

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A SZÍVSZÖVETI ÁTÉPÜLÉS JELÁTVITELI FOLYAMATAI

FÖLDES GÁBOR

SEMMELWEIS EGYETEM  
VÁROSMAJORI SZÍV- ÉS  
ÉRGYÓGYÁSZATI KLINIKA  
BUDAPEST, 2018



# Tartalomjegyzék

<b>1.</b>	<b>Tudományterületi háttér</b> .....	9
1.1.	Szívizomsejtek szívelégtelenségben.....	9
1.1.1.	A szívizomsejtek morfológiai változásai szívelégtelenségben.....	10
1.1.2.	Hibás génszabályozás.....	10
1.1.3.	Csökkent életképesség és megnövekedett apoptózis.....	11
1.1.4.	Intracelluláris kináz jelátvitel a szívizomsejtek apoptózisában.....	14
1.1.5.	Sejthalálózás transzplantált sejtekben.....	15
1.1.6.	Megváltozott sejtmag transzport.....	16
1.2.	Új humán szívizomsejtek őssejtekből, betegségmodellezés.....	17
1.2.1.	Szívhypertrophia modellezése őssejt eredetű szívizomsejtekkel.....	19
1.2.2.	G-protein kapcsolt receptorok a kardiovaszkuláris differenciációban.....	20
1.2.2.1.	Frizzled receptor.....	21
1.2.2.2.	Angiotenzin receptorok.....	22
1.2.2.3.	Adrenerg receptorok.....	22
1.2.2.4.	Endothelin receptorok.....	23
1.2.3.	A G-protein kapcsolt receptorok a differenciált kardiovaszkuláris őssejt-származékokban.....	23
1.2.3.1.	Alfa-adrenerg receptorok.....	23
1.2.3.2.	Béta-adrenerg receptorok.....	24
<b>2.</b>	<b>Célkitűzések</b> .....	26
<b>3.</b>	<b>Módszerek</b> .....	27
3.1.	Humán pluripotens őssejttenyészetek.....	27
3.2.	Humán őssejt eredetű szívizomsejtek.....	27
3.3.	Hypertrophiás stimulusk.....	29
3.4.	Immuncytokémia és vitális festések.....	31
3.5.	ADRA1A receptor overexpressziója hiPSC-CM sejtekben.....	32
3.6.	Sejthalálózás.....	32
3.7.	Kvantitatív PCR - G-protein kapcsolt receptorok és másodlagos jelátvitel.....	33
3.8.	Foszfokináz assay.....	33
3.9.	Kinázgátlás.....	34
3.10.	High content mikroszkópia a szívizomsejt hypertrophia vizsgálatában.....	35
3.11.	High content mikroszkópia a sejthalálózás vizsgálatában.....	36
3.12.	Kolóniaképzés hESC-CM sejtekkel.....	38
3.13.	In vivo vizsgálatok.....	38
3.14.	Neonatális szívizomsejtek.....	38
3.15.	Statisztikai analízis.....	38
<b>4.</b>	<b>Eredmények és megbeszélés</b> .....	40
4.1.	Sejthalálózás.....	40
4.1.1.	A patkány neonatális szívizomsejtek és a humán ESC-CM sejthalálózásának összehasonlítása.....	40

4.1.2.	Kardiotoxikus szerek vizsgálata hPSC eredetű szívműsejteken.....	42
4.1.3.	Immunosuppresszív szerek a szívműsejtek halálózásában.....	45
4.2.	Sejtmag transzport.....	46
4.3.	Őssejt eredetű szívműsejtek differenciációja és jellemzése.....	51
4.3.1.	Beteg-specifikus szívműsejtek.....	53
4.4.	A humán szívműsejtek hypertrophiás válaszkészségének vizsgálata in vitro.	56
4.4.1.	Intracelluláris kinázok mediátor szerepe a szívműsejtek hypertrophiájában...	58
4.4.2.	A humán ESC és iPSC eredetű szívműsejtek eltérő hypertrophiás válaszánaK vizsgálata.....	60
4.5.	Szívműsejt proliferáció.....	73
4.6.	In vivo vizsgálatok.....	74
4.7.	Immunosuppressziós szerek pleiotrop hatásai.....	78
5.	<b>Az új tudományos eredmények összefoglalása.....</b>	82
6.	<b>A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége.....</b>	83
7.	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	84
8.	<b>Saját közlemények.....</b>	97
8.1.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	97
8.1.1.	Eredeti közlemények.....	97
8.1.2.	Összefoglaló közlemények.....	97
8.1.3.	Könyvfejezet.....	98
8.2.	A PhD értekezésben nem szereplő további közlemények.....	98
8.2.1.	Eredeti közlemények.....	98
8.2.2.	Összefoglaló közlemények.....	100
8.2.3.	Könyvfejezet.....	101
8.2.4.	Magyar nyelvű közlemények.....	101
8.2.5.	Hozzászólás.....	101
8.3.	Összesített tudánymetriai adatok (lezárva: 2018. szeptember 5.).....	102
9.	<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	103

**Rövidítések jegyzéke**

7TM receptor	7 transzmembrán domén receptor
AC	adenilát-cikláz
ACE	angiotenzin konvertáló enzim
Ang II	angiotenzin II
ANP/ANF	pitvari nátriuretikus peptid/faktor
Apaf1	apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1
AR	adrenerg receptor
AT1-receptor	angiotenzin II 1-es típusú receptor
Bak	Bcl-2 antagonistá fehérje („ <i>Bcl-2 antagonist/killer</i> ”)
Bax	Bcl-2-társult X protein („ <i>Bcl-2-associated X protein</i> ”)
Bcl	B-sejtes krónikus lymphoid leukémia fehérje
BH3	Bcl-2 homológia domén-3
BMP4	csont morfogénikus protein 4
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
cAMP	3',5'- ciklikus adenzin-monofoszfát
CRISPR	halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések
CRM1	exportin 1 („ <i>chromosomal maintenance 1</i> ”)
DCM	dilatatív cardiomyopathia
DMD	Duchenne izomdystrophia
ECM	extracelluláris mátrix
EF	ejekciós frakció
EGFRK	epidermalis növekedési faktor-receptor kináz
EB	embrionális testecske („ <i>embryoid body</i> ”)
ER	endoplazmatikus retikulum
ERK1/2	extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2
ET1	endothelin-1
ET <sub>A</sub>	endothelin receptor A
FADD	Fas-függő domén
Fas	halál receptor („ <i>first apoptosis signal receptor</i> ”)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FZD	Frizzled receptor
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
Gi	G-protein inhibitor α alegység
GPCR	G-proteinhez kapcsolt receptor
Gs	G-protein stimuláns α alegység
GSK3	glikogén szintáz kináz 3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén-peroxid
HCM	hypertrophiás cardiomyopathia
HDAC	hiszton deacetyláz
hESC	humán embrionális őssejt („ <i>human embryonic stem cell</i> ”)
hiPSC	humán indukált pluripotens őssejt
HGP	Hutchinson-Gilford progéria szindróma
hPSC	humán pluripotens őssejt
IP3	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LQT	hosszú QT szindróma
LVEDD	bal kamrai végdiasztolés átmérő
LVEDP	bal kamrai végdiasztolés nyomás
LVESD	bal kamrai végszisztolés átmérő
LVESP	bal kamrai végszisztolés nyomás
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MEK1/2	mitogén-aktivált protein kináz-kináz 1/2
mESC	egér embrionális őssejt
MI	myocardialis infarktusz
miR	mikroRNS, mikro ribonukleinsav
mPTP	mitochondriális permeabilitás átmeneti pórusok

mRNS	hírvivő („ <i>messenger</i> ”) ribonukleinsav
NFAT	aktivált T-sejtek nukleáris faktora („ <i>nuclear factor of activated T cells</i> ”)
NLS	sejtmag lokalizációs szignál
NPC	sejtmag pórus komplex („ <i>nuclear pore complex</i> ”)
PDGF	trombocyta eredetű növekedési faktor
PE	phenylephrine
pF	pikofarad
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PP2A	protein foszfatáz 2A
PSC	pluripotens őssejt
PTX	pertussis toxin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	mintaközép hibája („ <i>standard error of mean</i> ”)
SD	Sprague-Dawley patkánytörzs
SERCA	szarkoplazmatikus retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATP-áz
siRNS	kis interferáló („ <i>short interfering</i> ”) ribonukleinsav
STAT	(„ <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> ”)
T3	trijód-thyronin
TGF-β	transzformáló növekedési faktor β
TLDA	TaqMan alacsony denzitású array („ <i>TaqMan low density array</i> ”)
TNF	tumor nekrozis faktor
UPR	selejt-fehérje-válasz („ <i>unfolded protein response</i> ”)
UPS	ubiquitin-proteaszóma rendszer
VEGF	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
VSMC	vaszkuláris simaizomsejt
WKY	Wistar-Kyoto patkánytörzs
Wnt	Wingless/int gén-kapcsolt
ZFN	cink ujj nukleáz („ <i>zinc finger nuclease</i> ”)
α-AR	α-adrenerg receptor
β-AR	β-adrenerg receptor
Δψ <sub>m</sub>	mitokondriális membránpotenciál

## Ábrák jegyzéke

- 1. ábra: Felnőtt human izolált kamrai szívizomsejtek transzplantációkor explantált szívekből.
- 2. ábra: Apoptózis jelátvitel utak szívizomsejtekben.
- 3. ábra: Az optimalizált (a-e) és jelenlegi (f-j) sejttérapiás stratégiák a sejtek túlélésében és a kardiális regenerációban.
- 4. ábra: A G-protein kapcsolt receptorok funkcionális egységei.
- 5. ábra: Szívizomsejt differenciációs protokollok.
- 6. ábra: High content mikroszkópos analízis a szívizomsejtek toxicitásának in vitro vizsgálatára.
- 7. ábra: High content mikroszkópos analízis a szívizomsejtek hypertrophiájának in vitro vizsgálatára.
- 8. ábra: A sejthalálhoz vezető folyamatok sematikus összefoglalása.
- 9. ábra: Sejthalálzás patkány és humán szívizomsejtekben.
- 10. ábra: A chelerythrine idő- és koncentráció-függő hatása patkány neonatális szívizomsejteken.
- 11. ábra: Reprezentatív high content mikroszkópos felvételek kontroll DMSO-val és doxorubicinnel kezelt hiPSC eredetű szívizomsejtekről.
- 12. ábra: Sejthalálzás profil CDI hiPSC eredetű szívizomsejtekben, doxorubicin (24 óra), lapatinib és docetaxel kezeléseket követően.
- 13. ábra: Az immunuszuppresszánsokkal való előkezelés hatása a hESC-CM sejtek chelerythrine-indukálta apoptózisára, nekrozisára és a sejtmaguk átépülésére.
- 14. ábra: Patkány ischemiás szívelégtelen sejtekben a sejtméret és a sejtmagméret egyaránt növekszik.
- 15. ábra: Phenylephrine növeli a sejtméretet és sejtmagméretet 3 hónapos patkányokból izolált szívizomsejtekben.
- 16. ábra: A nukleáris transzport hipotetikus modellje a myocardialis szövetben és izolált szívizomsejtekben.
- 17. ábra: Kardiális progenitorsejtek differenciációja.
- 18. ábra: Humán ESC-eredetű szívizomsejtek jellemzése tartós kultúrában.
- 19. ábra: Génexpressziós változások hESC-CM sejt kultúrában.
- 20. ábra: Össejt-alapú betegségmodellezés és toxicitási vizsgálatok vázlatos algoritmus.
- 21. ábra: Hypertrophiás cardiomyopathia modellezése hiPSC eredetű szívizomsejteken.
- 22. ábra: Phenylephrine-indukálta hypertrophia hESC-CM sejtekben.
- 23. ábra: Ciklikus nyújtás és angiotenzin II növeli a sejtméretet, a szarkomer elrendeződést és a hypertrophiás gének aktiválódását.
- 24. ábra: Kinázgátlók a phenylephrine-indukálta hypertrophiában.
- 25. ábra: Phenylephrine-indukálta hESC-CM sejtméret változások a p38-MAPK siRNS jelenlétében.
- 26. ábra: p38 MAPK mediálja a ciklikus nyújtás-indukálta hypertrophiás választ.

- 27. ábra: A hESC (H7, HUES7, és SHEF3) és hiPSC (LQT2, LQT2-PAT, CDI, és ReproCell) eredetű szívmusclejtek eltérő hypertrophiás válasza phenylephrinre
- 28. ábra: Kvantitatív RT-PCR az adrenerg receptor altípusok sejt-specifikus eloszlását mutatja
- 29. ábra: ADRA1A génexpresszió csenyesítés hESC és hiPSC kardiális differenciációja alatt.
- 30. ábra: Az ADRA1A csenyesítése hESC és hiPSC szívmusclejt irányú differenciációja során.
- 31. ábra: Fokozott ADRA1B expresszió a hESC és hiPSC differenciációja során.
- 32. ábra: Az ADRA1A overexpressziója hiPSC-CM sejtekben.
- 33. ábra: Foszfokináz proteom és kináz-gátló analízisek a phenylephrine-indukált jelátviteli folyamatokról a hESC-CM és hiPSC-CM sejt-kultúrákban.
- 34. ábra: A kinázgátlók hatásának vizsgálata a szívmusclejtek hypertrophiás válaszában.
- 35. ábra: A STAT3 nukleáris transzlokációja, valamint a hiPSC-CM sejt-méretének változásai interleukin-6 (100 ng/ml) hatására.
- 36. ábra: A STAT3 gátlás hatása a hESC-CM és hiPSC-CM sejtek növekedésére.
- 37. ábra: Nem-adrenerg stimulusok hatása a hiPSC-CM és hESC-EC hypertrophiás válaszkészségére.
- 38. ábra: A humán pluripotens őssejt eredetű szívmusclejtek (hiPSC-CM és hESC-EC) adrenerg stimulusokra adott eltérő hypertrophiás válaszkészségét a sejt-kultúra médium szérum-tartalma nem befolyásolja.
- 39. ábra: Sematikus összefoglaló a pluripotens őssejt eredetű szívmusclejtek (hiPSC-CM és hESC-EC) adrenerg stimulusokra adott eltérő hypertrophiás válaszkészségéről.
- 40. ábra: The Space Merchants.
- 41. ábra: Proliferáló hESC eredetű szívmusclejt populáció.
- 42. ábra: Túlélési arányok hepatomával inokulált patkányokban.
- 43. ábra: A kezelések hatása a jelátviteli folyamatokra hepatoma modellben.
- 44. ábra: Isoprenaline kezelés hatására a patkány neonatális szívmusclejtek csökkent  $\alpha$ - és  $\beta$ -miozin nehézlánc expressziót mutatnak.
- 45. ábra: Immunszuppresszív szerek hatása a hESC eredetű szívmusclejtek számára és proliferatív aktivitására.
- 46. ábra: Az NFAT transzkripciós faktor gátlása módosítja a phenylephrine által indukált hypertrophiás választ és sejt-növekedést hESC-CM sejtekben.
- 47. ábra: Az immunszuppresszáns jelátviteli utak szerepe a hypertrophiás és proliferatív válasz mediálásában hESC-CM sejtekben.

### **Táblázatok jegyzéke**

- 1. táblázat: hiPSC-alapú betegségmodellezés szívhypertrophiában
- 2. táblázat: Humán pluripotens őssejt eredetű szívmusclejtek differenciációja.
- 3. táblázat: Humán pluripotens őssejt eredetű szívmusclejtek hypertrophiás válaszkészségének vizsgálata in vitro assay-kkel.



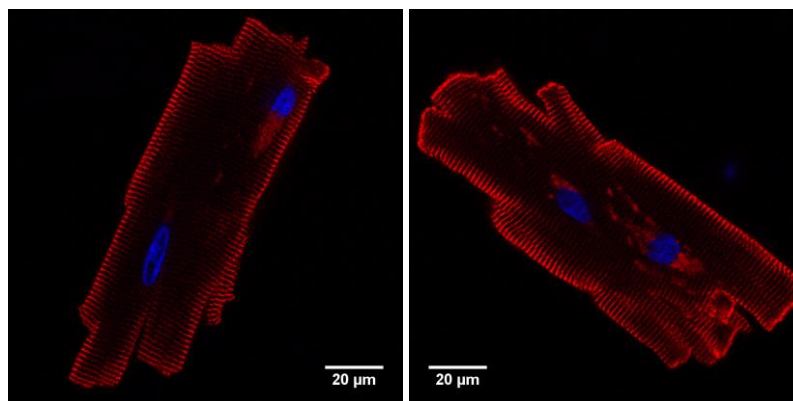
## 1. Tudományterületi háttér

### 1.1. Szívizomsejtek szívelégtelenségben

Az emberi myocardium számos sejtípust tartalmaz, ezek közül a szívizomsejtek a myocardium kontraktilis rendszerét alkotják, számuk a felnőtt szív kamráiban 3 milliárdra tehető, térbeli elrendeződésük a szívszövet 3D struktúrájáért felelős. A sejtek számának csökkenése szívelégtelenséghez, a szív funkciójának romlásához vezet. A sejtszám csökkenése jellemzően az alapbetegséghez, így például myocardialis infarktushoz társulhat vagy másodlagosan, a kiváltó sérüléstől függetlenül, kemoterápiához, a neurohormonális és gyulladásos válaszhoz kapcsolt apoptózis és nekrozis következményeként jelentkezik. A megmaradó életképes szívizomsejtek kontraktilis aktivitása elengedhetetlen ahhoz, hogy a szív perctérfogata ne csökkenjen a szövetkárosodást követően – az alacsonyabb sejtszám, abnormális falfeszülés és szívfali geometria, valamint az extracelluláris mátrix átépülése ellenére sem. A túlélő szívizomsejtek ezt az átmeneti kompenzatórikus szerepüket egy adaptív hypertrophiás állapotba kerülve fejtik ki (Diez és mtsai, 2005; Dorn és mtsai, 2003). Az elégtelen szöveti perfúzióhoz és pangáshoz társuló tartós neurohormonális aktiválódás is hozzájárul a perctérfogat biztosításához. Ez a folyamat, valamint a megnövekedett gyulladásos és elégtelen metabolikus válaszkészség együttesen ugyanakkor a hypertrophiás sejtek csökkent kontraktilitásához vezet szívelégtelenségben (Opie és mtsai, 2006). Az alapbetegség emellett további útvonalakon is gátolhatja a szívizomsejtek funkcióját, így például familiáris dilatatív cardiomyopathia esetében a szarkomer vagy cytoskeleton fehérjék mutációival (Davis és mtsai, 2016). A szívizomsejtek kóros működését szintén számos sejtszintű folyamat kölcsönhatása eredményezi, így az intracelluláris jelátviteli utak, ionáramok, a sejtek közötti kommunikáció, organellum funkció, az oxidatív stressz, a károsodott mitokondriális energetika, a megváltozott sejtmorfológia, az újrainduló foetalis génprogram és a sejthalalozásért felelős jelátvitel közvetlen változásai (Dirkx és mtsai, 2013; Hertelendi és mtsai, 2009; Rajabi és mtsai, 2007). Egyre világosabb, hogy ezek nem egymástól függetlenül értelmezendők, hanem az egymással szoros kölcsönhatásban lévő, különböző kóreltani folyamatok együttesen felelősek a kóros válasz felerősödéséért, a sejtek mechanikus funkciójának és végül életképességének fokozatos romlásáért. A jelátviteli csomópontok és központi szabályozó elemek azonosítása és célzott gátlása ezért klinikailag is fontos, új terápiás lehetőség lehet, és a szívelégtelen sejtek számos tulajdonságát érdemben javíthatja. A kialakult szívelégtelenség közös végpontja, függetlenül a kiváltó etiológiától, egységes sejtszintű és molekuláris jellegzetességekkel bír (Davies és mtsai, 1995). A humán szívelégtelen szívekből nyert és az állatkísérletes modellekből származó izolált szívizomsejtek csökkent kontraktilitást és relaxációt mutatnak. A sejtek ezen csökkent mechanikai működése a magasabb szívfrekvencia, magasabb intracelluláris kalcium koncentráció vagy katekolaminok adása mellett még kifejezettebbé válik. A frekvencia-erőkifejtés összefüggés romlása (Treppe- vagy Bowditch-hatás) ennek megfelelően a szívelégtelenség egyik alapvető jellemzője (Davies és mtsai, 1995).

### 1.1.1. A szívizomsejtek morfológiai változásai szívelégtelenségben

Az egészséges szívizomsejtek megnyúlt, pálca alakú, tipikusan 20-30  $\mu\text{m}$  széles,  $\sim 100 \mu\text{m}$  hosszú és 30  $\mu\text{m}$  átmérőjű sejtek (Severs, 2000). A sejteken végzett kapacitancia vizsgálatok alapján a kapacitásuk nagyjából  $\sim 100 \text{ pF}$ , tehát a térfogatuk  $\sim 30$  pikoliternek felel meg (Terracciano és mtsai, 2003). A szívelégtelen sejtek ehhez képest megnagyobodottak. A pontos morfológiai változások elsősorban az alapbetegségtől függenek: így például a hipertonia vagy aorta billentyű stenosis miatt megnőtt nyomással túlterhelt bal kamrából származó szívizomsejtek hosszúsága és szélessége egyaránt nagyobb az egészségesekhez képest. Mitrális regurgitáció vagy súlyos dilatatív cardiomyopathia miatt volumen-terhelt szívizomsejtek esetében elsősorban a sejtek hosszúsága növekszik (Opie és mtsai, 2006). A transzplantációkor eltávolított végstádiumú szívekből olyan sejtek izolálhatóak, amelyek az ún. dekompenzált fenotípust mutatják (1. ábra). Ezek a sejtek a normálisnál nagyobbak, a kompenzált hypertrophiás szív sejtjeinél azonban kisebbek. A sejtméret és funkció változásainak együttes értékelése alapján levonható az a fontos következtetés, hogy a két tulajdonság független egymástól, tehát a hypertrophiás szívben található, egyébként még normális méretű sejtek funkcionálisan is károsodottak lehetnek (del Monte és mtsai, 1995).



1. ábra: Felnőtt humán izolált kamrai szívizomsejtek transzplantációkor explantált szívekből. Troponin szarkomer strukturális fehérje immuncytokémiái kimutatása (piros), DAPI sejtmagfestés (kék).

