

# **EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

## **A kontraktilis fehérjerendszer $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységeinek jelentősége szívelégtelenségben**

**Dr. Czuriga Dániel**

**Témavezető: Dr. Papp Zoltán**



**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....                                                                                                                          | 3  |
| 1.1. Szívelégtelenség és szívizom-remodelláció.....                                                                                                               | 3  |
| 1.2. A szívelégtelenség definíciója, klinikai vonatkozásai .....                                                                                                  | 3  |
| 1.3. A szívelégtelenség molekuláris háttere.....                                                                                                                  | 6  |
| 1.4. A szívizom kontraktilis filamentumai .....                                                                                                                   | 6  |
| 1.5. A kontraktilis erő $\text{Ca}^{2+}$ -függése .....                                                                                                           | 9  |
| 1.6. $\beta$ -adrenerg szignalizáció és szívizomsejt kontraktilitás .....                                                                                         | 12 |
| 1.7. A csökkent $\beta$ -adrenerg szignalizáció hatásai a szívelégtelen humán szívben .....                                                                       | 13 |
| 1.8. Megváltozott $\beta$ -adrenerg válaszok a szívelégtelenség kis- és nagyállat modelljeiben.....                                                               | 14 |
| 1.9. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben megfigyelt regionális különbségek .....                                                              | 16 |
| 1.10. A $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítők szerepe szívelégtelenségben.....                                                                                           | 16 |
| 2. CÉLKITŰZÉSEK.....                                                                                                                                              | 20 |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....                                                                                                                                     | 21 |
| 3.1. Állatkísérletes modellek .....                                                                                                                               | 21 |
| 3.1.1. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modellje .....                                                                                 | 21 |
| 3.1.2. Poszt-infarktusos patkánymodell .....                                                                                                                      | 23 |
| 3.2. Immunhisztokémia .....                                                                                                                                       | 23 |
| 3.3. TnI back-foszforiláció .....                                                                                                                                 | 25 |
| 3.4. Western immunoblot .....                                                                                                                                     | 25 |
| 3.5. PKA aktivitás mérés .....                                                                                                                                    | 27 |
| 3.6. Áramlási citometria .....                                                                                                                                    | 28 |
| 3.7. Erőmérések permeabilizált szívizomsejteken .....                                                                                                             | 29 |
| 3.8. Adatelemzés, statisztikai analízis .....                                                                                                                     | 32 |
| 4. EREDMÉNYEK.....                                                                                                                                                | 34 |
| 4.1. A troponin I fehérje foszforilációját érintő változások az elektomos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében .....                         | 34 |
| 4.2. Az SR33805 szívizomsejtek $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységére és endogén proteinkináz A aktivitására gyakorolt hatásai poszt-infarktusos patkánymodellben ..... | 46 |
| 5. MEGBESZÉLÉS .....                                                                                                                                              | 51 |
| 5.1. Celluláris inhomogenitás a regionális kontraktilis diszfunkció hátterében az elektomos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség során .....                    | 51 |
| 5.2. Az SR33805 kontraktilis rendszerre gyakorolt jótékony hatásai poszt-infarktusos patkánymodellben.....                                                        | 56 |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                                                                                            | 61 |
| 7. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE.....                                                                                                                                     | 63 |
| 8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....                                                                                                                                | 71 |
| 9. TÁRGYSZAVAK .....                                                                                                                                              | 74 |
| 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....                                                                                                                                     | 76 |
| 11. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....                                                                                                                                    | 77 |
| 12. FÜGGELÉK.....                                                                                                                                                 | 80 |

# **1. Bevezetés és Irodalmi Áttekintés**

## **1.1. Szívelégtelenség és szívizom-remodelláció**

A szívelégtelenség egy komplex patofiziológiai folyamatok által létrejövő progresszív klinikai szindróma, melynek lényege a szív csökkent teljesítőképessége. A szívelégtelenség rossz prognózisa és riasztó méreteket öltő előfordulási gyakorisága egyaránt arra hívják fel a figyelmet, hogy sürgető lenne új terápiás lehetőségek keresése és azok minél szélesebb körű alkalmazása. Mind a nagy betegszámú, randomizált, prospektív klinikai vizsgálatok, mind a betegség molekuláris patofiziológiai hátterének részletes feltárását célzó alap kutatások kiemelten fontos szereppel bírnak a betegség elleni küzdelemben.

Krónikus szívelégtelenség során a szívizomzatban kóros remodelláció jön létre, melynek okai részben a szívelégtelenséget kiváltó tényezőkben, részben pedig a neurohumorális kompenzációs mechanizmusokra adott maladaptív miokardiális válaszokban keresendők. A szívizom-remodelláció molekuláris hátterét jelentős részben a szívizomsejtek kontraktilis fehérjeinek és intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartását szabályzó fehérjeinek megváltozott expressziója, foszforilációs állapota, szerkezeti és funkcionális eltérései adják.

A szívelégtelenségben kialakuló molekuláris változásokról az irodalomban eddig összegyűlt adatok több szempontból nyújtottak felvilágosítást, ugyanakkor a mai napig maradtak tisztázatlan és ellentmondásos kérdések, például a kontraktilis fehérjerendszer poszttranszlációs módosulásai kapcsán. Vizsgálataink során ezen kérdések egy részére igyekeztünk megkeresni a válaszokat.

## **1.2. A szívelégtelenség definíciója és klinikai vonatkozásai**

A szívelégtelenség egy komplex klinikai szindróma, melynek oka lehet bármely olyan strukturális vagy funkcionális kardiális működészavar, amely a bal kamra (BK) szisztolés és/vagy diasztolés funkcióját károsítja.

Napjainkban a szívelégtelenség a vezető halálokok között szerepel szerte a világon. A betegség előfordulási gyakorisága riasztó méreteket ölt az iparilag fejlett országokban. A betegség prevalenciája átlagosan 0,4-2 % között van, és szoros összefüggést mutat az életkorral [1]. Az évente jelentkező új esetek száma (incidencia) a legtöbb epidemiológiai adat szerint átlagosan 1-5 eset/1000 fő [2]. A szívelégtelenség kezelésében az elmúlt évtizedben bekövetkezett jelentős fejlődés ellenére a betegség mortalitása ma is igen magas, eléri, vagy meg is haladja a malignus betegségekét [3].

Klinikai megközelítésből a szívelégtelenség a szív csökkent teljesítőképességét jelenti, amely alacsonyabb fizikai terhelhetőséggel, típusos panaszokkal (nehézlégzés, fulladás, gyengeség, szapora szívdobogás), később kis- és nagyvérköri pangással és testszerte jelentkező ödéma felszaporodással jár együtt. Előrehaladott állapotban a szív adaptációs mechanizmusainak teljes kimerüléséhez, végső soron halálhoz vezet.

A szívelégtelenségnek több kiváltó oka lehet. Leggyakrabban a koszorúérbetegség, a magas vérnyomás, a szívbillentyű hibák, lezajlott szívinfarktus, a tartósan magas pulzusszám (pl. ritmuszavar esetén), vagy a különböző kardiomiopátiák vezetnek szívelégtelenséghez, de az is előfordulhat, hogy a betegség ismeretlen eredetű, nincs azonosítható etiológiai tényező annak hátterében. A szívelégtelenséghez vezető leggyakoribb okok mellett számos egyéb patológiai tényező is hozzájárulhat a betegség kialakulásához, ilyenek például a diabétesz, a tárolási betegségek, korábbi infekció, toxikus károsodások, stb.

A krónikus szívelégtelenség során az előnytelen hemodinamikai paraméterek (pl. nyomás- és/vagy volumenterhelés), a miokardiumban fennálló iszkémia (koszorúérszűkület esetén), vagy a szívizomkárosodás és/vagy szívizomelhalás (kardiomiopátiák, miokardiális infarktus esetén) a szív kóros átépüléséhez vezetnek, amely romló szívizomfunkcióval (szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkció), valamint megváltozott szívgeometriával (koncentrikus, illetve excentrikus hipertrófia, dilatált szívüregek, elvékonyodott kamrafalak) jellemezhető.

Ennek következtében csökken az ejekciós frakció és a perctérfogat, melyre a neurohumorális rendszer fokozott aktivitással reagál: a mellékvesékből kiáramló katekolaminok elsősorban a szívre gyakorolt pozitív ino- és kronotróp hatásokkal, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer aktiválódása pedig a fokozott vízviisszatartással és az erekre gyakorolt vazokonstrikciónal igyekszik a normális vérnyomást és perctérfogatot fenntartani.

Napjainkban a hagyományos szívelégtelenség-terápia során az életmódbeli változtatásokon túl (só-, valamint folyadékbevitel csökkentés, fokozott fizikai kímélet, testsúlycsökkentés) a legtöbb esetben indokolt bizonyos gyógyszerek alkalmazása [vízhajtók, angiotenzinkonvertáló-enzim gátlók (ACEi),  $\beta$ -receptor blokkoló szerek], már a betegség korai stádiumában is. A betegek egy részének a maximális tolerált dózissal feltitrált farmakológiai terápia sem csökkenti panaszait, tüneteit, életminőségük és életkilátásuk továbbra is kedvezőtlen marad. A krónikus szívelégtelenségben szenvedő, hagyományos gyógyszeres kezelésre nem reagáló betegek esetében újabban lehetőség nyílik az ún.  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő kezelés alkalmazására. A  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítők a szívglikozidokkal és katekolaminokkal ellentétben a szívizom teljesítményének fokozását nem az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) növelésén keresztül, hanem közvetlenül a kontraktilis fehérjékre hatva érik el. Ezen tulajdonságuk csökkentheti a  $\text{Ca}^{2+}$ -terhelésből adódó nem kívánatos hatásokat, mivel a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szerek a szív kontraktilitását az oxigénfogyasztás emelése és súlyos ritmuszavarok kiváltása nélkül fokozzák.

Tekintettel a szívelégtelenség magas morbiditási és mortalitási adataira, a betegség molekuláris patofiziológiai hátterének jobb megismerése kiemelt fontosságú. Ennek egyik lehetséges módja olyan állatmodellek létrehozása, melyek nagymértékben utánozzák a humán patológiát, teret biztosítva így a potenciálisan új terápiás próbálkozásoknak.

### **1.3. A szívelégtelenség molekuláris háttere**

A krónikus szívelégtelenség kialakulása kapcsán létrejövő miokardiális remodelling hátterében a szívizom fehérjék expressziójában és poszttranszlációs módosulásaiban bekövetkező változások állnak. Ezen fehérje módosulások hatással vannak a miokardium struktúrájára, valamint felelősek a sejtfunkciókban bekövetkező zavarokért az intracelluláris jelátviteltől a szívizomsejt kontraktilitáson át a sejtek metabolizmusáig. Ennek megfelelően számos korábbi tanulmányban felvetették, hogy a miofilamentáris fehérjék szerepet kaphatnak a progresszív szívizomfunkció-hyatlásban [4-7]. Humán szívelégtelenség kapcsán pl. azt találták, hogy a csökkenő hatékonyságot mutató  $\beta$ -adrenerg jelátvitel az alacsonyabb proteinkináz A (PKA)-mediált troponin I (TnI) és miozin kötő C fehérje (MyBP-C) foszforiláción keresztül a szívizom megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységéhez vezet [8-13]. Tény azonban, hogy ezen összefüggés nem volt egyöntetűen igazolható a szívelégtelenség valamennyi állatmodelljében [14-17]. Az ellentmondások hátterében a humán patológia komplexitása, a humán szívizommintákhoz való hozzáférés nehézségei, valamint a nagy- és kisállat modellek jelátviteli útvonalai közti lehetséges különbségek egyaránt állhatnak [18, 19]. Ezért a szívelégtelenség megfelelő állatmodelljeiben végzett megfigyelések kiemelt fontossággal és direkt relevanciával bírhatnak a humán szívelégtelenség során létrejövő fehérje módosulások tisztázására nézve.

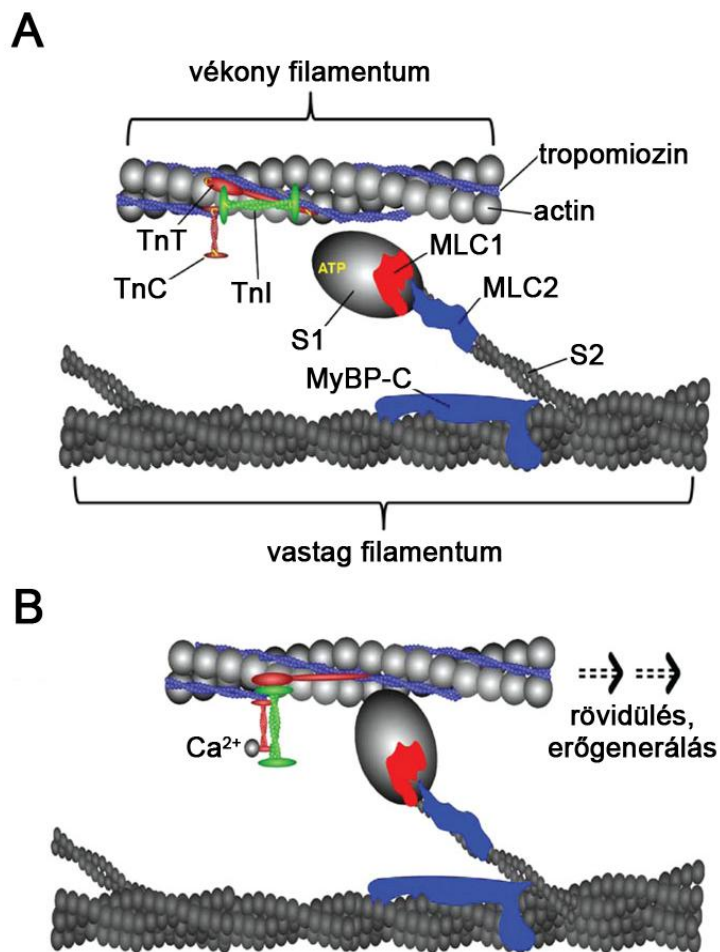
### **1.4. A szívizom kontraktilis filamentumai**

A szívizom-összehúzódás a vastag és vékony filamentumok kölcsönhatásán alapszik. A vastag filamentumok zömében miozin nehéz láncokból, kisebb részben egyéb fehérjékből (miozin könnyű láncok, MyBP-C) állnak. A két-két farki és feji régióval rendelkező miozin két, kb. 200 kDa molekulatömegű miozin nehéz láncból (MHC), valamint négy kisebb polipeptidből (miozin könnyű láncok, MLC) épül fel. A könnyű láncokkal kapcsolatban álló

nehéz láncok három különböző izomiozint alkothatnak. A  $V_1$  jelű homodimer két  $\alpha$ -MHC-t, a  $V_3$  jelű két  $\beta$ -MHC-t, míg a  $V_2$  heterodimer, egy molekula  $\alpha$ -MHC-t és egy molekula  $\beta$ -MHC-t tartalmaz. *In vitro* körülmények között a  $V_1$  jelű izomiozin rendelkezik a legmagasabb, a  $V_3$  jelű a legalacsonyabb ATPáz aktivitással. A  $V_2$  jelű izomiozin ATPáz aktivitása a  $V_1$  és  $V_3$  homodimeré között helyezkedik el. Élettani körülmények között a humán kamrai miokardiumban többnyire  $\beta$ -MHC található. Kisebb emlősökben, (pl. egerekben) viszont nagyrészt  $\alpha$ -MHC fordul elő. A MLC-k révén további kombinációk jöhetnek létre. Az MLC1-nek, az ún. esszenciális miozin könnyű láncnak két formája létezik: a pitvari (ALC1) és a kamrai (VLC1). A regulatórikus miozin könnyű láncnak (MLC2) három formája ismert: ezek közül egy a pitvari izomzatra specifikus (ALC2), kettő pedig a kamraira (VLC2 és VLC2\*). A regulatórikus könnyű miozin lánc (MLC2) egyaránt foszforilálható a  $Ca^{2+}$ -kalmodulin-dependens kináz (CAMK), valamint a proteinkináz C (PKC) által is.

A vékony filamentumot felépítő legfontosabb fehérje az aktin. Az aktin monomerek 43-48 kDa molekulatömegű globuláris fehérjék (G-aktin), melyek polimerizációval alakítják ki az aktin filamentumot. Két polimerizált aktin filamentum egymás köré csavarodásával alakul ki a kettős hélix struktúra, amely a vékony filamentumok vázát képezi. A tropomiozin szintén két  $\alpha$ -helikális polipeptid lánc egymás köré tekeredésével alakul ki. A vég a véghez kapcsolódó tropomiozin dimerek formálta pálcá-szerű láncolat kívülről az aktin kettős hélixre fonódik. Ez a kapcsolat egyrészt stabilizálja, merevebbé teszi az aktint, másrészt takarja az aktin monomerek miozinkötő helyeit. Klasszikus elképzelés szerint a tropomiozin alapállapotában tehát nem következhet be az aktin-miozin interakció, mivel ahhoz a troponinok  $Ca^{2+}$ -kötött állapota is szükséges. A vékony filamentum minden hetedik globuláris aktin monomeréhez egy-egy troponin komplex kapcsolódik. A troponin komplex három különböző funkcióval rendelkező alegységből épül fel. A troponin C (TnC) a  $Ca^{2+}$ -kötő alegység, a troponin T (TnT) a tropomiozint kötő fehérje, végül a troponin I (TnI) az aktin-

miozin kereszthíd kialakulását gátló struktúra. A vékony filamentumokhoz kapcsolódó TnC molekula (a troponin komplex tropomiozin molekulákkal kialakított térbeli konformációs kapcsolata révén) az aktin és miozin kölcsönhatását  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon befolyásolja. A szívizom kontraktilis filamentumai közül tehát a TnC rendelkezik azzal a  $\text{Ca}^{2+}$ -affinitással, mely ezt a fehérjét a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzorává teszi. A miofibrilláris fehérjék szisztole és disztole alatti konformáció változását az 1. ábra szemlélteti.



**1. ábra. A kontraktilis fehérjerendszer konformációjának változása a szívizom összehúzódása során.**

A vékony filamentumot aktin, tropomiozin és a három alegységből (TnT, TnC, TnI) álló troponin komplex alkotják. A vastag filamentum miozin fehérjéből és miozin kötő C fehérjéből (MyBP-C) épül fel. A miozin fehérje miozin nehéz láncból (MHC), esszenciális miozin könnyű láncból (MLC1), valamint regulatórikus miozin könnyű láncból (MLC2) áll, és 3 régióra tagolható: fejrégió (S1), nyakrégió és farok (S2). Két MHC alkot egy funkcionális egységet, ahol a farokrégió egy kettős spirálba csavarodik. A miozin feji régióján található az ATP-t hidrolizáló domén, valamint az aktin kötőhely. A miozin könnyű láncok a

nyakrégiónál kapcsolódnak az MHC-hez, pontos funkciójuk még csak részben tisztázott. **A)** A disztole alatt a tropomiozin gátolja az aktin és a miozin közötti kereszthidak létrejöttét. **B)** A szisztole során  $\text{Ca}^{2+}$  kötődik a TnC-hez, ami konformációs átrendeződést indukál a troponin-tropomiozin komplexben. A tropomiozin elmozdulása révén az aktin fehérjén elérhetővé válik a miozin kötőhely, és létrejön a kereszthíd képződés. Ez erőgeneráláshoz és szarkomer rövidüléshez vezet. (de Tombe, J Biomech 2003;36:721–730 alapján módosítva)

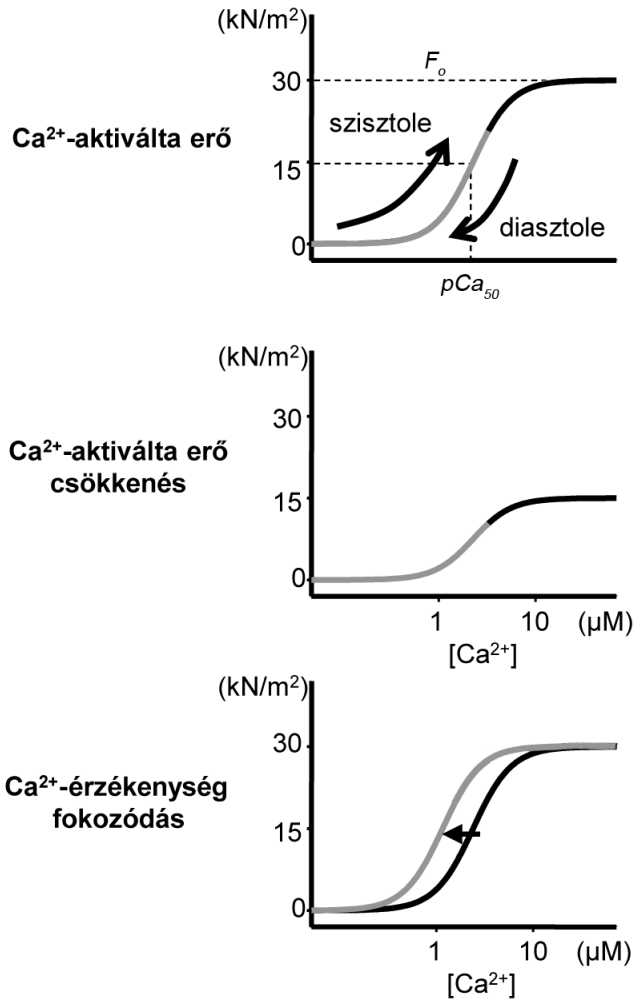
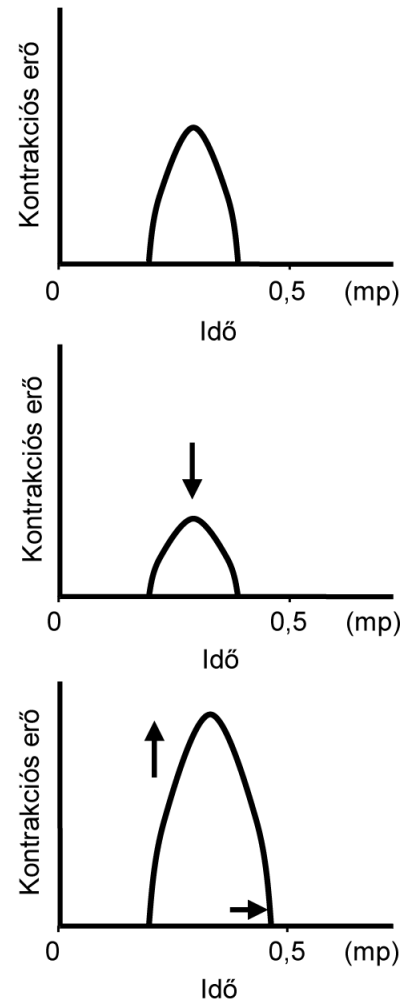
A szívizomsejtek összehúzódása és relaxációja során fontos szerepet tulajdonítanak a szarkomer elaszticitásáért nagymértékben felelős óriásfehérjének, a titinnek is. A titin egy kb. 3200 kDa molekulásúlyú, kétirányú molekuláris rugóként funkcionáló fehérje, ami az egész szarkomert átfedi. A szarkomereket elválasztó Z-vonalakból indul ki, az aktin filamentummal több helyen is interakciókat képez, majd a vastag filamentumhoz kapcsolódik, és azzal párhuzamosan fut le. Két izoformája ismert, a merevebb N2B, valamint az elasztikusabb N2BA izoforma. Ismert, hogy a megnövekedett szívizomsejt feszülés hátterében a titin molekula megváltozott izoforma expressziója és/vagy foszforilációs állapota állhat. A merevebb, N2B titin izoforma PKA-függő hipofoszforilációja a szívizomsejtek magas nyugalmi feszülését idézi elő, ami részlegesen korrigálható *in vitro* PKA kezeléssel. A titin fehérje "N2B unique sequence" nevű doménjének proteinkináz G-mediált foszforilációja szintén csökkenti az izolált szívizomsejtek passzív feszülését, míg a titin molekula PEVK szegmensének [prolin (P), glutamát (E), valin (V) és lizin (K) aminosavakban gazdag terület] PKC $\alpha$ -mediált foszforilációja fordított hatású a passzív feszülésre nézve.

### 1.5. A kontraktilis erő $\text{Ca}^{2+}$ -függése

A szív miofibrilláris struktúrái által generált erő  $\text{Ca}^{2+}$ -függését intakt szívizomzaton nehéz meghatározni, mert a mioplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) a szívciklus alatt folyamatosan és igen gyorsan változik. Ez a tény és az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pontos mérésének technikai nehézségei nagymértékben gátolják, hogy a szívciklus alatti pillanatnyi  $[\text{Ca}^{2+}]$  és a kontraktilis válasz közötti kapcsolatot megbízhatóan jellemezzük. A kontraktilis erő  $[\text{Ca}^{2+}]$ -függésének tanulmányozására egyszerűbb rendszerekre van szükség. A mérésekhez leggyakrabban sejtmembránjuktól megfosztott, ún. „nyúzott” (más néven „skinned”) preparátumokat alkalmaznak. Az ilyen preparátumok mioplazmatikus terében a szabad  $[\text{Ca}^{2+}]$  szabályozható, a generált erő pedig kontrollált szarkomerhosszak mellett egyidejűleg mérhető. Amennyiben az erőértékeket a  $[\text{Ca}^{2+}]$  függvényben ábrázoljuk, úgy jellegzetes szigmoid

lefutású görbét kapunk ( $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés, 2. ábra). A  $[\text{Ca}^{2+}]$  kifejezésére rendszerint a moláris érték 10-es alapú logaritmusának  $-1$ -szeresét alkalmazzák ( $p\text{Ca}$ ), így  $p\text{Ca}$ -erő összefüggésről is beszélhetünk. A szigmoid lefutású görbe az ún. Hill-egyenlettel ([1] egyenlet) illeszthető, mely a kontraktilis rendszer által generált erő  $\text{Ca}^{2+}$ -függésének legfontosabb mennyiségi jellemzőit tartalmazza. A "félmaximális" erő eléréséhez szükséges  $[\text{Ca}^{2+}]$ , a  $[\text{Ca}_{50}]$  (vagy  $p\text{Ca}_{50}$ ), a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$  iránti érzékenységet önmagában jellemző paraméter. Értéke nagymértékben függ a TnC fehérje  $\text{Ca}^{2+}$  iránti affinitásától.

A  $[\text{Ca}_{50}]$  csökkenése (mely értelemszerűen a  $p\text{Ca}_{50}$  növekedésével jár együtt) a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés balra tolódásával ( $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység fokozódás, pl. a szarkomerhossz növelése vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szerek alkalmazása esetén) jár együtt, a  $[\text{Ca}_{50}]$  növekedése ( $p\text{Ca}_{50}$  csökkenése) ezzel ellentétes hatású ( $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés, pl.  $\beta$ -adrenerg inger hatására). A Hill-koefficiens ( $n_{\text{Hill}}$ ) a szigmoid görbe meredekségére, és egyúttal a kontraktilis rendszeren belüli kooperativitás mértékére jellemző paraméter. A kontraktilis filamentumok kooperatív interakciója számos, a vékony és vastag filamentumok között létrejövő bonyolult intermolekuláris kapcsolat következménye. Lényeges összefüggés volt annak a felismerése, hogy az aktin-miozin rendszeren belül uralkodó kooperativitás a vékony filamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzor funkcióját is befolyásolja [20].

**A****B**

**2. ábra. A Ca<sup>2+</sup>-erő görbe és a szívizom kontrakció összefüggései.** A Ca<sup>2+</sup>-erő összefüggés lehetséges változásainak (A) hatásait a szívizom összehúzódása során generált kontrakciós erőre (B) nézve egyszerűsített sémában tüntettük fel. Kísérleti körülmények között a szívizomsejtek által generált erő a  $[\text{Ca}^{2+}]$  emelkedésével együtt nő egy maximum eléréséig (maximális Ca<sup>2+</sup>-aktiválta erő,  $F_o$ ). A  $[\text{Ca}^{2+}]$  és az erő között szigmoid összefüggés áll fenn, mely a Ca<sup>2+</sup>-függő kontraktilis válasz kooperatív jellegére utal. A "félmaximális" erő eléréséhez szükséges  $[\text{Ca}^{2+}]$  a  $[\text{Ca}_{50}]$  (vagy  $p\text{Ca}_{50}$ ), mely a kontraktilis filamentumok Ca<sup>2+</sup>-érzékenységét önmagában jellemző paraméter. *In vivo* a szív szisztolés kontrakciója és diasztolés relaxációja a kontraktilis apparátus szubmaximális Ca<sup>2+</sup>-szaturációjának függvénye (felső panel). A maximális Ca<sup>2+</sup>-aktiválta erő csökkenése változatlan Ca<sup>2+</sup>-tranzienst mellett (pl. az aktin-miozin kereszthidak számának csökkenése következtében) a szisztolés kontrakciós erő csökkenéséhez vezet (középső panel). A Ca<sup>2+</sup>-erő görbe balra tolódása (fokozott Ca<sup>2+</sup>-érzékenység, szürke görbe és nyíl, alsó panel) növeli a szisztolés erőgenerálást, ugyanakkor késlelteti a diasztolés relaxációt.

## 1.6. $\beta$ -adrenerg szignalizáció és szívizomsejt kontraktilitás

A szívizomsejtek kontraktilitásának fokozódása a  $\beta$ -adrenerg stimuláció szimpatikus idegrendszeri aktivációján keresztül valósulhat meg. A  $\beta$ -adrenerg receptorok aktivációja számos membrán- és intracelluláris fehérje PKA-mediált foszforilációjához vezet (pl. L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna, rianodin receptor, foszfolambán). Ezen fehérjék foszforilációja a citoszólikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  fokozódását, valamint a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz (SERCA2) megnövekedett aktivitását eredményezi, amely fokozott szarkoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  felvételhez vezet. A nagyobb szisztolés citoszólikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  és szarkoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -töltöttség a szívizomsejtek kontraktilis erejének fokozódását idézi elő [21]. A  $\beta$ -adrenerg rendszer aktiválódása a miofilamentumok szintjén is számos fehérje foszforilációját eredményezi, ami a szívizomsejtek kontraktilitását meghatározó különböző miofilamentáris paramétereket (maximális erőgeneráló képesség,  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység, passzív feszülés) érintő változásokban nyilvánul meg. A vékony filamentumok TnI fehérjéjének, valamint a vastag filamentumok MyBP-C-jének PKA-mediált foszforilációja csökkenti a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét [8, 22], ami a szívizom relaxációjának diasztole alatti akcelerációját eredményezi (pozitív luzitropia) [23-26]. Továbbá a MyBP-C foszforilációjáról feltételezik, hogy növeli a szisztole alatti erőgenerálódás sebességét is [27]. Számos tanulmány számolt be a szívizomsejtek elasztikus tulajdonságait meghatározó szarkomerikus óriásfehérje, a titin molekula PKA-mediált foszforilációjának a szívizomsejtek passzív feszülésében betöltött szabályozó szerepéről is [28-30].

A fent részletezett szimpatikus idegrendszeri aktivációval szemben a paraszimpatikus aktiváció ellentétes hatású, azaz a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázist és a kontraktilis erőt szabályozó fehérjék PKA-mediált hipofoszforilációjához, következményesen negatív tróphatásokhoz vezet. Hasonlóan a foszfodiészteráz enzim is, amely a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) adenzin-monofoszfáttá (AMP) történő bontásán keresztül csökkenti a PKA-mediált fehérje

foszforiláció pozitív tróphatásait. Értelmszerűen a foszfodiészteráz-gátló szerek ezzel ellentétes, azaz pozitív ino- és luzitróp hatásokkal bírnak.

### **1.7. A csökkent $\beta$ -adrenerg szignalizáció hatásai a szívelégtelen humán szívben**

Az egészséges humán szívizomban szigorú egyensúlyban állnak azon kinázok és foszfatázok, melyek a szívizomsejtek kontraktilitásában szerepet játszó regulátor fehérjék foszforilációjáért felelnek. Így az egészséges szívben a fokozott  $\beta$ -adrenerg stimulációra bekövetkező kontraktilis erő fokozódás,  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés, és az ezekből adódó pozitív inotróp és luzitróp válaszok előnyös hatásokkal bírnak a szív teljesítőképességére nézve. Szívelégtelenség során a fokozott neurohumorális stimuláció kompenzálni igyekszik a szív csökkent pumpafunkcióját. Bár ez a folyamat a szívizom kontrakciós erejének fenntartását célozza, végső soron hátrányosan érinti a szívizomzatot, mivel az egyes kinázok és foszfatázok közötti egyensúly felborulásához, kóros szívizom átépüléshez, valamint a szabályzó fehérjék olyan foszforilációs változásaihoz vezet, amelyek károsítják a szívizomsejtek funkcióit. Így a krónikus szívelégtelenség során létrejövő fokozott neurohumorális stimuláció következtében a  $\beta$ -adrenerg jelátviteli útvonal deszenzitizálódik, ezzel limitálva a szív válaszadó képességét a fokozott terhelésre. A deszenzitizáció a szívizomsejtek szintjén a  $\beta$ -adrenerg receptorok down-regulációjában és szétkapcsolódásában nyilvánul meg, ami a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban résztvevő-, valamint a miofilamentáris fehérjék csökkent PKA-mediált foszforilációját eredményezi [31, 32]. Ezen csökkent PKA-mediált foszforiláció a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens beszűküléséhez, a miofilamentumok fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységéhez, valamint a szívizomsejtek megnövekedett passzív feszüléséhez vezet. Bár mind a nagyobb passzív feszülés, mind a fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység limitálja a szívizom relaxációját, utóbbi a szívizomsejtek erőgeneráló képességét elméletileg növelhetné, ezáltal fokozva a szívizom kontraktilitását. Ugyanakkor, a szívelégtelen szívizomsejtekben bekövetkező szisztolés  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintek csökkenése, valamint a diasztolés  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintek

emelkedése alapján azt feltételezhetjük, hogy a remodeláción átesett szívizomban a miofilamentáris diszfunkció tovább rontja, mintsem hogy javítaná a szív teljesítőképességét [33].

### **1.8. Megváltozott $\beta$ -adrenerg válaszok a szívelégtelenség kis- és nagyállat modelljeiben**

A szívelégtelenség állatmodelljeiben közelmúltban végzett tanulmányok a humán szívelégtelenségben megfigyeltékhez hasonlóan a szívizomsejtek olyan változásairól számolnak be, amely a miofilamentumok erőgenerálási képességét,  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, valamint a szívizomsejtek passzív feszülését érintik. Ezen eltérések nagyrészt a kontraktilis fehérjék megváltozott foszforilációjából adódnak, melyet a szívizomsejteken belüli neurohumorális eltérések okozta kináz-foszfatáz egyensúly felborulása idéz elő [34]. A különböző állatmodellekből nyert, egyedi szívizomsejteken végzett erőmérések számos mechanikai eltérés kialakulását igazolták. Sajnos a szívelégtelenségre specifikus jellemzőket olykor elfedhetik a specieszek-, vagy az egyes modellek közötti különbségek, ezért az így kapott eredményeket kellő körültekintéssel szükséges értelmezni [35]. Mindazonáltal a szívelégtelen állatmodellek vizsgálati eredményeiből levont következtetések számos tanulmány esetén hasonlóan adódtak.

A fentiek alapján azt feltételezik, hogy a szívizomsejtek legalább három különböző paraméterében következnek be koordinált változások a szívelégtelenség során. Először is számos különböző szívelégtelen állatmodellben is leírták a miofilamentumok fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét a humán szívelégtelenségben megfigyeltékhez hasonlóan [36-38]. Egy poszt-infarktusos sertés modellben az infarktusos területekről nyert szívizomsejteken végzett mérések 3 héttel az artéria circumflexa ligációját követően fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet igazoltak, melyet a sejtek *in vitro* PKA oldatban történő inkubálása normalizált. Ez összhangban állt az állatokban *in vivo* kialakuló, feltételezett  $\beta$ -adrenerg down-regulációval, melynek következtében az állatok szívének terhelésre mutatott válaszadó képessége csökkent

volt (terhelés során az emelkedő noradrenalin szintek mellett alacsonyabb szívfrekvencia-, valamint perctérfogat fokozódást figyeltek meg kontrollokhhoz képest), valamint az infarktusos területekről nyert szívizom homogenizátumokban alacsonyabb cAMP és PKA szinteket mértek *in vitro* [39]. Ellentétben a fenti szívelégtelen nagyállat modellel, a patkányokban krónikus nyomásterheléssel (aorta lekötés), valamint miokardiális infarktus előidézésével (koronária artéria ligáció) kiváltott szívelégtelenség során a kontroll állatokhoz képest csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet, továbbá nagyobb TnI foszforilációs szinteket találtak. Ezen eltéréseket a fokozott PKC $\alpha$  aktivitással és szignalizációval magyarázták [15, 16].

A szívelégtelenség során megfigyelt másik kontraktilis paraméterben bekövetkező változást a szívizomsejtek erőgeneráló képessége kapcsán írták le. A maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta erőt ( $F_o$ ) szignifikánsan alacsonyabbnak találták nemcsak a szívelégtelenség fenti poszt-iszkémiás sertés és patkány modelljeiben, de hasonló egér modellből nyert, remodeláción átesett szívizomsejtekben is kontrollokhhoz képest [15, 39, 40]. Ugyancsak a maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta erő csökkenését figyelték meg végstádiumú szívelégtelenségbe progrediáló állatoknál egy szívelégtelen transzgenikus egérmodellben is, mely a PKC útvonal egyik szignalizációs molekuláját, a G $\alpha_q$  fehérjét overexpresszálta [37].

A szívelégtelen állatmodellek vizsgálataiból származó eredmények egy harmadik paraméter változására is felhívják a figyelmet: a szívizomsejtek passzív feszülésében ( $F_{passzív}$ ) megfigyelt változásokat szintén relevánsnak gondolják a szívizomban létrejövő mechanikai diszfunkció kialakulása kapcsán. Jóllehet, a poszt-iszkémiás egér-, valamint sertés modellben a  $F_{passzív}$  nem különbözött jelentős mértékben a szívelégtelen és kontroll szívek között [39, 40].

