

Rola zaburzonej gospodarki jonami wapnia w etiopatogenezie rozwoju przerostu mięśnia sercowego

Role of impaired calcium homeostasis in the development of cardiac hypertrophy

Beata Kieć-Wilk¹, Paweł Petkow-Dimitrow², Małgorzata Kwaśniak¹, Aldona Dembińska-Kieć¹

¹ Zakład Biochemii Klinicznej, Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

² II Klinika Kardiologii, Instytut Kardiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Kardiologia Pol 2009; 67: 1396-1402

Regulacja stężenia jonów wapnia oraz ich funkcjonalna rola w kardiomiocytach

Jony wapnia (Ca^{2+}) pełnią podstawową rolę w pobudzeniu i regulacji skurczu komórek mięśnia sercowego. Stężenie wolnego wapnia w cytoplazmie kardiomiocytów i innych komórek jest 10^3 – 10^4 razy mniejsze niż stężenie wolnego wapnia w przestrzeni wewnątrzkomórkowej (retikulum endoplazmatycznym, RE) [1]. Gradient stężeń przez błonę komórkową i błonę RE jest aktywnie utrzymywany przez pompy wapniowe zależne od ATP zlokalizowane w tych błonach [1]. W trakcie inicjacji skurczu dochodzi do napływu Ca^{2+} do cytoplazmy poprzez kanały w błonie komórkowej i w błonie RE [2, 3]. Po aktywacji komórka mięśniowa przechodzi w stan spoczynku i w okresie rozkurczu, w wyniku aktywnego transportu jonów wapnia przez pompy wapniowe, zostaje przywrócone niskie stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie [1].

Istnieje duże prawdopodobieństwo udziału białek kanałów jonowych w rozwoju przebudowy ścian naczyń i serca, ponieważ rozciąganie (jako bodziec mechaniczny) przyspiesza repolaryzację i skraca okres trwania potencjałów. Do kanałów aktywowanych przez rozciąganie (ang. *stretch activated*, SA) należą zarówno nieselektywne kanały kationowe, np. dla K^+ lub Ca^{2+} , selektywne kanały, jak i wymiennik $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), a ich otwarcie wiąże się ze wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} [4].

Czynnościowy potencjał w kardiomiocytach o wartości powyżej -40 mV otwiera kanały wapniowe typu L, należące do grupy kanałów dihydropirydynowych (DHP), co powoduje napływ wapnia do komórki. Wnikające jony Ca^{2+} aktywują i otwierają kanały rianodynowe (RyR) zlokalizowane w błonie siateczki wewnątrzkomórkowej – jest to tzw. proces uwalniania wapnia poprzez jony wapnia (ang.

calcium induced relasing calcium, CIRC) [3]. Kanały rianodynowe w błonie RE mięśnia serca (RyR2) odpowiadają za wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie. Kanał rianodynowy ulega aktywacji przez jony wapnia i ATP, jest hamowany natomiast przez oddziaływanie kalmoduliny [5]. Normalizacja poziomu jonów wapnia jest regulowana przez pompy jonowe, takie jak: Na^+/K^+ ATP-aza, wymiennik $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ oraz Ca^{2+} ATP-aza – zlokalizowana w błonie siateczki śródplazmatycznej (SERCA). Rozkurcz i repolaryzacja są możliwe dzięki aktywnemu transportowi wapnia przez Ca^{2+} ATP-azę oraz wymiennik $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [3]. Na regulację homeostazy wapniowej w kardiomiocytach mają wpływ inne czynniki, jak napięcie układu adrenergicznego, hormony tarczycy czy neurotransmitery [6].

Oprócz opisanej bezpośredniej roli jonów wapnia w mechanizmie skurczu i relaksacji komórki mięśniowej, jony wapnia odgrywają również rolę wtórnych przekaźników, a przez to i regulatorów ekspresji genów [7]. Dzięki tym właściwościom Ca^{2+} odgrywają rolę w takich procesach, jak regulacja wzrostu i apoptozy komórek, czy w etiologii rozwoju zmian patologicznych, np. przerostu mięśnia serca [8].

Molekularne podstawy przebudowy mięśnia serca

Przebudowa ściany naczyń i mięśnia serca (remodeling) jest krytycznym zjawiskiem towarzyszącym większości patologii układu krążenia. Sugeruje się, że niekorzystna zmiana konfiguracji geometrycznej mięśnia serca, a nie uszkodzenie pojedynczych kardiomiocytów, stanowi podstawę upośledzenia wydolności pracy serca [9]. Do niedawna uważano, że dojrzałe miocyty nie mogą ulegać podziałowi, w związku z tym przerost mięśnia serca może być związa-

Adres do korespondencji:

dr n. med. Beata Kieć-Wilk, Zakład Biochemii Klinicznej, Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Kopernika 15 a, 31-501 Kraków, tel.: +48 12 421 40 06, e-mail: mbbkiec@cyf-kr.edu.pl

Praca wpłynęła: 01.06.2009. Zaakceptowana do druku: 03.06.2009.

