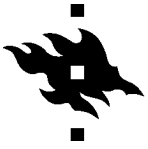


# SYDÄNLIHASSOLUJEN HYPERTROFIA LÄÄKEVAIKUTUKSEN KOHTEENA

Lotta Pohjolainen  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja lääkehoidon osasto

Maaliskuu 2017



Tiedekunta Farmasian tiedekunta		Osasto Farmakologian ja lääkehoidon osasto	
Tekijä Lotta Pohjolainen			
Työn nimi Sydänlihassolujen hypertrofia lääkevaikutuksen kohteena			
Oppiaine Farmakologia			
Työn laji Pro gradu -tutkielma		Aika Maaliskuu 2017	Sivumäärä 90
Tiivistelmä Sydämen vasemman kammion hypertrofia (engl. left ventricular hypertrophy, LVH) tarkoittaa vasemman kammion massan kasvua. Se on alun perin sopeutumiskeino, jolla sydän yrittää kompensoida siihen kohdistuvaa esimerkiksi kohonneen verenpaineen aiheuttamaa lisääntynyttä kuormitusta, mutta se johtaa lopulta sydämen vajaatoimintaan. LVH on seurausta sydänlihassolujen eli kardiomyosyyttien koon kasvusta, minkä lisäksi niiden apoptoosi ja nekroosi sekä sydämen fibroosi lisääntyvät. Nykyinen LVH:n hoito perustuu epäillyn syyn, yleensä kohonneen verenpaineen, hoitoon. Verenpainelääkkeillä on havaittu suotuisia vaikutuksia LVH:aan, mutta niillä ei ole voitu estää hypertrofiaa täysin, joten muitakin hoitovaihtoehtoja kaivataan. LVH:n puutteellisesti tunnettujen syntymekanismien ja signaalinvälitysreittien selvittäminen on tärkeää uusien mahdollisten lääkevaikutuskohteiden löytämiseksi.  Keskeisimpinä hypertrofiaa aiheuttavina ärsykkeinä pidetään mekaanista venytystä sekä joitakin humoraalisia välittäjäaineita, kuten angiotensiini II:ta ja endoteliini-1:tä (ET-1), joihin kardiomyosyytit reagoivat aktiivomalla useita solunsisäisiä signaalinvälitysreittejä. Tämän seurauksena kardiomyosyyttien geeniekspressio ja proteiinisynteesi lisääntyvät ja sarkomeerit kasvavat ja järjestäytyvät uudelleen, mikä johtaa solujen koon kasvuun. Lisäksi sydänlihassolujen kalsiumin säätely, supistustoiminta ja energia-aineenvaihdunta muuttuvat. Lukuisat solunsisäiset signaalinvälittäjät vuorovaikuttavat keskenään sekä voivat kompensoida toisiaan, mikä vaikeuttaa eri tekijöiden merkitysten tutkimista. Tärkeinä signaalinvälittäjinä pidetään muun muassa proteiinikinaasi C:tä (PKC) sekä sydämen transkriptiotekijöitä GATA4:ää ja NKX2-5:tä.  Sydämen hypertrofian <i>in vitro</i> -tutkimuksia tehdään yleensä vastasyntyneen rotan sydäimestä eristetyillä primäärisydänlihassoluilla. Vaihtoehtoisena menetelmänä on joissakin tutkimuksissa käytetty jatkuvaa H9c2-solulinjaa, minkä avulla on pyritty vähentämään koe-eläinten käyttöä. Tämän pro gradu -tutkielman kokeellisessa osassa tutkittiin H9c2-solujen soveltuvuutta hypertrofiatutkimuksiin vertaamalla niitä primäärisydänlihassoluihin. Lisäksi tutkittiin uusien kokeellisten PKC:hen ja sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavien yhdisteiden vaikutuksia H9c2-solujen ja primäärisydänlihassolujen elinkykyyn ja hypertrofiavasteisiin. Yhdisteiden toksisuutta ja vaikutusta solujen elinkykyyn tutkittiin laktaattidehydrogenaasitestillä (LDH-testi) ja 3-(4,5-dimetyyli-2-tiatsolyyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi-testillä (MTT-testi). Mekaanisen syklisen venytyksen ja ET-1:n aiheuttamia hypertrofiavasteita arvioitiin ensisijaisesti solujen pinta-alan määrittämisellä fluoresenssivärijäyistä soluista. Lisäksi ET-1-stimuloitujen primäärisydänlihassolujen hypertrofiaan liitettyjen <i>Nppa</i> - ja <i>Nppb</i> -geenien ekspressiota mitattiin kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla (engl. quantitative polymerase chain reaction, qPCR).  Sekä venytys että ET-1 aiheuttivat primäärisydänlihassoluissa pinta-alan kasvun, jota ei havaittu H9c2-soluissa. Tämän perusteella H9c2-solujen vaste hypertrofiaa aiheuttaviin stimulaatioihin ei vastaa primäärikardiomyosyyteillä saatavaa vastetta ja solulinjan soveltuvuutta hypertrofiatutkimukseen voidaan siksi pitää kyseenalaisena. Tutkitut transkriptiotekijöihin vaikuttavat yhdisteet eivät 1–30 µM pitoisuuksilla olleet juuri sytotoksisia, mutta niillä ei myöskään havaittu merkittävää vaikutusta hypertrofiavasteisiin. Sen sijaan PKC:hen vaikuttavista yhdisteistä 30 µM HMI-1a3 oli toksinen primäärikardiomyosyyteille ja 30 µM HMI-1b11 H9c2-soluille. HMI-1b11 ja bryostatiini-1 aiheuttivat myös muutoksia primäärisydänlihassolujen hypertrofiavasteisiin, mutta tulosten merkityksen selvittäminen vaatii vielä lisää tutkimuksia.			
Avainsanat sydämen vasemman kammion hypertrofia, sydänlihassolu, proteiinikinaasi C, transkriptiotekijät, lääkekehitys			
Säilytyspaikka Farmakologian ja lääkehoidon osasto			
Muita tietoja Ohjaajat: Virpi Talman, FaT ja Sini Kinnunen, FM			



Faculty Faculty of Pharmacy		Department Division of Pharmacology and Pharmacotherapy	
Author Lotta Pohjolainen			
Title Hypertrophy of cardiac myocytes as therapeutic target			
Subject Pharmacology			
Level Master's Thesis	Month and year March 2017	Number of pages 90	
Abstract <p>Left ventricular hypertrophy (LVH) is defined as an increase in left ventricular mass. It is initially a coping mechanism by which the heart tries to compensate for the increase in load caused by, for example, hypertension, but it will eventually lead to heart failure. LVH is the result of primarily an increase in cardiac myocyte size, in addition to increased apoptosis and necrosis of cardiac myocytes and fibrosis. Current treatment of LVH is based on a treatment of suspected cause, generally hypertension. Antihypertensive medication has been found to have beneficial effects on LVH. However, antihypertensive drugs can not cure LVH completely, hence other treatment options are needed. To identify new possible drug targets, it is important to increase the inadequate knowledge of the mechanisms and signal transduction pathways mediating LVH.</p> <p>The most relevant stimuli causing hypertrophy are considered to be mechanical stretch, as well as some humoral mediators such as angiotensin II and endothelin 1 (ET-1), to which cardiomyocytes respond through activation of several intracellular signal transduction pathways. As a result, cardiomyocyte gene expression and protein synthesis increase and sarcomeres grow and rearrange, resulting in an increase in cell size. In addition, regulation of calcium, contractile function and energy metabolism of cardiac myocytes change. Numerous intracellular signal mediators interact with each other and can compensate for each other, making it difficult to investigate the significance of individual factors. As important signal mediators are considered to include protein kinase C (PKC) and cardiac transcription factors GATA4 and NKX2-5.</p> <p><i>In vitro</i> studies of cardiac hypertrophy are usually performed with primary cardiac myocytes isolated from the ventricles of neonatal rats. The H9c2 continuous cell line has been used in some studies as an alternative cell model to reduce the use of laboratory animals. In the experimental part of this thesis, the suitability of H9c2 cells for hypertrophy studies was examined by comparing them to primary cardiac myocytes. In addition, experimental compounds targeted to cardiac transcription factors and PKC were studied by exploring their effects on viability and hypertrophic responses of H9c2 cells and primary cardiac myocytes. The toxicity of the compounds and the effects on cell viability were studied using the lactate dehydrogenase (LDH) assay and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The hypertrophy responses to cyclic mechanical stretch and ET-1 were primarily assessed by measuring the surface area of cells from fluorescence microscopy images. In addition, the relative expression levels of <i>Nppa</i> and <i>Nppb</i> genes in ET-1 stimulated primary cardiac myocytes were studied by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).</p> <p>Both stretching and ET-1 caused an increase in the cell surface area in primary cardiac myocytes but not in H9c2 cells. On this basis, the H9c2 cells respond differently to hypertrophic stimuli than primary cardiac myocytes, and the suitability of H9c2 cell line to hypertrophy studies can therefore be questioned. The compounds targeted to cardiac transcription factors were not cytotoxic at 1–30 µM concentrations, but they also had no significant effect on the hypertrophic responses. In contrast, the PKC compound HMI-1a3 at 30 µM was toxic to primary cardiac myocytes and HMI-1b11 at 30 µM was toxic to H9c2 cells. HMI-1b11 and bryostatin-1 also induced changes in the hypertrophic responses of primary cardiac myocytes, but the significance of these results requires further investigation.</p>			
Keywords left ventricular hypertrophy, cardiomyocyte, protein kinase C, transcription factors, drug discovery			
Where deposited Division of Pharmacology and Pharmacotherapy			
Additional information Supervisors: Virpi Talman, Ph.D. (Pharm) and Sini Kinnunen, M.Sc.			

## LYHENTEET

ACE	Angiotensin converting enzyme, angiotensiinikonvertaasi
ACTA1, <i>Acta1</i>	Skeletal $\alpha$ actin, luurankolihasen $\alpha$ -aktiini
<i>Actc1</i>	Cardiac muscle $\alpha$ actin, sydänlihaksen $\alpha$ -aktiini
AngII	Angiotensin II, angiotensiini II
ANP, <i>Nppa</i>	Atrial natriuretic peptide, A-tyypin natriureettinen peptidi
aPKC	Atypical protein kinase C, epätyypillinen proteiinikinaasi C
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II receptor type 1, tyypin 1 angiotensiini II -reseptori
<i>Atp2a2</i>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase 2, sarkoplasmisen/endoplasmisen kalvoston Ca <sup>2+</sup> -ATPaasi 2
BNP, <i>Nppb</i>	B-type natriuretic peptide, B-tyypin natriureettinen peptidi
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase, Ca <sup>2+</sup> /kalmoduliini-riippuvainen proteiinikinaasi
cPKC	Conventional protein kinase C, konventionaalinen proteiinikinaasi C
DAG	Diacylglycerol, diasyylylglyseroli
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-diamidino-2-fenyylimidindoli
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (elatusliuos)
DMSO	Dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi
DODN	Decoy oligodeoxynucleotides, "decoy" -oligodeoksinukleotidit
EKG	Electrocardiography, sydänsähkökäyrä
ERK	Extracellular signal-regulated kinase, mitogeneeniaktivoitu proteiinikinaasi
ET-1	Endothelin 1, endoteliini-1
ET <sub>A</sub>	Endothelin receptor type A, endoteliini A -reseptori
ET <sub>B</sub>	Endothelin receptor type B, endoteliini B -reseptori
FBS	Fetal bovine serum, sikiövasikan seerumi

gp130	Glycoprotein 130, glykoproteiini 130
GPCR	G protein-coupled receptor, G-proteiinikytkentäinen reseptori
GRK	G protein-coupled receptor kinase, G-proteiinikytkentäisen reseptorin kinaasi
GSK3	Glycogen synthase kinase 3, glykogeenisyntaasikinaasi 3
HDAC	Histone deacetylase, histonideasetylaasi
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-2-hydroksietyyli-1-piperatsiinietaanisulfonihappo
IEG	Immediate early response gene, välittömän aikaisen vasteen geeni
IGF1	Insulin-like growth factor 1, insuliinin kaltainen kasvutekijä 1
IP <sub>3</sub>	Inositol trisphosphate, inositolitriposfaatti
JAK	Janus kinase, Janus-kinaasi
JNK	c-Jun N-terminal kinase, mitogeeniaktivoitu proteiinikinaasi
LDH	Lactate dehydrogenase, laktaattidehydrogenaasi
LVH	Left ventricular hypertrophy, vasemman kammion hypertrofia
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1, mitogeeniaktivoitun proteiinikinaasin kinaasi 1
MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6, mitogeeniaktivoitun proteiinikinaasin kinaasi 6
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, mitogeeniaktivoitu proteiinikinaasi
MEF2	Myocyte enhancer factor 2, transkriptiotekijä
MYH, <i>Myh</i>	Myosin heavy chain, myosiinin raskasketju
MYL, <i>Myl</i>	Myosin light chain, myosiinin kevytketju
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 3-(4,5-dimetyyli-2-tiatsolyyli)-2,5-difenyyli-tetratsoliumbromidi
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells, transkriptiotekijä
nPKC	Novel protein kinase C, uudentyyppinen proteiinikinaasi C
NPR	Natriuretic peptide receptor, natriureettisten peptidien reseptori

PBS	Phosphate-buffered saline, fosfaattipuskuroitu keittosuolaliuos
PCR	Polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase, fosfoinositidi-3-kinaasi
PKC	Protein kinase C, proteiinikinaasi C
PLC	Phospholipase C, fosfolipaasi C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate, forboli-12-myristaatti-13-asettaatti
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction, kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
RACK	Receptor for activated C kinase, aktivoituneen C kinaasin reseptori
RAS	Renin-angiotensin system, reniini-angiotensiinijärjestelmä
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction, käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio
<i>Slc8a1</i>	Solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger) member 1, sydämen natrium/kalsium-vaihtaja
STAT	Signal transducer and activator of transcription, transkriptiotekijä
T <sub>3</sub>	Triiodothyronine, trijodityroniini

## SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO .....	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS .....	2
2.1 Sydämen vasemman kammion hypertrofia.....	2
2.1.1 Vasemman kammion hypertrofiaa aiheuttavia tekijöitä ja sen seurauksia .....	3
2.1.2 Sydämen hypertrofian tyypit .....	4
2.1.3 Sydämen hypertrofia solutasolla.....	6
2.2 Sydänlihassolujen hypertrofisia signaalireittejä .....	12
2.2.1 Hypertrofiaa aiheuttavia ärsykejä .....	15
2.2.2 Proteiinkinaasi C.....	18
2.2.3 Transkriptiotekijöitä.....	25
2.3 Vasemman kammion hypertrofian hoito .....	30
2.3.1 Lääkkeiden vaikutus vasemman kammion hypertrofiaan .....	30
2.3.2 Elintapojen vaikutus vasemman kammion hypertrofiaan.....	33
2.3.3 Lääkehoidon uusia mahdollisuuksia.....	35
3 TUTKIMUKSEN TAVOITE .....	39
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	40
4.1 Tutkitut yhdisteet ja muut käytetyt reagenssit .....	40
4.2 H9c2-soluviljelmät.....	41
4.3 Primäärrikardiomyosyyttiviljelmät .....	42
4.4 Sytotoksisuuden tutkiminen.....	43
4.5 Hypertrofiastimulaatiot ja yhdistealtistukset .....	44
4.6 Immunofluoresenssivärjäys ja solujen pinta-alan määrittäminen .....	45
4.7 Kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio ja geeniekspression määrittäminen.....	47
4.8 Tilastollinen analyysi .....	49
5 TULOKSET .....	49
5.1 Yhdisteiden vaikutus sydänlihassolujen elinkykyyn .....	49
5.2 Hypertrofiastimulaatioiden ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus sydänlihassolujen pinta-alaan ja morfologiaan .....	52

5.2.1 Endoteliini-1:n ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus primäärisydänlihassolujen pinta-alaan ja morfologiaan .....	52
5.2.2 Endoteliini-1:n ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus H9c2-solujen pinta-alaan ja morfologiaan .....	56
5.2.3 Venytyksen ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus primäärisydänlihassolujen pinta-alaan ja morfologiaan.....	58
5.2.4 Venytyksen ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus H9c2-solujen pinta-alaan ja morfologiaan .....	60
5.3 Endoteliini-1:n ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus primäärisydänlihassolujen <i>Nppa</i> - ja <i>Nppb</i> -geenien ekspressioon .....	62
6 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA.....	65
7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	73
8 LÄHDELUETTELO .....	74



## 1 JOHDANTO

Sydämen ylikuormitus, kuten kohonnut verenpaine, aiheuttaa sydämelle ylimääräistä työtaakkaa ja heikentää siten sydämen pumppaustehoa (van Berlo ym. 2013b). Vasemman kammion hypertrofia (engl. left ventricular hypertrophy, LVH) on sopeutumiskeino, jolla sydän yrittää säilyttää pumppaustehonsa ja vähentää vasemman kammion seinämään kohdistuvaa painetta kasvattamalla sydänlihassolujen kokoa ilman solujen lisääntyntä jakautumista (Grossman ym. 1975). Aluksi tämä on hyödyllistä, mutta pitkittyessään se heikentää sydämen toimintaa ja johtaa usein sydämen vajaatoimintaan. LVH:aa pidetään sydän- ja verisuonitautien ennusmerkkinä, sillä vasemman kammion massan lisääntyminen on liitetty lisääntyneeseen kuoleman sekä sydän- ja verisuonisairauksien riskiin (Levy ym. 1990). Sydämen vasemman kammion hypertrofia on yleistä. Framinghamin sydäntutkimuksen väestötöksessä (4976 osallistujaa) sen esiintyvyys oli miehillä 16 % ja naisilla 19 % (Levy ym. 1988). LVH:n yleisimpänä riskitekijänä pidetään kohonnutta verenpainetta. Muita tunnistettuja riskitekijöitä ovat muun muassa lihavuus, korkea ikä, läppävika ja sydäninfarkti.

LVH:n lääkkeellinen hoito perustuu yleensä verenpainelääkkeisiin (Kohonnut verenpaine, Käypä hoito -suositus, 2014). Verenpaineen alentamisella on todettu olevan suotuisia vaikutuksia LVH:aan, mutta niillä on myös verenpaineesta riippumattomia hypertrofiaa korjaavia vaikutuksia (Kantola ja Mervaala 2014). Millään lääkehoidolla ei ole kuitenkaan voitu estää hypertrofiaa täysin, joten muitakin hoitovaihtoehtoja kaivataan. LVH:n syntymekanismien ja signaalinvälitysreittien selvittäminen on tärkeää uusien mahdollisten lääkevaikutuskohteiden löytämiseksi. Niitä on tutkittu paljon, mutta silti hypertrofian mekanismien tuntemus on puutteellista. Kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan osaa näistä mekanismeista, etenkin hypertrofiaa aiheuttavia ärsykejä sekä solunsisäisiä signaalinvälittäjiä proteiinikinaasi C:tä (PKC) sekä transkriptiotekijä GATA:aa ja NKX2-5:tä, sekä niiden mahdollisuuksia lääkevaikutuksen kohteena.

Sydämen hypertrofian *in vitro* -tutkimuksia tehdään yleensä vastasyntyneen rotan sydäimestä eristetyillä primäärisydänlihassoluilla. Vaihtoehtoisena menetelmänä on joissakin tutkimuksissa käytetty jatkuvaa H9c2-solulinjaa, minkä avulla on pyritty vähentämään koe-eläinten käyttöä. Kokeellisessa osassa tutkitaan tämän solulinjan soveltuvuutta hypertrofiatutkimuksiin vertaamalla sitä primäärisydänlihassoluihin. Lisäksi selvitetään uusien kokeellisten yhdisteiden vaikutuksia H9c2-solujen ja primäärisydänlihassolujen elinkykyyn ja hypertrofiavasteisiin.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Sydämen vasemman kammion hypertrofia

Sydämen hypertrofia tarkoittaa sydämen massan kasvua. Se on sopeutumiskeino, jolla sydän yrittää kompensoida siihen kohdistuvaa lisääntyneitä hemodynaamista kuormitusta (Grossman ym. 1975). Lisääntyneellä hemodynaamisella kuormituksella tarkoitetaan yleensä sydämeen kohdistuvan paineen tai tilavuuden kasvua. Tämä lisää sydämen seinämiin kohdistuvaa painetta, jota sydänlihassolut kompensoivat kasvattamalla kokoaan. Se puolestaan johtaa etenkin kammion koon ja massan kasvuun. Lisäksi sydänlihassoluja kuolee ja syntyy fibroosia. Lopulta sydän ei enää pysty kompensoimaan siihen kohdistuvaa lisääntyneitä painetta ja sen toiminta heikkenee johtaen sydämen vajaatoimintaan.

Koska sydämen vasen kammio vastaa veren pumppaamisesta systeemiseen verenkiertoon, siihen kohdistuu suurin systolinen paine (Guyton ja Hall 2006). Tämän vuoksi hemodynaamisen kuormituksen lisääntyminen johtaa yleensä vasemman kammion hypertrofiaan, mutta myös oikean kammion tai molempien kammion hypertrofia on mahdollista (Campbell ym. 1991). Oikean kammion hypertrofia on yleensä seurausta keuhkohtaumataudista, keuhkoverenpainetaudista tai synnynnäisestä sydänviasta (Parikka 2016).

LVH:n diagnoosi tehdään yleensä sydänsähkökäyrän (engl. electrocardiography, EKG) ja kliinisen tutkimuksen avulla (Suomen Verenpaineyhdistys ry:n asettama työryhmä 2002). Kliinisessä työssä vain epäselvissä tilanteissa käytetään EKG:tä kalliimpaa sydämen kaikututkimusta, joka on kuitenkin näistä menetelmistä luotettavampi. Menetelmän valinta vaikuttaakin LVH:n diagnosointiin. EKG:llä arvioitua vasemman kammion hypertrofiaa esiintyi vain 3 %:lla Framinghamin sydäntutkimuksen aineistossa, kun kaikututkimuksella arvioituna esiintyvyys samassa aineistossa oli 16–19 % (Levy ym. 1988). Lisäksi LVH:aa voidaan mitata magneettiresonanssikuvauksella (Ruilope ja Schmieder 2008). Tieteellisissä tutkimuksissa hypertrofiaa arvioidaan yleensä sydämen kaikututkimuksella. Sillä voidaan mitata kammion massaa, tilavuutta ja seinämien paksuutta (de Simone ym. 2008). LVH:aa arvioidaan yleensä suhteuttamalla mitattu kammion massa potilaan ruumiin kokoon (esimerkiksi pituuteen tai kehon pinta-alaan) ja sukupuoleen. Erilaisia menetelmiä ja suhteutusmalleja sekä kriteerejä, joiden perusteella kammion massa luokitellaan suurentuneeksi, on runsaasti.

### 2.1.1 Vasemman kammion hypertrofiaa aiheuttavia tekijöitä ja sen seurauksia

Vasemman kammion hypertrofiaan yleisimmin liitetty riskitekijä on kohonnut verenpaine, joka lisää LVH:n riskiä monissa tutkimuksissa 2–5-kertaiseksi (Devereux ym. 1987; Levy ym. 1988). Verenpainepotilaiden kohonneen verenpaineen laskulla normaaliin arvoon ei kuitenkaan voida estää sydämen hypertrofiaa täysin, mikä viittaa hypertrofian taustalla olevan muitakin tekijöitä (esim. Ruilope ja Schmieder 2008). Lisäksi hypertension ja hypertrofian korrelaatio toimii myös toisinpäin, eli lisääntynyt vasemman kammion massa ennustaa kohonnutta verenpainetta (Benjamin ja Levy 1999). Framinghamin sydäntutkimuksen mukaan verenpaineen lisäksi LVH:n muita itsenäisiä riskitekijöitä ovat ikä, lihavuus, läppävika ja sydänlihaksen infarkti (Levy ym. 1988). Joidenkin tutkimusten mukaan lihavuus on jopa suurempi LVH:n riskitekijä kuin verenpaine (de Simone ym. 1994; Benjamin ja Levy 1999). de Simonen ym. (1994) tutkimuksessa arvioitiin verenpaineen ja lihavuuden lisäksi sukupuolen vaikutusta, ja huomattiin, että naisilla pääasiassa lihavuus ja miehillä puolestaan korkea verenpaine oli yhteydessä vasemman kammion lisääntyneeseen

massaan. Muita vasemman kammion massaan liitettyjä tekijöitä ovat muun muassa diabetes, insuliiniresistenssi, tupakointi, miesten alkoholin kulutus, virtsan natriumpitoisuus, fyysinen aktiivisuus, hematokriitti ja veren viskositeetti (Benjamin ja Levy 1999). Tunnetut riskitekijät ovat kuitenkin pystyneet selittämään vain 25–50 % vasemman kammion massan vaihtelevuudesta.

LVH voi aiheuttaa sekä kammion systolisen että diastolisen toiminnan heikkenemistä (de Simone ym. 2004). Yleensä konsentrisessa hypertrofiassa (ks. 2.1.2 Sydämen hypertrofian tyypit) pääasiassa diastolinen toiminta heikkenee, kun taas eksentrisessä hypertrofiassa systolisen toiminnan heikkeneminen on vallitsevaa (Jessup ja Brozena 2003). Toiminnan heikkeneminen etenee usein sydämen vajaatoimintaan. Hypertrofista sydäntä pidetäänkin normaalin sydämen ja vajaatoimintaisen sydämen välimuotona. Eri sydämen vajaatoiminnan muotojen lisäksi LVH:lla on yhteys sydäninfarktiin, rytmihäiriöihin ja äkkikuolemiin (Levy ym. 1990). Framinghamin 4-vuotisessa sydäntutkimuksessa jokainen vasemman kammion massan 50 gramman lisäys per metri (potilaan pituus) suurensi sydän- ja verisuonitauteihin sairastumisen suhteellista riskiä miehillä 1,49 ja naisilla 1,57. Lisäksi suurentunut vasemman kammion massa suurensi sekä suhteellista kuoleman riskiä ylipäänsä (miehillä 1,49 ja naisilla 2,01) että tätäkin suurempaa riskiä sydän- ja verisuonitautien aiheuttamaan kuolemaan (miehillä 1,73 ja naisilla 2,12). Tutkimuksessa otettiin huomioon ikä, diastolinen verenpaine, pulssipaine, verenpainelääkitys, tupakointi, diabetes, painoindeksi ja kolesteroli. Vasemman kammion massan ohella ainoastaan ikä lisäsi näiden kolmen päätetapahtuman riskiä merkittävästi.

### 2.1.2 Sydämen hypertrofian tyypit

Sydämen hypertrofiatyypit voidaan jakaa fysiologiseen ja patologiseen hypertrofiaan sekä konsentriseen ja eksentriseen hypertrofiaan (Weeks ja McMullen 2011; van Berlo ym. 2013b). Fyysinen harjoittelu tai raskaus voivat saada aikaan fysiologista hypertrofiaa (urheilijasydän), joka on hyvänlaatuista ja johtaa sekä kammioden tilavuuden ja seinämien paksuuden kasvuun, kun sydänlihassolujen koko kasvaa. Tällöin sydämen pumppausteho

paranee ja kammioiden seinämiin kohdistuva paine laskee. Näin sydän pystyy ylläpitämään tai jopa parantamaan toimintaansa. Samantyyppistä hypertrofiaa, kehityksellistä hypertrofiaa, ilmenee myös syntymän jälkeen normaalisti, kun sydämen koko kasvaa kuormituksen kasvaessa. Fyysisen harjoittelun aikaansaama hypertrofia voi olla joko konsentrista, kuten voimaharjoittelussa, tai eksentristä, kuten kestävyysharjoittelussa. Fysiologiseen hypertrofiaan ei liity fibroosia eikä sydämen toiminnan heikkenemistä, ja se välittyy eri signaalireittejä pitkin kuin patologiset hypertrofian muodot.

Jatkuva patologinen hemodynaaminen ylikuormitus johtaa puolestaan patologiin hypertrofian muotoihin, joko konsentriseen tai eksentriseen hypertrofiaan (Grossman ym. 1975). Konsentrisessa hypertrofiassa kammion seinämä paksuuntuu ilman kammion tilavuuden kasvua, ja kammion tilavuus saattaa jopa pienentyä. Tämä johtuu pääasiassa sydänlihassolujen leveyden kasvusta suhteessa solun pituuteen. Konsentrisen hypertrofian syynä on yleensä paineen aiheuttama ylikuormitus, kuten kohonnut verenpaine tai aorttastenoosi eli aorttaläpän ahtauma. Kun verenpaine nousee, myös kammion seinämään kohdistuva systolinen paine nousee ja sydän kompensoi siihen kohdistuvaa lisääntyntä painetta kammion seinämän paksuuntumisella. Tähän liittyy usein myös fibroosia, joka jäykistää kammiota. Patologisen stimulaation jatkuessa kammio paksuuntuu edelleen johtaen lopulta joko sydämen toiminnan heikkenemiseen, sydämen vajaatoimintaan tai eksentriseen hypertrofiaan.

Eksentrisessä hypertrofiassa kammion tilavuus kasvaa ja sen seinämä saattaa ohentua, kun sydänlihassolujen pituus kasvaa suhteessa niiden leveyteen (Grossman ym. 1975). Siitä käytetäänkin myös nimitystä kammion laajentuma. Tämä aiheutuu tavallisesti sydänlihaksen infarktista tai tilavuuden aiheuttamasta ylikuormituksesta, jonka tavallisin aiheuttaja on vuotava läppä. Läppävian seurauksena kammioon virtaa verta normaalia enemmän ja kammion seinämään kohdistuva systolinen paine kasvaa. Lisääntyneen paineen normalisoimiseksi sydämen kammion tilavuus kasvaa. Tilavuuden kasvu johtaa kuitenkin kammion loppudistalisen paineen nousuun, joka voi lopulta käydä sydämelle liian suureksi johtaen sydämen pumppaustehon heikkenemiseen. Eksentrisen hypertrofia voi olla myös

seurausta pitkään jatkuneesta kohonneesta verenpaineesta tai konsentrisesta hypertrofiasta, jossa sydämen kompensaatiokyky on ylittynyt.

Patologinen sydämen hypertrofia voi olla myös perinnöllistä ja syntyä geneettisten muutosten seurauksena, jolloin sitä kutsutaan hypertrofiseksi kardiomyopatiaksi (Seidman ja Seidman 2001). Hypertrofista kardiomyopatiaa aiheuttavia geenimutaatioita on löydetty geeneistä, jotka koodaavat sarkomeeriproteiineja, muun muassa sydämen  $\beta$ -myosiiniraskasketjua, sydämen troponiini T:tä,  $\alpha$ -tropomyosiinia ja sydämen myosiinia sitovaa proteiini C:tä. Geneettisten tutkimusten perusteella oletetaan, että näiden mutaatioiden seurauksena sarkomeerien toiminta ja solunsisäisen  $\text{Ca}^{2+}$ :n säätely häiriintyvät, mikä puolestaan johtaa hypertrofiaan.

### 2.1.3 Sydämen hypertrofia solutasolla

Sydän koostuu neljästä vakituisesta solutyypistä: sydänlihassoluista, fibroblasteista, endoteelisoluista sekä verisuonten sileälihassoluista (Souders ym. 2009). Lisäksi sydämessä on vaihtelevasti muita soluja, kuten imusoluja, syöttösoluja ja makrofageja, jotka kommunikoivat vakituisen sydänsolujen kanssa. Sydänsolujen jakauma vaihtelee sikiön, vastasyntyneen ja aikuisen sekä eri lajien välillä. Uusimpien tutkimustulosten mukaan suurin osa sydämen soluista on endoteelisoluja, joita on lähes puolet sydämen soluista (Pinto ym. 2016). Toiseksi eniten sydämässä on sydänlihassoluja, joita on noin kolmannes. Sydänlihassolut eli kardiomyosyytit voidaan jakaa neljään päätyyppiin: eteisten ja kammion kardiomyosyytteihin sekä sähköisen ärsykkeen synnyttäviin tahdistinsoluihin ja sitä välittäviin johtoratasoluihin (Guyton ja Hall 2006). Eteisten ja kammion sydänlihassolujen supistuminen johtaa sydänlihaksen supistumiseen. Tahdistinsolut ja johtoratasolut vastaavat lähinnä sydämen sykkeen säätelystä ja aktiopotentialien kulkeutumisesta sydämässä.

Yleisen käsityksen mukaan syntymän jälkeen suurin osa sydänlihassoluista menettää kykynsä jakautua, joten sydämen kasvu on lähinnä seurausta kardiomyosyyttien koon

kasvusta eikä hyperplasiasta, eli niiden määrän lisääntymisestä (Soonpaa ym. 1996). Sydänlihassolujen kyvyttömyys jakautua on kuitenkin kyseenalainen (Nadal-Ginard ym. 2003). Niiden määrässä tapahtuvien muutosten tutkimista vaikeuttaa se, että sydänlihassoluissa tumia voi olla yksi tai kaksi. Soonpaan ym. (1996) mukaan syntymän jälkeen sydänlihassoluissa tapahtuva DNA-synteesi johtaakin pääasiassa tumien kaksinkertaistumiseen. Nadal-Ginardin ym. (2003) mukaan ylikuormitetussa sydämessä kardiomyosyyttien apoptoosi ja nekroosi lisääntyvät, mutta myös niiden uudelleenmuodostus lisääntyy. Tämän näkemyksen mukaan sydänlihassolujen uudelleenmuodostuksella on tärkeä rooli hypertrofiassa, sillä tällä tavoin sydän pystyy korvaamaan kuolevat kardiomyosyytit. Kun kardiomyosyyttien kuolemat ja uudelleenmuodostus ovat tasapainossa, niiden määrä pysyy vakiona. Uudelleenmuodostuksen ja hypertrofian heikkeneminen johtavat lopulta sydämen vajaatoimintaan. Toisaalta Hunterin ja Chienin (1999) mukaan apoptoosi ja hypertrofia ovat vastakkaisia signaalireittejä kardiomyosyyttien aistimaan biomekaaniseen stressiin. Lopputulos onkin riippuvainen näiden kahden reitin tasapainosta. Kun sydänlihassolujen vaste niiden aistimaan stressiin kääntyy apoptoottisen signaalireitin suuntaan, se johtaa kardiomyosyyttien kuolemaan ja sydämen vajaatoimintaan. Mahdollisista kardiomyosyyttien määrässä tapahtuvista muutoksista huolimatta hypertrofian uskotaan olevan seurausta lähinnä kardiomyosyyttien koon kasvusta.

