

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Barta Judit

Témavezető:

Dr. Papp Zoltán
egyetemi docens



Debreceni Egyetem

Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Általános Orvostudományi Kar

Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék

Debrecen

2004

Tartalomjegyzék

	Oldal
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
1. <i>A calpainok és feltételezett szerepük a szívizomszövetben</i>	4
2. <i>A familiáris hypertrophiás cardiomyopathia és a calpainok</i>	6
2.1. <i>A familiáris hypertrophiás cardiomyopathia genetikai háttere</i>	6
2.2. <i>A szívizom troponin komplexének szerepe a kontraktilis rendszer működésében</i>	6
2.3. <i>A PKA-mediált cTnI foszforiláció és következményei</i>	7
2.4. <i>A cTnI familiáris hypertrophiás cardiomyopathiával való kapcsolata</i>	9
2.5. <i>A calpainok feltételezett szerepe a hypertrophiás cardiomyopathiában</i>	10
3. <i>Az ischaemiás/reperfúziós myocardium károsodás és a calpainok</i>	11
3.1. <i>A szívizom metabolizmusának és kontraktilitásának változásai ischaemia/reperfúzió során</i>	11
3.2. <i>A reverzibilis ischaemiás/reperfúziós myocardium károsodás kialakulásának feltételezett mechanizmusa - calpain teória</i>	13
Célkitűzések	19
Anyagok és Módszerek	20
1. <i>Tisztított cTnI molekulák</i>	20
2. <i>Szövetminták</i>	21
3. <i>μ-calpain-mediált in vitro proteolízis</i>	21
4. <i>Egy-dimenziós gélelektroforézis</i>	22
5. <i>Ezüstfestés</i>	23
6. <i>Western immunoblot</i>	23
7. <i>A cTnI foszforilációs szintjének meghatározása</i>	24
8. <i>Eredmények értékelése/statisztika</i>	24
Eredmények	25
1. <i>Az izolált WT cTnI μ-calpain-mediált bomlásának aktivitás- és időfüggése</i>	25
2. <i>1 U μ-calpain proteolitikus hatása WT és mutáns cTnI molekulákon</i>	26
3. <i>0,25 U μ-calpain proteolitikus hatása WT és mutáns cTnI molekulákon</i>	28
4. <i>A donor és a DCM-ás szívminták cTnI molekuláinak PKA-függő foszforilációs szintjében levő különbségek és hatásuk a μ-calpain-indukált proteolízisre</i>	30
5. <i>A μ-calpain proteolitikus hatása bal kamrai szövethomogenizátumon</i>	31
6. <i>Kicsi és nagy μ-calpain aktivitás hatására bekövetkező proteolitikus változások a myofibrilláris fehérjék szerkezetében</i>	32
7. <i>Endogén Ca^{2+}-függő proteolitikus aktivitás a szívizom mintákban</i>	35

Megbeszélés	37
1. <i>A calpainok és az fHCM cTnI-asszociált formái</i>	37
2. <i>A PKA-mediált foszforiláció szerepe a myocardialis homogenizátumban levő cTnI degradációjában</i>	38
3. <i>A stunning pathomechanizmusának dilemmái</i>	39
4. <i>A μ-calpain humán myocardialis célfehérjei</i>	41
5. <i>Endogén Ca^{2+}-függő proteolitikus aktivitás a homogenizátumokban</i>	44
Összefoglalás	45
Köszönetnyilvánítás	46
Irodalomjegyzék	47
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	57
Az értekezéshez fel nem használt saját közlemények	58

Rövidítések jegyzéke

AMI:	acut myocardialis infarctus
Asn:	aszparagin
BSA:	szarvasmarha szérum albumin
Cys:	cisztein
cMHC:	szívizom-specifikus miozin nehéz lánc
cTm:	szívizom-specifikus tropomiozin
cTnC:	szívizom-specifikus troponin C
cTnI:	szívizom-specifikus troponin I
cTnT:	szívizom-specifikus troponin T
D1, D2, D3:	humán donor szívminák
DCM:	dilatatív cardiomyopathia
DMD:	Duchenne típusú izomdystrophia
Dp:	proteolitikus degradációs termék
DTT:	ditiotritol
ECL:	erősített kemilumineszcencia
EDTA:	etilén-diamin-tetraacetát
EGTA:	etilén-bis-oxietilénitrilo-tetraacetát
F1, F2:	humán dilatatív cardiomyopathiás szívminák
fHCM:	familiáris hypertrophiás cardiomyopathia
G203S:	203. aminosav pozícióban pontmutáns troponin I (glicin→szerin csere)
His:	hisztidin
kDa:	kilodalton
K206Q:	206. aminosav pozícióban pontmutáns troponin I (lizin→glutamin csere)
MDa:	megadalton
MHC:	miozin nehéz lánc
MMP-2:	matrix metalloproteináz-2
MOPS:	γ-morfolino-propánszulfonsav
N2B titin:	a kisebb méretű és kevésbé elasztikus titin izoforma
N2BA titin:	a nagyobb méretű és elasztikusabb titin izoforma
NYHA:	a szívelégtelenség New York Heart Association klasszifikációja
PAGE:	poliakriamid gélelektroforézis
PKA:	proteinkináz-A
PTCA:	percutan transluminaris coronaria angioplastica
R145G:	145. aminosav pozícióban pontmutáns troponin I (arginin→glicin csere)
SDS:	natrium-dodecil szulfát
Ser:	szerin
TG:	transzglutamináz
Tm:	tropomiozin
TnI:	troponin I
Tris:	hidroximetilaminometán
TTBS:	polioxietilénszorbítán monolaurát (Tween 20) tartalmú Tris puffer
vMLC1:	kamrai esszenciális miozin könnyűlánc
vMLC2:	kamrai miozin regulatórikus könnyűlánc
WT cTnI:	vad típusú cTnI

Bevezetés

1. A calpainok és feltételezett szerepük a szívizomszövetben

A calpainok a Ca^{2+} -aktivált proteolitikus enzimek önálló osztályaként kerültek felismerésre az agyszövetben (Guroff 1964). Elnevezésüket a cisztein-proteázok papain enzimesaládjával mutatott homológia és Ca^{2+} -függésük alapján kapták. Ezek az enzimek a legtöbb eukarióta sejtben megtalálhatók, így a szívizomszövetben is (Mellgren 1980), ahol 2 szövet-specifikus calpain típus expresszálódik (μ -calpain, vagy calpain I, illetve az m-calpain, vagy calpain II). A nevezéktant illetően a legújabb ajánlások a μ - és az m-calpain elnevezést tartják helyesnek (Goll és mtsai, 2003), így a továbbiakban mi is ezt a terminológiát használjuk.

A calpainok izomszövetben betöltött szerepe csak részben ismert. Feltételezhetően szerepük van az individuális fehérjék szöveti szintjének szabályozásában, az ischaemiás/reperfúziós szívizomkárosodás (myocardiális stunning) kialakulásában, és a fehérjék metabolizmusában, így az izomszövet atrófiájának, differenciálódásának és növekedésének szabályozásában (Croall 1991, Goll és mtsai, 1992a; Perrin és Huttenlocher, 2002).

A μ -calpain aktiválódásához *in vitro* kísérletes körülmények között μM koncentrációjú Ca^{2+} jelenléte szükséges, Ca^{2+} -ra vonatkoztatott K_m értéke 1-20 μM (Croall és DeMartino, 1991). Ez az érték az enzim autoproteolíziséhez *in vitro* szükséges Ca^{2+} koncentráció. A másik szívizomban expresszálódó calpain típus, az m-calpain esetében a K_m érték a mM-os koncentráció tartományba esik (Goll és mtsai, 1991; Suzuki 1991). Mindkét enzim felépítése hasonló, egy nagyobb (80 kDa) és egy kisebb (28 kDa) alegységből állnak. *In vitro* kísérletek alapján szerkezetük mellett a szubsztrát-specifitásuk is nagyon hasonló. Így nem tudni, hogy a μ - és az m-calpain milyen szempont alapján és milyen arányban osztozik a fiziológias, pathofiziológias feladatokon.

A calpainok intracelluláris aktiválódásának pontos mechanizmusa napjainkban még nem teljesen ismert, ugyanis a calpainok Ca^{2+} igénye magasabb, mint az élő sejtekben intracellulárisan előforduló 50-300 nM (Jacquemonod 1997; Maravall és mtsai, 2000). Úgy vélik, hogy a már aktiválódott μ -calpain működéséhez szükséges Ca^{2+} koncentráció a fiziológias tartományba eshet, mivel ilyenkor a K_m érték csökken. 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 citoskeletális struktúrákhoz kötve van jelen a citoszolban (Kumamoto és mtsai, 1992; Lane és mtsai, 1992), 66%-ban a szarkomer Z-csíkok, 20%-ban az I-sávok, 14%-ban az A-sávok területén (Goll és mtsai, 1991; Kumamoto és mtsai, 1992). Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésekor az enzim térszerkezete oly módon változik meg, hogy az úgynevezett katalitikus triádot alkotó oldalláncok (Cys, His, Asn) megfelelő közelségbe kerülnek, és képesek létrehozni a funkcionálisan aktív katalitikus helyet (Goll és mtsai, 2003). Az enzim a sejtmembránba transzlokálódik, majd egyes elképzelések szerint, intramolekuláris proteolízist követően válik aktívvá (Suzuki és mtsai, 1987; Croall és DeMartino, 1991). Van arra vonatkozó adat is, hogy az autolízis nem esszenciális az enzim aktiválódásához, de tény, hogy a gyors autolízis jelentősen, kb. tized részére csökkenti a μ -calpain proteolitikus aktivitásához szükséges Ca^{2+} -igényt (Goll és mtsai, 1995). A calpainok működését a Ca^{2+} -on és az autoproteolízisen kívül egyéb mechanizmusok is szabályozzák. Ilyenek az enzim Ca^{2+} -érzékenységét szabályozó foszfolipidek (Saido és mtsai, 1992), vagy az endogén calpain inhibitor (calpastatin), mely feltehetően az enzim spontán aktiválódását képes gátolni. A calpastatin és a calpain általában kolokalizált (Lane és mtsai, 1985; Goll és mtsai, 1992b; Kumamoto és mtsai, 1992), a calpastatin gátló funkciójához azonban alacsony koncentrációjú Ca^{2+} -ra is szükség van. Ez a Ca^{2+} koncentráció viszont mindig alacsonyabb, mint amennyi a μ -calpain autolíziséhez szükséges (Kapprell és Goll, 1989). Ennek megfelelően kell, hogy legyen a sejtben azonban olyan mechanizmus, ami lehetővé teszi a calpain aktiválódását a calpastatin jelenlétében is. Elképzelhető, hogy az enzim transzlokálódik az inhibitorról, vagy csökken az enzim aktiválódásához szükséges Ca^{2+} igény anélkül, hogy változna a calpastatin gátló funkciójához szükséges Ca^{2+} koncentráció. Úgy tűnik, hogy a calpastatin és a calpain egyidejű proteinkináz-A (PKA)-mediált foszforilációja képes teljesen felfüggeszteni a calpastatin gátló hatását (Goll és mtsai, 2003). Növekvő az érdeklődés továbbá az úgynevezett endogén calpain aktivátorok iránt is (Croall és DeMartino, 1991). A calpainok szabályozásának pontos mechanizmusa - beleértve aktiválódásukat és inaktiválódásukat - tehát még korántsem tisztázott. Azt viszont tudjuk, hogy a calpainok aktivitásának jellegzetes tulajdonsága a sejt bizonyos fehérjéinek limitált hasítása, mely stabil, viszonylag nagy méretű fehérje fragmentumok keletkezését eredményezi (Kay 1984a; Goll és mtsai, 1992b). A kis peptidek (3-5 aminosav) például kimondottan rossz calpain-szubsztrátok (Sasaki és mtsai, 1984). Ez nem annyira fehérje degradációs folyamatra, mint inkább posttranszlációs módosításra utal, ezért többen tekintik a μ -calpaint inkább a sejt

fehérje-metabolizmus szabályozójának (u.n. house-keeping enzim), mint degradatív enzimnek (Croall és DeMartino, 1991).

2. A familiáris hypertrophiás cardiomyopathia és a calpainok

2.1. A familiáris hypertrophiás cardiomyopathia genetikai háttere

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 fehérjéjét 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 (Kimura és mtsai, 1997). Emellett a vastag filamentumot alkotó szívspecifikus miozin nehézlánc (cMHC), a szívizom-specifikus C protein, a kamrai esszenciális miozin könnyűlánc (vMLC1), a kamrai miozin regulatórikus könnyűlánc (vMLC2), a vékony filamentumot felépítő szívizom-specifikus troponin T (cTnT) és a tropomiozin (Tm) gén érintettsége is előfordul. 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.

2.2. A szívizom troponin komplexének szerepe a kontraktilis rendszer működésében

A szívizom kontraktilis fehérjei közül a troponin C (cTnC), cTnT és cTnI fiziológias körülmények között 1:1:1 arányú komplexet alkotva fordulnak elő. A cTnC rendelkezik azzal a Ca^{2+} -kötő képességgel, mely ezt a fehérjét a miofibrilláris rendszer Ca^{2+} -receptorává teszi. A vékony filamentum egyéb komponenseihez kapcsolódó troponin C molekula része az ún. troponin komplexnek, mely a cTnC másik két troponin molekulával (cTnT és cTnI) kialakított kapcsolata eredményeként alakul ki. A cTnC (a Tm molekulákkal fenntartott térbeli konformációs kapcsolat révén) az erőgenerálásért közvetlenül felelős aktin és miozin kölcsönhatását Ca^{2+} -függő módon szabályozza (Édes, 2000). A mioplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció emelkedése a cTnC Ca^{2+} kötésén keresztül a kontraktilis rendszer aktiválódását okozza. A relaxáció során a hirtelen csökkenő intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció a cTnC alegységről a Ca^{2+} disszociációját váltja ki, így visszaáll a troponinok és a Tm nyugvó

állapotra jellemző térszerkezete. Ez a folyamat az aktin-miozin kölcsönhatást gátolva vezet a relaxációhoz.

A 210 aminosavból álló humán cTnI molekula kulcsfontosságú szerepet tölt be a kontraktilis rendszer működésének troponin komplexen keresztül történő ki-be kapcsolásában. Ez annak köszönhető, hogy a cTnI különböző régiói ciklikus módon asszociálódnak és disszociálódnak az aktin és a miozin molekulákhoz (1. ábra) (Solaro és Rarick, 1998). Amikor a cTnI úgynevezett centrális inhibitorikus doménje (139-150 aminosav) az aktinhoz kapcsolódik, akkor a miozin nehézláncok nem kötődhetnek az aktinhoz, és így nem jöhet létre a kontraktilis rendszeren belüli erőgeneráló kölcsönhatás. Két további régiónak is fontos szerepe a maximális gátlás kifejtésében, ezek az inhibitorikus régióhoz képest C-terminálisan helyezkednek el, 152-188 és 189-199 lokalizációban. A cTnI gátló funkciójáért 50%-ban az inhibitorikus régió a felelős, a másik 50%-ért a 2 említett régió felel 25-25% arányban (Rarick és mtsai, 1997). A cTnC-hez kötődő Ca^{2+} hatására a cTnI-aktin kapcsolat felszakad, és ez lehetővé teszi az aktin és a miozin közötti ATP-t igénylő ciklus elindulását. Ez a ciklus a vastag és vékony filamentumok egymáshoz viszonyított elmozdulását, végső soron az izom rövidülését és az erő kifejlődését eredményezi. Az aktin-miozin ciklus mindaddig folytatódik, amíg a közegben található Ca^{2+} -koncentráció emelkedett értéke a cTnI és az aktin közötti kapcsolat helyreállítását gátolja. A kontraktilis rendszer működését tehát kifejezett Ca^{2+} -függés jellemzi, mely szervesen kapcsolódik a cTnI molekula térbeli helyzetéhez.

2.3. A PKA-mediált cTnI foszforiláció és következményei

A troponinok funkciójának finom hangolása fehérje-foszforilációs/defoszforilációs folyamatok útján történik, mely szoros összefüggésben van a molekula térszerkezetével. A cTnI intracelluláris foszforilációját a proteinkináz-A katalizálja. A molekula két funkcionális szempontból jelentős PKA foszforilációs hellyel rendelkezik, a Ser-22 és Ser-23 pozícióban, melyek a molekula N-terminális végéhez közel helyezkednek el (Mittmann és mtsai, 1990). 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 (Dohet és mtsai, 1995; Zhang és mtsai, 1995; Reiffert és mtsai,

1999). A cTnI foszforiláció elősegíti a myocardium relaxációját (England 1976; Zhang és mtsai, 1995), 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 (Schillinger és Kogler, 2003).