## **1.9. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben megfigyelt regionális különbségek**

A szívelégtelenség egyik bevált nagyállat modelljét a szív folyamatos, a spontán szívfrekvencia három-négyszeresével történő elektromos ingerlésével hozzák létre legtöbbször kutyákban, sertésekben, birkákban és majmokban [41, 42]. Ezen modellre jellemzőek a funkcionális és molekuláris remodelációban fellelhető regionális különbségek. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség kutya modelljében például regionális különbségeket észleltek az akciós potenciál meghosszabbodásának, valamint a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis zavarainak mértékében [43]. Továbbá, ezen szívek reszinkronizációs terápiája is eltérő válaszokhoz vezetett [44]. A szívelégtelenség egyik sertés modelljében a tartós elektromos ingerlés indukálta bal kamrai (BK) aszinkrónia nagyobb mértékben csökkentette a BK szisztolés falvastagodást és cirkumferenciális rövidülést az anterior/anterolaterális (közvetlenül ingerelt), mint az inferoszeptális régióban (közvetlenül nem ingerelt ellenoldal) (~7% vs. ~31% és ~-5% vs. ~-7% az ingerelt és ellenoldali területeken). Ezen változások a minden régióban egységesen bekövetkező magasabb glükóz felvételtől függetlenül jöttek létre. Ugyanakkor ezek az eltérések jól korreláltak a natriuretikus peptidek aszimmetrikus miokardiális expressziójával [45]. Kutásaim során ugyanezen modellből nyert szívizommintákon végzett kísérletekkel azt kívántam tisztázni, hogy a fent részletezett *in vivo* regionális kontraktilis diszfunkció hátterében felismerhetőek-e a miofibrilláris fehérjék PKA-dependens foszforilációjának változásai.

## **1.10. A $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítők szerepe szívelégtelenségben**

A vékony filamentumokat alkotó troponin komplex központi szerepet tölt be a szív kontraktilis folyamatainak szabályozásában. A troponin komplex egyik alegysége, a TnC molekula a miofibrilláris rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjéjeként szolgál.  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzor funkciójának

köszönhetően molekuláris kapcsolóként funkcionál, amely a szív szisztolés és diasztolés fázisai alatt az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  függvényében be- és kikapcsolja a kontraktilis apparátus erőgeneráló funkcióját.

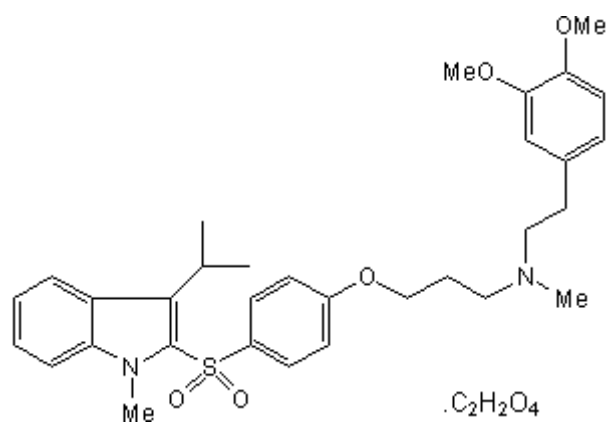
A krónikus szívelégtelenségben használt  $Ca^{2+}$ -érzékenyítők olyan kardiotioniás hatással bíró ágensek, melyek pozitív inotróp hatásaikat a szívizom excitációs-kontrakciós kapcsolásának befolyásolásával érik el. Ezen anyagok miofilamentáris szinten a TnC fehérjével létrejövő interakción, a vékony filamentumok regulátor helyein, és/vagy a keresztkötési kinetika direkt szabályozásán keresztül javítják a kontraktilis apparátus  $Ca^{2+}$ -ra adott válaszát [46]. Hatásmechanizmusuk eredményeként a pozitív inotrópia változatlan intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  mellett jön létre, ami csökkenti a  $Ca^{2+}$ -túlterhelésből adódó ritmuszavarok előfordulásának lehetőségét [47].

A számos  $Ca^{2+}$ -érzékenyítő vegyület közül az egyik legrégebb óta kutatott molekula a levosimendan, amely pozitív inotróp hatása mellett egyéb, a szív- és érrendszerre gyakorolt jótékony hatással is bír (vazodilatáció, kardioprotekció, foszfodiészteráz-gátló), melyeket részben aktív metabolitja (OR-1896) révén fejt ki. A szer a TnC fehérjéhez történő  $Ca^{2+}$ -kötődés modulálásával, lényegében a fehérje  $Ca^{2+}$ -kötött állapotának stabilizálásával fejt ki  $Ca^{2+}$ -szenzitizáló hatását, a szívizomsejtek maximális  $Ca^{2+}$ -aktiválta erejének befolyásolása nélkül. A levosimendan szív és érrendszerre gyakorolt ún. inodilatátor hatásának molekuláris hátterében egyrészt a szer miofilamentáris TnC fehérjével kialakuló direkt interakciója, másrészt a vaszkuláris simaizomsejtek szarkolemmájában található ATP-szenzitív  $K^+$  csatornák aktiválása áll. Mind a levosimendan, mind annak aktív metabolitja gátlószerei a foszfodiészteráz enzim 3-as izoformájának, ami felveti a fokozott cAMP szignalizáció és a pozitív ino- és luzitrop hatások közötti lehetséges összefüggéseket [48].

Érdekes megfigyelés, hogy közvetlen miofilamentáris hatások olyan vegyületek esetén is kialakulhatnak, melyek fejlesztésénél ezzel a tényezővel közvetlenül nem számoltak. A

szubsztituált indol osztályba sorolt fantofaron-származék, az SR33805 ([*N*-[dimetoxi-3,4-fenetil]-*N*-metil-amino-propoxil]-4-benzénszulfonil]-2-izopropil-3-metil-1-indol) (3. ábra) pl. egy potens  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló, amely feltehetően a szívizom miofilamentumainak  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét is fokozza. Egy korábbi tanulmányban ugyanis bemutatták, hogy az SR33805 ugyan csökkentette a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens amplitúdóját, de mégis képes volt növelni egészséges patkányok intakt kamrai szívizomsejtjeinek rövidülését [49]. Feltételezhető, hogy az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonista hatását elsődlegesen az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákhöz kötődve fejt ki [50]. Egyes irodalmi adatok szerint dóziszfüggő módon képes gátolni azt. Korábbi kísérletekben a szer  $\text{IC}_{50}$  értéke (a "félmáximális" gátlás eléréséhez szükséges koncentráció) 24 nM-nak adódott [49]. Meglepő volt azonban, hogy az SR33805 a potens  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonizmus ellenére viszonylag elenyésző negatív inotróp effektussal bírt. Ezt egy korábbi tanulmányban igazolták, melyben nyúl szívizom elektromos stimulációval kiváltott kontrakcióit vizsgálták [51]. Az SR33805 kis koncentrációban alkalmazva egészséges patkány szívizomsejtekben növelte a kontraktilis erőt, valamint csökkentette a sejtrövidülés időtartamát a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens jelentősebb befolyásolása nélkül. A szer nagyobb koncentrációkban történő alkalmazásánál egyértelmű  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatást figyeltek meg, mely főként nagyobb szarkomerhosszaknál volt nyilvánvaló [49].

A korábbi preklinikai vizsgálatok alapján nem világos, hogy az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatása megfigyelhető-e szívelégtelen miokardiumban történő alkalmazáskor. Továbbá az sem eldöntött, hogy az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatása összefüggésbe hozható-e a szívizom kontraktilitását szabályzó fehérjék foszforilációs állapotában bekövetkező változásokkal.



**3. ábra.** A fantofaron-származék SR33805 vegyület kémiai szerkezeti képlete. ([[N-[dimetoxi-3,4-fenetil]-N-metil-amino-propoxil]-4-benzénszulfonil]-2-izopropil-3-metil-1-indol).

## 2. Célkitűzések

Tudományos kutatásaim során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség nagyállat modelljében meg kívántam vizsgálni a miokardiális kontraktilis fehérje foszforiláció feltételezett rendellenességeit, valamint a szívizomsejtek által generált izometriás erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének ezzel összefüggő változásait.
2. Poszt-infarktusos patkány modellben tesztelni kívántam - a kórosan átépült szívizmon még nem vizsgált -  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló SR33805 lehetséges  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatásait.

### 3. Anyagok és Módszerek

#### 3.1. Állatkísérletes modellek

##### 3.1.1. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modellje

10 db hím, felnőtt minidisznót (súly: 35–40 kg) 3 hetes időtartamra pacemaker-elektródával, valamint hemodinamikai mérésekre alkalmas műszerekkel szereltek fel az olaszországi Pisa kollaborációs partnerlaboratóriumában. Az elektrodákat transztorakális feltárásból a BK anterior falának epicardiális felszínén rögzítették. Az ingerlési terület pontos helyét MRI-vel vezérelten keresték fel. Az elektrodákat ezután egy olyan, utólag módosított Medtronic Prevail típusú pacemaker generátorhoz csatlakoztatták, amely folyamatosan képes volt a magas frekvenciájú ingerlésre. A szívelégtelenséget a BK anterior falának három héten át tartó, 180/min frekvenciával történő elektromos ingerlésével idézték elő 2,5 V-os jelamplitúdó, valamint 0,5 msec-os jelszélesség mellett. A szívelégtelenség (HF) indukciója akkor volt eredményes, ha a BK végdiasztolés nyomás meghaladta a 20 Hgmm-t, valamint az ejekciós frakció kisebb volt, mint 40%. Kontrollokként sham-operált, egészséges állatok szolgáltak, melyeket szintén elektródával láttak el, azonban a pacemaker-üket nem aktiválták, így az állatok szíve nem volt ingerelve. 10-12 nappal a műtétet követően csak azon állatokat vonták be a kísérletekbe, amelyeknél nem voltak gyulladásra, infekcióra, torakális összenövésekre vagy fibrózisra utaló jelek és tünetek. Az állatokban *in vivo* hemodinamikai méréseket, MRI és PET vizsgálatokat végeztek, amelyekkel meghatározták a BK nyomásokat, térfogatokat, átmérőket, a globális BK funkciót, a koronáriák vérátáramlását, valamint a miokardium perfúzióját, viabilitását és glükóz felvételét. Az MRI vizsgálatok regionális falmozgászavart igazoltak az ingerelt területeken. Az állatokban *in vivo* mért funkcionális és strukturális paramétereket az 1. táblázat tartalmazza. Az "n" értékek némelyik paraméternél különböznek, mivel előfordult, hogy a sertésekben létrehozott súlyos fokú

szívelégtelenség, valamint a pacemaker MRI képalkotás során történő ki- és bekapcsolása fatális aritmiákat és az állatok elhullását eredményezte, még mielőtt a hemodinamikai mérések megtörténhetek volna [52]. Az *in vivo* méréseket követően az állatok szívét eltávolították, és alacsony hőmérsékleten kisebb darabokra vágták, majd az elkülönített területekből származó mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztották. A BK anterolaterális (ingerelt), valamint az inferoszeptális régiót (ellenoldal) különválasztották (egyszerűsítés végett a kontroll állatoknál is ingerelt, illetve ellenoldali területként utalunk az adott szívizom régiókra, jóllehet, ezen állatok szívét egyáltalán nem ingerelték). A szívizommintákon végzett *in vitro* vizsgálatok a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DEOEC) Kardiológiai Intézet Klinikai Fiziológiai Tanszékén valósultak meg, a citometriai vizsgálatok a DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében történtek. A szívizomminták laboratóriumok közti szállítása szárazjégen történt. Az állatokat az olasz nemzeti irányelvek szerint gondozták (No. DLGS 27/01/1992, no. 116).

|                                    | <i>n</i> | Kontroll       | HF               |
|------------------------------------|----------|----------------|------------------|
| Szívfrekvencia (BPM)               | 13       | 88,16 ± 4,6    | 115,66 ± 7,6*    |
| CBF (ml/perc)                      | 9        | 24,9 ± 3,07    | 20,23 ± 4,43     |
| Artériás középnyomás (Hgmm)        | 13       | 105,3 ± 7,2    | 80,3 ± 7,2*      |
| LVEDP (Hgmm)                       | 11       | 6,4 ± 1,06     | 20,37 ± 3,05*    |
| LVSP (Hgmm)                        | 11       | 123,3 ± 12,43  | 96,2 ± 7,9*      |
| LV dP/dt <sub>max</sub> (Hgmm/sec) | 11       | 2223,3 ± 246,6 | 1436,8 ± 151,21* |
| LVEDD (cm)                         | 7        | 3,6 ± 0,25     | 4,3 ± 0,3*       |
| LVESD (cm)                         | 7        | 1,54 ± 0,34    | 3,5 ± 1,02*      |
| LVEDV (ml)                         | 7        | 69,16 ± 4,78   | 82,6 ± 7         |
| LVESV (ml)                         | 7        | 18,5 ± 1,91    | 47,83 ± 5*       |
| Ejekciós frakció (%)               | 7        | 75,6 ± 1,84    | 34,8 ± 3,5*      |
| FS (%)                             | 7        | 44,1 ± 1,9     | 17,5 ± 2,55*     |

**1. táblázat. Az állatokban *in vivo* mért funkcionális és strukturális paraméterek.** CBF: átlagos koronária vérátáramlás; LVEDP: BK végdiasztolés nyomás; LVSP: BK szisztolés nyomás; LV dP/dt<sub>max</sub>: a bal kamrában egységnyi idő alatt létrejövő nyomásváltozás maximális értéke; LVEDD: BK végdiasztolés átmérő; LVESD: BK végszisztolés átmérő; LVEDV: BK végdiasztolés térfogat; LVESV: BK végszisztolés térfogat; FS: a BK rövid tengely átmérőjének frakcionált rövidülése; A számok az átlag ± S.E.M. értékeket jelölik; *n*: a kísérletek száma; \*: P<0,05 kontrollhoz képest (Lionetti, Guiducci et al. 2007 alapján).

### 3.1.2. Poszt-infarktusos patkánymodell

A miokardiális infarktust (MI) 5 hetes hím Wistar patkányok bal anterior leszálló koszorúérének (LAD) proximális szegmensébe helyezett permanens ligatúrával idézték elő a franciaországi Montpellier egyetemi kutatólaboratóriumában. Kontrollként sham-operált, ligatúrától mentes állatok szolgáltak. Az állatokat az infarktus előidézését követő 18. héten tanulmányoztuk. Kollaborációs partnereink *in vivo* kivitelezett echokardiográfiás, valamint szöveti Doppler méréseket végeztek az állati szívek kontraktilitásának megítélése céljából, intraperitoneálisan alkalmazott bolus SR33805 (20 mg/kg) adása előtt és után. Ezt követően az állatok szívét eltávolítottuk, és azokat mechanikai, valamint biokémiai mérésekre használtuk fel. A kontraktilis fehérjék Western immunoblot analízise a külföldi partnerlaboratóriumban, míg a szívizomminták endogén PKA-aktivitásának meghatározása a DEOEC Kardiológiai Intézetének Klinikai Fiziológiai Tanszékén valósult meg. Az SR33805 kontraktilis hatásainak elemzése érdekében végzett mérések részben a franciaországi, részben a debreceni laboratóriumokban történtek. Minden vizsgálat eleget tett az amerikai National Institutes of Health "Laboratóriumi állatok gondozásának és használatának irányelvei" c. kiadvány (NIH Publications No. 85-23, 1996-ban átdolgozott kiadás) követelményeinek, azok a Francia Mezőgazdasági Minisztérium jóváhagyásával, valamint az Európai Unió laboratóriumi állatok gondozására vonatkozó irányelvei szerint történtek.

### 3.2. Immunhisztokémia

A -80 °C-on tárolt natív, sertés szívizommintákat felolvasztást, valamint Shandon cryomatrix gyantába (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) történő ágyazást követően cryostat mikrotómmal -20 °C-on 10 µm vastagságú szeletekre metszettük. Minden további lépés szobahőmérsékleten zajlott. A szövetmetszeteket 5 percen keresztül jéghideg acetonban fixáltuk, majd 20 percig metanolban inkubáltuk. Az így fixálódott metszeteket foszfát

pufferben (PBS) mostuk (a PBS oldat tartalma: 150,7 mM NaCl, 3,22 mM KCl, 0,735 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,4), majd normál kecske szérumban 20 percig blokkoltuk. Elsődleges antitestként monoklonális egér anti-TnI-t [Clone 19C7, Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA; hígítás: 1:500 PBS-BSA-ban (PBS-borjú szérum albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)] használtunk a foszforilációtól független (össz) TnI mennyiség, és poliklonális nyúl anti-TnI antitestet (foszfo S22 + S23) (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság; hígítás: 1:500 PBS-BSA-ban) a PKA-mediált TnI foszforiláció (P-TnI) meghatározásához. Ezt egy éjszakán át tartó inkubáció követte +4 °C-on, majd 30 perces inkubáció szobahőmérsékleten anti-egér-Cy3 (piros), valamint anti-nyúl-Cy2 (zöld) másodlagos antitestek (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; hígítás: 1:200 PBS-ben) jelenlétében, melyek segítségével a kardiális TnI fehérjét és annak PKA-specifikus foszforilált formáját jelenítettük meg. A PKC-mediált TnI foszforiláció meghatározásához poliklonális nyúl anti-TnI elsődleges antitestet (foszfo T143) (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság; hígítás: 1:100 PBS-BSA-ban) használtunk, amit egy éjszakán át tartó inkubáció követett +4 °C-on, majd 30 perces inkubáció szobahőmérsékleten anti-nyúl-Biotin másodlagos antitest (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; hígítás: 1:200 normál kecske szérum tartalmú PBS-ben) jelenlétében. A PKC-specifikus TnI foszforiláció megjelenítésére streptavidin-Cy2-t (zöld) használtunk. A tárgylemezeket 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) tartalmazó Vectashield médiummal rögzítettük (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A szövetmetszetekről készült mikroszkópikus felvételeket NIKON Eclipse 80i Fluorescein mikroszkóppal rögzítettük, melyhez a 100×-os végső nagyítás eléréséhez NIKON 10×-es objektívet [Numerikus apertúra (NA): 0,30] használtunk. Nagy felbontású felvételek készítésére egy Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot használtunk Olympus LUCPLFLN 20×-os objektívvel (NA: 0,45), valamint digitális zoom-ot a 180×-os és 540×-es végső nagyítások eléréséhez.

### 3.3. TnI back-foszforiláció

A permeabilizált sertés szívizomsejtekből nyert fehérje homogenizátumok TnI foszforilációs szintjeinek meghatározására back-foszforilációs esszét végeztünk [37]. A membránfosztott szívizomsejteket ugyanolyan módon készítettük elő, mint ahogy azt korábban közölték [53]. A reakció oldatok az izolált szívizomsejt frakcióból 40 µl-t {a protein koncentráció 0,5 mg/ml volt a módosított izoláló oldatban [mM-ban: KCl 100, etilén-glikol-tetraacetát (EGTA) 2, MgCl<sub>2</sub> 1, ATP 0,1, valamint imidazol 100; pH 7,0; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA]}, a foszfor 32-es tömegszámú izotópjával (<sup>32</sup>P) jelölt ATP-t tartalmazó módosított izoláló oldatból 10 µl-t (végső specifikus aktivitás: 1500 cpm/pmol), valamint a PKA-ból 1 µl-t [Sigma, St. Louis, MO, USA, aktivitás: 4000 U/ml a 6 mg/ml (ditiotritol) DTT-t tartalmazó módosított izoláló oldatban] tartalmaztak. A reakció szobahőmérsékleten ment végbe 15 percen keresztül. A reakcióoldathoz legvégül 50 µl nátrium dodecyl szulfát (SDS) mintapuffert (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk, és a mintákat 5 percen keresztül főztük. A felfőzött mintákból 30 µl-t 10%-os poliakrilamid gélekre vittünk fel, majd szeparációt követően azokat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A foszfátcsoport TnI fehérjébe való beépülését autoradiográfiával detektáltuk (kék-szenzitív RTGB filmek, Primax, Berlin, Németország). Az egyes csíkok intenzitásértékeit (melyek a foszfát beépülését tükrözték) Image J szoftverrel (ingyenesen hozzáférhető a [www.nih.gov](http://www.nih.gov) oldalon) történő denzitometrálással határoztuk meg. Az ábrákon az optikai denzitásokat arbitrális egységekben (AU) tüntettük fel.

### 3.4. Western immunoblot

A sertés szívek BK szövetmintáit "radioimmun precipitációs esszé" pufferben homogenizáltuk, amely az alábbi összetevőket tartalmazta: Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, valamint 1% nátrium-deoxykolát; pH 7,4. A fehérje

koncentrációkat BCA esszé segítségével határoztuk meg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) BSA-t használva standardként. A homogenizátumok koncentrációit 4 mg/ml-re állítottuk be, majd 2X-es töménységű SDS-mintapuffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) azonos térfogatú elegyével hígítottuk, végül a mintákat az elektroforetizálás előtt 10 percig főztük. A 10%-os SDS-poliakrilamid gélekre 50 µg mennyiségű fehérjemintákat vittünk fel, melyeket - szeparációt követően - nitrocellulóz membránokra transzferáltunk. A membránokat TnI ellenes antitesttel jelöltük (Clone 19C7, Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA, dilution: 1:5000), és a jelet peroxidázzal konjugált anti-nyúl IgG-specifikus antitesttel detektáltuk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; hígítás: 1:50,000). A sávokat enhanced kemilumineszcencia (*Plus-ECL*, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) segítségével jelenítettük meg, a kiértékelés Image J szoftverben zajlott. Kizárólag az egyazon membránhoz tartozó sávokat értékeltük annak érdekében, hogy elkerüljük a különböző transzfer hatásfokokból vagy egyéb technikai nehézségből adódó eltéréseket.

A patkány szívizomban található TnI és MLC2 fehérjék össz-, valamint azok foszforilált formáinak mennyiségeit a franciaországi kollaborációs partnerlaboratóriumban határozták meg olyan fehérjemintákból, melyeket permeabilizált, manuálisan disszekált, BK szubendokardiális szívizom preparátumokból nyertek. Az izomnyalábokat fagyasztás előtt a kezdeti hosszuk 20-30%-val megnyújtották. A szívizommintákat jéghideg, 10%-os triklóracetáttal kezelték, hogy a kontraktilis fehérjék megőrizzék foszforilációs állapotukat. Ezt követően a mintákat 10 mM DTT-t tartalmazó acetonnal háromszor átmosták, majd a pelletet megszáritották, és urea pufferrel [mM-ban: urea 8, Tris 0,2, glicin 0,25, DTT 0,5, szukrózzal szaturált etilén-diamin-tetraacetát (EDTA) 0,4, proteáz inhibitorok] szobahőmérsékleten egy órán keresztül elegyítették. A fehérje koncentrációt RCDC kittel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) határozták meg. A 15-, illetve 10%-os SDS-poliakrilamid gélekre 20 µg mennyiségű fehérjemintákat vittek fel. Az egy állatból származó

összes mintát ugyanazon gélen szeparálták mindkét fehérje esetében. Az MLC2 izoformákat specifikus kardiális MLC2 ellenes antitesttel detektálták (Coger SA, Párizs, Franciaország). Az össz TnI fehérjemennyiséget kardiális TnI ellenes antitesttel (Hytest, Turku, Finnország; Katalógusszám: 4T21), míg annak PKA által foszforilált formáját foszfo-specifikus antitesttel (Hytest, Turku, Finnország; Katalógusszám: 4T45) azonosították. A sávokat ECL Plus rendszer segítségével jelenítették meg (Amersham Pharmacia, Little Chalfont Buckinghamshire, Anglia).

### **3.5. PKA aktivitás mérés**

A fagyasztott patkány BK szövetmintákat felolvasztást követően módosított izoláló oldatba helyeztük, majd mechanikailag izoláltuk. A citoszól frakciót centrifugálással szeparáltuk (300 g-vel 1 percre), majd a felülúszót (citoszól frakció) elkülönítettük. Ezután meghatároztuk a citoszól frakció fehérje koncentrációját BCA technikával (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), standardként BSA-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használva. A fehérje koncentrációt 3 mg/ml-esre állítottuk be a citoszól frakció módosított izoláló oldattal történő hígításával. Az endogén PKA aktivitást szobahőmérsékleten vizsgáltuk egy, a citoszól frakcióból 30 µl-t, <sup>32</sup>P-al jelölt ATP-t tartalmazó módosított izoláló oldatból 5 µl-t (végső specifikus aktivitás: 2500 cpm/pmol), 8-Br-cAMP-ből 5 µl-t (100 nM), kemptidből 5 µl-t (GenScript, Piscataway, NJ, USA; 1 mg/ml), valamint a PKA inhibitor H-89-ből vagy az SR33805-ből 5 µl-t tartalmazó reakcióelegyen. A reakciókat a citoszól frakció hozzáadásával indítottuk el, majd a reakció oldatokból 10 µl-t foszfocellulóz papírra (GE Healthcare, München, Németország) pipettáztunk 0 és 15 perces időpontokban. A papírokat 30 percre szárítottuk, majd háromszor 0,5 %-os foszforsavval (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd legvégül acetonnal mostuk át. A papírok radioaktivitását szcintillációs eljárással detektáltuk (TriCarb szcintillációs számláló, PerkinElmer Life Science, Boston, MA, USA). Az SR33805 hatásait a rekombináns módon előállított PKA molekula (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA; 4000 U/ml, borjúból izolálva, 6 mg/ml koncentrációjú DTT oldatban) aktivitására nézve is megvizsgáltuk. Ebben az esetben a rekombináns PKA aktivitását szobahőmérsékleten mértük egy, a módosított izoláló oldatból 35 µl-t, <sup>32</sup>P-al jelölt ATP-t tartalmazó módosított izoláló oldatból 5 µl-t (végső specifikus aktivitás: 450 cpm/pmol), PKA inhibitor H-89-ből vagy SR33805-ből 5 µl-t, rekombináns PKA oldatból 1 µl-t, valamint a szubsztrátként szolgáló hiszton IIA-ből 5 µl-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 1 mg/ml) tartalmazó reakcióelegyben. A reakciókat a szubsztrát (hiszton IIA) hozzáadásával indítottuk el, majd a reakció oldatokból 10 µl-t foszfocellulóz papírra (GE Healthcare, München, Németország) pipettáztunk 0 és 15 perces időpontokban. A beépülő foszfátmennyiséget a fent részletezett módon mértük. A PKA aktivitásokat a maximális aktivitásra (az inhibitor távollétében mért aktivitás) normalizált %-os értékekben fejeztük ki, és "baseline"-ra (a PKA távollétében mért baseline aktivitás) korrigáltuk.

### **3.6. Áramlási citometria**

A BK sertés szívizommintákat (~0,04 g nedves tömeg) korábban közölt eljárások szerint mechanikailag izoláltuk [54]. Röviden, az izolált szívizomsejteket sejtizoláló oldatban (mM-ban: MgCl<sub>2</sub> 1, KCl 100, EGTA 2, ATP 4, valamint imidazole 10; pH 7,0; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a korábban ismertetett módon permeabilizáltuk [54]. Ezt követően a szívizomsejteket 90 percig jégen 100 µl-nyi 2 mg/ml töménységű BSA-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), valamint elsődleges antitestet tartalmazó izoláló oldatban inkubáltuk. Elsődleges antitestként monoklonális egér anti-TnI (19C7-es klón, Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA; hígítás: 1:200), valamint a foszforilációra érzékeny poliklonális nyúl anti-TnI (foszfo S22 + S23) (Abcam, Cambridge, UK; hígítás: 1:100) antitesteket használtunk. Ezt követően a TnI és P-TnI jelintenzitások megjelenítésének céljából 30 perces inkubációkat végeztünk jégen anti-egér-Cy3 és anti-nyúl-Cy5 antitestekkel (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; hígítás: 1:50). A szívizomsejteket jéghideg, 2%-os formaldehidben

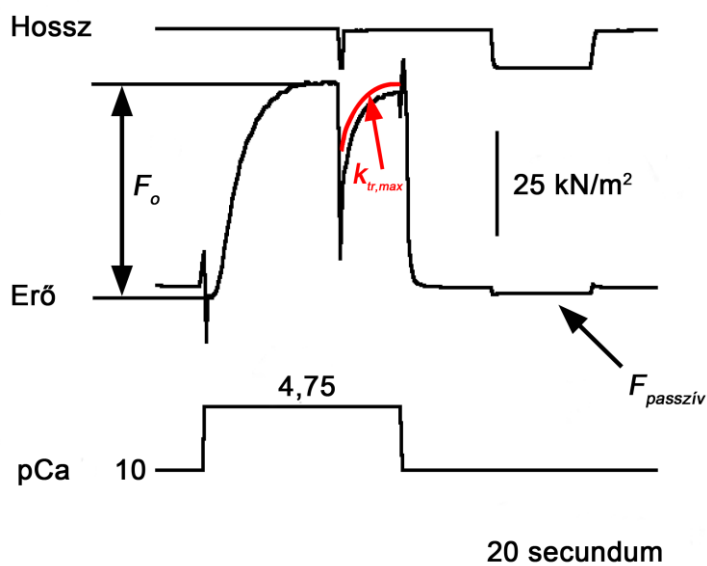
(sejtzoláló oldatban oldva) 30 percen keresztül fixáltuk. Minden mosási lépést izoláló oldattal végeztünk. A sejtszuspenziókat finoman szonikáltuk, majd azokat egy 50  $\mu\text{m}$ -es sejtszűrőn filtráltuk keresztül. Az áramlási citometriai méréseket FACSArray áramlási citométer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) segítségével végeztük. Az egyes partikulumok fluoreszcencia intenzitásértékeit csoportonként 6 állatban határoztuk meg. Állatonként átlagosan 6,000-10,000 partikulumot vizsgáltunk meg. A Cy3 fluoreszcenciát 532 nm-en gerjesztettük és  $585\pm 21$  nm-en detektáltuk, míg a Cy5 fluoreszcenciát 635 nm-en gerjesztettük és  $661\pm 8$  nm-en detektáltuk. A sejtörmelék az előre, valamint a jobbra szóródó fényintenzitások kapuzásával zártuk ki. Az így nyert listafájlokat REFLEX szoftverrel elemeztük [55].

### 3.7. Erőmérések permeabilizált szívizomsejteken

A sertés- és patkányszívekből nyert szívizomsejtek mechanikai funkciójának mérésére azonos módszereket alkalmaztunk. Méréseink során a miofibrilláris funkció megítélésének céljából meghatároztuk a maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta aktív erőt ( $F_o$ ), a passzív erőkomponenst ( $F_{passzív}$ ), a szívizomsejtekben ébredő izometriás erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet ( $p\text{Ca}_{50}$ ), a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés meredekségét jellemző paramétert ( $n\text{Hill}$ ), valamint az erő regenerálódás sebességi állandóját maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál ( $k_{tr,max}$  - az aktin-miozin keresztkötési ciklus maximális sebességére jellemző paraméter). Az erőmérések során használt relaxáló és aktiváló oldatok  $p\text{Ca}$  ( $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ ) értékei 10, valamint 4,75 voltak. A relaxáló oldat összetétele lényegében csak annyiban különbözött az aktiváló oldatétól, hogy az a  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA helyett EGTA-t tartalmazott (a relaxáló oldat összetétele mM-ban: BES 10, KCl 37,11,  $\text{MgCl}_2$  6,41, EGTA 7, ATP 6,94, kreatin-foszfát 15; pH 7,2; az aktiváló oldat összetétele mM-ban: BES 10, KCl 37,34,  $\text{MgCl}_2$  6,24,  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA 7, ATP 6,99, kreatin-foszfát, 15; pH 7,2; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; KCl és EGTA: Merck, Darmstadt, Németország). Mindkét oldat az alábbi proteáz inhibitorokat tartalmazta: 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 40  $\mu\text{M}$  leupeptin és 10  $\mu\text{M}$  E-64 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A

köztes  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú oldatokat a relaxáló és aktiváló oldatok megfelelő arányú keverésével állítottuk elő.

Az egyedi, szívizomsejt méretű preparátumokon alkalmazott, 15 °C-os hőmérsékleten végrehajtott erőmérések technikáját egy korábbi közleményben részletesen ismertették [54]. Méréseink során egy izolált, permeabilizált szívizomsejtet a mechanikai mérőrendszerhez rögzítettünk. A szarkomerhossz 2,3  $\mu\text{m}$ -re történő precíz beállítását követően ismételt aktivációs-relaxációs ciklusokban izometriás  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúrákat váltottunk ki, melyek során a szívizomsejtet a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes relaxáló oldatból egymás után csökkenő  $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú aktiváló oldatokba mozgattuk. Az izometriás csúcs erőértékeket a maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta aktív erőre normalizáltuk, az így kapott  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggéseket ábrázoltuk, majd egy módosított Hill függvény szerint illesztettük ([1] egyenlet). Ezzel a módszerrel a szívizomsejtekben ébredő izometriás erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, azaz a  $p\text{Ca}_{50}$  értéket, valamint a kontraktilis apparátuson belüli kooperativitás mértékét ( $n\text{Hill}$ ; a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő görbe meredekségére jellemző paraméter) tudtuk értékelni. Az egyedi  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúrák során a maximális erőérték elérése után, egy gyors "release-restretch" manővert végeztünk, hogy meghatározzuk az erő regenerálódás sebességi állandóját ( $k_{tr,max}$ ). Ennek a beavatkozásnak az eredményeként először az erő a maximális értékről nullára esett, lehetővé téve ezzel a totál erő meghatározását ( $F_{totál}$ ), majd ismét elkezdett növekedni. A szívizomsejtet ezután ismét relaxáló oldatba helyeztük, ahol eredeti hosszának 80%-ára rövidítettük, hogy meghatározhassuk a sejt passzív erejét ( $F_{passzív}$ ). Az izometriás aktív erőt ( $F_o$ ) a totál és a passzív erőértékek különbségéből nyertük. A  $F_o$ -t és a  $F_{passzív}$ -t a szívizomsejt keresztmetszeti területére normalizáltuk, amit az optikailag irányított megvilágítás során lemerített sejt szélességéből és vastagságából számítottunk ki. Az izolált szívizomsejten végzett mérési protokoll alatt készült erőgörbét a 4. ábra demonstrálja.



4. ábra. Az izolált szívizomsejten végzett mérési protokoll alatt készült erőgörbe. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúrákat a szívizomsejt  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes relaxáló oldatból ( $\text{pCa } 10$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú aktiváló oldatba ( $\text{pCa } 4,75$ ) történő átvitelével idéztük elő. Az aktiváció során a gyors hosszváltozást [„release-restretch” manőver a kontraktúra csúcsán ( $F_o$ )] a kontraktilis erő megszűnése, majd

gyors regenerációja kísérte. Az erőgörbe ezen szakaszának exponenciális függvénnel ([2] egyenlet) történő illesztése (piros nyíl) lehetővé tette az aktin-miozin ciklus sebességi állandójának ( $k_{tr,max}$ ) meghatározását. A relaxáló oldatban végrehajtott hosszváltozások révén a sejt passzív erejét ( $F_{passzív}$ ) mértük meg.

A sertés szívekből izolált szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggéseit *in vitro* PKA kezelés előtt és után is meghatároztuk. A PKA törzsoldat borjú szívből kinyert PKA katalitikus alegységet tartalmazott [a gyártó által javasolt 100 U-ot 6 mg/ml koncentrációjú DTT-t tartalmazó desztillált vízben, 0,05 mg/ml-es fehérjekoncentrációban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Katalógusszám: P2645; LOT szám: 021M7676V)]. A PKA hatás kialakulásához a szívizomsejteket 20 percig inkubáltuk 5  $\mu\text{l}$  PKA törzsoldatot tartalmazó 100  $\mu\text{l}$ -nyi relaxáló oldatban. Egy különálló vizsgálatban izometriás erőméréseket végeztünk az izolált sertés szívizomsejteken először 1,9, majd 2,3  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhosszakon, így tanulmányozva a hosszfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítésben bekövetkező esetleges változásokat, azaz a Frank-Starling mechanizmus molekuláris hátterét.

A patkány szívekből nyert szívizomsejtek mechanikai paramétereit *in vitro* SR33805 kezelés (10  $\mu\text{M}$ , 10 perc, szobahőmérséklet) előtt és azt követően vizsgáltuk két különböző szarkomerhosszon (1,9, valamint 2,3  $\mu\text{m}$ ).

Azon sejteket, melyek a protokoll végére nem őrizték meg a kezdeti maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta erejük 75%-át, vagy  $nHill$  értékük 1,5-nél kisebbnek adódott, kizártuk a statisztikai analízisből.

### 3.8. Adatelemzés, statisztikai analízis

A  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggéseket módosított Hill egyenlettel illesztettük:

$$[1] \quad F = F_o[\text{Ca}^{2+}]^{nHill} / (Ca_{50}^{nHill} + [\text{Ca}^{2+}]^{nHill})$$

ahol  $F$  egy adott  $[\text{Ca}^{2+}]$ -hoz tartozó "steady-state" erőt, míg  $F_o$ ,  $nHill$  és  $Ca_{50}$  (vagy  $pCa_{50}$ ) a maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -hoz tartozó aktív erőt, valamint szemilogaritmikus ábrázolásban a szigmoidális összefüggés meredekségét és középpontját jelölik.

A "release-restretch" manővert követő erő regenerálódást egyváltozós exponenciális függvénnyel illesztettük, megbecsülve annak sebességi állandóját ( $k_{tr,max}$ ) a maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál:

$$[2] \quad F(t) = F_i + F_a(1 - e^{-k_{tr,max}t})$$

ahol  $F(t)$  a "restretch" utáni bármely időpillanatban ( $t$ ) a maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál mért erőt,  $F_i$  és  $F_a$  pedig a "restretch" utáni kezdeti erőt, valamint a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta erő regenerálódásának amplitúdóját jelölik. A kísérleti preparátumokból kapott adatsorokat egyedileg illesztettük, az illesztett paramétereket összegeztük, és azok átlagait mutatjuk be.

A biokémiai és mechanikai mérések statisztikai analízisét egy-utas ANOVA-val végeztük, az egyes csoportok közötti többszörös összehasonlításokra Bonferroni poszt-tesztet használtunk. Két folyamatos változó között lineáris regressziós analízissel határoztuk meg az összefüggést. A mechanikai mérések során az *in vitro* kezelések hatására bekövetkező változásokat Student-féle páros t-próbával elemeztük. Az eredményeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a P érték kisebb volt, mint 0,05. Az áramlási citometriai mérések során nyert több ezer egyedi adatpont analízisének kivitelezésére egy olyan modellezési eljárásra volt szükség, amely feltételezte az egyedi szívizomsejtek kapcsolatát, és

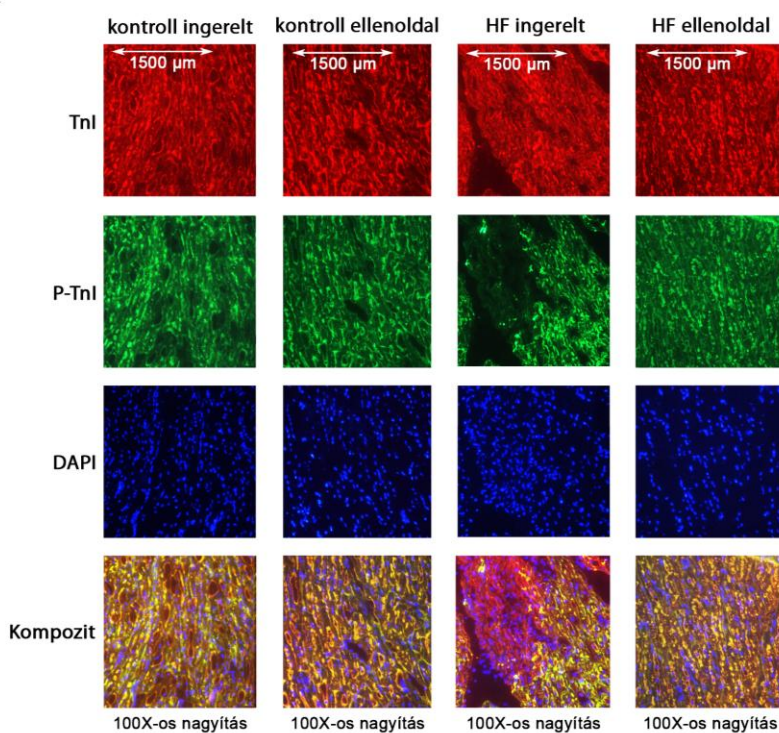
képes volt kezelni az egyazon állati szívekből származó sejtek mérési eredményei közti korrelációkat. Így nem a hagyományos ANOVA-t, vagy lineáris regressziós analízist használtuk, hanem a "maximum likelihood mixed effects" többszintű modellezést csoportok és területek közötti interakciókkal [56]. Az ingerlés hatását az átlagos log relatív jelintenzitásokból  $[\log(P-TnI/TnI)]$  határoztuk meg a foszforiláció mértékére nézve, az interkvartilis tartományokból (IQR) pedig a foszforiláció heterogenitására vonatkozóan. Az adatok logaritmikus transzformációja elősegítette a változók eloszlásának normalizálását.

