

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Fehérje karboniláció miofilamentáris hatásai és szerepe a
posztinfarktusos szívizom-átépülésben**

Dr. Balogh Ágnes

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2014**

Fehérje karboniláció miofilamentáris hatásai és szerepe a posztinfarktusos szívizom-átépülésben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Balogh Ágnes okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola
Kardiovaszkuláris megbetegedések programja keretében.

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Dr. Bay Péter, PhD
Dr. Sepp Róbert, PhD

A doktori szigorlat helye, időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK
Gyermekgyógyászati Intézet Könyvtára
2014. április 29. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Lekli István, PhD
Dr. Radovits Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Dr. Bay Péter, PhD
Dr. Lekli István, PhD
Dr. Radovits Tamás, PhD
Dr. Sepp Róbert, PhD

Az értekezés védésének helye, időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterem
2014. április 29. 13:00

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. Miokardiális infarktus és a posztinfarktusos remodelláció

Az iszkémiás szívbetegség világszerte a vezető halálokok közé tartozik. A szívinfarktus az elhúzódó iszkémia következtében létrejövő szívizomelhalás, melynek hátterében az esetek nagy részében ateroszklerotikus plakkruptúra és trombotikus koszorúér-elzáródás áll.

Az utóbbi években az akut miokardiális infarktus (MI) halálozásának csökkenése következtében egyre több beteg éli túl az akut eseményt, akiknél a posztinfarktusos szívizom-átépülés, remodelláció folyamatával kell számolnunk, mely végső soron szívelégtelenség kialakulásához vezethet. A szívizomzat infarktust követő átépülése klinikailag a szívüregek kítágulásában, bal kamra hipertrófiában és romló szisztolés funkcióban nyilvánul meg, de a pontos celluláris és molekuláris mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak. Az infarktus akut szakja során a szívizomsejtek elhalnak, majd a miokardium limitált endogén regeneratív kapacitásának köszönhetően az elhalt területen heg képződik. Az akut miokardiális izomvesztés következtében a neurohumorális rendszerek [szimpatikus idegrendszer, renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)] aktivációja következik be. Mindez az akut szakban kompenzatorikus jellegű, azonban hosszú távon ezen folyamatok patológiás mértéket öltenek és hozzájárulnak a szívizomzat kóros átépüléséhez.

A neurohumorális aktiváción kívül a szívizomzatban a nekrosis intenzív gyulladáshoz vezet, mely egyrészt nélkülözhetetlen az elhalt törmelék eltakarításában és a megfelelő hegeképződésben, azonban a felszabaduló szabad gyökök tovább károsíthatják a környező struktúrákat.

Ezen változások globálisan a szív egészét érintve határozzák meg az infarktus kimenetelét, illetve a posztinfarktusos szívizom-átépülés folyamatát. A háttérben a miokardiumot felépítő sejtekben, főként a szívizomsejtekben bekövetkező változások állnak, ugyanis a fentiek eredőjeként a túlélő szívizomsejtek működése adaptív módon megváltozik, azonban a pontos celluláris és molekuláris mechanizmusok még nem tisztázottak. Jelen munkám egyik része a posztinfarktusos szívizomsejt átépülés részleteire koncentrálok.

1.2. A kontraktilis rendszer felépítése és a kontrakció mechanizmusa

A kamrai miokardium felépítésében számos sejttípus vesz részt, a szív működése szempontjából legnagyobb jelentőséggel a szívizomsejtek bírnak, melyek kontraktilis funkciójuk révén biztosítják a véráramlást.

Ezen sejtek jellegzetes harántcsíkolatot mutatnak a miofibrillumok elrendeződésének köszönhetően. Vékony és vastag filamentumokat különítünk el, melyek felépítésében számos kontraktilis fehérje [aktin, miozin könnyű lánc-1 és -2 (MLC-1 és MLC-2), miozin nehéz láncok (MHC), troponin C, I, T (TnC, TnI, TnT), tropomiozin, miozinkötő C-fehérje (MyBPC), alfa-aktinin, dezmin, stb.] vesz részt.

A kontrakció alapját az akciós potenciál hatására a kamrai szívizomsejtek citoplazmájába beáramló Ca^{2+} képezi, mely a TnC-hez kötődve lehetővé teszi az aktin-miozin ciklikus interakcióját és a kontraktilis erő létrejöttét. A kontraktilis erő Ca^{2+} függését a Ca^{2+} -erő összefüggés, más néven a Ca^{2+} -érzékenységi görbe megszerkesztésével gyakran membránrendszerüktől megfosztott, permeabilizált szívizomsejteken tanulmányozzák izometriás Ca^{2+} -kontraktúra kialakulása során, mivel intakt szívizomsejteken mindez akadályokba ütközik. A szigmoid lefutású görbe segítségével információt nyerhetünk a kontraktilis rendszeren belüli kooperativitás mértékéről, valamint

a kontraktilis fehérjerendszer Ca^{2+} iránti érzékenységről. A kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenysége nagyban függ a szarkomerhossztól, az úgynevezett hosszfüggő Ca^{2+} -érzékenyítés képezi a Frank-Starling mechanizmus alapját. Ezen kívül számos számos tényező és állapot (pl.: oxidáció, foszforiláció) befolyásolja még a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét. Jelen munkában a posztinfarktusos eltérésekre és az oxidatív stressz hatásaira összpontosítottunk.

1.3. A kontraktilis rendszer posztinfarktusos remodellációja

A szívinfarktust követő miofilamentáris változásokról számos tanulmány látott napvilágot az utóbbi években. A kontraktilis rendszer működését jellemző paraméterek közül a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenysége került leginkább a figyelem középpontjába, melynek változásáról, illetve a változás irányáról még jelenleg is ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. A Ca^{2+} -érzékenység esetleges változásának hátterében a miofilamentumokat felépítő fehérjék posztranszlációs módosulásai állnak. A szívinfarktus lezajlását követően a perctérfogat fenntartása érdekében tartósan aktiválódó neurohumorális rendszerek (RAAS és a β -adrenerg rendszer) hatására megváltozik a fehérjék foszforilációja [pl.: protein kináz A (PKA) mediálta csökkent miofilamentáris fehérje foszforiláció, megnövekedett protein kináz C (PKC)-függő foszforiláció].

A foszforilációs hatásokon kívül az oxidatív eredetű posztranszlációs fehérje módosulásoknak is kiemelkedő jelentősége van a kontraktilis rendszer működésének szabályozásában, mely, ha csak részben is, de felelős lehet a posztinfarktusos miokardiális funkcióromlásért.

Míg az iszkémia közvetlen hatásai az infarcerálódott területre korlátozódnak, a szívizomzat átépülése az iszkémia által közvetlenül nem érintett területen is fellelhető. Az azonban nem tisztázott, hogy a fent részletezett neurohumorális

és oxidatív hatások egyformán érvényesülnek-e a bal kamra különböző területein, beleértve az elzáródott ér ellátási területén túlélő szívizomzatot is.