### 1.1.2. Hibás génszabályozás

Szívelégtelenségben számos adaptív funkcionális változás figyelhető meg a felnőtt szívizomsejtekben, amelyek a foetalis szív kamrai sejtjeinek fiziológiás működésére emlékeztetnek. Ide sorolhatóak azok a metabolikus változások, amelyek során a zsírsav-alapú anyagcsere helyett a szénhidrátok kerülnek túlsúlyba. Emellett a T-tubulusok és a szarkoplazmatikus retikulum változásai, a megváltozott szarkolemmális ioncsatorna expressziók és a miozin nehézlánc expressziós és izoforma változásai szintén foetalis irányba tolódnak. Ezen folyamatokat kódoló expressziós aktivitások mindegyike a foetalis myocardiumban látott mintázatnak felel meg (Rajabi és mtsai, 2007). A foetalis génprogram aktiválódása a szívelégtelenség jelátviteli folyamatainak egyik jól jellemzett komponense (Dirkx és mtsai, 2013), ez mind a humán szívelégtelen szöveti mintákban, mind a foetalis szívizomsejtekben látható expressziós profilból megállapítható (Razeghi és mtsai, 2001). A

génprogram változásának pontos szabályozó mechanizmusa és a változások időbelisége ugyanakkor nem teljesen tisztázott. A foetalis génprogramnak megfelelő expressziós profil értelmezhető a szívizomsejtek extracelluláris stresszre és elégtelen oxigén ellátására adott válaszaként, vagy a szív adaptív válaszaként, amivel energiaháztartását és kontraktilis funkcióját optimalizálja szívelégtelenségben. Ezt támasztja alá, hogy a foetalis génprogram krónikus ischémiában reaktiválódik a hibernált myocardiumban (Depre és mtsai, 2004). A génprogram aktiválódása előnyös hatásokkal bír a sejtek túlélésére, elsősorban a károsodást követő kezdeti időszakban. A felnőtt és foetalis programok arányának megváltozása ugyanakkor a szívelégtelenség előrehaladtával számos működési zavarhoz vezet. Ez például megfigyelhető a myocardialis excitáció-kontrakció elégtelen csatolásában is, ami a szívizomsejtek romló funkciójához vezet.

A program a foetalis rövid, nem-kódoló RNS-ek újraaktiválására (mikroRNS, miR) is kiterjed: ezek egy jellegzetes, az egészséges kontroll szívektől eltérő expressziós profilt mutatnak szívelégtelenségben (Thum és mtsai, 2007). Ennek a jelentősége abban áll, hogy a nem-kódoló RNS-ek számos intracelluláris folyamatot, így a szívizomsejtek növekedését, mRNS poszttranszkripciót érését, protein szintézist szabályoznak - mindezt nagyszámú gén és jelátviteli folyamat modulálásával érik el. A nem kódoló RNS-ek közvetlenül befolyásolják a szívizomsejtek fenotípusát szívelégtelenségben (Lorenzen és mtsai, 2016; Uchida és mtsai, 2015). A miR-ek közül a legpontosabban jellemzettek a miR1 és a miR133, amelyek expressziója a kardiális hypertrophia mértékével fordítottan korrelál. A magas miR1 szintek a kalcium-calmodulin rendszer modulálásán keresztül gátolják a szívizomsejtek hypertrophiájának kialakulását. A miR133 emellett a myocardium kontraktilitását is szabályozza a  $\beta$ 1 adrenerg receptor jelátviteli úton keresztül (Castaldi és mtsai, 2014). Az újgenerációs szekvenálás eredményei továbbá azt is igazolták, hogy a hosszú (200 bázispárnál hosszabb) nem-kódoló RNS-ek profilja is megváltozik szívelégtelenségben. Különösen érdekes, hogy a hosszú, nem-kódoló RNS-ek expressziója pontosabban jelzi az ischémiás és nem-ischémiás etiológiájú szívelégtelenség közötti különbségeket, mint a miR-ek vagy az mRNS-ek vizsgálata (Yang és mtsai, 2014a).

### **1.1.3. Csökkent életképesség és fokozott sejthalálozás**

A szívizomsejtek számának csökkenése a myocardium károsodásának legfontosabb jellemzője szívelégtelenségben. Ez lehet a kiváltó betegség, így az akut koronária szindróma és infarktust okozó érelzáródás következménye, de indirekt módon, a sejthalálért felelős intracelluláris jelátvitel aktiválódása is eredményezheti (Abdelwahid és mtsai, 2016). Az infarktus és más akut myocardialis károsodások sejtnekrózist okoznak, elsősorban a sejtek intracelluláris ATP szintjében hirtelen bekövetkező csökkenés következtében. A nekrózis során a sejtek megduzzadnak, a sejtmembrán károsodik és az intracelluláris tartalom kiáramlik a sejt közötti térbe, gyulladást és másodlagosan sejt-károsodást eredményezve a környező sejtekben. Ezzel ellentétben, a programozott sejthalál (apoptózis) energiaigényes folyamat, ahol a sejtek protein és kromatin állománya fragmentálódik - ez azonban nem vált ki másodlagos gyulladást választ.

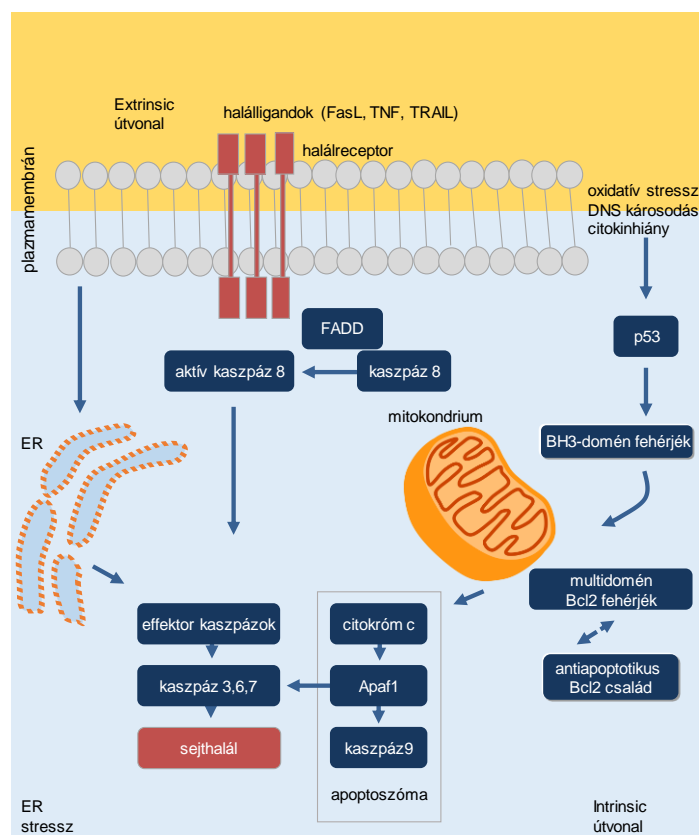
A felnőtt emlős szívizomsejtek jellemzően nem apoptotizálnak: az egészséges szívben az apoptotikus sejtek aránya összesen 1/10000-1/100000 közé tehető (Soonpaa és mtsai, 1998). Ugyanakkor szívelégtelenségben az apoptózis pontosan szabályozott folyamata fokozott aktivitást mutat, a számos pro-apoptotikus jelátviteli út aktiválódásának köszönhetően. Egyidejűleg a kompenzatórikus anti-apoptotikus utak csendesedése figyelhető meg (Haider és mtsai, 2009). A folyamat végeredménye, hogy a kiváltó stimulust követően a szívizomsejtek száma progresszíven csökken és a túlélő sejtekre háruló terhelés nagyobb lesz. Az apoptózist mediáló jelátviteli utak összetettek (Diwan és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2009), a kamrai szívizomsejtekben a folyamatok három nagy részre oszthatóak: az *extrinsic* útvonal, a mitokondriális (vagy *intrinsic*) útvonal és az *intrinsic* csoportba sorolható endoplazmatikus retikulum (ER)-stressz útvonal (Taylor és mtsai, 2008) (2. ábra). A három útvonal egy közös kaszkádot indít be, amely során „öngyilkos” kaszpáz enzimek (cisztein- és szerin-proteázok) aktiválódnak (Communal és mtsai, 2002). Az ehhez szükséges enzimek zimogén formában találhatóak meg a sejtekben, a kaszpázok hasítják ezeket aktív enzimekké. A hatást közvetítő központi elem a kaszpáz3, amely további fehérje szubsztrátokat bont, ennek következménye az irreverzibilis protein hasítás, DNS fragmentálódás, a sejtmag kondenzációja és végül a sejt halála. Az *extrinsic* útvonalat a sejtfelszíni receptorokhoz kötődő citokinek aktiválják, amelyet a szekunder pro-apoptotikus jelátviteli utak aktiválódása követ. Az ezeket közvetítő receptorok elsősorban a TNF membrán receptorcsalád különböző tagjai, így például a Fas receptorok és a TNF receptor-1. A folyamat során, a ligand kapcsolódásakor a Fas receptor oligomerizálódik és ehhez a Fas-függő domén kapcsolódik hozzá (FADD). Ezután a Fas-FADD komplexum megköti a prokaspáz-8-at, és azt hasítva jön létre az aktív kaszpáz-8 enzim. Ezt követően a kaszpáz-8 indítja be a jelátviteli kaszkádot, majd a DNS és számos szabályozó fehérje bontását, ez vezet végül a teljes apoptózishoz. Transzgenikus egérmockokban a kaszpáz-8 szívbeli aktiválása dilatatív cardiomyopathiát eredményez, külső behatások nélkül is (Wencker és mtsai, 2003).

A második, mitokondriális útvonalat a fokozott oxidatív stressz és a mitokondriumban felszaporodó szabadgyökök indítják be. A belső mitokondrium membránban az elektrontranszport-láncból szivárgó elektronok oxigénhez kötődnek, ennek következménye a szuperoxid anionok képződése. A felszaporodott szabadgyökök szintjét a myocardium antioxidáns rendszere ugyan hatékonyan tudja pufferelni, azonban az akut ischémiát követő reperfüzióban és krónikus szívelégtelenségben a szabadgyökök szintje tovább emelkedik. Ez a mitokondriális permeabilitás átmeneti pórusai (mPTP) összekapcsolásával megnöveli a mitokondrium külső membránjának permeabilitását (Halestrap, 2009). Az mPTP megnyílása a mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\psi_m$ ) irreverzibilis csökkenését és így az ATP szintézis megszűnését eredményezi. Ilyenkor a mitokondriumok megduzzadnak, a külső membrán felrepedezik és számos pro-apoptotikus faktor áramlik ki (citokróm-c, apoptózis indukáló faktor [AIF], endonukleáz G) és nagyszámú mitokondriális kaszpáz (Smac/Diablo), amelyek együttesen vezetnek apoptózishoz. A citokróm-c ún. apoptozóma komplexet képez, ami az

Apaf1-gyel együtt aktiválja a kaszpáz-9 utat. A kaszpáz-9 ezt követően a kaszpáz3-at aktiválja, utóbbi közvetlenül bontja a célfehérjéket, így a DNS polimerázt, ezáltal az endonukleáz aktivitást és az apoptózist indukálja. Ennek az útvonalnak számos szabályozó eleme van, ezek közül a legtöbbet vizsgálta a Bcl2 proteincsalád (Kirshenbaum és mtsai, 1997). A Bcl2 proteinek szerkezetük alapján multidomén és „csak BH3” alcsoportokra csoportosíthatók. A pro-apoptotikus multidomén Bcl2 proteinek, a Bax és a Bak egyaránt részt vesznek az mPTP létrehozásában és az apoptózis beindításában. Ezzel párhuzamosan anti-apoptotikus multidomén fehérjék is aktiválódnak: a Bcl2 és Bcl-xl kötik és blokkolják a pro-apoptotikus Bax és Bak fehérjéket. A „csak BH3” proteinek stressz szenzorként funkcionálnak, és a növekedési faktor megvonása vagy oxidatív stressz hatására beinduló sejtválaszt mediálják, így például növelik a mitokondriális permeabilitást. Ezek egyik példája a szívizomsejtekben a Nix fehérje, ami elsősorban apoptózissal társuló cardiomyopathiában aktiválódik (Syed és mtsai, 2004). A Nix fehérjék a Bcl2 utat is aktiválják, a „csak BH3” Bcl-2 és Bcl-xl fehérjék inaktiválásával. A pro- és anti-apoptotikus folyamatok egyensúlya meghatározza a szívizomsejtek sorsát szívelégtelenségben. Kisállat modellben igazolt példaként említhető, hogy a Bax:Bcl-xl protein arány szignifikánsan növekszik, amikor kompenzált hypertrophiából dekompenzált szívelégtelenség fejlődik ki, mindez a cytoplazmatikus citokróm-c és kaszpáz3 aktiválódással szoros összefüggésben (Sharma és mtsai, 2007).

A harmadik apoptotikus útvonalat az ER-károsító megnövekedett stressz indukálja. Az ER a proteinszintézis és protein *foldíng* helye; a szívizomsejtek remodellációja érinti a proteinek szintézisét, féléletidejét és a nem megfelelően formált vagy aggregátumot képző fehérjék eliminálását. A megnövekedett ER stressz, elsősorban a károsodott kalcium egyensúly, csökkent energiafelhasználás, hypoxia, oxidatív stressz vagy károsodott ER protein transzport következményeként, a „selejt-fehérjék” felhalmozódását eredményezi az ER lumenében. Ezt a folyamatot számos szívelégtelenség és dilatatív cardiomyopathia modellben sikerült már leírni (del Monte és mtsai, 2008; Okada és mtsai, 2004). Ez a folyamat több olyan változást eredményez, amelyeket összefoglalóan „selejt-fehérje-válasznak” nevezünk (*Unfolded Protein Response: UPR*), ideértve az ER membrán fehérjéit is. Az UPR „érzékel” a selejt-fehérjék felszaporodását és egy olyan transzkripciósi folyamatot indít be, amely növeli az ER folding kapacitását, csökkenti a hibás folding és egyben a bazális fehérjeszintézis mértékét és így gátolja az ER túlterhelését. Az UPR egy kompenzatórikus folyamat, azonban tartós aktiválódása már az apoptózist is beindítja, a kaszpáz-12 és a CHOP/GADD 153 transzkripciósi faktor aktiválásával. A kaszpáz-12 a kaszpáz3-at és az apoptózist közvetlenül aktiválja, míg a CHOP/GADD 153 különböző pro-apoptotikus géneket, így a „csak BH3” proteinek közül a Puma-t aktiválja. Az UPR gátlása, például kémiai chaperonokkal, terápiásan is hasznosítható lehet (Ozcan és mtsai, 2006). Az ubiquitin-proteaszóma rendszer (UPS) a fehérjebontás egy másik szabályozója. Az ubiquitinált fehérjék szívelégtelenségben felhalmozódnak a szívizomsejtekben (Yan és mtsai,

2008), ez a proteaszóma csökkent aktivitását eredményezi (Predmore és mtsai, 2010); a fehérjék felhalmozódása toxikus lehet a sejtekre.



**2. ábra: Apoptózis jelátviteli utak szívműködő sejtekben.** A sematikus ábra az extrinsic, intrinsic és ER túlterheléshez kapcsolódó jelátviteli utakat mutatja be.

Az autofágia az eddigiek mellett működő szabályozó rendszer, ami az organelumok és fehérjék újrahasznosítását végzi. Az autofágiás folyamat lépései károsodnak szívelégtelenségben (Saito és mtsai, 2016; Zilinyi és mtsai, 2018). Az autofágiát és apoptózist irányító fő proteinek között egyértelműen kimutatható a kapcsolat és az átfedés (Nishida és mtsai, 2008). Így például az Atg5, ami egy fontos autofágia protein, az apoptózist mind a mitokondriális, mind a halálreceptor (*death receptor*) jelátvitelen keresztül aktiválja. Az UPR, UPS, az autofágia és más protein bontási útvonalak így együttesen befolyásolják a fehérjék forgalmát.

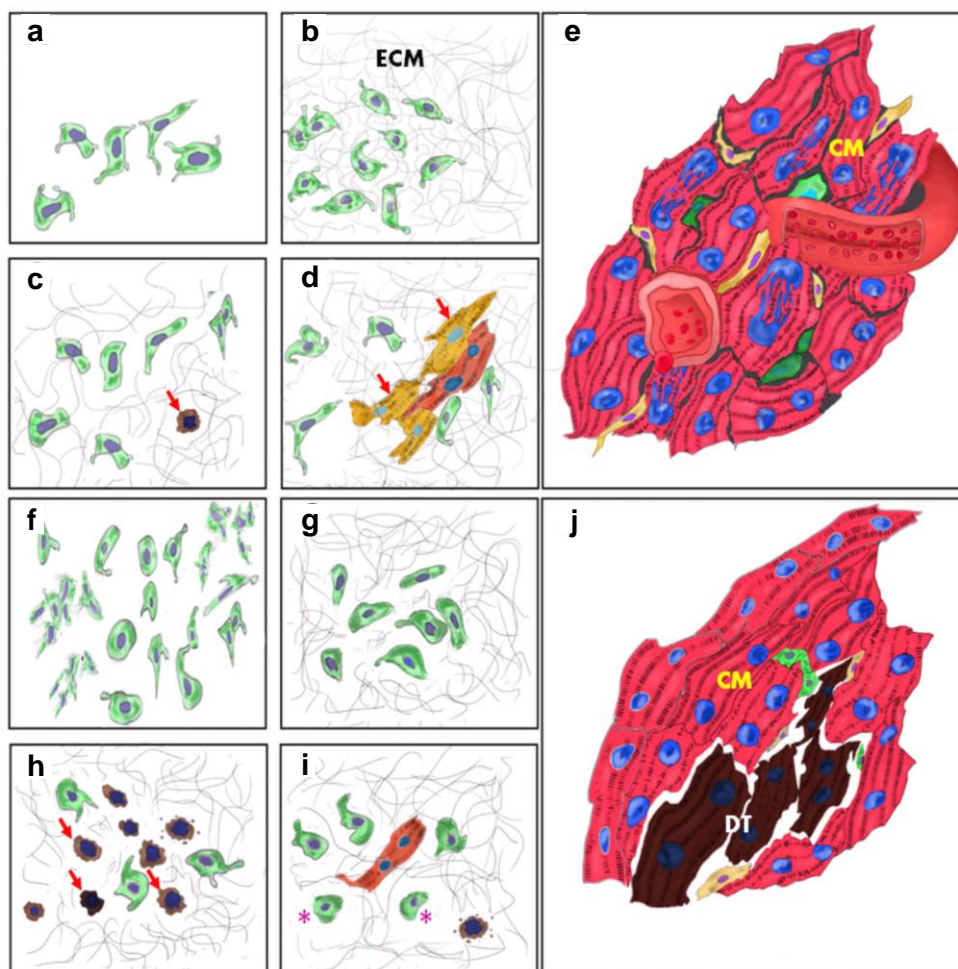
#### 1.1.4. Intracelluláris kináz jelátvitel a szívműködő sejtek apoptózisában

A sejtek túlélését és a sejtciklust szabályozó intracelluláris jelátvitelben MAP (mitogén-aktivált protein) kinázok központi szerepet játszanak. A MAP kinázok fontosak a kardiális patológiás folyamatokban (Molkentin és mtsai, 2001; Rose és mtsai, 2010). A MAP kinázok kardioprotektív hatása nagyban függ a moduláló kinázok foszforiláltságától. Számos adatunk van arról, hogy az aktív MEK/ERK1/2 jelátvitel védi a szívműködő sejteket az apoptózistól (Halmosi és mtsai, 2016; Kovács és mtsai, 2009). A család másik tagja, a JNK1/2 különféle

emlős sejtekben indukál apoptózist, de ezzel ellentétes, anti-apoptotikus szerepét is igazolták már kísérleti körülmények között. A JNK befolyásolja az apoptózis mitokondriális útvonalát, pro-apoptotikus molekulák, így a citokróm-c, AIF felszabadulásán keresztül, illetve az anti-apoptotikus Bcl-2 foszforilációjával (Yamamoto és mtsai, 1999). A JNK gátlás a szívizomsejt kultúra apoptózisát gátolja (Andreka és mtsai, 2001). Az apoptózis mitokondriális útvonala JNK-hiányos fibroblasztokban sem aktív (Tournier és mtsai, 2000). A JNK jelátvitel aktiválásának más esetekben túlélést fokozó hatása van. Így az aktív JNK gátolja a sejthalált ischaemia-reperfúzióban vagy a TNF- $\alpha$  kezelésnek kitett sejtek károsodását (Rohrbach és mtsai, 2015). A MAP kinázok közül a p38 is szerepet játszik a szívizomsejtek apoptózisában in vivo és in vitro egyaránt, valamint módosítja a sejt differenciációt is. A p38 foszforilálja az E47 transzkripciós faktort, fokozza annak az izomfejlődésben szerepet játszó MyoD-vel való interakcióját, a MyoD/E47 komplex fokozza a sejt differenciációt (Xiao és mtsai, 2012). A domináns negatív (a p38-t „upstream” reguláló) MKK6-transzgen egerekben a myocardialis infarktus mérete csökkent (Kaiser és mtsai, 2004). Hasonlóképpen, a p38- $\alpha$  ( $\pm$ ) heterozigóta egerek a vad-típusúakhoz (+/+) képest rezisztensebbek az ischémiára (Otsu és mtsai, 2003). A p38 farmakológiai gátlása szívizomsejt kultúrában egyaránt csökkenti az ischaemia-indukálta apoptózist és a kemoterápiás szerként használt antraciklinek egyike, a doxorubicin toxikus hatását (Mackay és mtsai, 2000; Sharov és mtsai, 2003). Ez a p38 útvonal pro-apoptotikus hatására utal ezekben a modellekben. Ezzel szemben a p38 védőhatása volt igazolható  $\beta$ -adrenerg stimulust követően szívizomsejtekben (Communal és mtsai, 2000).

#### 1.1.5. Sejthalál transzplantált sejtekben

A szívizomsejtek mitotikus osztódása ugyan bizonyított, például myocardialis infarktust követően, a szívszövet mitotikus kapacitása azonban nem elegendő ahhoz, hogy a sejtvesztést megfelelően kompenzálja (Bergmann és mtsai, 2015). A sejtek plaszticitásának növelése megoldás lehet a veszteség ellensúlyozására: ez a mechanizmus emelheti az új szívizomsejtek számát ischémiát követően, fokozhatja a revaszkularizációt a sérült régióban és gátolhatja az infarktushoz társuló pathológiás remodelláció mértékét (Hamano és mtsai, 2002). A sejtek sérült szövetbe történő sikeres transzplantációjához megfelelő hisztokompatibilitás, sejtproliferáció, differenciáció, és migráció szükséges (3. ábra). A transzplantált sejtek csökkentik a myocardium károsodását a szöveti regeneráció által (direkt celluláris hatás), vagy a szív saját endogén regenerációs aktivitását fokozzák. Az őssejtek 99%-a azonban a beadást követően néhány napon belül elpusztul (Geng, 2003). A sejtek jelentős pusztulása több sejttípusnál is előfordul. Kiemelkedően fontos, hogy a sejthalál általános mechanizmusát és a kiváltó stimulusokat jobban megértsük, azért, hogy a sejtek életképességének megtartása sikeres legyen a különböző kardiovaszkuláris pathológiás körülmények között (Laflamme és mtsai, 2007; Robey és mtsai, 2008).