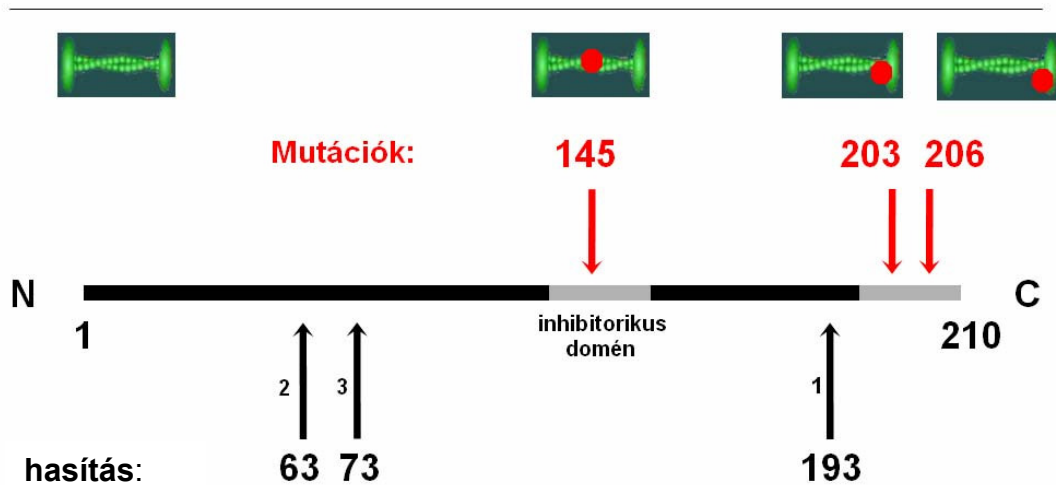
A tapasztalatok azt mutatják, hogy a szívelégtelenségben szenvedő (New York Heart Association (NYHA) osztály III-IV.), rossz bal kamara funkcióval rendelkező myocardium sérülékenyebb a myocardialis stunning során, mint az egészséges, vagy kevésbé beteg szívek. Ennek egyik lehetséges magyarázata az egészséges és a beteg myocardium fehérjeinek 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 (Bodor és mtsai, 1997, van der Velden és mtsai, 2003). A cTnI szívelégtelenségben tapasztalt csökkent foszforilációs szintje a myofibrilláris rendszer emelkedett Ca^{2+} -érzékenységéhez vezet (Wolff és mtsai, 1996; Bodor és mtsai, 1997; Reiffert és mtsai, 1999). A megváltozott foszforilációs szint érinti a cTnI molekula töltését, konformációját, a troponin komplexen belül elfoglalt helyzetét (Ward és mtsai, 2002). Defoszforilált cTnI esetén ugyanis a molekula 16-28 aminosav szekvenciája a cTnC N-terminális doménjéhez kötődik, ezzel mintegy stabilizálva az utóbbi Ca^{2+} -kötött, nyitottabb konformációt. Foszforiláció során a negatív töltések szaporodása és a lokális konformáció-változás miatt csökken a cTnI affinitása a cTnC felé, nő a Ca^{2+} disszociáció mivel csökken a cTnC nyitott konformációjának stabilitása. Felmerült, hogy a cTnI foszforiláció-függő konformáció-változásával módosulhat a molekulák hozzáférhetősége a proteolitikus enzimek, mint pl. a μ -calpain számára is. Defoszforilált estében a molekula esendőbbé válik a calpain hasítás iránt. Közvetetten ezt támasztják alá a cTnI molekulák PKA-mediált foszforilációs (Di Lisa és mtsai, 1995) és β -adrenerg stimulációs vizsgálatai is (Mc Donough és mtsai, 1999), mely esetekben a foszforiláció eredményeként a cTnI csökkent μ -calpain hasíthatóságát észlelték. Érdekes, hogy korábban Toyo-Oka (1982) a cTnI PKA-mediált foszforilációja során éppen ellenkezőleg, a calpain-mediált degradáció fokozódását észlelte.

2.4. A cTnI familiáris hypertrophiás cardiomyopathiával való kapcsolata

A cTnI molekula kulcsfontosságú szerepet tölt be a kontraktilis rendszer működésének ki-be kapcsolásában (Solaro és Rarick, 1998; Solaro, 1999). Illusztráltuk, hogy a kontraktilis rendszer működését kifejezett Ca^{2+} -függés jellemzi, mely szerves kapcsolatban áll a cTnI molekula szerkezetével. Így a cTnI szerkezetében bekövetkező legkisebb változás is a szívizom kontraktilitásának megváltozását 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 (James és mtsai, 2000; Takahashi-Yanaga és mtsai, 2001; Lang és mtsai, 2002). Ennek során születtek olyan eredmények, amelyek a kontraktilis rendszer funkcionális hasonlóságaira mutattak rá a cTnI fHCM-asszociált mutációi esetén. Így pl. a Ca^{2+} -függő erőgenerálás és a miozin ATP-áz aktivitás Ca^{2+} -érzékenységének fokozódását találták több kísérletsorozat végeredményeként (James és mtsai, 2000; Elliott és mtsai, 2000; Takahashi-Yanaga és mtsai, 2001; Lang és mtsai, 2002). Fontosnak látszik azonban megemlíteni, hogy 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 cTnC-hez történő kapcsolatra és egyes esetekben a miozin ATP-áz aktivitására is (Elliott és mtsai, 2000; Takahashi-Yanaga és mtsai, 2001). 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 terminális közeli K206Q mutáció (1. ábra) 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 (Kimura és mtsai, 1997). A cTnI különböző szakaszait károsító mutációk és azok myofibrilláris mechanikára kifejtett következményei tehát nem magyarázzák tökéletesen az fHCM morfológiai és klinikai jellegzetességeit.

A mechanizmus komplexitásához hozzájárul az a korábban már ismertetett tény, hogy a mutáns cTnI β -aderenerg stimulációra bekövetkező foszforilációja is hatással lehet a molekula konformációjára és a troponin komplexben elfoglalt helyzetére.

Troponin I



1. ábra. A cTnI molekula vázlatos szerkezete, funkcionális elemei, az fHCM-hez kapcsolódó mutációk és a μ -calpain hasítási helyek. A cTnI sematikus térbeli szerkezete látható felül. A 210 aminosavból felépülő fehérje fHCM-asszociált mutációi (pirossal jelölve) a centrális inhibitorikus és a C-terminális domének (szürke szakaszok) aminosav összetételét egyaránt érinthetik. A cTnI μ -calpain általi hasításának feltételezett helyeit fekete színű számok és nyilak jelzik, míg a hasítás sorrendjét a nyilakra írt fekete színnel feltüntetett számok mutatják. N: N-terminális; C: C-terminális

2.5. A calpainok feltételezett szerepe a hypertrophiás cardiomyopathiában

Goll és mtsai rámutattak, hogy a calpainoknak szerepe van az izomszövet növekedésében és differenciálódásában (Goll és mtsai, 1992a). 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. Ezt az elképzelést alátámasztja az a tény is, hogy a calpain-3 gén mutációja a harántcsíkolt izmokat érintő Limb-Girdle izomdystrophia egyik változatának kialakulásához vezet (Richard és mtsai, 1995).

Patkányok különböző szívpreparátumain és *in vitro* végzett kísérletek közvetetten igazolták, hogy a μ -calpain a vad típusú (WT) cTnI molekulát legalább 3 különböző helyen képes hasítani (Gao és mtsai, 1997; McDonough és mtsai, 1999). A cTnI molekula primer aminosav-szekvenciájában bekövetkező fHCM-asszociált mutációk fontos hatással lehetnek a cTnI szekunder és terciér struktúrájára, sőt a cTnI troponin komplexben elfoglalt helyzetére is. Elképzelhető, hogy a PKA-mediált cTnI foszforiláció konformációra gyakorolt hatása is módosul a mutáns cTnI molekulákban. Így jogosan vetődik fel a gondolat, hogy a mutációk

ill. a PKA-mediált foszforiláció hatással lehetnek a cTnI μ -calpain-hasíthatóságára, befolyásolva a fehérje turnover-t és a szívizom kontraktilitását is.

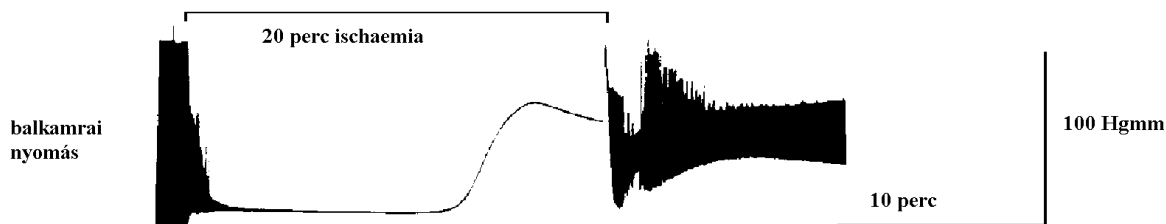
3. Az ischaemiás/reperfúziós myocardium károsodás és a calpainok

3.1. A szívizom metabolizmusának és kontraktilitásának változásai ischaemia/reperfúzió során

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 energiatermelés a csökkent oxigén ellátottság miatt alacsonyabb, mint az energiafelhasználás. Ennek következtében a szívizomzat leginkább energiaigényes funkciói szenvednek zavart, mint pl. a Ca^{2+} -homeostasis, így az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése következik be (Marban és mtsai, 1989; Eisner és mtsai, 1989; Elliott és mtsai, 1992; Piper és mtsai, 1998). Az anaerob anyagcserére kényszerült myocardiumban a pH is megváltozik, a H^+ akkumulációja következtében acidózis alakul ki az intra- és az extracelluláris térben egyaránt. Ennek szerepet tulajdonítanak a kontraktilis funkció ischaemia alatti csökkenésében (Allen és Orchard, 1987; Papp és Édes, 2000), mivel az alacsony pH csökkenti a kontraktilis rendszerben Ca^{2+} -érzékenyítő funkcióval rendelkező cTnC molekula Ca^{2+} -kötését (Kentish, 1991; Palmer és Kentish, 1994). Az említett anyagcsere változások a szív globális funkcióját tekintve először relaxációs zavar formájában tükröződnek, majd ezt követi a kontraktilis erő szisztolés csökkenése, kifejlődnek az elektromos diszfunkció jelei, és végül az ischaemiás eredetű fájdalom, az angina. Amennyiben az ischaemiát okozó érelzáródás megszűnik, megindulhat a reperfúzió, melynek során az extracelluláris pH és az oxigénellátás hamar normalizálódik. Ez azonban érdekes módon átmenetileg növeli a szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} -telítettségét (Marban és mtsai, 1989). Ezt a jelenséget részben azzal magyarázzák, hogy a sejtmembránon át megvalósuló H^+ kiáramlást a Na^+/H^+ antiport rendszeren keresztül jelentős Na^+ beáramlás kíséri, mely termodinamikailag előnytelenül érinti egy másik transzporter, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger működését, így az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció tovább emelkedik (Kloner és mtsai, 1998). 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 szívizomsejtek belső terében a Ca^{2+} koncentráció emelkedéséhez (Piper és mtsai, 1998; Bolli és Marban, 1999). A fentiek

alapján késő ischaemia és korai reperfúzió során a Ca^{2+} -tútelítettség kialakulásával egyaránt számolni kell, melynek szerepe lehet az ischaemiás/reperfúziós myocardium-károsodás létrejöttében (Marban és mtsai, 1989; Gao és mtsai, 1996; Bolli és Marban, 1999). A kórosan emelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció pathológiai szerepét azonban nagyban befolyásolja az ischaemiás periódus időtartama. Az 1-2 percig tartó, úgynevezett azonnal szűnő ischaemiát követően a kontraktilis funkció néhány másodperc után normalizálódik, azonban a 10–20 percig tartó teljes vérellátási hiány súlyosabb, de még mindig reverzibilis, úgynevezett myocardialis kábulatot („stunning”) idéz elő (Opie, 1992; Kloner és mtsai, 1998). Ezekben az esetekben a vérkeringés helyreállítását követően 15-20 perc alatt bekövetkezik a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció normalizálódása (Gao és mtsai, 1995). A myocardium egyértelműen életképes, nekrozistól mentes marad, ennek ellenére a szívizom kontraktilitása rövidebb-hosszabb ideig (órák-napok) továbbra is károsodott lehet. Ez az úgynevezett „myocardialis stunning” klasszikus megjelenése. A sejtek tehát a túléléshez nélkülözhetetlen reperfúzióból azonnal nem profitálnak.

A csökkent kontraktilitású, de életképes szívizomzatnak a működészavarát különböző állatmodelleken vizsgálták. A szívizomzat ischaemiás/reperfúziós funkciózavarai jól követhetők - a valós viszonyokat sok szempontból helyesen modellező - izolált szíveket alkalmazó kísérletekben (Gao és mtsai, 1995 és 1996) (2. ábra). Ezen megközelítés alapja az, hogy a leggyakrabban kis állatokból (pl. patkány) eltávolított szív koszorúsér-keringését (az aortába rögzített kanülön keresztül történő retrográd) perfúzió révén fenntartják (Langendorff-szív). Ily módon, a kamrák funkciója *ex vivo* körülmények között több órán keresztül tanulmányozható, a balkamrai nyomás pedig mérhető. A perfúzió megszüntetése ilyenkor az egész szívre kiterjedő ún. globális ischaemiát hoz létre, mely a kontraktilis erő néhány perc alatti teljes megszűnését vonja maga után. A balkamrai nyomásban ilyenkor kialakuló zuhanás tehát az oxigénhiányossá tett izomszövet pumpafunkciójának rohamos csökkenésére hívja fel a figyelmet. Az 2. ábrán egy Langendorff-szerint perfundált patkányszív bal kamrai nyomásváltozásait egy 20 percig tartó globális ischaemiás periódus előtt, alatt és után tüntettük fel. Az ischaemia kezdetét követően a bal kamrai nyomás gyorsan megszűnt, 10-15 perc elmúltával ischaemiás kontraktúra (Papp és mtsai, 2002) alakult ki. A reperfúziót halmozott arrythmiák követték, majd a kamranyomás egy a pre-ischaemiához viszonyított csökkent funkcionalitású szinten stabilizálódott (kábult myocardium, stunning).



2. ábra. Langendorff-szerint perfundált izolált patkány szív balkamrai nyomásváltozásai egy 20 percig tartó globális ischaemiás periódus előtt, alatt és után.

Az ischaemia kezdetét követően a balkamrai nyomás gyorsan megszűnt, 10-15 perc elmúltával ischaemiás kontraktúra alakult ki. A reperfüziót halmozott arrhythmia követék, majd a kamranyomás egy, a pre-ischaemiához viszonyított csökkent funkcionális szinten stabilizálódott (kábult myocardium, stunning). (Az illusztrációként használt ábra témavezetőm mérési anyagából származik.)

3.2. A reverzibilis ischaemiás/reperfüziós myocardium károsodás kialakulásának feltételezett mechanizmusa – calpain teória

A napjainkban leginkább elfogadott álláspont szerint a reverzibilisen csökkent myocardialis pumpafunkció magyarázata a károsodott kontraktilis fehérjerendszer csökkent Ca^{2+} -reaktivitása (Bolli és Marban, 1999). E jelenség háttérében akut ultrastrukturális károsodások keresendők, melyek intracelluláris fehérjéket érintenek. A fehérjekárosodások létrejöttében egy Ca^{2+} -függő proteolitikus folyamat szerepe bizonyítottan látszik (Matsumura és mtsai, 1996; Kloner és mtsai 1998). Specifikus proteáz inhibitorokkal végzett kísérletek alapján a proteolízis nagy valószínűséggel a már említett neutrális intracelluláris proteázhoz, a μ -calpainhoz kapcsolható (Matsumura és mtsai, 1993; Yoshida és mtsai, 1995; Gao és mtsai, 1996 és 1997). Az enzim aktiválódását a késő ischaemia és korai reperfüzió során kialakuló Ca^{2+} -túltöltődés triggereli és ez indítja be a proteolitikus változásokat (Gao és mtsai, 1995 és 1996). A károsodott fehérjék cseréje illetve újrászintetizálása időt igényel, ez magyarázná az órákig - napokig tartó funkcionális zavart (Gao 1997, Bolli és Marban, 1999). 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 (Bolli és mtsai, 1999). A legújabb vizsgálati eredmények alapján azonban az is felmerült, hogy a proteolitikus aktivitáshoz a szabadgyökök által aktivált matrix metalloproteináz-2 enzim (MMP-2) működése is hozzájárulhat (Wang és mtsai, 2002a és 2002b).