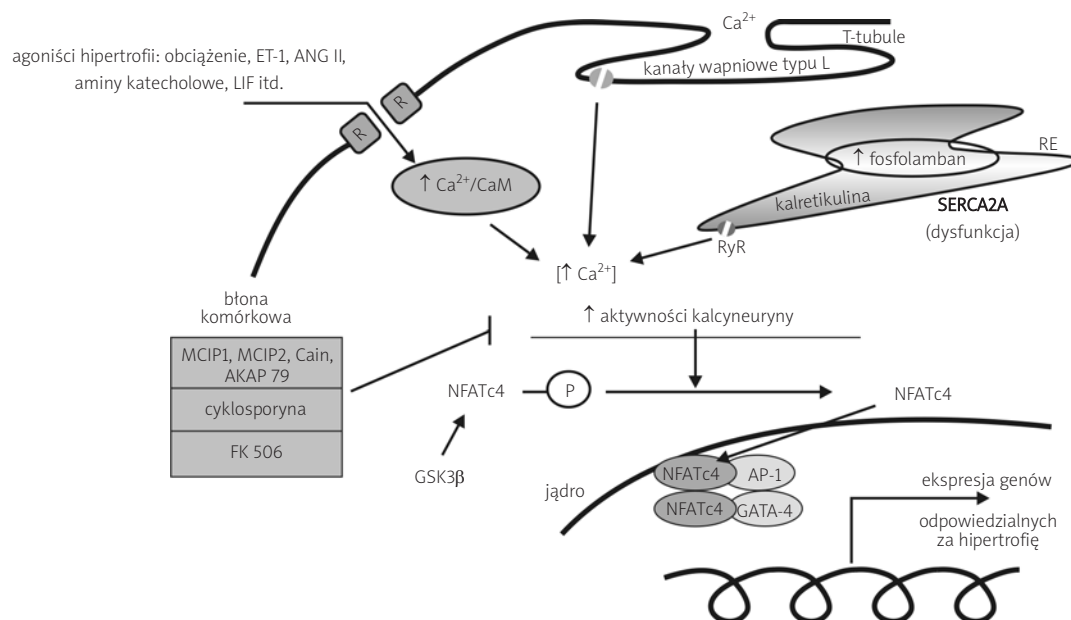
ny jedynie ze zwiększeniem ich objętości (hipertrofia bez hiperplazji). Obecnie uważa się, że źródłem dzielących się kardiomiocytów są tzw. komórki progenitorowe, pochodzące bądź to z samego serca, bądź krążące we krwi i zagnieżdżające się w narządzie (*homing*) ze szpiku kostnego [10].

Obciążenie mechaniczne (rozciąganie) komórek mięśni szkieletowych, mięśni gładkich ścian naczyń (VSMC) czy kardiomiocytów decyduje o ich masie, wynikającej ze zwiększonej produkcji białka w stosunku do DNA (hipertrofii), ilości (hiperplazji), lecz także o ich fenotypie, czyli decyduje o stopniu dojrzałości komórki [11]. W trakcie przerostu kardiomiocytów dochodzi do indukcji transkrypcji tzw. genów natychmiastowej, wczesnej odpowiedzi (*immediate early genes*), po których następuje długotrwała indukcja genów charakterystycznych dla życia płodowego komórki, czyli uwstecznienie fenotypu [11]. Ekspresji ulegają geny typowe dla rozwoju płodowego, takie jak gen przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP), gen jego mózgowej izoformy (BNP) czy gen ciężkich łańcuchów beta-miozyny (β -MHC), równocześnie zahamowaniu ulega ekspresja genów charakterystycznych dla dojrzałych kardiomiocytów, np. genu dla ciężkich łańcuchów alfa-miozyny (α -MHC) [11]. W wyniku tych zmian komórka rozpoczyna nasiloną produkcję białka i przez to zwiększa swoją objętość.

Innym istotnym czynnikiem regulującym ekspresję genów jest poziom jonów wapnia w komórce miocyty (Rycina 1.). Zwiększenie ilości kompleksów Ca^{2+} /kalmodulina i jonów Ca^{2+} w cytoplazmie prowadzi do aktywacji fosfatazy – kalcyneuryny, która odłącza resztę fosforanową od ufosforylowanego (nieaktywnego) czynnika transkrypcyjnego (ang. *nuclear factor of activated T cells*, NFAT), co pozwala na jego translokację do jądra. Tam, po dimeryzacji z innymi czynnikami, np. AP-1, GATA-4, bierze udział w regulacji ekspresji szeregu genów kodujących białka odgrywające rolę w przerostie, jak np. białka podścieliska [12]. Dalsze obserwacje nad patomechanizmem i regulacją procesu przerostu mięśnia serca wykazały istnienie endogennych białek hamujących aktywność kalcyneuryny. Są nimi selektywnie działające białka MCIP-1 i MCIP-2 (*myocyte-enriched calcineurin-interacting protein*), białko Cain (*calcineurin inhibitor*) i działające nieselektywnie białko AKP79 (*A-kinase anchoring protein*) (Rycina 1.) [13].

