiomyopathiában, koncentrációja korrelál a tünetek súlyosságával, fordított arányban áll az ejekciós frakcióval és a terhelhetőséggel (Rochette és munkatársai, 2008). Állatkísérletben a kontraktilitás csökkenésével egyidejűleg megnövekedett malon-dialdehid szintet mértek, ami reaktív oxigéngyökök jelenlétére, lipid peroxidációra utal (Nakamura és munkatársai, 2002). Napjaink megfigyelése, hogy az oxidatív stressz markerének tartott F2-izoprosztán (8-epi-PGF2) szintjének emelkedése a perikardiális folyadékban arányos a szívelégtelenség súlyosságával, direkt kapcsolat áll fenn koncentrációjának nagysága és a bal kamra végdiasztolés és végszisztolés átmérői között (Mallat és munkatársai, 1998). Számos kísérletben bizonyították a szívizomsejteket érő oxidatív stressz kontraktilis funkcióra kifejtett káros hatását, és vizsgálták ennek szerteágazó molekuláris hátterét (Ide és munkatársai, 2000). A miokardiális oxigéngyökök legfontosabb forrásai az ismétlődő iszkémia/reperfúziós periódusok, gyulladásos citokinek, katekolamin auto-oxidáció, prosztaglandinok (Sorescu és Griendling, 2002). A szervezet elégtelen antioxidáns enzimrendszerei (szuperoxid dizmutáz, kataláz és glutation peroxidáz) valamint a védelmi rendszer működéséhez szükséges vitaminok és ásványi anyagok hiánya (E vitamin, C-vitamin, cisztein) következtében felszabadulnak a reaktív szabadgyökök a szívizomsejtekben (Giordano, 2005). Szívelégtelenségben szenvedő betegekben összefüggést találtak a szívelégtelenség klinikai stádiumai, az antioxidánsok és oxidánsok szintje között: A NYHA III stádiumban lévő betegekben szignifikánsan alacsonyabb A vitamin, E vitamin és lutein szinteket, míg magasabb malondialdehid értékeket mértek, mint a NYHA II állapotban levő betegekben (Polidori és munkatársai, 2002). Szívelégtelenségben ROS forrás lehet a sejtben számos speciális enzim: a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NAD(P)H) oxidáz, a xantin-oxidáz, a cyclooxygenázok, a nitrogén-monoxid szintáz; a mitokondriális elektrontranszport lánc; gyulladásos környezetben aktivált neutrofil granulociták (Berry és Hare, 2004; Ferrari és munkatársai, 2004; Giordano, 2005; Li és Feldman, 2001; Sorescu és Griendling, 2002; Szabo és munkatársai, 2004a; Tyagi és Hayden, 2003). Méréseink alapján humán szívelégtelen mintákban szignifikáns oxidatív károsodás mutatható ki, szemben a kontroll humán donor

mintákkal. Ez igazolja azt, hogy a mintavétel, a tárolás és a feldolgozás folyamata nem járt jelentős oxidatív stresszel. A szívizomsejtek, az endokardium, a koronáriák endothelje, a szív idegei mind kalciumfüggő nitrogén-monoxid-szintáz tartalmaznak. A nitrogén-monoxid kulcsszerepet játszik a keringési rendszer élettani szabályozásában, mint például a vazodilatáció, a trombocita- és fehérvérsejt-aktiváció gátlása, a szívizom kontraktilis funkciójának szabályozása, az oxigénfogyasztás csökkentése, de antiapoptotikus és gyulladásgátló hatásai is ismertek (Massion és munkatársai, 2003). A nitrogén-monoxid kulcsfontosságú a különféle szív-, illetve keringési betegség káros következményei elleni védelemben is. Mindaddig pozitív, védő, szabályozó hatású mediátorként viselkedik, amíg a peroxinitrit-képződés fokozódása következtében nem ez utóbbi hatása kerül előtérbe (Pacher és munkatársai, 2005; Szabo, 2003). Korábbi vizsgálatok eredményei szerint kis emlősökben a szívelégtelenség kialakulásában szerepet játszik a nitrogén-monoxidból és szuperoxid anionból fiziológias körülmények között is képződő reaktív nitrogén gyök, a peroxinitrit megnövekedett termelődése. Szívelégtelenségben a fokozott NO képződés hátterében az indukálható nitrogénmonoxid szintetáz (iNOS) enzim expressziós szintjének és aktivitásának növekedése áll (Fukuchi és munkatársai, 1998).

Állatkísérletes modellekben iNOS overexpresszió és a peroxinitrit megnövekedett termelődése valamint dilatatív kardiomiopátia, vezetési zavarok, hirtelen szívhalál és nem utolsósorban a szívelégtelenség között szoros összefüggést mutattak ki (Mungrue és munkatársai, 2002). Patkányokon végzett kísérletek is megerősítették, hogy a miokardiális iNOS aktivitás fokozódás hatására romlik a szív pumpafunkciója és károsodik a β -adrenerg válaszkészség (Gealekman és munkatársai, 2002). Humán szívelégtelenségben kimutatták a neuronális (nNOS vagy NOS1) nitrogén-monoxid-szintáz fokozott aktivitását is (Damy és munkatársai, 2004). Annak ellenére, hogy a peroxinitrit indukált nitrotirozin oldallánc képződést állatokból származó (Ferdinandy és munkatársai, 2000; Pacher és munkatársai, 2003; Szabo és munkatársai, 2002a) és humán (Frustaci és munkatársai, 2000; Hunt és munkatársai, 2002) szívizompreparátumokban is kimutatták, eredményeink szerint szívelégtelen betegekből és a donorokból származó mintáinkban a nitrált fehérjék tekintetében nincs különbség.

A szívelégtelenség kialakulásában nagy jelentőséggel bír a PARP-1 aktivációja. Reaktív nitrogén intermedierek és oxigén származékok, illetve ezek hatására aktiválódó matrix metalloproteinázok, valamint kaszpázok és az oxidatív károsodások okozta DNS lánc törések legfontosabb hatása a poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimek aktiválása (Virag és Szabo, 2002).

Korábbi vizsgálatok eredményei szerint (Pacher és munkatársai, 2002a; Pacher és munkatársai, 2002b; Pillai és munkatársai, 2005; Szabo és munkatársai, 2004a; Xiao és munkatársai, 2005) kis emlősökben a PARP enzim túlaktivációja megfigyelhető többek között iszkémia-reperfúzió, diabetes és kardiotoxikus szerek indukálta szívelégtelenségben. Széles körben vizsgálta a kaszpázok szerepe, krónikus szívelégtelenség és az apoptózis vonatkozásában a megfigyelések azonban ellentmondásosak (Di Napoli és munkatársai, 2003; Hughes, 2003; Kumar és Jugdutt, 2003).

A mátrix metalloproteinázok aktivációja is imert krónikus szívelégtelenségben (Ducharme és munkatársai, 2000; Kwan és munkatársai, 2004). Mind a kaszpázok, mind az MMP-k képesek PARP-1 enzim hasítása révén annak inaktiválására szívelégtelenségben (Di Napoli és munkatársai, 2003; Ducharme és munkatársai, 2000; Hughes, 2003; Kumar és Jugdutt, 2003; Kwan és munkatársai, 2004). Eredményeink szerint megfigyelhető a PARP-1 aktiváció szívelégtelen betegek szívizom mintáiban, ami további példával bővíti azon humán betegségek sorát, melyekben PARP aktiváció kialakul. Megfigyeléseink megegyeznek Pillai, DiNapoli és munkatársai eredményével, mely szerint humán szívelégtelenségben fokozott a poli(ADP-ribozil)áció (Di Napoli és munkatársai, 2003; Pillai és munkatársai, 2005). Ugyanakkor mi nem tudtuk kimutatni szignifikáns PARP-1 expressziónövekedést a szívelégtelen betegek mintáiban, ami felveti, hogy a mintáinkban megfigyelt fokozott poli-ADP-riboziláció hátterében a PARP-1 katalitikus alegység aktivitásának fokozódása áll. A PARP-1 szabályozása elsősorban a DNS-törések vagy intracellularis kalcium koncentráció növekedés szintjén történik (Jagtap és Szabo, 2005; Virag és Szabo, 2002).

