

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Szívizomsejtek kontraktilis funkcióváltozásait
eredményező miofilamentális fehérje eltérések**

Bódi Beáta

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Szívizomsejtek kontraktilis funkcióváltozásait eredményező miofilamentális fehérje eltérések

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

Írta: Bódi Beáta, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szokodi István, az MTA doktora
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A doktori szigorlat (online formában) időpontja: 2021. február 16. 9:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sepp Róbert, az MTA doktora
Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szokodi István, az MTA doktora
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD
Prof. Dr. Sepp Róbert, az MTA doktora
Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2021. február 16. 11:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a bodibea0509@gmail.com email címre a vitát megelőző nap (2021. 02. 15) 16:00 óráig.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A kardiovaszkuláris kórképek patomechanizmusában kiemelkedő jelentőséget tulajdonítanak az oxidatív stressznek. A szívműködésben fiziológiai körülmények között is keletkező reaktív oxigén-származékok (ROS) és antioxidánsok egyensúlyának megváltozása a sejtek oxidoredukciós állapotának megváltozását eredményezik. Számos klinikai tanulmány vitathatatlanul tette a ROS szerepét a szívbetegség kialakulásában és progressziójában egyaránt. A szabadgyökök direkt módon károsítják a kontraktilis fehérjéket, ami kardiális diszfunkcióhoz vezet. 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.

Az is ismert, hogy a szív a káros hatásokra (pl. fokozott krónikus nyomásterhelés) adaptációs folyamatok beindításával válaszol, ami krónikus kardiális átépüléshez (*remodelling*), patológiai miokardiális hipertrofia kialakulásához vezet. A folyamat hátterében megváltozott intracelluláris jelátviteli mechanizmusok is felismerhetők. Ezért nem meglepő, hogy a közelmúltban az alapkutatások területén jelentős erőfeszítéseket tettek olyan *in vivo* állatmodellek létrehozásában, amelyek segítenek jobban megérteni a szív hemodinamikai túlterhelése által indukált *remodelling* patofiziológiáját.

1.1. A szarkomer felépítése és mechanikája

A szívműködésben a vékony (6-9 nm átmérőjű) és vastag (12-15 nm átmérőjű) filamentumok a kontrakciós erő generálására képes szarkomerekbe rendeződnek. 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. A kardiális TnI (cTnI) jellegzetes foszforilációs helyei proteinkináz A (PKA)-mediált esetben rácsálókban a szerin 22/23 (Ser-

22/23), míg a humán szívizomban a Ser-23/24, proteinkináz C (PKC)-mediált esetben a Ser-43/45 és a treonin-144 (Thr-144) aminosavak. A szarkomer közepén elhelyezkedő vastag filamentumok könnyű (MLC) és nehéz miozin (MHC) láncokból állnak, melyek feji és farki régiókból épülnek fel. A vastag filamentum felépítésében részt vesz a 140 kDa méretű kardiális miozinkötő C-fehérje (cMyBP-C), mely kapcsolatban áll az aktinnal, miozinnal és a titinnel és jelentős szerepet játszik az aktin-miozin interakcióban. A cMyBP-C három foszforilálható szerinnel rendelkezik (Ser-273, Ser-282 és Ser-302). Összességében a miofilamentumokat alkotó strukturális és regulátor funkciójú fehérjék poszttranszlációs módosulásai a szívizomsejtek erőgenerációs teljesítményét és Ca^{2+} -érzékenységét egyaránt befolyásolhatják.

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 filamentáris rendszere, azon belül is leginkább annak titin komponense felelős.

1.2. A titin elhelyezkedése és szerkezete

A celluláris diasztolé és a szívizomsejtek passzív feszülésének fő meghatározója a titin. A molekuláris rugó kinyújtott hossza csaknem 1 μm , mely a fél szarkomert átöleli a Z-lemeztől az M-vonalig húzódva. Molekula mérete izoformától függően 3000-3800 kDa (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 α -aktinon keresztül kötődnek a Z-lemezhez. 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. A molekula 2 MDa-nyi része az A-szakaszban található, ahol minden vastag filamentum-félhez hat titin molekula kötődik, ezáltal szoros kapcsolatot

alakít ki a miozin, illetve a cMyBP-C fehérjével egyaránt. A titin molekula egyetlen gén (TTN) által kódolt, ami 363 exont tartalmaz. Gigantikus mérete ellenére viszonylag monoton felépítésű. A *titin elsődleges szerkezetét* izoformáinként átlagosan 27000-33000 aminosav alkotja, jelenlegi adatbázisok alapján a teljes fehérje 38138 aminosavból is állhat. *Másodlagos szerkezet.* A titin szekvencia két különböző típusú, kb. 90-100 aminosav hosszúságú mintázat többszöri ismétlődéséből áll. Később az első típust I-típusú immunglobulin (Ig), a második típust fibronektin III típusú (Fn) domének szupercsaládjába sorolták. 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 harmadlagos szerkezete* alatt a domének és egyedi szekvenciák sorozatát értjük, kapcsolatuk a szarkomer állapotának és egyéb (pato)fiziológiás állapotok függvénye.