Rola cytokin i czynników wzrostu w procesie przebudowy mięśnia sercowego

Badania wykazały, że szereg czynników endokrynnych i parakrynnych (PDGF, TXA2, 5-HT, MPC-1, bFGF, TGF β 1, endotelina-1, IGF-1, VEGF i in.), poprzez aktywację prolifera-



Rycina 1. Hipotetyczny mechanizm udziału kalcyneuryny (fosfataza aktywowana wewnątrzkomórkowym poziomem jonów Ca^{2+} i kompleksami Ca^{2+} /kalmodulina) w regulacji ekspresji białek w przebudowie ściany układu sercowo-naczyniowego

ANG II – angiotensyna II, Et-1 – endotelina, CaM – kalmodulina, CsA – cyklosporyna, NFATc4 – czynnik transkrypcyjny (ang. *nuclear factor of activated T-cell*) AP-1, GATA-4 – inne czynniki transkrypcyjne, LIF – cytokina (ang. *leukemia inhibitory factor*), SERCA2A – zależny od ATP kanał wapniowy siateczki endoplazmatycznej kardiomiocyty, MCIP-1, MCIP-2 – ang. *myocyte enriched calcineurin interacting proteins*, CAIN – ang. *calcineurin inhibitory protein*, AKP79 – ang. *A-kinase anchoring protein*

racji i migracji komórek, odgrywa ważną rolę w procesie przebudowy ścian naczyń i serca [9].

Wymienione substancje oddziałują na komórkę poprzez przyłączenie się do specyficznego dla danego czynnika receptora błonowego i aktywację kaskady przekazu sygnału do jądra komórkowego. Ze względu na różny mechanizm działania i przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego wyróżnia się trzy główne klasy receptorów:

- receptory będące kanałami jonowymi – kanały jonowe bramkowane przez ligandy (ang. *ligand gated channels*),
- receptory metabotropowe (R7TM, polipeptydy R7G) sprzężone z białkiem G – ich pobudzenie powoduje generację w komórce wtórnego przekazywnika, oraz receptory o aktywności enzymatycznej (kinazy tyrozynowe),
- receptory czynników wzrostu i cytokin [9].

W tych ostatnich przyłączający się ligand powoduje zmianę konformacyjną części zewnątrzkomórkowej receptora, co umożliwia interakcję między domenami cytoplazmatycznymi sąsiadujących receptorów (dimeryzację) i aktywację kinaz tyrozynowych [9]. Wiązanie się czynnika wzrostu z receptorem i aktywacja kinazy tyrozynowej (autofosforylacja tyrozyny receptora) zapoczątkowuje wiele zmian w komórce efektorowej, jak np.: hydrolizę fosfatydyloinozytoli, zmiany komórkowego pH, wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, indukcję ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne – c-myc oraz rodziny Fos i Jun. Wszystkie te zmiany prowadzą do indukcji ekspresji genów białek, syntezy DNA i podziału komórek [14]. Najbardziej poznanym szlakiem mającym bezpośredni wpływ na aktywność transkrypcyjną komórki i ekspresję genów jest szlak kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), której fosforylację reszt treoninowych i tyrozynowych przeprowadzają kinazy MAP (MAPKK) [9]. Uaktywniona MAPK reguluje szereg cytozolowych enzymów: fosfolipazę A_2 , ale i czynniki transkrypcyjne c-myc, c-jun, Elk-1. MAP są kinazami serynowo-treoninowymi odpowiedzialnymi za proliferację i różnicowanie (dojrzewanie) komórek. W procesie przerostu mięśnia serca MAPK odgrywa jedną z głównych ról w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego wpływającego na ekspresję genów efektorowych [14].

Cytokiny i czynniki wzrostu (ang. *transforming growth factor beta 1*, TGF- β 1, *basic fibroblast growth factor*, bFGF, FGF2, *insulin like growth factor*, IGF-1) biorą udział w regulacji takich procesów, jak proliferacja i różnicowanie się komórek, wzrost i rozwój organizmu, stymulacja procesów naprawczych czy zapalnych [15, 16]. Badania *in vitro* wykazały stymulację przerostu kardiomiocytów i zmianę profilu genowego na „profil płodowy”, typowy dla proliferujących komórek oraz zahamowanie apoptozy po dodaniu TGF- β 1 czy IGF-1 do medium [15, 17].

