

# **A nátriuretikus peptidek szekréciójának molekuláris mechanizmusa és adaptációja kóros állapotokhoz állatmodellben és a klinikai gyakorlatban**

PhD értekezés tézisei

**dr. Kováts Tímea**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Tóth Miklós, tanszékvez. egy tanár, az MTA doktora

Bírálok: Dr. Vásárhelyi Barna, tudományos főmunkatárs  
Dr. Szokodi István, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Radák Zsolt, tanszékvez. egy. tanár  
tagjai: Dr. Székely Andrea főorvos  
Dr. Zima Endre egy. tanársegéd

Budapest  
2008

## I. Bevezetés

A szíveredetű nátriuretikus peptidek (pitvari nátriuretikus peptid: ANP, agyi vagy B-típusú nátriuretikus peptid: BNP) fontos szerepet játszanak a cardiovascularis homeostasisban, többek között vazodilatációs, nátriuretikus, diuretikus és antiproliferatív hatásuk által. Szekréciónál a nátriuretikus peptidek inaktív prohormonként (pro-ANP ill. pro-BNP) a szívműködés perinukleáris granulumaiban tárolódnak. Szekréciónál egy multidomén transzmembrán szerin-proteáz, az ún. corin enzimatikusan hasítja a pro-ANP-t (és valószínűleg a pro-BNP-t is), létrehozva ezzel az aktív hormon C-terminális ANP-t (ill. BNP-t), és a biológiailag inaktív N-terminális NT-proANP-t (és NT-proBNP-t). A kardiális nátriuretikus peptidek szekréciónál legfontosabb triggerere a pitvari ill. a kamrai falfeszülés, bár számos bioaktív ágens, mint pl. az endothelin, szintén növeli a kardiális nátriuretikus peptidek expresszióját és elválasztását. Az egyes cardiovascularis patológiás állapotokban, elsősorban szívelégtelenségben, kamrai diszfunkcióban, és akut koronária szindrómában tapasztalható kardiális nátriuretikus peptid-szint emelkedés diagnosztikus és prognosztikus jelentőséggel bír, az intravénásan adagolt BNP-t pedig a terápiában is alkalmazzák.

A számos tanulmány ellenére (ez idáig több mint 20.000, nátriuretikus peptidekről szóló cikket publikáltak) még mindig sok kérdés maradt megválaszolatlanul, többek között a nátriuretikus peptidek szekréciónál molekuláris mechanizmusával és prohormonjának aktivációjával kapcsolatban. Ezek megválaszolása későbbi terápiás beavatkozásokra teremtheti meg az alapot, befolyásolva ezzel az oly sokakat érintő cardiovascularis kórképek lefolyását, mint a szívelégtelenség vagy a hypertonia.

## **II. Célok**

### ***1. In vitro és ex vivo tanulmányok: a szívműködés ANP szekréciójának fiziológiai mechanizmusa***

#### **A. A szívműködés ANP szekréciójának regulációja**

A SNARE molekulák és a SNARE komplex létrejöttét szabályozó peptidok, mint pl. a munc18, más specializált szekréciós sejtekben széles körben vizsgált regulátorai az exocitotikus folyamatoknak. A SNARE-ek három alcsoportjába (syntaxinok, VAMP-ek, SNAP 23/25) tartozó egy-egy protein egy háromtagú fehérjekomplexet hoz létre, mely membránfúzióhoz vezet. A syntaxin komplexbe kerülését a munc18 proteinek szabályozzák. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, a kardiális ANP-szekréció hasonlóan SNARE-dependens mechanizmus-e, melyet a munc18 molekula egyik izoformája regulál.

#### **B. Corin, a pro-ANP konvertáz vizsgálata**

Corin, a pro-ANP aktivációért felelős proteáz korábbi kutatások eredménye alapján nagy mennyiségben expresszálódik a szívben, sejtszintű lokalizációját azonban még nem azonosították. A cDNS szekvencia valószínűsítette, hogy zymogén formában szintetizálódik, és aktiválódásához proteolitikus hasítást igényel. Kísérleteinkben a corin poszttranszlációs modifikációját és molekuláris formáinak vizsgálatát, valamint ezek sejtszintű lokalizációját tűztük ki célul.

### ***2. In vivo vizsgálatok: nátriuretikus peptid szekréció diabetesben, volumenterhelés hatására***

A diabetes rizikófaktor sok cardiovascularis megbetegedésben. A nátriuretikus peptidok és az endothelin egymással ellentétes hatású hormonok, melyek részt vesznek a diabetes cardiovascularis szövődményeinek pathofiziológiájában. Kísérleteink célja az ANP és

endothelin szekréciójának vizsgálata volt, akut hemodinamikus terhelés hatására, diabetesben.

### ***3. Klinikai gyakorlat: nátriuretikus peptid szekréció és bradycardia összefüggései***

A tachycardia-indukált cardiomyopathia által kiváltott nátriuretikus peptid szint emelkedés jól ismert jelenség a klinikai gyakorlatban. A szekréciót provokáló tényező a szívizomsejtek megnyúlása. Fokozott pitvari/kamrai falfeszülést azonban bradycardia is okozhat. Esettanulmányunk a bradycardia-indukált klinikailag szignifikáns nátriuretikus peptid-szint emelkedést vizsgálta.

## **III. Módszerek**

### ***1. Klónozás, bakteriális expresszió, és bakteriális fehérjék tisztítása***

Egér cDNS könyvtárból a kívánt corin fragmentumokat (stem domén, proteáz domén az aktivációs peptiddel) PCR-rel pCR<sup>TM</sup> II vektorba klónoztuk. A szekvenálással ellenőrzött terméket pGEX-4T-2 vagy pProEX-HTb expressziós vektorba juttattuk. Ezt a konstrukciót transzformáltuk *E. coli* BL21 törzsbe. Expressziót követően a zárványtestekből kivont fehérjéket dializáltuk, majd a GST-fúziós proteineket thrombinnal hasítottuk. Az előállított rekombináns fehérjéket Western bloton ellenőriztük.