Az apoptózis jelátviteli, majd végrehajtó szakaszában fontos szerepet játszanak a kaszpázok. Degradatív enzimsajátságaik miatt a kaszpázok prokaspázok formájában találhatóak – elsősorban – a sejtek citoplazmájában (Hengartner, 2000). Az „érett” kaszpázok heterotetramer szerkezetűek. A kaszpáz-8 és -9 a leggyakoribb úgynevezett iniciátor kaszpáz, amely a jelátviteli úton elindítja a kaszkádot, míg a legfontosabb végrehajtó kaszpáz a kaszpáz-3. A kaszpázok igen sok szubsztráttal rendelkeznek, ezek részben struktúrfehérjék, részben olyan enzimek, amelyek aktiválásuk után részt vesznek a sejt lebontásában (Hengartner, 2000). A PARP az apoptózis kialakulása során általában a kaszpáz-9 általi hasítás áldozatává válik (Soldani és Scovassi, 2002). Eredményeink azt mutatták, hogy a kaszpáz-9 overexpresszálódott (prokaspáz mennyisége nőtt) humán szívizom sejtekben. A kapcsolat a PARP-1 aktiváció és hasítás, a sejthalál apoptotikus vagy nekrotikus formája között bonyolult, de valószínűsíthető, hogy a PARP-1 túlzott aktivációja a sejtek NAD⁺ és ATP raktárainak kiürítése révén nekrozist eredményez. Míg a PARP-1 hasítása, ami az enzim

inaktiválódásához vezet, protektív mechanizmusként utat enged az apoptózisnak, mivel megőrzi a sejtek NAD^+ és energia készletét az energiaigényes további apoptotikus folyamatok számára (Virag és Szabo, 2002).

Mindezek mellett figyelembe kell venni, hogy a vizsgált humán szívizom mintáink különböző eredetűek voltak. Befolyásolhatja az apoptózis és a PARP-1 aktiváció kapcsolatát a betegek NYHA stádiuma, gyógyszeres kezelése, a mintavétel helye (endo-, epikardium) (Bartunek és munkatársai, 2002; Koda és munkatársai, 2003; Okada és munkatársai, 2005; Zorc és munkatársai, 2001; Zorc és munkatársai, 2003). A szívelégtelenség etiológiájának sokszínűsége hozzájárulhatott az eltérő megfigyelésekhez (az iszkémiás eredetű szívelégtelenségben az oxidatív stresszmarkerek által mediált diszfunkció figyelhető meg, míg dilatatív kardiomiopátiát okozhatja alkohol, vagy vírusfertőzés).

Megfigyeléseink szerint humán szívelégtelenségben a PARP-1 aktiváció nem eredményez apoptózist, az AIF transzlokáció hiányának megfelelően. Az azonban lehetséges, hogy enyhe DNS károsodás esetén a PARP-1 aktiválódik és szerepet játszik a DNS-hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében. Spekuláció szintjén az is felvethető, hogy mintáink végstadiumú szívelégtelenségben szenvedő betegekből származtak, akik talán sikeresen alkalmazkodtak a magasabb reaktív gyök szinthez és a kövekezményes PARP-1 aktivációhoz.

Ezen megfigyeléseink ellenére nem vitatott, hogy állatkísérletekben a reaktív oxigén szabadgyökök által kiváltott DNS károsodások, melyek végső soron apoptózishoz vezetnek, fontos szerepet játszanak betegségek kialakulásában (pl. szívelégtelenség). Állatkísérletekben a PARP-1 enzim specifikus gátlószereivel és antioxidánsokkal csökkenteni lehet az infarktus során elhalt terület nagyságát, a szöveti károsodásokat, a miokardium diszfunkciót (Jagtap és Szabo, 2005). Az a tény, hogy a PARP-1 inhibitorok csökkentik a citoplazmatikus NAD^+ katabolizmust, és feltehetőleg mérséklék a szabadgyökök indukálta mitokondriális NAD^+ vesztést, feltételez egy kapcsolatot az oxidatív mitokondriális károsodás és a PARP-1 aktiválódás között. Az oxidatív stressz vizsgálata humán kórképekben és experimentális modellekben közelebb vihet a szabadgyökök okozta kórfolyamatok megértéséhez, a kardiovaszkuláris betegségek megelőzéséhez és kezeléséhez.

További kísérleteinkben a protein kináz C funkcionális jelentőségét mutattuk ki a humán szívizomzat kontraktilis erejének fenntartásában, elnyújtott intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció jelenlétében, mely az iszkémia/reperfúzió egyik jellegzetes eseménye (Karmazyn és Moffat, 1993).

Ismert, hogy a PKC izoenzimek részt vesznek a humán szívizomsejtek erőgenerálásának szabályozásában (Noguchi és munkatársai, 2004). *In vitro* kísérletekben bebizonyosodott, hogy troponin I (TnI), troponinT (TnT), miozin könnyűlánc 2 (MLC-2), kardiális miozin kötő C fehérje (cMyBP-C) és dezmin (Damron és munkatársai, 1995; Huang és munkatársai, 2002; Noland és munkatársai, 1989; Noland és Kuo, 1992) szubsztrátjai a PKC-nek. A molekulák PKC-mediált foszforilációja csökkenti a miozin ATPáz aktivitását (Jideama és munkatársai, 1996; Noland és munkatársai, 1995) és a maximális erőt, meghosszabbítja az izovolumetriás relaxáció idejét, növeli az utóterhelést (Bilchick és munkatársai, 2006), csökkenti a keresztkötések kialakulásának a sebességét (Burkart és munkatársai, 2003) és a kontraktilis erőt (Belin és munkatársai, 2007; Burkart és munkatársai, 2003; Montgomery és munkatársai, 2002; Pyle és munkatársai, 2002; Roman és munkatársai, 2004; Sakthivel és munkatársai, 2005; Scruggs és munkatársai, 2006; Takeishi és munkatársai, 1998). Patkány szívelégtelen modellen Belin és munkatársai megfigyelték, hogy a szívelégtelenség kísérő jelensége a fokozott PKC függő miofibrilláris fehérje foszforiláció és a csökkent kontraktilitás (Belin és munkatársai, 2007). Sőt valószínűsítették, hogy a fentebb leírt eltérést a troponin fehérjék PKC mediálta foszforilációja okozza (Belin és munkatársai, 2006).

Saját és irodalmi adatok közötti ellentmondás (növekvő versus csökkenő kontraktilitás) egyrészt adódhat a különböző fajok szívizom sejtjeiben kifejeződő izoformák eltérő jellegéből, másrészt a PKC hatásait vizsgáló eltérő kísérletes modellekből. A PKC szerepével foglalkozó korábbi beszámolómban a PKC aktivitás jobbra jelentősen magasabb volt, mint az egészséges állapotban fiziológiás körülmények közötti érték. Így például szívelégtelenségben vagy transzgénikus állatmodellekben (Belin és munkatársai, 2006; Goldspink és munkatársai, 2004; Gu és Bishop, 1994; Takeishi és munkatársai, 1998) a magasabb PKC expresszió vezethet a PKC egészségesekben betöltött szerepének elfedéséhez. *In vitro* kináz kezelések hatására a miofibrilláris fehérjék foszforilációja jelentősen meghaladhatja a fiziológiás szintet (Belin és munkatársai, 2007; Burkart és munkatársai, 2003; van der Velden és munkatársai, 2006). Végül a szubsztrátok hely-specifikus mutagenezise is afiziológiás hatásokhoz vezethet (Burkart és munkatársai, 2003; Montgomery és munkatársai, 2002; Pyle és munkatársai, 2002; Roman és munkatársai, 2004; Sakthivel és munkatársai, 2005; Scruggs és munkatársai, 2006). Esetünkben a kardiomiociták „rekonstruálása” során a PKC izoenzimek egymáshoz viszonyított aránya fiziológiához közeli helyzetet tükrözött, a kísérletekben fiziológiához közeli módon foszforilált endogén miofibrilláris fehérjéket (köztük PKC célfehérjéket) alkalmaztunk humán szívizomzaton

végzett kísérleteinkben. Ennek megfelelően eredményeink is eltérnek a korábban találtaktól a PKC kontraktilásban betöltött szerepére vonatkozóan. Adataink arra utalnak, hogy szívelégtelenségben, melynek kialakulását a PKC útvonal diszregulációjával jellemzünk, nem csak a fiziológias szubsztrátok fokozott foszforilációját, hanem egyéb, fiziológias körülmények között nem foszforilálódó fehérje foszforilációját is megfigyelhetjük, ami mintegy elrejtheti a fiziológias hatásokat (22. ábra).