Czynnik TGF- β 1 działa na komórki docelowe poprzez swoisty receptor (TGF- β 1R), który podobnie jak receptor dla bFGF, ma właściwości kinazy serynowo-treoninowej i po przyłączeniu się do niego ligandu uaktywnia szlak we-

wnążkomórkowego przekazu sygnału z udziałem kinaz białkowych, jak ERK i p38-MAPK [18]. Alternatywną drogą przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego może być udział jonów wapnia. Stwierdzono zwiększenie stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie w wyniku uwalniania go z RE pod wpływem działania TGF- β 1 na komórki [19]. Równocześnie autorzy stwierdzili wzrost stężenia Ca^{2+} /kalmodulinozależnej kinazy białkowej IV, co może sugerować udział tych kinaz w przekazywaniu wewnątrzkomórkowego sygnału po stymulacji TGF- β 1 [20]. Podobnie stymulacja przez IGF-1 powoduje wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie komórki na drodze IP3-zależnej (stymulacja uwalniania jonów z RE) [21].

Zarówno TGF- β 1, bFGF, jak i IGF-1 odgrywają rolę w patogenezie przerostu i przebudowy mięśnia serca [21, 22]. Podwyższoną ekspresję tych genów stwierdzano nie tylko w kardiomiocytach przerostowego serca w przebiegu nadciśnienia tętniczego, lecz także zaobserwowano wzrost mRNA dla TGF- β 1 i IGF-1 w kardiomiopatii przerostowej (HCM) [22]. Wszystkie opisane czynniki powodują wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i wydaje się, że Ca^{2+} może odgrywać rolę w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego, w tym stymulacji przerostu kardiomiocytów (Rycina 2.).

Jony wapnia służą jako przekaźnik sygnału wewnątrzkomórkowego, patologiczny wzrost ich stężenia w cytoplazmie może indukować niespecyficzną odpowiedź komórki docelowej (kardiomiocytu) nawet przy braku aktywującego działania ligandu zewnątrzkomórkowego. Układem odgrywającym główną rolę w normalizacji poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie jest układ PLB-SERCA2 [23].

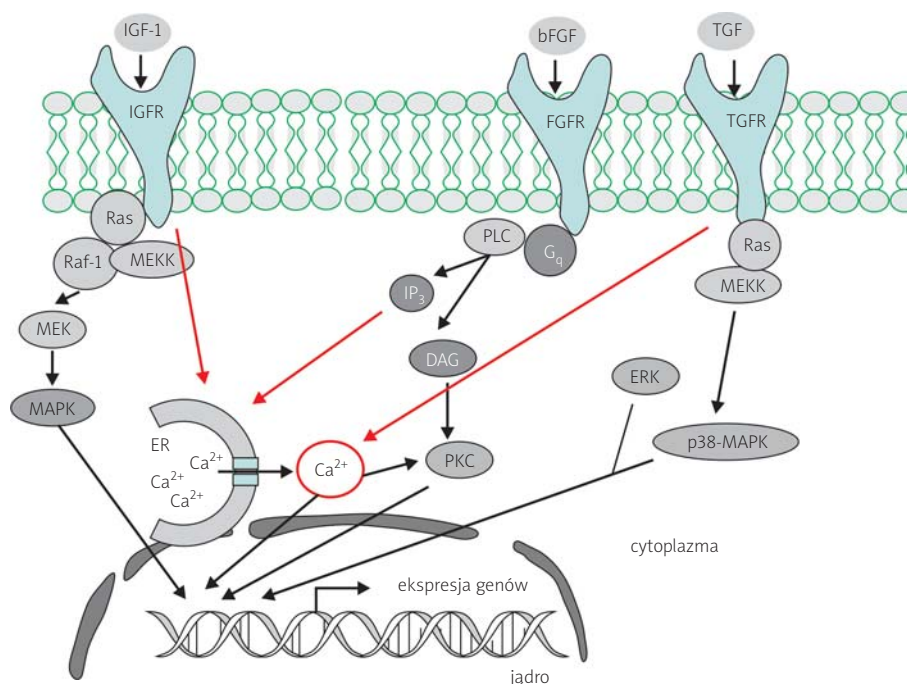
SERCA2A i PLB

Sarcoplasmic reticulum calcium ATP-ase (SERCA) jest grupą pomp jonowych typu P, które w obecności wysokoenergetycznego związku adenosynotrójfosforanu (ATP) aktywnie transportują kationy, wbrew gradientowi przez błonę [23]. Znane są trzy typy pomp P:

- ATP-azy, transportery metali ciężkich,
- Na^+/K^+ ATP-azy, SERCA,
- H^+ ATP-azy, Ca^{2+} ATP-azy [23].

Uważa się, że za utrzymanie prawidłowego poziomu jonów wapnia w kardiomiocytach odpowiada zależny od ATP kanał wapniowy siateczki retikularnej – SERCA, którego aktywność usuwania komórkowego Ca^{2+} do siateczki pozostaje w fizjologicznej przeciwnowadze z aktywnością wymiennika $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ w komórce. Wyróżniane są trzy podtypy białek SERCA kodowane przez różne geny (*ATP2A*) charakteryzujące się odmiennym występowaniem w komórkach [24]. Aktywność SERCA podlega regulacji przez wpływ fosfolambanu, hormonów tarczycy, wapń/kalmodulinozależnej kinazy czy obecności polimorfizmów genu *ATP2A2* [25].

