

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Bódi Beáta**

**Szívizomsejtek kontraktilis funkcióváltásait  
eredményező miofilamentális fehérje eltérések**

**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2021**

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **Szívizomsejtek kontraktilis funkcióváltozásait eredményező miofilamentális fehérje eltérések**

**Bódi Beáta**

**Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán**



**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2021**

# Tartalomjegyzék

Gyakori rövidítések jegyzéke .....	5
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>8</b>
2.1. A szívelégtelenség epidemiológiája, definíciója és csoportosítása .....	8
2.2. A szarkomer felépítése és mechanikája.....	9
2.3. Titin a szarkomer mechanikai rugója .....	11
2.3.1. A titin elhelyezkedése és szerkezete.....	11
2.3.2. A titin funkciója.....	14
2.4. Titin-dependens passzív feszülés direkt módosítása: Oxidatív stressz.....	15
2.4.1. Szulfhidril csoportok oxidációja.....	16
2.4.2. Karboniláció .....	18
2.5. Titin-dependens passzív feszülés indirekt módosítása: hőszokkfehérjék .....	19
2.5.1. HSP27 és $\alpha$ B-krisztallin .....	19
2.6. A bal kamra nyomás-túlterhelésével járó klinikai kórképek .....	21
2.6.1. Kompenzált és dekompenzált patológiás bal kamra hipertrófia.....	21
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. A titin-dependens passzív feszülés és titin izoformák oxidatív módosulásainak vizsgálata a szívizomsejtek fejlődése során .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Korai és késői patológiás hipertrófia miofilamentális vizsgálata a nyomás-túlterhelés patkánymodelljén .....</b>	<b>24</b>
<b>4. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>25</b>
4.1. Módszerek I: Oxidáció vizsgálatának patkánymodellje .....	25
4.2. Módszerek II: Bal kamra hipertrófia állatmodellje .....	30
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1. A titin-dependens passzív feszülés és titin izoformák oxidatív módosulásainak tanulmányozása a szívizomsejtek fejlődése során .....</b>	<b>33</b>
5.1.1. A titin izoformák SH oxidációja életkorfüggő módon növeli az $F_{\text{passzív-Ot}}$ .....	34
5.1.2. A titin izoformák karbonilációja életkorfüggő módon növeli az $F_{\text{passzív-Ot}}$ .....	36
5.1.3. HSP27 és $\alpha$ B-krisztallin fehérjék miofibrillummal-asszociált mennyisége fokozódik a szívizomsejtek fejlődése során .....	40
5.1.4. Összefüggés a titin-dependens $F_{\text{passzív}}$ és titin izoformák oxidatív érzékenysége, valamint a hőszokkfehérjék növekvő expressziós szintje között a szívizomsejtek érése során.....	42
<b>5.2. Miofilamentális változások vizsgálata a nyomásterhelés-indukált patológiás hipertrófia patkánymodelljén .....</b>	<b>43</b>
5.2.1. A maximális $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált erőgeneráció nem változott a korai és késői patológiás hipertrófiában .....	43
5.2.2. A szívizomsejtek $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége nőtt a korai patológiás hipertrófiában .....	44

5.2.3. A titin-dependens passzív feszülés nem változott a patológiás hipertrófia fejlődése során a vizsgált patkánymodellben .....	45
5.2.4. A cTnI PKC-mediált Thr-144 oldallánc hiperfoszforilációja és változatlan cMyBP-C oldallánc-specifikus foszforiláció a korai patológiás bal kamra hipertrófiában .....	45
<b>6. Megbeszélés</b> .....	48
<b>7. Összefoglalás</b> .....	58
<b>8. Summary</b> .....	59
<b>Irodalomjegyzék</b> .....	60
<b>Saját közlemények jegyzéke</b> .....	71
Tárgyszavak.....	74
Keywords .....	75
Köszönetnyilvánítás .....	76

## Gyakori rövidítések jegyzéke

<b>AB</b>	abdominális aorta szűkítés
<b>ATP</b>	adenozin-trifoszfát
<b>BK</b>	bal kamra
<b>cMyBP-C</b>	kardiális miozinkötő C-fehérje
<b>cTnI</b>	kardiális troponin I
<b>DTDP</b>	2,2'-ditiopiridin
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>F<sub>aktív</sub></b>	aktív izometrikus erő
<b>F<sub>max</sub></b>	maximális izometrikus erő
<b>F<sub>passzív</sub></b>	passzív feszülés
<b>HSP/sHSP</b>	hősokkfehérje/kis hősokkfehérje
<b>Ig</b>	immunglobulin
<b>N2B</b>	merev titin izoforma
<b>N2-Bus</b>	szívspecifikus egyedi titin szekvencia
<b>N2BA</b>	rugalmas titin izoforma
<b>PBST</b>	0,1% Tween-20-tartalmú foszfát puffer
<b>pCa</b>	$-\lg[\text{Ca}^{2+}]$
<b>pCa<sub>50</sub></b>	félmaximális erő létrejöttéhez szükséges pCa érték
<b>PEVK</b>	prolinban, glutamátban, valinban és lizinben gazdag titin szekvencia
<b>PKC</b>	protein kináz C
<b>ROS</b>	reaktív oxigéngyökök
<b>SH</b>	szulfhidril
<b>SL</b>	szarkomerhossz

## 1. Bevezetés

A szív-érrendszeri betegségek előfordulásának gyakorisága mind a fejlődő, mind a fejlett országokban jelentős méreteket ölt. A kardiovaszkuláris kórképek patomechanizmusában kiemelkedő jelentőséget tulajdonítanak az oxidatív stressznek<sup>(1)</sup>. A szívizomsejtekben fiziológias körülmények között is keletkező reaktív oxigén-származékok (ROS) és antioxidánsok egyensúlyának megbomlása a sejtek oxidoredukciós állapotának megváltozását eredményezik, melynek következtében a különféle biomolekulák reverzibilis vagy irreverzibilis károsodást szenvedhetnek<sup>(2)</sup>. Számos klinikai tanulmány vitathatatlaná tette a ROS szerepét a szívelégtelenség kialakulásában és progressziójában egyaránt<sup>(3)</sup>. A szabadgyökök direkt módon károsítják a kontraktilis fehérjéket (pl. aktin, MLC1), ami kardiális diszfunkcióhoz vezet<sup>(4)</sup>. Az elmúlt években az intracelluláris elemek között a titin óriásfehérjét megkülönböztetett figyelem övezi, melynek indirekt (pl. hősokkfehérjéken keresztül megvalósuló) és direkt (pl. oxidáció okozta) módosulásai kulcsfontosságú szerepet játszanak a diasztolés feszülés (*stiffness*) adaptív és kóros eltéréseiben<sup>(5)</sup>.

Az is ismert, hogy a szív a káros hatásokra (pl. fokozott krónikus nyomásterhelés) adaptációs folyamatok beindításával válaszol, ami krónikus kardiális átépüléshez (*remodelling*), patológiás miokardiális hipertrófia kialakulásához vezet. Mindez kezdetben a megnövekedett biomechanikai stresszt kompenzálja<sup>(6)</sup>, azonban progressziója szisztolés és diasztolés diszfunkciót eredményez. A folyamat háttérében megváltozott intracelluláris jelátviteli mechanizmusok is felismerhetőek<sup>(7)</sup>. Ezért nem meglepő, hogy a közelmúltban az alap kutatások területén jelentős erőfeszítéseket tettek olyan *in vivo* állatmodellek létrehozásában, amelyek segítenek jobban megérteni a szív hemodinamikai túlterhelése által indukált *remodelling* patofiziológiáját.

A jelenlegi irányelvek alapján, intenzív kutatások tárgyát kell, hogy képezze a szívelégtelenség háttérében lezajló celluláris és molekuláris mechanizmusok mélyebb megismerése, ami potenciálisan új terápiás lehetőségeket is kínálhat<sup>(8)</sup>.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A szívelégtelenség epidemiológiája, definíciója és csoportosítása

A 21. században a kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte a morbiditási statisztikák első helyén szerepelnek<sup>(9)</sup>. A jelenlegi adatok alapján a szívelégtelenség prevalenciája a felnőtt populáció körében megközelítőleg 1-2%<sup>(10)</sup>, azonban a 2030-ra történő előrejelzések, a népesség növekvő öregedési tendenciájának köszönhetően még aggasztóbbak<sup>(11)</sup>. Az utóbbi évtizedekben az orvostudomány ugrásszerű fejlődésének ellenére, a szívelégtelenség diagnózisát követően az 5 éves mortalitási ráta közel 50%<sup>(12)</sup>. Definíció szerint, a szívelégtelenség egy klinikai szindróma, melynek tipikus tünetei (légszomj, lábdagadás és fáradtságérzet) a szív strukturális és/vagy funkcionális rendellenességeiből adódnak<sup>(8)</sup>, amely károsítja a kamra szisztolés és/vagy diasztolés funkcióját. Kialakulásában számos tényező játszik szerepet. Leggyakrabban a miokardiális iszkémia, szívbillentyű betegségek, a primer (genetikai faktorok) és szekunder kardiomiopátiák (immunmediált és gyulladásos ártalmak, toxikus károsodások stb.)<sup>(9)</sup> indítják be a szívelégtelenséghez vezető utat, de egyéb kardiovaszkuláris komorbiditások, mint a hipertónia és diabétesz mellitusz is hozzájárulnak a krónikus szívizom átépüléshez<sup>(13)</sup>.

Korábbi klasszifikáció alapján a szívelégtelenség két típusos megjelenési formája a szisztolés és diasztolés szívelégtelenség. A szisztolés szívelégtelenségre leginkább a kontrakciós erő és az ejekciós frakció (EF) csökkenése jellemző, míg a diasztolés szívelégtelenség során a bal kamra kontraktilitása és az EF megtartott, a diasztolés telődés károsodik. Bár a szisztolés és diasztolés szívelégtelenség kialakulásának mechanizmusa valószínűsíthetően eltér egymástól, azonban a két kórkép gyakran kombinálódik.

Az Európai Kardiológus Társaság (ESC, European Society of Cardiology 2016-os) irányelvei a szívelégtelenség klasszifikációját az EF alapján három fő altípusban határozta meg<sup>8</sup>. Ha a bal kamrai EF 40% alatti, akkor csökkent EF-val járó szívelégtelenségről beszélünk



(*HFrEF, heart failure with reduced ejection fraction*), melyet leginkább szisztolés szívelégtelenségként definiálunk<sup>(6)</sup>. A szívelégtelenség tünetei gyakran 50% EF mellett jelentkeznek, melyre diasztolés szívelégtelenségként tekintünk (*HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction*). Mindezek mellett meghatározásra került egy „átmeneti kategória” is, ahová azokat a betegeket soroljuk, akiknek EF-ja 40-50% között van, ezáltal bevezetve a közepes EF-jú szívelégtelenség (*HFmrEF, heart failure with mid-range ejection fraction*) fogalmát. A szívelégtelenségben a kamrai hipertrófia, a szív üregrendszerét érintő térfogati eltérések és az extracelluláris mátrix átépülése (fibrózis) a szívizomzat „*remodellingjét*” eredményezik<sup>(14,15)</sup>. Mindezen változásokat a szívizomsejtek miofilamentális fehérjerendszerében szokatlan izoformák megjelenése, a fehérjék kóros degradációja és foszforilációs eltéréseik is kísérhetik, melyek hozzájárulhatnak a szívizomsejtek kontrakciós-relaxációs ciklusának romlásához<sup>(16)</sup>.

## **2.2. A szarkomer felépítése és mechanikája**

A szívizomsejtekben a vékony (6-9 nm átmérőjű) és vastag (12-15 nm átmérőjű) filamentumok a kontrakciós erő generálására képes szarkomerekbe rendeződnek, amelyet két Z-lemez határol. A vékony filamentumok dominánsan aktin fehérjéből épülnek fel és a polimerizált filamentumok egymás köré tekeredve alakítják ki a kettős hélix struktúrát, amelyhez regulatórikus troponin (Tn)- tropomiozin (Tm) molekulákból álló komplexek kötődnek<sup>(17)</sup>. Klasszikus elképzelés szerint, az aktin-miozin interakció a tropomiozin alapállapotában nem következhet be, mivel ahhoz a troponinok  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött állapota is szükséges. A troponin komplexet három eltérő funkciót ellátó alegység alkotja: (1) a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő troponin C (TnC) alegység<sup>(18)</sup>, (2) a tropomiozint kötő troponin T (TnT)<sup>(19)</sup> és (3) a troponin I (TnI), mely az aktin-miozin kereszthíd kialakulását gátló fehérje<sup>(18)</sup>. A kardiális TnI (cTnI) jellegzetes foszforilációs helyei proteinkináz A (PKA)-mediált esetben a szerin 22/23 (Ser-

22/23) rágcsálókban, míg a humán szívizomban a Ser-23/24, proteinkináz C (PKC)-mediált esetben a Ser-43/45 és a treonin-144 (Thr-144) aminosavak<sup>(20)</sup>.

A szarkomer közepén elhelyezkedő vastag filamentumok könnyű (MLC) és nehéz miozin (MHC) láncokból állnak, melyek feji és farki régiókból épülnek fel. A könnyű és nehéz láncok kapcsolata három különböző izomiozint alkothat. A legmagasabb ATPáz aktivitással rendelkező V<sub>1</sub> jelű homodimer két  $\alpha$ -MHC-t, a legalacsonyabb ATPáz aktivitással bíró V<sub>3</sub> jelű két  $\beta$ -MHC-t, míg a V<sub>2</sub> heterodimer, egy-egy molekula  $\alpha$ -MHC-t és  $\beta$ -MHC-t tartalmaz, melynek ATPáz aktivitása *in vitro* a V<sub>1</sub> és V<sub>3</sub> homodimer aktivitása között helyezkedik el. A MLC-k révén további kombinációk képződhetnek. A vastag filamentum felépítésében részt vesz még a 140 kDa méretű kardiális miozinkötő C-fehérje (cMyBP-C), mely kapcsolatban áll az aktinnal, miozinnal, valamint a titinnel<sup>(21)</sup> és jelentős szerepet játszik az aktin-miozin interakcióban<sup>(22)</sup>. A cMyBP-C három foszforilálható szerinnel rendelkezik (Ser-273, Ser-282 és Ser-302), melyek foszforilációját a PKA, PKC és proteinkináz D (PKD), a Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin által aktivált kináz II (CaMKII), valamint a 90 kDa nagyságú riboszómális S6 kináz egyaránt végezheti<sup>(23)</sup>. A fehérje eltérő típusú módosulásainak több kórkép kialakulásában is jelentős szerepe van<sup>(24)</sup>. Összességében a miofilamentumokat alkotó strukturális és regulátor funkciójú fehérjék poszttranszlációs módosulásai a szívizomsejtek erőgenerációs teljesítményét és Ca<sup>2+</sup>-érzékenységét egyaránt befolyásolhatják<sup>(16, 25, 26)</sup>.

Az izom-kontrakció élettani alapja az aktin és miozin molekulák feji régiói között kialakult kereszthidak képződése és felbomlása. A kereszthíd-ciklus következtében a filamentumok elcsúsznak egymáson, ami megrövidíti a szarkomert. Ez a „csúszó filamentum modell”<sup>(27)</sup>, melynek részletes ismertetésétől a disszertációban eltekintek. Diasztolé alatt az intracelluláris [Ca<sup>2+</sup>] alacsony, a cTnI-tropomiozin komplex gátolja az aktin-miozin interakciót. Szisztolé során a citoplazmatikus [Ca<sup>2+</sup>] emelkedése indítja meg és tartja fent az aktin-miozin

kölcsönhatás kialakulását. A miozin az aktinnal közösen az ATP hidrolíziséből biztosítja a miofilamentális kontrakcióhoz szükséges kémiai energiát.

A harántcsíkolt izom és szívizom aktív mechanikai képességén túl igen fontos tulajdonsága, hogy rugalmas. A szarkomerben uralkodó szerkezeti rend megbomlása nélkül az izomrostok akár eredeti hosszuk több mint kétszeresére nyújthatók. A folyamat során az izomban ún. passzív erő (ellenállás) alakul ki, amely az izom nyugalmi hosszát a nyújtóerő megszűnése után helyreállítja. Az izom passzív rugalmasságáért a szarkomer harmadik filamentális rendszere, azon belül is leginkább annak titin komponense felelős.

### **2.3. Titin a szarkomer mechanikai rugója**

Már az 1950-es években feltételezték a titin molekula, mint harmadik filamentum létét a szarkomerben<sup>(28)</sup>, azonban az elektroforézises analízis során először csak 1979-ben került kimutatásra<sup>(29)</sup>, ami a titáni mérete miatt, a titin elnevezést kapta<sup>(30)</sup>. A titin az izom teljes fehérjemennyiségének csaknem 10%-át teszi ki, mégis a felfedezése elég sokáig váratott magára. Ennek az volt az oka, hogy gigantikus mérete miatt a hagyományos 6-15% akrilamidot tartalmazó gélekben egyáltalán nem jelenik meg, detektálásához speciális, kevesebb, mint 2%-os gélek szükségesek.

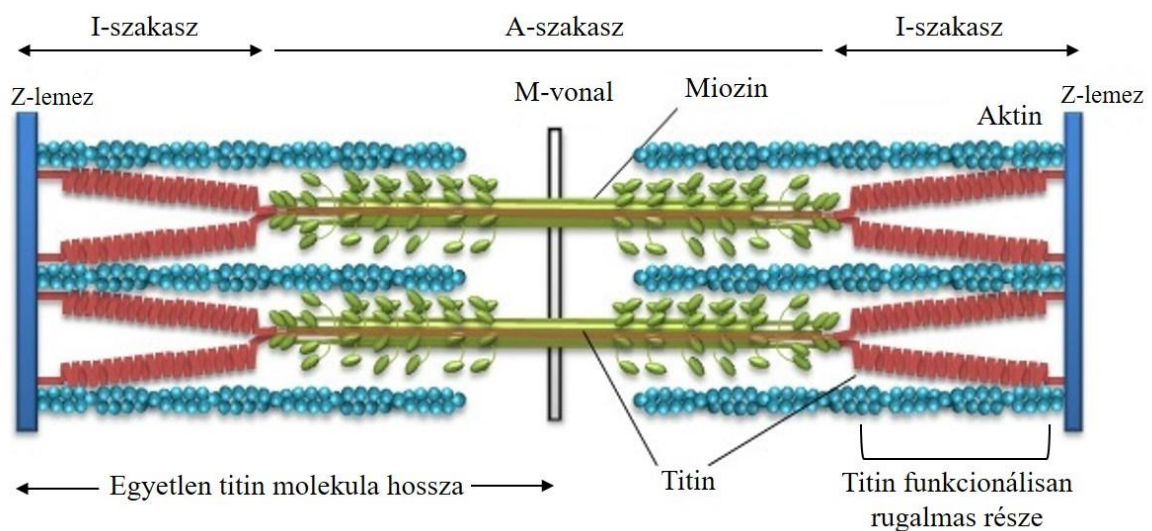
#### **2.3.1. A titin elhelyezkedése és szerkezete**

A celluláris diasztolé és a szívizomsejtek passzív feszülésének fő meghatározója a titin<sup>(5)</sup>.<sup>31)</sup> (1. ábra). A molekuláris rugó kinyújtott hossza csaknem 1  $\mu\text{m}$ , mely a fél szarkomert átöleli a Z-lemeztől az M-vonalig húzódva. Molekula mérete izoformától függően 3000-3800 kDa<sup>(32)</sup> (viszonyításképpen, az aktin 43-48 kDa, a miozin 480 kDa molekulatömegű fehérje).

A titin molekulák Z1 és Z2 doménjei a teletoninon (más néven T-cap/titin-sapka) és  $\alpha$ -aktinon keresztül kötődnek a Z-lemezhez<sup>(33)</sup>. A fehérje N-terminálisának 80 kDa-nyi része ível át a Z-lemezen, ahol a titin molekulák a szomszédos szarkomerekbe benyúlva egymással teljesen átfednek<sup>(32)</sup>.

Az I-szakaszban található a titin kb. 800-1500 kDa része, ahol rugalmas kapcsolatot alakít ki a vékony filamentumok Z-lemezhez közeli vége és a vastag filamentumok csúcsai között. Ebben a szakaszban a titin elrendeződése alapján három zónát különböztetünk meg<sup>(34)</sup>: (1) egy úgynevezett „end filament” zónát, ahol a vastag filamentum végétől egy kb. 0,1  $\mu\text{m}$ -es szakaszon a titin molekulák hosszuk mentén több molekulából álló kötegekké rendeződnek<sup>(35)</sup>, (2) a Z-lemez közepétől kb. 0,1  $\mu\text{m}$ -es szakaszon a titin fehérjék a vékony filamentumokhoz kötődnek<sup>(36, 37)</sup>, (3) végül pedig a két zóna között a kötegek különálló molekulákká válnak szét<sup>(38)</sup>.

A molekula 2 MDa-nyi része az A-szakaszban található, ahol minden vastag filamentum-félhez hat titin molekula kötődik<sup>(39)</sup>, ezáltal szoros kapcsolatot alakít ki a miozin, illetve a cMyBP-C fehérjével egyaránt. Ezért fiziológias körülmények között ezt a régiót nyújthatatlannak tartják<sup>(33)</sup>. A titin C-terminálisának 200 kDa-os része az M-vonalban helyezkedik el, ahol a titin filamentumok ugyancsak átlapolnak egymáson<sup>(33, 40)</sup>.



1. **ábra.** A titin fehérje (piros) elhelyezkedése a szarkomerben. Egyetlen titin molekula a Z-lemeztől M-vonalig húzódik. A molekula nyújtható része az I-szakaszban foglal helyet.

A titin molekula egyetlen gén (TTN) által kódolt, ami 363 exont tartalmaz. Gigantikus mérete ellenére viszonylag monoton felépítésű.

*A titin elsődleges szerkezetét* izoformánként átlagosan 27000-33000 aminosav alkotja, jelenlegi adatbázisok alapján a teljes fehérje 38138 aminosavból is állhat.