Az eltérő kísérletes körülményeken túl szembetűnő különbségeket találtak rágcsálók valamint humán szívizom mintákban expresszáladó PKC izoformákban. Míg például kis állatokban (patkány, egér) a PKC ϵ a túlsúlyban lévő izoforma (Bowling és munkatársai, 1999; Braun és munkatársai, 2003; Braz és munkatársai, 2004; Disatnik és munkatársai, 1994; Goldberg és Steinberg, 1996; Gu és Bishop, 1994; Murthy és munkatársai, 2004; Rybin és Steinberg, 1994), addig humán mintákban a PKC α (Hambleton és munkatársai, 2006). A saját elvégzett kísérleteink igazolták, hogy a humán szívizomban legnagyobb mennyiségben előforduló izoforma, a PKC α expressziós szintje közel húszszor nagyobb, mint a vizsgált másik két izoformáé, a PKC deltáé és epszilóné. A fajok közötti közös vonás azonban, hogy magasabb PKC expresszió figyelhető meg szívelégtelenségben, végstádiumú dilatatív kardiomiopátiában és súlyos aorta sztenózisban (Simonis és munkatársai, 2007).

A PKC izoenzimek aktivitása három úton szabályozható, (i) szelektív expresszióval, (ii) különböző szubsztrát specificitással (iii) vagy eltérő célra irányítással (targeting). Kísérleteinkben mindezen lehetőségeket vizsgáltuk humán szívizom mintákban.

Saját kísérleteinkben a PKC izoenzimek szubsztrát specificitást *in vitro* foszforilációs assay-vel vizsgáltuk humán kamrai szívizomban. A kináz aktivitás mérésekor két szubsztrátot alkalmaztunk. Egyrészt a kináz aktivitásokat egy kontroll szubsztráton (hiszton H1) mértük és arra törekedtünk az adott reakcióegyben az alkalmazott körülmények mellett hasonló aktivitása legyen valamennyi izoenzimnek. Ezt követően a beállított körülményeknek megfelelően humán szívizom homogenizátumot használtunk szubsztrátként és mértük a radioaktív foszfát beépülését (miokardiális fehérjékbe, szcintillációs számlálóval), valamint a foszforilálódó fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követően autoradiogramon is láthatóvá tettük (azonosítás, gélkép). Eredményink szerint habár a különböző izoenzimek esetében jelentős különbségek voltak felismerhetőek, a jól ismert, funkcionálisan karakterizált fehérjéket (troponinok, miozin könnyű lánc) (Jideama és munkatársai, 1996; Mochly-Rosen és Gordon, 1998) valamennyi izoforma képes volt foszforilálni. Mindezek arra utalhatnak, hogy az *in vivo* specificitásban a különféle izoformák szubcelluláris lokalizációja, targetingje kulcsfontosságú. Végül, hangsúlyoznunk kell, hogy az *in vitro* foszforilációs kísérletekben

valamennyi esetben exogén rekombináns enzimmal végeztük a foszforilációt. Ennek megfelelően a kapott eredmények pusztán arra utalnak, hogy hasonló mértékű hiszton H3S foszforilációs aktivitás mellett a miofibrilláris fehérjék irányában mért aktivitás izoenzimenként eltérő. Hangsúlyozni kell ugyanakkor, hogy az alkalmazott rekombináns PKC izoenzimek mennyisége és aktivitása ezen kísérletben nem mutat összefüggést az endogén kinázok mennyiségével/aktivitásával. A felhasznált izoenzimek egy része (pl. PKC γ) feltehetőleg nem expresszálódik a humán szívben, de a kísérlet célja annak bizonyítása volt, hogy a PKC mediált foszforilációban a katalitikus domén mellett központi szerepet játszanak egyéb tényezők (pl. célra irányítás, targeting) is.

Kísérleteink java részében ezért a PKC α intracelluláris targetingjét vizsgáltuk részletesen. Korábbi kísérletekben bebizonyosodott, hogy a Ca²⁺-koncentráció emelése szelektíven a PKC α transzlokációját indukálta patkány szívekben (Rybin és Steinberg, 1994). Ez felveti a PKC α kiemelkedő szerepét a kalcium-függő miofibrilláris-kontraktilitás szabályozásában. Egyes adatok szerint a PKC aktiváció csökkenti a miofibrilláris rendszer kontraktilitását (Belin és munkatársai, 2006; Belin és munkatársai, 2007), míg saját eredményeink szerint a PKC α a kontraktilitás fenntartásához járul hozzá. Mindenesetre a PKC α ígéretes terápiás célpontnak tűnik a szívizom kontraktilitásának javítására (Belin és munkatársai, 2007; Braz és munkatársai, 2004; Hambleton és munkatársai, 2006). Ezt a potenciált azonban feltehetően sejten belüli kötőhelyeinek (targeting) pontosabb feltárását követően tudjuk kihasználni.

Következő lépésben PKC α horganyzó fehérjéket vizsgáltuk. Kimutattuk a PKC α Ca²⁺-függő transzlokációját a miokardiális troponin I-hez, mely független a troponin komplex alkotóinak jelenlététől. A biokémiai eredményeinkkel összhangban az immunfluoreszcens felvételeken PKC α és cTnI kolkalizációt figyelhettünk meg humán kamrai szövetmintákban.

Fontos megemlíteni, hogy a PKC gátlása *ex vivo* körülmények között gyakran hatásos a különböző szívbetegségek (pl. szívinfarktus során megjelenő iszkémiás/reperfúziós károsodás, illetve a szívelégtelenség) során bekövetkező kontraktilitás csökkenés megelőzésében. A PKC a szervezet minden sejtípusában expresszálódik és változatos funkciókat lát el. Ennek megfelelően a PKC minden sejtre kiterjedő gátlása nem alkalmazható, és a PKC aktivitás modulálásán alapuló terápiás eljárások a megfelelő specifitás eléréséig váratnak magukra. Kísérleteink ezen a téren jelentős előrelépéssel szolgáltak, amennyiben kimutattuk, hogy a PKC α miofibrilláris hatásainak közvetítésében részt vesz a troponin I általi célra irányítása (targeting). Így felmerül annak a lehetősége, hogy

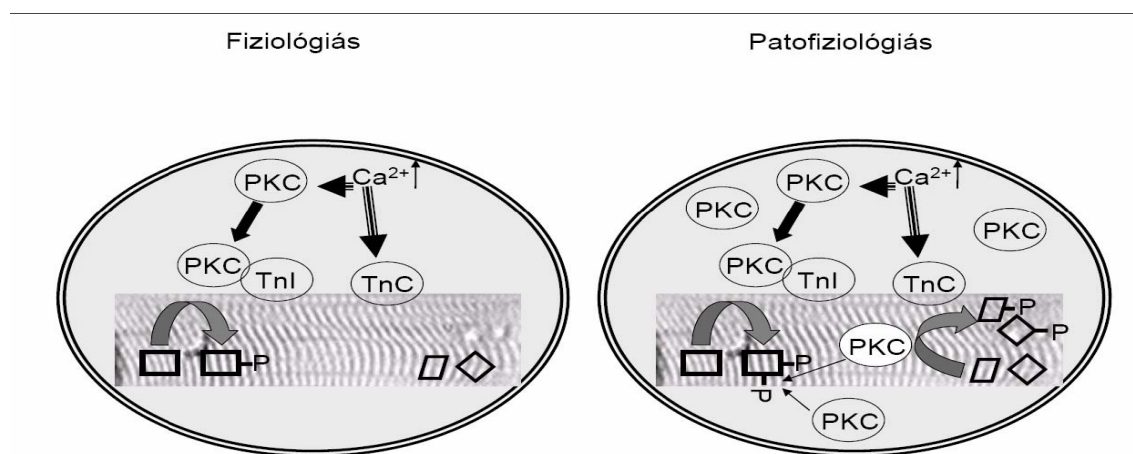
a PKC α troponin I asszociációjának gátlása/segítése révén a PKC α miofibrilláris rendszerre gyakorolt hatása szelektíven modulálható.

