

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HUMÁN MYOCARDIÁLIS FEHÉRJÉK μ -CALPAIN-MEDIÁLT
PROTEOLÍZISÉNEK *IN VITRO* ELEMZÉSE**

Dr. Barta Judit

Témavezető:

Dr. Papp Zoltán

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
KARDIOLÓGIAI INTÉZET, KLINIKAI FIZIOLÓGIAI TANSZÉK

Debrecen

2004

Bevezetés

A calpainok és feltételezett szerepük a szívizomszövetben

A calpainok Ca^{2+} -aktivált intracelluláris neutrális proteolitikus enzimek. A legtöbb eukarióta sejtben megtalálhatók. A calpainok izomszövetben betöltött szerepe csak részben ismert. Feltételezhetően szerepük van az individuális fehérjék szöveti szintjének szabályozásában, az ischaemiás/reperfúziós szívizomkárosodás (myocardiális stunning) kialakulásában, a fehérjék metabolizmusában, így az izomszövet növekedésének, differenciálódásának és atrófiájának szabályozásában. A szívizomszövetben 2 szövet-specifikus calpain típus expresszálódik. Az egyik az u.n. μ -calpain vagy calpain-1, melynek aktiválódásához *in vitro* körülmények között μM -os koncentrációjú Ca^{2+} jelenléte szükséges. A másik calpain típus, az m-calpain aktiválódásához lényegesen magasabb, mM-os Ca^{2+} koncentrációt igényel. A calpainok intracelluláris aktiválódásának pontos mechanizmusa napjainkban még nem teljesen ismert, ugyanis a calpainok Ca^{2+} igénye magasabb, mint az élő sejtekben előforduló 50-300 nM. De úgy vélik, hogy a már aktiválódott μ -calpain működéséhez szükséges Ca^{2+} koncentráció a fiziológiás tartományba eshet. Az m-calpain aktiválódásához és működéséhez *in vitro* szükséges Ca^{2+} koncentráció a sejtek életképességével vélhetően összeegyeztethetetlen.

A μ -calpain alacsony intracelluláris Ca^{2+} koncentráció esetén inaktív formában myofibrilláris és citoszkeletális struktúrákhoz kötve van jelen a citoszolban, döntően a szarkomer Z-csíkokhoz asszociáltnak. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésekor az enzim a sejtmembránba transzlokálódik, majd egyes elképzelések szerint, intramolekuláris proteolízist követően válik aktívvá. A calpainok működését a Ca^{2+} -on és az autoproteolízisen kívül egyéb mechanizmusok is szabályozzák. Ilyen az endogén calpain inhibitor (calpastatin), mely feltehetően az enzim spontán aktiválódását képes gátolni, az enzim Ca^{2+} -érzékenységét szabályozó foszfolipidek és az endogén calpain aktivátorok. A calpainok proteolitikus aktivitásának jellegzetes tulajdonsága a sejt bizonyos fehérjeinek limitált hasítása, mely stabil, viszonylag nagy méretű fehérje fragmentumok keletkezését eredményezi. Ez nem annyira fehérje degradációs folyamatra, mint inkább posttranszlációs módosításra utal, ezért többen tekintik a μ -calpaint a sejt fehérje-metabolizmus szabályozójának (u.n. house-keeping enzim), mint degradatív enzimnek.

A familiáris hypertrophiás cardiomyopathia és a calpainok

A familiáris hypertrophiás cardiomyopathia (fHCM) kamrai hypertrophiával, a myofibrilláris fehérjék rendezetlenségével és fibrózissal jellemezhető örökletes megbetegedés, mely gyakran okoz hirtelen szívhalált. A betegséghez 9 gén eddig több mint 100 azonosított mutációja vezet, melyek kivétel nélkül a kontraktilis rendszer vékony és vastag filamentumainak valamely proteinjét érintik. Ezért az fHCM a szarkomer betegségének tekinthető, azonban a mutációk és az fHCM kialakulási mechanizmusa közötti kapcsolat nem tisztázott. Korábbi tanulmányokban igazolták, hogy a kórképben viszonylag gyakran következik be a troponin I (TnI) molekula szívspecifikus izoformáját (cTnI) kódoló gén mutációja. Nem ismert azonban, hogy a kontraktilis rendszer különböző szerkezetű és funkciójú fehérjeinek mutációi miért vezetnek a klinikai tünetek kialakulásához, továbbá a makroszkópikus és mikroszkópikus szerkezet tekintetében gyakorta hasonló klinikai megjelenéshez.

A cTnI fiziológias körülmények között a troponin C (cTnC) és troponin T (cTnT) fehérjékkel 1:1:1 arányú komplexet alkotva fordul elő. A cTnI molekula kulcsfontosságú szerepet tölt be a kontraktilis rendszer működésének troponin komplexen keresztül történő ki-be kapcsolásában. Ez annak köszönhető, hogy az intracelluláris Ca^{2+} függvényében cTnI különböző régiói ciklikus módon asszociálódnak és disszociálódnak az aktin és a miozin molekulákhoz. Ez a ciklus a vastag és vékony filamentumok egymáshoz viszonyított elmozdulását, végső soron az izom rövidülését és az erő kifejlődését eredményezi. A kontraktilis rendszer működésének kifejezett Ca^{2+} -függése szervesen kapcsolódik a cTnI molekula térbeli helyzetéhez.

cTnI szerkezetében bekövetkező legkisebb változás is a szívizom kontraktilitás-változását vonhatja maga után. Ilyen térszerkezet-változást hozhatnak létre például a cTnI molekula fHCM-asszociált mutációi. Ezért intenzív kutatás bontakozott ki azzal a céllal, hogy a cTnI mutációknak a szív pumpafunkciójára kifejtett hatásait minél pontosabban megérthessük. A cTnI-t érintő mutációk több esetben a molekula strukturálisan és funkcionálisan eltérő szereppel rendelkező régióit érintik, melyek különböző hatást gyakorolnak az erőgenerálás folyamatára, a TnC-hez történő kapcsolat jellegzetességeire és egyes esetekben a miozin ATP-áz aktivitására is. Ennek tükrében nehezen tűnik értelmezhetőnek, hogy miért alakulnak ki a hypertrophiás átépülés hasonló morfológiai variánsai a cTnI molekula egymástól távoli régióit érintő mutációk hatására. Így pl. az R145G mutáció, mely a cTnI centrális inhibitoros

doménjének struktúráját és funkcióját változtatja meg, valamint a C-terminális terminálshoz közeli K206Q mutáció egyaránt az fHCM klasszikus ún. „ventriculáris” típusú variánsát idézik elő, melyben az interventriculáris septum megvastagodása dominál. A C-terminálison található másik mutáció, a G203S viszont az fHCM „apicális” variánsát okozza. A cTnI különböző szakaszait károsító mutációk és azok myofibrilláris mechanikára kifejtett következményei tehát nem magyarázzák tökéletesen az fHCM morfológiai és klinikai jellegzetességeit.

Goll és mtsai rámutattak, hogy a calpainoknak szerepe van az izomszövet növekedésében, így valószínűsíthető, hogy a calpainok részt vesznek az izomfehérjék bontásának és felépítésének szabályozásában is, mely kóros esetben elvileg a myocardium izomfehérjék arányának eltolódásához, akár szívizom hypertrophiához is vezethet. Számos adat van arra vonatkozóan, hogy a vad típusú (WT) cTnI a μ -calpainnak jó szubsztrátja. A cTnI molekula primer aminosav-szekvenciájában bekövetkező fHCM-asszociált mutációk azonban felboríthatják a cTnI μ -calpain-regulált turnoverét. A cTnI csökkent μ -calpain-mediált degradációja a fehérjék intracelluláris akkumulációjához és hypertrophiás cardiomyopathiához vezethet.