### ***2. Antitestek***

C-ANP ellen termeltetett anti-ANP szérum, poliklonális anti-syntaxin 2 és anti-syntaxin 4, valamint monoklonális anti-syntaxin 4 és anti-syntaxin 6 antitesteket biotechnológiai cégektől értékesítettük.

### **A. Poliklonális antitest előállítás**

Új-Zélandi fehér nyulaktól vért vettünk preimmun szérum előállítására. Ezt követően 3-4 hónapon át, kéthetente 50-100 µg tisztított, Freund adjuvánsban emulzifikált proteint fecskendeztünk be bőr alá, miközben az antitest szintet szérumból rendszeresen ellenőriztük. A nyert szérumok specificitását teszteltük az immunizáláshoz használt antigénnel szemben, valamint egér szívizom- és más szöveti extraktumokkal végzett Western blottal.

### **B. Monoklonális antitest előállítás**

Nőstény BALB/c egereket intraperitoneálisan immunizáltunk 50µg, komplett Freund adjuvánsban emulzifikált rekombináns proteinnel. Két héttel később adott emlékeztető oltás után az antitest szintet RIA (radioimmunoassay) segítségével meghatároztuk. Ezt követően az egér lépsejteket SP2/0 sejt vonal sejtjeivel fuzionáltuk. A hybridoma sejtek antitest-termelését RIA segítségével ellenőriztük, az antitest specificitás teszteléséhez Western blot technikát alkalmaztunk. A megfelelő hybridoma sejteket klónoztuk. A termelt monoklonális antitesteket ELISA (enzyme-linked immunoassay) segítségével klasszifikáltuk.

## **3. Fehérje kivonat készítése**

### **A. Fehérjék kivonása szövetekből**

A vizsgálni kívánt szövetet jég hideg PBS oldatban (phosphate buffered saline) öblítettük, folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd proteáz gátlókat tartalmazó TRIS pufferoldatban homogenizáltuk. A szöveti homogenizátumot centrifugáltuk, a főleg citoszolikus fehérjéket tartalmazó felülúszót -80°C-ra lefagyasztottuk, a kémcsövek alján összegyűlt ún. pellet frakciót ismételt mosás és centrifugálás után detergens tartalmú, magas ionkoncentrációjú oldatban homogenizáltuk, majd 4 °C-on állandó keverés mellett 1 órán keresztül inkubáltuk. Ismételt centrifugálást követően a membránproteineket tartalmazó felülúszót -80°C-ra fagyasztva tároltuk a további felhasználásig. A minták fehérje koncentrációját BCA Protein Assay Kit segítségével mértük.

Egy másik kísérlet során kontraháló egér szívet in situ FITC-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketonnal injektáltunk, majd 5 perc inkubációs idő leteltével membránfehérje-kivonatot készítettünk a fenti protokoll alapján.

## **B. Fehérje kivonat készítése sejt kultúrából**

Pitvari szívizomsejteket tartalmazó primer sejt kultúra ill. HL-1 sejt vonal sejtjeit 1% Triton-X-et, 125mM NaCl-ot és proteáz-inhibítort tartalmazó TRIS-HCl pufferben inkubáltuk 1 órán keresztül, 4 °C-on. Centrifugálás után a felülúszó fehérje-koncentrációját a BCA Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg.

## **4. *Plazma peptidek kivonása és radioimmunoassay***

1,5 ml savasított plazmát előzőleg metanollal és 0,1 %-os trifluoroacetáttal aktivált Sep Pack C18 szűrőkre töltöttünk, majd a kötődött peptideket 80% acetonnitrilt tartalmazó 0,1%-os trifluoroacetát pufferrel eluáltuk. A mintakomponenst evaporáltuk majd radioimmunoassay pufferben újra oldatba vittük. Az immunoreaktív peptid koncentrációt (NT-proANP, ET-1) radioimmunoassay segítségével határoztuk meg. Az intra-assay és inter-assay variációs koefficiens 10% ill. 15% alatt volt.

## **5. *Concanavalin A-Sepharose kötődés vizsgálata és sejtmembrán-jelölés***

Sejt kultúrából fehérje-kivonatot (5,5mg/ml) készítettünk a fentiek szerint, majd 1,5 órán 4 °C-on inkubáltuk Concanavalin A-Sepharose-zal 1:5 arányban, a gyártó utasítása szerint.

Sejtmembrán-jelölés vizsgálatához HL-1 sejteket 1mg/ml EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin tartalmú PBS pufferban inkubáltunk a gyártó utasítása szerint. A feleslegben lévő EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotint 50 mM TRIS-HCl inkubációval távolítottuk el. Mosást követően a sejteket lizáltuk, és a lizátumot Immobilized Streptavidin oszlopon inkubáltuk. Az oszlophoz kötődés alapján elkülönített frakciókat Western blottal vizsgáltuk.

## **6. *Western blot***

Forrásban lévő Laemmli-pufferban való inkubálással denaturáltuk a fehérjéket, majd Na-dodecyl-sulfat poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével a proteinek molekula méret szerint szétválasztottuk és Immobilon-P transzfer membránra transzferáltuk elektroblottolással. Ezt követően a nem-specifikus kötőhelyeket blokkolása céljából a membránokat 5%-os zsírmentes tejben inkubáltuk. A keresett fehérjék kimutatására a membránokat a megfelelő primer antitest tartalmú oldatban inkubáltuk, majd mosást követően a bekötődött primer antitesteket kecskében kifejlesztett, nyúl- ill. egér-ellenes (IGG + IgM), alkáli-foszfataz konjugált szekunder antitestekkel detektáltuk. A reakciót ECF (enhanced chemifluorescence) szubsztráttal tettük láthatóvá egy fluorescens/phosphoimager kamera által. További analízis céljából az immunoblotokat esetenként 100 mM  $\beta$ -mercapto-etanol, 62.5 mM TRIS-HCl, 2% Na-dodecyl-sulfat tartalmú oldatban, 50 °C-on inkubáltuk az antigén-antitest kötés felbontására. Inkubációt követően a membránokat alaposan mostuk a  $\beta$ -mercapto-etanol tökéletes eltávolítása céljából, majd a membránokat ismételten blokkoltuk. Az újabb antigén-antitest kötődés vizsgálata előtt a korábbi reakciók maradványának mentességéről ismételt ECF szubsztrát alkalmazással, és az ezt követő negatív chemifluorescens kép detektálásával nyertünk bizonyosságot.