A jelátviteli folyamatok térbeli szabályozása horganyzó fehérjék segítségével az intracelluláris tér egy adott kompartmentére korlátozza a jelátviteli folyamatot, egyúttal több jelátviteli láncban szereplő molekulát is helyhez köthet, ami lehetővé teszi a jelátviteli útvonalak konvergálását. A PKC-hez kötődő fehérjék három nagy csoportba sorolhatóak. Egyik fontos csoportját a STICK (*Substrates That Interact with C-Kinase*) fehérjék alkotják, a második csoportba a RACK (*Receptors for Activated C-Kinase*) fehérjék tartoznak, melyek az enzim aktív konformációját stabilizálják, valamint az ellentétes hatású RICK (*Receptors for Inactivated C-Kinase*) fehérjék (Mochly-Rosen és Gordon, 1998). Miután a különböző kötő szekvenciák az izoenzimekre specifikusak, izgalmas lehetőségeket rejt magában a PKC izoenzimok szelektív aktiválására vagy gátlására.

Általában, a PKC aktiválás magába foglalja a DAG kötődését (vagy exogén megfelelőjének, a PMA-nak) a citoskeletonban található szolubilis enzimhez, amely rögzíti azt a membránstruktúrához. Amíg a TnI kétségtelenül a STICK-ek egyike az emberi szívben, addig, úgy tűnik, hogy az interakciót a TnI és a PKC α között egyedül a Ca²⁺ szabályozza, függetlenül a lipidektől. Az sdr fehérje, mely a caveolinokhoz kötődik, hasonló tulajdonsággal rendelkezik, mint a TnI, ugyanis DAG vagy annak analógjának hiányában, Ca²⁺-dependes módon kötődik a PKC α -hoz (Mineo és munkatársai, 1998). Ez a felfedezés is azt mutatja, hogy a Ca²⁺ olyan szerkezetváltozást idéz elő a PKC-ban, amely szabaddá teszi azokat a szekvenciákat, amelyek lehetővé teszik az interakciót a közeli/szomszédos proteinekkal. Ugyanakkor kimutatták, hogy amíg az sdr-PKC α kötődést a Ca²⁺ elősegíti, addig a foszfatidil szerin stabilizálja azt. Saját kísérleteinkben kétségtelenül stabil interakciót találtunk a TnI és a PKC α között lipidek hiányában, habár lehet, hogy a foszfatidil szerin *in vivo* részt vesz a komplex stabilitásának növelésében.

Masch megfigyelései rámutattak arra, hogy az intracelluláris szabad kalcium koncentráció időbeli és térbeli változásai meghatározó szerepet játszanak a PKC α lokalizációjában érfali simaizom sejtekben (Maasch és munkatársai, 2000). Hasonló elképzelés alkalmazható kamrai szívizomsejtek esetében is. Adataink szerint a PKC α szubcelluláris lokalizációja jelentősen megváltozik az intracelluláris szabad Ca²⁺ koncentráció megemelése által. Eredményeink ezen felül arra is rámutattak, hogy a kontrakció/relaxáció ciklus során a PKC α lokalizációja megváltozhat, transzlokálódhat a vékony filamentumhoz, átmenetileg kötődhet a TnI-hez Ca²⁺-függő módon, mely hozzájárulhat a kontraktilitás fenntartásához iszkémia/reperfúzió során. Másrészt, patológiás körülmények között a PKC α

mennyisége jelentősen megnő, amely feltehetően elvezet a fiziológias (saját adataink szerint troponin I-vel történő asszociáció keresztüli) szabályozás megbomlásához, számos miofibrilláris fehérje foszforilációja pedig a kontraktilitás csökkenéséhez (Belin és munkatársai, 2006; Belin és munkatársai, 2007) vezethet (22. ábra). Krónikus szívelégtelenség kapcsán (Bowling és munkatársai, 1999; Wang és munkatársai, 2003; van Velden és munkatársai, 2006) kimutatták a kalcium függő izoformák, PKC α , β I és β II szelektív upregulációját. Nincs összhang abban, hogy az intracelluláris foszforilációs folyamatok mely strukturális fehérjéket érintik. *In vitro* kísérletekben (Noland és munkatársai, 1989, 1993, 1996) bizonyították, hogy a troponin I (TnI), a troponinT (TnT), a miozin könnyűlánc 2 (MLC-2) és kardiális miozin kötő C fehérje (cMyBP-C) egyaránt szubsztrátjai a PKC-nek.



22. ábra A PKC szabályozása fiziológias és patológias körülmények között.

Fiziológiás körülmények között a kontrakció során megemelkedő intracelluláris Ca²⁺ koncentrációk hatására a PKC a troponin I-hez kötődik, és a környezetben elhelyezkedő fehérjék foszforilációja révén hozzájárul a kontraktilis erő fenntartásához. Ezzel szemben patológias körülmények között túltermelődik, ami nem csak a fiziológias szubsztrátok fokozott foszforilációját, hanem egyéb, fiziológias körülmények között nem foszforilálódó fehérje foszforilációját is kiválthatja. Ezen túlzott működés eredménye a kontraktilitás csökkenése lehet.

7. Összefoglalás

Méréseink alapján humán szívelégtelen mintákban szignifikáns oxidatív károsodás mutatható ki, szemben a kontroll humán donor mintákkal. Eredményeink szerint szívelégtelen betegekben és a donorokból származó mintáinkban a nitrált fehérjék tekintetében nincs különbség. Megfigyelhető a PARP-1 aktiváció és következményes fokozott poli(ADP-ribozil)áció szívelégtelen betegek szívizom mintáiban, ami további példával bővíti azon humán betegségek sorát, melyekben PARP-1 aktiváció kialakul. Ugyanakkor mi nem tudtuk kimutatni szignifikáns PARP-1 expressziónövekedést a szívelégtelen betegek mintáiban, ami felveti, hogy a mintáinkba megfigyelt fokozott poli-ADP-riboziláció hátterében a PARP-1 katalitikus alegység aktivitás fokozódása áll. Kaszpáz-9 expresszió szignifikánsan nagyobb volt szívelégtelen mintáinkban, mint a donorokban. Ezen adatok felvetik, hogy enyhe DNS károsodás esetén a PARP-1 aktiválódik és szerepet játszik a DNS-hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében. Spekuláció szintjén az is felvethető, hogy mintáink végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő betegekben származtak, akik talán sikeresen alkalmazkodtak a magasabb reaktív gyök szinthez és a következményes PARP-1 aktivációhoz.

Eredményeink ezen felül arra is rámutattak, hogy a kontrakció/relaxáció ciklus során a PKC α lokalizációja megváltozhat, transzlokálódhat a vékony filamentumhoz, átmenetileg kötődhet a TnI-hez Ca²⁺-függő módon, mely hozzájárulhat a kontraktilitás fenntartásához iszkémia/reperfúzió során. Úgy tűnik, hogy az interakciót a TnI és a PKC α között egyedül a Ca²⁺ szabályozza, függetlenül a lipidektől. A PKC α miofibrilláris hatásainak közvetítésében részt vesz a troponin I általi célra irányítása (targeting). Így felmerül annak a lehetősége, hogy a PKC α troponin I asszociációjának gátlása/segítése révén a PKC α miofibrilláris rendszerre gyakorolt hatása szelektíven modulálható. Mindenesetre a PKC α ígéretes terápiás célpontnak tűnik a szívizom kontraktilitásának javítására. Ezt a potenciált azonban feltehetően sejten belüli kötőhelyeinek (targeting) pontosabb feltárását követően tudjuk kihasználni. Fontos azt is megemlíteni, hogy patológias körülmények között a PKC α mennyisége jelentősen megnő, amely feltehetően elvezet a fiziológias (saját adataink szerint troponin I-vel történő asszociáción keresztüli) szabályozás megbomlásához, számos miofibrilláris fehérje foszforilációja pedig a végső közös úthoz, a kontraktilitás csökkenéséhez vezethet.

8. Tudományos eredmények hasznosíthatósága

A szívelégtelenség relatív gyakorisága miatt sok embert érintő malignus betegség (a betegség prevalenciája 1-2%). Ezért fontos kutatási feladat a miokardium kontraktilitását befolyásoló miofibrilláris és intracelluláris hatásmechanizmusok tisztázása, mert további adatokat nyújt a betegség jobb megértésére és az újabb terápiás lehetőségek kialakítására.

Vizsgálatainknak jelentőségét az adta, hogy kísérleteinket humán preprátumokon végeztük. Így az általunk észlelt mechanikai és biokémiai eltérések direkt módon adaptálhatók.

