

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Miokardiális szarkomer diszfunkció
akut és krónikus patkány modellekben**

Dr. Kovács Árpád

Témavezető: Dr. Barta Judit



Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2017

Miokardiális szarkomer diszfunkció akut és krónikus patkány modellekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban.

Írta: Dr. Kovács Árpád, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola
Kardiovaszkuláris megbetegedések programja keretében.

Témavezető: Dr. Barta Judit, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Varga Albert, az MTA doktora

Dr. Pórszász Róbert, PhD

A doktori szigorlat helye, időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet, Könyvtár

2019. február 21. 09:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Csonka Csaba, PhD

Dr. Horváth Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Varga Albert, az MTA doktora

Dr. Pórszász Róbert, PhD

Dr. Csonka Csaba, PhD

Dr. Horváth Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Kardiológiai Intézet, Augusztia tanterem

2019. február 21. 11:00

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Szívelégtelenség: egy globális egészségügyi kihívás

A szívelégtelenség prevalenciája a fejlett országok felnőtt lakosságának körében 1-2%, melynek diagnózisa után az 5 és 10 éves túlélés mindössze 50% és 10%. A szívelégtelenség egy olyan komplex szindróma, mely a kardiális szisztolés vagy diasztolés kapacitás bármilyen jellegű diszfunkciójából adódhat. Kardiovaszkuláris komorbiditásokkal (pl. hipertónia) terhelt öregedő populációkban a szívelégtelenség gyakran megtartott bal kamrai ejekciós frakcióval ($\geq 50\%$) jelentkezik (HFpEF). Akut koronária szindróma fellépte esetén viszont a bal kamrai miokardiális infarktus csökkent ejekciós frakciót ($< 40\%$) okoz (HFrEF). Sajnálatos módon a szívelégtelenség minden fenotípusának prevalenciája és mortalitása magas.

A szarkomer a legkisebb funkcionális egység a szívben. A szarkomert alkotó strukturális, funkcionális és regulátor fehérjék patofiziológiai modulációja ezért alapvetően befolyásolja a szívműködést a kontrakció-relaxáció finoman hangolt ciklusát. A kardiális *remodelling* során ilyen jellegű kóros modulációk a miofilamentális fehérjék akut degradációjához vagy krónikus foszforilációs változásaihoz vezetve ronthatják a szívműködés erőgenerációs kapacitását és rugalmasságát.

Annak ellenére, hogy a miokardiális infarktus adekvát terápia az azonnali revaszkularizáció, a beavatkozás eredményeként fellépő iszkémia-reperfúzió károsodások komoly gyakorlati kihívást jelentenek. Az is ismert, hogy a hipertónia a szívelégtelenség leggyakoribb komorbiditása, melyben a legjelentősebb kóros tényező a renin-angiotenzin rendszer (RAS) patológiás aktivitása, a RAS terápia gátlása azonban a szívelégtelenség egyik fenotípusában (HFrEF) hatásos, míg a másikban (HFpEF) nem.

1.2. A szarkomer működésének élettani alapjai

A szívműködés által kifejtett mechanikai munka a szarkomer kontraktilis (aktív), valamint nem kontraktilis rugalmas és viszkózus (passzív) elemeinek összehatásán alapul.

A szívizom-kontrakció mechanizmusának élettani alapja az aktin molekulák és a miozin molekulák ún. „feji” régiói közötti kereszthidak képződése és felbomlása. A kereszthíd-ciklus eredményeként az interdigitáló vékony (aktin) és vastag (miozin) filamentumok egymáson való elcsúszása egymáshoz közelíti a Z-korongokat, ezért a szarkomer megrövidül. Ez az ún. „csúszó filamentum modell”.

Diasztolé során az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ alacsony, a kontrakciót szabályozó troponin fehérje komplex [kardiális troponin C (cTnC), I (cTnI), T (cTnT)] és a tropomiozin megakadályozza az erőgeneráló aktin-miozin kölcsönhatást. Szisztolé során az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedése indítja meg és tartja fent a filamentumok csúszását. A miofilamentális kontrakcióhoz szükséges kémiai energiát a miozin adenozin-trifoszfát (ATP)áz által végzett ATP hidrolízis biztosítja. A relaxációhoz a miozin fejek ismételt ATP kötése szükséges, ennek elmaradása esetén az aktin-miozin komplex megmerevedik (rigor). A miozin motor fehérje tehát azáltal generál erőt és elmozdulást, hogy ATPáz aktivitását összehangolja az aktinnal létesített ciklikus interakciójával.

A miozint két miozin nehéz lánc (MHC), valamint két esszenciális miozin könnyű lánc (MLC-1) és két regulatórikus miozin könnyű lánc (MLC-2) alkotja. Az MHC izoforma kompozíció összefüggésben van az erőgeneráció sebességével és energetikájával. Emlőszövetben két különböző MHC izoforma ismert (α -MHC és β -MHC), melyet két különböző gén kódol. A rágcsáló kamrai szívizomzatban az α -MHC az elsődleges (~90%), míg a humán kamrai miokardiumban a β -MHC a domináns izoforma.

A szívizomsejt passzív feszülés és egyben a celluláris diasztolé egyik fő tényezője a titin óriásfehérje. A titin 3000-3700 kDa molekulatömegével a legnagyobb ismert polipeptid, és mintegy molekuláris rugó kifestülve a fél szarkomeren (a Z-korongtól az M-csíkig) az izom passzív nyújthatóságáért felel. Felnőtt humán szívben a titin két fő izoformája expresszálódik: egy rövidebb és merevebb N2B (~3000 kDa) izoforma és egy hosszabb,

rugalmasabb N2BA (>3200 kDa) izoforma. A titin elasztikus rugója a szarkomer I-csík régiójába esik, melynek komplex szekvenciájában az egyik intrinszik rendezetlen struktúra az ún. "PEVK" szegmens (prolinban, glutamátban, valinban és lizinben gazdag elem). A titin izoforma kompozíciója fajkként eltérő, ami predominánsan az N2B izoforma rágcsálókban és az N2BA nagyobb emlősökben. A hosszú titin izoformák (N2BA) alacsonyabb passzív feszülést eredményeznek, míg a rövid izoformák (N2B) magasabb passzív feszülést biztosítanak.

Krónikus kardiovaszkuláris betegségekben (pl. HFpEF-ben) a szarkomer passzív mechanikai tulajdonságait meghatározó patofiziológiai tényező a titin foszforilációs állapotának kinázok által mediált változatos modulációja. A protein kináz Ca (PKCa) a titin PEVK domén (pl. Ser-12742 és Ser-12884 a patkány, illetve Ser-11878 és Ser-12022 a humán szekvencia szerint) kizárólagos foszforilációjával növeli a molekula feszülését és viszkozitását.

Patológias körülmények között a miofilamentumok (aktin, miozin és titin), valamint a regulátor fehérjék (troponin komplex és tropomiozin) izoforma összetételének megváltozása, oxidációs és foszforilációs állapotának módosulása, vagy degradációja direkt módon befolyásolhatja egyrészt az erőgeneráció teljesítményét, Ca²⁺-érzékenységet és kinetikáját, másrészt a titin-dependens passzív feszülést.