1.2.1. A titin funkciója

A titin elsődleges feladata az izom passzív rugalmasságának élettani igények szerinti biztosítása, melynek alapját a molekula különböző izoformái biztosítják.

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. Ebből adódóan a rövid izoformák nagyobb, míg a hosszabb titin izoformák kisebb passzív feszülést eredményeznek. A titin izoforma-kompozíciója fajonként és életkortól függően változik. Újszülött patkány szívmusclejtekben 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.

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 szívizom passzív feszülését.

1.3. 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. A szabadgyökök túltermelődését a szervezet antioxidáns rendszere ellensúlyozza, azonban az egyensúly megbomlása reaktív oxigén/nitrogén származékok (ROS/RNS) képződéséhez, így oxidatív stresszállapotok kialakulásához vezet. A fehérjéket felépítő aminosavak közül a cisztein rendkívül érzékeny az oxidatív hatásokra. A szívizomsejtek fehérjei oxidáció következtében reverzibilis és irreverzibilis károsodást szenvedhetnek el, mely módosulások közül kiemelendő a szulfhidril (SH) oxidáció és a karboniláció.

1.3.1. Szulfhidril csoportok oxidációja

A szívizom fehérjék cisztein oldalláncain jelenlévő szulfhidril (SH) csoportok reverzibilis oxidációjának jelentős élettani és kórélettani szerepe van az eukarióta sejtekben. 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.

Laboratóriumunkban végzett korábbi kísérletek igazolták, hogy a kontraktilis fehérjék SH oxidációja hozzájárulhat a szívelégtelenség során kialakuló kontraktilis diszfunkcióhoz. A vizsgálatok során kimutatták, hogy az SH-csoportokat *in vitro* oxidáló ditiodipiridin (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. 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.

Kimutatták, hogy 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. Ezért a titin ezen régiójának SH oxidációja patológiai szempontból is jelentősnek bizonyult.

1.3.2. Karboniláció

Az irreverzibilis karboniláció során reaktív aldehid vagy keton csoportok kötődnek a fehérjék aminosavaihoz, mely leginkább a prolin, lizin, arginin és treonin oldalláncokat érinti. A karbonilációs módosulások jelentős része fém-katalizált Fenton- reakció során valósul meg. A folyamat során vas(II) és H₂O₂ közreműködésével hidroxil szabadgyök (OH•) képződik, amely jelentős károsító hatásai mellett, karbonilációs aktivitással is rendelkezik. A Fenton-reakció a protein karboniláció *in vitro* körülmények közötti vizsgálatára széles körben elterjedt. Arról azonban nem áll rendelkezésre információ, hogy miként modulálja a titin karboniláció a szívizomsejtek titin-dependens passzív erejét.

1.4. Titin-dependens passzív feszülés indirekt módosítása: hősokkfehérjék

A kis hősokkfehérjék (sHSP, small heat shock proteins), mint a HSP27 (HSPB1) és az αB-krisztallin (HSPB5) elsősorban a szívizomban, vázizomban, vesében és agyban termelődnek nagy mennyiségben. Mindkét fehérje kifejeződése stresszhatásokra megemelkedik.

A HSP27 és az αB-krisztallin hősokkfehérjék 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. Stresszhatások során preferenciálisan transzlokálódnak a szarkomerbe, melynek pontos mechanizmusa a mai napig nem tisztázott. A szívben a HSP27 és αB-krisztallin leginkább iszkémia, hőstressz vagy szívelégtelenség során indukálódik.

Stressz során a sHSP-k a citoszólból a Z-lemezhez és/vagy az I-szakaszhoz transzlokálódnak. A sHSP-interakció következtében védett fehérjék közé tartozik a dezmin, α -aktinin, aktin, troponin-I és T, miozin és a titin.