*Másodlagos szerkezet.* Az 1990-es években került kimutatásra, hogy a titin szekvencia két különböző típusú, kb. 90-100 aminosav hosszúságú mintázat többszöri ismétlődéséből áll<sup>(41)</sup>. Később az első típust I-típusú immunglobulin (Ig), a második típust fibronektin III típusú (Fn) domének szuperfamilijába sorolták<sup>(42)</sup>. Ezek mindegyike hét antiparallel béta-lemezből álló stabil globuláris doméneket alkot<sup>(43, 44)</sup>. A doméneken kívül a titin kb. 8-10%-át egyedi szekvenciák alkotják. Funkcionális szempontból legfontosabb az I-szakaszban helyet foglaló PEVK szegmens, amely nevét a felépítésében döntő hányadban közreműködő prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavakról kapta. A titin I-szakaszban található funkcionálisan rugalmas része 4 régióra osztható: (1) a „proximális Ig-domének” (Ig10-Ig20), (2) a PEVK régió, (3) az N2B egyedi szekvenciákból álló régióra (N2-Bus), valamint (4) a „disztális Ig-domének” (Ig80-Ig95) régióra. Az N2BA izoforma esetében megkülönböztetünk még egy „középső Ig-domének” (Ig24-Ig76) és egy úgynevezett N2-A alkotórészt is. A „disztális Ig-domén” régió konstitutívan fejeződik ki, azonban a „proximális Ig-domén” régió és a PEVK szegmens hossza izoformától függően változik<sup>(42, 45)</sup>.

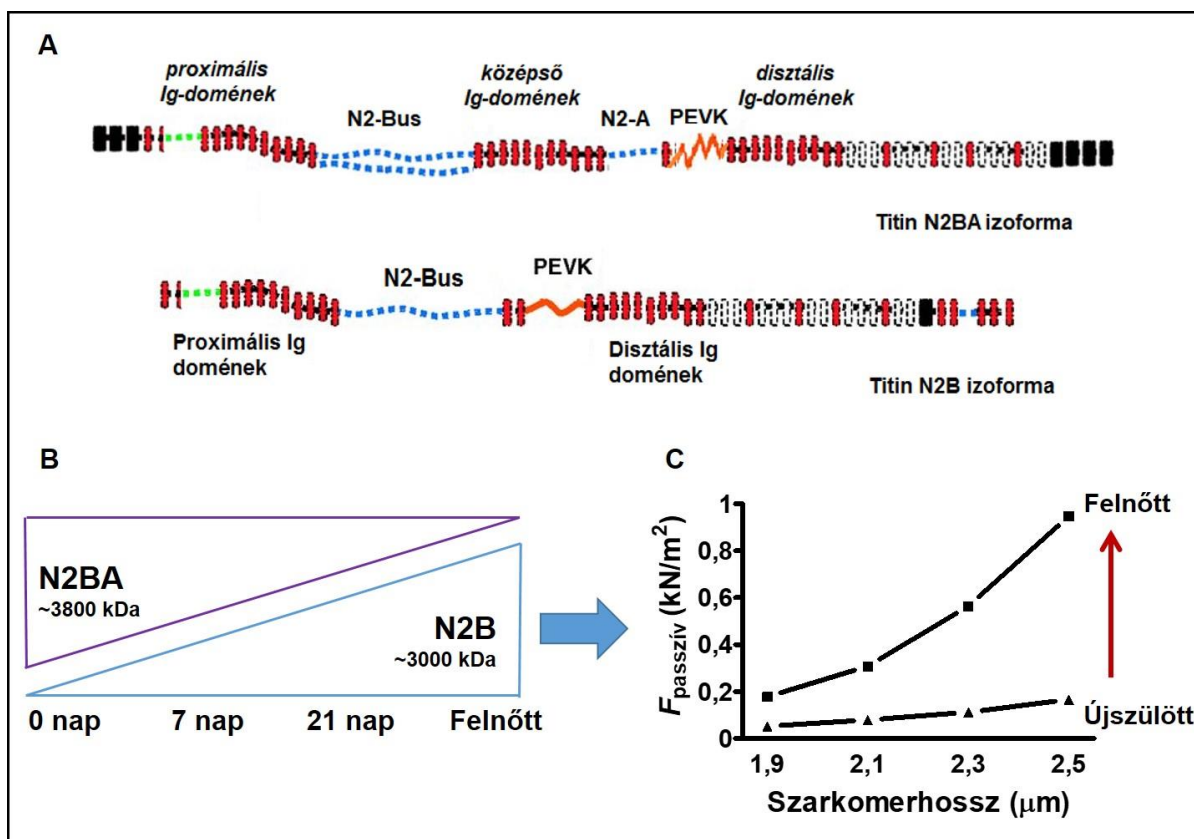
*A titin harmadlagos szerkezete* alatt a domének és egyedi szekvenciák sorozatát értjük, kapcsolatuk a szarkomer állapotának és egyéb (pato)fiziológias állapotok függvénye.

### 2.3.2. A titin funkciója

A titin elsődleges feladata az izom passzív rugalmasságának élettani igények szerinti biztosítása, melynek alapját a molekula különböző izoformái adják. Mindemellett fontos szerepe van a vastag filamentumok rögzítésében és hatékony molekuláris rugóként működik az izomkontrakció során<sup>(38)</sup>. Feltételezik, hogy a miogenezis során a titin részt vesz a miofibrillumok szerkezetének kialakításában, illetve szerin/treonin kináz doménje révén szerepet tölthet be jelátviteli útvonalak közvetítésében is<sup>(46)</sup>.

A titin méretében és rugalmasságában is eltérő izoformákban fejeződik ki. Felnőtt humán szívben a titin egy rövidebb és merevebb N2B (~3000 kDa, az összes titin 70%-a) és egy hosszabb, elasztikusabb N2BA (~3800 kDa, az összes titin 30%-a) izoformája expresszálódik<sup>(47)</sup>. Ebből adódóan a rövid izoformák nagyobb, míg a hosszabb titin izoformák kisebb passzív feszülést eredményeznek<sup>(48)</sup>. A titin izoforma-kompozíciója fajonként és életkortól függően változik. Újszülött patkány szívizomsejtekben a rugalmasabb N2BA titin (kb. 90%) a domináns izoforma, azonban születés után a kisebb N2B izoforma expressziója fokozódik (kb. 90-95%), mindez pedig fokozza a passzív feszülést a felnőtt kardiomiocitákban (2. ábra). Az izoforma-kompozíciók érvényre jutásának hátterében az életkorfüggő fajon belüli, valamint a fajok közötti eltérő hemodinamikai viszonyok<sup>(49)</sup>, illetve a rágcsálók lényegesen rövidebb élettartama is feltételezhető.

A kardiomiociták titin alapú passzív rugalmassága nem egy konzervált tulajdonság, így a titin izoforma-összetételének megváltozása (pl. életkor előrehaladtával), az oxidatív és foszforilációs állapotának változása, valamint egyéb fiziológiás tényezők (pl. titinhez kötődő hősokkfehérjék) direkt és indirekt módon befolyásolhatják a szívizomsejtek passzív feszülését<sup>(49-51)</sup>.



**2. ábra.** Az N2BA és N2B titin izoformák: molekuláris szerkezete (Kovács Á. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016 alapján módosítva) (A), életkorfüggő megoszlása (B), valamint a titin-dependens passzív feszülésre gyakorolt hatása (C). N2-Bus: N2-B unique sequence (egyedi szekvencia) elem; PEVK: prolin, glutamát, valin és lizin aminosavakban gazdag domén.

#### 2.4. Titin-dependens passzív feszülés direkt módosítása: Oxidatív stressz

A szabadgyökök és antioxidánsok aránya meghatározó a normál szöveti működés szempontjából, a közöttük lévő egyensúly megbomlása oxidatív károsodás kialakulásához vezethet, mely jelentős szerepet játszik számos kardiovaszkuláris kórkép kialakulásában<sup>(2, 52)</sup>. A kardiovaszkuláris rendszerben a szabadgyökök jelentős részét a mitokondriális légzési lánc biztosítja, de többek között a xantin-oxidáz, mieloperoxidáz, nitrogén-monoxid szintáz és lipoxigenázok is hozzájárulnak a szabadgyökök termeléséhez<sup>(53)</sup>.

Élettani körülmények között nagyon fontos szerepet töltenek be a jelátviteli folyamatok szabályozásában, hatással vannak a protein foszfatázok és kinázok működésére és részt vesznek a patogének elleni küzdelemben is<sup>(54)</sup>. A szabadgyökök túltermelését a szervezet antioxidáns

rendszere ellensúlyozza, azonban az egyensúly megbomlása reaktív oxigén/nitrogén származékok (ROS/RNS) képződéséhez, így oxidatív stresszállapotok kialakulásához vezet. A ROS csoportban a szuperoxidot ( $\text{O}_2^-$ ), a hidrogén-peroxidot ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) és a hidroxilgyököt ( $\text{OH}^\bullet$ ) tartjuk számon. Az RNS-sek közé a nitrogén-monoxidot (NO) és a belőle más molekulákkal ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{CO}_2$ ) vagy protonnal történő reakció során keletkező peroxinitritet ( $\text{OONO}^-$ ), nitrozo peroxokarboxilátot ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ) és peroxonitritet (ONOOH) soroljuk<sup>(55)</sup>. Oxidatív körülmények között a ROS/RNS szabadgyökök károsítják a sejtek építőköveit, köztük a nukleinsavakat, lipideket és fehérjéket. A fehérjéket felépítő aminosavak közül a cisztein rendkívül érzékeny az oxidatív hatásokra<sup>(54)</sup>. A szívizomsejtek fehérjéi oxidáció következtében reverzibilis és irreverzibilis károsodást szenvedhetnek el, mely módosulások közül kiemelendő a szulfhidril (SH) oxidáció és a karboniláció<sup>(25)</sup>.

Az oxidatív stressz következtében a miofilamentális fehérjék (pl. titin) strukturális és funkcionális változásokat szenvednek el, mely végső soron kardiális diszfunkció kialakulásához is vezethet.

#### **2.4.1. Szulfhidril csoportok oxidációja**

A szívizom fehérjék cisztein oldalláncain jelenlévő szulfhidril (SH) csoportok reverzibilis oxidációjának jelentős élettani és kórélettani szerepe van az eukarióta sejtekben. Részt vesznek elektron transzferben, fehérjék strukturájának kialakításában, szerepet játszanak számos katalitikus folyamatban és DNS-kötő fehérjék működésében. Jelenlétük nélkülözhetetlen az antioxidáns védelemben, az intracelluláris redox homeosztázis fenntartásában. A protein SH-csoportok azonban rendkívül érzékenyek az oxigén és nitrogén tartalmú szabadgyökökkel szemben egyaránt. Oxidáció következtében a fehérjék SH-csoportjai egymással reagálva reverzibilis intra- és intermolekuláris diszulfid hidak létrejöttét eredményezhetik. Megemlítendő még az ugyancsak reverzibilis S-tioláció és S-nitroziláció. Előbbi során kis molekulatömegű tiolok (pl. glutation, S-glutationiláció) kapcsolódnak a



proteinek SH-csoportjaihoz vegyes diszulfidokat eredményezve, míg utóbbinál a NO és a proteinek SH-csoportja között jön létre a kapcsolat<sup>(56)</sup>. Oxidatív stressz során a fehérjék SH-csoportjainak módosulása feltételezhetően az elsők között következik be, ezáltal a sejtek védelmében nélkülözhetetlen szerepet játszanak. Reverzibilis oxidációjának köszönhetően megvédi a fehérjéket az irreverzibilis módosulástól. Az oxidáció során kialakult diszulfidok reverziója redukáló hatású molekulákkal megvalósítható, a sejtekben a redukció a tioredoxin rendszer által biztosított<sup>(56)</sup>. Kutatások szerint a szívizom egyes fehérjeinek SH oxidációja nem egyforma mértékben valósul meg<sup>(57)</sup>.

Laboratóriumunkban végzett korábbi kísérletek igazolták, hogy a kontraktilis fehérjék SH oxidációja hozzájárulhat a szívelégtelenség során kialakuló kontraktilis diszfunkcióhoz<sup>(4)</sup>. A vizsgálatok során kimutatták, hogy az SH-csoportokat *in vitro* oxidáló ditioldipiridin (DTDP, 2,5 mM) a kontraktilis fehérjék oxidációjával párhuzamosan csökkentette a szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -függő aktív erejét és  $Ca^{2+}$ -érzékenységet, valamint kismértékben fokozta a  $Ca^{2+}$ -független passzív erőt<sup>(4)</sup>. Feltételezték továbbá, hogy a titin molekula oxidációja a passzív tenzióra hatással lehet, azonban a titin oxidációjának részletesebb vizsgálatát a szakirodalomi adatok hiánya, valamint a fehérje gigantikus molekulatömegéből eredő technikai nehézségek nem tették lehetővé. Ezek a tényezők szolgáltatták a kiindulási pontot jelen munkához.

Ma már több információval rendelkezünk a titin-alapú passzív erő diszulfidkötések általi modulálásával kapcsolatban. Az N2BA izoforma megközelítőleg 513, míg az N2B titin izoforma 355 ciszteint tartalmaz<sup>(58)</sup>. A titin egyedi szekvenciákat tartalmazó N2B régiójában (N2-Bus) hat cisztein molekula található, amelyek az oxidáció következtében három diszulfidkötés kialakítására képesek, mindez pedig a passzív merevséget jelentősen növeli<sup>(50)</sup>. Ezért a titin ezen régiójának SH oxidációja patológiai szempontból is jelentősnek bizonyult. Néhány évvel ezelőtt megjelent egy tanulmány, ahol kimutatták, hogy a titin Ig-doménekben úgynevezett rejtett ciszteinek vannak jelen, amelyek az S-glutationiláció legfontosabb

célpontjai. Azonban a rejtett oldalláncok csak a szívizomsejtek extrém megnyúlása (2,7-2,8  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhosszon) során, így a fehérje kitekeredése révén válnak elérhetővé. A titin ezen jellegű módosulása pedig fokozza a titin rugalmasságát, ezáltal csökkentve a szívizomsejtek passzív feszülését<sup>(59)</sup>. Mindez bizonyítja, hogy a titin különböző régióiban bekövetkező oxidatív változások eltérő módon befolyásolhatják a szívizomsejtek titin-alapú passzív feszülését.

A jelen értekezésben bemutatásra kerülő eredmények kizárólag az egyedi szekvenciákat tartalmazó N2-Bus régióban található ciszteinek SH oxidációjának titin-dependens passzív feszülésre kifejtett hatását vizsgálta különböző fejlettségi állapotú szívizomsejtekben.

#### **2.4.2. Karboniláció**

Az irreverzibilis karboniláció során reaktív aldehid vagy keton csoportok kötődnek a fehérjék aminosavaihoz, mely leginkább a prolin, lizin, arginin és treonin oldalláncokat érinti<sup>(60, 61)</sup>. A karbonilációs módosulások jelentős része fém-katalizált Fenton-reakció során valósul meg. A folyamat során vas(II) és  $\text{H}_2\text{O}_2$  közreműködésével hidroxil szabadgyök ( $\text{OH}\bullet$ ) képződik, amely jelentős károsító hatásai mellett, karbonilációs aktivitással is rendelkezik<sup>(62-64)</sup>. A Fenton-reakció a protein karboniláció *in vitro* körülmények közötti vizsgálatára széles körben elterjedt<sup>(64)</sup>.

Fiziológias körülmények között a vas fehérjékhez kötött formában van jelen, azonban patológias körülmények között szabad vas szabadulhat fel, ami  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal reagálva hidroxil szabadgyök ( $\text{OH}\bullet$ ) képződését eredményezi<sup>(62, 63)</sup>. A protein karboniláció során a fehérjék degradálódhatnak vagy funkciójuk megváltozhat, valamint az oxidatív módosulás szignalizációs folyamatokat is befolyásolhat<sup>(65)</sup>. Ezáltal szerepe van számos kardiovaszkuláris kórkép kialakulásában<sup>(66)</sup>. Kísérletek bizonyítják például az MHC csökkent működését diabéteszes kardiomiopátiában a fehérje karbonilációját követően<sup>(67)</sup>. Különböző modellekben végzett kutatások kimutatták az aktin és a tropomiozin iszkémia/reperfúzió indukált

karbonilációját, mely szoros kapcsolatot mutatott a bal kamra diszfunkció mértékével<sup>(68)</sup>, sőt erős korrelációt találtak az oxidatív károsodás és a kontraktilis diszfunkció mértéke között szívelégtelen betegek bal kamrai biopsziás mintáiban is<sup>(69)</sup>.

Arról azonban nem áll rendelkezésre információ, hogy miként modulálja a titin karboniláció a szívizomsejtek titin-dependens passzív erejét.

## **2.5. Titin-dependens passzív feszülés indirekt módosítása: hőszokkfehérjék**

### **2.5.1. HSP27 és $\alpha$ B-krisztallin**

A hőszokkfehérjék (HSP, heat shock proteins) lényegében nagymértékben hasonló molekuláris szerkezettel és biokémiai tulajdonságokkal rendelkező konzervált ubiquiter molekulák, amelyek megtalálhatóak a prokariótáktól az eukariótákon át, minden szervezetben. Konzerváltságuk funkcionális jelentőségükre utal, a sejtek fehérje tartalmának kb. 1-2%-át alkotják, ugyanakkor számos fiziológiás és patológiás tényező és környezeti faktor hatására mennyiségük az összfehérjemennyiség akár 15%-át is elérheti<sup>(70)</sup>. Fiziológiás körülmények között a sejtsztódási ciklus és a szövetfejlődés során indukálódhatnak, valamint növekedési faktorok és hormonok is szabályozhatják képződésüket. Kóros körülmények között többek között fertőzések, gyulladás, oxidatív stressz, hipertrófia és toxinok indukálják termelésüket. A környezeti faktorok közül kiemelendő a hőmérsékletváltozás (hő- vagy hidegsokk), alkohol és sugárzás, melyek képesek fokozni a HSP-k expresszióját<sup>(71)</sup>.

A kis hőszokkfehérjék (sHSP, small heat shock proteins), mint a HSP27 (HSPB1) és az  $\alpha$ B-krisztallin (HSPB5) elsősorban a szívizomban, vázizomban, vesében és agyban termelődnek nagy mennyiségben. Ezen felül az  $\alpha$ B-krisztallin a szemlencsében expresszálódik túlnyomórészt<sup>(72)</sup>. Mindkét fehérje kifejeződése stresszhatásokra megemelkedik.

A HSP-k több ponton is képesek az apoptózis folyamatát gátolni, ezáltal segítve a sejtek túlélését<sup>(73)</sup>. Részt vesznek továbbá a citoskeletális rendszer szerveződésének és stabilitásának szabályozásában<sup>(72)</sup>. A HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin hőszokkfehérjék védelmet nyújtanak az oxidatív károsodásokkal szemben. Egyrészt szabályozzák a redukált glutation mennyiségét az

oxidatív védelemben, másrészt csökkentik a ROS/RNS gyökök mennyiségét, ezáltal a fehérje oxidáció mértékét is<sup>(72)</sup>. Stresszhatások során preferenciálisan transzlokálódnak a szarkomerbe, melynek pontos mechanizmusa a mai napig nem tisztázott. A szívben a HSP27 és  $\alpha$ B-krisztallin leginkább iszkémia, hőstressz vagy szívelégtelenség során indukálódik<sup>(74-77)</sup>.

Stressz során a sHSP-k a citoszólból a Z-lemezhez és/vagy az I-szakaszhoz transzlokálódnak<sup>(78-80)</sup>. Egyelőre még nem tisztázott, hogy a sHSP-k foszforilációs állapota befolyásolja-e a transzlokáció folyamatát<sup>(81)</sup>. A sHSP-interakció következtében védett fehérjék közé tartozik a dezmin,  $\alpha$ -aktinin, aktin, troponin-I és T, miozin és a titin<sup>(82-87)</sup>.

Azonban patológiás körülmények között a sHSP-k nem csak a Z-lemezhez, hanem a titin molekula funkcionálisan rugalmas I-szakasz régiójába is transzlokálódnak, ezáltal szabályozva a szívműködés passzív merevségét<sup>(86)</sup>. A titin ezen molekulárisan rugalmas szakaszában található Ig-domének (proximális, középső és disztális) és N2-Bus domének *in vitro* stabilizációja a sHSP fehérjék kötődésén keresztül valósul meg<sup>(87)</sup>. Kísérletek bizonyítják, hogy a titin domének kitekeredése során felszínre kerülő rejtett hidrofób helyek védettek maradtak a sHSP-k jelenlétében az oxidatív stressz alatt<sup>(86)</sup>. Ezek alapján kutatások sugallják, hogy a sHSP-k és a titin molekula közötti interakciót mind a szarkomer nyújtása, mind pedig a merevebb N2B izoforma expressziója egyaránt fokozza, így védve a titin doméneket az esetleges aggregációtól<sup>(86)</sup>.

Az elmúlt évtizedben megjelent tanulmányok valószínűsítik, hogy a HSP-k funkcióját az oxidatív stressz mellett az életkor is nagyban befolyásolja<sup>(88, 89)</sup>. Jelenlegi adatok alapján azonban nem ismert, hogy a titinhez fiziológiás körülmények között kötődő kis hőszokkfehérjék (HSP27 és  $\alpha$ B-krisztallin) mennyire befolyásolhatják az *in vitro* oxidatív titin-dependens passzív feszülés mértékét a különböző fejlettségi állapotú szívműködésben.

## **2.6. A bal kamra nyomás-túlterhelésével járó klinikai kórképek**

Számos szívbetegség következménye a szívelégtelenség, melyek strukturálisan és funkcionálisan egyaránt károsítják a bal kamrát (BK). A szívizom károsodás és a tartós hemodinamikai túlterhelés jelentős plusz terhet ró a szív működésére. A leggyakoribb klinikai állapotok, amelyek a bal kamra fokozott utóterhelésével járnak a magas vérnyomás (hipertónia) és az aorta billentyű szűkülete (sztenózis). A hipertónia a leggyakoribb humán betegség és a szívelégtelenség legfontosabb rizikófaktora<sup>(90)</sup>. 2017 novemberében az American Heart Association (AHA) Kongresszusán kihirdették az új amerikai hipertónia-ajánlást, amelyben a korábbi 140/90 Hgmm-es határértéket 130/80 Hgmm-ben határozták meg<sup>(91)</sup>. A normális értéknek pedig továbbra is a <120/80 Hgmm-et tekintik. Mindezzel pedig jelentősen megnőtt az amerikai hipertóniások száma. Az aorta billentyű szűkülete a leggyakrabban előforduló, a bal kamrai kiáramlás progresszív obstrukcióját okozó kórkép. Előfordulhat valvuláris, sub- és supra- valvuláris formája is. Mindkét kórkép gyakorisága az életkor előrehaladtával exponenciálisan emelkedik<sup>(92, 93)</sup>, amelyek hosszútávon progresszív bal kamrai hipertrófiát és következményes szívelégtelenséget okoznak.