1.4. Szabad gyökök és oxidatív stressz

Az oxidatív stressz a reaktív oxigén/nitrogén szabad gyökök (ROS/RNS) és az antioxidáns mechanizmusok közötti egyensúly megbomlásával jellemezhető állapot, mely szerepet játszik több kardiovaszkuláris kórkép kialakulásában. A szabad gyökök fő forrását a kardiovaszkuláris rendszerben a mitokondriális légzési lánc jelenti, emellett nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidázok (NADPH oxidázok), a xantin-oxidáz, a nitrogén-monoxid szintetáz, a mieloperoxidáz és a lipoxigenázok is jelentős mennyiségű szabad gyök termeléséért felelősek.

Míg fiziológiás körülmények között az antioxidáns rendszerek ellensúlyozzák a ROS/RNS káros hatásait, az oxidatív stressz állapotokat az antioxidánsokkal szembeni ROS/RNS túlsúly jellemzi. Az oxigén alapú szabad gyökök az oxigén inkomplett redukciója kapcsán jönnek létre, ide sorolható a szuperoxid gyök ($O_2^{\cdot-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), mely utóbbi fémionok jelenlétében a Fenton-reakció során a legreaktívabb hidroxil gyökké ($OH\cdot$) alakul. Ezek a szabad gyökök fiziológiás körülmények között is keletkeznek, sőt, számos fehérje és szignalizációs útvonal működését befolyásolják a kardiovaszkuláris rendszerben. Ezáltal a vazoreguláció, a sejtnövekedés, a programozott sejthalál, valamint az iszkémiás prekondicionálás fontos mediátorai. Továbbá kulcsszerepük van az immunválaszban, a patogének elleni küzdelemben.

Oxidatív stressz állapotokban azonban a túlsúlyba kerülő szabad gyökök károsítják a sejteket felépítő nukleinsavakat, lipideket, illetve fehérjéket. A kardiovaszkuláris rendszerben a kontraktilis fehérjék közvetett vagy közvetlen

érintettsége strukturális és funkcionális változásokon keresztül szisztolés vagy diasztolés diszfunkcióhoz vezet.

1.5. Fehérje karboniláció

A fehérje oxidáció következtében különböző típusú fehérje módosulások jöhetnek létre, mint a tirozin nitráció, szulfhidril (SH) oxidáció, glutationiláció vagy a karboniláció. A súlyos oxidatív stressz és az oxidatív károsodás okozta fehérje diszfunkció egyik igen gyakran használt biomarkere a fehérje karboniláció. A karboniláció egy olyan irreverzibilis oxidatív módosulás, mely abban az esetben jön létre, ha reaktív aldehid vagy keton csoportok kötődnek a fehérjéket felépítő aminosavakhoz. Primer karboniláció fém-katalizált oxidáció során jön létre, mely a prolin, lizin, arginin és treonin aminosavakat érinti. A fém-katalizált oxidáció vas(II) és H_2O_2 közreműködésével jön létre a Fenton-reakció során, mely $OH\cdot$ képződését eredményezi. Ez a kémiai reakció széles körben elterjedt a fehérje karboniláció *in vitro* kivitelezésére és vizsgálatára.

A fehérjék karbonilációja egyrészt módosíthatja az érintett fehérje funkcióját, fehérje-degradációt indukálhat, valamint szignalizációs folyamatokat is befolyásolhat. A fehérje karboniláció jelentőségét mutatja, hogy szerepe van számos kórkép kialakulásában, mint miokardiális infarktus kapcsán, iszkémia/reperfúziós károsodásban, szívsebészeti beavatkozásokhoz kötődően, diabéteszes kardiomiopátiában vagy szívelégtelenségben.

Számos adattal rendelkezünk a karbonilációról, arról azonban kevés információ áll rendelkezésre, hogy miként modulálja a fehérje karboniláció a kontraktilis rendszer működését a szívizomsejtekben.

2. Célkitűzések

Kísérleteink során a következő célkitűzéseket tettük:

1. Megvizsgálni a kontraktilis fehérjék karbonilációjának funkcionális hatásait a humán permeabilizált szívizomsejtek kontraktilis rendszerének működésére.
2. Feltérképezni egy szívinfarktusos egérm modellen a posztinfarktusos szívizom-átépülés celluláris és molekuláris résztvevőit, az infarktusos és az infarktus által közvetlenül nem érintett területeket külön-külön vizsgálva.
3. Tanulmányozni a fehérje karboniláció részvételét a miokardium remodeláció folyamatában.

3. Metodikák

3.1. Szívizomminták

3.1.1. Humán egészséges donor szívizomminták

A humán bal kamrai szívizomminták transzplantáció során fel nem használt donor szívekből származtak (41 és 46 éves nő, 53 és 57 éves férfi). A donrok agyi aneurizma-ruptúra és vérzéses stroke következtében haláloztak el, kardiális betegsége utaló leleteik, tüneteik nem voltak, rövid ideig tartó dopamin, noradrenalin és mannizol kivételével egyéb terápiában nem részesültek. A szívizommintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk és felhasználásig -80°C -on tároltuk. A humán szívizommintákon végzett kísérleteink a Helsink Deklarációban foglaltaknak teljes mértékben megfeleltek és a Magyar Egészségügyi Minisztérium által jóváhagyottak (No. 323-8/2005-1018EKU).

3.1.2. A miokardiális infarktus egérmodellje

Az infarktusos egérmodell kialakítása osztrák kollaborációs laboratóriumban valósult meg. 16 hetes nőstény egereken (n=25) a bal elülső leszálló koronária artéria (LAD) lekötésével hoztunk létre miokardiális infarktust. Áloperált egészséges egerek szolgáltak kontroll csoportként (n=5). A sebészeti beavatkozást követő tizedik héten szívultrahang vizsgálatot végeztünk a bal kamra szisztolés funkcióját jellemző ejekciós frakció (EF) mérésével.

A szívek eltávolítását követően a szívek egy részét formaldehidben fixáltuk, és az infarktus által érintett terület nagyságát Masson-trikróm festett bal kamrai metszeteken határoztuk meg. A szívek másik részét a molekuláris esszékhez és az izometriás erőmérésekhez előkészítve több részre osztottuk, elkülönítve a bal kamra infarktusos anterior területét az infarktus által nem érintett, inferior szegmentumtól. A mintákat debreceni laboratóriumunkba szállítottuk és felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.2. *In vitro* fehérje karboniláció Fenton-reakcióval

In vitro fehérje karbonilációt mind a humán, mind a kontroll egér bal kamrai mintákon azonos módon idéztünk elő. Az izolált, permeabilizált szívizomsejteket Fenton-reagens (FeSO₄, H₂O₂, aszkorbinsav relaxáló oldatban) jelenlétében inkubáltuk 7 percig szobahőmérsékleten. Az esetleges SH oxidációs hatások kiküszöbölése érdekében a minták egy részét ditioneitróllal (DTT) kezeltük, mely SH-reagensként az oxidált SH csoportokat redukálja. A mechanikai mérések során további kombinált kezeléseket is alkalmaztunk.