## 4. Eredmények

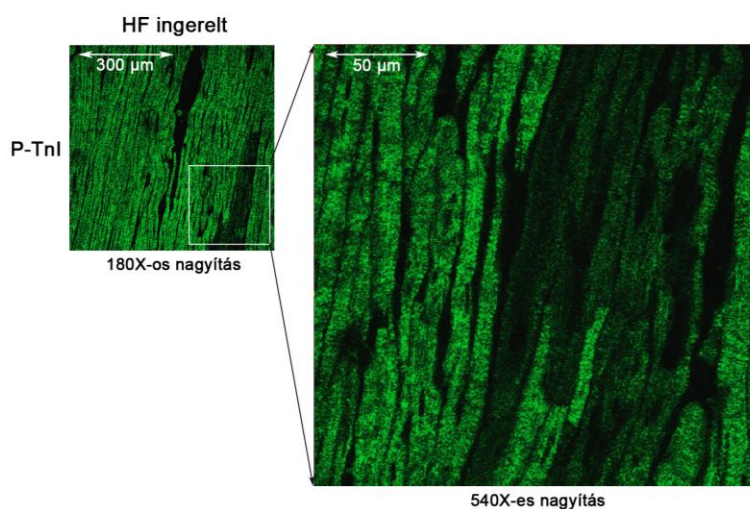
### 4.1. A troponin I fehérje foszforilációját érintő változások az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében

A PKA-mediált miofilamentum fehérje foszforiláció homogenitásának vizsgálata céljából szívelégtelen, valamint kontroll sertések szívének BK anterior/anterolaterális (ingerelt), valamint inferoseptális (ellenoldal) régióiból származó szívizomszövet mintáiban határoztuk meg a TnI foszforiláció mértékét immunhisztokémiai eljárással. A miokardiális szövetminta szívizomsejtjeit TnI-foszforilációra nem érzékeny, valamint annak PKA-specifikusan (S22 + S23) foszforilált formájára (P-TnI) érzékeny antitestekkel jelöltük meg, majd a szövetmetszeteket DAPI-t tartalmazó médiumban is festettük. A 5. ábrán a fluoreszcens mikroszkópiával rögzített, három izolált jelölési technikával nyert képet, valamint azok egymásra vetített kompozit-képeit is bemutatjuk. Általánosságban elmondható, hogy bármely minta bármely területén homogén festődést kaptunk, ha a szív mintákat TnI foszforilációra nem érzékeny antitesttel jelöltük. Ehhez hasonlóan a kontroll szívek bármely területén, valamint a szívelégtelen állatok nem ingerelt (ún. ellenoldali) területeiről származó mintákban a P-TnI-re specifikus szövetjelölés homogén festési intenzitást eredményezett. Ezzel szemben a szívelégtelen ingerelt oldalon variábilis P-TnI intenzitásokat figyeltünk meg (5. ábra, A panel). Az eltérő jelintenzitással festődő területeket olyan szívizomsejt csoportosulások alkották, melyek a szívelégtelen állatok ingerelt területein belül a környezetükhöz képest egyöntetűen csökkent P-TnI szinttel rendelkeztek (5. ábra, B panel). A P-TnI szintek az egyes szívizomsejteken belül lényegesen sehol sem változtak.

**A**



**B**



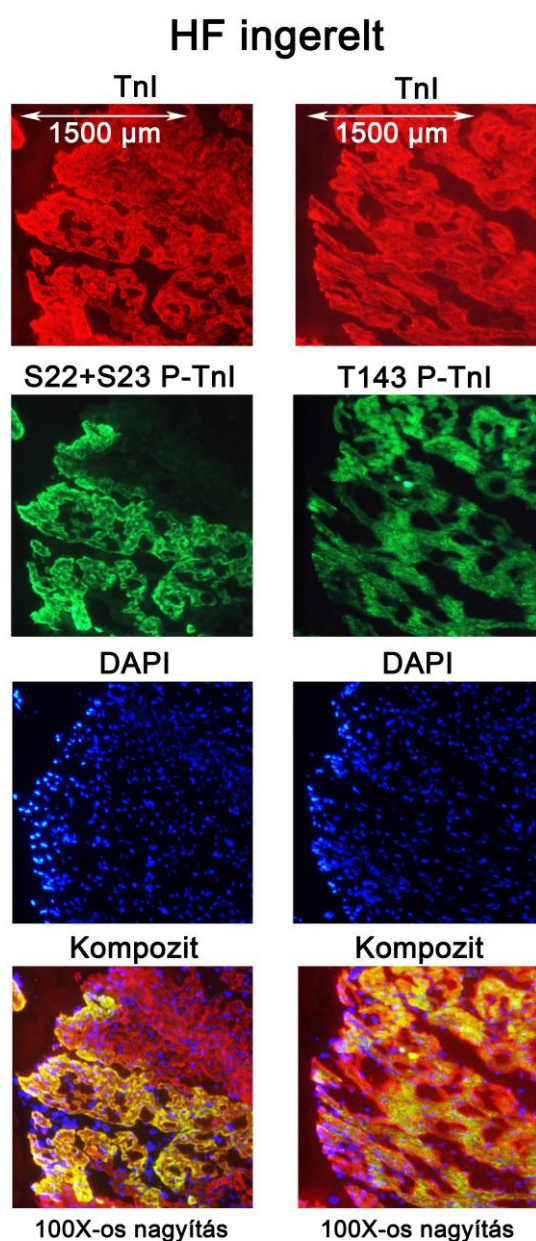
## 5. ábra. Immunhisztokémia. A)

A szívizomszövet mintákat a TnI fehérjére, valamint annak foszforilált formájára (P-TnI) specifikus antitestekkel jelöltük meg, míg a sejtmagok pozícióját DAPI-val emeltük ki. A szívelégtelen ingerelt csoport kompozit képén az eltérő mennyiségű P-TnI intenzitások területenként változó sárga színintenzitásokhoz vezettek. B)

A szövetmetszetek konfokális mikroszkóp által rögzített felvételei sejtről-sejtre érvényesülő különbségeket mutattak: a szívelégtelen állatok ingerelt területein olyan szívizomsejt csoportosulásokat lehetett elkülöníteni, amelyek környezetükhöz képest jelentős mértékben csökkent P-TnI szintekkel rendelkeztek.

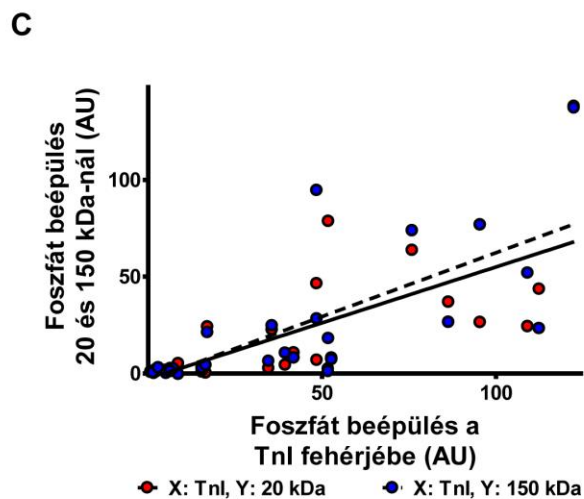
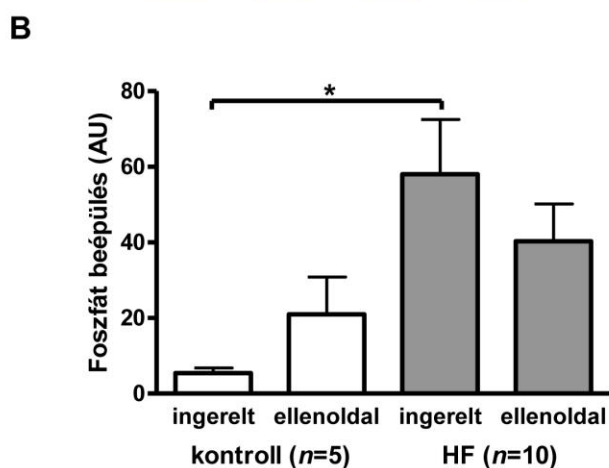
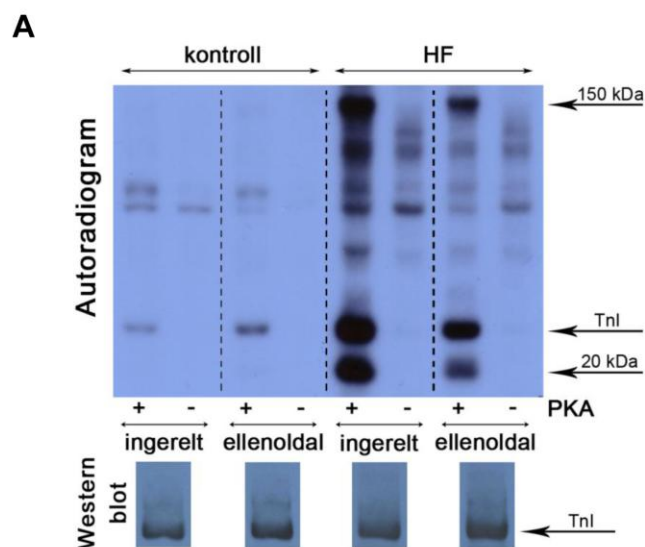
A szívelégtelen szívek ingerelt területein az össz-TnI ellenes antitest által mutatott homogén festődés, valamint a szívizomsejt magok DAPI-val történő jelölődése ellentétben állt az ugyanazon területen megfigyelhető inhomogén P-TnI festődéssel, ami kizárta annak lehetőségét, hogy a jelenség hátterében esetlegesen fibrózis vagy nekrózis állna.

Egy párhuzamos vizsgálat sorban azt határoztuk meg, hogy hogyan alakult a PKC-mediált TnI foszforiláció a szívelégtelen állatok szívének ingerelt területein. Ennek érdekében a szívizom szövetmintákat az 5. ábra elrendezésének megfelelően PKA-, valamint PKC-specifikus P-TnI ellenes antitest (T143) jelöléssel is elláttuk (6. ábra). Általánosságban elmondható, hogy a PKC-specifikus helyen jelölt szövetmetszetek homogénebb festődést mutattak a PKA-specifikus jelöléshez képest.



**6. ábra. Komparatív immunhisztokémiai eredmények a PKA- és PKC-specifikus TnI foszforilációs mintázatok meghatározására a szívelégtelen sertések ingerelt BK területein.** A TnI foszforiláció PKA-specifikus jelölése egy heterogénebb festődési mintázatot eredményezett a szívelégtelen állatok ingerelt területeiről származó szövetmintában, összevetve az ugyanerről a területről származó szomszédos, PKC-specifikus TnI foszforilációra jelölt szövetmetszettel. (Az elrendezés ugyanaz, mint az 5. ábra A paneljén. Ez a módszer megegyező eredményt adott további három szívelégtelen szívizommintában is).

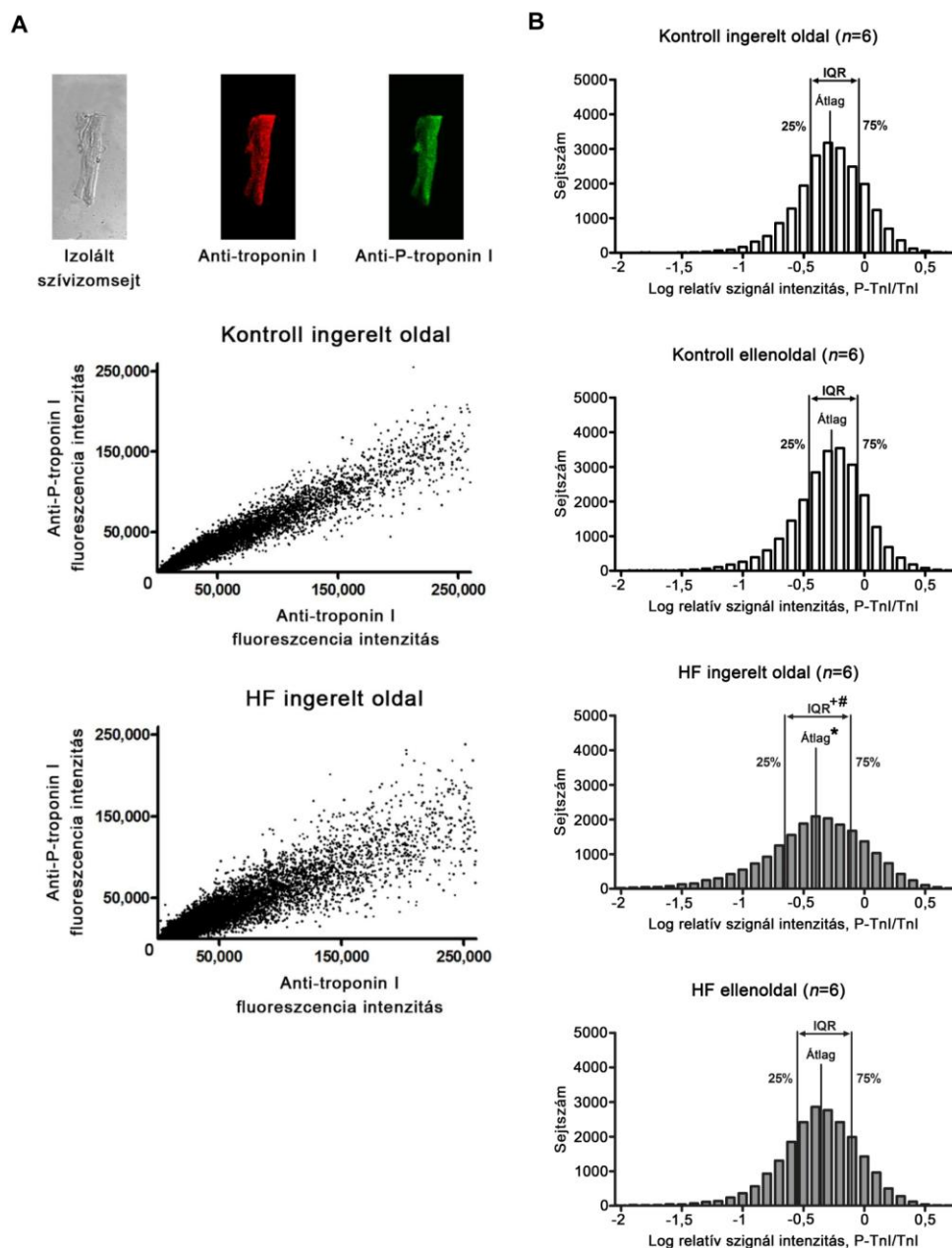
A miofilamentáris fehérjék foszforilációjának átlagos szintjét back-foszforilációs esszé segítségével is megbecsültük. A permeabilizált szívizomsejtekből nyert fehérje homogenizátumok átlagos foszfo-specifikus TnI jelintenzitásai jelentősen nagyobbak adódtak a szívelégtelen állatok szívének ingerelt területein ( $58 \pm 14,49$  AU) a kontroll állatok ugyanazon területeihez képest ( $5,41 \pm 1,34$  AU;  $P < 0,05$ ), ami a szívelégtelen ingerelt területek PKA-dependens TnI foszforilációjának *in vivo* bekövetkező csökkenésére utalt (7. ábra, A és B panelek). A 20, valamint 150 kDa-os molekulaméretnél felfedezhető, foszforiláció dependens jelintenzitások korreláltak a TnI foszforiláció mértékével (7. ábra, C panel). Ezen molekulásúly tartományok közel helyezkednek el a MyBP-C, valamint az MLC2 molekulaméretéhez. PKA expozíció esetén a TnI és a MyBP-C foszforilációjában hasonló változások mehetnek végbe, azonban az MLC2 molekula esetében nem jellemző a foszfát beépülés PKA alkalmazásakor, így a 20 kDa-nál lévő fehérje valószínűleg nem feleltethető meg az MLC2-nek. A szívelégtelen állatok szíveinek ingerelt, valamint ellenoldali területein mért átlagos TnI foszforiláció egymástól nem tért el szignifikánsan ( $P > 0,05$ ) (HF ellenoldal:  $40,3 \pm 9,86$  AU) (7. ábra, A és B panelek).



**7. ábra. TnI back-foszforiláció.** A) Felül az autoradiográfia, alul a Western immunoblot eredményei láthatóak egy reprezentatív TnI back-foszforilációs esszéből. A kontroll és szívelégtelen állatok BK ingerelt, valamint ellenoldali területein a TnI fehérjébe történő PKA-dependens foszfátbeépülést  $^{32}\text{P}$  izotóppal jelölt ATP segítségével határoztuk meg SDS gélelektroforézist követően. Az autoradiogramokon megfigyelhető jelintenzitásokat úgy tekintjük, hogy azok egyenesen arányosak az anorganikus foszfát ( $\text{P}_i$ ) TnI fehérjébe történő beépülésével PKA jelenlétében (+ jelek) *in vitro*, valamint fordítottan arányosak a kiindulási TnI foszforilációs szintekkel a PKA alkalmazását megelőzően *in vivo*. PKA hiányában a jelintenzitások elhanyagolhatóak voltak (- jelek). A TnI érzékeny antitest jelenlétében előhívott TnI Western immunoblottok az egyenlő mennyiségben felvitt fehérjemennyiségeket igazolták minden kísérlet során. B) Az ugyanolyan körülmények között végzett back-foszforilációs esszék eredményeinek statisztikai kiértékelése az átlagos TnI foszforiláció alacsonyabb szintjét igazolta a szívelégtelen csoport ingerelt oldalán a kontroll ingerelt oldalhoz képest. (Az oszlopok az átlag  $\pm$  S.E.M. értékeket jelölik; n: az állatok száma; AU: optikai denzitás arbitráris egységekben; \*:  $P < 0,05$  HF ingerelt vs. kontroll ingerelt oldal). C) A TnI foszforiláció, valamint a 20 (nyitott kör),

illetve 150 kDa-os magasságban (zárt kör) található másik két fehérje közötti korrelációkat X-Y koordinátarendszerben ábrázoltuk. Az állatok szívének ingerelt és ellenoldalairól származó jelintenzitásokat az egyes minták TnI fehérjébe történő  $\text{P}_i$  beépülés függvényében tüntettük fel. A vonalak a lineáris regressziós analízisből származó, az adott fehérje, valamint a TnI fehérje foszforilációja közötti összefüggésre vonatkozó kapcsolatot reprezentálják, és az ezen változók közötti pozitív korrelációkra utalnak (X: TnI, Y: 20 kDa:  $r=0,71$ ;  $P < 0,0001$ ; X: TnI, Y: 150 kDa:  $r=0,74$ ;  $P < 0,0001$ ).

Az immunhisztokémiai és back-foszforilációs esszéből nyert eredményeket követően kifejlesztettünk egy protokollt, amely lehetővé tette a permeabilizált szívizomsejt szuszpenziók TnI foszforilációjának szintjében bekövetkező regionális különbségek kvantitatív kiértékelését áramlási citométerrel. Ez a metodika nagyszámú, TnI-re és P-TnI-re egyaránt jelölt szívizomsejt esetében adta meg a relatív P-TnI értéket (8. ábra, A panel). A logaritmikusan transzformált, relatív jelintenzitások [ $\log(P\text{-TnI}/TnI)$ ] eloszlás hisztogramjait a szívelégtelen, valamint a kontroll állatok szíveinek mindkét szóban forgó régiójára nézve meghatároztuk, csoportonként 6 állat adatainak bevonásával. A 8. ábra B panelje azt demonstrálja, hogy a kontroll állatok ingerelt oldalainak megfelelő területekről képzett eloszlás hisztogram a Gauss-eloszláshoz hasonló megjelenést mutatott, szemben a szívelégtelen állatok ingerelt területeinek hisztogramjával, amely egy aszimmetrikus formát öltött a relatíve alacsonyabb  $\log(P\text{-TnI}/TnI)$  értékeknél detektált szívizomsejt szám növekedés miatt. A back-foszforilációs esszé eredményeivel összhangban (7. ábra, A és B panelek) a szívelégtelen állatok szívének ingerelt területéhez tartozó  $\log(P\text{-TnI}/TnI)$  átlagérték szignifikánsan alacsonyabbnak adódott, mint a kontroll állatok ugyanazon területein (-0,41 vs. -0,28 a HF ingerelt és a kontroll ingerelt területeken;  $P=0,0071$ ), így mindkét esszé a P-TnI relatív csökkenését igazolta a szívelégtelen állatok ingerelt területeire nézve. Ezen túlmenően a szívelégtelen ingerelt csoportban szignifikánsan szélesebb IQR értéket figyeltünk meg a kontroll ingerelt, valamint a szívelégtelen ellenoldali területekhez képest (0,53 vs. 0,36 vagy 0,42 a HF ingerelt, kontroll ingerelt és HF ellenoldali területeken;  $P=0,0093$  vs. kontroll ingerelt oldalhoz képest;  $P=0,0047$  vs. HF ellenoldalhoz képest). A szívelégtelen csoport ingerelt területein megfigyelt IQR kiszélesedés az ezen területekről származó szívizomsejtek közötti relatív TnI foszforilációban létrejövő nagyobb szórást tükrözte. Az eloszlás hisztogramokat jellemző paraméterek a 2. táblázatban találhatóak.

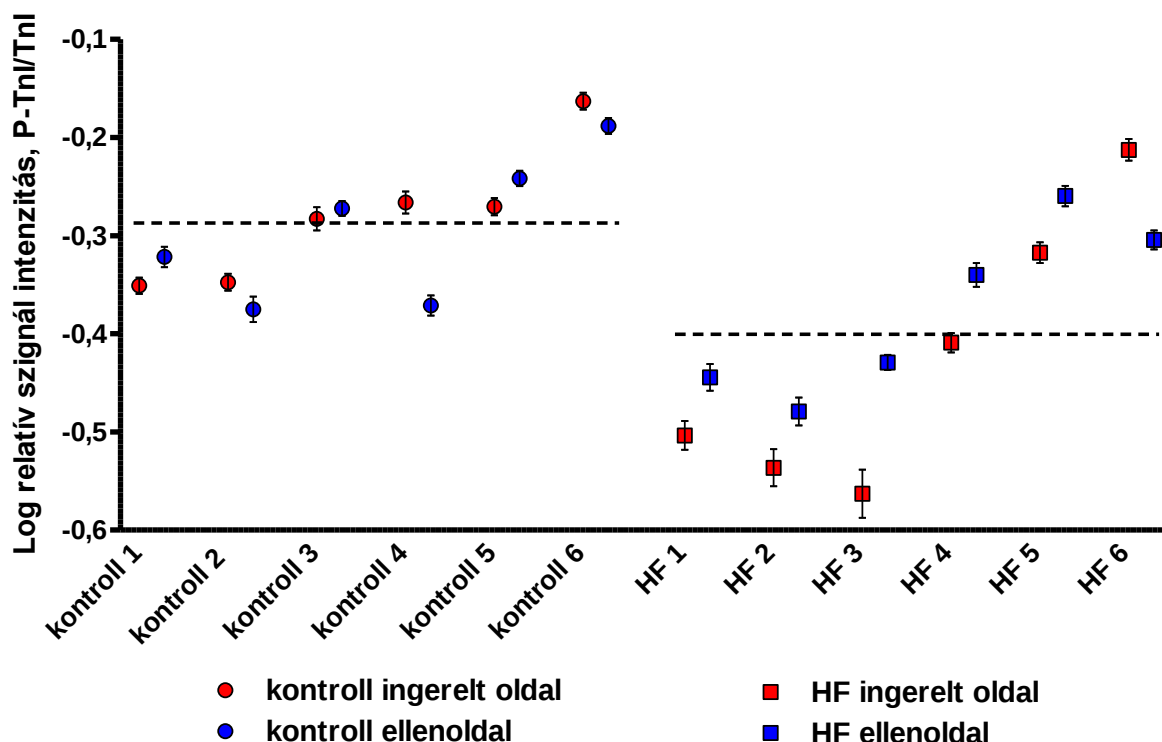


**8. ábra. Áramlási citometria.** **A)** Az áramlási citometriai méréshez előkészített, TnI-re (piros) és P-TnI-re (zöld) egyaránt jelölt, reprezentatív, permeabilizált szívizomsejt mikroszkópikus felvétele (felső panel). A jelintenzitásokat X-Y koordinátarendszerekben ábráztuk, ahol az X tengelyhez tartozó értékek a TnI, az Y tengelyhez tartozó értékek pedig a P-TnI jelintenzitásokat tükrözték (középső és alsó panelek,  $n$ : csoportonként ~20,000 szívizomsejt 6-6 állatból). A szívélgtelen állatok ingerelt oldaláról nyert adatok nagyobb szórása (alsó panel) a kontroll állatok ingerelt oldalához képest (középső panel) az innen származó szívizomsejtek heterogénebb TnI foszforilációs szintjeire utalt. **B)** Az izolált szívizomsejtek áramlási citometriai méréseiből adódó relatív TnI foszforiláció eloszlását histogramok formájában tüntettük fel. A logaritmikusan transzformált, relatív jelintenzitások [ $\log(P\text{-TnI}/TnI)$ ] eloszlásprofiljait mind a négy csoportra nézve külön ábráztuk. (Az eloszlás histogramokon a 25 és 75 percentilisek közötti IQR-t tüntettük fel;  $n$ : az állatok száma; \*:  $P=0,0071$  HF ingerelt vs. kontroll ingerelt oldal; +:  $P=0,0093$  HF ingerelt vs. kontroll ingerelt oldal; #:  $P=0,0047$  HF ingerelt vs. HF ellenoldal)

| <b>log(P-TnI/TnI)<br/>eloszlás</b> | <b>Kontroll ingerelt<br/>(n=6)</b> | <b>Kontroll ellenoldal<br/>(n=6)</b> | <b>HF ingerelt (n=6)</b> | <b>HF ellenoldal<br/>(n=6)</b> |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| <b>25 percentilis</b>              | -0,45                              | -0,46                                | -0,65                    | -0,57                          |
| <b>Medián</b>                      | -0,27                              | -0,26                                | -0,37                    | -0,36                          |
| <b>75 percentilis</b>              | -0,09                              | -0,09                                | -0,12                    | -0,15                          |
| <b>IQR</b>                         | 0,36                               | 0,37                                 | <b>0,53<sup>+#</sup></b> | 0,42                           |
| <b>Átlag</b>                       | -0,28                              | -0,29                                | <b>-0,41*</b>            | -0,38                          |
| <b>SD</b>                          | 0,29                               | 0,31                                 | 0,43                     | 0,35                           |
| <b>S.E.M.</b>                      | 0,002                              | 0,002                                | 0,003                    | 0,002                          |

**2. táblázat. Az áramlási citometria kísérletek során nyert eloszlási hisztogramokat jellemző paraméterek.** (\*: P=0,0071 HF ingerelt vs. kontroll ingerelt oldal; +: P=0,0093 HF ingerelt vs. kontroll ingerelt oldal; #: P=0,0047 HF ingerelt vs. HF ellenoldal)

Az egyes állatok átlagos log(P-TnI/TnI) intenzitásértékeit a 9. ábrán ábrázoltuk 95%-os konfidencia intervallumokkal. Ez a reprezentáció lehetővé tette a TnI foszforilációban bekövetkező variabilitás kiértékelését az egyes kontroll és szívelégtelen állatok szíveinek különböző régióiban. Általánosságban elmondható, hogy a kontroll szívek log(P-TnI/TnI) értékei egy keskenyebb sávot öleltek fel a szívelégtelen állatokéhoz képest. Továbbá, a kontroll állatok átlagos log(P-TnI/TnI) értékei véletlenszerűen magasabbnak vagy alacsonyabbnak adódtak az ingerelt vagy ellenoldali szívizomterületeken, és a két oldal közötti különbség (a kontroll 4 állat kivételével) kismértékű volt. Ezzel szemben a szívelégtelen állatok ingerelt szívizomterületeihez tartozó átlagos log(P-TnI/TnI) értékek (a HF 6 állat kivételével) rendre alacsonyabbnak adódtak az ellenoldalon mértékhez képest, valamint a két oldal közti különbség az egyes szívelégtelen szívekben kb. kétszerese volt a kontrolloknál megfigyelt átlagos különbséghez képest.

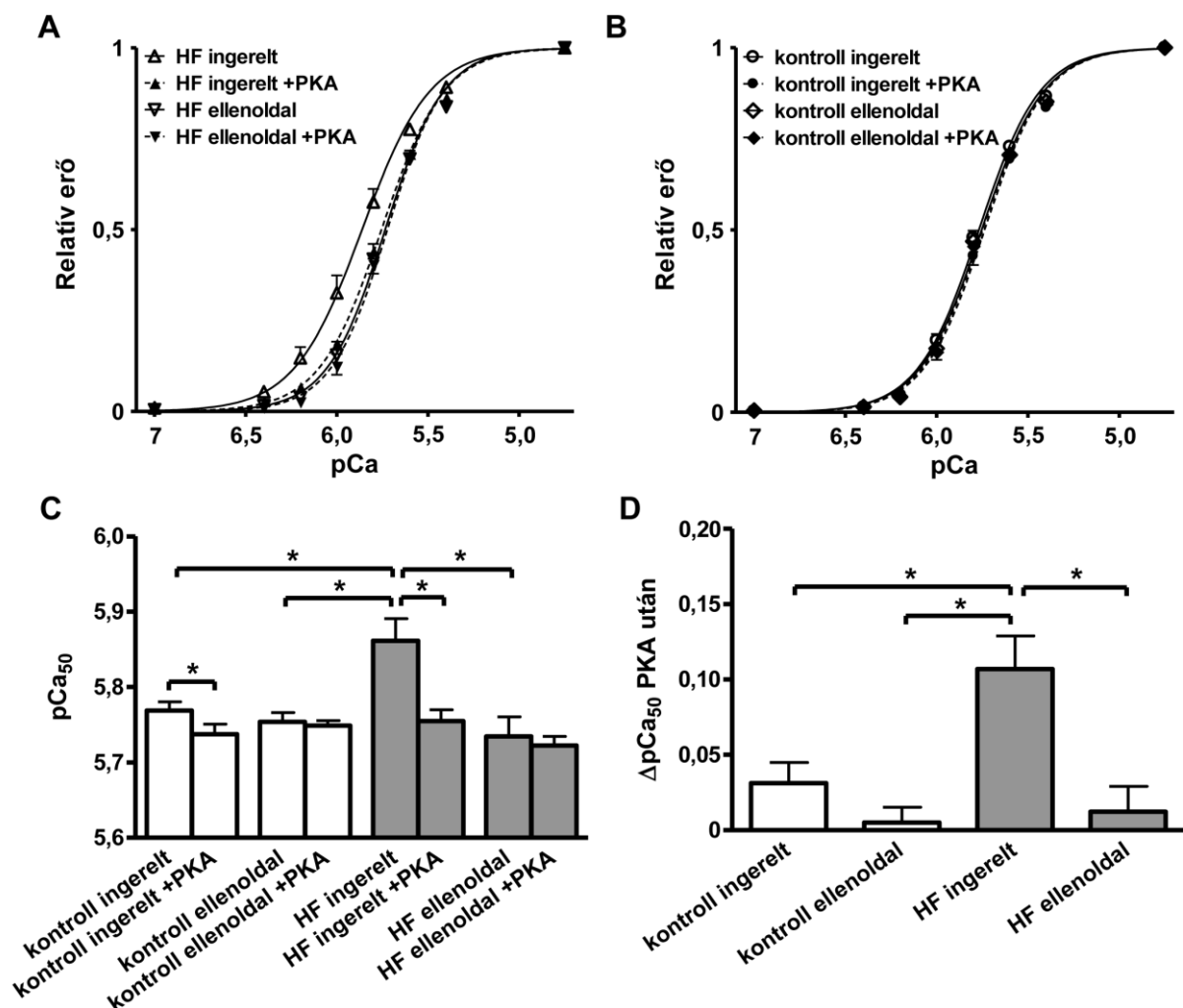


9. ábra. *TnI foszforiláció az egyes kísérleti állatokban.* A  $\log(P\text{-TnI}/TnI)$  intenzitások átlagos szintjeit 95%-os konfidencia intervallumokkal ábrázoltuk az adott állatok mindkét területére nézve. A vízszintes szaggatott vonalak a kontroll, illetve a szívelégtelen állatok mindkét területének összesített, átlagos  $\log(P\text{-TnI}/TnI)$  értékét jelölik. A kontroll állatok  $\log(P\text{-TnI}/TnI)$  értékei egy keskenyebb tartományt öleltek fel a szívelégtelen állatok értékeihez képest.

A kontroll, valamint a szívelégtelen állatok szívizmából származó egyedi, permeabilizált szívizomsejtek mechanikai paramétereiben létrejövő lehetséges különbségeket direkt erőméréssel tanulmányoztuk (10-12. ábra). Meghatároztuk az egyes szívizomsejtekben ébredő izometriás erő  $Ca^{2+}$ -érzékenységi görbéit ( $Ca^{2+}$ -erő összefüggések) 2,3  $\mu m$ -es szarkomerhosszon, majd azokat csoportonként átlagoltuk PKA kezelés előtt és után (10. ábra, A-D panelek). A köztes  $[Ca^{2+}]$ -knál kialakuló erőértékeket a maximális  $Ca^{2+}$ -aktiválta erőre ( $F_o$ ) normalizáltuk, és azokat a  $pCa$  függvényében ábrázoltuk. Az erőgenerálás  $Ca^{2+}$ -érzékenységének szemléltetése céljából, valamint a  $pCa_{50}$  értékek meghatározásához a módosított Hill-függvényt ([1] egyenlet) alkalmaztuk minden egyes szívizomsejten külön-külön. A kontroll szívek ingerelt területeihez tartozó átlagos  $pCa_{50}$  értékek nem különböztek szignifikánsan sem a kontroll, sem a szívelégtelen szívek ellenoldali területein kapott

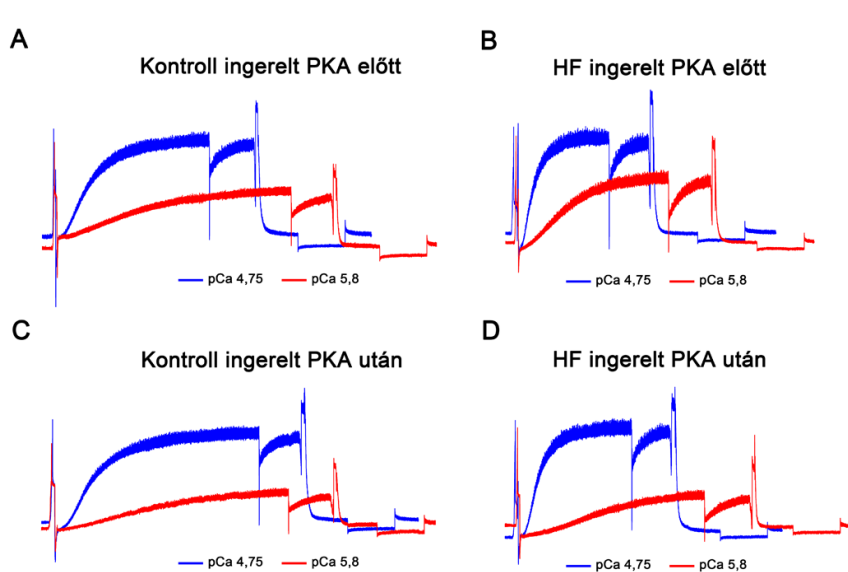
értékektől PKA kezelést megelőzően (a  $pCa_{50}$  értékek rendre  $5,77\pm0,01$ ,  $5,75\pm0,01$  és  $5,73\pm0,03$  voltak a kontroll ingerelt, kontroll ellenoldali és HF ellenoldali területeken). Ugyanakkor a szívelégtelen állatok szívműködésének ingerelt területein mért átlagos  $pCa_{50}$  érték (és ebből kifolyólag az izometriás erő  $Ca^{2+}$ -érzékenysége) szignifikánsan magasabbnak adódott ( $5,86\pm0,03$ ;  $P<0,05$ ) mindhárom csoporthoz képest. Mindemellett a PKA expozíció ennél a csoportnál csökkentette legnagyobb mértékben a  $pCa_{50}$  értéket, eltüntetve ezzel a négy csoport közti,  $Ca^{2+}$ -érzékenységekben megfigyelt különbséget. A maximális, valamint a félérték közeli  $[Ca^{2+}]$ -k kiváltotta egyedi kontrakciók reprezentatív erőgörbéi a 11. ábrán láthatóak a kontroll és a szívelégtelen ingerelt csoportban PKA kezelés előtt és után. A  $pCa_{50}$  értékek eloszlásai az áramlási citometriai mérések során kapott eloszlás hisztogramok jellegzetességeit tükrözték, így ezen mérések összhangban álltak a biokémiai és hisztokémiai eredményekkel is (12. ábra, A-D panelek). Ezen túlmenően az *in vitro* PKA kezelés  $Ca^{2+}$ -érzékenységre gyakorolt hatása a szívelégtelen ingerelt oldalon minden más csoporthoz képest szélesebb tartományt felölelő csökkenést eredményezett a  $pCa_{50}$  értékekből képzett eloszlásokban. Az átlagos  $F_o$ ,  $F_{passzív}$  és a keresztmetszeti kinetikára érzékeny  $k_{tr,max}$  értékek a 3. táblázatban találhatóak. A szívelégtelen ingerelt oldalon mért  $F_{passzív}$  szignifikánsan nagyobbak adódtak a szívelégtelen ellenoldalhoz képest, de nem találtunk különbséget a csoportok között a  $F_o$  és a  $k_{tr,max}$  értékek tekintetében.