A proteinkináz-A-mediált cTnI foszforiláció és következményei

A troponinok funkciójának finom hangolása fehérje-foszforilációs/defoszforilációs folyamatok útján történik, mely szintén szoros összefüggésben van a molekula szerkezetével. A cTnI intracelluláris foszforilációját a proteinkináz-A (PKA) katalizálja. A molekula két funkcionális szempontból jelentős PKA foszforilációs hellyel rendelkezik, a Ser-22 és Ser-23 pozícióban. A molekula a két foszforilációs hely miatt három különböző foszforilációs állapotban: defoszforilált, monofoszforilált és biszfoszforilált formában fordulhat elő a szívizomban. Ezen formák egymáshoz viszonyított aránya a β -adrenerg rendszer aktuális aktiváltsági szintjétől függ. A molekula PKA-mediált foszforilációja a kontraktilis rendszer csökkent Ca^{2+} -érzékenységéhez vezet, azonban ehhez mind a két foszforilációs hely egyidejű foszforilációja szükséges. A cTnI foszforiláció elősegíti a myocardium relaxációját, mert ilyenkor a cTnC Ca^{2+} -affinitása csökken, ami a Ca^{2+} gyorsabb disszociációját teszi lehetővé. A PKA ugyanakkor foszforilálja a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} pumpáját szabályozó fehérjét, a foszfolambánt (PL) is, ami a Ca^{2+} citoplazmából való gyorsabb szekvesztrációjához vezet. A fokozott luzitropia hajlam különösen jótékony β -adrenerg

stimuláció során, mert az kompenzálni igyekszik a szívfrekvencia-emelkedés kedvezőtlen hatásait.

A tapasztalatok azt mutatják, hogy a szívelégtelenségben szenvedő (New York Heart Association(NYHA) osztály III-IV.), rossz bal kamara funkcióval rendelkező myocardium esendőbb a myocardialis stunning során, mint az egészséges, vagy kevésbé beteg szívek. Ennek egyik lehetséges magyarázata az egészséges és a beteg myocardium fehérjéinek PKA-mediált foszforilációs szintjében levő különbség. Szívelégtelenségben ugyanis a β -adrenerg rendszer down-regulációja miatt bizonyos fehérjék, pl. a cTnI és a PL PKA foszforilációs szintje csökken. Egészséges myocardiumban irodalmi adatok szerint hozzávetőlegesen 84%, míg szívelégtelenségből származó mintákban csak 56% a cTnI foszforilációs szintje. A cTnI szívelégtelenségben tapasztalt csökkent foszforilációs szintje a myofibrilláris rendszer emelkedett Ca^{2+} -érzékenységéhez vezet. A megváltozott foszforilációs szint érinti a cTnI molekula töltését, konformációját, a troponin komplexen belül elfoglalt helyzetét. Defoszforilált cTnI esetén a Ca^{2+} -kötött, nyitottabb konformáció, foszforiláció során a Ca^{2+} -disszociáciált, zártabb konformáció stabilitása fokozódik. Felmerült, hogy a cTnI foszforiláció-függő konformáció-változásával módosulhat a molekulák hozzáférhetősége a proteolitikus enzimek, mint pl. a μ -calpain számára is. Defoszforilált esetben a molekula esendőbbé válik a calpain hasítás iránt. Közvetetten ezt támasztják alá a cTnI molekulák PKA-mediált foszforilációs és β -adrenerg stimulációs vizsgálatai is, mely esetekben a foszforiláció eredményeként a cTnI csökkent μ -calpain hasíthatóságát észlelték.

A reverzibilis ischaemiás/reperfúziós myocardium károsodás kialakulásának feltételezett mechanizmusa – calpain teória

A myocardium akut ischaemia/reperfúziója során a szívizom pumpafunkciója rendszerint romlik. A kialakuló kontraktilitás diszfunkció hátterében a szívizomsejtek anyagcseréjében és Ca^{2+} homeosztázisában bekövetkező változások keresendők. Ischaemia alatt az energiafelhasználás meghaladja az aktuális energiatermelést. Ennek következtében a szívizomzat leginkább energiaigényes funkciói szenvednek zavart, mint pl. a Ca^{2+} homeostasis, így az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése következik be. Amennyiben az ischaemiát okozó érelzáródás megszűnik, megindulhat a reperfúzió, melynek során az extracelluláris pH és az oxigénellátás hamar normalizálódik, ez azonban paradox módon

átmenetileg növeli a szívműködő sejtek intracelluláris Ca^{2+} -telítettségét. Az ischaemiássá tett myocardium reoxigenizációja másrészt intenzív oxidatív szabadgyök-képzést is indukál, mely a magas Ca^{2+} koncentrációval jellemzett tereket elválasztó membránrendszerek károsításával járul hozzá a szívműködő sejtek belső terében a Ca^{2+} koncentráció fokozódásához. A fentiek alapján késő ischaemia és korai reperfüzió során a Ca^{2+} -túltelítettség kialakulásával egyaránt számolni kell, melynek szerepe lehet az ischaemiás/reperfüziós myocardium-károsodás létrejöttében. A 10–20 percet meg nem haladó teljes vérellátási hiány még reverzibilis, úgynevezett myocardialis kábulatot („stunning”) idézhet elő. Ezekben az esetekben a vérkeringés helyreállítását követően 15-20 perc alatt bekövetkezik a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció normalizálódása. A myocardium egyértelműen életképes, nekrozistól mentes marad, ennek ellenére a szívműködő kontraktilitása rövidebb-hosszabb ideig (órák-napok) továbbra is károsodott lehet. Ez az úgynevezett „myocardialis stunning” klasszikus megjelenése. Ez az úgynevezett „myocardialis stunning” klasszikus megjelenése.

A napjainkban leginkább elfogadott álláspont szerint a reverzibilisen csökkent myocardialis pumpafunkció magyarázata a károsodott kontraktilis fehérjerendszer csökkent Ca^{2+} -reaktivitása. E jelenség hátterében akut ultrastrukturális károsodások keresendők, melyek intracelluláris fehérjéket érintenek. A fehérjekárosodások létrejöttében egy Ca^{2+} -függő proteolitikus folyamat szerepe bizonyítottan látszik. Specifikus proteáz inhibitorokkal végzett kísérletek alapján a proteolízis a már említett neutrális intracelluláris proteázhoz, a μ -calpainhoz kapcsolható. Az enzim aktiválódását a késő ischaemia és korai reperfüzió során kialakuló Ca^{2+} -túltöltődés triggereli és ez indítja be a proteolitikus változásokat. A károsodott fehérjék cseréje illetve újrasszintetizálása időt igényel, ez magyarázná az órákig - napokig tartó funkcionális zavart. Arra vonatkozólag nem rendelkezünk abszolút érvényű bizonyítékokkal, hogy a Ca^{2+} -mediált proteolízist más mechanizmusok (pl. reaktív oxigén és nitrogén intermedierek) milyen mértékben egészítik ki. A legújabb vizsgálati eredmények alapján az is felmerült, hogy a proteolitikus aktivitáshoz a szabadgyökök által aktivált matrix metalloproteináz-2 enzim (MMP-2) működése is hozzájárulhat.

Ezen proteolitikus hatások kapcsán legtöbb figyelmet a myofilamentumot alkotó fehérjék lehetséges károsodásai kaptak. Viszonylag korán leírták a troponin-komplex inhibitoros, cTnI alegységének μ -calpain-mediálta ischaemiás/reperfüziós degradációját, ezáltal sokáig a cTnI-t tették felelőssé a stunning kialakulásáért. Így nem meglepő, hogy a

legtöbb adat a cTnI-ra vonatkozóan található. Állatkísérletes modelleken közvetetten igazolták, hogy az ischaemiás/reperfúziós anyagcserezavar kapcsán a μ -calpain egy 17 aminosavból álló polipeptid egységet hasít le a cTnI C-terminusáról. Azokban a transzgenikus egereken végzett kísérletekben, ahol a cTnI így megrövidített változatát expresszálták (cTnI₁₋₁₉₃), valóban sikerült kimutatni a szív csökkent pumpafunkciója és a cTnI-degradáció közötti kapcsolatot. Postischaemiás szívizommintákkal végzett biokémiai meghatározások során azt is felismerték, hogy a cTnI bomlása a C-terminális 17 polipeptidből álló szekvenciájának leválása után is folytatódik. A második hasítási hely a cTnI N-terminálisától számított 63., a harmadik a 73. aminosavnál valószínűsíthető. A cTnI proteolízise a szívizom károsodott relaxációs képességéhez vezet, ami a stunning egyik karakterisztikus jellemzője, alátámasztva, hogy a cTnI degradáció fontos szereplője a myocardialis stunningnak. Azonban nagytestű állatokon nem sikerült igazolni az említett fehérje postischaemiás károsodását.

