

**A *puma* gén kiütése
az apoptózis gátlásán keresztül
késlelteti a kardiális funkcióromlást
egér szívelégtelenség modellben**

Ph.D. Tézis

Dr. Mándl Adél

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán, az MTA doktora

Témavezető: Dr. Erhardt Péter, Ph.D.

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
I. sz. Belgyógyászati Klinika

2014.

BEVEZETÉS

Szívelégtelenség

A szívelégtelenség számos szívbetegség következménye lehet, amelyek strukturálisan vagy funkcionálisan károsítják a bal kamrát abban, hogy megfelelően telődjön és ürüljön. A társadalom elöregedése és az a tény, hogy a szívbeteg emberek manapság tovább élnek a modern terápiás beavatkozásoknak köszönhetően, hozzájárult a szívelégtelenség incidenciájának a növekedéséhez. Az American Heart Association (AHA) 2013-as beszámolója szerint körülbelül 23 millió ember szenvedett szívelégtelenségben világszerte. A kongesztív szívelégtelenség az egyik leggyakoribb oka a kórházba kerülésnek az Egyesült Államokban és a legtöbb nyugati Európai országban. Annak ellenére, hogy a kezelési lehetőségek javultak, a szívelégtelenség mortalitása még mindig nagyon magas, ezért továbbra is komoly szükség van újabb terápiás beavatkozások kifejlesztésére.

A szívizom károsodása vagy túltelődése csökkenti a szívizom hatékonyságát, és szívelégtelenséghez vezethet, többek között a következő betegségekben: szívinfarktus és egyéb iszkémiás szívbetegségek, magas vérnyomás, billentyűbetegségek, kardiomiopátia, miokarditis és amiloidózis. Bár különböző oka van ezeknek a betegségeknek, a lezajló molekuláris, biokémiai és celluláris események együttesen megváltoztatják a szívizom alakját, és szívelégtelenséghez vezetnek. A tézisben nyomás-túlterhelés okozta szívelégtelenség modellt használtunk, amelyik a magas vérnyomásnak és bizonyos billentyűbetegségek, mint például az aorta billentyű sztenózisának hatását utánozza. A magas vérnyomás a szívelégtelenség egyik legfontosabb rizikófaktora, mivel az esetek körülbelül 75%-ában megelőzi a szívelégtelenséget. A magas vérnyomás és az aorta billentyű sztenózis legfontosabb következménye a szív megnövekedett munkája, ami magasabb bal kamra nyomáshoz vezet. Kezdetben a bal kamra hipertrófiával kompenzál, így próbálva fenntartani a megfelelő nyomást. Bár a rövidtávú hipertrófia lehet adaptív, mivel normalizálja a fal feszülést és az oxigén szükségletet, hosszú távon a hipertrófia káros. A kompenzációs mechanizmusok idővel már nem tudják növelni a perctérfogatot, és szívelégtelenségbe torkolnak. Később pedig a bal kamra kitágul, a fala elvékonyodik, és a szisztolés funkció csökken.

Ezen a ponton a betegek a következő súlyos tünetekkel jelentkeznek: terhelésre és lefekvéskor fellépő légzési nehézség, fáradtság, gyanúság, lábödéma, rapid vagy

irreguláris szívdobogás, csökkent terhelhetőség, elúzódo köhögés vagy zihálás fehér vagy rózsaszínű véres váladékkal, aszcitesz, hirtelen súlyemelkedés a folyadék visszatartás miatt, étvágytalanság, émelygés, csökkent koncentrációs készség vagy éberség, és végül halál.

Egyenlőre még nem teljesen világos, hogy az adaptív hipertrófia hogyan alakul át maladaptív szívelégtelenséggé, ezért ennek a mechanizmusát vizsgáltuk a kísérleteink során. A csökkent kardiális funkcióhoz vezető folyamatok feltérképezése hozzásegíthet olyan terápiás beavatkozások kifejlesztéséhez, amelyek megelőzhetővé teszik a halált szívelégtelen betegekben.

Szív remodelláció

Egy kulcsfontosságú lépés a szívelégtelenség kialakulása során a bal kamra plaszticitását jelképező patológiás remodelláció. A szív remodelláció molekuláris, celluláris és intersticiális változások jellemzik, amelyek megváltoztatják a szív méretét, alakját és funkcióját egy-egy károsító stressz stimulus következtében. Bár a bal kamra remodelláció folyamatában a szívizomsejt növekedése és halála játsza a legfőbb szerepet, más sejtek is hozzájárulnak a folyamathoz, mint például a fibroblasztok (kötőszövet felhalmozódását okozva), a vaszkuláris simaizomsejtek (növelve az erek merevségét), a vaszkuláris endotél sejtek (endotél diszfunkciót okozva) és a fehérvérsejtek (elősegítve a gyulladást).