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 (Toyo-Oka és Ross, 1981;

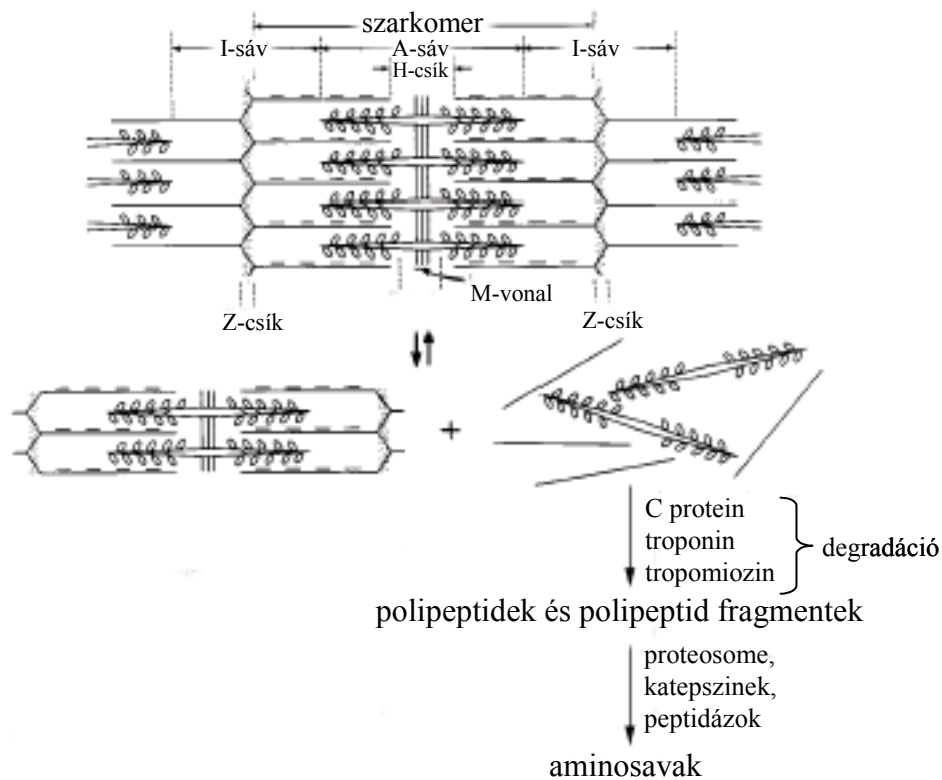
Kusuoka és mtsai, 1987). Így nem meglepő, hogy a legtöbb adat a cTnI-ra vonatkozóan található (Westfall és Solaro, 1992; Gao és mtsai 1996 és 1997; Van Eyk és mtsai 1998; McDonough és mtsai 1999; Murphy és mtsai 2000). Állatkísérletes modelleken közvetetten igazolták, hogy az ischaemiás/reperfúziós anyagcserezavar kapcsán a μ -calpain egy 17 aminosavból álló polipeptid egységet hasít le a cTnI C-terminusáról (Gao és mtsai, 1997; McDonough és mtsai, 1999). 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 (Murphy és mtsai, 2000). Postischaemiás szívizommintákkal végzett biokémiai meghatározások során azt is felismerték, hogy a cTnI bomlása a C-terminális 17 polipeptidből álló szekvenciájának leválása után is folytatódik (McDonough és mtsai, 1999). A második hasítási hely a cTnI N-terminálisától számított 63., a harmadik a 73. aminosavnál valószínűsíthető (1. ábra). A cTnI proteolízise a szívizom károsodott relaxációs képességéhez vezet, ami a stunning egyik karakterisztikus jellemzője, alátámasztva, hogy a cTnI degradáció fontos tényezője a myocardiális stunningnak (Lüss és mtsai, 2000). Azonban nagytestű állatokon nem sikerült igazolni az említett fehérje postischaemiás károsodását (Thomas és mtsai 1999; Lüß és mtsai 2000; Feng és mtsai 2001; Kim és mtsai 2001).

A regulatórikus cTnT a troponin komplex Tm-t kötő tagja. A szívizomban differenciáltsági foktól függően 4 különböző izoforma expresszálódik, ezeket T1-T4-ig számozzuk. A szám növekedésével csökken az expressziójuk esetén tapasztalt Ca^{2+} -affinitás. Felnőtt, differenciálódott szívizomban szinte csak a T3-as izoforma expresszálódik (Anderson és mtsai, 1995; Adamkova és Pelouch, 1999). A cTnT molekulák két lokalizációban figyelhetők meg a sejtben: a molekulák döntő többsége myofibrillumhoz kötött, kisebb részük a citoplazmában szolubilis formában található (Katus és mtsai, 1991). Ez utóbbi feltehetően azonnal mobilizálható prekurzorként szolgál a troponin komplex kialakulásánál (Adamkova és Pelouch, 1999). *In vitro* adat van arra vonatkozóan, hogy ez a fehérje is bomlik μ -calpain hatására (Westfall és Solaro, 1992; Di Lisa és mtsai, 1995), és a degradáció az aktin-miozin interakció megváltozásához vezet. Bonyolíthatja a képet, hogy a cTnI és cTnT molekulákból lehasadó degradációs termékeket transzglutamináz (TG) aktivitású enzimek más myofibrilláris fehérjékhez kapcsolhatják. Ilyen kovalens komplexeket a cTnI hasításából keletkező degradált proteinek vonatkozásában is azonosítottak (McDonough és mtsai, 1999). A humán myocardium ischaemiás károsodásának diagnosztikájában a troponin komplex (elsősorban a cTnI és a cTnT)

bomlástermékeinek vérplazmában történő felismerése jelenleg központi helyen szerepel (Katrukha és mtsai, 1998). Az is elég meggyőző adat, hogy stunned myocardiumból izolált troponin komplexet átültetve a vázizomba csökkent Ca^{2+} -érzékenységet tapasztaltak (McDonald és mtsai, 1998). 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 (Suzuki 1984; Kay 1984b; Kim és mtsai, 1995; Suzuki és mtsai, 1996; Huff-Lonergan és mtsai, 1996), 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) (Sasaki és mtsai, 1984, Fischer és mtsai, 1986). Az enzim inkább a szubsztrátok magasabb rendű struktúráit ismeri fel és azonosítja hasítási helyként (Harris és mtsai, 1988; Croall és mtsai, 1996; Stabach és mtsai, 1997). Vázizom-preparátumokat használó kísérletekben calpain-kezelés hatására a harántcsíkolt struktúra jellegzetes változása következett be, mely alapul szolgált az enzimhatás élettani működésének feltárásához is (3. ábra). 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-csíkok teljes eltűnéséhez vezet. Miután a calpain kiszabadította a fehérjéket a filamentámentáris rendszerből és nagy fragmentumokká hasította („előhasította”) őket (Goll és mtsai, 2003), más proteázok (proteosome, katepszinek, peptidázok) tehetik teljessé a fehérje lebomlást (Solomon és Goldberg, 1996; Eble és mtsai, 1999; Goll és mtsai, 2003).

Figyelemre méltó, hogy számos eredmény került közlésre annak alátámasztására, hogy a kábult myocardium pathogenezisében a szívizomsejteket érő strukturális fehérjék károsodás is szerepet kap (Kim és mtsai 1995, Matsumura és mtsai 1996; Yoshida és mtsai, 1995; Van Eyk és mtsai, 1998; Papp és mtsai, 2000). 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-csíkok egységét, ami elsősorban a struktúra károsodása miatt vezet jelentős kontraktilitás-diszfunkcióhoz.



3. ábra. A harántcsíkolt izom myofibrilláris fehérjék turnover/degradáció modelljének sematikus ábrája. Két Z-csík közötti szakasz egy szarkomernek felel meg. Az I-sávban szereplő vékony vonalak a vékony filamentumokat, az A-sávban a vastag vonalak a vastag filamentumokat tüntetik fel. A vékony filamentumok mentén rendeződött troponinokat szaggatott vonallal ábrázoltuk. A titin és a nebulin/nebulette nincs feltüntetve az ábrán, hogy elkerüljük annak túlzásfoltosságát. A calpain számára hozzáférhető titin és nebulin/nebulette hasítását követően a Z-csík fehérjék kötési felszakadnak, kiszabadulnak a felszínesen elhelyezkedő α -aktinin, a vékony és vastag filamentumok. A megmaradt, de vékonyabb miofibrillumok épek, kontrakcióra képesek. A kiszabadult filamentumok pedig vagy újra filament rendszerbe rendeződnek, vagy további hasításon mennek keresztül, és végül más proteázok által teljesen degradálódnak.

A degradációs folyamatban feltételezhetően érintett struktúrfehérjékről is egyre több információval rendelkezünk.

A titin, vagy más néven connectin 3000-3700 kDa-os molekulatömegével az eddig ismert legnagyobb méretű izomfehérje. A Z-csíkok és M-vonalak közötti tereket hidalja át. Hatalmas „interface” molekulaként fontos szerepe van a myofibrillumok strukturális és regulatórikus fehérjéinek összerendezésében, közvetlen ligandjai a T cap fehérje, α -aktinin, aktin, calpain p94, miozin, C protein és miomezin (Gregorio és mtsai, 1999). Rendelkezik továbbá foszforilációs helyekkel és szerin/treonin kináz doménnel. A titin kulcsfontosságú a szarkomer passzív és aktív mechanikai sajátosságainak meghatározásában. A passzív izomfeszülés legfőbb intracelluláris meghatározója, valamint képes érzékelni a szarkomerhosszban bekövetkező változásokat, ezáltal szabályozni a myofilamentumok Ca^{2+} -

érzékenységét (Neagoe és mtsai, 2002). A humán szívizomban szövet-specifikus alternatív „splicing” mechanizmussal két eltérő hosszúságú izoforma expresszálódik, egy nagyobb és elasztikusabb (N2BA, 3300 kDa) és egy rövidebb és merevebb (N2B, 3000 kDa) (Freiburg és mtsai, 2000). A titin szerkezeti változásainak fontos szerepet tulajdonítanak a myocardialis megbetegedések pathogenezisében is, mint pl. a citoskeletális remodellingben, a szívelégtelenségben és a pacing tachycardiában (Bell és mtsai, 2000; Neagoe és mtsai, 2002). Autoszomális dominánsan öröklődő dilatatív cardiomyopathiában (DCM) titin mutációt is találtak (Gregorio és mtsai, 1999), melynek fontos szerepet tulajdonítanak a betegség pathomechanizmusában. A harántcsíkolt izmot érintő Duchenne (DMD), Fukuyama (Matsumura és mtsai 1990), és a Limb-Girdle izomdystrophiában (Richard és mtsai 1995) pedig titin degradációt írtak le. Azt is kimutatták, hogy a titin érzékeny a calpainra, az enzim először az β -connectinné, majd további kisebb fragmentumokra hasítja (Zeece és mtsai, 1986; Hu és mtsai, 1989; Granzier és Irving, 1995; Huff-Lonergan és mtsai, 1996). Így logikusan vetődik fel, hogy a titin a myocardialis stunning során is potenciális célfehérje lehet.

A fodrin sejt/szövet-specifikusan expresszálódó, α és β alegységekből tetramert formáló struktúrfehérje. Hálózatos rendszert alkot a sejtmembrán alatt, ahol komplex kapcsolatot hoz létre a membrán és a citoskeletális rendszer között. Az aktint keresztkötve indirekt módon hat egyéb intracelluláris fehérjék szerveződésére, másrészt felelős a membránfehérjék rendeződésének megtartásáért, asszociálódik a sejtmembrán ioncsatornáival és pumpáival és felel a „szinaptikus transzmisszióért” is (Isayama és mtsai, 1993; Winkelmann és Forget, 1993; De Matteis és Morrow, 2000). Lokalizációs vizsgálatokkal kimutatták, hogy a fodrin fellelhető a T tubulusoknál, a Z-csíkoknál, és a discus inetrclarisoknál is. *In vitro* μ -calpain-indukált fodrin degradációs vizsgálatok során a fodrin membrán- és aktin-asszociációja allosztérikusan gátolt állapotba került (Hu és Bennett, 1991). Fodrin nélkül a sejtek ozmotikusan és mechanikailag egyaránt fragilissá váltak (Doctor és mtsai, 1993), megváltozott a szarkolemmális ioncsatornák és pumpák helyzete és működése, továbbá a gap junctionok dezorganizációja jött létre (Yoshida és mtsai, 1995). Többen igazolták, hogy az α -fodrin calpain-érzékeny fehérje illetve, hogy állatkísérletes modellekben degradálódik stunning során (Harris és mtsai, 1988; Yoshida és mtsai, 1995; Nath és mtsai, 1996; Matsumura és mtsai, 1996, Aki és mtsai, 2002). Degradációja Calpain Inhibitor I-el, vagy a reperfüzió alatt a Ca^{2+} koncentráció alacsony szinten tartása mellett kivédhető (Yoshida és mtsai, 1995).

A dezmin a szívizomsejtek citoskeletális rendszerében, hasonlóan más eukarióta sejtekhez, fontosnak tartják az intermedier filamentumok alkotásában. Döntően a Z-vonalak perifériáján helyezkedik el, így részt vesz a Z-csíkok szerkezeti stabilizálásában, a myofibrillumok egymáshoz és a szubsarkolemmális sejtvázhoz való rögzítésében is (Richardson és mtsai, 1981; Yagyú és mtsai, 1990). A dezmin esszenciális szerepére utal a dezmin null-mutációt hordozó egérmodellekben észlelt szívizomdegeneráció (Milner és mtsai, 1996; Thornell és mtsai, 1997). Izolált patkány szívizomsejteken μ -calpain hatására a harántcsíkolt gyors eltűnését és a Ca^{2+} -ra adott kontraktilis válasz csökkenését észlelték, melyet a dezmin degradációja kísért (Papp és mtsai, 2000). Így a dezmin degradációjával stunning során feltehetőleg szintén számolni kell (Matsumura és mtsai, 1996).

Az α -aktinin szintén a Z-csíkoknál lokalizálódó struktúrfehérje, ahol antiparalel dimereket képez összekötve az aktin filamentumok végeit (Isayama és mtsai, 1993). Amennyiben az α -aktinint eltávolították a filament rendszerből, károsodott az aktin-miozin kapcsolat során generált erő hatékony tovaterjedése, valamint feltehetően a megváltozott interfilamentáris távolságok miatt csökkent a keresztkötések kialakulásának valószínűsége is (Van Eyk és mtsai, 1998). Ezért nem meglepő, hogy az α -aktinin eltávolítása a miozin ATP-áz gátlásához és csökkent kontraktilitáshoz vezetett. Feltételezhető, hogy az α -aktinin molekulának fontos szerepe van a miozin ATP-áz maximális aktivitásának szabályozásában is (Malhotra és mtsai, 1986). Calpain hatására észlelték az α -aktinin myofibrillumokból való kiszabadulását és a Z-csíkok eltűnését is (Dayton és mtsai, 1976). Ugyanakkor azt is kimutatták, hogy az α -aktinin ugyan lassan és limitált módon, de degradálódhat (Goll és mtsai, 1991), amely a stunning során is bekövetkezhet (Matsumura és mtsai, 1996; Van Eyk és mtsai, 1998).

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy jelenleg még nincs egyetértés abban, hogy: (1) melyek a stunninghoz kötött proteolízis által elsősorban károsított fehérjestruktúrák (Westfall és Solaro, 1992; Sato és mtsai, 1993; Yoshida és mtsai, 1995; McDonald és mtsai, 1995; Matsumura és mtsai, 1996; Gao és mtsai, 1996; Van Eyk és mtsai, 1998; Thomas és mtsai, 1999), (2) ezek milyen módon viszonyulnak a megváltozott myofibrilláris funkcióhoz (Bolli és Marban, 1999), (3) az eddigi állatkísérletekből feltárt összefüggések milyen mértékben vonatkoztathatók a humán szívizomzat ischaemiás/reperfúziós károsodására (Kloner és mtsai, 1998).

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-érzékenységében?
7. A myocardialis 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

1. Tisztított cTnI molekulák

Kísérleteinket a Bochumi Egyetemen molekuláris biológiai módszerekkel előállított, rekombináns cTnI molekulák felhasználásával végeztük. Négyféle cTnI molekula áll rendelkezésünkre: a vad típusú (WT) és 3 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 (2001) valamint Reiffert és mtsai (1998) leírása szerint történt. A WT és a mutáns fehérjéket *E.coliban* overexpresszálták, majd CM-Sepharose fast flow (Pharmacia) és affinitás kromatográfia segítségével tisztították. A rekombináns fehérjék molekulatömegét tömegspektrometriával (Reiffert és mtsai, 1999), tisztaságát SDS-PAGE (15 %-os homogén poliakrilamid) segítségével ellenőrizték. Azon cTnI molekulák, amelyek nem kerültek felhasználásra, -20 °C-on kerültek tárolásra a következő összetételű oldatban (pH 7,0) (mM-ban): MOPS 10, KCl 300, DTT 1,5 és glicerol 60 %.

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 (Deng és mtsai, 2001). Ezt csökkenő urea koncentrációjú, magas sótartalmú pufferben való dialízisek követték, melyeknél a sótartalmat lépésről lépésre csökkentették. A troponin komplex képződés hatékonyságát analitikai gélfiltrációval ellenőrizték (Pharmacia Sephadex G-75). Szükség esetén a komplexbe be nem épült troponin alegységeket gélfiltrációval eltávolították.