3.3. Fehérje karboniláció kimutatása oxyblyt módszerrel

A fehérje karboniláció kimutatására preformált gyári oxyblyt kitet használtunk. A szívizommintákból fehérje homogenizátumot készítettünk, a fehérjék

karbonil csoportjait derivatizáltuk, melynek eredményeként 2,4-dinitrofenilhidrazon képződött. A derivatizált fehérjéket gélelektroforézis követően nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd dinitrofenilhidrazon-ellenes antitesttel jelöltük. A karboniláció-specifikus antitestek eltávolítását követően a membránokat anti-aktin, anti- α -aktinin és anti-MHC antitestekkel jelöltük. A karboniláció mértékét a fehérjék mennyiségére normalizáltuk és karbonilációs indexként fejeztük ki, ahol a kontroll minták karbonilációs indexét 1-nek tekintettük.

3.4. SH oxidáció vizsgálata

3.4.1. Ellman-reakció

A humán szívizommintákon végzett kísérletek során az SH oxidáció mértékét Ellman-reakcióval határoztuk meg. A permeabilizált szívizomsejtek egy részét növekvő H_2O_2 koncentrációjú ($0-10^5 \mu M$) Fenton-reagenssel kezeltük. Pozitív és negatív kontrollként 2,2'-ditio-dipiridinnel (DTDP) és DTT-vel kezelt minták szolgáltak. A mintákat a kezeléseket követően SH-specifikus Ellman-reagens jelenlétében inkubáltuk, mely a redukált SH csoportokhoz kötődve sárga színű terméket eredményez. Az oldatok abszorbanciáját megmértük és arányosnak tekintettük a minták SH tartalmával. Standardként ismert SH-tartalmú N-acetil-cisztein-sorból képzett kalibrációs görbét alkalmaztunk. Az egyes minták relatív SH tartalmát 1 mg fehérjére vonatkoztatva adtuk meg.

3.4.2. SH-specifikus biotiniláció és Western immunoblot

Az infarktusos egérmodell kapcsán a minták korlátozott mennyiségére való tekintettel biotinilációt alkalmaztunk az SH oxidáció vizsgálatára. A fehérjeoldatokat két részre osztottuk: az egyik felét DTT-vel kezeltük, míg a másik rész kontrollként szolgált. A DTT kezelés az SH csoportok redukcióját

célozta, míg a kontroll csoport a különböző helyről származó minták alap SH oxidációs státuszának feltérképezésére szolgált. Az SH szignál detektálására megfelelő körülmények közötti biotinilációt, gélelektroforézist, majd blotolást követően streptavidin-peroxidáz rendszert alkalmaztunk. A fehérje mennyiséget anti-aktin antitesttel detektáltuk, és az aktin mennyiségére normalizálva a relatív SH tartalmat fejeztük ki, ahol a DTT-vel kezelt minták oxidációját 100%-nak tekintettük.

3.5. Kardiális TnI foszforilációs státuszának vizsgálata

A szívizommintákból készített fehérjeoldatot azonos mennyiségű 2x SDS mintapufferben főztük, majd gélelektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, melyeket S22/23- vagy T143-foszforilált kardiális TnI-ellenes antitestekkel jelöltük, és a szignálokat rögzítettük. Ezen antitesteket a membránról eltávolítva, a fehérjéket foszforilációtól független kardiális TnI-ellenes antitesttel jelöltük. Kemilumineszcens (ECL) módszerrel és autoradiográfiával tettük láthatóvá a jeleket, és egy normalizációs lépést követően a relatív fehérje foszforilációt ábrázoltuk, a kontroll csoport foszforilációját 100%-nak tekintve.

3.6. Rekombináns troponin komplexek karbonilációja

Foszforilált (TnI-P) és nem foszforilált TnI-t (TnI), TnC-t és TnT-t tartalmazó rekombináns Tn komplexeket Fenton-kezelésnek vetettünk alá a fentieknek megfelelően azzal a céllal, hogy megvizsgáljuk, hogy a TnI foszforilációs állapota befolyásolja-e a Tn komplex fehérjéinek karbonilációját. A TnI foszforilációs státuszát foszforiláció-specifikus antitestekkel igazoltuk. A komplex fehérjéinek karbonilációját oxyblot esszével vizsgáltuk, a fehérjék mennyiségét Sypro ruby festéssel határoztuk meg. Normalizációt követően a fehérjék karbonilációs indexeit hasonlítottuk össze.

3.7. Izometriás erőmérések permeabilizált szívizomsejt preparátumokon

A humán és egér szívekből származó szívizomsejtek kontraktilis funkcióját izometriás erőmérések során vizsgáltuk. Az előzőleg előkészített, fagyasztott bal kamrai szövetdarabokat felhasználva mechanikai izolációt követően a szívizomsejteket permeabilizáltuk, biztosítva a kontraktilis funkciók kontrollált intracelluláris körülmények közötti vizsgálatának lehetőségét. Az egyedi szívizomsejteket mechanikai mérőrendszerhez rögzítettük. A kívánt, 1,9 vagy 2,3 μm -es szarkomerhossz beállítását követően ismételt aktivációs-relaxációs ciklusokat alkalmaztunk, Ca^{2+} -kontraktúrákat váltottunk ki 15 °C-on. Az oldatok Ca^{2+} -koncentrációját negatív tízes alapú logaritmikus pCa egységekben fejeztük ki ($-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]=\text{pCa}$). Az Ca^{2+} -kontraktúra kialakulása során mérhető a totál erő ($F_{\text{totál}}$), a Ca^{2+} -független passzív erő ($F_{\text{passzív}}$), számítható a Ca^{2+} -aktiválta izometriás aktív erő ($F_{\text{aktív}}$) és becsülhető az aktin-miozin ciklus sebessége ($k_{r,\text{max}}$). Ezen túl a Ca^{2+} -erő összefüggés megszerkesztésével információ nyerhető a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységéről (pCa_{50}).

3.7.1. Poszttranszlációs fehérje módosulások funkcionális hatásainak vizsgálata

A fehérje foszforiláció hatását *in vitro* PKA, az SH oxidáció reverzibilitását és hatásait SH-reagens DTT, míg a karboniláció hatásait Fenton-reagens alkalmazásával tanulmányoztuk. A sejtek egy részén a Fenton-kezelés után DTT-t alkalmaztunk, míg a sejtek egy másik csoportján a foszforiláció és a karboniláció közötti interakciók vizsgálata céljából kombinált kezeléseket alkalmaztunk, így a Fenton-kezelést PKA előtt és után, illetve protein-foszfataz-1 (PP1c) és -2A (PP2Ac) után alkalmaztuk. Az egyes kezelések előtt és után a Ca^{2+} -erő összefüggéseket rögzítettük.