Azonban patológiás körülmények között a sHSP-k nem csak a Z-koronghoz, hanem a titin molekula funkcionálisan rugalmas I-szakasz régiójába is transzlokálódnak, ezáltal szabályozva a szívműködés passzív merevségét. 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. Kísérletek bizonyítják, hogy a titin domének kitekeredése során felszínre kerülő rejtett hidrofób helyek védettek maradtak a sHSP-k jelenlétében az oxidatív stressz alatt. 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. Az elmúlt évtizedben megjelent tanulmányok valószínűsítik, hogy a HSP-k funkcióját az oxidatív stressz mellett az életkor is nagyban befolyásolja. Jelenlegi adatok alapján azonban nem ismert, hogy a titinhez fiziológiai körülmények között kötődő kis hő sokkfehérjék (HSP27 és α B-krisztallin) mennyire befolyásolhatják az *in vitro* oxidatív titin-dependens passzív feszülés mértékét a különböző fejlettségi állapotú szívműködési sejtekben.

1.5. Kompenzált és dekompenzált patológiás bal kamra-hipertrofia

A szív tartós nyomás-túlterhelésének következménye annak megnövekedett munkája, mely hosszútávon szívelégtelenséghez vezet. Kezdetben a bal kamra (BK) kompenzatórikus hipertrofiával alkalmazkodik a megváltozott hemodinamikai körülményekhez a megfelelő nyomás fenntartásának érdekében. Mindez rövidtávon támogatja a keringést, azonban hosszabb távon a hipertrofia káros. A kompenzációs mechanizmusok idővel a szívműködés strukturális és funkcionális átépüléséhez (*remodelling*) vezetnek, amely a kamrák elégtelen telődését és ürülését, valamint az extracelluláris mátrix fibrózist, a szívműködési sejtek nekrozisát és

apoptózisát eredményezik, ami kontraktilis diszfunkció kialakulásához vezet. Az még nem teljesen tisztázott, hogy az adaptív hipertrófia pontosan hogyan alakul át maladaptív hipertrófiává.

A patológiás bal kamra (BK) hipertrófia úgynevezett korai (kompenzált) és késői (dekompenzált) stádiumainak kontraktilitásában jellegzetes változások figyelhetők meg. Nyomás-térfogat analízissel végzett kísérleti munkák bizonyítják a kontraktilitás fokozódását a BK hipertrófia korai stádiumában, melynek során a szív a fokozott utóterhelést kompenzálja, biztosítva ezáltal a szív megőrzött szisztolés funkcióját. Azonban mindez csak ideiglenes alkalmazkodást tesz lehetővé, előrehaladottabb késői stádiumokban a kontraktilitás-paraméterek jelentősen romlanak, a szisztolés és diasztolés teljesítmény csökken. Emellett a progresszív kollagén-felhalmozódás és egyéb fibrotikus markerek megjelenése is megfigyelhetővé válik.

Kutatások sejtetik, hogy tartós nyomás-túlterhelés során a bal kamrai kontraktilitás nem csak szervi, hanem szarkomerfunkció szintjén is változásokat idéz elő. Ugyanakkor nincs információnk a szívmiocardiumsejtek miofilamentális rendszerének működésében bekövetkező stádiumfüggő változásokról. Mivel a bal kamra remodeláció hosszú időn keresztül hozzájárul a kontraktilis funkcióromláshoz, így felmerült, hogy a kompenzált fázisból a dekompenzált fázisba vezető folyamatok terápiás célpontként is szolgálhatnak.

2. Célkitűzések

2.1. A titin-dependens passzív feszülés és titin izoformák oxidatív módosulásainak vizsgálata a szívmiocardiumsejtek fejlődése során

Célul tűztük ki a titin oxidáció (SH oxidáció, karboniláció) passzív merevségre kifejtett hatásának tanulmányozását különböző fejlettségi állapotú permeabilizált szívmiocardiumsejteken. Megvizsgáltuk az oxidatív ágensek (DTDP, Fenton reagens) szívmiocardiumsejt mechanikára kifejtett

következményeit, valamint párhuzamosan tanulmányoztuk a titin izoformák oxidatív érzékenységet az életkor előrehaladtával.

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

2.2. 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.

3. Anyagok és módszerek

3.1. 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. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (Etikai engedély száma: 24/2013/DE MÁB) jóváhagyásával végeztük.

Titin-dependens passzív feszülés mérése permeabilizált szívizomsejteken

A különböző életkorú patkányokból (0, 7, 21 napos és felnőtt 8 hetes) származó BK-i szívizommintákat izoláló oldatban szövethomogenizátorral izoláltuk, majd 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 segítségével rögzítettük a mérőrendszer központi egységéhez. 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 Ca^{2+} -mentes relaxáló oldatban valósultak meg, ahol a sejteket eredeti hosszúságuk 20%-ával megrövidítettük (8 másodperc), melynek során a Ca^{2+} -független $F_{\text{passzív}}$ volt regisztrálható. Az $F_{\text{passzív}}$ értékeket a szívizomsejtek keresztmetszetére normalizáltuk és az értékeket abszolút erőegységekben (kN/m^2) ábrázoltuk.