A WT és a mutáns cTnI molekulákat a PKA katalitikus alegységével a Ser-22 és Ser-23 pozícióknak megfelelően korábbi leírás szerint foszforilálták (Deng és mtsai, 2001). Az izolált cTnI alegységek foszforilálásához 80 mU PKA/mg cTnI, a troponin komplexben levő WT cTnI és G203S mutáns foszforilálásához 160 mU/mg fehérje, a komplexben levő R145G és K206Q mutánsok foszforilálásához 120 mU/mg fehérje enzim mennyiséget használtak. Ilyen paraméterek mellett az összes cTnI molekula esetén hasonló foszforiláltsági szintet értek el. 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. További felhasználásig a mintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

2. Szövetminták

A kamrai szövetmintákat humán bal kamrai területekről nyertük. 2 minta dilatatív cardiomyopathiában szenvedő, Battista műtéten átesett betegből (NYHA III-IV), 3 további minta technikai okok miatt transzplantációra fel nem használt egészséges donor szívekből származott. A mintákra vonatkozó adatokat az 1. táblázatban tüntettük fel. A biopsziás anyagok mintavétel után azonnal folyékony nitrogénbe kerültek és azokat további felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tároltuk. A vizsgálatok a helyi Etikai Bizottság jóváhagyásával történtek.

	nem	kor	alapbetegség	gyógyszerelés
Donor 1	nő	37	-	-
Donor 2	férfi	56	-	-
Donor 3	férfi	18	-	-
Beteg 1	férfi	55	DCM	ACE, D, AK, DI
Beteg 2	férfi	65	DCM	ACE, D, AK, N

1. Táblázat. A szívizom mintákra vonatkozó adatok

DCM: dilatált cardiomyopathia, ACE: ACE inhibitor, D: diuretikumok, AK: antikoaguláns, DI: digitális, N: nitrátok.

3. 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) $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 100 μl össztérfogatban a következő összetételű pufferben inkubáltuk (mM-ban): KCl 30, imidazol 15, NaCl 5, MgCl_2 1, EGTA 1, EDTA 1 és DTT 0,5, CaCl_2 5, 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 (23 μl) és a mintákat azonos térfogatú 2x töménységű SDS mintapufferben $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 3 ml Ca^{2+} -mentes pufferben reszuszpendáltuk és mechanikus potter segítségével homogenizáltuk. A puffer összetétele (mM-ban): KCl 30, imidazol 15, NaCl 5, MgCl_2 1, EGTA 1, EDTA 1 és DTT 0,5, pH 7,5. Továbbá, minden reakció elegy tartalmazott Phosphatase Inhibitor Coctail I-et (1 μl /500 μg fehérje; Sigma). A homogenizátumok fehérje koncentrációját Bradford módszer szerint BSA standardot használva 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 össztérfogatban 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 (4 % SDS, 124 mM TRIS-HCl, 20 % glicerol, 40 mM DTT) 100 °C-on 3 percig szolubilizáltuk. Kontrollként Calpain Inhibitor I (0,3 mM, Calbiochem) jelenlétében illetve Ca^{2+} nélkül végzett inkubációk szolgálták. A μ -calpain-mentes, de Ca^{2+} -ot tartalmazó közegben végzett inkubációk a minták endogén proteolitikus aktivitásáról való tájékozódást szolgálták.

4. 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 fehérjénként különböző koncentrációjú SDS-poliakrilamid géleken (titin: 4 %, α -fodrin and α -aktinin: 7 %, dezmin: 10 %, cTnT és cTnI: 15 %; Mini Protean II, Bio-Rad) Laemmli protokoll szerint (Laemmli 1970; Wiley és mtsai, 1996), titin esetében fedő gél nélkül, a többi fehérje esetében fedő gél alkalmazásával (5 %) azonos fehérje mennyiséget tartalmazó homogenizátumokat szeparáltunk (6 μg az ezüstoffestéshez és 12 μg a Western immunoblothoz, kivéve a titint, mely esetben 20 illetve 50 μg -ot használtunk). Tisztított cTnI molekulák elválasztásakor a gélekre felvitt fehérjemennyiség izolált molekuláknál 0,2 μg , komplexben levő molekuláknál 0,5 μg volt. Az elektroforézis során a futtatáshoz használt áramerősség titin esetében 10, a többi fehérje esetén 120 mA/gél volt.

5. Ezüsfestés

A fehérjemintázatot a homogenizátumok esetén ezüsfestéssel tettük láthatóvá, melyet Giulian és mtsai ajánlása szerint végeztünk (Giulian és mtsai, 1983). SDS-PAGE-et követően a poliakrilamid géleket etanosol-formaldehides oldatban fixáltuk, majd érzékenyítő oldatban inkubáltuk egy éjszakán át. Tridesztillált vízben végzett többszöri mosást követően az inkubációt ezüstnitrát tartalmú oldatban folytattuk. Ismételt mosási ciklus után az előhívás formaldehid-citromsav tartalmú oldatban történt. Az optimális színintenzitás elérése után a reakciót ecetsav-etanolamin tartalmú oldattal állítottuk le. A fehérjék molekulatömegét Silver Standard (Bio-Rad) segítségével határoztuk meg, kivéve a titint és degradációs termékeit, mert azok molekulatömegét csak becsülni állt módunkban.

6. Western immunoblot

A homogenizátumok célzott fehérjéinek 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 (4 °C-on egész éjszakán át) követően 3x5 perces TTBS-ben mosásokat végeztünk. Majd a membránokat egérben termeltetett primer monoklonális antitestet (anti-titin, clone ab 7034 az Abcam-től, hígítás 1:1000; monoclonal anti- α -fodrin, clone AA6 az ICN-től, hígítás 1:1000; monoclonal anti- α -actinin, clone EA-53 a Sigma-tól, hígítás 1:5000; mouse monoclonal anti-desmin, clone DE-U-10 a Sigma-tól, hígítás 1:7000; monoclonal anti-cardiac TnT, clone 1A11 a Research Diagnostics-tól (RDI), hígítás 1:3000; mouse anti-human cTnI, clone 16A11, 22B11 és C5 az RDI-től, hígítás 1:10000, 1:6000 és 1:2000) tartalmazó 1 % tejporos TTBS-ben szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. Ez után ismét 3x5 perces mosási periódus következett TTBS-ben, majd 1 órás inkubáció következett szobahőmérsékleten peroxidáz-konjugált másodlagos antitestet tartalmazó 1 % tejporos TTBS-ben (Sigma, hígítás 1:2500). A folyamatot 3x5 perces mosás zárta TTBS-ben. Az immunkomplexeket felerősített kemilumineszcencia (ECL) módszerrel röntgen filmen tettük láthatóvá. A kapott jel intenzitása arányos volt a vizsgált fehérje membránon levő mennyiségével. A fehérjék molekulatömegét Prestained Standard (Bio-Rad) segítségével határoztuk meg.

7. A cTnI foszforilációs szintjének meghatározása

A Ca^{2+} -mentes homogenizátumokban a Phosphatase Inhibitor Coctail I (1 μl /500 μg fehérje) jelenléte meggátolta a fehérjék defoszforilációját, az SDS mintapufferben történő főzés pedig felfüggesztette az endogén proteolitikus aktivitást. Optikai denzitás – fehérje koncentráció kalibrációs görbéket vettünk föl, hogy meghatározzuk azt a fehérjemennyiséget, amely Western immunoblot módszernél nem telíti a jelintenzitást az összes cTnI- és a defoszforilált cTnI-specifikus antitestek használata esetén sem (egér anti-human cTnI, clone 16A11 és anti-human cTnI, clone 22B11 RDI-től). Majd minden mintából (3 donor és 2 DCM) azonos mennyiségű (9 μg) fehérjét választottunk el SDS-poliakrilamid géleken (15 %, Mini Protean II, Bio-Rad) és Western immunoblottot végeztünk mind a két cTnI-specifikus antitesttel (összes cTnI- és defoszforilált cTnI-specifikus antitest 1:10000 és 1:6000 hígításban az említés sorrendjében). A foszforilált cTnI-t, mely az összes és a defoszforilált cTnI közötti optikai denzitások különbségét reprezentálja, az összes cTnI arányában százalékosan fejeztük ki.

8. Eredmények értékelése/statisztika

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

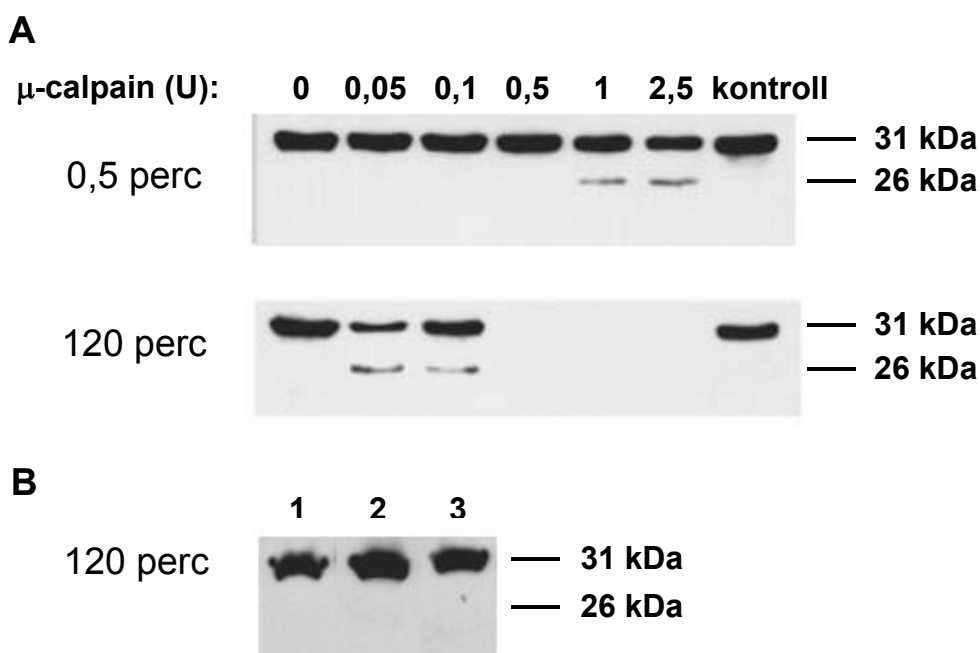
Homogenizátumok esetén a fehérjedegradáció mértékét az intakt molekulák enzimaktivitás- és időfüggő csökkenésén/eltűnésén keresztül illetve a degradációs termékek megjelenése alapján ítéltük meg. Adott μ -calpain aktivitás mellett a gyorsabban degradálódó fehérjéket tekintettük μ -calpain-érzékenyebbnak a lassabban degradálódóval szemben. A homogenizátumokon minden kísérletes körülmény esetén legalább 3 független kísérletet végeztünk. Az alacsony hőmérséklet és a Ca^{2+} -mentes közeg az endogén szöveti proteázokat gátolta az inkubáció előtt, az inkubáció végén pedig a hő-denaturáció és a mintapuffer állította le az enzimatis reakciót. Az általunk hozzáadott μ -calpain jelenlétében kapott proteindegradáció 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

1. Az izolált WT cTnI μ -calpain-mediált bomlásának aktivitás- és időfüggése

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. Az összehasonlítást izolált formában illetve troponin komplexben levő cTnI molekulák esetén is elvégeztük. Mivel minden molekula esetén rendelkezünk azok defoszforilált és PKA-biszfoszforilált változatával, lehetőségünk volt megvizsgálni a PKA foszforiláció proteolitikus folyamatban betöltött szerepét is.

Először a μ -calpain izolált WT cTnI-t bontó képességét az enzimaktivitás és az expozíciós idő függvényében határoztuk meg (4A. ábra). Azonos mennyiségű WT TnI fehérjét inkubáltunk egyre növekvő μ -calpain aktivitások (0, 0,05, 0,1, 0,5, 1 és 2,5 U) mellett. Az enzimatis reakciókat 0,5 percet vagy 120 percet követően állítottuk le. A Western immunoblot módszerrel készített regisztrátumon jól látható, hogy a WT cTnI bomlása a μ -calpain aktivitásának és az alkalmazott inkubációs időnek a növelésével párhuzamosan egyaránt fokozódott. Az anti-TnI antitesttel jelzett 31 kDa-os fehérjecsíkok intenzitásának a csökkenése vagy eltűnése az immunoblottokon (natív cTnI) a cTnI specifikus degradációjának a jele. Ezekben a kísérletekben az általunk használt monoklonális cTnI-specifikus antitest (clone C5) egyetlen, 26 kDa molekulatömegű degradációs terméket azonosított. Kis μ -calpain aktivitások jelenlétében (0,05 U és 0,1 U) viszonylag hosszú inkubációs időre (120 perc) volt szükség detektálható cTnI-bomlás előidézéséhez. Nagyobb μ -calpain aktivitások (0,5 U, 1 U és 2,5 U) azonban gyorsították a cTnI proteolízis ütemét, hiszen ezekben az esetekben a cTnI-re specifikus csíkok 120 percet követően teljesen eltűntek. Ez arra utalt, hogy a natív cTnI molekula kisebb, 26 kDa-tól különböző molekulatömegű fehérjefragmentumokra esett szét. A cTnI degradációját a Ca^{2+} -mentes reakcióközegben (kontroll, 4A. ábra) vagy 0,3 mM Calpain Inhibitor I jelenlétében (4B. ábra) végzett inkubációk 1 U μ -calpain jelenlétében is teljesen kivédtek (defoszforilált izolált, troponin komplexben található, és biszfoszforilált WT cTnI molekulákon). Ezért a cTnI bomlását egyértelműen a μ -calpain működéséhez rendelhetjük.



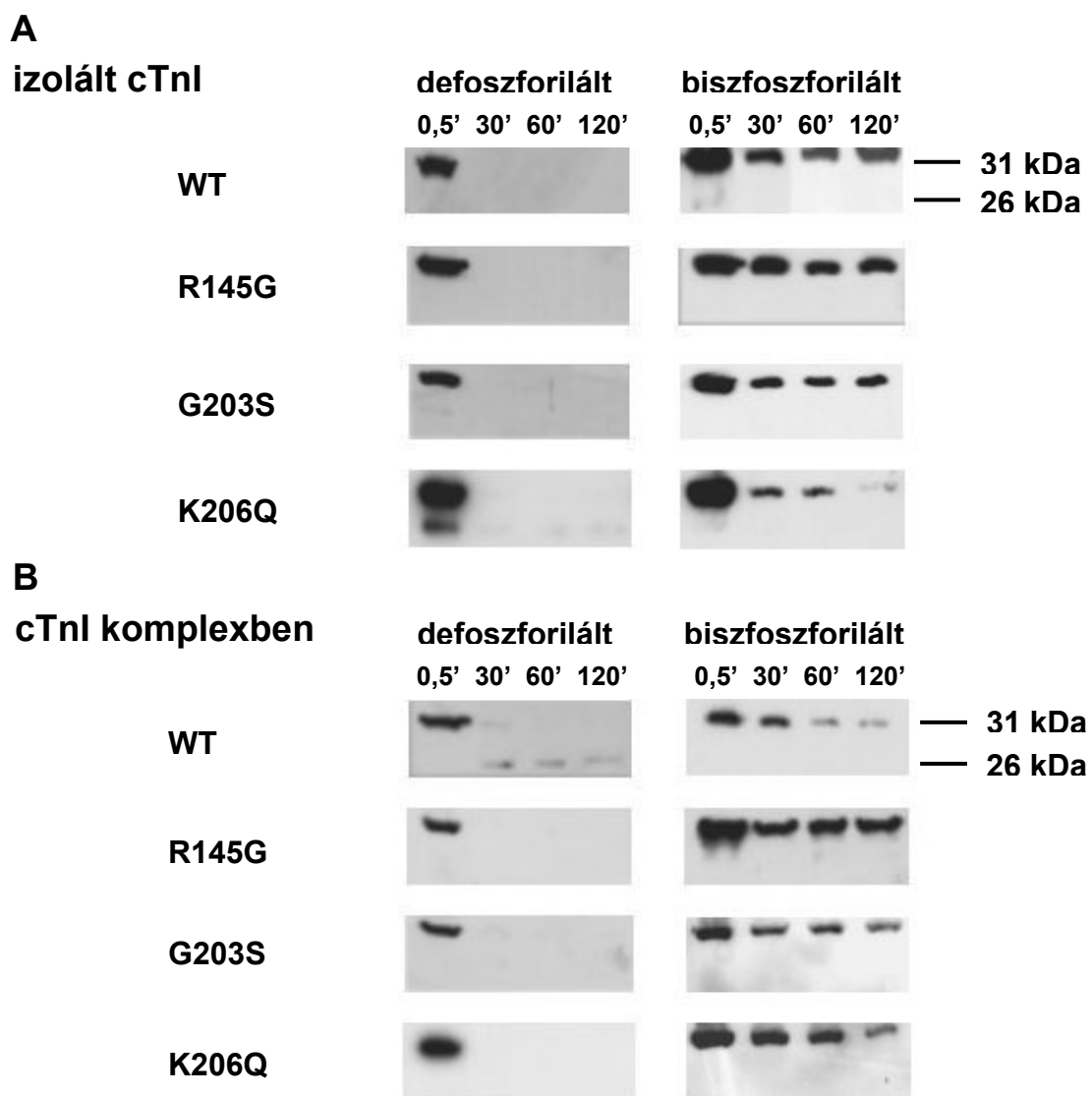
4. ábra. Az izolált WT cTnI μ -calpain-mediált bomlásának aktivitás és időfüggése. (A): Defoszforilált izolált WT cTnI (0,2 μ g/sáv) μ -calpain-mediált emésztésének eredménye Western immunoblottal illusztrálva. A különböző enzimaktivitások (0, 0,05, 0,1, 0,5, 1 és 2,5 U) mellett kapott eredmények egymás mellett, a 0,5 és 120 perces inkubációt követően kapott eredmények pedig egymás alatt vannak feltüntetve, $T=30^\circ\text{C}$. A Western immunoblothoz használt primer antitest: monoclonális anti-cTnI clone C5. A natív cTnI molekulát (31 kDa) és egy degradációs termékét (26 kDa) az ábra jobb oldalán külön megjelöltük. (B): 0,3 mM Calpain Inhibitor I jelenlétében végzett inkubáció képes volt kivédeni a különböző WT cTnI molekulák (defoszforilált izolált WT cTnI: 1, defoszforilált cTnI komplexben: 2, biszfoszforilált WT cTnI komplexben: 3) degradációját 1 U μ -calpain jelenlétében is.