### **2.6.1. Kompenzált és dekompenzált patológiás bal kamra hipertrófia**

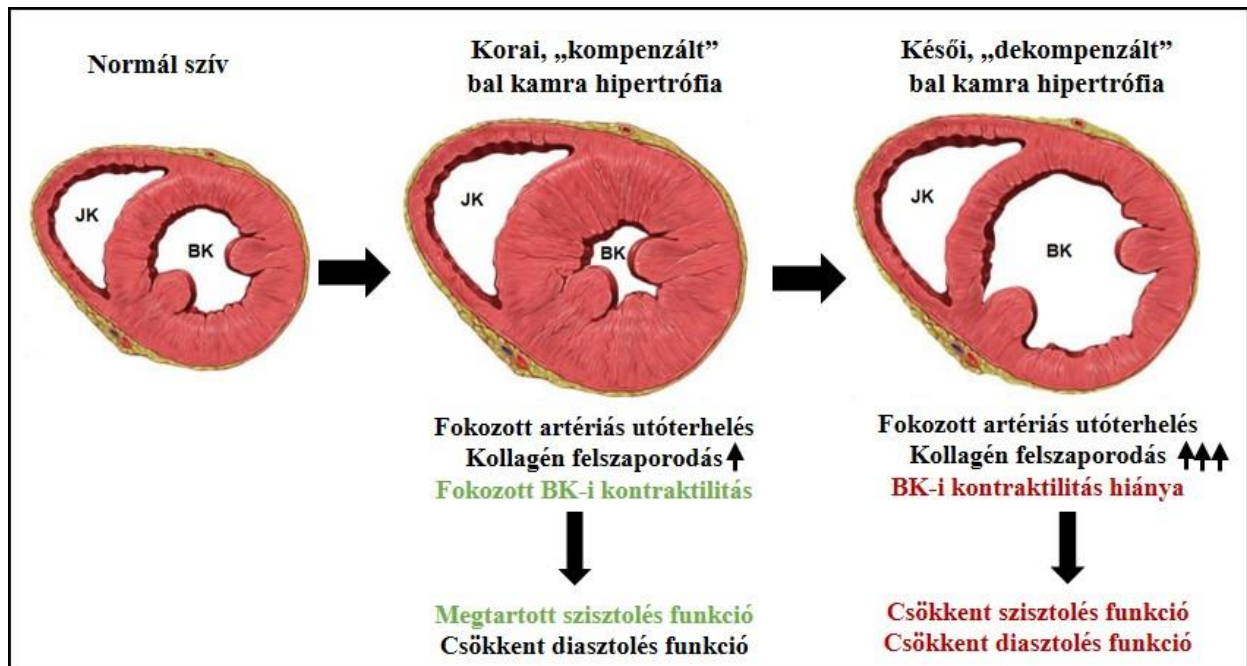
A szív tartós nyomás-túlterhelésének következménye a szív megnövekedett munkája, mely hosszútávon szívelégtelenséghez vezet. Kezdetben a BK kompenzatórikus hipertrófiával alkalmazkodik a megváltozott hemodinamikai körülményekhez a megfelelő nyomás fenntartásának érdekében. Mindez rövidtávon támogatja a keringést, azonban hosszabb távon a hipertrófia káros. A kompenzációs mechanizmusok idővel a szívizomzat strukturális és funkcionális átépüléséhez (*remodelling*) vezetnek, amely a kamrák elégtelen telődését és ürülését, valamint az extracelluláris mátrix fibrózist, a szívizomsejtek nekrozisát és apoptózist eredményezik, ami kontraktilis diszfunkció kialakulásához vezet<sup>(14)</sup>.

A szív krónikus nyomásterhelése patológiás szívizom-hipertrófia kifejlődéséhez vezet, ami a szívelégtelenség kialakulásának egyik legfontosabb oka. Az még nem teljesen tisztázott, hogy az adaptív hipertrófia pontosan hogyan alakul át maladaptív hipertrófiává.

A patológiás BK hipertrófia úgynevezett korai (kompenzált) és késői (dekompenzált) stádiumainak kontraktilitásában jellegzetes változások figyelhetők meg (3. ábra), melynek *in vivo* meghatározására az egyik leginkább elfogadott módszer a nyomás-térfogat analízis<sup>(94)</sup>. Nyomás-térfogat analízissel végzett kísérleti munkák bizonyítják a kontraktilitás fokozódását a BK hipertrófia korai stádiumában<sup>(95-97)</sup>, melynek során a szív a fokozott utóterhelést kompenzálja<sup>(98)</sup>, biztosítva ezáltal a szív megőrzött szisztolés funkcióját. Azonban mindez csak ideiglenes alkalmazkodást tesz lehetővé, előrehaladottabb késői stádiumokban a kontraktilitás-paraméterek jelentősen romlanak<sup>(97, 99)</sup>, a szisztolés és diasztolés teljesítmény csökken. Emellett a progresszív kollagén felhalmozódás és egyéb fibrotikus markerek megjelenése is megfigyelhetővé válik<sup>(100)</sup>.

Kutatások sejtetik, hogy tartós nyomás-túlterhelés során a BK kontraktilitás nem csak szervi, hanem szarkomerfunkció szintjén is változásokat idéz elő. Ugyanakkor nincs információnk a szívizomsejtek miofilamentális rendszerének működésében bekövetkező stádiumfüggő változásokról.

Mivel a BK remodeláció hosszú időn keresztül hozzájárul a kontraktilis funkcióromláshoz, így felmerült, hogy a kompenzált fázisból a dekompenzált fázisba vezető folyamatok terápiás célpontként is szolgálhatnak.



3. ábra. Fokozott nyomásterhelés által indukált bal kamra hipertrófia korai („kompenzált”) és késői („dekompenzált”) stádiumainak kialakulása és funkciójukban bekövetkező patológias változások. JK: jobb kamra; BK: bal kamra.

### **3. Célkitűzések**

A fentiek alapján munkánk során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

#### **3.1. A titin-dependens passzív feszülés és titin izoformák oxidatív módosulásainak vizsgálata a szívizomsejtek fejlődése során**

Célul tűztük ki a titin oxidáció (SH oxidáció, karboniláció) passzív merevségre kifejtett hatásának tanulmányozását különböző fejlettségi állapotú permeabilizált patkány szívizomsejteken. Megvizsgáltuk az oxidatív ágensek (DTDP, Fenton reagens) szívizomsejt mechanikára kifejtett következményeit, valamint párhuzamosan tanulmányoztuk a titin izoformák oxidatív érzékenységét az életkor előrehaladtával.

Célunk volt feltérképezni a titin-asszociált hősokkfehérjék (HSP27 és  $\alpha$ B-krisztallin) expressziójának változását a szívizomsejtek érése során, valamint vizsgálni a titin fehérje oxidáció szabályozásában valószínűsített szerepüket.

#### **3.2. Korai és késői patológiás hipertrófia miofilamentális vizsgálata a nyomás-túlterhelés patkánymodelljén**

Célul tűztük ki a szív krónikus nyomásterhelése során kialakuló korai/kompenzált és késői/dekompenzált patológiás miokardium hipertrófia lehetséges funkcionális és strukturális változásainak felderítését permeabilizált bal kamrai szívizomsejteken. Vizsgáltuk az izolált szívizomsejtek mechanikai teljesítményét, valamint azonosítottuk a szarkomer diszfunkció hátterében feltételezhető miofilamentális fehérjék (cTnI és cMyBP-C) foszforilációs állapotváltozásait.



## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Módszerek I: Oxidáció vizsgálatának patkánymodellje

#### Felhasznált szívizomminták

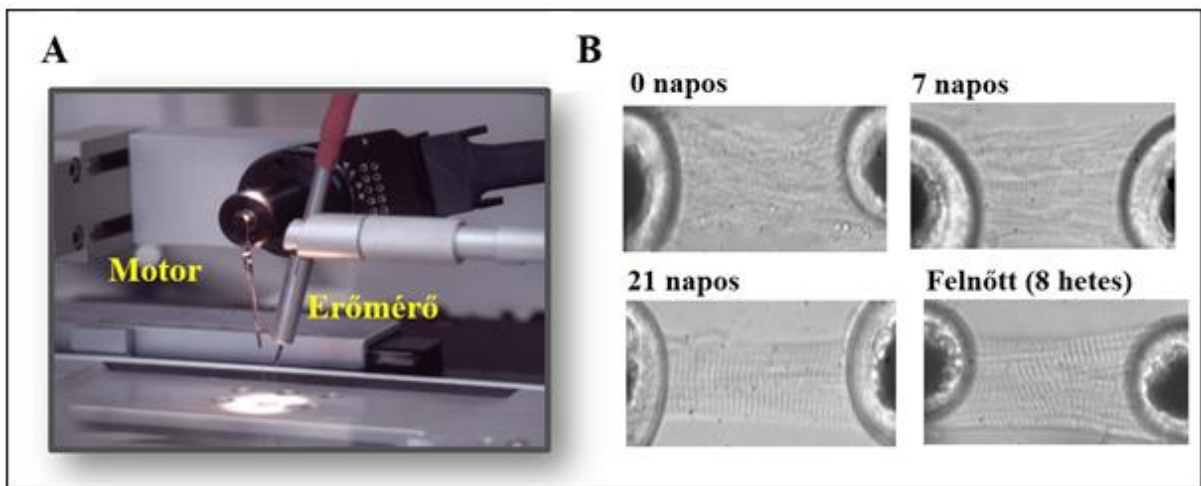
Az oxidációs kísérleteink során használt szívizomminták 0, 7, 21 napos és 8 hetes fiatal felnőtt egészséges Wistar-Kyoto patkányokból származtak. A kísérleti állatok standard körülmények között szabványos ketrecekben voltak elhelyezve a Debreceni Egyetem állatházában, ahol a standard laboratóriumi étel és folyadék *ad libitum* biztosított volt. Az állatkísérleteket az előírásoknak megfelelően, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (Etikai engedély száma: 24/2013/DE MÁB) jóváhagyásával végeztük.

A kísérleti állatok szívét a vizsgálni kívánt életkor elérésekor a mellkas megnyitása során eltávolítottuk, majd a BK-t jéghideg izoláló oldatban (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 2 mM EGTA, 4 mM ATP, 10 mM imidazol; pH 7,0; proteáz inhibitorok: 0,5 mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF), 40 μM leupeptin és 10 μM E-64, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) azonnal leválasztottuk és folyékony nitrogénes gyorsfagyasztást követően későbbi felhasználás céljából -80°C-on tároltuk.

#### Titin-dependens passzív feszülés mérése permeabilizált szívizomsejteken

A különböző életkorú patkányokból származó BK-i szívizommintákat izoláló oldatban szövethomogenizátorral izoláltuk, majd 0,5%-os nem-ionos Triton X-100-al 5 percig 4 °C-on permeabilizáltuk. Az így kapott membránfosztott szívizomsejtek titin-függő passzív merevségét egy Tanszékünkön egyedi fejlesztésű ún. miocita set-up mérőrendszeren mértük. Az izolált kardiomiocitákat szilikon-tartalmú akváriumragasztó (DAP 100% all-purpose silicone sealant; Baltimore, MD, USA) segítségével rögzítettük a mérőrendszer központi egységéhez (4. ábra). A méréseinket 15 °C-on végeztük. Az eltérő életkorú szívizomsejtek passzív feszülésének ( $F_{\text{passzív}}$ ) szarkomerhossz (SL)-függését a sejtek fokozatos nyújtásával vizsgáltuk (SL: 1,9-2,5 μm), míg az oxidoreduktív hatások feltárását fiziológias SL-on (2,3 μm)

mértük video-mikroszkópos ellenőrzés mellett. A mérések  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes relaxáló oldatban [10 mM N,N-Bis (2-hidroxietyl)-2-amino-etán-szulfonsav, 37,11 mM KCl, 6,41 mM  $\text{MgCl}_2$ , 7 mM EGTA, 6,94 mM ATP, 15 mM kreatin-foszfát; pH 7,2; proteáz inhibitorok: 0,5 mM PMSF, 40  $\mu\text{M}$  leupeptin és 10  $\mu\text{M}$  E-64, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] valósultak meg, ahol a sejteket eredeti hosszúságuk 20%-ával megrövidítettük (8 másodperc), melynek során a  $\text{Ca}^{2+}$ -független  $F_{\text{passzív}}$  volt regisztrálható. Az  $F_{\text{passzív}}$  értékeket a szívizomsejtek keresztmetszetére normalizáltuk és abszolút erőegységekben ( $\text{kN/m}^2$ ) ábrázoltuk. Méréseink során, a preparátumokon, úgynevezett „stabilitási próbát” végeztünk, melynek során az individuális szívizomsejteket a mérés legelején és a legvégén is megaktiváltuk a legmagasabb  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú aktiváló oldattal (összetétele azonos a relaxáló oldattal, de EGTA helyett CaEGTA-t tartalmaz). Mérési eredményeink értékelésébe csak azokat a preparátumokat vontuk be, ahol a kísérletes protokoll végén a sejt maximális kontraktilis ereje elérte a kiindulási érték 80%-át.



**4. ábra.** A kontraktilis mérőrendszer központi része (A), valamint a motor és az érzékeny erőmérő közé szilikonragasztóval rögzített különböző fejlettségi állapotú permeabilizált szívizomsejtek (B) (saját kísérlet).

A titin izoformák redukált és oxidált SH-csoport tartalmának vagy karbonilációs állapotának passzív feszülésre kifejtett hatásának vizsgálatához az izolált szívizomsejteket 200  $\mu$ l DTDP-t (ditioldipiridin, 10 mM, 30 perc, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vagy Fenton reagenst (50  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6 mM aszkorbinsav, 7 perc, Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmazó relaxáló oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az oxidatív módosulások revertálhatóságát az SH-csoportokat redukáló DTT (ditiotritol, 10 mM, relaxáló oldatban oldva, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oxidatív ágenseket követő 30 perces alkalmazásával teszteltük.

### **A titin izoformák SH-csoport oxidációjának meghatározása**

A különböző életkorú szívizomsejteket a mechanikai izolálást és permeabilizálást követően DTDP-t (10 mM, 2 percig) vagy DTT-t (10 mM, 30 percig) tartalmazó relaxáló oldatban inkubáltuk (200  $\mu$ l). A titin izoformák redukált/szabad SH-csoportjait EZ-Link Iodoacetyl-LC-Biotin (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, 60 percig, sötét szobában, szobahőmérsékleten) reagenssel jelöltük, amelynek kivitelezése pufferoldatban a gyártói leírás alapján történt [a biotint dimetilformamidban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldottuk fel és 0,1 mg/ml pufferoldatban hígítottuk]. A biotinizációt követően a sejtfehérjéket mintapufferben (8 M urea, 2 M thiourea, 3% (w/v) nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 75 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) glicerol, 0,5% brómfenolkék, 40  $\mu$ M leupeptin és 10  $\mu$ M E-64) oldottuk fel. A fehérjekoncentrációkat dot-blot alapú módszerrel határoztuk meg, ahol a marha szérum albumin (BSA) eltérő hígításai szolgáltak standardnak. A fehérjemennyiséget minden esetben egységesen 2 mg/ml-re állítottuk be. A speciális agaróz erősített 2%-os géleken a PAGE után a titin izoformákat Immobilon-FL PVDF membránra transzferáltuk (Millipore, Billerica, MA, USA). A membránok 2% BSA/PBST-ben (0,1% Tween) történő blokkolását követően a biotinnal jelölt SH-csoportokhoz fikoeritrin-konjugált (PE) streptavidint (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) kötöttünk. A teljes fehérjemennyiséget

szuperérzékeny blotfestékkel (UD-GenoMed, Debrecen, Magyarország) kvantitatív módon határoztuk meg. A fluoreszcens jeleket géldokumentációs rendszerrel (MF-ChemiBIS 3.2, DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzsálem, Izrael) detektáltuk, majd a kapott denzitásokat (szabad/redukált SH tartalom) az összfehérjemennyiségre normalizáltuk. A szabad/redukált SH tartalomból (100%) az izoformák oxidált SH tartalma is meghatározható (100 – oxidatív kezeléseket követő szabad/redukált SH tartalom).

### **A titin izoformák karbonilációjának meghatározása OxyBlot™ módszerrel**

A titin izoformák karbonil-csoport tartalmának meghatározását OxyBlot™ (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Millipore, Billerica, MA, USA) gyári kit alkalmazásával végeztük a gyártói leírás szerint. Ennek megfelelően az izolált és permeabilizált szívizomsejteket 200 µl Fenton reagenst (50 µM FeSO<sub>4</sub>, 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6 mM aszkorbinsav, Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmazó relaxáló oldatban kezeltük 7 percig. Ezt követően a szívizomsejteket mintapufferben szolubilizáltuk (8 M urea, 3% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 40 µM leupeptint és 10 µM E-64-et tartalmaz), és a karbonil-csoportokat 2,4-dinitrofenil-hidrazinnal (DNPH) derivatizáltuk. A derivatizálást követően a titin fehérjét tartalmazó pelletet mintapufferben oldottuk (8 M urea, 2 M tiourea, 3% (w/v) nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 75 mM DTT, 50 mM Tris-bázis (pH 14), 10% (v/v) glicerin, 0,5% brómfenolkék, 40 µM leupeptin és 10 µM E-64), majd a fehérjekoncentrációkat dot-blot technikával határoztuk, ahol a standardokat a BSA eltérő hígításai szolgáltatták. A fehérjekoncentrációkat egységesen 2 mg/ml-ben adtuk meg. A titin izoformákat speciális agaróz erősített 2%-os géleken választottuk el egymástól. Elektroforézist követően, a fehérjéket Immobilon-FL PVDF membránra transzferáltuk. Blokkolást követően a következő antitestekkel való jelölést alkalmaztuk: primer (anti-nyúl DNPH antitest 1:150, 1 óra) majd biotinnal konjugált másodlagos antitest (kecske anti-nyúl IgG 1:1000, 45 perc), 1% BSA/PBST-ben hígítva. A biotinnal jelölt karbonil-csoportokat fikoeritrin-konjugált (PE) streptavidinnal tettük láthatóvá. A titin izoformákat

érzékeny membránfestékekkel vizualizáltuk. A számszerűsített adatokat a kezeletlen kontrollok jelintenzitására vonatkoztatva adtuk meg (karbonilációs index, AU).

### **A HSP27 és az $\alpha$ B-krisztallin expressziójának meghatározása Western blot technikával**

Izolálást és permeabilizálást követően a BK-i szívizomsejteket SDS mintapufferben (Sigma, St. Louis, MO, USA) proteáz inhibitorok jelenlétében (10  $\mu$ M E-64 és 40  $\mu$ M leupeptin) oldottuk. A fehérjekoncentrációt a fent említett dot-blot alapú módszerrel határoztuk meg és 2 mg/ml-re állítottuk be. A fehérjéket 8% SDS-poliakrilamid géleken választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 5% BSA/PBST-ben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) blokkoltuk és primer [anti-HSP27 (1:300) vagy anti- $\alpha$ B-krisztallin (1:1000), Abcam-ban, Cambridge, Egyesült Királyság] és másodlagos antitestekkel [peroxidáz-konjugált kecske anti-egér (1:100000) vagy kecske anti-nyúl (1:300), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] jelöltük. A fehérjesávokat kemiluminiscens reakcióval detektáltuk. A teljes fehérjemennyiséget érzékeny membránfesték alkalmazásával számszerűsítettük.

### **Immunhisztokémia**

A szívizomsejteket a fagyasztott BK-i szívizomszövetből izoláltuk és permeabilizáltuk a fent leírtak szerint. A permeabilizált szívizomsejtek tárgylemezre fixálását acetonnal végeztük. Ezt követően a mintákat 20 percen keresztül metanolban inkubáltuk, majd a mosási lépéseket követően kecskeszérumban blokkoltuk (1,5% PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ezután a szívizomsejteket primer [anti-HSP27 (1:50), anti- $\alpha$ B-krisztallin (1: 300), (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) és anti-titin (1:50, T11, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA és T63, Wolfgang A. Linke, Bochum, Németország)] és másodlagos antitestekkel [kecske anti-nyúl Cy2 és Cy3 és biotinilezett kecske-anti-egér (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)] jelöltük. A biotinilált antitesteket Cy2- és Cy3-konjugált streptavidinnel

(1:500, Jackson, Bar Harbor, ME, USA) tettük láthatóvá. A képeket egy Nikon Eclipse 80i fluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettük (Nikon, Tokió, Japán). A rögzített miociták képeit az ImageJ szoftverrel dolgoztuk fel.

## **4.2. Módszerek II: Bal kamra hipertrófia állatmodellje**

### **Felhasznált szívizomminták**

A fokozott nyomásterhelés által kiváltott patológiás hipertrófia állatmodelljének beállítását és karakterizálását a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika munkatársai végezték. A Sprague-Dawley patkányokat (n= 67; 5-6 hetes korú; 160-180 g súlyú; Janvier, Franciaország) szabványos laboratóriumi körülmények ( $22 \pm 2$  °C-on, 12 órás világos/sötét ciklusokkal) között tartották ahol az étel és víz *ad libitum* biztosított volt. A vizsgálatok a kísérleti állatok tartásáról és felhasználásáról szóló nemzetközi szabályok (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Institutes of Health 1996; 85–23) előírásainak megfelelően történtek, a Baden-Württembergi állatetikai bizottság külön engedélyével (engedély kódszáma: G-94/15).

### **Hasi aorta műtéti beszűkítése és a kísérleti állatcsoportok**

Az akklimatizációs idő elteltével (1 hét), az állatokon áloperáció (Sham/kontroll) vagy a hasi aorta műtéti beszűkítése (abdominális aortic banding, AB) történt<sup>(98)</sup>. Az AB operáció (n= 39) során az aorta hasi szakaszának szűkítése egy 22G-s tű külső átmérőjével azonos méretre lett beállítva. A Sham állatok (n= 28) az aorta beszűkítésétől eltekintve, ugyanezen az operáción mentek keresztül. A műtétet követő fájdalom csillapítására buprenorfin (0,05 mg/kg dózisban) injekció alkalmazására került sor.

#### *Kísérleti csoportok*

Az operációs eljárásokat követően az állatokat hat csoportba osztottuk: (1) Sham-6hét (n= 9): a csoport tagjait az áloperációt követően 6 hétig, (2) AB-6hét (n= 13): a csoport tagjait az aorta

szűkítést követően 6 hétig, (3) Sham-12hét (n= 9): a csoport tagjait az áloperációt követően 12 hétig, (4) AB-12hét (n= 13): a csoport tagjait az aorta szűkítést követően 12 hétig, (5) Sham-18hét (n= 10): a csoport tagjait az áloperációt követően 18 hétig, (6) AB-18hét (n= 13): a csoport tagjait az aorta szűkítést követően 18 hétig követtük.