1.3. A Ca²⁺ szerepe akut miokardiális diszfunkcióban: a Ca²⁺ paradox jelenség

Az akut koszorúér-elzáródás okozta szívizom-károsodás egy kétarcú folyamat eredménye. Az egyik patológiai tényező maga az iszkémia, a másik probléma bizonyos esetekben éppen a reperfüzió (iszkémia-reperfüzió károsodások). Az akut miokardiális infarktus aktuálisan leghatékonyabb terápiája az időben végzett koronária revaszkularizáció, mely leginkább képes mérsékelni az infarktus méretét, megőrizni a bal kamrai szisztolés

funkciót, valamint késleltetni a krónikus átépülést és szívelégtelenséget. A reperfüzió azonban paradox módon hozzájárulhat az infarktus során kialakuló miokardiális károsodáshoz.

Ha egy fiziológiásan perfundált izolált szívet átmenetileg Ca^{2+} -mentes Krebs-Henseleit pufferrel, majd ismét fiziológiásan perfundálunk, akkor a szív hamar tönkremegy. Ez a rövid ideig Ca^{2+} depletált szíven kiváltott Ca^{2+} repláció okozta adverz hatás az ún. Ca^{2+} paradoxként ismert jelenség. Habár az *in vivo* patofiziológiában a Ca^{2+} deplációja és replációja nem kizárólagosan jelentkezik iszkémia-reperfüzió során, a citoszolikus $[\text{Ca}^{2+}]$ extrém emelkedése az egyik kulcselem az iszkémia-reperfüzió miokardium károsodásában. Éppen ezért a Ca^{2+} paradoxnak kitett izolált szív széles körben ismert modell az iszkémia-reperfüzió során fellépő Ca^{2+} túltöltődés okozta strukturális és funkcionális miokardiális károsodás mechanizmusának tanulmányozására.

A Ca^{2+} deplációt követő Ca^{2+} repláció globális bal kamrai funkcionális következménye a szisztolés nyomás látványos csökkenése és ezzel párhuzamosan a végdiasztolés nyomás jelentős emelkedése. A Ca^{2+} paradox hatására fellépő drámai kontraktilis zavar hátterében miokardiális hiperkontraktúra és kiterjedt ultrastrukturális károsodás áll. Ca^{2+} depláció alatt ugyanis megbomlik az egymással szomszédos szívizomsejtek interkaláló korongjai közötti kapcsolat, és felbomlanak a sejt-sejt, illetve sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok. Végül masszív Ca^{2+} túltöltődésben kialakul a hiperkontraktúra, mialatt a szív „sápadttá” válik a mioglobinnal való elvesztés miatt.

Ezzel párhuzamosan számos intracelluláris változás is bekövetkezik a Ca^{2+} paradoxnak kitett izolált szívekben, melyek együttesen Ca^{2+} túltöltődést előidézve az intracelluláris Ca^{2+} mozgás kiterjedt zavarát okozzák. Ugyanakkor, azt egyelőre még nem sikerült tisztázni, hogy Ca^{2+} paradoxban vajon a szarkomer szétesése és a miofilamentumok károsodása is hozzájárul-e a kontraktilis elégtelenséghez. Ezzel kapcsolatban a Ca^{2+} -paradox patkány modelljeiben az MLC-1, valamint a troponin I és az α -fodrin degradációját már

leírták. Annak ellenére, hogy a Ca^{2+} paradox mostanában nem egy „forró téma”, a legújabb tudományos erőfeszítések láthatóan mégis képesek voltak új betekintést nyújtani a Ca^{2+} túltöltődés mechanizmusába.

1.4. A RAS patofiziológiai szerepe krónikus miokardiális diszfunkcióban

A RAS biokémiai kaszkádja kulcstényező a vérnyomás szabályozásában, ennek megfelelően a RAS változásai kritikusak a hipertónia kialakulásában és fenntartásában. A hipertónia a leggyakoribb humán betegség és egyben a szívelégtelenség leggyakoribb társbetegsége. A jellemzően hipertónia talaján kialakuló HFpEF fenotípusban a bal kamra hipertrófia és fibrózis növeli a szívizomzat merevségét, ami következményesen rontja a bal kamrai relaxációt és diasztolés telődést, végül diasztolés diszfunkció fejlődik ki.

Kardiovaszkuláris betegségekben az angiotenzin II AT_1R típusú receptorán közvetíti a RAS patológiás hatásait, melyek elsősorban a fokozott szimpatikus tónus és aldosteron szekréció, vazokonstriktió, só- és vízretenció, immun- és gyulladásos válaszok, valamint a globális kardiovaszkuláris sejtproliferáció és *remodelling*. Ezzel szemben, az ACE homológ ACE2 enzim egy ellen-regulatórikus szereplő a RAS szignalizációban. Az ACE2 az angiotenzin II bontásával angiotenzin 1-7 molekulát képez, mely Mas receptorán (MasR) hatva fejt ki a RAS előnyös hatásait, melyek elsősorban a vazodilatáció, natriurézis, szövetgyógyulás, differenciáció, apoptózis és a csökkent sejtproliferáció. Mindezek tehát két ellentétes hatású ág működését igazolják a RAS jelátvitelében, az egyik ág a klasszikus ACE – angiotenzin II – AT_1R tengely, míg a másik ág az alternatív ACE2 – angiotenzin 1-7 – MasR tengely. Érdekesség, hogy az alternatív útvonal aktivitása a klasszikus úton termelődő angiotenzin I és II mennyiségének függvénye, tekintettel arra, hogy ezen peptidek az ACE2 szubsztrátjai. Az ACE2 az angiotenzin II-indukált miokardiális hipertrófia, fibrózis és diasztolés diszfunkció negatív regulátora, ezért hiánya hipertóniában és miokardiális infarktusból adózó patológiás *remodelling*-hez vezet.

A RAS inhibitorok gyakorlati sikere valóban igazolja a RAS központi szerepét a hipertónia patofiziológiájában, ezáltal a szívelégtelenség kialakulásában. Mindazonáltal, a szívelégtelenség HFpEF és HFrEF fenotípusainak patomechanizmusa és terápiája egymástól lényegesen eltérő. Érdekes módon a RAS gátlóinak hatékonysága ellentmondásosnak tűnik, mivel azok HFrEF-ben bázisterápiának számítanak, de HFpEF-ben eredménytelenek. Ami azt illeti, HFpEF-ben a mai napig nincs bevált terápiás módszer.

Az ellentmondó gyakorlati tapasztalat igazolja a renint túlexpresszázó transzgenikus patkány törzs (mRen2) mint hipertónia modell jelentőségét. Mivel ezekben az állatokban felmerült a szöveti angiotenzin II patofiziológiai szerepe, ezért az mRen2 modell alkalmas a lokális patológiás RAS jelátvitelhez köthető miokardiális diszfunkció tanulmányozására. Figyelemre méltó, hogy az mRen2 patkányok fenotípusának karaktere hasonló ahhoz, mint ami humán szívelégtelenségben is látható. Nevezetesen, az mRen2 miokardium hipertrófiát, extracelluláris kollagén felhalmozódást és perivaszkuláris fibrózist, valamint angiotenzin II-mediált oxidatív stresszt mutat. Továbbá, egyes *in vivo* vizsgálatok csökkent bal kamrai szisztolés funkciót (ejekciós frakció), a papilláris izmok csökkent pozitív inotróp válaszkészségét és nyúzott rostok csökkent Ca^{2+} -érzékenységét állapították meg ezekben az állatokban. Ezek a funkcionális változások összességében a kontraktilitás zavarára és a HFrEF fenotípusra jellemző eltérések. Ugyanakkor, más mRen2 tanulmányokban bizonyos *in vivo* evidenciák a normál ejekciós frakció, de a kóros diasztolés funkció mellett szólnak. Az mRen2 szívek relaxációs zavara összhangban lehet a belőlük származó nyúzott bal kamrai rostok megnövekedett diasztolés feszülésével. Összességében úgy tűnik, hogy a hipertóniás mRen2 patkányok kardiális diszfunkciójának fenti változatai megfelelően tükrözik a humán betegségben fellépő miokardiális átépülés sokszínűségét.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A szarkomer diszfunkció mechanizmusának vizsgálata Ca^{2+} paradoxban