A titin izoformák redukált/oxidatív SH-csoport tartalmának vagy karbonilációs állapotának passzív feszülésre kifejtett hatásának vizsgálatához az izolált szívizomsejteket DTDP-t (10 mM) vagy Fenton reagenst (50 μM FeSO_4 , 1,5 mM H_2O_2 , 6 mM aszkorbinsav) tartalmazó relaxáló oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az oxidatív módosulások revertálhatóságát az SH-csoportokat redukáló DTT (10 mM) 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 vagy DTT-t tartalmazó relaxáló oldatban inkubáltuk. A titin izoformák redukált/szabad SH-csoportjait EZ-Link Iodoacetyl-LC-Biotin reagenssel jelöltük, amelynek kivitelezése pufferoldatban a gyártói leírás alapján történt. A biotinilációt követően a sejtfehérjéket mintapufferben oldottuk. 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. A biotinnal jelölt SH-csoportokhoz fikoeritrin-konjugált (PE) streptavidint kötöttünk. A teljes fehérjemennyiséget szuperérzékeny blotfestéssel kvantitatív módon határoztuk meg.

A titin izoformák karbonilációjának meghatározása OxyBlot™ módszerrel

A titin izoformák karbonil-csoport tartalmának meghatározását OxyBlot™ gyári kit alkalmazásával végeztük. A permeabilizált szívizomsejteket Fenton reagenseket tartalmazó relaxáló oldatban kezeltük. A szívizomsejteket mintapufferben szolubilizáltuk, és a karbonil-csoportokat 2,4-dinitrofenil-hidrazinnal (DNPH) derivatizáltuk. 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). A biotinnal jelölt karbonil-csoportokat fikoeritrin-konjugált (PE) streptavidinnal tettük láthatóvá. A titin izoformákat érzékeny membránfestékekkel vizualizáltuk. A számszerűsített adatokat a kezeletlen kontrok jelintenzitására vonatkoztatva adtuk meg (karbonilációs index, AU).

A HSP27 és az α B-krisztallin expressziójának meghatározása Western immunoblot technikával

Izolálást és permeabilizálást követően a BK-i szívizomsejteket SDS mintapufferben oldottuk. A fehérjéket 8% SDS-poliakrilamid géleken választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat primer [anti-HSP27 (1: 300)] vagy anti- α B-krisztallin (1:1000)] és másodlagos antitestekkel [peroxidáz-konjugált kecske anti-egér (1:100000) vagy kecske anti-nyúl (1:300)] jelöltük. A teljes fehérjemennyiséget érzékeny membránfesték alkalmazásával számszerűsítettük.

Immunhisztokémia

A szívizomsejteket a fagyasztott BK-i szívizomszövetből izoláltuk és permeabilizáltuk a fent leírtak szerint. A permeabilizált szívizomsejteket tárgylemezre fixáltuk. A szívizomsejteket primer antitestekkel [anti-HSP27 (1:50), anti- α B-krisztallin (1: 300) és anti-titin (1:50, T11)] és másodlagos antitestekkel [kecske anti-nyúl Cy2 és Cy3 és biotinilezett kecske-anti-egér (1:

200] jelöltük. A biotinilált antitesteket Cy2- és Cy3-konjugált streptavidinnel (1: 500) tettük láthatóvá. A képeket egy Nikon Eclipse 80i fluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettük.

3.2. Módszerek II: Bal kamra hipertrófia állatmodellje

Felhasznált szívizomminták

A fokozott nyomás-terhelés által kiváltott patológiás hipertrófia állatmodelljének beállítását és karakterizálását a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika munkatársai végezték. 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/kontrol) vagy a hasi aorta műtéti beszűkítése (abdominális aortic banding, AB) történt. 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 BK-i szívizomszövetek izolálását és permeabilizálását, valamint a kontraktilis mérőrendszerhez való rögzítését a korábban leírtak alapján végeztük. Az izometriás erőket egységesen 2,3 μm szarkomerhosszon mértük. A szívizomsejtek Ca^{2+} -függő erőértékeinek meghatározását a preparátum relaxáló oldatból-aktiváló oldatba történő átvitelével valósítottuk meg. A kardiomiociták aktív erőértékét ($F_{\text{aktív}}$) és Ca^{2+} -érzékenységet ($p\text{Ca}_{50}$) maximális, ($p\text{Ca}=4,75$) és szubmaximális ($p\text{Ca}=5,2-7,0$) Ca^{2+} -koncentrációk mellett regisztráltuk. A szubmaximális $p\text{Ca}$ által kiváltott aktív erőértékeket a maximális erőre (F_{max} , $p\text{Ca} 4,75$) normalizáltuk és egy speciális szigmoid függvénnyel (módosított Hill-egyenlet) illesztettük az Origin 6.0 elemző program segítségével. Az így kapott úgynevezett Ca^{2+} -érzékenységi görbéből a fél-maximális erő kifejtéséhez szükséges $p\text{Ca}$ érték ($p\text{Ca}_{50}$) származtatható, mely a szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységet önmagában megadja. A szívizomsejtek Ca^{2+} -független passzív erejét ($F_{\text{passzív}}$) relaxáló oldatban a korábban leírtak alapján végeztük.