## **7. *Immunprecipitáció***

Membrán-fehérjékben gazdag szívizom kivonatot protein-A agaróz, ill. protein-G Sepharose 4B oszlopon inkubáltunk a későbbi aspecifikus kötések kiküszöbölése végett. Tisztított poliklonális antitesteket ill. nyúlból származó aspecifikus IgG-t protein-A agarózhoz kötöttünk. Hasonlóan, monoklonális antitesteket protein G Sepharose 4B-vel inkubáltunk. Az előtisztított fehérje extraktumot a protein-A agaróz, ill. a protein-G Sepharose-hoz kötött antitestekkel immunprecipitáltuk. Az immunprecipitátumot többszöri, jéghideg PBS pufferben végzett mosás után Laemmli pufferban forraltuk, majd centrifugálás után a felülúszót SDS-PAGE és immunoblot analízisnek vetettük alá.

## **8. *Primer szívizomsejt és HL-1 sejt kultúra***

Neonatalis patkány pitvari és kamrai szívizomsejtek a Worthington Neonatal Cardiomyocyte Isolation System Kit segítségével izoláltuk a gyártó utasítása szerint. A pitvari és kamrai sejteket elkülönített sejt kultúrában tenyésztettük. A 2. naptól a sejteket modifikált CSFM (Complete Serum Free Media) tápoldatban tartottuk (CSFM összetétel: DMEM/F12 tápoldat kiegészítve 25 mM HEPES, 1,7  $\mu$ M inzulin, 1  $\mu$ M transferrin, 10 nM nátrium-szelenit, 1 nM triiodo-thyronin, 0,2% albumin, 190 nM dexametazon, 1 mg/l arachidonsav, 0,5 mg/l dokózaheksaénsav, és 100 egység/ml penicillin/streptomycin).

Az egér HL-1 szívizomsejt-sejtvonal W. C. Claycomb szíves ajándéka. Az HL-1 sejteket 10% foetalis borjú szérumot, 0,1 mM norepinephrint, 2 mM L-glutamint és 100 egység/ml penicillin/streptomycint tartalmazó Claycomb tápoldatban tenyésztettük.

## **9. *Immunfluoreszcens festés***

Immunfluoreszcens festéshez a szívizomsejteket nyolcosztatú, üveg sejttenyésztő edényben tenyésztettük. Mosás és Cytifix pufferben való fixálás után a sejteket 0,1% Triton-X 100 vagy 0,1% szaponin oldattal permeabilizáltuk. A nem-specifikus kötőhelyeket 1% borjú szérum albumin oldattal blokkoltuk, majd a sejteket a primer antitest megfelelő hígítású oldatában inkubáltuk. Ismételt mosási ciklusok után a bekötődött primer antitesteket Alexa Fluor 488-konjugált kecskében termelt egér immunglobulin ellenes ill. Alexa Fluor 594-konjugált kecskében termelt nyúl immunglobulin ellenes szekunder antitestekkel detektáltuk. A sejtmagokat 4',6'-diamidino-2-fenilindol hidroklorid festéssel tettük láthatóvá. A preparátumokat Prolong Antifade Kit segítségével tartósítottuk, kiértékelésüket konfokális mikroszkópon végeztük, a fúziós képek Axion Vision programmal készültek.

## **10. *Sejt permeabilizáció, szekréción vizsgálat, ANP mérése***

A szívizomsejteket a sejttenyésztés 7-9. napján használtuk fel a szekréción kísérlethez. 0,05%-os borjú szérum albuminban (BSA) oldott Streptolizin-O-t (SLO) dithiothreitollal jégen redukáltunk, majd felhasználásig -80 °C-on tartottuk. A sejteket az intracelluláris



körülményeket utánzó  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú ún. KG pufferral öblítettük (KG puffer 100 nM szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációval tartalmaz: 140 mM K-glutamát, 5 mM PIPES, 12,5 mM Mg-acetát, 2,5 mM EGTA, 2,5 mM EDTA, 5 mM D-glükóz, 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 7.2-re beállítva KOH-dal), majd SLO-t és a megfelelő antitestet tartalmazó oldattal a sejteket permeabilizáltuk. Ezt követően a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megközelítőleg 100  $\mu\text{M}$ -ra emelésével  $\text{Na}_2\text{ATP}$  és  $\text{Na}_2\text{GTP}$  jelenlétében szekréció-indukciót végeztünk. A szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció meghatározására a WinMaxc v2.05 programot ill. titrációs görbékét használtunk. A felülúszót további felhasználásig (ANP és laktát-dehidrogenáz /LDH/ meghatározás)  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk. A sejteket 1%-os Triton-X 100 oldatban lizáltuk, majd centrifugálást követően a felülúszót további felhasználásig (LDH mérése a permeabilizáció meghatározására)  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk. Az ANP mérésére C-ANP-t detektáló, a kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kittet használtunk. A permeabilizáció becslését szintén a kereskedelmi forgalomban kapható kolorimetriás laktát-dehidrogenáz (LDH) esszé segítségével végeztük.