### **Szívizomsejtek mechanikai mérése**

A mélyfagyasztott (-80 °C) BK-i szívizomszövetek izolálását és permeabilizálását, valamint a kontraktilis mérőrendszerhez való rögzítését a korábban leírtak alapján végeztük. Az izometriás erőket egységesen 2,3  $\mu\text{m}$  szarkomerhosszon mértük. A szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -függő erőértékeinek meghatározását a preparátum relaxáló oldatból-aktiváló oldatba történő átvitelével valósítottuk meg. A  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációkat  $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$  egységekben tüntettük fel, mely alapján a relaxáló oldat pCa 9,0-nek, míg a maximális aktiváló oldat pCa 4,75-nek felelt meg. A kardiomiociták aktív erőértékét ( $F_{\text{aktív}}$ ) és  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét ( $\text{pCa}_{50}$ ) maximális, ( $\text{pCa}=4,75$ ) és szubmaximális ( $\text{pCa}=5,2-7,0$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációk mellett regisztráltuk. A szubmaximális pCa által kiváltott aktív erőértékeket a maximális erőre ( $F_{\text{max}}$ ,  $\text{pCa}=4,75$ ) normalizáltuk és egy speciális szigmoid függvényvel (módosított Hill-egyenlet) illesztettük<sup>(101)</sup> az Origin 6.0 elemző program (OriginLab, Northampton, MA, USA) segítségével. Az így kapott, úgynevezett  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységi görbéből a félmaximális erő kifejtéshez szükséges pCa érték ( $\text{pCa}_{50}$ ) származtatható, mely a szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét önmagában megadja.

A szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív erejét ( $F_{\text{passzív}}$ ) relaxáló oldatban a korábban leírtak alapján végeztük. Kísérleteink során minden erőértéket normalizáltunk a szívizomsejtek keresztmetszetére (sejt szélességéből és magasságából számítva). Minden egyes mérés végén a szívizomsejtek stabilitását szaturáló  $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú oldattal ellenőriztük. A szívizomsejtek izometrikus erőértékeit LabView-DAQ (National Instruments, Austin, TX, USA) programmal rögzítettük és MyoD programban értékeltük ki.

## **A cTnI és cMyBP-C fehérjék foszforilációs állapotának vizsgálata**

A BK-i szívműködéseket a mechanikai mérésekhez hasonlóan izoláltuk és permeabilizáltuk, majd SDS mintapufferben oldottuk. A fehérje koncentrációkat dot-blot technikával borjú szérum albumin (BSA) kalibrációs oldatsorral határoztuk meg és egységesen 2 mg/ml-re állítottuk be. A kardiális troponin I (cTnI) és a kardiális miozinkötő C-fehérje (cMyBP-C) elválasztását 12% és 4%-os poliakrilamid gélek alkalmazásával végeztük és a fehérjéket protein standard alapján azonosítottuk (ProSieve, Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME, USA). Gélelektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a membránokat 2% BSA/PBST-ben (0,1% Tween), blokkoltuk (30 perc). Ezt követően a fehérjéket PKA-dependens Ser-22/23-as helyen, PKC-függő Ser-43-as és Thr-144-es helyen foszforilált cTnI, valamint PKA-mediált Ser-282-es helyen foszforilált cMyBP-C ellenes primer antitestekkel jelöltük [(anti-cTnI Ser-23/24 (1:1000), anti-cTnI Ser-43 (1:500) és anti-cTnI Thr-144 (1:500) (Abcam, Cambridge, UK) és anti-cMyBP-C Ser-282 (1:500, Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York)]. A szignálokat peroxidáz-konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitestek (1:300) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) alkalmazásával detektáltuk. A teljes fehérjemennyiséget érzékeny blotfestéssel határoztuk meg. A kemilumineszcens jeleket az összfehérjemennyiségre normalizáltuk.

## **Statisztika**

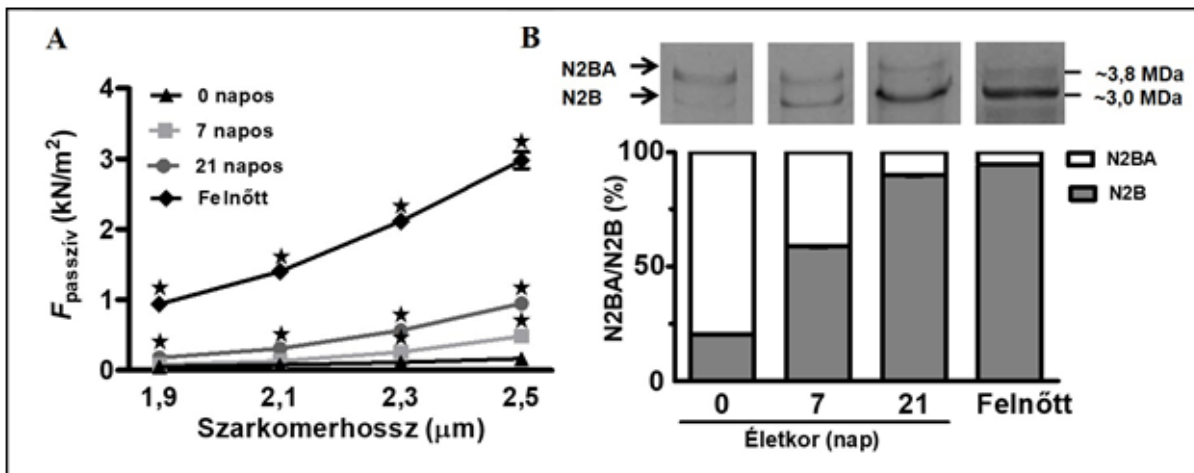
A fehérjesávok jelintenzitását az ImageJ képfeldolgozó program (Nemzeti Egészségügyi Intézetek, Bethesda, Maryland, USA) és a Magic Plot (Magicplot Systems, Szentpétervár, Oroszország) szoftverek segítségével számszerűsítettük. A statisztikai szignifikanciát varianciaanalízissel vizsgáltuk (ANOVA, majd Bonferroni post hoc tesztje). Az eredmények értékeléséhez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornia, USA) szoftvert használtuk. Az értékeket átlag±közéérték közepes hibája (SEM) értéként adtuk meg. A  $P < 0,05$  értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.



## 5. Eredmények

### 5.1. A titin-dependens passzív feszülés és titin izoformák oxidatív módosulásainak tanulmányozása a szívizomsejtek fejlődése során

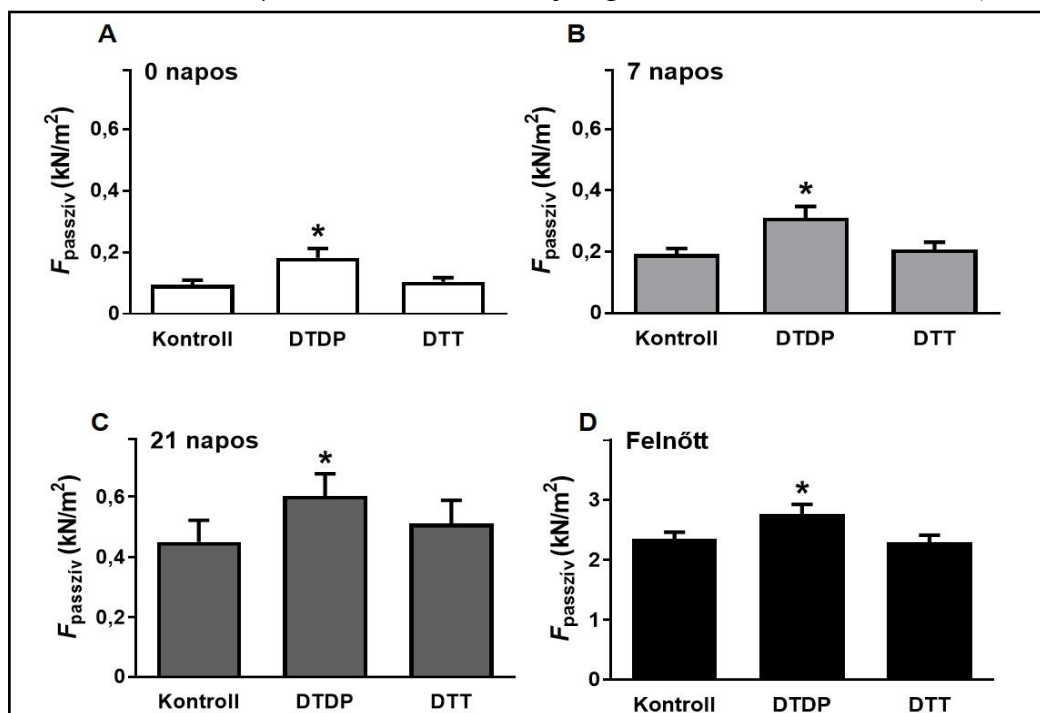
Kísérleteink első lépésében sikerült igazolnunk azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint a szívizomsejtek posztnatális adaptációja során a titin merevebb N2B izoformájának expressziója - változatlan titin összfehérjemennyisége mellett - a rugalmas N2BA izoformával szemben fokozódik<sup>(102)</sup>, ami egyúttal a szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív erejének ( $F_{\text{passzív}}$ ) fokozódását is eredményezi<sup>(102)</sup> (5. ábra). A korábbi szakirodalmi adatok teljeskörű reprodukálása arra utalt, hogy dacára azoknak a technikai nehézségeknek, melyek a titin fehérje óriási méretéből, valamint az újszülött patkány szív rendkívül kis bal kamra tömegéből származnak, kísérletes elrendezésünk alkalmas célkitűzéseink elérésére.



**5. ábra. A titin izoformák kifejeződésének passzív feszülésre kifejtett hatása.** A BK-i szívizomsejteken végzett erőmérések során az  $F_{\text{passzív}}$  a szarkomerhossz növelésével (SL; 1,9-2,5  $\mu\text{m}$ ) minden korcsoportban emelkedett, azonban a 0 és 7 napos patkányok BK-i szívizomsejtekben az erőértékek alacsonyabbak voltak a 21 napos és felnőtt erőértékekhez viszonyítva (0,11 $\pm$ 0,01  $\text{kN/m}^2$  vs. 0,26 $\pm$ 0,02  $\text{kN/m}^2$  vs. 0,56 $\pm$ 0,02  $\text{kN/m}^2$ , 2,1 $\pm$ 0,08  $\text{kN/m}^2$  SL: 2,3  $\mu\text{m}$ , \* $P < 0,05$ ,  $n = 6-13$ ) (A). Gélelektroforetikus vizsgálati eredményeink szerint az N2BA/N2B arányok megoszlása életkorfüggő sajátosságot mutatott (N2BA/N2B arány: 80 $\pm$ 1%/20 $\pm$ 1%; 41 $\pm$ 1%/59 $\pm$ 1%; 10 $\pm$ 1%/90 $\pm$ 1% és 5 $\pm$ 1%/95 $\pm$ 1%, 0, 7, 21 napos és felnőtt patkány szívizomsejtekben,  $n = 33-71$ ) (B) (saját kísérlet).

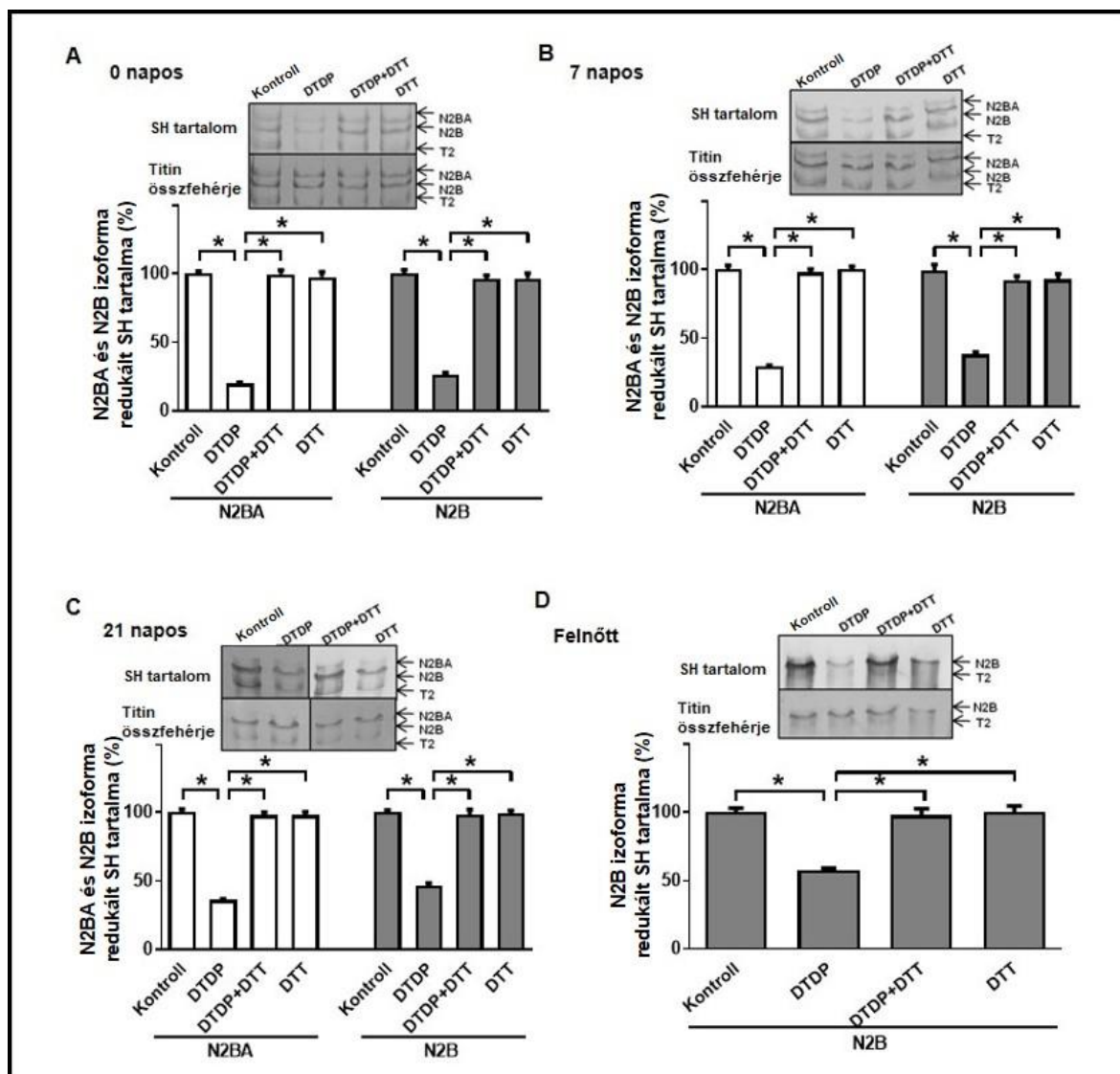
### 5.1.1. A titin izoformák SH oxidációja életkorfüggő módon növeli az $F_{\text{passzív}}$ -ot

Első lépésként az  $F_{\text{passzív}}$  SH oxidatív érzékenységét vizsgáltuk a születést követően. Az SH-csoportokat oxidáló DTDP (10 mM) kezelést követően a titin-alapú  $F_{\text{passzív}}$  szignifikánsan emelkedett minden korcsoportban, azonban a 0 napos és 7 napos patkány szívizomsejtekben ez a növekedés nagyobbak bizonyult, szemben a 21 napos és felnőtt korcsoportokban mért erőértékekkel (kontroll értékek változtak:  $0,09 \pm 0,02 \text{ kN/m}^2$ -ről  $0,18 \pm 0,03 \text{ kN/m}^2$ -re kezelést követően a 0 napos csoportban;  $0,19 \pm 0,02 \text{ kN/m}^2$ -ről  $0,31 \pm 0,04 \text{ kN/m}^2$ -re a 7 napos állatban;  $0,45 \pm 0,07 \text{ kN/m}^2$ -ről  $0,60 \pm 0,07 \text{ kN/m}^2$ -re a 21 napos csoportban, és  $2,35 \pm 0,11 \text{ kN/m}^2$ -ről  $2,76 \pm 0,16 \text{ kN/m}^2$ -re a felnőtt patkányban, SL:  $2,3 \mu\text{m}$ ,  $P < 0,05$  vs. kontroll,  $n = 6-8$  szívizomsejt/legalább 3 különböző szívből) (6. ábra). A DTDP kezeléseket követő SH oxidáció reverzibilitását a tiol-csoportokat redukáló DTT (10 mM) alkalmazásával teszteltük. Az emelkedett  $F_{\text{passzív}}$  értékeket a DTT redukálószer minden korcsoportban hatékonyan revertálta ( $0,10 \pm 0,01 \text{ kN/m}^2$ ;  $0,21 \pm 0,02 \text{ kN/m}^2$ ;  $0,51 \pm 0,08 \text{ kN/m}^2$  és  $2,28 \pm 0,12 \text{ kN/m}^2$  a 0, 7, 21 napos és felnőtt állatokban, SL:  $2,3 \mu\text{m}$ ;  $n = 6-8$  szívizomsejt legalább 3 különböző szívből) (6. ábra).



6. ábra. A DTDP hatása a különböző életkorú szívizomsejtek  $F_{\text{passzív}}$  értékeire. Az oszlopdiagrammok a DTDP-kezelések utáni  $F_{\text{passzív}}$  változásait mutatják a 0 (A), 7 (B), 21 napos (C) és felnőtt (D) állatokban, amit a szekvenciálisan alkalmazott SH-csoportokat redukáló DTT kezelés követett. Az adatokat átlag $\pm$ SEM értékekben fejeztük ki, ahol \* $P < 0,05$  a kontrollhoz viszonyítva.

Az erőmérésekkel párhuzamosan biotinilációs esszén alapuló vizsgálatok során megfigyeltük az N2BA és N2B titin izoformák SH oxidatív változásait a DTDP expozíciót követően. A DTDP az N2BA és N2B titin izoformák szabad SH-csoport tartalmát a funkcionális méréseinkhez hasonló mértékben csökkentette (normalizált SH-csoport tartalom: 100%, a DTDP kezelés előtt; kontroll) a 0, 7, 21 napos és felnőtt permeabilizált kardiomiocitákban (azaz:  $80\pm 1\%$ ,  $71\pm 1\%$ ,  $64\pm 1\%$  és nem detektálható, az N2BA titin izoformában; és:  $74\pm 1\%$ ,  $62\pm 2\%$ ,  $53\pm 2\%$  és  $32\pm 2\%$  az N2B titin izoformában; fenti sorrendben,  $P < 0,05$  vs. kontroll,  $n = 8-23$ ) (7. ábra). A felnőtt N2BA titin izoforma szabad SH-csoport tartalmát a rendkívül alacsony expressziós szintje miatt nem lehetett detektálni. A redukált SH-csoportok érzékeny jelintenzitása a DTT alkalmazását követően visszatért a kontroll szintre, ráadásul az önmagában alkalmazott DTT nem volt hatással a szívizomsejtek SH-csoport oxidációjára (7. ábra).

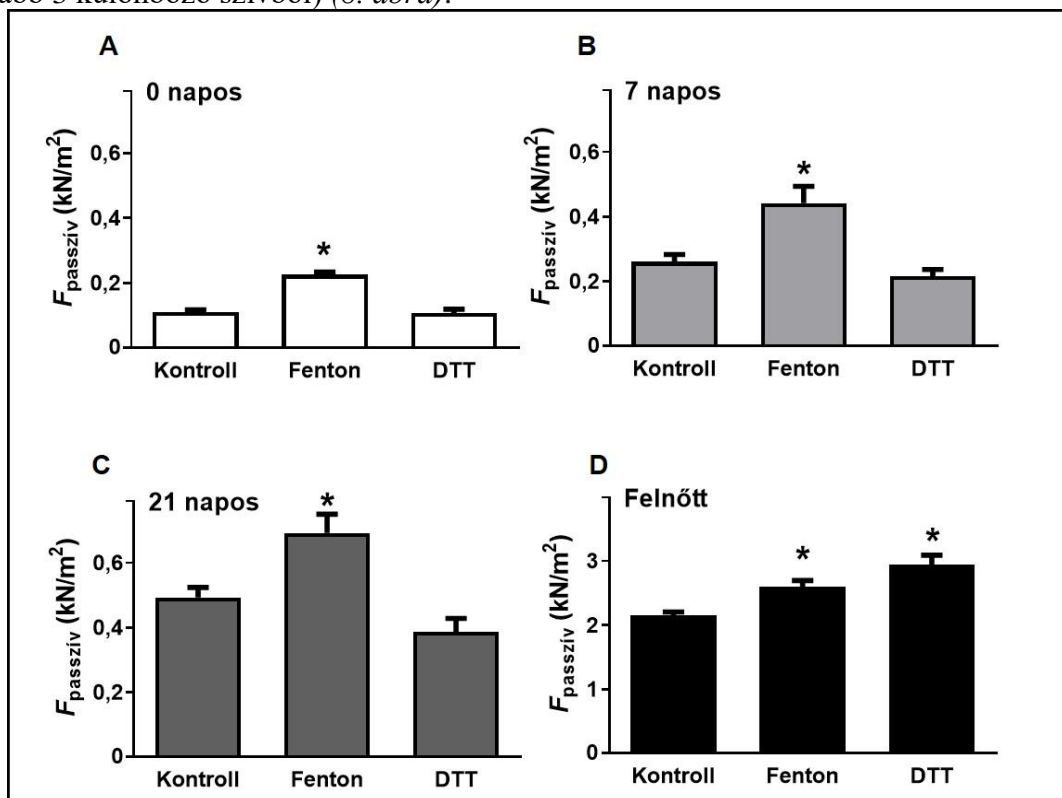


7. ábra. A DTDP-indukált titin izoformák SH-csoport oxidációja a születés utáni szívfejlődés során. A DTDP kezeléseket után az N2BA és N2B titin izoformák szabad/redukált SH-csoport tartalmát biotinilációs módszerrel határoztuk meg, és az izoformák összfehérjetartalmát blotfestéssel tettük láthatóvá minden korcsoportban (A-D). A sávok optikai denzitásának arányát (redukált SH-csoport tartalom/titin összfehérje) a kontroll értékekre normalizáltuk minden membránon (n= 10-16 szív). A T2 a titin degradációs terméke, amely elsősorban a titin A-szakaszban található szegmensét tartalmazza<sup>(103)</sup>. Az adatokat átlag±SEM értékekben adtuk meg, ahol \*P<0,05 a kontroll értékekhez viszonyítva. A felnőtt szívizomsejtekben az N2BA izoforma alacsony expressziója miatt nem detektálható (D).

