

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A humán szívizom kontraktilitását befolyásoló celluláris és molekuláris
folyamatok tanulmányozása**

Dr. Molnár Andrea

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Témavezető:

Dr. Tóth Attila, Ph.D.

Doktori Iskola:

Laki Kálmán

Doktori program:

Kardiovaszkuláris Megbetegedések

A Szigorlati Bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A bizottság tagjai:

Dr. Kékesi Violetta, Ph.D.

Dr. Soltész Pál, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2010. április 19., 11 óra

A Védési Bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

Opponensek:

Dr. Szokodi István, Ph.D.

Dr. Bíró Tamás, Ph.D.

A bizottság tagjai:

Dr. Kékesi Violetta, Ph.D.

Dr. Soltész Pál, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2010. április 19., 13 óra, I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris betegségeket – közöttük az iszkémiás szívbetegséget – a nyugati társadalmakban vezető halálökként tartjuk számon. A halálozások több mint fele Magyarországon is a szív- és érrendszeri betegségeknek tulajdonítható, melyek közül az iszkémiás szívbetegség a vezető halálok. A szívizomban az oxigén és a tápanyag ellátásának hiánya és az anaerob anyagcsere termékek felszaporodásának következtében funkciózavar, majd szöveti elhalás jön létre. Iszkémia/reperfúzió során a sejtek ATP tartalma és energiatartaléka csökken. Az intracelluláris tér szabad Ca^{2+} tartalma megnő a belső raktárak kiürülése és az extracelluláris térből való Ca^{2+} beáramlás következtében. A szív kontrakciós ereje és pumpafunkciója nagymértékben lecsökken. A kardiomiopátia kialakulásának hátterében számos mechanizmus állhat. Mindezek közül azt tartják a legvalószínűbbnek, hogy az irreverzibilis változások kialakulásában az oxidatív és a nitrozatív stressz játsza a központi szerepet. A szabadgyökök, mint rendkívül reaktív vegyületek számos citopatológiai folyamat előidézői. Károsítják a sejt szerkezetét, és megzavarják a sejt fiziológiás működését. A kardiotoxicitás egyik legutóbb megismert mechanizmusa a poli(ADP-ribóz)polimeráz-1 (PARP-1) enzim túlaktiválódásával függ össze. Különböző tanulmányok bizonyították, hogy a miociták pusztulása apoptózison és nekrozison keresztül is történhet. Az apoptózis általános, egyik jól ismert végrehajtói a kaszpázok.

A Ca^{2+} -jel tér és időbeli korlátai nemcsak a jelátvitel pontos célzottsága miatt fontosak, hanem a sejt túlélése szempontjából is. Az egész sejtre kiterjedő, huzamosabb ideig fennálló intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedés ugyanis olyan folyamatok aktiválásához vezethet, amelyek károsak a sejtre: a mitokondriális membránpotenciál semlegesítésén, a sejtlégzés szétkapcsolásán, apoptózis szignálok (citokróm c) felszabadításán túl aktiválja egyes protein kináz C (PKC) izoenzimeket is. A PKC alapvető és központi szereppel bír a sejtek proliferációjának és differenciációjának szabályozásában, az apoptózis folyamatában, a szervezet védekező mechanizmusában, mediátorok szintézisében, a miofibrilláris kontraktilitás szabályozásában. *In vivo* és *in vitro* iszkémia indukált szívizom károsodás során izolált szívizomsejtekben, perfundált szívben és transzgenikus egér modellben a PKC delta aktiváció a szívizom károsodás mértékét fokozza, ugyanakkor a PKC epsilon a kardioprotekció kialakulásáért felelős. Ezzel szemben, a PKC kontraktilis funkcióra gyakorolt hatásaira vonatkozóan meglehetősen kevés és ellentmondó humán vonatkozású vizsgálati adat áll rendelkezésünkre.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az alábbi két témakör köré csoportosítottuk kérdéseinket:

Munkánk során az alábbi két témakör köré csoportosítottuk kérdéseinket:

1. A protein kináz C szerepe a humán miokardium kontraktilitásában

Az iszkémia/reperfúziót követő kontraktilis változásokban milyen szereppel bírnak a PKC izoenzimek?

2. A miokardiális sejtek sérülésének markerei szívelégtelenségben

Szívelégtelenségben megfigyelhető-e reaktív oxigén vagy nitrogén gyökök megjelenése?
Amennyiben igen, ezek aktiválják-e az apoptózis mitokondriális kaszpáz függő vagy kaszpáz független útvonalát?

3. MÓDSZEREK

3.1. Szövetminták

Humán szívizom minták feldolgozása a World Medical Assosiation által kiadott Helsinki Deklarációnak megfelelően történt. A kísérletek végrehajtását a Magyar Egészségügyi Minisztérium (No. 323- 8/2005-1018EKU) és a Debreceni Egyetem Tudományos Tanács Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (No. DEOEC RKEB/IKEB 2553-2006) is jóváhagyta.

A kísérletek során felhasznált humán bal kamrai szívizom minták egyrészt 8 dilatív kardiomiopátiában szenvedő, Battista műtéten átesett betegtől (NYHA III-IV), másrészt 5, 18 és 56 év közötti, agyhalál állapotában levő szervdonorokból származtak. Ezen egészséges donor szíveket technikai okok miatt nem használták fel transzplantációra. A mintákat kardioplégias oldatban szállították 4 °C-on, majd cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk, és felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

A mechanikai mérésekhez és a biokémiai kísérleteinkben hasonló módon előállított izolált, permeabilizált szívizomsejteket használtuk.

3.2. A miokardiális sejtek sérülésének markerei szívelégtelenségben

Western immunoblot

A humán szívizom mintákban a miofibrilláris fehérjék poli-ADP ribozilációs mértékét, fehérje oldalláncok karboniláltságának fokát, a peroxinitrit kezelés hatására a miofibrilláris fehérjékben létrejövő nitrotirozin oldalláncok képződését, a PARP-1 és a kaszpáz-9 fehérjék expresszióját Western blot technika felhasználásával vizsgáltuk.

Immunhisztokémia

Beágyazást követően 5 µm-es konszekutív metszeteket készítettünk, majd acetonos fixálás után a metszeteket poli(ADP-ribóz) (PAR) (1:100) és apoptózis indukáló faktor (AIF) (1:100) ellenes antitestekkel jelöltük.