A szívizom kontraktilitásának szabályozása egy fontos élettani funkció a szívizom működése szempontjából. Az élettani szabályozás pontos megértése elengedhetetlen a patológiás történések követéséhez.

9. Irodalom

9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

- Anderson, P. A., Malouf, N. N., Oakeley, A. E., Pagani, E. D., and Allen, P. D. (1991), Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle *Circ.Res.* (69): 1226-1233.
- Anversa, P., Capasso, J. M., Olivetti, G., and Sonnenblick, E. H. (1992), Cellular basis of ventricular remodeling in hypertensive cardiomyopathy *Am.J.Hypertens.* (5): 758-770.
- Bartunek, J., Vanderheyden, M., Knaapen, M. W., Tack, W., Kockx, M. M., and Goethals, M. (2002), Deoxyribonucleic acid damage/repair proteins are elevated in the failing human myocardium due to idiopathic dilated cardiomyopathy *J.Am.Coll.Cardiol.* (40): 1097-1103.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990), Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (87): 1620-1624.
- Belin, R. J., Sumandea, M. P., Allen, E. J., Schoenfelt, K., Wang, H., Solaro, R. J., and de Tombe, P. P. (2007), Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure *Circ.Res.* (101): 195-204.
- Belin, R. J., Sumandea, M. P., Kobayashi, T., Walker, L. A., Rundell, V. L., Urboniene, D., Yuzhakova, M., Ruch, S. H., Geenen, D. L., Solaro, R. J., and de Tombe, P. P. (2006), Left ventricular myofilament dysfunction in rat experimental hypertrophy and congestive heart failure *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* (291): H2344-H2353.
- Berry, C. E. and Hare, J. M. (2004), Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications *J.Physiol* (555): 589-606.

- Beyer, R. E. (1990), The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation *Free Radic.Biol.Med.* (8): 545-565.
- Bilchick, K. C., Duncan, J. G., Ravi, R., Takimoto, E., Champion, H. C., Gao, W. D., Stull, L. B., Kass, D. A., and Murphy, A. M. (2006), Heart failure-associated alterations in troponin I phosphorylation impair ventricular relaxation-afterload and force-frequency responses and systolic function *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* (292): H318-H325.
- Bollag, W. (1983), Vitamin A and retinoids: from nutrition to pharmacotherapy in dermatology and oncology *Lancet.* (1): 860-863.
- Borbely, A., Toth, A., Edes, I., Virag, L., Papp, J. G., Varro, A., Paulus, W. J., van, der, V, Stienen, G. J., and Papp, Z. (2005), Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells *Cardiovasc.Res.* (67): 225-233.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., and Saran, M. (1990), Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies *Methods Enzymol.* (186:343-55.): 343-355.
- Bowling, N., Walsh, R. A., Song, G. J., Estridge, T., Sandusky, G. E., Fouts, R. L., Mintze, K., Pickard, T., Roden, R., Bristow, M. R., Sabbah, H. N., Mizrahi, J. L., Gromo, G., King, G. L., and Vlahos, C. J. (1999), Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart *Circulation* (99): 384-391.
- Braun, M. U., Szalai, P., Strasser, R. H., and Borst, M. M. (2003), Right ventricular hypertrophy and apoptosis after pulmonary artery banding: regulation of PKC isozymes *Cardiovascular Research* (59): 658-667.
- Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., Nairn, A. C., Liggett, S. B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E.

- G., DePaoli-Roach, A. A., Robbins, J., Hewett, T. E., Bibb, J. A., Westfall, M. V., Kranias, E. G., and Molkenin, J. D. (2004), PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure *Nat.Med.* (10): 248-254.
- Brenner, C. and Kroemer, G. (2000), Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators *Science.* (289): 1150-1151.
- Burkart, E. M., Sumandea, M. P., Kobayashi, T., Nili, M., Martin, A. F., Homsher, E., and Solaro, R. J. (2003), Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein kinase C sites on cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity *J.Biol.Chem.* (278): 11265-11272.
- Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. (1993), An introduction to free radical biochemistry *Br.Med.Bull.* (49): 481-493.
- Chen, L., Hahn, H., Wu, G., Chen, C. H., Liron, T., Schechtman, D., Cavallaro, G., Banci, L., Guo, Y., Bolli, R., Dorn, G. W., and Mochly-Rosen, D. (2001), Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (98): 11114-11119.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J. M. (1997), Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases *Science.* (278): 1966-1968.
- Crompton, M. (1999), The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death *Biochem.J.* (341): 233-249.
- Damron, D. S., Darvish, A., Murphy, L., Sweet, W., Moravec, C. S., and Bond, M. (1995), Arachidonic Acid-Dependent Phosphorylation of Troponin-I and Myosin Light-Chain-2 in Cardiac Myocytes *Circulation Research* (76): 1011-1019.

- Damy, T., Ratajczak, P., Shah, A. M., Camors, E., Marty, I., Hasenfuss, G., Marotte, F., Samuel, J. L., and Heymes, C. (2004), Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart *Lancet* (363): 1365-1367.
- de Boer, R. A., van Veldhuisen, D. J., van der, Wijk J., Brouwer, R. M., de Jonge, N., Cole, G. M., and Suurmeijer, A. J. (2000), Additional use of immunostaining for active caspase 3 and cleaved actin and PARP fragments to detect apoptosis in patients with chronic heart failure *J.Card Fail.* (6): 330-337.
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M., and Netticadan, T. (2000), Role of oxidative stress in cardiovascular diseases *J.Hypertens.* (18): 655-673.
- Di Napoli, P., Taccardi, A. A., Grilli, A., Felaco, M., Balbone, A., Angelucci, D., Gallina, S., Calafiore, A. M., De Caterina, R., and Barsotti, A. (2003), Left ventricular wall stress as a direct correlate of cardiomyocyte apoptosis in patients with severe dilated cardiomyopathy *Am.Heart J.* (146): 1105-1111.
- Disatnik, M. H., Buraggi, G., and Mochly-Rosen, D. (1994), Localization of Protein-Kinase-C Isozymes in Cardiac Myocytes *Experimental Cell Research* (210): 287-297.
- Dorn, G., W. (2009), Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling *Cardiovasc.Res.* (81):465-73.
- Dorn, G., W. and Force, T. (2005), Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy *J.Clin.Invest.* (115): 527-537.
- Douglas, L., and Mann, M., D. (1999) Mechanisms and Models in Heart Failure: A Combinatorial Approach *Circulation.* (100):999-1008
- Ducharme, A., Frantz, S., Aikawa, M., Rabkin, E., Lindsey, M., Rohde, L. E., Schoen, F. J., Kelly, R. A., Werb, Z., Libby, P., and Lee, R. T. (2000), Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction *J.Clin.Invest.* (106): 55-62.

- Ebashi, S., Masaki, T., Tsukui, R. (1974) Cardiac contractile proteins *Adv.Cardiol.* (12): 59-69.
- Edes, I. (2000) A szív- és simaizom Ca²⁺-anyagcseréje: elmélet, klinikum Budapest: Golden Book Kiadó.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998), A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD *Nature.* (391): 43-50.
- Fabiato, A. and Fabiato, F. (1979), Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells *J.Physiol (Paris).* (75): 463-505.
- Ferdinandy, P., Danial, H., Ambrus, I., Rothery, R. A., and Schulz, R. (2000), Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure *Circ.Res.* (87): 241-247.
- Ferrari, R., Guardigli, G., Mele, D., Percoco, G. F., Ceconi, C., and Curello, S. (2004), Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure *Curr.Pharm.Des.* (10): 1699-1711.
- Fowler, M. B., Laser, J. A., Hopkins, G. L., Minobe, W., and Bristow, M. R. (1986), Assessment of the beta-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response *Circulation.* (74): 1290-1302.
- Frank, D., Kuhn, C., Katus, H. A., Frey, N. (2006) The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease *J.Mol.Med.* (84): 446-68.
- Fridovich, I. (1986), Biological effects of the superoxide radical *Arch.Biochem.Biophys.* (247): 1-11.