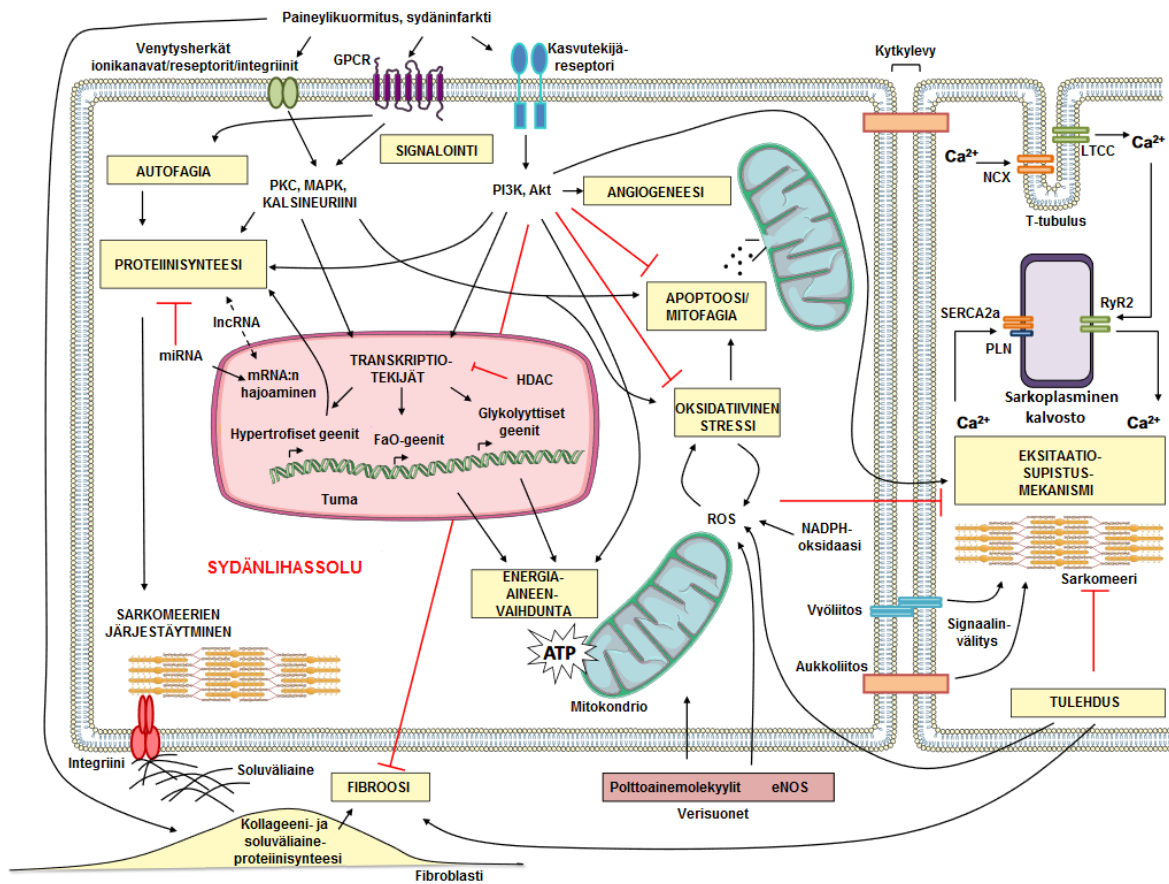
Sydänlihaksessa kardiomyosyytit ovat järjestäytyneet ristikkomaisesti, välillä haarautuen ja taas yhdistyen (Guyton ja Hall 2006). Ne ovat yhdistyneet toisiinsa monin kytkylevyin, joissa on ioneja läpäiseviä aukkoliitoksia, mikä mahdollistaa nopean aktiopotentiaalın kulkeutumisen solusta toiseen. Kardiomyosyyttien sisällä on rinnakkain pitkänomaisia lihassäikeitä eli myofibrillejä, jotka koostuvat toistuvista peräkkäisistä sarkomeereistä. Sarkomeerit muodostuvat kuitumaisista myofilamenteista: aktiini- ja myosiinifilamenteista (Hwang ja Sykes 2015). Myofilamenttien liukuessa toistensa lomaan sarkomeeri lyhenee ja lihassolu supistuu. Sarkomeerejä rajaavat pääasiassa  $\alpha$ -aktiniinista koostuvat Z-levyt, joihin aktiinifilamentit ovat kiinnittyneet. Ohuet aktiinifilamentit koostuvat aktiinista, tropomyosiinistä, troponiineista (C, I ja T) ja nebuliinista. Paksut myosiinifilamentit

koostuvat puolestaan myosiinin raskasketjuista (MYH), myosiinin kevytkejuista (MYL), myosiinia sitovasta proteiini C:stä sekä titiinistä.

Hypertrofiassa sydänlihassolut reagoivat lisääntyneeseen kuormitukseen aktivoimalla useita signaalinvälitysreittejä (Kuva 1) (Tham ym. 2015). Tämän seurauksena kardiomyosyytien geeniekspressio ja proteiinisynteesi lisääntyvät ja sarkomeerit kasvavat ja järjestäytyvät uudelleen, mikä johtaa solun koon kasvuun. Lisäksi sydänlihassoluissa tapahtuu paljon muitakin muutoksia, esimerkiksi kalsiumin säätely, supistustoiminta ja energia-aineenvaihdunta muuttuvat sekä autofagia ja oksidatiivinen stressi lisääntyvät.

Hypertrofinen stimulaatio aiheuttaa muutoksia geeniekspressiossa hyvin nopeasti. Puolen tunnin sisällä hypertrofiastimulaatiolle altistumisesta kammion kardiomyosyyteissä aktivoituvat välittömät aikaisen vasteen geenit (engl. immediate early response genes, IEG), joiden transkriptio ei ole riippuvaista uusien proteiinien synteesistä (Izumo ym. 1988; Iwaki ym. 1990). Näitä ovat muun muassa proto-onkogeenit *Fos*, *Jun* ja *Myc* sekä sinkkisormigeeni *Egr1* (engl. early growth response 1). IEG:ien merkitys hypertrofiassa ei ole täysin selvillä, mutta niiden uskotaan osallistuvan muiden hypertrofiassa ilmenevien geenien transkription säätelyyn. Samaan aikaan IEG-aktivaation kanssa B-tyypin natriureettisen peptidin (*Nppb*) geeniekspressio lisääntyy (Magga ym. 1998). Näiden jälkeen tapahtuu alkio-/sikiöaikaisten geenien, kuten A-tyypin natriureettisen peptidin (*Nppa*), myosiinin  $\beta$ -raskasketjun (*Myh7*) ja luurankolihaksen  $\alpha$ -aktiinin (*Acta1*), uudelleen aktivoituminen (Schwartz ym. 1986; Izumo ym. 1987; Izumo ym. 1988). Alkio-/sikiöaikaisten geenien uudelleen aktivoitumisen merkitys hypertrofiassa ei ole selvillä. Myosiinin  $\alpha$ - ja  $\beta$ -raskasketjut ovat myosiinifilamenttien rakenteita, joista yleensä lähinnä  $\alpha$ -raskasketjua (*Myh6*) ilmenee syntymän jälkeen kammion kardiomyosyyteissä (Izumo ym. 1987). Hypertrofiassa *Myh6*:n ilmeneminen kuitenkin vähenee, ja *Myh7*:n ilmeneminen lisääntyy (Izumo ym. 1987; Dorn ym. 1994).



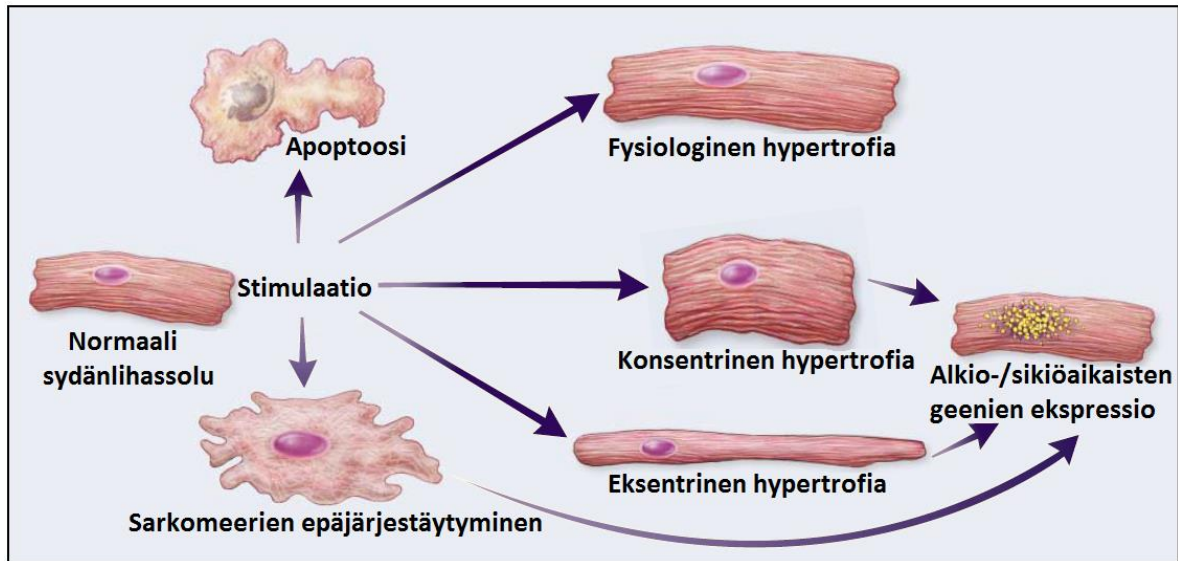


Kuva 1. Solutason prosesseja hypertrofiassa. Akt, seriini/treoniini-proteiinikinaasi; ATP, adensiinitrifosfaatti; eNOS, endoteelinen typpioksidisyntaasi; FaO, rasvahappojen oksidaatio; GPCR, G-proteiinikytkentäinen reseptori; HDAC, histonideasetylaasi; IncRNA, pitkä ei-koodaava RNA; LTCC, L-tyypin  $\text{Ca}^{2+}$ -kanava; MAPK, mitogeneeniaktivoitu proteiinikinaasi; miRNA, mikroRNA; NADPH, nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti; NCX,  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -vaihtaja; PI3K, fosfoinositidi-3-kinaasi; PKC, proteiinikinaasi C; PLN, fosfolambaani; ROS, reaktiivinen happiradikaali; RyR2, tyypin 2 ryanodiinireseptori; SERCA2a, sarkoplasmisen/endoplasmisen kalvoston  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi 2a (muokattu Tham ym. 2015).

B-tyypin natriureettista peptidiä (BNP) ilmentyy ja erittyy tavallisestikin kammioden kardiomyosyyteistä, kun taas syntymän jälkeen A-tyypin natriureettisen peptidin (ANP) ilmeneminen ja erityy tapahtuu tavallisesti lähinnä eteisten kardiomyosyyteistä (Magga ym. 1998). Hypertrofiassa näiden molempien ekspression ja erittymisen on todettu lisääntyneen kammion kardiomyosyyteissä. Niiden ekspression lisääntyminen saattaa olla kompensatiomekanismi, jolla yritetään suojata sydäntä, sillä ANP:lla ja BNP:lla on monissa

tutkimuksissa todettu olevan hypertrofiaa estäviä vaikutuksia (esim. Horio ym. 2000; Rosenkranz ym. 2003; Hayashi ym. 2004). Ne toimivat sekä paikallisesti sydänlihassoluissa että systeemisesti verenkierron kautta mm. verisuonissa, munuaisissa ja aivoissa. ANP:n ja BNP:n lisäksi natriureettisten peptidien reseptoreita 1 ja 3 (NPR1 ja NPR3) koodaavien geenien ekspression on todettu lisääntyneen rotilla paineylikuormitetun sydämen vasemman kammion sydänlihassoluissa (Christoffersen ym. 2006). ANP:n ja BNP:n vaikutukset solun sisään välittyvät solukalvon NPR1:n välityksellä, kun taas NPR3 vastaa kyseisten peptidien kuljetuksesta hajotettavaksi.

Aikaisten geeniekspression muutosten jälkeen myös tavallisten sarkomeeriproteiini geenien, kuten sydänlihaksen  $\alpha$ -aktiinin (*Actc1*) ja myosiinin kevytketju 2:n (*Myl2*), ilmeneminen lisääntyy, mikä johtaa sarkomeerien kasvuun ja uudelleen järjestäytymiseen (Lee ym. 1988; Long ym. 1989; Glennon ym. 1995). Sarkomeerien järjestäytyminen ja kasvu ovat välttämätöntä kardiomyosyyttien supistusvoiman lisäämiseksi. Hypertrofiastimulaatiosta riippuen sarkomeerit järjestäytyvät eri tavalla (Kuva 2) (Hunter ja Chien 1999). Fysiologisessa hypertrofiassa sarkomeerien kasvu tapahtuu joka suuntaan, jolloin myös solu kasvaa joka suuntaan. Konsentrisessa hypertrofiassa sarkomeeriproteiineja lisätään sarkomeereihin rinnakkain, jolloin sarkomeerien ja solun leveys kasvavat. Eksentrisessä hypertrofiassa sarkomeerit ja solut kasvavat pituussuunnassa, kun sarkomeeriproteiineja lisätään sarjaan. Hypertrofiassa myös solunsisäisen kalsiumin säätelyyn osallistuvien geenien ilmeneminen muuttuu, esimerkiksi sarkoplasmisen/endoplasmisen kalvoston  $Ca^{2+}$ -ATPaasi 2:n (*Atp2a2*) geeniekspressio vähenee ja sydämen natrium/kalsium-vaihtajan (*Slc8a1*) geeniekspressio lisääntyy (Kent ym. 1993; Huang ym. 2014). Sarkomeereissä ja kalsiumin säätelyssä tapahtuvien muutosten uskotaan muokkaavan solujen supistustoimintaa, mikä puolestaan aiheuttaa lopulta muutoksia koko sydämen supistustoiminnassa.



Kuva 2. Erilaisten hypertrofiastimulaatioiden aiheuttamat muutokset kammion kardiomyosyyttien fenotyypissä. Fysiologinen stimulaatio saa aikaan kardiomyosyytin koon kasvun joka suuntaan. Patologinen stimulaatio saa aikaan joko sarkomeerien järjestäytymisen rinnakkain aiheuttaen konsentrisen hypertrofian fenotyypin tai sarkomeerien järjestäytymisen peräkkäin, mikä johtaa eksentrisen hypertrofian fenotyyppiin. Patologisen hypertrofian muodoissa alkio-/sikiöaikaisten geenien ekspressio lisääntyy. Useissa kardiomyopatioissa sarkomeerit ovat epäjärjestäytyneet (muokattu Hunter ja Chien 1999).

Sydämen hypertrofia ei rajoitu ainoastaan sydänlihassoluihin, vaan muutoksia tapahtuu myös soluväliaineessa ja muissa sydämen soluissa, kuten fibroblasteissa (Souders ym. 2009; Creemers ja Pinto 2011). Sydämen hypertrofiaan liittyy usein fibroosia, jossa fibroblastien ja niiden säätelämän soluväliaineen määrä on lisääntynyt, mikä aiheuttaa sydänkudoksen jäykistymistä ja heikentää kammioden relaksaatiota ja supistumista. Soluväliaineen määrän lisääntyminen häiritsee sydänlihassolujen elektrofysiologista viestintää sekä heikentää hapen ja ravinteiden kulkua kardiomyosyytteihin. Fibroblastit erittävät soluväliaineeseen jäykistävän kollageenin lisäksi myös signaalimolekyylejä, kuten sytokiinejä ja kasvutekijöitä, jotka vaikuttavat ympärillä oleviin soluihin (Kamo ym. 2015). Osa näistä molekyyleistä on sydänlihassolujen hypertrofiaa voimistavia (esim. fibroblastikasvutekijä ja transformoiva kasvutekijä  $\beta$ ) ja osa sitä estäviä (esim. adrenomedulliini ja interleukiini 33). Paineylikuormituksen aktivoimien fibroblastien vaikutus kardiomyosyytteihin on kuitenkin hypertrofiaa voimistava (Cartledge ym. 2015).

Myös sydänkudoksessa olevat endoteelisolut osallistuvat hypertrofiavasteen syntymiseen (Shubeita ym. 1990; Kamo ym. 2015). Ne ovat suoraan kosketuksissa kardiomyosyyttien kanssa, joten niiden välittämät viestimolekyylit kulkeutuvat parakriinisesti kardiomyosyytteihin. Ne erittävät etenkin endoteliini-1:tä (ET-1), jonka erityksen on todettu lisääntyneen venytyksen ja angiotensiini II (AngII) -stimulaation seurauksena ja vahvistavan hypertrofiavastetta kardiomyosyyteissä (Yamazaki 1996; Adiarto 2012). Muita endoteelisolujen erittämiä viestimolekyylejä ovat typpioksidi, prostaglandiinit ja monet kasvutekijät (Kamo ym. 2015).

## 2.2 Sydänlihassolujen hypertrofisia signaalireittejä

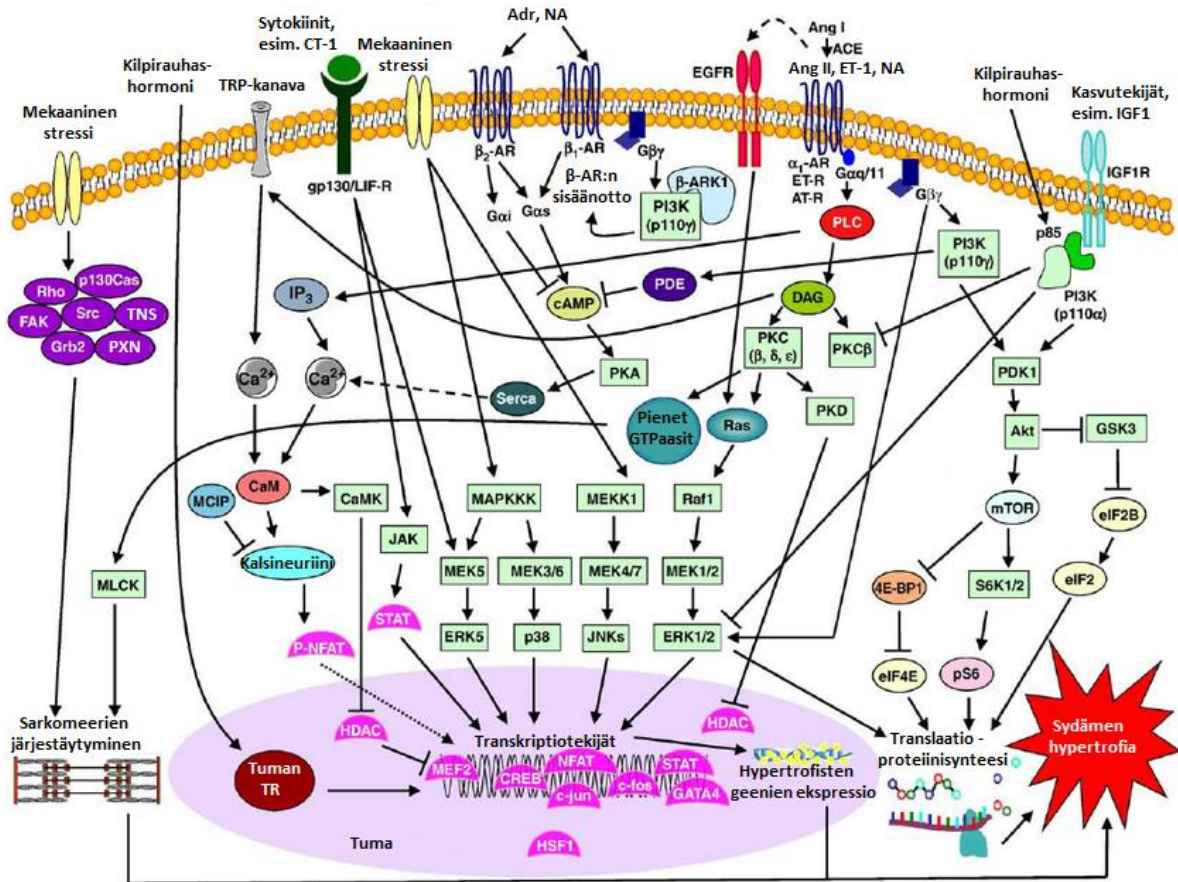
Sydämen hypertrofian signaalireitteihin kuuluu sekä sydäntä suojaavia että patologisia vasteita aiheuttavia signaalinvälittäjiä. Eri stimulaatiot aktivoivat eri reittejä, ja etenkin fysiologisen ja patologisen hypertrofian signaalireitit poikkeavat toisistaan (Weeks ja McMullen 2011). Lisäksi lukuisat signaalinvälittäjät vuorovaikuttavat keskenään sekä voivat kompensoida toisiaan, mikä vaikeuttaa eri reittien ja tekijöiden merkitysten tutkimista. Kuvassa 3 on esitetty yksinkertaistettuna joitakin hypertrofian keskeisimpiä ja tunnetuimpia signaalireittejä. Hypertrofiaa aiheuttava ärsyke aistitaan solukalvolta mm. G-proteiinikytkentäisten reseptorien (GPCR) ja kasvutekijäreseptorien välityksellä, kun ligandit (mm. katekoliamiinit ja kasvutekijät) aktivoivat niitä (Bernardo ym. 2010). Solukalvolta signaali kulkeutuu monien signaalinvälittäjien kautta sekä tumaan, ribosomeihin että sarkomeereihin, joissa solun geeniekspressiossa, proteiinisynteesissä ja rakenteessa tapahtuu muutoksia.

Tunnetuin sydäntä suojaava ja fysiologista hypertrofiaa aiheuttava signaalireitti aktivoituu insuliinin kaltaisen kasvutekijä 1:n (IGF1) aktivoitessa reseptorinsa, joka puolestaan aktivoi solun sisällä p110 $\alpha$ -alaysikön sisältävän fosfoinositidi-3-kinaasin (PI3K) kautta seriini/treoniinikinaasi AKT:ia (Weeks ja McMullen 2011). AKT osallistuu sydänlihassoluissa mm. apoptoosin ja proteiinisynteesin säätelyyn. PI3K (p110 $\alpha$ ) vaikuttaa

myös patologiseen signaalinvälitykseen estämällä ERK:ia (engl. extracellular signal-regulated kinase) ja PKC $\beta$ :aa (Bernardo ym. 2010). Toinen sydäntä suojaava ja hyvänlaatuisen hypertrofiaan liitetty reitti koostuu eri sytokiinien aktivoimasta glykoproteiini 130:sta (gp130), sitä seuraavasta Janus-kinaasin (JAK) ja transkriptiotekijä STAT:n (engl. signal transducer and activator of transcription) aktivaatiosta. Myös kilpirauhashormonin on havaittu osallistuvan fysiologiseen sydämen hypertrofiaan.

Tunnetuin patologisen hypertrofian signaalireiteistä on venytyksen, AngII:n, ET-1:n ja katekoliamiinien aktivoimien GPCR:ien G $\alpha_q$ -alaysiköstä seuraava signaalinvälitys (Bernardo ym. 2010). Sydänlihassoluissa venytys ja GPCR-agonistit aktivoivat useita reittejä pitkin kolmea hypertrofiaan liitettyä mitogeeniaktivoitua proteiinikinaasia (MAPK), ERK:ia, JNK:ta (engl. c-Jun N-terminal kinase) ja p38:ia, jotka säätelevät etenkin monien transkriptiotekijöiden, kuten GATA:n ja NFAT:n (engl. nuclear factor of activated T-cells), toimintaa. Proteiinikinaasi C:tä (PKC) pidetään tärkeänä G $\alpha_q$ :sta seuraavana signaalin välittäjänä, joka aktivoi ainakin seriini/treoniinikinaasi Raf1:tä ja proteiinikinaasi D:tä (PKD). Myös muiden G-proteiinien, kuten  $\beta$ -adrenergisten reseptorien aktivoimien G-proteiinien ja pieniin G-proteiineihin kuuluvien Ras:n ja Rho:n, on havaittu osallistuvan patologisen hypertrofian signaalinvälitykseen. GPCR:t aktivoivat myös p110 $\gamma$ -alaysiköllistä PI3K:ia, jonka (toisin kuin p110 $\alpha$ -alaysiköllisen PI3K:n) on havaittu osallistuvan patologisen hypertrofian signalointiin.

Kalsium on tunnettu lihassolujen supistumisen säätelijä, minkä lisäksi se osallistuu myös sydänlihassolujen kasvun säätelyyn (Bernardo ym. 2010). GPCR:ien aktivaatio lisää solusisäisen Ca<sup>2+</sup>:n määrää, mikä puolestaan aktivoi kalsineuriinia ja Ca<sup>2+</sup>/kalmoduliini-riippuvaisia proteiinikinaaseja (CaMK). Kalsineuriini defosforyloi hypertrofisen geeniekspression säätelyyn osallistuvan transkriptiotekijä NFAT:n ja indusoi sen kulkeutumista tumaan. CaMK II:n puolestaan epäillään fosforyloivan histonideasetylaaseja (HDAC), minkä myötä transkriptiotekijä MEF2 (engl. myocyte enhancer factor 2) aktivoituu.



Kuva 3. Kaavio keskeisimmistä sydänlihassolujen sisäisistä hypertrofisista signaalireiteistä. Kaikkia signaalinvälittäjiä ja vuorovaikutuksia ei ole kuvattu. 4E-BP1 (engl. 4E binding protein 1), eIF4E:hen sitoutuva proteiini; α<sub>1</sub>-AR, α<sub>1</sub>-adrenerginen reseptori; ACE, angiotensiinikonvertaasi; Adr, adrenaliini; Akt, seriini/treoniinikinaasi; Ang I, angiotensiini I; Ang II, angiotensiini II; AT-R, angiotensiinireseptori; β-AR, β-adrenerginen reseptori; β-ARK, β-adrenergisen reseptorin kinaasi; CaM, kalmoduliini; CaMK, Ca<sup>2+</sup>/kalmoduliini-riippuvainen proteiinkinaasi; cAMP, syklinen adenosiinimonofosfaatti; CREB (engl. cAMP response element-binding protein), transkriptiotekijä; c-fos, transkriptiotekijä; c-jun, transkriptiotekijä; CT-1, kardiotrofiini-1; DAG, diasyyloglyseroli; EGFR, epidermaalisen kasvutekijän reseptori; eIF2 (engl. eukaryotic initiation factor 2), proteiinin translaation osallistuva proteiini; eIF4E (engl. eukaryotic initiation factor 4E), proteiinin translaation osallistuva proteiini; ERK (engl. extracellular signal-regulated kinase), mitogeneeniaktivoitu proteiinkinaasi; ET-R, endoteliinireseptori; ET-I, endoteliini-1; FAK, fokaalinen adheesiokinaasi; GATA4, transkriptiotekijä; gp130, glykoproteiini 130; Grb2, kasvutekijäreseptorin sitova proteiini 2; GSK3, glykogeenisyntaasikinaasi 3; GTPaasi, guanosiinitrifosfataasi; HDAC, histonideasetylaasi; HSF1 (engl. heat shock transcription factor 1), lämpösokkiproteiinigeenejä säätelevä transkriptiotekijä 1; IGF1, insuliinin kaltainen kasvutekijä 1; IGF1R, insuliinin kaltainen kasvutekijä 1:n reseptori; IP<sub>3</sub>, inositolitrifosfaatti; JAK, Janus-kinaasi; JNK, (engl. c-Jun N-terminal kinase) mitogeneeniaktivoitu proteiinkinaasi; LIF-R, leukemiaa estävän tekijän reseptori; MAPKKK,

mitogeneeniaktivoidun proteiinikinaasin kinaasin kinaasit; MCIP (engl. mitogen-enriched calcineurin-interacting protein) kalsineuriinia säätelevä proteiini; MEF2, (engl. myocyte enhancer factor 2), transkriptiotekijä; MEK, mitogeneeniaktivoidun proteiinikinaasin kinaasi; MEKK1, mitogeneeniaktivoidun proteiinikinaasin kinaasin kinaasi 1; MLCK, myosiinin kevytketjun kinaasi; mTOR, nisäkkään rapamysiinin kohde; NA, noradrenaliini; NFAT (engl. nuclear factor of activated T-cells), transkriptiotekijä; p110 $\alpha$  ja p110 $\gamma$ , fosfoinositidi-3-kinaasin alayksikköjä; p130Cas, CAS/CSE-proteiiniperheen proteiini; p38, mitogeneeniaktivoitu proteiinikinaasi; p85, fosfoinositidi-3-kinaasin alayksikkö; PDE, fosfodiesteriini; PI3K, fosfoinositidi-3-kinaasi; PKA, proteiinikinaasi A; PKC, proteiinikinaasi C; PKD, proteiinikinaasi D; PLC, fosfolipaasi C; pS6 (engl. phosphorylation of 40 S ribosomal S6 protein), fosforyloitu ribosomaalinen proteiini S6; PXN, paksisilliini; Raf1, seriini/treoniini-proteiinikinaasi; Ras, guanosiinitrifosfaatasiperhe; Rho, rodopsiini; S6K1/2, ribosomaalinen proteiini S6 -kinaasi 1 ja 2; Serca, sarkoplasmisen/endoplasmisen kalvoston Ca<sup>2+</sup>-ATPaasi; Src, proteiinityrosiini-kinaasi; STAT (engl. signal transducer and activator of transcription), transkriptiotekijä; TNS, tensiini; TR, kilpirauhashormonireseptori (muokattu Bernardo ym. 2010).

Koska signaalireittien verkosto on hyvin laaja, käsitellään seuraavaksi pääasiassa kokeelliseen osaan liittyviä hypertrofian välittäjiä. Näitä ovat kokeellisessa osassa tutkittavien yhdisteiden mahdolliset vaikutuskohteet: PKC sekä sydämen transkriptiotekijät GATA ja NKX2-5. Lisäksi tarkastellaan lyhyesti kokeellisessa osassa käytettyjä hypertrofiaa aiheuttavia ärsykeitä: mekaanista venytystä ja ET-1:tä.

### 2.2.1 Hypertrofiaa aiheuttavia ärsykeitä

Hemodynaaminen ylikuormitus aiheuttaa kardiomyosyyttien venymistä, minkä uskotaan olevan hypertrofiaa välittävä mekanismi (Komuro 2001). On myös ajateltu, että hypertrofiaa aiheuttavat eräät verenkierrossa kulkeutuvat välittäjäaineet ja parakriiniset signaalimolekyylit. Kardiomyosyyttien venytys *in vitro* aiheuttaa kuitenkin samanlaisia hypertrofiavasteita soluissa kuin *in vivo* paineylikuormitus, mikä viittaa siihen, että systeemisesti vaikuttavat neurohumoraaliset tekijät eivät ole välttämättömiä hypertrofian syntymisessä (Sadoshima ja Izumo 1997). Kardiomyosyyttien venytyksen aistiminen ja sitä seuraava signaalinvälitys eivät ole kuitenkaan täysin selvillä. Venytyksen on todettu aiheuttavan monien signaalinvälitysreittien aktivaatiota sekä useiden välittäjäaineiden vapautumista. On kuitenkin epäselvää, mitkä niistä aktivoituvat suoraan venytyksestä ja

mitkä epäsuorasti. Venytyksen aistimista havaitsevien mekanosensorisien mekanismien epäillään olevan jotenkin yhteydessä solukalvoon, jotta ne voisivat tunnistaa solukalvon jännitteen muutoksia. Ehdotettuja mekanismeja ovat olleet muun muassa venytysherkät ionikanavat, soluväliaineeseen kiinnittyvät integriinireseptorit, solukalvon läpäisevät tyrosiinikinaasireseptorit, sarkomeereissä oleva lihaksen LIM-proteiini, apeliinireseptori ja eri GPCR:t, kuten tyypin 1 angiotensiini II ( $AT_1$ ) -reseptori (Sadoshima ja Izumo 1997; Buyandelger ym. 2011; Scimia ym. 2012). Voi myös olla, että kardiomyosyyteissä on useita eri mekanismeja venytyksen havaitsemiseksi.

Nestetasapainoa ja verenpainetta säätelevän reniini-angiotensiinijärjestelmän (RAS) on todettu aktivoituvan hypertrofiassa, ja sen vaikutusten on aiemmin uskottu syntyvän systeemisesti, mutta myöhemmin on havaittu, että sydämessä on oma paikallinen RAS (Baker ym. 1992; Sadoshima ym. 1993). Onkin epäilty, että kardiomyosyyteistä vapautunut AngII vaikuttaa sydämen paikallisessa RAS:ssa aktivoiden solun sisäisen signaalinvälityksen auto- ja parakriinisesti  $AT_1$ -reseptorin kautta (Baker ym. 1992). Tämä ajatus perustuu tutkimuksiin, joissa venytyksen on todettu vapauttavan AngII:ta kardiomyosyyteistä, sekä tutkimuksiin, joissa  $AT_1$ -reseptorin salpaajilla ja angiotensiinikonvertaasin (ACE) estäjillä on voitu estää hypertrofiaa (Pfeffer 1982; Baker ym. 1990; Sadoshima ym. 1993). Venytyksen on kuitenkin todettu aktivoivan  $AT_1$ -reseptoria ilman AngII:ta aiheuttamalla reseptorin konformaatiomuutoksen, jonka epäillään välittävän vasteen solun sisälle (Yasuda ym. 2008). Ei ole kuitenkaan selvää aiheuttaako venytys reseptorin konformaatiomuutoksen suoraan vai jonkin toisen tekijän välityksellä.  $AT_1$ -reseptorin salpaaja, kandesartaani, aiheuttaa toisenlaisen reseptorin konformaatiomuutoksen, jonka epäillään inaktivoivan reseptorin. Vaikka mekaaninen venytys yksinään pystyy aiheuttamaan hypertrofiaa, AngII:lla on myös kyky indusoida hypertrofiaa (Sadoshima ym. 1993). Tämän puolesta puhuu se, että AngII:ta lisäämällä solujen hypertrofiasignaalireitit aktivoituvat, ja se, että ACE:n estäjillä on voitu estää hypertrofiaa. Voidaankin ajatella, että  $AT_1$ -reseptori on hypertrofiaa aistiva mekanismi, jota aktivoi sekä venytys että AngII. Tämän ohella kardiomyosyyteissä on luultavasti myös muita venytystä aistivia mekanismeja.



AngII:n lisäksi toinen hypertrofiaan vahvasti liitetty välittäjäaine on ET-1. Se on tavallisesti verisuonia supistava ja solunjakautumista lisäävä peptidi, jota tuottavat muun muassa endoteelisolut, epiteelisolut, makrofagit, fibroblastit ja kardiomyosyytit (Battistini ym. 1993). ET-1:n tuotanto ja erityis kardiomyosyyteistä kasvavat venytyksen seurauksena (Yamazaki ym. 1996). Se aktivoi auto- ja parakriinisesti monia kardiomyosyyttien solunsisäisiä hypertrofisia signaalinvälitysreittejä, kuten PKC:tä, MAPK:eja ja seriini/treoniinikinaasi Raf1:tä, ja lisää proteiinisynteesiä kardiomyosyyteissä (Yamazaki ym. 1996; Yamazaki ym. 1999). Lisäksi ET-1 kasvattaa kardiomyosyyttien kokoa sekä lisää monien hypertrofiaan liitettyjen geenien, kuten *Nppa*:n ja *Myl2*:n, ekspressiota (Shubeita ym. 1990; Dulce ym. 2006). ET-1:n hypertrofinen vaste syntyy ET<sub>A</sub>-reseptorin kautta (Yamazaki ym. 1996).