A kardiális TnI és MyBP-C fehérjék foszforilációs állapotának vizsgálata

A BK-i szívizomsejteket 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 miozin kötő C fehérje (cMyBP-C) elválasztását 12% és 4%-os poliakrilamid gélek alkalmazásával végeztük és a fehérjéket protein standard alapján azonosítottuk. Gélelektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd blokkolást 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 cMyBPC ellenes primer antitestekkel jelöltük [(anti-cTnI Ser-23/24 (1:1000), anti-cTnI Ser-43 (1:500) és anti-cTnI Thr-144 (1:500) és anti-

cMyBP-C Ser-282 (1:500)]. A szignálokat peroxidáz-konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitestek (1:300) alkalmazásával detektáltuk. A teljes fehérjemennyiséget érzékeny blotfestéssel határoztuk meg. A kemilumineszcens jeleket (ECL) az összfehérjemennyiségre normalizáltuk.

Statisztika

A statisztikai szignifikanciát varianciaanalízissel vizsgáltuk (ANOVA, majd Bonferroni post hoc tesztje). Az értékeket átlag±közéérték közepes hibája (SEM) értéként adtuk meg. A $P < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. 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, ami egyúttal a szívizomsejtek Ca^{2+} -független passzív erejének ($F_{\text{passzív}}$) fokozódását is eredményezi. 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.

4.1.1. 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 magasabbnak 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; $0,19 \pm 0,02$ kN/m²-ről $0,31 \pm 0,04$ kN/m²-re a 7 napos állatban; $0,45 \pm 0,07$ kN/m²-ről $0,60 \pm 0,07$ kN/m²-re a 21 napos csoportban, és $2,35 \pm 0,11$ kN/m²-ről $2,76 \pm 0,16$ kN/m²-re a felnőtt patkányban, SL: 2,3 μ m, $P < 0,05$ vs. kontroll, $n = 6-8$ szívizomsejt/legálább 3 különböző szívből). 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 ($0,10 \pm 0,01$ kN/m²; $0,21 \pm 0,02$ kN/m²; $0,51 \pm 0,08$ kN/m² és $2,28 \pm 0,12$ kN/m² a 0, 7, 21 napos és felnőtt állatokban, SL: 2,3 μ m; $n = 6-8$ szívizomsejt legalább 3 különböző szívből).

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; $P < 0,05$ vs. kontroll, $n = 8-23$). 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.

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

Kísérleteink következő lépésében a titin fehérje karbonilációjának a $F_{\text{passzív}}$ értékeire 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 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/m²-ről $0,22 \pm 0,01$ kN/m²-re a 0 napos patkányokban; $0,26 \pm 0,02$ kN/m²-ről $0,44 \pm 0,05$ kN/m²-re a 7 napos állatokban; $0,49 \pm 0,03$ kN/m²-ről $0,69 \pm 0,06$ kN/m²-re a 21 napos csoportokban és $2,17 \pm 0,05$ kN/m²-ről $2,59 \pm 0,10$ kN/m²-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 szívizomsejtekben ez a reverzibilitás nem volt megfigyelhető ($F_{\text{passzív}}$: $0,11 \pm 0,01$ kN/m²; $0,22 \pm 0,02$ kN/m²; $0,35 \pm 0,03$ kN/m² és $2,94 \pm 0,15$ kN/m², a fenti sorrendben, $P < 0,05$ vs. kontroll, $n = 6-7$ szívizomsejt legalább 3 különböző szívből).