Szívizom hipertrófia a remodelláció egyik gyakori formája, amelyik a szív túlterheltsége esetén jelentkezik. Mivel a terminálisan differenciált szívizomsejtek nem tudnak hatékonyan újra belépni a sejtciklusba, nyomás-túlterhelésre sejt megnagyobbodással válaszolnak, ami végül a kamrafal vastagodásához és merevségéhez vezet. Ez a hipertrófiás válasz kezdetben kompenzálni próbál a perctérfogat fenntartása érdekében. De ahogy a kompenzált hipertrófia fokozatosan dilatált szívelégtelenséggé alakul, a szívizomsejtek tovább nyúlnak, a kamra kitágul, és csökken a szisztolés és diasztolés funkció. Nem megfelelő angiogenezis miatt kialakuló mikroiszkémia szintén hozzájárul a hipertrófiához és a dekompenzációhoz; ezzel ellentétben a betegség lassulását figyelték meg akkor ha az angiogenezist növelték.

A szívizomsejtek apoptotikus elhalása képes növelni a hemodinamikai stresszt, a kamra tágulását és a kamra fal elvékonyodását okozva, ezért az apoptózis feltételezhetően fontos szerepet játszik a bal kamra hipertrófia szívelégtelenségbe történő súlyosbodásában. Az utóbbi években egyre több állat- és emberkísérlet eredménye utal

arra, hogy a programozott sejthalál kulcsfontosságú a "kompenzált" hipertrófiától szívelégtelenséghez vezető úton. Szívelégtelenség miatt szívátültetésen átesett betegek szövetmintáiban több, mint 200-szorosára nőtt az apoptózis. A tézisünk kísérleteiben arra kerestük a választ, hogy az apoptózis valóban egy kritikus patofiziológiai mozgatórugója-e a hipertrófiához és dekompenzációhoz vezető folyamatoknak.

A szívizomsejtek elsősorban kollagénből álló kötőszövettel vannak rögzítve, amely stabilizálja a szívizomsejteket a megfelelő háromdimenziós szerkezetben. A kollagént az fibroblasztok termelik, és a kollagenázok, mint például a mátrix metalloproteinázok (MMP) bontják le. Egy-egy sérülés után a neurohumorális változások és a citokinek kollagén szintézist indítanak be, ami végül fibrózishoz és az extracelluláris mátrix remodellációjához vezet.

A szívremodelláció egy adaptív és egy maladaptív folyamat is egyben. Eleinte, az adaptív fázis során a szív képes fenntartani a funkcióját nyomás-túlterhelésre adott válaszként. Ezzel szemben, a progresszív remodelláció kimondottan káros és negatív hatással van a prognózisra. Ezért rendkívül fontos megkülönböztetni a jelátviteli folyamatokat, amelyek a kezdeti, kompenzált hipertrófiás fázisért felelősek azoktól, amelyek a dekompenzációt, kamra tágulást és remodellációt segítik elő. Mivel a bal kamra remodelláció még hosszú idővel az eredeti kardiális esemény után is hozzájárul a funkcióromláshoz, a kompenzáltból a dekompenzált fázisba történő átmenet egy vonzó terápiás célpont a kutatók számára.

Szívizomsejt apoptózis

A kutatási eredmények szerint a szívizomsejtek progresszív elhalása fontos szerepet játszik a hipertrófiás bal kamra funkcióromlásában és a szívelégtelenség kialakulásában. A sejthalál bekövetkezhet nekrozis által, ami egy kontroll nélküli, destruktív folyamat, vagy pedig a szorosan szabályozott, programozott apoptózis által. Az apoptózis egy komplex, energiafüggő jelátviteli kaszkád eredménye, amely végül a sejtek szabályozott halálához vezet. Ennek megfelelően az apoptózis elengedhetetlenül fontos bizonyos fiziológias folyamatokhoz, mint például a normális sejtszám egyensúlyának fenntartásához, embrionális fejlődéshez és az immunrendszer működéséhez. Azonban számos betegség kialakulhat, ha az apoptózis egyensúlya megbomlik, vagyis túl kevés vagy túl sok az apoptózis, mint például neurodegeneratív betegségek, iszkémiás szövetkárosodás, vagy autoimmun és rákos betegségek.

Az apoptózison átmenő sejtek sztereotipikus morfológiai változásokon mennek keresztül: sejtek összehúzódása és alakjának eltorzulása, a sejt-sejt kapcsolatok elvesztése, a kromatin kicsapódása, a plazmamembrán kidudorodása, és a sejtek apoptotikus testekké történő felszakadása. Ezeket a morfológiai változásokat tipikus molekuláris és biokémiai események előzik meg, legfőképpen a kaszpáznak nevezett proteolitikus enzimek aktiválódása. A kaszpázok felvágják a DNS-t és azokat a fehérjéket, amelyek a sejt alakjáért és integritásáért felelősek. Végül a makrofágok bekebelezik és eltávolítják az apoptotikus testeket, anélkül, hogy gyulladást váltanának ki.