AT<sub>1</sub>-reseptori ja ET<sub>A</sub>-reseptori ovat molemmat solukalvolla sijaitsevia GPCR:eja, jotka ovat kytköksissä heterotrimeeriseen G-proteiiniin, jonka  $\alpha$ -alaysikkö on G $\alpha_{q/11}$  (Molkentin ja Dorn 2001). Ligandin sitoutuessa reseptoriin G-proteiinin G $\alpha$ - ja G $\beta\gamma$ -alaysiköt erkanevat. G $\alpha_{q/11}$ -alaysikkö aktivoi fosfolipaasi C - $\beta$ :aa (PLC- $\beta$ ), joka puolestaan lisää diasyylyglyserolin (DAG) ja inositolitrifosfaatin (IP<sub>3</sub>) tuotantoa. IP<sub>3</sub> aiheuttaa solunsisäisen Ca<sup>2+</sup>-pitoisuuden nousun, mikä puolestaan aktivoi hypertrofiaa välittäviä kalsineuriinia sekä CaMK:eja. DAG ja lisääntynyt Ca<sup>2+</sup> aktivoivat myös PKC:n. G $\alpha_{q/11}$ -alaysikkö onkin tärkeä hypertrofian välittäjä. Sen yliekspression on todettu lisäävän hypertrofiaa ja sen poistaminen kardiomyosyyteissä esti paineylikuormituksen aiheuttaman sydämen hypertrofian hiirillä (D'Angelo ym. 1997; Adams ym. 1998; Wettschureck ym. 2001).

AT<sub>1</sub>:n ja ET<sub>A</sub>:n lisäksi  $\alpha$ 1-adrenergisissä reseptoreissa on G $\alpha_{q/11}$ -alaysikkö, joten myös  $\alpha$ 1-reseptorin kautta vaikuttavat sympatomimeetit, kuten adrenaliini ja noradrenaliini, voivat aikaansaada hypertrofisen signaalin kardiomyosyyteissä (Molkentin ja Dorn 2001). Myös  $\beta$ -adrenergisen stimulaation, kuten isoprenaliinin, on todettu aiheuttavan hypertrofiaa hiirillä (Saadane ym. 1999).  $\beta$ -adrenerginen reseptori koostuu yleensä G $\alpha_s$ - ja G $\beta\gamma$ -alaysikoista, joista molemmat aktivoivat solunsisäisiä signaalinvälitysreittejä (Molkentin ja Dorn 2001). G $\beta\gamma$ :n on todettu aktivoivan ainakin hypertrofiaan liitettyjä MAPK:eja, Raf1:tä ja PI3K:ta.

### 2.2.2 Proteiinikinaasi C

Proteiinikinaasi C (PKC) on seriini/treoniinikinaasiperhe, jonka ainakin 10 tunnettua isoformia toimivat soluissa monissa eri tehtävissä (Naruse ja King 2000). PKC:t jaetaan rakenteensa ja aktivoitumisensa perusteella kolmeen ryhmään: konventionaalisiin (engl. conventional, cPKC), uudenslaisiin (engl. novel, nPKC) sekä epätyypillisiin (engl. atypical, aPKC) PKC:ihin. cPKC:t  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II ja  $\gamma$  aktivoituvat  $\text{Ca}^{2+}$ :n ja DAG:in avulla, kun taas nPKC:t  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  ja  $\theta$  eivät tarvitse  $\text{Ca}^{2+}$ :ia aktivoituakseen vaan DAG on riittävä aktivoimaan niitä. aPKC:t  $\zeta$  ja  $\iota/\lambda$  ovat puolestaan riippumattomia sekä  $\text{Ca}^{2+}$ :sta että DAG:sta. cPKC:t ja nPKC:t aktivoituvat siis muun muassa edellä mainitun  $G\alpha_q$ -proteiinin kautta, koska sen aktivoima fosfolipaasi C lisää solussa kyseisiä PKC:ita aktivoivia  $\text{Ca}^{2+}$ :ia ja DAG:ia.

Jokaisen PKC-isoformin aktivaatio on riippuvainen kyseisen isoformin ekspressiotasosta, fosforylaatiosta ja lokalisaatiosta solun sisällä (Newton 2001). Yli 90 % PKC:ista on yleensä fosforyloituneena, joten fosforylaatio ei yleensä rajoita PKC:n aktivaatiota. Sen sijaan PKC:n aktivaatiota säätelee sen translokalisatio eli kulkeutuminen oikeaan paikkaan solun sisällä, yleensä solulimasta jollekin membraanille, tumaan tai solutukirangan osiin. Translokaatio tapahtuu lisääntyneiden  $\text{Ca}^{2+}$ :n ja DAG:in sekä fosfolipidien avulla. Lisäksi isoentsyymispesifisten aktivoituneiden C kinaasien reseptorien (engl. receptors for activated C kinases, RACK) avulla eri isoformit kulkeutuvat juuri niille oikeaan paikkaan solun sisällä sekä kosketuksiin substraattinsa kanssa, minkä uskotaan vaikuttavan isoformispesifisen signaalinvälityksen aktivaatioon (Mochly-Rosen 1995). Tämän spesifisen translokaation sekä substraattispesifisyyden avulla samasta signaalista aktivoituneiden PKC-isoformien uskotaan voivan aiheuttaa erilaisia, jopa päinvastaisia vasteita soluissa. Eri PKC-isoformeilla on kuitenkin monia yhteisiä substraatteja, minkä vuoksi niillä on myös päällekkäisiä rooleja.

## **PKC sydämessä**

Eri isoformien jakautuminen on kudosis-, ikä- ja lajisidonnaista (Ferreira ym. 2011a). Suurin osa nisäkkäistä ilmentää sydämessä isoformeja  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  ja  $\zeta$ , mutta eri lajien välillä on eroja (Dorn ja Force 2005). Simonisin ym. (2007) tutkimuksessa terveen ihmisen sydämen vasemmasta kammioista löydettiin isoformeja  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  ja  $\lambda$ . Disatnik ym. (1994) löysivät rotan primäärikardiomyosyyteistä isoformeja  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ja  $\zeta$ , kun taas Kohout ja Rogers (1993) tunnistivat rotan primäärikardiomyosyyteistä isoformeja  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  ja  $\eta$ . Erilaiset näytteiden tutkimusmenetelmät (mm. immunoblottaus ja polymeraasiketjureaktio) sekä erilaiset soluviljelmät tai kudosis-/solunäytteiden eristysmenetelmät voivat selittää hieman eroavia tuloksia. Sydänlihassoluviljelmät eivät ole yleensä täysin puhtaita, joten osa havaituista PKC-isoformeista voi olla peräisin esimerkiksi fibroblasteista eikä kardiomyosyyteistä.

Eri isoformien ekspressio ja aktiivisuus muuttuvat myös ikääntyessä (Ferreira ym. 2011a). Esimerkiksi PKC $\alpha$ ,  $-\delta$ ,  $-\epsilon$  ja  $-\zeta$  ilmenevät runsaasti sikiön ja vastasyntyneen rotan sydänlihassoluissa, kun aikuisen rotan kardiomyosyyteissä näiden isoformien ilmeneminen on selvästi vähentynyt, ja  $\alpha$ - ja  $\zeta$ -isoformeja ei havaita aikuisen rotan sydämessä juuri lainkaan (Rybin ja Steinberg 1994; Goldberg ja Steinberg 1996). Hiirten sydämissä ainakin  $\alpha$ -,  $\beta$ II-,  $\delta$ - ja  $\epsilon$ -isoformien ja ihmisten sydämissä isoformien  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  ja  $\lambda$  ekspression on havaittu vähentyneen ikääntyessä (Schreiber ym. 2001; Simonis ym. 2007). Sekä ihmisillä että rotilla  $\beta$ -isoformien ekspressio häviää aikuisilla lähes kokonaan, joskaan sen ekspressio ei ole myöskään sikiöllä tai vastasyntyneellä kovin suurta (Clerk ym. 1995; Simonis ym. 2007). Näin ollen aikuisen sydänlihassoluissa eniten ilmenevät PKC-isoformit ovat  $\alpha$ ,  $\delta$  ja  $\epsilon$ .

## **PKC hypertrofiassa**

PKC-isoformien ekspressio ja aktivaatio muuttuvat myös monissa sairauksissa, kuten LVH:ssa ja sydämen vajaatoiminnassa. LVH:ssa PKC:n ekspressio ja aktivaatio ovat lisääntyneet sekä mRNA- että proteiinitasolla (Allo ym. 1992; Gu ja Bishop 1994; Koide ym.

2003). PKC:n estolla, esimerkiksi staurosporiinilla, on puolestaan pystytty estämään *in vitro* kardiomyosyyttien PKC-aktivaatiota ja hypertrofista kasvua (Allo ym. 1992). Tämä viittaa PKC:n rooliin hypertrofian signaalinvälittäjänä. Eri PKC-isoformeilla on kuitenkin havaittu erilaisia vaikutuksia. PKC-signaloinnin tutkimista vaikeuttaa monien isoformien samanaikainen ekspressio ja aktivaatio sekä isoformien keskinäinen riippuvuus ja vuorovaikutus (Dorn ja Force 2005). Eri PKC-isoformien rooleja on tutkittu *in vitro* kardiomyosyyttiviljelmissä sekä *in vivo* transgeenisissä yliekspressiomalleissa, poistogeenisissä malleissa sekä isoformiselektiivisiä agonisteja, antagonisteja ja RACK:ejä hyödyntävissä malleissa. Monissa tutkimuksissa on saatu eroavia tuloksia LVH:ssa tapahtuvista muutoksista, mutta keskeisimmät muutokset näyttävät tapahtuvan  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - ja  $\epsilon$ -isoformien aktivaatiossa (mm. Gu ja Bishop 1994; Bowling ym. 1999; Braun ym. 2002; Simonis ym. 2007; Naskar ym. 2014).

PKC:lla on monia fysiologisia substraatteja, ja kardiomyosyyteissä se säätelee monia solunsisäisiä hypertrofisia signaalinvälittäjiä. Sen on esimerkiksi havaittu vastaavan AngII-stimulaation aiheuttamasta seriini/treoniinikinaasi Raf1:n aktivaatiosta ja sitä seuraavasta ERK1/2:n aktivaatiosta kardiomyosyyteissä (Zou ym. 1996). PKC osallistuu myös venytyksen aiheuttamaan Raf1:n ja MAPK:ien aktivaatioon, vaikka se ei ole välttämätön signaalinvälittäjä venytyksen aiheuttamassa hypertrofiassa (Yamazaki ym. 1995). Lisäksi AngII-, ET-1- ja  $\alpha$ -adrenergisen stimulaation seurauksena PKC aktivoi CaMK:eihin kuuluvaa PKD:tä kardiomyosyyteissä (Avkiran ym. 2008). PKD:n uskotaan välittävän PKC-aktivaatiosta seuraavaa HDAC5:n ulosvientiä tumasta, mikä puolestaan aktivoi pro-hypertrofisen transkriptiotekijä MEF2:n (Vega ym. 2004). PKC:n on havaittu myös parantavan pro-hypertrofisen GATA4-transkriptiotekijän sitoutumista DNA:han (Wang ym. 2005). Lisäksi eri PKC-isoformit aktivoivat eri signaalinvälittäjiä, esimerkiksi rotan kardiomyosyyteissä PKC $\delta$ :n on todettu aktivoivan JNK:ta ja p38:aa, kun taas PKC $\epsilon$ :n on todettu aktivoivan ERK1/2:ta (Heidkamp ym. 2001).

## PKC $\alpha$ hypertrofiassa

Tutkimukset PKC $\alpha$ :n roolista hypertrofiassa ovat ristiriitaisia. PKC $\alpha$ :n aktiivisuutta on tutkittu mittaamalla sekä sen määrää että sen translokaatiota solun sisällä (ilmeneminen solulimassa vs. solukalvolla). PKC $\alpha$ -proteiinin sekä sen mRNA:n ilmenemisen ja aktivaation on todettu lisääntyneen vasemman kammion hypertrofiassa sekä rotilla että ihmisillä (Braun ym. 2002; Koide ym. 2003; Simonis ym. 2007). Silti kaikissa tutkimuksissa PKC $\alpha$ :n ekspressiossa LVH-rotilla ei ole havaittu muutoksia (Gu ja Bishop 1994; Inagaki ym. 2002). Braz ym. (2002) tutkivat neljän eri PKC-isoformin ( $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$  ja  $\epsilon$ ) villityypin ja dominantin negatiivisen mutantin transgeenin vaikutuksia hypertrofiaan rotan primäärikardiomyosyyteissä. Näistä ainoastaan PKC $\alpha$ :n yliekspressio aiheutti hypertrofisen vasteen kardiomyosyyteissä, ja ainoastaan PKC $\alpha$ :n esto esti hypertrofiaa *in vitro*. PKC $\alpha$ -poistogeenisillä hiirillä *in vivo* hypertrofiavaste oli kuitenkin ennallaan eikä PKC $\alpha$ :n yliekspressio aiheuttanut hiirillä hypertrofiaa (Braz ym. 2004). Sen sijaan PKC $\alpha$ :lla huomattiin olevan vaikutuksia kardiomyosyytien supistuvuuteen, sillä PKC $\alpha$ :n poisto sydänlihassoluissa paransi supistuvuutta ja yliekspressio huononsi sitä. Hiirillä PKC $\alpha$ :n aktivoiminen translokaatiota parantamalla ei myöskään aiheuttanut hypertrofiaa (Hahn ym. 2003).

Bayerin ym. (2003) tutkimuksessa vatsa-aortan koarktaatiolla aiheutetussa LVH:ssa PKC $\alpha$ :n ekspressio ei lisääntynyt rotilla, mutta taudin edetessä sydämen vajaatoimintaan sen ekspressio lisääntyi, ja ekspression lisääntyminen korreloi suoraan vasemman kammion lisääntyneeseen massaansa. PKC $\alpha$ :n ilmenemisen lisääntymistä on havaittu myös ihmisen vajaatoimintaisessa sydämessä (Bowling ym. 1999). Nämä tulokset viittaavat PKC $\alpha$ :n rooliin sydämen vajaatoiminnan kehittymisessä.

Naskar ym. (2014) tutkivat PKC-isoformien ilmenemistä ja fosforylaatiota hiirillä sekä patologisessa että fysiologisessa hypertrofiassa ja huomasivat PKC $\alpha$ :n lisääntyneen ilmenemisen molemmissa malleissa. Sen lisääntynyt fosforylaatio havaittiin kuitenkin ainoastaan fysiologisen hypertrofian mallissa. Lisäksi kun tutkimuksessa estettiin PKC $\alpha$ :n

ilmeneminen fysiologisen hypertrofian mallissa, huomattiin toisen tutkitun PKC-isoformin PKC $\delta$ :n aktivaation lisääntyminen, joka tässä tutkimuksessa oli liitetty patologisen hypertrofian malliin. Tällöin fysiologisen hypertrofian mallin vaste siirtyikin patologisen suuntaan aiheuttaen sydämen toiminnan heikkenemistä. Tämän perusteella lisääntynyt PKC $\alpha$ :n aktivaatio voidaankin liittää hyvänlaatuiseseen fysiologiseen hypertrofiaan.

### **PKC $\beta$ I ja PKC $\beta$ II hypertrofiassa**

PKC $\beta$ I ja PKC $\beta$ II tuotetaan samasta geenistä vaihtoehdoisella silmukoinnilla, ja siksi ne muistuttavat paljon toisiaan. Kuten edellä mainittiin, vaikka aikuisen sydäimestä on löydetty molempia PKC $\beta$ -isoformeja, niiden ekspressio on vähäistä, ja kaikilla tutkimusmenetelmillä niitä ei edes havaita (esim. Goldberg ja Steinberg 1996; Braun ym. 2002). Kaikki tutkimusmenetelmät eivät myöskään erota näitä kahta isoformia toisistaan. Sydämen PKC $\beta$ -isoformien ekspression on havaittu lisääntyneen sydämen vajaatoiminnassa sekä ihmisillä että rotilla (Bowling ym. 1999; Inagaki ym. 2002; Wang ym. 2003; Simonis ym. 2007). PKC $\beta$ -isoformien ekspression on kuitenkin todettu jopa vähentyneen ihmisillä aorttastenoosin aiheuttamassa vasemman kammion hypertrofiassa (Simonis ym. 2007). PKC $\beta$ -isoformien epäillään silti osallistuvan myös hypertrofian kehittymiseen, sillä niiden ekspression on huomattu lisääntyneen vasemman kammion hypertrofiassa rotilla (Gu ja Bishop 1994; Koide ym. 2003). Stebbins ja Mochly-Rosen (2001) tutkivat isoformispesifisten RACK:ien salpauksen vaikutuksia hypertrofiaan vastasyntyneen rotan primäärikardiomyosyyteissä ja huomasivat, että sekä PKC $\beta$ I:n että PKC $\beta$ II:n translokaation spesifinen esto pystyivät estämään forboli-12-myristaatti-13-asetaatilla (PMA) indusoitua hypertrofiaa. Tämä tulos viittaa siihen, että molemmat PKC $\beta$ -isoformit osallistuvat hypertrofian signaalinvälitykseen.

Geneettisten hiirimallien avulla on huomattu, että PKC $\beta$ -ylikekspressio kardiomyosyyteissä aiheuttaa hypertrofiaa hiirillä (Bowman ym. 1997). PKC $\beta$  ei kuitenkaan uskota olevan välttämätön hypertrofian kehittymisessä, sillä PKC $\beta$ -poistogeenisillä hiirillä hypertrofia kehittyi samaan tapaan kuin kontrollihiirillä paineylikuormituksen tai fenyylifriini-

stimulaation seurauksena (Roman ym. 2001; Liu ym. 2009). PKC $\beta$ :n poisto ei myöskään aiheuttanut muutoksia muiden PKC-isoformien ekspressiossa tai jakautumisessa. Näiden tutkimusten perusteella PKC $\beta$ -isoformi on riittävä aiheuttamaan hypertrofiaa hiirillä, mutta se ei ole kuitenkaan välttämätön hypertrofian kehittymisessä. Ihmisillä PKC $\beta$ :n rooli hypertrofiassa ja sydämen vajaatoiminnassa on toistaiseksi tuntematon.

Konventionaalisten PKC:eiden roolia on tutkittu myös kaikkien cPKC:eiden ( $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ ) suhteen poistogeenisillä hiirillä (Liu ym. 2009). Poistogeenisillä hiirillä hypertrofia kehittyi samaan tapaan kuin villityypin hiirillä 2 viikon aortan koarktaation aiheuttaman paineylikuormituksen seurauksena. Tämä tulos viittaa siihen, että cPKC:t eivät ole vastuussa sydämen hypertrofian kehittymisestä.

### **PKC $\delta$ ja PKC $\epsilon$ hypertrofiassa**

Uudenlaisiin PKC:eihin kuuluvien PKC $\delta$ :n ja PKC $\epsilon$ :n ekspression lisääntyminen on liitetty hypertrofiaan monissa tutkimuksissa sekä hiirillä, rotilla että ihmisillä (Gu ja Bishop 1994; Inagaki ym. 2002; Braun ym. 2002; Koide ym. 2003; Simonis ym. 2007; Naskar ym. 2014). Tätä ei ole kuitenkaan havaittu kaikissa tutkimuksissa (Gu ja Bishop 1994; Inagaki ym. 2002). Bayerin ym. (2003) tutkimuksessa rotille aiheutettiin vatsa-aortan koarktaatiolla LVH, joka johti lopulta sydämen vajaatoimintaan viikoilla 16–24. PKC $\delta$ :n ekspressio ei muuttunut LVH:ssa, mutta oli lisääntynyt sydämen vajaatoiminnassa, ja kuten PKC $\alpha$ :n kohdalla ilmenemisen lisääntyminen korreloi suoraan vasemman kammion lisääntyneeseen massaan. Lisäksi PKC $\delta$ :n autofosforylaatio lisääntyi sekä juuri ennen LVH:n kehittymistä että taudin edetessä vajaatoimintaan. Tutkimuksen mukaan PKC $\delta$  voikin olla osallisena sekä LVH:n että sydämen vajaatoiminnan kehittymisen indusoinnissa. PKC $\epsilon$ :n ekspressiossa tai autofosforylaatioissa ei tässä tutkimuksessa havaittu muutoksia.

PKC $\epsilon$ :ia sydämessä yliekspressoivilla hiirillä on havaittu vasemman kammion konsentrista hypertrofiaa, johon liittyi kammion massan suurenemisen lisäksi hypertrofiaan liitettyjen *Acta1*- ja *Myh7*-geenien ekspression lisääntymistä, ilman muutoksia vasemman kammion

toiminnassa (Takeishi ym. 2000). Toisaalta PKC $\epsilon$ -poistogeenisillä hiirillä aortan koarktaation aiheuttama hypertrofia kehittyi samaan tapaan kuin villityypin hiirillä (Klein ym. 2005). Näiden tutkimusten perusteella voitaisiin olettaa, että PKC $\epsilon$  on riittävä hypertrofian aikaansaamiseksi, mutta se ei ole välttämätön.

Toisin kuin PKC $\alpha$ :n, - $\beta$ :n ja - $\epsilon$ :n kohdalla sydämessä PKC $\delta$ :aa yliekspressoivaa eläinmallia ei ole toistaiseksi julkaistu. PKC $\delta$ :n, kuten myös PKC $\epsilon$ :n, aktivaatiota on tutkittu puolestaan  $\psi$ RACK-transgeenisillä hiirillä (Chen ym. 2001).  $\psi$ RACK on peptidi, joka indusoi isoformispesifistä translokaatiota muuttamalla PKC-isoformin sen aktiiviseen ja RACK:iin sitoutuvaan muotoon (Souroujon ja Mochly-Rosen 1998).  $\psi\delta$ RACK-transgeneesillä voidaan siis lisätä PKC $\delta$ :n aktivaatiota vaikuttamatta lainkaan sen ekspression. PKC $\delta$ :n translokaation aktivaatio  $\psi\delta$ RACK:illa lisäsi sydämen massaa ja hypertrofiaan liitetyn *Myh7*-geenin ekspressiota (Chen ym. 2001). Samanlainen vaste havaittiin myös PKC $\epsilon$ :n translokaatiota aktivoivalla  $\psi\epsilon$ RACK:illa (Mochly-Rosen ym. 2000). Muiden hypertrofiaan liitettyjen geenien, kuten *Nppa*:n ja *Acta1*:n, ekspressio ei kuitenkaan lisääntynyt kummankaan isoformin kohdalla (Mochly-Rosen ym. 2000; Chen ym. 2001). Myöskään kardiomyosyyttien koko ei kasvanut, vaan jopa pieneni, ja sydämen massan lisääntyminen olikin enemmän seurausta hyperplasiasta kuin hypertrofiasta. Sen sijaan PKC $\epsilon$ :n translaatiota estävän peptidin  $\epsilon$ V1:n matala ekspressio aiheutti *Acta1*:n ekspression lisääntymisen, kammion seinämän ohenemista ja toiminnan heikkenemistä sekä kardiomyosyyttien koon kasvun (Mochly-Rosen ym. 2000). Korkeampi  $\epsilon$ V1:n ekspressio aiheutti puolestaan kuolemaan johtavan kammion laajentuman. Nämä tulokset viittaavat ainakin PKC $\epsilon$ :n aktivaation olevan välttämätön sydämen normaalille fysiologiselle kasvulle.

Songin ym. (2015) tutkimus vahvistaa, että PKC $\delta$ :n tai PKC $\epsilon$ :n deleetio sydänlihassoluissa ei aiheuta merkittäviä muutoksia sydämen kehitykseen tai toimintaan muuten normaaleilla sikiöillä, aikuisilla, tai paineylikuormitetussa sydämessä verrattuna villityypin hiiriin. Myöskään kun hiirten sydänlihassoluista poistettiin sekä PKC $\delta$ - että PKC $\epsilon$ -isoformit, terveillä hiirillä ei havaittu muutoksia sydämen koossa tai toiminnassa. Sen sijaan paineylikuormituksen seurauksena molempien isoformien suhteen poistogeenisillä hiirillä



sydämen hypertrofiset vasteet, kuten sydämen massan kasvu, supistuskyvyn heikkeneminen, hypertrofinen geeniekspressio ja hypertrofisten signaaliketjujen aktivaatio, olivat merkittävästi voimakkaampia kuin villityypin tai ainoastaan toisen isoformin suhteen poistogeenisillä hiirillä. Geeniekspressiota tutkittaessa havaittiinkin näiden kahden nPKC:n säätelevän sydämessä 90 % samoja geenejä. Tämä viittaa PKC $\delta$ :n ja PKC $\epsilon$ :n päällekkäisiin, hypertrofialta suojaaviin ja sydämen kasvua rajoittaviin rooleihin. Tulos on ristiriidassa yliekspressiomalleilla saatujen tulosten kanssa, mutta Song ym. (2015) selittävät yliekspressiomalleilla saatuja eroavia tuloksia sillä, että voimakas yliekspressio mahdollisesti heikentää kardiomyosyyttien luonnollisia säätelymekanismeja. Yliekspressiomalleissa ei myöskään oteta aina huomioon eri isoformien rinnakkaisia tai päällekkäisiä tehtäviä. Näin ollen yliekspressiomallit eivät anna oikeaa kuvaa eri PKC-isoformien roolista. Mochly-Rosen ym. (2000) puolestaan epäilevät, että eroavat tulokset yliekspressio- ja  $\psi$ RACK-malleissa, johtuvat siitä, että yliekspressiomallit suurentavat PKC-aktiivisuutta jopa 500–1000 %, kun esimerkiksi heidän  $\psi$ RACK-malleissaan PKC-aktiivisuus lisääntyi vain noin 15–20 %, minkä uskotaan olevan lähempänä todellista tilannetta hypertrofiassa.

Kaiken kaikkiaan PKC:illa näyttää olevan merkittävä rooli hypertrofian kehittymisessä, mutta eri isoformien merkitys signaalinvälityksessä on vielä epäselvä. Lisäksi voidaan todeta eri isoformien välillä olevan päällekkäisyyksiä ja riippuvuutta. Uusimmat isoformispesifistä PKC-translokaatiota muokkaavat mallit vaikuttavat lupaavilta eri isoformien roolien selvittämiseksi.

### 2.2.3 Transkriptiotekijöitä

Geeniekspression säätely on tärkeää solujen kasvulle ja erilaistumiselle. Transkriptiotekijät ovat spesifisesti tiettyyn DNA-sekvenssiin sitoutuvia proteiineja, jotka säätelevät transkriptiota ja vastaavat erilaisten signaalien, kuten aiemmin mainittujen hypertrofiasignaalien, aiheuttamista muutoksista geeniekspressiossa. Uskotaan, että monet eri signaalireitit vaikuttavat lopulta samoihin transkriptiotekijöihin, jotka saavat aikaan

hypertrofiset vasteet soluissa (Kohli ym. 2011). Hypertrofiaan liitetetyt transkriptiotekijät voidaan jakaa pro- ja anti-hypertrofisiin transkriptiotekijöihin. Aktivoituneina hypertrofiaa aiheuttaviin eli pro-hypertrofisiin transkriptiotekijöihin kuuluvat GATA4, GATA6, homeobox-proteiini NKX2-5, MEF2, seerumin vastetekijä (engl. serum response factor, SRF), HAND (engl. heart and neural crest derivatives expressed protein), TEAD (engl. TEA domain family member) ja NFAT. Aktivoituneina hypertrofiaa estäviin eli anti-hypertrofisiin transkriptiotekijöihin kuuluvat FoxO (engl. forkhead box O), MITF (engl. microphthalmia-associated transcription factor), YY1 (engl. yin yang 1) ja CHF1/Hey2 (engl. cardiovascular helix-loop-helix factor 1 tai hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2). Seuraavaksi keskitytään muutamaan pro-hypertrofiseen transkriptiotekijään, jotka ovat kokeellisessa osassa tutkittujen yhdisteiden mahdollisia vaikutuskohtia: GATA4 ja homeobox-transkriptiotekijä NKX2-5. Ne ovat sydämen transkriptiotekijöitä, jotka säätelevät kardiomyosyyteille tyypillisiä rakenne- ja säätelyproteiineja koodaavia genejä.

## **GATA4**

GATA-transkriptiotekijät sitoutuvat nimensä mukaisesti DNA-sekvenssiin (A/T)GATA(A/G), joka löytyy monien geenien säätelyalueelta (Ko ja Engel 1993). GATA-perheeseen kuuluu kuusi transkriptiotekijää, joista GATA4, -5 ja -6 ilmentyvät selkärankaisten sydämessä (Molkentin 2000). GATA4 ja -6 ilmentyvät sydänlihaksessa, kun taas GATA5 ilmentyy lähinnä endokardiumissa, eli sydämen sisäkalvossa (Charron ja Nemer 1999). GATA4 ja GATA6 ovat välttämättömiä kardiomyosyyttien erilaistumiselle ja sydämen normaalille kehitykselle (Kuo ym. 1997; Molkentin ym. 1997; Koutsourakis ym. 1999). Lisäksi niiden on havaittu osallistuvan hypertrofian säätelyyn.

GATA4:n ja -6:n ekspresion ja DNA:han sitoutumisen on todettu lisääntyneen paineylikuormituksen seurauksena hiirillä (van Berlo ym. 2013a). Sekä GATA4:n että -6:n yliexpresion on myös todettu aiheuttavan hypertrofiaa sekä *in vitro* kardiomyosyyttiviljelmissä että *in vivo* hiirten sydämissä (Liang ym. 2001a; van Berlo ym. 2013a). GATA4:n ekspresion geneettinen vähentäminen (70 % tai 95 %) hiirten sydämistä

vähensi paineylikuormituksen stimuloimaa sydämen hypertrofiaa 40–50 % ja GATA6:n geneettinen vähentäminen (yli 95 %) puolestaan vähensi paineylikuormituksen, AngII:n ja fenyyliefriinin aikaansaamaa hypertrofiaa (Oka ym. 2006; van Berlo ym. 2013a). Lisäksi niiden geneettinen poisto aiheutti hiirille kammioiden laajenemista ja sydämen vajaatoimintaa. Nämä tulokset viittaavat GATA4:n ja -6:n keskeiseen rooliin sydämen hypertrofiassa.

GATA4 on sydämen hypertrofiaan yleisimmin liitetty transkriptiotekijä. Se säätelee kardiomyosyyteissä monia sarkomeeriproteiineja koodaavia geenejä, kuten *Myh6*:ta, *Myh7*:ää, sydämen troponiineja I:tä ja C:tä sekä myosiinin kevytketjuja 1 ja 3, sekä natriureettisten peptidien *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ekspressiota (Molkentin 2000). Lisäksi se säätelee monia muita proteiineja, kuten AT<sub>1a</sub>-reseptoria, ET-1:tä, sydämen natrium/kalsium-vaihtajaa (*Slc8a1*), kolinergistä muskariinireseptori-2:ta ja A1-adenosiinireseptoria, koodaavia geenejä. Hypertrofiastimulaation seurauksena monien GATA4:n säätelemien geenien ekspressio muuttuu. GATA4:n onkin todettu olevan tärkeä paineylikuormituksen aikaansaamassa *Myh7*:n ja AT<sub>1a</sub>-reseptorin transkription indusoitumisessa (Hasegawa ym. 1997; Herzig ym. 1997). Se välittää myös adrenergisen stimulaation aiheuttamaa *NPPB*:n, *Slc8a1*:n ja ET-1:n ilmentymisen lisääntymistä (Cheng ym. 1999; Morimoto ym. 2000; He ym. 2002).

GATA4:n on huomattu aktivoituvan monen eri hypertrofisen stimulaation, kuten *in vivo* paineylikuormituksen ja  $\alpha$ - ja  $\beta$ -adrenergisen stimulaation sekä *in vitro* kardiomyosyyttien venytyksen,  $\alpha$ -adrenergisen, AngII- ja ET-1-stimulaation, seurauksena (Herzig ym. 1997; Saadane ym. 1999; Suzuki ym. 1999; Morimoto ym. 2000; Liang ym. 2001a; Morin ym. 2001; Pikkarainen ym. 2003; van Berlo ym. 2013a). Hypertrofiset stimulaatiot eivät (välttämättä) lisää GATA4:n ekspressiota. Sen sijaan ne lisäävät GATA4:n aktiivisuutta parantamalla sen DNA:han sitoutumista, jota puolestaan säätelee GATA4:n translaation jälkeinen muokkaus, kuten fosforylaatio, asetylaatio, metylaatio ja SUMOylaatio, sekä proteiinien väliset vuorovaikutukset (Katanasaka ym. 2016).

GATA4:ssä on useita seriinitähteitä, joiden fosforylaatio aktivoi sen sitoutumista DNA:han (Gallagher ym. 2012). Eri seriinitähteiden fosforylaatio aiheuttaa erilaisen transkriptionaalisen aktiivisuuden. Esimerkiksi seriini105:n fosforylaatio on tarpeellinen kardiomyosyytien hypertrofisen transkription aikaansaamiseksi, mutta se ei ole olennainen sydämen kehityksessä. Solunsisäisistä hypertrofian välittäjistä ERK1/2:n sekä p38:n on todettu fosforyloivan GATA4:n seriini105:tä (Morimoto ym. 2000; Charron ym. 2001; Liang ym. 2001b; Kerkelä ym. 2002). Liangin ym. (2001b) tutkimuksessa ERK1/2 fosforyloi GATA4:ää lisäten sen DNA-sitoutumista ja transkriptionaalista aktiivisuutta *in vitro* kardiomyosyyteissä. Lisäksi ERK1/2:ta aktivoivan MAPK-kinaasi 1:n (MAP2K1) farmakologinen inhibitio esti fenyyliefriinin stimuloiman GATA4:n aktiivisuuden lisääntymisen, kun taas p38:n farmakologisella estolla ei havaittu vastaavaa vaikutusta. Sen sijaan Charron ym. (2001) havaitsivat p38:n ja sitä aktivoivan MAPK-kinaasi 6:n (MAP2K6) aktivoivan GATA4:ää. Lisäksi dominantti negatiivinen p38:n muoto esti RhoA-indusoidun GATA4:n aktivoitumisen. Myös Kerkelä ym. (2002) havaitsivat p38:n välittävän ET-1:n stimuloiman GATA4:n aktivaation lisääntymisen. Heidän tutkimuksessaan p38:n farmakologinen esto vähensi GATA4:n sitoutumista *Nppb*-geeniin ET-1-stimulaation jälkeen, kun taas ERK1/2:n inhibitio MAP2K1:n estäjällä ei estänyt ET-1:n aiheuttamaa lisääntynyttä GATA4:n DNA-sitoutumista. Li ym. (2012) puolestaan havaitsivat ERK1/2:n fosforyloivan ribosomaalista S6-kinaasia, joka on myös kykenevä fosforyloimaan ja aktivoimaan GATA4:ää.

MAPK-välitteisen signaloinnin lisäksi GATA4:n säätelijöihin kuuluu muitakin kinaaseja. Kuten edellä todettiin PKC välittää solunsisäisiä hypertrofisia signaaleja aktivoimalla monia signaalinvälittäjiä, mutta PKC:n on todettu myös suoraan fosforyloivan GATA4:ää ja siten lisäävän sen aktiivisuutta (Wang ym. 2005). Histoniasetyylitransferaasi p300 puolestaan asetyloi GATA4:ää ja lisää siten sen DNA-sitoutumista ja transkriptionaalista aktiivisuutta (Takaya ym. 2008). GATA4:n aktiivisuuden negatiivisiin säätelijöihin kuuluu glykogeenisyntaasikinaasi 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), joka lisää GATA4:n kulkeutumista tumasta ulos (Morisco ym. 2001). GATA4:n transkriptionaalista aktiivisuutta säätelee myös sen

vuorovaikutus muiden transkriptiotekijöiden, kuten NKX2-5:n, MEF2:n, SRF:n, NFAT:n ja GATA6:n, kanssa (Kohli ym. 2011).