- Frustaci, A., Kajstura, J., Chimenti, C., Jakoniuk, I., Leri, A., Maseri, A., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. (2000), Myocardial cell death in human diabetes *Circ.Res.* (87): 1123-1132.
- Fukuchi, M., Hussain, S. N., and Giaid, A. (1998), Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and beta-adrenergic receptor therapy *Circulation* (98): 132-139.
- Gealekman, O., Abassi, Z., Rubinstein, I., Winaver, J., and Binah, O. (2002), Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure *Circulation* (105): 236-243.
- Giordano, F. J. (2005), Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure *J.Clin.Invest* (115): 500-508.
- Goldberg, M. and Steinberg, S. F. (1996), Tissue-specific developmental regulation of protein kinase C isoforms *Biochemical Pharmacology* (51): 1089-1093.
- Goldspink, P. H., Montgomery, D. E., Walker, L. A., Urboniene, D., McKinney, R. D., Geenen, D. L., Solaro, R. J., and Buttrick, P. M. (2004), Protein kinase Cepsilon overexpression alters myofilament properties and composition during the progression of heart failure *Circ.Res.* (95): 424-432.
- Gruss, H. J. and Dower, S. K. (1995), The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases *Cytokines Mol.Ther.* (1): 75-105.
- Gu, X. and Bishop, S. P. (1994), Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat *Circ.Res.* (75): 926-931.
- Gutteridge, J. M. (1995), Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage *Clin.Chem.* (41): 1819-1828.

- Halliwell, B. (1987), Oxidants and human disease: some new concepts *FASEB J.* (1): 358-364.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1986), Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts *Arch.Biochem.Biophys.* (246): 501-514.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004), Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br.J.Pharmacol.* (142): 231-255.
- Hambleton, M., Hahn, H., Pleger, S. T., Kuhn, M. C., Klevitsky, R., Carr, A. N., Kimball, T. F., Hewett, T. E., Dorn, G. W., Koch, W. J., and Molkentin, J. D. (2006), Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase C α / β enhances cardiac contractility and attenuates heart failure *Circulation.* (114): 574-582.
- Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2003), Role of oxidative stress in atherosclerosis *Am.J.Cardiol.* (91): 7A-11A.
- Hengartner, M. O. (2000), The biochemistry of apoptosis *Nature* (407): 770-776.
- Himmelfarb, J., Stenvinkel, P., Ikizler, T. A., and Hakim, R. M. (2002), The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia *Kidney Int.* (62): 1524-1538.
- Huang, X. P., Li, J., Foster, D., Lemanski, S. L., Dube, D. K., Zhang, C., and Lemanski, L. F. (2002), Protein kinase C-mediated desmin phosphorylation is related to myofibril disarray in cardiomyopathic hamster heart *Experimental Biology and Medicine* (227): 1039-1046.
- Hughes, S. E. (2003), Detection of apoptosis using in situ markers for DNA strand breaks in the failing human heart. Fact or epiphenomenon? *J.Pathol.* (201): 181-186.

- Hunt, M. J., Aru, G. M., Hayden, M. R., Moore, C. K., Hoit, B. D., and Tyagi, S. C. (2002), Induction of oxidative stress and disintegrin metalloproteinase in human heart end-stage failure *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* (283): L239-L245.
- Huxley, A. F., Niedergerke, R. (1954), Structural changes in muscle during contraction *Nature* (173): 971-973.
- Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Suematsu, N., Hayashidani, S., Ichikawa, K., Utsumi, H., Machida, Y., Egashira, K., and Takeshita, A. (2000), Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium *Circ.Res.* (86): 152-157.
- Ignarro, L. J., Napoli, C., and Loscalzo, J. (2002), Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview *Circ.Res.* (90): 21-28.
- Ishida, H., Ichimori, K., Hirota, Y., Fukahori, M., and Nakazawa, H. (1996), Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury *Free Radic.Biol.Med.* (20): 343-350.
- Jagtap, P. and Szabo, C. (2005), Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors *Nat.Rev.Drug Discov.* (4): 421-440.
- Jideama, N. M., Noland, T. A., Raynor, R. L., Blobe, G. C., Fabbro, D., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Hannun, Y. A., and Kuo, J. F. (1996), Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties *Journal of Biological Chemistry* (271): 23277-23283.
- Karmazyn, M. and Moffat, M. P. (1993), Role of Na⁺/H⁺ exchange in cardiac physiology and pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox *Cardiovasc.Res.* (27): 915-924.
- Kirshenbaum, L. A. (1998), Regulators of apoptosis in the heart: a matter of life and death *Can.J.Cardiol.* (14): 457-460.

- Koda, M., Takemura, G., Kanoh, M., Hayakawa, K., Kawase, Y., Maruyama, R., Li, Y., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., and Fujiwara, H. (2003), Myocytes positive for in situ markers for DNA breaks in human hearts which are hypertrophic, but neither failed nor dilated: a manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure *J.Pathol.* (199): 229-236.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., and Williams, L. T. (1997), Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis *Science.* (278): 294-298.
- Kumar, D. and Jugdutt, B. I. (2003), Apoptosis and oxidants in the heart *J.Lab Clin.Med.* (142): 288-297.
- Kwan, J. A., Schulze, C. J., Wang, W., Leon, H., Sariahmetoglu, M., Sung, M., Sawicka, J., Sims, D. E., Sawicki, G., and Schulz, R. (2004), Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro *FASEB J.* (18): 690-692.
- LeWinter, M., M. (2004), Titin isoforms in heart failure: are there benefits to supersizing? *Circulation.* (110):109-111.
- Li, Y. Y. and Feldman, A. M. (2001), Matrix metalloproteinases in the progression of heart failure: potential therapeutic implications *Drugs* (61): 1239-1252.
- Liew, C. C. and Dzau, V. J. (2004), Molecular genetics and genomics of heart failure *Nat.Rev.Genet.* (5): 811-825.
- Maasch, C., Wagner, S., Lindschau, C., Alexander, G., Buchner, K., Gollasch, M., Luft, F. C., and Haller, H. (2000), Protein kinase C alpha targeting is regulated by temporal and spatial changes in intracellular free calcium concentration [Ca²⁺]_i *Faseb Journal* (14): 1653-1663.

- Mallat, Z., Philip, I., Lebret, M., Chatel, D., Maclouf, J., and Tedgui, A. (1998), Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂α in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure *Circulation* (97): 1536-1539.
- Mariani, E. Polidori, M., C., Cherubinina, A., and Mecocci, P. (2005), Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview *J.Chromatogr.B.Analyt.Technol. Biomed. Life. Sci.* (827): 65-75.
- Massion, P. B., Feron, O., Dessy, C., and Balligand, J. L. (2003), Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing *Circ.Res.* (93): 388-398.
- Mercadier, J. J., Lompre, A. M., Wisnewsky, C., Samuel, J. L., Bercovici, J., Swynghedauw, B., and Schwartz, K. (1981), Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy *Circ.Res.* (49): 525-532.
- Mineo, C., Ying, Y. S., Chapline, C., Jaken, S., and Anderson, R. G. W. (1998), Targeting of protein kinase C alpha to caveolae *Journal of Cell Biology* (141): 601-610.
- Mochly-Rosen, D. (1995), Localization of Protein-Kinases by Anchoring Proteins - A Theme in Signal-Transduction *Science* (268): 247-251.
- Mochly-Rosen, D. and Gordon, A. S. (1998), Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity *Faseb Journal* (12): 35-42.
- Montgomery, D. E., Wolska, B. M., Pyle, W. G., Roman, B. B., Dowell, J. C., Buttrick, P. M., Koretsky, A. P., Del Nido, P., and Solaro, R. J. (2002), alpha-Adrenergic response and myofilament activity in mouse hearts lacking PKC phosphorylation sites on cardiac TnI *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* (282): H2397-H2405.
- Mortensen, S. A. (1993), Perspectives on therapy of cardiovascular diseases with coenzyme Q10 (ubiquinone) *Clin.Investig.* (71): S116-S123.