Célul tűztük ki a Ca^{2+} túltöltődés kiváltását követően csökkent szívizom-kontraktilitás háttérében álló lehetséges funkcionális és strukturális szarkomer diszfunkció felderítését. Munkánk során Ca^{2+} paradoxnak kitett szívekben meghatároztuk a miofibrilláris ATPáz aktivitásokat, karakterizáltuk az izolált szívizomsejtek mechanikai teljesítményét, valamint megvizsgáltuk a Ca^{2+} paradoxban lehetséges fehérjedegradáció célpontjait a kontraktilis (pl. aktin, miozin), strukturális (pl. titin, α -aktinin) és regulátor (pl. troponin komplex, MLC) miofilamentális fehérjék között.

2.2. A szöveti RAS szerepének vizsgálata diasztolés diszfunkcióban

Célunk volt meghatározni a RAS patológiás aktivitásának közvetlen hatását a kardiális szarkomer működésére a renint túlexpresszázó mRen2 állattörzsben. Tanulmányunkban 15 hetes hím homozigóta mRen2 patkányokban meghatároztuk a miokardiális ACE és ACE2 aktivitásokat, karakterizáltuk az izolált szívizomsejtek funkcióját, felmértük az angiotenzin II útvonalon a PKC α expressziót, valamint megvizsgáltuk a szarkomer passzív feszüléséért felelős titin foszforiláltsági állapotát.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Módszerek I: a Ca^{2+} paradox modell

3.1.1. A kísérleti állatok felhasználásának irányelvei

Az állatkísérleti protokollokat a „*Canadian Council on Animal Care*” és a „*National Institute of Health*” iránymutatásai alapján ellenőrizte és elfogadta a „*University of Manitoba Animal Care Committee*”.

3.1.2. Ca^{2+} paradox Langendorff szerint

Hím Sprague-Dawley patkányok (SD, 250-300 g) izolált szívét fiziológias Krebs-Henseleit oldattal (120,0 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,25 mM $CaCl_2$, 1,25 mM $MgSO_4$, 25,0 mM $NaHCO_3$ és 8,6 mM glükóz; pH 7,4) Langendorff módszerrel (37 °C, 95% O_2 , 5% CO_2) perfundáltuk. A perfúzió során a szíveket elektromosan ingereltük (300 stimulus/perc). Húsz perces stabilizációs periódust követően a szíveket 3 csoportba (n = 7-9/csoport) randomizáltuk. Ezt követően a szíveket perfundáltuk vagy továbbra is fiziológias (Ca^{2+} -os) Krebs-Henseleit pufferrel 15 percig (kontroll), vagy Ca^{2+} -mentes, máskülönben normál pufferrel 5 percig (Ca^{2+} depléció), vagy Ca^{2+} depléciót követően ismét fiziológias Krebs-Henseleit pufferrel 10 percig (Ca^{2+} paradox). A Langendorff szerint perfundált szívek bal kamrai üregébe erőmérőhöz csatlakoztatott vízzel teli latex ballont helyeztünk. Regisztráltuk a bal kamra által kifejtett nyomást és a bal kamrai végdiasztolés nyomást, valamint meghatároztuk a bal kamrában kifejlődő nyomás idő szerinti első deriváltjának maximumát és minimumát abszolút értékben (dP/dt_{max} és dP/dt_{min} , a fenti sorrendben).

3.1.3. Miofibrilláris ATPáz aktivitás

Bal kamrai miofibrillumokat (n = 7-9/csoport) izoláltunk, majd szuszpenziós médiumban szuszpendáltunk (100,0 mM KCl, 20,0 mM Tris_HCl; pH 7,0). A totál ATPáz aktivitást a következő pufferben mértük: 20,0 mM imidazol, 3,0 mM $MgCl_2$, 2,0 mM Na_2ATP , 5,0 mM NaN_3 , 50,0 mM KCl, 0,01 mM szabad Ca^{2+} ; pH 7,0. A bazális Mg^{2+} -függő ATPáz aktivitást szintén ebben a pufferben határoztuk meg, kivéve, hogy ekkor a szabad Ca^{2+} -ot 1,0 mM EGTA-ra cseréltük. A reakcióidő 37 °C-on 5 perc volt, melyet jéghideg 12%-os trikloroecetsav hozzáadásával állítottunk le. Centrifugálást követően a foszfátot a felülúszóból kolorimetriás módszerrel határoztuk meg. A Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitást a totál és a bazális (Mg^{2+}) ATPáz aktivitás különbségeként számoltuk.

Izolált szívizomsejtek mechanikai vizsgálatának mérőrendszere

A Langendorff-perfundált mélyfagyasztott ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) szívizomszövet mintákat ($n = 5-7/\text{csoport}$) izoláló oldatban ($1,0\text{ mM MgCl}_2$, $100,0\text{ mM KCl}$, $2,0\text{ mM EGTA}$, $4,0\text{ mM ATP}$, $10,0\text{ mM imidazol}$; $\text{pH } 7,0$) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on mechanikailag izoláltuk és $0,5\%$ Triton X-100 detergenssel membrán-permeabilizáltuk. Az izolált szívizomsejteket egy hosszvezérlő motorhoz és egy erőmérő egységhez rögzítettük $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A szívizomsejtek izometriás erőgenerációját $2,3\text{ }\mu\text{m}$ szarkomerhosszon regisztráltuk ($n = 12-13/\text{csoport}$). Az izolált szívizomsejtek Ca^{2+} -függő erőgenerációját a preparátum relaxáló oldatból ($10,0\text{ mM BES}$, $37,11\text{ mM KCl}$, $6,41\text{ mM MgCl}_2$, $7,0\text{ mM EGTA}$, $6,94\text{ mM ATP}$, $15,0\text{ mM kreatin-foszfát}$; $\text{pH } 7,2$) aktiváló oldatba (összetétele megegyezik a relaxáló oldattal, de EGTA helyett CaEGTA-t tartalmaz) történő transzferével indukáltuk. Kísérleteinkben a Ca^{2+} koncentrációkat $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$ egységekben adtuk meg. Minden oldatot frissen egészítettünk ki proteáz inhibitorokkal: fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF): $0,5\text{ mM}$; leupeptin: $40\text{ }\mu\text{M}$; és E-64: $10\text{ }\mu\text{M}$. A membránfosztott szívizomsejtek maximális és szubmaximális Ca^{2+} -aktivált erőgenerációját maximális ($\text{pCa } 4,75$) és szubmaximális ($\text{pCa } 5,4-7,0$) aktiváló oldatok használatával regisztráltuk. Meghatároztuk az erő-regeneráció sebességi állandóját (k_{tr}) és az erőgeneráció Ca^{2+} -érzékenységét (pCa_{50}). A vizsgált szívizomsejtek Ca^{2+} -független passzív erejét relaxáló oldatban ($\text{pCa } 9,0$) mértük.

Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A Langendorff-perfundált bal kamrai szövetmintákat ($n = 5/\text{csoport}$) fagyos mozsárban porítottuk és jéghideg pufferben ($30,0\text{ mM KCl}$, $15,0\text{ mM imidazol}$, $5,0\text{ mM NaCl}$, $1,0\text{ mM MgCl}_2$, $1,0\text{ mM EGTA}$, $1,0\text{ mM EDTA}$, $0,5\text{ mM DTT}$ és CaCl_2 , $0,3\text{ mM Calpain Inhibitor I}$, leupeptin és *Phosphatase Inhibitor Cocktail 1*; $\text{pH } 7,5$) homogenizáltuk. A homogenizátumokat nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferben 3 percig főztük. A

fehérjéket egy-dimenziós SDS-PAGE használatával grádiens gélben (koncentráció tartomány: 6-18%) szeparáltuk és ezüsfestéssel vizualizáltuk. A kisméretű miofilamentális fehérjéket (≤ 100 kDa körül) egy-koncentrációs SDS-PAGE használatával (α -aktinin: 7%; dezmin: 10%; aktin, cTnT, Tm és cTnI: 15%; MLC-1 és MLC-2: 20%) szeparáltuk.

Western immunoblot

A miofilamentális fehérjéket Western immunoblottal azonosítottuk, ahol a membránokat a következő elsődleges antitestekkel jelöltük: anti- α -aktinin EA-53 klón (Sigma-Aldrich), hígítás 1:5000; anti-dezmin DE-U-10 klón (Sigma-Aldrich), hígítás 1:7000; anti-aktin (Abcam), hígítás 1:1000; anti-cTnT 1A11 klón (Research Diagnostics), hígítás 1:3000; anti-Tm (Sigma-Aldrich), hígítás 1:600; anti-cTnI 19C7 klón (Research Diagnostics), hígítás 1:1000; anti-MLC-1 (Santa Cruz Biotechnology), hígítás 1:7000; anti-MLC-2 (Abcam), hígítás 1:400.

MHC izoformák vizsgálata

A kamrai szöveteket ($n = 5$ /csoport) denaturáló körülmények között homogenizáltuk. Az MHC izoformákat (α és β) 4%-os poliakrilamid gélen szeparáltuk konstans 220 V feszültségen 3-3,5 órán át 15 °C-on. A géleket *Coomassie* gélfestéssel festettük. Humán szívelégtelen kamrai szívizomszövet szolgált α -MHC és β -MHC izoforma kontrollként. Az MHC Western immunoblot analízishez a mintákat ($n = 4-6$ /csoport) a mechanikai mérésekhez hasonlóan dolgoztuk fel, de ebben az esetben a szívizomszövetet izoláló oldat helyett mintapufferben oldottuk fel. Hím SD patkány *musculus soleus* vázizom szolgált β -MHC izoforma kontrollként. A membránokat transzfer után az alábbi elsődleges antitestekkel jelöltük: pán anti-MHC (Sigma-Aldrich), hígítás 1:10000; és anti- β -MHC izoforma: egér IgM, MYH7 (A4.840) sc-53089 (Santa Cruz Biotechnology), hígítás 1:1000.

Titin esszék

A kamrai szívizomszöveteket (n = 3 duplikátumban/csoport) a mechanikai mérésekhez hasonlóan készítettük elő, és SDS mintapufferben [8,0 M urea, 2,0 M tiourea, 3,0% SDS, 75,0 mM ditiotreitól (DTT), 0,05 M Tris_HCl (pH 6,8), 10,0% glicerol, 0,004% bróm-fenol kék, 40,0 µM leupeptin, 10,0 µM E-64] tártuk fel. Humán szívelégtelen kamrai minta szolgált N2BA és N2B titin izoforma kontrollként. A titin szeparációját 2%-os agarózzal megerősített géleken PAGE által végeztük. A gélek 2 mA konstans áramerősség mellett 540 percig futottak. A géleket Coomassie kék fehérjefestékkel festettük.

Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm a középérték közepes hibája (SEM) formában tüntettük fel. A csoportok közötti különbségeket egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) Bonferroni *post-hoc* teszt használatával értékeltük, ahol $P < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

3.2. Módszerek II: az mRen2 modell

A kísérleti állatok felhasználásának irányelvei

Az állatkísérleti protokollokat az Európai Parlament 2010/63/EU sz. előírásával összhangban ellenőrizte és elfogadta a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (Etikai engedély száma: 1/2013/DE MÁB). A transzgenikus mRen2 patkány törzs vizsgálatában SD patkányok (n = 6) szolgáltak geno- és fenotípus kontrollként.

A hipertónia transzgenikus mRen2 patkány modellje

Egér *Ren-2^d* renin transzgén hordozó (mRen2) hím homozigóta patkányokat (n = 6) a „Max Delbrück Centrum Für Molekulare Medizin” (Berlin-Buch, Németország) intézettől szereztük be. A 15 hetes kísérleti állatok szívét eltávolítottuk, a bal kamrát izoláló oldatban azonnal leválasztottuk, folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd -70 °C-on tároltuk.

Miokardiális ACE és ACE2 aktivitás

Körülbelül 0,1 g mélyfagyasztott bal kamrai mintát (n = 4, SD és mRen2 patkányokból egyaránt) tízszeres térfogatú jéghideg *Dulbecco's* foszfát-puffer sóoldatban (DPBS, Ca²⁺- és Mg²⁺-mentes, Gibco) homogenizáltunk. Az ACE aktivitás meghatározás reakcióelegye 6 µl szívhomogenizátumot tartalmazott pufferben (100,0 mM Tris_HCl, 15,0 µM Abz-FRK(Dnp)P, 50,0 mM NaCl, 10,0 µM ZnCl₂; pH 7,0). A 45 perces reakcióidő során a fluoreszcens intenzitásokat (excitáció: 320 nm; emisszió: 405 nm) 60 másodpercenként mértük. A mért értékeket az idő függvényében ábrázoltuk és lineáris regresszióval illesztettük. Az ACE aktivitást az alábbi képlet szerint kalkuláltuk: ACE aktivitás = (S/k)*D/P; melyben S a fluoreszcens intenzitás emelkedésének sebessége (meredekség), k a fluoreszcens intenzitás emelkedése 1 µmol szubsztrát hasítása esetén, D a hígítási faktor (35 ezekben a kísérletekben) és P a fehérjekoncentráció (mg/ml-ben). Egy Unit megfelel 1 µmol szubsztrát hasításának 1 perc alatt 1 mg fehérje által.