## ***11. Flowcytometria***

HL-1 sejteket hatosztatú sejttenyésztő edényekben a fentiekben ismertetett körülmények között tenyésztettük. Nem-permeabilizált sejteket 3% foetalis borjú szérumot tartalmazó, jéghideg PBS pufferban mostunk, centrifugáltunk, reszuszpendáltunk  $4 \times 10^6$  sejt/ml denzitásban, majd monoklonális anti-corin antitestek keverékével vagy kontroll monoklonális antitestekkel inkubáltuk. Ismételt mosási ciklusokat és blokkolást követően a sejteket Alexa Fluor 488-konjugált, kecskében termelt egér immunglobulin-ellenes IgG/IgM antitestekkel festettük meg. A sejteket mosás után BD Cytotfix pufferban fixáltuk. A fluoreszcenciát flowcytometerben, CellQuest programmal mértük és elemeztük.

## ***12. Diabetes indukció és arteriovenosus shunt preparáció kutyákban***

Mindkét nembeli mongrel kutyákat véletlenszerűen a vizsgálati vagy a kontroll csoportba soroltunk. Diabetes indukálására egyszeri alloxan-monohidrát infúziót alkalmaztunk. Az ismertett kísérleteket 8 héttel a diabetes indukció után végeztük.

Akut hemodinamikus terhelés modellezésére arteriovenosus shunt-öt alkalmaztunk. Az általános anaesthesia bevezetésére és fenntartására intravénás Na-pentobarbitált használtunk. A distalis femoralis régióban, az arteria és a vena femoralis között mintegy 3-4 cm-es szakaszon shunt-öt alakítottunk ki. A kontroll csoportban álműtétet végeztünk. Az 1. ill. a 3. postoperatív napon a vérnyomást invazívan, az aorta abdominalisban mértük, majd az állatokat extermináltuk. Mintát vettünk a perifériás és a sinus coronarius vérből, valamint a pericardialis folyadékból. A vérből centrifugálással elkülönítettük a plazmát, majd a mintákat további felhasználásig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Megmértük a szív, valamint külön a jobb és a bal kamra tömegét.

## ***13. Statisztikai módszerek***

Az adatszoportok közötti összehasonlítására variációanalízist (ANOVA) használtunk, 1) a szövettani vizsgálatok esetén Bonferroni-Dunn korrekcióval, 2) az állatkísérletes modell esetében Mann-Whitney teszt alkalmazásával. A corin tanulmányban a statisztikai analízisre t-próbát alkalmaztunk. Szignifikancia szintnek az általánosan elfogadott  $P < 0,05$  értéket tekintettük. Az eredményeket átlag  $\pm$  átlag standard hiba, ún. SEM (állatmodelles kísérletek) ill. átlag  $\pm$  tapasztalati szórás, ún. SD (sejtszintű vizsgálatok) adtuk meg. A közölt adatok legkevesebb három különálló kísérlet eredményét tükrözik.

## ***14. Állatkísérletek***

Minden állatkísérletet a laboratóriumi állatok tartására vonatkozó nemzetközi szabályoknak megfelelően végeztünk, valamint a beavatkozásokat az intézmény laboratóriumi állattartásért felelős szervezete jóváhagyta.

## IV. Eredmények

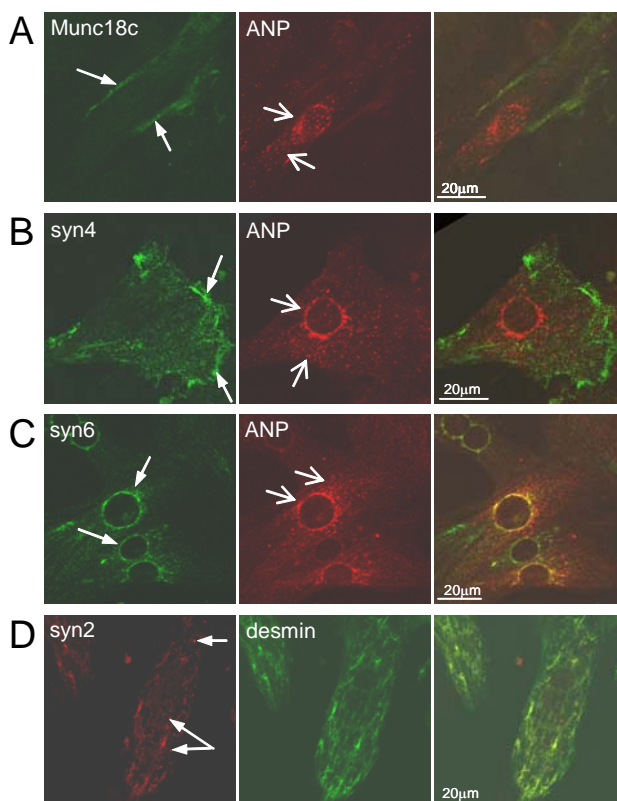
### 1. *A munc18c szabályozza a szívműködés ANP szekrécióját*

#### A. A syntaxin 4 és a munc18c proteinek a szívműködés plazmamembránjára lokalizálódnak és reagálnak egymással

Szívműködés kettős immunfluoreszcens festése a munc18c proteint elsősorban a plazmamembránra lokalizálta, a tipikus perinukleáris ANP festés megjelenése mellett (1A ábra). Immunoblot analízis mind pitvari, mind kamrai szívműködészetben a vártan megfelelően 67 kDa molekulatömegű proteinként detektálta a munc18c fehérjét. Syntaxin 4 esetében hasonlóan a plazmamembrán festődött immunfluoreszcens festéssel az ANP-pozitív szívműködészetekben (1B ábra). Western blottal kamrai és pitvari szívműködészet esetén is egy könnyen detektálható sávot kaptunk kb. 36kDa molekulatömegnek megfelelően.

Co-immunprecipitációs vizsgálat munc18 – syntaxin 4, ill. specifikusan munc18c – syntaxin 4 reakciót igazolt.