GATA6 on GATA4:ää vähemmän tutkittu hypertrofiaa säätelevä transkriptiotekijä. Sen on kuitenkin todettu olevan sekä riittävä että välttämätön hypertrofisen geeniekspression säätelijä *in vivo* (van Berlo ym. 2010). Se osallistuu sekä paineylikuormituksen että adrenergisen ja AngII-stimulaation aiheuttaman hypertrofian säätelyyn. GATA6 toimii hypertrofian säätelijänä sekä yksin että yhdessä ainakin GATA4:n kanssa.

### **NKX2-5**

Homeobox-transkriptiotekijä NKX2-5 on sydämen transkriptiotekijä, joka on GATA4:n ja -6:n ohella välttämätön sydämen normaalille kehitykselle. Sen poistaminen johtaa hiirillä alkion sydämen kehityksen häiriintymiseen ja alkion kuolemaan (Lyons ym. 1995). NKX2-5 sitoutuu useisiin DNA-sekvensseihin, joista vahvimmin sen on havaittu sitoutuvan sekvenssiin T(C/T)AAGTG (Chen ja Schwartz 1995). Se osallistuu monien alkion sydämen geenien, kuten *Nppa*:n, *Nppb*:n, *Myl2*:n, *Mef2c*:n ja *Hand1*:n, ekspression säätelyyn (Tanaka ym. 1999). Se säätelee myös aikuisen sydämässä monien hypertrofisten geenien, kuten natriureettisten peptidien ja *Myl2*:n, transkription lisääntymistä (Akazawa ja Komuro 2003). Lisäksi *Nkx2-5*-geeniekspression on todettu lisääntyneen  $\alpha$ - ja  $\beta$ -adrenergisen stimulaation sekä paineylikuormituksen aiheuttamissa sydämen hypertrofioissa (Thompson ym. 1998; Saadane ym. 1999). Sen yliekspressio hiirillä ei kuitenkaan aiheuttanut sydämen hypertrofiaa, vaikka joidenkin hypertrofisten geenien ekspression havaittiin lisääntyneen (Akazawa ja Komuro 2003). NKX2-5 ei siis yksinään kykene aiheuttamaan hypertrofiaa, mutta sen on huomattu osallistuvan hypertrofisten geenien, kuten *Nppa*:n ja *Acta1*:n, transkription säätelyyn yhdessä muiden transkriptiotekijöiden, kuten GATA4:n, HAND2:n, SRF:n ja transkriptioaktivaattori CAMTA2:n (engl. calmodulin binding transcription activator 2), kanssa (Chen ja Schwartz 1996; Shiojima ym. 1999; Thattaliyath 2002; Song ym. 2006).

### 2.3 Vasemman kammion hypertrofian hoito

LVH:n hoito on tärkeää sydän- ja verisuonisairauksien ehkäisemiseksi (Ruilope ja Schmieder 2008). LVH:n regressiolla on monessa tutkimuksessa voitu vähentää sydän- ja verisuonisairauksien aiheuttamia kuolemia sekä sydäninfarktin ja aivoverenkiertohäiriöiden ilmaantumista. LVH:lle ei ole omaa hoitosuositusta ja sen hoito perustuu usein epäillyn syyn mukaiseen hoitoon. Koska LVH on useimmiten liitetty kohonneeseen verenpaineeseen, verenpainelääkitys on tavallinen LVH:n hoito (Kohonnut verenpaine, Käypä hoito -suositus, 2014). Verenpainelääkityksellä on myös verenpaineesta riippumattomia vaikutuksia, joten verenpainelääkehoito voi soveltua myös potilaille, joilla verenpaine on normaali. Lämpävian aiheuttama LVH hoidetaan ensisijaisesti läppäleikkauksella, jossa viallinen läppä korvataan tekoläpällä (Kettunen 2014). Seuraavaksi käsitellään LVH:n hoidossa käytettyjen lääkehoitojen sekä joidenkin lääkkeettömien hoitojen vaikutusta LVH:aan sekä pohditaan uusien lääkeaineiden ja potentiaalisten lääkevaikutuskohteiden mahdollisuuksia LVH:n hoidossa.

#### 2.3.1 Lääkkeiden vaikutus vasemman kammion hypertrofiaan

Verenpainelääkitys on toistaiseksi yleisin ja paras LVH:n hoitomuoto (Kohonnut verenpaine, Käypä hoito -suositus, 2014). Monien kliinisten kokeiden perusteella useat eri verenpainelääkkeet ja niiden yhdistelmät pienentävät vasemman kammion massaa ja seinämien paksuutta. Lisäksi ne parantavat potilaiden ennustetta ja vähentävät riskiä sydän- ja verisuonisairauksien syntymiseen.

Gottdiener ym. (1997) tutkivat vuoden ajan kuuden eri vaikutusmekanismilla toimivan verenpainelääkkeen vaikutusta vasemman kammion massaan hypertensiivisillä LVH:aa sairastavilla miehillä (n=1105). Tutkituista lääkkeistä kaptopriili (ACE:n estäjä), hydroklooritiatsidi (diureetti) ja atenololi ( $\beta_1$ -reseptorin salpaaja) pienensivät vasemman kammion massaa merkitsevästi, kun taas diltiatseemilla (kalsiumkanavan salpaaja), klonidiinilla (keskushermoston  $\alpha_2$ -reseptorin agonisti) ja pratsosiinilla ( $\alpha_1$ -reseptorin salpaaja)

ei ollut vaikutusta vasemman kammion massaan. Vasemman kammion massan muutos ei ollut riippuvainen lääkkeiden verenpainetta alentavasta vaikutuksesta. Tutkimuksesta selviää, että eri verenpainelääkkeillä on erilainen teho LVH:aan riippumatta niiden verenpainetta alentavasta vaikutuksesta. Tutkimus oli kuitenkin vain vuoden mittainen, minkä vuoksi lääkkeiden pitkäaikaisesta tehosta ei saatu tietoa.

LIFE (The Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension) -tutkimuksessa arvioitiin puolestaan losartaanin (AT<sub>1</sub>-reseptorin salpaaja) ja atenololin vaikutusta hypertensiivisten LVH-potilaiden vasemman kammion massaan (Devereux ym. 2004a). Yhteensä 960 potilaasta koostuvan 6 vuoden satunnaistetun ja kaksoissokkoutetun tutkimuksen mukaan losartaani pienensi vasemman kammion massaa merkitsevästi enemmän kuin atenololi. Kuuden vuoden hoito losartaanilla vähensi vasemman kammion massan indeksiä (vasemman kammion massa suhteutettuna kehon pinta-alaan) keskimäärin 21,7 %, kun atenololihoito vähensi sitä 17,7 %. Verenpaineen aleneminen ei eronnut ryhmien välillä, mutta systolisen verenpaineen lasku oli yhteydessä vasemman kammion massan pienenemiseen. Myös AT<sub>1</sub>-reseptorin salpaajaa telmisartaania verrattaessa uuden polven beetasalpaaja karvediloliin huomattiin AT<sub>1</sub>-reseptorin salpaajan vähentävän vasemman kammion massaa tehokkaammin kuin beetasalpaaja (Galzerano ym. 2005).

Tutkimuksista eri verenpainelääkkeiden tehosta LVH:n hoidossa on tehty monta meta-analyysiä. Esimerkiksi Schmiederin ym. (1998) 50 satunnaistetun ja kaksoissokkoutetun kokeen meta-analyysissä tutkittiin yhteensä 1715 hypertensiivisen potilaan aineistosta neljään eri ryhmään kuuluvien verenpainelääkkeiden vaikutusta vasemman kammion massaan. Meta-analyysin perusteella systolinen verenpaine, verenpainelääkityksen kesto ja verenpainelääkeryhmä vaikuttivat vasemman kammion massaan merkitsevästi. Vasemman kammion massa oli sitä pienempi, mitä enemmän systolinen verenpaine aleni ja mitä pidempään hoito kesti. Eri lääkeaineryhmillä oli kuitenkin erilainen vaikutus vasemman kammion massaan, vaikka verenpainetta alentava teho oli samanlainen. ACE:n estäjät pienensivät vasemman kammion massan indeksiä 12 %, kalsiumkanavan salpaajat 11 %, diureetit 8 % ja beetasalpaajat 5 %. ACE:n estäjillä ja kalsiumkanavan salpaajilla saavutettiin

merkitsevästi parempi teho kuin beetasalpaajilla. Myös myöhemmät meta-analyysit mukailevat näitä tuloksia. Esimerkiksi Klingbeilin ym. (2003) 3767 potilaasta koostuvan meta-analyysin mukaan AT<sub>1</sub>-reseptorin salpaajat, kalsiumkanavan salpaajat ja ACE:n estäjät pienensivät vasemman kammion massan indeksiä merkitsevästi enemmän (10–13 %) kuin beetasalpaajat (6 %). Myös Fagardin ym. (2009) meta-analyysin (n=6001) mukaan AT<sub>1</sub>-reseptorin salpaajilla saadaan parempi teho kuin beetasalpaajilla. Edellä esitetyt tulokset viittaavat siihen, että RAS:ia ja kalsiumkanavia estävät lääkeaineet olisivat tehokkaimpia vähentämään vasemman kammion massaa.

Edellä mainituista tutkimuksista ja meta-analyyseistä selviää, että vasemman kammion massaan voidaan vaikuttaa eri verenpainelääkkeillä. Niistä ei kuitenkaan ilmene, mikä vasemman kammion massan vähenemisen merkitys on. Verdecchia ym. (2003) tutkivat meta-analyysissään vasemman kammion massan vähenemisen merkitystä verenpainepotilaiden sydän- ja verisuonitautien (mm. aivoinfarkti, sydäninfarkti, sydämen vajaatoiminta, äkkikuolema) riskiin. Meta-analyysi koostui 4 tutkimuksesta, joihin osallistui yhteensä 1064 potilasta, joiden vasemman kammion massa oli mitattu kaikuttutkimuksella ennen verenpainelääkehoitoa, sen aikana ja sen jälkeen. LVH määritettiin vasemman kammion massan suhteena kehon pinta-alaan. Meta-analyysin perusteella potilailla, joilla verenpainelääkkeet korjasivat LVH:n, riski sairastua sydän- ja verisuonitauteihin pieneni 59 % verrattuna potilaisiin, joilla LVH ei korjaantunut tai ilmaantui uusi LVH. Potilailla, joilla LVH korjaantui, riski ei merkitsevästi eronnut potilaista, joilla ei ollut LVH:aa. LIFE-tutkimuksen 941 potilaan aineistosta tehty analyysi myötäilee edellä mainitun meta-analyysin tuloksia (Devereux ym. 2004b). LVH:n korjaantuminen verenpainelääkityksellä paransi potilaiden ennustetta ja vähensi sydän- ja verisuonitauteihin sairastuvuutta ja kuolleisuutta riippumatta verenpaineen alenemisesta, verenpainelääkkeestä (losartaani tai atenololi) tai muista riskitekijöistä. Nämä tutkimustulokset osoittavat LVH:n hoidon olevan keskeisessä asemassa sydän- ja verisuonisairauksien ehkäisyssä.

Monilla potilailla on verenpaineen lisäksi myös muita sydän- ja verisuonitautien riskitekijöitä, ja useimmat näistä potilaista eivät saavuta tarvittavaa hyötyä yhdestä lääkeaineesta (Artham



ym. 2009). Verenpaineen hoidossa käytetään usein lääkeaineiden yhdistelmää yhden lääkeaineen sijaan. Yhdistelmä-lääkityksen avulla voidaan vaikuttaa verenpaineeseen, ja luultavasti myös LVH:aan, useammalla eri mekanismilla, jolloin lääkituksen vaikutuksen uskotaan voimistuvan. Yhdistelmä-lääkityksen etuna on myös, että yhden lääkeaineen annos voidaan pitää alhaisena, jolloin voidaan monesti vähentää lääkkeiden haittavaikutuksia.

Yhdistelmä- ja monoterapiaa on vertailtu myös LVH:n hoidossa. Esimerkiksi Neutel ym. (2004) vertasivat ACE:n estäjä benatsepriilin ja kalsiumkanavan salpaaja amlodipiinin yhdistelmä- ja monoterapian vaikutusta verenpainepotilaiden vasemman kammion massaan. Amlodipiinin (5 mg) ja benatsepriilin (20 mg) yhdistelmä vähensi vasemman kammion massan indeksiä merkitsevästi enemmän (30 %) kuin amlodipiini (10 mg) yksinään (14 %). Yhdistelmä-lääkitys ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi benatsepriilistä (40 mg; 19 %). Tutkimuksessa tarkasteltiin myös lääkitysten vaikutusta verenpaineeseen. Yhdistelmä-lääkitys alensi verenpainetta merkitsevästi enemmän kuin benatsepriililääkitys, mutta ei eronnut amlodipiinilääkityksestä. Myös Dahlöf ym. (2005) vertasivat yhdistelmä- ja monoterapiaa vaikutusta LVH:aan 525 hypertensiivisellä LVH-potilaalla. He havaitsivat, että ACE:n estäjä perindopriilin ja diureetti indapamidin yhdistelmä vähensi vasemman kammion massan indeksiä merkitsevästi enemmän (14 %) kuin ACE:n estäjä enalapriili yksinään (4 %). Lisäksi verenpaine ja kammion seinämän paksuudet pienenevät enemmän yhdistelmä-lääkityksellä kuin enalapriilillä yksinään. Myös ACE:n estäjä enalapriilin ja aldosteronin estäjä eplerenonin yhdistelmä oli eplerenonin monoterapiaa tehokkaampi LVH:n hoidossa (Pitt ym. 2003). Nämä tulokset viittaavat yhdistelmä-lääkityksen olevan mahdollisesti monoterapiaa tehokkaampi vaihtoehto LVH:n hoidossa.

### 2.3.2 Elintapojen vaikutus vasemman kammion hypertrofiaan

Liebson ym. (1995) tutkimuksen mukaan lääkkeetön ja lääkkeellinen hoito ovat yhtä tehokkaita LVH:n hoidossa. Tutkimuksessa verrattiin viittä verenpainelääkettä: diureettia (klortalidoni), beetasalpaajaa (asebutololi),  $\alpha_1$ -reseptorin salpaajaa (doksatsosiini), kalsiumkanavan salpaajaa (amlodipiini) ja ACE:n estäjää (enalapriili) lumelääkkeeseen

yhteensä 844 lievästi hypertensiivisellä potilaalla. Kaikkiin hoitoihin yhdistettiin myös elintapainterventio, jonka päämääränä oli painonpudotus, suolan ja alkoholin kulutuksen vähentäminen sekä fyysisen aktiivisuuden lisääminen. Potilaiden vasemman kammion massaa seurattiin kaikututkimuksilla 4 vuoden ajan. Neljän vuoden jälkeen vasemman kammion massa oli vähentynyt yhtä paljon lumelääkettä ja verenpainelääkkeitä saaneilla potilailla, lukuun ottamatta klortalidonia, jota saaneiden potilaiden vasemman kammion massa oli pienentynyt hieman enemmän. Verenpainelääkkeiden verenpainetta alentava teho oli kuitenkin lumelääkettä parempi. Ryhmien sisäisissä vertailuissa havaittiin potilaiden painon muutosten, natriuminerityksen ja systolisen verenpaineen korreloivan vasemman kammion massan muutoksiin. Nämä tulokset viittaavat lääkkeettömän elintapahoidon, etenkin painonpudotuksen ja suolan käytön vähentämisen, olevan yhtä tehokas LVH:n hoitomuoto kuin verenpainelääkkeet. Alkoholin kulutuksen vähentäminen ja fyysisen aktiivisuuden lisääminen olivat tutkimuksessa vähäisiä, joten niiden vaikutusta LVH:aan ei pystytty arvioimaan.

Jo vuonna 1988 Schmieder ym. huomasivat, että suolan käyttö korreloi vahvasti vasemman kammion massaan ja rakenteeseen. Runsas natriumin erityys, joka kuvastaa suolan käyttöä, oli yhteydessä kammion seinämän paksuuntumiseen sekä suurentuneeseen vasemman kammion massaan. Jula ja Karanko (1994) tutkivat suolan rajoituksen vaikutuksia vasemman kammion massaan 76:lla lievästi tai kohtalaisesti hypertensiivisellä potilaalla. Kohtalaisen natriumin rajoituksen ( $\leq 70$  mmol/vrk) lisäksi käsittelyryhmän potilaat saivat tarvittaessa ohjeistusta painon pudotukseen ja tyydyttyneiden rasvojen vähentämiseen. Kontrolliryhmä ei saanut minkäänlaista hoitoa tai ohjeistusta. Vuoden tutkimuksen aikana käsittelyryhmän potilaiden vasemman kammion massa väheni 5,4 % ja vasemman kammion massan indeksi 4,7 %, kun kontrolliryhmässä ei havaittu muutoksia. Käsittelyryhmän painonpudotus ja rasvojen vähentäminen eivät selittäneet vasemman kammion massan muutoksia, joten natriumin rajoituksen uskotaan olevan syynä LVH:n pienenemiseen. Tämä tutkimustulos viittaa suolan käytön rajoituksen olevan toimiva LVH:n lääkkeetön hoitomuoto.

Suolan vähentämisen lisäksi painon pudotuksella on todettu olevan LVH:ta vähentävä vaikutus. MacMahonin ym. (1986) 21-viikkoisessa tutkimuksessa ylipainoisten hypertensiivisten potilaiden painon pudotus (keskimäärin 8,3 kg) vähensi vasemman kammion massaa 20 %. Laihduttaneiden vasemman kammion massa pieneni enemmän kuin beetasalpaaja metoprololia tai lumelääkettä saaneiden verrokkien. Myös Mukerjin ym. (2012) tutkimuksessa normotensiivisten ylipainoisten LVH-potilaiden painonpudotuksella (painoindeksin väheneminen keskimäärin 12,4 kg/m<sup>2</sup>) saavutettiin merkittävä vasemman kammion massan indeksin pieneneminen (-29,5 g/m<sup>2.7</sup>). Nämä tulokset viittaavat ylipainon vähentämisen olevan merkittävä LVH:ta vähentävä lääkkeetön hoitomuoto sekä hypertensiivisillä että normotensiivisillä potilailla.

Lääkkeetöntä hoitoa voidaan edellä mainittujen tutkimusten valossa pitää lääkehoitoon rinnastettavana LVH:n hoitomuotona. Etenkin suolan käytön vähentäminen ja laihdutus vaikuttavat tehokkailta lääkkeettömiltä hoidoilta. Näillä hoidoilla on usein myös myönteisiä vaikutuksia muihin sydän- ja verisuonitautien riskitekijöihin, kuten verenpaineeseen ja plasman reniiniaktiivisuuteen.

### 2.3.3 Lääkehoidon uusia mahdollisuuksia

Monissa tutkimuksissa verenpainelääkkeillä on voitu tehokkaasti estää vasemman kammion hypertrofiaa, ainakin kun puhutaan potilaiden keskiarvoista. Monissa tutkimuksissa ei kuitenkaan kerrota hoitoon reagoimattomista potilaista. Verenpainepotilailla verenpainelääkeresistentti on hyvinkin yleistä, kliinisten kokeiden perusteella tehtyjen arvioiden mukaan jopa 20–30 % potilaista ei saa tarvittavaa verenpainetta alentavaa vastetta verenpainelääkityksestä (Calhoun ym. 2008). LVH-hoitoon resistenteistä potilaista ei ole olemassa samanlaisia arvioita, mutta luultavasti osa potilaista on nykyiselle lääkehoidolle resistenttejä. Esimerkiksi LIFE-tutkimuksessa 660 potilaalla todettiin tutkimuksen alkaessa LVH, ja viiden vuoden hoidon jälkeen LVH todettiin yhä 78 potilaalla, eli noin 12 % potilaista LVH ei korjaantunut hoidosta huolimatta (Devereux ym. 2004b). Myös potilailla, jotka reagoivat lääkehoitoon, vaste ei välttämättä ole riittävä ja tauti etenee (van Berlo ym.

2013b). Lisäksi nykyisillä lääkehoidoilla saattaa olla haitallisia vaikutuksia esimerkiksi sydämen supistustoimintaan. Siksi uusia lääkeaineita ja hoitostrategioita tarvitaan. Moniin tunnistettuihin hypertrofiaa välittäviin signaalireitteihin onkin pyritty vaikuttamaan joko uusilla lääkeaineilla tai jo käytössä olevilla toiseen käyttöaiheeseen tarkoitetuilla lääkeaineilla. Käytössä olevien lääkeaineiden etuna on niiden kliinisen turvallisuuden tunteminen. Seuraavaksi esitellään joitakin uusia LVH:n lääkehoidon mahdollisuuksia, keskittyen edellä esiteltyihin hypertrofisiin signaalireitteihin.

Solukalvon GPCR:iin vaikuttavia lääkeaineita, kuten  $AT_1$ -,  $\beta$ - ja  $\alpha$ -reseptorien salpaajia, käytetään paljon LVH:n hoidossa. Näiden reseptorien patologiset vaikutukset ilmenevät pitkään jatkuneen G-proteiinien aktivaation seurauksena (van Berlo ym. 2013b). GPCR:ien aktivaatiota säätelevät G-proteiinikytkentäisten reseptorien kinaasit (GRK).  $\beta$ -adrenergisen reseptorin kinaasin GRK2:n on todettu aktivoivan mm.  $G\beta\gamma$ -alaysikköä ja GRK2:n eston arvellaankin olevan mahdollinen lääkevaikutuksen kohde. Pienmolekyylisen M119:n on todettu estävän GRK2:n ja  $G\beta\gamma$ :n vuorovaikutusta (Casey ym. 2010). M119:lla onkin tehty kokeita sekä *in vitro* sydänlihassoluilla että *in vivo* hiirillä ja sen on havaittu vähentävän hypertrofiaa ja estävän sydämen vajaatoiminnan kehittymistä hiirillä. GRK:iin vaikuttaminen on uusi GPCR:iin vaikuttava strategia, joka vaatii kuitenkin vielä lisää tutkimuksia.

Tavallisesti GPCR:ien on ajateltu välittävän signaalin ainoastaan G-proteiinien välityksellä, mutta uudempien tutkimusten mukaan niiden on havaittu aktivoivan myös muita G-proteiineista riippumattomia signaalireittejä, kuten  $\beta$ -arrestiinia (Ikeda ym. 2015).  $\beta$ -arrestiinilla on todettu olevan hyödyllisiä vaikutuksia kardiomyosyyttien supistustoimintaan ja selvitymiseen. Nykyiset GPCR-salpaajat (mm.  $AT_1$ -salpaajat) estävät G-proteiinien lisäksi  $\beta$ -arrestiinia, joten ne estävät myös mahdollisesti hyödyllisten signaalien etenemistä sydänlihassoluissa. TRV027 on uudenlainen synteettinen  $AT_1$ -reseptorin ligandi, joka estää G-proteiinivälitteisen signaloinnin samalla aktivoiden  $\beta$ -arrestiinin ja sitä seuraavan signaloinnin. TRV027 on tällä hetkellä faasi II:n kliinisissä kokeissa akuutin sydämen

vajaatoiminnan hoitoon. Mikäli kliinisten kokeiden tulokset ovat hyviä, voitaisiin TRV027:n mahdollisuutta myös hypertrofian hoitoon arvioida.

Myös ET-1:n vaikutusten on todettu välittyvän GPCR:n,  $ET_A$ -reseptorin, välityksellä. Keuhkoverenpainetautiin hyväksytyä  $ET_A$ - ja  $ET_B$ -reseptorien estäjä bosentaania on sen vuoksi tutkittu eläinkokeissa hypertrofian ja sydämen vajaatoiminnan hoitoon (Mishima ym. 2000; Iwanaga ym. 2001). Koirilla sen havaittiin estävän mikroembolisaatiolla indusoitua vasemman kammion toiminnan heikkenemistä sekä sen aiheuttamaa LVH:ta (Mishima ym. 2000). Iwanaga ym. (2001) puolestaan vertasivat bosentaania ACE:n estäjä temokapriiliin paineylikuormitetuilla suolaherkillä rotilla. Bosentaani paransi temokapriilin tavoin sydämen toimintaa ja rottien selviytymistä, mutta ei sen sijaan estänyt vasemman kammion hypertrofiaa. Myöskään toinen  $ET_A$ - ja  $ET_B$ -reseptorien estäjä, enrasentaani, ei kyennyt estämään aortan koarktaation aiheuttamaa hypertrofiaa rotilla (Willette ym. 1998). ET-reseptorien potentiaali lääkevaikutuksen kohteena on siis vielä kyseenalainen.

PKC:n on edellä todettu olevan merkittävä hypertrofiaa välittävä proteiinikinaasiperhe. Siksi PKC:n estäjät ovat mahdollinen lääkeaineryhmä LVH:n hoitoon. Staurosporiini on monissa tutkimuksissa käytetty epäspesifinen PKC:n estäjä, joka estää eri PKC-isoformien lisäksi monia muitakin kinaaseja (Ferreira ym. 2011a). Koska eri PKC-isoformeilla on erilaisia rooleja hypertrofiassa, isoformiselektiivisten antagonistien/agonistien kehittäminen on keskeistä. Pienmolekyylinen suun kautta annosteltava ruboksistauriini on selektiivisesti PKC $\beta$ :aa estävä lääkeaine, joka on hyväksytty diabeettisen retinopatian hoitoon (van Berlo ym. 2013b). Sillä on tosin havaittu myös PKC $\alpha$ :aa estävä vaikutus (Liu ym. 2009). Ruboksistauriinia on tutkittu eläinkokeissa myös sydämen hypertrofian ja vajaatoiminnan hoitoon (Liu ym. 2009; Liu ym. 2012). Suuriannoksinen ruboksistauriini esti metoprololin lailla sydämen paineylikuormituksen aiheuttaman sydämen hypertrofian ja paransi sydämen toimintakykyä hiirillä (Liu ym. 2009). Se myös esti täysin 10 viikon paineylikuormituksen aiheuttamat kuolemat hiirillä, toisin kuin metoprololi tai lumelääke. Lisäksi sen on todettu vähentävän streptotsosiinilla indusoitua diabeettista hypertrofiaa ja sydämen toiminnan heikkenemistä rotilla (Liu ym. 2012). Ruboksistauriini on kliinisissä kokeissa todettu

turvalliseksi diabeettisen retinopatian hoidossa, minkä vuoksi sen mahdollisuutta myös LVH:n ja sydämen vajaatoiminnan hoidossa olisi hyvä tutkia lisää.

Eri PKC-isoformeja on pyritty selektiivisesti estämään myös estämällä niiden interaktiota isoformispesifisten RACK:ien kanssa (Ferreira ym. 2011a). Interaktiota on voitu estää selektiivisesti eri RACK:eihin sitoutuvien peptidien avulla. Kuten aiemmin todettiin sekä PKC $\beta$ I:n että PKC $\beta$ II:n isoformispesifisten RACK:ien salpauksella pystyttiin estämään PMA-indusoitua hypertrofiaa kardiomyosyyteissä *in vitro* (Stebbins ja Mochly-Rosen 2001).  $\beta$ IIPKC-spesifinen inhibiittoripeptidi pystyi myös estämään suolaherkkien hypertensiivisten rottien pitkälle edenneen hypertrofian etenemistä sydämen vajaatoimintaan ja paransi näiden rottien selviytymistä (Ferreira ym. 2011b). Myös muiden isoformien, kuten PKC $\epsilon$ :n, translokaatiota parantavia ja estäviä peptidejä on kehitetty. Spesifisti tiettyä PKC-isoformia estävien tai aktivoivien yhdisteiden kehittäminen vaatii vielä lisää tutkimusta liittyen sekä itse yhdisteiden toimintaan että eri PKC-isoformien rooleihin hypertrofiassa.

PKC:n lisäksi myös muut solunsisäiset signaalinvälitysreitit, kuten MAPK:t ja kalmoduliiniriippuvainen kinaasi, ovat mahdollisia lääkevaikutuksen kohteita ja niihin vaikuttavia lääkkeitä on pyritty kehittämään (van Berlo ym. 2013b). Kaikki edellä mainitut signaalinvälitysreitit, niin reseptorit kuin solunsisäiset kinaasit, johtavat kuitenkin lopulta geenitason hypertrofisia muutoksia välittäviin transkriptiotekijöihin. Eri signaalireittien estoa voidaankin pitää epäsuorana transkriptiotekijöihin vaikuttamisena (Kohli ym. 2011). Yhden signaalinvälittäjän esto on kuitenkin transkriptiotekijöiden suhteen epäspesifistä ja sen potentiaalia rajoittaa eri signaalinvälittäjien ja -reittien keskinäinen vuorovaikutus ja päällekkäisyys. Siksi transkriptiotekijöihin suoraan ja selektiivisesti vaikuttaminen on uusi mielenkiintoinen lääkehoidon strategia.

Transkriptiotekijöillä on monia domeeneja, kuten ligandin sitova, dimerisoituva, DNA:han sitoutuva ja aktiivisuutta säätelevä domeeni, joihin voitaisiin vaikuttaa pienmolekyyleillä (Kohli ym. 2011). Mahdollisuuksina olisi estää pro-hypertrofisia transkriptiotekijöitä tai aktivoida anti-hypertrofisia transkriptiotekijöitä. Eräs lähestymistapa on transkriptiotekijöille

spesifisen DNA:n sitoutumispaikan sekvenssin sisältävät “decoy”-oligodeoksinukleotidit (engl. decoy oligodeoxynucleotides, DODN), joiden avulla voidaan sitoa tiettyä transkriptiotekijää ja estää siten sen toimintaa (Mann ja Dzau 2000).

Pikkarainen ym. (2002) tutkivat GATA4-transkriptiotekijän estoa DODN:ien avulla *in vitro* rotan primäärisydänlihassoluissa. Menetelmällä onnistuttiin estämään GATA4:n DNA-sitoutumista ja vähentämään GATA4:n säätelemien natriureettisten peptidien ekspressiota lähtötilanteessa. GATA4:n estäminen DODN:eillä ei kuitenkaan estänyt ET-1- tai fenyylierfiini-stimulaatioiden aikaansaamaa natriureettisten peptidien ekspresion lisääntymistä eikä ET-1:n aiheuttamaa lisääntynyttä sarkomeeriproteiinien tuotantoa. Näin ollen kyseisellä menetelmällä ei pystytty estämään hypertrofisia vasteita kardiomyosyyteissä. Pikkarainen ym. (2002) epäilevätkin, että hypertrofinen stimulaatio saattaa vaikuttaa GATA4:n DNA-sitoutumisen sijaan ennemminkin GATA4:n vuorovaikutukseen muiden transkriptiotekijöiden kanssa. Tämä vuorovaikutus puolestaan johtaa hypertrofisten geenien promoottorien aktivaatioon muiden kuin tyypillisten GATA:n sitoutumiskohtien kautta. Tämä tarkoittaisi, että tyypillisen GATA4:n DNA-sitoutumiskohdan esto ei estä hypertrofiassa aktivoituneen GATA4:n toimintaa. DNA-sitoutumisen eston sijaan hypertrofisten transkriptiotekijöiden vuorovaikutuksen esto saattaisi olla mahdollinen lääkevaikutuksen kohde.

### 3 TUTKIMUKSEN TAVOITE

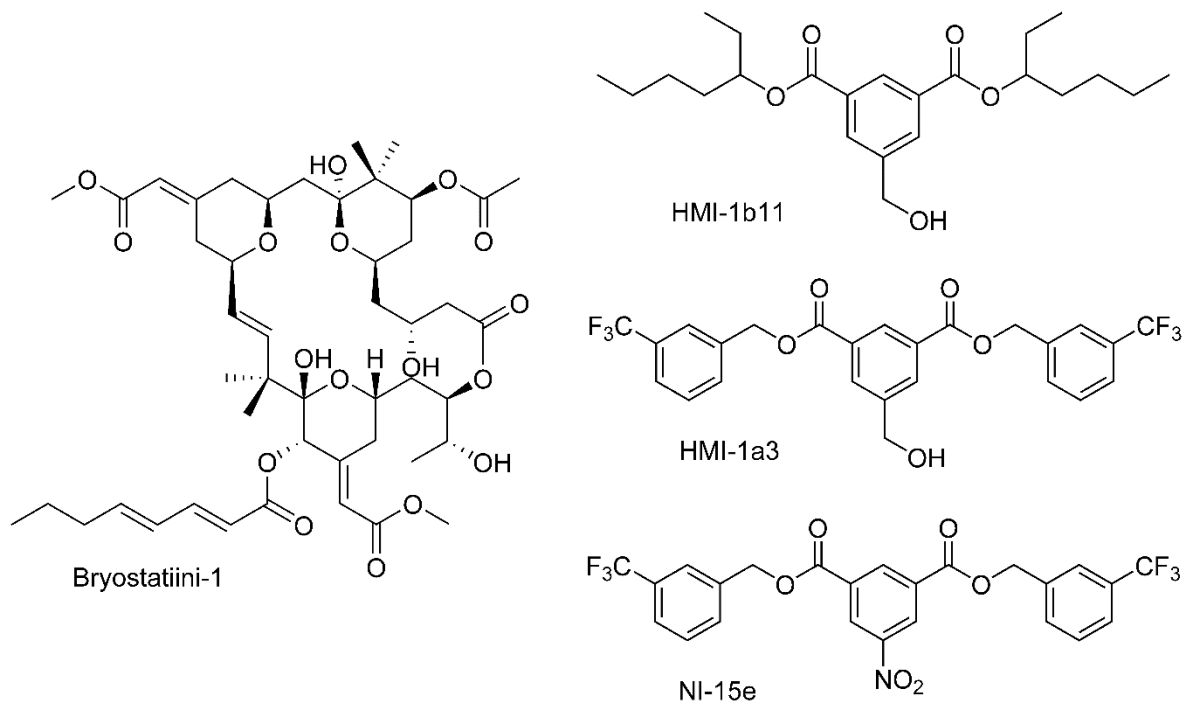
Tämän erikoistyöprojektin tavoitteena oli verrata mekaanisen venytyksen ja ET-1-stimulaation aiheuttamia hypertrofiavasteita H9c2-myoblastisolulinjassa ja primäärikardiomyosyyteissä, ja näin selvittää H9c2-solulinjan mahdollisuutta korvata primäärisydänlihassolut sydämen hypertrofiatutkimuksissa ja lääkeaineiden seulonnassa. Näin voitaisiin helpottaa tutkimusprosessia ja vähentää koe-eläinten käyttöä. Lisäksi tutkimuksen tavoitteena oli selvittää uusien kokeellisten yhdisteiden vaikutuksia solujen

elinkykyyn sekä mekaanisen ja farmakologisen stimulaation aiheuttamiin hypertrofiavasteisiin.