### 5.1.2. A titin izoformák karbonilációja életkorfüggő módon növeli az $F_{\text{passzív}}$ -ot

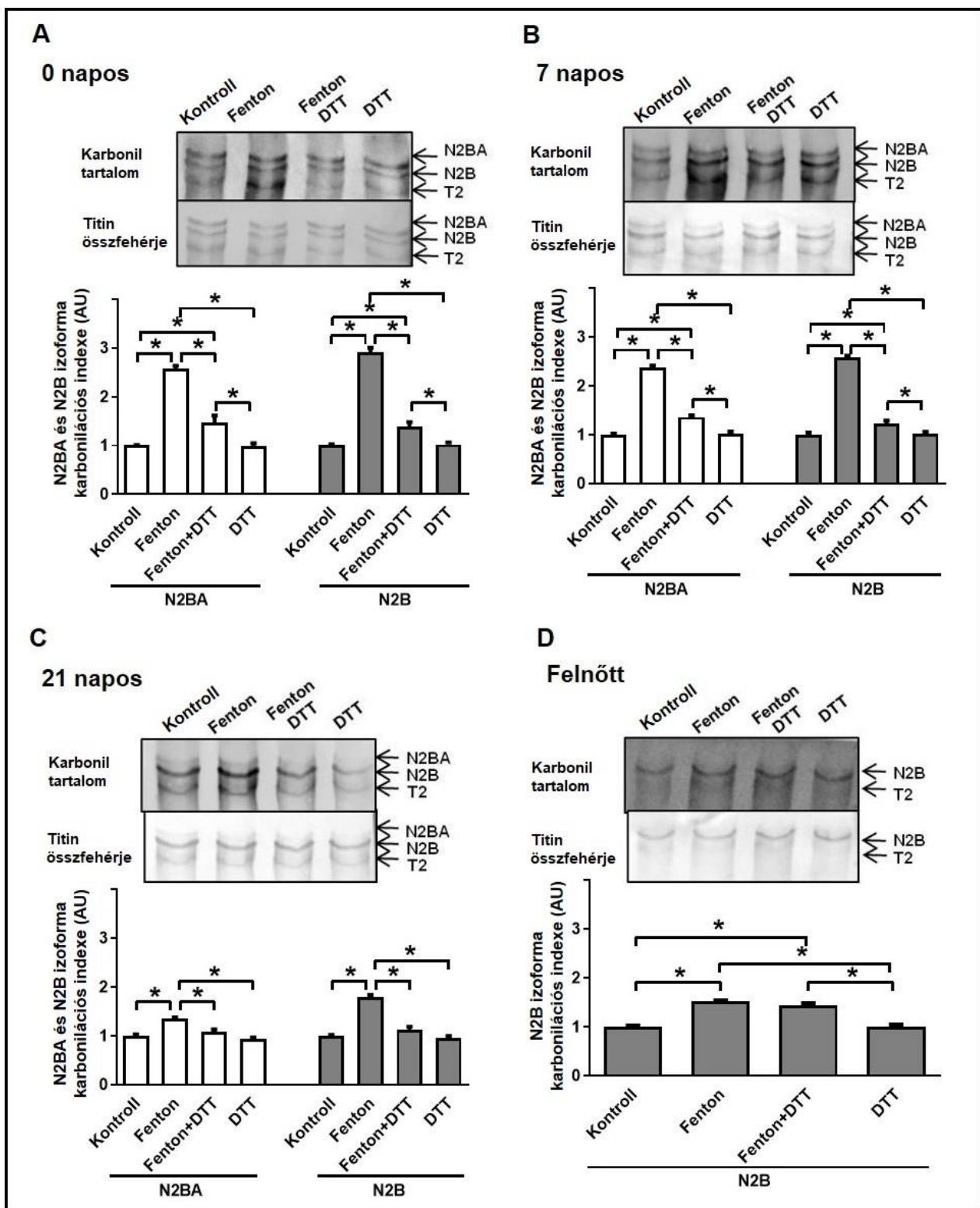
Kísérleteink következő lépésében a titin fehérje karbonilációjának  $F_{\text{passzív}}$  értékekre gyakorolt hatását vizsgáltuk Fenton reagens jelenlétében a különböző életkorú permeabilizált BK-i szívizomsejtekben. A korábbi kísérletekhez hasonlóan megkíséreltük a Fenton hatásokat

a DTT alkalmazásával megfordítani. A 8. ábra szemlélteti, hogy a Fenton reagens szignifikánsan növelik a  $F_{\text{passzív}}$ -ot a 0, 7, 21 napos és felnőtt csoportokban, azonban ennek a növekedésnek a relatív mértéke fokozatosan csökkent az életkor előrehaladtával (azaz:  $0,11 \pm 0,01$  kN/m<sup>2</sup>-ről  $0,22 \pm 0,01$  kN/m<sup>2</sup>-re a 0 napos patkányokban;  $0,26 \pm 0,02$  kN/m<sup>2</sup>-ről  $0,44 \pm 0,05$  kN/m<sup>2</sup>-re a 7 napos állatokban;  $0,49 \pm 0,03$  kN/m<sup>2</sup>-ről  $0,69 \pm 0,06$  kN/m<sup>2</sup>-re a 21 napos csoportokban és  $2,17 \pm 0,05$  kN/m<sup>2</sup>-ről  $2,59 \pm 0,10$  kN/m<sup>2</sup>-re a felnőtt patkányokban,  $P < 0,05$  vs. kontroll,  $n = 6-7$  kardiomiocita legalább 3 különböző szívből). Mindezen hatásokat a DTT teljesen revertálta a 0, 7 és 21 napos korcsoportokban, azonban a felnőtt szívműveletekben ez a reverzibilitás nem volt megfigyelhető ( $F_{\text{passzív}}$ :  $0,11 \pm 0,01$  kN/m<sup>2</sup>;  $0,22 \pm 0,02$  kN/m<sup>2</sup>;  $0,35 \pm 0,03$  kN/m<sup>2</sup> és  $2,94 \pm 0,15$  kN/m<sup>2</sup>, a fenti sorrendben,  $P < 0,05$  vs. kontroll,  $n = 6-7$  szívművelet legalább 3 különböző szívből) (8. ábra).



8. ábra. A titin karboniláció hatása a szívműveletek  $F_{\text{passzív}}$  értékeire a születést követően. A BK-i szívműveletek titin-dependens  $F_{\text{passzív}}$  értékeit relaxáló oldatban (kontroll), Fenton reagens jelenlétében (Fenton), valamint DTT-vel történő inkubációt követően határoztuk meg a négy korcsoportban (A-D). Az adatokat átlag $\pm$ SEM értékekben tüntettük fel, ahol  $*P < 0,05$ ,  $n = 6-7$  szívművelet minden csoportban.

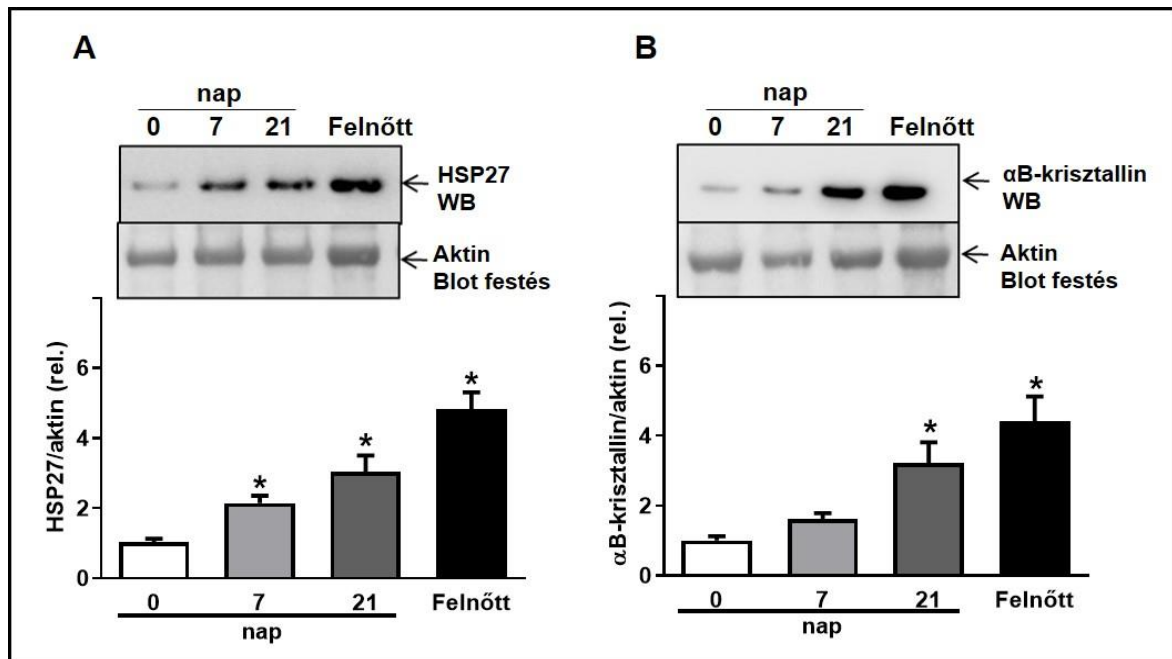
Parallel biokémiai vizsgálatok során OxyBlot™ módszerrel végeztük az N2BA és N2B titin izoformák karbonil-csoport képződéseinek meghatározását a különböző életkorú szöveti homogenizátumokban. A 9. ábra szemlélteti, hogy a karbonil-csoportok szintje (a kezeletlen kontroll karbonilációs indexe: 1 AU) a Fenton reagenssel való inkubációt követően jelentősen megnőtt, bár mindez látszólag negatív korrelációban volt az életkorral (2,57±0,06 AU, 2,37±0,02 AU, 1,35±0,03 AU a 0, 7, 21 napos állatokban az N2BA titin izoformákban, valamint: 2,90±0,10 AU, 2,57±0,04 AU, 1,79±0,03 AU, 1,51±0,02 AU a 0, 7, 21 napos és felnőtt N2B titin izoformákban, P<0,05, n= 9-18 legalább 3 különböző szívből). Az N2BA titin izoforma karbonilációját a felnőtt patkányokban nem lehetett értékelni, annak alacsony expressziós szintje miatt. A titin karboniláció mértékét a DTT visszafordította a 0, 7 és 21 napos szívizomsejtekben, azonban a felnőtt csoportokban ez nem volt megfigyelhető (9. ábra).



9. ábra. A titin izoformák Fenton-indukált karbonilációja az eltérő fejlettségi állapotú szívizomsejtekben. A különböző korcsoportok szívizom mintáit Fenton reagenssel kezeltük, majd a fehérje karbonilációját Oxyblot™ módszerrel (n= 9-16 szív) vizsgáltuk. A titin összfehérjemennyiséget nagyon érzékeny blotfestéssel határoztuk meg. A karboniláció mértékét relatív értékekben fejeztük ki (CI=1, a relaxáló oldatban kapott jelintenzitások alapján, kontroll) (A-D). Az adatok átlag±SEM formában szerepelnek, \*P<0,05. A T2 titin fehérje bomlásterméke. Az N2BA titin izoforma karbonilációja felnőtt patkány szívizomsejtekben nem detektálható (D).

### 5.1.3. HSP27 és $\alpha$ B-krisztallin fehérjék miofibrillummal-asszociált mennyisége fokozódik a szívizomsejtek fejlődése során

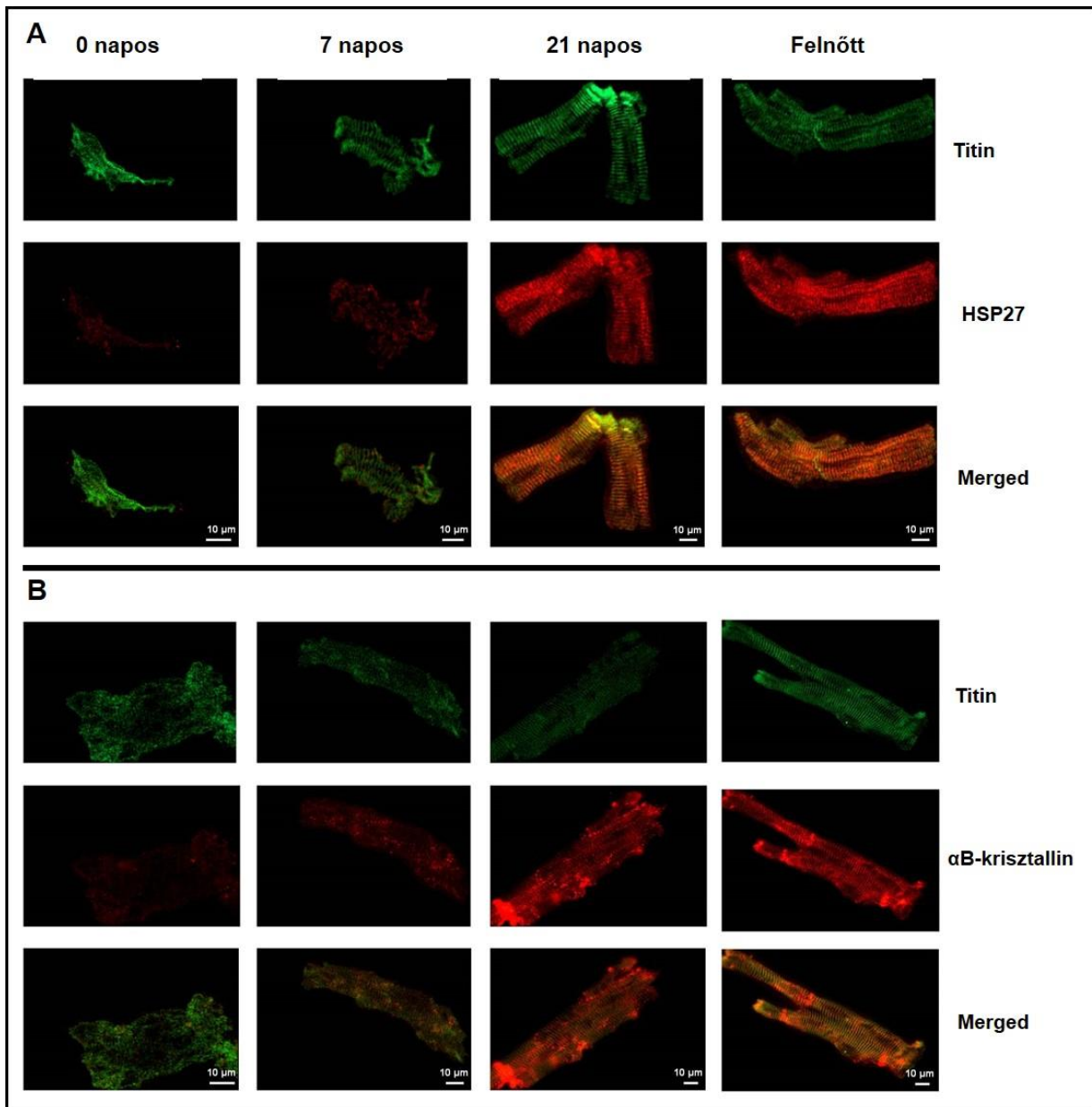
A 0, 7, 21 napos és felnőtt patkányok permeabilizált szívizomsejtjeiben a HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin fehérjék expressziós szintjének vizsgálatát Western blot technika alkalmazásával végeztük. Eredményeink azt mutatták, hogy a HSP27 [ $1,04 \pm 0,08$ ;  $2,14 \pm 0,30$ ;  $3,04 \pm 0,49$ ;  $4,83 \pm 0,54$ ] relatív értékekben kifejezve a 0, 7, 21 napos és felnőtt patkányokban,  $P < 0,05$  (a 0 nap a referenciaszint: 1),  $n = 9-17$  legalább 3 különböző szívből (10A. ábra)] és  $\alpha$ B-krisztallin [ $1,00 \pm 0,11$ ;  $1,61 \pm 0,19$ ;  $3,23 \pm 0,86$ ;  $4,42 \pm 0,96$  a 0, 7, 21 napos és felnőtt szívből,  $P < 0,05$  vs. 0 nap,  $n = 8-15$  legalább 3 különböző szívből (10B. ábra)] kifejeződése a szívizomsejtek életkorával párhuzamosan fokozódott.



10. ábra. A HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin expressziós szintje a szívfejlődés során. A Western blot (WB) vizsgálatok reprezentatív membránképei demonstrálják a HSP27 (A) és az  $\alpha$ B-krisztallin (B) expressziós szintjét a permeabilizált szívizomsejtjeiben az életkor előrehaladtával. A HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin fehérjéket specifikus antitestekkel jelöltük, és az expressziós szintjüket normalizáltuk az aktin fehérje expressziójához. A szimbólumok (\*) a 0 napos patkányokhoz (kontroll) viszonyított szignifikáns különbséget jelölik. Az adatok átlag $\pm$ SEM értékekben ábrázoltuk relatív skálán (rel.) ( $n = 6-8$  szív).



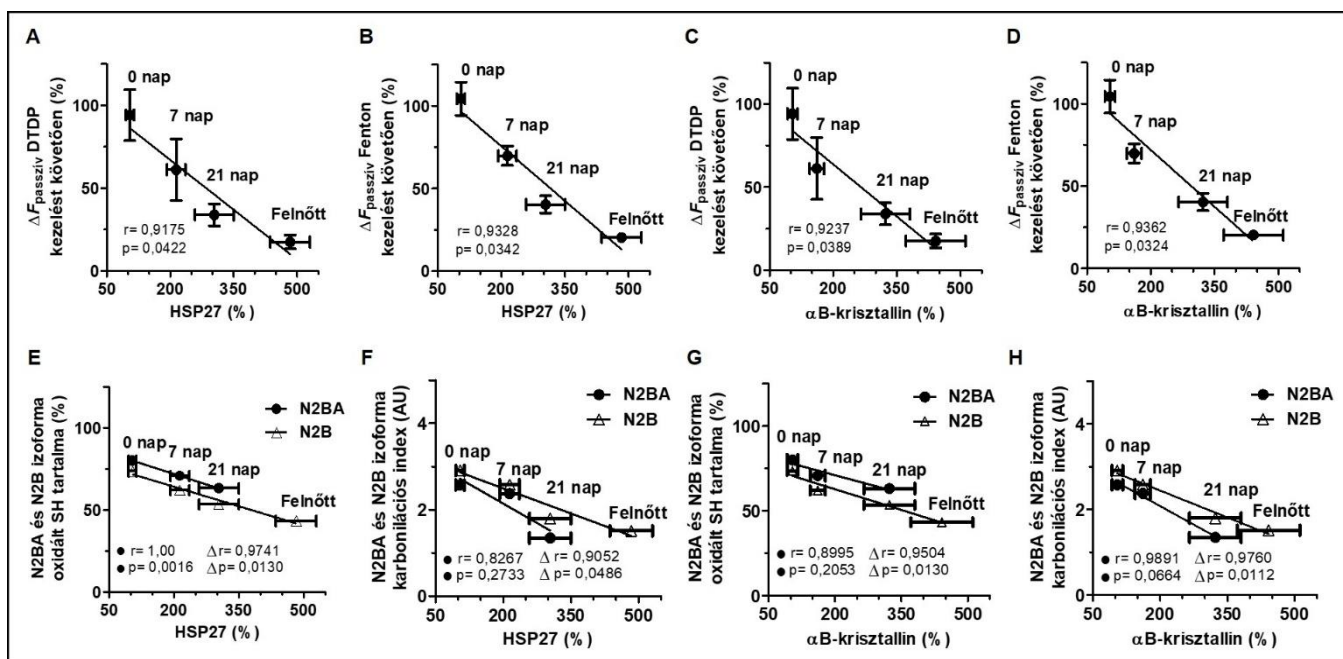
Ezt követően a biokémiai megfigyeléseinket immunhisztokémiai vizsgálatokkal egészítettük ki, annak céljából, hogy tanulmányozzuk a HSP27 (11A. ábra) és  $\alpha$ B-krisztallin (11B. ábra) fehérjék kolokalizációját a titin molekulával. Mind a két fehérje esetében figyelemre méltó kolokalizáció volt megfigyelhető a titin óriásfehérjével a szívizomsejtek érése során.



**11. ábra.** A HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin kötődése a titin molekulához. A különböző koresoportok szívizomsejtjeit anti-titin T11 (zöld) és anti-HSP27 (piros) (A) vagy anti-titin T63 (zöld) és anti- $\alpha$ B-krisztallin (piros) antitestekkel (B) jelöltük. Cy2- vagy Cy3-konjugált másodlagos antitesteket használtunk a detektáláshoz. A „Merged” az egyesített képeket jelöli. Hasonló megfigyeléseket kaptunk négy független immunhisztokémiai vizsgálat során.

### 5.1.4. Összefüggés a titin-dependens $F_{\text{passzív}}$ és a titin izoformák oxidatív érzékenysége, valamint a hőszokkfehérjék növekvő expressziós szintje között a szívizomsejtek érése során

Az  $F_{\text{passzív}}$  oxidatív érzékenysége, illetve az ezt meghatározó titin izoformák (N2BA és N2B) oxidatív érzékenysége DTDP és Fenton reagens alkalmazását követően erős negatív korrelációt mutatott a két hőszokkfehérje fokozatos kifejeződésével a posztnatális adaptáció során (12. ábra).



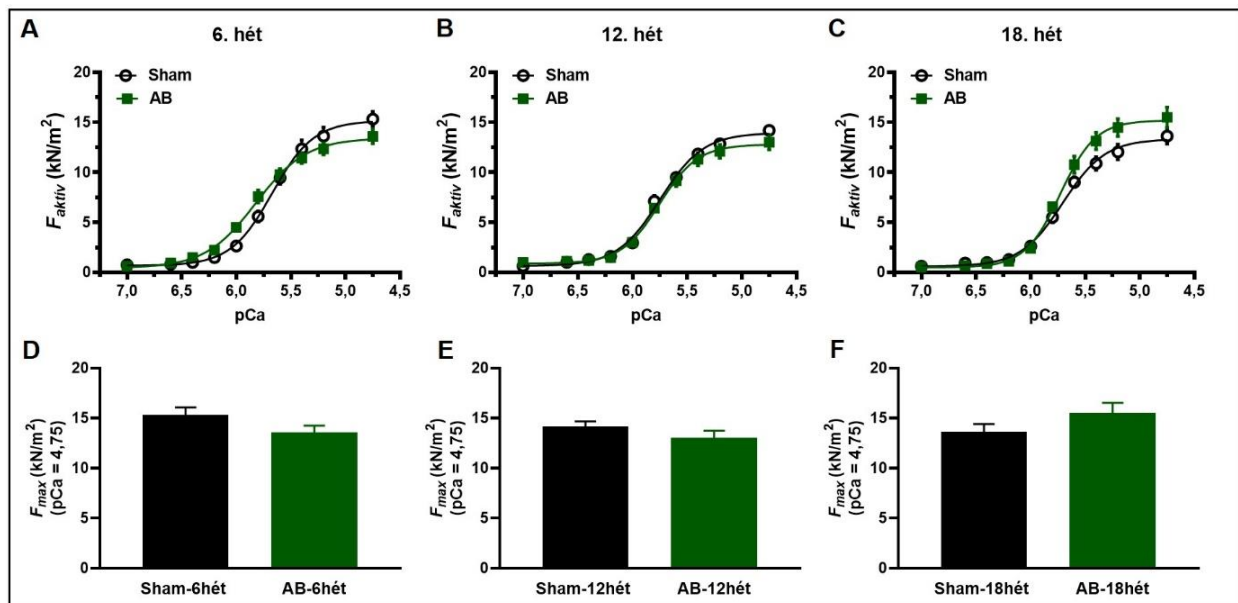
12. ábra. Az sHSP-k expressziós szintjei korrelálnak az  $F_{\text{passzív}}$  és a titin izoformák oxidatív változásaival. Erős összefüggéseket találtunk a HSP27 vagy az  $\alpha$ B-krisztallin expressziós szintje és a DTDP- vagy Fenton-indukált  $\Delta F_{\text{passzív}}$  (A-D) oxidatív érzékenysége között a szív fejlődését követően. Az N2B és N2BA titin izoformák oxidált SH tartalma és karbonilációs indexe minden csoportban erősen korrelált a HSP27 vagy az  $\alpha$ B-krisztallin korrall fokozódó expressziós szintjével (E-H). A korrelációkat lineáris regresszió alkalmazásával értékeltük. Az adatpontok átlag $\pm$ SEM formában szerepeltették.