**3. ábra: Az optimalizált (a-e) és jelenlegi (f-j) sejterápiás stratégiák a sejtek túlélésében és a kardiális regenerációban.** Az optimalizált transzplantáció során kisebb sejttség (a) szükséges, a sejtek proliferációja hatékonyabb (b), a sejthalálzás kisebb arányú (c, nyíl), kardiális differenciáció fokozottabb lehet (d, nyílak). A beültetett sejtek kapcsolata az extracelluláris mátrixszal (ECM) és egészséges sejtekkel megtartottabb (CM, e), ez a szöveti regeneráció hatékonyságát növeli. A jelenlegi terápiás eljárásokban az összejtek és származékaik kardiális transzplantációja elégtelen, mivel a nagyszámú bejuttatott sejt (f) proliferációja gátolt (g), többségük ezt követően elpusztul (h, nyílak), részben az elégtelen mátrix-sejt vagy sejt-sejt kapcsolatok miatt (csillagokkal jelölve) (i). Ez végül elégtelen szöveti regenerációt eredményez (DT, *damaged tissue*, károsodott szövet, j) (Abdelwahid és mtsai, 2016 alapján).

### 1.1.6. Megváltozott sejtmag transzport

A szívégtelenséget legtöbbször hypertrophia előzi meg, amely egy olyan adaptív folyamat, amely során a szív fiziológiás kompenzatórikus válaszából pathológiás maladaptív válasz fejlődik ki. Az ilyen komplex változások szabályozása összefügghet azokkal a regulátor jelátviteli faktorokkal, amelyek a sejtmag és a cytoplazma között transzportálódnak. A sejtmag és cytoplazma közötti hírvivő molekulák transzportja fontos eleme a szívmusclek transzkripciós szabályozásának. Szívégtelen sejtekben a sejtmag transzport működése megváltozik, ami a sejtmag pórusok remodellációjával jár együtt. Ennek során a sejtmagból az exportfolyamatok fokozódnak, de mindez a sejtmagba irányuló import csökkenésének terhére történik (Molina-Navarro és mtsai, 2013; Tarazon és mtsai, 2012). Mivel a teljes nukleáris transzport csak korlátozott kapacitású, nem tisztázott, hogy a transzport működésében résztvevő elemek (így a transzport receptorok, póruskomplex - *nuclear pore*



*complex, NPC*) mennyire növelik a sejtmagból a cytoplazmába irányuló forgalmat a megnövekedett transzport-terheléssel összhangban. Ugyanakkor szívhypertrophiában és szívelégtelenségben egyaránt központi szerepe van a sejtmagba transzporttal bejutó, a transzkripció folyamatok szabályozásáért felelős molekuláknak és ezek sejtmagbéli aktiválódásának (ilyenek például a HDAC kinázok és az NFAT). A hypertrophiát mediáló ezen transzkripció faktorok sejtmag irányú transzlokációja alapvetően szükséges a hypertrophiában jellemzően fokozott protein szintézishez. Ez felveti, hogy az exportin-1-függő transzport közvetlen gátlása kivédheti, vagy akár meg is fordíthatja a sejtek remodelációját, így a sejtméret növekedését és a foetalis génprogram újraaktiválódását (Chahine és mtsai, 2015).

## 1.2. Új humán szívizomsejtek őssejtekből, betegségmodellelés

A kísérletes kardiológia és egyben a kardiovaszkuláris sejterápia egy fontos mérföldkővét jelenti, hogy humán embrionális és indukált pluripotens őssejtvonalakból új humán szívizomsejteket tudunk laboratóriumi körülmények között létrehozni. Az őssejtek differenciáltatásához szükséges jelátviteli mechanizmusok ma már részletesen ismertek. A létrehozott szívizomsejtek a legújabb differenciációs metodikák alkalmazása mellett is sokat megőriznek az éretlen tulajdonságaikból (Földes és mtsai, 2008; Kane és mtsai, 2017), felnőtt sejtekkel való összehasonlításukkor ezek a különbségek jelentősek lehetnek. A mára már elterjedten alkalmazott szívizomsejt differenciációs technikák lényege, hogy a korai embriogenezis cardiomyogeneziséért felelős meso- és/vagy endodermális jelátvitelét „utánozzuk” sejt kultúrában.

Humán PSC kardiovaszkuláris származékai jó lehetőséget jelenthetnek a betegségek modellezésére, megfelelő autológ vagy allogén források lehetnek a kardiális transzplantációs terápiáknak. Különösen a szívizomsejtek esetében igaz ez, amelyek esetében a felnőtt sejtek tartósan nehezen tenyészthetőek vagy módosíthatóak *in vitro* sejt kultúrában, így a betegspecifikus humán indukált pluripotens őssejtekből differenciált szívizomsejtek (hiPSC-CM) létrehozása jelentős előrelépést jelent. A differenciációs eljárások hatékonysága és reprodukálhatósága egyaránt javult az elmúlt években, ami lényegesen megkönnyíti az alkalmazhatóságukat. A sejtmodelleket azonban ezzel együtt sem lehet minden kritika nélkül általánosan alkalmazni: az egyes klinikai helyzetekben külön is értékelni kell megbízhatóságukat. E nehézség hátterében a sejtek, elsősorban 2D sejt kultúrákban látott, a felnőtt sejtekhez viszonyított éretlensége áll. Olyan betegségekben, amelyek klinikai körülmények között csak későbbi életkorban jelentkeznek, ez problémát jelenthet, hiszen a felnőtt myocardium élettani jellemzőihez hasonlító tulajdonságokat, így az excitációs-kontrakciós kapcsolást (amely a T-tubulusok jelenlétét igényli), a pozitív kontrakciós erő/frekvencia kapcsolatot (amelyhez érett intracelluláris kalcium forgalom szükséges) és a jelenleginél hatékonyabb energiafelhasználást (ami egy oxidatív metabolizmus-függő folyamat) az eddigi legjobb differenciációs technikákkal sem sikerült megközelíteni. Számos módszertani megoldási lehetőség merült fel azonban, amivel az őssejt eredetű

szívizomsejtek érettségét fokozni lehet, hogy ezáltal a betegség pontosabb modelljét alkalmazhassuk. Ide sorolhatóak a krónikus sejtkultúrák (Ivashchenko és mtsai, 2013), a pajzsmirigyhormon (T3) krónikus alkalmazása a sejtenyésztő médiumban (Ivashchenko és mtsai, 2013; Lee és mtsai, 2010; Ribeiro és mtsai, 2015; Yang és mtsai, 2014b), a sejtkultúra felszínek optimalizálása (Rao és mtsai, 2013; Tallawi és mtsai, 2015), a különféle 3D sejtkultúrák (Schaaf és mtsai, 2011) és tartós elektromos, mechanikai vagy hidrodinamikai stimulálás (Hirt és mtsai, 2014; Lieu és mtsai, 2013). Az *in vitro* érési folyamatok nem teljesen követik az *in vivo* megismert mintázatot, ezért az élettanitól eltérő ingerlés, mint például a magas frekvenciájú stimuláció és kondicionálás képes volt arra, hogy a sejtek érettségét jelentősen növelje (Ronaldson-Bouchard és mtsai, 2018).

Az egyes betegségek őssejtekkel való modellezésénél további nehézséget jelent a megfelelő kontroll sejtenyésztetek kiválasztása. Egyik lehetőség az, hogy a beteg közvetlen egyenesági hozzátartozóiból nyerhetünk szomatikus sejteket a kiindulási kontroll őssejt újraprogramozásához, azonban a genetikai háttér nem teljes azonossága a pontos analízist megnehezíti. A génmódosítási eljárások, például a halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR*), és a cink-ujj nukleázok (*zinc finger nucleases, ZFN*), igen hasznosnak bizonyultak a kontroll, a beteggel közel azonos genetikai háttérű őssejtvonalak létrehozásában. Egy további lehetőség, hogy betegséget kiváltó mutáció kialakítható egy egészséges őssejtvonalban, és így egy, vagy több mutáció jobban kontrollált körülmények között hasonlítható össze. A farmakológiailag is fontos fenotípusok meghatározására ez az eljárás különösen hasznos lehet. Annak eldöntésében, hogy a monogénes kardiovaszkuláris betegségek és farmakológiai modelljeik érzékenysége milyen, a génmodulálás alkalmazása fontos segítséget jelenthet.

Azok a betegségek, amelyek a szívszövet egészét érintik, így például a hegeképződés, fibrózis, szöveti degeneráció/sérülés, standard 2D sejtkultúrában nem pontosan vizsgálhatóak és modellezhetőek. Ennél sokkal pontosabb válaszokat kaphatunk a 3D szöveti rendszer *in vitro* modellezésével. A 3D sejtkultúrák alkalmazása a G-protein kapcsolt receptorok jelátvitelénél és a társult gyógyszerhatások pontosabb meghatározásánál különösen fontos. A megbetegedések a hiPSC-CM sejteken jellemzően korai formában fejeződhetnek ki, ide sorolva a csökkent kontraktilitást, elektrofiziológiai eltéréseket és arrythmiát, a késői formához pedig a normálistól eltérő struktúrát, hypertrophiát és sejthalálózásra való nagyobb hajlamot lehet sorolni. Az akut formában a felnőtt sejtekkel összehasonlítva számos hasonlóság figyelhető meg a hPSC sejteken, ugyanakkor az utóbbiak és ezekre épülő modellrendszerek nagy előnye, hogy sejtkultúrában tartva csak a hPSC-szívizomsejtekre jellemző a hosszútávú életképesség, a felnőtt sejtekre nem (hPSC>1 év, felnőtt sejtek ~2 nap).

betegség	sejttípus	mutáció	kardiális fenotípus	hivatkozás
LEOPARD szindróma	hiPSC	Protein tirozin foszfatáz, non-receptor típus 11 gén (PTPN11)	Kardiális hypertrophia, EKG eltérések, pulmonális billentyű stenosis	(Carvajal-Vergara és mtsai, 2010)
Hypertrophiás cardiomyopathia (HCM)	hiPSC	$\beta$ -miozin nehézlánc gén missense mutációja (18.exon); miozin kötő protein C	Nem-ischemiás cardiomyopathia, szívizomsejt megnagyobbodás	(Dambrot és mtsai, 2014; Lan és mtsai, 2013)
Dilatatív cardiomyopathia (DCM)	hiPSC	R173W pontmutáció a troponin T2 gén 12. exonon	Nem-ischemiás cardiomyopathia, heterogén szarkomer elrendeződés	(Karakikes és mtsai, 2015; Sun és mtsai, 2012; Wu és mtsai, 2015a)
Barth-szindróma	hiPSC	tafazzin gén mutációja	Cardiomyopathia, cardiolipin abnormalitás	(Wang és mtsai, 2014)
Duchenne-féle izomdystrophia (DMD)	hiPSC	dystrophin gén mutációja	Izomdegeneráció; szarkomer elrendeződés zavara	(Lin és mtsai, 2015)
Down-szindróma	hESC	21-es kromoszóma triszómia	Hypertrophiás cardiomyopathia gének megnövekedett expressziója	(Bosman és mtsai, 2015)

1. táblázat: hiPSC-alapú betegséggmodellezés szívhypertrophiában

### 1.2.1. Szívhypertrophia modellezése összejt eredetű szívizomsejtekkel

A kardiális hypertrophia egyike azon klinikailag fontos pathológiás folyamatoknak, amelyekben a G-protein kapcsolt fehérjék szerepet játszanak. A hypertrophia egy olyan adaptív válasz, amelyet elsősorban a szívizomsejtek megnagyobbodása jellemez. A fiziológiás hypertrophia, amely például terhességben vagy atlétáknál fejlődik ki, nem káros, normális vagy fokozott kardiális funkcióval jár. Ezzel ellentétes a pathológiás hypertrophia, amely a szív fokozott nyomásterhelése (hypertonia, myocardialis infarktus vagy veleszületett szívrendellenességek) következtében jön létre. Mindkét típus modellezésére alkalmasnak tűntek a hPSC eredetű szívizomsejtek.

A keresett, klinikailag ismert fenotípus nem mindig van jelen az összejt-alapú in vitro modellben, erre példa a kardiális hypertrophia (Földes és mtsai, 2014a). Több hiPSC-CM

modellben vizsgálták a hypertrophia genetikailag meghatározott formáit, így LEOPARD-szindrómában és hypertrophiás cardiomyopathiában (HCM). A HCM betegekben nyert, újraprogramozott és differenciált hiPSC-CM sejtek bazális sejtmérete nagyobb, mint a kontroll sejtek mérete (Tanaka és mtsai, 2014; Wu és mtsai, 2015a). A  $\beta$ -adrenerg stimulus a sejtek hypertrophiáját fokozza a HCM hiPSC modellben (Wu és mtsai, 2015a). A LEOPARD modellben a sejtek megnövekedett mérete mellett az NFAT transzkripció faktor nukleáris transzlokációja is fokozott (Carvajal-Vergara és mtsai, 2010). Az azonban kérdéses, hogy a HCM betegekben származtatott hiPSC és az abból differenciált szívizomsejtek mennyiben alkalmasak a genetikailag determinált formákon kívül az exogén, így farmakológiai hypertrophiás stimulusok in vitro vizsgálatára.

A hypertrophia mellett, a kérdéses betegségmodellek további információval szolgálnak a G-protein kapcsolt fehérjéket is érintő patológiás folyamatokról (1. táblázat). A dilatatív cardiomyopathiában szenvedő betegekben létrehozott hiPSC-CM fokozott érzékenységet mutat az extracelluláris stresszre. A  $\beta$ -adrenerg rendszer deszenzitizációja kimutatható volt ezeken a DCM hiPSC-CM sejteken, mind a bazális mérések során, mind az akut noradrenalin kezelés hatására. Ez a megfigyelés ellentétes a  $\beta$ -adrenerg rendszer deszenzitizációjára vonatkozó jelenlegi elképzelésünkkel (változatlan koncentrációjú agonista adása mellett a hatás idővel lecseng), amely szerint ez a folyamat a szívelégtelenségben fenálló tartós szimpatikus aktivitás következménye lenne (Harding és mtsai, 1994). A troponin mutációja az egyik lehetséges mechanikai magyarázat a  $\beta$ -adrenerg receptoron látott folyamatra, másik felmerülő érdekes lehetőség a receptor öröklött variáns szerepét helyezi a középpontba ezekben a betegekben (Sun és mtsai, 2012). Emellett a tartós  $\beta$ -adrenerg stimulus a szarkomer struktúra dezorganizációját és következményesen csökkent inotrop és kronotrop válaszhoz vezet. A HCM betegből generált hiPSC-CM sejtekben a  $\beta$ -adrenerg stimulus a sejtek abnormalis kalcium forgalmát és arrythmiáját eredményezi (Lan és mtsai, 2013). Hosszú QT szindrómában (LQTS2 és LQTS1) a hiPSC-CM sejteknél hasonlóan arrhythmogén választ kapunk a  $\beta$ -adrenerg stimulusra, amelyet  $\beta$ -blokkolók adásával kivédhetünk (Matsa és mtsai, 2012; Tseng és mtsai, 2006). Ez szoros összefüggést mutat azzal a klinikai helyzettel, amikor a  $\beta$ -blokkolók rutinszerű adásával kezeljük a hasonló állapotot. A sejtmodellek jelentős része betegekben generált hiPSC sejtek alkalmazásán alapul; ugyanakkor a 21 triszómia (Down kór) modellt Bosman és munkatársai hESC sejtek és azokból differenciált szívizomsejtek alkalmazásával állították fel (Bosman és mtsai, 2015). A triszómiás sejtek megnövekedett  $\beta$ -adrenerg válaszkészséget mutattak izoprenalin alkalmazásakor az euploid sejtekhez képest.

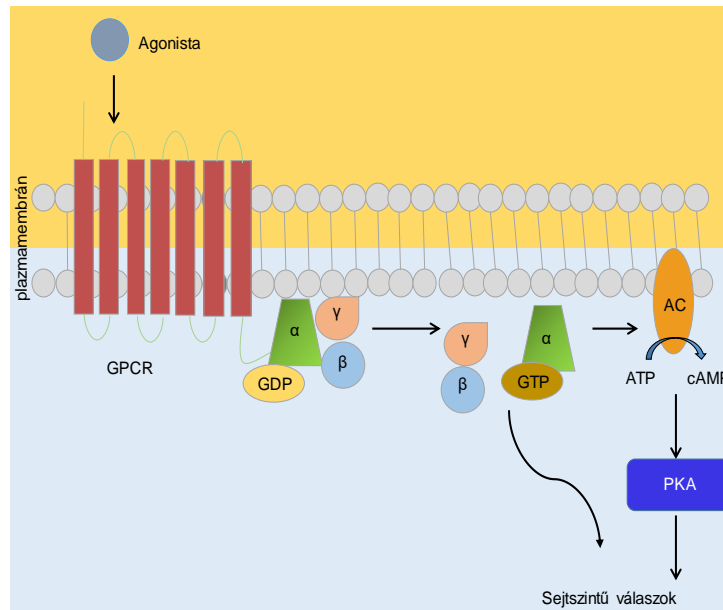
### 1.2.2. G-protein kapcsolt receptorok a kardiovaszkuláris differenciációban

A G-protein kapcsolt receptorok a sejtmembránban található fehérjék (4. ábra), amelyek egyaránt központi szerepet játszanak a korai és késői mesoderma kialakulásában, az embrionális fejlődés és a sejt differenciáció során. Az elmúlt években a humán kardiovaszkuláris sejtek rutinszerű differenciáltatása lehetővé tette, hogy nagy mennyiségben

hozzunk létre pluripotens őssejt-származékokat. Nagy előnyt jelent az alkalmazott differenciációs eljárásoknál, hogy a kiindulásként szolgáló pluripotens őssejtek korlátlan osztódásra és megújulásra képesek.

**1.2.2.1. Frizzled receptor.** A Wnt jelátvitel az embrionális szívfejlődés több szakaszában is központi szerepet játszik, ide tartozik az őssejt-származékok myocardialis elköteleződése, a kardiális morfogenezis és a szívbillentyűk kialakulásának koordinálása (Korkaya és mtsai, 2009). A foetalis növekedés során a myocardium kompakt része gyorsabban proliferál, mint a szívüreg felőli trabecularis szöveti részek (Jeter, Jr. és mtsai, 1971; Luxan és mtsai, 2013). A foetalis szívizomsejtek proliferációja ebben a régióban a kamrai myocardium, trabeculák, és kamrai üregek megfelelő kialakulásához elengedhetetlen.

A szívizomsejtek képzésének utolsó lépése jellemzően a differenciáció első hetének végére tehető a legtöbb differenciációs protokoll alkalmazásakor, ez a folyamat a Wnt/ $\beta$ -catenin jelátvitel gátlását igényli (Gessert és mtsai, 2010). A Wnt jelátvitel többfázisú aktivitást mutat a humán szívizomsejtek kialakulásában: egyfelől a jelátvitel a differenciáció korai fázisában aktiválódik, másfelől a késői szakaszban gátlódik (Lian és mtsai, 2012). Az elmúlt évek ehhez kapcsolódó megfigyelése, hogy a kamrai szívizomsejtek regionális expanzióját is a Wnt/ $\beta$ -catenin jelátviteli út koordinálja, ez a folyamat a születésig aktív marad. Egérmodellben igazolódott, hogy a foetalis Wnt/ $\beta$ -catenin jelátvitel myocardialis infarktuszban és más ischémiás szívszöveti károsodás során újraaktiválódik (Buikema és mtsai, 2013a; Buikema és mtsai, 2013b). Ez arra utal, hogy a felnőtt szívben a Wnt/ $\beta$ -catenin jelátvitel az endogén szöveti regenerációban játszhat szerepet, de szerepük nem teljesen tisztázott (Oerlemans és mtsai, 2010; Oka és mtsai, 2007). Azt gondoljuk, hogy a nem-kanonikus Wnt jelátvitel elsődleges szerepe a kardiális specifikációban és a kardiális progenitorsejtek ezt követő expanziójában van (Gao és mtsai, 2014). Ennek megfelelően a legtöbb szívizomsejt differenciációs protokoll alkalmaz Wnt és/vagy GSK3 $\beta$  modulátorokat. Az őssejt-alapú szívizomsejt differenciáció három szakasza a mesodermális indukció, a kardiális progenitorok kialakulása és a szívizomsejtek kialakulása és érése. Ebből az első szakasz beindításáért a TGF $\beta$  jelátvitel felelős elsősorban (Watabe és mtsai, 2009; Xu és mtsai, 2002). Laboratóriumi körülmények között ezt BMP4 és Activin A növekedési faktorok együttes adásával lehet kiváltani. A TGF $\beta$  indirekt aktiválása in vitro kis molekulákkal is elérhető, ilyenek a GSK3 $\beta$  inhibitorok (CHIR99021 vagy BIO), amelyek az endogén BMP2/4 szinteket növelik (Lian és mtsai, 2012; Minami és mtsai, 2012). A kardiális progenitorok indukciójához a TGF $\beta$  útvonal inaktiválódása szükséges. Ezt kétféleképpen lehet elérni: az aktivátorok eltávolításával és további növekedési faktorok (FGF, VEGF) egyidejű hozzáadásával, amelyek többek között az ERK jelátviteli utat indítják be, vagy Wnt inhibitor kismolekulák adásával (KY02111, XAV939, DKK1, IWP-2 és IWR-1) (Chen és mtsai, 2006). Ennek eredménye a kardiális progenitorok kialakulása a mesodermális vonal sejtjeiből és egyidejűleg más sejtvonalak (simaizom-, endothelsejtek) kifejlődésének gátlása (Woll és mtsai, 2008; Yang és mtsai, 2008).



**4. ábra: A G-protein kapcsolt receptorok funkcionális egységei.** Az egyes G-protein kapcsolt receptorok peptidláncában 7 transzmembrán régió található, amelyek számos hormon és más ligandok hatását közvetítik a szívizomsejtekbe. A jelátvitel a heterotrimer (három különböző alegységből álló) G-fehérjék közreműködésével történik. Egyik (α) alegységükön kötőhely van guanozin-di- vagy trifoszfát számára; GDP-kötött állapotban a fehérje inaktív. A jelátvitel során a ligand által aktivált receptor készíti a G-fehérje α alegységét, hogy GDP helyett GTP-t kössön meg. GTP-kötött állapotban a G-fehérje aktiválódik, disszociál α és βγ alegységekre, amelyek mindegyike hatni kezd valamilyen effektor fehérjére. Az α alegység egyik tipikus effektora az adenilát-cikláz; a βγ alegység jellemzően ioncsatornákat és foszfolipázokat aktivál. A Gα-fehérje azonban GTP-áz aktivitással is rendelkezik, ezért rövid idő alatt elbontja a rajta levő GTP-t, ezáltal újra inaktív állapotba kerül és így a három alegység ismét összeáll. A G-fehérje tehát kapcsolóként működik: az aktivált receptor bekapcsolja, saját enzimaktivitása viszont egy idő múlva automatikusan kikapcsolja, és így a jelátviteli lánc megszakad. A sejtekben a G-fehérjék sokféle változata fordul elő, és ezek más és más effektorokat aktiválnak. Közülük egyik leggyakoribb az adenilát-cikláz, egy plazmamembránhoz kötött enzim, amely ATP-ből ciklikus adenosin-monofoszfátot (cAMP) szintetizál. A cAMP hatására egy kináz (protein kináz A) aktiválódik, amely további enzimeket foszforilál, és ezen keresztül szabályozza aktivitásukat. (Pálfia és mtsai, 2013)

### 1.2.2.2. Angiotenzin receptorok

Az angiotenzin receptorok szintén a G-protein kapcsolt receptorok közé sorolhatóak, két altípusuk ( $AT_1$  és  $AT_2$ ) hasonló affinitással köti az angiotenzin II-t (Ang II) (de Gasparo és mtsai, 2000). Az aktivált  $AT_1$   $G_{q/11}$  és  $G_{i/o}$  proteinekhez köt, amely a foszfolipáz C-t aktiválja, melyen keresztül növeli az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációt. Az  $AT_2$  hatását a  $G_{12/3}$  heterotrimer G-protein komplexumhoz kötve fejt ki (Higuchi és mtsai, 2007). Mindkét receptor hemodinamikai hatásai mára jól ismertek: az  $AT_1$  a kontraktilis válasz modulálásáért felelős, míg az  $AT_2$  a relaxációt szabályozza (Batenburg és mtsai, 2004; Uri és mtsai, 2014). Az eddigi in vitro vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy az angiotenzin II az  $AT_1$  receptoron keresztül az egér ESC-CM differenciálódásában játszik szerepet (Wu és mtsai, 2013). A receptorok humán kardiovaszkuláris sejtek differenciálódásában és összejtől képzett szívizomsejtek működésében betöltött szerepe azonban nem ismert eddig.