2. 1 U μ -calpain proteolitikus hatása WT és mutáns cTnI molekulákon

A 4. ábrán bemutatott eredményeink alapján további kísérleteinkhez két különböző μ -calpain enzimaktivitást választottunk, melyek közül a nagyobb a WT cTnI teljes (1 U), a kisebb (0,25 U) parciális degradációját okozta. Ezáltal az 1 U μ -calpain aktivitás annak megítélésében segített, hogy valamely cTnI molekula mutat-e abszolút rezisztenciát a μ -calpain-mediált degradációval szemben, míg a 0,25 U enzimaktivitás alkalmazása a fehérjedegradációk közötti finomabb különbségeket segített felismerni. A fehérjedegradáció kinetikájának követésére 0,5, 30, 60 és 120 perc inkubációt követően mintákat vettünk.

A 5. ábra az izolált formában (A panel) és troponin komplexben (B panel) levő WT és az fHCM-asszociált mutáns cTnI molekulák 1 U μ -calpain jelenlétében végzett proteolízisét mutatja Western immunoblot módszerrel. Mindkét panelen feltüntettük a vizsgált cTnI molekulák PKA által biszfoszforilált formáin végzett emésztés eredményeit is. A 31 kDa-os defoszforilált natív cTnI csíkok gyors és egyöntetű eltűnése (az izolált és a komplexben levő

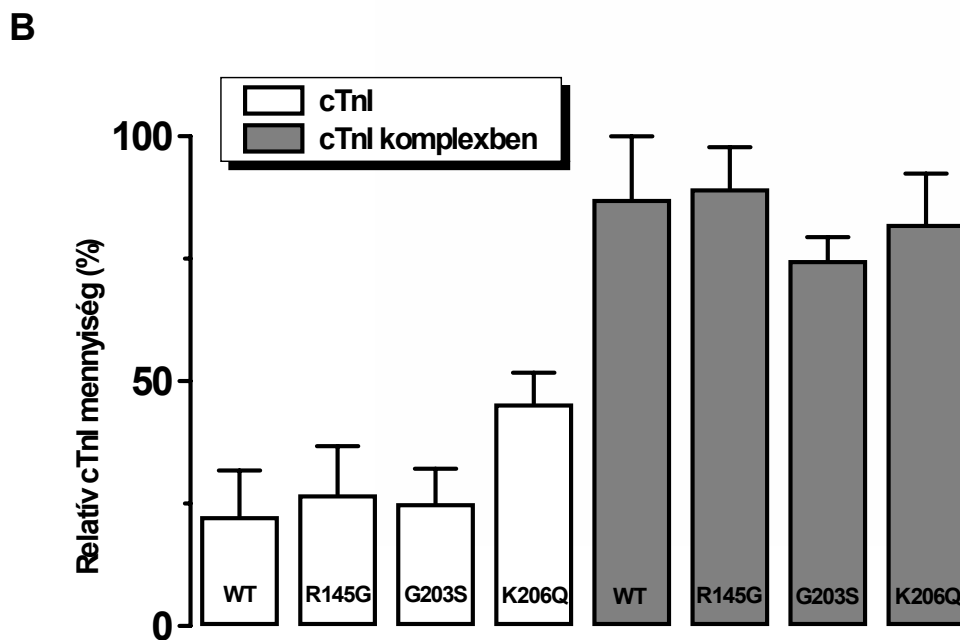
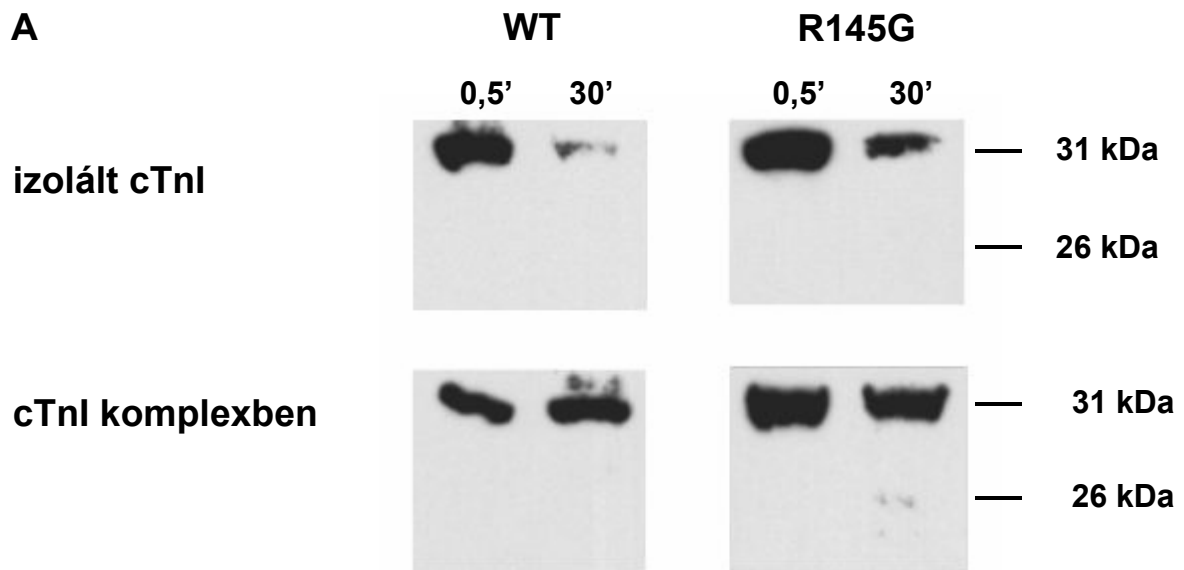
WT és mutáns - R145G, G203S és K206Q cTnI molekulák esetében egyaránt) arra hívja fel a figyelmet, hogy az fHCM-hez kapcsolt cTnI mutációk nem eredményeznek védelmet a μ -calpain-mediált proteolízissel szemben. A natív fehérje gyors degradációja és a véletlenszerűen és halványan feltűnő 26 kDa-os degradációs 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. A Ser-22 és Ser-23 foszforilációja ennek megfelelően részlegesen gátolta az 1 U μ -calpain proteolitikus hatását a WT és a mutáns cTnI molekuláknál egyaránt.



5. ábra. 1 U μ -calpain alkalmazásakor tapasztalt WT és mutáns cTnI bomlás. A különböző cTnI molekulákat (WT, R145G, G203S, K206Q) 1 U μ -calpain jelenlétében emésztettük izolált formában (felső panel) és troponin komplexben (alsó panel), illetőleg defoszforilált (bal oszlop) és PKA biszfoszforilált (jobb oszlop) formában. A Western immunoblotthoz anti-cTnI clone C5 primer antitestet használtunk. A natív molekulák (31 kDa) bomlásának időbeli változását egymás mellett tüntettük fel az inkubáció 0,5, 30, 60 és 120 percében.

3. 0,25 U μ -calpain proteolitikus hatása WT és mutáns cTnI molekulákon

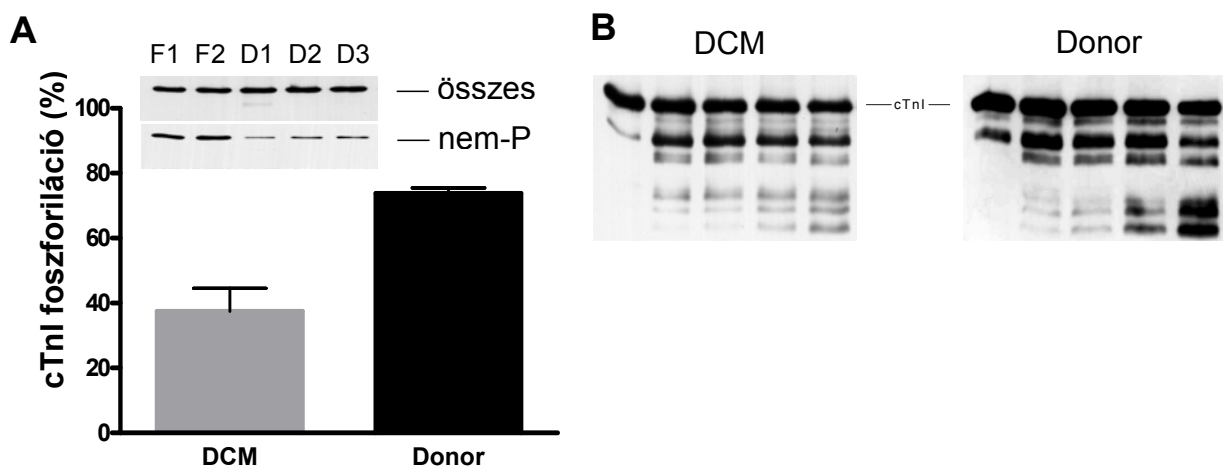
Annak meghatározására, hogy az egyes cTnI molekulák (izoláltan és troponin komplexben levő WT és mutáns cTnI molekulák) μ -calpain-érzékenység szempontjából különböznek-e, kisebb μ -calpain aktivitás (0,25 U) mellett is elvégeztük az inkubációkat. A 6A. ábrán az izolált és a komplexben levő WT cTnI és R145G mutáns emésztésének Western immunoblot eredményét mutatjuk be. Az így végrehajtott kísérletek 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 6B. ábra összesített oszlopdiagramjának százalékban kifejezett eredményei azt mutatják, hogy 30 perces 0,25 U μ -calpain jelenlétében végzett emésztés során mennyi marad az intakt molekulák szintje. Izolált WT, R145G, G203S és K206Q mutáns cTnI esetén ez az érték 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.



6. ábra. Izolált és komplexben található cTnI molekulák μ -calpain-mediált proteolízisének összehasonlítása (A): A WT és az R145G mutáns cTnI 30 perces 0,25 U μ -calpain jelenlétében végzett proteolízisének Western immunoblot eredménye izolált cTnI molekulák (felül) és troponin komplexben található cTnI molekulák (alul) esetén **(B):** A különböző típusú cTnI molekulák (WT és mutáns, izolált és komplexben levő), 0,25 U μ -calpain jelenlétében végzett proteolízisei során (30 perc) az emésztetlenül maradt molekulák aránya %-osan kifejezve, a Western immunoblotok denzitometriás értékelése alapján. A számok 4-10 független emésztés eredményét tükrözik, átlag \pm S.E.M.

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

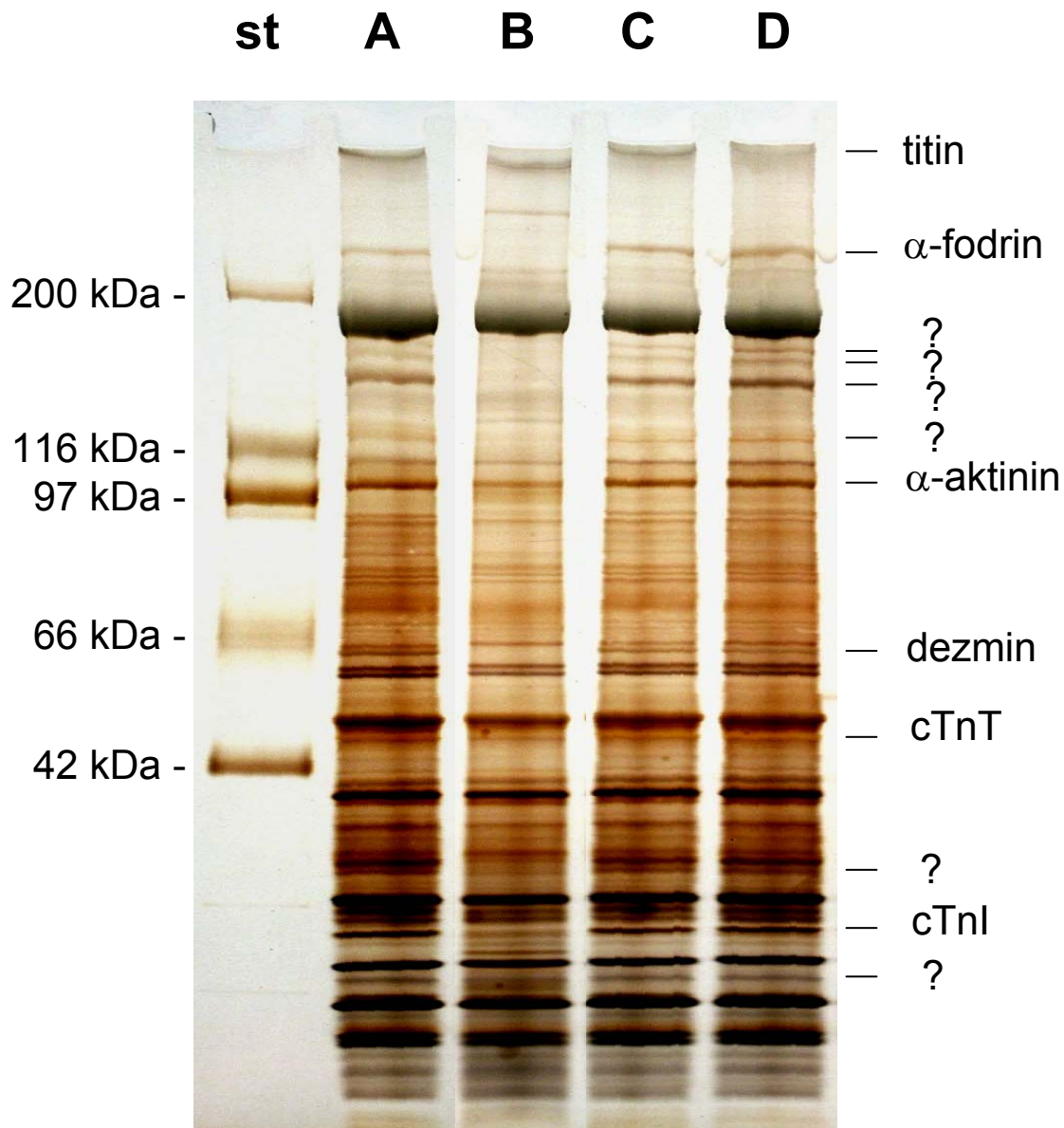
Kíváncsiak voltunk, hogy a szívelégtelenségben szenvedő betegek szív mintáiban csökken-e a cTnI molekulák PKA foszforilációs szintje. Az egyes minták (DCM-ás és donor) foszforilációs szintjét (7A. ábra betét) indirekt módszerrel határoztuk meg. cTnI foszforilációs állapotra nem érzékeny primer antitesttel (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 szív minták (F1 és F2), mint a donor (D1, D2 és D3) minták esetén. A DCM-ás illetve a donor szív minták cTnI molekuláinak foszforilációs szintje az eredmények denzitometriás értékelése alapján $37 \pm 7\%$ és $62,5 \pm 2\%$ -nak adódott (7A. ábra). A cTnI foszforilációs szintben mutatkozó szignifikáns különbség ellenére ($P < 0,05$) nem találtunk lényeges különbséget a donor és dilatált szívek μ -calpain mediált cTnI degradációjában (7B. ábra).



7. ábra. A cTnI foszforilációs szintje és μ -calpain-mediált proteolízise közti összefüggés. Az A panelen a donor (D1, D2 és D3) és a beteg (DCM) szívek (F1 és F2) homogenizátumaiban (Ca^{2+} -mentes minták) cTnI foszforilációs állapottól függetlenül (anti-human cTnI, clone 16A11) és defoszforiláció-specifikus (anti-human cTnI, 22B11) antitestek segítségével kapott Western immunoblot látható (inzert). Az összes és a defoszforilált cTnI molekulák mennyiségének denzitometriás értékelése látható az oszlopdiaagramon ($n=3$, átlag \pm S.E.M.). A beteg (bal) és a donor (jobb) szív minták Ca^{2+} és 1 U μ -calpain-indukált cTnI degradációját 120 perc inkubációt követően a B panel hasonlítja össze. A degradáció változását az időben (0, 5, 15, 30, 60 és 120 perc) egymás mellett ábrázoltuk. Az anti-cTnI clone 16A11 primer antitest számos cTnI degradációs termék detektálására alkalmas.

5. A μ -calpain proteolitikus hatása bal kamrai szövethomogenizátumon

A μ -calpain humán myofibrilláris fehérjéket érintő általános proteolitikus hatásairól kamrai homogenizátumokon végzett emésztéssel tájékozódunk. Az eredményt ezüstoffestett gradiens SDS-poliakrilamid gélen tüntettük fel (8. ábra).