3.8. Adatfeldolgozás, statisztikai analízis

A Ca^{2+} -erő összefüggéseket módosított Hill-egyenlettel, míg a gyors hosszváltoztatási manővert követő erő-regenerálódást egyváltozós exponenciális függvénnyel illesztettük, meghatározva annak sebességi állandóját ($k_{tr,max}$) a maximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál. A kísérleti preparátumokból kapott adatokat egyedileg illesztettük, az illesztett paraméterek átlagait mutatjuk be.

A disszertáció ábráit GraphPad Prism (5.02 verzió) program segítségével készítettem. Az adatokat átlag \pm SEM (mintaközép hibája) formában tüntettem fel. A mérési eredményeket megfelelően megválasztott Student-féle kétmintás t-próba vagy egy-utas variancia-analízis (ANOVA) segítségével hasonlítottuk össze. Lineáris regresszió analízist alkalmaztunk a Ca^{2+} -érzékenységben bekövetkező változás ($\Delta p\text{Ca}_{50}$) és a fehérje karboniláció közötti összefüggés vizsgálatára. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a P érték kisebb volt 0,05-nél.

4. Eredmények

4.1. Humán szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek karbonilációja

Humán szívizomsejteken Fenton-reakció segítségével *in vitro* modellrendszert alkalmaztunk a fehérje karboniláció kivitelezésére. Az emelkedő koncentrációban H_2O_2 -t tartalmazó Fenton-reagens hatására a humán permeabilizált szívizomsejtek fehérjéi fokozott karbonilációt mutatnak. A kontraktilis rendszert alkotó, karbonilálódó fehérjéket molekulaméret alapján azonosítottuk: MLC-1 (20 kDa), aktin (43 kDa), dezmin (55 kDa), α -aktinin (100 kDa), MyBPC (140 kDa) és MHC (200 kDa). A kontraktilis fehérjék átlagos karbonilációs indexe a Fenton-reagensben található H_2O_2 koncentrációjától függően szigmoid emelkedést mutatott (Kontroll: $1,00 \pm 0,05$; $0 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$: $1,05 \pm 0,06$; $10^0 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$: $1,08 \pm 0,06$; $10^2 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$: $1,27 \pm 0,07$; $10^3 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$: $1,86 \pm 0,11$; $3 \cdot 10^3 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$: $3,38 \pm 0,32^*$; $3 \cdot 10^4 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$: $6,22 \pm 0,75^*$; $10^5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$: $6,80 \pm 0,82^*$; $P < 0,05$). Egyes fehérjék (MLC-1, MyBPC és α -aktinin) az átlagoshoz képest erősebb, míg más fehérjék (dezmin, aktin, MHC) gyengébb karbonilációt mutattak, jelezve a kontraktilis fehérjék eltérő érzékenységét a karbonilációs hatásokra.

Ellman-reakciót használtunk, hogy megvizsgáljuk a Fenton-reakció indukálta SH oxidációs hatásokat. A Fenton-reakció lejátékozását követően az SH csoportok oxidációja következett be (kontroll: $471,6 \pm 59,1 \mu\text{M/mg protein}$; Fenton 10^5 : $201,6 \pm 2,4 \mu\text{M/mg protein}$; $P < 0,05$), azonban csak extrém magas koncentrációban H_2O_2 -t tartalmazó reagensek alkalmazása hozott szignifikáns változást. A belső kontrollként alkalmazott DTDP a vártan megfelelően tovább csökkentette a redukált SH tartalmat ($83,1 \pm 15,3 \mu\text{M/mg protein}$; $P < 0,05$ vs. Kontroll), a DTT pedig bizonyította az SH oxidáció revertálhatóságát, mind DTDP ($621,2 \pm 107,3 \mu\text{M/mg protein}$; $P < 0,05$ vs. DTT

előtt), mind a Fenton-kezelést követően ($599,3 \pm 102,1 \mu\text{M}/\text{mg}$ protein; $P < 0,05$ vs. DTT előtt). A Fenton-reakció következményeként tehát a karboniláció mellett extrém magas H_2O_2 koncentrációk alkalmazásával SH oxidációs hatások is kialakulnak.

A mechanikai mérőrendszerhez rögzített, izolált, permeabilizált humán szívizomsejteken ($n=6$) a fentiekhez hasonlóan Fenton-kezelést alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk a kontraktilis fehérjék karbonilációjának funkcionális következményeit. Elsőként az izometriás aktív erőre kifejtett koncentrációfüggő hatást tanulmányoztuk. Az ismételt Fenton-kezelések során rögzítettük a szívizomsejtek fénymikroszkópos képét. A kísérletsorozat teljes hossza alatt sem következett be jelentős fénymikroszkóposan detektálható strukturális változás a szívizomsejtek szerkezetében. Ezzel szemben az $F_{\text{aktív}}$ fokozatos csökkenését tapasztaltuk a fokozódó oxidatív hatásra, azaz a H_2O_2 koncentrációjának növekedésére a Fenton-reagensben, változatlan vas(II) és aszkorbinsav koncentráció mellett (Kontroll: 100,0%; Fenton 0: $98,9 \pm 3,3\%$; Fenton 10^0 : $95,0 \pm 3,9\%$; Fenton 10^2 : $89,1 \pm 3,7\%*$; Fenton 10^3 : $68,3 \pm 4,1\%*$; Fenton $3 \cdot 10^3$: $54,9 \pm 4,7\%*$; Fenton 10^4 : $36,0 \pm 3,7\%*$; Fenton $3 \cdot 10^4$: $3,5 \pm 1,6\%*$; Fenton 10^5 : $0,3 \pm 0,1\%*$; $P < 0,05$). Az $F_{\text{aktív}}$ -ban bekövetkező változás összefüggésbe hozható a miofilamentáris fehérjék fokozódó karbonilációjával. Az izolált humán szívizomsejtek egy másik csoportján ($n=6$) $3 \cdot 10^3 \mu\text{M}$ H_2O_2 -ot tartalmazó Fenton-reagenst alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk, befolyásolja-e a karboniláció a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét ($p\text{Ca}_{50}$), az $F_{\text{aktív}}$ -t és a $F_{\text{passzív}}$ -t. Második lépésként DTT kezelést hajtottunk végre az SH oxidáció funkcionális hatásainak tanulmányozására. A Fenton-reakció hatására a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének egyértelmű csökkenését tapasztaltuk [$p\text{Ca}_{50}$ (Kontroll):

5,74±0,01; pCa_{50} (Fenton): 5,65±0,01; $P<0,05$]. Ezen felül a kezelés csökkentette az $F_{aktív}$ -t és jelentősen növelte a $F_{passzív}$ -t [$F_{aktív}$ (Kontroll): 11,39±1,63 kN/m²; $F_{aktív}$ (Fenton): 8,66±1,06 kN/m²*; $F_{passzív}$ (Kontroll): 1,72±0,21 kN/m²; $F_{passzív}$ (Fenton): 2,33±0,22 kN/m²*; $P<0,05$]. Az aktinmiozin ciklus sebességét jellemző konstans és a Hill-koefficiens nem változott a kezelés hatására [$k_{tr,max}$ (Kontroll): 0,68±0,06 1/sec; $k_{tr,max}$ (Fenton): 0,57±0,02 1/sec; n_{Hill} (Kontroll): 2,42±0,05; n_{Hill} (Fenton): 2,31±0,06; $P>0,05$]. A DTT kezelés nem okozott változást a fenti paraméterek egyikében sem [pCa_{50} (DTT): 5,63±0,01; $F_{aktív}$ (DTT): 7,14±1,10 kN/m²; $F_{passzív}$ (DTT): 2,44±0,28 kN/m²; $k_{tr,max}$ (DTT): 0,55±0,07 1/sec; n_{Hill} (DTT): 2,43±0,10; $P>0,05$ vs. Fenton; $P<0,05$ vs. Kontroll].