Fosfolamban (PLB) jest 52-aminokwasowym białkiem integralnym błony siateczki śródplazmatycznej [25, 26]. W swojej nieufosforylowanej formie hamuje aktywność

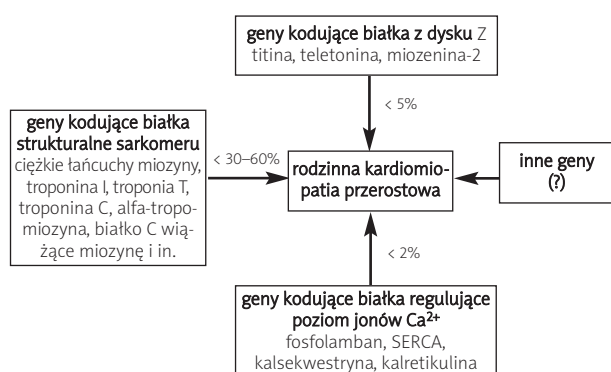


Rycina 2. Prawdopodobny udział jonów wapnia w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego w wyniku stymulacji komórki przez TGF- β 1, bFGF czy IGF-1

pompy SERCA, zmniejszając przez to transport jonów do siateczki i zwiększając stężenie jonów wapnia w cytoplazmie [26, 27]. Fosfolamban ulega fosforylacji w pozycji Ser16 pod wpływem działania kinazy białkowej C lub Thr17 w wyniku działania Ca^{2+} /kalmodulinozależnej kinazy (CaMK), w wyniku tego procesu PLB oddysocjowuje od SERCA i kończy swój hamujący wpływ na działanie tej pompy [27]. Jak dotąd wiadomo, że PLB wiąże się w określonych proporcjach z białkiem SERCA, ta interakcja nie została jednak jednoznacznie określona ilościowo. Tada i wsp. [27] proponowali model interakcji 1 mola PLB na 1 monomer SERCA, inna teoria zakłada, że na transport 1 jonu wapnia przypadają 2 mole PLB [28]. Wiadomo natomiast, że oddziaływanie PLB i SERCA jest wysoko specyficzne. W domenie cytoplazmatycznej (L4 5) białka SERCA znajduje się charakterystyczna sekwencja aminokwasowa (KDDKPV), specyficznie wiążąca PLB (tzw. *PLB-binding domain*). Równocześnie dalsze obserwacje wykazały, że oddziaływanie PLB i SERCA odbywa się również poprzez domeny błonowe [28]. Mutacje w obrębie tych domen powodują zaburzenia oddziaływania tych białek, a w konsekwencji zmiany w równowadze gospodarki wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Zarówno badania na modelach zwierzęcych, jak i obserwacje kliniczne potwierdziły rolę zaburzonej wewnątrzkomórkowej homeostazy wapniowej w etiopatogenezie przebudowy mięśnia serca, w tym rozwoju kardiomiopatii [29].

Zaburzenia homeostazy komórkowej gospodarki wapniowej w kardiomiopatiach

Kardiomiopatia przerostowa (ang. *hypertrophic cardiomyopathy*, HCM) jest pierwotnym, genetycznie uwarunkowanym schorzeniem, fenotypowo charakteryzującym się przerostem mięśnia sercowego, który najczęściej przybiera formę asymetrycznego przerostu przegrody [30]. Znałe są formy rodzinne występującej kardiomiopatii będącej cechą autosomalną związaną z występowaniem mutacji różnych genów kodujących białka sarkomeru, między innymi mutacją w genie ciężkiej miozyny sercowej (głównie beta-miozyny) (*MYH7*), białka C wiążącego miozynę, ciężkiego łańcucha alfa-miozyny czy troponiny T (*TNNT2*) [31]. W ok. 30–40% przypadków HCM nie zidentyfikowano mutacji genetycznych, co może wynikać z obecności nieodkrytej jeszcze mutacji lub też przerost może być następstwem nierozpoznanej innej choroby, np. spichrzeniowej. Dominującym zaburzeniem hemodynamicznym w kardiomiopatii przerostowej jest dysfunkcja rozkurczowa lewej komory spowodowana upośledzeniem procesu relaksacji izowolumetrycznej i procesu napętniania LK [30]. Wydaje się, że podstawową przyczyną upośledzenia relaksacji izowolumetrycznej (tzw. ujemny efekt lusitropowy) jest przeciążenie jonami wapniowymi cytozolu kardiomiocytów. Badania ostatnich lat coraz częściej podkreślają rolę mutacji w obrębie genów kodujących białka regulujące gospodar-