Mivel a szívizomsejtek felelősek a szív összehúzódásáért, de nem képesek szaporodni, a túlélésük annál inkább kritikus. Más szavakkal, ha egy szívizomsejt elhal, nem lehet helyettesíteni. Éppen azért, mert az apoptózis olyan szorosan szabályozott folyamat, az apoptotikus jelátviteli utak manipulálása rendkívüli terápiás lehetőségeket hordoz magában. Ahogy említettük, a kompenzált hipertrófiából szívelégtelenségbe történő átmenet egyik kulcsfontosságú modulátora az apoptózis, ezért az apoptotikus sejthalál gátlása potenciálisan megelőzheti a szívizom veszteséget szívelégtelen betegekben. Jelen kísérleteinkben az apoptózis szívelégtelenség kialakulásában játszott szerepét vizsgáltuk.

Mdm4-p53-Puma jelátviteli út

p53, a genom védőangyala: A tumor szuppresszor, p53-t a genom védőangyalának is hívják, mivel képes meghatározni egy sejt sorsát DNS károsodás esetén. A p53 fő szerepe, hogy eltávolítsa a károsodott sejteket abban az esetben, ha már semmi más nem segít. Normális körülmények között a p53 szintje alacsony, de a sejtet érő stressz esetén, főleg DNS károsodásra, aktiválódik, leállítja a sejtnövekedést, és beindítja a DNS javító mechanizmusokat. Súlyos sejt-károsodás esetén azonban a p53 apoptózist indukál. Ezen keresztül a p53 megakadályozza, hogy az abnormális DNS-sel rendelkező sejtek tovább szaporodjanak, vagy a sejtciklus gátlásán és DNS javításon keresztül, vagy pedig az apoptózison keresztül. Mivel a p53 elősegíti az apoptózist, és az apoptózis hozzájárul a szívelégtelenség kialakulásához, a p53 szívelégtelenségben játszott szerepét már régóta vizsgálták. Újabb kutatási eredmények szerint a p53 jelátviteli útvonal szerepét játszhatja a szív remodellációban, például nyomás-túlterhelés hatására. A p53 megnövekedett szintje szükségesnek tűnt a hipertrófiából

szívelégtelenségbe történő átmenetbe, és a p53 kiütése megelőzte a nyomás-túlterhelés okozta kardiomiopátiát.

Puma és p53: A p53 egy tumor szuppresszor protein, amelyik proapoptotikus és antiproliferatív hatással rendelkezik; mindezt nagyszámú gén transzkripciók aktiválásával éri el, beleértve a proapoptotikus Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) proteint is. Amíg a p53 sokféle sejtfolyamat szabályozásában vesz részt, a Puma a Bcl-2 fehérjék családjába tartozó proapoptotikus molekula. A Bcl-2 fehérjék szabályozzák a mitokondriális külső membrán permeabilizációját, és ezáltal lehetnek proapoptotikusak vagy antiapoptotikusak. A Bcl-2 család tagjainak legalább egy BH (Bcl-2 homology) doménjuk van a 4 lehetséges közül (BH1, BH2, BH3, and BH4). A BH domének alapvető fontosságúak a Bcl-2 fehérjék funkcionális integritásához, mivel a kiütésük megváltoztatja a fehérjék pro- és antiapoptotikus tulajdonságát. Az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjék, mint például a Bcl-2 és Bcl-xL tartalmazzák mind a négy BH domént. A proapoptotikus Bcl-2 fehérjék egy része számos BH domént tartalmaz (például a Bax és Bak), amíg mások csak a BH3 domént (például a Puma, Bid, Bim, és Bad). Egy apoptotikus stimulus után, a Puma hozzákötődik az antiapoptotikus Bcl-2 vagy Bcl-xL proteinhez, ezáltal elengedve proapoptotikus Bax és Bak fehérjéket, amelyek gátolt. A Bax és a Bak a mitokondriális membrán permeabilizációját képes előidézni, ami citokróm-c, Smac, és AIF (apoptosis-inducing factor) felszabadulást, a kaszpázok aktiválódását és végül sejthalált okoz.

A Puma, amely csak egy BH domént tartalmaz (ezért BH3-fehérjének is hívják), egy különleges Bcl-2 fehérje, mivel képes integrálni és végrehajtani különféle eredetű proapoptotikus stimulusokat, mint például a doxorubicin, hipoxia/reoxigenizáció, kináz gátlók, forbol észterek, citokinek, növekedési faktor depriváció és a gamma besugárzás. Aktiválódást követően a Puma a tipikus mitokondriális apoptotikus utat indítja be, sőt a Puma az egyik legerősebb proapoptotikus BH3-fehérje a Bcl-2 proteinek családjában.