3.3. A protein kináz C szerepe a humán miokardium kontraktilitásában

Humán szívizomsejtek rekonstrukciója

Az izolált, permeabilizált kardiomiocitákhoz visszaadtuk a mosás során eltávolított citoszólt ~1 mg miocita protein/ml koncentrációt beállítva. Az aktivációk során a rekonstruált szívizomsejteket 10 (erőmérések) illetve 30 (biokémiai módszerek) percreg inkubáltuk forbol-mirisztil-acetát (PMA, PKC aktivátor), GF 109207X és Gö 6976 (PKC inhibitorok, valamennyit 10 µM koncentrációban) jelenlétében vagy hiányában.

In vitro foszforiláció

A humán szívizom homogenizátumokat rekombináns protein kináz A, protein kináz C (PKC) α , γ , δ , ϵ és η izoenzimekkel 60 percreg 37°C-on inkubáltuk 10 mM magnézium és 100 µM [γ -³²P] ATP jelenlétében HEPES pufferben. A rekombináns PKC izoenzimek kináz aktivitásának mérésére 1 mg/ml hiszton III S szubsztrátot alkalmaztunk. A rekombináns PKC izoenzimek kináz aktivitását szcintillációs számlálóval, valamint a miofibrilláris fehérjékbe épült ³²P-t autoradiográfiával detektáltuk.

Western immunoblot

Három PKC izoforma expressziós szintjét (α , δ és ϵ) vizsgáltuk humán szívizom-homogenizátumokban. A frakciók fehérjetartalmát BCA assay-vel határoztuk meg, BSA standard alapján, és azt 4 mg/ml-re állítottuk be RIPA hozzáadásával. Minden mintából 50 µg protein homogenizátumot illetve kontrollként humán rekombináns PKC izoenzimeket vittünk

fel 10%-os gradiens géltre. A molekulasúly szerint szétválasztott fehérjéket 1%-os tejporban blokkoltuk 1 óráig, majd az 1%-os tej-PBS-ben hígított elsődleges PKC α (1:5 000) PKC δ és PKC ϵ (mindkettő 1:1 000)) ellenes antitesttel inkubáltuk. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (1:50 000) inkubáltuk. A jeleket felerősített chemiluminescencia (ECL) segítségével autoradiográfiás filmen tettük láthatóvá. A kapott jel intenzitása arányos a membránon levő fehérje mennyiségével.

PKC izoenzimek transzlokációja

Endogén PKC α , β I, δ és ϵ izoformák citoszólból a kontraktilis fehérjékhez történő transzlokációját vizsgáltuk. A membránrendszerüktől megfosztott szívizomsejtekhez visszaadtuk a citoszólt (1 mg/ml, 450 μ l/cső) és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk kalcium jelenlétében (5 mM) vagy hiányában, valamint forbol-mirisztát-acetát (PMA, 10 μ M) jelenlétében vagy hiányában. A sejteket 3 alkalommal mostuk izoláló oldattal (centrifugálás: 1000 rpm, 2 perc), az inkubáció során alkalmazott kalcium és PMA koncentráció mellett. Ezt követően a mintákat 5 percig főztük 60 μ l SDS-mintapufferrel majd 30 μ l mintából a PKC α , β I, δ és ϵ fehérjék mennyiségét határoztuk meg. A fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált másodlagos antitesteket, Western immunoblot és ECL módszereket alkalmaztunk. A sávok intenzitását ImageJ software felhasználásával mértük, az értékeket optikai denzitásban (OD) határoztuk meg.

Citoszól szabad kalcium koncentrációjának meghatározása

A PKC α kalcium függő transzlokációjának vizsgálatakor membránrendszerétől megfosztott szívizomsejteket citoszól és 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5 vagy 10 mM hozzáadott Ca²⁺ jelenlétében illetve kalcium mentes oldatban inkubáltuk. A szabad kalcium koncentráció meghatározása Fluo-3 fluoreszcencia intenzitás mérésének segítségével történt.

Gel-overlay assay PKC α -kötő fehérjék kimutatására

A PKC α potenciális horgonyzó fehérjéit overlay assay-vel vizsgáltuk membránrendszerüktől megfosztott humán szívizomsejteken. Továbbá immunprecipitációs módszerrel vizsgáltuk, hogy a tisztított, rekombináns TnI és PKC α molekulák között van-e kölcsönhatás. Az izolált, permeabilizált kardiomiocitákat SDS-mintapufferben főztük, nitrocellulóz membránra cseppentettük. A membránok blokkolását követően 2 órán át inkubáltuk azokat 1%-os tej-TBS-ben 2 μ g/ml tisztított, rekombináns PKC α , 10 μ M forbol-mirisztát-acetát (PMA) és 5 mM Ca²⁺ jelenlétében. A kontroll membránokhoz nem adtunk

tisztított, rekombináns PKC α -t. A membránokat 3 alkalommal mostuk 5 mM Ca²⁺-mal kiegészített TBS-ben, majd PKC α ellenes elsődleges antitesttel inkubáltuk (1:20 000). A fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált másodlagos antitesteket, Western immunoblot és ECL módszereket alkalmaztunk.

Immunhisztokémia

Beágyazást követően 10 μ m-es konszekutív metszeteket készítettünk, majd acetonos fixálás után a metszeteket PKC α és TnI ellenes antitestekkel (mindkettő 1:100) jelöltük.

Erőmérés permeabilizált humán szívizom preparátumokon

A szívizomsejteket a -80 °C-on tárolt humán szívizom minták felolvasztása után mechanikus úton izoláltuk. A membránjaitól megfosztott szívizomsejteket szilikon ragasztó segítségével rögzítettük a mechanikai mérőrendszeren. Az izometriás kontraktilis erőt a szívizomsejt relaxáló oldatból Ca²⁺-tartalmú aktiváló oldatba történő átvitelét követően mértük. Az izometriás csúcserő ($F_{\text{totál}}$) kifejlődése után meghatároztuk az aktin-miozin ciklus sebességére jellemző kinetikai paramétert (k_{tr}). Az ún. passzív erőkomponenst ($F_{\text{passzív}}$) a Ca²⁺ kontraktúrák után relaxáló oldatban mértük. A Ca²⁺-aktivált izometriás erőt (F_o) a következő képlet szerint számoltuk: $F_o = F_{\text{totál}} - F_{\text{passzív}}$. A kontraktilis rendszer Ca²⁺-érzékenységének (pCa_{50}) meghatározására a szubmaximális Ca²⁺ koncentrációknál mért erőértékeket a maximális aktivációnál kapott erőértékekre (F_{max}) normálizáltuk.

