



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Agnieszka Olejnik

*„Rola białka Klotho podczas uszkodzenia
niedokrwiennie-reperfuzyjnego mięśnia sercowego”*

Streszczenie

Promotor: dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula

Kierownik Katedry Analizy Medycznej

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Wrocław 2021

STRESZCZENIE

Zapadalność na choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD) na świecie stale rośnie. CVD są nadal jedną z głównych przyczyn zgonów wśród Europejczyków. Najskuteczniejszą formą terapii ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego jest przywrócenie przepływu krwi w tętnicach wieńcowych za pomocą interwencji farmakologicznej i/lub mechanicznej. Konsekwencją nagłego przywrócenia krążenia w niedokrwionej tkance jest uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (IRI), które prowadzi z kolei do zmian strukturalnych i funkcjonalnych serca oraz śmierci kardiomiocytów. Stąd, kluczowym jest poznanie podstawowych mechanizmów komórkowych, biorących udział w tym procesie oraz poszukiwanie potencjalnych czynników o działaniu kardioprotekcyjnym.

Klotho jest transbłonowym i wydzielniczym białkiem, zidentyfikowanym po raz pierwszy w 1997 r. u transgenicznym myszy. U zwierząt z niedoborem Klotho zaobserwowano skrócony czas życia, podczas gdy nadekspresja tego białka korelowała ze znacznie wydłużonym okresem życia zwierząt. Synteza białka Klotho zachodzi głównie w nerkach i mózgu, jednakże jego ekspresję potwierdzono również w wielu innych narządach, w tym w tkance sercowej. Dobrze poznaną funkcją Klotho jest udział w regulacji metabolizmu oraz zachowaniu równowagi jonowej organizmu. Dowiedziono, iż Klotho uczestniczy w zmniejszeniu stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego i zmian włóknieniowych. Białko to zostało gruntownie przeanalizowane w przebiegu chorób nerek. Wykazano, iż niedobór Klotho może być biomarkerem uszkodzenia nerek i jednocześnie celem terapeutycznym. Ochronny wpływ Klotho wykazano również w neuropatologiach oraz karcynogenezie.

Mimo iż istnieją liczne doniesienia naukowe o ochronnym działaniu Klotho w nerkach i mózgu, jego wpływ na serce uszkodzone podczas niedokrwienia/reperfuzji (IR) nie jest do końca poznany. Dlatego celem pracy była ocena roli białka Klotho i jego wpływu na mechanizmy kardioprotekcyjne podczas IRI serca w badaniach *in vitro* i *ex vivo*. Cele szczegółowe badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej to:

1. Ocena ekspresji białka Klotho w sercu na poziomie komórkowym i tkankowym.
2. Ocena wykorzystania białka Klotho jako markera uszkodzenia serca.
3. Ocena wpływu białka Klotho na żywotność, aktywność metaboliczną i kurczliwość kardiomiocytów w badaniach *in vitro*.

4. Ocena wpływu białka Klotho na stopień uszkodzenia, stres oksydacyjny i degradację białek kurczliwych serca w badaniach *ex vivo*.

W badaniach eksperymentalnych wykorzystano trzy modele IRI: linię komórkową ludzkich miocytów serca (HCM), izolowane serca szczurze, perfundowane metodą Langendorffa oraz izolowane kardiomiocyty szczurze. IRI HCM oraz izolowanych kardiomiocytów wywołano chemicznie. Izolowane serca zostały poddane globalnemu niedokrwieniu poprzez zatrzymanie ich perfuzji. Białko Klotho podawane było wraz z buforami inkubacyjnymi/perfuzyjnymi. Grupę kontrolną stanowiły komórki/serca utrzymywane w warunkach tlenowych. Analizowano ekspresję Klotho oraz wpływ podaży egzogenego białka Klotho na poziomie komórkowym i tkankowym w badaniach *in vitro* i *ex vivo*. W pracy zastosowano testy do analizy jakościowej i ilościowej białka Klotho w HCM i izolowanych sercach. Badano również parametry pracy serca, markery uszkodzenia i stresu oksydacyjnego oraz nasilenie degradacji białek kurczliwych tkanki sercowej. Wpływ podaży białka Klotho na kurczliwość komórek oceniono na modelu izolowanych kardiomiocytów szczurzych.