### 1.2.2.3. Adrenerg receptorok

Az adrenerg receptorok ( $\alpha$ -AR és  $\beta$ -AR) közül a  $\beta$ -AR szerepe szintén igazolódott szívizomsejtek differenciálódásában (Liggett, 2001). A  $\beta_1$ -AR a stimuláló G-proteinekhez ( $G_s$ ) kötődik. Az aktiválódás során ezek az adenilát ciklázal (AC) lépnek kapcsolatba, ami a

cAMP szinteket növeli a sejtekben. A  $\beta_2$ -AR és  $\beta_3$ -AR az inhibitoros G-proteinhez is kötődik ( $G_i$ ) (Gauthier és mtsai, 1996; Gong és mtsai, 2002). A  $\beta_2$ -AR /  $G_i$  csökkenti az AC aktiválódását és így a cAMP termelését, valamint fokozza a kapcsolt kardiális fehérjék (troponin I, miozin-nehézlánc-kötő fehérje C, L-típusú kalcium csatorna) foszforilációját. A két folyamat közös hatása, hogy a szívizomsejtek kontraktilitása csökken (Xiao és mtsai, 1995). A  $\beta$ -AR agonisták használata az egér ESC kardiális differenciációját, az ERK és p38 másodlagos hírvivőkön keresztül is módosítja. Mind a  $\beta_1$ -AR, mind a  $\beta_2$ -AR mRNS és protein jól mérhető a differenciálódó őssejtekben. A differenciáció első szakaszában, a 7. napig a  $\beta_1$ -AR expressziója alacsonyabb, mint a  $\beta_2$ -AR szintek. Ezt követően a  $\beta_1$  szintek fokozatosan növekednek, és a 14. napon érik el a maximális expressziót, ami a 3. hét végéig fennmarad. A  $\beta_2$ -AR, ezzel szemben magas expressziós aktivitást a differenciálatlan sejtekben mutat, és a differenciáció alatt érdemi változás a szintekben nem mutatható ki. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a  $\beta_2$ -AR lehet a domináns forma a fejlődés korai szakában, míg a  $\beta_1$ -AR a késői szakaszban tölt be fontosabb szerepet (Yan és mtsai, 2011).

#### 1.2.2.4. Endothelin receptorok

Az endothelin receptorok, elsősorban az endothelin-A ( $ET_A$ ) receptor, a kardiális hypertrophia és szívszöveti átépülés egyik fontos jelátviteli mediátora.  $ET_A$  a kardiovaszkuláris rendszerben kifejeződik és számos élettani folyamatot mediál, így többek között a vazokonstriktiót, tachycardiát, pozitív inotropiát és a hypertrophiát (Bupha-Intr és mtsai, 2012; Concas és mtsai, 1989; Salazar és mtsai, 2007). Az endothelin-1 közvetlen hatásához sorolható az arrhythmogenitás is (Gellér és mtsai, 1998). Az endothelin receptorok kardiális expressziója megnő a humán krónikus szívelégtelenségben (Asano és mtsai, 2002; Salazar és mtsai, 2007); a pontos intracelluláris jelátviteli folyamat nem tisztázott.

### 1.2.3. A G-protein kapcsolt receptorok a differenciált kardiovaszkuláris őssejt-származékokban

#### 1.2.3.1. Alfa-adrenerg receptorok

Különösen nagy figyelmet fordítottunk az  $\alpha$ -adrenerg receptorok szerepének pontosabb megértésére. Az  $\alpha$ -receptorok ( $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1d}$ ) a kardiális rendszer sejtjeit a  $G_{\alpha_q}$  útvonalon keresztül befolyásolják. Az aktivált receptor /  $G_{\alpha_q}$  a foszfolipáz C (PLC)-t aktiválja, amely a myo-inozitol-1,4,5-triszfoszfát szintet növeli a sejtekben, következményesen pedig az endoplazmatikus retikulum raktáraiból szabadít fel kalciumot (Exton, 1985; Salazar és mtsai, 2007). A szervezetben a receptorok elsősorban a vérnyomást, inotropiát és hypertrophiát szabályozzák: többek között az egyes  $\alpha$ -receptor altípusokkal és  $\beta$ -receptorokkal is együttműködve (Salazar és mtsai, 2007). Az  $\alpha_{1a}$ -AR overexpresszálása fokozza a kardiális kontraktilitást, de a hypertrophiát nem (Lin és mtsai, 2001). Az  $\alpha_{1b}$ -AR overexpresszálása csökkent bal kamrai kontraktilis választ eredményez izoprenalin adását követő  $\beta$ -AR aktiválódásban, feltehetőleg a  $G_i$  kapcsolódása eredményeképpen (Akhter és mtsai, 1997).

Az  $\alpha_{1b}$ -receptor hiánya  $\alpha_1$ -AR agonista phenylephrine-re adott csökkent vérnyomás választ eredményez (Cavalli és mtsai, 1997). Az  $\alpha_2$ -AR  $G_i$  kapcsolt receptor típus, amely a  $G_s$  jelátvitelt gátolja úgy, hogy gátolja az AC és a cAMP termelődését, valamint az ehhez társuló jelátvitelt (Salazar és mtsai, 2007). A kardiális  $\alpha_2$ -AR receptorok elsősorban preszinaptikusak és egyben gátolják a preszinaptikus noradrenalin felszabadulást; elsődleges feladatuk a  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR és  $\alpha_1$ -AR szimpatikus aktiválódásának gátlása adrenerg stimulus mellett. Klinikai jelentőségük is igazolható volt: olyan betegeknél, akiknél egy polimorfizmus következtében az  $\alpha_2$ -AR funkciója károsodott, a szívelégtelenség incidenciája magasabb volt a kontroll csoporthoz képest (Small és mtsai, 2002). Az  $\alpha$ -adrenerg agonisták inotrop hatásában a  $Ca^{2+}$ -mobilizáció jelentősége kevésbé lényeges, mint a  $\beta$ -adrenerg agonisták esetében. Itt döntően a  $Ca^{2+}$ -érzékenyítés útján nő a kontrakciós erő.

### 1.2.3.2. Béta-adrenerg receptorok

A béta receptoroknak három altípusa mutatható ki a kardiovaszkuláris rendszerben;  $\beta_1$ -AR az egészséges emberi szívben levő receptorok 75-80%-át teszi ki (Rockman és mtsai, 2002);  $\beta_2$ -AR és  $\beta_3$ -AR a fennmaradó százalékokon osztozik. A  $\beta_1$ -AR elsősorban az inotrop és kronotrop válaszokat mediálja a szívben. Aktiválódását követően a stimuláns  $G_s$  proteinekkel lép kölcsönhatásba, amelyet fokozott cAMP termelődés követ. A cAMP a protein kináz A megnövekedett kötődését eredményezi számos szívizomsejt fehérjéhez (troponin I, feszültség-függő L-típusú csatorna, kardiális ryanodin receptor), amelyek együttesen a kardiális kontraktilitásért felelősek (Rockman és mtsai, 2002; Xiang és mtsai, 2003). A  $\beta_1$ -AR kardiovaszkuláris rendszerben betöltött központi szerepét a  $\beta_1$ -AR knockout egerek vizsgálata tisztázta. A receptor hiánya sok esetben embrionális halálozáshoz vezet, a túlélő állatokban pedig csökkent szívfrekvencia, terhelésre/agonistákra adott csökkent inotrop válasz igazolható (Rohrer és mtsai, 1996). Másfelől, a  $\beta_1$ -AR transzgén állatokban jelentős szívhypertrophia és kezdetben fokozott inotrop válasz volt, amelyet később szívelégtelenség váltott fel. A kontraktilitás szabályozásában és a  $G_s$ -protein aktiválásában a  $\beta_2$ -AR és a  $\beta_1$ -AR hasonlóságot mutat; ugyanígy az AC jelátvitel és az L-típusú kalcium csatornák aktiválása is megegyezik (Salazar és mtsai, 2007). Az elsődleges különbség azonban az, hogy a  $\beta_2$ -AR emellett  $G_i$  proteinhez is kapcsolódni tud (Xiang és mtsai, 2003). A  $\beta_2$ -AR receptort hatványosra overexpresszáló egerekben a bazális kardiális funkció javult, anélkül hogy az állatok egyéves halálozási aránya változott volna. Tovább emelve a receptor expresszióját százszorosra, az állatokban fibrotikus cardiomyopathia és szívelégtelenség fejlődött ki, arányosan az expresszió mértékével (Liggett, 2001). A  $\beta_2$ -AR génkiütött egerek normális fenotípust mutattak nyugalomban, azonban stresszre (fizikai terhelés, adrenalin), összevetve a kontroll állatokkal, fokozottabb hypertoniás választ adtak (Chruscinski és mtsai, 1999). Ez arra utal, hogy a gátló jellegű G-protein kapcsolt receptor és jelátvitel fontos szerepet játszik az adrenerg stimulációban (Salazar és mtsai, 2007). A receptorcsalád harmadik tagja, a  $\beta_3$ -AR expressziója a szívből szintén kimutatható, a kardiovaszkuláris szabályozó szerepe azonban kevésbé körülhatárolt. A humán  $\beta_3$ -receptort overexpresszáló egerek megváltozott inotrop válaszkészsége eddig kérdéses maradt. A  $\beta_3$ -AR humán szívelégtelenségben



fokozott expressziót mutat (Bajpai és mtsai, 2012), ugyanakkor az emberi szívben magasan expresszált  $\beta_3$ -AR receptorhoz negatív inotropia nem társul (Gauthier és mtsai, 1996; Kohout és mtsai, 2001). Pluripotens modellekben, a humán iPSC-CM sejteken végzett kísérletek azt mutatják, hogy a  $\beta$ -AR válaszkészség hESC és hiPSC eredetű szívmuscle sejteken jól kimutatható (Harada és mtsai, 1999; Paradis és mtsai, 2000). Emellett mind a  $\beta_1$ -AR és mind a  $\beta_2$ -AR kimutathatók a sejtekből (Suzuki és mtsai, 1993).

## 2. Célkitűzések

1. A humán pluripotens őssejt eredetű szívműködő sejtek hypertrophiás válaszáinak vizsgálata és felnőtt sejtekkel való összevetése
2. Az adrenerg jelátvitel jellemzése és szabályozása humán pluripotens őssejt eredetű szívműködő sejtekben
3. Az immunosuppresszív szerek kardiovaszkuláris hatásának in vitro jellemzése
4. A sejtmag transzport szerepe a szívműködő sejtek hypertrophiájában
5. A hypertrophia jelátvitel vizsgálata tumor-indukálta szívelégtelenségben
6. Automatizált toxicitási vizsgálatok humán szívműködő sejtekkel

### 3. Módszerek

Az alkalmazott módszereket rövidítve ismertetjük, a részletes technikai leírások a megfelelő közleményekben találhatóak meg.

#### 3.1. Humán pluripotens őssejttenyészetek

A legtöbb kísérletet H7 hESC-sejtvonalon (*WiCell Research Institute Bank, Madison, USA*) és a ReproCell-től vásárolt hiPSC-sejtvonalon vagy a *WiCell*-től vásárolt IMR 90-4 sejtvonalon végeztük. A humán PSC-eket differenciálatlan állapotban, dajkasejtektől mentes körülmények között, Matrigellel (*BD Biosciences, San Jose, USA*) bevont, hatlyukú lemezeken tartottuk, mTeSR1 médiumban (*StemCell Technologies, Vancouver, Kanada*). Az őssejttenyészeteket naponta komplett médiumcserével tápláltuk, és 37°C, 5% CO<sub>2</sub> és 21% O<sub>2</sub> mellett tenyésztettük. A sejttényszeteket naponta ellenőriztük, 4-10 naponta mechanikai vagy enzimatikus passzálást végeztünk mechanikai vagy enzimes/kémiai leválasztással, diszpázzal vagy Versene-nel (*StemCell Technologies*). A kromoszomális stabilitást és a pluripotenciát jelző markerek génexpresszióját a korábban (Merkely és mtsai, 2015) leírt módon vizsgáltuk. A ReproCell hiPSC-sejtvonalat kiinduló sejttypusként szívizomsejtek alkalmazásával, lentivírusos visszaprogramozással (OCT4, KLF4, SOX2, cMyc) állították elő. A sejteket ReproFF közegben tartottuk. A sejtek szélesztése előtt a lemezeket 1:30 hígított Matrigel-oldattal (Becton Dickinson-BD, UK) fedtük knockout DMEM közegben (Gibco, UK) és legalább 30 percig inkubáltuk 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett. A sejtpasszálás protokollja magában foglalt kalcium- és magnézium-mentes foszfátpuffer sóoldattal (PBS w/o Ca-Mg) (Gibco, UK) való mosást a sejtek leválasztása előtt, amit lyukanként 1 ml Versene-oldattal (0.048 mM, 0.2 gr EDTA) (Gibco, UK) végeztünk, ezután 5 percet inkubáltunk 37°C-on. Ezután a sejteket friss mTeSR1 közegben szuszpendáltuk, újra szélesztettük a Matrigellel bevont lemezekre és végül 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett inkubáltuk a kívánt konfluencia eléréséig. A tenyészeteket naponta ellenőriztük mikroszkóp alatt, hogy növekedésüket monitorozzuk és, hogy a fertőzés, a sejthalál vagy a spontán differenciálódás bármely jelét felfedezzük.

#### 3.2. Humán őssejt eredetű szívizomsejtek

A kísérleteinknél alkalmazott szívizomsejt differenciációs protokollokat az 5. ábra foglalja össze. Az in vitro kardiális differenciálódásnak három alkalmazási iránya lehet: kétdimenziós monolayer, háromdimenziós embrionális testecske, és a kettő eljárást egyesítő microcarrier-alapú, háromdimenziós sejt kultúrák. A technikák hatékonysága több tényezőtől függ: *a.* az alkalmazott biológiailag aktív molekulák (növekedési faktorok, kismolekulájú gátlószerek), *b.* az alkalmazott komplex molekuláris szignálok időbeli aktiválódása/inaktiválódása a differenciáció során (Chen és mtsai, 2014). A komplex jelátvitel megfelelő időzítésű befolyásolása javítja a differenciálódás hatékonyságát és elősegítheti a szöveti regenerációt is. Az elmúlt évtizedben az első protokollokat (amelyek az embrionális testecskek létrehozására, majd a szélesztett sejtek szérumot tartalmazó differenciáció médiumban való differenciáltatására épülnek), új, 2D konfluens őssejt monolayer technikák alkalmazásai

váltották fel. Az embrionális testecske (EB) technikák során a differenciáltatáshoz a pluripotens össejteket Matrigel extracelluláris mátrixon tenyésztették, dajkasejtek nélkül, egér foetalis fibroblaszt-kondicionált médiumban (Communal és mtsai, 2002; Xu, 2012). Ugyanez a technika alkalmas volt a kérdéses sejt-származékok képzésére, a technika hatékonysága azonban alacsony maradt. A mesodermális sejt-képződésért felelős *in vivo* és *in vitro* faktorok pontosabb ismeretével, az elmúlt években a differenciációs protokollok hatékonysága is jelentősen javult. A Wnt jelátviteli út szignálmolekulái és a nem G-protein kapcsolt fibroblaszt növekedési faktor (FGF), Nodal jelátviteli agonista Activin A és BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) egyaránt fontos elemei a szívizomsejt differenciáció jelátvitelének (Laflamme és mtsai, 2007; Yang és mtsai, 2008). Az egyes protokollokban az alkalmazott koncentrációk és időtartamok sejtvonalként változhatnak.

napok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Földes és mtsai	MEF-CM+FGF			EB +FBS			differenciálódó EB+FBS															
Laflamme és mtsai	MEF-CM+FGF			A	BMP4			RPMI+B27+INS														
Lian és mtsai	mTESR1			Gi	R	WNTi	R-	RPMI-B27+INS														
Burridge és mtsai	E8	Gi	R-	WNTi	RPMI-B27-INS								metabolikus szelekció				RPMI-B27+INS					

**5. ábra: Szívizomsejt differenciációs protokollok.** MEF-CM, egér kondicionált médium; FGF, fibroblaszt növekedési faktor; EB, 3D sejtaggregátum, "embrionális testecske"; A, Activin A, Nodal jelátvitel agonista; RPMI+B27+INS szérummentes bazális médium, inzulinnal. RPMI+B27+INS, szérummentes bazális médium, inzulinnal. RPMI+B27-INS (illetve R-), szérummentes bazális médium, inzulin nélkül. Metabolikus szelekció, glükózmentes médium, laktáttal; FBS, foetalis borjúsavó, mTESR1 és E8, pluripotens össejt médiumok; Gi, GSK3 $\beta$  inhibitor; WNTi, Wnt jelátvitel inhibitor.

A monolayer technikáknál az össejteket mTESR1 vagy E8 össejt médiumban tenyésztjük, majd szérummentes médiumot használunk a differenciáltatásukhoz. Az egyik gyakran alkalmazott metodika, hogy a mesodermális és kardiális indukciót az Activin A és BMP4 kezeléssel érjük el, amelyet az RPMI/B27 médium adása követ (Laflamme és mtsai, 2007). A differenciáltatás hatékonysága ezzel a technikával elégtelen, a differenciált sejt-kultúrában a szívizomsejtek aránya nem haladja meg a 20%-ot. Emiatt az egyéb, nem szívizomsejtek jelenléte érdemben befolyásolhatja a kardiális génexpressziós és funkcionális mérések pontosságát. A differenciációs protokollok az elmúlt években jelentősen pontosodtak, hatékonyságuk nőtt. Az új protokollok alkalmazásával ma már „tisztá”, csak szívizomsejtet tartalmazó sejt-kultúrák hozhatóak létre (27. ábra, bal alsó panel, 4.4.2. fejezet). Ezen protokollok fontos újítása, hogy a növekedési faktorok, morfogének, vagy szérum alkalmazása helyett, jól reprodukálható és szabályozható, a korai kardiális fejlődés jelátvitelét befolyásoló (Burridge és mtsai, 2015; Nosedá és mtsai, 2011) kis molekulákat alkalmazunk szekvenciális adagolásban. Ez lehetővé tesz egy olyan pontosan szabályozható, hatékony differenciációt, amely a klinikai igényű sejt-differenciáció alapját is képezheti. Röviden, a monolayerként tenyésztett, 75-90% konfluenciájú össejt-kultúrát RPMI-B27 (inzulin- és szérummentes) médiumba helyezük és szelektív GSK3 $\beta$  inhibitor CHIR99021-gyel (6 $\mu$ M vagy 8 $\mu$ M) kezeljük egy (sejtvonaltól függően esetleg két) napig.

Második lépésként a differenciáció 3. napján Wnt jelátviteli gátlószerrel, így például C59-cel kezeljük a sejt kultúrát (2.5µM) 48 órán át. A differenciáció 11-13. napján egy ún. metabolikus szelektációs lépést alkalmazunk, amely során a glükóz-mentes RPMI-B27 médiumban tartjuk a sejt kultúrát 2-4 napig. Ennek hatására a sejt kultúrában található, proliferáló, nem szívizomsejtek elpusztulnak, így a fennmaradó sejt kultúra már csak tisztán szívizomsejteket tartalmaz. A hypertrophiás kísérleteknél alkalmazott össejtvonalakat és szívizomsejteket a 2. táblázat foglalja össze.

Sejtvonal	Újraprogramozott sejt típus	Újraprogramozási protokoll	Össejt sejt kultúra	Differenciációs protokoll	Szívizomsejt sejt kultúra	Sejtforrás
H7 hESC			dajkasejt-mentes, MEF- CM vagy mTESR1	EB, szérum / Activin A- BMP4, szérummentes	szérum / szérummentes	WiCell, WI, USA; GE Healthcare
SHEF3 hESC			iMEF / dajkasejt-mentes, mTESR1	EB, szérum	szérum	UK Stem Cell Bank
HUES7 hESC			dajkasejt-mentes, MEF-CM	EB, szérummentes	szérummentes	Harvard University
HUES7-hiPSC	HUES7 eredetű fibroblasztok	Lentivírus (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28)	dajkasejt-mentes, MEF-CM	EB, szérummentes	szérummentes	University of Nottingham
LQT2 hiPSC	Bőr fibroblaszt	Lentivírus (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28)	dajkasejt-mentes, MEF-CM	EB, szérummentes	szérummentes	University of Nottingham
LQT2-PAT hiPSC	Bőr fibroblaszt	Lentivírus (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28)	dajkasejt-mentes, MEF-CM	EB, szérummentes	szérummentes	University of Nottingham
ReproCell hiPSC	szívizomsejt	Lentivírus (OCT4, KLF4, C-MYC, SOX2)	MEF/ dajkasejt-mentes, ReproFF	EB, szérummentes	szérum / szérummentes	ReproCell Japán
iCell hiPSC	Foetalis tüdő fibroblaszt	Episzómális (OCT4, KLF4, C- MYC, SOX2)	dajkasejt-mentes	αMHC-RFP szortolt, szérum	szérum / szérummentes	Wicell, WI, US

**2. táblázat: Humán pluripotens össejt eredetű szívizomsejtek differenciációja.** MEF-CM, egér embrionális fibroblaszt kultúra kondicionált médium; EB, embrionális testecske; LQT2, hosszú QT-szindrómás beteg; LQT2-PAT, a hosszú QT-szindrómás beteg egészséges hozzátartozója

### 3.3. Hypertrophiás stimulusok

A szívizomsejtek hypertrophiás válaszkészségének meghatározására több assay is alkalmazható (3. táblázat). A G-fehérjéhez kapcsolt jelátvitelű hypertrophiás agonisták hatásának jellemzésére, a sejtek inkubációját követően (1 óra), a tenyésztőlemezekon növesztett sejteket 48 órán át α-adrenerg agonista phenylephrinnel kezeltük (10 µM, Sigma). Az iCell hiPSC-CM és H7 hESC-CM sejtek esetében, a kísérleteket szérummentes médiumban és 20% szérum mellett is megismételtük (Dambrot és mtsai, 2014). A sejteket egy független kísérletsorozatban angiotenzin II-vel (Sigma; 100 nM, 48 óra), endothelin-1-gyel (Sigma; 1, 10, és 100 nM, 24 óra) és β-adrenerg izoproterenollal (Sigma; 10 µM, 48 óra)

is kezeltük. Az izoproterenol esetében szelektív  $\beta$ 1-blokkoló CGP20712A (Sigma; 300 nM) jelenlétében is megismételtük a kísérleteket.