A rendszerbe az endogén PKC molekulákat a felülúszó (citoszól) visszaadásával biztosítottuk. Kísérleteinkben PKC aktiváló szerként kalciumot, forbol-mirisztil-acetátot (PMA), gátlószerként GF 109207X-t (nem szelektív PKC inhibitor) és Gö 6976-t (szelektív Ca²⁺-dependens PKC α és β I inhibitor) használtunk. Majd ismételt Ca²⁺-erő összefüggés felvételét követően ezek hatását egy második Ca²⁺-erő összefüggés regisztrálásával vizsgáltuk.

Statisztikai módszerek

A nyert adatokat Microsoft Excel program segítségével táblázatos formában rendeztük. Az ábrákat és az illesztéseket részben az Origin (Microcal Software, Inc., MA, USA), részben a Graph Pad program segítségével készítettük el. A disszertációban bemutatott adatokat átlag \pm SEM formában tüntettük fel. Az egyes kísérletekhez tartozó elemszámot a megfelelő ábrák alatt tüntettük fel. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a Student-féle t -próba (ugyanazon sejten végzett kísérletek esetében

páros, egyéb esetekben páratlan próbát használva) eredményeként a kapott p érték kisebb volt 0,05-nél.

A Western immunoblot során az egyes minták fehérjemennyiségét Ponceau-vörös festés után denzitometriás analízissel hasonlítottuk össze. Az eredményeket 4-10 független kísérlet elvégzése alapján kvantitáltuk. Az értékeket átlag \pm S.E.M. formában fejeztük ki. A különbségeket a Student-féle *t*-próba segítségével $P < 0,05$ -es szignifikancia szint mellett tekintettük szignifikánsnak

4. EREDMÉNYEK

4.1. A miokardiális sejtek sérülésének markerei szívelégtelenségben

Oxidatív károsodások kimutatása szívelégtelenségben

Méréseink alapján a kardiális fehérjék oldalláncainak karboniláltsága szívelégtelenségben $118,3 \pm 22,3$ OD, míg a donorokban $38,7 \pm 12,1$ OD volt. Szívelégtelen betegekből és a donorokból származó mintáinkban a nitrált fehérjék tekintetében nem találtunk különbséget. Ezen adatok fokozott oxidatív stressz jelenlétére utaltak szívelégtelenségben.

Az oxidatív hatások következményeinek vizsgálata

Az oxidatív hatásokkal összhangban poli(ADP-ribozilált) fehérjék mennyiségében mintegy 2,3-szeres növekedés volt megfigyelhető a szívelégtelen betegek mintáiban. Az immunfestési mintázat alapján a poli(ADP-ribozilált) fehérjék sejten belüli megoszlása egyértelműen a sejtmagra lokalizálódott a szívelégtelen betegek és a donorok szövetszövetmintáinak metszetein. PAR-pozitív sejtmagok aránya szignifikánsan nagyobb volt szívelégtelen csoportban. A növekedés 3,1-szeresnek adódott. Az immunoblot nem mutatott szignifikáns PARP-1 expressziónövekedést a szívelégtelen betegek mintáiban. Ezen túlmenően azonban, az irodalmi adatokkal megegyezően mi is nagymértékű PARP-1 degradációt detektáltunk mind a donor, mind a szívelégtelen szívekben.

A kontroll donor mintákhoz képest a szívelégtelen betegekből származó mintákban háromszorosára nőtt a prokaspáz-9 mennyisége. Kísérleteink szerint AIF kiáramlás a mitokondriumból sem donor, sem szívelégtelen szívizomzatban nem volt megfigyelhető.

4.2. Protein kináz C szerepe a humán miokardiális kontraktilitásban

Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek kalcium aktiválta kontraktilis erejére

A permeabilizált humán kamrai szívizomsejteket félmaximális kontrakciót kiváltó Ca^{2+} koncentráció mellett (pCa 5,8; a kifejlődő aktív erő a maximum $62 \pm 1\%$ -a) inkubáltuk 10 percig. Ez a kezelés a maximális Ca^{2+} aktivált kontrakciós erő $37 \pm 5\%$ -os csökkenését eredményezte. Ezzel szemben, a citoszól jelenlétében hasonló módon kezelt sejtek (kontrakciós erő az inkubáció alatt: a maximum $56 \pm 8\%$ -a) az erőcsökkenéstől teljes mértékben védettek voltak ($2 \pm 3\%$ -os erő növekedés a kezelés végére). A mechanikai változásokkal párhuzamosan a sejtek szerkezetében (harántcsíkolat) bekövetkező változásokat is rögzítettük, a fénymikroszkópos harántcsíkolat mindkét kezelést követően jelentősen elmosódott. A továbbiakban a citoszolikus fehérjék hozzájárulását vizsgáltuk. Az általános PKC aktiválószer PMA (10 perces kezelés) nem volt hatással sem a kontraktilis erőre, sem a citoszól mediált védelemre. Mindemellett a GF 109203X nem mutatott hatást a 10 perces Ca^{2+} kontraktúra hiányában (a maximális erő $2 \pm 3\%$ -os növekedése).

Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek passzív feszülésére

Az izolált szívizomsejtek kalcium független passzív erejét $2,2 \mu\text{m}$ szarkomerhosszon vizsgáltuk. Ellentétben a Ca^{2+} aktiválta maximális aktív erővel humán kardiomiocitákban a passzív erő szignifikánsan magasabb értéket vett fel 1 mM Ca^{2+} -ot tartalmazó oldattal végzett inkubáció hatására. A citoszól hozzáadása szignifikáns mértékben antagonizálta ezt a hatást. Ugyanakkor kísérleteinket PKC aktivátor PMA és nem szelektív PKC inhibitor GF 109203, valamint Gö 6976 hozzáadásával megismételve sem Ca^{2+} jelenlétében, sem hiányában nem tapasztaltunk változást a passzív erőben az inhibitor hiányába mért értékekhez képest.

Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek kalcium érzékenységére

A kontraktilis rendszer kalcium érzékenysége (pCa_{50}) és a Ca^{2+} -erő összefüggés meredekségére jellemző paraméter (nHill) nem változott szignifikánsan sem a PKC aktivációt (PMA) sem az inaktivációt (GF 109203 és Gö 6976) kiváltó kezeléseket követően.

PKC izoenzimek expressziója humán szívizomsejtekben

Az elvégzett kísérletek igazolták, hogy a humán szívizomban legnagyobb mennyiségben előforduló izoforma, a PKC α expressziós szintje közel húszszor nagyobb, mint a vizsgált másik két izoformáé, a PKC δ és PKC ϵ .

Humán miokardiális fehérjék in vitro foszforilációja PKC-vel

Az izoenzimek közötti különbségek nemcsak az aktiváló kofaktorok iránti igényben, szöveti expresszióban, lokalizációban mutatkoznak meg, hanem az eltérő szubsztrátokban is. A Ca^{2+} -dependens PKC α és γ közel azonos aktivitást és szubsztrát specificitást mutatott, míg a Ca^{2+} -független izoformák meglehetősen egyedi mintázattal bírtak. A PKC δ izoenzimnek volt a legnagyobb kináz aktivitása miokardiális fehérjéken, és szelektíven foszforilált egy 26 kDa molekulatömegű fehérjét. Míg a PKC ϵ aktivitása adódott a legalacsonyabbnak, és ez a kináz egy 60 kDa molekulatömegű fehérjét foszforilált specifikusan. A PKC η által foszforilált két fehérje molekulamérete is eltérő, >200 kDa és 48 kDa volt.

PKC α intracelluláris target fehérjéinek kimutatása

Kísérleteinket endogén PKC α , β I, δ és ϵ izoformák citoszólból a kontraktilis fehérjékhez történő transzlokációjának vizsgálatával folytattuk. Kontroll körülmények között, Ca^{2+} hiányában az izoenzimket túlnyomórészt a citoszólban lehetett kimutatni, csak csekély mértékű asszociáció volt megfigyelhető a PKC izoenzimek és a kontraktilis fehérje rendszer között. Ca^{2+} jelenlétében a PKC α kötődése a kontraktilis rendszerhez szelektíven nőtt. A széles körben használt diacil-glicerol analóg PMA-nak egymagában nem volt megfigyelhető szignifikáns hatása a PKC izoenzimek és a kontraktilis apparátus közti interakcióra. Ca^{2+} és PMA együttes jelenlétében PKC α és ϵ szignifikáns transzlokációja volt megfigyelhető. Eredményeink egyértelműen azt sugallják, hogy döntően a Ca^{2+} -nak van szerepe a PKC α transzlokációjának szabályozásában. A PKC α transzlokáció Ca^{2+} -függésének vizsgálatokor a félmaximális aktivációhoz szükséges Ca^{2+} koncentráció (EC_{50}) 645 nM-nak adódott.

Ca^{2+} -függő cTnI és PKC α kölcsönhatás (kötődés)

A miofibrilláris rendszer öt fehérjéjét azonosítottuk lehetséges PKC alfa kötő fehérjeként. Ezek közül az egyik motilitása a ~ 24 kDa tömegű TnI motilitásával egyezett meg. *In vitro* fehérjekötéses analízissel megállapítottuk, hogy a tisztított, rekombináns TnI és PKC α molekulák között Ca^{2+} -dependens kölcsönhatás van. Ugyanakkor ezt a hatást nem befolyásolta az a tény, ha a TnI molekula Tn-komplexben (TnI:TnT:TnC aránya 1:1:1) volt jelen.

PKC α és cTnI együttes előfordulásának (kolokalizáció) kimutatása humán kamrai izomzatban

Biokémiai eredményeinkkel összhangban az immunfluoreszcens felvételeken megfigyelhető a PKC α és cTnI kolokalizációja humán kamrai szövetmintákban.

5. MEGBESZÉLÉS

Egyre növekszik azoknak az experimentális és klinikai bizonyítékoknak a száma, melyek szerint az oxidatív stressz szerepet játszik a szív működés rendellenesség és a szívelégtelenség kialakulásában. A fokozott lipidperoxidációt jelző plazma malondialdehid (MDA) emelkedés kifejezett iszkémiás és nem-iszkémiás dilatatív kardiomiopátiában, koncentrációja korrelál a tünetek súlyosságával, fordított arányban áll az ejekciós frakcióval és a terhelhetőséggel. Állatkísérletben a kontraktilitás csökkenésével egyidejűleg megnövekedett malon-dialdehid szintet mértek, ami reaktív oxigéngyökök jelenlétére, lipid peroxidációra utal. Napjaink megfigyelése, hogy az oxidatív stressz markerének tartott F2-izoprosztán (8-epi-PGF₂) szintjének emelkedése a perikardiális folyadékban arányos a szívelégtelenség súlyosságával, direkt kapcsolat áll fenn koncentrációjának nagysága és a bal kamra végdiasztolés és végszisztolés átmérői között. Számos kísérletben bizonyították a szívizomsejteket érő oxidatív stressz kontraktilis funkcióra kifejtett káros hatását, és vizsgálták ennek szerteágazó molekuláris hátterét. A miokardiális oxigéngyökök legfontosabb forrásai az ismétlődő iszkémia/reperfúziós periódusok, gyulladással citokinek, catecholamin auto-oxidáció, prosztaglandinok. A szervezet elégtelen antioxidáns enzimrendszerei (szuperoxid dizmutáz, kataláz és glutation peroxidáz) valamint a védelmi rendszer működéséhez szükséges vitaminok és ásványi anyagok hiánya (E vitamin, C-vitamin, cisztein) következtében felszabadulnak a reaktív szabadgyökök a szívizomsejtekben. Szívelégtelenségben szenvedő betegekben összefüggést találtak a szívelégtelenség klinikai stádiumai, az antioxidánsok és oxidánsok szintje között: A NYHA III stádiumban lévő betegekben szignifikánsan alacsonyabb A vitamin, E vitamin és lutein szinteket, míg magasabb malondialdehid értékeket mértek, mint a NYHA II állapotban levő betegekben. Szívelégtelenségben reaktív oxigéngyök forrás lehet a sejtben számos speciális enzim: a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidáz, a cyclooxygenázok, a nitrogén-monoxid szintáz; a mitokondriális elektrontranszport lánc; gyulladással környezetben aktivált neutrofil granulociták.