#### 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

##### 4.1 Tutkitut yhdisteet ja muut käytetyt reagenssit

Tutkituista yhdisteistä PKC:hen sitoutuvat HMI-1a3, HMI-1b11 ja NI-15e syntetisoitiin Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnassa, Farmaseuttisen kemian ja teknologian osastolla ja bryostatiini-1 hankittiin Sigma-Aldrichilta (Steinheim, Saksa) (Kuva 4). Sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavista yhdisteistä 3i-1047 ja 3i-1194 syntetisoitiin Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnassa, Farmaseuttisen kemian ja teknologian osastolla, kun taas I-666 hankittiin Pharmatory Ltd:ltä (Oulu, Suomi).



Kuva 4. Tutkittujen PKC:hen sitoutuvien yhdisteiden rakennekaavat.



Soluviljelyssä käytetyt penisilliini-streptomysiiniliuos, lämpöinaktivoitu sikiövasikan seerumi (engl. fetal bovine serum, FBS) ja DMEM/F-12-elatusliuos (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 nutrient mixture; 31330-038) ostettiin Gibco Life Technologiesilta (Paisley, Iso-Britannia). Kollagenaasi 2 hankittiin Worthington Biochemical Corporationilta (Lakewood, New Jersey, Yhdysvallat). Dimetyylisulfoksidi (DMSO), DMEM-elatusliuos (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium), ET-1, insuliini-transferrini-natriumseleniittiliuos (I1884), natriumpyruvaatti, naudan seerumin albumiini (engl. bovine serum albumin, BSA), pankreatiini ja toksisuuskoeksissa käytetyt reagenssit ostettiin Sigma-Aldrichilta. Gelatiini hankittiin Merck Milliporelta (Billerica, Massachusetts, Yhdysvallat).

Immunofluoresenssivärjäyksissä käytetyistä reagensseista primäärivasta-aine anti- $\alpha$ -aktiniini (A7811) hankittiin Sigma-Aldrichilta ja sekundäärivasta-aine Alexa Fluor® 488 anti-mouse (A-11029), Alexa Fluor® 647 falloidiini (A22287) sekä Prolong Gold antifade reagent with DAPI -reagenssi Life Technologiesilta (Eugene, Oregon, Yhdysvallat). RNA-eristyksessä käytetty Nucleospin® RNA -reagenssarja hankittiin Macherey-Nagelilta (Düren, Saksa). Geeniekspression tutkimisessa käytetyt Taqmanin aluke-koetin-seokset *Nppa*:lle (Rn00664637\_g1), *Nppb*:lle (Rn00580641\_m1) ja *Actb*:lle (Mm\_00607939\_s1) hankittiin Life Technologiesilta ja Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit sekä FastStart Universal Probe Master (ROX) Rochelta (Mannheim, Saksa).

#### 4.2 H9c2-soluviljelmät

H9c2-soluja viljeltiin 75 cm<sup>2</sup> ja 175 cm<sup>2</sup> kasvatuspulloissa DMEM-elatusliuoksessa, johon oli lisätty 10 % FBS, 100 U/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Solut jaettiin kaksi kertaa viikossa uusiin pulloihin ja niitä kasvatettiin soluviljelykaapissa 37 °C lämpötilassa, kyllästetyssä ilmankosteudessa ja 5 % CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa.

### 4.3 Primäärikardiomyosyyttiviljelmät

Wistar-rotat dekapitoitiin 1–3 päivän ikäisinä, rintaontelot avattiin ja sydämet irrotettiin maljoille (5–6 sydäntä/malja), joissa oli 5 ml Vornase-puskuria (100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM  $\text{MgSO}_4$  (6  $\text{H}_2\text{O}$ ), 50 mM tauriinia, 20 mM glukoosia, 10 mM 4-2-hydroksietyyli-1-piperatsiinietaanisulfonihappoa (HEPES), pH 6,9), johon oli lisätty 100 U/ml penisilliiniä ja 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomysiiniä. Eteiset poistettiin ja kammiot siirrettiin 5 ml:aan Vornase-puskuria, johon oli lisätty 2 mg/ml kollageenaasi 2:ta, 2 mg/ml pankreatiinia, 100 U/ml penisilliiniä ja 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomysiiniä. Kammiot leikattiin 6–8 osaan ja niiden annettiin hajota tasoravistelijassa (600 rpm) 37 °C lämpötilassa 1–2 tuntia.

Entsyyttisen hajotuksen jälkeen suspensio sentrifugoitiin 160 g 5 minuuttia. Supernatantti poistettiin ja pohjalle jääneet elävät kardiomyosyytit suspensioitiin varovasti kaupalliseen DMEM/Ham's F12 -elatusliuokseen, johon oli lisätty 10 % FBS, 100 U/ml penisilliiniä ja 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomysiiniä. Solususpensio esimaljattiin kardiomyosyyttien rikastamiseksi 10  $\text{cm}^2$  maljalle tai 75  $\text{cm}^2$  tai 175  $\text{cm}^2$  kasvatuspulloon ja inkuboitiin 1–2,5 tuntia soluviljelykaapissa 37 °C lämpötilassa, kyllästetyssä ilmankosteudessa ja 5 %  $\text{CO}_2$ -pitoisuudessa. Esimaljauksen jälkeen maljaa/pulloa heiluteltiin varovasti ja pohjaan tarttumattomat solut, kardiomyosyytit, sisältävä elatusliuos kerättiin talteen. Solut maljattiin haluttuun tiheyteen kokeita varten ja niitä kasvatettiin soluviljelykaapissa samoissa olosuhteissa, joissa esimaljaus tehtiin.

Noin 24 tunnin kuluttua soluille vaihdettiin seerumiton DMEM/F-12-elatusliuos, johon oli lisätty 1 % insuliini-transferrini-natriumseleniittiliuosta (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insuliinia, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  transferriniä, 5 ng/ml seleeniä), 2,8 mM natriumpyruvaattia, 1 % BSA:ta, 0,1 nM trijodityroniinia ( $\text{T}_3$ ), 100 U/ml penisilliiniä ja 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomysiiniä. Kokeet aloitettiin noin 24 tunnin kuluttua seerumittoman elatusliuoksen vaihtamisen jälkeen samassa elatusliuoksessa.

#### 4.4 Sytotoksisuuden tutkiminen

Yhdisteiden sytotoksisuutta ja vaikutusta solujen elinkykyyn tutkittiin laktaattidehydrogenaasitestillä (LDH-testi) ja 3-(4,5-dimetyyli-2-tiatsolyyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromiditestillä (MTT-testi). LDH-testi perustuu solukalvon vaurioitumisen seurauksena solusta vapautuneen laktaattidehydrogenaasin (LDH) aktiivisuuden määrittämiseen (Fotakis ja Timbrell 2006). LDH on entsyymi, joka katalysoi laktaatin ja pyruvaatin hapetus- ja pelkistysreaktiota (samalla pelkistäen tai hapettaen  $\beta$ -nikotiiniamidiadeniinukleotidia). MTT-testi perustuu elävien solujen kykyyn pelkistää tetratsoliumsuola formatsaaniksi, joka kiteytyy solujen sisään ja joka voidaan havaita absorbanssimittauksilla. MTT-testillä mitataan siis solujen metaboliakykyä ja sytotoksisuus voidaan havaita jo ennen solukalvon vaurioitumista.

Sytotoksisuuskokeita varten primäärikardiomyosyyttejä ( $4 \times 10^5$  solua/kuoppa) ja H9c2-soluja ( $3\text{--}5 \times 10^4$  solua/kuoppa) maljattiin 96-kuoppalevyille. Maljauksen jälkeen H9c2-solujen annettiin kasvaa kuoppalevyillä noin 24 tuntia ja primäärikardiomyosyyttien noin 48 tuntia, minkä jälkeen ne altistettiin tutkittaville yhdisteille neljällä eri pitoisuudella. Vuorokauden altistusten jälkeen suoritettiin sytotoksisuustestit.

Maksimaalisen LDH:n vapautumisen määrittämiseksi osa soluista hajotettiin lisäämällä niiden kuoppien elatusliuokseen 0,9 % Triton X-100 -liuosta, jonka annettiin vaikuttaa 45 minuuttia. Sen jälkeen jokaisesta kuopasta siirrettiin 50  $\mu$ l elatusliuosta uudelle 96-kuoppalevyille ja kuoppiin lisättiin 50  $\mu$ l LDH-substraattiliuosta, jossa oli 1,3 mM  $\beta$ -nikotiiniamidiadeniinukleotidia, 660  $\mu$ M jodonitrotetratsoliumia, 54 mM L-(+)-maitohappoa ja 280  $\mu$ M fenatsiinimetosulfaattia 0,2 M Tris-HCl -puskuriliuoksessa (pH 8,0). Levyä ravisteltiin 400 rpm 10 minuuttia, jonka jälkeen sen annettiin olla huoneenlämmössä vielä 20 minuuttia. Formatsaanin muodostumisreaktio lopetettiin lisäämällä kuoppiin 50  $\mu$ l 1 M etikkahappoa, minkä jälkeen kuopista mitattiin absorbanssi aallonpituudella 490 nm Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter -laitteella (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat). LDH:n vapautumista kuvaavista absorbanssiarvoista vähennettiin ensin

käsitlemättömien solujen spontaani LDH:n vapautuminen, minkä jälkeen sytotoksisuusprosentti laskettiin suhteuttamalla arvot maksimaaliseen vapautumiseen.

MTT-testissä 96-kuoppalevyille maljattujen solujen elatusliuokseen lisättiin HBSS:ään (engl. Hank's Balanced Salt Solution) valmistettua MTT-liuosta niin, että lopullinen MTT-pitoisuus oli 0,5 mg/ml, minkä jälkeen soluja pidettiin soluviljelykaapissa 2–3 tuntia. Sen jälkeen kuopista poistettiin elatusliuos ja jokaisen kuopan pohjalle jääneet kiteet liuotettiin 200 µl:aan DMSO:a. Absorbanssi mitattiin Bio-Radin levylukijalla (Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat) aallonpituudella 550 nm vähentäen siitä 650 nm:n absorbanssi taustana. Solujen elinkyisyys laskettiin suhteuttamalla formatsaanin määrää kuvaava absorbanssilukema käsitlemättömiä soluja sisältäneiden kontrollikaivojen lukemiin.

#### 4.5 Hypertrofiastimulaatiot ja yhdistealtistukset

Hypertrofisen vasteen aikaansaamiseksi kardiomyosyytit altistettiin joko ET-1:lle tai mekaaniselle venytykselle. Immunofluoresenssivärjäyksiä varten solut altistettiin 100 nM ET-1:lle 48 tunniksi, mitä varten primäärikardiomyosyytit maljattiin ( $2 \times 10^5$  solua/kuoppa) gelatinoitujen peitinlasien päälle 24-kuoppalevyille ja H9c2-solut ( $10^4$  solua/kuoppa) gelatinoitujen peitinlasien päälle 12-kuoppalevyille. Geeniekspression määrittystä varten primäärikardiomyosyytit altistettiin 100 nM ET-1:lle 4 ja 24 tunniksi, mitä varten niitä maljattiin 6-kuoppalevyille ( $8\text{--}10 \times 10^5$  solua/kuoppa). Primäärikardiomyosyyttien annettiin kasvaa kuoppalevyillä noin 48 tuntia ja H9c2-solujen noin 24 tuntia, minkä jälkeen ne altistettiin 10 µM pitoisuudella yhdisteille I-666, 3i-1047, 3i-1194, HMI-1a3, HMI-1b11 ja NI-15e sekä 10 nM bryostatiini-1:lle ja kontrolliksi 0,1 % DMSO:lle, jota käytettiin tutkittavien yhdisteiden liuottimena. Noin 15–20 minuuttia yhdisteiden lisäämisen jälkeen altistusliuoksiin lisättiin ET-1:tä niin, että lopullinen pitoisuus oli 100 nM. Kontrollikaivoihin lisättiin saman verran ET-1:n liuottimena käytettyä DMEM:iä, jossa oli 1 % BSA:ta. Altistuksia jatkettiin 4, 24 tai 48 tuntia, ja jokaisesta kokeesta tehtiin kolme toistoa.

Venytyskoetta varten primäärikardiomyosyyttejä ( $10^6$  solua/kuoppa) ja H9c2-soluja ( $7,5-10 \times 10^4$  solua/kuoppa) maljattiin kollageeni I -päälystetyille joustavapohjaisille 6-kuoppalevyille (Bioflex Collagen I, Flexcell International Corp, Burlington, Pohjois-Carolina, Yhdysvallat). Primäärikardiomyosyyttien annettiin kasvaa venytysmaljoilla noin 48 tuntia ja H9c2-solujen noin 24 tuntia, minkä jälkeen ne altistettiin yhdisteille I-666, 3i-1047, 3i-1194, HMI-1a3, HMI-1b11 ja NI-15e pitoisuudella  $10 \mu\text{M}$ , bryostatiini-1:lle pitoisuudella  $10 \text{ nM}$  ja kontrolliksi  $0,1 \%$  DMSO:lle. Noin 15 minuuttia yhdisteiden lisäämisen jälkeen solut altistettiin  $10-20 \%$  syklistelle venytykselle  $0,5 \text{ Hz}$  taajuudella Flexcell FX-5000 -laitteistolla (Flexcell International Corp). Kontrollisoluja kasvatettiin samaan aikaan samoilla venytysmaljoilla ilman venytystä. Venytystä jatkettiin 48 tuntia ja kokeista tehtiin kolme toistoa.

#### 4.6 Immunofluoresenssivärjäys ja solujen pinta-alan määrittäminen

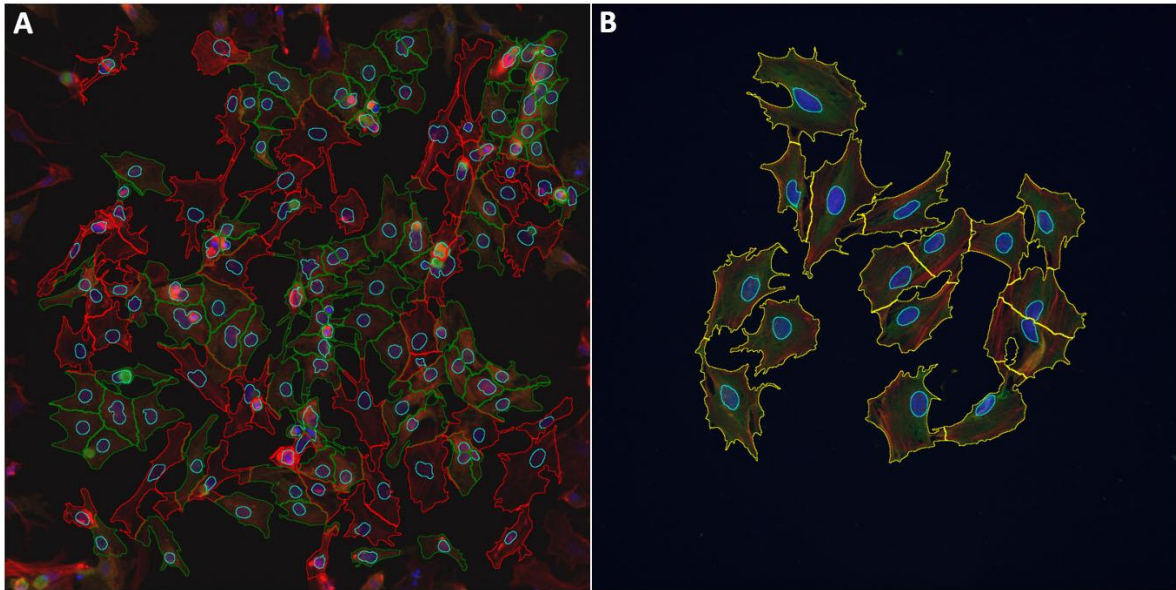
Neljänkymmenen kahdeksan tunnin venytyksen tai ET-1-altistuksen jälkeen solut pestiin kaksi kertaa fosfaattipuskuroidulla keittosuolaliuoksella (engl. phosphate buffered saline, PBS), fiksoitiin  $4 \%$  paraformaldehydillä 20 minuuttia ja pestiin jälleen kahdesti PBS:llä, jossa ne säilytettiin jääkaapissa  $4-8 \text{ }^\circ\text{C}$  lämpötilassa. Sen jälkeen venytysmaljojen kaivojen pohjista leikattiin keskeltä  $10-15 \text{ mm} \times 10-15 \text{ mm}$  kokoiset neliön muotoiset kalvopalat. Kalvopalat ja peitinlasit pestiin kahdesti 10 minuuttia Dulbeccon PBS:llä, johon on lisätty  $0,2 \%$  BSA:ta (Dulbecco-BSA). Solukalvot tehtiin läpäiseviksi pitämällä näytteitä PBS:ään tehdyssä  $0,1 \%$  Triton X-100 -liuoksessa 10 minuuttia, minkä jälkeen ne pestiin jälleen kahdesti 10 minuuttia Dulbecco-BSA:lla.

Primäärikardiomyosyyttejä inkuboitiin Dulbecco-BSA:han valmistetussa hiiren  $\alpha$ -aktiniinivasta-aineessa  $1:800$  laimennoksessa ja H9c2-soluja samassa vasta-aineessa  $1:200$  laimennoksessa huoneenlämmössä 60 minuuttia, minkä jälkeen näytteet pestiin Dulbecco-BSA:lla kolme kertaa 10 minuuttia. Sen jälkeen näytteitä pidettiin sekundäärivasta-aineliuoksessa kosteassa ja pimeässä kammiossa 45 minuuttia. Sekundäärivasta-aineliuos sisälsi fluoresoivalla Alexa Fluor 488 -leimalla konjugoitua hiirtä vastaan tuotettua vasta-

ainetta 1:200 sekä Alexa Fluor 647 -leimalla konjugoitua falloidiinia 1:140 Dulbecco-BSA:ssa. Sekundäärivasta-aineinkubaation jälkeen kalvot ja peitinlasit pestiin vielä kolmesti Dulbecco-BSA:lla 10 minuuttia ja kiinnitettiin objektilaseille 4',6-diamidino-2-fenyyli-indolia (DAPI) sisältävällä Prolong Gold -reagenssilla. Näytteiden annettiin kuivua yön yli huoneenlämmössä valolta suojassa, minkä jälkeen ne siirrettiin 4–8 °C lämpötilaan.

Kaikista näytteistä otettiin vähintään 6 kuvaa Leica DM6000B -fluoresenssimikroskooppiin (Leica Microsystems, Wetzlar, Saksa) kiinnitetyllä Hamamatsu-Flash4-kameralla (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japani) 20x/0.7 HC PL APO CS2 -objektiivillä ja Leica Application Suite X -ohjelmistoa (Leica Microsystems, Wetzlar, Saksa) käyttäen. Valotusajat säädettiin sekundäärivasta-ainekontrollin avulla ja ne olivat vakiot kaikille yhden kokeen näytteille.

Kuvista mitattiin solujen pinta-ala CellProfiler-ohjelmistolla (Carpenter ym. 2006, Broad Institute, saatavilla internetistä <http://cellprofiler.org/>) tehtyjen analyysiprotokollien avulla. Molemmille solutyypeille luotiin oma protokolla, jonka parametrejä hienosäädettiin optimaalisen tunnistuksen saavuttamiseksi kullekin kokeelle erikseen. Molemmissa protokollissa kuvista paikannettiin ensin sinistä fluoresoivat tumat (DAPI). Sen jälkeen ohjelma yhdisti vihreän fluoresenssin ( $\alpha$ -aktiniini) ja punaisen fluoresenssin (falloidiinin värjäämä F-aktiini) samaan kuvaan, jonka avulla se määrittäi solujen rajat tumien ympärille. H9c2-soluille luodussa protokollassa ohjelma mittasi solujen pinta-alat näin tunnistettujen solujen rajojen avulla (Kuva 5B). Primäärikardiomyosyyteille luodussa protokollassa ohjelma valitsi pinta-ala-analyysiin vain ne solut, joissa oli vihreää fluoresenssia (kardiomyosyytit), ja ainoastaan punaista fluoresoivat solut (ei-kardiomyosyytit) jätettiin analysoimatta (Kuva 5A). Analyysiin käytettiin jokaisesta näytteestä 5–16 kuvaa (vähintään 100 solua), joista laskettiin solujen pinta-alojen keskiarvo. Jokaisen näytteen keskiarvo suhteutettiin saman kokeen kontrollinäytteen (DMSO 0,1 %) keskiarvoon, ja kolmen riippumattoman kokeen arvoista laskettiin keskiarvot.



Kuva 5. Esimerkit CellProfiler-ohjelman tekemistä primäärikardiomyosyyttien (A) ja H9c2-solujen (B) tumien ja solujen tunnistuksesta. Tumien rajat on piirretty sinisellä. Primäärikardiomyosyyteiksi luokiteltujen solujen rajat on piirretty vihreällä ja ei-kardiomyosyyteiksi luokiteltujen solujen rajat punaisella. H9c2-solujen rajat on piirretty keltaisella.

#### 4.7 Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio ja geeniekspression määrittäminen

Kvantitatiivista polymeraasiketjureaktiota (engl. quantitative polymerase chain reaction, qPCR) varten 4 ja 24 tunnin ET-1-altistusten jälkeen solut homogenisoitiin ja RNA eristettiin käyttäen NucleoSpin RNA -reagenssisarjaa valmistajan (Macherey-Nagel) ohjeiden mukaisesti. Solut pestiin kerran PBS:llä, minkä jälkeen kuoppiin lisättiin 350 µl eristyssarjan homogenisointipuskuria, johon oli lisätty 1 % β-merkaptoetanolonia, ja solut raaputettiin irti pohjasta. Soluhomogenaatit suodatettiin NucleoSpin Filter -kolonnin avulla sentrifugoiden 11 000 g 1 minuutin ajan. RNA ja proteiini eroteltiin NucleoSpin RNA/Protein -kolonnin avulla sentrifugoiden 11 000 g 30 sekuntia. Kolonnin membraanista poistettiin suola siihen tarkoitetulla puskurilla ja näytteiden mahdollisesti sisältämä DNA hajotettiin rDNAasin avulla, minkä jälkeen näytteet pestiin ja RNA eluoiittiin kolonnista 60 µl:aan RNAasitonta vettä sentrifugoimalla 11 000 g 1 minuutin ajan. Lopuksi näytteet pakastettiin -80 °C:een.

RNA-näytteiden puhtaus ja RNA-pitoisuus määritettiin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific). Käänteistranskriptaasi-PCR:n (engl. Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) avulla 500 ng:sta RNA:ta syntetisoitiin cDNA:ta käyttäen Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit:iä ja siihen kuuluvia satunnaisia heksameerialukkeita valmistajan (Roche) ohjeiden mukaisesti MJ Mini Personal thermal cyclers -laitteella (Bio-Rad). Ohjelma koostui 10 minuutin inkubaatiosta 25 °C:ssa ja 60 minuutin inkubaatiosta 50 °C:ssa, jota seurasi 5 minuutin käänteistranskriptaasin inaktivaatio 85 °C:ssa. Lopuksi syntyneet cDNA:t pakastettiin -20 °C:een ennen qPCR:ta.

qPCR suoritettiin 384-kuoppalevyillä käyttäen TaqManin kaupallisia aluke-koetinseoksia ANP:tä koodavalle *Nppa*:lle (FAM-fluorofori), BNP:tä koodaavalle *Nppb*:lle (FAM-fluorofori) ja  $\beta$ -aktiinia koodaavalle *Actb*:lle (VIC-fluorofori) sekä Rochen FastStart Universal Probe Master (ROX) -reagenssia valmistajien ohjeiden mukaisesti. Reagensseja sekoitettiin valmistajien ohjeiden mukaiset pitoisuudet, jonka jälkeen seokseen lisättiin 10 % RT-PCR:ssa syntetisoidusta cDNA:sta. cDNA monistettiin LightCycler® 480 Real-Time PCR System -laitteella (Roche) käyttäen ohjelmaa, joka sisälsi 10 minuutin DNA-polymeraasin aktivaation 95 °C:ssa sekä 40 monistussykliä. Yksi monistussykli koostui 15 sekunnin DNA:n denaturaatiovaiheesta 95 °C:ssa ja sitä seuraavasta 1 minuutin alukkeiden liittymis- ja elongaatiovaiheesta 60 °C:ssa. Fluoroforien eksitaatio aallonpituuksilla 483 nm (FAM) ja 523 nm (VIC) sekä emission kvantifikaatio aallonpituuksilla 533 nm (FAM) ja 568 nm (VIC) tapahtui jokaisen monistussyklin lopussa.

LightCycler® 480 -laitteisto määrittäi fluoresenssisignaalin kynnystason, jonka perusteella saatiin jokaisen näytteen kolmelle tutkitulle geenille Ct-arvo eli kynnysyksi (engl. cycle threshold), joka kuvaa fluoresenssisignaalin kynnystason ylittymiseen tarvittujen monistuskierrosten määrää. Tulokset analysoitiin  $\Delta\Delta C_t$ -menetelmällä suhteuttamalla tutkittavien geenien (*Nppa* ja *Nppb*) Ct-arvot saman näytteen referenssigeenin (*Actb*) Ct-arvoon ja normalisoimalla tulokset DMSO-kontrollinäytteeseen. Kolmen riippumattoman kokeen tuloksista laskettiin keskiarvot.



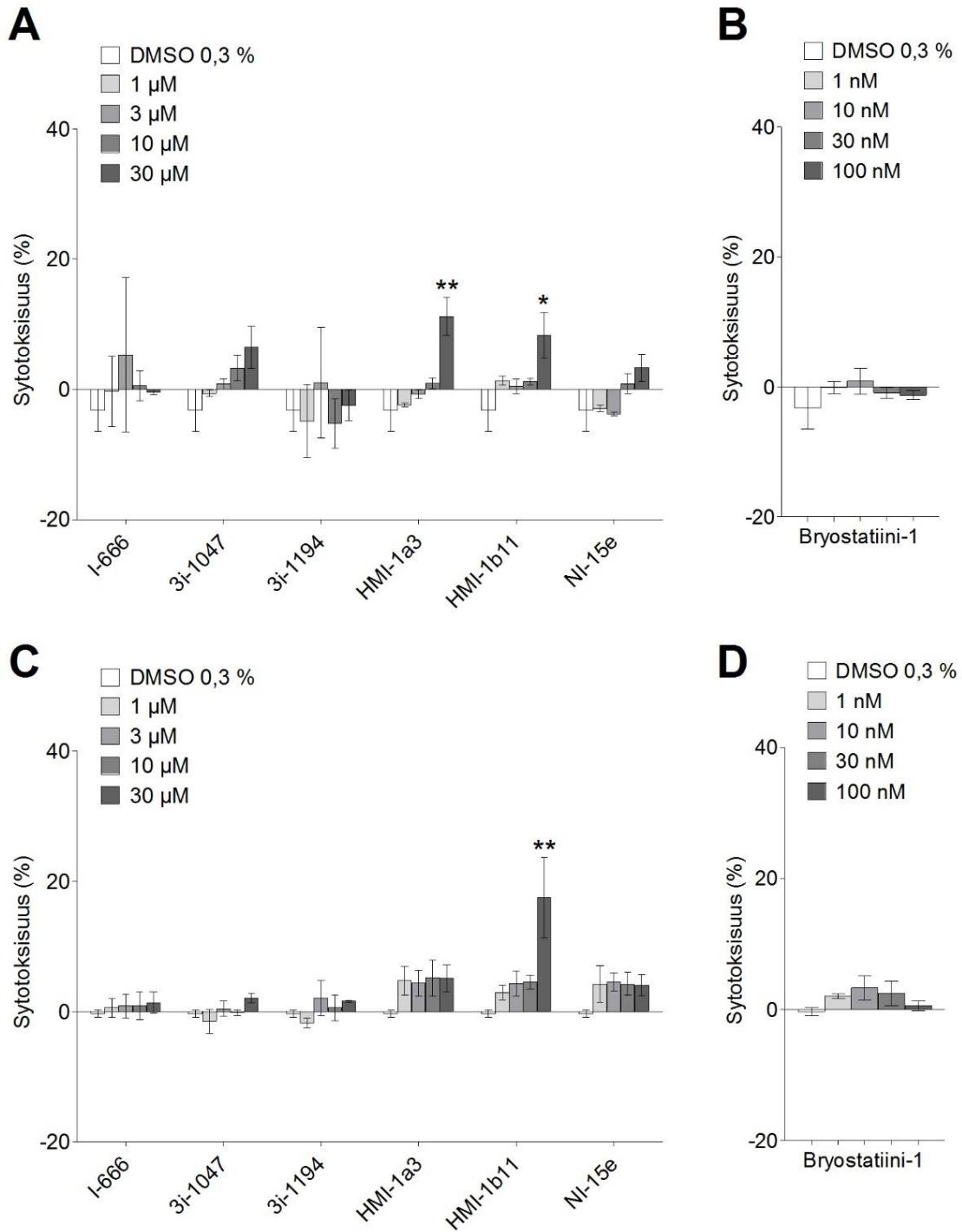
## 4.8 Tilastollinen analyysi

Tilastolliset analyysit suoritettiin SPSS statistics 24 -ohjelmalla (SPSS, Chicago, Illinois, Yhdysvallat). Toksisuuskokeiden tulokset analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja jatkotestinä käytettiin Tukey HSD -testiä. Pinta-alojen ja qPCR-tulosten analyysissä käytettiin paritonta T-testiä jokaisen yhdisteen kohdalla verrattaessa hypertrofiastimulaation saaneita soluja stimuloimattomiin soluihin. Lisäksi yhdistekäsittelyjä verrattiin DMSO-kontrolliin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukey HSD -jatkotestillä. Tilastollinen merkitsevyys hyväksyttiin, kun  $p < 0,05$ . Tulokset on esitetty vähintään kolmen riippumattoman kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä (engl. standard error of the mean, SEM).

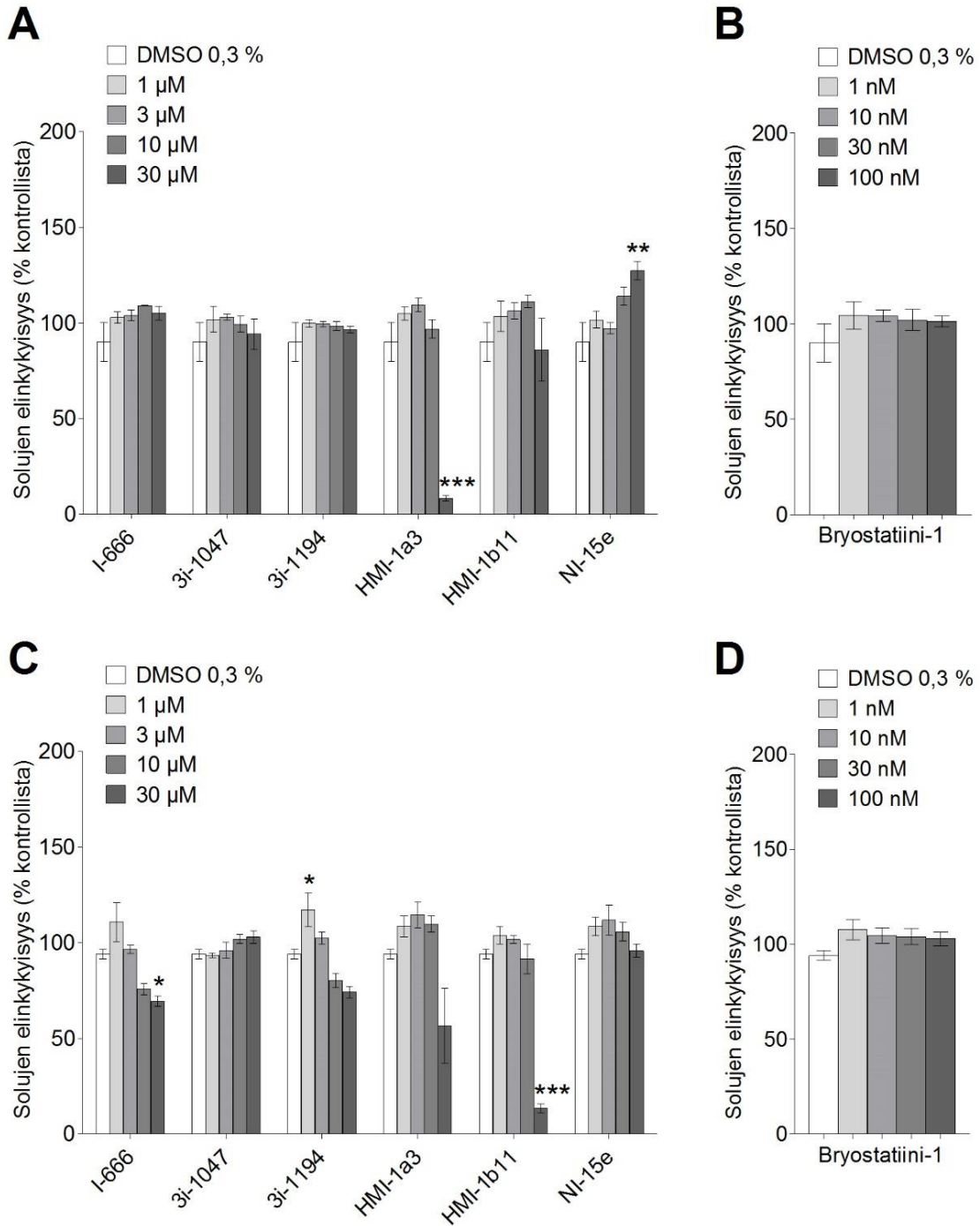
## 5 TULOKSET

### 5.1 Yhdisteiden vaikutus sydänlihassolujen elinkykyyn

Tutkittujen yhdisteiden vaikutukset solujen elinkykyyn 24 tunnin altistuksen jälkeen olivat erilaiset primäärrikardiomyosyyteissä ja H9c2-soluissa. LDH-testillä mitattuna yhdisteiden toksisuus oli vähäistä (alle 20 %) (Kuva 6). Primäärrikardiomyosyyteissä ainoastaan HMI-1a3 30  $\mu\text{M}$ :n pitoisuudella oli MTT-testillä mitattuna toksinen (Kuva 7). Se laski primäärrikardiomyosyytien elinkykyisyyttä 82 % ( $p < 0,001$ ; yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -testi). Muut HMI-1a3:n pitoisuudet eivät laskeneet elinkykyisyyttä eikä annosvastetta ollut havaittavissa. Muilla yhdisteillä ei havaittu merkitsevää sytotoksisuutta primäärrikardiomyosyyteissä. Sen sijaan NI-15e 30  $\mu\text{M}$  pitoisuudella näytti lisäävän primäärrikardiomyosyytien metabolia-aktiivisuutta 37 % ( $p = 0,009$ ) MTT-testillä mitattuna.



Kuva 6. LDH-testillä mitattu yhdisteiden aiheuttama sytotoksisuus primäärikardiomyosyyteissä (A ja B; n=3) ja H9c2-soluissa (C ja D; n=4) 24 tunnin altistuksen jälkeen (keskiarvo  $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$  vs. DMSO 0,3 %, \*\*  $p < 0,01$  vs. DMSO 0,3 % (yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -testi).



Kuva 7. MTT-testillä mitattu yhdisteiden vaikutus primäärikardiomyosyyttien (A ja B; n=3) ja H9c2-solujen (C ja D; n=4) elinkykyyn 24 tunnin altistuksen jälkeen. Tulokset on esitetty käsittelemättömiin soluihin normalisoitujen kokeiden keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä. \*  $p < 0,05$  vs. DMSO 0,3 %, \*\*  $p < 0,01$  vs. DMSO 0,3 %, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. DMSO 0,3 % (yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -testi).