Syntaxin 6 immunfluoreszcens vizsgálata során perinukleáris lokalizációt találtunk. Kettős immunfluoreszcencia ANP-vel csak részben igazolta az együttes előfordulást: bár az ANP-pozitív sejtek syntaxin 6-ellenes antitesttel is festődtek, az ANP-negatív sejtek is tartalmaztak perinukleárisan elhelyezkedő syntaxin 6-ot (1C ábra). Western blottal pitvari és kamrai szövetekből egyaránt kimutatható volt a syntaxin 6, 34 kDa-nál. Co-immunprecipitációs vizsgálattal nem



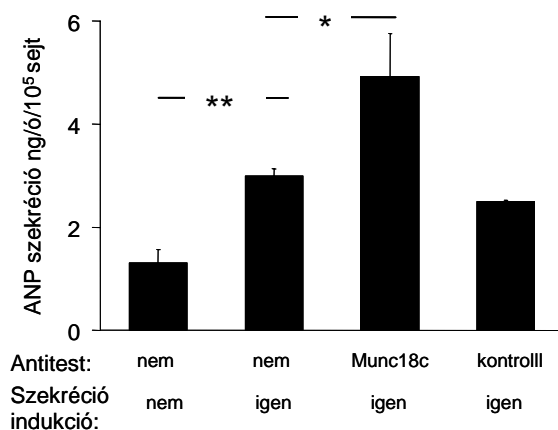
1. ábra Szívműködés kettős immunfluoreszcens festése.

tudtunk munc18 – syntaxin 6 reakciót kimutatni.

Immuncitokémiai vizsgálat syntaxin 2 esetében diffúz granuláris mintázatot mutatott (1D ábra). Desmin egyidejű kimutatásával győződünk meg arról, hogy a látott kép valóban szívizomsejtekre jellemző. Western blottal syntaxin 2 egy, 34 kDa molekulatömegnél megjelenő sávot adott mind pitvari, mind kamrai szövetekből. Co-immunprecipitációs vizsgálat gyenge munc18 – syntaxin 2 reakciót mutatott, amennyiben egy pan-munc18 ellenes antitestet használtunk, azonban specifikus munc18c-ellenes antitesttel nem tudtunk munc18c – syntaxin 2 reakciót kimutatni.

## B. Munc18c inhibitor szelektíven fokozza az ANP szekréciót

Annak érdekében, hogy a munc18c funkcióját élő sejtben vizsgálhassuk, beállítottunk egy sejtpermeabilizációs módszert, melynek során streptolizin-O-val (SLO) antitestek számára átjárhatóvá tettük a sejtmembránt, ugyanakkor a konstitutív ANP szekréció nem változott (tehát magától „nem folyt ki” az ANP a granulumokból/sejtekből) és  $Ca^{2+}$ /ATP/GTP hozzáadásával az ANP szekréció triggerelhető maradt ( $P < 0,01$ ) (2. ábra). Kontroll monoklonális antitestet a rendszerbe juttatva nem változott a triggerelt ANP szekréció mértéke. Ezzel szemben anti-munc18c specifikus antitest adásakor a kiváltott ANP szekrécióban szignifikáns emelkedés állt be ( $P < 0,05$ ).



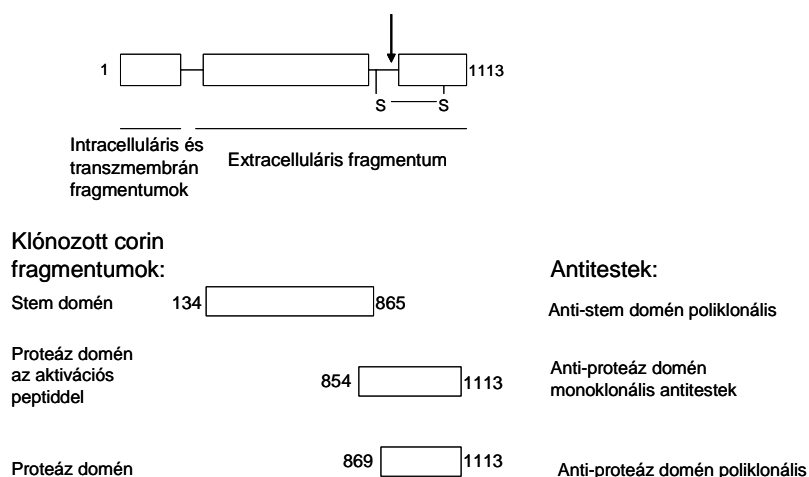
**2. ábra** Munc18c gátlása szignifikánsan emeli a szívizomsejtek ANP szekrécióját.

\*  $P < 0,05$       \*\*  $P < 0,01$

## 2. *Corin, a pro-ANP konvertáz, a szívizomsejtek plazmamembránján lokalizálódik*

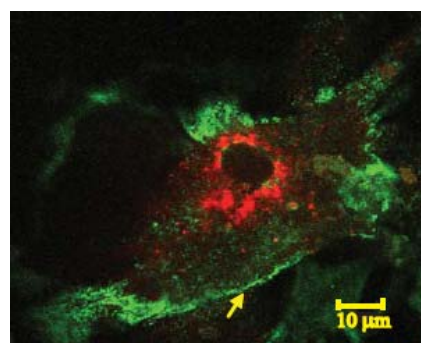
### A. A corin expressziója és sejt szintű lokalizációja

A corin fehérje szintű vizsgálatának első lépéseként poliklonális (anti-stem és anti-proteáz domén) és monoklonális (anti-proteáz domén) anti-corin antitesteket állítottunk elő (3. ábra).



### 3. ábra Corin szerkezete és az előállított antitestek

Az antitestek karakterizálását követően immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk szívizomsejteken. Nem-permeabilizált sejteken mind a poliklonális, mind a monoklonális antitestek festették a sejtmembránt. Permeabilizált sejtek kettős immunfluoreszcens festése igazolta az ANP és corin egyazon sejten belüli előfordulását. (4. ábra).



4. ábra Szívizomsejt kettős immunfluoreszcens festése. Pro-ANP (piros); corin (zöld).