A Puma sejten belüli szintje elsősorban a transzkripcióján keresztül szabályozott, és normális körülmények között nagyon alacsony az expressziója. Bár számos transzkripció faktor befolyásolja a szintjét (p53, p73, Foxo3a és E2F1), a p53 a leginkább vizsgált ezek közül. A *puma in vivo* expresszióját és apoptózist indukáló képességét sok szövetben igazolták már, beleértve a hematopoetikus, neuronális, kardiális, intesztinális és immun sejteket, ami szintén megerősíteni látszik azt feltételezést, hogy a Puma univerzális szerepet játszhat különböző betegségek kialakulásában. Ezért úgy tűnik, hogy a p53-szubsztrát Puma a sejthalált indukáló

jelátviteli utak általános szenzora, és a szövetkárosodást megelőző, potenciális gyógyszer célpont lehet a szívben, agyban, bélrendszerben, AIDS-ben és más betegségekben.

Mdm4 és p53: Figyelembe véve a genom védőangyalaként játszott szerepét, a p53 sejten belüli koncentrációja szorosan szabályozott, elsősorban az Mdm fehérjecsaldába tartozó E3 ubikvitin ligázok, mint például az Mdm2 és Mdm4, által végrehajtott ubikvitináció keresztül. Mind az Mdm2 és az Mdm4 negatívan befolyásolják a p53 aktivitását. Az Mdm4 a p53 transkripciót aktiváló doménjéhez kötődve gátolja a p53 sejtciklust leállító és apoptózist indukáló funkcióját.

Bár az Mdm fehérjék és a p53 közötti kapcsolatot tumorsejtekben már régóta kutatják, viszonylag keveset tudunk ugyanerről az interakcióról a szívben. Az embrionális fejlődés során a p53 negatív szabályozásában elengedhetetlen és nem redundáns szerepe van az Mdm4-nak. Az *mdm4* gén kiütése egerekben halva születést okoz, ezért nem lehet felnőtt állatokban vizsgálni az Mdm4 szerepét. Ezzel szemben az *mdm4* gén kondicionális, szívspecifikus kiütésekor az egerekben dilatált kardiomiopátia alakul ki, párhuzamosan a szívizomsejtek megnövekedett apoptózisával. Mivel ez nagyon hasonló a nyomás-túlterhelés során tapasztaltakhoz, ez a kondicionális, *mdm4*-deficiens egér megfelelő genetikai modellnek tűnt ahhoz, hogy a p53, Puma és Mdm4 szerepét vizsgáljuk a patológiás hipertrófia és a szívelégtelenség kialakulásában.

CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a Puma a p53 proapoptotikus funkcióval rendelkező szubsztrátja, kísérleteink során azt a hipotézist teszteltük, hogy stressz hatására a p53 stabilizálódik, és aktiválja a Pumát, amely apoptózist indukálva dilatált kardiomiopátiához vezet. Ennek megfelelően kísérleteinkben az Mdm4-p53-Puma jelátviteli útvonalat vizsgáltuk a következő két *in vivo* modellben:

- először egy *puma* génkiütéses egér modellben, ahol aortaív szűkítéssel (transverse aortic constriction, TAC) nyomás-túlterhelést hoztunk létre;
- másodsor pedig egy kettős *Puma*^{-/-} és kondicionális, szívspecifikus *Mdm4*^{-/-} modellben, ahol a dilatált kardiomiopátia kifejlődését monitoroztuk.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a *puma* gén kiütése csökkenti a túlzott mértékű apoptózist szívizom károsodás esetén, és segít fenntartani a szívfunkciót. Mindez felveti

annak a lehetőségét, hogy érdemes lehet egy Puma elleni gyógyszert fejleszteni szívbetegségek kezelésére.

EREDMÉNYEK

A TAC modell

A Puma szívelégtelenségben játszott szerepét a transzverz aorta konstriktós állatmodellben vizsgáltuk. A TAC a bal kamra nyomás-túlterhelését idézte elő, amelyik hasonlít a klinikumban látható hipertenzió és aorta billentyűszűkület következményeként fellépő állapotra. Ebben a modellben a TAC műtét után körülbelül 7 nappal jelentkezett a hipertrófia, és 4 héttel a műtét után pedig szív dilatáció alakult ki a kardiális remodelláció következő, tipikus jellemzőivel együtt:

- szív megnagyobbodás, amelyet a szívtömeg/testtömeg megnövekedett aránya jelzett;
- kardiális diszfunkció, amelyet a csökkent frakcionális rövidülés jelzett echokardiográfia során;
- megnövekedett szívműködés keresztmetszet;
- megnövekedett szívműködés apoptózis; és
- fokozottabb perivaszkuláris és miokardiális fibrózis.