- Mungrue, I. N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D. J., and Husain, M. (2002), Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death *J.Clin.Invest* (109): 735-743.
- Murthy, K. G., Xiao, C. Y., Mabley, J. G., Chen, M., and Szabo, C. (2004), Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in circulating leukocytes during myocardial infarction *Shock* (21): 230-234.
- Muth, J. N., Yamaguchi, H., Mikala, G., Grupp, I. L., Lewis, W., Cheng, H., Song, L. S., Lakatta, E. G., Varadi, G., and Schwartz, A. (1999), Cardiac-specific overexpression of the alpha(1) subunit of the L-type voltage-dependent Ca(2+) channel in transgenic mice. Loss of isoproterenol-induced contraction *J.Biol.Chem.* (274): 21503-21506.
- Nakamura, A. and Goto, S. (1996), Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis *J.Biochem.* (119): 768-774.
- Nakamura, K., Kusano, K., Nakamura, Y., Kakishita, M., Ohta, K., Nagase, S., Yamamoto, M., Miyaji, K., Saito, H., Morita, H., Emori, T., Matsubara, H., Toyokuni, S., and Ohe, T. (2002), Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium *Circulation* (105): 2867-2871.
- Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1997), Caspases: killer proteases *Trends Biochem.Sci.* (22): 299-306.
- Noguchi, T., Hunlich, M., Camp, P. C., Begin, K. J., El Zaru, M., Patten, R., Leavitt, B. J., Ittleman, F. P., Alpert, N. R., LeWinter, M. M., and VanBuren, P. (2004), Thin filament-based modulation of contractile performance in human heart failure *Circulation* (110): 982-987.

- Noland, T. A., Guo, X. D., Raynor, R. L., Jideama, N. M., Averyhartfullard, V., Solaro, R. J., and Kuo, J. F. (1995), Cardiac Troponin-I Mutants - Phosphorylation by Protein-Kinase-C and Protein-Kinase-A and Regulation of Ca²⁺-Stimulated MgATPase of Reconstituted Actomyosin S-1 *Journal of Biological Chemistry* (270): 25445-25454.
- Noland, T. A. and Kuo, J. F. (1992), Protein-Kinase-C Phosphorylation of Cardiac Troponin-T Decreases Ca²⁺-Dependent Actomyosin MgATPase Activity and Troponin-T Binding to Tropomyosin-F-Actin Complex *Biochemical Journal* (288): 123-129.
- Noland, T. A., Jr. and Kuo, J. F. (1993), Phosphorylation of cardiac myosin light chain 2 by protein kinase C and myosin light chain kinase increases Ca²⁺-stimulated actomyosin MgATPase activity *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (193): 254-260.
- Noland, T. A., Jr., Raynor, R. L., Jideama, N. M., Guo, X., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Solaro, R. J., and Kuo, J. F. (1996), Differential regulation of cardiac actomyosin S-1 MgATPase by protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of specific sites in cardiac troponin I and its phosphorylation site mutants *Biochemistry.* (35): 14923-14931.
- Noland, T. A., Raynor, R. L., and Kuo, J. F. (1989), Identification of Sites Phosphorylated in Bovine Cardiac Troponin-I and Troponin-T by Protein Kinase-C and Comparative Substrate Activity of Synthetic Peptides Containing the Phosphorylation Sites *Journal of Biological Chemistry* (264): 20778-20785.
- Okada, H., Takemura, G., Koda, M., Kanoh, M., Kawase, Y., Minatoguchi, S., and Fujiwara, H. (2005), Myocardial apoptotic index based on in situ DNA nick end-labeling of endomyocardial biopsies does not predict prognosis of dilated cardiomyopathy *Chest.* (128): 1060-1062.
- Pacher, P., Liaudet, L., Bai, P., Mabley, J. G., Kaminski, P. M., Virag, L., Deb, A., Szabo, E., Ungvari, Z., Wolin, M. S., Groves, J. T., and Szabo, C. (2003), Potent

- metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction *Circulation* (107): 896-904.
- Pacher, P., Liaudet, L., Mabley, J., Komjati, K., and Szabo, C. (2002a), Pharmacologic inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase may represent a novel therapeutic approach in chronic heart failure *J.Am.Coll.Cardiol.* (40): 1006-1016.
- Pacher, P., Liaudet, L., Soriano, F. G., Mabley, J. G., Szabo, E., and Szabo, C. (2002b), The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes *Diabetes* (51): 514-521.
- Pacher, P., Obrosova, I. G., Mabley, J. G., and Szabo, C. (2005), Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies *Curr.Med.Chem.* (12): 267-275.
- Palmer, S. and Kentish, J. C. (1994), The role of troponin C in modulating the Ca²⁺ sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres *J.Physiol.* (480): 45-60.
- Pennathur, S. and Heinecke, J. W. (2004), Mechanisms of oxidative stress in diabetes: implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy *Front Biosci.* (9:565-74.): 565-574.
- Pi, Y., Zhang, D., Kemnitz, K. R., Wang, H., and Walker, J. W. (2003), Protein kinase C and A sites on troponin I regulate myofilament Ca²⁺ sensitivity and ATPase activity in the mouse myocardium *J.Physiol.* (552): 845-857.
- Pillai, J. B., Russell, H. M., Raman, J., Jeevanandam, V., and Gupta, M. P. (2005), Increased expression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 contributes to caspase-independent myocyte cell death during heart failure *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* (288): H486-H496.

- Polidori, M. C., Savino, K., Alunni, G., Freddio, M., Senin, U., Sies, H., Stahl, W., and Mecocci, P. (2002), Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity *Free Radic.Biol.Med.* (32): 148-152.
- Pryor, W. A. (1982), Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (393:1-22.): 1-22.
- Pyle, W. G., Sumandea, M. P., Solaro, R. J., and de Tombe, P. P. (2002), Troponin I serines 43/45 and regulation of cardiac myofilament function *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* (283): H1215-H1224.
- Richter, B. W. and Duckett, C. S. (2000), The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond *Sci.STKE.* (2000): E1-
- Rochette, L., Tatou, E., Vergely, C., Maupoil, V., Bouchot, O., Mossiat, C., Jazayeri, S., Benkhadra, S., Brenot, R., Girard, C., and David, M. (2008), Regional heterogeneity of decreased myocardial norepinephrine and increased lipid peroxidation levels in patients with end-stage failing heart secondary to dilated or ischemic cardiomyopathy *J.Heart Lung Transplant.* (27): 767-774.
- Roman, B. B., Goldspink, P. H., Spaite, E., Urboniene, D., McKinney, R., Geenen, D. L., Solaro, R. J., and Buttrick, P. M. (2004), Inhibition of PKC phosphorylation of cTnI improves cardiac performance in vivo *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* (286): H2089-H2095.
- Rybin, V. O. and Steinberg, S. F. (1994), Protein-Kinase-C Isoform Expression and Regulation in the Developing Rat-Heart *Circulation Research* (74): 299-309.
- Sakthivel, S., Finley, N. L., Rosevear, P. R., Lorenz, J. N., Gulick, J., Kim, S., VanBuren, P., Martin, L. A., and Robbins, J. (2005), In vivo and in vitro analysis of cardiac troponin I phosphorylation *J.Biol.Chem.* (280): 703-714.

- Schaub, M.,C., Hefti, M.,A., and Zaugg, M. (2006) Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes *J.Mol.Cell.Cardiol.* (41): 183–214.
- Scruggs, S. B., Walker, L. A., Lyu, T., Geenen, D. L., Solaro, R. J., Buttrick, P. M., and Goldspink, P. H. (2006), Partial replacement of cardiac troponin I with a non-phosphorylatable mutant at serines 43/45 attenuates the contractile dysfunction associated with PKCepsilon phosphorylation *J.Mol.Cell Cardiol.* (40): 465-473.
- Sies, H. and Murphy, M. E. (1991), Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage *J.Photochem.Photobiol.B.* (8): 211-218.
- Simonis, G., Briem, S. K., Schoen, S. P., Bock, M., Marquetant, R., and Strasser, R. H. (2007), Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic stenosis or dilated cardiomyopathy *Mol.Cell Biochem.* (305): 103-111.
- Singal, P. K., Khaper, N., Palace, V., and Kumar, D. (1998), The role of oxidative stress in the genesis of heart disease *Cardiovasc.Res.* (40): 426-432.
- Slater, T. F. (1984), Free-radical mechanisms in tissue injury *Biochem.J.* (222): 1-15.
- Sodha, N. R., Clements, R. T., Bianchi, C., and Sellke, F. W. (2008), Cardiopulmonary bypass with cardioplegic arrest activates protein kinase C in the human myocardium *J.Am.Coll.Surg.* (206): 33-41.
- Solaro, R. J., Pang, D. C., and Briggs, F. N. (1971), The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100 *Biochim.Biophys.Acta.* (245): 259-262.
- Soldani, C. and Scovassi, A. I. (2002), Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update *Apoptosis.* (7): 321-328.
- Sonnenblick, E. H. (1968) Correlation of myocardial ultrastructure and function *Circulation.* (38): 29-44.