Paralell biokémiai vizsgálatok során OxyBlot™ módszerrel végeztük az N2BA és N2B titin izoformák karbonil-csoport képződéseinek meghatározását a különböző életkorú szöveti homogenizátumokban. A karbonil-csoportok szintje (a kezeltlen kontroll karbonilációs indexe: 1 AU) a Fenton reagensekkel való inkubációt követően jelentősen megnőtt, bár mindez látszólag negatív korrelációban volt az életkorral ($2,57 \pm 0,06$ AU, $2,37 \pm 0,02$ AU, $1,35 \pm 0,03$ AU a 0-, 7-, 21-napos állatokban az N2BA titin izoformákban, valamint: $2,90 \pm 0,10$ AU, $2,57 \pm 0,04$ AU, $1,79 \pm 0,03$ AU, $1,51 \pm 0,02$ 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.

4.1.3. HSP27 és α 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 α 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±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] és α B-krisztallin [$1,00\pm0,11$; $1,61\pm0,19$; $3,23\pm0,86$; $4,42\pm0,96$ a 0, 7, 21 napos és felnőtt szívben, $P<0,05$ vs. 0 nap, $n=8-15$ legalább 3 különböző szívből] kifejeződése a szívizomsejtek életkorával párhuzamosan fokozódott.

Ezt követően a biokémiai megfigyeléseinket immunhisztokémiai vizsgálatokkal egészítettük ki, annak céljából, hogy tanulmányozzuk a HSP27 és α B-krisztallin fehérjék kolokalizációját a titin molekulával. Mind a két fehérje esetében figyelemreméltó kolokalizáció volt megfigyelhető a titin óriásfehérjével a szívizomsejtek érése során.

4.1.4. Összefüggés a titin-dependens $F_{\text{passzív}}$ és titin izoformák oxidatív érzékenysége, valamint a hősokkfehérjék 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 reagensok alkalmazását követően erős negatív korrelációt mutatott a két hősokkfehérje fokozatos kifejeződésével a posztnatális adaptáció során.

4.2. Miofilamentális változások vizsgálata a nyomásterhelés-indukált patológiás hipertrófia patkánymodelljén

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

4.2.1. A maximális Ca^{2+} -aktivált erőgeneráció nem változott a korai és késői patológiás hipertrófiában

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/m²; 12hét: $14,19 \pm 0,47$ kN/m²; 18hét: $13,62 \pm 0,79$ kN/m², n=9-10 szívizomsejt/csoport) a megfelelő AB csoportokban (6hét: $13,57 \pm 0,69$ kN/m²; 12hét: $13,01 \pm 0,76$ kN/m²; 18hét: $15,49 \pm 1,02$ kN/m², P<0,05, n=13 szívizomsejt/csoport) mért erőértékekhez viszonyítva.

4.2.2. A szívizomsejtek Ca²⁺-érzékenysége nőtt a korai patológiás hipertrófiában

A változatlan F_{max} kontraktilis paraméterrel szemben, a szívizomsejtek pCa₅₀ 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 Ca²⁺-érzékenységére utal. Az AB-6hét szívizomsejtekben mért pCa₅₀ értékek az AB-12hét ($5,77 \pm 0,01$) és AB-18hét csoportokhoz ($5,74 \pm 0,01$) képest is szignifikánsan nagyobbak voltak. Ez utóbbi két (AB-12hét és AB-18hét) csoport Ca²⁺-érzékenysége nem különbözött jelentősen a megfelelő kontroll csoportoktól (Sham-12hét: $5,75 \pm 0,01$ és Sham-18hét: $5,74 \pm 0,02$).

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

A permeabilizált szívizomsejtek Ca²⁺-független passzív feszülése nem változott a patológiás BK-i hipertrófia korai (AB-6hét: $1,34 \pm 0,01$ kN/m²) és késői (AB-12hét: $1,09 \pm 0,04$ kN/m² és AB-18hét: $1,05 \pm 0,09$ kN/m², n=9-13 szívizomsejt/csoport) stádiumaiban a megfelelő Sham csoportokhoz viszonyítva (Sham-6hét: $1,07 \pm 0,08$ kN/m²; Sham-12hét: $1,14 \pm 0,07$ kN/m² és Sham-18hét: $1,15 \pm 0,14$ kN/m²).

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

Western-immunoblot kísérletek során vizsgáltuk a miofilamentális rendszer Ca²⁺-érzékenységeben 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 és a PKC-függő Ser-43 oldalláncokon 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). Ugyanakkor nem találtunk különbséget a cMyBP-C foszforiláltságában a PKA-dependens Ser-282 oldalláncon a csoportpárokon belül és a csoportok között.

5. 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 α 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 fiziológiás szarkomerhosszon 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.