Aby sprawdzić stan aktualnej wiedzy dotyczącej białka Klotho i jego roli w CVD, dokonano przeglądu najnowszej literatury. W pracy pogładowej przedstawiono podstawowe informacje dotyczące budowy i funkcji biologicznych Klotho. Następnie wskazano na udział białka w ograniczeniu stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, włóknienia i apoptozy przy użyciu modeli komórkowych i zwierzęcych. Istnieje również silna korelacja między polimorfizmem genu *KLOTHO* (*KL*) lub niedoborem białka Klotho a rozwojem CVD u ludzi. Liczne analizy wykazały ochronne działanie Klotho podczas niedokrwienych i toksycznych uszkodzeń tkanek. Regulacja ekspresji genu *Klotho* (*Kl*) lub suplementacja białkiem Klotho u zwierząt działała ochronnie w zmianach, polegających na przeroście i przebudowie mięśnia sercowego i w dysfunkcjach naczyniowych. Praca zawiera również istotne informacje dotyczące ochronnej roli Klotho i czynnika wzrostu fibroblastów 21 (FGF21) w kardiomiocytach. Biorąc pod uwagę dostępną literaturę, jest to pierwsza publikacja, która tak wnikliwie omawia udział białka Klotho w CVD.

Badania eksperymentalne rozpoczęto od oznaczenia komórkowej ekspresji Klotho. Analizy wykazały intensywną ekspresję genu *KL* i białka Klotho w HCM poddanych IRI, co potwierdzono następnie na poziomie tkankowym, w izolowanych sercach szczurzych. Serca w grupie IRI charakteryzowały się osłabioną funkcją mechaniczną oraz wykazały większe uszkodzenie. Wzmoczonej ekspresji białka Klotho w sercach poddanych IRI towarzyszyło również jego uwalnianie do perfuzatu, co korelowało z uszkodzeniem tkanki

i obniżoną funkcją mechaniczną serc. Otrzymane wyniki wskazują na kompensacyjną syntezę Klotho w warunkach stresowych, w celu ochrony komórek serca przed IRI. Wykazano również, iż podaż rekombinowanego białka Klotho zwiększyła żywotność i aktywność metaboliczną HCM uszkodzonych w wyniku IR.

Kolejnym etapem pracy były badania na poziomie tkankowym. IRI doprowadziło do istotnego obniżenia funkcji mechanicznej izolowanych serc szczurzych i do osłabienia kurczliwości izolowanych kardiomiocytów. Suplementacja serc białkiem Klotho podczas IR przyczyniła się do poprawy parametrów hemodynamicznych oraz wyraźnego zwiększenia odzysku funkcji mechanicznej serc. Ponadto, kurczliwość izolowanych kardiomiocytów z grupy IRI+Klotho uległa zwiększeniu. Istotnych informacji dostarczyła również analiza markerów uszkodzenia. Wykazano istotny wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwolnionej z tkanki sercowej w perfuzatach i cytotoksyczności w sercach poddanych IRI. Stopień uszkodzenia był odwrotnie proporcjonalny do odzysku funkcji mechanicznej serca po IRI. Perfuzja serc z białkiem Klotho istotnie ograniczyła uszkodzenie tkanki sercowej. Następnie oceniono nasilenie stresu oksydacyjnego i dowiedziono, iż serca z grupy IRI charakteryzowały się intensywną syntezą reaktywnych form tlenu i azotu (ROS/RNS). Synteza ROS/RNS nasilała się wraz ze stopniem uszkodzenia tkanki sercowej. Po podaży białka Klotho podczas IR zaobserwowano wzmocnioną produkcję antyoksydantów i wysoką całkowitą zdolność antyoksydacyjną w sercach. Zgodnie z dostępną wiedzą, stres oksydacyjny prowadzi do aktywacji enzymów proteolitycznych i degradacji białek kurczliwych mięśnia sercowego. Dlatego też analizie poddano białka kurczliwe, takie jak: troponina I (TnI) i łańcuchy lekkie miozyny 1 (MLC1). W zastosowanym modelu IRI serca wykazano intensywne uwalnianie TnI i MLC1, pozytywną korelację tych parametrów ze stopniem uszkodzenia tkanki oraz ich ujemną korelację z funkcją mechaniczną serc. Badania wykazały, że Klotho przyczyniło się do znacznego obniżenia ilości zdegradowanych białek kurczliwych, uwalnianych z uszkodzonych komórek serca.