Egy különálló tanulmányban megvizsgáltuk a szívműködés mechanikai paramétereinek hosszfüggő sajátosságait 1,9, majd 2,3  $\mu m$ -es szarkomerhosszakon végzett erőmérések segítségével. A  $F_o$  és  $F_{passzív}$  értékek-, valamint a miofilamentáris  $Ca^{2+}$ -érzékenység hosszfüggésének meghatározásakor azt találtuk, hogy a szívműködés megnyújtásával összefüggésben álló mechanikai tulajdonságok megtartottak maradtak az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség kifejlődése során.



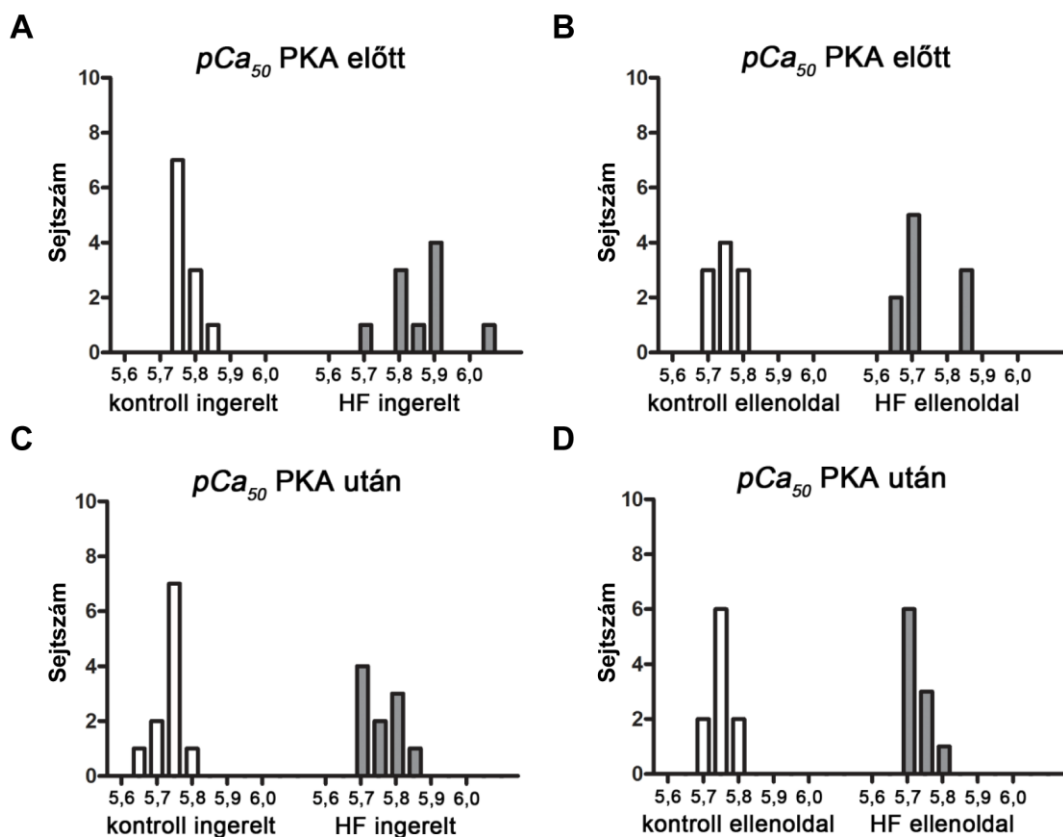
10. ábra. Az izolált sertés szívmusclejtekben meghatározott átlagos  $Ca^{2+}$ -erő összefüggések és  $pCa_{50}$  értékek.

A) A szívelégtelen állatok ingerelt és ellenoldali területeiről származó izolált szívmusclejtek  $Ca^{2+}$ -erő összefüggései *in vitro* PKA kezelés előtt és után. A  $Ca^{2+}$ -erő összefüggés balra tolódása a szívelégtelen ingerelt csoportban PKA kezelés előtt az izometriás erő  $Ca^{2+}$ -érzékenységeinek növekedését illusztrálja ezen szívmusclejtekben a többi csoporthoz képest. PKA kezelést követően a  $Ca^{2+}$ -erő összefüggés jobbra tolódását figyeltük meg. B) A kontroll ingerelt és ellenoldali területekről származó szívmusclejtek  $Ca^{2+}$ -erő görbéi között csupán kis különbségeket detektáltunk mind *in vitro* PKA kezelés előtt, mind azt követően. C) A négy csoport szívmusclejtjeiben megfigyelt átlagos  $pCa_{50}$  értékek *in vitro* PKA kezelés előtt és után. A szívelégtelen állatok ingerelt területein mért átlagos  $pCa_{50}$  érték jelentősen magasabbnak adódott a többi csoportéhoz képest kiindulási körülmények között, és ezt a különbséget a PKA kezelés eltüntette (\*:  $P < 0,05$ ). D) A  $pCa_{50}$  érték PKA kezelés hatására bekövetkező változásának nagysága a négy kísérleti csoportban. A PKA kezelés átlagos  $pCa_{50}$  értékre gyakorolt hatása ( $\Delta pCa_{50}$ ) a szívelégtelen állatok ingerelt területein volt a legnagyobb (\*:  $P < 0,05$ ). A Hill koefficiens nem különbözött szignifikánsan a négy csoportban a PKA expozíció előtt és azt követően ( $n_{Hill}$ :  $\sim 2,6$ ). (n: csoportonként 10-11 szívmusclejt 3-5 állatból)



**11. ábra.** Az egyedi  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúrák során készült reprezentatív erőgörbék. A szívelégtelen ingerelt területről származó szívműködési maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál mért kontraktilis ereje PKA kezelés előtt (**B**) a kontroll sejt által generált erővel (**A**) összemérhető. Ugyanakkor a félérték közeli  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál rögzített erőérték a szívelégtelen sejt

esetében jóval nagyobbak adódtak kontrollhoz képest, ami ezen sejt fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét tükrözi. PKA kezelést követően a szívelégtelen sejt félérték közeli  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál mért erőértéke a kontrolléhoz hasonló nagyságú amplitúdót mutat (**C, D**).



**12. ábra.** Az egyes szívműködési területekben mért  $p\text{Ca}_{50}$  értékek eloszlásai a négy kísérleti csoportban *in vitro* PKA kezelés előtt és után. **A, B, C, D)** A szívelégtelen állatok ingerelt területein mért  $p\text{Ca}_{50}$  értékek egy szélesebb tartományt öleltek fel minden más csoporthoz képest. PKA kezelést követően ezen a területen is egy keskenyebb eloszlás volt felfedezhető a  $p\text{Ca}_{50}$  értékekben. ( $n$ : csoportonként 10-11 szívműködési terület 3-5 állatból)

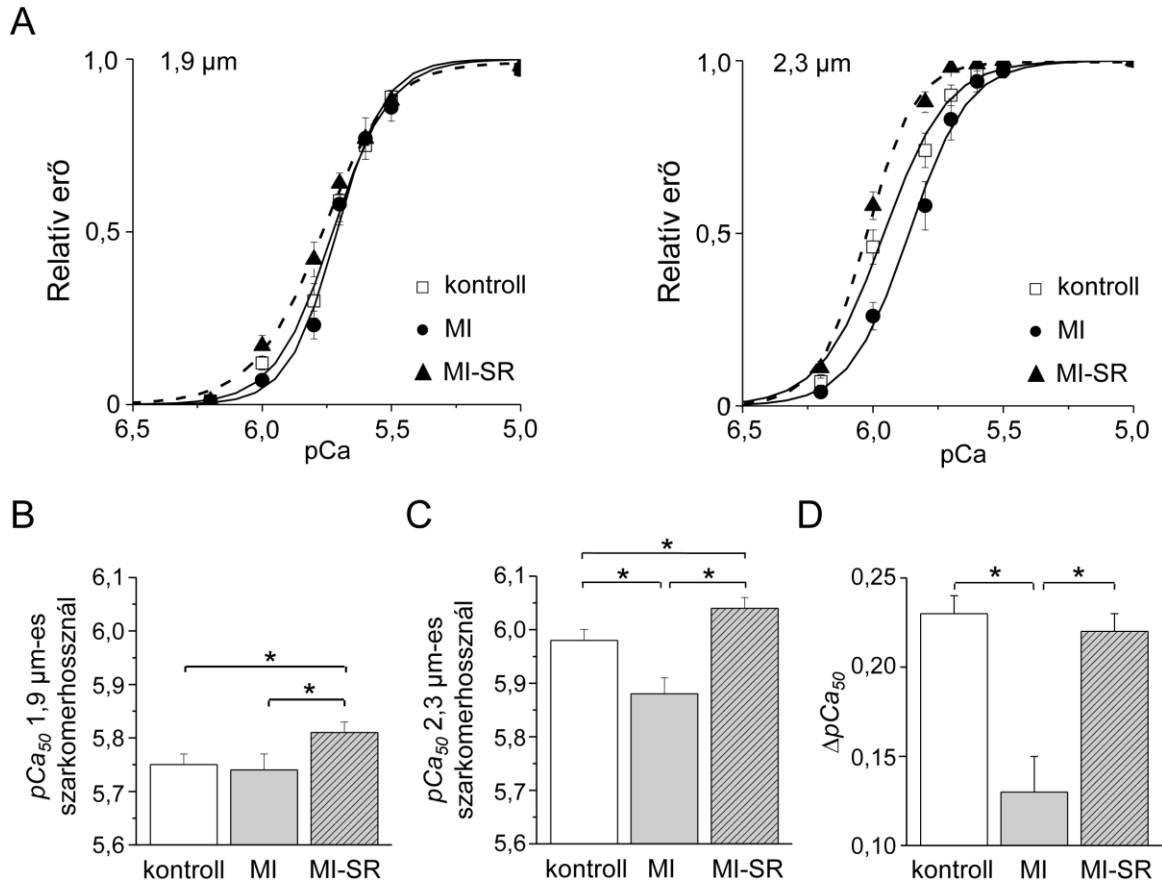
|                                    | Kontroll ingerelt<br>(n=23) | Kontroll ellenoldal<br>(n=20) | HF ingerelt<br>(n=21) | HF ellenoldal<br>(n=29) |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| $F_o$ (kN/m <sup>2</sup> )         | 12,83 ± 1,73                | 15,47 ± 1,84                  | 12,05 ± 1,15          | 16,81 ± 1,42            |
| $F_{passzív}$ (kN/m <sup>2</sup> ) | 1,46 ± 0,20                 | 1,69 ± 0,43                   | <b>2,26 ± 0,48*</b>   | 1,17 ± 0,11             |
| $k_{tr,max}$ (1/sec)               | 0,81 ± 0,06                 | 0,75 ± 0,04                   | 0,82 ± 0,05           | 0,96 ± 0,05             |

3. táblázat. A direkt erőmérések során nyert aktív, passzív erők és a  $k_{tr,max}$  átlagértékei permeabilizált sertés szívműködéseiben. A számok az átlag ± S.E.M. értékeket jelölik (n: 5 kontroll és 8 szívelégtelen állatból származó szívműködések száma; \*: P<0,05 HF ingerelt vs. HF ellenoldal).

#### 4.2. Az SR33805 szívműködések $Ca^{2+}$ -érzékenysége és endogén proteinkináz A aktivitására gyakorolt hatásai poszt-infarktusos patkánymodellben

Az intakt, előfeszítetlen,  $Ca^{2+}$ -fluoreszcencia indikátor festékkel feltöltött izolált szívműködések elektromos stimulációja lehetőséget biztosított a sejtek rövidülésében, valamint azzal egyidejűleg azok  $Ca^{2+}$ -tranzienében bekövetkező változások vizsgálatára. Az izolált, permeabilizált szívműködés preparátumok pedig lehetővé tették a kontraktilis apparátus tulajdonságainak, valamint a miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -ra adott válaszainak vizsgálatát a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$  tartalomtól függetlenül. A francia laboratóriumban az infarktusos állatokból származó intakt, izolált szívműködések csökkent mértékű rövidülésének normalizálódását igazolták SR33805 kezelés hatására, a  $Ca^{2+}$ -tranzien amplitúdójának változása nélkül. Kollaborációs partnereinkkel közösen egészséges kontroll, valamint infarktuson átesett patkányok (MI) izolált, permeabilizált szívműködéseiben történő direkt erőmérésekkel vizsgáltuk a kontraktilis rendszer jellemzőit, továbbá teszteltük az *in vitro* SR33805 kezelés hatásait az infarktuson átesett állatok szívműködéseinek (MI-SR) kontraktilis paramétereire nézve (13. ábra). A miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -érzékenységét egy rövidebb (1,9  $\mu$ m-es), valamint egy hosszabb (2,3  $\mu$ m-es) szarkomerhosszon is meghatároztuk. A miofilamentumok rövidebb szarkomerhosszon mért  $Ca^{2+}$ -érzékenysége nem különbözött a MI csoportban kontrollhoz képest, ugyanakkor *in vitro* SR33805 kezelést (10  $\mu$ M, 10 percig, szobahőmérsékleten) követően az jelentősen

nagyobbnak adódott ( $\sim 0,07$  pCa egységgel) (13. ábra, A panel, 4. táblázat). A sejtek  $2,3 \mu\text{m}$ -re történő nyújtása a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő görbék balra tolódását eredményezte mind a kontroll, mind a MI csoportban, amit a  $p\text{Ca}_{50}$  értékek emelkedése jelzett (13. ábra, C panel). Ugyanakkor a MI csoportban megfigyelt  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés nyújtást követő balra tolódása kisebb mértékű volt kontrollhoz képest, ami összhangban állt a korábban megfigyelttel [57, 58]. Az SR33805 kezelés a nagyobb szarkomerhosszon jelentős mértékben fokozta a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet a MI csoportban ( $\sim 0,18$  pCa egységgel) (13. ábra, A és C panelek). A két szarkomerhosszon mért  $p\text{Ca}_{50}$  érték közötti különbséget [ami a kontraktilis rendszer hosszfüggő aktivációjának indexeként szolgált ( $\Delta p\text{Ca}_{50}$ )] az SR33805-ben történő inkubáció teljes mértékben helyreállította a MI csoportban a szer nagyobb szarkomerhosszon kifejtett erősebb hatása révén (13. ábra, D panel). A szívmuscle sejtek egyéb kontraktilis paraméterei ( $F_{\text{passzív}}$ ,  $F_o$ ) hasonlóan adódtak minden csoportban mindkét szarkomerhosszon (4. táblázat).



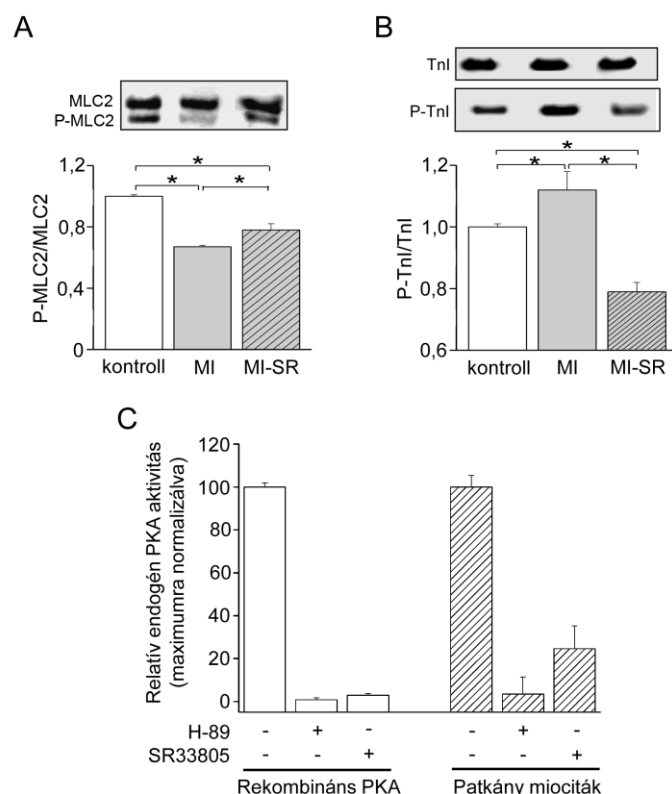
13. ábra. Az SR33805 hatásai a miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -érzékenységére izolált, permeabilizált patkány szívmizomsejtekben két különböző szarkomerhosszon. A) Az izolált szívmizomsejtek átlagos  $Ca^{2+}$ -erő összefüggéseit 1,9 (bal panel), valamint 2,3 μm-es szarkomerhosszon (jobb panel) mértük kontroll (négyzet, folytonos vonal), MI (kör, folytonos vonal) és SR33805-tel kezelt MI csoportban (MI-SR; háromszög, szaggatott vonal). A miofilamentumok kisebb (B), illetve nagyobb szarkomerhosszon (C) mért  $Ca^{2+}$ -érzékenységét az átlagos  $pCa_{50}$  értékekkel tüntettük fel. D) A sejtek nyújtásának hatására kialakuló  $Ca^{2+}$ -szenzitizációt a  $\Delta pCa_{50}$  értékek jelölik. (n=9-15 szívmizomsejt 4 állatból; \*:  $P < 0,05$ )

|                                    | 1,9 μm-es szarkomerhossz |              |                                 | 2,3 μm-es szarkomerhossz |                     |                                 |
|------------------------------------|--------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------------|
|                                    | Kontroll<br>(n=15)       | MI<br>(n=10) | MI-SR<br>(n=9)                  | Kontroll<br>(n=15)       | MI<br>(n=10)        | MI-SR<br>(n=9)                  |
| $F_o$ (kN/m <sup>2</sup> )         | 47 ± 4                   | 40 ± 3       | 44 ± 3                          | 50 ± 3                   | 47 ± 3              | 45 ± 3                          |
| $F_{passzív}$ (kN/m <sup>2</sup> ) | 0,9 ± 0,2                | 0,9 ± 0,3    | 1,2 ± 0,1                       | 11,5 ± 0,7               | 9,4 ± 1,2           | 12,3 ± 1,5                      |
| $pCa_{50}$                         | 5,75 ± 0,02              | 5,74 ± 0,03  | <b>5,81 ± 0,02*<sup>+</sup></b> | 5,98 ± 0,02              | <b>5,88 ± 0,03*</b> | <b>6,04 ± 0,02*<sup>+</sup></b> |

4. táblázat. A direkt erőmérések során nyert aktív, passzív erők és  $pCa_{50}$  átlagértékei permeabilizált patkány szívmizomsejtekben. A számok az átlag ± S.E.M. értékeket jelölik. (n=9-15 szívmizomsejt 4 állatból; \*:  $P < 0,05$  vs. kontroll; <sup>+</sup>:  $P < 0,05$  MI vs. MI-SR)

Annak megítélésére, hogy vajon az SR33805 szívműködésekre gyakorolt hatásának háttérben felfedezhető-e a kontraktilis erőgenerációt szabályzó fehérjék foszforilációs állapotának módosulása, az állatokból származó permeabilizált, megnyújtott izom preparátumokból nyert mintákban meghatároztuk a TnI és MLC2 fehérjék foszforilációs szintjeit Western blot analízissel (14. ábra). A MI csökkentette az MLC2 fehérje foszforilációját ~33%-kal (14. ábra, A panel), ami szintén összhangban állt a korábban kapott eredményekkel [57, 58]. Az SR33805 kis mértékben ugyan, de szignifikánsan növelte az MLC2 foszforilációt a MI csoportban, jóllehet, az 22%-al továbbra is elmaradt a kontroll állatokban mértéktől. A TnI fehérje foszforilációjának megítélésére egy, a Ser23/24 helyekre (a fő cAMP-dependens PKA foszforilációs hely) specifikus foszforilációt felismerő antitestet használtunk. A TnI foszforiláció magasabbnak adódott a MI csoportban, amit az SR33805-tel történő inkubáció jelentős mértékben csökkentett az MI (~30%), valamint a kontroll sejtekhez (~20%) képest (14. ábra, B panel).

Ezen TnI foszforilációban bekövetkező SR33805 indukálta redukció emelkedett foszfátáz, vagy csökkent PKA aktivitásra engedett következtetni. Ennek eldöntésére az SR33805 PKA aktivitásra gyakorolt hatásait radioaktív aktivitási esszével vizsgáltuk meg (14. ábra, C panel). Elsőként rekombináns PKA-t használtunk, hogy megvizsgáljuk a szer esetleges direkt, a kinázzal létrejövő interakcióját. A rekombináns PKA aktivitást a 10  $\mu$ M-os SR33805 kezelés egy standard PKA inhibitor (H-89) által előidézett redukcióhoz hasonló mértékben csökkentette. Ezen megfigyelés arra engedett következtetni, hogy az SR33805 képes közvetlenül gátolni a PKA-t *in vitro*. A szer inhibitorikus hatását a kontroll patkány szívek endogén PKA aktivitásán is teszteltük, és hasonló eredményt kaptunk, mint a rekombináns PKA esetében (14. ábra, C panel).



**14. ábra.** Az SR33805 hatása a patkány szívmiocytes fehérjéinek foszforilációjára, valamint a PKA aktivitásra. **A)** Az MLC2 fehérje foszforilált (P-MLC2) és nem foszforilált formáját urea gélen szeparáltuk, és Western blot analízissel jelenítettük meg kardiális MLC2 ellenes antitestet használva. A kísérleteket kontroll, MI és SR33805-tel kezelt infarktusos szívmiocytesal végeztük. **B)** Western immunoblot során meghatároztuk az össz-, illetve foszforilált TnI mennyiségeket kardiális TnI ellenes, valamint PKA-specifikus P-TnI ellenes antitestekkel. Mindkét fehérje foszforilációs szintjét azok összmennyiségéhez képest, valamint a kontroll mintákban mért szintekre normalizálva fejeztük ki ( $n=5$  szív). **C)** A 10  $\mu$ M koncentrációjú SR33805 PKA aktivitásra gyakorolt hatását radioaktív esszével határoztuk meg rekombináns, vagy a kontroll állatok szívéből nyert endogén PKA segítségével. A H-89 egy PKA inhibitor, ami kontrollként szolgált a PKA aktivitás gátlására nézve (50 nM). ( $n=3$  kísérlet;  $*P<0,05$ )

Összefoglalva elmondható, hogy az SR33805 csökkentette a TnI fehérje Ser23/24 helyének foszforilációját a PKA aktivitás gátlásán keresztül, ami a miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -érzékenységének fokozódásához vezetett.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Celluláris inhomogenitás a regionális kontraktilis diszfunkció hátterében az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség során

Elvégzett kísérleteink az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében létrejövő PKA-dependens TnI foszforiláció heterogén csökkenését tárták fel. Érdekes módon a P-TnI szint sejtről-sejtre kialakuló variabilitása nagyobb mértéket öltött az ingerlő elektróda közelében a nem ingerelt BK területekhez képest. Ebből adódóan azt feltételezzük, hogy az inhomogén PKA-dependens kontraktilis fehérje hipofoszforiláció hozzájárul a miokardiális remodeláció regionális mechanikai diszfunkciójához ebben a nagyállat modellben.

A kamrai kontraktilis válaszokban létrejövő diszszinkroniát a BK remodeláció kapcsán fellépő mechanikai diszfunkció egyik fontos tényezőjeként tartják számon, így az elektromos reszinkronizáció előnyt nyújthat a szignifikáns QRS megnyúlással rendelkező szívelégtelen betegek számára [59]. Az elektromos stimulálás hatására kialakuló szívelégtelenség különböző modelljeiben számos alkalommal írtak le miokardiumot érintő regionális különbségeket [45, 52, 60-62]. Altatott, nyitott mellkasú kutyák BK-inak ingerelt területén fellépő falmozgászavar korai rövidüléshez és késői szisztolés hosszabbodáshoz vezetett, míg a távoli területeken a rövidülési mintázat megtartott maradt [61]. Ezen régió-specifikus változások létrejöttét számos mechanizmussal próbálták magyarázni, melyek a mátrix metalloproteináz-9 aktivációtól kezdve [61] az egyes fehérjék (pl. foszforilált ERK mitogén-aktiválta proteinkináz, SERCA2, foszfolambán, konnexin 43) transzmurálisan, valamint kamrán belül létrejövő expressziós grádiensének kifejlődéséig terjednek [60, 63]. A parakrín/autokrín jelátvitel szerepét szintén hangsúlyozták az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség során megfigyelt regionális szövetmódosulások feltételezett mechanizmusai között. A kardiotropin-1 fehérje expressziójával kapcsolatban például azt találták, hogy az kifejezetten az ingerlő elektróda környezetében nő meg [64]. Az elektromos ingerléssel

kiváltott szívelégtelenség egyik kutya modelljében a mitokondriális bioenergetikai enzimek, valamint a respirációs lánc alegység és apoptózis fehérjék expressziós mintázatának összehangolt eltolódását is megfigyelték, melyeket a mitokondriumok regionális eloszlásával, illetve azok különböző alpopulációival is kapcsolatba hozták [62]. Mindezek ellenére jelenleg még nem teljesen tisztázott, hogy mely jelátviteli útvonalak érintettek elsősorban a regionális mechanikai változások létrejöttében, és hogy ezek hogyan kapcsolódnak a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -ra adott válaszaihoz és/vagy a szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisához [43, 44, 65]. Mindazonáltal csalogatónak tűnik az a spekuláció miszerint a natriuretikus peptidekre adott parakrín válaszok összefügghetnek a cGMP- és cAMP-dependens intracelluláris jelátviteli útvonalakkal [66].

Tekintettel a  $\beta$ -adrenerg kaszkád miokardiális kontraktilitás szabályzásban betöltött központi szerepére, számos korábbi tanulmány feltételezte annak részvételét az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben megfigyelhető regionális jellegzetességek kialakulásában. Az efferens szimpatikus funkciók és a  $\beta$ -adrenerg válaszok csökkentek az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelen kutya-modellben, még hozzá régió-specifikus funkcionális változások mellett [67, 68], jöllehet, a  $\beta$ -adrenerg jelátvitel biokémiai és celluláris paraméterei nem mutattak egyértelműen regionális jellegzetességeket [67, 69-71]. A miofilamentumok szintjén a bazális  $\beta$ -adrenerg jelátvitelben bekövetkező csökkenés a miofibrilláris erőgenerálás  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységeinek fokozódását feltételezné, ami egy olyan változás, amit gyakran hoznak összefüggésbe a TnI és MyBP-C fehérjék összehangolt hipofoszforylációjával [10, 72, 73]. A miofilamentáris  $\text{Ca}^{2+}$ -válaszok *in situ* meghatározása során nyert kísérleti adatok a miofibrilláris erőgeneráció megőrzött, vagy csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységre utaltak elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelen kutya-modellben [74]. Továbbá, hasonló sertés modellben az alacsony dózisú dobutamin stimulációra adott BK kontraktilis válaszok relatív növekedése nagyobbak adódott az ingerelt, mint az ellenoldali

területen, jóllehet a kiindulási kontraktilitás csökkent volt az ingerelt területen az ellenoldalhoz képest [75].

Kísérleteink során az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében létrejövő, feltételezhetően kisebb PKA-mediált TnI foszforilációnak nemcsak regionális, hanem intraregionális aspektusait is meg kívántuk vizsgálni. A kísérleti állatokban végzett MRI vizsgálatok regionális kontraktilis diszfunkciót detektáltak, amely nagyobb mértékben csökkentette a BK szisztolés falvastagodást és cirkumferenciális rövidülést az ingerelt, mint az ellenoldali területeken (~7% vs. ~31% és ~-5% vs. ~-7% az ingerelt és ellenoldali területeken). Azt feltételeztük, hogy a mechanikai funkcióban létrejövő regionális különbségek összefügghetnek a  $\beta$ -adrenerg rendszer vezérelte TnI foszforilációban bekövetkező szöveti szintű változásokkal.

Back-foszforilációs esszé segítségével jelentősen csökkent TnI foszforilációt tártunk fel a szívelégtelen állatok ingerelt területein a kontroll állatokhoz képest, egybehangzóan azon feltételezéssel, miszerint az ingerelt oldalon a  $\beta$ -adrenerg rendszer down-regulációja jön létre. Az irodalomban elfogadott nézet, hogy a csökkent TnI foszforiláció a miofibrilláris erőgeneráció  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységeinek ( $p\text{Ca}_{50}$ ) növekedését vonhatja maga után. Ezzel összhangban, kísérleteink során az átlagos  $p\text{Ca}_{50}$  értékek jelentősen magasabbnak adódtak a szívelégtelen szívek ingerelt területein, mint azok ellenoldali vagy a kontroll szívek bármely területén, és ezen különbségeket az *in vitro* PKA kezelés eltüntette. Immunhisztokémiai, áramlási citometriai és direkt erőmérési kísérleteink eredményei a relatív P-TnI szintek jelentősen nagyobb, sejtről-sejtre kialakuló variabilitására mutattak rá a szívelégtelen állatok ingerelt területein. Emellett a szívizomsejtek mechanikai paramétereinek többsége megtartott maradt a szívelégtelen állatok ingerelt területein (pl. az izometriás erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységeinek szarkomerhossz függése vagy a  $k_{tr,max}$ ), ami megőrzött Frank-Starling-mechanizmusra és keresztökötési ciklussebességre utal ezekben a szívizomsejtekben. Megfigyeléseink arra

utalnak, hogy a szívelégtelen ingerelt oldalon mért  $pCa_{50}$  értékek tükrözik a szívizomsejtek miofilamentáris funkciójában végbemenő változásokat, és ez a paraméter összefüggésbe hozható a PKA-dependens TnI és MyBP-C foszforilációval. Emiatt azt feltételezzük, hogy a PKA-dependens kontraktilis fehérje foszforiláció zavara hozzájárul az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében megfigyelt regionális kontraktilis diszfunkcióhoz [52].

Az állatok szívének 3 héten át tartó folyamatos, nagyfrekvenciával történő ingerlése manifest szívelégtelenség kialakulásához vezetett. Ezalatt az állatok feltételezhetően nagy stressz hatás, valamint fokozott szimpatikus tónus alatt álltak. Azt feltételeztük, hogy ennek következtében a szívizomsejtek  $\beta$ -adrenerg receptorainak down-regulációja alakul ki, ami tetten érhető volt mind a back-foszforilációs esszével és áramlási citometria mérésekkel igazolt átlagos P-TnI szint csökkenésben, mind az izolált szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -érzékenységének növekedésében. A fenti eltérések a szívizom ellenoldali területein nem voltak kimutathatóak, ami a sejtmembránok felszínén lévő  $\beta$ -adrenerg receptorok számának megőrzöttségére utal.

Ezen kívül az sem zárható ki, hogy az ingerelt oldalon egyéb miofilamentáris fehérjék (pl. titin) PKA-dependens hipofoszforilációja járul hozzá a nagyobb  $F_{passzív}$  kialakulásához, így az ezen szívekben megfigyelt BK végdiasztolés nyomásemelkedés létrejöttéhez (~6 Hgmm-ről ~20 Hgmm-re) [76]. Mindazonáltal jelen vizsgálataink alapján nem egyértelmű, hogy a miofilamentáris fehérje foszforilációban létrejövő regionális eltérések milyen mértékben működnek közre a funkcionális hemodinamikai változásokban (pl. az ejekciós frakció ~76%-ról ~35%-ra való csökkenésében) [52].

Legjobb tudomásunk szerint elsőként tanulmányoztuk a szívizomsejtek TnI foszforilációjának szöveti szintű inhomogenitását nem iszkémiás eredetű szívelégtelenségben néhány érzékeny módszer kombinációjával (fehérje biokémia, hisztokémia, direkt

erőmérések, valamint áramlási citometria). Korábban már beszámoltak a kontraktilis fehérje foszforiláció transzmurális grádiensének csökkenéséről poszt-iszkémiás patkánymodell miokardiális remodelációja kapcsán [58], jóllehet, hasonló jellegzetességeket nem találtak elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben szenvedő kutyákban [63]. Adataink arra mutattak rá, hogy a TnI foszforiláció szintje szélesebb tartományt ölelhet fel az ingerlő elektróda környezetében, mint máshol, valamint az jelentősen eltérő lehet az egyes egymáshoz közelálló szívizomsejt csoportosulások között az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség létrejötte során. Jelenleg nem tudunk magyarázattal szolgálni a P-TnI jelintenzitás ezen eloszlási mintázatára vonatkozóan; azt feltételezzük, hogy annak létrejötte a stimuláló elektromos áram miokardiumra gyakorolt közvetlen fizikai hatásaival összefügghet.

Összefoglalva a BK nagy frekvenciájú ingerlése a sertés szívek remodelációjához, és következményesen szívelégtelenséghez vezetett, amit az elektromos stimulációhoz közeli területeken a PKA-mediált TnI foszforiláció átlagos csökkenésével lehetett jellemezni. A PKA-dependens TnI foszforiláció szintje a BK ingerelt területeken nagyobb mértékű, sejtről-sejtre kialakuló változékonyságot mutatott a távolabbi vagy a kontroll szívek bármely területéhez képest. Ezen  $\beta$ -adrenerg-dependens változóban bekövetkező intraregionális inhomogenitás hatással van a miofibrilláris erőgenerálás  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységére, így ennek következtében hozzájárulhat a diszszinkron, és emiatt csökkent BK kontrakcióhoz az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében.

## 5.2. Az SR33805 kontraktilis rendszerre gyakorolt jótékony hatásai poszt-infarktusos patkánymodellben

Kísérleteink során poszt-infarktusos patkány modellben vizsgáltuk az SR33805 hatásait a szívizom kontraktilis tulajdonságaira nézve. Az állatokat a bal anterior leszálló koszorúér proximális ligációját követő 18. héten tanulmányoztuk, amikor az állatok szívében lezajlott infarktus minden bizonnyal funkcionális károsodásokat hozott létre. Az ekkor elvégzett echokardiográfiás és szöveti Doppler mérések során kollaborációs partnereink az SR33805 kontraktilitás-fokozó hatását figyelték meg *in vivo*, melyet részben az intakt, infarktusos szívizomsejtekben *in vitro* végzett vizsgálatok eredményei is visszatükröztek. Ezek során az infarktusos sejtek csökkent mértékű rövidülésének SR33805 kezelés hatására bekövetkező normalizálódását figyelték meg, amely nem volt magyarázható a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens amplitúdójának változásával. Az SR33805 pozitív inotróp hatásait permeabilizált szívizomsejt preparátumokon történő direkt erőmérésekkel is megerősítettük, melyek során a szer fokozta a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét. Ennek hátterében az MLC2 fehérje foszforilációjának SR33805 kezelés hatására bekövetkező kismértékű növekedése, valamint a TnI fehérje foszforiláció jelentős mértékű csökkenése állhatott, mely PKA aktivitás méréseink eredményei alapján az SR33805 PKA-gátló szerepével függhetett össze.

Korábban megfigyelték, hogy miokardiális infarktust követően a szívizom kontraktilitás fokozása növelheti a szívizom károsodás mértékét, valamint tovább ronthatja a csökkent pumpafunkciót [77]. Jóllehet, a kontraktilitás fokozódást az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák  $\beta_2$  alegységének overexpressziójával, és az ebből adódó  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás fokozásával érték el, ami a klinikumban használt terápiával ellentétes stratégia. A jelenlegi klinikai irányelvek szerint miokardiális infarktusból a  $\beta$ -adrenerg rendszer katekolaminok által történő stimulálása csak akut szívelégtelenség esetén indokolt, akkor is csak rövid ideig, a keringés támogatására. Hosszútávon pumpafunkció rezerv létrehozása, valamint a  $\text{Ca}^{2+}$ -terhelésből

adódó aritmiák csökkentése a cél, ami  $\beta$ -blokkoló terápiával érhető el. Krónikus szívelégtelenségben a kontraktilis diszfunkció javítására a miofilamentumokon közvetlenül ható  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szerek azonban elviekben használhatóak. Legjobb tudomásunk szerint először tanulmányoztuk a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő tulajdonsággal is rendelkező  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló SR33805 hatásait kórosan átépült szívizmon.

Az *in vivo* végzett echokardiográfiás kísérletek arra mutattak rá, hogy az SR33805 fokozza a BK kontraktilitást patkány szívbén. Ezen eredmények összhangban állnak altatott, nyitott mellkasú kutyákon végzett vizsgálatokkal, ahol az intravénásan alkalmazott SR33805 jelentősen fokozta a szegmentális rövidülést [51]. Jóllehet, ezen megfigyeléseket nem magyarázták az SR33805-tel kapcsolatban általában leírt vazorelaxáns, illetve  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló hatások, így további vizsgálatok voltak szükségesek annak eldöntésére, hogy az SR33805 miokardiumra gyakorolt jótékony hatásai milyen egyéb lehetséges mechanizmusok útján valósulhatnak meg.

Korábbi tanulmányokban részletesen bemutatták az SR33805 hatását egészséges patkány szívizom kontraktilis filamentumain, ahol is a kis koncentrációban alkalmazott szer (0,01  $\mu\text{M}$ ) növelte a maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta erőt a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység jelentősebb befolyásolása nélkül, míg a nagyobb koncentrációban alkalmazott szer (1-10  $\mu\text{M}$ ) kifejezetten növelte a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, különösen a nagyobb szarkomerhosszon (2,3  $\mu\text{m}$ ) [49]. Érdekes módon az SR33805 - a kontroll szívizomsejtekkel ellentétben - nem befolyásolta a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienst szívelégtelen szívizomsejtekben. Ennek egyik lehetséges magyarázata az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -blokkoló hatásának membrápotenciáltól való függése, hiszen korábban mind a vaszkuláris [51], mind a szívizom mintákon végzett kísérletekben [77] azt találták, hogy a szer  $\text{Ca}^{2+}$ -blokkoló hatása alacsonyabb volt depolarizált preparátumok esetében. Hasonló effektus okozhatja az SR33805 szívelégtelen szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensének amplitúdójára gyakorolt hatástalanságát is. Egy másik magyarázatként a szívizomsejtek

intracelluláris metabolikus környezetének szívelégtelenség során bekövetkező megváltozása szolgálhat.