4.2. Posztinfarktusos szívizom-átépülés egér szívekben a szívizomsejtek szintjén

10 héttel a sebészi LAD ligációt követően az egerek a bécsi laboratóriumban szívultrahangos vizsgálaton estek át. A bal kamra szisztolés funkciója a kontroll csoporthoz képest közel felére csökkent az infarktus hatására. Ezt követően az eltávolított szívek Masson-trikróm festett metszetein meghatároztuk az infarktusos terület nagyságát, mely átlagosan a bal kamra 50,3±5,7%-át tette ki.

Izometriás erőméréseket végeztünk mindkét csoportból származó izolált, permeabilizált bal kamrai szívizomsejteken és meghatároztuk a kontraktilis rendszer különböző paramétereit. Az infarktusos területen túlélő szívizomsejtek kontraktilis rendszere alacsonyabb Ca^{2+} -érzékenységgel volt jellemezhető [Kontroll(1,9 μ m): 5,81±0,02; MI Inferior(1,9 μ m): 5,80±0,02; MI anterior(1,9 μ m): 5,73±0,03*; Kontroll(2,3 μ m): 5,91±0,02, MI Inferior(2,3 μ m): 5,88±0,02; MI anterior(2,3 μ m): 5,81±0,03*; * $P<0,05$] mind

az ellenoldali, nem infarcerálódott területről, mind a kontroll bal kamrákból származó szívizomsejtekhez képest. A kontraktilis rendszer hosszfüggő sajátosságai megtartottak maradtak az infarktusos bal kamrákban is, melyet az egyes paraméterek szarkomerhossz növelésre bekövetkező változásai mutatnak. Az egyes csoportokban mért $F_{aktív}$, $F_{passzív}$ és $k_{tr,max}$ értékekben, illetve a szívizomsejtek struktúrájában nem mutatkozott különbség.

A csökkent Ca^{2+} -érzékenység háttérében álló lehetséges mechanizmusok feltérképezése kapcsán elsőként a TnI specifikus foszforilációs állapotait vizsgáltuk. A PKC-specifikus treonin 143 hely foszforilációja hasonló mértékűnek adódott mindhárom csoportban. Ezzel ellentétben a PKA-specifikus 22-es szerin aminosav alacsonyabb szintű foszforilációját mutattuk ki az infarktusos területről származó mintákban. Ezzel összhangban, ezen szívizomsejtek *in vitro* PKA kezelése, mely a PKA-függő foszforilációs helyek fokozott foszforilációjához vezet, a Ca^{2+} -érzékenység kismértékű, bár statisztikailag szignifikáns csökkenését eredményezte, míg a kezelés a kontroll szívizomsejtekben nem idézett elő változást.

Következő lépésben az oxidatív fehérje módosulások szerepét vizsgáltuk az infarktus utáni szívizom-átépülés részeként detektált alacsonyabb Ca^{2+} -érzékenység háttérében. Az infarktusos területről származó szívizomsejtek aktinja jelentősen kisebb mennyiségű redukált SH csoportot tartalmazott a kontrollhoz képest, ami ezen terület fokozott SH oxidációjára utal (Kontroll: $83,8 \pm 6,2\%$; MI inferior: $62,5 \pm 10,3\%$; MI anterior: $49,1 \pm 10,6\%*$; $P < 0,05$). *In vitro* alkalmazott antioxidáns DTT hatására a redukált SH csoportok mennyisége szignifikánsan megemelkedett (100%), ami az SH oxidáció reverzibilitását bizonyítja. Ugyanakkor a DTT hatására az MI anterior

szívizomsejtek kontraktilis rendszerének Ca^{2+} -érzékenysége nem változott ($p\text{Ca}_{50}$ (DTT előtt): $5,79\pm 0,02$, $p\text{Ca}_{50}$ (DTT után): $5,76\pm 0,02$; $P>0,05$).

Oxyblot esszé segítségével vizsgáltuk a kontroll és infarcerált bal kamrából származó miofilamentáris fehérje homogenizátumok karbonilációját. Kísérleteink során az aktin (Kontroll: $1,00\pm 0,04$; MI inferior: $1,40\pm 0,12$; MI anterior: $1,46\pm 0,18^*$; $P<0,05$ vs. Kontroll) és a MHC karbonilációja (Kontroll: $1,00\pm 0,07$; MI inferior: $1,46\pm 0,17$; MI anterior: $2,06\pm 0,46^*$; $P<0,05$ vs. Kontroll) jelentősen magasabbnak adódott az infarktusz területéről származó mintákban a kontrollhoz képest, míg az α -aktinin (Kontroll: $1,00\pm 0,07$; MI inferior: $0,95\pm 0,09$; MI anterior: $1,25\pm 0,16$; $P>0,05$) és a MyBPC (Kontroll: $1,00\pm 0,14$; MI inferior: $0,82\pm 0,11$; MI anterior: $0,70\pm 0,14$; $P>0,05$) esetében hasonló karbonilációs indexet kaptunk mindhárom csoportban.

In vitro Fenton-reakció segítségével vizsgáltuk az egér szívizomsejteken is, hogy a miofilamentumok karbonilációja összefüggésben áll-e az alacsonyabb Ca^{2+} -érzékenységgel. A Fenton-reakció eredményeként intenzív fehérje karboniláció mellett enyhe SH oxidációs hatásokat mutattunk ki (relatív SH tartalom: Kontroll: $100,0\pm 1,4\%$; Fenton: $77,8\pm 3,5\%$; $P<0,05$), ezért a továbbiakban DTT kezelést alkalmaztunk az esetleges SH oxidáció kiküszöbölése érdekében. Az infarktuszos egérmodell vizsgálata kapcsán nyert eredményekhez hasonlóan a Fenton-kezelést követően számos fehérje, többek között az aktin és a MHC fokozott karbonilációját regisztráltuk, melynek mértéke hasonló volt az infarktuszos mintákban detektált értékekhez. Ezen hatást a következő lépésben végzett DTT kezelés nem befolyásolta. A Fenton-reagens ezen felül szignifikánsan csökkentette a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét ($p\text{Ca}_{50}$ (Kontroll): $5,76\pm 0,03$; $p\text{Ca}_{50}$ (Fenton): $5,62\pm 0,04$; $P<0,05$), melyet a továbbiakban alkalmazott DTT kezelés nem befolyásolt.