In vitro adat van arra vonatkozóan, hogy regulatórikus a cTnT, a troponin komplex tropomiozint kötő tagja is bomlik μ -calpain hatására, és ez a degradáció az aktin-miozin interakció megváltozásához vezet. Bonyolíthatja a képet, hogy a cTnI és cTnT molekulákból lehasadó degradációs termékeket transzglutamináz aktivitású enzimek más myofibrilláris fehérjékhez kapcsolhatnak. Ilyen kovalens komplexeket a TnI hasításából keletkező degradált proteinek vonatkozásában is azonosítottak. A humán myocardium ischaemiás károsodásának diagnosztikájában a troponin komplex (elsősorban a cTnI és a cTnT) bomlástermékeinek vérplazmában történő felismerése jelenleg központi helyen szerepel. Mindezek alapján a kábult myocardium a kontraktilis fehérjék regulációs folyamatainak izolált károsodása következtében alakulna ki.

Kevésbé elképzelhető azonban, hogy a μ -calpain, amely úgy hívta fel magára a figyelmet, mint egy proteáz, amely vázizom struktúr fehérjék dagradációját végzi, a szívizomban egyedül a regulatórikus cTnI és esetleg a cTnT bontására lenne képes. Az igen szelektív enzimhatás azért is valószínűtlen, mert a μ -calpain nem rendelkezik szigorú szekvencia-specifitással, bár „előnyben részesíti” a nagy hidrofób oldalláncokat (Leu, Val). Az enzim inkább a szubsztrátok magasabb rendű struktúráit ismeri fel és azonosítja hasítási helyként. Vázizom-preparátumokat használó kísérletekben calpain-kezelés hatására a harántcsíkolt struktúra jellegzetes változása következett be, mely alapul szolgált az

enzimhatás élettani működésének feltárásához is. Az enzim a titin és a nebulin (vázizomban nebulin) struktúrfehérjéket gyorsan hasítja, ezáltal zavart szenved egyéb fehérjék szarkomerben való rögzítettsége is. Károsodik továbbá a dezmin és kötött állapotából kiszabadul esetleg el is hasad az α -aktitin. Tovább lazulnak a fehérjék közötti kapcsolatok, kiszabadul és hasad cTnT, a cTnI, a cTm és a C protein. Ez a folyamat végül a Z-csík teljes eltűnéséhez vezet. Miután a calpain kiszabadította a fehérjéket a filamentámentáris rendszerből és nagy fragmentumokká hasította („előhasította”) őket, más proteázok (proteosome, katepszinek, peptidázok) tehetik teljessé a fehérje lebomlást.

Figyelemre méltó, hogy számos eredmény került közlésre annak alátámasztására is, hogy a kábult myocardium pathogenezisében a szívizomsejteket érő strukturális károsodás is szerepet kap. E megközelítés szerint az egyes strukturális és myofibrilláris funkciókkal bíró fehérjék proteolízise vagy akár csak kiszabadulása a szigorú szabályok szerint felépített filamentáris rendszerből megbontja a Z-csík egységét, ami elsősorban a struktúra károsodása miatt vezet jelentős kontraktilitás-diszfunkcióhoz.

A degradációs folyamatban feltehetően érintett struktúrfehérjék között szerepel többek között a titin óriásfehérje (más néven connectin), az α -fodrin, a dezmin és az α -aktinin, melyekről egyre több információval rendelkezünk.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy jelenleg még nincs egyetértés abban, hogy: (1) melyek a stunninghoz kötött proteolízis által elsősorban károsított fehérjestruktúrák, (2) ezek milyen módon viszonyulnak a megváltozott myofibrilláris funkcióhoz, (3) az eddigi állatkísérletekből feltárt összefüggések milyen mértékben vonatkoztathatók a humán szívizomzat ischaemiás/reperfúziós károsodására.

Célkitűzések

In vitro kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Rekombináns cTnI molekulák fHCM-specifikus pontmutációi következtében (R145G, G203S és K206Q) változik-e a cTnI molekulák calpain-hasíthatósága?
2. Különböznek-e az izoláltan és a troponin komplexben levő mutáns cTnI molekulák μ -calpain-hasíthatóság szempontjából?
3. Hatással van-e a PKA-mediált biszfoszforiláció a mutáns cTnI molekulák μ -calpain-hasíthatóságára?
4. Magyarázatul szolgálhat-e a familiáris hypertrophiás cardiomyopathiában tapasztalható morfológiai és funkcionális változásokra a cTnI mutációk és a μ -calpain-hasíthatóság közti kapcsolat?
5. Van-e különbség a dilatatív cardiomyopathiás (NYHA III-IV.) és a donor szívek cTnI molekuláinak foszforilációs szintjében? Hatással van-e ez a molekulák μ -calpain-hasíthatóságára?
6. A cTnI-n kívül vannak-e más μ -calpain-érzékeny fehérjék a humán myocardium regulatórikus és strukturális myofibrilláris fehérjéi között? Van-e különbség ezen fehérjék egymáshoz viszonyított μ -calpain-érzékenységekben?
7. A myocardiális stunninggal kapcsolatos eddigi állatkísérletes adatok milyen mértékben mutatnak kapcsolatot a humán myofibrilláris fehérjék *in vitro* μ -calpain emésztése során szerzett ismeretekkel?
8. Milyen proteolitikus változások valószínűsíthetők a szabályozatlanná váló μ -calpain működés következtében a humán myocardiumban?

Anyagok és Módszerek

Tisztított cTnI molekulák

Kísérleteinket a Bochumi Egyetemen molekuláris biológiai módszerekkel előállított, rekombináns cTnI molekulák felhasználásával végeztük. Négyféle cTnI molekula állt rendelkezésünkre: a vad típusú (WT) és 3 fHCM-asszociált mutáns forma. A vad típusú az egészséges emberek szívében előforduló cTnI-nak felelt meg. A „missense” mutációk a cTnI molekulát a 145-ös, 203-as és 206-os aminosav pozíciókban érintették. Jelölésük ennek és a kialakult aminosav cseréknek megfelelően: R145G, G203S és K206Q. A molekulák expressziója és tisztítása Deng és mtsai valamint Reiffert és mtsai leírása szerint történt.

A humán szívizom-specifikus troponin komplexek képzéséhez cTnT és cTnC molekulákat összekeverték WT vagy mutáns cTnI molekulával (R145G, G203S, K206Q) 1:1:1 mól arányban 6 M ureát tartalmazó pufferben. Ezt csökkenő urea koncentrációjú pufferben végzett dialízisek követték. A troponin komplex képződés hatékonyságát analitikai gélfiltrációval ellenőrizték.

A WT és a mutáns cTnI molekulákat a PKA katalitikus alegységével a Ser-22 és Ser-23 pozícióknak megfelelően Deng és mtsai leírása szerint foszforilálták. A cTnI molekulák foszforilációs szintjét izoelektromos fókuszálással rutinszerűen ellenőrizték. Kísérleteinkhez csak azokat a mintákat használtuk, amelyek nem tartalmaztak defoszforilált molekulákat és a monofoszforilált molekulák aránya 10 % vagy az alatt maradt, a biszfoszforilált molekulák aránya pedig elérte a 90 %-ot.

Szövetminták

A kamrai szövetmintákat humán bal kamrai területekről nyertük. 2 minta dilatív cardiomyopathiában szenvedő, Battista műtéten átesett betegből (NYHA III-IV.), 3 további minta technikai okok miatt transzplantációra fel nem használt egészséges donor szívekből származott. A biopsziás anyagok mintavétel után azonnal folyékony nitrogénbe kerültek és azokat további felhasználásig -80°C tároltuk. A vizsgálatok a helyi Etikai Bizottság jóváhagyásával történtek.

μ-calpain-mediált in vitro proteolízis

A tisztított humán defoszforilált és PKA biszfoszforilált cTnI molekulákat (3 μg az izolált WT és mutáns cTnI molekulákból, 10 μg a troponin komplexekből) 30 °C-on 100 μl ösztérfogatban Ca^{2+} tartalmú imidazol pufferben inkubáltuk, pH 7,5. A proteolízis elindítása 0,05, 0,1 0,5, 1 illetve 2,5 U μ-calpain (Calbiochem) reakcióelegyhez való hozzáadásával történt. A reakció kinetikájának megállapításához a proteolízis 0,5, 30, 60 és 120 percét követően mintákat vettünk és a mintákat azonos térfogatú 2x töménységű SDS mintapufferben 100 °C-on 5 percig főztük. Kontrollként Calpain Inhibitor I (0,3 mM, Calbiochem) jelenlétében illetve Ca^{2+} nélkül végzett inkubációk szolgáltak.