Mai napig vitatott kérdés, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítők alkalmazásánál potenciális veszélyt jelent-e a diasztolés diszfunkció felerősítése, melyet az intracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]$  diasztolés szintjére adott fokozott érzékenység indukálhat [78, 79]. Az egyetlen  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szer, amely eljutott a klinikai vizsgálatok szintjére, a levosimendan, nem befolyásolta kedvezőtlenül a relaxáció idejét [80], sőt, némi luzitrop hatást is mutatott egészséges és szívelégtelen kutyákban [81]. Hasonlóképp, az SR33805 *in vivo* hatásait célzó vizsgálatok során sem volt felfedezhető a szer relaxációs időt prolongáló hatása, csakúgy, mint az intakt szívműködésű sejteken történt mérések alatt, ahol is az SR33805 kezelés hatására gyorsabb  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens lecsengés, valamint relaxáció volt megfigyelhető, mely a  $\text{Ca}^{2+}$  fokozott szarkoplazmatikus felvételére engedett következtetni. Az SR33805 kezelés ezen jótékony hatásai mellett a permeabilizált szívműködésű sejteken végzett mérések során sem találtunk a passzív feszülésben bekövetkező növekedést, ami arra utal, hogy a szer a diasztolés funkció passzív komponensére sincs kedvezőtlen hatással. Az intakt szívműködésű sejtek vizsgálatából kiderült, hogy az SR33805 kezelés normalizálta az infarktusos szívműködésű sejtek károsodott kontrakciós és relaxációs sebességét. Hasonló, kontrakciót érintő változásokat figyeltek meg MLC-kinázt overexpresszáló szívműködésű sejtekben, melyekben az MLC2 foszforilációs szintje magasabbnak adódott [82]. Ez arra enged következtetni, hogy a miofilamentumok foszforilációs állapota képes lehet a sejtrövidülést, illetve a sejtek relaxációját befolyásolni. Ezek alapján az általunk megfigyelt, SR33805 hatására létrejövő magasabb MLC2 foszforiláció, ugyan kismértékű volt, de hozzájárulhatott a sejtek gyorsabb aktivációjának és relaxációjának létrejöttéhez. Az SR33805 indukálta  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens gyorsabb lecsengésének pontos mechanizmusa egyelőre még tisztázatlan. Felmerül, hogy a szer ezen hatása az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizáció befolyásolásán, azaz a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis szabályozásában

részt vevő fehérjék funkciójának megváltozásán keresztül jön létre. Ebből adódóan az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban betöltött szerepének tisztázására további kísérletek szükségesek.

Az SR33805 egyik érdekes jellemzője a szer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységre gyakorolt hatásaiban megfigyelt hossz-függő sajátosság. Míg 1,9  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhosszon egy kismértékű, de szignifikáns, 2,3  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhosszon egy sokkal kifejezettebb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység fokozó hatást lehetett felfedezni. Ez az infarktusos szívizomsejtek kontrollokhoz képesti csökkent hosszfüggő aktivációjának ( $\Delta p\text{Ca}_{50}$ ) normalizálódását eredményezte. A szer hasonló hatását figyelték meg egy korábbi tanulmányban kontroll szívizomsejteken [49]. Érdekes módon más  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő tulajdonságú vegyületek esetében (pl. EMD 57033, CGP-48506, kalmidazolium) épp ellenkező hatásról, a permeabilizált szívizomsejtek hosszfüggő aktivációjának csökkenéséről számoltak be [83]. A szívizomsejtek hosszfüggő aktivációja képezi a Frank-Starling mechanizmus celluláris alapját, ami alapfeltétele a normál szívműködésnek. A hosszfüggő aktiváció - és értelemszerűen a Frank-Starling mechanizmus - molekuláris alapja, valamint az SR33805 erre gyakorolt hatása egyelőre még tisztázatlan. Valószínűsíthető azonban, hogy az MLC2 fehérje foszforilációjának fokozása szerepet játszik az infarktusos szívizomsejtek hosszfüggő aktivációjának helyreállításában, noha a kísérleteink során ezen paraméterben megfigyelt kismértékű változás felveti más mechanizmusok szerepét is.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő tulajdonsággal bíró vegyületek pozitív inotróp hatásaikat a troponin komplex direkt befolyásolásán, vagy a keresztkötési kinetika facilitálásán keresztül fejtik ki. Kísérleteink alapján nem zárható ki az SR33805 troponin fehérjékre gyakorolt direkt hatása, azt azonban további kísérletekkel szükséges igazolni. Biokémiai kísérleteink a troponin I fehérje PKA-specifikus foszforilációjának növekedését támasztották alá az infarktusos állatokból származó szívizommintákban, ami összhangban állt ezen állatok fokozott

szimpatikus idegrendszeri aktivációjával, valamint azok kontraktilis fehérjéinek csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységgel. Szívelégtelenség során az adekvát perctérfogat fenntartásának érdekében fokozott szimpatikus idegrendszeri aktiváció jön létre. Ez fokozott  $\beta$ -receptor aktivációhoz, és számos, az excitációs-kontrakciós kapcsolásban résztvevő fehérje PKA-mediált foszforilációjához vezet. A szívelégtelenség előrehaladott stádiumában a fokozott szimpatikus idegrendszeri aktiváció a  $\beta$ -adrenerg receptorok deszenzitizációjához vezet, ami a PKA-mediált szignalizációs útvonal down-regulációját eredményezi [31, 32]. Vizsgálataink arra utalnak, hogy az SR33805 gátolta az infarktuson átesett patkány szívmusclejtekben a PKA aktivitását, ami a csökkent TnI foszforiláción keresztül magyarázhatja a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$  iránti szenzitizációját az SR33805 kezelést követően. Ebben a tekintetben az SR33805 egyedülállónak tűnik a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szerek családjában, mivel ezen anyagok némelyike épp a foszfodiészteráz aktivitásra fejt ki gátló hatást, ami fokozott cAMP szinteket eredményez, és következményesen növeli a TnI fehérjén található PKA-specifikus foszforilációs helyek telítettségét. Ezzel szemben kísérleti eredményeink az SR33805 direkt PKA gátló hatását igazolták, ami inkább a  $\beta$ -receptor blokkolók hatásmechanizmusára emlékeztet.

Összefoglalva, az SR33805 fokozta az infarktuson átesett patkányokból származó szívmusclejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet. Ennek hátterében a kontraktilitást szabályzó fehérjék foszforilációs állapotában bekövetkező változásokat igazoltuk, amit a szer részben a PKA aktivitás direkt gátlásával ért el, a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban bekövetkező káros következmények nélkül. Mindezek alapján az SR33805 kezelés *in vitro* igazolt jótékony hatásai hozzájárultak az állatokban *in vivo* megfigyelt kontraktilitás javulásához, így a szer potenciális terápiás szerepe felmerülhet a későbbiekben a humán szívelégtelenség kezelésében.

## 6. Összefoglalás

A krónikus szívelégtelenség molekuláris háttere a mai napig nem teljesen egyértelmű, így a betegség patofiziológiájának részletesebb feltárása hozzájárulhat a szívelégtelenség új terápiáinak megjelenéséhez.

Kísérleteink során azt kívántuk megvizsgálni, hogy az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben megfigyelt regionális kontraktilis diszfunkció hátterében felfedezhetők-e a szívizomsejtek miofibrilláris fehérjéinek foszforilációs változásai. Emellett poszt-infarktusos állatmodellben tesztelni kívántuk - a kórosan átépült szívizmon korábban még nem vizsgált -  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló SR33805 lehetséges  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatásait.

Vizsgálataink során az alábbi új megállapításokat tettük: 1) Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében alacsony proteinkináz A-mediált troponin I foszforiláció jön létre az ingerléshez közeli területeken, ami nagymértékű, sejtről-sejtre kialakuló variabilitást mutat. 2) A szívizom ezen heterogén átépülése hatással van a szívizomsejtek által generált erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységére, így ennek következtében hozzájárulhat az állatokban megfigyelt regionális kontraktilis eltérésekhez. 3) Az SR33805 változásokat indukál a kontraktilitást szabályzó fehérjék foszforilációs állapotában poszt-infarktusos patkánymodellben, amit részben a proteinkináz A aktivitásának direkt gátlásával ér el. 4) A szer ezen hatásai fokozzák az izolált szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, így azok hozzájárulnak az infarktuson átesett állatokban *in vivo* megfigyelt kontraktilitás javulásához.

Eredményeink rámutatnak a szívelégtelenség során tapasztalt regionális kontraktilis diszfunkció molekuláris aspektusaira, továbbá felhívják a figyelmet egy új típusú farmakológiai  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő mechanizmusra, mely a szívelégtelenség terápiája során a jövőben talán kiaknázható lehet.

## Summary

At present the molecular background of chronic heart failure is not yet completely understood. Therefore, revealing the pathophysiology of the disease in detail can contribute to development of new therapeutic approaches of heart failure.

During our experiments we investigated, whether changes in myofilamentary protein phosphorylation can be associated with the *in vivo* found regional contractile dysfunction in pacing-induced heart failure. Furthermore, on a post-ischemic rat model we aimed to evaluate the possible  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitizing effect of SR33805, a potent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blocker that has never been previously tested in pathological conditions of the cardiovascular system.

During our investigations we made the following key observations: 1) In the porcine model of pacing-induced heart failure an overall decrease in protein kinase A-mediated troponin I phosphorylation can be characterized close to the site of electrical stimulation, which exhibits a large degree of cell-to-cell variability. 2) Heterogeneous remodeling of the failing myocardium which accompanies pacing-induced heart failure alters the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of myofibrillar force production and may thereby contribute to regional contractile abnormalities observed in the animals *in vivo*. 3) SR33805 modulates the phosphorylation status of regulatory proteins of myofilamentary contractile function in post-ischemic rat myocardium. This result correlates in part with direct inhibition of protein kinase A activity. 4) SR33805 thus, increases  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity in isolated rat cardiomyocytes, thereby contributing to improved contractility of ischemic failing hearts *in vivo*.

Major conclusions: outcomes of the present investigations improve insight into molecular aspects of heart failure-associated regional contractile dysfunction, and illustrate the possibility for a new pharmacological  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitizing mechanism in future heart failure therapies.

## 7. Hivatkozások jegyzéke

1. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* 1971; **285**(26): 1441-1446.
2. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J.* 1999; **20**(6): 421-428.
3. Miller LW, Missov ED. Epidemiology of heart failure. *Cardiol Clin.* 2001; **19**(4): 547-555.
4. Perez NG, Hashimoto K, McCune S, Altschuld RA, Marban E. Origin of contractile dysfunction in heart failure: calcium cycling versus myofilaments. *Circulation.* 1999; **99**(8): 1077-1083.
5. Purcell IF, Bing W, Marston SB. Functional analysis of human cardiac troponin by the in vitro motility assay: comparison of adult, foetal and failing hearts. *Cardiovasc Res.* 1999; **43**(4): 884-891.
6. van der Velden J, Klein LJ, Zaremba R, Boontje NM, Huybregts MA, Stooker W, Eijssman L, de Jong JW, Visser CA, Visser FC, Stienen GJ. Effects of calcium, inorganic phosphate, and pH on isometric force in single skinned cardiomyocytes from donor and failing human hearts. *Circulation.* 2001; **104**(10): 1140-1146.
7. Falcao-Pires I, Palladini G, Goncalves N, van der Velden J, Moreira-Goncalves D, Miranda-Silva D, Salinaro F, Paulus WJ, Niessen HW, Perlini S, Leite-Moreira AF. Distinct mechanisms for diastolic dysfunction in diabetes mellitus and chronic pressure-overload. *Basic Res Cardiol.* 2011; **106**(5): 801-814.
8. Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM. Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest.* 1996; **98**(1): 167-176.
9. Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation.* 1997; **96**(5): 1495-1500.
10. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ. Increased  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res.* 2003; **57**(1): 37-47.

11. Messer AE, Jacques AM, Marston SB. Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; **42**(1): 247-259.
12. van der Velden J, Boontje NM, Papp Z, Klein LJ, Visser FC, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Stienen GJ. Calcium sensitivity of force in human ventricular cardiomyocytes from donor and failing hearts. *Basic Res Cardiol.* 2002; **97 Suppl 1**: I118-126.
13. Verduyn SC, Zaremba R, van der Velden J, Stienen GJ. Effects of contractile protein phosphorylation on force development in permeabilized rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol.* 2007; **102**(6): 476-487.
14. Montgomery DE, Rundell VL, Goldspink PH, Urboniene D, Geenen DL, de Tombe PP, Buttrick PM. Protein kinase C epsilon induces systolic cardiac failure marked by exhausted inotropic reserve and intact Frank-Starling mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; **289**(5): H1881-1888.
15. Belin RJ, Sumandea MP, Kobayashi T, Walker LA, Rundell VL, Urboniene D, Yuzhakova M, Ruch SH, Geenen DL, Solaro RJ, de Tombe PP. Left ventricular myofilament dysfunction in rat experimental hypertrophy and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; **291**(5): H2344-2353.
16. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res.* 2007; **101**(2): 195-204.
17. Skyschally A, Gres P, van Caster P, van de Sand A, Boengler K, Schulz R, Heusch G. Reduced calcium responsiveness characterizes contractile dysfunction following coronary microembolization. *Basic Res Cardiol.* 2008; **103**(6): 552-559.
18. Marston SB, de Tombe PP. Troponin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup>-sensitivity in heart failure: increased or decreased? *J Mol Cell Cardiol.* 2008; **45**(5): 603-607.
19. Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M. Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol.* 2011; **106**(2): 249-262.
20. Bremel RD, Weber A. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nat New Biol.* 1972; **238**(82): 97-101.
21. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002; **415**(6868): 198-205.

22. Cazorla O, Szilagyi S, Vignier N, Salazar G, Kramer E, Vassort G, Carrier L, Lacampagne A. Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2006; **69**(2): 370-380.
23. Solaro RJ, Moir AJ, Perry SV. Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature.* 1976; **262**(5569): 615-617.
24. Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res.* 1995; **76**(6): 1028-1035.
25. Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ. Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res.* 2001; **88**(10): 1059-1065.
26. Ramirez-Correa GA, Murphy AM. Is phospholamban or troponin I the "prima donna" in beta-adrenergic induced lusitropy? *Circ Res.* 2007; **101**(4): 326-327.
27. Stelzer JE, Patel JR, Walker JW, Moss RL. Differential roles of cardiac myosin-binding protein C and cardiac troponin I in the myofibrillar force responses to protein kinase A phosphorylation. *Circ Res.* 2007; **101**(5): 503-511.
28. Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol.* 2005; **125**(3): 257-271.
29. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation.* 2005; **111**(6): 774-781.
30. Kruger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006; **27**(5-7): 435-444.
31. Harding SE, Brown LA, Wynne DG, Davies CH, Poole-Wilson PA. Mechanisms of beta adrenoceptor desensitisation in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 1994; **28**(10): 1451-1460.
32. Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation.* 2000; **101**(5): 558-569.
33. Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W, Stienen GJ, Marston SB, van der Velden J. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008; **29**(6-8): 189-201.

34. Hamdani N, Kooij V, van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, Remedios CD, Duncker DJ, Stienen GJ, van der Velden J. Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2008; **77**(4): 649-658.
35. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; **39**(1): 60-76.
36. Wolff MR, Whitesell LF, Moss RL. Calcium sensitivity of isometric tension is increased in canine experimental heart failure. *Circ Res.* 1995; **76**(5): 781-789.
37. Edes IF, Toth A, Csanyi G, Lomnicka M, Chlopicki S, Edes I, Papp Z. Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (Tgalphaq\*44). *J Mol Cell Cardiol.* 2008; **45**(3): 363-372.
38. Pott C, Willkomm L, Grafweg S, Bolck B, Dorn GW, 2nd, Schwinger RH, Brixius K. Reduced troponin I phosphorylation and increased Ca(2+)-dependent ATP-consumption in triton X-skinned fiber preparations from Galphaq overexpressor mice. *Mol Cell Biochem.* 2008; **314**(1-2): 133-141.
39. van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR, James AT, Boontje NM, Dekkers DH, Stienen GJ, Lamers JM, Duncker DJ. Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004; **95**(11): e85-95.
40. de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, Dekkers DH, Schoonderwoerd K, Schuurbijs HC, de Crom R, Stienen GJ, Sipido KR, Lamers JM, Duncker DJ. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res.* 2007; **100**(7): 1079-1088.
41. Recchia FA, Lionetti V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun.* 2007; **31 Suppl 1**: 35-41.
42. Heusch G. Heart rate and heart failure. Not a simple relationship. *Circ J.* 2011; **75**(2): 229-236.
43. Aiba T, Hesketh GG, Barth AS, Liu T, Daya S, Chakir K, Dimaano VL, Abraham TP, O'Rourke B, Akar FG, Kass DA, Tomaselli GF. Electrophysiological consequences of dyssynchronous heart failure and its restoration by resynchronization therapy. *Circulation.* 2009; **119**(9): 1220-1230.
44. Aiba T, Tomaselli GF. Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol.* 2010; **25**(1): 29-36.

45. Del Ry S, Cabiati M, Lionetti V, Simioniuc A, Caselli C, Prescimone T, Emdin M, Giannessi D. Asymmetrical myocardial expression of natriuretic peptides in pacing-induced heart failure. *Peptides*. 2009; **30**(9): 1710-1713.
46. Endoh M. Mechanism of action of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers--update 2001. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001; **15**(5): 397-403.
47. Sorsa T, Pollesello P, Solaro RJ. The contractile apparatus as a target for drugs against heart failure: interaction of levosimendan, a calcium sensitiser, with cardiac troponin c. *Mol Cell Biochem*. 2004; **266**(1-2): 87-107.
48. Papp Z, Edes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenpera M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RH, Meyer S, Algotsson L, Wikstrom BG, Jorgensen K, Filippatos G, Parissis JT, Gonzalez MJ, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F. Levosimendan: Molecular mechanisms and clinical implications Consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol*. 2011.
49. Cazorla O, Lacampagne A, Fauconnier J, Vassort G. SR33805, a  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist with length-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitizing properties in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol*. 2003; **139**(1): 99-108.
50. Chatelain P, Dewinkleer P, Beaufort P, Meysmans L, Clinet M. Characterization of the binding of [3H]SR 33805 to the slow  $\text{Ca}^{2+}$  channel in rat heart sarcolemmal membrane. *Eur J Pharmacol*. 1994; **267**(2): 151-160.
51. Chatelain P, Clinet M, Polster P, Christophe B, Manning AS. In vitro characterization of a novel  $\text{Ca}^{2+}$  entry blocker: SR 33805. *Eur J Pharmacol*. 1993; **246**(3): 181-193.
52. Lionetti V, Guiducci L, Simioniuc A, Aquaro GD, Simi C, De Marchi D, Burchielli S, Pratali L, Piacenti M, Lombardi M, Salvadori P, Pingitore A, Neglia D, Recchia FA. Mismatch between uniform increase in cardiac glucose uptake and regional contractile dysfunction in pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; **293**(5): H2747-2756.
53. Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJ, Papp Z. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res*. 2005; **67**(2): 225-233.
54. Papp Z, Szabo A, Barends JP, Stienen GJ. The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 2002; **543**(Pt 1): 177-189.
55. Szentesi G, Horvath G, Bori I, Vamosi G, Szollosi J, Gaspar R, Damjanovich S, Jenei A, Matyus L. Computer program for determining fluorescence resonance energy

- transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput Methods Programs Biomed.* 2004; **75**(3): 201-211.
56. Burton P, Gurrin L, Sly P. Extending the simple linear regression model to account for correlated responses: an introduction to generalized estimating equations and multi-level mixed modelling. *Stat Med.* 1998; **17**(11): 1261-1291.
  57. Ait Mou Y, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2009; **81**(3): 555-564.
  58. Cazorla O, Szilagyi S, Le Guennec JY, Vassort G, Lacampagne A. Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J.* 2005; **19**(1): 88-90.
  59. Prinzen FW, Peschar M. Relation between the pacing induced sequence of activation and left ventricular pump function in animals. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2002; **25**(4 Pt 1): 484-498.
  60. Spragg DD, Leclercq C, Loghmani M, Faris OP, Tunin RS, DiSilvestre D, McVeigh ER, Tomaselli GF, Kass DA. Regional alterations in protein expression in the dyssynchronous failing heart. *Circulation.* 2003; **108**(8): 929-932.
  61. Garcia RA, Brown KL, Pavelec RS, Go KV, Covell JW, Villarreal FJ. Abnormal cardiac wall motion and early matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; **288**(3): H1080-1087.
  62. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Damle S, Pi Y, Moe GW. Regional distribution of mitochondrial dysfunction and apoptotic remodeling in pacing-induced heart failure. *J Card Fail.* 2009; **15**(8): 700-708.
  63. Igarashi-Saito K, Tsutsui H, Takahashi M, Kinugawa S, Egashira K, Takeshita A. Endocardial versus epicardial differences of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gene expression in the canine failing myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1999; **94**(4): 267-273.
  64. Potter DD, Araoz PA, Ng LL, Kruger DG, Thompson JL, 3rd, Hamner CE, Rysavy JA, Mandrekar JN, Sundt TM, 3rd. Cardiotropin-1 and myocardial strain change heterogeneously in cardiomyopathy. *J Surg Res.* 2007; **141**(2): 277-283.
  65. Heusch G, Rose J, Skyschally A, Post H, Schulz R. Calcium responsiveness in regional myocardial short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. Inotropic responses to postextrasystolic potentiation and intracoronary calcium. *Circulation.* 1996; **93**(8): 1556-1566.

66. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res*. 2006; **99**(8): 816-828.
67. Simmons WW, Freeman MR, Grima EA, Hsia TW, Armstrong PW. Abnormalities of cardiac sympathetic function in pacing-induced heart failure as assessed by [123I]metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Circulation*. 1994; **89**(6): 2843-2851.
68. Huang MW, Leone RJ, Jr., Weiss HR, Tse J, Scholz PM. Effects of beta-adrenoceptor stimulation on pacing-induced failure of dog hypertrophic hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; **27**(3): 202-207.
69. Hinton RB, Hebbar L, Cox MH, Mukherjee R, Joshi JD, Crawford FA, Jr., Spinale FG. Left ventricular regional myocyte contractility in normal and heart failure states. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; **29**(7): 1939-1946.
70. Anzai T, Lai NC, Gao M, Hammond HK. Dissociation between regional dysfunction and beta-adrenergic receptor signaling in heart failure. *Am J Physiol*. 1998; **275**(4 Pt 2): H1267-1273.
71. Takahama H, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Sasaki H, Wakeno M, Kim J, Asakura M, Takashima S, Minamino T, Komamura K, Sugimachi M, Kitakaze M. A histamine H receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of beta-adrenergic receptor blockade. *Basic Res Cardiol*. 2010; **105**(6): 787-794.
72. Luss H, Meissner A, Rolf N, Van Aken H, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Laer S, Linck B, Luss I, Muller FU, Neumann J, Schmitz W. Biochemical mechanism(s) of stunning in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; **279**(1): H176-184.
73. Kooij V, Boontje N, Zaremba R, Jaquet K, dos Remedios C, Stienen GJ, van der Velden J. Protein kinase C alpha and epsilon phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce  $Ca^{2+}$  sensitivity in human myocardium. *Basic Res Cardiol*. 2010; **105**(2): 289-300.
74. Heusch G, Neumann T. Calcium responsiveness in canine pacing-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; **30**(8): 1605-1613.
75. Lionetti V, Aquaro GD, Simioniuc A, Di Cristofano C, Forini F, Cecchetti F, Campan M, De Marchi D, Bernini F, Grana M, Nannipieri M, Mancini M, Lombardi M, Recchia FA, Pingitore A. Severe mechanical dyssynchrony causes regional hibernation-like changes in pigs with nonischemic heart failure. *J Card Fail*. 2009; **15**(10): 920-928.

76. Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ, Paulus WJ. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res.* 2009; **104**(6): 780-786.
77. Romey G, Lazdunski M. Effects of a new class of calcium antagonists, SR33557 (fantofarone) and SR33805, on neuronal voltage-activated  $\text{Ca}^{++}$  channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; **271**(3): 1348-1352.
78. Lee JA, Allen DG. EMD 53998 sensitizes the contractile proteins to calcium in intact ferret ventricular muscle. *Circ Res.* 1991; **69**(4): 927-936.
79. White J, Lee JA, Shah N, Orchard CH. Differential effects of the optical isomers of EMD 53998 on contraction and cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in isolated ferret cardiac muscle. *Circ Res.* 1993; **73**(1): 61-70.
80. Lehtonen LA. Levosimendan: a parenteral calcium-sensitising drug with additional vasodilatory properties. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001; **10**(5): 955-970.
81. Masutani S, Cheng HJ, Hyttila-Hopponen M, Levijoki J, Heikkila A, Vuorela A, Little WC, Cheng CP. Orally available levosimendan dose-related positive inotropic and lusitropic effect in conscious chronically instrumented normal and heart failure dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; **325**(1): 236-247.
82. Chan JY, Takeda M, Briggs LE, Graham ML, Lu JT, Horikoshi N, Weinberg EO, Aoki H, Sato N, Chien KR, Kasahara H. Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ Res.* 2008; **102**(5): 571-580.
83. Arteaga GM, Palmiter KA, Leiden JM, Solaro RJ. Attenuation of length dependence of calcium activation in myofilaments of transgenic mouse hearts expressing slow skeletal troponin I. *J Physiol.* 2000; **526 Pt 3**: 541-549.

## 8. Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /75/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Czuriga Dániel

Neptun kód: THKBBP

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Czuriga, D.**, Tóth, A., Pásztor, E.T., Balogh, Á., Bodnár, A., Nizsalóczki, E., Lionetti, V., Recchia, F.A., Czuriga, I., Édes, I., Papp, Z.: Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure.  
*Basic Res. Cardiol.* 107 (2), 13p., 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-012-0244-x>  
IF:6.128 (2010)
2. Ait Mou, Y., Tóth, A., Cassan, C., **Czuriga, D.**, de Tombe, P.P., Papp, Z., Lacampagne, A., Cazorla, O.: Beneficial effects of SR33805 in failing myocardium.  
*Cardiovasc. Res.* 91 (3), 412-419, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr096>  
IF:6.051 (2010)



### További Közlemények

3. **Czuriga, D.**, Paulus, W.J., Czuriga, I., Édes, I., Papp, Z., Borbély, A.: Cellular mechanisms for diastolic dysfunction in the human heart.  
*Curr. Pharm. Biotechnol. Epub ahead of print (2012)*  
IF:3.455 (2010)
4. Kovács, K.R., **Czuriga, D.**, Bereczki, D., Bornstein, N.M., Csiba, L.: Silent brain infarction: A review of recent observations.  
*Int. J. Stroke. "accepted by publisher", 2012.*  
IF:3.125 (2010)
5. Papp, Z., **Czuriga, D.**, Balogh, L., Balogh, Á., Borbély, A.: How cardiomyocytes make the heart old.  
*Curr. Pharm. Biotechnol. Epub ahead of print (2012)*  
IF:3.455 (2010)
6. **Czuriga, D.**, Papp, Z., Czuriga, I., Balogh, Á.: Cardiac aging: A review.  
*Eur Surg. 43 (2), 69-77, 2011.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10353-011-0600-3>  
IF:0.534 (2010)
7. Czuriga I., **Czuriga D.**, Borbély A.: Diastolés szívelégtelenség =Diastolic heart failure.  
*Orvosképzés. 85 (1), 49-54, 2010.*
8. **Czuriga, D.**, Stienen, G.J.M., Velden van der, J., Papp, Z.: Cardiomyocytes and cardiac contractile function.  
In: Advances in Cardiomyocyte Research. Ed.: Péter P. Nánási, Transworld Research Network, Kerala, India, 227-244, 2009.
9. Molnár, A., Borbély, A., **Czuriga, D.**, Siket, M.I., Szilágyi, S., Hertelendi, Z., Pásztorné Tóth, E., Balogh, Á., Galajda, Z., Szeráfin, T., Jaquet, K., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes.  
*J. Biol. Chem. 284 (2), 1031-1039, 2009.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M807600200>  
IF:5.328



10. Édes, I., **Czuriga, D.**, Csányi, G., Chlopicki, S., Recchia, F.A., Borbély, A., Galajda, Z., Édes, I., Velden van der, J., Stienen, G.J.M., Papp, Z.: Rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine, and porcine cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293 (1), R20-R29, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00537.2006>  
IF:3.661

Összesített impakt faktor: 31.737

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 12.179

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.02.28



## 9. Tárgyszavak

Szívelégtelenség

Elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség

Dilatatív kardiomiopátia

$\beta$ -adrenerg szignalizáció

Szívizomsejtek

Kontraktilis funkció

Kardiális troponin I

$\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítés

## **Keywords**

Heart failure

Pacing induced heart failure

Dilated cardiomyopathy

$\beta$ -adrenergic signaling

Cardiomyocytes

Contractile function

Cardiac troponin I

Ca<sup>2+</sup>-sensitizing

## 10. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Dr. Papp Zoltán Professzor Úrnak, témavezetőmnek, aki Ph.D-s éveim alatt rengeteg segítséget, támogatást nyújtott, és lehetővé tette azt, hogy megismerkedjem a tudományos ismeretszerzés érdekfeszítő és felemelő érzésével.

Köszönöm Dr. Édes István Professzor Úrnak, a Kardiológiai Intézet igazgatójának szakmai segítségnyújtását, hasznos tanácsait, és azt, hogy lehetővé tette számomra intézetében a kísérletek megvalósítását.

Hálával tartozom Dr. Tóth Attila Tanár Úrnak, Dr. Balogh Ágnesnek, valamint Pásztorné Tóth Enikőnek, amiért kutatómunkám során számos alkalommal készséggel segédkeztek a kísérletek elvégzésében, a technikai akadályok leküzdésében, valamint ragyogó ötleteikkel nagyban hozzájárultak a jelen disszertációban bemutatott új eredmények megszületéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Walter Paulus Professzor Úrnak és Dr. Borbély Attila barátomnak, akiktől sok segítséget kaptam, és nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy munkám során betekintést nyerhessek egy külföldi kutatólaboratórium belső műhelymunkájába.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Édesapámnak, Dr. Czuriga Istvánnak, aki önzetlen segítségével folyamatos iránymutatást nyújtott Ph.D-s éveim alatt is, Édesanyámnak, aki áldozatkész tevékenységével lehetővé tette számomra a gördülékeny munkát, valamint Testvéreimnek és Menyasszonyomnak, akik támogatása sok erőt adott a felmerülő akadályok leküzdéséhez.

## 11. Rövidítések jegyzéke

|               |                                                                    |
|---------------|--------------------------------------------------------------------|
| ACEi          | angiotenzinkonvertáló-enzim gátló                                  |
| AMP           | adenozin-monofoszfát                                               |
| ANOVA         | variancia analízis                                                 |
| ATP           | adenozin-trifoszfát                                                |
| AU            | optikai denzitás arbitrális egységekben                            |
| BCA           | bicinkoninsav                                                      |
| BK            | bal kamra/bal kamrai                                               |
| BSA           | borjú szérum albumin                                               |
| $[Ca^{2+}]$   | $Ca^{2+}$ -koncentráció                                            |
| $[Ca^{2+}]_i$ | intracelluláris $Ca^{2+}$ -koncentráció                            |
| $[Ca_{50}]$   | a "félmaksimalis" erő eléréséhez szükséges $Ca^{2+}$ -koncentráció |
| CA            | Kalifornia állam                                                   |
| cAMP          | ciklikus adenzin-monofoszfát                                       |
| CAMK          | $Ca^{2+}$ -kaldulin-dependens kináz                                |
| CBF           | koronária vérátáramlás                                             |
| cGMP          | ciklikus guanozin-monofoszfát                                      |
| DAPI          | diamidino-2-fenilindolt                                            |
| DEOEC         | Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum              |
| DTT           | ditiotreitol                                                       |
| E-64          | proteináz inhibitor                                                |
| ECL           | enhanced kemilumineszcencia                                        |
| EDTA          | etilén-diamin-tetraacetát                                          |
| EGTA          | etilén-glikol-tetraacetát                                          |
| $F_o$         | maximalis $Ca^{2+}$ -aktiválta erő                                 |
| $F_{passzív}$ | $Ca^{2+}$ mentes környezetben mért passzív erő                     |
| $F_{totál}$   | totál erő ( $F_o + F_{passzív}$ )                                  |
| FS            | frakcionált rövidülés                                              |
| Gαq           | G proteinek családjába tartozó fehérje                             |
| H-89          | proteinkináz A inhibitor                                           |
| HF            | szívelégtelenség                                                   |

|                  |                                                                              |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| IQR              | interkvartilis tartomány                                                     |
| $k_{tr,max}$     | erő regenerálódás sebességi állandója                                        |
| LAD              | bal anterior leszálló koszorúér                                              |
| LV $dP/dt_{max}$ | a bal kamrában egységnyi idő alatt létrejövő nyomásváltozás maximális értéke |
| LVEDD            | bal kamrai végdiasztolés átmérő                                              |
| LVEDP            | bal kamrai végdiasztolés nyomás                                              |
| LVEDV            | bal kamrai végdiasztolés térfogat                                            |
| LVESD            | bal kamrai végszisztolés átmérő                                              |
| LVESV            | bal kamrai végszisztolés térfogat                                            |
| LVSP             | bal kamrai szisztolés nyomás                                                 |
| MA               | Massachusetts állam                                                          |
| ME               | Maine állam                                                                  |
| MgADP            | magnézium-adenozin-difoszfát                                                 |
| MHC              | miozin nehéz lánc                                                            |
| MI               | miokardiális infarktus                                                       |
| MI-SR            | SR33805-tel kezelt infarktusos csoport                                       |
| MLC              | miozin könnyű láncok                                                         |
| MLC1             | esszenciális miozin könnyű lánc                                              |
| MLC2             | regulatórikus miozin könnyű lánc                                             |
| MO               | Missouri állam                                                               |
| MRI              | mágneses rezonancia képalkotás                                               |
| MyBP-C           | miozin kötő C fehérje                                                        |
| NA               | numerikus apertúra                                                           |
| $n_{Hill}$       | a $Ca^{2+}$ -erő görbe meredeksége                                           |
| NIH              | National Institutes of Health                                                |
| NJ               | New Jersey állam                                                             |
| OR-1896          | a levosimendan aktív metabolitja                                             |
| $^{32}P$         | a foszfor 32-es tömegszámú izotópja                                          |
| P-MLC2           | regulatórikus miozin könnyű lánc foszforilált formája                        |
| P-TnI            | troponin I fehérje foszforilált formája                                      |
| $P_i$            | anorganikus foszfát                                                          |
| PBS              | foszfát puffer                                                               |
| pCa              | $-\log[Ca^{2+}]$                                                             |

|              |                                              |
|--------------|----------------------------------------------|
| $pCa_{50}$   | az izometriás erő $Ca^{2+}$ -érzékenysége    |
| PET          | pozitron emissziós tomográfia                |
| PKA          | proteinkináz A                               |
| PKC          | proteinkináz C                               |
| PKC $\alpha$ | proteinkináz C $\alpha$ izoenzim             |
| PMSF         | fenil-metil-szulfonil-fluoride               |
| S.E.M.       | a mintaközép hibája                          |
| S1           | miozin fehérje fejrégio                      |
| S2           | miozin fehérje farok régió                   |
| SERCA2       | szarkoplazmatikus retikulum $Ca^{2+}$ -ATPáz |
| SD           | standard deviáció                            |
| SDS          | nátrium-dodecil-szulfát                      |
| TnC          | troponin C fehérje                           |
| TnI          | troponin I fehérje                           |
| TnT          | troponin T fehérje                           |

## **12. Függelék**

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza:

# Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure

Dániel Czuriga · Attila Tóth · Enikő T. Pásztor · Ágnes Balogh · Andrea Bodnár ·  
Enikő Nizsalóczki · Vincenzo Lionetti · Fabio A. Recchia · István Czuriga ·  
István Édes · Zoltán Papp

Received: 4 December 2011 / Revised: 12 December 2011 / Accepted: 31 December 2011  
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** We tested the hypothesis that myocardial contractile protein phosphorylation and the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of force production are dysregulated in a porcine model of pacing-induced heart failure (HF). The level of protein kinase A (PKA)-dependent cardiac troponin I (TnI) phosphorylation was lower in the myocardium surrounding the pacing electrode (pacing site) of the failing left ventricle (LV) than in the controls. Immunohistochemical assays of the LV pacing site pointed to isolated clusters of cardiomyocytes exhibiting a reduced level of phosphorylated TnI. Flow cytometry on isolated and permeabilized cardiomyocytes revealed a significantly larger cell-to-cell

variation in the level of TnI phosphorylation of the LV pacing site than in the opposite region in HF or in either region in the controls: the interquartile range (IQR) on the distribution histogram of relative TnI phosphorylation was wider at the pacing site (IQR = 0.53) than that at the remote site of HF (IQR = 0.42;  $P = 0.0047$ ) or that of the free wall of the control animals (IQR = 0.36;  $P = 0.0093$ ). Additionally, the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivities of isometric force production were higher and appeared to be more variable in single permeabilized cardiomyocytes from the HF pacing site than in the healthy myocardium. In conclusion, the level of PKA-dependent TnI phosphorylation and the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of force production exhibited a high cell-to-cell variability at the LV pacing site, possibly explaining the abnormalities of the regional myocardial contractile function in a porcine model of pacing-induced HF.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00395-012-0244-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Czuriga · A. Tóth · E. T. Pásztor · Á. Balogh · I. Czuriga ·  
I. Édes · Z. Papp (✉)  
Division of Clinical Physiology, Research Center for Molecular  
Medicine, Institute of Cardiology, Faculty of Medicine,  
University of Debrecen, Medical and Health Science Center,  
Móricz Zs. krt. 22, 4032 Debrecen, Hungary  
e-mail: pappz@med.unideb.hu

A. Bodnár · E. Nizsalóczki  
HAS-UD Cell Biology and Signaling Research Group,  
Department of Biophysics and Cell Biology,  
University of Debrecen, Medical and Health Science Center,  
Debrecen, Hungary

V. Lionetti · F. A. Recchia  
Sector of Medicine, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

V. Lionetti · F. A. Recchia  
Fondazione CNR-Regione Toscana "G. Monasterio", Pisa, Italy

F. A. Recchia  
Department of Physiology, New York Medical College,  
Valhalla, NY, USA

**Keywords** Cardiac function · Pacing-induced heart failure ·  $\beta$ -adrenergic signaling · Dilated cardiomyopathy · Cardiac troponin I

## Introduction

Changes in the expression and post-translational modifications of myocardial proteins occur in the molecular background of myocardial remodeling during the development of chronic heart failure (HF). These alterations affect the myocardial structure and are responsible for disturbances in cellular functions ranging from intracellular signaling through cardiomyocyte contractility to metabolism. In this context, a number of studies have implicated the involvement of myofilamentary proteins in the progressive decay of the myocardial function [12, 30, 33, 42]. In the failing human heart, a downgraded  $\beta$ -adrenergic

responsiveness was found to be associated with an increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of force production through a diminished level of protein kinase A (PKA)-mediated troponin I (TnI) and myosin-binding protein-C (MyBP-C) phosphorylation [6, 27, 41, 43–45], although these relationships were not fully confirmed in all models of HF [4, 5, 28, 37]. Some of the discrepancies arise from the complexity of the human pathology, the difficulty of finding reliable human control materials, and possible species-dependent differences between signaling pathways in large and small mammals [26, 35]. It follows that investigations in large animal models of HF are of great importance, as they will possibly elucidate HF-specific protein alterations with direct relevance for the human pathology.