Podsumowując, w rozprawie doktorskiej wykazano kardioprotekcyjną rolę białka Klotho w sercu podczas IR na poziomie komórkowym i tkankowym. Białko Klotho syntezowane było kompensacyjnie w odpowiedzi na uszkodzenie i może posłużyć jako marker niedokrwienych zmian *myocardium* w przyszłości. Wywnioskowano, iż Klotho przyczynia się do poprawy czynności serca i ograniczenia dysfunkcji skurczowych, poprzez obniżenie stresu oksydacyjnego i degradacji białek kurczliwych przez enzymy proteolityczne. Klotho może stanowić nowy czynnik prewencyjny i/lub terapeutyczny podczas ostrych zespołów wieńcowych. Dlatego wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej mogą być podstawą

do opracowania nowej strategii diagnostyczno-terapeutycznej CVD. Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, są to pierwsze badania, które wykazały ochronny wpływ białka Klotho z wykorzystaniem modelu IRI serca.

ABSTRACT

The incidence of cardiovascular diseases (CVD) in the world is constantly increasing. CVD are still one of the leading causes of death among Europeans. The most effective therapy for acute myocardial infarction is the restoration of the blood flow in coronary arteries by the pharmacological and/or mechanical intervention. The consequence of the sudden restoration of the blood flow to the ischemic tissue is ischemia/reperfusion injury (IRI), which in turn leads to structural and functional disorders in the heart and death of the cardiomyocytes. For this reason, the key task is to understand the basic cellular mechanisms involved in this process and to explore the potential cardioprotective factors.

Klotho is a transmembrane and secretory protein that was first identified in 1997 in transgenic mice. In Klotho-deficient mice, a shortened lifetime was observed, while in an animal model of Klotho overexpression, the lifespan was extended. While Klotho is produced mainly in the kidneys and brain, it has been recently proven that Klotho is also expressed in many other organs, including the heart muscle. The main function of Klotho is the regulation of metabolism and maintenance of ion homeostasis. It has been proven that Klotho participates in the reduction of oxidative stress, inflammation and fibrosis. Recent studies have underlined the importance of Klotho in renal disorders. Klotho deficiency served as an early biomarker of kidney injury and the therapeutic target. The protective role of Klotho has also been demonstrated in neuropathology and carcinogenesis.

There is a lot of evidence for the protective effect of Klotho in the kidneys and brain. However, an influence of Klotho on the heart during ischemia/reperfusion (IR) remains unknown. The aim of the current work was to investigate the role of Klotho protein during heart IRI, as well as an influence of Klotho on cardioprotective mechanisms in the *in vitro* and *ex vivo* studies. The specific objectives of the research conducted as part of this doctoral dissertation were:

1. To analyse the expression of cardiac Klotho at the cellular and tissue level.
2. To analyse the use of Klotho protein as a marker of heart damage.
3. To analyse the effect of Klotho protein on the viability, metabolic activity and contractility of the cardiomyocytes in *in vitro* studies.
4. To analyse the influence of Klotho protein on the injury, oxidative stress and degradation of cardiac contractile proteins in *ex vivo* studies.

Three models of IRI were used in the experimental part of the investigation: human cardiac myocytes (HCM) cell line, isolated rat hearts perfused with the Langendorff method and isolated rat cardiomyocytes. HCM and isolated rat cardiomyocytes underwent chemical IRI. The isolated rat hearts were subjected to global no-flow ischemia by the cessation of the perfusion. Klotho protein was administered along with the incubation/perfusion buffers. Cells/hearts in the control group were maintained under aerobic conditions. The expression of Klotho and an effect of exogenous Klotho protein administration at the cellular and tissue level in *in vitro* and *ex vivo* studies were evaluated. In the analysis of Klotho protein in HCM and isolated hearts, qualitative and quantitative tests were used. The parameters of heart function, markers of tissue damage and parameters of oxidative stress, as well as the level of degradation of heart contractile proteins were also examined. The effect of Klotho protein administration on cell contractility was assessed in a model of isolated rat cardiomyocytes.