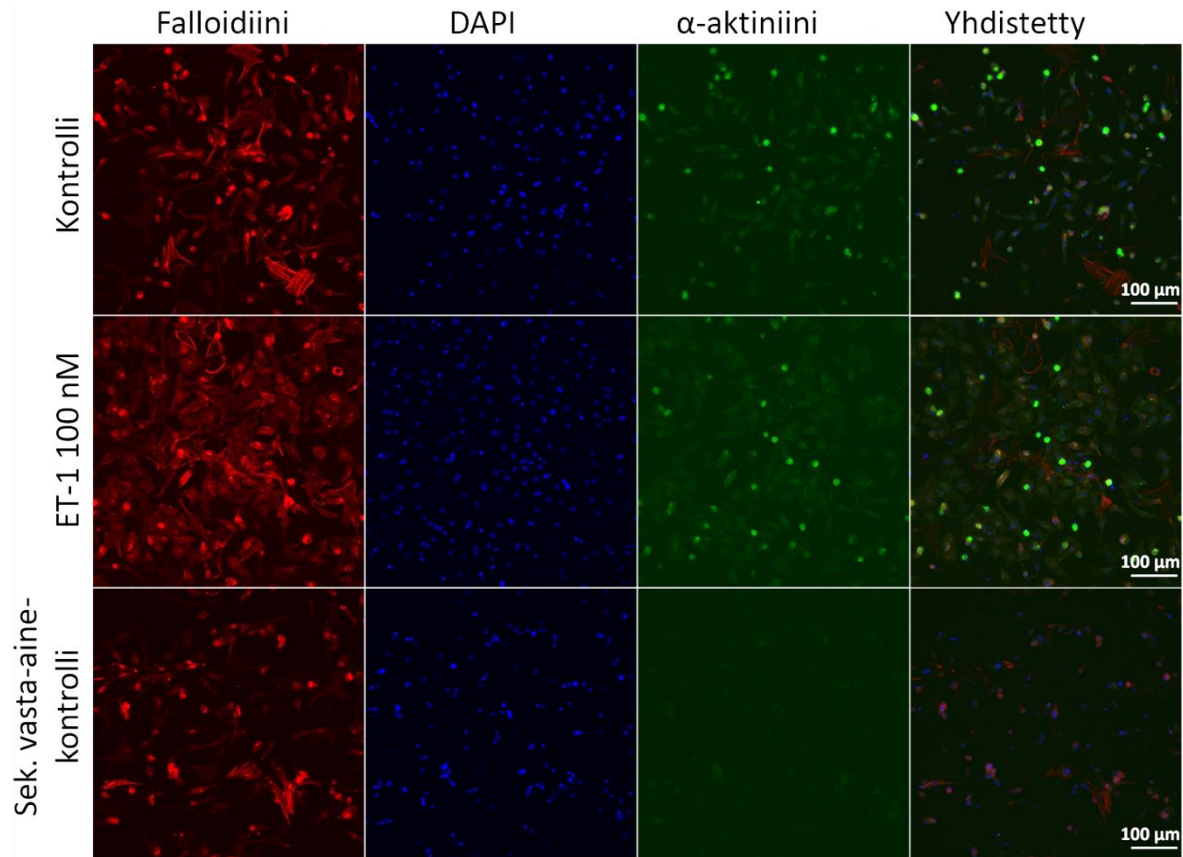
H9c2-soluissa HMI-1b11 30  $\mu$ M pitoisuudella oli ainoa käsittely, jolla havaittiin toksisuutta molemmilla testeillä. LDH-testissä sen aiheuttama sytotoksisuus oli kuitenkin vain 18 % ( $p=0,006$ ) (Kuva 6C), kun taas MTT-testissä se vähensi solujen elinkykyisyyttä jopa 81 % ( $p<0,001$ ) (Kuva 7C). Muilla tutkituilla yhdisteillä tai pienemmillä HMI-1b11:n pitoisuuksilla ei havaittu lainkaan merkitsevää toksisuutta LDH-testissä. MTT-testissä puolestaan HMI-1b11:n lisäksi H9c2-solujen elinkykyisyyttä vähensi myös I-666. Se näytti laskevan elinkykyisyyttä konsentraatiovasteisesti ja 30  $\mu$ M pitoisuudella metabolia-aktiivisuus laski tilastollisesti merkitsevästi 25 % ( $p=0,028$ ). Muilla yhdisteillä ei havaittu MTT-testissä merkitsevää elinkykyisyyden vähenemistä. Sitä vastoin 1  $\mu$ M pitoisuudella 3i-1194 lisäsi H9c2-solujen metabolia-aktiivisuutta 23 % ( $p=0,027$ ). Suuremmilla pitoisuuksilla elinkykyisyys näytti kuitenkin laskevan konsentraatiovasteisesti, vaikka erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

## 5.2 Hypertrofiastimulaatioiden ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus sydänlihassolujen pinta-alaan ja morfologiaan

### 5.2.1 Endoteliini-1:n ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus primäärisydänlihassolujen pinta-alaan ja morfologiaan

ET-1:llä 48 tuntia stimuloitujen primäärisydänlihassolujen pinta-ala oli keskimäärin 35 % suurempi kuin stimuloimattomien solujen pinta-ala ( $p=0,046$ , pariton t-testi) (Kuvat 8 ja 9). I-666-käsitellyt solut ilman ET-1-stimulaatiota olivat pinta-alaltaan 35 % pienempiä kuin DMSO-käsitellyt solut ( $p=0,025$ ; yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -testi). Tämä pienentyminen näyttää johtuvan solujen pyöristymisestä (Kuva 10). ET-1-käsittelyn jälkeen yhtä selkeää pyöristymistä ei ollut havaittavissa, eikä myöskään pinta-ala eronnut merkitsevästi DMSO-käsiteltyjen solujen pinta-alasta. Muilla transkriptiotekijöihin vaikuttavilla yhdisteillä yksinään ei ollut merkittävää vaikutusta solujen pinta-alaan eikä niillä havaittu vaikutuksia solujen morfologiaan. Sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavat yhdisteet eivät estäneet ET-1:n vaikutusta solujen pinta-alaan. Sen sijaan ne jopa näyttivät tehostavan ET-1:n vaikutusta solujen pinta-alaan (Kuva 9A). Yhdistealtistusten seurauksena

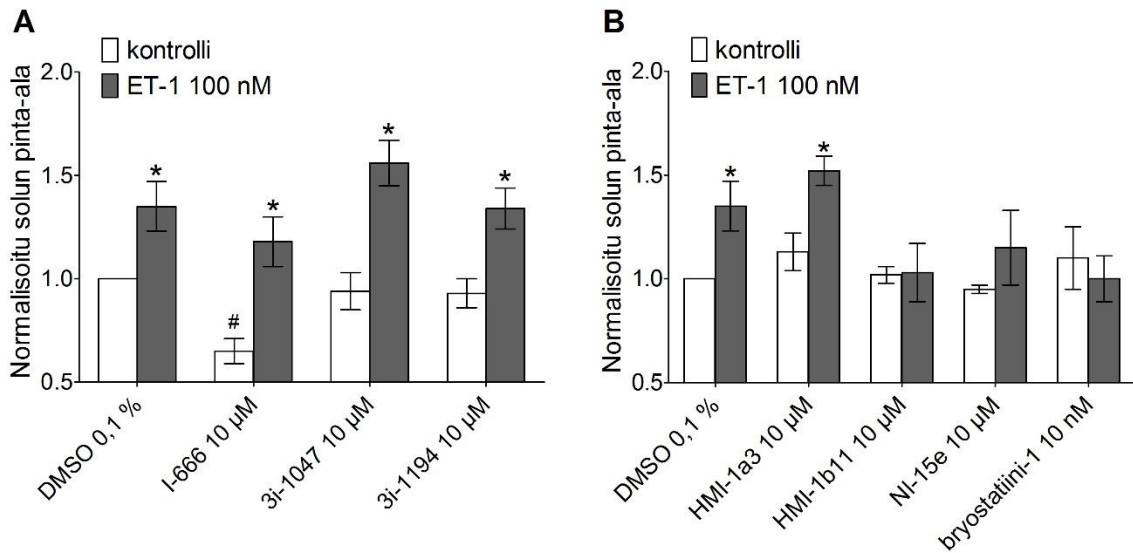
ET-1 kasvatti solujen pinta-alaa 81 % (I-666), 65 % (3i-1047) ja 44 % (3i-1194) verrattuna altistukseen kyseisellä yhdisteellä ilman ET-1-stimulaatiota.



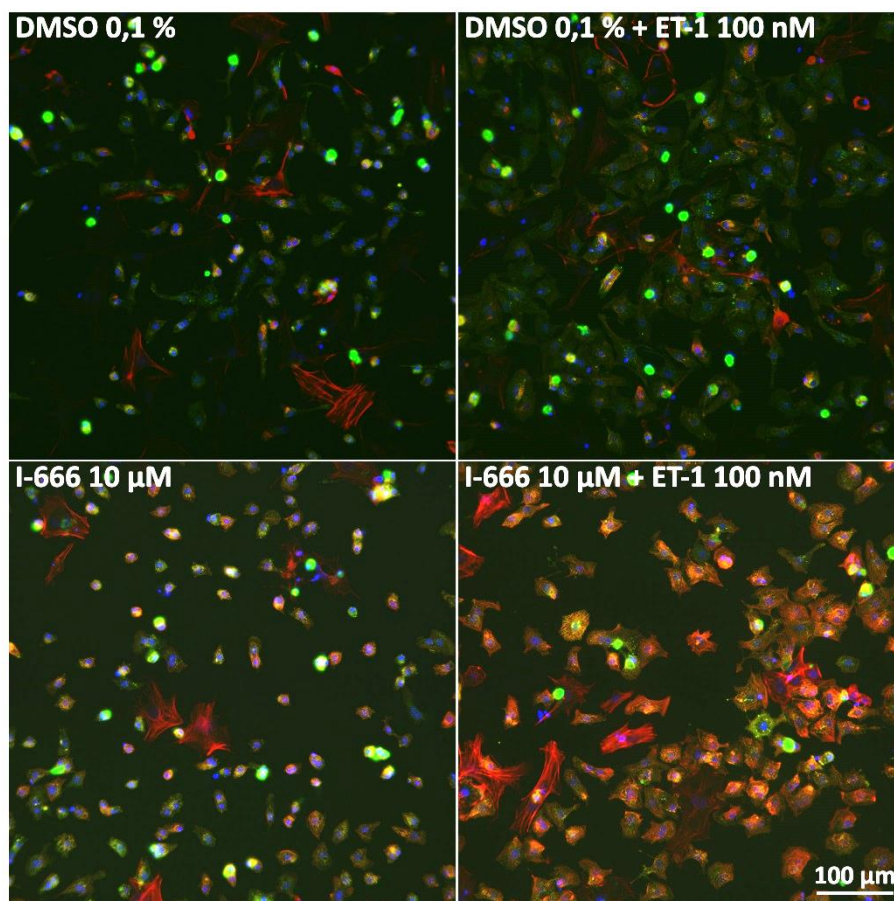
Kuva 8. Endoteliini-1:n (ET-1) vaikutus primäärisydänlihassolujen morfologiaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Kiinnitetyistä primäärisydänlihassoluista värjättiin F-aktiini falloidiinilla, tumat DAPI:lla sekä  $\alpha$ -aktiniini spesifisellä primäärivasta-aineella ja fluoresoivalla sekundäärivasta-aineella. Ylimmällä rivillä on kuvat ET-1:llä stimuloimattomista soluista ja keskirivillä ET-1-stimuloituista soluista. Alimmalla rivillä olevat kuvat ovat kontrollinäytteestä ilman  $\alpha$ -aktiniinin primäärivasta-ainetta.

PKC:hen vaikuttavilla yhdisteillä ilman ET-1-stimulaatiota ei ollut vaikutusta primäärikardiomyosyyttien pinta-alaan. Kyseisille yhdisteille altistetuista primäärisydänlihassoluista ainoastaan HMI-1a3-käsiteltyjen solujen pinta-ala oli merkitsevästi suurempi ET-1:llä käsitellyillä kuin ET-1:llä käsittelemättömillä soluilla ( $p=0,029$ , pariton t-testi) (Kuva 9B). Sen sijaan HMI-1b11-, NI-15e- ja bryostatiini-1-käsittelyt näyttivät estävän ET-1:n aiheuttamaa solujen pinta-alan kasvua. Lisäksi

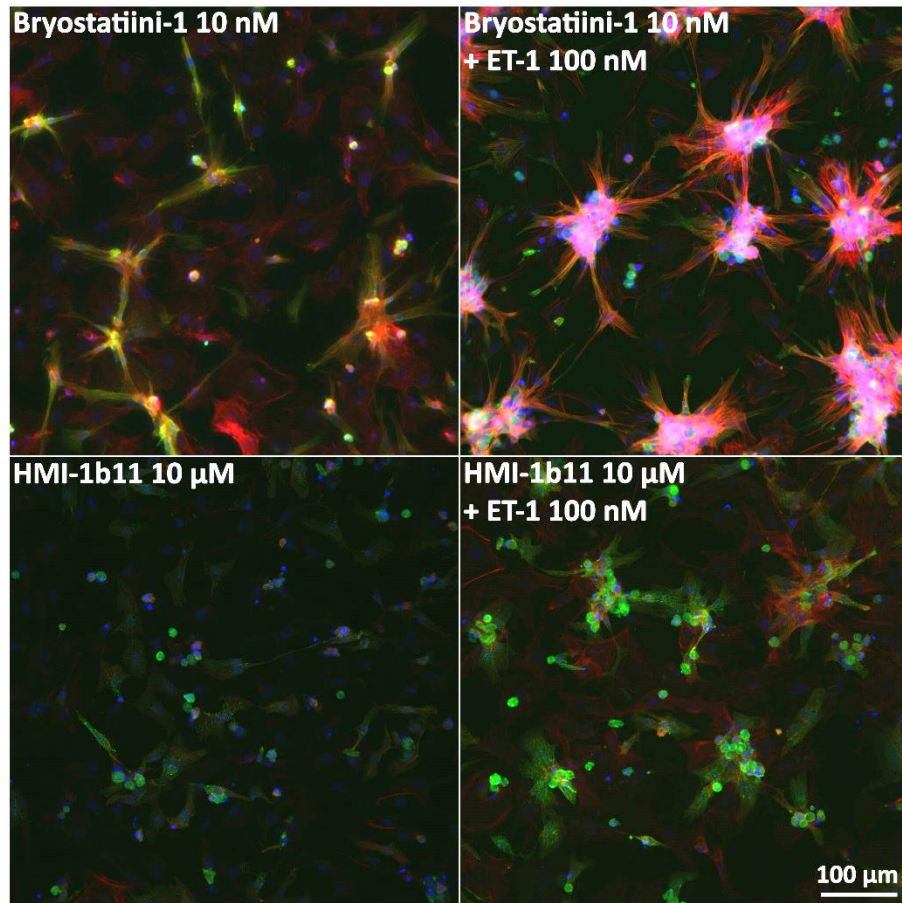
fluoresenssikuvista havaittiin HMI-1b11:n ja bryostatiini-1:n aiheuttama solujen kasautuminen rykelmiin (Kuva 11). Bryostatiini-1:llä käsitellyt solut kasautuivat rykelmiin sekä ET-1:llä käsitellyissä että käsittelemättömissä näytteissä. Lisäksi etenkin bryostatiini-1- ja ET-1-käsittelyn jälkeen F-aktiini näkyi selvästi voimakkaammin kuin muissa näytteissä. HMI-1b11-käsitellyissä soluissa kasautuminen ei ollut yhtä voimakasta ja sitä tapahtui ainoastaan ET-1-stimulaation jälkeen. Tarkasteltaessa soluja mikroskoopilla ennen niiden fiksoimista bryostatiini-1- tai HMI-1b11-käsittelyn saaneet solut näyttivät myös sykkivän muita soluja enemmän, etenkin yhdistettynä ET-1-stimulaatioon.



Kuva 9. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B) vaikuttavien yhdisteiden ja endoteliini-1:n (ET-1) vaikutus primäärisydänlihassolujen pinta-alaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Tulokset on esitetty kolmen riippumattoman DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoidun kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä. \*  $p < 0,05$  vs. kyseisen yhdisteen kontrolli ilman ET-1-käsittelyä (pariton t-testi). #  $p < 0,05$  vs. DMSO 0,1 % -kontrolli (yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -jatkotesti).



Kuva 10. I-666:n ja endoteliini-1:n (ET-1) vaikutus primäärisydänlihassolujen morfologiaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Kuvissa näkyy falloidiinilla värjätty F-aktiini punaisella, DAPI:lla värjättyt tumat sinisellä sekä spesifisillä primääri- ja sekundäärivasta-aineilla värjätty  $\alpha$ -aktiniini vihreällä.

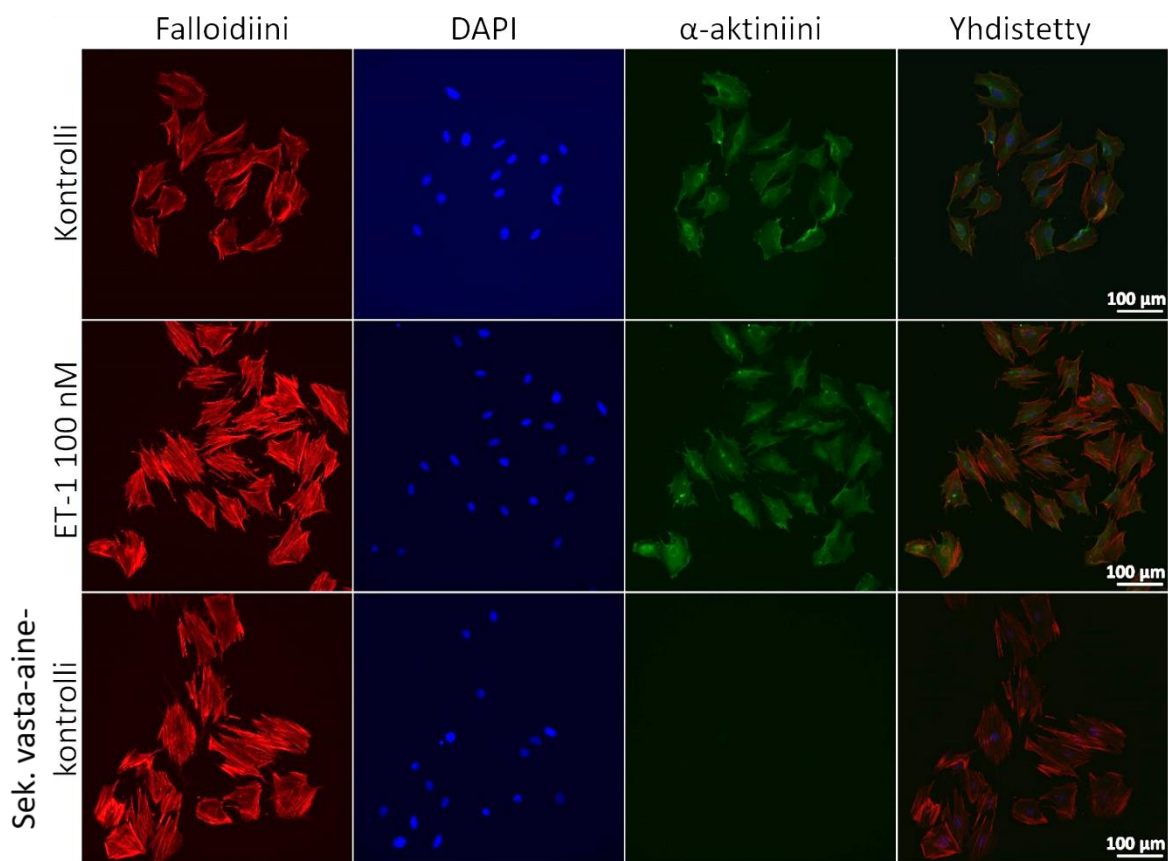


Kuva 11. Bryostatiini-1:n ja HMI-1b11:n sekä endoteliini-1:n (ET-1) vaikutus primäärisydänlihassolujen morfologiaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Kuvissa näkyy falloidiinilla värjätty F-aktiini punaisella, DAPI:lla värjättyt tumat sinisellä sekä spesifisillä primääri- ja sekundaarivasta-aineilla värjätty  $\alpha$ -aktiniini vihreällä.

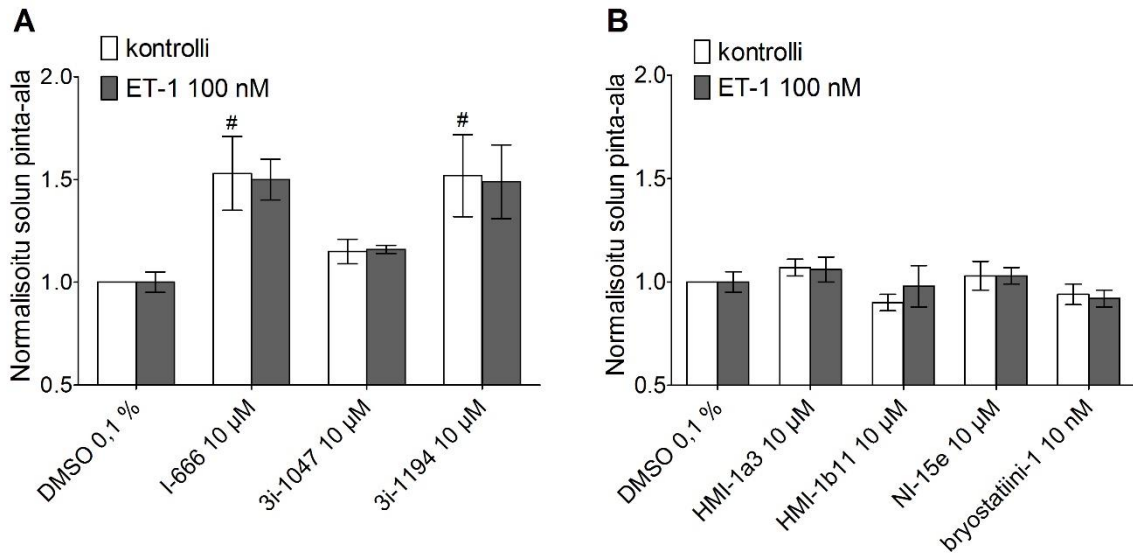
### 5.2.2 Endoteliini-1:n ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus H9c2-solujen pinta-alaan ja morfologiaan

ET-1-stimulaatiolla ei ollut vaikutusta H9c2-solujen pinta-alaan (Kuvat 12 ja 13). Sen sijaan I-666-käsittely näytti suurentavan H9c2-solujen pinta-alaa 35 % ( $p=0,036$ ; yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -testi) ja 3i-1194-käsittely 52 % ( $p=0,041$ ) verrattuna DMSO-kontrolliin (Kuva 13A). Muilla tutkituilla yhdisteillä ei ollut vaikutusta H9c2-solujen pinta-alaan. Myöskään mikroskooppikuvissa ei nähty silmin havaittavia morfologiamuutoksia.





Kuva 12. Endoteliini-1:n (ET-1) vaikutus H9c2-solujen morfologiaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Kiinnitetyistä H9c2-soluista värjättiin F-aktiini falloidiinilla, tumat DAPI:lla sekä  $\alpha$ -aktiniini spesifisellä primäärivasta-aineella ja fluoresoivalla sekundäärivasta-aineella. Ylimmällä rivillä on kuvat ET-1:llä stimuloimattomista soluista ja keskirivillä ET-1-stimuloiduista soluista. Alimmalla rivillä olevat kuvat ovat kontrollinäytteestä ilman  $\alpha$ -aktiniinin primäärivasta-ainetta.

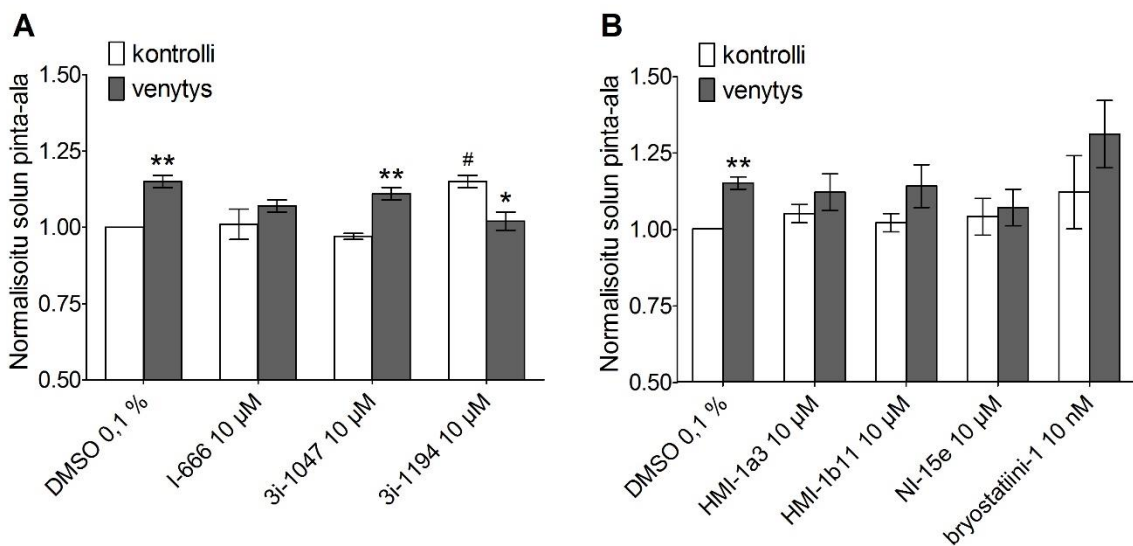


Kuva 13. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B) vaikuttavien yhdisteiden ja endoteliini-1:n (ET-1) vaikutus H9c2-solujen pinta-alaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Tulokset on esitetty kolmen riippumattoman DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoidun kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä. #  $p < 0,05$  vs. DMSO 0,1 % -kontrolli (yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -jatkotesti).

### 5.2.3 Venytyksen ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus primäärisydänlihassolujen pinta-alaan ja morfologiaan

Venytykselle 48 tunniksi altistetut primäärisydänlihassolut olivat pinta-alaltaan keskimäärin 15 % suurempia kuin venyttämättömät kontrollisolut ( $p=0,001$ , pariton t-testi) (Kuva 14). Sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavista yhdisteistä ainoastaan 3i-1194-käsittely näytti vaikuttavan venytysmaljoilla kasvatettujen solujen pinta-alaan ilman venytystä. Venyttämättömät 3i-1194-käsitellyt solut olivat 15 % suurempia kuin venyttämättömät DMSO-kontrollisolut ( $p=0,021$ , yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -testi) (Kuva 14A). Toisin kuin peitinlaseilla kasvatetuilla soluilla ET-1-kokeessa, venytysmaljoilla kasvatetuilla I-666-käsitellyillä soluilla pinta-ala ei eronnut merkitsevästi DMSO-kontrollisolujen pinta-alasta. Myöskään morfologiassa ei nähty vastaavaa solujen pyöristymistä, jota nähtiin peitinlaseilla kasvatetuissa I-666-käsitellyissä soluissa. Ero venytysmaljoilla ja kollageenipäällystetyillä peitinlaseilla kasvatettujen solujen pinta-alassa

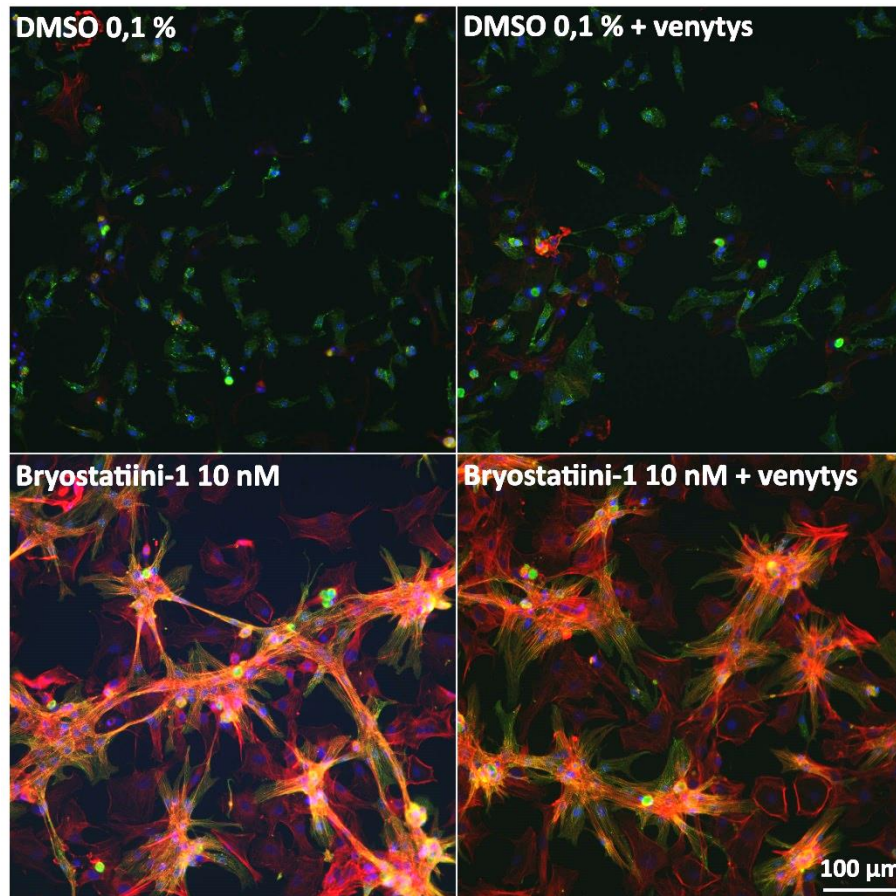
oli nähtävissä myös ilman yhdistealtistuksia, sillä venytymäljoilla kasvatetut sydänlihassolut olivat keskimäärin 17 % pienempiä kuin peitinlaseilla kasvatetut solut ( $p=0,035$ , pariton t-testi). Transkriptiotekijöihin vaikuttavista yhdisteistä ainoastaan 3i-1047:llä käsitellyillä primäärikardiomyosyyteillä pinta-ala oli merkitsevästi suurempi venytetyillä kuin venyttämättömillä soluilla ( $p=0,001$ ). Sen sijaan venytetyt 3i-1194-käsitellyt solut olivat 11 % pienempiä kuin venyttämättömät 3i-1194-käsitellyt solut ( $p=0,036$ ) ja I-666 käsitelyihin soluihin venytys ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi.



Kuva 14. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B) vaikuttavien yhdisteiden ja 10–20 % syklisen venytyksen (0,5 Hz) vaikutus primäärisydänlihassolujen pinta-alaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Tulokset on esitetty kolmen riippumattoman DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoidun kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä. \*  $p<0,05$  ja \*\*  $p<0,01$  vs. kyseisen yhdisteen kontrolli ilman venytystä (pariton t-testi). #  $p<0,05$  vs. DMSO 0,1 % -kontrolli (yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -jatkotesti).

Mikään PKC:hen vaikuttavista yhdisteistä ei muuttanut solujen pinta-alaa verrattuna DMSO-kontrolliin myöskään venytymäljoilla viljeltäessä (Kuva 14B). PKC:hen vaikuttavilla yhdisteillä käsitellyissä primäärisydänlihassoluissa ei kuitenkaan havaittu DMSO-kontrollisolujen kaltaista venytyksen aiheuttamaa tilastollisesti merkitsevää pinta-alan kasvua verrattuna venyttämättömiin kontrollisoluihin. Trendi näyttää silti olevan, että PKC:n vaikuttaville yhdisteille altistetuilla venytetyillä soluilla pinta-ala oli hieman suurempi (3–

16 %) kuin venyttämättömillä soluilla. Morfologiaa tarkasteltaessa bryostatiini-1:n huomattiin myös venytyskokeessa aiheuttavan primäärikardiomyosyyttien kasautumista rykelmiksi (Kuva 15). Vastaavaa ei havaittu muilla yhdisteillä.



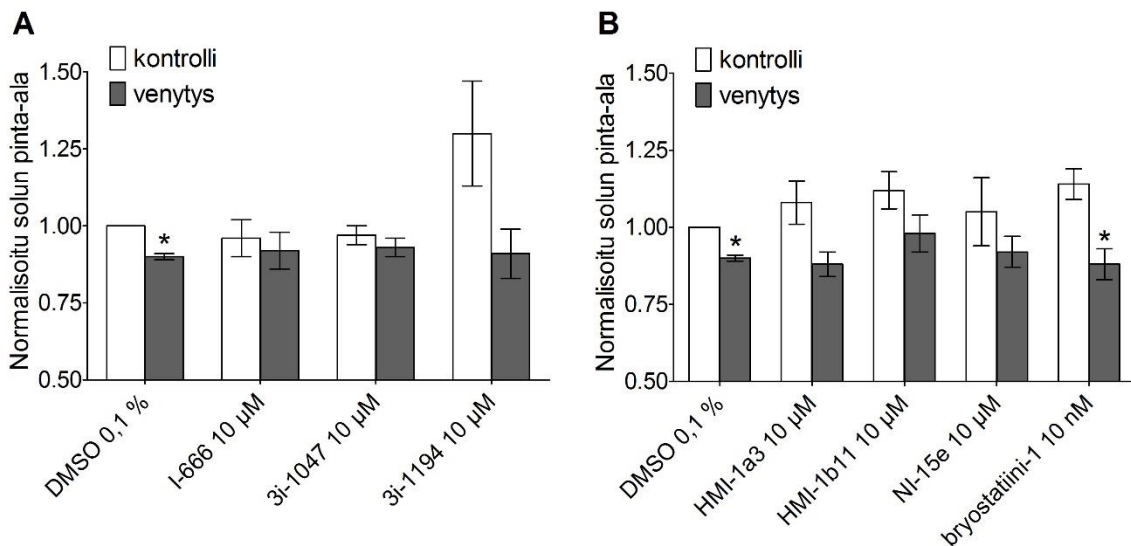
Kuva 15. Bryostatiini-1:n ja 48 tunnin venytyksen vaikutus primäärisydänlihassolujen morfologiaan. Kuvissa näkyy falloidiinilla värjätty F-aktiini punaisella, DAPI:lla värjättyt tumat sinisellä sekä spesifisillä primääri- ja sekundäärivasta-aineilla värjätty  $\alpha$ -aktiniini vihreällä. Keltaisena näkyvät alueet ovat vihreän ja punaisen värjäyksen kolokalisaatiota.

#### 5.2.4 Venytyksen ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus H9c2-solujen pinta-alaan ja morfologiaan

Venytyttyt H9c2-solut olivat pinta-alaltaan keskimäärin 10 % pienempiä kuin venyttämättömät kontrollisolut ( $p=0,013$ , pariton t-testi) (Kuva 16). Mikään transkriptiotekijöihin vaikuttavista yhdisteistä ei muuttanut venytysmaljoilla kasvatettujen

H9c2-solujen pinta-alaa tilastollisesti merkitsevästi verrattuna DMSO-kontrolliin. Kuvasta 16A voidaan kuitenkin havaita 3i-1194-käsittelyn solujen pinta-alaa kasvattava trendi, joka ei ole nähtävissä venytyksen jälkeen. Millään transkriptiotekijöihin vaikuttavalla yhdisteellä käsitellyissä soluissa venytyksellä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta H9c2-solujen pinta-alaan. Suunta kuitenkin näyttää olevan DMSO-kontrollisolujen kaltainen (Kuva 16A).