5.1. A miokardiális sejtek sérülésének markerei szívelégtelenségben

Méréseink alapján humán szívelégtelen mintákban szignifikáns oxidatív károsodás mutatható ki, szemben a kontroll humán donor mintákkal. Ez igazolja azt, hogy a mintavétel, a tárolás és a feldolgozás folyamata nem járt jelentős oxidatív stresszel. A szívizomsejtek, az endokardium, a koronáriák endothelje, a szív idegei mind kalciumfüggő nitrogénmonoxid-szintáz tartalmaznak. A nitrogén-monoxid kulcsszerepet játszik a keringési rendszer élettani szabályozásában, mint például a vazodilatáció, a trombocita- és fehérvérsejt-aktiváció gátlása, a szívizom kontraktilis funkciójának szabályozása, az oxigénfogyasztás csökkentése, de antiapoptotikus és gyulladásgátló hatásai is ismertek. A nitrogén-monoxid kulcsfontosságú a különféle szív-, illetve keringési betegség káros következményei elleni védelemben is. Mindaddig pozitív, védő, szabályozó hatását mediátorként viselkedik, amíg a peroxinitrit-képződés fokozódása következtében ez utóbbi hatása előtérbe nem kerül. Korábbi vizsgálatok eredményei szerint kis emlősökben a szívelégtelenség kialakulásában szerepet játszik a nitrogén-monoxidból és szuperoxid anionból fiziológias körülmények között is képződő reaktív nitrogén gyök, a peroxinitrit megnövekedett termelődése. Szívelégtelenségben a fokozott NO képződés hátterében az indukálható nitrogénmonoxid szintetáz (iNOS) enzim expressziós szintjének és aktivitásának növekedése áll.

Állatkísérletes modellekben iNOS overexpresszió és a peroxinitrit megnövekedett termelődése valamint dilatatív kardiomiopátia, vezetési zavarok, hirtelen szívhalál és nem utolsósorban a szívelégtelenség között szoros összefüggést mutattak ki. Patkányokon végzett kísérletek is megerősítették, hogy a miokardiális iNOS aktivitás fokozódás hatására romlik a szív pumpafunkciója és károsodik a β -adrenerg válaszkészség. Humán szívelégtelenségben kimutatták a neuronális (nNOS vagy NOS1) nitrogén-monoxid-szintáz fokozott aktivitását is. Annak ellenére, hogy a peroxinitrit indukált nitrotirozin oldallánc képződést állatokból származó és humán szívizom preparátumokban is kimutatták, eredményeink szerint szívelégtelen betegekből és a donorokból származó mintáinkban a nitrált fehérjék tekintetében nincs különbség.

A szívelégtelenség kialakulásában nagy jelentőséggel bír a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP-1) aktivációja. Reaktív nitrogén intermedierek és oxigén származékok, illetve ezek hatására aktiválódó mátrix metalloproteinázok, valamint kaspázok és az oxidatív károsodások okozta DNS lánc törések legfontosabb hatása a PARP-1 enzimek aktiválása.

Korábbi vizsgálatok eredményei szerint kis emlősökben a PARP-1 enzim túlzott aktivációja megfigyelhető többek között iszkémia-reperfúzió, diabetes és kardiotoxikus szerek

indukálta szívelégtelenségben. Széles körben vizsgált a kaspázok szerepe, a krónikus szívelégtelenség és az apoptózis vonatkozásában a megfigyelések ellentmondásosak.

A mátrix metalloproteinázok aktivációja is ismert krónikus szívelégtelenségben. Mind a kaspázok, mind az MMP-k képesek PARP-1 enzim hasítása révén annak inaktiválására szívelégtelenségben. Eredményeink szerint megfigyelhető a PARP aktiváció szívelégtelen betegek szívizom mintáiban, ami további példával bővíti azon humán betegségek sorát, melyekben PARP-1 aktiváció kialakul. Ugyanakkor mi nem tudtuk kimutatni szignifikáns PARP-1 expresszió növekedést a szívelégtelen betegek mintáiban, ami felveti, hogy a mintáinkba megfigyelt fokozott poli(ADP-ribozil)áció hátterében a PARP-1 katalitikus alegység aktivitás fokozódása áll. PARP-1 szabályozása elsősorban a DNS-törések vagy intracellularis kalcium koncentráció növekedés szintjén történik.

Az apoptózis jelátviteli, majd végrehajtó szakaszában fontos szerepet játszanak a kaspázok. Degradatív enzimsajátságaik miatt a kaspázok prokaspázok formájában találhatóak – elsősorban – a sejtek citoplazmájában. Az „érett” kaspázok heterotetramer szerkezetűek. A kaspáz-8 és -9 a leggyakoribb úgynevezett iniciátor kaspáz, amely a jelátviteli úton elindítja a kaskádot, míg a legfontosabb végrehajtó kaspáz a kaspáz-3. A kaspázok igen sok szubsztráttal rendelkeznek, ezek részben struktúrfehérjék, részben olyan enzimek, amelyek aktiválásuk után részt vesznek a sejt lebontásában. A PARP-1 az apoptózis kialakulása során általában a kaspáz-9 általi hasítás áldozatává válik. Eredményeink azt mutatták, hogy a kaspáz-9 overexpresszálódott (prokaspáz mennyisége nőtt) humán szívelégtelenségben. A kapcsolat a PARP-1 aktiváció és hasítás, a sejthalál apoptotikus vagy nekrotikus formája között bonyolult, de valószínűsíthető, hogy a PARP-1 túlzott aktivációja a sejtek NAD⁺ és ATP raktárainak kiürítése révén nekrozist eredményez. Míg a PARP-1 hasítása, ami az enzim inaktiválódásához vezet, protektív mechanizmusként utat enged az apoptózisnak, mivel megőrzi a sejtek NAD⁺ és energia készletét az energiaigényes további apoptotikus folyamatok számára.