## 5.2. Miofilamentális változások vizsgálata a nyomásterhelés-indukált patológiás hipertrofia patkánymodelljén

A kutatómunkánk második részében célunk volt tanulmányozni a nyomás-túlterhelés során kialakuló patológiás szívizom hipertrofia kontraktilis paraméterekre ( $F_{\max}$ ,  $pCa_{50}$  és  $F_{\text{passzív}}$ ) és miofilamentális fehérjékre (cTnI és cMyBP-C) kifejtett stádium-függő változásait.

### 5.2.1. A maximális $Ca^{2+}$ -aktivált erőgeneráció nem változott a korai és késői patológiás hipertrofiában

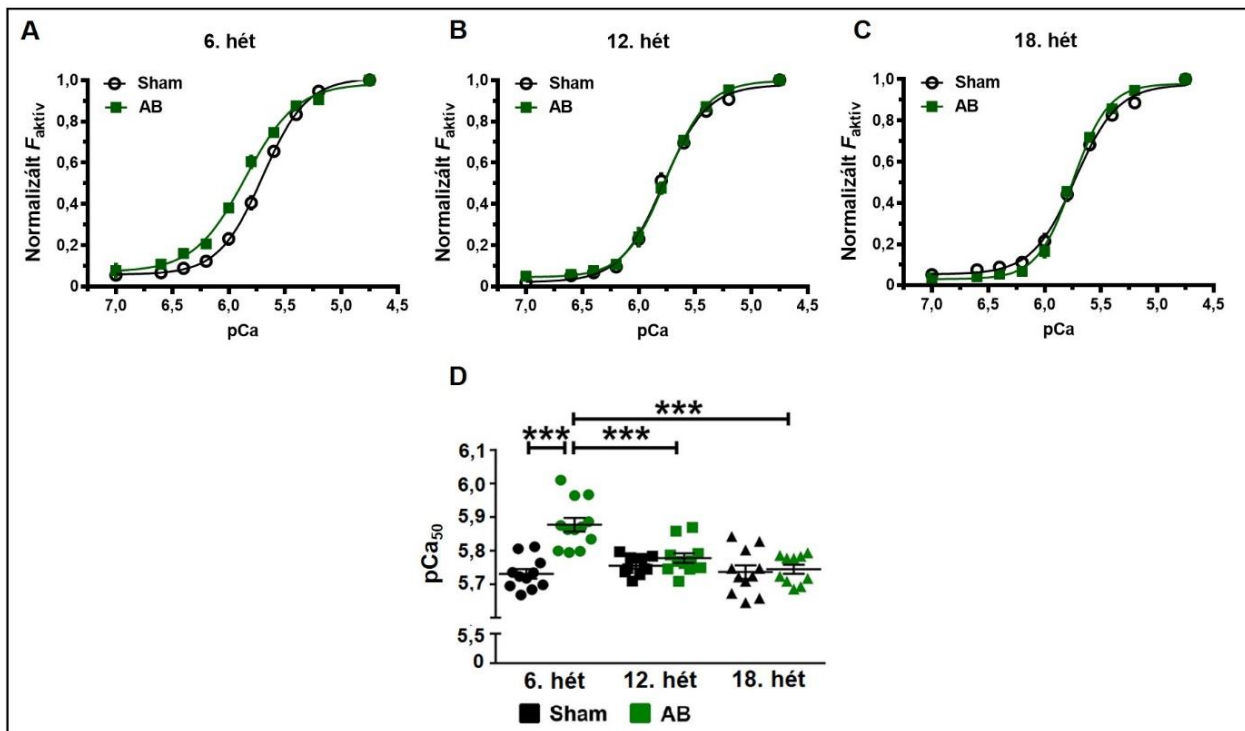
A  $Ca^{2+}$ -aktivált erőgenerációt ( $F_{\text{aktív}}$ ) a Sham és AB állatokból izolált bal kamrai szívizomsejteken tanulmányoztuk 6, 12 és 18 hetes aorta szűkítést követően. A Sham csoportokból származó kardiomiociták maximális  $Ca^{2+}$ -aktivált aktív ereje ( $F_{\max}$ ) nem különbözött szignifikánsan (6hét:  $15,32 \pm 0,78$  kN/m<sup>2</sup>; 12hét:  $14,19 \pm 0,47$  kN/m<sup>2</sup>; 18hét:  $13,62 \pm 0,79$  kN/m<sup>2</sup>, n= 9-10 szívizomsejt/csoport) a megfelelő AB csoportokban (6hét:  $13,57 \pm 0,69$  kN/m<sup>2</sup>; 12hét:  $13,01 \pm 0,76$  kN/m<sup>2</sup>; 18hét:  $15,49 \pm 1,02$  kN/m<sup>2</sup>,  $P < 0,05$ , n= 13 szívizomsejt/csoport) mért erőértékekhez viszonyítva. (13. ábra).



13. ábra. A BK-i permeabilizált szívizomsejtek mechanikai teljesítménye a Sham-operált és aorta szűkített (AB) csoportokban. A szívizomsejtek aktív erőgenerációját ( $F_{\text{aktív}}$ ) az alkalmazott pCa függvényében 2,3  $\mu$ m szarkomerhosszon mértük (A-C). A szívizomsejtek pCa=4,75 mellett mért maximális erejét ( $F_{\max}$ ) külön oszlopdiagrammon ábrázoltuk (D-F). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel, n= 9-13/csoport.

### 5.2.2. A szívizomsejtek $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége nőtt a korai patológiás hipertrófiában

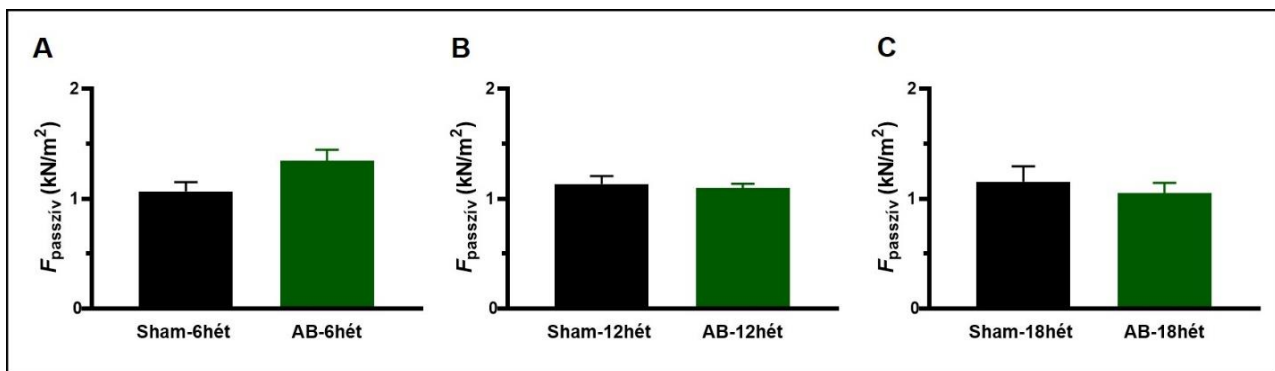
A változatlan  $F_{\max}$  kontraktilis paraméterrel szemben, a szívizomsejtek  $\text{pCa}_{50}$  értéke szignifikánsan nőtt az AB-6hét csoportban ( $5,88 \pm 0,02$ ,  $P < 0,05$ ) a Sham-6hét csoporthoz ( $5,73 \pm 0,01$ ) képest, ami a miofilamentumok megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységre utal (14A. ábra). Az AB-6hét szívizomsejtekben mért  $\text{pCa}_{50}$  értékek az AB-12hét ( $5,77 \pm 0,01$ ) és AB-18hét csoportokhoz ( $5,74 \pm 0,01$ ) képest is szignifikánsan nagyobbak voltak (14D. ábra). Ez utóbbi két (AB-12hét és AB-18hét) csoport  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége nem különbözött jelentősen a megfelelő kontroll csoportoktól (Sham-12hét:  $5,75 \pm 0,01$  és Sham-18hét:  $5,74 \pm 0,02$ ) (14B-C. ábra).



14. ábra. Az izolált szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége a fokozott nyomásterhelés által előidézett BK hipertrófiában. A normalizált aktív erő-pCa összefüggések illesztése során a szívizomsejtek szigmoid  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységi görbéjét ábrázoltuk minden vizsgált csoportban (A-C). A félmaximális kontrakció kiváltásához szükséges  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt ( $\text{pCa}_{50}$ ) külön diagrammon hasonlítottuk össze (D). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg,  $n = 9-13$  szívizomsejt/csoport. A mérési adatok csoportonként 6 állatból származtak, \*\*\* $P < 0,001$ .

### 5.2.3. A titin-dependens passzív feszülés nem változott a patológiás hipertrófia fejlődése során a vizsgált patkánymodellben

A permeabilizált szívimsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív feszülése nem változott a patológiás BK hipertrófia korai (AB-6hét:  $1,34 \pm 0,01 \text{ kN/m}^2$ ) és késői (AB-12hét:  $1,09 \pm 0,04 \text{ kN/m}^2$  és AB-18hét:  $1,05 \pm 0,09 \text{ kN/m}^2$ ,  $n=9-13$  szívimsejt/csoport) stádiumaiban a megfelelő Sham csoportokhoz viszonyítva (Sham-6hét:  $1,07 \pm 0,08 \text{ kN/m}^2$ ; Sham-12hét:  $1,14 \pm 0,07 \text{ kN/m}^2$  és Sham-18hét:  $1,15 \pm 0,14 \text{ kN/m}^2$ ) (15. ábra).

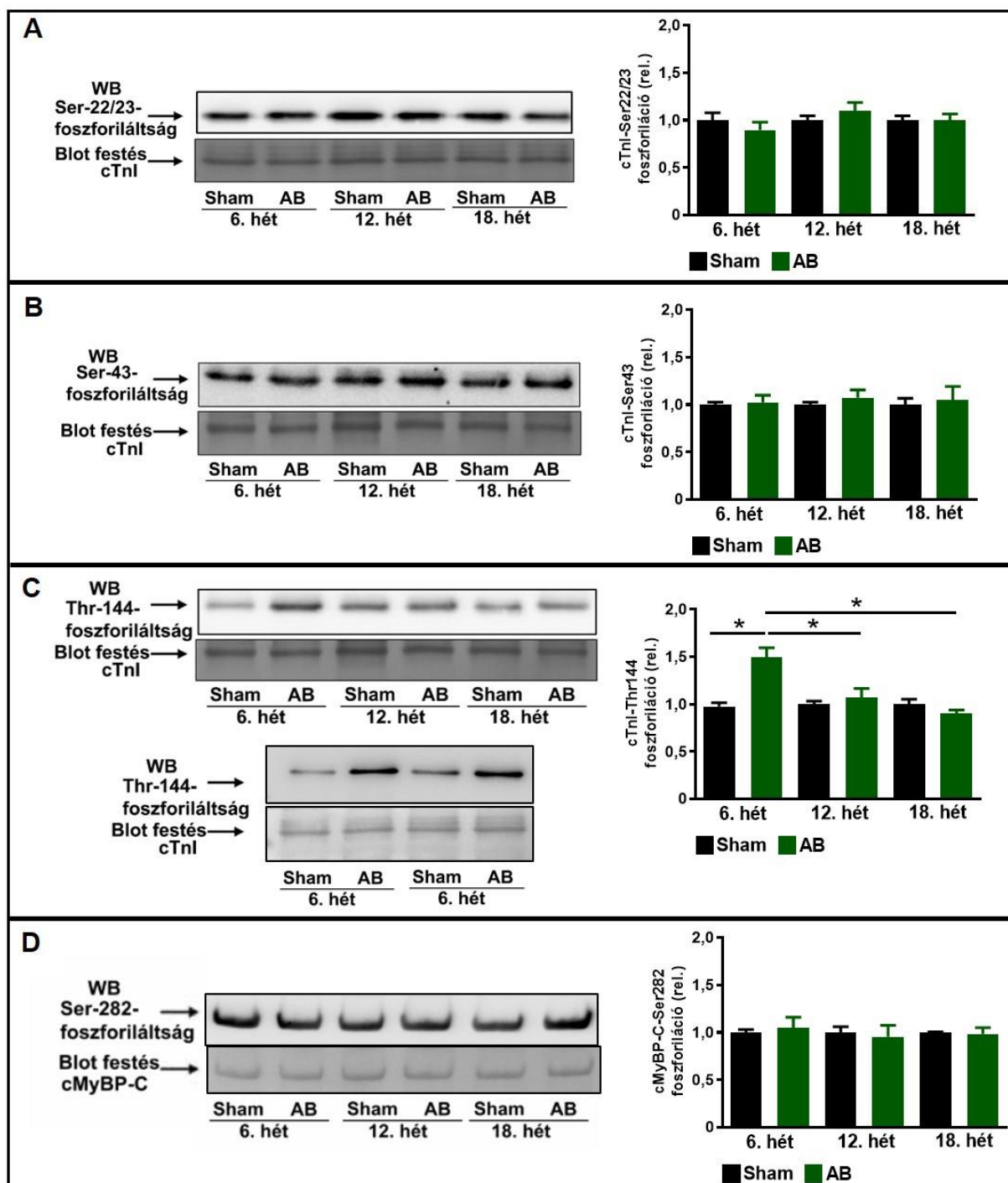


15. ábra. A szívimsejtek titin-alapú passzív feszülése a kompenzált és dekompenzált BK hipertrófiában. A preparátumok  $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív feszülése  $2,3 \mu\text{m}$  szarkomerhosszon, relaxáló oldatban mérve ( $\text{pCa}=9,0$ ) (A-C). Az értékek átlag $\pm$ SEM formában szerepelnek,  $n= 6-13$  szívimsejt/csoport.

### 5.2.4. A cTnI PKC-mediált Thr-144 oldallánc hiperfoszforilációja és változatlan cMyBP-C oldallánc-specifikus foszforiláció a korai patológiás bal kamra hipertrófiában

Western blot kísérletek során vizsgáltuk a miofilamentális rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységében döntő szerepet játszó két fehérje (cTnI és cMyBP-C) PKA- és PKC-specifikus oldalláncainak foszforilációs állapotát. A cTnI foszforilációja nem mutatott különbséget a PKA-dependens Ser-22/23 (Sham-6hét, 12hét és 18hét:  $1,00 \pm 0,08$ ,  $1,00 \pm 0,05$  és  $1,00 \pm 0,05$ ; AB-6hét, 12hét és 18hét:  $0,91 \pm 0,08$ ,  $1,09 \pm 0,09$  és  $1,00 \pm 0,06$ ,  $n= 3$  különböző szív/csoport, relatív egységekben) (16A. ábra) és a PKC-függő Ser-43 oldalláncokon (Sham-6hét, 12hét és 18hét:  $1,00 \pm 0,03$ ,  $1,00 \pm 0,03$  és  $1,00 \pm 0,07$ ; AB-6hét, 12hét és 18hét:  $1,03 \pm 0,07$ ,  $1,07 \pm 0,08$  és  $1,05 \pm 0,14$ ,  $n= 3$

különböző szív/csoport, relatív egységekben) (16B. ábra) a vizsgált csoportokban. A cTnI PKC-által mediált Thr-144-es oldallánca azonban hiperfoszforilált volt az AB-6hét csoportban ( $1,51 \pm 0,09$ ) mind a Sham párjához ( $0,98 \pm 0,04$ ,  $*P < 0,05$ ), mind a többi AB csoporthoz képest (Sham-12hét és 18hét:  $1,00 \pm 0,04$  és  $1,00 \pm 0,05$ ; AB-12hét és 18hét:  $1,07 \pm 0,09$  és  $0,91 \pm 0,04$ ,  $n = 3$  különböző szív/csoport,  $*P < 0,05$ , relatív egységekben) (16C. ábra). Ugyanakkor nem találtunk különbséget a cMyBP-C foszforiláltságában a PKA-dependens Ser-282 oldalláncon a csoport párokon belül és a csoportok között (Sham-6hét, 12hét és 18hét:  $1,00 \pm 0,03$ ,  $1,00 \pm 0,06$  és  $1,00 \pm 0,01$ ; AB-6hét, 12hét és 18hét:  $1,05 \pm 0,11$ ,  $0,96 \pm 0,12$  és  $0,99 \pm 0,07$ ,  $n = 3$  különböző szív/csoport, relatív egységekben) (16D. ábra).



16. ábra. A cTnI és a cMyBP-C fehérje site-specifikus foszforilációjának meghatározása a BK hipertrófiában Western blot (WB) technikával. Az áloperált (Sham) és aorta szűkítésen (AB) átesett csoportok 12%-os (cTnI) és 4%-os (cMyBP-C) poliakrilamid géleken elválasztott fehérjéit molekulásúly (kDa) alapján ProSieve fehérje markerrel azonosítottuk és oldallánc-specifikus antitestekkel jelöltük. Az összfehérjemennyiség meghatározása szuperérzékeny blotfestéssel történt. Az adatokat átlagérték±SEM formában tüntettük fel, n= legalább 3 különböző szívből/csoport, \*P<0,05.

## 6. Megbeszélés

### **A titin fehérje oxidációval szembeni védettsége a szívizomsejtek fejlődése során fokozódik**

Tanulmányunkban első alkalommal jellemeztük a titin fehérje oxidációjának passzív feszülésre kifejtett hatását a szív születést követő adaptációja során. Megfigyeléseink alapján, a fehérje SH oxidációjának és karbonilációjának is hasonló hatása van a titin izoformákra (N2BA és N2B), valamint a titinhez kötődő kis hősokkfehérjék (HSP27 és  $\alpha$ B-krisztallin) védelmet nyújthatnak az oxidatív módosítások alkalmazott formáival szemben. Érdekes módon azonban, ez a feltételezett hősokkfehérje-közvetített védelem fokozatosan épül fel a posztnatális szívizomsejt életkorával, bármilyen kísérletes stressz befolyásolása nélkül (azaz kontroll, kezeletlen szívizomsejtekben).

Kísérleteinkben a titin-dependens passzív erő alakulását oxidatív expozíciónak kitett izolált és permeabilizált bal kamrai szívizomsejteken vizsgáltuk fiziológias szarkomerhossz mellett a különböző fejlődési stádiumokban (0, 7, 21 napos és 8 hetes felnőtt egészséges patkányok), ami egyaránt felvetette a titin fehérje oxidáció és a hozzá kötődő kis hősokkfehérjék hipotetikus kapcsolatának vizsgálatát. Eredményeink arra utalnak, hogy a titin izoformák oxidatív érzékenysége, így következetesen a titin-alapú passzív feszülés oxidatív hatásokkal szembeni érzékenysége fokozatosan csökken a szívizomsejtek fejlődése során. Mindez pedig magába foglalhat egy titin-oxidációt megakadályozó mechanizmus folyamatos felépülését a születést követően.

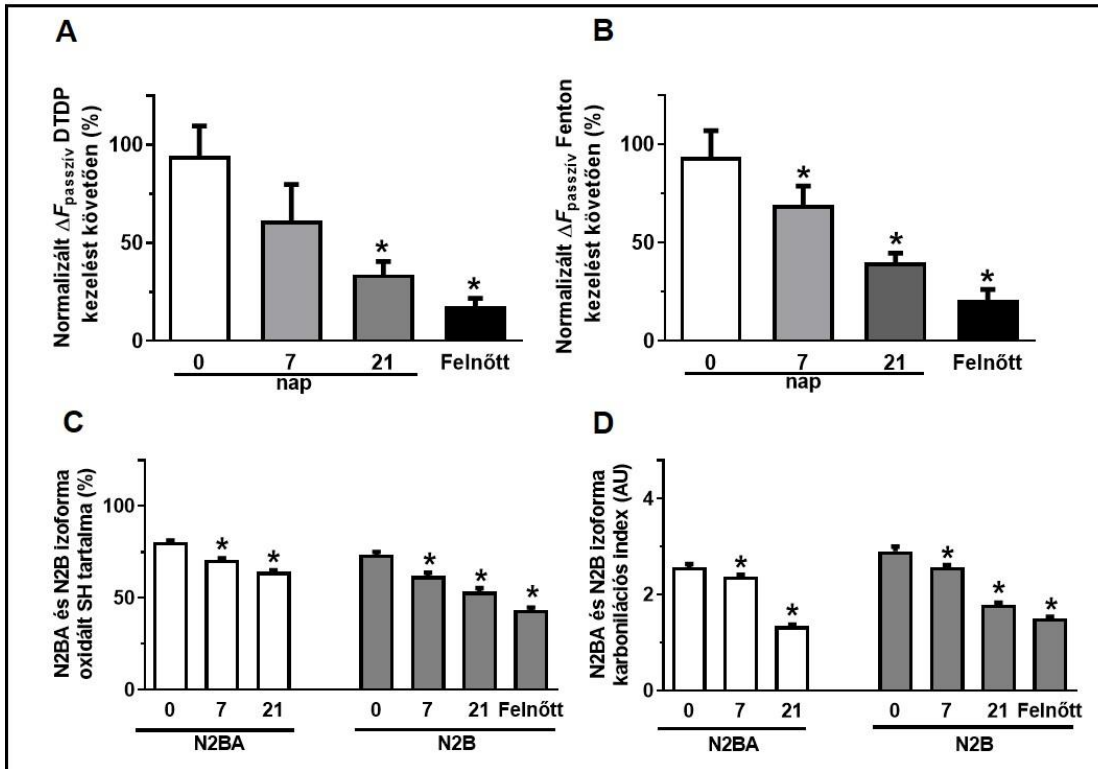
Eredményeink alátámasztják azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint a szívizomsejtek passzív feszülése nemcsak a szarkomer nyújtása során, hanem az életkorral egyaránt nő, melynek háttérében a passzív merevséget meghatározó titin izoformák N2B/N2BA arányának születést követő fokozatos expressziója áll<sup>(102)</sup> (5. ábra). Ugyanakkor sikerült igazolnunk, hogy a titin összfehérjemennyisége független az életkortól (nem mutatott eredmény), mindössze csak a titin izoforma arányok változnak az életkor függvényében<sup>(102, 103)</sup>.