A kb. 1 g tömegű szívizom mintákat lehűtött dörzscsészében folyékony nitrogén jelenlétében porítottuk, majd jégen tartva Ca^{2+} -mentes imidazol pufferben reszuspendáltuk és mechanikus potter segítségével homogenizáltuk. Minden reakció elegy tartalmazott Phosphatase Inhibitor Coctail I-et (1 μl/500 μg fehérje; Sigma). A homogenizátumok fehérje koncentrációját Bradford módszer szerint határoztuk meg. A mintákat további felhasználásig jégen tároltuk. 600 μg összfehérjét tartalmazó Ca^{2+} -mentes homogenizátumokat rendszerint 30 °C-on 3 mM CaCl_2 hozzáadásával 200 μl ösztérfogatban inkubáltuk. A proteolízis indukálása 1 U vagy 5 U μ-calpain (Calbiochem) reakcióelegyhez való hozzáadásával történt. 0,5, 15, 30, 60 illetve 120 percet követően mintát vettünk és a mintákat azonos térfogatú 2x töménységű SDS mintapufferben 100 °C-on 3 percig szolubilizáltuk. Kontrollként Calpain Inhibitor I (0,3 mM, Calbiochem) jelenlétében illetve Ca^{2+} nélkül végzett inkubációk szolgáltak. A μ-calpain-mentes, de Ca^{2+} -ot tartalmazó közegben végzett inkubációk a minták endogén proteolitikus aktivitásáról való tájékozódást szolgálták.

Egy-dimenziós gélelektroforézis

A μ-calpain homogenizátumokon kifejtett proteolitikus hatásának áttekintő értékeléséhez fedőgél-mentes szeparálógéleken 6-18 % koncentráció tartományban egy-dimenziós folyamatos gradiens szukróz-SDS-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk (összfehérje: 30 μg/sáv, készülék: Protean II xi, Bio-Rad). A célzott fehérje analízishez különböző koncentrációjú SDS-poliakrilamid géleken (Mini Protean II, Bio-Rad) Laemmli protokoll szerint, titin esetében fedő gél nélkül, a többi fehérje esetében fedő gél alkalmazásával azonos fehérje mennyiséget tartalmazó homogenizátumokat szeparáltunk.

Ezüstfestés

A fehérjemintázatot a homogenizátumok esetén ezüstfestéssel tettük láthatóvá, melyet Giulian és mtsai ajánlása szerint végeztünk. A fehérjék molekulatömegének meghatározása Silver Standard (Bio-Rad) segítségével történt, kivéve a titint és degradációs termékeit, mert azok molekulatömegét csak becsülni állt módunkban.

Western immunoblot

A homogenizátumok célzott fehérjeinek és a tisztított cTnI molekulák azonosítására Western immunoblot technikát alkalmaztuk. Első lépésként az SDS-PAGE-el elválasztott fehérjéket nedves transzferrel (Bio-Rad) nitrocellulóz membránra vittük át. A membránok 5 %-os sovány tejporos TTBS-ben történt blokkolását követően azokat először egérben termeltetett primer monoklonális antitestet (anti-titin, anti- α -fodrin, anti- α -aktinin, anti-dezmin, anti-TnT, anti-cTnI) tartalmazó 1 % tejporos TTBS-ben inkubáltuk. Ezt követően peroxidáz-konjugált szekunder antitestet tartalmazó 1 % tejporos TTBS-ben. A jelölődött molekulákat röntgen filmen felerősített kemilumineszcencia (ECL) módszerrel tettük láthatóvá. A fehérjék molekulatömegének meghatározása Prestained Standard (Bio-Rad) segítségével történt.

A cTnI foszforilációs szintjének meghatározása

Minden mintából (3 donor és 2 DCM) azonos mennyiségű fehérjét szeparáltunk 15%-os SDS-poliakrilamid géleken és összes cTnI- és defoszforilált cTnI-specifikus antitesttel Western immunoblottot végeztünk. A foszforilált cTnI-t, mely az összes és a defoszforilált cTnI közötti optikai denzitások különbségét reprezentálja, az összes cTnI arányában százalékosan fejeztük ki.

Eredmények értékelése/statisztika

Az ezüstfestés és a Western immunoblot során kapott képeket személyi számítógéphez illesztett scanner segítségével digitalizáltuk, majd az így kapott képeket denzitometriásan, egyedi fejlesztésű szoftver segítségével értékeltük.

Tisztított cTnI molekulák esetén a fehérje degradációt a 31 kDa molekulatömegű, bomlatlan cTnI-hez tartozó denzitás kontrollhoz viszonyított csökkenésén keresztül ítéltük meg. Az eredményeket 4-10 független kísérlet elvégzése alapján kvantitáltuk.

Homogenizátumok esetén a fehérjedegradáció mértékét az intakt molekulák enzimaktivitás- és időfüggő csökkenésén/eltűnésén keresztül illetve a degradációs termékek megjelenése alapján ítéltük meg. Adott μ -calpain aktivitás mellett a gyorsabban degradálódó fehérjéket tekintettük μ -calpain-érzékenyebbnek a lassabban degradálódóval szemben. A homogenizátumokon minden kísérletes körülmény esetén legalább 3 független kísérletet végeztünk. Az általunk hozzáadott μ -calpain jelenlétében kapott protein degradáció eredményét nem korrigáltuk az endogén Ca^{2+} -függő proteolízisre.

Az értékeket átlag $\pm$ S.E.M. formában fejeztük ki. A különbségeket a Student-féle *t*-próba segítségével $P < 0,05$ -es szignifikancia szint mellett tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Annak eldöntésére, hogy a mutáns cTnI fehérjék megváltozott μ -calpain-érzékenysége felelős lehet-e az fHCM kialakulásáért, összehasonlítottuk a rekombináns WT és 3 fHCM-ben azonosított mutáns cTnI (G203S, K206Q, R145G) μ -calpain-hasíthatóságát. Kísérleteinkhez két különböző μ -calpain enzimaktivitást választottunk, melyek közül a nagyobb (1 U) a WT cTnI teljes, a kisebb (0,25 U) parciális degradációját okozta. Ca^{2+} -mentes reakcióközegben (kontroll) és 0,3 mM Calpain Inhibitor I jelenlétében végzett inkubációk során bizonyosodtunk meg arról, hogy a cTnI bomlás egyértelműen a μ -calpain működéséhez rendelhető.

1 U μ -calpain proteolitikus hatása WT és mutáns cTnI molekulákon

Az 1 U μ -calpain aktivitás annak megítélésében segített, hogy valamely cTnI molekula mutat-e abszolút rezisztenciát a μ -calpain-mediált degradációval szemben. A 31 kDa-os defoszforilált natív cTnI csíkok gyors és egyöntetű eltűnése (az izolált és a komplexben levő WT és mutáns - R145G, G203S és K206Q cTnI molekulák esetében egyaránt) arra hívta fel a figyelmet, hogy az fHCM-hez kapcsolt cTnI mutációk nem eredményeznek védelmet a μ -calpain-mediált proteolízissel szemben. A natív fehérje gyorsütemű degradációja és a véletlenszerűen és halványan feltűnő 26 kDa-os degradációs termék nem volt alkalmas a különböző cTnI szekvenciák között levő esetleges különbségek vizsgálatára. A

biszfoszforilált cTnI molekulák 31 kDa-os specifikus csíkjai azonos kísérletes körülmények között az inkubáció teljes időtartama alatt részlegesen megőrződtek. Azaz a Ser-22 és Ser-23 foszforilációja részlegesen meggátolta az 1 U μ -calpain proteolitikus hatását a WT és a mutáns cTnI molekuláknál egyaránt.