Mindezek mellett figyelembe kell venni, hogy a vizsgált humán szívizom mintáink különböző eredetűek voltak. Befolyásolhatja az apoptózis és a PARP-1 aktiváció kapcsolatát a betegek NYHA stádiuma, gyógyszeres kezelése, a mintavétel helye (endo-, epikardium). A szívelégtelenség etiológiájának sokszínűsége hozzájárulhatott az eltérő megfigyelésekhez (az iszkémiás eredetű szívelégtelenségben az oxidatív stresszmarkerek által mediált diszfunkció figyelhető meg, míg dilatatív kardiomiopátiát okozhatja alkohol, vagy vírusfertőzés). Megfigyeléseink szerint humán szívelégtelenségben a PARP-1 aktiváció nem eredményez apoptózist, az AIF transzlokáció hiányának megfelelően. Az azonban lehetséges, hogy enyhe

DNS károsodás esetén a PARP-1 aktiválódik és szerepet játszik a DNS-hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében. Spekuláció szintjén az is felvethető, hogy mintáink végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő betegekből származtak, akik talán sikeresen alkalmazkodtak a magasabb reaktív gyök szinthez és a következményes PARP-1 aktivációhoz.

Ezen megfigyeléseink ellenére nem vitatott, hogy állatkísérletekben a reaktív oxigén szabadgyökök által kiváltott DNS károsodások, melyek végső soron apoptózishoz vezetnek, fontos szerepet játszanak betegségek kialakulásában (pl. szívelégtelenség). Állatkísérletekben a PARP-1 enzim specifikus gátlószereivel és antioxidánsokkal csökkenteni lehet az infarktus során elhalt terület nagyságát, a szöveti károsodásokat, a miokardium diszfunkciót. Az a tény, hogy a PARP-1 inhibitorok csökkentik a citoplazmatikus NAD^+ katabolizmust, és feltehetőleg mérséklék a szabadgyökök indukálta mitokondriális NAD^+ vesztést, feltételez egy kapcsolatot az oxidatív mitokondriális károsodás és a PARP-1 aktiválódás között. Az oxidatív stressz vizsgálata humán kórképekben és experimentális modellekben közelebb vihet a szabadgyökök okozta kórfolyamatok megértéséhez, a kardiovaszkuláris betegségek megelőzéséhez és kezeléséhez.

5.2. Protein kináz C szerepe a humán miokardiális kontraktilitásban

További kísérleteinkben a PKC funkcionális jelentőségét mutattuk ki a humán szívmuszkuláció kontraktilis erejének fenntartásában, elnyújtott intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció jelenlétében, mely az iszkémia/reperfúzió egyik jellegzetes eseménye.

Ismert, hogy a PKC izoenzimek részt vesznek a humán szívmuszkuláció erőgenerálásának szabályozásában. *In vitro* kísérletekben bebizonyosodott, hogy troponin I (TnI), troponin T (TnT), miozin könnyűlánc 2 (MLC-2), kardiális miozin kötő C fehérje (cMyBP-C) és dezmin szubsztrátjai a PKC-nek. A molekulák PKC-mediált foszforilációja csökkenti a miozin ATP-áz aktivitását és a maximális erőt, meghosszabbítja az izovolumetriás relaxáció idejét, növeli az utóterhelést, csökkenti a keresztmetszések kialakulásának a sebességét és a kontraktilis erőt. Patkány szívelégtelen modellen megfigyelték, hogy a szívelégtelenség kísérő jelensége a fokozott PKC függő miofibrilláris fehérje foszforiláció és a csökkent kontraktilitás. Sőt valószínűsítették, hogy a fentebb leírt eltérést a troponin fehérjék PKC mediálta foszforilációja okozza. Saját és irodalmi adatok közötti ellentmondás (növekvő versus csökkenő kontraktilitás) egyrészt adódhat a különböző fajok szívmuszkuláció sejtjeiben kifejeződő izoformák eltérő jellegéből, másrészt a PKC hatásait vizsgáló eltérő kísérletes körülményekből. A PKC szerepével foglalkozó korábbi beszámolóinkban a PKC aktivitás

jobbára jelentősen magasabb volt, mint az egészséges állapotban fiziológias körülmények közötti érték. Így például szívelégtelenségben vagy transzgenikus állatmodellekben a magasabb PKC expresszió vezethet a PKC egészségesekben betöltött szerepének elfedéséhez. *In vitro* kináz kezelések hatására a miofibrilláris fehérjék foszforilációja jelentősen meghaladhatja a fiziológias szintet. Végül a szubsztrátok hely-specifikus mutagenézise is afiziológias hatásokhoz vezethet. Ezen fenti példákkal szemben mi rekonstruáltuk a szívizomsejteket, fiziológias mennyiségű PKC izoformákat, endogén miofibrilláris fehérjéket és a PKC enzimek saját célfehérjéit alkalmaztuk kísérleteinkben. Ennek megfelelően eredményeink is eltérnek a korábban találtaktól a PKC kontraktilitásban betöltött szerepére vonatkozóan. Adataink arra utalnak, hogy szívelégtelenségben, melynek kialakulását a PKC útvonal diszregulációjával jellemzünk, nem csak a fiziológias szubsztrátok fokozott foszforilációját, hanem egyéb, fiziológias körülmények között nem foszforilálódó fehérje foszforilációját is megfigyelhetjük, ami mintegy elrejtheti a fiziológias hatásokat.

Az eltérő kísérletes körülményeken túl, szembetűnő különbségeket találtak rágsálók valamint humán szívizom mintákban expresszáldó PKC izoformákban. Míg kis állatokban (patkány, egér) a PKC ϵ a domináns izoforma, addig humán mintákban a PKC α . Saját elvégzett kísérleteink igazolták, hogy a humán szívizomban legnagyobb mennyiségben előforduló izoforma, a PKC α expressziós szintje közel húszszor nagyobb, mint a vizsgált másik két izoformáé, a PKC deltáé és epszilóné. A fajok közötti közös vonás, hogy magasabb PKC expresszió figyelhető meg szívelégtelenségben végstádiumú dilatatív kardiomiopátiában és súlyos aorta sztenózisban.

A PKC izoenzimek aktivitása három úton szabályozható, (i) szelektív expresszióval, (ii) különböző szubsztrát specificitással (iii) vagy eltérő célra irányítással (targeting). Kísérleteinkben mindezen lehetőségeket vizsgáltuk humán szívizom mintákban.