- Sorescu, D. and Griendling, K. K. (2002), Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure *Congest.Heart Fail.* (8): 132-140.
- Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. (1999), Catalytic properties of the caspases *Cell Death.Differ.* (6): 1054-1059.
- Szabo, C. (2003), Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity *Toxicol.Lett.* (140-141:105-12.): 105-112.
- Szabo, C., Liaudet, L., Hagl, S., and Szabo, C. (2004a), Poly(ADP-ribose) polymerase activation in the reperfused myocardium *Cardiovasc.Res.* (61): 471-480.
- Szabo, C., Mabley, J. G., Moeller, S. M., Shimanovich, R., Pacher, P., Virag, L., Soriano, F. G., Van Duzer, J. H., Williams, W., Salzman, A. L., and Groves, J. T. (2002a), Part I: pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst *Mol.Med.* (8): 571-580.
- Szabo, G. and Bahrle, S. (2005), Role of nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in myocardial reperfusion injury *Curr.Vasc.Pharmacol.* (3): 215-220.
- Szabo, G., Bahrle, S., Stumpf, N., Sonnenberg, K., Szabo, E. E., Pacher, P., Csont, T., Schulz, R., Dengler, T. J., Liaudet, L., Jagtap, P. G., Southan, G. J., Vahl, C. F., Hagl, S., and Szabo, C. (2002b), Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition reduces reperfusion injury after heart transplantation *Circ.Res.* (90): 100-106.
- Szabo, G., Soos, P., Mandra, S., Heger, U., Flechtenmacher, C., Bahrle, S., Seres, L., Cziraki, A., Gries, A., Zsengeller, Z., Vahl, C. F., Hagl, S., and Szabo, C. (2004b), INO-1001 a novel poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor improves cardiac and pulmonary function after crystalloid cardioplegia and extracorporeal circulation *Shock.* (21): 426-432.

- Takeishi, Y., Chu, G. X., Kirkpatrick, D. M., Li, Z. L., Wakasaki, H., Kranias, E. G., King, G. L., and Walsh, R. A. (1998), In vivo phosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase C beta 2 decreases cardiomyocyte calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts *Journal of Clinical Investigation* (102): 72-78.
- Taniyama, Y. and Griendling, K. K. (2003), Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms *Hypertension*. (42): 1075-1081.
- Thiemermann, C., Bowes, J., Myint, F. P., and Vane, J. R. (1997), Inhibition of the activity of poly(ADP ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (94): 679-683.
- Tyagi, S. C. and Hayden, M. R. (2003), Role of nitric oxide in matrix remodeling in diabetes and heart failure *Heart Fail.Rev.* (8): 23-28.
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E., and Lohse, M. J. (1993), Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart *Circulation*. (87): 454-463.
- Valgimigli, M., Merli, E., Malagutti, P., Soukhomovskaia, O., Cicchitelli, G., Macri, G., and Ferrari, R. (2003), Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress *Arch.Biochem.Biophys.* (420): 255-261.
- van der Velden, J., Narolska, N. A., Lamberts, R. R., Boontje, N. M., Borbely, A., Zaremba, R., Bronzwaer, J. G., Papp, Z., Jaquet, K., Paulus, W. J., and Stienen, G. J. (2006), Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium *Cardiovasc.Res.* (69): 876-887.
- Virag, L. and Szabo, C. (2002), The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors *Pharmacol.Rev.* (54): 375-429.

- Wang, J., Liu, X., Sentex, E., Takeda, N., and Dhalla, N. S. (2003), Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* (284): H2277-H2287.
- Waring, W. S., Webb, D. J., and Maxwell, S. R. (2001), Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers *J.Cardiovasc.Pharmacol.* (38): 365-371.
- Xiao, C. Y., Chen, M., Zsengeller, Z., Li, H., Kiss, L., Kollai, M., and Szabo, C. (2005), Poly(ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure *J.Pharmacol.Exp.Ther.* (312): 891-898.
- Zile, M., R., Baicu, C., F., and Gaasch, W., H. (2004) Diastolic heart failure –abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N.Engl.J.Med.*(350):1953-9.
- Zimmer, H., G. (2002) Who Discovered the Frank-Starling Mechanism? *News Physiol Sci* (17): 181-184.
- Zorc, M., Porenta, O. V., Pleskovic, R., Radovanovic, N., Cijan, A., Milosavijevic, A., and Petrovic, D. (2001), Myocytes' apoptosis and proliferation in endomyocardial biopsy as prognostic factors in terminal heart failure *Pflugers Arch.* (442): R163-R164.
- Zorc, M., Vraspir-Porenta, O., Zorc-Pleskovic, R., Radovanovic, N., and Petrovic, D. (2003), Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end-stage dilated cardiomyopathy *Cardiovasc.Pathol.* (12): 36-39.
- Zot, A. S. and Potter, J. D. (1987), Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* (16:535-59.): 535-559.

Molnár A, Tóth A, Bagi Z, Papp Z, Édes I, Vaszily M, Galajda Z, Papp G, Varró A, Szüts V, Domokos G, Lacza Z, Szabó C. Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Exp. Clin. Cardiol.* 2006; 11, 3.

Előadások:

Molnár A., Szilágyi S., Vaszily M., Papp Z., Édes I., Tóth A. The role of PKC isozymes on the regulation of contraction of human cardiomyocytes. *Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred, Hungary. 2004*

Molnár A., Szilágyi S, Papp Z., Vaszily M., Édes I., Tóth A. PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. *6th Meeting France-New CEE members, La Grande-Motte, France. 2004*

Molnár A., Szilágyi S., Borbély A., Vaszily M., Édes I., Papp Z., Tóth A. Translocation and substrate specificity of protein kinase C alpha isozyme in human myocardium. *Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred, Hungary. 2005*

Molnár A., Tóth A., Bagi Z., Papp Z., Édes I., Vaszily M., Galajda Z., Papp G., Varró A., Szüts V., Domokos G., Lacza Z., Szabó C. Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred, Hungary. 2006*

Molnár A., Pásztorné Tóth E., Jaquet K., Szüts V., Varró A., Papp G., Vaszily M., Galajda Z., Bagi Z., Papp Z., Édes I., Blumberg P. M., Tóth A. Ca²⁺ dependent anchoring of PKC alpha to the contractile system of human ventricular cardiomyocytes. *70th Meeting of the Hungarian Physiological Society, Szeged, Hungary. 2006*

Poszterek:

Molnár A., Szilágyi S., Papp Z., Vaszily M., Édes I., Tóth A. PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. *XXXIII. European Muscle Conference, Isola d'Elba, Italy. 2004*

Molnár A., Szilágyi S., Papp Z., Vaszily M., Édes I. Tóth A. PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. *6th Meeting France-New CEE members, La Grande-Motte, France. 2004*

Molnár A., Szilágyi S., Borbély A., Vaszily M., Varró A., Papp J.Gy., Édes I., Papp Z., Tóth A. PKC alpha in the human myocardium: expression, translocation and possible functions. *XXXIV European Muscle Conference, Máta, Hungary. 2005*

Molnár A., Tóth A., Bagi Zs, Papp Z., Édes I., Vaszily M., Galajda Z., Papp J. Gy., Varró A., Szüts V., Domokos G., Lacza Zs., Szabó Cs. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human hear failure. *V. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, Pécs, Hungary. 2006*

10. Köszönetnyilvánítás

Értekezésem végén szeretném megköszönni mindazoknak a segítségét, akik az eddigi többéves munkámban a segítségemre voltak:

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Kardiológiai Intézet munkatársainak, kiemelten Professzor Dr. Édes István Intézet Igazgató Úrnak, hogy a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola keretében végzett munkámat mindenkor támogatták.

Köszönettel tartozom a Klinikai Fiziológia Tanszék vezetőjének, Dr. Papp Zoltánnak, illetve köszönet illeti a közleményekben szereplő minden szerzőtársat, a Klinikai Fiziológiai-labor és a Szívsebészeti Tanszék munkatársait, hogy támogatták munkámat.

Külön köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Tóth Attilának a munkámhoz nyújtott pótolhatatlan segítségéért.

Végezetül, de nem utolsó sorban köszönöm Balogh Attilának, kedvesemnek a biztató szavait, a mellettem való kitartását és szüleimnek a sok türelmet, a sok éves biztatást.

11. Bekötött publikációk