Recent literature has been reviewed to check the state of the art on Klotho protein and its role in CVD. The review article indicated in the PhD thesis presents basic information on the structure and biological functions of Klotho. Then, the role of Klotho in the reduction of oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis in the cellular and animal models was demonstrated. There is also a strong correlation between *KLOTHO* gene (*KL*) polymorphism or Klotho protein deficiency and the development of CVD in humans. Numerous investigations have shown the protective effect of Klotho during ischemic and toxic tissue damage. Regulation of the expression of *Klotho* gene (*Kl*) or supplementation with Klotho protein in animals served preventive during myocardial hypertrophy and remodelling and in vascular dysfunctions. The article also contains an important information on the protective impact of Klotho and fibroblast growth factor 21 (FGF21) in the cardiomyocytes. Taking into account the available literature, it is the first publication that so thoroughly discusses the role of Klotho protein in CVD.

At the beginning of the experimental analysis, the cellular expression of Klotho was studied. Data showed an enhanced expression of *KL* gene and Klotho protein in HCM subjected to IRI, and was then confirmed at the tissue level in the isolated rat hearts. A decrease in heart mechanical function and an increased injury of the hearts subjected to IRI were observed. High expression of Klotho protein in the hearts subjected to IRI was also accompanied by its release into the coronary effluents, which correlated with tissue damage and reduced heart mechanical function. The results indicated the compensatory production of Klotho under stressful conditions in order to protect the heart cells from IRI. Finally, the administration of recombinant Klotho protein increased the viability and metabolic activity of HCM injured by IR.

The next stage of experimental study was the analysis of Klotho at the tissue level. Subjecting the isolated rat hearts and cardiomyocytes to IRI protocol resulted in a significant decrease in parameters of heart mechanical function and cells contractility. Supplementation of the hearts with Klotho protein during IR led to an increase in cardiac haemodynamic parameters and the recovery of heart mechanical function. Moreover, the contractility of isolated cardiomyocytes in the IRI+Klotho group was enhanced. The analysis of injury markers showed an increased activity of lactate dehydrogenase released from the cardiac tissue in coronary effluents and cytotoxicity in the hearts subjected to IRI. The level of cardiac damage was inversely related to the recovery of heart mechanical function. Perfusion of hearts with Klotho protein significantly reduced cardiac tissue damage. Then, the level of oxidative stress was verified and hearts from the IRI group showed an enhanced production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS). ROS/RNS synthesis increased in proportion to the level of tissue damage. An increased production of the antioxidants and a high total antioxidant capacity in the hearts supplemented with Klotho protein during IR were observed. According to the present knowledge, oxidative stress leads to the activation of proteolytic enzymes and the degradation of contractile proteins in the heart muscle. Therefore, the contractile proteins such as troponin I (TnI) and myosin light chains 1 (MLC1) were analysed. Enlarged release of TnI and MLC1 in the heart IRI model was observed. It was positively correlated with the degree of tissue damage and negatively correlated with heart mechanical function. The study showed that Klotho contributed to a significant reduction in the amount of degraded contractile proteins released from the injured cells.

In conclusion, the doctoral dissertation reported the cardioprotective role of Klotho protein in the heart during IR at the cellular and tissue level. Since compensatory production of Klotho protein in a response to injury was observed, it may serve as a marker of ischemic lesion in the *myocardium* in the future. Summarizing, Klotho contributes to the improvement of heart function and contraction by limitation of oxidative stress and degradation of contractile proteins. Klotho may serve as a new preventive and/or therapeutic factor in the acute coronary syndrome. For this reason, data obtained from this PhD thesis may be the basis for a new strategy for the diagnosis and treatment of CVD. To the best of my knowledge, it is the first study to demonstrate the protective effect of Klotho protein using the heart IRI model.