0,25 U μ -calpain proteolitikus hatása WT és mutáns cTnI molekulákon

A 0,25 U enzimaktivitás mellett végzett inkubációk a cTnI degradációk (izoláltan és troponin komplexben levő WT és mutáns cTnI molekulák) közötti finomabb különbségeket segítettek felismerni. Az így végrehajtott emésztések során a cTnI molekulák 30 perccel a proteolízis kezdetét követően nem bomlottak le teljesen. Ez lehetőséget adott a bomlatlan cTnI relatív mennyiségének becslésére és a különböző cTnI molekulák bomlásra való érzékenységének összehasonlítására. A különböző cTnI típusok emésztésének összehasonlítása minden egyes mintánál a 30 perces inkubációhoz tartozó natív (31 kDa) cTnI sáv intenzitásának a 0,5 perces inkubáció eredményéhez viszonyított intenzitás csökkenése alapján történt. A 30 perces 0,25 U μ -calpain jelenlétében végzett emésztés során az intakt molekulák szintje izolált WT, R145G, G203S és K206Q mutáns cTnI esetén rendre $22 \pm 9 \%$, $27 \pm 10 \%$, $25 \pm 7 \%$ és $45 \pm 6 \%$ -nak adódott, szemben a komplexben levő cTnI molekulákkal, ahol ezek az értékek szignifikánsan magasabbak voltak ($P < 0,05$): $87 \pm 13 \%$, $89 \pm 8 \%$, $75 \pm 5 \%$ és $82 \pm 10 \%$. A számokból kitűnik, hogy a komplexben található cTnI fehérjéket a μ -calpain kevésbé bontotta, mint az izolált molekulákat. Azonban az azonos csoportban levő különböző cTnI molekulákat összehasonlítva nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni az egyes cTnI molekula típusok relatív mennyiségében ($P > 0,05$). Ezért megállapíthatjuk, hogy az fHCM-hez asszociált cTnI gént érintő mutációk nem befolyásolták az expresszálandó fehérjék μ -calpain-érzékenységét.

A donor és a DCM-ás szívminták cTnI molekuláinak PKA-függő foszforilációs szintjében levő különbségek és hatásuk a μ -calpain-indukált proteolízisre

Kíváncsiak voltunk, hogy a szívelégtelenségben szenvedő betegeink szívmintáiban csökken-e a cTnI molekulák PKA foszforilációs szintje. Az egyes minták (DCM-ás és donor) foszforilációs szintjét indirekt módszerrel határoztuk meg. cTnI foszforilációs állapotra nem érzékeny primer antitesttel (clone 16A11) végzett Western immunoblot alapján a

homogenizátumok összes cTnI tartalma hasonló volt mind az 5 különböző szívből származó minta esetén. Azonban a defoszforilált cTnI (Ser-22/Ser-23)-specifikus primer antitesttel (clone 22B11) végzett Western immunoblot lényegesen intenzívebb jelet adott a dilatált cardiomyopathiás szívminták, mint a donor minták esetén. A DCM-ás illetve a donor szívminták cTnI molekuláinak foszforilációs szintje $37 \pm 7 \%$ és $62,5 \pm 2 \%$ ($P < 0,05$)-nak adódott. A cTnI foszforilációs szintben mutatkozó különbség ellenére azonban nem találtunk lényeges különbséget a donor és dilatált szívek cTnI degradációjában.

A μ -calpain proteolitikus hatása bal kamrai szövethomogenizátumon

A μ -calpain humán myofibrilláris fehérjéket érintő általános proteolitikus hatásairól kamrai homogenizátumokon végzett emésztéssel tájékozódunk. A homogenizátumok Ca^{2+} -mentes kontroll fehérjemintázatát összehasonlítva a 120 percig 5 U μ -calpain jelenlétében inkubált homogenizátum fehérjemintázatával ezüstoffestett gradiens SDS-poliakrilamid géleken, 12 különböző fehérje pozícióban jelentős intenzitás-csökkenést észleltünk. Némely eltérés olyan molekulatömeg tartományban jelentkezett, mely hasonló a korábbi adatok alapján a myocardium postischaeмиás károsodásában feltehetően szerepet játszó myofibrilláris fehérjék molekulatömegéhez. Ez a megfigyelés arra inspirált bennünket, hogy részletesebben megvizsgáljuk, valyon az észlelt proteolitikus változások valóban egy sor myofibrilláris fehérje - titin, α -fodrin, α -aktinin, dezmin, cTnT and cTnI - μ -calpain-mediált proteolízisét érintik-e. Az említett fehérjék degradációját célzottan Western immunoblot vagy ezüstoffestett SDS-poliakrilamid gél analízissel μ -calpain-érzékenységük összehasonlítása végett tovább vizsgáltuk.

Kicsi és nagy μ -calpain aktivitás hatására bekövetkező proteolitikus változások a myofibrilláris fehérjék szerkezetében

A nagy (5 U) μ -calpain aktivitás mellett végzett inkubáció eredménye azt mutatta, hogy az összes általunk vizsgált fehérjét képes hasítani a μ -calpain. A titin degradációját Western immunoblottal végzett azonosítást követően ezüsttel festett SDS géleken vizsgáltuk. A titin nagyon érzékenynek bizonyult a proteolízis során. A μ -calpain ennek az óriás struktúrfehérjének mindkét izoformáját (N2B $\approx$ 3000 kDa és N2BA $\approx$ 3300 kDa) hasította és a kb. 3000 kDa – 1700 kDa molekulatömeg közti tartományban aktivitástól függően legalább 7

degradációs termék megjelenését eredményezte. Mindkét natív izoforma 1 U μ -calpain hatására már az inkubáció első 15 percében teljesen elhasadt. A nagyobb μ -calpain aktivitás (5 U) pedig tovább fokozta a titin degradációt és számos degradációs terméket eredményezett. Az α -fodrin struktúrfehérje szintén jelentős μ -calpain-érzékenységet mutatott. A Western immunoblot assay-ken az intakt α -fodrin molekula (≈ 284 kDa) a kisebb μ -calpain aktivitás (1 U) mellett gyorsan elhasadt. Sőt, első degradációs terméke (≈ 164 kDa) már az inkubáció kezdetén megjelent, és a titinhez hasonlóan a natív molekula is 15 perc inkubáció után eltűnt. 5 U μ -calpain jelenlétében egy második hasítási termék is megjelent (≈ 30 kDa magasságában). A μ -calpain a Z-csíkok nélkülözhetetlen struktúrfehérjéjét, a dezmin (≈ 64 kDa) is jelentősen károsította. Azonban az intakt molekula eltűnése lassabban következett be, mint azt a titin vagy az α -fodrin esetében láttuk. Habár számos dezmin degradációs termék ($\approx 54, 52, 45, 44, 41, 39$ és 37 kDa) az inkubáció kezdetén gyorsan feltűnt, kisebb (1 U) μ -calpain aktivitás esetén az intakt fehérje még 120 perces inkubációt követően is detektálható maradt. A nagyobb μ -calpain aktivitás (5 U), ellenben az intakt molekulák mennyiségének drámai csökkenéséhez vezetett és gyorsan eliminálta az intermediér degradációs termékeket, további lebomlási lépésekre utalva. A cTnT (≈ 44 kDa) szintén közepes μ -calpain érzékenységet mutatott. A natív molekula és egyetlen degradációs terméke (≈ 33 kDa) a kisebb μ -calpain aktivitás (1 U) mellett végzett emésztés során végig detektálható volt. Nagyobb μ -calpain aktivitás (5 U) esetén viszont a degradációs termék nagyobb mennyiségben volt jelen és a natív cTnT molekula gyorsan eltűnt. Hasonló kísérletes körülmények között a cTnI (31 kDa) egyértelműen észrevehető, de kevésbé intenzív degradáción ment keresztül az eddig említett fehérjékhez képest. Habár számos cTnI-immunspecifikus degradációs termék ($\approx 28, 27, 26, 23, 19, 18, 16$ és 13 kDa) jelent meg a μ -calpainnal végzett inkubáció során, a 120 perces inkubációs periódus végére még a nagyobb enzim aktivitás (5 U) sem eredményezte a natív molekula teljes eltűnését. Az α -aktinin (≈ 115 kDa), a Z-csík aktin-kötő struktúr fehérjéje bizonyult a legkevésbé érzékenynek a μ -calpain-indukált emésztések során. 1 U enzimaktivitás mellett nem volt jelentős fehérjedegradáció, viszont az 5 U μ -calpain jelenlétében újonnan megjelenő fehérjecsík pár (≈ 116 kDa és ≈ 112 kDa) egyértelműen jelezte a fehérje μ -calpain-mediált hasítását egyértelműen jelezte a fehérje μ -calpain-mediált hasítását.

Az 5 különböző szívizom mintán végzett emésztések eredményeit összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbségeket az egyes minták vizsgált fehérjéinek proteolitikus mintázatában.