Rycina 3. Procentowy udział prawdopodobnych czynników genetycznych (mutacji) w etiopatogenezie rodzinnej kardiomiopatii przerostowej [32]

kę wapniową w etiopatogenezie HCM [32]. Wykazano, że mutacje w obrębie genów kodujących białka z dysku Z (układ białek odpowiedzialnych za organizację strukturalną sarkomerów, będący zakotwiczeniem dla filamentów aktyny i równocześnie pełniący rolę mechanoreceptorów w miocytach) stanowią przyczynę mniej niż 5% przypadków HCM [32]. Mutacje genów kodujących białka sarkomerowe odpowiadają za 30–60% przypadków HCM, natomiast kilka procent przypadków HCM jest uwarunkowane mutacjami w obrębie genów regulujących gospodarkę wapniową kardiomiocytów (Rycina 3.) [32].

Wzrost stężenia Ca^{2+} jako następstwo upośledzenia procesów regulujących transport tych jonów stanowi coraz częściej cel badań nad mechanizmami rozwoju HCM [29]. Jednym z głównych badanych genów jest fosfolamban, przy czym pierwsze mutacje *PLB* wykryto w kardiomiopatii rozstrzeniowej [33]. Na modelu mysim wykazano, że u nosicieli mutacji R9C [substytucja argininy przez cysteinę w obrębie kodonu 9 (części kodującej domenę cytoplazmatyczną *PLB*)] genu *PLB* rozwijała się kardiomiopatia rozstrzeniowa. Analiza funkcjonalna tej mutacji wykazała oporność fosfolambanu na działanie kinazy białkowej, co powoduje brak jego fosforylacji i ciągłe zahamowanie pompy SERCA. W efekcie powodowało to utrzymujące się stale podwyższone stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie [33]. Dalsze badania kliniczne potwierdziły istotność mutacji R9C genu *PLB*, która u ludzi prowadzi do niewydolności mięśnia serca [34]. Badano również obecność mutacji *PLB* u pacjentów z HCM [35].

Badania na modelu zwierzęcym HCM wykazały istotne obniżenie poziomu białka SERCA2A oraz zwiększenie względnego stosunku *PLB* do SERCA2A [36]. Wytworzenie heterozygotycznych myszy z fenotypową kardiomiopatią i zmniejszoną ekspresją genu *PLB* wykazało, że zahamowanie *PLB* powodowało terapeutyczną poprawę transportu jonów Ca^{2+} , a przez to poprawę funkcji mięśnia serca (zarówno skurczowej, jak i rozkurczowej) [36]. Inną opisa-

ną mutacją genu *PLB* jest zamiana waliny przez glicynę w pozycji 49 (V49G), która jest związana z nadekspresją genu *PLB* i zahamowaniem białka SERCA2 [35]. Substytucję V49G stwierdzono również u pacjentów z HCM i potwierdzono jej rolę w rozwoju zaburzeń pracy mięśnia serca w modelu mysim [36].

W badaniach przeprowadzonych w populacji japońskiej dotyczących różnych postaci kardiomiopatii oceniano mutacje w genie *PLB*, jako genie kandydacie predysponującym do rozwoju HCM. Przebadano 87 pacjentów z HCM, 10 z kardiomiopatią rozstrzeniową oraz 296 osób z grupy kontrolnej. Obserwacje w grupie z HCM wykazały obecność mutacji (–77) A > G w promotorze genu *PLB*, zwiększającą aktywność promotora tego genu z następującą zwiększoną ekspresją genu *PLB* [37]. Z drugiej strony badania prowadzone w populacji kaukaskiej u pacjentów z rodzinną kardiomiopatią rozstrzeniową (ang. *familial dilated cardiomyopathy*, FDCM), analizujące mutacje w genach MYH7, TNNT2, *PLB* i VCL (*cardio-specific exon of metavinculin*) nie wykazały obecności mutacji w genie *PLB* u pacjentów z FDCM [34]. W kolejnych badaniach klinicznych pacjenci z FDCM charakteryzowali się obecnością mutacji w genie *PLB* (R9C) [34]. Nosiciele tej mutacji mieli powiększone wymiary lewej komory serca w wieku 20–30 lat, a w ciągu 5–10 lat rozwijała się u nich niewydolność serca. W badaniu Haghighi i wsp. [38] pacjenci z idiopatyczną kardiomiopatią rozstrzeniową byli nosicielami mutacji Leu39Ter (L39X). U homozygotycznych nosicieli niewydolność mięśnia serca rozwijała się bardzo szybko, bo już w wieku 16–27 lat. Heterozygotyczni nosiciele (11 osób) charakteryzowali się różnym stopniem nasilenia objawów kardiomiopatii [38]. Należy jednak pamiętać, że wyniki obserwacji klinicznych nad rolą zaburzonej funkcji (obecności mutacji genu) fosfolambanu u pacjentów z HCM nie są jednoznaczne. W badaniach przeprowadzonych przez ośrodek autorów i w obserwacjach grupy Kalemie nie wykazano obecności mutacji w obrębie genu dla *PLB* u pacjentów z HCM [39, 40].