Az ACE2 aktivitás meghatározás reakcióelegyéhez 20 µl szövethomogenizátumot adtunk proteáz inhibitorok jelenlétében: 10,0 µM Bestatin-hidroklorid; 10,0 µM Z-prolil-prolin; 5,0 µM Amastatin-hidroklorid; 10,0 µM Captopril és 5,0 mM NaCl; 100,0 µM ZnCl₂; 75,0 mM Tris_HCl; pH 6,5. A reakció-hőmérséklet 37 °C volt. A 84 perces reakcióidő során a fluoreszcens intenzitásokat (excitáció: 320 nm; emisszió: 405 nm) 6 percenként mértük. A mért értékeket az idő függvényében ábrázoltuk és lineáris regresszióval illesztettük. Az illesztést $r^2 > 0,8$ esetén fogadtuk el. Az ACE2 aktivitást az alábbi képlet szerint kalkuláltuk: ACE2 aktivitás = (S/k)*D/P; melyben S a fluoreszcens intenzitás emelkedésének sebessége (meredekség), k a fluoreszcens intenzitás emelkedése 1 nmol szubsztrát hasítása esetén, D a hígítási faktor (10 ezekben a kísérletekben) és P a fehérjekoncentráció (mg/ml-ben). Egy Unit megfelel 1 nmol szubsztrát hasításának 1 perc alatt 1 mg fehérje által.

Izolált szívizomsejtek mechanikai teljesítménye

SD kontroll és mRen2 szívekből (n = 4/csoport) izolált szívizomsejtek (n = 5-6/szív) mechanikai teljesítményét a Ca²⁺ paradox protokolljában leírtak szerint vizsgáltuk.

Titin esszék

A titin szeparációját és azonosítását SD és mRen2 bal kamrai szövetmintákban (n = 4 duplikátumban/csoport) a Ca²⁺ paradox protokolljában leírtaknak megfelelően végeztük el. Az SD kontroll és mRen2 mintákat tartalmazó géleket Pro-Q Diamond foszfoprotein festékkel is megfestettük 90 percig. Western immunoblottal vizsgáltuk a titin PEVK domén egyes szerin oldalláncainak foszforilációját is. A foszfo-specifikus antitestek a teljes humán és patkány titin szekvencia alapján vagy a Ser-11878 és Ser-12742 (PS26, GL Biochem, hígítás 1:1000) vagy a Ser-12022 és Ser-12884 (PS170, Genscript, Piscataway, hígítás 1:1000) foszforilált oldalláncokat ismerik fel, a fenti sorrendben.

Protein kináz Ca (PKC α) és aktin kontroll Western immunoblot

Körülbelül 0,1 g mélyfagyasztott SD és mRen2 bal kamrai szívizomszövetet (n = 4/csoport) tízszeres térfogatú jéghideg DPBS-ben (Ca²⁺- és Mg²⁺-mentes, Gibco) homogenizáltunk. A homogenizátumokat azonos volumenű kétszeresen koncentrált SDS mintapufferrel egészítettük ki és 10 percig 100 °C-on inkubáltuk. A PKC α expressziót és aktivitást anti-PKC α (Sigma-Aldrich, hígítás 1:20000) és anti-foszfo(Ser-657/Tyr-658)-PKC α (EMD Millipore, hígítás 1:500) antitestekkel teszteltük, a fenti sorrendben. Az aktin expressziót anti-aktin antitesttel (Sigma-Aldrich, hígítás 1:3500) vizsgáltuk.

Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm a középérték közepes hibája (SEM) formában tüntettük fel. A csoportok összehasonlítására nem-paraméteres Mann-Whitney tesztet használtunk, ahol P<0,05 értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Kontraktilis és miofibrilláris diszfunkció Ca^{2+} paradoxban

A Ca^{2+} paradox drámaian rontja a bal kamra funkciót

A kontroll bal kamra által kifejtett nyomás ($127,4 \pm 6,1$ Hgmm) látványosan csökkent Ca^{2+} depléció ($9,8 \pm 1,3$ Hgmm, $P < 0,001$) és Ca^{2+} paradox ($12,9 \pm 1,3$ Hgmm, $P < 0,001$) hatására egyaránt. A kontroll dP/dt_{\max} és dP/dt_{\min} ($7073,8 \pm 351,0$ és $4075,3 \pm 206,2$ Hgmm/sec, a fenti sorrendben) ugyancsak jelentősen zuhant Ca^{2+} depléció ($62,6 \pm 6,9$ és $87,9 \pm 12,6$ Hgmm/sec, a fenti sorrendben, $P < 0,001$) és Ca^{2+} paradox ($93,9 \pm 19,7$ és $163,4 \pm 17,9$ Hgmm/sec, a fenti sorrendben, $P < 0,001$) során. Ugyanakkor, a kontroll bal kamrai végdiasztolés nyomás ($4,1 \pm 0,5$ Hgmm) markánsan emelkedett Ca^{2+} deplécióban ($32,2 \pm 3,3$ Hgmm, $P < 0,001$), és még tovább nőtt Ca^{2+} paradoxban ($72,4 \pm 5,0$ Hgmm, $P < 0,001$).

A miofibrilláris Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitás csökken, míg a Mg^{2+} -függő ATPáz aktivitás nő Ca^{2+} paradoxban

A kontroll Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitás ($12,08 \pm 0,57$ $\mu\text{mol Pi/mg fehérje/h}$) lecsökkent Ca^{2+} deplécióban ($8,13 \pm 0,19$ $\mu\text{mol Pi/mg fehérje/h}$, $P < 0,001$), és az is maradt Ca^{2+} paradox során is ($8,40 \pm 0,22$ $\mu\text{mol Pi/mg fehérje/h}$, $P < 0,001$). Ezzel szemben, a kontroll bazális Mg^{2+} -függő ATPáz aktivitás ($3,20 \pm 0,25$ $\mu\text{mol Pi/mg fehérje/h}$) nem változott Ca^{2+} deplécióban ($3,27 \pm 0,10$ $\mu\text{mol Pi/mg fehérje/h}$), de nőtt Ca^{2+} paradox során ($7,21 \pm 0,36$ $\mu\text{mol Pi/mg fehérje/h}$, $P < 0,001$).

A Ca^{2+} paradox lerontja a szívműködés Ca^{2+} -aktivált erőgenerációját

A kardiomiociták maximális aktív feszülése Ca^{2+} deplécióban ($21,04 \pm 2,32$ kN/m^2) nem volt szignifikánsan különböző a kontroll értékektől ($25,07 \pm 3,51$ kN/m^2), de az jelentősen csökkent a Ca^{2+} paradoxnak kitett sejtekben ($12,12 \pm 3,19$ kN/m^2 , $P < 0,05$). A kontroll szívműködés maximális k_{tr} értékétől pCa 4,75 mellett ($k_{tr, \max}$, $4,61 \pm 0,22$) a Ca^{2+}

depléción (3,85 ± 0,21, P<0,05) és a Ca²⁺ paradox (3,21 ± 0,23, P<0,001) csoportok sejtjei egyaránt alacsonyabb értékeket produkáltak. A vizsgált szívműsejtek Ca²⁺-érzékenységére vonatkozóan a pCa₅₀ érték 5,99 ± 0,02 volt a Ca²⁺ depléción csoportban, amely azonban szignifikánsan nem különbözött a kontroll csoport pCa₅₀ értékétől (5,94 ± 0,02). Ugyanakkor, a pCa₅₀ értéke 5,90 ± 0,03 volt Ca²⁺ repléción követően, ami a Ca²⁺ depléción csoporthoz képest alacsonyabb Ca²⁺-érzékenységre utal a Ca²⁺ paradox csoportban (P<0,05). A szívműsejtek passzív feszülése a kontrollhoz képest (2,13 ± 0,29 kN/m²) Ca²⁺ depléciónban (2,11 ± 0,54 kN/m²) és Ca²⁺ paradoxban (2,25 ± 0,35 kN/m²) nem változott.