Endogén Ca^{2+} -függő proteolitikus aktivitás a szívizom mintákban

Összehasonlítottuk a homogenizátumok endogén Ca^{2+} -függő proteolitikus aktivitásának eredményét az *in vitro* μ -calpain-indukált proteolízissel. Az endogén proteolitikus aktivitást úgy vizsgáltuk, hogy a homogenizátumokat Ca^{2+} jelenlétében, de kívülről hozzáadott μ -calpain nélkül inkubáltuk 120 percig. A Western immunoblottok eredményei azt mutatták, hogy a titin, α -fodrin, dezmin, cTnI és cTnT kívülről hozzáadott μ -calpain nélkül is részleges proteolízisen ment keresztül: erre utalt a nagyobbik titin izoforma eltűnése, az α -fodrin egyik, valamint a dezmin és a cTnI számos immunreaktív degradációs termékének detektálhatósága, és az intakt cTnT jelintenzitás-csökkenése. Az α -aktinin esetében nem figyeltünk meg spontán degradációt. A különböző fehérjéknél észlelt autodegradáció mértéke általában az intakt molekulák kevesebb, mint 5 %-t jelentette (a titint kivéve). Az előbb említett autoproteolitikus fragmentumok molekulatömegeit összehasonlítva a μ -calpain-mediált degradáció során keletkező hasítási termékek molekulatömegével megfigyeltük, hogy bizonyos α -fodrin, dezmin és cTnI fragmentumok molekulatömege a két esetben hozzávetőlegesen megegyezik. Ez felveti, hogy az endogén Ca^{2+} -függő proteolitikus aktivitás részben a calpainoknak tulajdonítható.

Megbeszélés

Kísérleteink során egy intracelluláris Ca^{2+} -függő proteáz, a μ -calpain familiáris hypertrophiás cardiomyopathiában és a myocardialis stunning kialakulásában betöltött potenciális szerepét vizsgáltuk.

A calpainok és az fHCM cTnI-asszociált formái

Az izomszövet állományának hypertrophiás átépülése a sejteket alkotó fehérjék turnoverében bekövetkező egyensúlyzavar következménye. Az izomfehérjék bomlását

korábban összefüggésbe hozták a calpainok működésével. Ezért merült fel, hogy a calpain által bekövetkező cTnI bomlás sebessége és a cTnI mutációk talaján kialakuló fHCM között kapcsolat áll fenn. A troponin komplex képződés és a PKA-mediált foszforiláció mutáns cTnI-proteolízisre gyakorolt potenciális hatásait szintén vizsgáltuk.

Jelenleg nem tudjuk, hogy a cTnI mutációi, amelyek egyaránt érinthetik annak C-terminálisát (G203S és K206Q), valamint a centrális inhibitorikus domént (R145G), miként járulnak hozzá az fHCM kialakulásához. A G203S mutáció elsősorban a szívcsúcon jelentkező hypertrophiát alakítja ki. Ezzel szemben a K206Q és R145G mutációk következtében a gyakrabban előforduló és a kamrai septumot megvastagító hypertrophia jelenkezik. Érdekes, hogy a cTnI első calpain-hasítási termékét (cTnI₁₋₁₉₃) expresszáló egértörzsekben szintén szívmegegyobbodás jött létre. A szövettani és biokémiai markerek vonatkozásában ez a transzgenikus egérmodell azonban nem felelt meg az R145G mutációt hordozó (R146G az egér szekvenciájában) hypertrophiás cardiomyopathiának. Mindezek alapján a cTnI₁₋₁₉₃ nem játszik szerepet az fHCM kialakulásában. Alternatívaként felmerül az is, hogy a mutáns cTnI fehérjék csökkent bomlási sebessége esetleg magyarázatul szolgálhat az izomtömeg fHCM-hez társuló növekedéséhez. Jelen tanulmány eredményei azonban azt mutatják, hogy egyetlen általunk vizsgált cTnI mutáció sem csökkentette a μ -calpain által megvalósított proteolízist *in vitro*.

Korábbi tanulmányokkal összhangban azt találtuk, hogy a μ -calpain proteolízis kevésbé volt intenzív akkor, amikor a cTnI a troponin komplex részeként volt jelen. Ennek hátterében összetett konformációs változás és a hasítási hely felismerésének megváltozása állhat, nem egyszerűen a cTnI könnyebb vagy nehezebb hozzáférhetősége.

Az intracelluláris PKA hatására bekövetkező cTnI foszforiláció a következményes cTnI konformáció-változás és az erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenysége megváltozása a szimpatikus aktiváció során fokozott relaxációhoz vezet. Ezzel szemben a legtöbb fHCM-ben felismert cTnI mutáció növeli az erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenységet, így ellentétes hatással van a relaxációra. Korábbi adatok és saját kísérleteink egyaránt arra utalnak, hogy a cTnI mutánsok foszforiláció-függő regulációja megtartott fHCM során. Habár a cTnI mutáció és a cTnI foszforiláció myofibrilláris mechanikára kifejtett kombinált hatása nem teljesen ismert, az a nézet van elterjedőben, hogy a kamrai relaxáció károsodása indukálhatja a myocardium hypertrophiás transzformációját az fHCM kialakulása során. Patkány szívizom

preparátumokon végzett korábbi tanulmányok azt sugallták, hogy a cTnI foszforiláció védelmet nyújt a μ -calpain-mediált proteolízissel szemben. Saját méréseinkben a cTnI PKA-mediált biszfoszforilációja szintén hatékony védelmet biztosított a cTnI PKA-mediált biszfoszforilációja szintén hatékony védelmet biztosított a μ -calpain-mediált proteolízissel szemben, a WT és a mutáns cTnI molekuláknál egyaránt. Emellett a cTnI vizsgált mutációi (R145G, G203S és K206Q) nem voltak hatással a foszforiláció-mediált védelemre a troponin komplexben levő cTnI molekulák esetén sem.

Mindezek alapján az fHCM-hez rendelt cTnI mutánsok eltérő μ -calpain-érzékenysége nem ad elfogadható magyarázatot az fHCM kialakulására.

A PKA-mediált foszforiláció hatása a myocardialis homogenizátumban levő cTnI degradációjára

A kísérleteinkhez használt humán szívminiók cTnI molekuláinak foszforilációs szintje összevethető volt a korábbi vizsgálatokban kapott eredményekkel: a remodellált, beteg szívminiók alacsonyabb cTnI foszforilációs szinttel rendelkeztek a donor miniókhoz képest. A cTnI molekulák μ -calpain-érzékenységében azonban az eltérő foszforilációs szintek ellenére sem volt szignifikáns különbség. Erre az ellentmondásra magyarázatul szolgálhat, hogy a cTnI foszforilációs szintjének meghatározására általunk használt módszer nem tett különbséget a mono- és a biszfoszforilált cTnI molekulák között. Így a monofoszforilált cTnI mennyisége szignifikánsan magasabb lehetett a donor szívekben, mint a dilatált szívekben, a biszfoszforilált cTnI mennyisége ugyanakkor hasonló is lehetett. A calpain-mediált proteolízissel szemben védelmet viszont csak a biszfoszforiláció jelent. A cTnI-hoz hasonlóan, lényeges calpain-érzékenységbeli különbséget a többi vizsgált fehérje esetében sem tudtunk kimutatni a donor és a beteg szívek között. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a postischaemiás myofibrilláris protein degradáció feltehetően hasonlóan történik az egészséges és a remodellált dilatált myocardiumban.

A μ -calpain humán myocardialis célfehérjei

Ezüstfestéses módszerrel számos mennyiségi és minőségi változást sikerült kimutatni μ -calpain hatására a szívizom fehérjemintázatában. Ezek közül 6 fehérjét immunológiai módszerrel is azonosítani tudtunk és ezek degradációját részletesen tanulmányoztuk (titin, α -

fodrin, dezmin, cTnT, cTnI és α -aktinin). Miután ezen fehérjékhez fontos regulatórikus vagy strukturális szerep rendelhető, így minimális mennyiségi és minőségi változásuk is komoly következménnyel járhat a myocardium kontraktilis funkciójának tekintetében.