Jeśli chodzi o drugi element układu, należy zaznaczyć, że również mutacje w obrębie samego białka transportowego SERCA2A są związane z upośledzonym wychwytem jonów wapnia. Badania nad funkcją pompy SERCA wykazały, że zarówno występujące naturalnie, jak i sztucznie wywołane mutacje w obrębie rejonu kodującego pętlę cytoplazmatyczną L6 7 (Asp813Asn/Asp818Asn) powodują zaburzenie transportu jonów wapnia oraz zaburzenie aktywności ATP-azowej pompy jonowej [41]. Obecność zarówno tej mutacji, jak i substytucji Pro811Asn, Pro812Asn, Pro820Asn, Pro821Asn, także kodujących fragment domeny L6 7, powoduje spadek wydolności reakcji, gdzie Ca^{2+} regulował proces zarówno fosforylacji, jak i defosforylacji białka SERCA przy udziale ATP, a przez to zahamowanie transportu jonów wapnia [41]. O tym, jak skomplikowanym procesem jest regulacja poziomu jonów wapnia w komórkach, świadczy również fakt, że mutacje w obrębie

szlaku przekazu wewnątrzkomórkowego sygnału związanego z receptorami współdziałającymi z białkami G (układ Ras) mogą wpływać na funkcjonowanie transportu jonów wapnia [42]. U myszy transgenicznych z mutacją H-Ras-v12 zaobserwowano rozwój HCM [42]. U nosicieli mutacji układu Ras stwierdzono spadek stężenia m-RNA dla genu *ATP2A2*, lecz również dla PLB. Co ciekawe, poziom białka SERCA był obniżony, natomiast nie stwierdzono istotnych zmian stężenia PLB w kardiomiocytach badanych zwierząt [42]. Analiza funkcjonalna wykazała zahamowanie działania SERCA zarówno poprzez zmniejszenie ilości tego białka w kardiomiocytach, jak i nadmierną inhibicję wywołaną przez PLB (u nosicieli mutacji H-Ras-v12 stwierdzono gwałtowny spadek fosforylacji PLB w porównaniu z grupą kontrolną – *wild type*) [42].

Dodatkowym argumentem, oprócz wyżej przedstawionych badań, który wydaje się potwierdzać rolę przeciążenia jonami wapnia w patogenezie HCM, jest obserwowana dobra odpowiedź kliniczna części pacjentów z tym schorzeniem na leczenie werapamillem [43–45]. Werapamil, jako antagonistą kanału wapniowego, zmniejsza napływ jonów wapnia do komórki mięśnia sercowego, natomiast beta-bloker – drugi lek powszechnie stosowany w leczeniu HCM, jest pozbawiony tego efektu [43–45]. W najnowszym badaniu na modelu mysim HCM wykazano możliwości redukcji przerostu (regresja fenotypu) poprzez zmniejszenie nasilonego stresu oksydacyjnego [46]. Zwiększony stres oksydacyjny wykryto również u ludzi z HCM [47], co sugeruje, że próba wdrożenia leczenia antyoksydacyjnego w celu redukcji przerostu mięśnia sercowego ma sens.

W wyniku dokonanych obserwacji dotyczących regulacji poziomu jonów wapnia i ich roli w patogenezie chorób serca powstały próby genetycznej modyfikacji regulacji transportu Ca^{2+} w celach terapeutycznych. Są to próby modyfikacji ilości i funkcji PLB: wprowadzenie sekwencji antysensownych dla fosfolambanu do kardiomiocyta i zastosowanie swoistych przeciwciał monoklonalnych anty-PLB powoduje zahamowanie wpływu PLB na SERCA, co objawiało się poprawą funkcji skurczowej lewej komory [48, 49].

Podziękowania

Prace naukowców z Katedry Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum*, z których pochodzą przytoczone wyniki, były finansowane z programu numer K/ZDS/000622.