A TAC által indukált nyomás-túlterhelés aktiválta a *puma* transzkripciót a szívben

Kísérleteink során először azt vizsgáltuk, hogy a *puma* gén aktiválódik-e a TAC által indukált szívelégtelenség során. Mivel a *puma* aktivitása a transzkripción keresztül szabályozott, az aktivitása jól követhető a *puma* messenger RNS (mRNS) szintjének mérésével. A *puma* mRNS expressziója nem változott 1 hét után, de 2,75-szörösére nőtt 4 héttel a TAC műtét után a sham-operált, kontroll egerekben. A *puma* mRNS nem volt detektálható azokban a szív mintákban, amelyekben a *puma* ki volt ütve.

Immunhisztológiával tipikus citoplazmatikus Puma festést láttunk a TAC műtéten átesett kontroll állatok szívében. A kontroll állatokkal ellentétben, a Puma festés könnyen detektálható volt a TAC operált állatokban, ami arra utal, hogy a sejteket érő stressz fontos szerepet játszhat a *puma* expresszió indukálásában a szívben. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *puma* szintjének növekedése a szívfunkció csökkenésével egyidejűleg zajlik, ami miatt felmerül annak a lehetősége, hogy a Puma hozzájárulhat a TAC-indukálta szívfunkció romláshoz a kontroll állatokban.

Mivel a p53 a *puma* egyik kritikus regulátora, *p53*^{-/-} állatok segítségével vizsgáltuk azt, hogy a *puma* megnövekedett expressziója p53 függő-e a TAC modellben. Bár a *puma* mRNS szintje hasonló volt a sham-operált kontroll és a *p53*^{-/-} egerekben, a TAC operáció nem vezetett magasabb *puma* mRNS szinthez a *p53*^{-/-} állatokban. Ez arra utal, hogy a *puma* transzkripció aktiválódása legalább részben a p53 által vezérelt a sejtet érő stressz hatására.

A *Puma*^{-/-} egerek szívének vizsgálata

A továbbiakban a *Puma* szerepét vizsgáltuk a szívelégtelenség kifejlődésében egy *Puma*^{-/-} egérmodell segítségével. A *Puma*^{-/-} egerek fertilisek voltak, és heterozigótaként kerültek szaporításra. A *Puma*^{-/-} egerek a Mendeli frekvencia szerint születtek, és nem volt szignifikáns különbség az azonos korú kontroll állatokhoz képest kinézetben, testtömegben és a szív tömegében. A *Puma*^{-/-} szívek nem mutattak morfológiai defektust, vagy pedig a kardiomiopátia, nekrozis, vagy kamra fibrózis jelét a szövettani vizsgálatokon.

Echokardiográfiával azt is megvizsgáltuk, hogy a *puma* gén kiütése befolyásolja-e a szív funkcióját 8 hetes egerekben. Az echokardiográfias eredmények szerint nem volt szignifikáns különbség a bal kamra végdiasztolés and végszisztolés átmérői között, a hátsó fal vastagságában és a frakcionális rövidülésben a két genotípus között. Mindezek arra utalnak, hogy a *Puma*^{-/-} szívek szerkezete és funkciója normális. Néhány *Puma*^{-/-} egeret egy éves koron túl is követtünk, nekik is normális volt a szívfunkciójuk, ami azt jelenti, hogy a *puma* gén kiütése nem volt káros még idősebb korban sem. Mindezek szerint a *puma* gén nem tűnik szükségesnek a normális embrionális és születés utáni szívfejlődéshez.

A *puma* gén kiütése késlelteti a szív funkcióromlását TAC műtét után

A *puma* gén kiütésének a hatását a stressznek kitett szívre úgy vizsgáltuk, hogy 8 hetes egerekben bal kamrai nyomás-túlterhelést indukáltunk a TAC műtéttel. Ezekben a kísérletekben sham és TAC-operált *Puma*^{-/-} és hasonló korú kontroll állatokat használtunk. Echokardiográfiával monitoroztuk a szívfunkciót a következő időpontokban: a TAC műtét előtt (0. napon), a korai adaptáció fázisában (1 hét), a kardiális funkcióromlás kialakulása után (4 hét) és a betegség késői progressziója során (12 hét). Ahogy várható volt, a frakcionális rövidülés normális maradt az első héten a kontroll állatokban, de lecsökkent a 4. hétre, és tovább csökkent a TAC utáni 12. hétre. Ezzel

szemben a *Puma*^{-/-} állatokban a szívfunkció közel normális maradt 1 és 4 héttel a TAC műtét után is, hasonlóan a sham-operált állatokéhoz. A TAC műtét után 12 héttel azonban ezekben az állatokban is enyhén csökkent a kardiális funkció.

A sham-operált egerekhez képest, szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a bal kamra végdiasztolés and végszisztolés átmérői között a kontroll állatokban, de nem a *Puma*^{-/-} egerekben, 4 héttel a TAC műtét után. A TAC műtét után 12 héttel azonban a *Puma*^{-/-} egerekben is hasonló változásokat figyeltünk meg. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *Puma*^{-/-} egerek tovább fent tudják tartani a normális szívfunkciót, mint a kontroll állatok, ha nyomás-túlterhelésnek vannak kitéve. A *puma* gén kiütése tehát lelassította, de teljesen nem tudta megelőzni a nyomás-túlterhelés okozta kardiális funkcióromlást.