Mikään PKC:hen vaikuttavista yhdisteistä ei muuttanut solujen pinta-alaa verrattuna DMSO-kontrolliin (Kuva 16B). PKC:hen vaikuttavista yhdisteistä ainoastaan bryostatiini-1-käsittelyn saaneilla H9c2-soluilla venytys muutti solujen pinta-alaa tilastollisesti merkitsevästi. Venytettyjen bryostatiini-1:lle altistettujen H9c2-solujen pinta-ala oli 23 % pienempi verrattuna venyttämättömiin bryostatiini-1-käsiteltyihin soluihin ( $p=0,021$ , pariton t-testi). Muillakin yhdisteillä käsitellyissä soluissa pinta-alat näyttivät olevan venytetyissä soluissa pienempiä kuin venyttämättömissä soluissa, mutta muutokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Fluoresenssikuvien silmämääräisessä tarkastelussa H9c2-soluissa ei havaittu morfologiamuutoksia.



Kuva 16. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B) vaikuttavien yhdisteiden ja 10–20 % syklisen venytyksen (0,5 Hz) vaikutus H9c2-solujen pinta-alaan 48 tunnin altistuksen jälkeen. Tulokset on esitetty kolmen riippumattoman DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoidun kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä. \*  $p < 0,05$  vs. kyseisen yhdisteen kontrolli ilman venytystä (pariton t-testi).

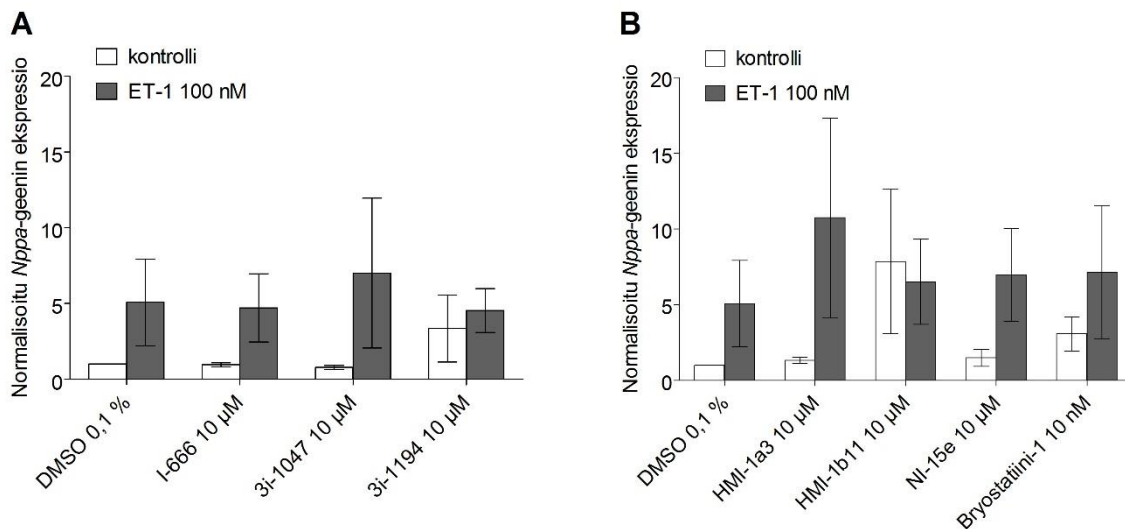
### 5.3 Endoteliini-1:n ja tutkittavien yhdisteiden vaikutus primäärisydänlihassolujen *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ekspressioon

ET-1:lle 4 ja 24 tunniksi altistettujen primäärikardiomyosyyttien *Nppa*- ja *Nppb*-geenin ilmeneminen eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi ET-1:llä käsittelemättömien solujen geeniekspressiosta. Kuvista 17, 18, 19 ja 20 voidaan kuitenkin nähdä, että ET-1-käsittely näytti lisäävän *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ekspressiota. Vaikka hajonnat kokeiden välillä olivat suuria, muutokset olivat samansuuntaisia kaikissa kolmessa erillisessä kokeessa. DMSO:lla käsitellyissä soluissa 4 tunnin ET-1-altistuksen jälkeen *Nppa*-geenin ekspressio oli keskimäärin 5-kertainen (vaihteluväli 1,8–10,8) ja *Nppb*-geenin ekspressio 19-kertainen (vaihteluväli 6,7–36,6) verrattuna ET-1:llä käsittelemättömiin soluihin. Vuorokauden altistuksen jälkeen sekä *Nppa*- että *Nppb*-geenin ilmeneminen olivat ET-1-käsitellyissä soluissa keskimäärin 7-kertaisia (vaihteluväli *Nppa*:lla 1,9–13,0; *Nppb*:llä 2,8–11,7) verrattuna käsittelemättömiin soluihin.

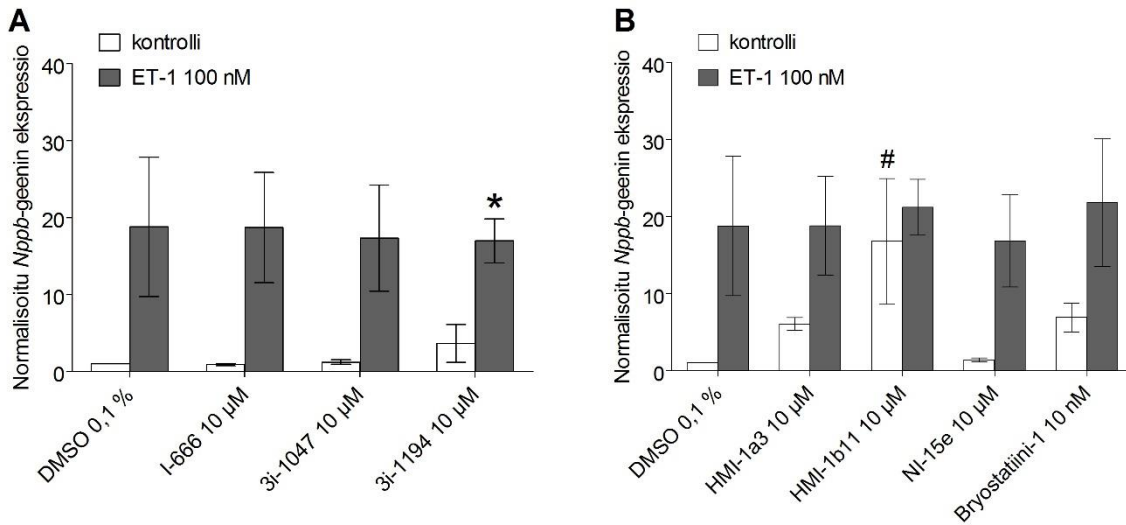
Mikään sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavista yhdisteistä ei muuttanut *Nppa*- tai *Nppb*-geenin ekspressiota tilastollisesti merkitsevästi verrattuna DMSO-kontrolliin. Neljän tunnin altisuksella 3i-1194 näytti kuitenkin hieman lisäävän *Nppa*- ja *Nppb*-geenin ilmenemistä ilman ET-1-altistusta (Kuvat 17A ja 18A). Muutos ei ollut tilastollisesti merkitsevä ja näytti palautuvan DMSO-käsittelyn tasolle 24 tunnin altistuksen kohdalla (Kuvat 19A ja 20A).

PKC:hen vaikuttavista yhdisteistä ainoastaan HMI-1b11-käsittely vaikutti solujen *Nppb*-geenin ekspressioon tilastollisesti merkitsevästi. Neljäksi tunniksi HMI-1b11:lle altistetuilla soluilla *Nppb*-geenin ekspressio oli 17-kertainen (6,7–33,0) verrattuna DMSO-kontrolliin ( $p=0,039$ ; yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -jatkotesti) (Kuva 18B). Samansuuntainen, mutta ei tilastollisesti merkitsevä, muutos on nähtävissä myös HMI-1b11:llä käsitellyillä soluilla *Nppa*-geenin ekspressiossa 4 tunnin sekä molempien geenien ekspressiossa 24 tunnin altistuksen kohdalla (Kuvat 17B, 19B ja 20B). Myös bryostatiini-1:lle altistettujen primäärikardiomyosyyttien *Nppa*- ja *Nppb*-geeniekspressio näyttävät

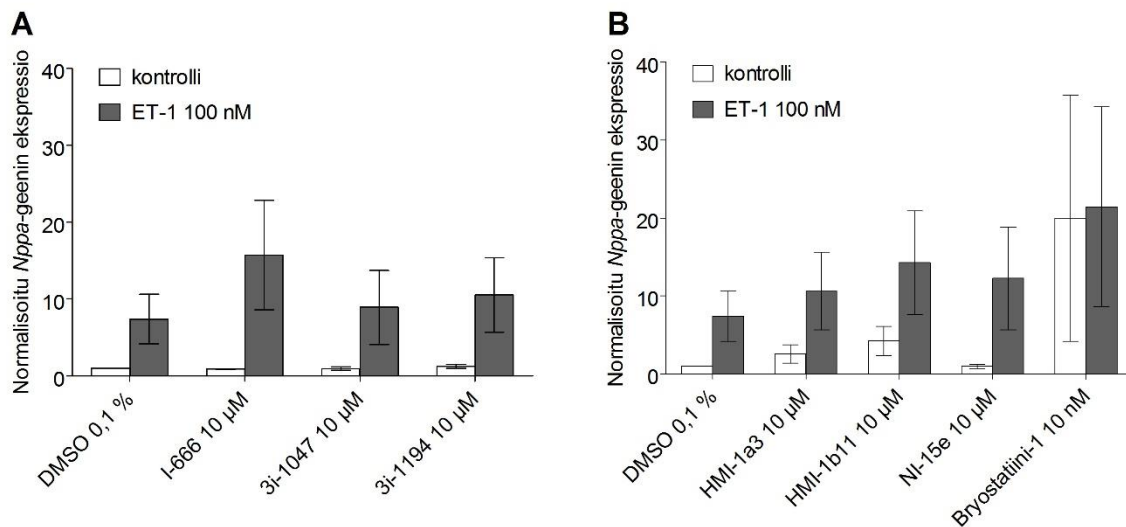
lisääntyneen verrattuna DMSO-kontrolliin, mutta muutokset eivät ole tilastollisesti merkitseviä. Etenkin 24 tunnin bryostatiini-1-käsittelyn jälkeen *Nppb*-geenin ekspresio näyttää olevan huomattavasti lisääntynyt verrattuna muihin yhdistekäsittelyihin (Kuva 20C). Myös HMI-1a3 näytti hieman lisäävän *Nppb*-geenin ilmenemistä sekä 4 että 24 tunnin altistuksen kohdalla (Kuvat 18B ja 20B). *Nppa*-geenin ekspresioon HMI-1a3:lla ei näytä olevan vaikutusta. NI-15e-käsiteltyjen solujen *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ilmeneminen ei juuri eroa DMSO-käsitellyistä kontrollisoluista. ET-1:llä käsiteltyjen ja käsittelemättömien solujen välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja tutkittujen geenien ekspressiossa myöskään PKC:hen vaikuttavien yhdistekäsittelyjen jälkeen.



Kuva 17. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B) vaikuttavien yhdisteiden sekä 4 tunnin endoteliini-1-stimulaation vaikutus primäärisydänlihassolujen *Nppa*-geenin ekspresioon. mRNA:n määrä kvantitoitiin qPCR:llä. Tulokset on esitetty DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoitujen kolmen riippumattoman kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä.

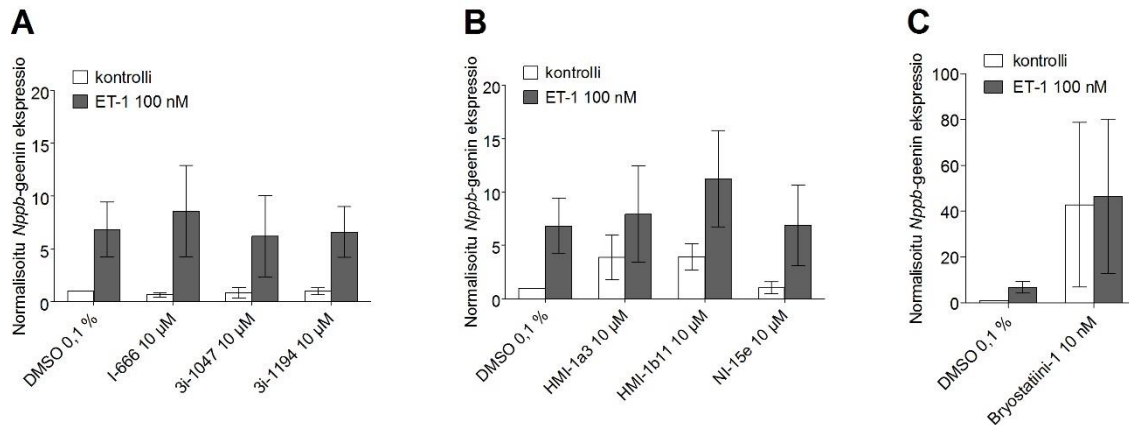


Kuva 18. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B) vaikuttavien yhdisteiden sekä 4 tunnin endoteliini-1-stimulaation vaikutus primäärisydänlihassolujen *Nppb*-geenin ekspressioon. mRNA:n määrä kvantitoitiin qPCR:llä. Tulokset on esitetty DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoidujen kolmen riippumattoman kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä. \*  $p < 0,05$  vs. kyseisen yhdisteen kontrolli ilman ET-1-käsittelyä (pariton t-testi) #  $p < 0,05$  vs. DMSO 0,1 % (yksisuuntainen varianssianalyysi, Tukey HSD -jatkotesti).



Kuva 19. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B) vaikuttavien yhdisteiden sekä 24 tunnin endoteliini-1-stimulaation vaikutus primäärisydänlihassolujen *Nppa*-geenin ekspressioon. mRNA:n määrä kvantitoitiin qPCR:llä. Tulokset on esitetty DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoidujen kolmen riippumattoman kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä.





Kuva 20. Sydämen transkriptiotekijöihin (A) ja PKC:hen (B ja C) vaikuttavien yhdisteiden sekä 24 tunnin endoteliini-1-stimulaation vaikutus primäärisydänlihassolujen *Nppb*-geenin ekspressioon. mRNA:n määrä kvantitoitiin qPCR:llä. Tulokset on esitetty DMSO 0,1 % -kontrolliin normalisoitujen kolmen riippumattoman kokeen keskiarvona  $\pm$  keskiarvon keskivirheenä. (Huomaa erilainen asteikko kuvaajassa C.)

## 6 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Tämän erikoistyön ensimmäisenä tavoitteena oli selvittää, voisiko jatkuva H9c2-solulinja korvata primäärikardiomyosyytit sydämen hypertrofian *in vitro* -tutkimuksissa. Primäärikardiomyosyytit ovat laajasti käytetty solumalli hypertrofiatutkimuksissa, mutta joissakin tutkimuksissa alun perin rotan alkion kammioista eristettyjä H9c2-myoblasteja on käytetty vaihtoehtoisena koe-eläimettömänä mallina (esim. Huang ym. 2004; Zhou ym. 2007; Yang ym. 2016).

Watkins ym. (2011) ovatkin tutkineet H9c2-solulinjan mahdollisuutta primäärisydänlihassolujen korvaajana. Kyseisessä tutkimuksessa AngII- ja ET-1-stimulaatiot saivat aikaan samanlaisia hypertrofiavasteita H9c2-soluissa ja vastasyntyneen rotan primäärikardiomyosyyteissä. Hypertrofiavastetta mitattiin pinta-alan määrittämisellä sekä neljän hypertrofiaan liitetyn geenin (*Acta1*, *Myl2*, *Nppa*, *Nppb*) ekspression qPCR-mittauksella. Lisäksi tutkimuksessa arvioitiin mikroskooppikuvista F-aktiini-stressisäikeiden

ja  $\alpha$ -aktiniinin lisääntymistä ja uudelleen järjestäytymistä silmämääräisesti. AngII sai molemmissa solutyypeissä aikaan samanlaiset vasteet solun pinta-alassa ja geeniekspressiossa. ET-1:n aiheuttamat vasteet olivat myös samanlaiset molemmissa soluissa lukuun ottamatta *Acta1*-geenin ilmenemistä, joka oli primäärikardiomyosyyteissä lisääntynyt merkitsevästi enemmän kuin H9c2-soluissa. Kumpikaan hypertrofia-altistus ei kuitenkaan aiheuttanut H9c2-solujen yhtä selvää sarkomeerien  $\alpha$ -aktiniinin järjestäytymistä kuin primäärikardiomyosyyteissä. Geeniekspression muutokset primäärikardiomyosyyteissä eivät Watkinsin ym. (2011) tutkimuksessa toisaalta olleet täysin samanlaisia kuin muissa tutkimuksissa. Esimerkiksi AngII:n on todettu lisäävän rotan primäärikardiomyosyyttien *Nppa*-geenin ekspressiota (Qin ja Liu 2006; Zhang ym. 2015) ja ET-1:n on havaittu lisäävän rotan primäärikardiomyosyyttien *Myl2*-geenin ilmentymistä (Ito ym. 1991), mutta näitä muutoksia ei havaittu Watkinsin ym. (2011) tutkimuksessa. Vaikka Watkinsin ym. (2011) tutkimuksessa hypertrofiavasteet H9c2-soluissa ja primäärikardiomyosyyteissä olivat siis samansuuntaiset, ne eivät täysin vastanneet toisiaan tai muita tutkimustuloksia.

Tässä erikoistyössä ET-1:n ja venytyksen aiheuttamaa hypertrofiaa arvioitiin ensisijaisesti solujen pinta-alan määrittämisellä. Molemmat stimulaatiot kasvattivat 48 tunnin aikana primäärikardiomyosyyttien pinta-alaa merkitsevästi verrattuna käsittelemättömiin soluihin, kun taas H9c2-soluissa ET-1-stimulaatio ei aiheuttanut pinta-alassa minkäänlaista muutosta ja venytyksen havaittiin jopa hieman pienentävän H9c2-solujen pinta-alaa. Lisäksi eri yhdisteiden aiheuttamat pinta-alamuutokset olivat eri soluissa erilaisia, jopa päinvastaisia. Esimerkiksi I-666-käsittely pienensi primäärikardiomyosyyttien pinta-alaa ja kasvatti H9c2-solujen pinta-alaa, kun soluja kasvatettiin gelatiinipäälystetyillä peitinlaseilla. 3i-1194:llä ei puolestaan ollut vaikutusta gelatiinipäälystetyillä peitinlaseilla kasvatettujen primäärisydänlihassolujen pinta-alaan, kun taas H9c2-solujen pinta-ala kasvoi merkitsevästi 3i-1194-käsittelyn seurauksena.

H9c2-soluissa ei myöskään havaittu  $\alpha$ -aktiniinin samanlaista järjestäytymistä kuin primäärikardiomyosyyteissä. Itse asiassa  $\alpha$ -aktiniinin vasta-ainevärjäys näytti värjäävän H9c2-solut erittäin heikosti ja diffuusisti, ja tarvittava vasta-aineen määrä oli nelinkertainen

verrattuna primäärikardiomyosyytien värjäykseen. Myöskään Watkinsin ym. (2011) tutkimuksessa H9c2-solujen  $\alpha$ -aktiniinivärjäys ei näkynyt vahvasti käsittelemättömissä soluissa. Tosin hypertrofia-altistusten jälkeen Watkins ym. (2011) havaitsivat jonkin verran sarkomeerien  $\alpha$ -aktiniinin järjestäytymistä H9c2-soluissa, mitä ei kuitenkaan havaittu tässä tutkimuksessa. Tämän tutkimuksen perusteella nämä kaksi soluviljelmää eivät vastaa toisiaan ja H9c2-solujen soveltuvuus hypertrofiatutkimuksiin on kyseenalainen.

Koska pinta-ala-analyysin perusteella ET-1 ja venytys eivät saaneet H9c2-soluissa aikaan solujen hypertrofiaa, H9c2-solujen geeniekspressiota ei analysoitu. Geeniekspression muutosten tutkiminen primäärikardiomyosyyteissä rajattiin ET-1-stimulaatioon. Kahden eri geenin (*Nppa* ja *Nppb*) ekspressiota tutkittiin kahden eri aikapisteen kohdalla (4 h ja 24 h). Tässä tutkimuksessa kolmen riippumattoman kokeen välillä oli paljon hajontaa, minkä vuoksi tilastollisesti merkitseviä muutoksia geenien ekspressiossa ei havaittu. Jokaisessa kokeessa muutos oli kuitenkin samansuuntainen, eli *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ekspressio lisääntyivät ET-1-altistuksen seurauksena. Havaitut geeniekspression muutokset vaikuttavat kuitenkin todella suurilta verrattuna esimerkiksi Watkinsin ym. (2011) tutkimukseen, jossa 4 tuntia ET-1:llä stimuloitujen primäärimyosyytien *Nppa*-geenin ekspressio oli 1,6-kertainen ja *Nppb*-geenin 2,1-kertainen verrattuna kontrolliin, kun tässä tutkimuksessa vastaavat muutokset olivat 5- ja 19-kertaiset. Tutkimusryhmämme aikaisemmissa tutkimuksissa ET-1-stimulaation on tosin havaittu aiheuttavan jopa 20-kertaiset *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ekspresion muutokset rotan primäärisydänlihassoluissa (Kinnunen S, Tölli M, ym., julkaisematon tieto). Näiden tulosten perusteella vaihtelu geeniekspressiossa voi olla hyvinkin suurta eri kokeiden ja tutkimusten välillä.

Tässä erikoistyössä tutkituista sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavista yhdisteistä (I-666, 3i-1047 ja 3i-1194) ei ole julkaistu aiempaa tutkimustietoa. Nyt tehtyjen toksisuuskoekien perusteella 1–30  $\mu$ M pitoisuuksilla kyseiset yhdisteet eivät olleet toksisia primäärikardiomyosyyteille. Sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavat yhdisteet vaikuttavat turvallisilta myös H9c2-soluille. Ainoastaan I-666 suurimmalla pitoisuudella laski hieman H9c2-solujen metabolia-aktiivisuutta, mutta ei aiheuttanut H9c2-soluille LDH-

testissä havaittavaa nekroosia. Näin ollen kyseisiä yhdisteitä voidaan pitää turvallisina sekä rotan primääriskardiomyosyyteille että H9c2-soluille.

Yhdisteet I-666, 3i-1047 ja 3i-1194 on suunniteltu vaikuttaviksi sydämen transkriptiotekijöistä GATA4:ään ja NKX2-5:een, mahdollisesti muokkamalla niiden keskinäistä vuorovaikutusta. GATA4:llä ja NKX2-5:llä on keskeinen rooli hypertrofiassa (ks. 2.2.3 Transkriptiotekijöitä), minkä vuoksi kyseisten kokeellisten yhdisteiden vaikutuksia sydänlihassolujen hypertrofiaan haluttiin tutkia. Näiden tutkimustulosten perusteella kyseiset yhdisteet eivät kuitenkaan estäneet hypertrofiaa. I-666:n havaittiin kuitenkin muokkaavan sydänlihassolujen pinta-alaa ja morfologiaa ja 3i-1194:llä näytti kardiomyosyytien pinta-alan lisäksi olevan vaikutuksia *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ekspressioon. Näiden yhdisteiden vaikutusten ja vaikutusmekanismien selvittämiseksi tarvitaan vielä lisää tutkimuksia.

LDH-testillä mitattuna PKC:hen vaikuttavat yhdisteet (bryostatiini-1, HMI-1a3, HMI-1b11 ja NI-15e) eivät aiheuttaneet merkittävää toksisuutta primääriskardiomyosyyteissä ja MTT-testissä vain HMI-1a3 suurimmalla tutkitulla pitoisuudella (30  $\mu\text{M}$ ) laski primääriskardiomyosyytien elinkykyä merkittävästi. HMI-1a3 ei siis aiheuta nekroottista solukuolemaa rotan primääriskardiomyosyyteille, mutta heikentää niiden metabolia-aktiivisuutta korkeilla pitoisuuksilla. H9c2-soluissa ainoastaan HMI-1b11 oli suurimmalla pitoisuudella toksinen, mikä havaittiin MTT-testissä voimakkaana metabolia-aktiivisuuden laskuna. LDH-testillä mitattu HMI-1b11:n aiheuttama nekroottinen solukuolema oli metabolia-aktiivisuuden laskuun verrattuna vähäistä, mikä viittaa siihen, ettei nekroosi ole merkittävä HMI-1b11:n toksisuuden mekanismi. Bryostatiini-1:llä ja NI-15e:llä ei havaittu toksisuutta. PKC:hen vaikuttavia yhdisteitä on aiemmin tutkittu HeLa-soluissa eli ihmisen kohdunkaulansyöpäsoluissa, joissa HMI-1a3 ja HMI-1b11 laskivat solujen elinkykyisyyttä jo 1  $\mu\text{M}$  (HMI-1a3) ja 4  $\mu\text{M}$  (HMI-1b11) pitoisuuksilla (Talman ym. 2011). Ihmisen SH-SY5Y-neuroblastoomasolulinjan soluissa puolestaan HMI-1a3 (20  $\mu\text{M}$ ) tappoi 31 % soluista 48 tunnin altistuksen aikana, kun taas HMI-1b11 (0,1–20  $\mu\text{M}$ ) ei juuri aiheuttanut solukuolemaa 72 tunnin altistuksen aikana (Talman ym. 2013). Näiden

isoftalaattijohdannaisten vaikutus solujen elinkykyyn näyttää siis riippuvan voimakkaasti solutyypistä.

Hypertrofiatutkimuksissa tutkituista yhdisteistä esille nousivat HMI-1b11 ja bryostatiini-1, joiden havaittiin vaikuttavan hypertrofiavasteisiin. Näiden yhdisteiden uskotaan vaikuttavan PKC:n kautta. HMI-1b11:n on todettu sitoutuvan ainakin PKC $\alpha$ :n ja - $\delta$ :n C1-domeeniin (Boije af Gennäs ym. 2009). SH-SY5Y-soluissa se aktivoi PKC $\alpha$ :aa, kun taas HeLa-soluissa se esti voimakkaamman PKC-aktivaattori PMA:n indusoimaa ERK1/2:n fosforylaatiota (Talman ym. 2011; Talman ym. 2013). Sen vaikutukset PKC:hen eivät ole siis täysin selvillä eikä sen vaikutuksia sydänlihassoluihin ole aiemmin tutkittu.

Myös PKC-aktivaattorina tunnetun bryostatiini-1:n vaikutukset PKC:hen ovat jokseenkin ristiriitaisia. Bryostatiini-1:n on nimittäin havaittu estävän PKC-aktivaattori PMA:n indusoimaa proliferaatiota ihmisen T-lymfosyyteissä, mutta aktivoivan sitä hiukan yksinään (Hess ym. 1988). PKC-inhibiittorilla on pystytty estämään bryostatiini-1:n proliferatiivinen vaikutus, mikä viittaa bryostatiini-1:n vaikuttavan PKC:n aktivaation kautta. Bryostatiini-1:n epäilläänkin toimivan PKC-ligandien läsnäollessa PKC-inhibiittorina vuorovaikuttaen tai kilpaillen ligandien kanssa ja PKC-ligandittomassa ympäristössä aktivoivan PKC:tä (Haas ym. 2003). Sekä bryostatiini-1 että HMI-1b11 saattavat siis toimia PKC:n agonisti-antagonisteina tai osittaisagonisteina. Bryostatiini-1:tä on tutkittu useissa solumalleissa ja moniin käyttöaiheisiin, mutta myöskään sen vaikutuksia sydänlihassolujen hypertrofiaan ei ole julkaistu.

Ristiriitaisia tuloksia on saatu myös forboliestereihin kuuluvalla PMA:lla. Se on PKC-aktivaattori, jonka on havaittu aiheuttavan rotan primäärikardiomyosyyteissä voimakkaan ja nopean PKC $\alpha$ :n, - $\delta$ :n ja - $\epsilon$ :n translokaation alle minuutissa (Clerk ym. 1995). Pidempi altistus PMA:lle (0,2–1  $\mu$ M) aiheuttaa puolestaan kyseisten isoformien vaimennussäätelyn eli down-regulaation (Clerk ym. 1995; Porter ym. 2003). Näin ollen pitkän altistuksen yhteydessä PMA:ta voidaankin pitää PKC-aktivaattorin sijaan PKC-inhibiittorina. Pitkän (12–92 h) PMA-altistuksen (0,2–0,7  $\mu$ M) on todettu aiheuttavan hypertrofiaa rotan

primäärisydänlihassoluissa ja vähentävän hypertrofiassa tavallisestikin vähentyvän *Atp2a2*:n ekspressiota (Allo ym. 1991; Porter ym. 2003). Nämä tulokset viittaavat PKC:n down-regulaation olevan mahdollisesti hypertrofiaa välittävä mekanismi. Toisaalta myös lyhyen (5–30 min) PMA-altistuksen (0,2–1  $\mu$ M) on havaittu aiheuttavan hypertrofiaa ja aktivoivan hypertrofiaa välittävää ERK1/2:ta (Vijayan ym. 2004; Sugden ym. 2011). Lisäksi 24 tunnin PMA-altistuksen aiheuttama PKC:n down-regulaatio esti kardiomyosyyteissä AngII:n indusoimaa Raf1- ja ERK1/2-aktivaatiota (Zou ym. 1996). Nämä tulokset puolestaan viittaavat PKC-aktivaation välittävän hypertrofisia vasteita. Eri tutkimusten tulokset ovat siis hyvin ristiriitaisia ja PKC:n down-regulaation vuoksi vaikeasti tulkittavissa.

HMI-1b11:n ja bryostatiini-1:n ei ole tässä tutkimuksessa käytetyillä pitoisuuksilla raportoitu aiheuttavan PKC:n down-regulaatiota. Jos HMI-1b11 ja bryostatiini-1 toimivat primäärikardiomyosyyteissä PKC-aktivaattoreina, niiden aktivoimien PKC-isoformien voidaan ajatella välittävän havaitut vasteet. Toisaalta yhdisteillä saattaa olla myös muita vaikutuskohteita kuin PKC. Mielenkiintoista olisikin selvittää, millä mekanismilla yhdisteet vaikuttavat. Tämän selvittämiseksi yhdisteiden vaikutuksia voisi tutkia PKC-aktivaattori PMA:n sekä PKC:n estäjien kanssa. Lisäksi eri PKC-isoformien translokaatiota mittaamalla voitaisiin selvittää yhdisteiden isoformispesifisyyttä.

Tämän tutkimuksen pinta-ala-analyysin perusteella HMI-1b11 ja bryostatiini-1 näyttävät estävän rotan primäärikardiomyosyyteissä ET-1:n aiheuttamaa hypertrofiaa. Lisäksi HMI-1b11- ja bryostatiini-1-käsittelyiden huomattiin lisäävän primäärikardiomyosyyttien *Nppa*- ja *Nppb*-geenin ekspressiota verrattuna DMSO-kontrolliin, vaikka kaikki muutokset eivät olleetkaan tilastollisesti merkitseviä. Kun ANP:n ja BNP:n tiedetään suojaavan sydäntä hypertrofialta, yhdisteiden voitaisiin näiden tulosten perusteella ajatella suojaavan sydänlihassoluja hypertrofialta (Woods 2004). Toisaalta kyseiset yhdisteet eivät näyttäneet juuri vaikuttavan venytyksen aiheuttamaan sydänlihassolujen pinta-alan kasvuun. HMI-1b11 ja bryostatiini-1 saattavatkin muokata ET-1:stä seuraavaa signaalinvälitystä, joka välittyy eri signaalinvälitysreittien kautta kuin venytys.

Bryostatiini-1- ja HMI-1b11-käsittelyiden huomattiin lisäksi aiheuttavan primäärisydänlihassolujen kasautumista rykelmiksi. Solujen kasautuminen saattoi vaikuttaa pinta-ala-analyysin tuloksiin, sillä CellProfiler-ohjelmalla luotu protokolla ei ehkä kykene tunnistamaan päällekkäin olevien solujen reunoja, jolloin näiden solujen pinta-alamääritys fluoresenssikuvista oli epätarkkaa. Näin ollen pinta-ala-analyysin tuloksia kyseisten yhdisteiden kohdalla ei voida pitää täysin luotettavina. Geeniekspression määrittämiseen solujen kasautumisella ei ollut vaikutusta. Bryostatiini-1:n ja HMI-1b11:n aiheuttama lisääntynyt *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ilmeneminen saattaa olla merkki hypertrofisten signaalireittien aktivaatiosta.

HMI-1b11:n ja bryostatiini-1:n havaittiin myös aiheuttavan primäärikardiomyosyyttien voimakasta sykkimistä, jota ET-1 näytti voimistavan. Lisäksi etenkin bryostatiini-1-käsitellyissä soluissa F-aktiinin värjäytymisen havaittiin voimistuneen huomattavasti verrattuna DMSO-kontrolliin ja muihin käsittelyihin, mikä viittaa aktiinifilamenttien paksuuntumiseen tai määrän kasvuun. Kardiomyosyyttien voimakas supistuminen ja sarkomeeriproteiinien lisääntyminen viittaavat puolestaan hypertrofiaan. PKC:n eri isoformeilla on erilaisia vaikutuksia sydänlihassolujen supistuvuuteen. Esimerkiksi PKC $\alpha$ :lla on todettu negatiivinen inotrooppinen vaikutus, kun taas PKC $\epsilon$ :lla on positiivinen inotrooppinen vaikutus kardiomyosyytteihin (Braz ym. 2004; Kang ja Chung 2012). Tulokset PKC $\beta$ :n vaikutuksista sydänlihassolujen supistuvuuteen ovat ristiriitaisia (Takeishi ym. 1998; Huang ym. 2001). Myös ET-1:llä on todettu positiivinen inotrooppinen vaikutus sydänlihassoluihin, minkä uskotaan välittyvän PKC $\epsilon$ :n kautta (Kang ja Chung 2012). Näin ollen myös HMI-1b11:n ja bryostatiini-1:n havaitut vaikutukset sydänlihassolujen supistuvuuteen saattavat välittyä PKC $\epsilon$ :n aktivaation kautta. Nämä havainnot perustuvat kuitenkin silmämääräisiin arvioihin, ja aktiinifilamenttien sekä supistuvuudessa tapahtuvien muutoksien mittaaminen vaatii vielä lisää tutkimuksia.