Saját kísérleteinkben a PKC izoenzimek szubsztrát specificitást *in vitro* foszforilációs assay-vel vizsgáltuk humán kamrai szívizomban. Eredményeink szerint habár a különböző izoenzimek esetében jelentős különbségek voltak felismerhetőek, a jól ismert, funkcionálisan karakterizált fehérjéket (troponinok, miozin könnyű lánc) valamennyi izoforma képes volt foszforilálni. Mindezek arra utalhatnak, hogy az *in vivo* specificitásban a különféle izoformák szubcelluláris lokalizációja, targetingje kulcsfontosságú.

Kísérleteink java részében ezért a PKC α intracelluláris targetingjét vizsgáltuk részletesen. Korábbi kísérletekben bebizonyosodott, hogy a Ca²⁺-koncentráció emelése szelektíven a PKC α transzlokációját indukálta patkány szívekben. Ezzel összhangban saját adataink szerint humán kamrai szívizomban egyaránt megfigyelhető. Ez felveti a PKC α

kiemelkedő szerepét a kalcium-függő miofibrilláris-kontraktilitás szabályozásában. Egyes adatok szerint a PKC aktiváció csökkenti a miofibrilláris rendszer kontraktilitását, míg saját eredményeink szerint a PKC α a kontraktilitás fenntartásához járul hozzá. Mindenesetre a PKC α ígéretes terápiás célpontnak tűnik a szívizom kontraktilitásának javítására. Ezt a potenciált azonban feltehetően sejten belüli kötőhelyeinek (targeting) pontosabb feltárását követően tudjuk kihasználni.

Következő lépésben PKC α horganyzó fehérjéket vizsgáltuk. Kimutattuk a PKC α Ca²⁺-függő transzlokációját a miokardiális troponin I-hez, mely független a troponin komplex alkotóinak jelenlététől. A biokémiai eredményeinkkel összhangban az immunfluoreszcens felvételeken szignifikáns PKC alfa és cTnI kolokalizációt figyelhettünk meg humán kamrai szövetmintákban.

Fontos megemlíteni, hogy a PKC gátlása *ex vivo* körülmények között gyakran hatásos a különböző szívbetegségek (pl. szívinfarktus során megjelenő iszkémiás-reperfúziós károsodás, illetve a szívelégtelenség) során bekövetkező kontraktilitás csökkenés megelőzésében. Sajnos, a PKC a szervezet minden sejt típusában expresszálódik és változatos funkciókat lát el. Ennek megfelelően a PKC minden sejtre kiterjedő gátlása nem alkalmazható, és a PKC aktivitás modulálásán alapuló terápiás eljárások a megfelelő specificitás eléréséig váratnak magukra. Kísérleteink ezen a téren jelentős előrelépéssel szolgálhatnak, amennyiben kimutattuk, hogy a PKC α miofibrilláris hatásainak közvetítésében részt vesz a troponin I általi célra irányítása (targeting). Így felmerül annak a lehetősége, hogy a PKC α troponin I asszociációjának gátlása/fokozása révén a PKC α miofibrilláris rendszerre gyakorolt hatása szelektíven modulálható.

A jelátviteli folyamatok térbeli szabályozása horganyzó fehérjék segítségével az intracelluláris tér egy adott kompartmentére korlátozza a jelátviteli folyamatot, egyúttal több jelátviteli láncban szereplő molekulát is helyhez köthet, ami lehetővé teszi a jelátviteli útvonalak konvergálását. A PKC-hez kötődő fehérjék három nagy csoportba sorolhatóak, egyik fontos csoportját a STICK (Substrates That Interact with C-Kinase) fehérjék alkotják, a második csoportba a RACK (Receptors for Activated C-Kinase) fehérjék tartoznak, melyek az enzim aktív konformációját stabilizálják, valamint az ellentétes hatású RICK (Receptors for Inactivated C-Kinase) fehérjék. Miután a különböző kötő szekvenciák az izoenzimre specifikusak, izgalmas lehetőségeket rejt magában a PKC izoenzim-szelektív aktiválására, vagy gátlására.

Általában, a PKC aktiválás magába foglalja a DAG kötődését (vagy exogén megfelelőjének, a PMA-nak) a citoszólban található szolubilis enzimhez, amely rögzíti azt a

membránstruktúrához. Amíg a TnI kétségtelenül a STICK-ek egyike az emberi szívben, addig, úgy tűnik, hogy az interakciót a TnI és a PKC α között egyedül a Ca²⁺ szabályozza, függetlenül a lipidektől. Az sdr fehérje, mely a caveolinokhoz kötődik, hasonló tulajdonsággal rendelkezik, mint a TnI, ugyanis DAG vagy annak analógjának hiányában, Ca²⁺-dependes módon kötődik a PKC α -hoz. Ez a felfedezés is azt mutatja, hogy a Ca²⁺ olyan szerkezetváltozást idéz elő a PKC-ban, amely szabaddá teszi azokat a szekvenciákat, amelyek lehetővé teszik az interakciót a közeli/szomszédos proteinekkal. Ugyanakkor kimutatták, hogy amíg az sdr-PKC α kötődést a Ca²⁺ elősegíti, addig a foszfatidil-szerin stabilizálja azt. Saját kísérleteinkben kétségtelenül stabil interakciót találtunk a TnI és a PKC α között lipidek hiányában, habár lehet, hogy a foszfatidil-szerin *in vivo* részt vesz a komplex stabilitásának növelésében.

