

MISSENSE MUTÁCIÓK ÉS A PKA-FOSZFORILÁCIÓ HATÁSA A CALPAIN-I-INDUKÁLT CTNI HASÍTHATÓSÁGRA

Barta Judit, Tóth Attila, Hertelendi Zita, Édes István, Jaquet Kornelia*, Reidlich Alexander*, Papp Zoltán
 DEOEC Kardiológiai Klinika, Debrecen;
 *Institute für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum, Germany

ischaemia, myocardial proteins, experimental

A myocardialis troponin I (cTnI) a troponin komplex inhibitoros komponense, melynek Calpain-I (Ca^{2+} -függő proteáz) indukált proteolízise szerepet kaphat a myocardium fiziológiai folyamataiban és az ischaemiás/reperfúziós károsodásban egyaránt. A hypertrophias cardiomyopathia (HCM) egyes típusaiban missense mutációt szenvedett cTnI molekulákat írtak le, végstádiumú szívelégtelenségben pedig korábban azt találták, hogy a cTnI foszforiláltsága jelentősen csökken. Jelenleg még nem ismert, hogy a HCM-hez társuló mutációk és a megváltozott foszforiláltsági állapot befolyásolja-e a cTnI Calpain-I mediált hasíthatóságát. Kísérleteink során molekuláris biológiai módszerekkel előállított és tisztított human cTnI fehérjéket (vad típusú (WT)), mutáns cTnI (G203S, K206Q, R145G), izoláltak és troponin komplexben, nem foszforilált és proteinkináz A- (PKA) foszforilált formában) 1 mM Ca^{2+} jelenlétében (pH: 7,5; T: 30 °C) *in vitro* proteolizáltunk. A proteolízis elindításához exogén Calpain-I (1 U) használtunk. Kontrollként Ca^{2+} -mentes közegben és Calpain-inhibitor jelenlétében történt inkubációk szolgáltak. A fehérje-degradáció megítélésére Western immunoblot módszert alkalmaztunk. A proteolízis kinetikáját a 0,5, 30, 60 és 120 perc inkubációt követő mintavételek alapján rekonstruáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a WTcTnI-hez hasonlóan a mutáns fehérjék izoláltak, troponin komplex formában, nem foszforilált és PKA-foszforilált formában egyaránt bomlanak Calpain-I hatására. A Calpain-I iránti érzékenységben azonban különbségeket észleltünk. A foszforiláció minden esetben részleges védelmet biztosított a Calpain-I mediált degradációval szemben. Amennyiben a cTnI nem izoláltak, hanem komplex formában volt jelen, szintén kevésbé intenzív proteolízis alakult ki. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a β -adrenerg inger hatására bekövetkező PKA-foszforiláció effektív védelmet nyújt a komplex formában levő cTnI Calpain-I- β függő degradációjával szemben.

Ez a munka a 6002-1/01/ETT támogatás segítségével valósult meg.

AZ AKTÍV ORTHOSTASIS BAROREFLEX MECHANIZMUSAI

Halmaj László, Paprika Dóra, Zöllei Éva, Gingl Zoltán, Rudas László
 Szegedi Tudományegyetem, Kardiológiai Központ,
 Belgyógyászati Intenzív Osztály, Szeged

autonomic nervous system, baroreceptors

Az aktív orthostasis során létrejövő haemodinamikai változások összetett autonóm regulációt foglalnak magukba. Az artériás és intracardiális nyomások hirtelen változásai baroreflex válaszokat indítanak el. A függőleges testhelyzet felvételét kísérő vérnyomás túlregulációs fázis artériás baroreflex aktiválódáshoz vezet, mely lehetővé teszi baroreflex gain számítását. Számos baroreflex érzékenységi indexet (BRS) használunk, azonban ezek összefüggései nem tisztázottak. Vizsgálatunkban a spontán BRS paramétereket (upBRS, downBRS, LF alfa index) hasonlítottuk össze 20 egészséges önkéntesben az orthostasis során nyert értékekkel. A vérnyomás túlregulációs fázis lag 0 és lag 1 késleltetésű BRS értékeit és az új, egyszerűsített BRS indexet (SBRS: maximum-minimum RR intervallum/maximum-minimum systoles vérnyomás) vizsgáltuk. **Eredmények:** a baroreflex érzékenységi mutatók összefüggései (* = $p < 0,05$)

	Lag0 gain	Lag1 gain	SBRS-I	Up-BRS	DownBRS	LFalpha
Lag0 gain	-	R = 0,99*	R = 0,95*	R = 0,14	R = 0,14	R = 0,25
Lag1 gain	-	-	R = 0,93*	R = 0,13	R = 0,16	R = 0,34
SBRS-I	-	-	-	R = 0,11	R = 0,33	R = 0,26
Up-BRS	-	-	-	-	R = 0,81*	R = 0,8*
Down-BRS	-	-	-	-	-	R = 0,6*
LF alpha	-	-	-	-	-	-

Az eredmények arra utalnak, hogy az orthostasis során létrejövő vérnyomás és pulzusszám-változások létrejöttében baroreflex mechanizmusok is szerepet játszanak. A baroreflex válasz leírható egy egyszerűsített BRS mutató segítségével. Bár a vizsgált orthostasis-függő paraméterek, indexek, szoros korrelációt mutattak egymással, nem mutattak összefüggést a spontán paraméterekkel. Eredményeink alapján a különböző módon számított BRS értékek nem helyettesíthetik egymást.