Tässä tutkimuksessa tutkittiin ainoastaan solujen pinta-alassa sekä kahden hypertrofiaalta suojaavan geenin ekspressiossa tapahtuvia muutoksia. HMI-1b11:n ja bryostatiini-1:n muiden vaikutusten selvittäminen vaatii vielä lisää tutkimuksia. Lisäksi harvemmassa

kasvatettujen primäärisydänlihassolujen pinta-alamittauksella tai kolmiulotteisella solun tilavuuden mittauksella tulisi varmistaa näiden yhdisteiden vaikutus sydänlihassolujen kokoon. Oleellista olisi myös selvittää, miten kyseiset yhdisteet vaikuttavat muiden hypertrofialle tyypillisten geenien ilmenemiseen. Esimerkiksi sarkomeeriproteiinien, kuten *Myl:n* ja *Myh:n*, ekspression muutosten tutkiminen voisi antaa viitteitä siitä, voidaanko näillä yhdisteillä vaikuttaa hypertrofiassa syntyviin solun rakenteen muutoksiin. Muiden hypertrofisten signaalien välittäjien, kuten MAPK:ien ja transkriptiotekijöiden, aktivaation tutkiminen voisi puolestaan kertoa näiden yhdisteiden vaikutuksista PKC:n aktivoimiin hypertrofisiin signaalireitteihin.

Pinta-ala-analyysin ja visuaalisen havainnoinnin perusteella solujen kasvatusalustalla näyttää olevan vaikutus solujen pinta-alaan ja morfologiaan. Gelatiinipäällystetyillä peitinlaseilla kasvatetut primäärisydänlihassolut olivat pinta-alaltaan suurempia kuin venytysmaljoilla kasvatetut primäärisydänlihassolut. Lisäksi yhdistekäsittelyiden aiheuttamat muutokset olivat erisuuntaisia eri kasvatusalustoilla viljellyillä soluilla. Esimerkiksi I-666:lla käsiteltyjen primäärisydänlihassolujen pinta-ala pieneni gelatiinipäällystetyillä peitinlaseilla, mutta ei muuttunut joustavilla kollageenipäällystetyillä venytysmaljoilla. I-666:lla käsitellyt solut näyttivät myös pyöristyvän gelatiinipäällystetyillä peitinlaseilla, mitä ei havaittu venytysmaljoilla. Lisäksi 3i-1194-käsiteltyjen primäärikardiomyosyyttien pinta-ala kasvoi kollageenipäällystetyillä venytysmaljoilla, mutta ei muuttunut gelatiinipäällystetyillä peitinlaseilla. Kasvatusalustan jäykkyys (kova/joustava) tai päällyste (gelatiini/kollageeni) saattavat vaikuttaa solujen pinta-alaan ja morfologiaan. Kasvatusalustalla saattaa myös olla vaikutusta muihin solun prosesseihin ja rakenteisiin, mitä ei tässä tutkimuksessa selvitetty. Jacot ym. (2008) ovat havainneet kasvatusalustan elastisuuden vaikuttavan muun muassa rotan primäärisydänlihassolujen maturaatioon, solutukirankaan, kalsiumin säätelyyn ja supistuvuuteen.



## 7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

LVH on merkittävä sydän- ja verisuonitautien riskitekijä. LVH:ssa sydänlihassolut kasvavat aiheuttaen koko sydämen massan kasvun. Lisäksi sydämen fibroosi lisääntyy ja supistustoiminta muuttuu johtaen lopulta sydämen vajaatoimintaan. LVH:n yleisin syy on kohonnut verenpaine, jonka alentamiseen myös LVH:n hoito perustuu. Verenpainelääkkeillä on myös verenpaineesta riippumattomia suotuisia vaikutuksia LVH:aan, mutta niillä ei kuitenkaan voida estää sitä täysin, minkä vuoksi LVH:n uusia läikehoitoja on pyritty ja pyritään kehittämään. Lääkekehityksessä yritetään vaikuttaa etenkin sydänlihassolujen hypertrofisiin signaalireitteihin. Signaalireittien verkosto on kuitenkin laaja koostuen monista päällekkäisistä ja keskenään vuorovaikuttavista signaalinvälittäjistä, minkä vuoksi sen tuntemus on vielä puutteellista. Joitakin keskeisiä tekijöitä, kuten G-proteiinikytkentäiset AT<sub>1</sub>- ja ET<sub>A</sub>-reseptorit, PKC ja eräät transkriptiotekijät, on kuitenkin tunnistettu.

Tässä erikoistyössä havaittiin joissakin hypertrofiatutkimuksissa käytettyjen H9c2-solujen olevan soveltumattomia hypertrofiatutkimuksiin, kun niitä verrattiin yleisimmin käytettyihin vastasyntyneen rotan primäärisydänlihassoluihin. Hypertrofiastimulaatiot, ET-1 ja venytys, aiheuttivat primäärisydänlihassoluissa merkittävän pinta-alan kasvun, mitä ei havaittu H9c2-soluissa. Toksisuuskokeissa tutkittujen PKC:hen ja sydämen transkriptiotekijöihin vaikuttavien yhdisteiden havaittiin olevan pääsääntöisesti turvallisia sekä rotan primäärisydänlihassoluille että H9c2-soluille. Lisäksi havaittiin PKC:hen vaikuttavien kokeellisten yhdisteiden, HMI-1b11:n ja bryostatiini-1:n, vaikuttavan mitattuihin hypertrofiavasteisiin. Keskeisin havainto oli niiden *Nppa*- ja *Nppb*-geenien ekspressiota voimistava vaikutus, minkä lisäksi silmämääräisesti havaittiin muutoksia sydänlihassolujen aktiinisäikeissä ja supistuvuudessa, mitä ei tässä tutkimuksessa kuitenkaan mitattu. Havaittujen vaikutusten merkityksen sekä yhdisteiden muiden vaikutusten selvittäminen vaativat vielä lisää tutkimuksia. Yhdisteillä voitaisiin mahdollisesti vaikuttaa sydämen hypertrofiaan tai ainakin niiden avulla voitaisiin saada lisää tietoa sydänlihassolujen hypertrofisista signaalireiteistä.

## 8 LÄHDELUETTELO

Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW 2nd: Enhanced G $\alpha$ q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10140–10145, 1998

Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N: ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci* 91: 651–657, 2012

Akazawa H, Komuro I: Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92: 1079–1088, 2003

Allo SN, McDermott PJ, Carl LL, Morgan HE: Phorbol ester stimulation of protein kinase C activity and ribosomal DNA transcription. Role in hypertrophic growth of cultured cardiomyocytes. *J Biol Chem* 266: 22003–22009, 1991

Allo SN, Carl LL, Morgan HE: Acceleration of growth of cultured cardiomyocytes and translocation of protein kinase C. *Am J Physiol* 263: 319–325, 1992

Artham SM, Lavie CJ, Milani RV, Patel DA, Verma A, Ventura HO: Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Prog Cardiovasc Dis* 52: 153–167, 2009

Avkiran M, Rowland AJ, Cuello F, Haworth RS: Protein kinase D in the cardiovascular system: emerging roles in health and disease. *Circ Res* 102: 157–163, 2008

Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF: Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 259: 324–332, 1990

Baker KM, Booz GW, Dostal DE: Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 54: 227–241, 1992

Battistini B, Chailier P, D'Orléans-Juste P, Brière N, Sirois P: Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 14: 385–399, 1993

Bayer AL, Heidkamp MC, Patel N, Porter M, Engman S, Samarel AM: Alterations in protein kinase C isoenzyme expression and autophosphorylation during the progression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 242: 145–152, 2003

Benjamin EJ, Levy D: Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci* 317:168–175, 1999

- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR: Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 128: 191–227, 2010
- Boije af Gennäs G, Talman V, Aitio O, Ekokoski E, Finel M, Tuominen RK, Yli-Kauhaluoma J: Design, synthesis, and biological activity of isophthalic acid derivatives targeted to the C1 domain of protein kinase C. *J Med Chem* 52: 3969–3981, 2009
- Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromo G, King GL, Vlahos CJ: Increased protein kinase C activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 99: 384–391, 1999
- Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM: Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest* 100: 2189–2195, 1997
- Braun MU, LaRosée P, Schön S, Borst MM, Strasser RH: Differential regulation of cardiac protein kinase C isozyme expression after aortic banding in rat. *Cardiovasc Res* 56: 52–63, 2002
- Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ, Molkenin JD: PKC $\alpha$  regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol* 156: 905–919, 2002
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkenin JD: PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10:248–254, 2004
- Buyandelger B, Ng KE, Miodic S, Piotrowska I, Gunkel S, Ku CH, Knöll R: MLP (muscle LIM protein) as a stress sensor in the heart. *Pflugers Arch* 462: 135–142, 2011
- Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM; American Heart Association Professional Education Committee: Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation* 117: 510–526, 2008
- Campbell SE, Korecky B, Rakusan K: Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res* 68: 984–996, 1991

- Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM: CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7: 100, 2006
- Cartledge JE, Kane C, Dias P, Tesfom M, Clarke L, Mckee B, Al Ayoubi S, Chester A, Yacoub MH, Camelliti P, Terracciano CM: Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovasc Res* 105: 260–270, 2015
- Casey LM, Pistner AR, Belmonte SL, Migdalovich D, Stolpnik O, Nwakanma FE, Vorobiof G, Dunaevsky O, Matavel A, Lopes CM, Smrcka AV, Blaxall BC: Small molecule disruption of G $\beta$  $\gamma$  signaling inhibits the progression of heart failure. *Circ Res* 107: 532–539, 2010
- Charron F, Nemer M: GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol* 10: 85–91, 1999
- Charron F, Tsimiklis G, Arcand M, Robitaille L, Liang Q, Molkenstein JD, Meloche S, Nemer M: Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev* 15: 2702–2719, 2001
- Chen CY, Schwartz RJ: Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J Biol Chem* 270: 15628–15633, 1995
- Chen CY, Schwartz RJ: Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac  $\alpha$ -actin gene transcription. *Mol Cell Biol* 16: 6372–6384, 1996
- Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW 2nd, Mochly-Rosen D: Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11114–11119, 2001
- Cheng G, Hagen TP, Dawson ML, Barnes KV, Menick DR: The role of GATA, CArG, E-box, and a novel element in the regulation of cardiac expression of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger gene. *J Biol Chem* 274: 12819–12826, 1999
- Christoffersen TE, Aplin M, Strom CC, Sheikh SP, Skott O, Busk PK, Haunso S, Nielsen LB: Increased natriuretic peptide receptor A and C gene expression in rats with pressure-overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: 1635–1641, 2006
- Clerk A, Bogoyevitch MA, Fuller SJ, Lazou A, Parker PJ, Sugden PH: Expression of protein kinase C isoforms during cardiac ventricular development. *Am J Physiol* 269: 1087–1097, 1995
- Creemers EE, Pinto YM: Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res* 89: 265–272, 2011

Dahlöf B, Gosse P, Guéret P, Dubourg O, de Simone G, Schmieder R, Karpov Y, García-Puig J, Matos L, De Leeuw PW, Degaute JP, Magometschnigg D, PICXEL Investigators: Perindopril/indapamide combination more effective than enalapril in reducing blood pressure and left ventricular mass: the PICXEL study. *J Hypertens* 23: 2063–2070, 2005

D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW 2nd: Transgenic  $G\alpha_q$  overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8121–8126, 1997

de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH: Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. *Hypertension* 23: 600–606, 1994

de Simone G, Kitzman DW, Palmieri V, Liu JE, Oberman A, Hopkins PN, Bella JN, Rao DC, Arnett DK, Devereux RB: Association of inappropriate left ventricular mass with systolic and diastolic dysfunction: the HyperGEN study. *Am J Hypertens* 17: 828–833, 2004

de Simone G, Gottdiener JS, Chinali M, Maurer MS: Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the cardiovascular health study. *Eur Heart J* 29: 741–747, 2008

Devereux RB, Pickering TG, Alderman MH, Chien S, Borer JS, Laragh JH: Left ventricular hypertrophy in hypertension. Prevalence and relationship to pathophysiologic variables. *Hypertension* 9: 53–60, 1987

Devereux RB, Dahlöf B, Gerds E, Boman K, Nieminen MS, Papademetriou V, Rokkedal J, Harris KE, Edelman JM, Wachtell K: Regression of hypertensive left ventricular hypertrophy by losartan compared with atenolol: the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE) trial. *Circulation* 110: 1456–1462, 2004a

Devereux RB, Wachtell K, Gerds E, Boman K, Nieminen MS, Papademetriou V, Rokkedal J, Harris K, Aurup P, Dahlöf B: Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *JAMA* 292: 2350–2356, 2004b

Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D: Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 210: 287–297, 1994

Dorn GW 2nd, Robbins J, Ball N, Walsh RA: Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aortic-banded mice. *Am J Physiol* 267: 400–405, 1994

Dorn GW 2nd, Force T: Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115: 527–537, 2005

Dulce RA, Hurtado C, Ennis IL, Garcarena CD, Alvarez MC, Caldiz C, Pierce GN, Portiansky EL, Chiappe de Cingolani GE, Camili3n de Hurtado MC: Endothelin-1 induced hypertrophic effect in neonatal rat cardiomyocytes: involvement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers. *J Mol Cell Cardiol* 41: 807–815, 2006

Fagard RH, Celis H, Thijs L, Wouters S: Regression of left ventricular mass by antihypertensive treatment: a meta-analysis of randomized comparative studies. *Hypertension* 54: 1084–1091, 2009

Ferreira JC, Brum PC, Mochly-Rosen D:  $\beta$ IIPKC and  $\epsilon$ PKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51: 479–484, 2011a

Ferreira JC, Koyanagi T, Palaniyandi SS, Fajardo G, Churchill EN, Budas G, Disatnik MH, Bernstein D, Brum PC, Mochly-Rosen D: Pharmacological inhibition of  $\beta$ IIPKC is cardioprotective in late-stage hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 5: 980–987, 2011b

Fotakis G, Timbrell JA: *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160: 171–177, 2006

Gallagher JM, Komati H, Roy E, Nemer M, Latinki3 BV: Dissociation of cardiogenic and postnatal myocardial activities of GATA4. *Mol Cell Biol* 32: 2214–2223, 2012

Galzerano D, Tammaro P, del Viscovo L, Lama D, Galzerano A, Breglio R, Tuccillo B, Paolisso G, Capogrosso P: Three-dimensional echocardiographic and magnetic resonance assessment of the effect of telmisartan compared with carvedilol on left ventricular mass a multicenter, randomized, longitudinal study. *Am J Hypertens* 18: 1563–1569, 2005

Glennon PE, Sugden PH, Poole-Wilson PA: Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J* 73: 496–499, 1995

Goldberg M, Steinberg SF: Tissue-specific developmental regulation of protein kinase C isoforms. *Biochem Pharmacol* 51:1089–1093, 1996

Gottdiener JS, Reda DJ, Massie BM, Materson BJ, Williams DW, Anderson RJ: Effect of single-drug therapy on reduction of left ventricular mass in mild to moderate hypertension: comparison of six antihypertensive agents. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *Circulation* 95: 2007–2014, 1997

Grossman W, Jones D, McLaurin LP: Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56–64, 1975

Gu X, Bishop SP: Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 75: 926–931, 1994

Guyton AC, Hall JE: UNIT III The Heart. Kirjassa: Textbook of medical physiology. s. 101–157, 11. painos. Toim. Elsevier Inc, Philadelphia 2006

Haas NB, Smith M, Lewis N, Littman L, Yeslow G, Joshi ID, Murgu A, Bradley J, Gordon R, Wang H, Rogatko A, Hudes GR: Weekly bryostatin-1 in metastatic renal cell carcinoma: a phase II study. *Clin Cancer Res* 9: 109–114, 2003

Hahn HS, Marreez Y, Odley A, Sterbling A, Yussman MG, Hilty KC, Bodi I, Liggett SB, Schwartz A, Dorn GW 2nd: Protein kinase C $\alpha$  negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ Res* 93: 1111–1119, 2003

Hasegawa K, Lee SJ, Jobe SM, Markham BE, Kitsis RN: cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* 96: 3943–3953, 1997

Hayashi D, Kudoh S, Shiojima I, Zou Y, Harada K, Shimoyama M, Imai Y, Monzen K, Yamazaki T, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I: Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 310–319, 2004

He Q, Mendez M, LaPointe MC: Regulation of the human brain natriuretic peptide gene by GATA-4. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: 50–57, 2002

Heidkamp MC, Bayer AL, Martin JL, Samarel AM: Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C  $\epsilon$  and  $\delta$  in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 89: 882–890, 2001

Herzig TC, Jobe SM, Aoki H, Molkentin JD, Cowley AW Jr, Izumo S, Markham BE: Angiotensin II type<sub>1a</sub> receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7543–7548, 1997

Hess AD, Silanskis MK, Esa AH, Pettit GR, May WS: Activation of human T lymphocytes by bryostatin. *J Immunol* 141: 3263–3269, 1988

Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K: Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 35: 19–24, 2000

Huang L, Wolska BM, Montgomery DE, Burkart EM, Buttrick PM, Solaro RJ: Increased contractility and altered Ca<sup>2+</sup> transients of mouse heart myocytes conditionally expressing PKC $\beta$ . *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1114–1120, 2001

Huang CY, Chueh PJ, Tseng CT, Liu KY, Tsai HY, Kuo WW, Chou MY, Yang JJ: ZAK reprograms atrial natriuretic factor expression and induces hypertrophic growth in H9c2 cardiomyoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 973–980, 2004

Huang H, Joseph LC, Gurin MI, Thorp EB, Morrow JP: Extracellular signal-regulated kinase activation during cardiac hypertrophy reduces sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) transcription. *J Mol Cell Cardiol* 75: 58–63, 2014

Hunter JJ, Chien KR: Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure, *N Engl J Med* 341: 1276–1283, 1999

Hwang PM, Sykes BD: Targeting the sarcomere to correct muscle function. *Nat Rev Drug Discov* 14: 313–328, 2015

Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Komuro I: Biased Agonism of the Angiotensin II Type I Receptor. *Int Heart J* 56: 485–488, 2015

Inagaki K, Iwanaga Y, Sarai N, Onozawa Y, Takenaka H, Mochly-Rosen D, Kihara Y: Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC $\epsilon$  and PKC $\beta$ . *J Mol Cell Cardiol* 34: 1377–85, 2002

Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F: Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69: 209–215, 1991

Iwaki K, Sukhatmen VP, Shubeita HE, Chien KR:  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. *J Biol Chem* 265: 13809–13817, 1990

Iwanaga Y, Kihara Y, Inagaki K, Onozawa Y, Yoneda T, Kataoka K, Sasayama S: Differential effects of angiotensin II versus endothelin-1 inhibitions in hypertrophic left ventricular myocardium during transition to heart failure. *Circulation* 104: 606–612, 2001

Izumo S, Lompré AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V: Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 79: 970–977, 1987

Izumo, S, Nadal-Ginard, B, Mahdavi V: Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 339–343, 1988

Jacot JG, McCulloch AD, Omens JH: Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophys J* 95: 3479–3487, 2008

Jessup M, Brozena S: Heart failure. *N Engl J Med* 15: 2007–2018, 2003



Jula AM, Karanko HM: Effects on left ventricular hypertrophy of long-term nonpharmacological treatment with sodium restriction in mild-to-moderate essential hypertension. *Circulation* 89: 1023–1031, 1994

Kamo T, Akazawa H, Komuro I: Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 117: 89–98, 2015

Kang M, Chung KY: PKC- $\epsilon$  mediates multiple endothelin-1 actions on systolic  $\text{Ca}^{2+}$  and contractility in ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 600–605, 2012

Kantola I, Mervaala E: Verenpainelääkehoidon vaikutus vasemman kammion hypertrofiaan (online). Näytönastekatsaus, Käypä hoito -suositus. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2014 (viitattu 11.11.2016). Saatavilla Internetissä: [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi)

Katanasaka Y, Suzuki H, Sunagawa Y, Hasegawa K, Morimoto T: Regulation of Cardiac Transcription Factor GATA4 by Post-Translational Modification in Cardiomyocyte Hypertrophy and Heart Failure. *Int Heart J* 57: 672–675, 2016

Kent RL, Rozich JD, McCollam PL, McDermott DE, Thacker UF, Menick DR, McDermott PJ, Cooper G 4th: Rapid expression of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in response to cardiac pressure overload. *Am J Physiol* 265: H1024–1029, 1993

Kerkelä R, Pikkarainen S, Majalahti-Palviainen T, Tokola H, Ruskoaho H: Distinct roles of mitogen-activated protein kinase pathways in GATA-4 transcription factor-mediated regulation of B-type natriuretic peptide gene. *J Biol Chem* 277: 13752–13760, 2002

Kettunen R: Sydämen läppäviat (online). Lääkärikirja Duodecim 7.1.2014. (viitattu 19.12.2016). Saatavilla internetistä: [www.terveyskirjasto.fi](http://www.terveyskirjasto.fi)

Klein G, Schaefer A, Hilfiker-Kleiner D, Oppermann D, Shukla P, Quint A, Podewski E, Hilfiker A, Schröder F, Leitges M, Drexler H: Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKC $\epsilon$ . *Circ Res* 96: 748–755, 2005

Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE: A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med* 115: 41–46, 2003

Ko LJ, Engel JD: DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13: 4011–4022, 1993

Kohli S, Ahuja S, Rani V: Transcription factors in heart: promising therapeutic targets in cardiac hypertrophy. *Curr Cardiol Rev* 7: 262–271, 2011

Kohonnut verenpaine (online). Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecim ja Suomen Verenpaineyhdistys ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2014 (viitattu 10.11.2016). Saatavilla Internetissä: [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi)

Kohout TA, Rogers TB: Use of a PCR-based method to characterize protein kinase C isoform expression in cardiac cells. *Am J Physiol* 264: 1350–1359, 1993

Koide Y, Tamura K, Suzuki A, Kitamura K, Yokoyama K, Hashimoto T, Hirawa N, Kihara M, Ohno S, Umemura S: Differential induction of protein kinase C isoforms at the cardiac hypertrophy stage and congestive heart failure stage in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res* 26: 421–426, 2003

Komuro I: Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J* 65: 353–358, 2001

Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosveld F: The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 126: 723–732, 1999

Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM: GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11: 1048–1060, 1997

Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR:  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem* 263: 7352–7358, 1988

Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP: Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 108: 7–13, 1988

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study, *N Engl J Med* 322: 1561–1566, 1990

Li T, Liu Z, Hu X, Ma K, Zhou C: Involvement of ERK-RSK cascade in phenylephrine-induced phosphorylation of GATA4. *Biochim Biophys Acta* 1823: 582–592, 2012

Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkentin JD: The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276: 30245–30253, 2001a

- Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE, Molkentin JD: The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 21: 7460–7469, 2001b
- Liebson PR, Grandits GA, Dianzumba S, Prineas RJ, Grimm RH Jr, Neaton JD, Stamler J: Comparison of five antihypertensive monotherapies and placebo for change in left ventricular mass in patients receiving nutritional-hygienic therapy in the Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *Circulation* 91: 698–706, 1995
- Liu Q, Chen X, Macdonnell SM, Kranias EG, Lorenz JN, Leitges M, Houser SR, Molkentin JD: Protein kinase  $C\alpha$ , but not  $PKC\beta$  or  $PKC\gamma$ , regulates contractility and heart failure susceptibility: implications for ruboxistaurin as a novel therapeutic approach. *Circ Res* 105: 194–200, 2009
- Liu Y, Lei S, Gao X, Mao X, Wang T, Wong GT, Vanhoutte PM, Irwin MG, Xia Z:  $PKC\beta$  inhibition with ruboxistaurin reduces oxidative stress and attenuates left ventricular hypertrophy and dysfunction in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* 122: 161–173, 2012
- Long CS, Ordahl CP, Simpson PC:  $\alpha$ 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1078–1082, 1989
- Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP: Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 9: 1654–1666, 1995
- MacMahon SW, Wilcken DEL, Macdonald GJ. The effect of weight reduction on left ventricular mass. A randomized controlled trial in young, overweight hypertensive patients. *N Engl J Med* 314: 334–339, 1986
- Magga J, Vuolteenaho O, Tokola H, Marttila M, Ruskoaho H: B-type natriuretic peptide: a myocyte-specific marker for characterizing load-induced alterations in cardiac gene expression. *Ann Med* 30: 39–45, 1998
- Mann MJ, Dzau VJ: Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* 106: 1071–1075, 2000
- Mishima T, Tanimura M, Suzuki G, Todor A, Sharov VG, Goldstein S, Sabbah HN: Effects of long-term therapy with bosentan on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 35: 222–229, 2000
- Mochly-Rosen D: Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268: 247–251, 1995

Mochly-Rosen D, Wu G, Hahn H, Osinska H, Liron T, Lorenz JN, Yatani A, Robbins J, Dorn GW 2nd: Cardioprotective effects of protein kinase C  $\epsilon$ : analysis by in vivo modulation of PKC $\epsilon$  translocation 86: 1173–1179, 2000

Molkentin JD: The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275: 38949–38952, 2000

Molkentin JD, Dorn GW 2nd: Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63: 391–426, 2001

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN: Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11:1061–1072, 1997

Morimoto T, Hasegawa K, Kaburagi S, Kakita T, Wada H, Yanazume T, Sasayama S: Phosphorylation of GATA-4 is involved in  $\alpha$ 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275: 13721–13726, 2000

Morin S, Paradis P, Aries A, Nemer M: Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol Cell Biol* 21: 1036–1044, 2001

Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J: Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276: 28586–28597, 2001

Mukerji R, Petruc M, Fresen JL, Terry BE, Govindarajan G, Alpert MA: Effect of weight loss after bariatric surgery on left ventricular mass and ventricular repolarization in normotensive morbidly obese patients. *Am J Cardiol* 110: 415–419, 2012

Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P: Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 92: 139–150, 2003

Naruse K, King GL: Protein kinase C and myocardial biology and function. *Circ Res* 86: 1104–1106, 2000

Naskar S, Datta K, Mitra A, Pathak K, Datta R, Bansal T, Sarkar S: Differential and conditional activation of PKC-isoforms dictates cardiac adaptation during physiological to pathological hypertrophy. *PLoS One* 9: e104711, 2014

Neutel JM, Smith DH, Weber MA: Effect of antihypertensive monotherapy and combination therapy on arterial distensibility and left ventricular mass. *Am J Hypertens* 17: 37–42, 2004

Newton A: Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101: 2353–2364, 2001

Oka T, Maillet M, Watt AJ, Schwartz RJ, Aronow BJ, Duncan SA, Molkenin JD: Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res* 98: 837–845, 2006

Parikka H: Kammiohypertrofioiden arviointi EKG:n perusteella (online). Lääkärin käsikirja, 4.4.2016 (viitattu 7.2.2017). Toim. Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla Internetistä: [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E: Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3310–3314, 1982

Pikkarainen S, Kerkelä R, Pöntinen J, Majalahti-Palviainen T, Tokola H, Eskelinen S, Vuolteenaho O, Ruskoaho H: Decoy oligonucleotide characterization of GATA-4 transcription factor in hypertrophic agonist induced responses of cardiac myocytes. *J Mol Med (Berl)* 80: 51–60, 2002

Pikkarainen S, Tokola H, Majalahti-Palviainen T, Kerkelä R, Hautala N, Bhalla SS, Charron F, Nemer M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H: GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *J Biol Chem* 278: 23807–23816, 2003

Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD: Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 118: 400–409, 2016

Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips RA, Roniker B, Kleiman J, Krause S, Burns D, Williams GH: Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation* 108: 1831–1838, 2003

Porter MJ, Heidkamp MC, Scully BT, Patel N, Martin JL, Samarel AM: Isoenzyme-selective regulation of SERCA2 gene expression by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: 39–47, 2003

Qin J, Liu ZX: FAK-related nonkinase attenuates hypertrophy induced by angiotensin-II in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Acta Pharmacol Sin* 27: 1159–1164, 2006

Roman BB, Geenen DL, Leitges M, Buttrick PM: PKC- $\beta$  is not necessary for cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: 2264–2270, 2001

Rosenkranz AC, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH: Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc Res* 57: 515–522, 2003

Ruilope LM, Schmieder RE: Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 21: 500–508, 2008

Rybin VO, Steinberg SF: Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ Res* 74: 299–309, 1994

Saadane N, Alpert L, Chalifour LE: Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol* 127: 1165–1176, 1999

Sadoshima J, Izumo S: The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59: 551–571, 1997

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S: Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 977–984, 1993

Schmieder RE, Messerli FH, Garavaglia GE, Nunez BD: Dietary salt intake. A determinant of cardiac involvement in essential hypertension. *Circulation* 78: 951–956, 1988

Schmieder RE, Schlaich MP, Klingbeil AU, Martus P: Update on reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension (a meta-analysis of all randomized double-blind studies until December 1996). *Nephrol Dial Transplant* 13: 564–569, 1998

Schreiber KL, Paquet L, Allen BG, Rindt H: Protein kinase C isoform expression and activity in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: 2062–2071, 2001

Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M:  $\alpha$ -skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res* 59: 551–555, 1986

Scimia MC, Hurtado C, Ray S, Metzler S, Wei K, Wang J, Woods CE, Purcell NH, Catalucci D, Akasaka T, Bueno OF, Vlasuk GP, Kaliman P, Bodmer R, Smith LH, Ashley E, Mercola M, Brown JH, Ruiz-Lozano P: APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature* 488: 394–398, 2012

Seidman JG, Seidman C: The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104: 557–567, 2001

Shiojima I, Komuro I, Oka T, Hiroi Y, Mizuno T, Takimoto E, Monzen K, Aikawa R, Akazawa H, Yamazaki T, Kudoh S, Yazaki Y: Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *J Biol Chem* 274: 8231–8239, 1999

Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR: Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and

cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 265: 20555–20562, 1990

Simonis G, Briem SK, Schoen SP, Bock M, Marquetant R, Strasser RH: Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic stenosis or dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 305: 103–111, 2007

Song K, Backs J, McAnally J, Qi X, Gerard RD, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN: The transcriptional coactivator CAMTA2 stimulates cardiac growth by opposing class II histone deacetylases. *Cell* 125: 453–466, 2006

Song M, Matkovich SJ, Zhang Y, Hammer DJ, Dorn GW 2nd: Combined cardiomyocyte PKC $\delta$  and PKC $\epsilon$  gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth. *Sci Signal* 8: ra39, 2015

Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ: Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 271: 2183–2189, 1996

Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA: Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105: 1164–1176, 2009

Souroujon MC, Mochly-Rosen D: Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol* 16: 919–924, 1998

Stebbins EG, Mochly-Rosen D: Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of  $\beta$ II protein kinase C. *J Biol Chem* 276: 29644–29650, 2001

Sugden PH, Markou T, Fuller SJ, Tham el L, Molkentin JD, Paterson HF, Clerk A: Monophosphothreonyl extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) are formed endogenously in intact cardiac myocytes and are enzymically active. *Cell Signal* 23: 468–477, 2011

Suomen Verenpaineyhdistys ry:n asettama työryhmä: Kohonneen verenpaineen hoito. *Duodecim* 118, 110–126, 2002

Suzuki YJ, Shi SS, Blumberg JB: Modulation of angiotensin II signaling for GATA4 activation by homocysteine. *Antioxid Redox Signal* 1: 233–238, 1999

Takaya T, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K: Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 283: 9828–9835, 2008

Takeishi Y, Chu G, Kirkpatrick DM, Li Z, Wakasaki H, Kranias EG, King GL, Walsh RA: In vivo phosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase C $\beta$ 2 decreases cardiomyocyte

calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts. *J Clin Invest* 102: 72–78, 1998

Takeishi Y, Ping P, Bolli R, Kirkpatrick DL, Hoit BD, Walsh RA: Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C  $\epsilon$  causes concentric cardiac hypertrophy. *Circ Res* 86: 1218–1223, 2000

Talman V, Tuominen RK, Boije af Gennäs G, Yli-Kauhahuoma J, Ekokoski E: C1 Domain-targeted isophthalate derivatives induce cell elongation and cell cycle arrest in HeLa cells. *PLoS One* 6: e20053, 2011

Talman V, Amadio M, Osera C, Sorvari S, Boije Af Gennäs G, Yli-Kauhahuoma J, Rossi D, Govoni S, Collina S, Ekokoski E, Tuominen RK, Pascale A: The C1 domain-targeted isophthalate derivative HMI-1b11 promotes neurite outgrowth and GAP-43 expression through PKC $\alpha$  activation in SH-SY5Y cells. *Pharmacol Res* 73: 44–54, 2013

Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S: The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 126: 1269–1280, 1999

Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR: Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 89: 1401–1438, 2015

Thattaliyath BD, Firulli BA, Firulli AB: The basic-helix-loop-helix transcription factor *HAND2* directly regulates transcription of the atrial natriuretic peptide gene. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1335–1344, 2002

Thompson JT, Rackley MS, O'Brien TX: Upregulation of the cardiac homeobox gene *Nkx2-5* (*CSX*) in feline right ventricular pressure overload. *Am J Physiol* 274: 1569–1573, 1998

van Berlo JH, Elrod JW, van den Hoogenhof MM, York AJ, Aronow BJ, Duncan SA, Molkenin JD: The transcription factor *GATA-6* regulates pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res* 107: 1032–1040, 2010

van Berlo JH, Aronow BJ, Molkenin JD: Parsing the roles of the transcription factors *GATA-4* and *GATA-6* in the adult cardiac hypertrophic response. *PLoS One* 8: e84591, 2013a

van Berlo, Maillet M, Molkenin JD: Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest* 123: 37–45, 2013b

Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA: Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* 24: 8374–8385, 2004



- Verdecchia P, Angeli F, Borgioni C, Gattobigio R, de Simone G, Devereux RB, Porcellati C: Changes in cardiovascular risk by reduction of left ventricular mass in hypertension: a meta-analysis. *Am J Hypertens* 16: 895–899, 2003
- Wang J, Liu X, Sentex E, Takeda N, Dhalla NS: Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: 2277–2287, 2003
- Wang J, Paradis P, Aries A, Komati H, Lefebvre C, Wang H, Nemer M: Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4. *Mol Cell Biol* 25: 9829–9844, 2005
- Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM: The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47: 125–131, 2011
- Weeks KL, McMullen JR: The athlete's heart vs. the failing heart: Can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology* 26: 97–105, 2011
- Wettschureck N, Rütten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermanns S: Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  in cardiomyocytes. *Nat Med* 7: 1236–1240, 2001
- Willette RN, Minehart H, Ellison J, Simons T, Short B, Pullen M, Ohlstein EH, Nambi P: Effects of endothelin receptor antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on cardiac and renal remodeling in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 277–283, 1998
- Woods RL: Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31: 791–794, 2004
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y: Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96: 438–446, 1995
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y: Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271: 3221–3228, 1996
- Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Yazaki Y: Hypertrophic responses of cardiomyocytes induced by endothelin-1 through the protein kinase C-dependent but Src and Ras-independent pathways. *Hypertens Res* 22: 113–119, 1999
- Yang W, Liu Z, Xu Q, Peng H, Chen L, Huang X, Yang T, Yu Z, Cheng G, Zhang G, Shi R: Involvement of vascular peroxidase 1 in angiotensin II-induced hypertrophy of H9c2 cells. *J Am Soc Hypertens*, 2016

Yasuda N, Miura S, Akazawa H, Tanaka T, Qin Y, Kiya Y, Imaizumi S, Fujino M, Ito K, Zou Y, Fukuhara S, Kunimoto S, Fukuzaki K, Sato T, Ge J, Mochizuki N, Nakaya H, Saku K, Komuro I: Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep* 9: 179–186, 2008

Zhang Q, Tan Y, Zhang N, Yao F: Polydatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and myocardial superoxide generation. *Exp Biol Med* 240: 1352–1361, 2015

Zhou Y, Jiang Y, Kang YJ: Copper inhibition of hydrogen peroxide-induced hypertrophy in embryonic rat cardiac H9c2 cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 385–389, 2007

Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y: Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 271: 33592–33597, 1996