Piśmiennictwo

1. Martonosi AN, Pikula S. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1-30.
2. Murayama T, Ogawa Y. Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 305-11.
3. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-55.
4. von Lewinski D, Stumme B, Fialka F, et al. Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium. *Circ Res* 2004; 94: 1392-8.
5. Samso M, Wagenknecht T. Apocalmodulin and Ca^{2+} -calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 1349-53.
6. van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 28-39.
7. Tfelt-Hansen J, Brown EM. The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; 42: 35-70.
8. Frey N, Katus HA, Olson EN, et al. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004; 109: 1580-9.
9. Dembińska-Kieć A, Kieć-Wilk B, Kieć M. Proponowane mechanizmy przebudowy ściany naczyń i serca w chorobach układu krążenia. In: Januszewicz A (ed.). Nadciśnienie tętnicze. *Medycyna Praktyczna* 2004; 43-54.
10. Benzhi C, Limei Z, Ning W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate transient outward potassium currents in postnatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47: 41-8.
11. Hasegawa K, Lee SJ, Jobe SM, et al. cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* 1997; 96: 3943-53.
12. Sanna B, Bueno OF, Dai YS, et al. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 865-78.
13. Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, et al. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 669-74.
14. Sanak M. Podstawy medycyny molekularnej. Układy sygnałowe komórki-cytokiny i szlak fosforylacji białek. *Med Prakt* 1998; 6: 161-8.
15. Petrich BG, Wang Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 50-5.
16. Glick AB. TGFbeta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 276-83.
17. Chen CH, Poucher SM, Lu J, et al. Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2: 33-43.
18. Ren J, Samson WK, Sowers JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 2049-61.
19. Imamichi Y, Waidmann O, Hein R, et al. TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol Chem* 2005; 386: 225-36.
20. Alevizopoulos A, Dusserre Y, Ruegg U, et al. Regulation of the transforming growth factor beta-responsive transcription factor CTF-1 by calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Biol Chem* 1997; 272: 23597-605.
21. Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, et al. Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 7554-65.
22. Li RK, Li G, Mickle DA, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients

- with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 96: 874-81.
23. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 265-73.
 24. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 2007; 35: 430-42.
 25. Traaseth NJ, Ha KN, Verardi R, et al. Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca (2+)-ATPase. *Biochemistry* 2008; 47: 3-13.
 26. MacLennan DH, Abu-Abed M, Kang C. Structure-function relationships in Ca(2+) cycling proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 897-918.
 27. Tada M, Inui M. Regulation of calcium transport by the ATPase-phospholamban system. *J Mol Cell Cardiol* 1983; 15: 565-75.
 28. James P, Inui M, Tada M, et al. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1989; 342: 90-2.
 29. Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem* 2007; 45: 523-37.
 30. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 2002; 287: 1308-20.
 31. Ackerman MJ, VanDriest SL, Ommen SR, et al. Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 2042-8.
 32. Chiu C, Tebo M, Ingles J, et al. Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43: 337-43.
 33. Chien KR, Ross J Jr, Hoshijima M. Calcium and heart failure: the cycle game. *Nat Med* 2003; 9: 508-9.
 34. Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, et al. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 2003; 299: 1410-3.
 35. Song Q, Schmidt AG, Hahn HS, et al. Rescue of cardiomyocyte dysfunction by phospholamban ablation does not prevent ventricular failure in genetic hypertrophy. *J Clin Invest* 2003; 111: 859-67.
 36. Minamisawa S, Sato Y, Tatsuguchi Y, et al. Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 1-4.
 37. Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, et al. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *Eur Heart J* 2005; 26: 794-803.
 38. Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, et al. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 2003; 111: 869-76.
 39. Kalemi T, Efthimiadis G, Zioutas D, et al. Phospholamban gene mutations are not associated with hypertrophic cardiomyopathy in a Northern Greek population. *Biochem Genet* 2005; 43: 637-42.
 40. Petkow-Dimitrow P, Kieć-Wilk B, Kwaśniak M, et al. Poszukiwanie polimorfizmów w genie kodującym fosfolamban u pacjentów z kardiomiopatią przerostową. 72 Konferencja Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego PTK, Kraków 18–19 czerwiec 2009.
 41. Menguy T, Corre F, Bouneau L, et al. The cytoplasmic loop located between transmembrane segments 6 and 7 controls activation by Ca²⁺ of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 20134-43.
 42. Zheng M, Dilly K, Dos Santos Cruz J, et al. Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H424-33.
 43. Kober G, Hopf R, Biamino G, et al. Long-term treatment of hypertrophic cardiomyopathy with verapamil or propranolol in matched pairs of patients: results of a multicenter study. *Z Kardiol* 1987; 76 (Suppl. 3): 113-8.
 44. Hess OM, Grimm J, Krayenbuehl HP. Diastolic function in hypertrophic cardiomyopathy: effects of propranolol and verapamil on diastolic stiffness. *Eur Heart J* 1983; 4 (Suppl. F): 47-56.
 45. Dimitrow PP, Krzanowski M, Niżankowski R, et al. Comparison of the effect of verapamil and propranolol on response of coronary vasomotion to cold pressor test in symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000; 14: 643-50.
 46. Lombardi R, Rodríguez G, Chen SN, et al. Resolution of established cardiac hypertrophy and fibrosis and prevention of systolic dysfunction in a transgenic rabbit model of human cardiomyopathy through thiol-sensitive mechanisms. *Circulation* 2009; 119: 1398-407.
 47. Dimitrow PP, Undas A, Wołkow P, et al. Enhanced oxidative stress in hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 491-5.
 48. Chen Y, Escoubet B, Prunier F, et al. Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias. *Circulation* 2004; 109: 1898-903.
 49. Suckau L, Fechner H, Chemaly E, et al. Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation* 2009; 119: 1241-52.