## **B. A szívizomsejtben előforduló corin molekula mérete és szerkezete**

Proteáz gátlók jelenlétében vizsgáltuk a szívizomsejtben előforduló corin strukturális sajátosságait. Anti-corin proteáz domén monoklonális antitesttel immunprecipitációt végezve Western-blotton a poliklonális anti-stem domén antitest 205-210 kDa-nál detektálta a corint. Mivel redukáló körülmények között mind az anti-stem, mind az anti-proteáz domén felismerte ezt a 205-210 kDa-nál jelentkező sávot, ez valószínűleg a teljes corin proteinek felel meg. A lehetséges magyarázatot a vártnál magasabb molekulatömegre (az aminosav-szekvencia alapján 123 kDa a corin molekulatömege) a későbbiekben részletezzük.

A cDNS szekvencia alapján azt vártuk, hogy a corin proenzimként szintetizálódik, és aktivációja proteolitikus hasítást igényel. A számos diszulfidhíd lehetősége arra engedett következtetni, hogy a corin molekula a proteolitikus aktivációt követően is kötődhet a sejt felszínhez. Annak megállapítására, hogy a szívizomsejtek felszínén a corin zimogén vagy aktív formában található-e, szívizomszövet membránfrakcióját redukáló körülmények között Western blottal vizsgáltuk. Az anti-corin stem domén antitest 180 és 110 kDa-nál ismert fel proteinsávokat, melyeket az anti-corin proteáz domén antitest nem detektált, ebből arra következtettünk, hogy ezek a struktúrák elsősorban a stem domént tartalmazzák. Az anti-corin proteáz domén 40-50 és 90 kDa-nál detektált fehérjéket, amelyek az anti-corin stem domén antitesttel nem mutattak reakciót, így valószínűleg a proteáz domént tartalmazzák. Az immunprecipitációs kísérletek azonban redukáló körülmények mellett is detektálták a teljes, 205-210 kDa molekulatömegű corint, bizonyítva ezzel, hogy a corin egy része zimogén formájában van jelen a sejtmembránon. Összességében elmondhatjuk, hogy a teljes corin, valamint a corin fragmenteket kimutatása a szívizomsejtek plazmamembránján azt bizonyítja, hogy a corin jelen van mind zimogén formában (mercaptoetanollal nem volt hasítható) ill. aktív enzimként (mercaptoetanol hatására kisebb molekulatömegű fragmentek keletkeztek).

A katalitikusan aktív forma plazmamembránon való jelenlétének további bizonyítására egy irreverzibilis proteázgátlót, FITC-FPR-CMK-t használtunk. Ennek a molekulának az FPR (fenilalanin-prolin-arginin) része a pro-ANP proteolitikus aktivációs helyét

utánozza, FITC része pedig az autofluoreszcenciáért felelős. A szívbe fecskendezve minden aktív proteázzal kovalens kötést képez, amely felismeri az FPR szekvenciát. Működő szívbe injektálása után a membránprotein-frakciót SDS-PAGE és elektroblottolás segítségével vizsgáltuk. Autofluoreszcencia detektálása útján 50 és 90 kDa körüli sávokat észleltünk. Az elektroblottolt membránt anti-corin proteáz domén antitesttel vizsgálva ugyanezt a két sávot észleltük, megerősítve ezzel az aktív corin plazmamembrán lokalizációját.

### **C. Corin expresszió HL-1 sejt vonal sejtjeiben**

A HL-1 sejt vonal pitvari tumorból izolált, a felnőtt pitvari szívműködő sejtek tulajdonságait hordozó sejteket tartalmaz. Flowcytometria igazolta a corin plazmamembrán lokalizációját. Ennek további megerősítésére a sejtmembránt biotinnal jelöltük, a sejtlyázatot streptavidin oszlopon fracionáltuk, majd Western bloton monoklonális anti-corin antitestekkel vizsgáltuk a streptavidin-kötött (tehát membrán-) frakciót. A 205-210 kDa-nál megjelenő, corinnak megfelelő fehérjesáv megerősítette a corin plazmamembrán lokalizációját.

A többszörösen megfigyelt 205-210 kDa corin molekulatömeg és az aminosav-szekvencia alapján várt 123 kDa körüli molekulatömeg közötti eltérés magyarázatára vizsgáltuk a corin glikozilációs státuszát. HL-1 sejtek fehérjekivonatát Concanavalin A-Sepharose-on inkubáltuk, mely megköti a glikozilált fehérjéket. Az ezt követő Western blot a 205-210 kDa corin Concanavalin-A-hoz való erős affinitását mutatta, igazolva ezzel, hogy glikozilált proteinnal van szó. A kísérletet primer szívműködő sejtekkel is megismételtük, azonos eredménnyel.

### ***3. Akut hemodinamikus terhelés növeli a pitvari nátriuretikus peptid-szintet mind egészséges metabolizmus, mind diabetes esetén***

#### **A. A cardiovascularis paraméterek változása akut hemodinamikus terhelése hatására diabetesben és egészséges metabolizmus esetén**

Megmértük az artériás középnyomást, a szív, valamint a jobb és balkamra tömegét a testtömeg arányában, diabetes és egészséges metabolizmus esetén, akut hemodinamikus terhelés hatására és alaphelyzetben. Az akut hemodinamikus terhelés modelljeként arteriovenosus shunt-öt alkalmaztunk, és a fenti paramétereket a posztoperatív 1. és 3. napon rögzítettük. Diabetesben szignifikánsan alacsonyabb vérnyomást mértünk ( $79 \pm 2$  Hgmm vs.  $89 \pm 6$  Hgmm;  $P < 0,05$ ). Akut hemodinamikus terhelés a postop. 1. napon további vérnyomáscsökkenést okozott a diabeteses állatokban ( $72 \pm 3$  Hgmm vs.  $79 \pm 2$  Hgmm;  $P < 0,05$ ). Ezzel szemben, egészséges metabolizmus mellett a shuntkeringés kialakítása nem járt vérnyomáscsökkenéssel. A szív tömege, valamint a jobb és balkamra tömege a testtömeg arányában hemodinamikus terhelés hatására nőtt, mind diabetesben mind egészséges metabolizmus esetén.