Korábbi tanulmányok rámutattak arra, hogy az intracellularis szabad kalcium koncentráció időbeli és térbeli változásai meghatározó szerepet játszanak a PKC α lokalizációjában érfali simaizom sejtekben. Hasonló elképzelés alkalmazható kamrai szívizomsejtek esetében is. Adataink szerint a PKC α szubcellularis lokalizációja jelentősen megváltozik az intracellularis szabad Ca²⁺ koncentráció megemelése által. Eredményeink ezen felül arra is rámutattak, hogy a kontrakció/relaxáció ciklus során a PKC α lokalizációja megváltozhat, transzlokálódhat a vékony filamentumhoz, átmenetileg kötődhet a TnI-hez Ca²⁺-függő módon, mely hozzájárulhat a kontraktilitás fenntartásához iszkémia/reperfúzió során. Fontos azt is megemlíteni, patológias körülmények között a PKC α mennyisége jelentősen megnő, amely feltehetően elvezet a fiziológias (saját adataink szerint troponin I-vel történő asszociáción keresztüli) szabályozás megbomlásához, számos miofibrilláris fehérje foszforilációja pedig a végül a kontraktilitás csökkenéséhez vezethet.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Méréseink alapján humán szívelégtelen mintákban szignifikáns oxidatív károsodás mutatható ki, szemben a kontroll humán donor mintákkal. Eredményeink szerint szívelégtelen betegekben és a donorokból származó mintáinkban a nitrált fehérjék tekintetében nincs különbség. Megfigyelhető a PARP-1 aktiváció és következményes fokozott poli(ADP-ribozil)áció szívelégtelen betegek szívizom mintáiban, ami további példával bővíti azon humán betegségek sorát, melyekben PARP-1 aktiváció kialakul. Ugyanakkor mi nem tudtuk kimutatni szignifikáns PARP-1 expressziónövekedést a szívelégtelen betegek mintáiban, ami felveti, hogy a mintáinkba megfigyelt fokozott poli-ADP-riboziláció hátterében a PARP-1 katalitikus alegység aktivitás fokozódása áll. Kaszpáz-9 expresszió szignifikánsan nagyobb volt szívelégtelen mintáinkban, mint a donorokban. Ezen adatok felvetik, hogy enyhe DNS károsodás esetén a PARP-1 aktiválódik és szerepet játszik a DNS-hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében. Spekuláció szintjén az is felvethető, hogy mintáink végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő betegekben származtak, akik talán sikeresen alkalmazkodtak a magasabb reaktív gyök szinthez és a következményes PARP-1 aktivációhoz.

Eredményeink ezen felül arra is rámutattak, hogy a kontrakció/relaxáció ciklus során a PKC α lokalizációja megváltozhat, transzlokálódhat a vékony filamentumhoz, átmenetileg kötődhet a TnI-hez Ca²⁺-függő módon, mely hozzájárulhat a kontraktilitás fenntartásához iszkémia/reperfúzió során. Úgy tűnik, hogy az interakciót a TnI és a PKC α között egyedül a Ca²⁺ szabályozza, függetlenül a lipidektől. A PKC α miofibrilláris hatásainak közvetítésében részt vesz a troponin I általi célra irányítása (targeting). Így felmerül annak a lehetősége, hogy a PKC α troponin I asszociációjának gátlása/segítése révén a PKC α miofibrilláris rendszerre gyakorolt hatása szelektíven modulálható. Mindenesetre a PKC α ígéretes terápiás célpontnak tűnik a szívizom kontraktilitásának javítására. Ezt a potenciált azonban feltehetően sejten belüli kötőhelyeinek (targeting) pontosabb feltárását követően tudjuk kihasználni. Fontos azt is megemlíteni, hogy patológiás körülmények között a PKC α mennyisége jelentősen megnő, amely feltehetően elvezet a fiziológias (saját adataink szerint troponin I-vel történő asszociáción keresztüli) szabályozás megbomlásához, számos miofibrilláris fehérje foszforilációja pedig a végső közös úthoz, a kontraktilitás csökkenéséhez vezethet.

7. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A szívelégtelenség relatív gyakorisága miatt sok embert érintő malignus betegség (a betegség prevalenciája 1-2%). Ezért fontos kutatási feladat a miokardium kontraktilitását befolyásoló miofibrilláris és intracelluláris hatásmechanizmusok tisztázása, mert további adatokat nyújt a betegség jobb megértésére és az újabb terápiás lehetőségek kialakítására. Vizsgálatainknak jelentőségét az adta, hogy kísérleteinket humán preprátumokon végeztük. Így az általunk észlelt mechanikai és biokémiai eltérések direkt módon adaptálhatók. A szívízom kontraktilitásának szabályozása egy fontos élettani funkció a szívízom működése szempontjából. Az élettani szabályozás pontos megértése elengedhetetlen a patológiás történések követéséhez.

Molnár A, Tóth A, Bagi Z, Papp Z, Édes I, Vaszily M, Galajda Z, Papp G, Varró A, Szüts V, Domokos G, Lacza Z, Szabó C. Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Exp. Clin. Cardiol.* 2006; 11, 3.

Előadások:

Molnár A., Szilágyi S., Vaszily M., Papp Z., Édes I., Tóth A. The role of PKC isozymes on the regulation of contraction of human cardiomyocytes. *Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred, Hungary. 2004*

Molnár A., Szilágyi S, Papp Z., Vaszily M., Édes I., Tóth A. PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. *6th Meeting France-New CEE members, La Grande-Motte, France. 2004*

Molnár A., Szilágyi S., Borbély A., Vaszily M., Édes I., Papp Z., Tóth A. Translocation and substrate specificity of protein kinase C alpha isozyme in human myocardium. *Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred, Hungary. 2005*

Molnár A., Tóth A., Bagi Z., Papp Z., Édes I., Vaszily M., Galajda Z., Papp G., Varró A., Szüts V., Domokos G., Lacza Z., Szabó C. Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred, Hungary. 2006*

Molnár A., Pásztorné Tóth E., Jaquet K., Szüts V., Varró A., Papp G., Vaszily M., Galajda Z., Bagi Z., Papp Z., Édes I., Blumberg P. M., Tóth A. Ca²⁺ dependent anchoring of PKC alpha to the contractile system of human ventricular cardiomyocytes. *70th Meeting of the Hungarian Physiological Society, Szeged, Hungary. 2006*

Poszterek:

Molnár A., Szilágyi S., Papp Z., Vaszily M., Édes I., Tóth A. PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. XXXIII. European Muscle Conference, Isola d'Elba, Italy. 2004

Molnár A., Szilágyi S., Papp Z., Vaszily M., Édes I. Tóth A. PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. 6th Meeting France-New CEE members, La Grande-Motte, France. 2004

Molnár A., Szilágyi S., Borbély A., Vaszily M., Varró A., Papp J.Gy., Édes I., Papp Z., Tóth A. PKC alpha in the human myocardium: expression, translocation and possible functions. XXXIV European Muscle Conference, Máta, Hungary. 2005

Molnár A., Tóth A., Bagi Zs, Papp Z., Édes I., Vaszily M., Galajda Z., Papp J. Gy., Varró A., Szüts V., Domokos G., Lacza Zs., Szabó Cs. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human hear failure. V. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, Pécs, Hungary. 2006