A *puma* gén kiütése nem előzi meg a TAC által okozott hipertrófiát

A *Puma* szív hipertrófiában játszott esetleges szerepének megértéséhez, a hipertrófia 3 paraméterét vizsgáltuk a TAC műtét után: a szívtömeg/testtömeg arányát, a hátsó fal vastagságát és a szívizomsejt keresztmetszetet. Mindhárom paraméter szignifikánsan nőtt a TAC műtét következtében, mind a kontroll, mind pedig a *Puma*^{-/-} egerekben, a sham-operáltakhoz képest. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll TAC és a *Puma*^{-/-} TAC állatok között.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *puma* gén kiütése nem volt hatással a TAC műtét által indukált korai, adaptív, illetve a késői változásokra. Az eredmények azt is felvetik a funkcionális adatokkal együtt, hogy a hipertrófiás szívizom már a szívelégtelenség stádiumában van a kontroll állatokban, de nem a *Puma*^{-/-} egerekben. Mivel a nyomás-túlterhelésre adott hipertrófiás válasz továbbra is megvan a *Puma*^{-/-} egerekben, valószínű, hogy a *Puma* funkciója nem szükséges a hipertrófiához vagy pedig más hipertrófiát szabályozó molekulák kompenzálják a hatását. Mindenesetre, a *puma* gén kiütése úgy tűnik, hogy lassítja a TAC-indukált szív hipertrófia maladaptív fázisának kialakulását.

A *puma* gén kiütése nem befolyásolja a TAC által okozott angiogenezist

Szintén megvizsgáltuk a *Puma* hatását az angiogenezisre a vaszkuláris endotél növekedési factor (*VEGF*) expresszió és a kapilláris denzitás (CD-31 festés) tesztelésével. Ezek a kísérletek nem mutattak különbséget a TAC-operált kontroll és *Puma*^{-/-} állatok között, ezért a *Puma* nem valószínű, hogy szerepet játszik a nyomás-túlterhelés okozta angiogenezisben.

A *puma* gén kiütése gátolja a nyomás-túlterhelés okozta apoptózist

A *Puma* szívizomsejt apoptózisban játszott szerepének feltárásához megvizsgáltuk az apoptotikus sejtek arányát kontroll és *Puma*^{-/-} egerek szívében a TAC műtét után (TUNEL festést használva). Az apoptotikus sejtek aránya elhanyagolható volt a sham-operált kontroll és *Puma*^{-/-} szívekben, és nem változott jelentősen 1 héttel a TAC műtét után sem. Azonban 4 héttel a műtét után szignifikáns különbséget találtunk az apoptotikus sejtek számában a kontroll és a *Puma*^{-/-} egerek között. A különbség körülbelül 10-szeres volt a kontroll állatokban, ugyanakkor csak 3-4-szeres a *Puma*^{-/-} szívekben, a sham-operált egerekhez képest. A TUNEL festéssel talált eredményeket sikerült megerősítenünk a kaszpáz-3 felbomlását detektáló szövettani festéssel is.

Kvantitatív PCR segítségével megvizsgáltuk a Bcl-2 család anti-apoptotikus tagjainak az expresszióját is, beleértve a Bcl-2-t, Bcl-xL-t és Mcl-1-t. Mivel nem találtunk szignifikáns különbségeket ezeknek a fehérjéknek az expressziójában a kontroll állatokban 4 héttel a TAC műtét után, feltételezhető, hogy a TAC-operált *Puma*^{-/-} egerekben látott alacsony apoptotikus sejtarányért nem az anti-apoptotikus faktorok kompenzációs növekedése volt a felelős. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *puma* gén kiütése, legalább is részben, az apoptózis gátlásán keresztül késlelteti a nyomás-túlterhelés okozta szívelégtelenség kifejlődését.

A TAC okozta fibrózis csökkent a *puma* gén kiütésekor

A TAC műtét szívizomsejt veszteséget okoz, ami hosszútávon a szívizom fibrózisához vezet. Kontroll és *Puma*^{-/-} egerek szív mintáiban Masson's trikróm festéssel vizsgáltuk, hogy a *puma* gén kiütése milyen hatással van az intersticiális fibrózisra. Sham-operált egerekben normális szövet morfológiát találtunk, kollagén lerakódás nélkül.