A well-established large animal model of HF, induced by continuous cardiac pacing at a frequency three- to fourfold higher than the spontaneous heart rate, is mostly applied to dogs, pigs, sheep, and monkeys [15, 34]. One characteristic of this model is the presence of regional differences in functional and molecular remodeling. For example, in a canine tachy-pacing HF model, regional differences were noted in the extent of action potential prolongation and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis abnormalities [1]. Moreover, cardiac resynchronization therapy in these hearts furnished non-uniform responses [2]. In a porcine model of HF, sustained pacing-induced dyssynchronous left ventricular (LV) activation caused more pronounced decreases in LV systolic thickening and circumferential shortening in the anterior/anterolateral region (pacing site) as compared with the inferoseptal region (opposite site) (to  $\sim 7$  vs.  $\sim 31\%$  and to  $\sim -5$  vs.  $\sim -7\%$ , respectively), which were unrelated to a uniform increase in glucose uptake in the corresponding regions [further parameters of in vivo hemodynamic alterations of this model have been detailed in a previous study [23] (p. H2750, Table 1)]. However, these changes did correlate with an asymmetrical myocardial expression of natriuretic peptides [10].

In the present study, we set out to investigate a hypothetical relationship between PKA-dependent myofilament hypophosphorylation and the contractile dysfunction in a porcine model of pacing-induced HF. With a view to analyzing PKA-dependent TnI phosphorylation at the tissue and cellular levels, we performed biochemical studies (back-phosphorylation) in tissue homogenates, immunohistochemical studies in LV tissue slices, and flow cytometric assays in a large number of permeabilized cardiomyocytes isolated from paced and non-paced regions of failing LVs. To assess functional correlates, we measured the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of isometric force production ( $\text{pCa}_{50}$ ) and additional mechanical parameters of isolated cardiomyocytes of failing and healthy hearts.

Our data revealed disparate myocardial tissue characteristics within the LV of the HF animals and hence suggested a plausible explanation for the dyssynchronous LV activation.

## Materials and methods

### Experimental tissue material

Ten male, sexually mature minipigs (35–40 kg) were chronically instrumented in the laboratory of the Sector of Medicine, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy. HF was induced by pacing the LV anterior wall at 180 beats/min for 3 weeks. Pigs were considered to develop severe HF when the LV end-diastolic pressure was  $\geq 20$  mmHg and the ejection fraction was  $< 40\%$ . Untreated animals were used as healthy controls. Hemodynamic measurements, MRI and PET examinations were performed in controls and in HF animals and identified regional wall motion abnormalities as reported earlier [23]. The minipigs were then killed and their hearts were removed, dissected, and immediately frozen in liquid nitrogen. The anterolateral

**Table 1** Descriptive values for the distribution histograms of the flow cytometric experiments

| [log(P-TnI/TnI)]<br>distribution | Control pacing<br>site ( $n = 6$ ) | Control opposite<br>site ( $n = 6$ ) | HF pacing<br>site ( $n = 6$ ) | HF opposite<br>site ( $n = 6$ ) |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 25% percentile                   | <i>-0.45</i>                       | <i>-0.46</i>                         | <i>-0.65</i>                  | <i>-0.57</i>                    |
| Median                           | <i>-0.27</i>                       | <i>-0.26</i>                         | <i>-0.37</i>                  | <i>-0.36</i>                    |
| 75% percentile                   | <i>-0.09</i>                       | <i>-0.09</i>                         | <i>-0.12</i>                  | <i>-0.15</i>                    |
| IQR                              | 0.36                               | 0.37                                 | 0.53 <sup>+</sup> #           | 0.42                            |
| Mean                             | <i>-0.28</i>                       | <i>-0.29</i>                         | <i>-0.41*</i>                 | <i>-0.38</i>                    |
| Std. deviation                   | <i>0.29</i>                        | <i>0.31</i>                          | <i>0.43</i>                   | <i>0.35</i>                     |
| Std. error of mean               | <i>0.002</i>                       | <i>0.002</i>                         | <i>0.003</i>                  | <i>0.002</i>                    |

Rows in italics were not analyzed statistically since these parameters cannot be interpreted at the single-particle level

\*  $P = 0.0071$  HF pacing versus control pacing site

<sup>+</sup>  $P = 0.0093$  HF pacing versus control pacing site

<sup>#</sup>  $P = 0.0047$  HF pacing versus HF opposite site

wall (pacing site) and inferoseptal region (opposite site) of the LVs were separated. Transfer of the cardiac samples between laboratories was performed on dry ice. The pigs were treated and housed in accordance with the Italian national guidelines (No. DLGS 27/01/1992, No. 116).

### Immunohistochemistry

Porcine heart samples were sectioned in a cryostat at  $-20^{\circ}\text{C}$  to obtain 10- $\mu\text{m}$ -thick slices. All subsequent steps were performed at room temperature. Slides were fixed with ice-cold acetone for 5 min and incubated in methanol for 20 min. The fixed slides were then rinsed in PBS (containing 150.7 mM NaCl, 3.22 mM KCl, 0.735 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.4) and blocked for 20 min in normal goat serum. A monoclonal mouse anti-TnI primary antibody (Clone 19C7, Research Diagnostics Inc., Flanders, USA; 1:500 dilution in PBS-BSA) was used to analyze TnI independently of its phosphorylation status, and a polyclonal rabbit anti-TnI (phospho S22 + S23) (Abcam, Cambridge, UK; 1:500 dilution in PBS-BSA) was employed to assess PKA-mediated TnI phosphorylation (P-TnI). Slides were incubated overnight at  $+4^{\circ}\text{C}$ , followed by a 30-min incubation at room temperature with anti-mouse-Cy3 (red) and anti-rabbit-Cy2 (green) antibodies (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; 1:200 dilution in PBS) to visualize cardiac TnI and its PKA-specific phosphorylated form. To assess protein kinase C (PKC)-mediated TnI phosphorylation, polyclonal rabbit anti-TnI primary antibody (phospho T143) (Abcam, Cambridge, UK; 1:100 dilution in PBS-BSA) was used, followed by overnight incubation at  $+4^{\circ}\text{C}$ , then 30 min incubation at room temperature with anti-rabbit-Biotin antibody (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; dilution: 1:200). Streptavidin-Cy2 (green) was used to visualize PKC-specific phosphorylation of TnI. Microscope slides were mounted with Vectashield mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Microscopic images of tissue cuts were recorded with a NIKON Eclipse 80i Fluorescein microscope, using a NIKON 10 $\times$  objective (NA:0.30) at 100 $\times$  magnification. High-quality images were recorded with an Olympus FluoView 1000 Confocal microscope, using an Olympus LUCPLFLN 20 $\times$  objective (NA:0.45) and digital zoom at 180 $\times$  and 540 $\times$  magnifications.

### Back-phosphorylation of TnI

A back-phosphorylation assay was performed to assess the phosphorylation level of TnI in protein homogenates of permeabilized cardiomyocytes [11]. Permeabilized cardiomyocytes were prepared as described elsewhere [8]. Reaction mixtures contained 40  $\mu\text{l}$  of the isolated cardiomyocyte

fraction {protein concentration 0.5 mg/ml in a modified isolation solution [in mM: KCl 100, ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) 2,  $\text{MgCl}_2$  1, ATP 0.1, and imidazole 100; pH 7.0; all chemicals from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA]}, 10  $\mu\text{l}$  of modified isolation solution containing  $^{32}\text{P}$ -labeled ATP (final specific activity: 1,500 cpm/pmol), and 1  $\mu\text{l}$  of PKA [from Sigma, St. Louis, MO, USA, 4,000 U/ml in 6 mg/ml of (dithiothreitol) DTT-containing modified isolation solution]. The reaction was performed at room temperature for 15 min. At the end, 50  $\mu\text{l}$  of sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added and the samples were boiled for 5 min. Thirty microliters of boiled samples was loaded onto 10% polyacrylamide gels, separated, and transferred onto nitrocellulose membranes. Phosphate incorporation into TnI was detected by autoradiography (blue-sensitive RTGB films from Primax, Berlin, Germany). Band intensities (reflecting phosphate incorporation) were determined by densitometry using Image J software (freeware from <http://www.nih.gov>). Optical densities are shown in arbitrary units in the Figures.

### Western immunoblotting

Porcine LV tissue samples were homogenized in radioimmune precipitation assay buffer containing Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 1% sodiumdeoxycholate; pH 7.4. Protein concentrations were determined by BCA assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using bovine serum albumin (BSA) as standard, and the concentration of each homogenate was adjusted to 4 mg/ml. The homogenates were then mixed with an equal volume of 2 $\times$  SDS sample buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were boiled for 10 min before electrophoresis. 50  $\mu\text{g}$  of proteins was loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels and, after separation, transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with antibodies against TnI (Clone 19C7, Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA, dilution: 1:5,000) and the signal was detected with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG-specific antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; dilution: 1:50,000). The bands were visualized by enhanced chemiluminescence and evaluated with Image J software. Only bands on the same membrane were used to avoid alterations due to differences in transfer efficiency or other technical reasons.

### Flow cytometry

LV tissue samples ( $\sim 0.04$  g wet weight) were mechanically disrupted and isolated as described earlier. In brief, the isolated cells were permeabilized in cell isolation solution (in mM:  $\text{MgCl}_2$  1, KCl 100, EGTA 2, ATP 4, and

imidazole 10; pH 7.0; all chemicals from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described elsewhere [29]. Thereafter, the myocytes were incubated on ice for 90 min in 100  $\mu$ l of isolation solution containing 2 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and primary antibody. Monoclonal mouse anti-TnI antibody (Clone 19C7, Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA; dilution: 1:200), and a phosphorylation-sensitive polyclonal rabbit anti-TnI antibody (phospho S22 + S23) (Abcam, Cambridge, UK; 1:100 dilution) were used as primary antibodies, followed by a 30-min incubation on ice with anti-mouse-Cy3 and anti-rabbit-Cy5 antibodies (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; dilution: 1:50) to label cardiac TnI and P-TnI. Myocytes were fixed with ice-cold 2% formaldehyde solution (in cell isolation solution) for 30 min. All washing steps were performed with isolation solution. The cell suspensions were gently sonicated and then filtered through a 50- $\mu$ m-wide cell filter. Flow cytometric experiments were carried out on a FACSArray flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA). Fluorescence intensities for single particles were determined in six animals per group. 6,000–10,000 particles were measured per animal. Cy3 fluorescence was excited at 532 nm and detected at  $585 \pm 21$  nm, whereas Cy5 was excited at 635 nm and detected at  $661 \pm 8$  nm. Cell debris was excluded from the analysis by gating on the forward and right angle light scatter signals. List mode files were analyzed with the software REFLEX [39].

#### Force measurements in permeabilized cardiomyocyte preparations

The force at saturating  $[Ca^{2+}]$  ( $F_o$ ), the passive force component ( $F_{passive}$ ), the  $Ca^{2+}$  sensitivity of isometric force production ( $pCa_{50}$ ), the steepness of the  $Ca^{2+}$ –force relationship ( $n_{Hill}$ ), and the rate constant of force redevelopment at saturating  $Ca^{2+}$  levels ( $k_{tr,max}$ ; specific for the maximal turnover rate of the actin-myosin cross-bridge cycle) were used as parameters of the myofibrillar function. Moreover, these mechanical data were determined at sarcomere lengths (SLs) of 1.9 and 2.3  $\mu$ m to test for possible alterations in length-dependent  $Ca^{2+}$  sensitization, i.e. in the molecular background of the Frank-Starling mechanism. The  $pCa$ , i.e.  $-\log[Ca^{2+}]$ , values of the relaxing solution and the activating solution used during the force measurements (pH 7.2) were 9.0 and 4.75, respectively. The composition of the relaxing solution differed from that of the activating solution only in the use of 7 mM EGTA instead of Ca-EGTA. Both solutions were supplemented with protease inhibitors: 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 40  $\mu$ M leupeptin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 10  $\mu$ M E-64 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

The technique employed for force measurements in a single myocyte-sized preparation was detailed earlier [29]. Briefly, a single permeabilized cardiomyocyte was attached to a mechanical measuring system. After precise SL adjustment to 2.3  $\mu$ m, isometric  $Ca^{2+}$  contractures were evoked at 15°C during repeated activation–relaxation cycles by moving the myocyte from  $Ca^{2+}$ -free relaxing solution to activating solutions of gradually increasing  $[Ca^{2+}]$ . Isometric force values were normalized for maximal  $Ca^{2+}$ -activated active force, and  $Ca^{2+}$ –force relations were plotted and fitted with a modified Hill function to determine the  $Ca^{2+}$  sensitivity of isometric force production, i.e.  $pCa_{50}$ , and the cooperativity within the contractile machinery ( $n_{Hill}$ ).  $Ca^{2+}$ –force relationships were determined before and after in vitro PKA exposures. The PKA stock solution contained the catalytic subunit of PKA from bovine heart [100 U in distilled water supplemented with 6 mg/ml of DTT at a protein concentration of 0.05 mg/ml, as recommended by the manufacturer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Catalog number: P2645; LOT number: 021M7676V)]. To assess the effects of PKA, cardiomyocytes were incubated for 20 min in 100  $\mu$ l of relaxing solution supplemented with 5  $\mu$ l of the PKA stock solution. In a separate study, isometric force measurements were performed first at a SL of 1.9  $\mu$ m and then at a SL of 2.3  $\mu$ m.

During single  $Ca^{2+}$  contractures, once the peak force was reached, the rate constant of force redevelopment ( $k_{tr,max}$ ) was determined by a quick release–restretch maneuver in the activating solution. As a result of this intervention, the force dropped from peak level to zero, allowing determination of the total force level ( $F_{total}$ ), and then started to redevelop. The cardiomyocyte was next returned to the relaxing solution, where a shortening to 80% of the original preparation length was performed to assess the passive force level ( $F_{passive}$ ). The active isometric force ( $F_o$ ) was calculated by subtracting the passive force from the total isometric force.  $F_o$  and  $F_{passive}$  were normalized for the cardiomyocyte cross-sectional area, calculated from the width and thickness of the myocyte, which were measured with optically directed light.

#### Data analysis, statistics

$Ca^{2+}$ –force relations were fitted to a modified Hill equation:

$$F = F_o [Ca^{2+}]^{n_{Hill}} / (Ca_{50}^{n_{Hill}} + [Ca^{2+}]^{n_{Hill}})$$

where  $F$  is the steady-state force at a given  $[Ca^{2+}]$ , while  $F_o$ ,  $n_{Hill}$  and  $Ca_{50}$  (or  $pCa_{50}$ ) denote the maximal  $Ca^{2+}$ -activated force at saturating  $[Ca^{2+}]$ , and the slope and midpoint of the sigmoidal relationship, respectively.

The force redevelopment after the release–restretch maneuver was fitted to a single exponential function in

order to estimate the rate constant of force redevelopment ( $k_{tr,max}$ ) at the maximal  $[Ca^{2+}]$  level:

$$F(t) = F_i + F_a(1 - e^{-k_{tr,max}t})$$

where  $F(t)$  is the force at any time ( $t$ ) after the restretch at the maximal  $[Ca^{2+}]$ , and  $F_i$  and  $F_a$  denote the initial force after the restretch and the amplitude of  $Ca^{2+}$ -activated force redevelopment, respectively. Each experimental preparation was fitted individually, the fitted parameters were pooled, and the mean values are reported.

Statistical analyses of the back-phosphorylation assay and mechanical measurements were performed by ANOVA followed by a Bonferroni test for multiple comparisons between groups. Relationships between two continuous variables were assessed with linear regression analysis. Differences due to PKA treatment during mechanical measurements were analyzed using a paired Student's  $t$  test. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$ . Analysis of the thousands of single data points obtained from the flow cytometric measurements required a modeling method that does not assume independence across single particles, but is able to handle the correlation between particle-level measurements within the same animal's heart. Thus, conventional ANOVA or linear regression could not be used, but maximum likelihood mixed effects multilevel modeling with interaction between groups and sites was found to be appropriate. Estimation of the pacing effect was based on mean log relative signal intensities  $[\log(P\text{-TnI}/TnI)]$  for the level of phosphorylation and on interquartile ranges (IQRs) for the heterogeneity of phosphorylation. Logarithmic transformation of the data improved the normality of the distribution of the variables.

## Results

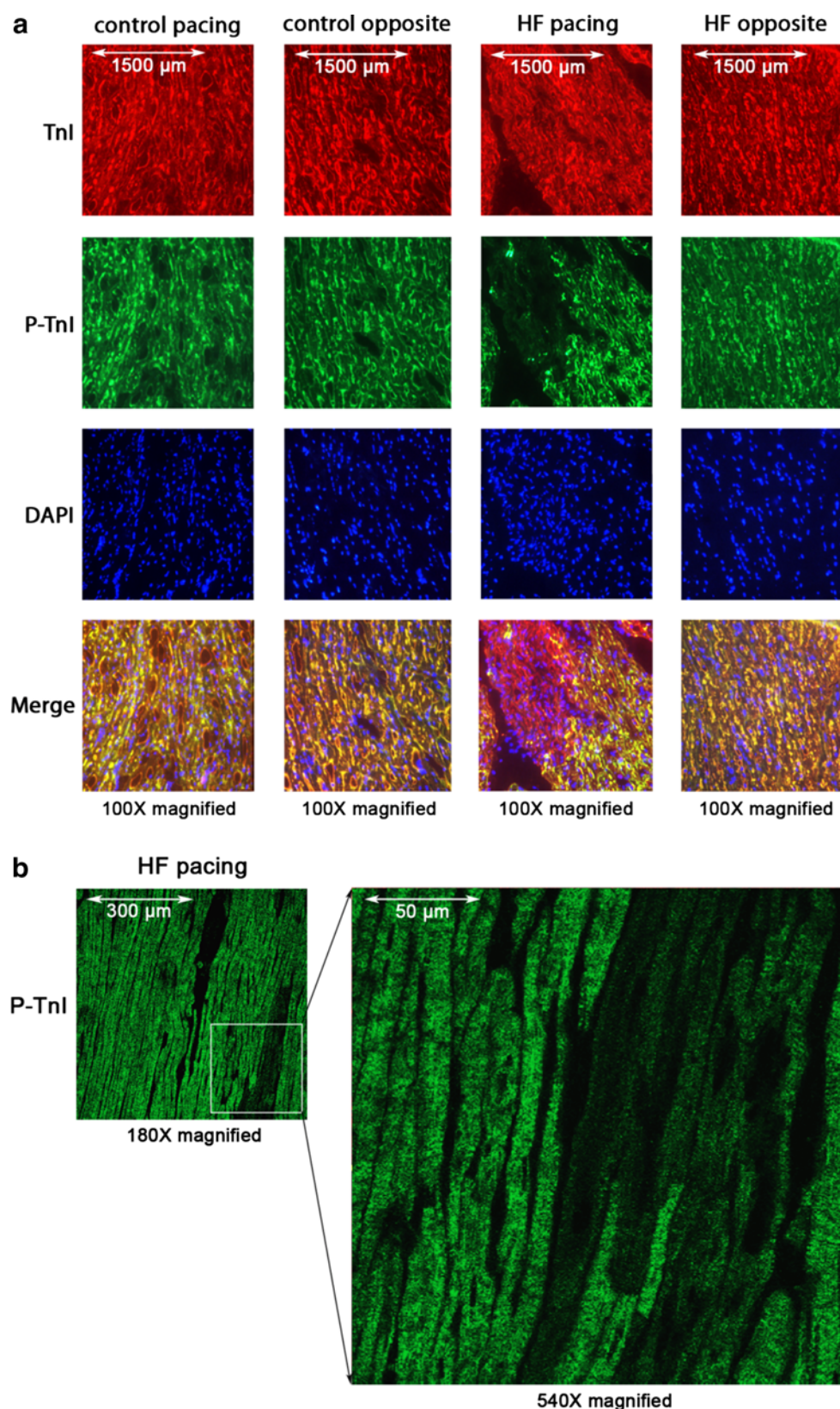
To test homogeneity in PKA-mediated myofilament protein phosphorylation, the level of TnI phosphorylation was visualized during immunohistochemical studies on myocardial tissue samples in the anterior/anterolateral (pacing site) and in the inferoseptal regions (opposite site) in HF and control hearts. Myocardial tissue samples were labeled with specific antibodies against TnI, the phosphorylated form of TnI (P-TnI) at PKA-specific sites (S22 + S23), and slides were also mounted with DAPI-containing medium. In Fig. 1, beside the three separate signals captured with fluorescent light microscopy, merged pictures from each group are also shown. In general, the staining of tissue slices for P-TnI resulted in a more homogeneous staining intensity in the controls and opposite site of HF hearts than in the pacing site of HF hearts, where areas with various P-TnI intensity levels could be observed. Areas with given staining intensities were formed by clusters of

cardiomyocytes with similar P-TnI signal levels in the pacing site of HF hearts (Fig. 1b). The P-TnI staining did not appear to vary within single cardiomyocytes. The homogenous picture with phosphorylation-insensitive TnI antibody and the identification of cardiomyocyte nuclei by DAPI were in contrast with the inhomogeneous pattern observed following P-TnI staining in the same myocardial sections, and hence indicated that fibrosis or necrosis could not explain the heterogeneous staining pattern at the pacing sites of HF hearts. In a separate study, we also attempted to test the homogeneity of PKC-mediated TnI phosphorylation at the pacing site of HF animals. To this end, myocardial tissue samples were labeled similarly as those in Fig. 1 for the PKA-specific TnI phosphorylation sites and also with antibodies specific for a PKC-specific TnI phosphorylation site (T143) (Online Resource 1). In general, these sections suggested TnI phosphorylation to be more homogenous at the PKC site than at the PKA-specific sites.

The mean levels of myofilament protein phosphorylation were tested in a back-phosphorylation assay. The mean phospho-specific TnI signal intensity of protein homogenates of permeabilized cardiomyocytes from the pacing sites of the HF animals ( $58 \pm 14.49$  AU) was significantly higher than that in the control pigs ( $5.41 \pm 1.34$  AU;  $P < 0.05$ ), which was suggestive of a PKA-dependent phosphorylation deficit of TnI at the HF pacing site (Fig. 2a, b). The phosphorylation-dependent intensities at the molecular masses of 20 and 150 kDa [i.e. close to those of MyBP-C and myosin light chain 2 (MLC2)] correlated with TnI phosphorylation (Fig. 2c). Parallel changes in TnI phosphorylation and MyBP-C phosphorylation are expected upon PKA applications; however, phosphate incorporation into MLC2 is not expected for PKA exposures, and hence the protein at 20 kDa could be a protein other than MLC2. The difference in the overall phosphorylation level of myocardial TnI (P-TnI) between the pacing and the opposite sites of the HF pigs did not reach significance ( $P > 0.05$ ) (HF opposite site:  $40.3 \pm 9.86$  AU) (Fig. 2a, b).

Motivated by the results of our histochemical observations and back-phosphorylation assays, we developed a protocol that allowed the quantitative evaluation of regional differences in the level of TnI phosphorylation in suspensions of permeabilized cardiomyocytes by flow cytometry. This method yielded relative P-TnI levels in a vast number of cardiomyocytes following dual-labeling of cardiomyocytes for TnI and P-TnI (Fig. 3a). Distribution histograms of logarithmically transformed relative signal intensities  $[\log(P\text{-TnI}/TnI)]$  were then expressed for the two regions of interest in the HF and control groups by pooling data from six hearts in each group. Figure 3b shows that the distribution histogram of the pacing site in the controls demonstrated close to Gaussian distribution, in

**Fig. 1** Immunohistochemistry. **a** Myocardial tissue samples were labeled with specific antibodies against TnI, the phosphorylated form of TnI (P-TnI) and nuclei with DAPI. Disparate amounts of P-TnI intensities resulted in variable yellow intensities on the merged picture of the HF pacing group. **b** Capturing images of P-TnI stained slices under a confocal microscope revealed cell-to-cell differences: clusters of cardiomyocytes with divergent levels of TnI phosphorylation could be distinguished in the HF animals at the pacing site



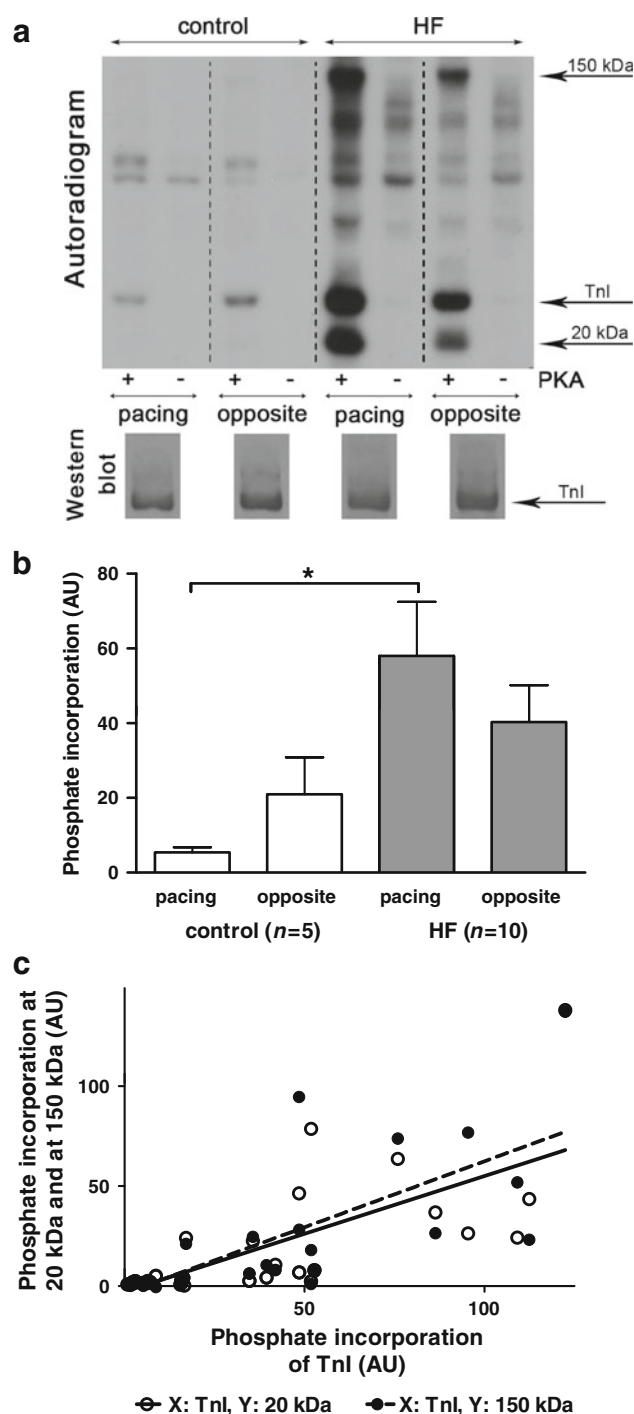
contrast with the histogram of the HF pacing site, which appeared to be asymmetrical due to an increase in cardiomyocyte count at relatively low  $[\log(\text{P-TnI}/\text{TnI})]$  ratios.

In agreement with the results of our back-phosphorylation assays (Fig. 2a, b), the mean value of  $[\log(\text{P-TnI}/\text{TnI})]$  at the HF pacing site was significantly lower than that at the

**Fig. 2** TnI back-phosphorylation. **a** Results of autoradiography (top) and western immunoblotting (bottom) in a representative TnI back-phosphorylation assay.  $^{32}\text{P}$ -labeled ATP was used to determine PKA-dependent phosphate incorporation into TnI at the pacing and opposite LV sites in control and HF animals following SDS gel electrophoresis. Signal intensities in the autoradiograms were considered to be directly proportional to the extents of inorganic phosphate ( $\text{P}_i$ ) incorporation into TnI in the presence of PKA (+ signs) in vitro, and inversely proportional to the initial levels of phosphorylation of TnI prior to PKA application in vivo. Signal intensities in the absence of PKA were negligible (– signs). Western immunoblots developed with a TnI-sensitive antibody confirmed comparable protein loads during all tests. **b** Statistical analysis on the results of back-phosphorylation assays under identical conditions suggested a lower mean level of TnI phosphorylation for the HF pacing site than for the control pacing site (columns show means  $\pm$  SEM;  $n$  number of animals, AU optical density in arbitrary units,  $*P < 0.05$  HF pacing vs. control pacing site). **c** Correlations between TnI phosphorylation and additional proteins at 20 and 150 kDa. Signal intensities at 20 and 150 kDa from pacing and opposite sites of individual animals were plotted in an X–Y diagram as functions of  $\text{P}_i$  incorporation into TnI in the respective samples. Lines represent relationships between phosphorylation at 20 or 150 kDa and TnI phosphorylation from linear regression analyses, suggesting positive correlations between these variables ( $r = 0.71$ ,  $P < 0.0001$ ;  $r = 0.74$ ,  $P < 0.0001$ , respectively)

same site in the control animals ( $-0.41$  vs.  $-0.28$  for the HF pacing site and the control pacing site, respectively;  $P = 0.0071$ ), and hence both of these assays pointed to a relative reduction in P-TnI in the paced region of failing hearts. Moreover, the IQR in this group was significantly higher than that at the pacing site of the controls or at the opposite site of failing hearts ( $0.53$  vs.  $0.36$  or  $0.42$ , for the HF pacing, control pacing and HF opposite sites, respectively;  $P = 0.0093$  vs. control pacing site;  $P = 0.0047$  vs. HF opposite site). The widening of the IQR at the HF pacing site reflected the increased scatter in the levels of relative TnI phosphorylation at the pacing site among the cardiomyocytes of failing hearts. Descriptive values of distribution histograms are given in Table 1.

Mean levels of  $\log(\text{P-TnI/TnI})$  intensities with 95% confidence intervals for each animal are illustrated in Fig. 4. This representation allowed us to analyze the variability of TnI phosphorylation in the different regions of interest in the individual control and failing hearts. In general, the  $\log(\text{P-TnI/TnI})$  values for the control hearts were scattered in a narrower range than those for the failing hearts. Further, in the control animals the means of  $\log(\text{P-TnI/TnI})$  were randomly higher or lower for the pacing or opposite sites, and the differences between these two sites (with the exception of control 4) were small. In contrast, in HF (with the exception of HF 6) the means for the  $\log(\text{P-TnI/TnI})$  values at the pacing sites were lower than those at the opposite sites. Moreover, the differences between the two sites of individual failing hearts were about twice the mean difference detected within the control group.

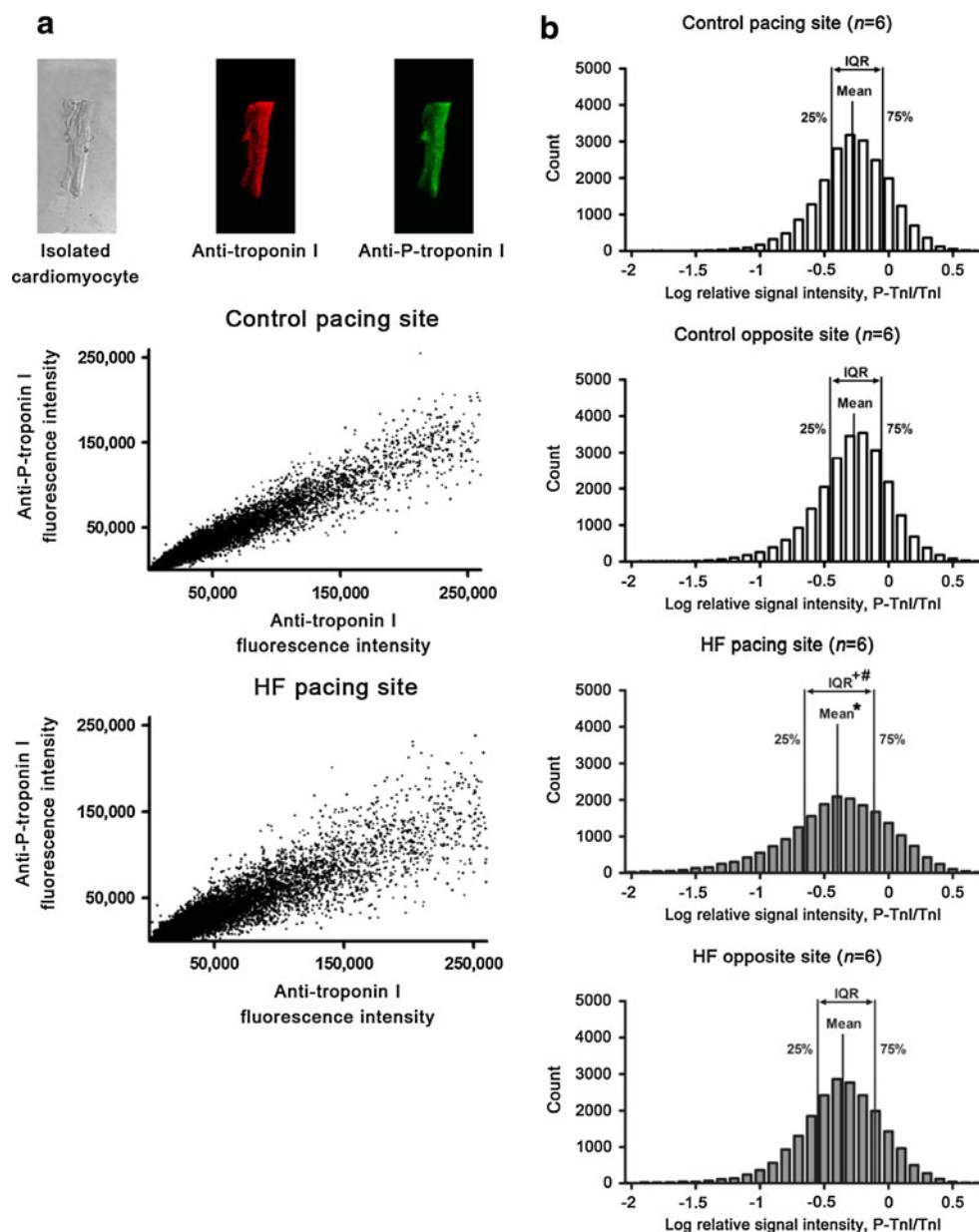


A hypothetical difference in cardiomyocyte mechanics was also studied by means of direct force measurements on single permeabilized cardiomyocytes isolated from HF and control animals (Fig. 5).  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity curves of isometric force production ( $\text{Ca}^{2+}$ –force relations) were determined for individual cardiomyocytes and subsequently averaged in all groups at  $2.3 \mu\text{m}$  SL before and after PKA exposures (Fig. 5a–d). Force values at intermediate  $[\text{Ca}^{2+}]$  were normalized to maximal  $\text{Ca}^{2+}$ -activated force ( $F_0$ ) and

**Fig. 3** Flow cytometry.

**a** Microscopic images of a representative permeabilized cardiomyocyte (*top panel*) dual-labeled for TnI (*red*) and P-TnI (*green*) for flow cytometric evaluation. Signal intensities were plotted in *X–Y* diagrams, where the values on the *X* and *Y* axes reflected TnI and P-TnI intensity levels, respectively (*middle and lower panels*,  $n \approx 20,000$  cardiomyocytes from 6 hearts). The wider scatter of the data obtained from the HF pacing site (*bottom panel*) than those from the control pacing site (*middle panel*) suggested more heterogeneous TnI phosphorylation levels in the cardiomyocytes of the HF animals in the paced area.

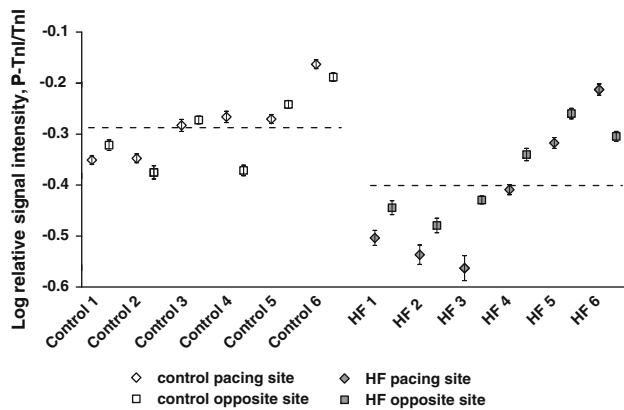
**b** Distribution of relative TnI phosphorylation in isolated cardiomyocytes. Distribution profiles of logarithmically transformed relative signal intensities [ $\log(P\text{-TnI}/\text{TnI})$ ] were expressed for the four groups. (The IQRs between the 25 and 75 percentile values of the distribution histograms are highlighted;  $n$  number of animals;  $*P = 0.0071$  HF pacing vs. control pacing site;  $^+P = 0.0093$  HF pacing vs. control pacing site;  $^{\#}P = 0.0047$  HF pacing vs. HF opposite site)



plotted as a function of  $pCa$ . A Hill function was then used to determine  $pCa_{50}$ , which therefore illustrated the  $Ca^{2+}$  sensitivity of force production. Mean  $pCa_{50}$  values of control hearts at the pacing site did not differ significantly from those of the opposite site in control and HF hearts before PKA treatments ( $5.77 \pm 0.01$ ,  $5.75 \pm 0.01$  and  $5.73 \pm 0.03$ , respectively). However, mean  $pCa_{50}$  (and hence  $Ca^{2+}$  sensitivity of force production) was significantly higher at the pacing site of HF hearts ( $5.86 \pm 0.03$ ) than at all the other sites of HF and control hearts. Moreover, PKA exposures reduced  $pCa_{50}$  by the largest degree in cardiomyocytes of the pacing site of HF animals, thereby eliminating the differences in the  $Ca^{2+}$  sensitivities of force production among the four groups of cardiomyocytes. In addition, the distributions of  $pCa_{50}$  at the pacing sites of the

failing and the control hearts resembled the characteristics of those obtained in our flow cytometric assays and were therefore also in agreement with the biochemical and histochemical findings (Fig. 5e–h). Furthermore, in vitro PKA treatments evoked a wider range in  $Ca^{2+}$  sensitivity reductions at the HF pacing site than at all other sites. Mean values of  $F_o$ ,  $F_{passive}$  and the cross-bridge-sensitive  $k_{tr,max}$  are given in Table 2.  $F_{passive}$  at the HF pacing site was significantly higher than at the HF opposite site; however, no significant differences in  $F_o$  and in maximal actin-myosin cross-bridge cycle rates ( $k_{tr,max}$ ) were found between the different experimental groups.

In a separate study, the length dependencies of the mechanical parameters were investigated by performing force measurements at the SL of  $1.9 \mu m$  and subsequently



**Fig. 4** TnI phosphorylation in experimental animals. Mean levels of  $[\log(\text{P-TnI/TnI})]$  intensities with 95% confidence intervals for each site of each animal. Horizontal lines indicate average  $[\log(\text{P-TnI/TnI})]$  values of control and HF pacing sites. The  $[\log(\text{P-TnI/TnI})]$  values for the control animals were scattered in a narrower range than those for the HF animals

at the SL of  $2.3 \mu\text{m}$ . In short, length dependencies of  $F_o$ ,  $F_{\text{passive}}$ , and the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of force production were observed in all groups of cardiomyocytes, implying that the stretch-dependent mechanical characteristics of the cardiomyocytes are well preserved during the development of pacing-induced HF (data not shown).