A titin izoforma-váltás<sup>(104)</sup> mellett, a szívizomsejtek passzív feszülését a fehérje foszforilációja<sup>(105)</sup> és oxidációja (beleértve az SH oxidációt<sup>(50)</sup> és karbonilációt<sup>(106)</sup>) egyaránt befolyásolhatja. Ennek ellenére, kevés információ áll rendelkezésre a titin izoformák oxidációjáról és azok funkcionális következményeiről a fejlődő szívben.

Jelen munkánkban a titin izoformák SH oxidációját *in vitro* SH-csoport-specifikus oxidálószerrel, a DTDP-vel váltottuk ki. A DTDP képes reagálni és oxidálni a fehérjék tiol-csoportjait, ily módon létrehozva intra- és intermolekuláris diszulfid hidakat vagy vegyes diszulfidokat a ciszten csoportok és a DTDP között<sup>(107)</sup>. Megfigyeltük, hogy az oxidálószerrel kiváltott passzív merevség növekedések az *in vitro* alkalmazott SH-csoportokat redukáló DTT-vel visszafordítható módon csökkentek a patkány permeabilizált szívizomsejtekben (6. ábra). Kimutattuk, hogy a szívizomsejtek DTDP-indukált passzív feszülésének oxidatív érzékenysége fokozatosan csökken az életkor előrehaladtával [ $\Delta F_{\text{passzív}}$ : a DTDP kezelése során emelkedett  $F_{\text{passzív}}$  értékeket az alapértékekre (*kontroll*) normalizáltuk minden korcsoportban (17A. ábra)]. Mindemellett a DTDP által kiváltott SH-csoport oxidáció mértéke is csökkent az N2BA és az N2B titin izoformákban az életkorral (17C. ábra).

Az SH-csoport oxidációja mellett a ROS által indukált miofilamentális proteinek karbonilációja is hozzájárulhat a szív kontraktilis diszfunkciójához<sup>(108)</sup>. A hidroxilgyökök rendkívül reaktívak és különféle sejtkomponensekkel képesek reagálni<sup>(109)</sup>. Kísérleteinkben a titin karboniláció indukálását *in vitro* Fenton reagens alkalmazásával végeztük. A funkcionális méréseink során, a szívizomsejtek megnövekedett passzív feszülését tapasztaltuk a Fenton kezeléseket követően minden korcsoportban (8. ábra). A DTDP hatásokhoz hasonlóan, a Fenton reagens által indukált passzív feszülés növekedése ( $\Delta F_{\text{passzív}}$ : a kiindulási passzív erőre történő normalizációt követően) az életkorral egyaránt csökkent (17B. ábra). Párhuzamos biokémiai vizsgálatok során kimutattuk, hogy a passzív merevséget meghatározó titin fehérje karbonilációjának mértéke is fokozatosan csökkent a születést követően (17D. ábra).



17. ábra. A DTDP- és Fenton-indukált passzív feszülés relatív mértéke ( $\Delta F_{\text{passzív}}$ ) és a títin izoformák oxidált SH és karbonil tartalma a fejlődő patkány szívében. \* $P < 0,05$  a 0 napos szívizomsejtekhez viszonyítva. /Izoformák oxidált SH tartalma a redukált SH tartalomtól (100%) származtatva (C)/

Munkánk során érdekes megfigyelés volt, hogy a Fenton kezelést követő DTT-expozíciók visszaállíthatják a fiziológiás passzív merevséget a 0, 7 és 21 napos szívizomsejtekben, azonban a felnőtt kardiomiocitákban nem. Eredményeink összhangban állnak Wong és munkatársai felfedezésével, miszerint a fehérje karboniláció mértékét a tiolcsoportokat redukáló szerek csökkenthetik. A folyamatot protein dekarbonilációnak nevezték el<sup>(61, 65, 110)</sup>. Ugyanakkor laboratóriumunkban végzett korábbi kísérletes munkák is bizonyítják a Fenton-reakció revertálhatóságát a DTT kezelést követően. Kimutatták, hogy a Fenton-reakció következményeként, a karboniláció mellett SH oxidációs hatások is kialakulhatnak extrém magas  $H_2O_2$  koncentrációkat tartalmazó reagensek alkalmazásakor<sup>(108)</sup>. Így a 0, 7 és 21 napos szívizomsejtek extrém érzékenysége miatt nem kizárható, hogy az általunk alkalmazott karbonilációs kezelések mellett, SH oxidációs módosulások is létrejöhetnek.

A fentiek alapján elmondható, hogy a titin izoformák SH oxidációjának és karbonilációjának mértéke a szív posztnatális adaptációja során fokozatosan csökkent. Ezt a hatást az N2B/N2BA titin izoformák expressziójának aránya nem befolyásolta. Ugyanakkor ezek a változások párhuzamosnak bizonyultak a normalizált passzív merevségben ( $\Delta F_{\text{passzív}}$ ) bekövetkező változásokkal, mely egy rendkívül erős kapcsolatra utal. Az eredményeink azt mutatták, hogy a titin-dependens passzív feszülés oxidatív érzékenysége fokozatosan csökkent a szívizomsejtek érése során, mely parallelnek mutatkozott a titin izoformák SH oxidációjának és karbonilációjának mértékével a kor előrehaladtával (17. ábra).

Korábbi kísérleti tanulmányok bizonyítják, hogy a kis hősokkfehérjék védő szerepet töltenek be számos szarkomer fehérje, köztük a titin esetében is<sup>(82-84)</sup>. A kis hősokkfehérjék nagyon fontos szerepet játszanak a helyes fehérje feltekeredésében, ezáltal védik a natív makromolekulák működését, valamint védenek az oxidatív stressz káros hatásaival szemben<sup>(111)</sup>. A szívben két kis hősokkfehérje, a HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin expresszióját a hőstressz, öregedés, végstádiumú szívelégtelenség vagy az iszkémiás betegségek fokozzák<sup>(76, 112)</sup>. Továbbá ismert, hogy ezek a proteinek részt vesznek az oxidatív stressz kivédésében<sup>(113)</sup> és a sejtek redox állapotának szabályozásában<sup>(114)</sup>. Habár hősokkfehérjék sokasága asszociálódik a szarkomer fehérjékkel, mégis zebrahal szívizomsejtjeiben végzett kísérletek bizonyítják, hogy a HSP27 nem kötődik sem az aktinhoz, sem az aktin-kötő fehérjékhez, miozinhoz vagy a dezminhez<sup>(115)</sup>. Ugyanakkor stressz hatására a HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin fehérjék a titin izoformák I-szakaszban található funkcionálisan rugalmas elemeihez kötődnek, ezáltal hozzájárulhatnak a fiziológiás passzív rugalmasság fenntartásához az izomszövetekben<sup>(86, 87, 116)</sup>. Továbbá, Kötter és munkatársai kimutatták, hogy a titin fehérje és a kis hősokkfehérjék közötti interakciót nem csak a stressz hatások, hanem az N2B titin izoforma expressziója is fokozza<sup>(86)</sup>. Ezekkel a megfigyelésekkel párhuzamosan, vizsgálataink során erős kolokalizációt figyeltünk meg a kis hősokkfehérjék és szarkomer előrehaladottabb érési stádiumai között, ahol

az N2B titin izoforma expresszió magas volt (11. ábra). Ugyanakkor újszülött szívmusculusokban az N2BA titin a domináns, így vélhetően a kis hőszokkfehérjék nem képesek hatékonyan kötődni a rugalmas izoformához<sup>(86)</sup>. Mindezt kísérletesen is alátámasztottuk, ahol nem találtunk erős kolokalizációt a kis hőszokkfehérjék és a titin között az újszülött kardiomiocitákban (11. ábra), ami alapján feltételezhető, hogy a szívmusculusok ezen fejlődési szakaszában a titin molekulák funkcionális csoportjai kevésbé védettek az oxidatív hatásokkal szemben.

Jelenlegi eredményeink párhuzamba állíthatók a fenti megfigyelésekkel, és arra utalnak, hogy a kis hőszokkfehérjék kifejeződésének mértéke fokozatos a kardiomiociták fejlődése során, mely egy szoros titin-sHSP kapcsolatra mutathat rá (10. ábra). Feltételezéseinket alátámasztva, erős korrelációt találtunk a HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin expressziójának mértéke, valamint a titin izoformák mechanikai (passzív feszülés) és biokémiai (azaz SH oxidációja vagy karbonilációja) oxidatív változásai között, mely egy hipotetikus kapcsolatra utal a titin izoformák oxidatív érzékenysége és a kis hőszokkfehérjék fokozatos kifejeződése között a szívmusculusok fejlődése során.

A szarkomer fehérje oxidációjának mértéke az alkalmazott oxidálószer és a kölcsönható fehérje kémiai és térbeli jellégétől egyaránt függ. Ebben az összefüggésben az SL kritikus meghatározó tényezője a titin oxidációnak, mivel az oxidációra érzékeny aminosavszármazékok expozícióját a fehérje térbeli szerkezete jelentősen befolyásolja<sup>(59)</sup>. Kísérleteink során, az SH-csoport oxidációra gyakorolt mechanikus válaszok nem különböztek egymástól 1,9  $\mu$ m vagy 2,3  $\mu$ m SL-en (nem mutatott eredmény), ami arra utal, hogy az SL-ek ezen tartományában a fenti hatások elhanyagolható befolyást gyakorolnak. Mindazonáltal nem zárhatjuk ki, hogy más oxidáló szerek által végzett oxidatív módosítások, valamint az általunk alkalmazottnál nagyobb szarkomerhosszak további, úgynevezett titin izoformák rejtett cisztein csoportjait fedhetik fel, ezáltal eltérő funkcionális hatásokhoz vezethetnek. A fentiekben óriási

szerepet játszhat a két izoforma eltérő nyújthatósága, ami az N2BA és az N2B titin izoformák oxidatív tulajdonságai közötti különbségeket fedheti fel. Továbbá, jelen tanulmányunkban a sHSP-k hipotetikus szerepét a titin izoformák oxidációjának kivédésében csak korrelációs asszociációk támogatják, ezért hangsúlyoznunk kell, hogy a fenti folyamatokban további molekuláris mechanizmusok is szerepet játszhatnak.

Munkánk során kapcsolatot mutattunk ki a titin izoformák oxidációja, a szívizomsejtek passzív feszülése, valamint a HSP27/ $\alpha$ B-krisztallin expressziója között a fejlődő patkány szívben. Az oxidatív módosulás kétféle típusa: a titin izoformák SH-csoport oxidációja és karbonilációja hasonló módon befolyásolta a szívizomsejtek passzív feszülését, utalva a molekuláris mechanizmusok összehangolt hatására. Eredményeink alapján, a titin-dependens passzív feszülés oxidatív érzékenysége csökkent a szív fejlődése során, mely a titin oxidációját ellensúlyozó mechanizmus fokozatos felépülését sugallja. Azt gondoljuk, hogy ezt a védelmet (legalább részben) a titinhez kötődő kis hőszokkfehérjék, mint a HSP27 és az  $\alpha$ B-krisztallin biztosíthatják.

### **Kompenzatórikus $Ca^{2+}$ -érzékenység növekedés a korai bal kamra hipertrófiában**

Tanulmányunk második részében a BK nyomásterhelésének hatására kialakuló patológiás szívizom hipertrófia korai/kompenzált és késői/dekompenzált stádiumainak miofilamentális rendszerében bekövetkező funkcionális és molekuláris változásait figyeltük meg hím patkánymodelleken. Kimutattuk, hogy a permeabilizált szívizomsejtek emelkedett  $Ca^{2+}$ -érzékenységének hátterében a cTnI PKC-specifikus Thr-144-helyének hiperfoszforilációja állhat a BK hipertrófia korai stádiumában. Ugyanakkor a betegség előrehaladottabb állapotaiban a molekuláris szintű adaptációk eltűntek a beteg állatokban.

A BK hosszú időn keresztül fennálló nyomásterhelésére BK hipertrófia alakul ki, melynek progressziója szívelégtelenség kialakulásához vezet. A BK hipertrófia korai és előrehaladottabb

állapotaiban a kamra kontraktilitásában jellegzetes változások figyelhetők meg. Nyomás-térfogat analízisen alapuló *in vivo* vizsgálatok kimutatták, hogy a patológiás szívizom-hipertrófia korai fázisában a kamra kontraktilitása jelentősen fokozódik<sup>(95-97)</sup>, kompenzálva ezzel a rendszerben uralkodó utóterhelést<sup>(98)</sup>. Így ebben a stádiumban a szív szisztolés funkciója megőrzött. Azonban a kamra csak ideiglenesen képes alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez, a hosszan tartó nyomásterhelés hatására ugyanis a kontraktilitás, ezáltal a szisztolés funkció is romlik<sup>(97, 99)</sup>. A fokozott nyomásterhelés a kamra kontraktilitását szervi és szarkomerfunkció szinten is egyaránt érinti<sup>(117)</sup>. Korábbi vizsgálatok fokozott, változatlan és csökkent szarkomerfunkciót is leírtak a BK hipertrófia egyes stádiumaiban<sup>(118-121)</sup>, azonban a szarkomerfunkció időbeli változásairól jelenleg nincsenek adatok. Így korlátozott ismeretekkel rendelkezünk a permeabilizált szívizomsejtek működésében bekövetkező változásokról a fokozott nyomásterhelés-indukált BK hipertrófia kialakulása és progressziója során.

A patológiás hipertrófia patkánymodellek *in vivo* operációját és karakterizálását kollaborációs partnereink, a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika munkatársai végezték. A fokozott nyomásterhelést a hasi aorta műtéti beszűkítésével biztosították 6, 12 és 18 hét időtartamra, ami jelentős mértékű BK hipertrófia kialakulását eredményezett. Az abdominális aorta szűkítéssel kapcsolatos korábbi tapasztalatok, valamint az *in vivo* hemodinamikai mérések egyaránt igazolták, hogy az aorta szűkítés 6. hetében korai BK hipertrófia alakult ki, melyre károsodott diasztolés funkció és megtartott szisztolés funkció volt jellemző<sup>(96, 122)</sup>. Mindez igazolta, hogy az AB-6hét csoport megfelelőnek bizonyult a fokozott nyomásterhelés indukált BK hipertrófia korai stádiumának vizsgálatához. A betegség korai fázisában az emelkedett BK-i kontraktilitással párhuzamosan kísérleteink során a permeabilizált szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -érzékenységének növekedését tapasztaltuk, változatlan maximális  $Ca^{2+}$ -dependens aktív erők mellett (13D és 14A. ábra). Bár a szarkomer  $Ca^{2+}$ -érzékenységének emelkedése megőrzött szisztolés funkció mellett ismert a betegségben<sup>(120, 123)</sup>,

azonban nem rendelkezünk adattal a permeabilizált szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét leginkább meghatározó miofilamentális fehérjék (cTnI és cMyBP-C) foszforiláltsági állapotáról. Biokémiai kísérleteink a cTnI PKC-mediált Thr-144 helyének nagyfokú foszforiláltságát mutatta az AB-6hét csoportban (16C. ábra). Eredményeinkkel összhangban korábbi kutatások igazolták, hogy a miofilamentális  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét növeli a cTnI ezen specifikus helyének hiperfoszforilációja<sup>(124, 125)</sup>, ami érdekes módon nem volt hatással a szívizomsejtek maximális erőgenerálására a humán szívben<sup>(124)</sup>. Figyelembe véve azt a tényt, hogy a cTnI (Ser-22/23 és Ser-43) és cMyBP-C (Ser-282) fehérjék egyéb vizsgált oldalláncain nem történt változás az áloperált kontroll párokhoz viszonyítva (16. ábra) feltételezzük, hogy a miofilamentális rendszer megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének hátterében a cTnI PKC-specifikus Thr-144 helyének hiperfoszforilációja állhat a korai patológiás hipertrófia patkánymodellben.

A BK hipertrófia korai szakaszában megfigyelhető kompenzatórikus kontraktilitás-fokozódás a betegség progressziója során regrediál<sup>(97, 98)</sup>. Szakirodalmi adatok alapján a szisztolés funkció dekompenzációjának időpontja függ az alkalmazott állat fajától, a szűkítés helyétől és súlyosságától egyaránt<sup>(126)</sup> nyomástúlterhelt állatmodellekben. A hasi aorta szűkítéssel folytatott kísérletek alapján a szisztolés diszfunkcióba történő átmenet a fokozott nyomásterhelés 12. hetében feltételezhető a hím patkányokban<sup>(98)</sup>. Ennek megfelelően kollaborációs munkatársaink a krónikus nyomásterhelést 12 és 18 hét időtartamra biztosították hím patkányokban a BK hipertrófia előrehaladott stádiumának vizsgálatához, valamint bizonyították, hogy ezekben a kísérleti csoportokban a BK fokozott kontraktilitása regrediál. Az *in vivo* hemodinamikai eredményekkel összhangban, funkcionális vizsgálataink során a korai BK hipertrófiában tapasztalt  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység növekedés, valamint a biokémiai méréseinkben megfigyelt cTnI PKC- mediált Thr-144 helyének hiperfoszforilációja már nem volt kimutatható a 12. és 18. hétre (14B-C és 16. ábra), a kezdeti sejt és molekuláris szintű

adaptációk feltételezhetően megszűntek. Bár *in vivo* vizsgálatok során az EF szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető az AB-12hét és AB-18hét csoportokban, sejtszintű méréseinkben az  $F_{\max}$  értéke nem változott ezekben a csoportokban (13E-F. ábra).

Korábbi tanulmányokban a szívizomsejtek normális vagy csökkent  $Ca^{2+}$ -érzékenységét mutatták ki a fokozott nyomásterhelés által előidézett BK hipertrófia előrehaladottabb állapotaiban. Spontán hipertenzív szívelégtelen patkánytörzsön végzett vizsgálatokban a miofilamentális-funkció két komponensének ( $pCa_{50}$  és  $F_{\max}$ ) értékei nem különböztek a kontroll csoport értékeitől<sup>(121)</sup>, mindezzel rámutatva a sejtes adaptációs mechanizmusok hiányára a késői BK hipertrófiában. Ugyanakkor jelentős csökkenést tapasztaltak a  $pCa_{50}$  és  $F_{\max}$  értékekben az aortaív szűkítés-indukált végstádiumú szívelégtelenség patkánymodelljében<sup>(119, 120)</sup>. Fontos megjegyezni, hogy ebben a vizsgálatban az aortaív szűkület hosszú ideig (36 hétig) állt fent és rendkívül súlyos mértékű volt, így feltételezhető, hogy a BK hipertrófia egy sokkal előrehaladottabb stádiumot ért el, mint az általunk alkalmazott vagy a spontán hipertenzív patkánymodellekben.

Az izolált szívizomsejtek passzív erejét a BK hipertrófia korai (megnyúlt aktív relaxáció) és késői stádiumaiban (aktív relaxáció és passzív feszülés) bekövetkező diasztolés funkciókárosodás egyáltalán nem érintette (15. ábra). A BK hipertrófia általunk vizsgált stádiumaiban ezért nem valószínű, hogy a szarkomer passzív elemei (titin) elsődleges szerepet játszanának a miokardium merevségében.

Az irodalmi és saját adataink alapján feltételezzük, hogy a permeabilizált szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -érzékenységének növekedése a cTnI PKC-mediált Thr-144 helyének hiperfoszforilációja következtében egy korai, ideiglenes kompenzációs mechanizmusként működik a BK fokozott nyomásterhelése során. A  $Ca^{2+}$ -érzékenység kompenzatórikus emelkedése visszaalakul a kompenzált BK hipertrófiából a szívelégtelenségbe történő átmenetkor, majd jelentősen csökken a végstádiumú szívelégtelenségben.



## A doktori értekezésben szereplő új tudományos eredmények

Eredményeink alapján az alábbi új megállapításokat fogalmazzuk meg:

- A bal kamrai szívmuszkuláció passzív merevségének oxidatív érzékenysége fokozatosan csökken a posztnatális adaptáció során.
- Az N2BA és N2B titin izoformák egyre kevésbé módosíthatók az oxidatív hatásokkal szemben a szívmuszkuláció posztnatális fejlődése során.
- A miofibrillummal-asszociált kis hőszokkfehérjék fokozatos kifejeződése védelmet nyújthat az oxidatív titin módosításokkal szemben a születést követően.
- A korai patológiás szívmuszkuláció-hipertrofia patkánymodelljében a PKC-mediált kardiális troponin I (Thr-144) hiperfoszforilációja együtt jár a szívmuszkuláció megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységével, ami a miofilamentális rendszer kompenzatórikus válasza lehet a bal kamra fokozott nyomásterhelésére.

## 7. Összefoglalás

A szívizomsejtek diasztolés feszülését a titin óriásfehérje indirekt (pl. hősokkfehérjéken keresztül megvalósuló) és direkt (pl. oxidáció okozta) módosulása egyaránt befolyásolja, melyeknek kiemelt fontosságot tulajdonítanak a szív élettani és kóros adaptációja során. A disszertációban bemutatott adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a titin oxidatív jellegű poszttranszlációs módosulásainak (SH-oxidáció, karboniláció) passzív merevségre kifejtett hatása fokozatosan csökken a szív poszt-natális adaptációja során, melynek háttérében a titin-asszociált hősokkfehérjék (HSP27 és  $\alpha$ B-krisztallin) születést követő fokozatos kifejeződése állhat. Ezek az eredmények felvethetik egy védelmi rendszer fokozatos kiépülését a szarkomer struktúra érése során.

A bal kamra fokozott nyomásterhelésének talaján kialakuló patológiás bal kamra hipertrófia eltérő stádiumaiban a kamra kontraktilitásában és a miofilamentális rendszer funkciójában jellegzetes változások figyelhetők meg, melyek végső soron szívelégtelenség kialakulásához vezetnek. A korai bal kamra hipertrófiában a permeabilizált szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érékenysége emelkedett, melynek háttérében a PKC-mediált kardiális troponin I (Thr-144) hiperfoszforilációja állhat. A disszertációban bemutatott eredmények a miofilamentális rendszer kompenzatórikus válaszát feltételezik a bal kamra fokozott nyomásterhelésére.