4.2. α-MHC és cTnT degradáción Ca²⁺ paradoxban

A Ca²⁺ paradox károsítja a miofibrillumok integritását: célkeresztben az α-MHC és a cTnT

A kontroll csoporthoz képest a pán MHC Western immunoblot több fehérjesávot is azonosított a Ca²⁺ depléción és a Ca²⁺ paradox csoportokban, mely sávok nagyobb mobilitással jelentek meg, mint az MHC anyamolekula, utalva ezzel az MHC degradációjára. A β-MHC izoformát Western immunoblottal nem tudtuk kimutatni az általunk vizsgált patkány szívekben. Ennek megfelelően az α-MHC az egyetlen MHC izoforma, ami a mintáinkban expresszálódik. Az MHC izoformák specifikus elektroforetikus szeparációját követő Coomassie festés szintén csak az α-MHC izoformát igazolta a kontroll csoportban, mely izoforma azonban az anyamolekulától alacsonyabb fehérjesávként jelent meg a Ca²⁺ depléción és a Ca²⁺ paradox csoportokban, utalva ezzel az MHC degradációra ezekben a mintákban. Továbbá, a cTnT is szemmel látható progresszív degradációt mutatott Ca²⁺ depléción és Ca²⁺ repléción hatására. Ezzel szemben, nem találtunk változást a fehérjék mennyiségében és integritásában az α-aktinin, dezmin, aktin, Tm, cTnI, MLC-1 és MLC-2 esetében. Látszólag a titin sem mutatott degradációt Ca²⁺ depléción és Ca²⁺ paradox során.

4.3. Megnövekedett szívizomsejt Ca^{2+} -független passzív feszülés az mRen2 patkányokban

A Ca^{2+} -aktivált erőgeneráció nem változik, míg a passzív feszülés nő az mRen2 szívekben

A kardiomiociták Ca^{2+} -aktivált maximális feszülése szignifikánsan nem különbözött az SD ($29,05 \pm 2,80 \text{ kN/m}^2$) és mRen2 ($25,89 \pm 0,99 \text{ kN/m}^2$) patkányokban. Hasonlóképpen, az erőgeneráció Ca^{2+} -érzékenységében sem találtunk szignifikáns különbséget az SD ($5,87 \pm 0,05$) és mRen2 ($5,83 \pm 0,01$) csoportok között. Ezzel szemben, a szívizomsejtek Ca^{2+} -független passzív feszülése magasabb volt az mRen2 patkányok bal kamrájában ($1,74 \pm 0,06 \text{ kN/m}^2$, $P < 0,05$), mint az SD kontroll bal kamrában ($1,28 \pm 0,18 \text{ kN/m}^2$).

4.4. A szöveti RAS intracelluláris diszregulációja és a kardiális titin megváltozott foszforilációs mintázatának kapcsolata az mRen2 modellben

A szöveti RAS jótékony útvonalának hatásfoka romlik az mRen2 bal kamrában

A kardiális ACE aktivitás hasonló volt az SD ($0,22 \pm 0,02 \text{ U/mg}$) és mRen2 ($0,26 \pm 0,02 \text{ U/mg}$) bal kamrában. A bal kamrai ACE2 aktivitás azonban az SD kontrollhoz képest ($3,82 \pm 0,31 \text{ U/mg}$) alacsonyabb volt az mRen2 csoportban ($2,49 \pm 0,40 \text{ U/mg}$, $P < 0,05$).

A kardiális PKC α expresszió nő az mRen2 modellben

A bal kamrai PKC α expresszió az SD kontrollhoz képest ($1,00 \pm 0,12$) $1,78 \pm 0,14$ -szerez emelkedést mutatott az mRen2 állatokban ($P < 0,01$). Ezzel párhuzamosan az mRen2 szívekben nem volt különbség a foszforilált (Ser-657/Tyr-658) PKC α relatív mennyiségében, sem az aktin ($1,25 \pm 0,17$ mRen2-ben vs. $1,00 \pm 0,06$ SD-ben), sem a PKC α expresszióra normalizálva ($0,79 \pm 0,13$ mRen2-ben vs. $1,00 \pm 0,10$ SD-ben).

A titin PEVK domén foszforilációja nő az mRen2 állatokban

Gél- és blotfestés hasonló titin expressziós mintázatot mutatott az mRen2 és SD szívekben. A domináns fehérjesáv 3000 kDa körül az N2B titin izoformának felel meg. Pro-Q

Diamond foszfoprotein specifikus festékkel a titin hasonló foszforilációs szintjét találtuk az mRen2 ($0,92 \pm 0,04$) és SD ($1,00 \pm 0,04$) szívekben. Hasonlóan, nem láttunk különbséget a titin PEVK domén Ser-12884 foszforilációjában sem ($0,92 \pm 0,14$ mRen2-ben vs. $1,00 \pm 0,08$ SD-ben). Az mRen2 miokardium ($1,33 \pm 0,12$, $P < 0,05$) azonban a kontrolltól nagyobb Ser-12742 foszforilációt mutatott ($1,00 \pm 0,06$) ugyanabban a titin (PEVK) régióban.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A kontraktilis fehérjék degradációja az aktomiozin mechanoenzim diszfunkciójához vezet kísérletes Ca^{2+} paradoxban

Tanulmányunkban első alkalommal jellemeztük a miofibrillumok szintjén a Ca^{2+} paradox kardiális funkcióra kifejtett hatását. Megfigyeléseink alapján Ca^{2+} depléció, majd repléció hatására az izolált szívek globális funkciózavarához megváltozott miofibrilláris ATPáz aktivitás és csökkent szívizomsejt Ca^{2+} -függő erőgeneráció társul. Továbbá, a Ca^{2+} paradoxot elszenvedő szívekben a kontraktilis fehérjék (α -MHC és cTnT) degradációja következik be. Eredményeink arra utalnak, hogy az aktin-miozin interakció elégtelensége feltehetőleg a miofibrillumok károsodása által hozzájárul a Ca^{2+} túltöltöttségben kialakuló kontraktilis diszfunkcióhoz.

Kísérleteinkben Ca^{2+} megvonásban és Ca^{2+} paradoxban egyaránt a bal kamra által kifejtett nyomás és dP/dt_{max} drámai csökkenését figyeltük meg, ami korábbi vizsgálatokkal összhangban a pumpafunkció nagymértékű hanyatlásának a jele. Mindemellet, Ca^{2+} paradoxban a bal kamra jelentős végdiasztolés nyomásemelkedése és a csökkent dP/dt_{min} a diasztolés telődés zavarára utal, ami pedig párhuzamba állítható a miokardium nagyobb nyugalmi feszülésével.