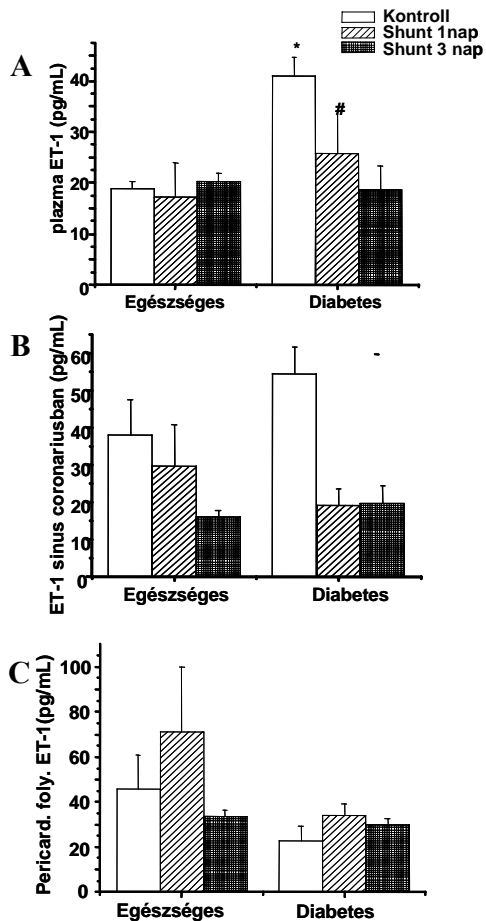
#### **B. Endothelin szintek változása akut hemodinamikus terhelése hatására diabetesben és egészséges metabolizmus esetén**

Endothelin-1 (ET-1) szintjét mértük a perifériás és a sinus coronarius plazmában, valamint a pericardialis folyadékban, egészséges metabolizmus és diabetes esetén, alaphelyzetben és hemodinamikus terhelés hatására. A perifériás plazma ET-1 szintje szignifikánsan magasabb volt a diabeteses állatokban (5A ábra). Egészséges metabolizmusú állatokban hemodinamikus terhelés hatására nem változott az ET-1 szint, míg diabetesben csökkent. Hasonló változásokat észleltünk a sinus coronarius plazmában is (5B ábra). A pericardialis folyadék ET-1 szintjét minden esetben magasabbnak mértük a plazmáénál, azonban sem a diabetes, sem a hemodinamikus terhelése nem volt rá hatással (5C ábra).

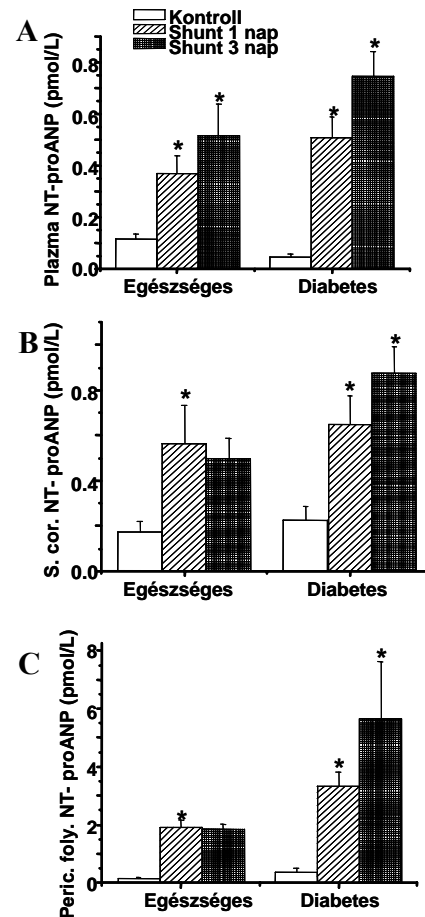


**C. Az akut hemodinamikus terhelés emeli az ANP szintet minden kompartmentben, mind diabetesben mind egészséges metabolizmus esetén**

Végezetül mértük az NT-proANP szintet a perifériás és sinus coronarius plazmából, valamint a perikardiális folyadékból, az előzőekhez hasonlóan diabetesben és egészséges metabolizmus esetén, alaphelyzetben és hemodinamikus terhelés hatására. Az NT-proANP szintek hasonlóan alakultak mindhárom kompartmentben hemodinamikus terhelés hatására, függetlenül a metabolikus státuszról: hemodinamikus terhelés szignifikánsan emelte az NT-proANP szintet, mind egészséges metabolizmusú, mind diabeteses állatokban (6A-C ábra).



**5. ábra** Diabetes és hemodinamikus terhelés hatása az endothelin koncentrációra a különböző kompartmentekben



**6. ábra** Akut hemodinamikus terhelés hatása az NT-proANP szintekre diabetesben és normál metabolizmus esetén

#### ***4. Bradycardia által kiváltott nátriuretikus peptid-szint emelkedés (Esetismertetés)***

94 éves nőbeteg négy napja tartó gyengeség és dyspnoe miatt került felvételre. Rendszeresen szedett gyógyszerei között antihipertenzív terápiaként  $\beta$ -blokkoló (naponta 5 mg bisoprolol) és tiazid diuretikum szerepelt. Felvételekor készült EKG sinus-leállást mutatott 40/min frekvenciájú junctionalis pótritlussal. A rutin laboratóriumi tesztekben (beleértve a TSH-t és troponint) nem volt eltérés. Ezzel szemben extrém magas NT-proBNP szintet (22420pg/ml; normálérték 270pg/ml alatt) mértünk. Echokardiográfiával normál systoles bal kamra funkciót és enyhe mitrális- és aorta insufficienciát találtunk. Terápia-indukált bradycardia diagnózisa miatt a  $\beta$ -blokkolót elvettük. Mivel a beteg hemodinamikai paraméterei stabilak voltak, pacemaker implantáció nem történt. 48 órán belül a beteg panaszmentessé vált, sinusritmusa 90/min frekvenciával visszatért. Kontroll NT-proBNP szintje mintegy tizedére csökkent (2117 pg/ml).