Korábbi közleményekkel egyetértésben, a szívizom fibrózisa prominens volt a kontroll állatokban 4 héttel a TAC műtét után (több szétszórt fibrotikus góccal). Ezzel szemben a *Puma*^{-/-} egerekben minimális szívizom fibrózist találtunk, alacsonyabb fokú remodelációra utalva a TAC után (perivaszkuláris fibrózis a közép és nagy erek körül). A kvantitatív analízis szerint 2-3-szoros emelkedés volt a *Puma*^{-/-} egerekben a sham-operáltakhoz képest, míg 10-szeres a kontroll TAC-operált szívekben. Az extracelluláris mátrix változásait megnéztük még a *kollagén III* és a *mátrix metalloproteináz-2* és *9* expressziójának segítségével. Bár ezek a markerek is emelkedtek a *Puma*^{-/-} egerekben a TAC műtét után, ez az emelkedés jóval kisebb volt, mint a kontroll állatokban. Ezek az

eredmények arra utalnak, hogy a *puma* gén kiütése képes volt csökkenteni a nyomás-túlterhelés okozta szívizom fibrózist, amely hozzájárulhat a szívfunkció részleges megőrzéséhez ebben a szívelégtelenség modellben.

A *puma* gén kiütése késlelteti a dilatált kardiomiopátia kialakulását a kondicionális, szív-specifikus *mdm4*-negatív egerekben

Az utolsó kísérletsorozatunkban egy p53-dependens kardiomiopátia modellben vizsgáltuk a *puma* szívelégtelenségben játszott esetleges szerepét. Azt analizáltuk, hogy a *puma* gén kiütése késlelteti-e a dilatált kardiomiopátia kialakulását a kondicionális, szív-specifikus *Mdm4*^{-/-} egerekben. Bár a kondicionális, szív-specifikus *Mdm4*^{-/-} egerek életképesek és fertilisek, p53-dependens, spontán dilatált kardiomiopátia alakul ki bennük, ami miatt ez a modell használhatónak tűnt a p53–Puma jelátviteli útvonal *in vivo* szívelégtelenségben történő feltérképezéséhez. A dupla homozigóta állatok (*Puma*^{-/-}/*Mdm4*^{-/-}) ritka előfordulása miatt különböző alomból származó egereket használtunk ebben a 2 éves kísérletsorozatban. Két hónaptól 8 hónapos korig havonta mértük a szívfunkciót echokardiográfiával a dupla és szimpla mutáns (*Mdm4*^{-/-}/*Puma*^{+/+} vagy *Mdm4*^{+/+}/*Puma*^{-/-}), illetve a kontroll (*Mdm4*^{+/+}/*Puma*^{+/+}) egerekben.

Két hónapos korban nem volt szignifikáns különbség a kontroll és *Puma*^{-/-} állatok frakcionális rövidülésében (42% és 39%), és ez így maradt az egész kísérlet ideje alatt. Az *Mdm4*^{-/-} csoportban a frakcionális rövidülés valamivel kisebb (35%) volt 2 hónapos korban, mint a kontroll egerekben, és ahogy várható volt, idővel fokozatosan csökkent a falvékonyodással együtt, tükrözve a dilatált kardiomiopátia kialakulását. Érdekes módon az *Mdm4*^{-/-}/*Puma*^{-/-} egereknek normális frakcionális rövidülésük volt 2 hónaposan, ami szignifikánsan magasabb szinten is maradt, mint az *Mdm4*^{-/-}/*Puma*^{+/+} csoportban. Ráadásul az *Mdm4*^{-/-}/*Puma*^{-/-} állatok tovább éltek (legalább egy évig), mint az *Mdm4*^{-/-}/*Puma*^{+/+} egerek (7-9 hónapos korig).

A *puma* mRNS expresszió fokozatosan emelkedett az *Mdm4*^{-/-} egerekben 3 hónapos kortól, a szívfunkció romlásával egyidejűleg. Ugyanezt az emelkedést nem észleltük a hasonló korú kontroll egerekben, ami ugyancsak utal a *puma* expresszió és a szívelégtelenség közötti esetleges kapcsolatra. Az apoptotikus sejtek száma szintén nőtt a *puma* expresszió növekedésével párhuzamosan. Az *Mdm4*^{-/-}/*Puma*^{-/-} állatokban látott eredmények szintén arra utalnak, hogy a p53-Puma jelátviteli útvonal szerepet játszhat a szívelégtelenség kialakulásában.