Kontroll körülmények között a titin nagyobb (N2BA) és kisebb (N2B) izoformáját a szívminiókon egyaránt sikerült kimutatni. μ -calpain hatására azonban ez a mintázat gyorsan megváltozott. Azt tapasztaltuk, hogy a titin különösen μ -calpain-érzékeny fehérje. Számos degradációs terméket is sikerült kimutatni. Morano és mtsai szívelégtelenségből származó mintákon a titin egy módosult variánsát detektálták, amit „fast migrating titin” néven különböztettek meg. Hein és mtsai pedig szintén szívelégtelenségből származó mintákon spontán titin-degradációt mutattak ki. Érdekes továbbá, hogy egyesek szívelégtelenségben a titin mennyiségének a csökkenését figyelték meg. Mi nem tapasztaltunk ilyen eltéréseket a beteg szíveken. Ez azzal lehet magyarázható, hogy a kísérleteinkhez használt beteg szívminiók (NYHA III-IV.) morfológiailag még nem mutattak olyan előrehaladott szívelégtelenségre utaló eltéréseket, amit az általunk használt diagnosztikus módszerekkel detektálni tudtunk volna. Helmes és mtsai találtak degradációs terméket a MHC alatt is, amit a gradiens géleken nekünk nem sikerült kimutatni, a 4%-os mini-gélek pedig nem tették lehetővé ennek a molekulatartománynak a vizsgálatát. Így nem zárható ki, hogy a titinnak valóban van degradációs terméke az említett pozícióban.

Az α -fodrin μ -calpain-indukált proteolízise során a degradáció megkérdőjelezhetetlen volt, azonban a rendkívül gyors degradáció miatt szinte csak a degradációs termékek tanulmányozására volt lehetőségünk. Az általunk tapasztalt intenzív bomlás nem egyedülálló megfigyelés. Yoshida és mtsai már korábban azt tapasztalták, hogy a fodrin sokkal gyorsabban bomlik az ischaemia/reperfúzió során, mint bármely más citoszkeletális fehérje. Antitestünk segítségével két degradációs terméket sikerült felismerni. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a μ -calpain két helyen képes az α -fodrint hasítani.

A dezmin károsodása a komplex szarkomer struktúra megbomlásához vezethet. Egy korábbi tanulmányban párhuzamosságot fedeztek fel a μ -calpain-indukált dezmin degradáció, a szarkomer mintázat és a csökkent Ca^{2+} -aktivált erő között permeabilizált patkány szívmiósejteken. A dezmin humán modellünkben is kitűnő μ -calpain szubsztrátnak bizonyult, a korábbi állatkísérletes adatokkal összevethető degradációs intenzitást és bomlástermékeket észleltünk *in vitro*. A μ -calpain hatására bekövetkező dezmin bontás

dózis- és idő-függő jellegzetességeket mutatott, hasonlóan a korábban megállapított in vitro TnI és TnT bomlásokhoz. A dezmin bomlástermékek molekulaméret szerinti mintázata összevethető volt a korábban patkány szívizommintákon kapottakkal. Ebből arra következtethetünk, hogy a dezmin fehérje szekvenciájában lévő inter-species különbségek a patkány és az ember összehasonlítása kapcsán nem eredményez messzemenő különbségeket a μ -calpain hasítási helyeiben.

A regulatórikus cTnT μ -calpain proteolízise a mi kísérletes körülményeink mellett elég gyors volt. Sajnos nincs adat arra vonatkozóan, hogy cTnT degradáció milyen mértékben felelős a postischaemiás myocardium myofibrilláris rendszerének megváltozott Ca^{2+} -reaktivitásáért.

A cTnI calpain-mediált degradációjáról számos irodalmi adattal rendelkezünk. Postischaemiás patkány szívizomban a cTnI proteolitikus hasítása legalább 3 lépésben zajlik. A kísérleteink során kapott cTnI degradációs termékek molekulatömeg szempontjából részben átfednek egyéb kísérletes modellekben észleltekkel (ischaemiás/reperfúziós patkány szívek és humán bal kamrai szívmok). Az általunk használt egyik cTnI elleni antitest (clone 16A11) több mint 3, nevezetesen 8 degradációs cTnI terméket azonosított hasonló molekulatömeg tartományban. Ugyanezzel az antitesttel Katrukha és mtsai humán nekrotikus humán szívizomszövetben (37 °C) 7 különböző cTnI degradációs terméket tudtak megkülönböztetni. Így elképzelhető, hogy a humán cTnI molekulákat a μ -calpain több helyen hasította, mint azt postischaemiás patkány szíveknél tapasztalták. Ez magyarázhatja a bypass műtetre került szívekből epicardialis biopsziával nyert minták cTnI degradációs termékeinek nagy számát McDonough és mtsai kísérleteiben is. A nagyszámú degradációs termékek további lehetséges magyarázata, hogy a cTnI fragmentek kovalens komplexeket képezhetnek egyéb myocardial fehérjékkel, ennek következtében számos cTnI immunoreaktív csík keletkezik. Meg kell azonban emléteni, hogy ezekben az esetekben az immunreaktív fehérjék egy részének magasabb molekulatömeggel kellett volna rendelkezni. Továbbá nem szabad elfelejtenünk azt a tényt, hogy az eredményt nagymértékben befolyásolja a kísérlethez használt antitest minősége is, mert az antitestek különböznek specificitásban, szenzitivitásban, és eltérő affinitással kötődnek a natív molekulához és a degradációs termékhez. A cTnI u.n. stabil epitópjához kötődő antitestek több degradációs termék felismerésére képesek. Az általunk használt clone 16A11-es anti-cTnI antitest epitópja is a

cTnI ezen stabil régiójában lokalizálódik és ez számos degradációs termék detektálását tette lehetővé. Ellenben a clone C5 (melynek az epitópja ugyan nem ismert, de feltételezések szerint nem az említett stabil szakaszra lokalizálódik), csak 1 degradációs termék feltűntetésére volt képes. További érdekes megfigyelés volt, hogy cTnI aránylag alacsony μ -calpain-érzékenységgel rendelkezett a titinhez, α -fodrinhoz, dezminhez és cTnT-hez viszonyítva. Felvetődött, hogy a cTnI viszonylag alacsony proteolitikus érzékenységet a cTnI molekulák igen magas foszforilációs szintje magyarázza. Ezt a lehetőséget azonban a szívminák cTnI foszforiláltsági szintjének meghatározására végzett vizsgálataink alapján kizárhattuk.

Korábbi állatkísérletekben az α -aktinin nagy mértékű elvesztését találták postischemiás szíveken, így valamelyest meglepő, hogy kísérleteink során az összes vizsgált fehérje között a humán α -aktinin volt a legkevésbé érzékeny a μ -calpain proteolízis során. Goll és mtsai szolgáltathatnak erre magyarázatot, akik úgy vélik, hogy a μ -calpain az α -aktinin Z-csíkokból való kiszabadulását okozza (anélkül, hogy degradálná azt) más kapcsolódó fehérjék módosítása révén. Így a Z-csík α -aktinin elvesztése nem feltétlenül jelenti a molekula degradációját, hanem inkább annak kiszabadulását egy fellazult myofibrilláris struktúrából.

Összefoglalva, a stunned myocardium kialakulásában tehát számos strukturális és regulatórikus funkcióval bíró fehérje károsodása valószínűsíthető, de úgy tűnik, hogy nem minden μ -calpain-szenzitív szubsztrát hasad el egy adott inzultus kapcsán. Hogy mely fehérjék lesznek érintettek, az nagy méretékben függ attól, hogy milyen szignált kapott a sejt, milyen a calpainok és a calpain szubsztrátok egymáshoz viszonyított lokalizációja és feltehetően egyéb tényezőktől. Ez magyarázattal szolgálhat az irodalmi adatok nagyfokú divergenciájára. Azt is szem előtt kell tartanunk, hogy a funkció-romlásához nem szükséges feltétlenül nagymérvű protein degradáció. A finom fehérje-változásokat pedig sokszor nehéz pontosan azonosítani.

Endogén Ca^{2+} -függő proteolitikus aktivitás a homogenizátumokban

Figyelemre méltó volt, hogy a szívizom homogenizátumok kívülről hozzáadott μ -calpain nélkül is mutattak „spontán” fehérje degradációt, mely csak a Ca^{2+} -ot tartalmazó reakcióközegben, calpain inhibitor hiányában volt megfigyelhető. Az endogén proteolitikus

aktivitás okozta változások a degradációs termékek molekulatömege alapján hasonlóságot mutattak az *in vitro* exogén μ -calpain-indukált inkubációk során kapott eredményekkel. Ezek a hasonlóságok felvetik annak a lehetőségét, hogy a humán myocardium képes szabályozni a myofibrilláris fehérjék szintjét saját endogén calpainjai révén is. Ebből adódóan az előbb felsorolt fehérjék degradációja átmeneti szabályozatlan μ -calpain aktiváció során várhatóan arányban van a myofibrilláris diszfunkcióval. Eredményeink arra utalnak, hogy a μ -calpain-mediált proteolízis nem valószínű, hogy egyetlen fehérjére például a cTnI-re korlátozódik, hanem inkább a posttranszlációs módosítások egyik fő útvonalát reprezentálja érintve számos fehérje szerkezetét és működését.