8. ábra. Humán bal kamrai homogenizátum fehérje mintázatában μ -calpain hatására bekövetkező változások. Az ezüstoffestett gradiens (6-18 %) SDS poliakrilamid gélen elválasztott fehérjék 0,5 perces Ca^{2+} - és μ -calpain-mentes (A sáv, kontroll); 120 perces 5 U μ -calpain és Ca^{2+} jelenlétében (B sáv); 120 perces Ca^{2+} - és μ -calpain-mentes (C sáv); valamint 120 perces 5 U μ -calpain, Ca^{2+} és 0,3 mM Calpain Inhibitor I jelenlétében (D sáv) végzett kezelések eredményeit mutatja. A B sáv proteolízis hatására intenzitás-csökkenésen átesett fehérjecsíkjainak pozícióit a jobb oldali vonalak mutatják. A lebomlott molekulák pozíciói molekulatömeg alapján megfelelhetnek néhány jelentős mennyiségben expresszálandó szívizomfehérjének (jobb oldal). A molekulasúly standardok a bal oldalon láthatók. Az öt különböző szív mintán három független emésztés esetén hasonló eredményeket kaptunk.

A példaként választott homogenizátum Ca^{2+} -mentes kontroll fehérjemintázatát (A oszlop) összehasonlítva a 120 percig 5 U μ -calpain jelenlétében inkubált homogenizátum fehérjemintázatával (B oszlop), 12 különböző fehérje pozícióban jelentős intenzitás-csökkenést észleltünk. A fehérjecsíkok intenzitásának csökkenése (akár teljes eltűnése) vagy előzőleg nem detektálható, μ -calpain hatásra megjelenő új fehérjecsíkok a fehérje degradáció jelenségére utaltak. Némely eltérés olyan molekulatömeg tartományban jelentkezett, mely hasonló a korábbi adatok alapján a myocardium postischaemiás károsodásában feltehetően szerepet játszó myofibrilláris fehérjék molekulatömegéhez. Amikor az inkubáció előtti Ca^{2+} -mentes kontroll minta (A oszlop) fehérjemintázatát a 120 perces Ca^{2+} és μ -calpain-mentes inkubációval (C oszlop), illetve 0,3 U Calpain Inhibitor I és 5 U μ -calpain jelenlétében (D oszlop) kapott eredményekkel hasonítottuk össze, nem találtunk különbségeket. Ez arra utal, hogy Ca^{2+} -mentes közegben illetve Calpain Inhibitor I jelenlétében nincs μ -calpain mediált fehérje-degradáció, valamint arra, hogy a Ca^{2+} jelenlétében talált fehérje bomlás ebben a rendszerben a μ -calpain aktivitásának tulajdonítható.

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

Korábbi kísérletes eredmények (Westfall és Solaro, 1992; Di Lisa és mtsai, 1995; Kim és mtsai, 1995; Yoshida és mtsai, 1995; Matsumura és mtsai, 1996; Gao és mtsai, 1997; Van Eyk és mtsai, 1998; McDonough és mtsai, 1999; Murphy és mtsai, 2000; Papp és mtsai, 2000) és a lebomlott fehérjék molekulatömegének összevetése arra inspirált bennünket, hogy részletesebben megvizsgáljuk, a μ -calpain mediált proteolízis valóban a titin, α -fodrin, α -aktinin, dezmin, cTnT and cTnI fehérjéket érinti-e. Ezen fehérjék degradációját ezért célzott Western immunoblot vagy ezüstoffestett SDS-poliakrilamid gél analízissel (9. ábra) μ -calpain-érzékenységük összehasonlítása végett tovább vizsgáltuk. Az 1 U illetve 5 U μ -calpain aktivitás mellett végzett emésztés eredményeit 0,5, 15, 30, 60 és 120 perc inkubációt követően értékeltük. 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 ezüsttel festett SDS géleken tettük láthatóvá. Az intakt titin két izoformáját (N2B \approx 3000 kDa és N2BA \approx 3300 kDa) (Neagoe és mtsai, 2002) a géleken külön megjelöltük és Western immunoblottal azonosítottuk. A μ -calpain ennek az óriás struktúrfehérjének mindkét izoformáját 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) tovább fokozta a titin degradációt és számos degradációs terméket eredményezett. Összességében, a titin nagyon érzékenynek bizonyult a proteolízis során.

Az α -fodrin struktúrfehérje szintén jelentős μ -calpain-érzékenységet mutatott. A Western immunoblot assay-ken az intakt α -fodrin molekula (≈ 284 kDa) kisebb μ -calpain aktivitás (1 U) mellett gyorsan elhasadt. Sőt, első degradációs terméke (≈ 164 kDa, Dp1) már az inkubáció kezdetén megjelent, és a titinhez hasonlóan 15 perc inkubáció után a natív molekula is eltűnt. 5 U μ -calpain jelenlétében egy második hasítási termék is megjelent (kb. 30 kDa (Dp2) magasságában).

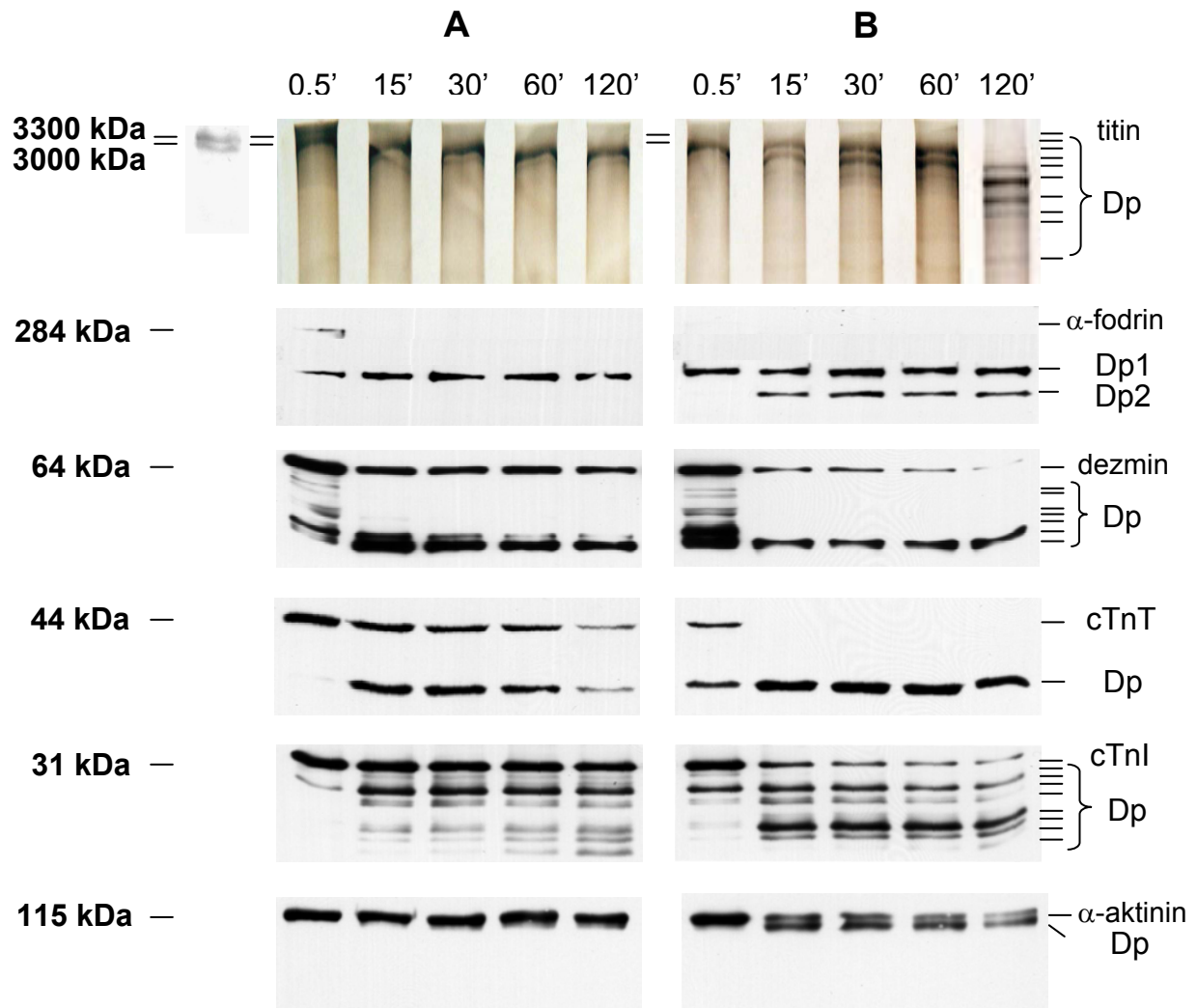
A μ -calpain a Z-csíkok nélkülözhetetlen struktúrfehérjéjét, a dezmin (≈ 64 kDa) is jelentősen károsította. Azonban az intakt molekula eltűnése lassabban következett be, mint azt a titin vagy az α -fodrin esetében láttuk. Habár számos dezmin degradációs termék ($\approx 54, 52, 45, 44, 41, 39$ és 37 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 intermedier 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-immunspezifikus 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) 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.

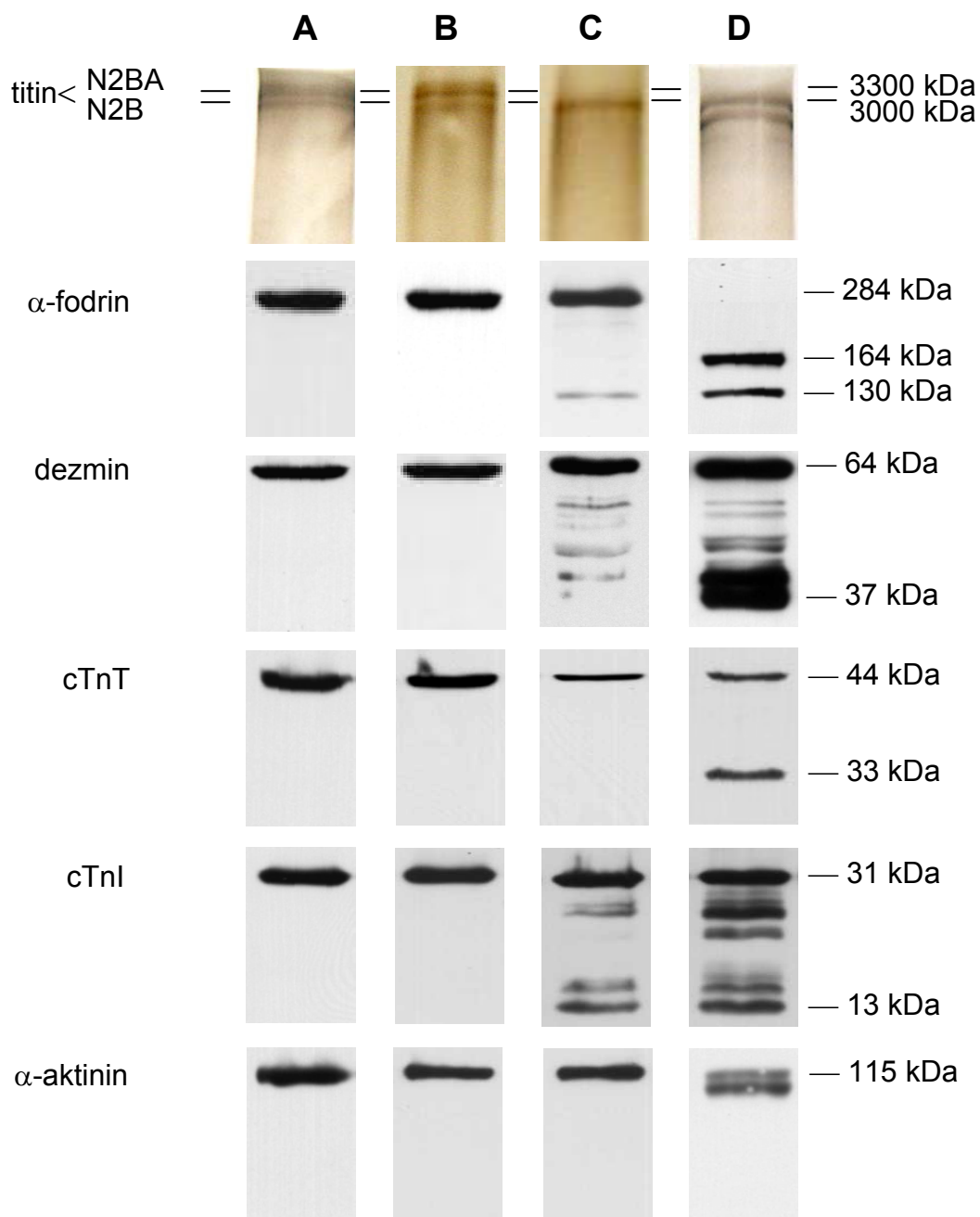
Az 5 különböző szívizom mintán végzett emésztések eredményeit összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbségeket az egyes minták vizsgált fehérjéinek proteolitikus mintázatában (ábra nincs feltüntetve).



9. ábra. A humán myofibrilláris μ -calpain-mediált proteolízisének mértéke és kinetikája. A mintákat 0,5, 15, 30, 60 illetve 120 percig inkubáltuk 1 U (A panel) illetve 5 U μ -calpain (B panel) jelenlétében, a fehérjedegradációt Western immunoblot ábrák (az adott kísérletben vizsgált fehérjék a jobb oldalon láthatóak) vagy ezüsttel megfestett SDS poliakrilamid gélek (a titin esetében) mutatják. A proteolízisre a natív fehérjék mennyiségének csökkenése és alacsonyabb molekulatömegű degradációs termékeik (Dp) megjelenése utal. Az intakt titin izoformáit (N2BA és N2B) Western immunoblot segítségével verifikáltuk (A panel bal oldalt). A kísérlet öt különböző szív mintán végzett három független emésztésével történt. Az ábrán egy-egy reprezentatív eredmény látható.

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

A következőkben összehasonlítottuk a homogenizátumok endogén Ca^{2+} -függő proteolitikus aktivitásának eredményét az *in vitro* μ -calpain-indukált proteolízissel (10. ábra). Az endogén proteolitikus aktivitást úgy vizsgáltuk, hogy a homogenizátumokat Ca^{2+} jelenlétében, de kívülről hozzáadott μ -calpain nélkül inkubáltuk 120 percig.



10. ábra. Endogén Ca^{2+} -függő proteolitikus aktivitás titinre, α -fodrinra, dezminre, cTnT-re, cTnI-ra és α -aktininra kifejtett hatása (felülről lefelé). Western immunoblot eredmények láthatók (a titint kivéve): Ca^{2+} -mentes közegben (A oszlop, kontroll); Ca^{2+} jelenlétében de kívülről hozzáadott μ -calpain nélkül 0,5 illetve 120 perc (B és C oszlop) inkubáció után; valamint Ca^{2+} és 5 U μ -calpain egyidejű jelenléte mellett végzett 0,5 perces (cTnT and dezmin), 15 perces (titin, α -fodrin és α -aktinin) illetve 30 perces (cTnI) (D oszlop) inkubációt követően.

A Western immunoblotok eredményei azt mutatták, hogy a titin, α -fodrin, dezmin, cTnI és cTnT kívülről hozzáadott μ -calpain nélkül is részleges proteolízisen ment keresztül (10. ábra, C oszlop): 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 emített autoproteolitikus fragmentumok molekulatömegeit összehasonlítva a μ -calpain-mediált degradáció során keletkező hasítási termékek molekulatömegével (5. ábra, C és D oszlop) 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 a calpainoknak tulajdonítható.

Megbeszélés

Kísérleteink során egy intracelluláris Ca^{2+} -függő proteáz, a μ -calpain potenciális szerepét az fHCM és a humán myocardialis stunning kialakulásában vizsgáltuk.

1. 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 (Goll és mtsai, 1992). 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 szívcsúcson 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 μ -calpain-hasítási termékét (cTnI₁₋₁₉₃) expresszáló egértörzsekben szintén szívmegegyobbodás jött létre (Murphy és mtsai, 2000). A szövettani és biokémiai markerek vonatkozásában ez a traszgenikus egérmodell azonban nem felelt meg az R145G mutációt hordozó (R146G az egér szekvenciájában) hypertrophiás cardiomyopathiának (James és mtsai, 2000). Mindezek alapján feltehetően a cTnI₁₋₁₉₃ nem játszik szerepet az fHCM kialakulásában. Alternatívaként felmerült 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 (Di Lisa és mtsai, 1995) a μ -calpain-mediált proteolízis kevésbé volt intenzív akkor, amikor a cTnI a troponin komplex részeként volt jelen. Ennek háttérében összetett konformációs változás és a hasítási hely felismerésének megváltozása állhat, nem egyszerűen a cTnI könnyebb vagy nehezebb hozzáférhetősége.