A szívizomsejtek ciklikus mechanikus feszítése is egy logikus lehetőségként merült fel a hypertrophia kiváltására. A hPSC-CM sejteket ciklikus mechanikus nyújtásnak tettük ki (0.5 Hz, 10–25% sejtnyújtás, 24 óra). A sejteket ehhez egy szilikonos és így nyújtható aljú tenyésztőedényben szélesztettük, majd ciklikus vákuummal vongáltuk az edény tenyésztőfelszínét és így közvetve a letapadt sejteket is (Flexcell International, FX-2000). Kontrollként a vákuum nélküli tenyésztőedényeket használtuk.

A hypertrophiás kísérleteknél leggyakrabban alkalmazott másik szérumentes médium összetevői: DMEM:M199 médium, 3:1 arányban, 1 ml penicillin/streptomycin, 0.2 g borjú szérum albumin (0.2% wt/vol), 1.76 mg aszkorbinsav, 66 mg kreatin, 62.6 mg taurin, 32.24 mg karnitin, inzulin 1:10, összesen 100 ml DMEM/M199 médiumban. A hypertrophiát mediálól NFAT/calcineurin jelátvitel gátlására 200 nM dnNFATc1 vagy pGFP-VIVIT (Földes és mtsai, 2014b) plazmiddal transzfektáltuk a hESC-CM sejteket. A kísérleteket sejt-permeabilis peptiddel, 11R-VIVIT-tel is elvégeztük. A peptid 30 órás féléletideje miatt a 11R-VIVIT adását a kísérlet felénél megismételtük. A transzfekcióhoz Eugene HD (Roche) transzfekciós reagenst, a VIVIT transzfekció kontrolljaként pGFP kontroll vektort, illetve pBj-stop (Clontech) vektort használtunk. A sejtek adrenerg válaszkészségét, a korábbiaknak megfelelően, 10  $\mu$ M phenylephrine 48 órás adásával vizsgáltuk, a gátlószerek jelenlétében is.

Az immunszuppresszáns kísérletekhez Activin/BMP4-gyel differenciált H7 hESC-CM sejteket használtunk, RPMI/B27 médiumban tenyésztve. Az izolált szívizomsejteket a differenciációt követő 30. napon kezeltük immunszuppresszáns szerekkel: cyclosporin A (CsA, 0.2  $\mu$ M; Sigma), FK506 (122 nM; Sigma), rapamycin (10 ng/mL, 11 nM; Sigma), 11R-VIVIT (2  $\mu$ M; Calbiochem) (Noguchi és mtsai, 2004), illetve kontroll DMSO adásával 24 órán keresztül. A kísérletben használt gyógyszerkoncentrációk a szívtranszplantált betegeknél alkalmazott koncentrációknak feleltek meg.

Hypertrophia assay	Technológia	Hivatkozás
A hypertrophiás sejtek mechanikai analízise / myocardialis szöveti konstruktumok	Kardiális „mikroszövet”; egyedi sejt microarray; post detectors (mPads); in vitro generált szívszövet; heart-on-chip modell; vékony izomfilm; egyedi sejtek nyújtása Flexercell készülékkel	(Hansen és mtsai, 2010; Hinson és mtsai, 2015; Schaaf és mtsai, 2011; Wang és mtsai, 2014)
Intracelluláris változások vizualizálása	Flow cytometria troponin/BNP-pozitív sejtekre; spontán Ca <sup>2+</sup> tranziens képkalkotás és mérések; transzkripció faktor transzlokáció; extracelluláris flux analízis (Seahorse) a megváltozott metabolizmus mérésére; időbeli aljzat-deformációs mikroszkópia egyedi sejt kontrakciók vizsgálatára; sejtimpedancia sejtnövekedés mérésére	(Drawnel és mtsai, 2014; Kijlstra és mtsai, 2015; Tanaka és mtsai, 2014; Wang és mtsai, 2014; Wu és mtsai, 2015a)
Génexpressziós profil / génhálózat szabályozása / kapcsolt jelátviteli utak jellemzése	Kvantitatív PCR; TaqMan TLDA kártyák; egyedi sejtek PCR analízise; rövid RNS assay-k; Microarray; RNAseq; miRNASeq	(Aggarwal és mtsai, 2014; Drawnel és mtsai, 2014; Hinson és mtsai, 2015)
Hypertrophiás faktorok termelése és felszabadulása	ANF, BNP, ET-1, FABP3, troponin I ELISA és Western blot	(Carlson és mtsai, 2013; Drawnel és mtsai, 2014; Tanaka és mtsai, 2014)
Natív és in vitro differenciált sejtek összehasonlítása	Izolált humán kamrai szívizomsejtek; neonatális egér/patkány sejtek; patkány embrionális szívizomsejtek (H9C2); CRISPR/Cas9-izogenikus kontrollok	(Földes és mtsai, 2014a; Hinson és mtsai, 2015; Ren és mtsai, 2012; Wang és mtsai, 2014)

**3. táblázat: Humán pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtek hypertrophiás válaszkésztségének vizsgálata in vitro assay-ekkel.**

### 3.4. Immuncytokémia és vitális festések

A hypertrophiás tulajdonságok mikroszkópos jellemzésére kombinált immuncytokémiai festéseket alkalmaztunk. A sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd 0.2% Triton X-100-zal permeabilizáltuk, 4% foetalis borjúsavós blokkolást követően a sejteket anti-ANF (Santa Cruz, sc20518, 1:300), anti-troponin I (Abcam, ab47003, 1:200) elsődleges antitestekkel festettük. Alexa488-, és Alexa546-konjugált szekunder antitesteket használtunk (1:400, ThermoFisher Scientific, 3% borjú szérum albumin mellett). A sejtmagok jelölésére Hoechst festést alkalmaztunk (0.5 µg/ml; Sigma-Aldrich). További antitestek az anti-Ki67 (proliferációs marker, 1:100), anti-foszfo-hisztin H3 (proliferációs marker, 1:100), anti- $\alpha$ -aktinin (szarkomer protein, 1:500, Sigma-Aldrich) és anti-NFAT (transzkripció faktor, 1:100, ab93628, Abcam), anti-STAT3 (ab32500, Abcam, 1:100), és anti-miozin nehézlánc  $\alpha/\beta$  (MHC  $\alpha/\beta$ , klón 3-48, Abcam, 1:200). A proliferáció további jellemzésére a sejtek Hoechst-tel jelölt DNS-ének intenzitását is felhasználtuk. A teljes intenzitásértékek meghatározásával így egy olyan hisztogram hozható létre, ahol az egyes sejtciklus lépéseknek megfelelő populációk elkülöníthetőek (2N, 4N). A szívizomsejt differenciáció hatékonyságának az elmúlt években bekövetkezett jelentős javulása a „tisztá” szívizomsejt kultúrák létrehozását és így olyan in vitro vitális assay-k alkalmazását is lehetővé teszi, amelyek során az élő sejteket jelöljük

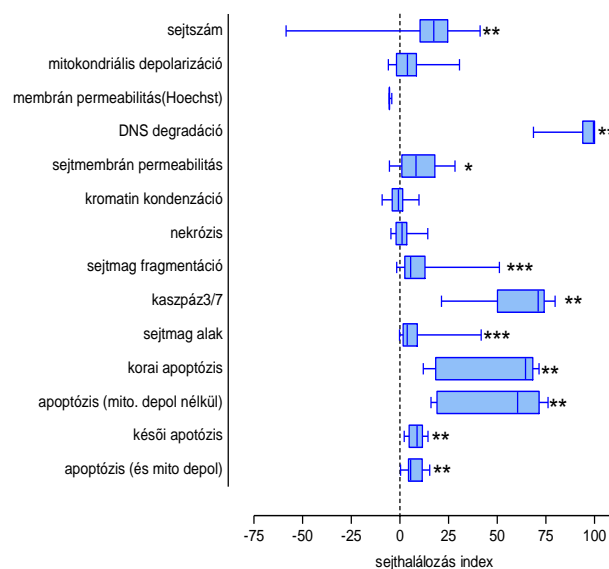
meg. A vizsgálataink egy részében a sejteket a kezeléseket követően Cell Tracker Red vitális festékkel jelöltük, majd automatizált mikroszkóppal vizsgáltuk.

### 3.5. ADRA1A receptor overexpressziója hiPSC-CM sejtekben

6000 humán iPSC-CM (iCell, Cellular Dynamics) sejtet tenyésztettünk 48 órán át 96 lyukú tenyésztőlemezekben, majd a sejteket 100 ng/lyuk ADRA1A-eYFP konstrukttal (Professzor Graeme Milligan, University of Glasgow ajándéka) transzfektáltuk. Transzfekciós reagensként TransIT-LT1 transzfekciós reagenst alkalmaztunk (MirusBio, Madison, WI). A sejteket a transzfekció utáni napon phenylephrinnel vagy kontroll médiummal kezeltük 48 órán keresztül. A transzfekciót követő 3. napon Zeiss LSM-780 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg a transzfekció hatékonyságát az eYFP-pozitív sejtek arányának meghatározásával. Az ADRA1A sejtbeli lokalizációját monoklonális antitesttel (ab137123, Abcam) és immuncytokémiával mértük high content mikroszkóppal. A sejtméret mennyiségi meghatározására CellTracker Red CMTPIX (Thermo Scientific) vitális festéket használtunk. Az ADRA1A és ANF mRNS szinteket kvantitatív PCR-rel mértük.

### 3.6. Sejthalálózás

Az élő sejtek festésére Vybrant FAM kaszpáz3/7 apoptózis markert, BOBO-1/TOTO-3/Topro3 nekrozis markereket, Hoechst sejtmagfestést, és mitokondriális membrán potenciált



**6. ábra: High content mikroszkópos analízis a szívizomsejtek toxicitásának in vitro vizsgálatára.** Izolált hPSC eredetű sejtek vitális és immuncytokémiái jelölésével lehetővé válik a sejtek toxicitásának és életképességének és az ezeket befolyásoló intracelluláris jelátviteli folyamatoknak a számszerű értékelése. X tengely, sejthalálózási index, maximális hatás = 100 (toxikus hatás) ill. -100 (protektív hatás). Az eredményeket medián és interkvartilis tartományként mutatjuk be, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 vs. kontroll, Mann-Whitney teszt (Mioulane és mtsai, 2012).

mutató TMRM jelöléseket alkalmaztunk. A sejteket 96- vagy 384-lyukú tenyésztőedényekben kezeltük, RPMI+B27 médiumban; az egyes lyukokban minimum 50000/cm<sup>2</sup> sejtet használtunk. Az antitest-alapú vizsgálatoknál a sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, Triton X-100 detergenssel permeabilizáltuk és a következő antitestek kombinációjával jelöltük: anti-



Ki67, anti-kaszpáz3, anti-NFAT1c, és anti-miozin nehézlánc  $\alpha/\beta$ . A nekrozis markerekből a BOBO-1 és a TOTO-3 jelölés fixálást követően is jól alkalmazható. A vizsgált szerek, így  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ , 24 óra) és chelerythrine (CHE; 10  $\mu M$ , 24 óra) toxicitását 3 nappal a sejtek szélesztését követően értékeltük (6. ábra).

### 3.7. Kvantitatív PCR - G-protein kapcsolt receptorok és másodlagos jelátvitel

A kvantitatív PCR méréseket standard TaqMan Gene Expression Assay-vel és TLDA array kártyákkal végeztük el a differenciálatlan és differenciálódó őssejteken, differenciált szívizomsejteken, felnőtt szívből izolált szívizomsejteken, foetalis és felnőtt szívből nyert fibroblasztokon. Az explantált humán szívekből felnőtt kamrai sejteket izoláltunk (Harding és mtsai, 1992). A foetalis szívből (Clontech) és foetalis fibroblasztokból (MRC5, foetalis tüdő fibroblaszt vonal, ATCC) izolált RNS-t használtunk kontrollként. A sejtekből teljes RNS-t szeparáltunk, TriReagent pufferrel lizáltuk a mintákat. Az RNS-t a lizátumból RNeasy oszlopokon (Qiagen, CA) izoláltuk. Kettős-szálú cDNS előállítására mintánként 400 ng teljes RNS-t és High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tet (ThermoFisher Scientific) használtunk. Kvantitatív PCR-rel és TaqMan Gene Expression Assay-vel a következő gének mRNS szintjeit határoztuk meg: ANF (Hs00383230\_g1), adrenerg receptor  $\alpha 1A$  (Hs00169124\_m1) és  $\alpha 1B$  (Hs00171263\_m1), Gq protein (Hs01586103\_m1), G $\beta 1$  protein (Hs00929799\_m1), G $\gamma 2$  protein (Hs00828232\_m1), OCT4 (Hs00999634\_gH) differenciálatlan hESC és hiPSC kultúrákban, foetalis fibroblaszt, felnőtt izolált szívizomsejt, hESC-CM és hiPSC-CM sejteken. Saját és mások korábbi munkái azt igazolták, hogy a nátriuretikus peptidek mRNS szintjei nem feltétlenül korrelálnak szorosan a mért protein szintekkel. Ezért a TaqMan-alapú génexpressziós mérés mellett az ANF fluoreszcens intenzitások mikroszkópos meghatározását is elvégeztük.

A kvantitatív PCR-nél endogén, *housekeeping* kontroll génnek a GAPDH-t (FAM/MGB) választottuk (Arenas-Hernandez és mtsai, 2013). A génexpressziós stabilitást M módszerrel határoztuk meg; a GAPDH M-értéke 0.07 volt, amely stabil gén referenciát jelent. A differenciáció korai fázisában a GAPDH stabilitását további kontroll génekkel (pl. ACTB) való összehasonlítással is igazoltuk; a két *housekeeping* gén egymással megegyező stabilitásúnak bizonyult. A G-protein-kapcsolt receptorok expresszióját SYBR green PCR reakcióval határoztuk meg. Az intron-specifikus valósídejű PCR reakciókhoz tervezett primerek és próbák: adrenerg receptor  $\alpha 1A$ : ADRA1A F: CACCCAACCTCACTGAACAC; R: CCACTGGGTGCTAAACTCCT; Hyb: 5'FAM- AGAGCTTCACATGCAGCAGCTGATC-3'TAMRA. RPL13A (1.intron) *housekeeping* endogén kontroll F: ACATGGCAAACCCCTGACTC; R: AAGGCTCTGCCCACTGACTA; Hyb: 5'FAM- AGCGAGACCCTGTCTCAAAA- 3'TAMRA.

### 3.8. Foszfokináz assay

A hESC-CM és hiPSC-CM sejteket hatlyukú tenyésztőlemezeken tartottuk és a hypertrophiás válasz kiváltására phenylephrinnel kezeltük (10  $\mu M$ , 48 óra). A lizálást követően a sejt kultúra protein-tartalmát Pierce protein assay-vel határoztuk meg. Az egyes foszfokinázok

foszforilációs szintjeit a sejtek lizátumából határoztuk meg humán foszfokináz antitest array (Proteome Profiler, R&D Systems) alkalmazásával. Számos esetben - a hPSC-CM funkcionális/hypertrophiás morfológiai válaszainak hiányában is - igazolható volt a kérdéses jelátvitel sejtbeli aktivitása. Párhuzamosan a következő proteinek relatív foszforilációját határoztuk meg: Akt (S473), HSP27 (S78/S82), Paxillin (Y118), Akt (T308), JNK pan (T183/Y185, T221/Y223), PLC gamma-1 (Y783), AMPK alfa1 (T174), Lck (Y394), Pyk2 (Y402), AMPK alfa2 (T172), RSK1/2 (S221),  $\beta$ -Catenin, MEK1/2 (S218/S222, S222/S226), RSK1/2/3 (S380), Chk-2 (T68), MSK1/2 (S376/S360), Src (Y419), c-Jun (S63), p27 (T157), STAT1 (Y701), CREB (S133), p27 (T198), STAT2 (Y689), eNOS (S1177), p38 alfa (T180/Y182), STAT3 (Y705), ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187), p53 (S15), STAT4 (Y693), FAK (Y397), p53 (S46), STAT5a (Y699), Fgr (Y412), p53 (S392), STAT5a/b (Y699), Fyn (Y420), p70 S6 kináz (T229), STAT5b (Y699), GSK-3 alfa/béta (S21/S9), p70 S6 kináz (T389), STAT6 (Y641), Hck (Y411), p70 S6 kináz (T421/S424), TOR (S2448), és Yes (Y426). Tormaperoxidáz szubsztrátot alkalmaztunk a protein expresszió detektálására. A membránokat GeneSnap rendszeren (SynGene) mértük, a denzitometriához ImageJ szoftvert használtunk. A biológiailag releváns kináz-interakciókat Ingenuity Pathways Analysis szoftver (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis>) segítségével térképeztük fel. Az Ingenuity rendszer az előzőleg statisztikailag megszűrt és bevitt adatokból a már publikált eredmények szerint képes valószínűsített jelátviteli útvonalak megjelenítésére.

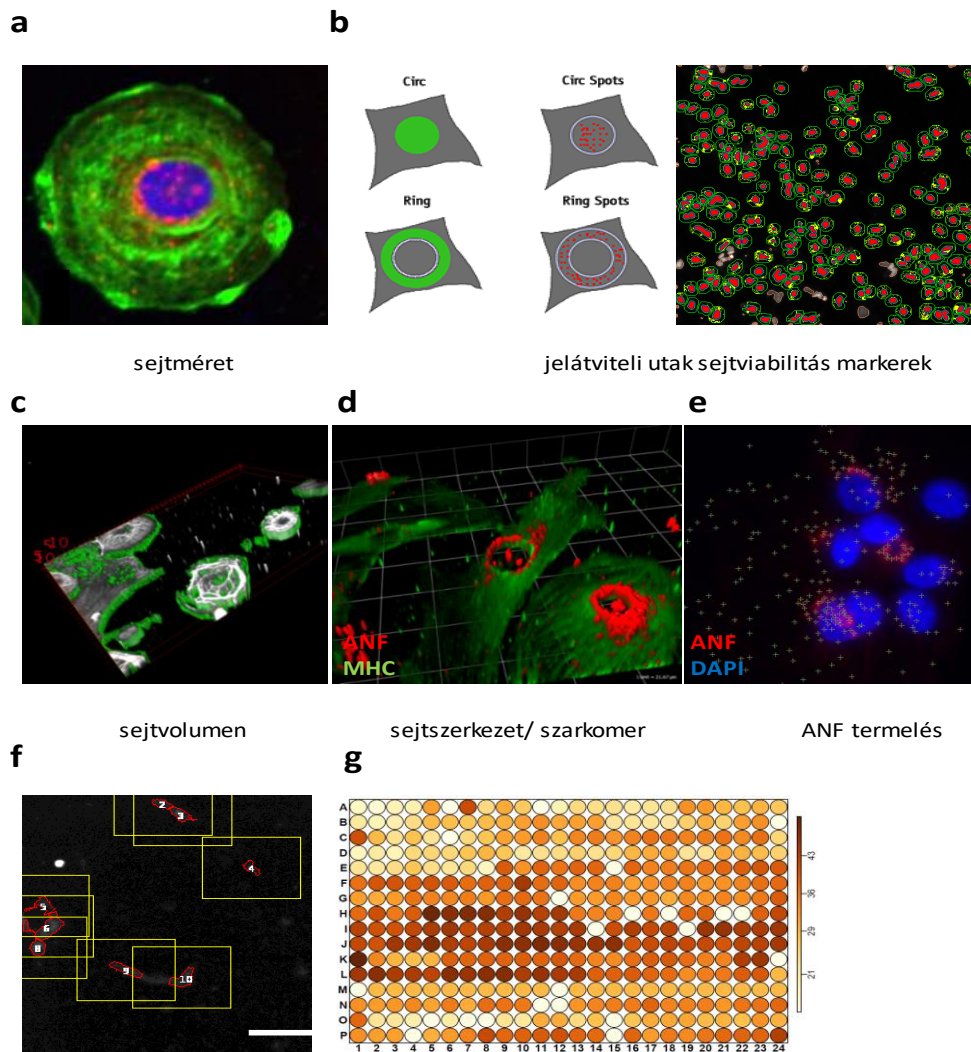
### 3.9. Kinázgátlás

Azok a gyógyszerfejlesztési technológiák, amelyek az antihypertrophiás szerek előállítását szolgálják, jellemzően fenotípus-alapú, kismolekulájú gátlószereket alkalmazó high-throughput vizsgálatokra épülnek (McKinsey és mtsai, 2007). Kísérleteinkben a protein kináz gátlók hPSC-CM sejtnövekedést gátló hatását vizsgáltuk. Szelektív kismolekulájú gátlószereket használtunk, így például p38-gátló SB202190 (1  $\mu$ M, Sigma), PKG-gátló KT5823 (1  $\mu$ M), HDAC II-gátló trichostatin A (0.25  $\mu$ M), ERK-gátló PD98059 (10  $\mu$ M), JNK-gátló SP600125 (1  $\mu$ M), GSK3 $\beta$ -gátló 1-azakenpaullone (10  $\mu$ M), CaMK II-gátló KN93 (10  $\mu$ M), calcineurin-gátló cyclosporin A (0.2  $\mu$ M), mTOR-gátló rapamycin (10 ng/ml), és calcineurin/FKBP-gátló FK506 (0.1  $\mu$ M) molekulákat. A BioMol Screen-Well Kinase Inhibitor Library használatával a bazális és phenylephrine-indukálta változásokat közvetítő számos további protein kináz szerepét is megvizsgáltuk a szívizomsejtek hypertrophiás változóiban. Ez a könyvtár 80 ismert kinázgátlót tartalmaz; a gátlószereket BioMek FX automata adagolóval (Beckman Coulter) osztottuk szét 96-, illetve 384-lyukú tenyésztőedényekbe. Az itt vizsgált kináz inhibitorok például az inzulin/IGF receptorok, PI3-kináz, CAM kináz II, JAK, PKA, CDK, JNK, PKC, CKI II, p38-MAPK, RAF, EGFR, MEK, JNK, GSK, MLCK, Src-kinázcsalád, IKK, PDGFR, és a VEGFR gátlószerei. A STAT3 jelátvitel aktivitásának vizsgálatára emellett rekombináns interleukin-6-ot (100 ng/ml, 48 órás kezelés, Sigma) alkalmaztunk. A STAT3 gátlására VIII, 5,15-DPP STAT3 inhibitor (Sigma; 10  $\mu$ M, 48 óra) és membrán-permeábilis STAT3 inhibitor proteint (Calbiochem, 100  $\mu$ M, 48 óra) használtunk. Az

újabbban leírt humán hypertrophiás jelátviteli utak más megközelítésű jellemzésére géntranszdukciós in vitro vizsgálatok merülnek fel további lehetőségként.