## 8. Summary

Diastolic stiffness of cardiomyocytes is regulated by both indirect (e.g., via heat shock proteins) and direct (e.g., oxidation effects) modifications of the giant titin protein which are very important in the physiological and pathological adaptation of the heart. According to data provided in this study, we conclude that the effect of oxidative posttranslational modifications (SH oxidation, carbonylation) of titin on passive stiffness gradually decreases during postnatal adaptation of the heart, which is due to the upregulation of titin-associated heat shock protein (HSP27 and  $\alpha$ B-crystallin) expressions after birth. Our data implicate a gradual build-up of a protective mechanism against titin oxidation during the maturation of the sarcomere structure.

During various phases of the development of pressure overload-induced pathological left ventricular myocardial hypertrophy distinct alterations could be observed in left ventricular contractility and myofilament function contributing to the progression of heart failure. Hyperphosphorylation of PKC-mediated cardiac troponin I at Thr-144 underlies the increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of force production in permeabilized cardiomyocytes in the early stage of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. Data provided here implicate a compensatory response of the myofilament system for increased pressure loading in the left ventricle.

## Irodalomjegyzék

1. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol.* 1996;148(1):291-300.
2. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):H2181-90.
3. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 2007;49(2):241-8.
4. Hertelendi Z, Toth A, Borbely A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJ, et al. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(7):1175-84.
5. Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res.* 2014;114(6):1052-68.
6. Sunagawa K, Maughan WL, Burkhoff D, Sagawa K. Left ventricular interaction with arterial load studied in isolated canine ventricle. *Am J Physiol.* 1983;245(5 Pt 1):H773-80.
7. Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev.* 2011;16(1):13-21.
8. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2016;37(27):2129-200.
9. Ziaeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(6):368-78.
10. Ponikowski P, Anker SD, AlHabib KF, Cowie MR, Force TL, Hu S, et al. Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail.* 2014;1(1):4-25.
11. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev.* 2017;3(1):7-11.

12. Roger VL. Epidemiology of heart failure. *Circ Res.* 2013;113(6):646-59.
13. Dzau VJ, Antman EM, Black HR, Hayes DL, Manson JE, Plutzky J, et al. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). *Circulation.* 2006;114(25):2850-70.
14. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 2013;128(4):388-400.
15. Ventura-Clapier R, Veksler V. Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res.* 1994;74(5):920-9.
16. Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, et al. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008;29(6-8):189-201.
17. Ebashi S, Masaki T, Tsukui R. Cardiac contractile proteins. *Adv Cardiol.* 1974;12(0):59-69.
18. Palmer S, Kentish JC. The role of troponin C in modulating the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1994;480 ( Pt 1):45-60.
19. Zot AS, Potter JD. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1987;16:535-59.
20. Layland J, Solaro RJ, Shah AM. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2005;66(1):12-21.
21. Barefield D, Sadayappan S. Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(5):866-75.
22. Tong CW, Nair NA, Doersch KM, Liu Y, Rosas PC. Cardiac myosin-binding protein-C is a critical mediator of diastolic function. *Pflugers Arch.* 2014;466(3):451-7.
23. Sadayappan S, Gulick J, Osinska H, Barefield D, Cuello F, Avkiran M, et al. A critical function for Ser-282 in cardiac Myosin binding protein-C phosphorylation and cardiac function. *Circ Res.* 2011;109(2):141-50.
24. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res.* 2000;86(1):51-8.

25. Steinberg SF. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ Res.* 2013;112(2):393-405.
26. Streng AS, de Boer D, van der Velden J, van Dieijen-Visser MP, Wodzig WK. Posttranslational modifications of cardiac troponin T: an overview. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;63:47-56.
27. Stehle R, Iorga B. Kinetics of cardiac sarcomeric processes and rate-limiting steps in contraction and relaxation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(5):843-50.
28. Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature.* 1954;173(4412):973-6.
29. Wang K, McClure J, Tu A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(8):3698-702.
30. Maruyama K. beta-Actinin, Cap Z, connectin and titin: what's in a name? *Trends Biochem Sci.* 2002;27(5):264-6.
31. Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J.* 1995;68(3):1027-44.
32. Gregorio CC, Trombitas K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, et al. The NH<sub>2</sub> terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol.* 1998;143(4):1013-27.
33. Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(1):18-25.
34. Tskhovrebova L, Trinick J. Extensibility in the titin molecule and its relation to muscle elasticity. *Adv Exp Med Biol.* 2000;481:163-73; discussion 74-8.
35. Trinick J, Knight P, Whiting A. Purification and properties of native titin. *J Mol Biol.* 1984;180(2):331-56.
36. Trombitas K, Greaser ML, Pollack GH. Interaction between titin and thin filaments in intact cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997;18(3):345-51.
37. Linke WA, Ivemeyer M, Labeit S, Hinssen H, Ruegg JC, Gautel M. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys J.* 1997;73(2):905-19.

38. Funatsu T, Kono E, Higuchi H, Kimura S, Ishiwata S, Yoshioka T, et al. Elastic filaments in situ in cardiac muscle: deep-etch replica analysis in combination with selective removal of actin and myosin filaments. *J Cell Biol.* 1993;120(3):711-24.
39. Al-Khayat HA, Kensler RW, Squire JM, Marston SB, Morris EP. Atomic model of the human cardiac muscle myosin filament. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(1):318-23.
40. Zou P, Pinotsis N, Lange S, Song YH, Popov A, Mavridis I, et al. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature.* 2006;439(7073):229-33.
41. Labeit S, Barlow DP, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh CL, et al. A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature.* 1990;345(6272):273-6.
42. Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 1995;270(5234):293-6.
43. Goll CM, Pastore A, Nilges M. The three-dimensional structure of a type I module from titin: a prototype of intracellular fibronectin type III domains. *Structure.* 1998;6(10):1291-302.
44. Improta S, Politou AS, Pastore A. Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure.* 1996;4(3):323-37.
45. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, et al. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res.* 2000;86(11):1114-21.
46. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Furst DO, et al. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature.* 1998;395(6705):863-9.
47. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, et al. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;110(2):155-62.
48. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, et al. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res.* 2000;86(1):59-67.
49. Barta J, Toth A, Edes I, Vaszily M, Papp JG, Varro A, et al. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem.* 2005;278(1-2):1-8.

50. Grutzner A, Garcia-Manyes S, Kotter S, Badilla CL, Fernandez JM, Linke WA. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*. 2009;97(3):825-34.
51. van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 2006;113(16):1966-73.
52. Mughal W, Kirshenbaum LA. Cell death signalling mechanisms in heart failure. *Exp Clin Cardiol*. 2011;16(4):102-8.
53. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2013;61:473-501.
54. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
55. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(11):1287-312.
56. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med*. 2004;8(2):201-12.
57. Eaton P, Byers HL, Leeds N, Ward MA, Shattock MJ. Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem*. 2002;277(12):9806-11.
58. <http://www.uniprot.org/>
59. Alegre-Cebollada J, Kosuri P, Giganti D, Eckels E, Rivas-Pardo JA, Hamdani N, et al. S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*. 2014;156(6):1235-46.
60. Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(3):323-5.
61. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(3):393-404.



62. Karwatowska-Prokopczuk E, Czarnowska E, Beresewicz A. Iron availability and free radical induced injury in the isolated ischaemic/reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 1992;26(1):58-66.
63. Obata T, Yamanaka Y. Effect of iron (II) on the generation of hydroxyl free radicals in rat myocardium. *Biochem Pharmacol.* 1996;51(10):1411-3.
64. Voss P, Engels M, Strosova M, Grune T, Horakova L. Protective effect of antioxidants against sarcoplasmic reticulum (SR) oxidation by Fenton reaction, however without prevention of Ca-pump activity. *Toxicol In Vitro.* 2008;22(7):1726-33.
65. Wong CM, Bansal G, Marcocci L, Suzuki YJ. Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling. *Redox Rep.* 2012;17(2):90-4.
66. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):169-76.
67. Shao CH, Rozanski GJ, Nagai R, Stockdale FE, Patel KP, Wang M, et al. Carbonylation of myosin heavy chains in rat heart during diabetes. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(2):205-17.
68. Powell SR, Gurzenda EM, Wahezi SE. Actin is oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(10):1171-6.
69. Canton M, Menazza S, Sheeran FL, Polverino de Laureto P, Di Lisa F, Pepe S. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(3):300-9.
70. Welch WJ. How cells respond to stress. *Sci Am.* 1993;268(5):56-64.
71. Prohaszka Z, Fust G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol Immunol.* 2004;41(1):29-44.
72. Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, et al. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3665-74.
73. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.* 2006;5(22):2592-601.
74. Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation.* 1997;96(12):4343-8.

75. Knowlton AA, Kapadia S, Torre-Amione G, Durand JB, Bies R, Young J, et al. Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(4):811-8.
76. Dohke T, Wada A, Isono T, Fujii M, Yamamoto T, Tsutamoto T, et al. Proteomic analysis reveals significant alternations of cardiac small heat shock protein expression in congestive heart failure. *J Card Fail.* 2006;12(1):77-84.
77. Li W, Rong R, Zhao S, Zhu X, Zhang K, Xiong X, et al. Proteomic analysis of metabolic, cytoskeletal and stress response proteins in human heart failure. *J Cell Mol Med.* 2012;16(1):59-71.
78. Barbato R, Menabo R, Dainese P, Carafoli E, Schiaffino S, Di Lisa F. Binding of cytosolic proteins to myofibrils in ischemic rat hearts. *Circ Res.* 1996;78(5):821-8.
79. van de Klundert FA, Gijzen ML, van den IPR, Snoeckx LH, de Jong WW. alpha B-crystallin and hsp25 in neonatal cardiac cells--differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol.* 1998;75(1):38-45.
80. Paulsen G, Lauritzen F, Bayer ML, Kalhovde JM, Ugelstad I, Owe SG, et al. Subcellular movement and expression of HSP27, alphaB-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2009;107(2):570-82.
81. Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1123-59.
82. Bennardini F, Wrzosek A, Chiesi M. Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circ Res.* 1992;71(2):288-94.
83. Wang X, Klevitsky R, Huang W, Glasford J, Li F, Robbins J. AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circ Res.* 2003;93(10):998-1005.
84. Lu XY, Chen L, Cai XL, Yang HT. Overexpression of heat shock protein 27 protects against ischaemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction via stabilization of troponin I and T. *Cardiovasc Res.* 2008;79(3):500-8.
85. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet.* 1998;20(1):92-5.

86. Kotter S, Unger A, Hamdani N, Lang P, Vorgerd M, Nagel-Steger L, et al. Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. *J Cell Biol.* 2014;204(2):187-202.
87. Bullard B, Ferguson C, Minajeva A, Leake MC, Gautel M, Labeit D, et al. Association of the chaperone alphaB-crystallin with titin in heart muscle. *J Biol Chem.* 2004;279(9):7917-24.
88. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998;12(24):3788-96.
89. Ahn SG, Thiele DJ. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 2003;17(4):516-28.
90. Campbell RT, McMurray JJ. Comorbidities and differential diagnosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Clin.* 2014;10(3):481-501.
91. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Jr., Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension.* 2018;71(6):1269-324.
92. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2019;139(10):e56-e528.
93. Eweborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study. *Heart.* 2013;99(6):396-400.
94. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc.* 2008;3(9):1422-34.
95. Chen J, Chemaly ER, Liang LF, LaRocca TJ, Yaniz-Galende E, Hajjar RJ. A new model of congestive heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(3):H994-1003.
96. Nemeth BT, Matyas C, Olah A, Lux A, Hidi L, Ruppert M, et al. Cinaciguat prevents the development of pathologic hypertrophy in a rat model of left ventricular pressure overload. *Sci Rep.* 2016;6:37166.

97. Ku HC, Su MJ. DPP4 deficiency preserved cardiac function in abdominal aortic banding rats. *PLoS One*. 2014;9(1):e85634.
98. Ruppert M, Korkmaz-Icoz S, Loganathan S, Jiang W, Lehmann L, Olah A, et al. Pressure-volume analysis reveals characteristic sex-related differences in cardiac function in a rat model of aortic banding-induced myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(3):H502-H11.
99. Ruppert M, Korkmaz-Icoz S, Li S, Nemeth BT, Hegedus P, Brlecic P, et al. Myocardial reverse remodeling after pressure unloading is associated with maintained cardiac mechanoenergetics in a rat model of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(3):H592-603.
100. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91(10):2642-54.
101. Papp Z, Szabo A, Barends JP, Stienen GJ. The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 2002;543(Pt 1):177-89.
102. Opitz CA, Leake MC, Makarenko I, Benes V, Linke WA. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*. 2004;94(7):967-75.
103. Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S, Granzier H. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res*. 2004;94(4):505-13.
104. LeWinter MM, Granzier H. Cardiac titin: a multifunctional giant. *Circulation*. 2010;121(19):2137-45.
105. Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, et al. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res*. 2009;104(6):780-6.
106. Balogh A, Toth A, Pasztor ET, Nagy L, Kovacs A, Kalasz J, Contreras GA, Edes I, Papp Z. Myofilament carbonylation modulates contractility in human cardiomyocytes. *Exp and Clin Card*. 2014;20(1):2026-2035.
107. Lamb GD, Posterino GS. Effects of oxidation and reduction on contractile function in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol*. 2003;546(Pt 1):149-63.

108. Balogh A, Santer D, Pasztor ET, Toth A, Czuriga D, Podesser BK, et al. Myofilament protein carbonylation contributes to the contractile dysfunction in the infarcted LV region of mouse hearts. *Cardiovasc Res.* 2014;101(1):108-19.
109. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219(1):1-14.
110. Wong CM, Marcocci L, Das D, Wang X, Luo H, Zungu-Edmondson M, et al. Mechanism of protein decarbonylation. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1126-33.
111. Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(4):310-8.
112. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 1998;83(2):117-32.
113. Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996;56(2):273-9.
114. Arrigo AP. Hsp27: novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life.* 2001;52(6):303-7.
115. Tucker NR, Shelden EA. Hsp27 associates with the titin filament system in heat-shocked zebrafish cardiomyocytes. *Exp Cell Res.* 2009;315(18):3176-86.
116. Franssen C, Kole J, Musters R, Hamdani N, Paulus WJ. alpha-B Crystallin Reverses High Diastolic Stiffness of Failing Human Cardiomyocytes. *Circ Heart Fail.* 2017;10(3):e003626.
117. Hamdani N, Kooij V, van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, Remedios CD, et al. Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2008;77(4):649-58.
118. Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA. Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res.* 2013;97(3):464-71.
119. Belin RJ, Sumandea MP, Kobayashi T, Walker LA, Rundell VL, Urbaniene D, et al. Left ventricular myofilament dysfunction in rat experimental hypertrophy and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(5):H2344-53.

120. Belin RJ, Sumandea MP, Sievert GA, Harvey LA, Geenen DL, Solaro RJ, et al. Interventricular differences in myofilament function in experimental congestive heart failure. *Pflugers Arch*. 2011;462(6):795-809.
121. Perreault CL, Bing OH, Brooks WW, Ransil BJ, Morgan JP. Differential effects of cardiac hypertrophy and failure on right versus left ventricular calcium activation. *Circ Res*. 1990;67(3):707-12.
122. Olah A, Nemeth BT, Matyas C, Hidi L, Lux A, Ruppert M, et al. Physiological and pathological left ventricular hypertrophy of comparable degree is associated with characteristic differences of in vivo hemodynamics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(5):H587-97.
123. Fraysse B, Weinberger F, Bardswell SC, Cuello F, Vignier N, Geertz B, et al. Increased myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(6):1299-307.
124. Wijnker PJ, Sequeira V, Foster DB, Li Y, Dos Remedios CG, Murphy AM, et al. Length-dependent activation is modulated by cardiac troponin I bisphosphorylation at Ser23 and Ser24 but not by Thr143 phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(8):H1171-81.
125. Wang H, Grant JE, Doede CM, Sadayappan S, Robbins J, Walker JW. PKC-betaII sensitizes cardiac myofilaments to Ca<sup>2+</sup> by phosphorylating troponin I on threonine-144. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(5):823-33.
126. Gomes AC, Falcao-Pires I, Pires AL, Bras-Silva C, Leite-Moreira AF. Rodent models of heart failure: an updated review. *Heart Fail Rev*. 2013;18(2):219-49.

## Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/319/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bódi Beáta  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Ruppert, M.\*, **Bódi, B.\***, Korkmaz-Icöz, S., Loganathan, S., Jiang, W., Lehmann, L., Oláh, A., Barta, B. A., Sayour, A. A., Merkely, B., Karck, M., Papp, Z., Szabó, G. T., Radovits, T.: Myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity correlates with left ventricular contractility during the progression of pressure overload-induced left ventricular myocardial hypertrophy in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 129, 208-218, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.02.017>  
\* These authors contributed equally this work.  
IF: 4.133
2. **Bódi, B.**, Pásztorné Tóth, E., Nagy, L., Tóth, A., Mártha, L., Kovács, Á., Balla, G., Kovács, T., Papp, Z.: Titin isoforms are increasingly protected against oxidative modifications in developing rat cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 113, 224-235, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.015>  
IF: 6.02





**További közlemények**

3. Lódi, M., Bánhegyi, V., **Bódi, B.**, Gyöngyösi, A., Kovács, Á., Árokszállási, A., Hamdani, N., Fagyas, M., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárday, Z., Lekli, I., Bai, P., Tóth, A., Papp, Z., Czuriga, D.: Prophylactic, single-drug cardioprotection in a comparative, experimental study of doxorubicin-induced cardiomyopathy.  
*J. Transl. Med.* "Accepted by Publisher", 1-48, 2020.  
IF: 4.124 (2019)
4. Lódi, M., Prikosz, D., Fülöp, G. Á., **Bódi, B.**, Gyöngyösi, A., Nagy, L. N., Kovács, Á., Kertész, A. B., Kocsis, J., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárday, Z., Juhász, B., Lekli, I., Bai, P., Tóth, A., Papp, Z., Czuriga, D.: Advantages of prophylactic versus conventionally scheduled heart failure therapy in an experimental model of doxorubicin-induced cardiomyopathy.  
*J. Transl. Med.* 17, 1-16, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-019-1978-0>  
IF: 4.124
5. Ruppert, M., **Bódi, B.**, Nagy, D., Korkmaz-Icöz, S., Loganathan, S., Oláh, A., Barta, B. A., Sayour, A. A., Benke, K., Karck, M., Merkely, B., Papp, Z., Szabó, G., Radovits, T.: A miofilamentáris rendszer Ca<sup>2+</sup>-érzékenysége korrelál a bal kamrai kontraktilitással a fokozott nyomásterhelés által előidézett patológiás szívizom-hipertrofia patkánymodelljében.  
*Cardiol. Hung.* 49 (2), 88-99, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.26430/CHUNGARICA.2019.49.2.88>
6. Márton, J., Péter, M., Balogh, G., **Bódi, B.**, Vida, A., Szántó, M., Bojcsuk, D., Jankó, L., Bhattoa, H. P., Gombos, I., Uray, K., Horváth, I., Török, Z., Bálint, B. L., Papp, Z., Vigh, L., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is a lipid-modulated modulator of muscular lipid homeostasis.  
*Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* 1863 (11), 1399-1412, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.013>  
IF: 4.402
7. Nagy, L., Gődény, I., Nánási, P. P. i., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., **Bódi, B.**, Csipő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktívátor hatású omecamtiv-mecarbil segítségével.  
*Cardiol. Hung.* 47 (1), 69-76, 2017.
8. Mátyás, C., Németh, B. T., Oláh, A., Török, M., Ruppert, M., Kellermayer, D., Barta, B. A., Szabó, G. T., Kökény, G., Horváth, E. M., **Bódi, B.**, Papp, Z., Merkely, B., Radovits, T.: Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes.  
*Eur. J. Heart Fail.* 19 (3), 326-336, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejhf.711>  
IF: 10.683







9. Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Kovács, A., Csipő, T., **Bódi, B.**, Priksz, D., Juhász, B., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Granzier, H. L., Édes, I., Fagyas, M., Papp, Z., Barta, J., Tóth, A.: Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats.  
*Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* 310 (11), H1671-H1682, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>  
IF: 3.348
10. Nagy, L., Kovács, Á., **Bódi, B.**, Pásztorné Tóth, E., Fülöp, G. Á., Tóth, A., Édes, I., Papp, Z.: The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat.  
*Br. J. Pharmacol.* 172 (18), 4506-4518, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13235>  
IF: 5.259
11. Kalász, J., Pásztorné Tóth, E., **Bódi, B.**, Fagyas, M., Tóth, A., Bhattoa, H. P., Vári, S. G., Balog, M., Blažetić, S., Heffer, M., Papp, Z., Borbély, A.: Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats.  
*Croat. Med. J.* 55 (3), 239-249, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2014.55.239>  
IF: 1.305

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,398**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
10,153**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.10.26.



## Tárgyszavak

izolált szívizomsejtek

passzív feszülés

titin oxidáció

hősokkfehérjék

miokardiális hipertrófia

miofilament funkció

Ca<sup>2+</sup>-érzékenység

## **Keywords**

isolated cardiomyocytes

passive stiffness

titin oxidation

heat shock proteins

miocardial hypertrophy

myofilament function

Ca<sup>2+</sup>-sensitivity

## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Papp Zoltánnak a kísérletes munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatásáért, valamint a publikációk és a disszertáció elkészítése során adott útmutatásáért.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Tóth Attilának, hogy szakmai felkészültségével és odafigyelésével egyengeti magam és munkatársaim pályafutását.

Óriási hálával tartozom Pásztorné Tóth Enikőnek, akinek magas szintű szakmai tudása és kreativitása nélkülözhetetlen volt a kísérleti nehézségek leküzdésében, valamint megtanította számomra a kutató munkához szükséges gondolkodásmód alapjait.

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Lászlónak, Kalász Juditnak és Dr. Kovács Árpádnak a kísérleti technika elsajátításában nyújtott segítségükért és tanácsaikért, valamint Orosz Józsefnek, aki az állatkísérletek kivitelezését és elvégzését jelentősen megkönnyítette számomra.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika munkatársainak, különösen Dr. Radovits Tamásnak, Dr. Ruppert Mihálynak és Dr. Oláh Attilának a közös munka lehetőségét, és hogy bizalmat szavaztak nekem.

Hálával tartozom a Klinikai Fiziológiai Tanszék jelenlegi és volt munkatársainak, különösen Mártha Lillának, aki önzetlen segítségével támogatta kutatásaim létrejöttét, valamint Csongrádi Alexandrának és Kass Krisztinának, hogy baráti támogatásukkal segítették munkámat. Köszönöm a TDK hallgatóinknak a támogatást.

Köszönöm férjemnek és a csodálatos lányaimnak a támogató szeretetüket és türelmüket, valamint Édesanyámnak és Édesapámnak a szavakban nem kifejezhető tanításaikat és biztatásukat.

Munkámat szeretett Nagyszüleimnek ajánlom.

*A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 „Szív és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)” és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program támogatta.  
A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.*