Az intracelluláris PKA hatására bekövetkezik a cTnI N-terminális véghez közeli két Ser oldalláncának (Ser-22 and Ser-23) foszforilációja. A következményes cTnI konformáció-

változás (Reiffert és mtsai, 1998) és az erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenységének megváltozása (Reiffert és mtsai, 1999) a szimpatikus aktiváció során fokozott relaxációhoz vezet. Ezzel szemben a legtöbb fHCM-ben azonosított cTnI mutáció növeli az erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenységét, így ellentétes hatással van a relaxációra (James és mtsai, 2000; Takahashi-Yanaga és mtsai, 2001; Lang és mtsai, 2002). Korábbi adatok (Deng és mtsai, 2001) 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 hozzájárul a myocardium hypertrophiás transzformációjához az fHCM kialakulása során (Solaro 1999; James és mtsai, 2000; Takahashi-Yanaga és mtsai, 2001; Lang és mtsai, 2002). Patkány szívizom preparátumokon végzett korábbi tanulmányok (McDonough és mtsai, 1999; Di Lisa és mtsai, 1995) azt sugallták, hogy a WT cTnI foszforiláció védelmet nyújt a μ -calpain-mediált proteolízissel szemben. Saját méréseinkben 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.

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

A kísérleteinkhez használt humán szívminták cTnI molekuláinak foszforilációs szintje összevethető volt a korábbi vizsgálatokban kapott eredményekkel (Bodor és mtsai, 1997; van der Velden és mtsai, 2003): a remodellált, beteg szívminták alacsonyabb cTnI foszforilációs szinttel rendelkeztek a donor mintákhoz 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 (Van Eyk és mtsai,

1998, McDonough és mtsai, 1999). 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 remodelált dilatált myocardiumban.

3. A stunning pathomechanizmusának dilemmái

Az ischaemiás/reperfúziós anyagcsere-zavar során számos sejtszintű kórfolyamat aktiválódik a myocardiumban, melyek a szív globális pumpafunkcióját rövidebb-hosszabb távon veszélyeztetik (Bolli és Marban, 1999). Ezek közé tartoznak az intracelluláris Ca^{2+} -túltöltöttség következtében kialakuló fehérje-degradációs folyamatok is. A myocardialis stunning megszűnéséhez szükséges idő (órák, napok) jól korrelál a kontraktilis fehérjék turnover-ének idejével, mely fehérjekárosodások esetén a citoplazmában levő molekulák cseréjével (Adamcova és Pelouch, 1999) és az új molekulák szintetizálásával kapcsolatos (Marban és Koretsune, 1990; Gao és mtsai, 1997). Ez amellet szól, hogy a fehérjedegradáció valóban szerepet kap a pathomechanizmusban. Részben *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokra támaszkodva feltételezik, hogy a fehérje-degradációs folyamatokért a μ -calpain-mediált enzimatikus hatás tehető felelőssé. Ezek között szerepelnek azok a megfigyelések is, hogy μ -calpainnal a kábult myocardium kontraktilis változásai előidézhetőek ugyanakkor calpain inhibitor egyidejű adásával kivédhetőek (Gao és mtsai, 1996), továbbá, hogy a μ -calpain számos intracelluláris myofibrilláris fehérje bontására képes (Goll és mtsai, 1991; Gao és mtsai, 1997; Papp és mtsai, 2000). A μ -calpain aktiválódásának feltételeiről szinte csak *in vitro* adatokkal rendelkezünk. Innen tudjuk, hogy a Ca^{2+} koncentráció μM tartományba való emelkedése szükséges az enzim aktiválódásához. Vitatott azonban, hogy ez az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció összeegyeztethető-e még a sejtek életképességével. Úgy tűnik, hogy a μ -calpain aktiválódása lokalizáltan, 1-10 μM -os Ca^{2+} „spike”-ok területén létrejöhet. Sőt, a foszfolipidek, melyek a Ca^{2+} -hoz hasonlóan nélkülözhetetlenek az enzim aktiválódásához, *in vivo* képesek jelentősen növelni az enzim Ca^{2+} -érzékenységét. Különösen igaz ez a polifoszfoinozitolokra, amelyek a μ -calpain aktiválódását szignifikánsan alacsonyabb, akár 100 nmol/l Ca^{2+} koncentráció mellett is lehetővé teszik (Saido és mtsai, 1992).

A célfehérjéket illetően legtöbb adat a cTnI degradációjával kapcsolatban került közlésre (Kusuoka és mtsai, 1987; Di Lisa és mtsai, 1995; Gao és mtsai, 1997; Van Eyk és mtsai, 1998; McDonough és mtsai, 1999), de egyre nő a myocardium egyéb intracelluláris fehérjéit érintő degradációról beszámoló közlemények száma is (Westfall és Solaro, 1992; Di

Lisa és mtsai, 1995; Kim és mtsai, 1995; Yoshida és mtsai, 1995; Matsumura és mtsai, 1996; Van Eyk és mtsai, 1998; Papp és mtsai, 2000). Ezen fehérjék bomlásának vizsgálatára használt állatkísérletes modellek azonban gyakran ellentmondó eredményekre vezettek. A kísérleteket különböző állatfajokon végezték, és nincs kizárva, hogy a stunning pathomechanizmusa állatfajtól függően eltérő, valamint az egyes állatfajok myocardiuma különbözhet proteáz és transzglutamináz tartalom és aktivitás szempontjából is. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy az *in vitro/in vivo* modellekben eltérő ischaemiás és reperfüziós időtartamot, globális és parciális ischaemiát alkalmaztak, valamint a legtöbb esetben nem győződtek meg arról, hogy a kísérlet során a myocardium valóban teljesen viabilis, nekrozistól mentes maradt-e, ami a tankönyvi stunning definíciójának alapkövetelménye. A különböző állatkísérletes eredmények tehát nehezen összevethetők. A humán myocardiumban stunning során zajló proteolitikus folyamatokról viszont alig vannak molekuláris ismereteink (Murphy és mtsai, 2000). Az ischaemiás szívbetegségben szenvedő, de még jó bal kamra funkcióval rendelkező betegek egy része az ischaemiás/reperfüziós zavart meglepően jól tolerálhatják. Ennek több oka lehet. A krónikus lefolyású ischaemiás szívbetegség során sokuknál már több alkalommal lezajlott rövid perfúziós zavar, ami elvileg „prekondicionálhatta” az érintett myocardiumot a következő ischaemiás epizóddal szemben. A betegek többsége rendszeresen anti-ischaemiás gyógyszert szed, és az alapbetegségből adódóan már jól működő kollaterális hálózattal rendelkeznek. Sokaknál jelen van egy ún. „flow-limiting stenosis” is, ami lassabb reperfüziót tesz csak lehetővé, ezáltal lassabb a Ca^{2+} -túltöltődés és a szabadgyök-generálódás, így enyhébb a reperfüziós károsodás is (Duncker és mtsai, 1998). Mindezek ellenére a klinikai kép számtalanszor okoz komoly kihívást az orvosi gyakorlatban, pl. instabil angina, acut myocardialis infarctus (AMI) korai reperfüziója, percutan transluminaris coronaria angioplastica (PTCA), nyitott szívműtétek, szívtranszplantáció vagy a szívizom terheléses vizsgálatai során (Bolli 1992). További komplikáló tényező, hogy a stunning legtöbbször nem „tisztá” formában jelentkezik, hanem myocardium necrosissal, azaz infarktussal kevert formában. Miután Ca^{2+} -antagonisták adásával javulást tudtak elérni a humán myocardialis stunning klinikai képében is (Sheiban és mtsai, 1995; Rinaldi és mtsai, 1998), feltételezhető, hogy a Ca^{2+} -nak kulcsszerepe lehet a folyamatban. Az is valószínű, hogy a myofilamentumok Ca^{2+} -mal szemben mutatott deszenzitizációjával állunk szemben, mert pozitív inotróp és Ca^{2+} -érzékenyítő szerekkel végzett kezelésekre javulást mutat a kontraktilis funkció (Kloner és Jennings, 2001). Mindezek mellett a Ca^{2+} -okozta károsodás hatásmechanizmusa a humán myocardiumban nem tisztázott. Az állatmodellekben a calpain-mediált proteolízis minden bizonnyal szerepet

kap, azonban az emberi szív esetében a proteolízis által érintett fehérjék identitása is tisztázatlan (Papp és mtsai, 2001). Etikai korlátok miatt természetesen csak *in vitro* kísérletek elvégzésére van lehetőség.

4. A μ -calpain humán myocardialis célfehérjéi

Ezüstfestéses módszerrel számos mennyiségi és minőségi változást sikerült kimutatni μ -calpain hatására a szívizom fehérjemintázatában (8. ábra). Ezek közül 6 fehérjét immunológiai módszerrel is azonosítani tudtunk és ezek dagradációját 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 szív mintákon egyaránt sikerült kimutatni. μ -calpain hatására azonban ez a mintázat gyorsan megváltozott. Azt tapasztaltuk, hogy a titin különösen μ -calpain-érzékeny fehérje. Számos dagradációs terméket is sikerült kimutatni. Néhol a dagradáció jelentéktelennek tűnhet, mert a dagradációs termékek gélbeli lokalizáció szerint alig különböznek a natív molekulától. Azonban nem szabad elfelejtenünk, hogy ebben a molekulatartományban (≈ 3000 kDa) 0,5-1 mm távolság a gélen több száz kDa molekulatömeg különbséget jelent, ami következményes funkcionális eltérésekkel járhat. Morano és mtsai (1994) szívelégtelenségből származó mintákon a titin egy módosult variánsát detektálták, amit „fast migrating titin” néven különböztettek meg. Hein és mtsai (2000) pedig szintén szívelégtelenségből származó mintákon spontán titin-degradációt mutattak ki. Érdekes továbbá, hogy egyesek szívelégtelenségben a titin mennyiségének a csökkenését figyelték meg (Morano és mtsai, 1994). Mi nem tapasztaltunk ilyen eltéréseket a beteg szíveken. Ez azzal lehet magyarázható, hogy a kísérleteinkhez használt beteg szív minták (NYHA III-IV.) morfológiailag még nem mutattak olyan előrehaladott szívelégtelenségre utaló eltéréseket, amit az általunk használt diagnosztikus módszerekkel detektálni tudtunk volna. Helmes és mtsai (1996) találtak dagradációs terméket a MHC alatt is, amit a gradients géleken nekünk nem sikerült kimutatni, a 4%-os mini-gélek pedig nem tették lehetővé ennek a molekulatartománynak a részletes vizsgálatát. Negatív eredményeink ellenére tehát nem zárható ki, hogy a titinnak valóban van dagradációs terméke az említett pozícióban.

A fodrin szívizomban expresszáldó α és β alegységei közül az α rendelkezik nagy calpain-érzékenységgel, ennek bomlása Ca^{2+} -függő calmodulin-independens folyamat. Az α alegység hasítását követően calmodulin jelenlétében a β alegység is károsodhat, így tetramerformálásra és fehérjekötésre inkompetens molekulák keletkeznek (Harris és Morrow, 1990). Az α -fodrin μ -calpain-indukált proteolízise során a rendkívül gyors degradáció miatt, szinte csak a degradációs termékek tanulmányozására volt lehetőségünk. Az általunk tapasztalt intenzív bomlás nem egyedülálló megfigyelés. Yoshida és mtsai (1995) már korábban azt tapasztalták, hogy a fodrin sokkal gyorsabban bomlik az ischaemia/reperfúzió során, mint bármely más citoskeletális fehérje. Az általunk használt antitest segítségével két degradációs terméket sikerült felismerni. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a μ -calpain két helyen képes az α -fodrint hasítani (Nath és mtsai, 1996).

A dezmin károsodása is a komplex szarkomer struktúra megbomlásához vezethet. Egy korábbi tanulmányban (Papp és mtsai, 2000) összefüggést feltételeztek a μ -calpain-indukált dezmin degradáció, a szarkomer mintázat és a csökkent Ca^{2+} -aktivált erő között permeabilizált patkány szívizomsejteken. 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 (Di Lisa és mtsai, 1995). A dezmin bomlástermékek molekulaméret szerinti mintázata összevethető volt a korábban patkány szívizommintákon kapottakkal (Papp és mtsai, 2000). Ebből arra következtethetünk, hogy a dezmin fehérje szekvenciájában lévő inter-species különbségek a patkány és az ember összehasonlítása kapcsán sem eredményez messzemenő különbségeket a μ -calpain hasítási helyeiben.

A regulatórikus cTnT μ -calpain proteolízise a mi kísérletes körülményeink mellett viszonylag 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 (McDonough és mtsai, 1999). A kísérleteink során kapott cTnI degradációs termékek molekulatömeg szempontjából részben átfedtek az egyéb kísérletes modellekben észleltekkal (ischaemiás/reperfúziós patkány szívek és humán bal kamrai szívmok (Gao és mtsai, 1997; McDonough és mtsai, 1999 és 2001; Murphy és mtsai, 2000)). 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 szívizomszövetben (37 °C) 7 különböző cTnI degradációs terméket tudtak megkülönböztetni (Katrukha és mtsai, 1998). Így elképzelhető, hogy a humán cTnI molekulákat a μ -calpain több helyen hasította, mint azt postischemiás patkány szíveknél tapasztalták. Ez magyarázhatja a bypass műtetre került szívekből epicardialis biopsziával nyert minták cTnI degradációs termékeinek nagy számát McDonough és mtsai kísérleteiben is (2001). A nagyszámú degradációs termékek további lehetséges magyarázata, hogy a cTnI fragmentek kovalens komplexeket képezhetnek egyéb myocardial fehérjékkel (McDonough és mtsai, 1999), ennek következtében számos cTnI immunoreaktív csík keletkezik. Meg kell azonban említeni, hogy ezekben az esetekben az immunreaktív fehérjék egy részének magasabb molekulatömeggel kellett volna rendelkezni. Továbbá nem szabad elfelejtenünk azt a tényt sem, hogy az eredményeket 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 (Foster és Van Eyk, 1999). Azok az antitestek képesek több degradációs termék feltüntetésére, amelyek az antigén u.n. stabil epitópjához kötődnek. A cTnI esetében a stabil epitóp helyek a molekula 30-110 aminosavszekvenciájának megfelelően találhatóak. Ezt azzal magyarázzák, hogy a molekulának ez a szekvenciája kapcsolatban áll a cTnC-vel, ezáltal viszonylagos védeltséget élvez. Az általunk használt clone 16A11-es anti-cTnI antitest epitópjája is a cTnI ezen stabil régiójában lokalizálódik és ez számos degradációs termék detektálását tette lehetővé. Ellenben a clone C5 antitest (melynek az epitópjája ugyan nem ismert, de feltételezések szerint nem az említett stabil szakaszra lokalizálódik) csak 1 degradációs termék feltüntetésére 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 szív minták cTnI foszforilációs szintjének meghatározására végzett vizsgálataink alapján kizárhattuk.

Korábbi állatkísérletekben az α -aktinin nagy mértékű elvesztését találták postischemiás szíveken (Matsumura és mtsai, 1996; Van Eyk és mtsai, 1998), így valamelyest meglepő, hogy kísérleteink során az összes vizsgált fehérje között a humán α -aktinin volt a legkevésbé érzékeny a μ -calpain proteolízis során. Erre magyarázatot szolgáltat az a megfigyelés, hogy a μ -calpain az α -aktinin Z-csíkokból való kiszabadulását

okozza (anélkül, hogy bontaná azt) más kapcsolódó fehérjék módosítása révén (Goll és mtsai, 1991). Így a Z-csík α -aktinin elvesztése nem feltétlenül jelenti a molekula degradációját, hanem inkább annak kiszabadulását egy fellazult myofibrilláris struktúrából.

A 8. ábra az előzőekben nem tárgyalt (kérdőjelekkel megjelölt) μ -calpain-érzékeny fehérjecsíkjaikat nem tudtuk egyértelműen azonosítani, a fehérjék esetleges komigrációja ezüstfestéses módszernél különösen megnehezíti ezt a feladatot. Molekulatömegéből ítélve a legfelső közülük talán a C protein, de immunológiai verifikálásra nem volt lehetőségünk.

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 (Papp és mtsai, 2001; Goll és mtsai, 2003). 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.

5. 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 fehérjéinek 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 (Croall és DeMartino, 1991; Goll és mtsai, 2003).

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.

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 ösztöndíjamban 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.

Irodalomjegyzék

- Adamcova M, Pelouch V:** Isoforms of troponin in normal and diseased myocardium. *Physiol Res* 48: 235-247, 1999.
- Allen DG, Orchard CH:** Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 60: 153-168, 1987.
- Anderson PA, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, Allen PD, Kay BK:** Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res* 76: 681-686, 1995.
- Aki T, Yoshida K, Fujimiya T:** Phosphoinositide 3-kinase accelerates calpain-dependent proteolysis of fodrin during hypoxic cell death. *J Biochem (Tokyo)* 132: 921-926, 2002.
- Bell SP, Nyland L, Tischler MD, McNabb M, Granzier H, LeWinter MM:** Alterations in the determinants of diastolic suction during pacing tachycardia. *Circ Res* 87: 235-240, 2000.
- Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA:** Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96: 1495-500, 1997.
- Bolli R, Marban E:** Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 79: 609-634, 1999.
- Bolli R:** Myocardial 'stunning' in man. *Circulation* 86: 1671-1691, 1992.
- Croall DE, DeMartino GN:** Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 71: 813-847, 1991.
- Croall DE, Chacko S, Wang Z:** Cleavage of caldesmon and calponin by calpain: substrate recognition is not dependent on calmodulin binding domains. *Biochim Biophys Acta* 1298: 276-284, 1996.
- Dayton WR, Reville WJ, Goll DE, Stromer MH:** A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 15: 2159-2167, 1976.
- De Matteis MA, Morrow JS:** Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113: 2331-2343, 2000.
- Deng Y, Schmidtman A, Redlich A, Westerdorf B, Jaquet K, Thieleczek R:** Effects of phosphorylation and mutation R145G on human cardiac troponin I function. *Biochemistry* 40: 14593-14602, 2001.
- Di Lisa F, De Tullio R, Salamino F, Barbato R, Melloni E, Siliprandi N, Schiaffino S, Pontremoli S:** Specific degradation of troponin T and I by μ -calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem J* 308: 57-61, 1995.