### 3.10. High content mikroszkópia a szívizomsejt hypertrophia vizsgálatában

A szívizomsejtek mérésére a standard fluoreszcens mikroszkópok mellett automatizált mikroszkópok is alkalmazhatóak, ezeken a rendszereken különféle alkalmazások futtathatóak.



**7. ábra: High content mikroszkópos analízis a szívizomsejtek hypertrophiájának in vitro vizsgálatára.** Izolált hPSC eredetű sejtek immuncytokémiai jelölésével lehetővé válik a sejtek morfológiájának, szekréciós aktivitásának és az ezeket befolyásoló intracelluláris jelátviteli folyamatoknak a számszerű értékelése. a. hESC-CM, miozin nehézlánc, zöld; ANF, piros; Hoechst, kék b. sematikus sejtpartikulum szegmentálás: *circ*=sejtmag compartment; *ring*=cytoplazma. c. sejtvolumen meghatározás konfokális high content mikroszkóp algoritmussal; d. 3D hESC-CM felvétel. e. ANF redistribúció analízis. f. adherens szívizomsejtek high content screenelése. Az egyes objektumok pirossal jelölve, látóter sárga keretben. g 96 lyukú plate screen, és reprezentatív hő térkép (Földes és mtsai, 2011, 2013, 2015; Mioulane és mtsai, 2012; Kriston-Vizi és mtsai 2016).

Így egyszerre mérhetőek az egyes sejtkompartmentekben az immunfluoreszcens aktivitások; csoportonként több ezer sejt részletes adatai is meghatározhatóak rövid idő alatt. A hESC-CM és hiPSC-CM sejtek hypertrophiás válaszában jellemzésére több *high content* immuncytokémiai assay-t fejlesztettünk ki. A sejteket ArrayScan VTi 2D automata

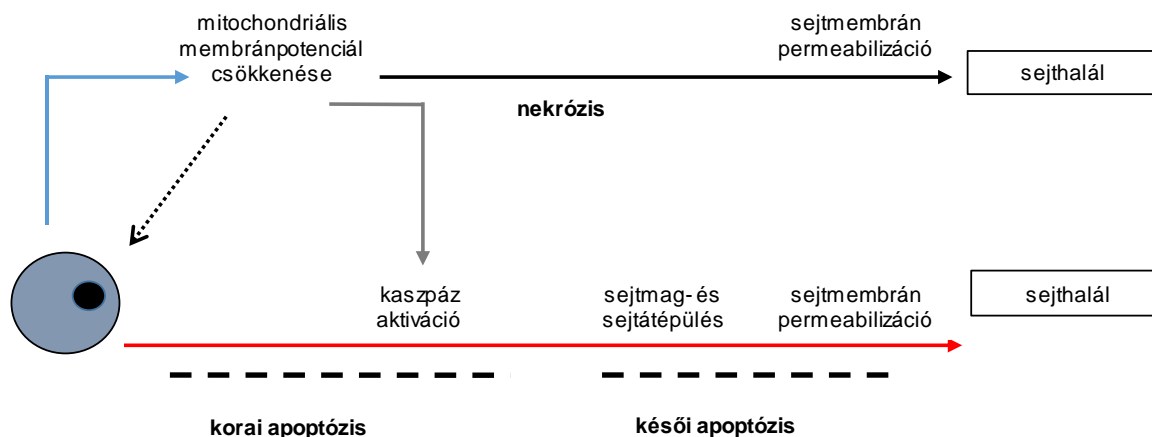
mikroszkóppal (Cellomics, ThermoFisher Scientific) és a konfokális Opera LX, illetve Opera Phenix mikroszkópokkal (PerkinElmer) szkenneltük.

*2D képalkotás:* A sejteket 96- vagy 384-lyukú tenyésztőedényekben tartottuk és kezeltük. Az automatizált mikroszkópia és képfeldolgozás előnye, hogy specifikus algoritmusokat használhatunk az információk gyűjtésére és csoportosítására, így morfológiai assay-eket (pl. szarkomer struktúra, sejtméret), sejtkompartmentek önálló jellemzésére szolgáló assay-eket (pl. transzkripciós faktor nukleáris transzlokációja, sejtmag festés önálló vizsgálata). A felvételeket jellemzően 10x objektívvel és több fluoreszcens csatornán készítettük, az immuncytokémiai festések (pl. Hoechst, 1. fluoreszcens csatorna, MHC  $\alpha/\beta$ -Alexa488, 2. csatorna és ANF-, vagy STAT3-Alexa546, 3. csatorna) kombinált alkalmazásával. Így a hypertrophia esetében a sejtek méretének növekedése, a szarkomer struktúra elrendeződése, a hypertrophiás transzkripciós faktorok (pl. NFAT) transzlokációja és a cytoplazmatikus ANF átrendeződése azok a változók, amelyeket az egyes sejtekben együttesen kell vizsgálnunk. Az egyes sejtszintű fenotipikus változásokat nagyobb felbontás mellett is értékeltük, 40x vagy 60x objektívek és 488/561/640 nm és UV (365 nm) hullámhosszú gerjesztés használatával (Perkin Elmer Opera vagy Opera Phenix). High content mikroszkópiával jellemzően 100 ms expozíciós idő szükséges a sejtmag felvételekhez a Hoechst csatornán (365 nm), 800 ms és 3330  $\mu$ W lézer a MHC  $\alpha/\beta$ -Alexa488 csatornához (488 nm), valamint 800 ms és 1600  $\mu$ W lézer teljesítmény az ANF-Alexa546 csatornához (561 nm).

*3D képalkotáshoz* és az optikai szeleteléshez konfokális nagyfelbontású mikroszkópot alkalmaztunk. A mérések során 4x objektívvel (NA=0.16) kerestük meg a vizsgálandó sejteket, majd 60x (NA=1.2) lencsével végeztük azok részletes szkennelését a kijelölt területeken. A feldolgozott képszeletek számát és pozícióját PreScanReScan Opera script-tel határoztuk meg (7. ábra).

### **3.11. High content mikroszkópia a sejthalálozás vizsgálatában**

A high content képalkotás az elmúlt években a gyógyszervizsgálatok központi elemévé vált. Különösen hasznosnak bizonyul a nem specifikus válaszok és mellékhatások, így a gyógyszertoxicitás korai kiszűrésében. Az eljárás közvetlen tudományos haszna mellett így természetesen előnyt jelent az ipari gyógyszerfejlesztések területén is, ahol az automatizált mikroszkópokkal és az új tenyésztőedényekkel a hPSC eredetű szívizomsejtek halálozása jól vizsgálható nagyszámú molekula esetében is. A kisebb tenyésztőfelület a sejtek előállításának költségeit is csökkenti. A sejthalálozás jelátviteli folyamatainak aktivációja



**8. ábra: A sejthalálozáshoz vezető folyamatok sematikus összefoglalása.** Az effektor kaspázok aktiválódása központi lépés az apoptózisban és a mitokondriális membránpotenciál változásával járhat, illetve annak változása nélkül is végbemehet. A sejtmembrán permeabilitásának növekedése az apoptotikus és nekrotikus folyamat terminális lépését jelenti. A szaggatott vonalak a reverzibilis folyamatokat jelölik az ábrán.

néhány másodperc és órák közötti intervallumra tehető (Rehm és mtsai, 2002) attól függően, hogy a kiváltó stimulus a pro-apoptotikus génprogram aktiválódását eredményezi vagy közvetlenül károsítja a sejtoranellumokat. Noha az egyes sejthalálozás formákra tipikus morfológiai változások utalnak, olyan univerzális biomarker nincs, amely egyértelműen elkülönítené az apoptotikus és nekrotikus folyamatokat és sejteket. A mitokondriális membránpotenciál, kaspáz aktiválódás, sejtvészítés, sejtmag átépülés és a sejtmembrán permeabilitásának növekedése alapján meghatározhatjuk a korai és késői apoptózis és nekrosis formákat (8. ábra). Fontos, hogy a nekrosisban a sejtekben a kaspáz proteolízise nem figyelhető meg, és ezért a kaspázok mérése jól alkalmazható az apoptózis és nekrosis elkülönítésére (Wan és mtsai, 2008). Az aktív kaspázok az apoptózison kívül az őssejtek differenciálódását, a sejtproliferációt, a tumoros sejttátépülést is mediálják (English és mtsai, 2011; Hong és mtsai, 2002; Saito és mtsai, 2000).

A sejtmembrán permeabilitásának növekedése a sejthalálozás folyamatának késői lépése. A membrán integritását ez esetben impermeabilis vitális festésekkel tudjuk igazolni, ilyenek a BOBO1 (zöld pszeudoszín), propidium-jodid (piros) és ToPRO-1 (ibolya piros). Ezek a jelölések jól elkülönítik az egyes populációkat nem fixált sejtkultúrákban is. A permeabilitás markerek és a kaspáz3 együttes használata a sejtek jelölésére egyfelől elkülöníti az apoptózist a nekrosistól, másfelől a folyamat korai és késői fázisát is. Ennek megfelelően a következő populációk különíthetők el: korai apoptózis (magas kaspáz/alacsony BOBO); késői apoptózis (magas kaspáz/magas BOBO); nekrosis (alacsony kaspáz/magas BOBO). A sejtmag morfológia változásai, így a sejtmag töredezése vagy zsugorodása, valamint a Hoechst sejtmag/DNS festés intenzitása emellett további információval szolgálnak a folyamat késői fázisában.

### 3.12. Kolóniaképzés hESC-CM sejtekkel

A hESC-CM sejt kultúrából enzimátikus úton önálló sejteket szeparáltunk, azokból átlagosan 6000 sejtet szélesztettünk 96-lyukú tenyésztőedénybe a mérésekhez. A sejtek számát és kolóniaképző tulajdonságát miozin-nehézlánc és Hoechst festésekkel, immunocytokémiával határoztuk meg 0, 2, 4, 6, 8, 10 nap után. Az egyes kolóniáknál a miozin-nehézlánc-pozitív kolóniákban kvantifikáltuk a sejtmagok számát *high content* mikroszkóppal.

### 3.13. In vivo vizsgálatok

A részletes metodikai leírást illetően a Springer és munkatársai cikkének online elérhető metodikai leírására utalunk (Springer és mtsai, 2014). Juvenilis Wistar Han ipatkányokat 10<sup>8</sup> AH-130 hepatoma sejttel inokuláltuk intraperitoneálisan, a tumornövekedést 5 (n=6), 7 (n=10), 9 (n=9), 11 (n=8) és 13 (n=12) napig követtük. A tumor növekedése a 8./9. napig volt exponenciális. A sham állatokban (csoportonként n=5) 7., 11. és 13. napon végeztünk funkcionális vizsgálatokat, így a kardiális funkció és a táplálék és folyadékfelvétel mérését. A kardiovaszkuláris gyógyszeres kezelések hatásait egy max. 16 napos követési időszakban vizsgáltuk. Az állatokat 0.5 (n=13), 2 (n=14), 5 (n=23) vagy 50 mg/kg/nap (n=20)  $\beta$ 1 blokkoló bisoprolollal, (n=9), 0.4 (n=10), 1 (n=14) vagy 10 mg/kg/nap (n=15) ACE-gátló imidaprillal, 2 (n=6), 5 (n=16) vagy 50 mg/kg/nap (n=16) aldosteron-gátló spironolactonnal vagy placeboval (n=73) kezeltük. A modellben a betegség előrehaladtával a hepatomával beoltott állatokban súlyos cachexia fejlődik ki, amely étvágytalanságban, progresszív testsúlyvesztésben nyilvánul meg. A hepatoma csoportokban ezért a tumor inokulációt megelőzően és a vizsgálat végén szintén meghatároztuk az állatok testtömegét, szöveti összetételét, lokomotoros aktivitását, kardiális funkcióját (EKG, echokardiográfia és invazív hemodinamika), és a táplálék- és folyadékfelvételét. A biomarkerek szintjét a levett plazmamintákból határoztuk meg radioimmunoassay-vel vagy ELISA-val. A proteozóma és kaszpáz aktivitásokat homogenizált kamrai szövetből fluorimetriás módszerekkel mértük. A kamrai protein és génexpressziókat Western blot és PCR-rel mértük. A szívszöveti átépülés és fibrózis kimutatására hisztológiai vizsgálatokat is végeztünk.

### 3.14. Neonatális szívizomsejtek

A neonatális patkány szívizomsejteket szérum-mentes DMEM / M199 (4:1) médiumban tartottuk a kezelést megelőzően 24 órát, majd a sejteket spironolactonnal (1  $\mu$ M), bisoprolollal (10  $\mu$ M), SB 415286-vel (10  $\mu$ M), aldosteronnal (1  $\mu$ M) vagy isoproterenollal (10  $\mu$ M) kezeltük. A kezelés 5. napján a sejteket mikroszkóp alatt vizsgáltuk, majd további vizsgálatokra feldolgoztuk.

### 3.15. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat Graph Pad 5.0 és 7.0 (Graph Pad Inc., CA, USA) programokkal végeztük. A folyamatos változókat normál eloszlásnál átlag  $\pm$  mintaközép hibája (*standard error of mean*, SEM) formában, a nem normál eloszlásnál medián és interkvartilis tartománnyal, a kategorikus változókat db / % formátumban adtuk meg. Az adatokat az adott

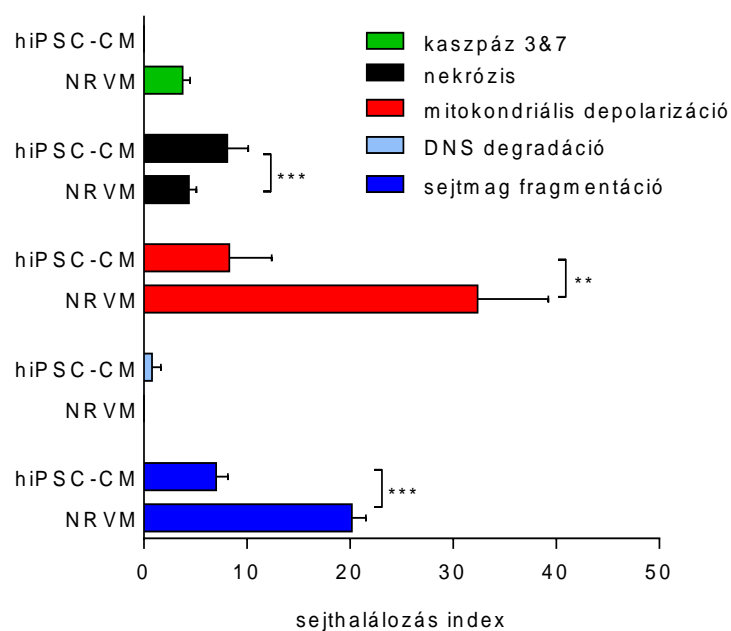
kísérleti elrendezésnek megfelelő statisztikai próbákkal (Student-féle t-próba, egyutas ANOVA-t követő Tukey/Dunnett post hoc tesztek vagy Mann-Whitney U teszttel) elemeztük. Az *in vivo* vizsgálatoknál az össz-mortalitást Kaplan-Meier görbével ábrázoltuk. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a statisztikai próba során kapott P érték kisebb volt 0.05-nél.

## 4. Eredmények és megbeszélés

### 4.1. Sejthalálózás

#### 4.1.1. A patkány neonatális szívizomsejtek és a humán PSC-CM sejthalálózásának összehasonlítása

A differenciálódás és a sejthalálózás jelátviteli közötti átfedések és kölcsönhatások vizsgálata (Zhang és mtsai, 2009) igazolta, hogy a kaszpáz3 egyaránt fontos a kardiovaszkuláris rendszer kialakulásában és a kardiális működés fenntartásában (Abdelwahid és mtsai, 2016). A chelerythrine (keleritin) egyike a gyógynövények benzophenanthridine alkaloid komponenseinek és potens gátlószere a protein kináz C jelátvitelnek (Noguchi és mtsai, 2004; Yamamoto és mtsai, 2001). Egyes vizsgálatok emellett a kezelés hatására intracelluláris oxigén szabadgyökök felszabadulását is leírták, amelyek közvetlenül is apoptózist indukálnak patkány szívizomsejtekben (Juhászova és mtsai, 2009). Kimutattuk, hogy a sejtkárosító hatású chelerythrine aktiválja a kaszpáz3-at: a fluoreszcens jel növekedése mind a hESC-CM sejtekben, mind a neonatális patkány szívizomsejtekben jól reprodukálhatóan mérhető volt (9. ábra).



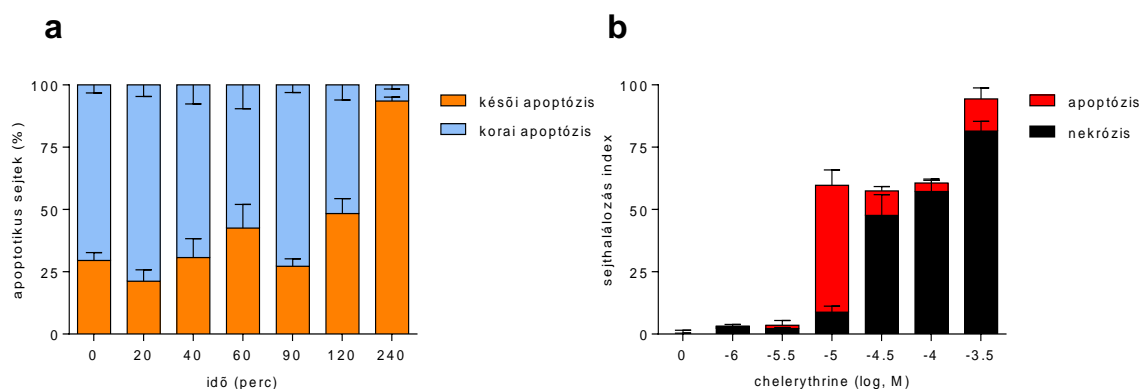
**9. ábra: Sejthalálózás patkány és humán szívizomsejtekben.** Chelerythrine (10  $\mu$ M, 90 min) eltérő sejthalálózás profilt hoz létre a patkány neonatális szívizomsejtekben (NRVM) és humán iPSC-CM sejtekben. A sejthalálózás index = (% pozitív - határérték) / (100 % - határérték), n = 11, 3 független kísérletből; \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001, Student t teszt.

A kaszpáz3 aktiválódását a sejtek morfológiai változásai követik, így a sejtmembrán károsodása és a sejt zsugorodása. A sejtszám csökkenése mindkét sejttípusban szintén megfigyelhető; így 10  $\mu$ M chelerythrine kísérletes alkalmazása a kaszpáz3 aktiválódását, sejtszám csökkenését és mérsékelt nekrotizist eredményezett mindkét vizsgált sejttípusban. A patkány (P) és humán (H) sejtek összehasonlítása azonban számos különbséget is feltárt a



sejtek között, így érdemi eltérés volt a kaspáz aktivitásban (apoptózis index,  $H$ =a maximális hatás  $11 \pm 2.4\%$ -a és  $P=31.9 \pm 4\%$ ,  $p=0.0001$ ) és ezzel párhuzamosan a sejtvesztés mértékében is ( $H=36.8 \pm 7.5$  és  $P=62.6 \pm 4.7$ ,  $p=0.028$ ). A nekrozis mértéke a két sejtípusban ugyanakkor nem tért el egymástól. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a humán ESC-CM a chelerythrine kezelésre kevésbé érzékeny, a látott apoptózis nem fordult nekrotikus folyamattá ezekben a sejtekben. A korai apoptotikus események során jól megfigyelhető a sejthalálózást mediáló molekulák cytoplazmabeli és sejtmagbéli transzlokációja. Ennek következtében az effektor kaspázok aktiválódnak és a sejtmag DNS állománya károsodik (Wan és mtsai, 2008). A szívizomsejt apoptózisában a mitokondriális károsodás központi jelentőségű, hiszen az intracelluláris ATP raktárak kiürülnek, ez pedig az apoptózist nekrozis irányába tolja el.

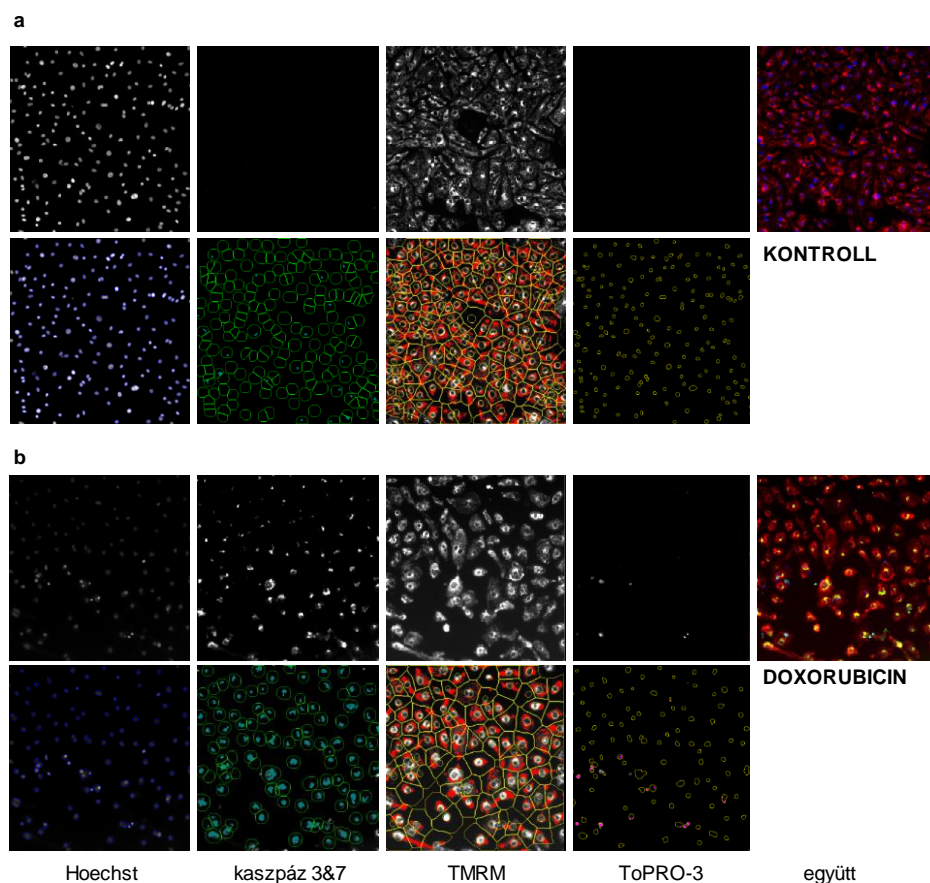
A patkány neonatális sejtek és a humán ESC-CM/hiPSC-CM sejtek összehasonlítása során először a chelerythrine koncentrációját és a kezelés időtartamát határoztuk meg patkány sejteken (10. ábra). A választott kezelésnél a patkány szívizomsejtek maximális apoptotikus választ mértek. A humán szívizomsejtek  $10 \mu\text{M}$  adása mellett hasonló választ adtak, a koncentráció további növelése azonban az apoptotikus választ nekrozis irányába tolta el. A chelerythrine mindkét sejtípusban átlagosan 40 perc után kezdett hatni, a maximumot 90 perc után érte el. Az alkalmazott koncentrációban a korai hESC-CM sejtek (38 nappal a differenciációs protokoll befejezése után) kevésbé voltak érzékenyek, mint a patkány szívizomsejtek, amit a magasabb sejtszám és a mérsékelt apoptózis jelzett - változatlan nekrozis arány mellett. A differenciáció után tartósan (65 napig) kultúrában tartott hESC-CM sejtekben kapott válasz azonban megegyezett a patkány sejtekben látott maximális válasszal ( $26.7 \pm 1.3\%$ ). Az éretlen szívizomsejtek jellemzően rezisztensek voltak oxidatív stresszre, ami magyarázhatja a korai hESC-CM kultúrák alacsony válaszkésztségét chelerythrinere.