Az itt bemutatott saját kísérleteinkben a Ca^{2+} paradoxot elszenvedett izolált szívek miofibrillumaiiban a Mg^{2+} -dependens ATPáz aktivitás nőtt, de a Ca^{2+} -stimulált ATPáz

aktivitás csökkent. Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy Ca^{2+} paradoxban a miozin fejek nagyobb mértékű bazális ATP hidrolízisét az ATP metabolitok kisebb mértékű disszociációja követi, hozzájárulva ezzel relaxáció során a merevebb aktin-miozin interakciókhoz és/vagy a helyi ATP elhasználásához. A szívizom kontrakciójának szabályozásában általános jelenség, hogy a Mg^{2+} -ADP szorosan kötődve a miozinhoz elősegíti az izometriás feszülés kialakulását és redukálja a feszülés kinetikáját. Nyúzott patkány rostokon végzett kísérletek bemutatták, hogy a Mg^{2+} -ADP direkt módon hat a rigor kialakulására és a miozin ATPáz aktivitására, sugallva ezzel az összefüggést a merev keresztthidak kialakulása és a miozin ATPáz aktivitás növekedése között. Valóban, patkány permeabilizált szívizomsejtekben a rigor fokozott miozin ATPáz aktivitással társult, továbbá, a Mg^{2+} -ADP stimulálta a miozin ATPáz-t. Ezek az eredmények felvetik a Mg^{2+} -ADP disszociációs lépésekre és/vagy a további Mg^{2+} -ATP kötésre és a keresztthidak szétválására kifejtett gátló hatását. Eszerint úgy tűnik, hogy Ca^{2+} paradoxban a stimulált ATPáz a Mg^{2+} -függő forma, ami fokozott ATP hidrolízist és mérsékelt P_i és ADP felszabadulást eredményez. Ez a látszólagos ellentmondás arányaiban egyre több aktinhoz kötött miozin fejhez vezethet minden egyes keresztthíd-ciklusban. A merev aktin-miozin kapcsolat és/vagy a magasabb bazális ATP fogyasztás pedig nagyobb nyugalmi feszüléshez vezethet. Ez az elképzelés magyarázhatja a bal kamra magasabb végdiasztolés nyomását Ca^{2+} paradoxban. Másfelől viszont azt találtuk, hogy a Ca^{2+} depletált és Ca^{2+} paradox szívekben a globális szisztolés funkcióromlás csökkent miofibrilláris Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitással társult. Régóta ismert, hogy a miozin ATPáz határozza meg az izomösszehúzódás sebességét, ezért a Ca^{2+} -aktivált kontrakció sebességének paraméterei (pl. dP/dt) szorosan korrelálnak a *power stroke* beindításához szükséges miofibrilláris Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitással. Következésképpen, az alacsony Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitás csökkent Ca^{2+} -függő kontrakcióval társul, ami viszont szisztolés diszfunkciót eredményez, csakúgy, mint a Ca^{2+} paradox szívben.

Ezen túlmenően, első alkalommal kíséreltük meg vizsgálni a celluláris mechanikai funkciót Ca^{2+} paradoxban, és írtuk le a maximális aktív feszülés és a $k_{\text{tr,max}}$ jelentős csökkenését a Langendorff-perfúziót túlélő szívizomsejtekben. Ezek az izolált preparátum eredmények összhangban állnak a bal kamrai kontraktilitás leleteivel, ugyanis az aktív feszülés csökkenését a bal kamrában kifejlődő nyomáscsökkenés celluláris alapjának gondoljuk. Megítélésünk szerint a $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ esése a csökkent $k_{\text{tr,max}}$ globális visszatükröződése a redukált Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitás miatt. A Ca^{2+} -függő paraméterekkel szemben, az izolált szívizomsejtek passzív feszülését a Ca^{2+} depléció és Ca^{2+} repléció egyáltalán nem érintette. Ca^{2+} paradoxban ezért nem valószínű, hogy a szarkomer passzív elemei elsődlegesen felelnének a miokardium merevségéért.

Biokémiai kísérleteinkben az α -MHC és a cTnT graduális károsodását figyeltük meg a Ca^{2+} paradox felé vezető úton. Korábbi tanulmányok alapján a miofibrillumok bizonyos degradációja előfordulhat paradox után, amely felveti a cTnT kiszabadulásának lehetőségét a szétesett membránon keresztül. Hasonlóképpen, Ca^{2+} túltöltődésnek kitett tengerimalac szívek homogenizátumai a cTnT degradációját mutatták. A troponin alegységek vagy fragmentumaik és más szívizom fehérjék közötti lehetséges keresztkötések szerepét ezért már felvetették a Ca^{2+} paradoxot követő sejthalálban. Ezek a megfigyelések teljes összhangban állnak az általunk végzett Western blot esszé eredményével, ami progresszív cTnT degradációra utal Ca^{2+} megvonás és Ca^{2+} paradox során, habár mi nem figyeltünk meg keresztkötött cTnT formákat.

5.2. A lokális RAS alternatív útvonalának gyengülése együtt jár a kardiális titin-mediált passzív feszülés növekedésével mRen2 patkányokban

Munkánk során a hipertónia mRen2 modelljében a kardiális angiotenzin II képződésért felelős ACE változatlan aktivitása mellett leírtuk a kardiális angiotenzin II lebontásért felelős szöveti ACE2 aktivitás csökkenését, ami a miokardiális angiotenzin II csökkent

eliminációjára, ezáltal a helyi RAS patológiás aktivitására utal. Továbbá, a szöveti angiotenzin II szignalizációs útvonalon megfigyeltük a PKC α fokozott expresszióját az mRen2 állatok bal kamrájában. Végül, kimutattuk a szarkomer passzív feszülését meghatározó titin PEVK doménjének emelkedett foszforilációs szintjét, ami hozzájárulhat a szívizomsejtek megnövekedett nyugalmi feszüléséhez, ezáltal a globális diasztolés diszfunkcióhoz az mRen2 patkányokban.

Az mRen2 patkányok bal kamrai szívizomsejtjeinek megnövekedett Ca²⁺-független (passzív) feszülését találtuk, míg a Ca²⁺-aktivált (aktív) erőgenerációban szignifikáns változást nem láttunk. Mechanikai kísérleteinkben az intracelluláris tényezők önálló szerepét első alkalommal vizsgáltuk – az extracelluláris mátrixtól függetlenül – mRen2 állatokból izolált membránfosztott szívizomsejteken. Valóban, szívelégtelen betegek szívizom biopsziáin végzett kísérletek bemutatták egyrészt, hogy a szívizomsejtek passzív feszülése megnő HFpEF-ben, másrészt, hogy ez a passzív feszülés HFpEF-ben nagyobb, mint HFrEF-ben. Ezek alapján a szívizomsejtek magas nyugalmi feszülését a HFpEF-ben látható diasztolés diszfunkció celluláris jellegzetességének tartják.

Intracellulárisan a kontraktilis apparátus passzív feszülésének fő meghatározója a fél szarkomeren áthidaló titin molekula. A titint elsőként vizsgáltuk az mRen2 patkányokban. A fehérjedegradáció különösebb jelei nélkül az mRen2 szívekben csak az N2B titin izoforma expresszióját figyeltük meg.

Az angiotenzin II intracellulárisan aktiválja a PKC α -mediált fehérje foszforilációt, több miofibrilláris fehérje mellett a titinen is hatva. Ennek megfelelően a PKC α expressziós szintje 1,8-szeres emelkedést mutatott, míg a foszforilált (Ser-657/Tyr-658) és a totál PKC α aránya nem változott az mRen2 állatok bal kamrájában, ami az aktivált (foszforilált) PKC α magasabb szintjére utal az mRen2 patkányokban.