MEGESZÉLÉS

A tézis alapjául szolgáló kísérleteinkben a Pumának a bal kamrai remodelláció és a szívelégtelenség kialakulásában játszott szerepét vizsgáltuk, felhasználva két egérmodellt, amikben a *puma* gén kiütésre került: egyrészt a TAC műtéttel okozott nyomás-túlterhelés, másrészt az *mdm4* gén kiütésén alapuló dilatált kardiomiopátiás modell. Mindkét modellben azt találtuk, hogy a Puma által indukált apoptózis hozzájárulhat a szívelégtelenség progressziójában. Adataink szerint a *puma* gén expressziója megnőtt a szívizmot érő mechanikai stressz hatására, és apoptózist indukált. Ezzel szemben, a *puma* gén kiütése csökkentette az apoptózist és a fibrózist, ezáltal mérsékelte a kardiális remodellációt, és késleltette a szívelégtelenség kifejlődését, anélkül hogy a szívizomsejtek méretét vagy az angiogenezist befolyásolta volna. Azt is kimutattuk, hogy a *puma* expressziója, legalább is részben, p53 függő. Végül pedig az *mdm4* gén kiütése a szívben Puma-dependens apoptózishoz vezetett, és az *Mdm4*^{-/-} egerekben a *puma* gén kiütése késleltette a szívelégtelenség kifejlődését. Az adataink arra utalnak, hogy a Puma megnőtt szintje fontos szerepet játszhat a szívelégtelenség patomechanizmusában, és tovább bővíti az Mdm4-p53-Puma jelátviteli út szívizomsejtekbeli szerepével kapcsolatos ismereteinket. Ezen túlmenően, az eredményeink tovább erősítik azt az elméletet, hogy a szívizomsejtek elhalása hozzájárul a szívelégtelenség kifejlődéséhez. Mivel az apoptózis egy szorosan szabályozott folyamat, az apoptotikus jelátviteli utak manipulálása rendkívüli terápiás lehetőségeket hordoz magában.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Az eredményeink szerint az Mdm4-p53-Puma tengely lehet a szívizomsejtek halálát szabályozó egyik jelátviteli útvonal nyomás-túlterhelés során.
2. Ezért az Mdm4-p53-Puma jelátviteli útvonal egy terápiás célpontként szolgálhat szívelégtelenségben és más, sejthalállal járó kardiális betegségekben.
3. Érdekes módon az Mdm4-p53-Puma jelátviteli útvonal a rákkutatók érdeklődésének középpontjában is áll, mivel a *puma* gén kiütésével el lehet kerülni a *p53*-negatív egerekben látott magasabb tumor fejlődési hajlamot. Ezért ha jobban megértjük ennek a jelátviteli útnak a kardiális szerepét, akkor effektívebb és kevésbé toxikus tumor elleni gyógyszereket lehetne kifejleszteni, amelyeknek minimális kardiotoxikus mellékhatásuk van.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kísérleteket a Boston Biomedical Research Institute-ban (Watertown, MA, Amerikai Egyesült Államok) folytattam 2007 és 2011 között. A projekt a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. sz. Belgyógyászati Klinikájával szoros együttműködésben került kivitelezésre.

Szeretnék köszönetet mondani programvezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, aki a tudományos együttműködést vezette a két laboratórium között, segítséget nyújtott a kísérletek megtervezésében, és tanácsaival elősegítette az eredmények értékelését és bemutatását.

Szeretném megköszönni témavezetőm, Dr. Erhardt Péter segítségét, aki a mindennapi munkámat felügyelte, megtanított a szívbetegségek molekuláris és celluláris alapjaira, elősegítette az *in vitro* és *in vivo* kísérleteim tervezését és megfelelő értékelését, és tanácsaival fáradhatatlanul egyengette az amerikai életformára történő átállásomat, mind szakmai, mind pedig kulturális szempontból.

Köszönettel tartozom közvetlen kollegámnak, Ly Huong Pham-nak, a kísérletekben nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban, hálával tartozom férjemnek, kisfiamnak és szüleimnek a kitartó támogatásukért ezen az úton.

A SZERZŐ KÖZLEMÉNYEI

A PhD tézis alapjául szolgáló közlemény

Mandl A, Huong Pham L, Toth K, Zambetti G, Erhardt P. Puma deletion delays cardiac dysfunction in murine heart failure models through attenuation of apoptosis. *Circulation*. 2011;124:31-39.

Impakt faktor: 15,202

A szerző további kutatási eredményeit összefoglaló közlemények

Mandl A, Sarkes D, Carricaburu V, Jung V, Rameh L. Serum withdrawal-induced accumulation of phosphoinositide 3-kinase lipids in differentiating 3T3-L6 myoblasts: distinct roles for Ship2 and PTEN. *Mol Cell Biol*. 2007;27:8098-8112.

Impakt faktor: 5,372

Hamada T, Gangopadhyay JP, Mandl A, Erhardt P, Ikemoto N. Defective regulation of the ryanodine receptor induces hypertrophy in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380:493-497.

Impakt faktor: 2,406

Könyvfejezet

Mandl A, Toth A, Erhardt P. Analysis of apoptosis in isolated primary cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*. 2009;559:293-311. In: *Apoptosis: Methods and Protocols*, Second Edition. Series: *Methods in Molecular Biology*. Erhardt P and Toth A (Eds.). Humana Press.

Összefoglaló (review) közlemény

Toth A, Nickson P, Mandl A, Bannister ML, Toth K, Erhardt P. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 7, 205-218; 2007.

Előadás absztrakt

Mandl A, Erhardt P. Activation of Puma is required for p53-dependent apoptosis in murine dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 118:S388, 2008. Oral presentation at the Scientific Sessions of the American Heart Association, New Orleans, LA, USA.