## **V. Következtetések**

### ***1. A munc18c befolyásolja az ANP-tartalmú granulumok szekrécióját***

Az ismertetett tanulmányok igazolják, hogy a szívizomsejtek tartalmazzák a syntaxin 2, syntaxin 4, syntaxin 6, valamint a munc18c szekréciós fehérjéket. Ezek közül a munc18c és a syntaxin 4 sejtmembrán-lokalizációt mutatott, míg a syntaxin 2 diffúz granuláris mintázatban, a syntaxin 6 pedig a perinukleáris granulumokon volt megtalálható. A munc18c – syntaxin 4 hasonló előfordulási mintázata, valamint a korábbi irodalmi adatok ezen molekulák interakciójára utalt, melyet az immunprecipitációs kísérletek igazoltak. Funkcionális vizsgálatok során SLO-permeabilizált szívizomsejtekben a  $Ca^{2+}$  koncentráció intracelluláris emelése a pro-ANP tartalmú granulumok szekrécióját váltotta ki. Munc18c-ellenes antitestek jelenléte ebben a rendszerben szignifikánsan növelte az ANP szekréciót, ezzel bizonyítva, hogy a munc18c molekula részt vesz az ANP szekréciós folyamatok szabályozásában.

## ***2. A corin a pro-ANP-vel azonos sejtekben termelődik, ahol a sejtmembránon található mind aktív, mind zimogén formában***

Monoklonális és poliklonális anti-corin stem ill. proteáz domén antitestek előállítása lehetővé tette számunkra a corin sejt felszíni kimutatását immunfluoreszcens festéssel, flow cytometriával, és biotin sejt felszíni jelölés alkalmazásával szívizomsejteken és HL-1 sejt vonal sejtjein. Kettős immunfluoreszcens festés kimutatta, hogy a corin egyazon sejtben termelődik a szubsztrátjával, amely a corin nátriuretikus peptidek rendszerében betöltött regulációs szerepére is utalhat a pro-ANP aktiválása által. A sejt felszínen található zimogén és aktív enzim formában jelenlévő corin szintén eredményezheti, hogy a corin aktivitásának szabályozása regulálja a keringésben található aktív ANP és inaktív pro-ANP arányát. A zimogén forma tartalékot képezhet, amely szükség esetén, pl. akut hemodinamikus terheléskor, rövid időn belül aktiválódhat a szívizomsejtek felszínén, megnövelve ezzel a pro-ANP átalakulását aktív ANP-vé.

## ***3. A hemodinamikus terhelés csökkenti az ET-1 szintet, és növeli az ANP szintet diabetesben***

Egészséges metabolizmus esetén az ET-1 szint nem változott hemodinamikus terhelés hatására. Ezzel szemben diabetesben magasabb kiindulási ET-1 perifériás és sinus coronarius plazmaszintet mértünk, mely szignifikánsan csökkent hemodinamikus terhelés hatására. A pericardialis folyadék mind egészséges metabolizmusú, mind diabeteses állatok esetében magasabb koncentrációban tartalmazta az endothelint, és szintje nem változott hemodinamikus terhelés hatására, a diabeteses állatokban sem. Hemodinamikus terhelés hatására az NP-proANP szintek nőttek mind egészséges metabolizmus, mind diabetes esetén, mindhárom kompartmentben. Ezek alapján a következőket állapítottuk meg: 1) a pericardialis folyadék az ET-1 plazmaszinttől funkcionálisan elkülönült kompartmentként viselkedik; 2) a hemodinamikus terhelés hatására megemelkedett NT-proANP szintek a nátriuretikus peptidek diagnosztikus értékét hangsúlyozzák diabetes esetén is; 3) lehetséges az NT-proANP szint diabetesben eltérő normálértéke, de jelen esetben szignifikáns különbséget kimutatni nem tudtunk.

#### ***4. Bradycardia is okozhat emelkedett BNP plazmaszintet***

Egy idős nőbeteg esetében extrém magas NT-proBNP szintet mértünk, melyet a  $\beta$ -blokkoló terápia hatására kialakult sinusleállás, ill. az alacsony frekvenciájú junctionalis pótritmus indukált. A  $\beta$ -blokkoló terápia leállítása a sinusritmus helyreállítását és az NT-proBNP szint gyors csökkenését eredményezte. Esetünk arra utal, hogy nem csak a klinikai gyakorlatban jól ismert tachycardia-indukált nátriuretikus peptid szint emelkedés érdemel figyelmet, hanem a bradycardia, ill. aszinkron kontrakció is okozhat emelkedett szívfal-feszülést, és ezen keresztül megnövekedett nátriuretikus peptid szintet, amely bradycardia-indukált szubklinikai cardiomyopathiát jelezhet.

## **VI. Publikációk**

### ***1. A témában megjelent közlemények***

Kováts T and Tomcsányi J: Bradycardia and B-type natriuretic peptide. Int J Cardiol. IJC-D-08-00826 Nyomtatásban.

Gladysheva IP, Robinson BR, Houg AK, Kováts T and King SM: Corin is co-expressed with pro-ANP and localized on the cardiomyocyte surface in both zymogen and catalytically active forms. J Mol Cell Cardiol. 2008 Jan;44(1):131-42.

Kováts T, Wettstein A, Nagy E and Tomcsányi J: Bradycardia can induce increased serum natriuretic peptide-level. Int J Cardiol. 2008 Jan 11;123(2):e43-4.

Skoumal R, Seres L, Soós P, Balogh E, Kováts T, Rysa J, Ruskoaho H, Tóth M and Horkay F: Endothelin Levels in Experimental Diabetes Combined with Cardiac Hypertrophy. J Cardiovasc Pharmacol. 2004 Nov;44:S195-S197.

### ***2. Egyéb közlemények***

Pósa I, Horkay F, Seres L, Skoumal R, Kováts T, Balogh E, de Chatel R, Tóth M and Kocsis E: Effects of Experimental Diabetes on Endothelin-induced Ventricular Arrhythmias in Dogs. J Cardiovasc Pharmacol. 2004 Nov;44:S380-S382.