Jelen munkánkban a titin izoformák SH- oxidációját *in vitro* SH-csoport-specifikus oxidálószerrel, a DTDP-vel váltottuk ki. Megfigyeltük, hogy az oxidálószerrel kiváltott passzív merevség növekedések a patkány permeabilizált szívizomsejtekben, az *in vitro* alkalmazott SH-csoportokat redukáló DTT-vel visszafordítható módon csökkentek. Kimutattuk, hogy a

szívizomsejtek DTDP-indukált passzív feszülésének oxidatív érzékenysége fokozatosan csökken az életkor előrehaladtával. Mindemellett a DTDP által kiváltott SH-csoport oxidáció mértéke is csökkent az N2BA és az N2B titin izoformákban az életkorral.

Az SH-csoport oxidációja mellett a ROS által indukált miofilamentális proteinek karbonilációja is hozzájárulhat a szív kontraktilis diszfunkciójához. A hidroxil-gyökök rendkívül reaktívak és különféle sejtkomponensekkel képesek reagálni. Kísérleteinkben a titin-karboniláció indukálását *in vitro* Fenton reagensek alkalmazásával végeztük. A funkcionális méréseink során a szívizomsejtek megnövekedett passzív feszülését tapasztaltuk a Fenton kezeléseket követően minden korcsoportban. A DTDP hatásokhoz hasonlóan, a Fenton reagens által indukált passzív feszülés növekedése az életkorral egyaránt csökkent. Párhuzamos biokémiai vizsgálatok során kimutattuk, hogy a passzív merevséget meghatározó titin fehérje karbonilációjának mértéke is csökkent a születést követően.

A fentiek alapján elmondható, hogy a titin izoformák SH-oxidációjának és karbonilációjának mértéke a szív posztнатális adaptációja során fokozatosan csökkent. Ezt a hatást az N2B/N2BA titin izoformák expressziójának aránya nem befolyásolta. 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.

Korábbi kísérleti tanulmányok bizonyítják, hogy a kis hősokkfehérjék védő szerepet töltenek be számos szarkomer fehérje, köztük a titin esetében is. 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. A szívben két kis hősokkfehérje (sHSP), a HSP27 és az α B-krisztallin expresszióját a hőstressz, öregedés, végstádiumú szívelégtelenség vagy az iszkémiás betegségek fokozzák. Továbbá ismert, hogy ezek a proteinek részt vesznek az oxidatív stressz kivédésében és a sejtek redox

állapotának szabályozásában. Stressz hatására a HSP27 és az α B-krisztallin fehérjék a titin izoformák I-szakaszban található funkcionálisan rugalmas elemeihez kötődnek, ezáltal hozzájárulhatnak a fiziológiás passzív rugalmasság fenntartásához az izomszövetekben. Érdekes módon Kötter és munkatársai kimutatták, hogy a titin fehérje és a kis hősokkfehérjék közötti interakciót az N2B titin izoform expressziója is fokozza. Ezekkel a megfigyelésekkel párhuzamosan, vizsgálataink során erős kolokalizációt figyeltünk meg a kis hősokkfehérjék és szarkomer előrehaladottabb érési stádiuma között, ahol az N2B titin izoforma expresszió magas volt. Ugyanakkor újszülött szívizomsejtekben az N2BA titin a domináns, így vélhetően a kis hősokkfehérjék nem képesek hatékonyan kötődni a rugalmas izoformához. Mindezt kísérletesen is alátámasztottuk, ahol nem találtunk erős kolokalizációt a kis hősokkfehérjék és a titin között az újszülött kardiomiocitákban (11. ábra), ami alapján feltételezhető, hogy a szívizomsejtek 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 hősokkfehérjék kifejeződésének mértéke fokozatos a kardiomiociták fejlődése során, mely egy szoros titin-sHSP kapcsolatra mutathat rá. Feltételezéseinket alátámasztva, erős korrelációt találtunk a HSP27 és az α 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 hősokkfehérjék fokozatos kifejeződése között a szívizomsejtek fejlődése során.

Munkánk során kapcsolatot mutattunk ki a titin izoformák oxidációja, a szívizomsejtek passzív feszülése, valamint a HSP27/ α B-krisztallin expressziója között a fejlődő patkány szívben. Az oxidatív módosulás kétféle típusa: a titin izoformák SH-csoport oxidációja és karbonilációja hasonló módon befolyásolták 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 hősokkfehérjék, mint a HSP27 és az α B-krisztallin biztosíthatják.

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

Tanulmányunk második részében a bal kamra nyomásterhelésének hatására kialakuló patológiás szívizom hipertrófia korai/kompenzált és késői/dekompenzált stádiumainak miofilamentális rendszerében bekövetkező funkcionális és molekuláris változásait figyeltük meg hím patkánymodellekben. 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 bal kamra hipertrófia alakul ki, melynek progressziója szívelégtelenség kialakulásához vezet. A bal kamra 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, kompenzálva ezzel a rendszerben uralkodó utóterhelést. 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. A fokozott nyomásterhelés a kamra kontraktilitását szervi és szarkomerfunkció szinten is egyaránt érinti.