Ezen túl az infarktuszos bal kamra két általunk vizsgált területét (MI anterior és inferior), valamint a Fenton-kezelést jellemző pCa_{50} érték kontrollhoz viszonyított csökkenése (ΔpCa_{50}) és a relatív aktin ($P=0,0264$; $r^2=0,8661$) és MHC karboniláció ($P=0,0114$; $r^2=0,9117$) között lineáris összefüggést mutattunk ki.

A fehérje foszforiláció és a karboniláció közötti esetleges interakciók felfedésére a Fenton-kezelés Ca^{2+} -érzékenységre kifejtett hatásait vizsgáltuk különböző foszforilációs állapotokban, így PKA alkalmazása előtt és után, valamint fehérje foszfatázokkal (PP1c vagy PP2Ac) történt kezelést követően. Az előző eredményeinkkel összhangban, a PKA kezelés nem módosította a kontroll szívizomsejtek kontraktilis rendszerének Ca^{2+} -érzékenységét, sem a Fenton-reakció előtt, sem pedig utána. Ezzel szemben a PP1c csökkentette, míg a PP2Ac fokozta a Ca^{2+} -érzékenységet. A Fenton-indukálta Ca^{2+} -érzékenység csökkenés mértéke hasonló volt a kináz és foszfatáz kezelésektől függetlenül. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a Fenton-kezelés Ca^{2+} -érzékenységre kifejtett hatása független a kontraktilis fehérjék foszforiláltsági állapotától. Ezt tovább erősíti a rekombináns Tn komplexek Fenton-reagenssel történő kezelése, mely a foszforilált és defoszforilált komplexek hasonló mértékű karbonilációjához vezetett, alátámasztva a fenti eredményeket.

5. Megbeszélés

5.1. Kontraktilis fehérjék karbonilációja befolyásolja a humán szívizomsejtek kontraktilitását

Munkám során a fehérje karboniláció közvetlen hatásait vizsgáltuk a humán szívizomsejtek kontraktilis funkcióira. A fehérje karboniláció kiváltására Fenton-reakciót alkalmaztunk, mely hidroxil gyökök termelődését eredményezi. Kísérleti elrendezésünk, a permeabilizált szívizomsejtek

alkalmazása lehetővé tette, hogy az izometriás erőgenerációt jellemző paraméterekben bekövetkező változás és a kontraktilis fehérjék karbonilációja közötti kapcsolatot feltárjuk. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy a kontraktilis proteinek karbonilációja a szívizomsejtek vizualizálható strukturális károsodása nélkül jelentősen befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis rendszerének működését, illetve annak szabályozását.

Különböző poszttranszlációs oxidatív fehérjemódosulások (pl. SH csoport oxidáció, fehérje nitroziláció, fehérje karboniláció, stb.) szerepéről számoltak már be korábban, melyek oxidatív stressz állapotok kapcsán kontraktilis diszfunkcióhoz vezethetnek. A mechanizmust, ahogy az oxidatív hatások funkcionális károsodáshoz vezetnek, néhány esetben sikerült feltárni, azonban gyakorlatilag nem rendelkezünk információval a humán szívizomsejtek karbonilációja és kontraktilis funkciója közötti összefüggésekről. Ezen oxidatív módosulás szerepéről számoltak be már több kórképpel kapcsolatban, jobb szívfél elégtelenségben, iszkémia/reperfúziós károsodás kapcsán, koronária mikroembolizációt követően, posztinfarktusos szívizom-átépülésben. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a fehérje karboniláció egy jelentős oxidatív marker, mely patofiziológiai szerepet játszik számos kórfolyamatban.

Ebben a tanulmányban a kontraktilis fehérjék karbonilációját Fenton-reakció segítségével idéztük elő humán permeabilizált szívizomsejtekben. A reakció lejátszódására bizonyítékok állnak rendelkezésre humán szívelégtelen mintákban és iszkémia/reperfúziós károsodásban, illetve ez a reakció széles körben alkalmazott *in vitro* körülmények között, mint modellrendszer. Az általunk alkalmazott technika, az izolált permeabilizált szívizomsejteken végrehajtott kezelések lehetővé teszik a karboniláció kontraktilis rendszerre

kifejtett hatásainak tanulmányozását, ugyanis a permeabilizált preparátumok esetén nem kell számolnunk a membrán komponensek, az intracelluláris organelumok és a Ca^{2+} -homeosztázis elemeinek változásaival és azok következményeivel. Természetesen a hidroxil gyök nemcsak karbonilációt okozhat, ezen szabad gyökkel kapcsolatban más típusú oxidatív módosulások szerepét sem zárhatjuk ki. Jelen tanulmányban az irodalmi adatok alapján is joggal felmerülő SH oxidációra fordítottunk figyelmet, de jelentős SH oxidációval összefüggésbe hozható funkcionális hatásokat nem detektáltunk. Ezek az adatok alátámasztják azt a hipotézist, miszerint ezek a változások nem az SH oxidáció, hanem a karboniláció következményei. Ezt támogatja az a tény is, hogy a kontraktilis rendszer fehérjéi fokozottan érzékenyek a karboniláció iránt. Az általunk alkalmazott emelkedő koncentrációk esetén fokozódó fehérje karbonilációt detektáltunk, ezzel párhuzamosan pedig a szívizomsejtek fokozatosan csökkenő izometriás erő generálására képesek. A kísérleteink során alkalmazott extrém koncentrációk és a következményesen termelődő szabad gyökök ilyen nagy mennyiségben kevésbé valószínű, hogy fiziológiás körülmények között előfordulnak a szervezetben. Habár, *in vivo* lokálisan, bizonyos kompartmentekben nagy eséllyel termelődhetnek olyan mennyiségben hidroxil gyökök, melyek karbonilációt indukálnak. Ebben az *in vitro* kísérletsorozatban a hidroxil gyökök a szívizomsejtek közvetlen közelében termelődtek és módosították számos miofilamentáris fehérje szerkezetét, valamint a proteinek, végső soron a szívizomsejtek működését. Arra a kérdésre azonban nem kaptunk választ, hogy egyetlen fehérje vagy több miofilamentáris protein karbonilációja felelős a megfigyelt mechanikai változásokért. Az oxidatív fehérjemódosulások a szívizomsejtek kontraktilis fehérjerendszerét érintve vezetnek szisztolés és diasztolés diszfunkcióhoz

oxidatív stresszállapotokban. Kísérleteink során a fehérje karboniláció csökkentette az izometriás aktív erőt és a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét. Ezen változások következtében csökken a miokardiális kontrakciók ereje és mindez szisztolés diszfunkcióhoz vezethet. Ezen felül a miofilamentumok karbonilációja növelte a Ca^{2+} -független passzív erőt, mely egy lehetséges molekuláris magyarázatként szolgálhat a szívizomsejtek diasztolés szívelégtelenség kapcsán megfigyelt fokozott rigiditásáért.