## Discussion

The results of this study have revealed a non-uniform down-regulation of myocardial PKA-dependent TnI phosphorylation in a porcine model of pacing-induced HF. Interestingly, the cell-to-cell variability in the level of P-TnI was larger in the vicinity of the pacing electrode than in non-paced regions of the LV. Consequently, we propose that the inhomogeneity in PKA-dependent contractile protein hypophosphorylation may contribute to the regional mechanical dysfunction of the remodeled myocardium in this model of HF.

Dyssynchrony in ventricular contractile responses is considered to be a major contributor of the mechanical dysfunction in the remodeled LV, and hence electrical resynchronization offers benefit for HF patients with a

significant QRS prolongation [32]. Regional myocardial differences have repeatedly been noted in various models of HF induced by electrical stimulation [10, 14, 23, 25, 38]. In open-chest anesthetized dogs, abnormal wall motion at the target site of the LV yielded early shortening and late systolic lengthening, whereas the shortening pattern at the remote site remained unaffected [14]. Various mechanisms have been postulated to explain these region-specific changes, ranging from matrix metalloproteinase-9 activation [14] to transmural and trans-chamber expression gradients of proteins such as phosphorylated ERK mitogen-activated protein kinase, sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, phospholamban, or gap junction protein connexin 43 [20, 38]. Paracrine/autocrine signaling mechanisms have also been stressed as players in the development of regional tissue alterations in pacing-induced HF. For instance, the cardiotropin-1 expression was found to be preferably increased in the vicinity of the pacemaker [31]. In a canine model of pacing-induced HF, an orchestrated shift in the pattern of expression of respiratory chain subunits, mitochondrial bioenergetic enzymes, and apoptotic proteins with distinct differences in the regional distribution and in the subpopulations of mitochondria have been described [25]. Collectively, it is currently not entirely clear which signaling processes are primarily involved in regional mechanical alterations and how they are linked with potential changes in the  $\text{Ca}^{2+}$  responsiveness of the myofilaments and/or with the  $\text{Ca}^{2+}$  handling of cardiomyocytes [1, 2, 17]. Nevertheless, it is tempting to speculate that paracrine responses to natriuretic peptides may relate to interactions between cGMP and cAMP-dependent intracellular signaling [13].

In view of the central position of the  $\beta$ -adrenergic cascade in the regulation of myocardial contractility, several previous investigations addressed its hypothetical involvement in the regional characteristics of pacing-induced HF. Indeed, the efferent sympathetic function and  $\beta$ -adrenergic responsiveness appeared to be reduced in association with the development of pacing-induced HF in dogs with region-specific alterations in function [19, 36], although the biochemical and cellular parameters of  $\beta$ -adrenergic signaling did not clearly exhibit regional characteristics [3, 18, 36,

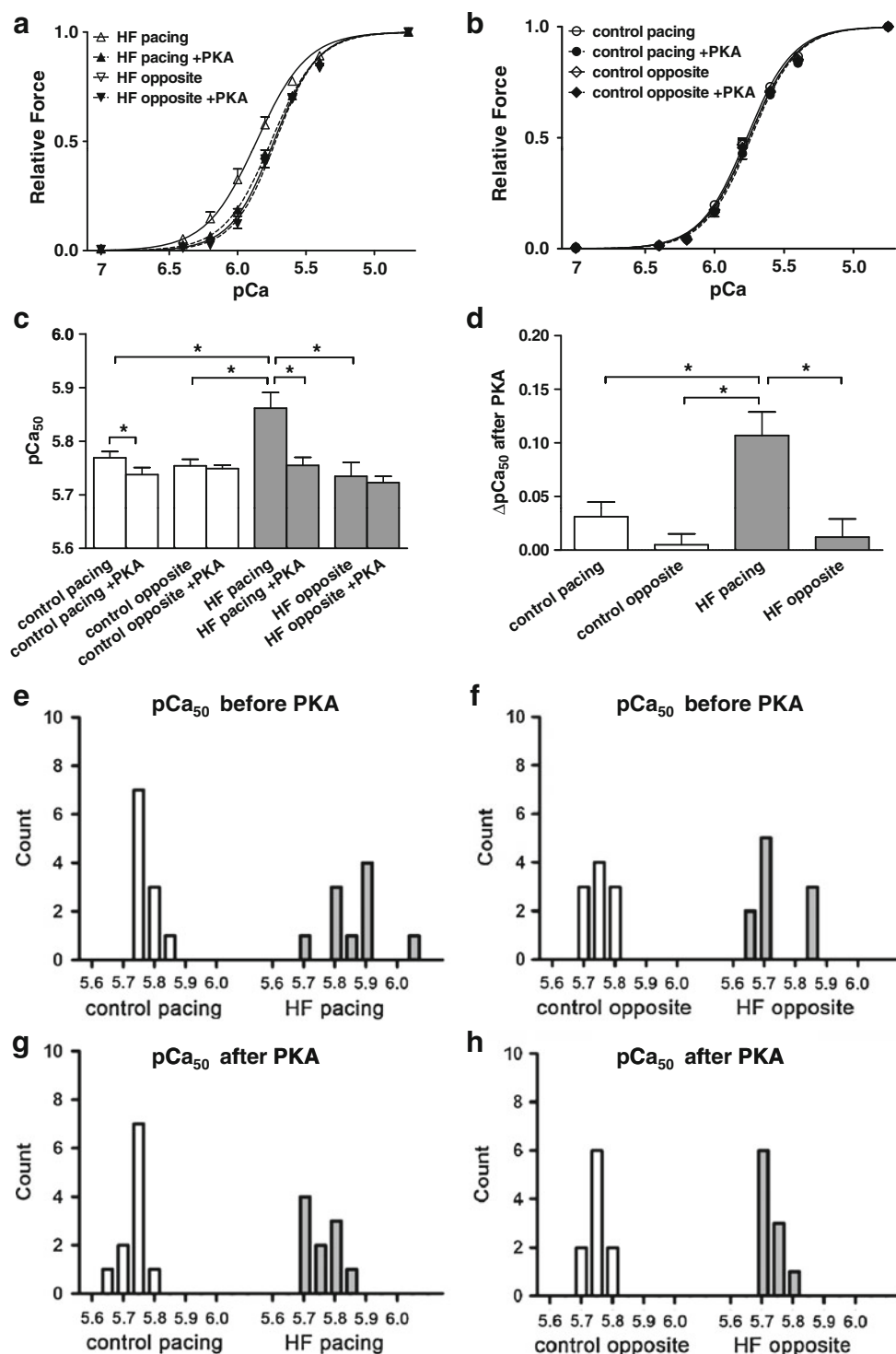
**Table 2** Mean values of active, passive force and  $k_{\text{tr,max}}$  obtained during direct force measurements in permeabilized cardiomyocytes

|                                          | Control pacing site ( $n = 23$ ) | Control opposite site ( $n = 20$ ) | HF pacing site ( $n = 21$ ) | HF opposite site ( $n = 29$ ) |
|------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| $F_o$ ( $\text{kN/m}^2$ )                | $12.83 \pm 1.73$                 | $15.47 \pm 1.84$                   | $12.05 \pm 1.15$            | $16.81 \pm 1.42$              |
| $F_{\text{passive}}$ ( $\text{kN/m}^2$ ) | $1.46 \pm 0.20$                  | $1.69 \pm 0.43$                    | $2.26 \pm 0.48^*$           | $1.17 \pm 0.11$               |
| $k_{\text{tr,max}}$ ( $1/\text{s}$ )     | $0.81 \pm 0.06$                  | $0.75 \pm 0.04$                    | $0.82 \pm 0.05$             | $0.96 \pm 0.05$               |

Values are means  $\pm$  SEM

$n$  number of cardiomyocytes from 5 control and 8 HF hearts

\*  $P < 0.05$  HF pacing versus HF opposite site



40]. At the cardiomyocyte level, a decrease in basal  $\beta$ -adrenergic signaling would predict an increase in the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of myofibrillar force production, a change often correlated with the coordinated hypophosphorylation of TnI and MyBP-C [21, 24, 43]. Experimental data obtained during an in situ assessment of myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  responsiveness suggested either preserved or decreased

$\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of myofibrillar force production in a canine model of pacing-induced HF [16]. Moreover, in the porcine model of pacing-induced HF, the relative increase in LV contractility in response to low-dose dobutamine stimulation was higher at the pacing site than at the opposite site, although the basal contractility was lower at the pacing site than at the opposite site [22].

◀ **Fig. 5** Mean  $\text{Ca}^{2+}$ -force relations and distributions of  $\text{pCa}_{50}$  values in isolated cardiomyocytes. **a**  $\text{Ca}^{2+}$ -force relations of isolated cardiomyocytes obtained from the pacing and opposite sites of the HF animals before and after in vitro PKA treatments. The leftward position of the  $\text{Ca}^{2+}$ -force relations at the HF pacing site before PKA treatment illustrated an increased  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of force production in cardiomyocytes of this region relative to all others. After PKA treatment, a rightward shift in the  $\text{Ca}^{2+}$ -force relation was observed. **b** Small differences between the  $\text{Ca}^{2+}$ -force relationships of the control pacing and control opposite groups could be detected before and after in vitro PKA treatment. **c** Means of  $\text{pCa}_{50}$  values in the four groups of cardiomyocytes before and after in vitro PKA treatment. Mean  $\text{pCa}_{50}$  at the HF pacing site was significantly higher than in all other groups under basal conditions, and this difference could be eliminated by PKA ( $*P < 0.05$ ). **d** PKA-evoked changes in  $\text{pCa}_{50}$  values in the four experimental groups. The effect of PKA on mean  $\text{pCa}_{50}$  was the highest at the pacing site of HF animals ( $*P < 0.05$ ). The Hill coefficient did not differ significantly among the four experimental groups before and after PKA exposures ( $n_{\text{Hill}} \sim 2.6$ ). **e–h** Distributions of  $\text{pCa}_{50}$  values in cardiomyocytes from the four experimental groups before and after in vitro PKA treatment.  $\text{pCa}_{50}$  values of the HF pacing group were dispersed on a wider range than in all other groups. After PKA treatment, a narrower distribution for the  $\text{pCa}_{50}$  values could be measured in HF cardiomyocytes at the pacing site

In our present study, we focused not only on regional, but also on intraregional aspects of a hypothetically blunted PKA-mediated TnI phosphorylation, along with the development of pacing-induced HF in pigs. We hypothesized that tissue-level alterations in TnI phosphorylation driven by the  $\beta$ -adrenergic system might be associated with regional differences in the mechanical function of the remodeled myocardium. Our back-phosphorylation assays revealed significantly decreased TnI phosphorylation at the pacing site of the HF animals as compared with the controls, consistently with a hypothetical down-regulation of the  $\beta$ -adrenergic system at the pacing site of the HF animals and hence implying an increase in the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of myofibrillar force production ( $\text{pCa}_{50}$ ). Accordingly, the mean  $\text{pCa}_{50}$  values were significantly higher at the HF pacing site than at the opposite site or both sides in controls, and this difference could be eliminated by in vitro PKA treatments. In addition, immunohistochemistry, flow cytometry, and direct force measurements confirmed a relatively high cell-to-cell variability in the relative P-TnI levels at the pacing site of the HF animals. The preservation of most of the mechanical parameters in the cardiomyocytes of the paced region of the HF animals (e.g. the SL dependence of the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of force production,  $k_{\text{tr,max}}$ , etc.) suggested an unchanged Frank-Starling mechanism and cross-bridge cycling rates in these cardiomyocytes. Overall, our observations suggested that alterations in the myofilament function of the cardiomyocytes were mirrored by  $\text{pCa}_{50}$  at the pacing site of the HF animals, a change that can be correlated to PKA-dependent TnI and MyBP-C phosphorylation. Therefore, we propose that dysregulation

of PKA-dependent contractile protein phosphorylation may contribute to the regional contractile dysfunction observed in the porcine model of pacing-induced HF [23]. Additionally, the increase in  $F_{\text{passive}}$  at the pacing site due to PKA-dependent hypophosphorylation of other myofilament proteins (e.g. titin) could participate in the increase in LV end-diastolic pressure in these hearts (from  $\sim 6$  to  $\sim 20$  mmHg) [7]. Nevertheless, our present investigations did not clarify to which extent regional alterations in myofilament protein phosphorylation were involved in functional hemodynamic alterations (e.g. reduction in the ejection fraction from  $\sim 76$  to  $\sim 35\%$ ) [23].

To the best of our knowledge, this is the first analysis of tissue-level inhomogeneities in cardiomyocyte TnI phosphorylation through a combination of a number of sensitive methods (protein biochemistry, histochemistry, direct force measurements and cell cytometry) during the development of non-ischemic HF. A diminishing transmural gradient in contractile protein phosphorylation has previously been implicated in post-ischemic myocardial remodeling in rats [9], although similar features have not been demonstrated in dogs suffering from pacing-induced HF [20]. Our data revealed that the level of TnI phosphorylation spans a wider range in the vicinity of the pacing electrode than elsewhere and suggested that it can be distinctly different in clusters of cardiomyocytes during pacing-induced HF. At present, we cannot provide an explanation for this distribution pattern of P-TnI staining intensity; we speculate that it may be related to the physical characteristics of the stimulating electrical current on the myocardium.

Overall, the rapid pacing of the LV induced the remodeling of porcine hearts and led to HF, which could be characterized by an overall decrease in PKA-mediated TnI phosphorylation close to the site of electrical stimulation. The level of PKA-dependent phosphorylation of TnI exhibited a larger cell-to-cell variation in the paced region of the LV than in more remote areas or in controls. This intraregional inhomogeneity in this  $\beta$ -adrenergic-dependent variable affects the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of myofibrillar force production and may thereby contribute to dyssynchronous and hence impaired LV contractions in the porcine model of pacing-induced HF.

**Acknowledgments** The authors are grateful to Dr. László Kardos for support with the statistical analyses. The work was supported by the TAMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 project and OTKA grant K 68363 and by the European Union Project FP7-HEALTH-2010: “MEDIA-Metabolic Road to Diastolic Heart Failure” MEDIA-261409. The project is implemented through the New Hungary Development Plan, co-financed by the European Social Fund.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

## References

1. Aiba T, Hesketh GG, Barth AS, Liu T, Daya S, Chakir K, Dimaano VL, Abraham TP, O'Rourke B, Akar FG, Kass DA, Tomaselli GF (2009) Electrophysiological consequences of dyssynchronous heart failure and its restoration by resynchronization therapy. *Circulation* 119:1220–1230. doi:[10.1161/CIRCULATIONAHA.108.794834](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.794834)
2. Aiba T, Tomaselli GF (2010) Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol* 25:29–36. doi:[10.1097/HCO.0b013e328333d3d6](https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e328333d3d6)
3. Anzai T, Lai NC, Gao M, Hammond HK (1998) Dissociation between regional dysfunction and beta-adrenergic receptor signaling in heart failure. *Am J Physiol* 275:H1267–H1273
4. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP (2007) Augmented protein kinase C- $\alpha$ -induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res* 101:195–204. doi:[10.1161/CIRCRESAHA.107.148288](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.148288)
5. Belin RJ, Sumandea MP, Kobayashi T, Walker LA, Rundell VL, Urboniene D, Yuzhakova M, Ruch SH, Geenen DL, Solaro RJ, de Tombe PP (2006) Left ventricular myofilament dysfunction in rat experimental hypertrophy and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2344–H2353. doi:[10.1152/ajpheart.00541.2006](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00541.2006)
6. Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA (1997) Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96:1495–1500. doi:[10.1161/01.CIR.96.5.1495](https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.5.1495)
7. Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ, Paulus WJ (2009) Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res* 104:780–786. doi:[10.1161/circresaha.108.193326](https://doi.org/10.1161/circresaha.108.193326)
8. Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJ, Papp Z (2005) Peroxynitrite-induced  $\alpha$ -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res* 67:225–233. doi:[10.1016/j.cardiores.2005.03.025](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.03.025)
9. Cazorla O, Szilagyi S, Le Guennec JY, Vassort G, Lacampagne A (2005) Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J* 19:88–90. doi:[10.1096/fj.04-2066fje](https://doi.org/10.1096/fj.04-2066fje)
10. Del Ry S, Cabiati M, Lionetti V, Simioniuc A, Caselli C, Prescimone T, Emdin M, Giannessi D (2009) Asymmetrical myocardial expression of natriuretic peptides in pacing-induced heart failure. *Peptides* 30:1710–1713. doi:[10.1016/j.peptides.2009.06.013](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.06.013)
11. Edes IF, Toth A, Csanyi G, Lomnicka M, Chlopicki S, Edes I, Papp Z (2008) Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (Tgalphaq\*44). *J Mol Cell Cardiol* 45:363–372. doi:[10.1016/j.yjmcc.2008.07.001](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.07.001)
12. Falcao-Pires I, Palladini G, Goncalves N, van der Velden J, Moreira-Goncalves D, Miranda-Silva D, Salinaro F, Paulus WJ, Niessen HW, Perlini S, Leite-Moreira AF (2011) Distinct mechanisms for diastolic dysfunction in diabetes mellitus and chronic pressure-overload. *Basic Res Cardiol* 106:801–814. doi:[10.1007/s00395-011-0184-x](https://doi.org/10.1007/s00395-011-0184-x)
13. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G (2006) Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99:816–828. doi:[10.1161/01.RES.0000246118.98832.04](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000246118.98832.04)
14. Garcia RA, Brown KL, Pavelec RS, Go KV, Covell JW, Villarreal FJ (2005) Abnormal cardiac wall motion and early matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1080–H1087. doi:[10.1152/ajpheart.00860.2004](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00860.2004)
15. Heusch G (2011) Heart rate and heart failure. Not a simple relationship. *Circ J* 75:229–236. doi:[10.1253/circj.CJ-10-0925](https://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0925)
16. Heusch G, Neumann T (1998) Calcium responsiveness in canine pacing-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30:1605–1613. doi:[10.1006/jmcc.1998.0726](https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0726)
17. Heusch G, Rose J, Skyschally A, Post H, Schulz R (1996) Calcium responsiveness in regional myocardial short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. Inotropic responses to postextrasystolic potentiation and intracoronary calcium. *Circulation* 93:1556–1566. doi:[10.1161/01.CIR.93.8.1556](https://doi.org/10.1161/01.CIR.93.8.1556)
18. Hinton RB, Hebbard L, Cox MH, Mukherjee R, Joshi JD, Crawford FA Jr, Spinale FG (1997) Left ventricular regional myocyte contractility in normal and heart failure states. *J Mol Cell Cardiol* 29:1939–1946. doi:[10.1006/jmcc.1997.0434](https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0434)
19. Huang MW, Leone RJ Jr, Weiss HR, Tse J, Scholz PM (2000) Effects of beta-adrenoceptor stimulation on pacing-induced failure of dog hypertrophic hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:202–207. doi:[10.1046/j.1440-1681.2000.03229.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03229.x)
20. Igarashi-Saito K, Tsutsui H, Takahashi M, Kinugawa S, Egashira K, Takeshita A (1999) Endocardial versus epicardial differences of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gene expression in the canine failing myocardium. *Basic Res Cardiol* 94:267–273. doi:[10.1007/s003950050152](https://doi.org/10.1007/s003950050152)
21. Kooij V, Boontje N, Zaremba R, Jaquet K, dos Remedios C, Stienen GJ, van der Velden J (2010) Protein kinase C  $\alpha$  and epsilon phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in human myocardium. *Basic Res Cardiol* 105:289–300. doi:[10.1007/s00395-009-0053-z](https://doi.org/10.1007/s00395-009-0053-z)
22. Lionetti V, Aquaro GD, Simioniuc A, Di Cristofano C, Forini F, Cecchetti F, Campan M, De Marchi D, Bernini F, Grana M, Nannipieri M, Mancini M, Lombardi M, Recchia FA, Pingitore A (2009) Severe mechanical dyssynchrony causes regional hibernation-like changes in pigs with nonischemic heart failure. *J Card Fail* 15:920–928. doi:[10.1016/j.cardfail.2009.06.436](https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.06.436)
23. Lionetti V, Guiducci L, Simioniuc A, Aquaro GD, Simi C, De Marchi D, Burchielli S, Pratali L, Piacenti M, Lombardi M, Salvadori P, Pingitore A, Neglia D, Recchia FA (2007) Mismatch between uniform increase in cardiac glucose uptake and regional contractile dysfunction in pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H2747–H2756. doi:[10.1152/ajpheart.00592.2007](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00592.2007)
24. Luss H, Meissner A, Rolf N, Van Aken H, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Laer S, Linck B, Luss I, Muller FU, Neumann J, Schmitz W (2000) Biochemical mechanism(s) of stunning in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H176–H184
25. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Damle S, Pi Y, Moe GW (2009) Regional distribution of mitochondrial dysfunction and apoptotic remodeling in pacing-induced heart failure. *J Card Fail* 15:700–708. doi:[10.1016/j.cardfail.2009.04.010](https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.04.010)
26. Marston SB, de Tombe PP (2008) Troponin phosphorylation and myofilament  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity in heart failure: increased or decreased? *J Mol Cell Cardiol* 45:603–607. doi:[10.1016/j.yjmcc.2008.07.004](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.07.004)
27. Messer AE, Jacques AM, Marston SB (2007) Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 42:247–259. doi:[10.1016/j.yjmcc.2006.08.017](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.08.017)
28. Montgomery DE, Rundell VL, Goldspink PH, Urboniene D, Geenen DL, de Tombe PP, Buttrick PM (2005) Protein kinase C epsilon induces systolic cardiac failure marked by exhausted inotropic reserve and intact Frank-Starling mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1881–H1888. doi:[10.1152/ajpheart.00454.2005](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00454.2005)

29. Papp Z, Szabo A, Barends JP, Stienen GJ (2002) The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 543:177–189. doi:[10.1113/jphysiol.2002.022145](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.022145)
30. Perez NG, Hashimoto K, McCune S, Altschuld RA, Marban E (1999) Origin of contractile dysfunction in heart failure: calcium cycling versus myofilaments. *Circulation* 99:1077–1083
31. Potter DD, Araoz PA, Ng LL, Kruger DG, Thompson JL 3rd, Hamner CE, Rysavy JA, Mandrekar JN, Sundt TM 3rd (2007) Cardiotropin-1 and myocardial strain change heterogeneously in cardiomyopathy. *J Surg Res* 141:277–283. doi:[10.1016/j.jss.2006.12.539](https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.12.539)
32. Prinzen FW, Peschar M (2002) Relation between the pacing induced sequence of activation and left ventricular pump function in animals. *Pacing Clin Electrophysiol* 25:484–498. doi:[10.1046/j.1460-9592.2002.00484.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9592.2002.00484.x)
33. Purcell IF, Bing W, Marston SB (1999) Functional analysis of human cardiac troponin by the in vitro motility assay: comparison of adult, foetal and failing hearts. *Cardiovasc Res* 43:884–891. doi:[10.1016/S0008-6363\(99\)00123-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00123-6)
34. Recchia FA, Lionetti V (2007) Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun* 31(Suppl 1):35–41. doi:[10.1007/s11259-007-0005-8](https://doi.org/10.1007/s11259-007-0005-8)
35. Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M (2011) Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol* 106:249–262. doi:[10.1007/s00395-010-0138-8](https://doi.org/10.1007/s00395-010-0138-8)
36. Simmons WW, Freeman MR, Grima EA, Hsia TW, Armstrong PW (1994) Abnormalities of cardiac sympathetic function in pacing-induced heart failure as assessed by [<sup>123</sup>I]metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Circulation* 89:2843–2851
37. Skyschally A, Gres P, van Caster P, van de Sand A, Boengler K, Schulz R, Heusch G (2008) Reduced calcium responsiveness characterizes contractile dysfunction following coronary microembolization. *Basic Res Cardiol* 103:552–559. doi:[10.1007/s00395-008-0732-1](https://doi.org/10.1007/s00395-008-0732-1)
38. Spragg DD, Leclercq C, Loghmani M, Faris OP, Tunin RS, Di-Silvestre D, McVeigh ER, Tomaselli GF, Kass DA (2003) Regional alterations in protein expression in the dyssynchronous failing heart. *Circulation* 108:929–932. doi:[10.1161/01.CIR.0000088782.99568.CA](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000088782.99568.CA)
39. Szentesi G, Horvath G, Bori I, Vamosi G, Szollosi J, Gaspar R, Damjanovich S, Jenei A, Matyus L (2004) Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput Methods Programs Biomed* 75:201–211. doi:[10.1016/j.cmpb.2004.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2004.02.004)
40. Takahama H, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Sasaki H, Wakeno M, Kim J, Asakura M, Takashima S, Minamino T, Komamura K, Sugimachi M, Kitakaze M (2010) A histamine H receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of beta-adrenergic receptor blockade. *Basic Res Cardiol* 105:787–794. doi:[10.1007/s00395-010-0119-y](https://doi.org/10.1007/s00395-010-0119-y)
41. van der Velden J, Boontje NM, Papp Z, Klein LJ, Visser FC, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Stienen GJ (2002) Calcium sensitivity of force in human ventricular cardiomyocytes from donor and failing hearts. *Basic Res Cardiol* 97(Suppl 1):I118–I126. doi:[10.1007/s003950200040](https://doi.org/10.1007/s003950200040)
42. van der Velden J, Klein LJ, Zaremba R, Boontje NM, Huybregts MA, Stooker W, Eijssman L, de Jong JW, Visser CA, Visser FC, Stienen GJ (2001) Effects of calcium, inorganic phosphate, and pH on isometric force in single skinned cardiomyocytes from donor and failing human hearts. *Circulation* 104:1140–1146. doi:[10.1161/hc3501.095485](https://doi.org/10.1161/hc3501.095485)
43. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ (2003) Increased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 57:37–47. doi:[10.1016/S0008-6363\(02\)00606-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00606-5)
44. Verduyn SC, Zaremba R, van der Velden J, Stienen GJ (2007) Effects of contractile protein phosphorylation on force development in permeabilized rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 102:476–487. doi:[10.1007/s00395-007-0663-2](https://doi.org/10.1007/s00395-007-0663-2)
45. Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM (1996) Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest* 98:167–176. doi:[10.1172/JCI118762](https://doi.org/10.1172/JCI118762)

# Beneficial effects of SR33805 in failing myocardium

Younss Ait Mou<sup>1,2\*</sup>, Attila Toth<sup>3</sup>, Cécile Cassan<sup>1</sup>, Daniel Czuriga<sup>3</sup>, Pieter P. de Tombe<sup>2</sup>, Zoltan Papp<sup>3</sup>, Alain Lacampagne<sup>1</sup>, and Olivier Cazorla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1046, Université Montpellier1, F-34295 Montpellier, France; <sup>2</sup>Department of Cell and Molecular Physiology, Stritch School of Medicine, Loyola University, 2160 South First Avenue, Maywood, Chicago, IL 60153-5500, USA; and <sup>3</sup>Institute of Cardiology, Division of Clinical Physiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Received 26 October 2010; revised 25 March 2011; accepted 30 March 2011; online publish-ahead-of-print 4 April 2011

Time for primary review: 27 days

|                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aims</b>                | SR33805, a potent $\text{Ca}^{2+}$ channel blocker, increases cardiac myofilament $\text{Ca}^{2+}$ sensitivity in healthy rat cardiomyocytes. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of SR33805 on contractile properties in ischaemic failing hearts after myocardial infarction (MI) <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> at the cellular level.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Methods and results</b> | The effect of SR33805 (10 $\mu\text{M}$ ) was tested on the excitation–contraction coupling of cardiomyocytes isolated from rat with end-stage heart failure. Cell shortening and $\text{Ca}^{2+}$ transients were measured in intact cardiomyocytes, while contractile properties were determined in Triton X-100 permeabilized myocytes. Acute treatment with SR33805 restored the MI-altered cell shortening without affecting the $\text{Ca}^{2+}$ transient amplitude, suggesting an increase of myofilament $\text{Ca}^{2+}$ sensitivity in MI myocytes. Indeed, a SR33805-induced sensitization of myofilament activation was found to be associated with a slight increase in myosin light chain-2 phosphorylation and a more significant decrease on troponin I (TnI) phosphorylation. Decreased TnI phosphorylation was related to inhibition of protein kinase A activity by SR33805. Finally, administration of a single intra-peritoneal bolus of SR33805 (20 mg/kg) improved end-systolic strain and fractional shortening of MI hearts. |
| <b>Conclusion</b>          | The present study indicates that treatment with SR33805 improved contractility of ischaemic failing hearts after MI in the rat by selectively modulating the phosphorylation status of sarcomeric regulatory proteins, which then sensitized the myofilaments to $\text{Ca}^{2+}$ . Our results gave a proof of concept that manipulation of the $\text{Ca}^{2+}$ sensitivity of sarcomeric regulatory proteins can be used to improve contractility of a failing heart.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Keywords</b>            | Myocytes • Heart failure • Contractile function • Sarcomere • Ventricular function                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## 1. Introduction

Cardiotonic agents are indispensable for improving contractile dysfunction in acute heart failure (HF) and in the decompensated end-stage HF.<sup>1</sup> These drugs act on various steps of the cardiac excitation–contraction coupling. Most cardiotonic agents available for clinical practice lead to calcium increase and are referred as  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizers.<sup>2</sup> Calcium sensitizers present a class of cardiotonic agents that are capable of producing a positive inotropic effect by acting on the cardiac excitation–contraction coupling process at the level of the myofilaments by modifying  $\text{Ca}^{2+}$  binding to troponin C, thin filament regulatory sites, and/or directly the cross-bridge cycling.<sup>2</sup> Their mechanism of action is not associated with an increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at therapeutic doses, and thus, does not induce  $\text{Ca}^{2+}$ -related deleterious effects such as arrhythmias or apoptosis.<sup>3</sup>

We have previously shown in intact control rat ventricular myocytes that SR33805, a cardiotonic-like agent, reduced the  $\text{Ca}^{2+}$  transient

amplitude and was able to increase cell shortening due to a pronounced increase in myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.<sup>4</sup> Interestingly, the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizing effect of the SR33805 was mostly observed when cells were stretched, suggesting a different mechanism of action than other known  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers. SR33805 ([N-[dimethoxy-3,4-phenetyl]-N-methyl-amino-pro-poxyl]-4-benzenesulfonyl]-2-isopropyl-3-methyl-1-indole) is a fantofarone derivative classified as a substituted indole. This compound binds to and inhibits L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels<sup>5</sup> and was characterized as a potent  $\text{Ca}^{2+}$  inhibitor with a favourably weak negative inotropic effect in electrically stimulated rabbit-isolated vascular and cardiac muscle preparations.<sup>6</sup> Similarly, SR33805 blocked the  $\text{Ca}^{2+}$  influx induced by potassium depolarization in porcine coronary artery and maintained force production by inducing a leftward shift of the  $\text{Ca}^{2+}$ –force relationship.<sup>7</sup> The effect of SR33805 on the cardiovascular system has never been tested in pathological conditions.

The phosphorylation of troponin I (TnI) and that of myosin light chain-2 (MLC-2) are known to regulate the cardiac myofilament

\* Corresponding author. Tel: +1 708 216 6245; fax: +1 708 216 6308, Email: yaitmou@lumc.edu

contractility (for review, see Kobayashi and Solaro<sup>8</sup>) by shifting the tension–pCa curve. Modifications of the phosphorylation level of these proteins have been reported during HF and have been proposed to participate in the contractile dysfunction.<sup>9–11</sup> The second hypothesis verified in the present study is whether or not the incubation with the SR33805 could affect the phosphorylation level of contractile regulatory proteins.

We evaluated the effect of SR33805 on, *in vivo* and *in vitro*, contractile properties of a failing rat heart after myocardial infarction (MI). *In vitro*, various indices of excitation–contraction coupling (cell shortening, calcium transient, and myofilament calcium sensitivity) were compared between isolated sham, MI, and SR33805-treated MI cardiomyocytes. Muscle strips were dissected from the left ventricular (LV) free wall and stretched to measure the phosphorylation level of MLC-2 and TnI, as well as the protein kinase A (PKA) activity. Finally, echocardiography was performed before and after a single intra-peritoneal (ip) bolus of SR33805 in MI hearts to evaluate the potential effects of the drug *in vivo* on global contractile properties.

## 2. Methods

### 2.1 Animals

Male Wistar rats (5 weeks old) were subjected to coronary artery ligation to produce MI as previously described.<sup>9,10</sup> MI rats were compared with sham-operated animals without ligation. Animals were investigated 18 weeks after MI. All experiments complied with the Guide for the 'Care and Use of Laboratory Animals' published by the US National Institutes of Health (NIH Publications No. 85-23, revised 1996), with the approval of the French Ministry of Agriculture and according to the European Union Council Directives for care of laboratory animals.

For a detailed description of methods, see the Methods section available as Supplementary material online.

### 2.2 Echocardiography

Cardiac function was assessed using echocardiography (Vivid 7, General Electric Healthcare) with a phase array 10 MHz probe in rats anaesthetized with isoflurane (Baxter) as previously described.<sup>9</sup> The LV end-diastolic or end-systolic diameter and the posterior wall thickness in diastole (PWTd) and systole (PWTs) were measured in M-mode. Fractional shortening (FS) and end-systolic strain (ESS) were calculated using their respective formulas (see Supplementary material online, Methods). A pulsed wave Doppler spectrum of the aortic outflow was recorded using the suprasternal view to evaluate the velocity-time integral (VTI) of the aortic flow. A pulsed wave Doppler spectrum of mitral inflow (E-wave) was recorded using the apical view as an index of diastolic function. The posterior wall velocity was measured with tissue Doppler.

Echocardiography lasted typically 10–15 min per animal. At the end of the first investigation, rats received an ip bolus of SR33805 (20 mg/kg diluted in water) and allowed to recover from anaesthesia. A second echocardiography was performed under the same conditions 30 min after the injection of SR33805. Control experiments were performed to confirm that parameters measured at the second echocardiography in vehicle-treated MI rats were similar to the first echocardiography.

### 2.3 Contractile properties in intact and permeabilized cardiomyocytes

Ventricular myocytes were isolated by enzymatic digestion as previously described<sup>9</sup> from the remaining subendocardium after removal of the fibrotic scar induced by the infarct. Cells loaded with Ca<sup>2+</sup> dye Indo-1 AM (10  $\mu$ M,

Invitrogen Inc., France) were electrically stimulated at a frequency of 0.5 Hz. Sarcomere length (SL) and fluorescences emitted at 405 and 480 nm were simultaneously recorded using IonOptix system (Hilton, USA) before and after 10 min incubation with 10  $\mu$ M SR33805.

Measurement of the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of force development was performed in myocytes permeabilized with 0.3% Triton X-100 in relaxing solution isolated by mechanical dissociation from subendocardial strips as described previously.<sup>9,10</sup> Myofilaments were incubated with 10  $\mu$ M SR33805 for 10 min at room temperature after cell attachment.<sup>4</sup> Active and passive forces were measured either by perfusing the cells with different Ca<sup>2+</sup> containing solutions at a given length (1.9 or 2.3  $\mu$ m SL) or by stretching the cells from 1.9 to 2.3  $\mu$ m SL in relaxing solution, respectively. Active tensions at submaximal activations were normalized to maximal isometric tension (generally obtained at pCa 5) at the same SL. The relation between force and pCa was fitted using hill equation (see Supplementary material online, Methods for details) from where the Hill coefficient ( $n_H$ ) and pCa for half-maximal activation (pCa<sub>50</sub>) were extracted.

### 2.4 Protein analysis

The phosphorylation levels of TnI and MLC-2 were performed as previously described<sup>4</sup> in skinned muscle strips treated with ice-cold trichloroacetate (10%) to maintain contractile protein phosphorylation status. In summary, proteins (20  $\mu$ g) were separated either on 15 or 10% SDS–PAGE for TnI and MLC-2, respectively. MLC-2 isoforms were specifically detected with a cardiac MLC-2 antibody (Coger SA, Paris, France). Total TnI content was determined on the first wells of the membrane with a total cardiac TnI antibody (Cat. #4T21, Hytest, Turku, Finland), and the PKA phosphorylated form of cardiac TnI antibody on the other wells (Cat. #4T45, Hytest).

PKA activity was measured as described previously.<sup>12</sup> Endogenous PKA activity in the cytosol fraction was measured at room temperature by mixing the cytosol fraction with a phosphorylation solution containing <sup>32</sup>P-labelled ATP (final specific activity: 2500 c.p.m./pmol), 8-Br-cAMP (100 nM), kemptide (1 mg/mL, from GenScript, Piscataway, NJ, USA), and PKA inhibitor (H-89) or SR33805. Radioactivity was measured by scintillation counting (TriCarb scintillation counter from PerkinElmer Life Science, Boston, MA, USA).

Effect of SR33805 on recombinant bovine PKA (Sigma) activity was also tested. The phosphorylation solution contained <sup>32</sup>P-labelled with ATP, PKA inhibitor (H-89 or SR33805), PKA subunit, and histone IIA (1 mg/mL, from Sigma). PKA activities were expressed as % of maximal activity (activity in the absence of inhibitor) over baseline (activity in the absence of kinase) on the figure (Figure 4C).