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 bal kamra 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 bal kamra hipertrófia alakult ki, melyre károsodott diasztolés funkció és megtartott szisztolés funkció volt jellemző. Mindez igazolta, hogy az AB-6hét csoport megfelelőnek bizonyult a fokozott nyomásterhelés indukált bal kamra hipertrófia korai stádiumának vizsgálatához. A betegség korai fázisában az emelkedett bal kamrai kontraktilitással párhuzamosan kísérleteink során a permeabilizált szívmusclesejtek Ca^{2+} -érzékenysége növekedését tapasztaltuk, változatlan maximális Ca^{2+} -dependens aktív erők mellett. Bár a szarkomer Ca^{2+} -érzékenysége emelkedése megőrzött szisztolés funkció mellett ismert a betegségben, azonban nem rendelkezünk adattal a permeabilizált szívmusclesejtek Ca^{2+} -érzékenységét leginkább meghatározó miofilamentális fehérjék (cTnI és cMyBP-C) foszforilációs állapotáról. Biokémiai kísérleteink a cTnI PKC-mediált Thr-144 helyének nagyfokú foszforilációját mutatta az AB-6hét csoportban. Eredményeinkkel összhangban korábbi kutatások igazolták, hogy a miofilamentális Ca^{2+} -érzékenységet növeli a cTnI ezen specifikus helyének hiperfoszforilációja, ami érdekes módon nem volt hatással a szívmusclesejtek maximális erőgenerálására a humán szívben. 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 kontrollpárokhöz viszonyítva feltételezzük, hogy a miofilamentális rendszer megnövekedett Ca^{2+} -érzékenysége háttérében a cTnI PKC-specifikus Thr-144 helyének hiperfoszforilációja állhat a korai patológiás hipertrófia patkánymodellben.

Kollaborációs munkatársaink a krónikus nyomásterhelést 12 és 18 hét időtartamra biztosították hím patkányokban a bal kamra hipertrófia előrehaladott stádiumának vizsgálatához, ahol a kísérleti csoportokban a bal kamra fokozott kontraktilitása regrediál. Az

in vivo hemodinamikai eredményekkel összhangban, funkcionális vizsgálataink során a korai BK hipertrófiában tapasztalt 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, a kezdeti sejt és molekuláris szintű adaptációk feltételezhetően megszűntek. Az izolált szívizomsejtek passzív erejét a bal kamra hipertrófia korai (megnyúlt aktív relaxáció) és késői stádiumaiban (aktív relaxáció és passzív feszülés) bekövetkező diasztolés funkciókárosodás egyáltalán nem érintette. A bal kamra hipertrófia általunk vizsgált stádiumaiban ezért nem valószínű, hogy a szarkomer passzív elemei 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 bal kamra 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 szívmusclejtek passzív merevségének oxidatív érzékenysége fokozatosan csökken a posztnatális adaptáció során.
- Az N2BA és N2B titin izoformák egyre kevésbé módosíthatók az oxidatív hatásokkal szemben a szívmusclejtek posztnatális fejlődése során.
- A miofibrillummal-asszociált kis hőszokkfehérjék fokozatos kifejeződése védelmet nyújthat az oxidatív titin módosításokkal szemben a születést követően.
- A korai patológiás szívmuscle-hipertrofia patkánymodelljében a PKC-mediált kardiális troponin I (Thr-144) hiperfoszforilációja együtt jár a szívmusclejtek megnövekedett Ca^{2+} -érzékenységével, ami a miofilamentális rendszer kompenzatórikus válasza lehet a bal kamra fokozott nyomásterhelésére.

6. Összefoglalás

A szívizomsejtek diasztolés feszülését a titin óriásfehérje indirekt (pl. hősokkfehérjéken keresztül megvalósuló) és direkt (pl. oxidáció okozta) módosulásai 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 posztntális adaptációja során, melynek hátterében a titin-asszociált hősokkfehérjék (HSP27 és α 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 Ca^{2+} -érékenysége emelkedett, melynek hátterében 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.



**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 Ca²⁺ 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., Kisvárdy, 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., Priksz, D., Fülöp, G. Á., **Bódi, B.**, Gyöngyösi, A., Nagy, L. N., Kovács, Á., Kertész, A. B., Kocsis, J., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárdy, 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 Ca²⁺-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., Gödény, 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-aktivátor hatású omecantiv-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.



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.*