Pro-Q Diamond foszfospecikus gélfestésen alapuló kísérleteinkben az mRen2 patkányokban nem találtunk változást a titin összfoszforilációjában. Korábbi kísérletek azonban arról árulkodtak, hogy a titin PEVK domént a Pro-Q Diamond festék nem ismeri fel. A PKC α viszont a titint a PEVK rugalmas elem Ser-12742 és Ser-12884 oldalláncain foszforilálja, ami pedig növeli a szívizomsejtek passzív feszülését. Mindezeket figyelembe véve, a titin PEVK foszforilációt Ser-12742 és Ser-12884 elleni foszfo-specifikus antitestekkel vizsgáltuk. Az mRen2 bal kamrában a Ser-12742 megnövekedett és Ser-12884 változatlan foszforilációs szintjét találtuk. A PEVK Ser-12742 hiperfoszforilációját korábban leírták aorta lekötésen átesett egerekben, a hipertónia idős kutya modelljében, csakúgy, mint humán magas vérnyomáshoz társuló HFpEF-ben. Eszerint a kollagén- és titin-dependens feszülés szignifikáns növekedése együtt jár a titin foszforilációs szintjének egyértelmű változásaival, úgymint a PKC α -függő hiperfoszforiláció a Ser-11878 (Ser-12742 patkányban) oldalláncon a PEVK elemében.

5.3. A doktori értekezésben megfogalmazott új tézisek

Eredményeink alapján az alábbi új megállapításokat fogalmazzuk meg:

- Ca²⁺ paradoxot elszenvedett szívben az α -MHC és a cTnT degradációja együtt jár a miofibrillumok megváltozott ATPáz aktivitásával és az izolált szívizomsejtek csökkent Ca²⁺-aktivált erőgenerációjával, amik együttesen hozzájárulhatnak a pumpafunkció globális zavarához.

- A hipertónia mRen2 transzgenikus patkány modelljében a miokardiális ACE2 aktivitás csökkenése együtt jár a titin PKC α -mediált PEVK (Ser-12742) hiperfoszforilációjával, ami hozzájárulhat az izolált szívizomsejtek megnövekedett passzív feszüléséhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A Ca^{2+} paradoxot elszenvedő izolált szívek globális és celluláris funkciózavarához csökkent Ca^{2+} -stimulált ATPáz aktivitás társul, ami potenciálisan a miofilamentális fehérjék degradációjának eredménye. A disszertációban bemutatott adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a szív relaxációjának Ca^{2+} paradoxban látható súlyos zavara valószínűleg a kereszthíd-ciklus elégtelenségének tudható be a kóros miofibrilláris ATPáz aktivitás miatt, és látszólag nincs közvetlen összefüggésben a titinnel. Másfelől viszont elképzelhető, hogy Ca^{2+} paradoxban a szisztolés funkció drámai csökkenésének egyik molekuláris alapja az α -MHC és cTnT hasítása, ami a Ca^{2+} -aktivált erőgeneráció kölcsönösen egymástól függő paramétereinek redukciónak okozza ezzel a szívizomsejtek, a miofibrillumok és az izolált szív szintjén.

A RAS jelátvitelének genetikai stimulációja által kiváltott hipertóniában a bal kamrában kifejlődő diasztolés diszfunkció celluláris és molekuláris alapja korrelál a humán HFpEF-ben is látható mechanisztikus változásokkal. Eredményeink felvetik a miokardiális RAS tengelyek egyensúlyának felborulását mint patofiziológiai tényezőt a diasztolés diszfunkció kialakulásában. A disszertáció eredményei arra utalnak, hogy a Ser-12742 hiperfoszforiláció a titin PEVK elemében és a megnövekedett passzív feszülés a szívizomsejtekben közös jellegzetességei a RAS-mediált kísérletes hipertóniában látható diasztolés diszfunkciónak és a klinikai HFpEF-nek.

7. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/175/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Árpád
Neptun kód: K5539B
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, Á.**, Kalász, J., Pásztorné Tóth, E., Tóth, A., Papp, Z., Dhalla, N. S., Barta, J.: Myosin heavy chain and cardiac troponin T damage is associated with impaired myofibrillar ATPase activity contributing to sarcomeric dysfunction in Ca²⁺-paradox rat hearts.
Mol. Cell. Biochem. 403 (1-2), 57-68, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-2954-8>
IF: 2.613 (2015)
2. **Kovács, Á.**, Fülöp, G. Á., Kovács, A., Csípő, T., Bódi, B., Priksz, D., Juhász, B., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Granzier, H. L., Édes, I., Fagyas, M., Papp, Z., Barta, J., Tóth, A.: Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 310 (11), H1671-H1682, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>
IF: 3.324 (2015)

További közlemények

3. Nagy, L., Gödény, I., Nánási, P. P., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csípő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., **Kovács, Á.**, Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecantiv-mecarbil segítségével.
Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.
4. **Kovács, Á.**, Alogna, A., Post, H., Hamdani, N.: Is enhancing cGMP-PKG signalling a promising therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction?
Neth. Heart. J. 24 (4), 268-274, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12471-016-0814-x>
IF: 2.062 (2015)

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



5. Barta, J., **Kovács, Á.**: Szívelégtelenség és cilostazol.
Cardiol. Hung. 45 (2), 108-116, 2015.
6. Nagy, L., **Kovács, Á.**, Bódi, B., Pásztorné Tóth, E., Fülöp, G. Á., Tóth, A., Édes, I., Papp, Z.: The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat.
Br. J. Pharmacol. 172 (18), 4506-4518, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13235>
IF: 5.259
7. **Kovács, Á.**, Papp, Z., Nagy, L.: Causes and pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction.
Heart Fail. Clin. 10 (3), 389-398, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hfc.2014.04.002>
IF: 1.844
8. Balogh, Á., Tóth, A., Pásztorné Tóth, E., Nagy, L., **Kovács, Á.**, Kalász, J., Contreras, G. A., Édes, I., Papp, Z.: Myofilament carbonylation modulates contractility in human cardiomyocytes.
Exp. Clin. Cardiol. 20 (1), 2026-2035, 2014.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,102

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,937

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.06.14.



8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Barta Judit*nak, akinek kivételes precizitása és professzionalitása zsinórmértékül szolgált PhD tanulmányaim alatt. Hálásan köszönöm, hogy hallgatójává fogadott és támogatott céljaim elérésében. Remélem, hogy közös munkánk tovább mutat a PhD fokozatom megszerzésénél.

Őszintén hálás vagyok a kivételes lehetőségért, hogy szakmai példaképeim irányítása alatt valósíthattam meg tudományos alkotómunkámat. Köszönöm *Dr. Papp Zoltán Professor Úr*nak mindazt az önzetlen támogatást, amivel napról napra segíti szakmai pályafutásomat. Köszönöm *Dr. Tóth Attila Professor Úr*nak, hogy érdekesnek talált a közös munkára. Az együtt megvalósított kísérletek és őszinte kritikák élménye azóta is szakmai és emberi támpont számomra. Köszönöm *Dr. Édes István Professor Úr*nak, a Kardiológiai Intézet vezetőjének, a folyamatos segítséget és támogatást szakmai karrierem során.

Hálásan köszönöm *Dr. Balogh Ágnes*, *Dr. Czuriga Dániel* és *Dr. Fülöp Gábor Áron* önzetlen és baráti támogatását. Szakmai munkájuk színvonala és hangulata a mai napig követendő példa számomra. Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden munkatársának és PhD hallgatójának is a munkámhoz nyújtott segítségükért.

Köszönöm feleségemnek és családomnak töretlen hitüket és támogatásukat.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. Az EMBERI ERŐFORRÁSOK MINISZTERIUMA ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.