A Ca^{2+} -érzékenység csökkenéséről, illetve kontraktilis diszfunkcióról számos olyan klinikai állapot kapcsán beszámoltak, melyek oxidatív stresszel járnak együtt. Így a miokardiális stunning során megfigyelhető alacsonyabb Ca^{2+} -érzékenység háttérben is oxidatív hatásokat feltételeznek, habár a pontos mechanizmus, a pontos target sejtkomponens még nem ismert. Továbbá, egy posztinfarktusos egérmodellben kimutatták, hogy hidroxil gyökfogó alkalmazásával kivédhető a bal kamra infarktus utáni kóros átépülése és a következményes bal kamra diszfunkció. Jelen eredményeink azt sugallják, hogy a miofilamentumok karbonilációja egy lehetséges összekötő kapocs lehet az oxidatív stressz és a csökkent Ca^{2+} -érzékenység okozta kontraktilis diszfunkció között a fenti kórállapotokban.

5.2. A karboniláció jelentősége a kontraktilis rendszer posztinfarktusos remodellációjában

Munkám második része a posztinfarktusos bal kamrai szívizom-átépülést vizsgálta egy egérmodellen 10 héttel a bal elülső leszálló koronária artéria lekötésével okozott szívinfarktus után. A globális bal kamra diszfunkció háttérben vizsgáltuk az egyes bal kamrai szegmentumokból származó szívizomsejtek kontraktilis funkcióját, és ezáltal a régió-specifikus szívizom-átépülés tanulmányozása volt a célunk. Az infarktusos elülső, valamint az

infarktus által közvetlenül nem érintett távoli, inferior bal kamrai területekről származó kardiomiocitákat elkülönítve vizsgáltuk. Az infarktusos területen a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének csökkenését és ezzel párhuzamosan kifejezett oxidatív hatásokra utaló kontraktilis fehérje módosulásokat (karboniláció, SH oxidáció) figyeltünk meg. Emellett kontroll egerekből származó szívizomsejteken a humán mintákhoz hasonlóan szelektív fehérje karbonilációval a Ca^{2+} -érzékenység csökkenését sikerült elérni, mely függetlennek bizonyult a miofilamentumok foszforilációs státuszától. Tovább vizsgálva a karboniláció és a Ca^{2+} -érzékenység csökkenése közötti kapcsolatot, egy látszólagos lineáris összefüggést sikerült kimutatnunk a fehérje karboniláció és a Ca^{2+} -érzékenység csökkenés mértéke között. Így ezen adataink is alátámasztják, hogy a miofilamentáris fehérje karboniláció képes a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének csökkentésére. Ez a változás a szívinfarktust követően a heges területen túlélő szívizomsejtekben kimutatható és hozzájárulhat a posztinfarktusos regionális bal kamra diszfunkcióhoz.

A posztinfarktusos szívizom-átépülés és a következményes bal kamra diszfunkció egy igen intenzíven kutatott terület a kardiovaszkuláris fiziológiában. Több tanulmány is alátámasztotta, hogy a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének változása fontos szerepet játszik a szisztolés diszfunkció és a posztinfarktusos szívelégtelenség kialakulásában. A szakirodalomban különböző eredményeket találhatunk a Ca^{2+} -érzékenység változásának irányáról és mértékéről az infarktust követő szívizom-átépülés folyamatával kapcsolatban. Ez az ellentmondásosság több tényezővel is magyarázható (pl.: eltérő modellek, időbeli különbségek, stb.), másrészt viszont ezek az adatok mozaikként felépítve segíthetnek megérteni a bal kamrai remodelláció folyamatát. A fenti tanulmányok elsősorban az infarktus

által közvetlenül nem érintett bal, illetve jobb kamrai területekre koncentráltak, míg mi mind az infarktusus, mind a távolabbi bal kamrai területeket vizsgáltuk.

10 héttel az infarktust követően az infarktusus területen sikerült túlélő szívműködési csoportokat azonosítanunk, melyek csökkent Ca^{2+} -érzékenységgel jellemezhetők. A kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét a kontraktilis fehérjék, döntően a TnI és a MyBPC foszforilációs állapota határozza meg fiziológiai körülmények között. Ezzel összhangban mi is összefüggést találtunk a TnI foszforilációja és a Ca^{2+} -érzékenység között, bár eredményeink összességében arra utalnak, hogy sem a PKA-, sem a PKC-függő TnI foszforiláció közvetlenül nem felelős az infarktusus területéről származó szívműködési csoportokban megfigyelt alacsonyabb Ca^{2+} -érzékenységért, ami felveti más molekuláris mechanizmus, mint például oxidatív fehérje módosulások szerepét. A többféle oxidatív módosulás közül az SH oxidáció és a humán mintákon kapott eredményeink alapján a karboniláció szerepe joggal merült fel a Ca^{2+} -érzékenység csökkentésében. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a kismértékű SH oxidáció, melyet az infarktusus területéről izolált szívműködési csoportokban detektáltunk nem játszik szerepet az infarktusus területre jellemző alacsonyabb Ca^{2+} -érzékenység meghatározásában.

A fehérje karboniláció, mint a súlyos oxidatív stressz markere számos tanulmányban felmerült a posztinfarktusus remodeláció résztvevőjeként. Jelen kísérletsorozatban az aktin és a MHC fokozott karbonilációját mutattuk ki az infarktusus szívműködési csoportokban. A karboniláció esetleges patofiziológiai szerepének tisztázására *in vitro* kísérleteket végeztünk kontroll egér szívműködési csoportokon is, melyek során hidroxil gyökök képződését indukálva sikerült az aktin és a MHC karbonilációját kiváltani. Következő lépésben a

karboniláció és a Ca^{2+} -érzékenység csökkenés mértéke között mutattunk ki pozitív korrelációt, az *in vitro* és az *in vivo* adatokat is figyelembe véve.

Eredményeink az irodalmi adatokkal összhangban azt tükrözik, hogy az eltérő típusú poszttranszlációs fehérje módosulások (fehérje foszforiláció, karboniláció) jelentősen befolyásolják a kontraktilis rendszer működését, főként a Ca^{2+} -érzékenységet. Mivel a kontraktilis rendszer működésének szabályozásában résztvevő enzimek aktivitását a szabad gyökök okozta oxidatív változások is módosíthatják, a továbbiakban a karboniláció és a foszforiláció közötti összefüggések vizsgálatára tettünk kísérletet. A PKA és különböző foszfatázok alkalmazása során azt tapasztaltuk, hogy a fehérjék foszforilációs állapota nem befolyásolja a karboniláció hatására bekövetkező Ca^{2+} -érzékenység csökkenés mértékét.