**10. ábra: A chelerythrine idő- (a) és koncentráció-függő (b) hatása patkány neonatális szívizomsejteken.** 90 percnél vizsgálva a hatásokat kimutatható, hogy az alacsony dózisok mellett az apoptózis, míg magasabb koncentrációknál a nekrozis dominál.  $N=6$ , 2000 sejt / csoport. Chelerythrine ( $10 \mu\text{M}$ ) adása mellett az első percekben a korai apoptózis dominál a sejt kultúrában (kaspáz-pozitív/BOBO-negatív sejtek), 240 percnél viszont a sejtek többsége késői apoptózist mutat (kaspáz-pozitív/BOBO-pozitív sejtek). Sejthalálózás index= (% pozitív - küszöbérték) / (100 % -küszöbérték).

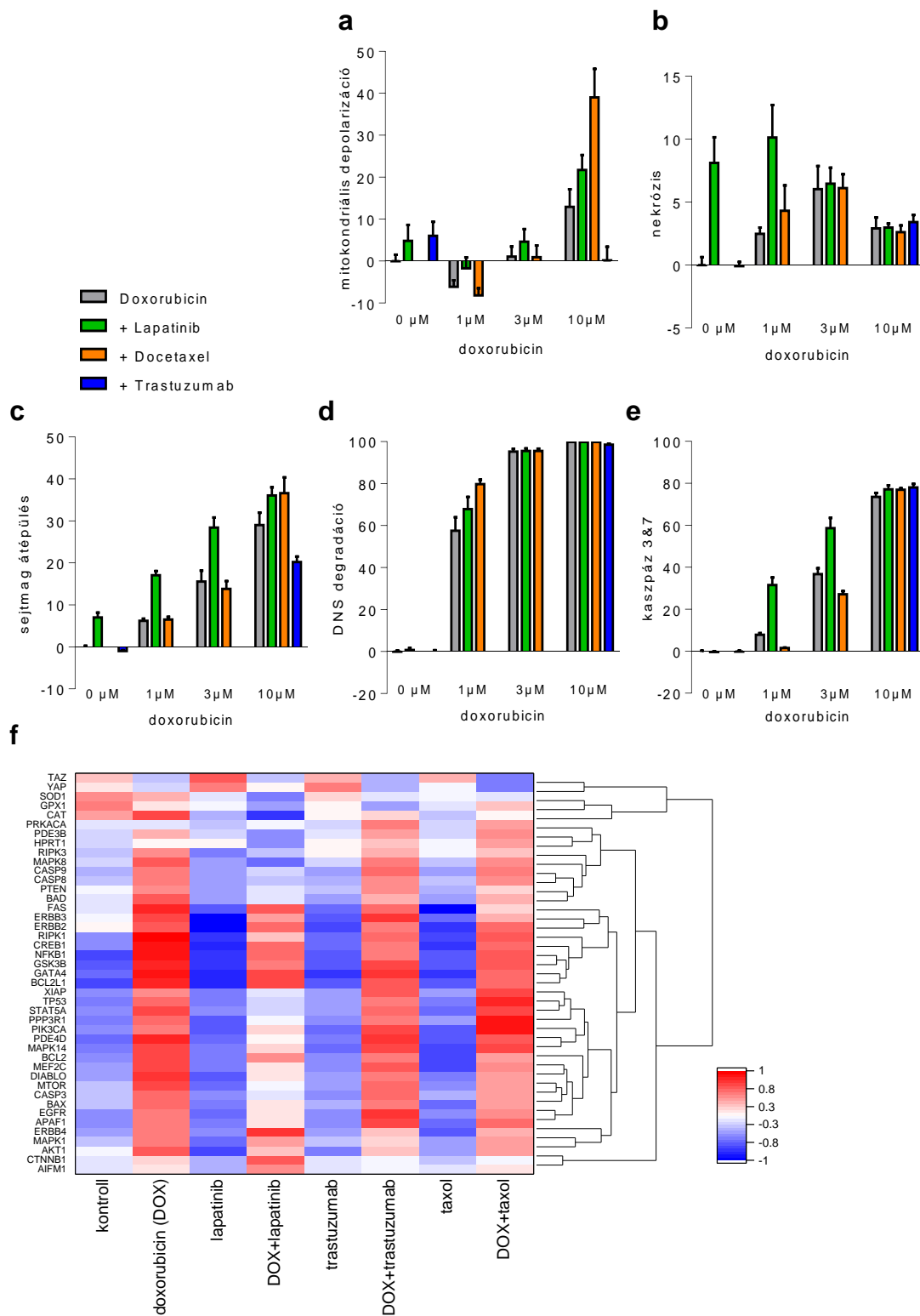
Eredményeink alapján állítható, hogy a *high content*-alapú kardiotoxicitás assay-k megbízhatóak és jól reprodukálhatóak. Összességében a markerek kombinált alkalmazása mind fixált, mind élő szívműködő sejteken pontos képet ad az egyes toxikus szerek időbeli hatásairól, azonban az egyes (állati eredetű, illetve humán) sejttípusok eltérő válaszkészségét az egyes szerek kardiotoxikus hatásának vizsgálatánál figyelembe kell vennünk. Az őssejt eredetű szívműködő sejtek előnyösek az ilyen vizsgálatok elvégzésére, elsősorban a hosszú élettartamuk miatt. A gyógyszeriparban ezért sok helyen a CHO és HEK sejtek helyett specifikusabb alkalmazásukra is lehetőség van a kardiovaszkuláris és toxikológiai vizsgálatokban. Ugyan az állati eredetű, felnőtt vagy neonatális szívműködő sejteket ez a technológia egyelőre nem váltja ki teljesen, de kihasználva a humán sejtek eltérő fenotípusát, általuk egy klinikailag fontosabb és megbízhatóbb kardiotoxicitási vizsgálat válik lehetővé. Ezáltal számos, késői fázisú humán vizsgálatra alkalmatlan vegyület már az *in vivo* vizsgálatok előtt azonosítható.

#### 4.1.2. Kardiotoxikus szerek vizsgálata hPSC eredetű szívműködő sejteken



**11. ábra: Reprezentatív high content mikroszkópos felvételek kontroll DMSO-val (a) és doxorubicinnel (b) kezelt hiPSC eredetű szívműködő sejtekről.** Doxorubicin a DNS degradáció erős stimulálójá, amely a sejtmembrán permeabilizálása és a mitokondriális membránpotenciál befolyásolása nélkül is növeli a kaszpáz3/7 szubsztrát szintjét és így korai apoptózist eredményez a sejtben. Nekrózis markerként ToPRO3-at használtunk.

A kidolgozott őssejt-alapú kardiális toxicitás assay-k klinikai alkalmazása is lehetséges. Ennek igazolására az onkológiai terápiában használt szerek hatásait vizsgáltuk hPSC-eredetű szívizomsejteken. Kimutattuk, hogy a humán iPSC eredetű szívizomsejtekben a kemoterápiában alkalmazott antraciklin (doxorubicin) kezelés hatására a kaszpázok aktiválódása fokozódik, megtartott mitokondriális membránpotenciál mellett is (11. ábra). Észlelésünknek a kemoterápiás szerek kardiotoxikus hatásainak jobb megértésében, ezáltal azok kivédésében lehet fontos szerepe. A beállított assay-k ugyanakkor nem tették lehetővé a mitokondriális funkciózavar teljeskörű analízisét, így a mitokondriális fragmentáció mérését sem, amely jellemzően szintén megfigyelhető doxorubicin hatására (Cao és mtsai, 2008). A kemoterápiás szerek főként a gyorsan osztódó tumorsejtek elpusztítását célozzák. A kardiovaszkuláris mellékhatásaik elsősorban az általános toxikus hatásaikkal, és legtöbb esetben az alacsony szöveti-specifitással hozhatóak kapcsolatba. A célzottabb kemoterápiás kezelések jelentősége ennek megfelelően megnőtt, de számos vegyület esetében a kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt negatív hatásukat így sem lehet kivédeni (Szebeni és mtsai, 2012). A tirozin kinázok gátlása antitestekkel vagy kis molekulájú gátlószerekkel egyike ezeknek a terápiás útvonalaknak (12. ábra). Ezen hatóanyagok a tumorsejtek apoptózisát aktiválják a PI3 kináz, STAT5 és Akt útvonalakon keresztül. Ezek az útvonalak azonban a szívizomsejteken is központi szabályozó szerepet töltenek be, ezért gyakran sejtprotektív útvonalak gátlása mitokondriális dysfunctiot, energiaháztartási zavart és sejthalálózást okoz. Ilyen a Her2-gátló trastuzumab, amely a neuregulin útvonalat blokkolja. A kemoterápiás szerek kardiotoxikus hatásának korai kimutatása számos akadályba ütközik. A humán monoklonális antitestek biztonságosságának megítélésére az állatkísérletes modellek legtöbbször nem megfelelőek, cytokin vihar alakulhat ki a kísérleti szer esetében is az első klinikai kipróbálás során egészséges vizsgálati alanyoknál (Suntharalingam és mtsai, 2006). A mérsékelt pro-apoptotikus vagy nekrotikus hatású szereknél a hatás nem mindig igazolható, vagy mert nem elegendő hosszúságú a követési idő, vagy mert a modellben egészséges és nem szívbeteg vagy idős állatokat alkalmaznak (Albini és mtsai, 2010). A kombinált kezelések hatásának pontos jellemzése szintén külön vizsgálati stratégiát, nagy elemszámú állatcsoportot igényel.



**12. ábra: Sejtthalálási profil CDI hiPSC eredetű szívizomsejtekben, doxorubicin (24 óra), lapatinib és docetaxel kezeléseket követően.** A lapatinib (5µM) párhuzamos adása potenciózza a doxorubicin kiváltotta sejtoxicitást hiPSC-CM sejtekben (zöld). Ez esetben a sejteket 24 órát lapatinibbal kezeltük a doxorubicin adását megelőzően. A sejtthalálást több változó, így a mitokondriális depolarizáció mértéke (a), nekrozis (b), sejtmag átépülés és deformitás (c), sejtmag DNS degradációja (d), aktivált kaspáz-mediálta apoptózis (e) meghatározásával jellemeztük. A kombinált kezeléseknél lapatinib (5µM; 48óra), doxorubicin (3µM; 24óra) docetaxel (0.0003 – 0.01 µM), trastuzumab (100-1500 µg/ml). n=3 kísérlet, 6 ismétlésben. f. TaqMan TLDA PCR array, amelyen 46 sejtthalálással összefüggő gén expressziós aktivitását mértük a kérdéses csoportokban. A hőkép 3 biológiai ismétlés adatait mutatja be, ahol az egyes géncsoportokat hierarchikus klaszteranalízissel csoportosítottuk.

#### 4.1.3. Immunszuppresszív szerek a szívizomsejtek halálózásában

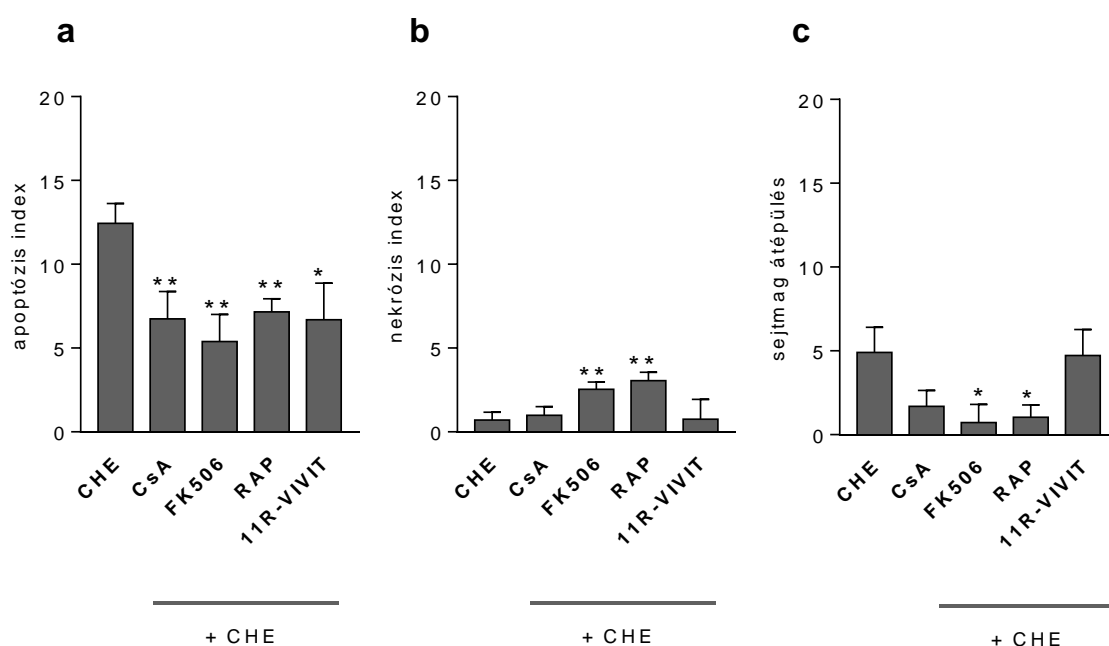
Az immunszuppresszáns gyógyszer család több tagja alkalmazásra kerül a sejterápiában és kardiális transzplantációban. Megvizsgáltuk ezért e gyógyszerek sejthalálózást befolyásoló aktivitását. A sejthalálózás kiváltására a hESC-CM sejt kultúrákat chelerythrine-nel kezeltük ismét; a sejthalálózást aktív kaszpáz3, BOBO-1 nekrozis marker immunfluoreszcens detektálásával, valamint a sejtmag átépülés leírásával kvantifikáltuk. Ezek alapján az alkalmazott immunszuppresszánsok mindegyike csökkentette a chelerythrine hatását (13. ábra). A nekrozis index alacsony maradt a chelerythrine kezelés mellett, és az FK506 és rapamycin mellett csak mérsékelten emelkedett (egyenként  $P < 0.01$ ). Az FK506 és rapamycin csökkentette az indukált sejtmag átépülést.

A szívizomsejtek regeneratív kapacitásának érdemi hiánya különösen érzékennyé teszi a szívet a külső káros behatásokra, így többek között az oxidatív stresszre. A felnőtt patkány sejtekkel ellentétben (Zhao és mtsai, 2011) kimutatható volt, hogy a klinikai dózisban adott immunszuppresszánsokkal kezelt hESC-CM sejtek nem apoptotizálnak vagy nekrotizálnak. A calcineurin gátlásán kívül, a cyclosporin A növeli az intracelluláris kalcium szinteket (Hong és mtsai, 2002). Továbbá növeli az oxidatív stresszt a felnőtt patkány szívizomsejtekben, ennek következtében ott az intrinsic apoptotikus útvonalat aktiválja (Elmore, 2007). A hESC-CM sejtek, mind az energiafelhasználásuk, mind morfológiájuk tekintetében viszonylag éretlen szívizomsejtek (Cao és mtsai, 2008). A génexpressziós és protein expressziós profiljuk szintén arra utal, hogy ezek a sejtek a felnőtt kamrai sejtekhez hasonló érettséget nem érnek el a differenciáció végére. Ez az eltérés egyben egy természetes rezisztenciát jelenthet a cyclosporin A indukálta válaszokra. Kísérleteinkben sem az FK506, sem a 11R-VIVIT, amely a calcineurin/NFAT kapcsolat specifikusabb gátlószere, nem fokozta a sejthalálózást. Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy a calcineurin/NFAT gátlás nem jelent közvetlen toxikus ártalmat a hESC-CM sejt kultúráknak. Az mTOR-ra ható rapamycin autofágiában betöltött szerepét részletesen leírták már (Rubinsztein és mtsai, 2007). Kontroll körülmények között az mTOR gátlása szintén nem befolyásolta a szívizomsejtek életképességét. A transzplantációt követően az őssejt-származékok a sérült myocardiumban számos gyulladáscsökkentő citokin, neurohormonális faktor és hypoxia hatására károsodhatnak. Ennek in vitro modellezésére a szívizomsejteket oxidatív stressznek tettük ki.

A cyclosporin A védő hatásának bizonyult a különféle oxidatív stresszorok ellen, így a reoxigenizációs károsodás (Griffiths és mtsai, 2000), chelerythrine (Wan és mtsai, 2008) és a doxorubicin kezelés alkalmazásakor (Montaigne és mtsai, 2011). A chelerythrine a reaktív oxigéngyökök, valószínűleg  $H_2O_2$ , felszabadulásán keresztül növeli a sejtek apoptózisát; ez a hatás kifejezettebb, mint a vegyület PKC-gátló hatása. Az apoptózis során a kaszpáz3 aktivációja rapidan fokozódik (Yamamoto és mtsai, 2001). Kimutattuk, hogy a CsA, FK506 és a 11R-VIVIT részlegesen gátolják a chelerythrine-indukálta kaszpáz3 aktivációját hESC-CM sejtekben. A calcineurin gátlása közvetlenül is javíthatja a sejtek életképességét, erre a 11R-VIVIT-specifikus NFAT-gátló hatása utal. Azt azonban nem lehet kizárni, hogy további

mechanizmusok is állhatnak az észlelt védőhatások hátterében. Így a mitokondriális permeabilitási pórus nyitásának gátlása (cyclosporin A) (Alfaro és mtsai, 2008) és az mTOR gátlása (FK506) (Romano és mtsai, 2010). A rapamycin részleges védőhatása szintén igazolható volt chelerythrine-kezelt szívizomsejtekben, ami arra utal, hogy az mTOR gátlása oxidatív stresszben pozitív hatású lehet. Ez egybevág mások korábbi vizsgálati eredményeivel is, ahol a rapamycin protektív hatását írták le ischaemia-reperfúzió során egérben, illetve felnőtt egér szívizomsejtekben (Khan és mtsai, 2006).

Levonható az a következtetés ezek alapján, hogy az allogén sejtek transzplantációjakor myocardialis infarktust követően, amikor a lokális ischaemia és oxidatív stressz káros lehet a beültetett sejtek számára, az immunszuppresszív szerek javíthatják a beültetett kardiális graft sejteinek életképességét. A hESC-CM sejtekkel végzett transzplantációs vizsgálatokban a cyclosporin A, az általunk is alkalmazott dózisban, javította a sejtek túlélését (Laflamme és mtsai, 2007; Pearl és mtsai, 2011; Swijnenburg és mtsai, 2008).

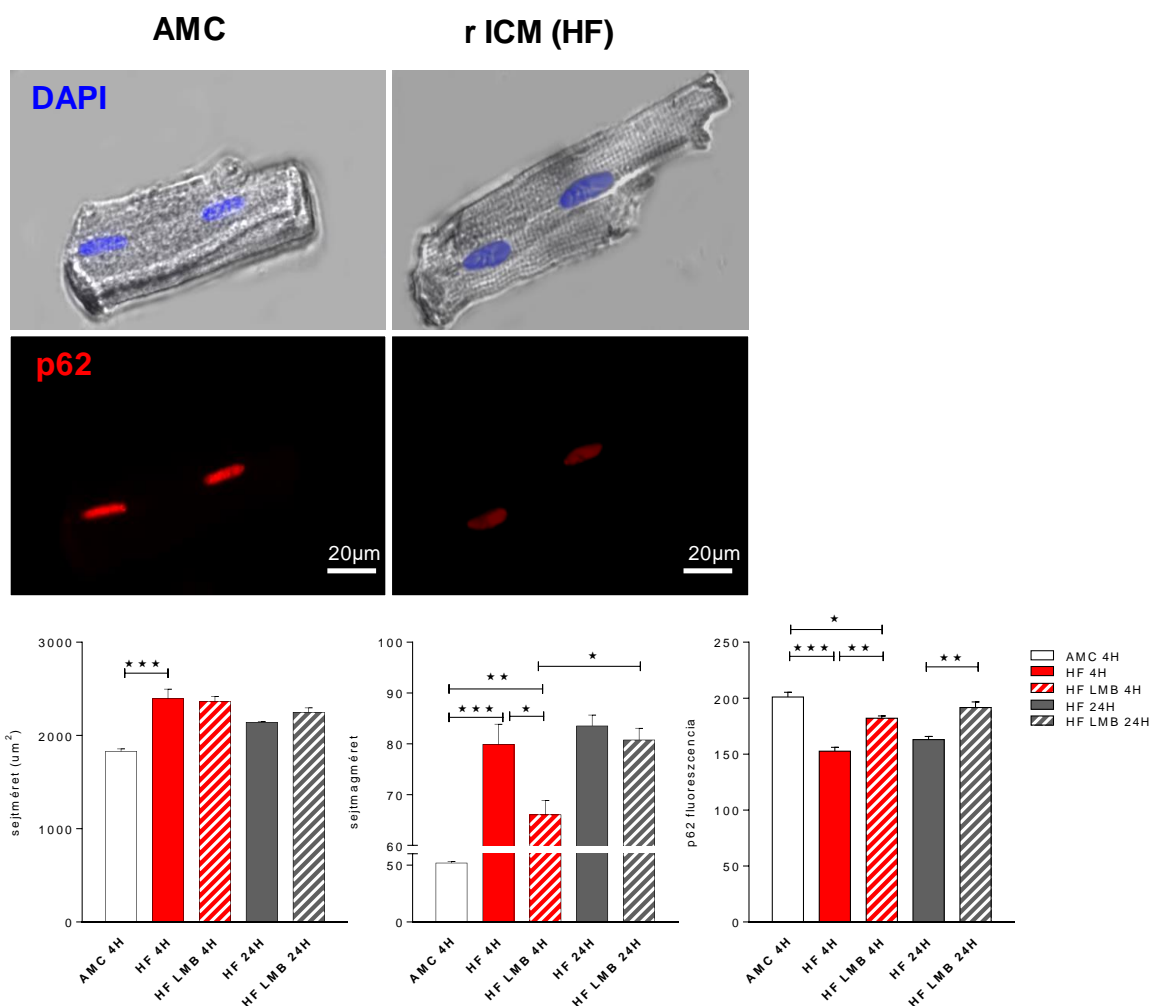


**13. ábra:** Az immunszuppresszánsokkal való előkezelés hatása a hESC-CM sejtek chelerythrine-indukálta apoptózisára (a), nekrozisára (a) és a sejtmaguk átépülésére (c). Az alkalmazott szerek cyclosporin A (CsA), tacrolimus (FK506), rapamycin (RAP), és 11R-VIVIT. ANOVA, n=15 >2000 sejt / kezelési csoport. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. kontroll.