- Doctor RB, Bennett V, Mandel LJ:** Degradation of spectrin and ankyrin in the ischemic rat kidney. *Am J Physiol* 264: C1003-1013, 1993.
- Dohet C, al-Hillawi E, Trayer IP, Ruegg JC:** Reconstitution of skinned cardiac fibres with human recombinant cardiac troponin-I mutants and troponin-C. *FEBS Lett* 377: 131-134, 1995.
- Duncker DJ, Schulz R, Ferrari R, Garcia-Dorado D, Guarnieri C, Heusch G, Verdouw PD:** Myocardial stunning" remaining questions. *Cardiovasc Res* 38: 549-558, 1998.
- Eble DM, Spragia ML, Ferguson AG, Samarel AM:** Sarcomeric myosin heavy chain is degraded by the proteasome. *Cell Tissue Res* 296: 541-8, 1999.
- Édes I:** szerk.: A szív és simaizom Ca²⁺-anyagcséréje: elmélet, klinikum. Golden Book Kiadó, Budapest, Magyarország, 2000.
- Eisner DA, Nichols CG, O'Neill SC, Smith GL, Valdeolmillos M:** The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J Physiol* 411: 393-418, 1989.
- Elliott K, Watkins H, Redwood CS:** Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 275: 22069-72204, 2000.
- Elliott AC, Smith GL, Eisner DA, Allen DG:** Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts. *J Physiol* 454: 467-490, 1992.
- England PJ:** Studies on the phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin during modification of contraction in perfused rat heart. *Biochem J* 160: 295-304, 1976.
- Feng J, Schaus BJ, Fallavollita JA, Lee TC, Canty JM Jr:** Preload induces troponin I degradation independently of myocardial ischemia. *Circulation* 103: 2035-2037, 2001.
- Fischer S, Vandekerckhove J, Ampe C, Traub P, Weber K:** Protein-chemical identification of the major cleavage sites of the Ca²⁺ proteinase on murine vimentin, the mesenchymal intermediate filament protein. *Biol Chem Hoppe Seyler* 367: 1147-1152, 1986.
- Foster DB, Van Eyk JE:** In search of the proteins that cause myocardial stunning. *Circ Res* 85: 470-472, 1999.
- Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S:** Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* 86: 1114-1121, 2000.
- Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E:** Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 80: 393-399, 1997.

- Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E:** Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium: consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis? *Circ Res* 78: 455-465, 1996.
- Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E:** Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium: direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res* 76: 1036-1048, 1995.
- Giulian GG, Moss RL, Greaser M:** Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels. *Anal Biochem* 129: 277-87, 1983.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J:** The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801, 2003.
- Goll DE, Dayton WR, Singh I, Robson RM:** Studies of the (α -actinin/actin interaction in the Z-disk by using Calpain. *J Biol Chem* 266: 8501-8510, 1991.
- Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Christiansen JA:** Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie* 74: 225-37, 1992a.
- Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Edmunds T, Cong J:** Properties and biological regulation of the calpain system. In: *Expression of Tissue Proteinases and Regulation of Protein Degradation*, edited by Ouali A, Demeyer DI, Smulders F. Utrecht, The Netherlands: EC\CE/AMST p.47-68, 1995.
- Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T:** Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays* 14: 549-556, 1992b.
- Granzier HL, Irving TC:** Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J* 68: 1027-1044, 1995.
- Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S:** Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol* 11: 18-25, 1999.
- Guroff G:** A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* 239: 149-155, 1964.
- Harris AS, Croall DE, Morrow JS:** The calmodulin-binding site in alpha-fodrin is near the calcium-dependent protease-I cleavage site. *J Biol Chem* 263: 15754-15761, 1988.
- Harris AS, Morrow JS:** Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3009-3013, 1990.
- Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J:** The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res* 45: 273-278, 2000.
- Helmes M, Trombitas K, Granzier H:** Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79: 619-626, 1996.

- Hu DH, Kimura S, Kawashima S, Maruyama K:** Calcium-activated neural protease quickly converts α -connectin to β -connectin in chicken breast muscle myofibrils. *Zool Sci* 6: 797-800, 1989.
- Hu RJ, Bennett V:** In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s). *J Biol Chem* 266: 18200-18205, 1991.
- Huff-Lonergan E, Mitsuhashi T, Beekman DD, Parrish FC Jr, Olson DG, Robson RM:** Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J Anim Sci* 74: 993-1008, 1996.
- Isayama T, Goodman SR, Zagon IS:** Localization of spectrin isoforms in the adult mouse heart. *Cell Tissue Res* 274: 127-33, 1993.
- Jacquemond V:** Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys J* 73: 920-928, 1997.
- James J, Zhang Y, Osinska H, Sanbe A, Klevitsky R, Hewett TE, Robbins J:** Transgenic modeling of a cardiac troponin I mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 87: 805-11, 2000.
- Kapprell HP, Goll DE:** Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem* 264: 17888-17896, 1989.
- Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, Esakova TV, Kolosova OV, Pettersson K, Lovgren T, Bulargina TV, Trifonov IR, Gratsiansky NA, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM, Gusev NB:** Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin Chem* 12: 2433-2440, 1998.
- Katus HA, Remppis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W:** Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 67: 1360-1367, 1991.
- Kay J:** in: *Proteases: Potential Role in Health and Disease* (Hörl WH. and Heidland A. eds) pp. 519-532, Plenum, New York, 1984a.
- Kay J:** Ca^{2+} -activated proteinases, protein degradation and muscular dystrophy. *Adv Exp Med Biol* 167: 519-531, 1984b.
- Kentish JC:** Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflügers Arch* 419: 310-318, 1991.
- Kim SJ, Kudej RK, Yatani A, Kim YK, Takagi G, Honda R, Colantonio DA, Van Eyk JE, Vatner DE, Rasmusson RL, Vatner SF:** A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca^{2+} handling. *Circ Res* 89: 831-837, 2001.
- Kim K, Homma Y, Ikeuchi Y, Suzuki A:** Cleavage of connectin by calpain and cathepsin D. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 896-899, 1995.

- Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, Sasazuki T:** Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 16: 379-382, 1997.
- Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E:** Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. *Circulation* 97: 1848-1867, 1998.
- Kloner RA, Jennings RB:** Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 104: 3158-3167, 2001.
- Kumamoto T, Kleese WC, Cong JY, Goll DE, Pierce PR, Allen RE:** Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec* 232: 60-77, 1992.
- Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E:** Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca²⁺ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 79: 950-961, 1987.
- Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Lane RD, Allan DM, Mellgren RL:** A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells. *Exp Cell Res* 203: 5-16, 1992.
- Lane RD, Mellgren RL, Mericle MT:** Subcellular localization of bovine heart calcium-dependent protease inhibitor. *J Mol Cell Cardiol* 17: 863-872, 1985.
- Lang R, Gomes AV, Zhao J, Housmans PR, Miller T, Potter JD:** Functional analysis of a troponin I (R145G) mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 277: 11670-11678, 2002.
- Lüss 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* 279: H176-184, 2000.
- Malhotra A, Margossian SS, Slayter HS:** Physico-chemical properties of rat and dog cardiac alpha-actinin. *Biochim Biophys Acta* 874:347-54, 1986.
- Maravall M, Mainen ZF, Sabatini BL, Svoboda K:** Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78: 2655-2667, 2000.
- Marban E, Koretsune Y, Coretti M, Chacko VP, Kusuoka H:** Calcium and its role in myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Circulation* 80(suppl IV): 17-22, 1989.

- Marban E, Koretsune Y:** Cell calcium, oncogenes, and hypertrophy. *Hypertension* 15: 652-658, 1990.
- Matsumura Y, Kusuoka H, Inoue M, Hori M, Kamada T:** Protective effect of the protease inhibitor leupeptin against myocardial stunning. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 135-142, 1993.
- Matsumura Y, Saeki E, Inoue M, Hori M, Kamada T, Kusuoka H:** Inhomogeneous disappearance of myofilament-related cytoskeletal proteins in stunned myocardium of guinea pig. *Circ Res* 79: 447-454, 1996.
- Matsumura K, Shimizu T, Sunada Y, Mannen T, Nonaka I, Kimura S, Maruyama K:** Degradation of connectin (titin) in Fukuyama type congenital muscular dystrophy: immunochemical study with monoclonal antibodies. *J Neurol Sci* 98: 155-162, 1990.
- McDonald KS, Mammen PPA, Strang KT, Moss RL, Miller WP:** Isometric and dynamic contractile properties of porcine skinned cardiac myocytes after stunning. *Circ Res* 77: 964-972, 1995.
- McDonald KS, Moss RL, Miller WP:** Incorporation of the troponin regulatory complex of post-ischemic stunned porcine myocardium reduces myofilament calcium sensitivity in rabbit psoas skeletal muscle fibers. *J Mol Cell Cardiol* 30: 285-296, 1998.
- McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE:** Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 84: 9-20, 1999.
- McDonough JL, Labugger R, Pickett W, Tse MY, MacKenzie S, Pang SC, Atar D, Ropchan G, Van Eyk JE:** Cardiac troponin I is modified in the myocardium of bypass patients. *Circulation* 103: 58-64, 2001.
- Mellgren RL:** Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *FEBS Lett* 109: 129-133, 1980.
- Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y:** Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol* 134: 1255-1270, 1996.
- Mittmann K, Jaquet K, Heilmeyer LM Jr:** A common motif of two adjacent phosphoserines in bovine, rabbit and human cardiac troponin I. *FEBS Lett* 273: 41-45, 1990.
- Morano I, Hadicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RH, Bohm M, Bartel S, Erdmann E, Krause EG:** Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 26: 361-368, 1994.
- Murphy AM, Kögler H, Georgakopoulos D, McDonough JL, Kass DA, Van Eyk JE, Marbán E:** Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* 287: 488-491, 2000.

- Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KK:** Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J* 319: 683-690, 1996.
- Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA:** Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106: 1333-1341, 2002.
- Opie LH:** Stunning, hibernation and calcium in myocardial ischemia and reperfusion. Kluwer Publishers, Boston, USA 1992
- Palmer S, Kentish JC:** The role of troponin C in modulating the Ca²⁺-sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres. *J Physiol* 480: 45-60, 1994.
- Papp Z, Édes I:** A myocardialis ischaemia és reperfúzió pathofiziológiája. *LAM* 10: 501-511, 2000.
- 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* 543: 177-189, 2002.
- Papp Z, Van der Velden J, Stienen GJM:** Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc Res* 45: 981-993, 2000.
- Papp Z, Barta J, Stienen GJM:** Troponin I degradation and myocardial stunning. *Circulation* 104: E157-E157, 2001.
- Perrin BJ, Huttenlocher A:** Calpain. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 722-725, 2002.
- Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M:** A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 38: 291-300, 1998.
- Rarick HM, Tu XH, Solaro RJ, Martin AF:** The C terminus of cardiac troponin I is essential for full inhibitory activity and Ca²⁺ sensitivity of rat myofibrils. *J Biol Chem* 272: 26887-26892, 1997.
- Reiffert S, Maytum R, Geeves M, Lohmann K, Greis T, Bluggel M, Meyer HE, Heilmeyer LM, Jaquet K:** Characterization of the cardiac holotroponin complex reconstituted from native cardiac troponin T and recombinant I and C. *Eur J Biochem.* 261: 40-47, 1999.
- Reiffert SU, Jaquet K, Heilmeyer LM Jr, Herberg FW:** Stepwise subunit interaction changes by mono- and bisphosphorylation of cardiac troponin I. *Biochemistry* 37: 13516-13525, 1998.

- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D, Passos-Bueno MR, Zatz M, Tischfield JA, Fardeau M, Jackson CE, Cohen D, Beckmann JS:** Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81: 27-40, 1995.
- Richardson FL, Stromer MH, Huiatt TW, Robson RM:** Immunoelectron and immunofluorescence localization of desmin in mature avian muscles. *Eur J Cell Biol* 26: 91-101, 1981.
- Rinaldi CA, Linka AZ, Masani ND, Avery PG, Jones E, Saunders H, Hall RJ:** Randomized, double-blind crossover study to investigate the effects of amlodipine and isosorbide mononitrate on the time course and severity of exercise-induced myocardial stunning. *Circulation* 98: 749-756, 1998.
- Saido TC, Shibata M, Takenawa T, Murofushi H, Suzuki K:** Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 267: 24585-24590, 1992.
- Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T:** Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J Biol Chem* 259: 12489-12494, 1984.
- Sato H, Hori M, Kitakaze M, Iwai K, Takashima S, Kurihara H, Inoue M, Kamada T:** Reperfusion after brief ischemia disrupts the microtubule network in canine hearts. *Circ Res* 72: 361-375, 1993.
- Schillinger W, Kogler H:** Altered phosphorylation and Ca²⁺-sensitivity of myofilaments in human heart failure. *Cardiovasc Res* 57: 5-7, 2003.
- Sheiban I, Tonni S, Marini A, Trevisani G:** Clinical and therapeutic implications of chronic left ventricular dysfunction in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 75: 23E-30E, 1995.
- Solaro RJ, Rarick HM:** Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res* 83: 471-480, 1998.
- Solaro RJ:** Troponin I, stunning, hypertrophy, and failure of the heart. *Circ Res* 84: 122-124, 1999.
- Solomon V, Goldberg AL:** Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271: 26690-26697, 1996.
- Stabach PR, Cianci CD, Glantz SB, Zhang Z, Morrow JS:** Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry* 36: 57-65, 1997.
- Suzuki K:** Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed Biochim Acta* 50: 483-484, 1991.

- Suzuki K, Imajoh S, Emori Y, Kawasaki H, Minami Y, Ohno S:** Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett* 220: 271-277, 1987.
- Suzuki K, Kawashima S, Imahori K:** in: *Calcium Regulation in Biological Systems* (Ebashi S. et al. eds) pp. 213-226, Academic Press, New York, 1984.
- Suzuki A, Kim K, Ikeuchi Y:** Proteolytic cleavage of connectin/titin. *Adv Biophys* 33: 53-64, 1996.
- Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Harada K, Minakami R, Shiraishi F, Ohta M, Lu QW, Sasaguri T, Ohtsuki I:** Functional consequences of the mutations in human cardiac troponin I gene found in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 33: 2095-2107, 2001.
- Thomas SA, Fallavollita JA, Lee TC, Feng J, Canty JM:** Absence of troponin I degradation or altered sarcoplasmic reticulum uptake protein expression after reversible ischemia in swine. *Circ Res* 85: 446-456, 1999.
- Thornell L, Carlsson L, Li Z, Mericskay M, Paulin D:** Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2107-2124, 1997.
- Toyo-Oka T:** Phosphorylation with cyclic adenosine 3':5' monophosphate-dependent protein kinase renders bovine cardiac troponin sensitive to the degradation by calcium-activated neutral protease. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 44-50, 1982.
- Toyo-Oka T, Ross J Jr:** Ca²⁺ sensitivity change and troponin loss in cardiac natural actomyosin after coronary occlusion. *Am J Physiol* 240: H704-708, 1981.
- van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ:** Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 57: 37-47, 2003.
- Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ:** Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res* 82: 261-271, 1998.
- Wang W, Sawicki G, Schulz R:** Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* 53: 165-174, 2002a.
- Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R:** Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 106: 1543-1549, 2002b.
- Ward DG, Cornes MP, Trayer IP:** Structural consequences of cardiac troponin I phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 41795-41801, 2002.

- Westfall M, Solaro RJ:** Alterations in Myofibrillar function and protein profiles after complete global ischemia in rat hearts. *Circ Res* 70: 302-313, 1992.
- Wiley J & Sons:** In: *Current Protocols in Molecular Biology: Electrophoretic Separation of Proteins*. Edited by Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. pp. 10.2.1-10.2.35, 1996.
- Winkelmann JC, Forget BG:** Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood* 81: 3173-3185, 1993.
- 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* 98: 167-176, 1996.
- Yagy M, Robson RM, Stromer MH:** Localization and identification of desmin filaments in mammalian striated muscle. *J Cell Biol* 111: 42a, 1990.
- Yoshida K, Inui M, Harada K, Saido TC, Sorimachi Y, Ishihara T, Kawashima S, Sobue K:** Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ Res* 77: 603-610, 1995.
- Zhang R, Zhao J, Potter JD:** Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca²⁺ affinity of cardiac troponin C. *J Biol Chem* 270: 30773-30780, 1995.
- Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD:** Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res* 76: 1028-1035, 1995.
- Zeece MG, Robson RM, Lusby ML, Parrish FC Jr:** Effect of calcium-activated protease (CAP) on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *J Food Science* 51: 797-803, 1986.

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, PappZ: 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.