Összefoglalva tehát adataink arra utalnak, hogy az experimentális szívinfarktus kapcsán létrejövő fehérje karboniláció a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének csökkenéséhez vezet az infarktusos területről származó szívizomsejtekben, sőt ez az irreverzibilis fehérje módosulás egyéb mechanizmusok akár ellenkező irányú hatásait is képes felülmúlni. Az infarktusos terület szívizomsejtjeiben a miofibrillumok karbonilációja a posztinfarktusos kontraktilis diszfunkció egyik meghatározó tényezője lehet, ugyanis a Ca^{2+} -érzékenység csökkenése következtében a miokardium hipokontraktilissá válhat, hozzájárulva a globális bal kamra diszfunkcióhoz.

6. Összefoglalás

A miokardiális infarktus és az infarktust követő szívizom-átépülés következtében kialakuló szívelégtelenség komoly népegészségügyi problémát jelent napjainkban. A folyamat háttérében álló molekuláris mechanizmusok feltérképezése hozzájárulhat a patofiziológia jobb megértéséhez, ezáltal esetlegesen új terápiás célpontok találásához. Az akut esemény és posztinfarktusos remodelláció egyaránt oxidatív stresszállapot, melyek során oxidatív poszttranszlációs fehérje módosulásokkal kell számolnunk.

Kísérleteink során humán szívizommintákat felhasználva tanulmányoztuk a miofilamentáris fehérje karboniláció kontraktilis rendszerre kifejtett hatásait, valamint a fehérje karboniláció posztinfarktusos szívizom-átépülésben betöltött szerepét vizsgáltuk egy infarktusos egérmodellben.

Vizsgálataink során az alábbi új megállapításokat tettük: 1) Az izolált szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek karbonilációja *in vitro* körülmények között a Fenton-reakció segítségével kiváltható. 2) A miofilamentumok karbonilációja közvetlen hatással van a kontraktilis rendszer működésére, befolyásolva az izometriás aktív erőt, a szívizomsejtek passzív feszülését, illetve a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét. 3) Szívinfarktust követően csökken a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenysége az infarktus által közvetlenül érintett bal kamrai területeken. 4) A posztinfarktusos Ca^{2+} -érzékenység csökkenés háttérében a fehérje karboniláció meghatározó jelentőségű.

Eredményeink alapján a miofilamentáris fehérjék karbonilációja közvetlenül befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis rendszerének működését, jelentős szerepet játszik az infarktust követő bal kamrai szívizom-átépülés folyamatában, hozzájárulva ezzel a posztinfarktusos bal kamra diszfunkció kialakulásához.

7. Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/30/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

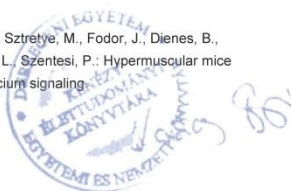
Jelölt: Balogh Ágnes
Neptun kód: I8HS03
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036795

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balogh, Á.**, Tóth, A., Pásztorné Tóth, E., Nagy, L., Kovács, Á., Kalász, J., Contreras, G.A., Édes, I., Papp, Z.: Myofilament carbonylation modulates contractility in human cardiomyocytes. *Exp. Clin. Cardiol.* "accepted by publisher", 2014.
IF:1.1 (2012)
2. **Balogh, Á.**, Santer, D., Pásztor, T.E., Tóth, A., Czuriga, D., Podesser, B.K., Trescher, K., Jaquet, K., Erdődi, F., Édes, I., Papp, Z.: Myofilament protein carbonylation contributes to the contractile dysfunction in the infarcted LV region of mouse hearts. *Cardiovasc. Res.* 101 (1), 108-119, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvt236>
IF:5.94 (2012)

További Közlemények

3. Bodnár, D., Geyer, N., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., Hegyi, B., Sztrétey, M., Fodor, J., Dienes, B., **Balogh, Á.**, Papp, Z., Szabó, L., Müller, G., Csernoch, L., Szentesi, P.: Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signaling. *J. Physiol.-London.* "accepted by publisher", 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261958>
IF:4.38 (2012)



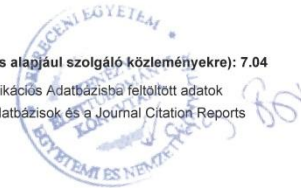
4. Vandenwijngaert, S., Pokreisz, P., Hermans, H., Gillijns, H., Pellens, M., Bax, N.A.M., Coppiello, G., Oosterlinck, W., **Balogh, Á.**, Papp, Z., Bouten, C.V.C., Bartunek, J., D'hooge, J., Luttun, A., Verbeke, E., Herregods, M.C., Herjigers, P., Bloch, K.D., Janssens, S.: Increased Cardiac Myocyte PDE5 Levels in Human and Murine Pressure Overload Hypertrophy Contribute to Adverse LV Remodeling.
PLoS One. 8 (3), e5884, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058841>
IF:3.73 (2012)
5. Czuriga, D., Tóth, A., Pásztor, E.T., **Balogh, Á.**, Bodnár, A., Nizsalóczi, E., Lionetti, V., Recchia, F.A., Czuriga, I., Édes, I., Papp, Z.: Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure.
Basic Res. Cardiol. 107 (2), 13p., 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-012-0244-x>
IF:5.904
6. Papp, Z., Czuriga, D., Balogh, L., **Balogh, Á.**, Borbély, A.: How cardiomyocytes make the heart old.
Curr. Pharm. Biotechnol. 13 (13), 2515-2521, 2012.
IF:2.69
7. Czuriga, D., Papp, Z., Czuriga, I., **Balogh, Á.**: Cardiac aging: A review.
Eur. Surg. 43 (2), 69-77, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10353-011-0600-3>
IF:0.283
8. Molnár, A., Borbély, A., Czuriga, D., Siket, M.Y., Szilágyi, S., Hertelendi, Z., Pásztorné T., E., **Balogh, Á.**, Galajda, Z., Szerafin, T., Jaquet, K., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes.
J. Biol. Chem. 284 (2), 1031-1039, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M807600200>
IF:5.328

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29.355

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7.04

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.02.14



8. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Papp Zoltánnak az elmúlt évek során nyújtott szakmai és emberi támogatásáért, az útmutatásért, melyet a kísérletes munkában és a publikációk, valamint a disszertáció elkészítése során adott.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Édes Istvánnak, a Kardiológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy bekapcsolódjak az Intézetben zajló experimentális tudományos munkába.

Hálával tartozom a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden jelenlegi és korábbi munkatársának, kiemelten Dr. Tóth Attilának, Pásztorné Tóth Enikőnek és Dr. Czuriga Dánielnek, akik munkájukkal és önzetlen segítségükkel hozzájárultak a terveim megvalósulásához. Köszönet illeti továbbá a Kardiológiai Intézet minden tagját, hogy a munkámat mindig segítették.

Köszönöm a bécsi kollaborációs laboratórium munkatársainak, Bruno Podessernek, David Santernek és Karola Treschernek a lehetőséget, hogy az intézetükben eltöltött hetek alatt betekintést nyerhettem az ott zajló munkába.

Végül, de nem utolsó sorban pedig szeretném megköszönni a családom, a Szüleim és a Férjem türelmét, támogatását, amelyekkel könnyebbé vált az akadályok leküzdése és céljaim elérése.



„A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 sz. és a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.”