THE EFFECTS OF MISSENSE MUTATIONS AND PKA PHOSPHORYLATION ON CALPAIN-I INDUCED CTNI DEGRADATION

J. Barta, A. Tóth, Z. Hertelendi, I. Édes, *K Jaquet, *A. Reidlich, Z. Papp.

UDMHSC, Dept. of Cardiology, Debrecen; *Institute für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum, Germany

ischaemia, myocardial proteins, experimental

Cardiac troponin I (cTnI) is the inhibitory component of the troponin complex. A Calpain-I (Ca^{2+} -dependent protease) induced proteolysis of this protein presumably participates in the physiological processes of the myocardium as well as in the development of myocardial ischemic/reperfusion injury. In certain types of hypertrophic cardiomyopathies (HCM) missense mutations of cTnI were noticed, moreover, during end-stage heart failure decreased myocardial cTnI phosphorylation was previously observed. It is currently not known, whether the mutations seen during HCM, or the phosphorylation state of the protein have any effect on the Calpain-I induced cTnI degradation. Purified cTnI molecules (wild type (WT) TnI, missense mutants (G203S, K206Q, R145G) alone, and in the troponin complex, non-phosphorylated and protein kinase A- (PKA) phosphorylated forms) produced using molecular biological methods were *in vitro* proteolysed in the presence of 1 mM Ca^{2+} (pH: 7.5; T: 30 °C). Proteolyses were initiated by adding exogenous Calpain-I (1 U). Incubations in the presence of Calpain-inhibitors and in the absence of Ca^{2+} served as controls. For determination of the protein degradation Western Immunoblotting was employed. The kinetics of proteolysis were reconstructed from the results obtained after 0.5, 30, 60 and 120 minutes of incubations. Our results indicate that, in similarity to WTcTnI, the mutants alone, in the troponin complex, in non-phosphorylated and PKA-phosphorylated forms are all degraded by Calpain-I. Nevertheless, we observed differences in the Calpain-I sensitivities of the different cTnI molecules. Phosphorylation conferred partial protection against Calpain-I mediated degradation in all cases. Furthermore, cTnI breakdown was also less intense when cTnI was present in the troponin complex. Hence, our results imply that β -adrenergic stimulus induced PKA phosphorylation confers effective protection against Calpain-I dependent cTnI degradation, when cTnI resides in the troponin complex.

This work was supported by the 6002-1/01/ETT grant.

BAROREFLEX MECHANISMS OF ACTIVE ORTHOSTASIS

L. Halmaj, D. Paprika, É. Zöllei, Z. Gingl, L. Rudas.
 University of Szeged, Cardiology Center, Medical Intensive Care Unit, Szeged

autonomic nervous system, baroreceptors

The hemodynamic responses to active orthostasis involve complex autonomic regulation. The mechanically induced sudden changes in arterial and intracardial pressures elicit baroreflex responses. The arterial baroreflex response during the overshoot blood pressure phase of the manoeuvre is well discernible, and allows calculation of a baroreflex gain. There is an abundance of "baroreflex sensitivity indexes" (BRS), however the relationship between these parameters are not well understood. Therefore in our study spontaneous BRS parameters, including Up- and Down BRS and LF alpha index of 20 healthy volunteers were compared to the orthostasis-derived parameters of the same subjects. The analysis included both Lag0 and Lag1 gains of the overshoot phase, and a simplified BRS index (SBRS-I: max-min RR interval/max-min systolic blood pressure). **Results:** Interrelationship of the baroreflex sensitivity parameters (* = $p < 0.05$):

	Lag0 gain	Lag1 gain	SBRS-I	Up-BRS	DownBRS	LFalpha
Lag0 gain	-	R = 0,99*	R = 0,95*	R = 0,14	R = 0,14	R = 0,25
Lag1 gain	-	-	R = 0,93*	R = 0,13	R = 0,16	R = 0,34
SBRS-I	-	-	-	R = 0,11	R = 0,33	R = 0,26
Up-BRS	-	-	-	-	R = 0,81*	R = 0,8*
Down-BRS	-	-	-	-	-	R = 0,6*
LF alpha	-	-	-	-	-	-

Our results indicate that blood pressure and heart rate responses to orthostasis indeed involve baroreflex mechanisms. This response could be described by a simplified index. Though these orthostatic baroreflex indices show close correlation with each other, we found no relationship with the spontaneous parameters. This finding supports the view that these BRS values are not interchangeable.