Összefoglalás

Kísérleteink során egy intracelluláris Ca^{2+} -függő proteáz, a μ -calpain familiáris hypertrophiás cardiomyopathiában és a myocardialis stunning kialakulásában betöltött potenciális szerepét vizsgáltuk.

Rekombináns humán vad típusú és mutáns cTnI (G203S, K206Q, R145G) illetve humán bal kamrai homogenizátumok regulatórikus (cTnI, cTnT) és strukturális (titin, α -fodrin, α -aktinin, dezmin) myofibrilláris fehérjéinek μ -calpain érzékenységi vizsgálata alapján a következő megállapításokat tehetjük:

1. A vad típusú és az fHCM-asszociált mutáns cTnI molekulák *in vitro* körülmények között hasonlóan bomlottak μ -calpain hatására, így nem valószínű, hogy a μ -calpain-mediált cTnI proteolízis változása felelős az fHCM cTnI-asszociált formáinak kialakulásáért.
2. A PKA-mediált biszfoszforiláció rekombináns molekulákon effektív védelmet nyújtott a cTnI μ -calpain-függő degradációjával szemben, amit a troponin komplex képződése tovább fokozott. Azonban ezt a foszforiláció-függő védelmet a donor myocardialis homogenizátumokon magasabb cTnI foszforilációs szintjük ellenére sem tudtuk igazolni.
3. A μ -calpain számos regulatórikus és strukturális myofibrilláris fehérjét hasított humán bal kamrai szövetmintákban különböző intenzitással és kinetikával. A titin és az α -fodrin mutatott a legintenzívebb, a dezmin és a cTnT közepes, végül a cTnI és az α -aktinin a legkisebb μ -calpain-érzékenységet. Az α -fodrin, a dezmin és a cTnI autoproteolitikus hasítási termékei (endogén Ca^{2+} -függő proteolízis eredményeként) hasonlóságot mutattak az exogén μ -calpain által indukált proteolízis során keletkező degradációs termékek molekula-tömegével. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy ezek a fehérjék esetleg *in vivo* is a μ -calpain célfehérjéi, így degradációjuk szerepet kaphat a myocardialis stunning kialakulásában.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

In extenso közlemények:

Barta J., Tóth A, Jaquet K, Redlich A, Édes I, Papp Z: Calpain-1-dependent degradation of Troponin I mutants found in familial hypertrophic cardiomyopathy. **Mol Cell Biochem** 251: 83-88, 2003.

IF.: 1,548

Barta J., Tóth A, Édes I, Vaszily M, Papp JG, Varró A, Papp Z: Calpain-1 sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. **Mol Cell Biochem** (in press) 2004.

IF.: 1,548

Letter:

Papp Z, **Barta J.**, Stienen GJM: Troponin I degradation and myocardial stunning. **Circulation** 104: E157-E157, 2001.

IF.: 10,517

Idézhető absztraktok:

Barta J., Tóth A, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Proteolytic components of reversible ischaemic/reperfusion injury (stunning) in the human myocardium. **Cardiol Hung Suppl.2.:** 37, 2001.

Barta J., Tóth A, Édes I, Vaszily M, Kristóf É, Bódi A, Papp Z: Calpain-I degrades desmin more effectively than TnI in human myocardium. **J Mol Cell Cardiol** 33: A8, 2001.

Barta J., Tóth A, Hertelendi Z, Édes I, Jaquet K, Redlich A, Papp Z: The effects of missense mutations and PKA phosphorylation on Calpain-1-induced cTnI degradation. **Cardiol Hung Suppl.1.:** 89, 2002,

Barta J., Tóth A, Hertelendi Z, Édes I, Jaquet K, Redlich A, Papp Z: Protection of Calpain-1-induced cTnI degradation by PKA phosphorylation *in vitro*. **J Mol Cell Cardiol** 34: A7, 2002.

Barta J., Tóth A, Édes I, Vaszily M, Varró A, Papp Z: Calpain-I sensitive proteins of the human myocardium. **Eur J Heart Failure Suppl. 2/1:** A213, 2003.

Barta J., Tóth A, Édes I, Vaszily M, Varró A, Papp Z: Calpain-I sensitive proteins of the human myocardium. **Exp Clin Cardiol** 8: A4, 2003.

Barta J., Tóth A, Édes I, Vaszily M, Papp JGy, Varró A, Papp Z: Proteolytic components of human postischemic myocardial stunning. **Cardiol Hung** (in press) 2004.

Az értekezéshez fel nem használt saját közlemények

Előkészületben levő közlemény:

Barta J, van der Velden J, Boontje NM, Zaremba R, Stienen GJM: PKC-M and phenylephrine induce comparable decrease in calcium sensitivity in skinned rat cardiac myocytes

Idézhető absztraktok:

Papp Z, **Barta J**, van der Velden J, de Jong JW, Vaszily M, Édes I, Stienen GJM: Differences between contractile properties of human myocytes isolated from explanted failing and donor hearts. **Cardiol Hung Suppl.2.**: 25, 2001.

Borbély A, **Barta J**, Édes I, Vaszily M, Virág L, Varró A, Papp Z. Peroxynitrite induced mechanical alterations of the actin-myosin interaction in isolated human myocardial cells. **Eur J Heart Failure Suppl. 2/1**: A132, 2003.

Borbély A, **Barta J**, Édes I, Vaszily M, Virág L, Varró A, Papp Z: Peroxynitrite induced mechanical alterations of the actin-myosin interaction in isolated human myocardial cells. **Exp Clin Cardiol 8**: A7, 2003.

Borbely A, **Barta J**, Edes I, Vaszily M, Virag L, Varro A and Papp Z: Peroxynitrite induced functional alterations in isolated human myocardial cells. **Cardiol Hung 2**(Suppl.): 33: A64, 2003.

Köszönetnyilvánítás

A következő sorokban szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik közvetlenül vagy közvetve hozzájárultak Ph.D. értekezésem elkészítéséhez.

Hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Papp Zoltánnak szakmai irányításáért, gyakorlati és elméleti tanácsaiért, a sok türelemért és a sok segítségért, amit Ph.D. tanulmányaim alatt és a disszertációm elkészítéséhez nyújtott, és azért, mert experimentális munkámhoz ideális feltételeket biztosított. Külön köszönettel tartozom a pályázataimhoz és Marie-Curie ösztöndíjjamhoz nyújtott támogatásáért, mely lehetővé tette számomra, hogy bekapcsolódhassak az Amszterdami Szabadegyetem Cardiovasculáris Kutatócsoportjával folyó kollaborációs kísérletekbe.

Sok köszönettel tartozom Dr. Tóth Attilának, mert segítségével elsajátíthattam a molekuláris biológia laboratóriumi alapjait, praktikus gyakorlati és elméleti tanácsaival sokat segített a kísérleteim során felmerült akadályok leküzdésében.

Köszönöm Dr. Édes István professzor úrnak, a Kardiológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra intézetében a kísérletek megvalósítását, a szakmai fejlődésemet elősegítő tudományos konferenciákon való részvételt és támogatta pályázataimat. Nyitott szemléletével és konstruktív észrevételeivel nagyban hozzájárult munkám eredményességéhez.

Szeretném megköszönni Móré Gábornénak a laborban és magánemberként nyújtott segítségét, mindenre kiterjedő figyelmét és hogy mindig kitartóan bátorított és támogatott. Köszönetet mondok közvetlen kollegáimnak is a laborban kifejtett segítségéért és megértéséért.

Nem utolsó sorban, kimondhatatlanul sok hálával tartozom szüleimnek, nagyszüleimnek, és barátomnak, akik tanulmányaim során mindig mellettem álltak, támogattak az időigényes munkák ellenére, akik bátorítása nélkül nem sikerült volna elérni a kitűzött célokat.