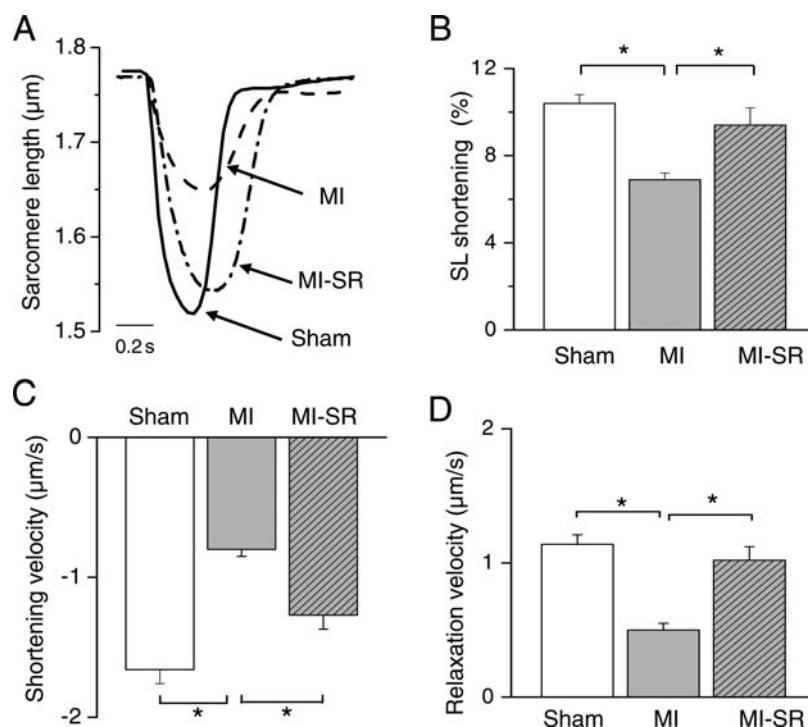
### 2.5 Statistical analysis

One-way ANOVA was applied for comparison between groups. When significant interactions were found, Bonferroni t-test was applied with  $P < 0.05$  (Sigmastat 3.5). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## 3. Results

### 3.1 Effect of SR33805 on unloaded shortening and Ca<sup>2+</sup> transient of failing myocytes

To test the effect of SR33805 on cell contraction, changes in SL and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in indo-1-loaded intact cardiomyocytes stimulated at 0.5 Hz were simultaneously recorded. Unloaded contraction decreased significantly with HF associated with a reduction in contraction and relaxation velocities (Figure 1). Incubation of MI cells for 10 min with 10  $\mu$ M SR33805 restored the amplitude and velocity of SL relaxation (Figure 1). The shortening velocity

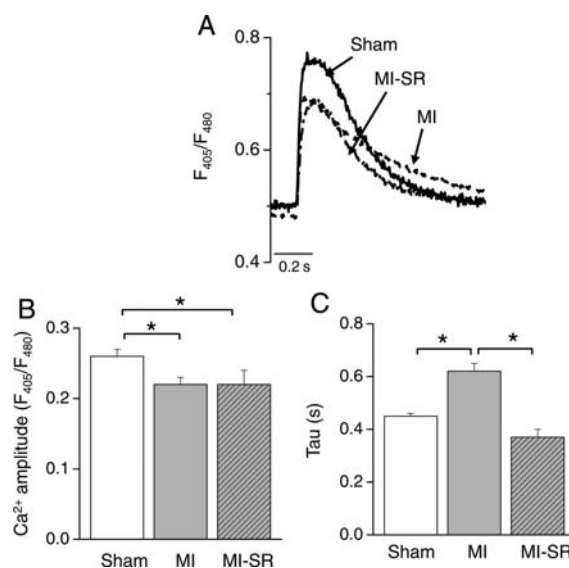


**Figure 1** Effects of SR33805 on SL shortening in isolated MI cardiomyocytes. (A) Representative traces of SL shortening in sham, MI, and MI cells treated with 10 μM SR33805 for 5 min (MI-SR). (B–D) Averaged data of SL shortening amplitude (in % of baseline) (B), SL shortening, and relaxation velocities (C and D, respectively). ( $n = 30$ – $50$  cells/group, five hearts,  $*P < 0.05$ .)

was partially restored by SR33805. The concentration of the drug used (10 μM) was determined from our previous study in control rat as the most effective dose on myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.<sup>4</sup> The contractile alterations observed in MI cells were associated with a significant decrease in the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transient, which was not affected by SR33805 treatment (Figure 2B). The  $\text{Ca}^{2+}$  transient decay was slowed by HF as indicated by the increase in Tau and was normalized by SR33805 (Figure 2C).

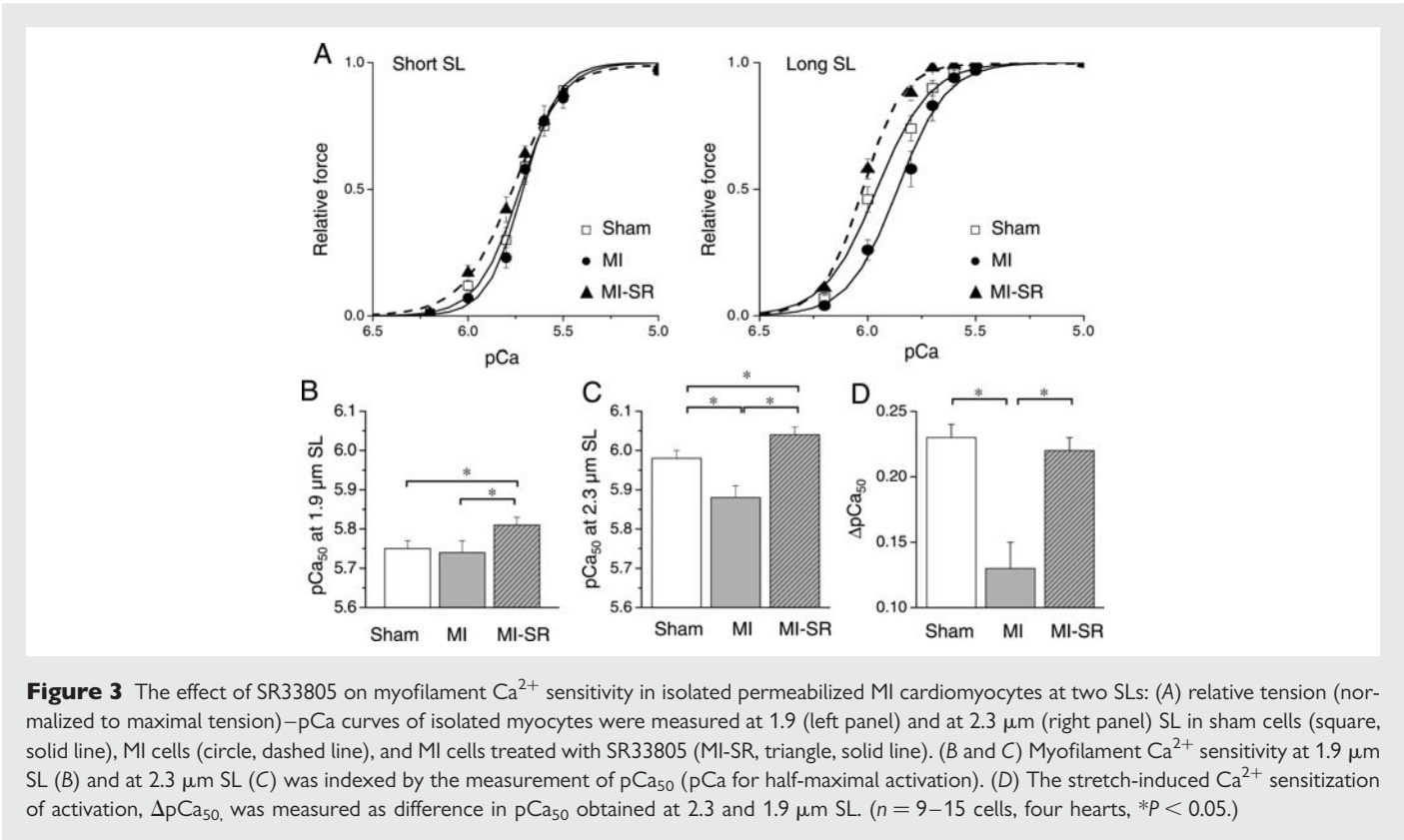
### 3.2 Effect of SR33805 on force development in MI-permeabilized myocytes

Permeabilization of cardiomyocytes allows investigation of the contractile machinery properties and its relation to  $\text{Ca}^{2+}$ , independent of the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  released by the sarcoplasmic reticulum. The contractile machinery properties were investigated by measuring the relationship between  $\text{Ca}^{2+}$ -activated tension and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration expressed as pCa ( $= -\log[\text{Ca}^{2+}]$ ) in permeabilized cardiomyocytes (Figure 3). Myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity ( $\text{pCa}_{50}$ ) was measured at short (1.9 μm) and long (2.3 μm) SLs (Figure 3A). Myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity at short SL was not affected by MI and was significantly increased after SR33805 treatment by  $\approx 0.07$  pCa units (Table 1; Figure 3A). Stretching the cells to 2.3 μm, SL induced a leftward shift of tension in both sham and MI groups as indicated by the higher  $\text{pCa}_{50}$  (Figure 3C). However, the shift of the tension–pCa curve after stretch was lower in MI cells, resulting in a lower  $\text{pCa}_{50}$ . This result confirmed previous reports on the same model.<sup>9,10</sup> Myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity at 2.3 μm SL was improved after SR33805



**Figure 2** Effects of SR33805 on  $\text{Ca}^{2+}$  transient in isolated MI cardiomyocytes. (A) Representative measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  transient in sham, MI, and MI cells treated with 10 μM SR33805 for 10 min (MI-SR). (B) Average data of  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude. (C)  $\text{Ca}^{2+}$  transient decay kinetic as expressed by tau. ( $n = 30$ – $50$  cells/group, five hearts,  $*P < 0.05$ .)

incubation in MI cells by  $\approx 0.18$  pCa units (Figure 3A and C). The difference between  $\text{pCa}_{50}$  at long and short SL [ $\Delta\text{pCa}_{50}$ ; used as an index of the length-dependent activation (LDA) of contractile machinery]



**Figure 3** The effect of SR33805 on myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in isolated permeabilized MI cardiomyocytes at two SLs: (A) relative tension (normalized to maximal tension)– $\text{pCa}$  curves of isolated permeabilized myocytes were measured at 1.9 (left panel) and at 2.3  $\mu\text{m}$  (right panel) SL in sham cells (square, solid line), MI cells (circle, dashed line), and MI cells treated with SR33805 (MI-SR, triangle, solid line). (B and C) Myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity at 1.9  $\mu\text{m}$  SL (B) and at 2.3  $\mu\text{m}$  SL (C) was indexed by the measurement of  $\text{pCa}_{50}$  ( $\text{pCa}$  for half-maximal activation). (D) The stretch-induced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of activation,  $\Delta\text{pCa}_{50}$ , was measured as difference in  $\text{pCa}_{50}$  obtained at 2.3 and 1.9  $\mu\text{m}$  SL. ( $n = 9\text{--}15$  cells, four hearts,  $*P < 0.05$ .)

**Table 1** Mechanical properties of sham, MI, and MI incubated with SR33805 (MI-SR) cardiomyocytes

|       | (n)  | Sarcomere length, 1.9 $\mu\text{m}$ |                  |                             |                          | Sarcomere length, 2.3 $\mu\text{m}$ |                  |                             |                   |                            |
|-------|------|-------------------------------------|------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|
|       |      | $T_{\text{pass}}$                   | $T_{\text{max}}$ | $\text{pCa}_{50}$           | $\eta_{\text{H}}$        | $T_{\text{pass}}$                   | $T_{\text{max}}$ | $\text{pCa}_{50}$           | $\eta_{\text{H}}$ | $\Delta\text{pCa}_{50}$    |
| Sham  | (15) | $0.9 \pm 0.2$                       | $47 \pm 4$       | $5.75 \pm 0.02$             | $4.1 \pm 0.3$            | $11.5 \pm 0.7$                      | $50 \pm 3$       | $5.98 \pm 0.02$             | $4.7 \pm 0.3$     | $0.23 \pm 0.01$            |
| MI    | (10) | $0.9 \pm 0.3$                       | $40 \pm 3$       | $5.74 \pm 0.03$             | $4.6 \pm 0.5$            | $9.4 \pm 1.2$                       | $47 \pm 3$       | $5.88 \pm 0.03^{\text{a}}$  | $5.2 \pm 0.5$     | $0.13 \pm 0.02^{\text{a}}$ |
| MI-SR | (9)  | $1.2 \pm 0.1$                       | $44 \pm 3$       | $5.81 \pm 0.02^{\text{ab}}$ | $3.3 \pm 0.1^{\text{b}}$ | $12.3 \pm 1.5$                      | $45 \pm 3$       | $6.04 \pm 0.02^{\text{ab}}$ | $5.5 \pm 0.5$     | $0.22 \pm 0.01^{\text{b}}$ |

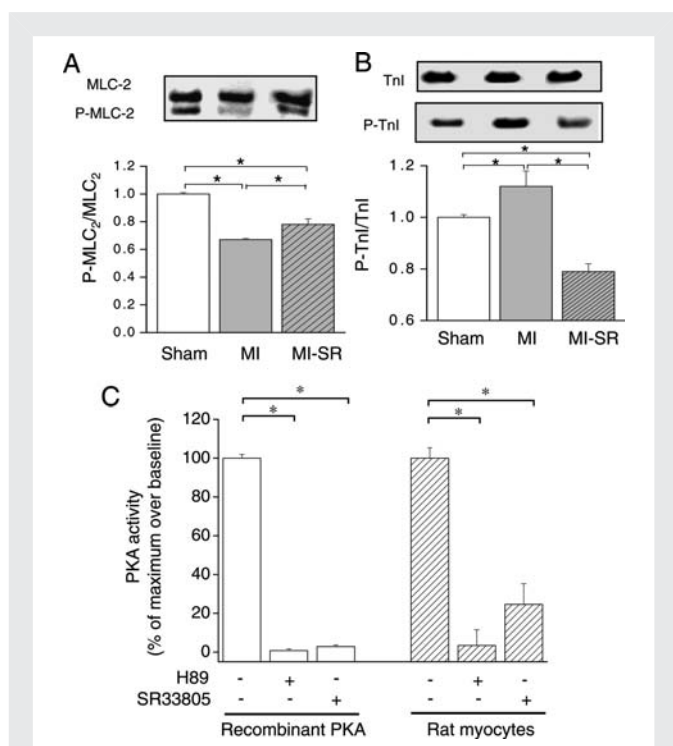
Passive ( $T_{\text{pass}}$ ) and maximal active ( $T_{\text{max}}$ ) tensions in  $\text{mN}/\text{mm}^2$  were measured at  $\text{pCa}$  9 and 4.5, respectively, at 1.9 and 2.3  $\mu\text{m}$  sarcomere length, on cells isolated from sham or MI hearts, with or without 10 min incubation with 10  $\mu\text{M}$  SR33805 (MI-SR).  $\text{pCa}_{50}$  ( $\text{pCa}$  for half-maximal activation) and  $\eta_{\text{H}}$  (Hill coefficient) were calculated by fitting the force– $\text{pCa}$  relation (see materials and methods). Values are means  $\pm$  SEM. <sup>a</sup>vs. sham, <sup>b</sup>MI vs. MI-SR;  $P < 0.05$ .

was completely restored following the incubation of MI cells with the SR33805 due to the stronger effect of the drug at long SL (Figure 3D). The other contractile parameters such as passive tension and maximal isometric tension measured at both SL were similar between all groups (Table 1).

3.3 Contractile protein phosphorylation

To verify whether the SR33805 effect is associated with a modification in the phosphorylation level of regulatory proteins, the Tnl and MLC-2 phosphorylation levels were measured in stretched permeabilized muscle strips by western blot analysis (Figure 4). HF reduced the phosphorylation level of MLC-2 by  $\approx 33\%$  (Figure 4A), consistent with previous reports from our group.<sup>9,10</sup> SR33805 significantly increased the MLC-2 phosphorylation level in MI tissues. The level of phosphorylation, however, remained 22% lower than in sham cells. For Tnl, a specific antibody that recognizes the phosphorylated sites on Ser<sup>23/24</sup> (the major cAMP-dependent PKA sites) was

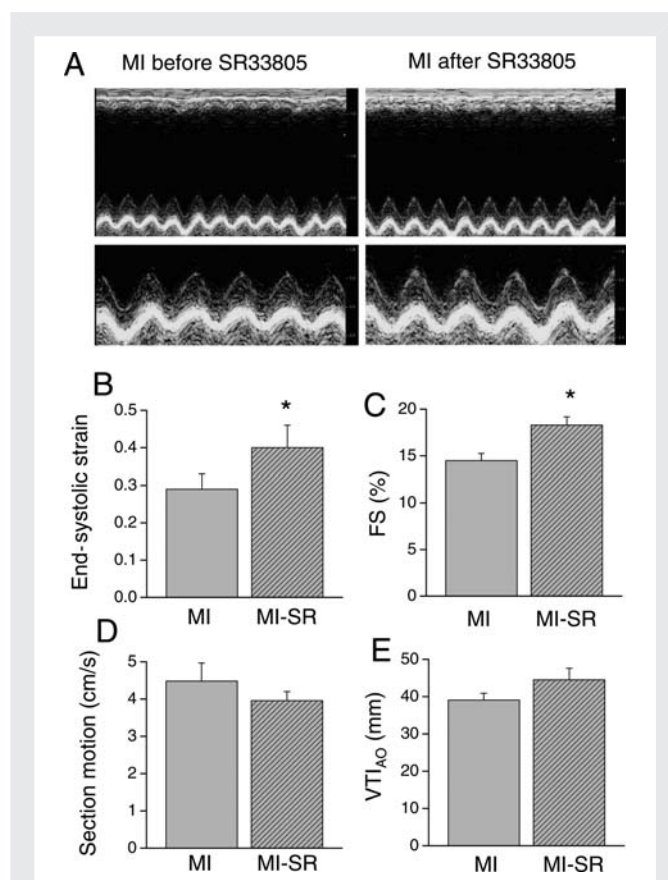
used. Tnl phosphorylation was increased in the MI myofilaments (Figure 4B). Incubation with SR33805 significantly reduced the Tnl phosphorylation when compared with MI ( $\approx -30\%$ ) and sham ( $\approx -20\%$ ) cells (Figure 4B). The reduction of Tnl phosphorylation level observed with the SR33805 treatment suggested either an increase or a decrease of phosphatase and PKA activity, respectively. To this aim, the effect of SR33805 on the PKA activity was measured with a radioactive activity assay (Figure 4C). A recombinant PKA was first used to test a possible direct interaction of the drug with the kinase. The activity of recombinant PKA was decreased by 10  $\mu\text{M}$  SR33805 to a similar extent than that by H89, a standard PKA inhibitor. This result suggested that SR33805 can directly inhibit PKA *in vitro*. This inhibitory effect of SR33805 was also tested on the endogenous PKA activity of the control rat hearts (Figure 4C). In summary, SR33805 targeted the phosphorylation of Ser<sup>23/24</sup> in Tnl by inhibiting the PKA activity and resulting in an increase in myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.



**Figure 4** The effect of SR33805 on sarcomeric protein phosphorylation levels in MI cells: (A) phosphorylated and non-phosphorylated forms of MLC-2 were separated on urea gel and were revealed by western blot analysis with an anti-cardiac MLC-2 antibody. Experiments were performed in stretched muscle strips from sham, MI, and MI treated with SR33805. (B) Western immunoblots with an anti-cardiac TnI antibody (TnI) and anti-PKA-mediated phosphorylated TnI antibody (P-TnI). The phosphorylation level of each protein was expressed relative to the total amount of the protein and was normalized to the level obtained in sham samples ( $n = 5$  hearts). (C) Effect of SR33805 ( $10 \mu\text{M}$ ) on PKA activity was determined by a radioactive assay using either a recombinant PKA or endogenous PKA contained in the control rat hearts. H89 is a PKA inhibitor that was used as a control to block PKA activity. ( $50 \text{ nM}$ ,  $n = 3$  experiments,  $*P < 0.05$ ).

### 3.4 *In vivo* cardiac function after SR33805 treatment

Based on the potency of SR33805 to improve contractility at the cellular level in rat hearts after MI, the effect of the drug *in vivo* on global cardiac contractile properties was tested by measuring the cardiac functional parameters by echocardiography and tissue Doppler imaging before and after (30 min) SR33805 treatment (ip injection). A pre-test was performed on rats with 0.2, 2, and 20 mg/kg of SR33805. The highest dose was the only one that had an effect and was selected for completing the *in vivo* test. MI animals had large anterolateral infarcts as indicated by akinetic infarct zone (Figure 5A). Acute treatment with SR33805 increased significantly both ESS and FS by about +38 and +26%, respectively (Figure 5B and C). SR33805 did not affect other contractile parameters such as the kinetics of contraction as determined by the posterior wall motion (Figure 5D) or another index of systolic function, the VTI of the aortic flow (VTI<sub>AO</sub>;  $P = 0.07$ ) (Figure 5E). The E-wave, an index of



**Figure 5** Effect of SR33805 on *in vivo* cardiac function in MI rats. (A) *In vivo* cardiac function in MI rats was evaluated by echocardiography and tissue Doppler imaging before and 30 min after ip injection of 20 mg/kg SR33805. Global systolic function was assessed with several indexes such as ESS (B), FS (C), velocity of the posterior endocardial wall (D), and aortic velocity-time integral (VTI<sub>AO</sub>, E). \*Paired *t*-test  $P < 0.05$  ( $n = 5$  rats).

diastolic function, was not altered by SR33805 between MI ( $1.18 \pm 0.06 \text{ m/s}$ ) and MI-SR ( $1.09 \pm 0.04 \text{ m/s}$ ).

## 4. Discussion

The present study was designed to test the effect of SR33805 on the cardiac contractile properties of rat with end-stage ischaemic HF characterized by defects of cell shortening,  $\text{Ca}^{2+}$  homoeostasis, and myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.<sup>9,10</sup> *In vivo*, a single ip bolus of SR33805 in MI rats improved contractile function. This effect could be explained, at least in part, by an effect of the drug at the cardiomyocyte level. Application of  $10 \mu\text{M}$  of the SR33805 restored MI cell shortening without affecting the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transient. This positive inotropic effect of SR33805 can be explained by the observed increase in myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, which could be related to the concomitant slight increase in MLC-2 phosphorylation and a more significant decrease in TnI phosphorylation after PKA inhibition induced by the drug.

It has been shown that increasing contractility after MI worsens cardiac injury and pump dysfunction.<sup>13</sup> However, the increase in contractility was performed by over-expressing of  $\beta_2$ -subunit of the L-type calcium channel, which increased  $\text{Ca}^{2+}$  release. This

therapeutic strategy is the opposite of that typically used clinically for treatment of HF, which involves the use of  $\beta$ -blockers to preserve the reserve of pump function and reduce  $\text{Ca}^{2+}$ -induced arrhythmias. There is, however, a need for cardiogenic agents for the improvement of contractile dysfunction in acute HF and in the aggravating phases of chronic congestive HF<sup>14</sup> that targets specifically the myofilaments. Recently, it was shown that increasing myofilament calcium sensitivity by over-expressing the slow skeletal TnI isoform delays decompensated hypertrophy following MI.<sup>15</sup> To our knowledge, this is the first study that investigated the effect of the SR33805 in pathological conditions. The results report that an ip bolus of SR33805 can improve *in vivo* LV contractility of rats with HF. *In vivo* LV contractility was estimated by echocardiography investigations. Although these experiments should be confirmed in the future with systemic haemodynamic investigations, they are in line with the results obtained in anaesthetized, open-chest dogs showing that intravenous administration of SR33805 resulted in a large, significant increase in the percentage segment shortening assessed using ultrasonic microcrystals and  $dP/dt_{\max}$ .<sup>6</sup> This effect cannot be explained by the vasorelaxant and  $\text{Ca}^{2+}$  entry blocker properties of the SR33805 classically described with this drug. Further investigations are required to clearly discriminate the relative contribution of the beneficial effects of this drug on cellular properties and other potential mechanisms. In particular, SR33805 has a strong effect on vascular system which has not been explored in the present study. Part of the positive inotropic effect observed here and in various studies could be related to increased coronary blood flow as described in the dog.<sup>6</sup> Interestingly, at the cellular level, SR33805 did not affect the  $\text{Ca}^{2+}$  transient in failing myocytes, whereas it did in control cells.<sup>4</sup> This effect could be due to a high dependency of SR33805  $\text{Ca}^{2+}$  blockade on membrane potential. Both in vascular<sup>6</sup> and cardiac<sup>16</sup> preparations, SR33805  $\text{Ca}^{2+}$  blockade is reduced in depolarized preparations, which could be the case in failing cardiomyocytes.<sup>17,18</sup> Alternatively, HF-specific alterations in the intracellular metabolic environment can possibly also underlie the difference in the effects of SR33805 on the  $\text{Ca}^{2+}$  transient between failing and control cardiomyocytes.

A potential risk of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers is the amplification of the diastolic dysfunction induced by an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity to diastolic levels of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .<sup>19,20</sup> Previous studies in isolated myocytes and myocardium have demonstrated longer relaxation time, higher resting force,<sup>21</sup> or shorter diastolic cell length<sup>22</sup> after EMD 57033 administration, all of them support myofilament activation. It has been argued that the use of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers in patients with HF might be deleterious rather than advantageous based on these results. The only class of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizer that reached clinical investigations is levosimendan, which did not alter the relaxation rate<sup>23</sup> and even showed some lusitropic effects in both normal and failing dogs.<sup>24</sup> The goal of the present study was not to compare to or compete with levosimendan but instead to find a drug that could have the same final beneficial effects with reduced negative side effects.

In the present study, there was no sign of relaxation prolongation after SR33805 treatment *in vivo* as assessed by the deceleration time ( $52.6 \pm 6.0$  and  $48.8 \pm 3.8$  ms in MI and MI-SR, respectively). At the cellular level, no signs of increased passive tension in permeabilized myocytes or prolongation of  $\text{Ca}^{2+}$  decline at low stimulation frequency in intact myocytes were observed, but instead, a faster decline as assessed by Tau was obtained, suggesting a favoured  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake by SR33805 treatment (Figure 2C). Moreover, SR33805 induced an acceleration of contraction and relaxation

velocities in MI cells (Figure 1C and D) and in control cells.<sup>4</sup> Similar changes on contraction have been reported in myocytes over-expressing the specific cardiac MLCK in which MLC-2 phosphorylation was increased.<sup>25</sup> This suggests that changes of myofilament properties can affect the velocities of cell shortening/relaxation and that the increased phosphorylation level of MLC-2 after SR33805 treatment, although modest, may participate in this effect. In addition, the faster  $\text{Ca}^{2+}$  decay observed in the present study after SR33805 treatment may also participate in the faster relaxation velocity. The mechanism of the accelerated  $\text{Ca}^{2+}$  decay seen after SR33805 treatment is unclear. Calcium transient decay is the resultant of  $\text{Ca}^{2+}$  release (via the ryanodine receptors) and  $\text{Ca}^{2+}$  removal from the cytosol. The latter is performed by SR  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake (via SERCA),  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion (via sodium–calcium exchange channels), and  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the myofilaments. Moreover, the action potential duration (APD) affects the duration of calcium entry through  $\text{I}_{\text{CaL}}$ . In previous experiments, we have shown that SR33805 can reduce the APD by decreasing  $\text{I}_{\text{CaL}}$ . During HF, APD is prolonged, which prolongs  $\text{Ca}^{2+}$  entry via  $\text{I}_{\text{CaL}}$  and alters  $\text{Ca}^{2+}$  signalling duration (for review, see Richard *et al.*<sup>26</sup>). Although the experiments have not been performed in MI myocytes, we expect APD reduction in MI myocytes with SR33805 treatment, which may initiate earlier  $\text{Ca}^{2+}$  decay without affecting the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transient that was already reduced in MI myocytes by  $-15\%$  compared with sham myocytes. More experiments are required to determine the effect of SR33805 on  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis during HF.

An interesting feature of SR33805 is the length dependency of its effects on HF myofilament properties. We observed a modest, but significant, effect at short SL on myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity ( $+0.07$  pCa unit) and a more pronounced effect at long SL ( $+0.16$  pCa unit), resulting in a normalized LDA as indexed by  $\Delta\text{pCa}_{50}$ . This result had been previously reported in control cells<sup>4</sup> and is not shared with other  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers such as EMD 57033, CGP-48506, and calmidazolium that blunted LDA in permeabilized preparations.<sup>27</sup> The LDA mechanism is a cellular basis of the Frank–Starling law of the heart and is a prerequisite of the normal heart function. The molecular mechanism of LDA and the effect of SR33805 on LDA are unclear. Increasing the phosphorylation level of MLC-2, even to a modest amount, is known to increase myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity<sup>28</sup> and has been proposed to participate in the LDA regulation.<sup>9,10</sup> In the present study, MLC-2 phosphorylation in stretched preparations was decreased in HF rats compared with sham animals and partially restored after SR33805 treatment (Figure 4A). This is in line with a report in porcine coronary artery study showing that application of SR33805 induces a leftward shift of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ –force relationship correlated with increased MLC-2 phosphorylation.<sup>7</sup> The signalling pathway that leads to MLC-2 phosphorylation, particularly in a stretched state, is unknown. SR33805 may thus act on a stretch-sensitive kinase or phosphatase and/or a phosphorylation site(s) more accessible in a stretched state. SR33805 modestly, but significantly, increased MLC-2 phosphorylation ( $+10\%$ ). Although minor changes of MLC-2 phosphorylation can significantly change myosin head position, and thus the level of myofilament activation (for review, see Morano<sup>29</sup>), we suspect that other mechanisms are involved that significantly contribute to the large myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization induced by SR33805.

$\text{Ca}^{2+}$  sensitizers can improve contraction by affecting troponins and/or directly facilitating cross-bridge cycling.<sup>14</sup> From the present study, a direct effect of SR33805 on troponins or cross-bridge kinetics

cannot be excluded and has to be determined in future experiments. Tnl phosphorylation on PKA sites was increased in the MI myofilaments (Figure 4B), consistent with a hyperadrenergic state and the decrease of myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity observed in MI at this stage of HF.<sup>30</sup> During HF, the sympathetic nervous system activity increases in order to maintain an adequate heart output.<sup>31</sup> This process leads to increased  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation and PKA-mediated phosphorylation of several excitation-contraction coupling proteins.<sup>32–34</sup> In the advanced stage of HF, the increased sympathetic nervous system leads to a desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptors that induces down-regulation of the PKA signalling pathway (for review, see Hamdani et al.<sup>35</sup>). The SR33805 behaved as a  $\beta$ -blocker molecule by blocking PKA activity, which decreased Tnl phosphorylation on PKA sites and could explain part of the sensitization of the myofilaments to calcium.<sup>30</sup> The effect of SR33805 on Tnl is unique in the family of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers that are known to affect, for some of them, Tnl phosphorylation on PKA sites by the inhibition of phosphodiesterase activity.<sup>36,37</sup> In addition, recent publications showed that  $\text{P}^{21}$ -activated kinase-1 (Pak-1) activation can increase myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity via stimulation of the phosphatase PP2A that dephosphorylates Tnl.<sup>38,39</sup> Thus, the effect of the SR33805 on phosphatase activity remains to be determined and the possible involvement of Pak-1 should be considered. Nevertheless, the present data suggested a direct inhibition of (recombinant) PKA, which does not support the involvement of these pathways in the SR33805-mediated alterations.

Potential limitations should be acknowledged in this study. In particular, the effect of the SR33805 in human tissue with HF has not been tested here. In human failing heart, several studies have reported an increase in myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity associated with a decrease in PKA-dependent phosphorylation of Tnl that is due to the heavy medication of the patients in particular with  $\beta$ -blockers.<sup>40–42</sup> Considering that SR33805 affects the level of phosphorylation of several myofilament regulatory proteins, future tests on human tissue with HF should carefully take into account a possible interaction with the pharmacological treatments of the patients.

In summary, our findings show that acute treatment with SR33805 improved cardiac contractility of rat with HF in part by modulating the phosphorylation status of sarcomeric regulatory proteins, which then sensitized the myofilaments to  $\text{Ca}^{2+}$ . Further investigations need to be conducted in order to explore other cellular mechanisms, such as direct interaction of SR33805 with thin or thick filaments, and the relative contribution of the vascular and myocardial systems that may underlay the *in vivo* beneficial effect of the SR33805. Another interesting feature of SR33805 is its lack of deleterious effects on  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis such as increased  $\text{Ca}^{2+}$  release and/or delayed  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake. SR33805 might therefore be considered as a therapeutic tool for the management of acute or chronic failing hearts, in particular, those without  $\beta$ -blocker treatment.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgements

We thank Patrice Bideaux for his technical assistance. SR33805 was a kind gift from Dr P. Gautier (Sanofi-Synthelabo, Montpellier, France). A.L. and O.C. are scientists from the Centre National de Recherche Scientifique.

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by INSERM (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale) and by a research grant from the Franco-Hungarian Partenariat Hubert Curien Balaton program. Y.A.M. and P.d.T. were supported by NIH grant NIH HL62426.

## References

- Endoh M, Hori M. Acute heart failure: inotropic agents and their clinical uses. *Expert Opin Pharmacother* 2006;**7**:2179–2202.
- Endoh M. Mechanism of action of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers—update 2001. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;**15**:397–403.
- Sorsa T, Pollesello P, Solaro RJ. The contractile apparatus as a target for drugs against heart failure: interaction of levosimendan, a calcium sensitizer, with cardiac troponin c. *Mol Cell Biochem* 2004;**266**:87–107.
- Cazorla O, Lacampagne A, Fauconnier J, Vassort G. SR33805, a  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist with length-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  -sensitizing properties in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 2003;**139**:99–108.
- Chatelain P, Dewinkleer P, Beaufort P, Meysmans L, Clinet M. Characterization of the binding of [3H]SR 33805 to the slow  $\text{Ca}^{2+}$  channel in rat heart sarcolemmal membrane. *Eur J Pharmacol* 1994;**267**:151–160.
- Chatelain P, Clinet M, Polster P, Christophe B, Manning AS. *In vitro* characterization of a novel  $\text{Ca}^{2+}$  entry blocker: SR 33805. *Eur J Pharmacol* 1993;**246**:181–193.
- Ieiri S, Hirano K, Nishimura J, Suita S, Kanaide H. Alteration of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -force relationship during the vasorelaxation induced by a  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker SR33805 in the porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 2000;**131**:1597–1606.
- Kobayashi T, Solaro RJ. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu Rev Physiol* 2005;**67**:39–67.
- Ait Mou Y, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:555–564.
- Cazorla O, Szilagyi S, Le Guennec JY, Vassort G, Lacampagne A. Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J* 2005;**19**:88–90.
- Kobayashi T, Jin L, de Tombe PP. Cardiac thin filament regulation. *Pflügers Arch* 2008;**457**:37–46.
- Edes IF, Toth A, Csanyi G, Lomnicka M, Chlopicki S, Edes I et al. Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (Tgalphaq\*44). *J Mol Cell Cardiol* 2008;**45**:363–372.
- Zhang H, Chen X, Gao E, MacDonnell SM, Wang W, Kolpakov M et al. Increasing cardiac contractility after myocardial infarction exacerbates cardiac injury and pump dysfunction. *Circ Res* 2010;**107**:800–809.
- Endoh M. Cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers. *Circ J* 2008;**72**:1915–1925.
- Shioura KM, Farjah M, Geenen DL, Solaro RJ, Goldspink PH. Myofilament calcium sensitization delays decompensated hypertrophy differently between the sexes following myocardial infarction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;**300**:R361–R368.
- Romey G, Lazdunski M. Effects of a new class of calcium antagonists, SR33557 (fantomarone) and SR33805, on neuronal voltage-activated  $\text{Ca}^{++}$  channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;**271**:1348–1352.
- Bokenes J, Aronsen JM, Birkeland JA, Henriksen UL, Louch WE, Sjaastad I et al. Slow contractions characterize failing rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2008;**103**:328–344.
- Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between  $\text{K}^{+}$  channel down-regulation and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999;**517**(Pt 1):229–245.
- Lee JA, Allen DG. EMD 53998 sensitizes the contractile proteins to calcium in intact ferret ventricular muscle. *Circ Res* 1991;**69**:927–936.
- White J, Lee JA, Shah N, Orchard CH. Differential effects of the optical isomers of EMD 53998 on contraction and cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in isolated ferret cardiac muscle. *Circ Res* 1993;**73**:61–70.
- Hajjar RJ, Schmidt U, Helm P, Gwathmey JK.  $\text{Ca}^{++}$  sensitizers impair cardiac relaxation in failing human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;**280**:247–254.
- Solaro RJ, Gambassi G, Warshaw DM, Keller MR, Spurgeon HA, Beier N et al. Stereoselective actions of thiazidinones on canine cardiac myocytes and myofilaments. *Circ Res* 1993;**73**:981–990.
- Lehtonen LA. Levosimendan: a parenteral calcium-sensitising drug with additional vasodilatory properties. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;**10**:955–970.
- Masutani S, Cheng HJ, Hyttia-Hopponen M, Levijoki J, Heikkilä A, Vuorela A et al. Orally available levosimendan dose-related positive inotropic and lusitropic effect in conscious chronically instrumented normal and heart failure dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;**325**:236–247.
- Chan JY, Takeda M, Briggs LE, Graham ML, Lu JT, Horikoshi N et al. Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ Res* 2008;**102**:571–580.

26. Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gomez AM et al. 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**90**:118–135.
27. Arteaga GM, Palmiter KA, Leiden JM, Solaro RJ. Attenuation of length dependence of calcium activation in myofilaments of transgenic mouse hearts expressing slow skeletal troponin I. *J Physiol* 2000;**526**(Pt 3):541–549.
28. Pi Y, Zhang D, Kemnitz KR, Wang H, Walker JW. Protein kinase C and A sites on troponin I regulate myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and ATPase activity in the mouse myocardium. *J Physiol* 2003;**552**:845–857.
29. Morano I. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med* 1999;**77**:544–555.
30. Chandra M, Dong WJ, Pan BS, Cheung HC, Solaro RJ. Effects of protein kinase A phosphorylation on signaling between cardiac troponin I and the N-terminal domain of cardiac troponin C. *Biochemistry* 1997;**36**:13305–13311.
31. Landmesser U, Wollert KC, Drexler H. Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:519–527.
32. Bers DM. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res* 2002;**90**:14–17.
33. Kruger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil* 2006;**27**:435–444.
34. Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM. Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest* 1996;**98**:167–176.
35. Hamdani N, Kooij V, van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, Remedios CD et al. Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 2008;**77**:649–658.
36. Brixius K, Reicke S, Reuter H, Schwinger RH. Effects of the Ca<sup>2+</sup> sensitizers EMD 57033 and CGP 48506 on myocardial contractility and Ca<sup>2+</sup> transients in human ventricular and atrial myocardium. *Z Kardiol* 2002;**91**:312–318.
37. Kristof E, Szigeti G, Papp Z, Bodi A, Ball NA, Walsh RA et al. The effects of levosimendan on the left ventricular function and protein phosphorylation in post-ischemic guinea pig hearts. *Basic Res Cardiol* 1999;**94**:223–230.
38. Ke Y, Wang L, Pyle WG, de Tombe PP, Solaro RJ. Intracellular localization and functional effects of P21-activated kinase-1 (Pak1) in cardiac myocytes. *Circ Res* 2004;**94**:194–200.
39. Ke Y, Butt AG, Swart M, Liu YF, McDonald FJ. COMMD1 downregulates the epithelial sodium channel through Nedd4–2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;**298**:F1445–F1456.
40. Kaumann A, Bartel S, Molenaar P, Sanders L, Burrell K, Vetter D et al. Activation of beta2-adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C-protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure. *Circulation* 1999;**99**:65–72.
41. Marston SB, de Tombe PP. Troponin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup>-sensitivity in heart failure: increased or decreased?. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**45**:603–607.
42. Hamdani N, Paulus WJ, van Heerebeek L, Borbely A, Boontje NM, Zuidwijk MJ et al. Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. *Eur Heart J* 2009;**30**:1863–1872.