## 4.2. Sejtmag transzport

A patológiás hypertrophia sok éve intenzív kutatások tárgya, de mostanra gyűlt össze elég bizonyíték, hogy a hypertrophiás jelátvitel számos párhuzamos és sokszor egymással átfedő útvonal aktiválódását és kölcsönhatását jelenti. A részletes állatkísérletes eredmények, valamint az emberi myocardium közvetlen vizsgálata olyan összefüggéseket írt le a hypertrophiás szabályozó hálózatok komplexitásáról, és az egyes elemek többszörös átfedéséről (Ryall és mtsai, 2012), amelyek a gyógyszerfejlesztési lépések megtervezését kifejezetten nehezé teszik. Ez magyarázhatja, miért nem sikerült eddig hatékony, terápiásan

használható anti-hypertrophiás gyógyszereket kifejleszteni. A high throughput technikák és az őssejt-alapú in vitro modellek kombinálása ideális megoldásnak tűnik a tisztázatlan kérdések megválaszolására és gyógyszerfejlesztési megoldások további optimalizálására. Ezen sejtszintű párhuzamos folyamatok egyik központi, de kevésbé vizsgált eleme a sejtmag transzport szabályozása. Ennek egy központi lépése során a  $G_{\alpha q}$  útvonal aktiválódása számos rapid folyamatot indít be, amelyek a szívizomsejt sejtmag működését érintik. Ezek a szívelégtelenség kialakulásában patkányban, az infarktus modellben és a humán szívelégtelen sejtekben egyaránt kimutathatók. A nukleáris transzport integráló csomópontja lehet azoknak a jelátviteli utaknak, amelyek végül a hypertrophiás gének aktiválódásához vezetnek, így a sejtmag transzporttal mint egy potenciális terápiás gyógyszerfejlesztési célponttal számolhatunk.



**14. ábra: Patkány ischiemiás szívelégtelen sejtekben a sejtméret és a sejtmagméret egyaránt növekszik.** Ez együtt jár a p62 és más import fehérjék szintjének csökkenésével. A sejtmag export gátlása (leptomycin B, LMB, 4 óra) kivédi a hypertrophiás választ és a sejtmag növekedését, valamint a p62 szinteket normalizálja a szívelégtelen sejtekben (n=3). AMC, felnőtt egészséges szívizomsejtek; rICM, ischiemiás cardiomyopathia, patkányban; HF, szívelégtelenség.

A hypertrophiát mediáló mechanizmusok és folyamatok időbeli lefutásának tisztázására  $\alpha$ -adrenerg agonista phenylephrine-t használtunk, amely a  $G_{\alpha q}$ -mediálta pathológiás

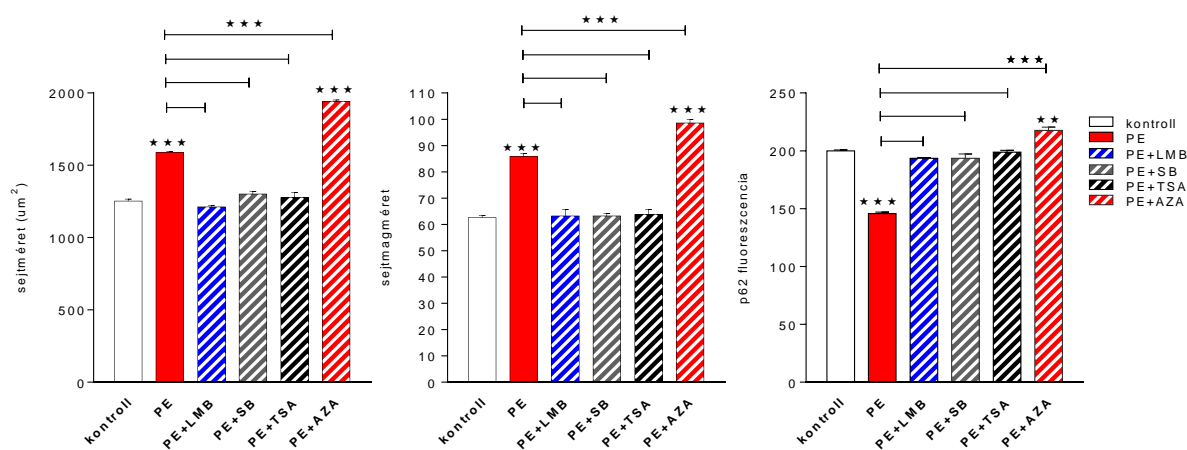
hypertrophia egyik ismert stimulusa (Davies és mtsai, 1994; Geng és mtsai, 1999). A felnőtt patkányból izolált szívizomsejteket 48 órán át kezeltük, ennek következtében a sejtméret, a sejtmagméret és az ANF expresszió jelentősen megnőtt a kontrollhoz képest. Emellett egy *in vivo* ischemiás szívelégtelenség modellben a patkányok infarktuszát követő 16. héten (kifejlődött szívelégtelenségben) ennél még kifejezettebb ANF választ is kaptunk. A phenylephrinere adott válasz hasonlóan alakul: megnövekedett CRM1 export protein szintek, csökkenő import protein expressziók, az import folyamatért felelős receptorok átépülése, valamint a fluoreszcensen jelölt NLS (*nuclear localization signal*)-kapcsolt szubsztrát csökkent felvétele sorolható fel (14. ábra).

A neonatális patkány szívizomsejtekben phenylephrine vagy angiotenzin II hatására, illetve a celluláris kalcium szintek direkt csökkentése nyomán a sejtmag importfolyamata gátlódik. Ennek kapcsán megfigyelhető a nukleáris pórusok átépülése, és az ennek következtében megváltozott egyensúly a hypertrophiás fenotípus kialakulásának egy korai lépését jelenti. Vizsgálataink azt igazolták, hogy a modellben fluoreszcens jelölésként alkalmazott sejtmag lokalizációs szignál (NLS) szubsztrát felvétele 15 perccel a phenylephrine adását követően fokozódik, ami arra utal, hogy a jelátvitel másodlagos hírvivő útvonalak aktiválódásához kötött, nem pedig egy direkt expressziós változáshoz. Azt találtuk, hogy a HDAC faktorok foszforilálódását és a sejtmagból való kikerülésüket (exportjukat) követően a hypertrophiás, többek között a MEF2 transzkripció faktor-mediálta génprogram aktiválódik. Az őssejt-alapú vizsgálataink szerint (Földes és mtsai, 2011) ezért kis molekulájú, HDAC II (Heineke és mtsai, 2006; McKinsey és mtsai, 2007) vagy p38 MAPK (Földes és mtsai, 2011) gátlószereket választottunk, hogy a különböző jelátviteli utak szerepét tisztázzuk a phenylephrine-indukálta hypertrophiás válaszban (15. ábra). A p38 MAPK gátlás szabályozó szerepét egyaránt igazoltuk siRNS csendesítés alkalmazásával és egy domináns negatív konstruktum overexpressziójával. A p38 MAPK hypertrophiás válaszban betöltött szerepe számos sejt- és állatmodellben igazolódott; a p38 gátlószerek kimutathatóan gátolják a hypertrophiás sejtnövekedést (Behr és mtsai, 2001; Kyoji és mtsai, 2006; Wenzel és mtsai, 2005). A saját kísérleteinkben a p38 gátlószerek mind a sejtméretet, mind az ANF expressziót csökkentették, és ezzel párhuzamosan a nukleáris importot is gátolták. A p38 MAPK transzgenikus overexpressziója vagy a kináz teljes csendesítése hatására a hypertrophia gátlását írták le, aktiválódást nem (Petrich és mtsai, 2004). A p38 gátlószerelemmel kapott eredmények azokkal a korábbi vizsgálatokkal is egybevágóak, amelyekben igazolható volt, hogy a sejtmag és cytoplazma közötti transzport különösen érzékeny a MAPK aktiválódására (Chahine és mtsai, 2009; Richard és mtsai, 2007). Érdekes, hogy a humán sejtekben mért hatások kevésbé voltak egyértelműek a felnőtt patkány sejtek hypertrophiájában.

Hasonló eredményeket kaptunk a HDAC gátlószerek alkalmazásakor is. Kimutattuk, hogy a jelátviteli utak gátlása trichostatin A (HDAC II-gátló) vagy SB202409 (p38-gátló) vegyületekkel normalizálja a nukleáris pórus expresszióját, visszaállítja a nukleáris import megfelelő alapértékét és a transzport receptorok újraeloszlását visszafordítja. Ez a felnőtt

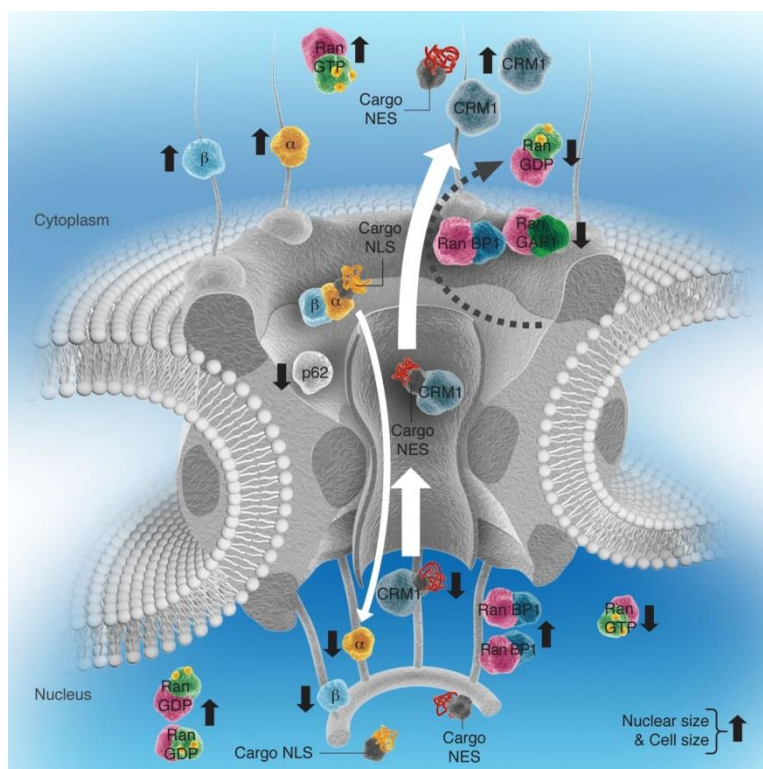


patkány szívizomsejtekben párhuzamosan zajlik az ANF szintek normalizálódásával és mind a sejt, mind a sejtmag méreteinek rendeződésével. A HDAC II gátlószerek módosítják - több gén locuson keresztül - a sejtmag pórus komplexumban a kromatin-nucleoporin (Nup, p62) kapcsolódást (Cao és mtsai, 2011), így feltételezhető, hogy a HDAC II közvetlenül is kapcsolódik a nucleoporinhoz a sejtmagban. Mivel a sejtmag export és import folyamatok ugyanazt az útvonalat használják a sejtmag póruson keresztül, ez a gátlás feltételezhetően kivédené a Nup szintek csökkenését és az ehhez társuló sejtmag irányú import csökkenését. A sejtmag-cytoplazma közötti aktív kommunikációs kapcsolat fenntartása szükséges a megnövekedett nukleáris exporthoz, így ez csak a sejtmag import gátlásának terhére történhet meg. A csökkent kapacitás így modulálná a MEF2-függő és az NFAT-mediálta transzkripciók folyamatokat és végül a szívizomsejtek hypertrophiás fenotípusának kialakulását is (16. ábra).



**15. ábra: Phenylephrine növeli a sejtméretet és sejtmagméretet 3 hónapos patkányokból izolált szívizomsejtekben.** A sejtmag export gátlása (leptomycin B, LMB), HDAC gátlás (trichostatin, TSA) és p38-MAPK gátlás (SB202190) egyaránt kivédik a hypertrophiás választ és a sejtmag növekedését. A GSK-3 $\beta$  (azakenpaullone, AZA) gátlása tovább növeli a sejt és sejtmag méretét. Phenylephrine hatására a p62 átlagos fluoreszcenciája csökken a 3 hónapos patkányokból izolált szívizomsejtekben. A sejtmag export gátlása (LMB), HDAC gátlás (TSA) és p38-MAPK gátlás (SB) egyaránt kivédik a p62 szint csökkenését. A GSK-3 $\beta$  (AZA) gátlása növeli az import mértékét (a p62 szint növekszik). \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001, egyutas ANOVA.

Hypertrophiás stimulusok hatására a transzkripciók faktorok nukleáris exportja jelentősen megnő, ennek megfelelően az export fehérje (CRM1) stabilan a cytoplazmában halmozódik fel. Ennek hatására a RanBP1, amely a GTP hidrolízist mediálja, nem transzlokálódik a cytoplazmába a CRM1 hatására, és további fontos import receptorok (importin- $\alpha$  és  $\beta$ ) szintén kikerülnek a RanGTP-vel együtt a cytoplazmába. Így a sejtmagban nem marad megfelelő mennyiségű, újra felhasználható importin fehérje, ami magyarázhatja a csökkent nukleáris import aktivitást. Összességében hypertrophiás körülmények között a sejtmag és a sejtek mérete egyaránt megnő, a CRM1 cytoplazmatikus transzlokációja fokozódik, míg a RanBP1, Nup p62 szintek és az importin- $\alpha$  és  $\beta$  nukleáris transzlokációja csökken.

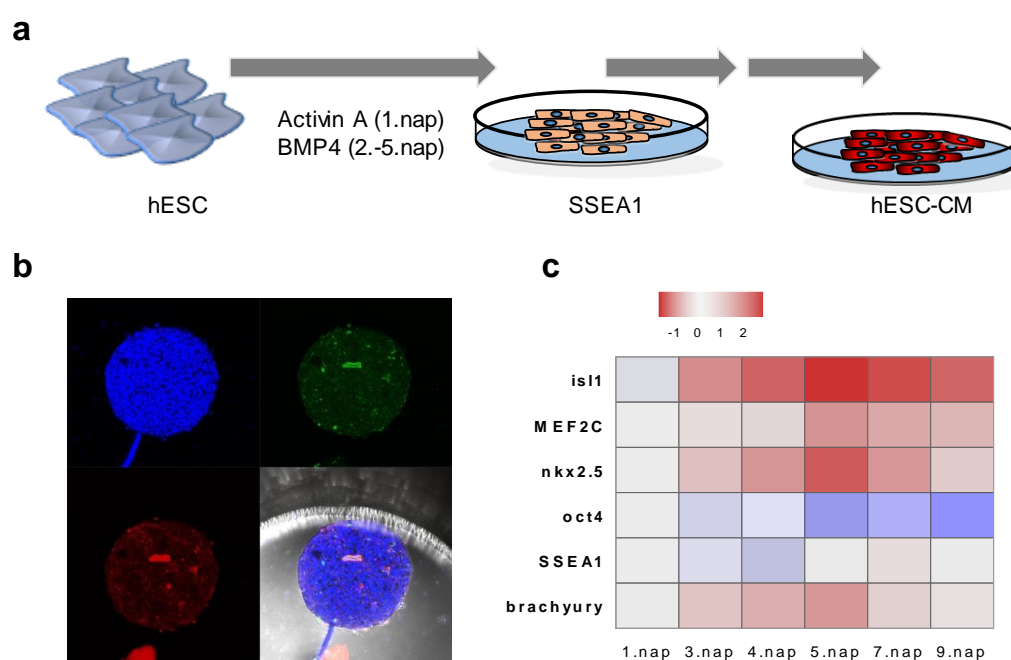


**16. ábra: A nukleáris transzport hipotetikus modellje a myocardialis szövetben és izolált szívizomsejtekben.** Kontroll (patkány) sejtekkel vagy egészséges humán szívizomsejtekkel összehasonlítva, a nukleáris import (NPI) és export (NPE) sérült patkány szívizomsejtekben 48 órás phenylephrine kezelést követően vagy patkány ischiemiás cardiomyopathiában, vagy humán DCM-ben. A fehér nyilak mérete arányos a transzport változások mértékével. Az ábra a mechanizmust egyszerűsítve mutatja be és a CAS, RanGEF, és NTF2 elemeket nem tárgyalja (Chahine és mtsai, 2015 alapján).

A sejtmagtranszport rendszerének átépülése és funkciójának megváltozása a szívelégtelenség korai hypertrophiás fázisában megfigyelhető volt, már 4 héttel az átépülést kiváltó myocardialis infarktust követően. Hasonlóképpen, ez a válasz más modellekben, így phenylephrine-indukálta hypertrophiában is kimutatható volt. Mindez egybevág a korábbi, egér és nyúl *in vivo* modellekben, valamint a humán izolált szívizomsejtekben végzett mérések eredményeivel (Ljubojevic és mtsai, 2014). Ezek a kísérletek egybehangzóan igazolták, hogy a korai változások a sejtmag struktúrájában és a sejtmagbéli kalcium jelekben jönnek létre és ez vezet a hypertrophiás gének aktiválódásához. Az exportin/crm1-függő sejtmag export gátlása leptomycin B-vel meggátolja, sőt visszafordítja a hypertrophiás folyamatot (így a sejtméretet, a foetalis génexpresszió aktiválódását és a sejtmag átépülését). Kérdés marad azonban, hogy a crm1-függő export hosszútávú gátlása mennyiben befolyásolja a kardiális funkciót. A leptomycin B normalizálja ugyan a sejtmag export/import aránytalanságát krónikus phenylephrine kezelés mellett, azonban a vegyület cytotoxikus hatása miatt a szélesebb körű alkalmazása nem valószínű (Senapedis és mtsai, 2014). A sejtmagexport elsősorban onkológiai céllal kifejlesztett, új szelektív gátlószerei (SINE) már rendelkezésünkre állnak, ezek vizsgálata érdekes új klinikai lehetőség lehetne szívelégtelenségben is (Bossuyt, 2015). Az ilyen gátlószerekkel a sejtmagtranszportot lehetne közvetlenül befolyásolni, nem pedig a transzportált faktorokat.

### 4.3. Össejt eredetű szívizomsejtek differenciációja és jellemzése

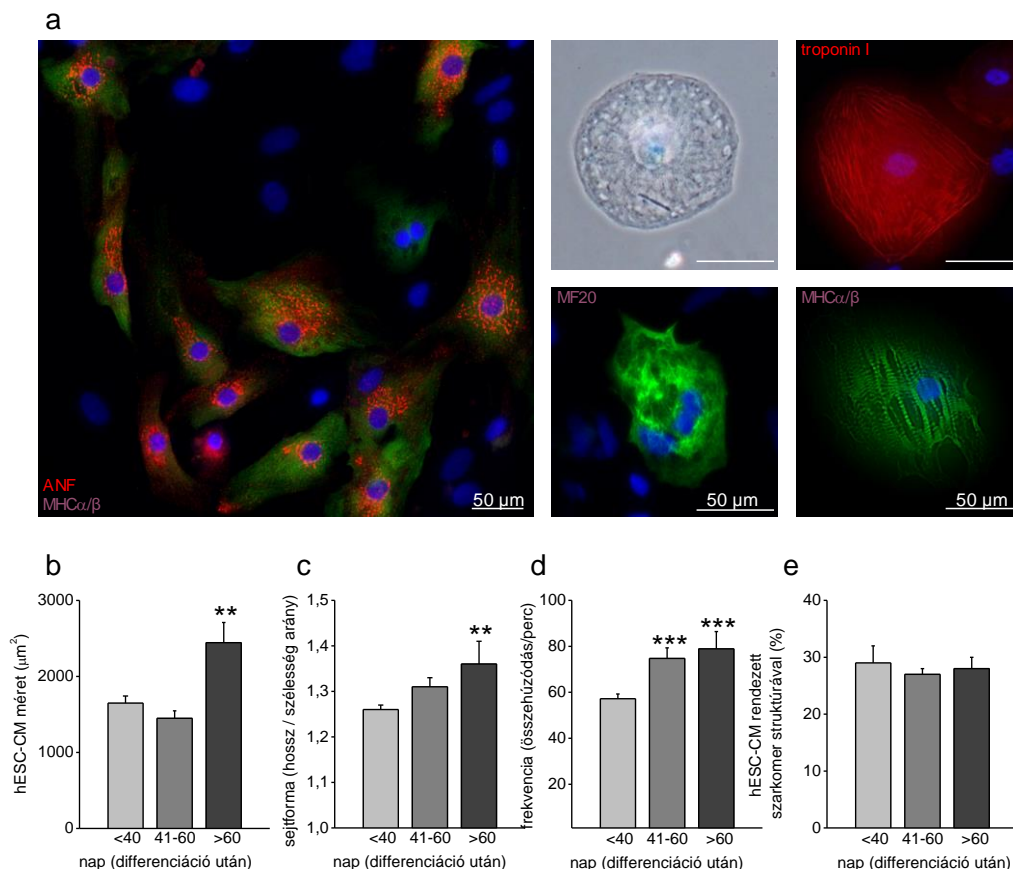
A szívizomsejtek differenciáltatásához használt protokollok jelentősen fejlődtek az elmúlt évtizedben. A kezdeti szívizomsejt arány 5-10% közé volt tehető, ezt 3D embrionális testek létrehozásával és szérum-tartalmú médium alkalmazásával érték el. Ahogy ezt a high content mikroszkópos méréseink igazolják, a jelenleg alkalmazott metodikával (5. ábra, alsó sor) ma már >95% tisztaságú szívizomsejt kultúra hozható létre. A monolayer technikánál (Aggarwal és mtsai, 2014) ugyan a GSK3 $\beta$  gátlók indukálják a kardiális differenciációt, de a teljes hatáshoz az endogén BMP4 és Activin/NODAL/TGF $\beta$  jelátvitel aktiválására is szükség van. Látható, hogy az in vitro alkalmazott szignálok kifejezetten hasonlítanak az in vivo embrionális fejlődés központi szignáljaira. A differenciáció során a pluripotens őssejtek az in vivo mintához hasonlóan T (brachyury)-pozitív(+), MESP1<sup>+</sup>, NKX2-5<sup>+</sup>, MEF2C<sup>+</sup>, TBX5<sup>+</sup>, és végül miozin nehézlánc (MYH6<sup>+</sup> / MYH7<sup>+</sup>) populációs fázisokon mennek keresztül. Az ezért felelős génhálózatok aktivitása szintén megfeleltethető az in vivo génmintázatnak. A humán pluripotens őssejtek szívizomsejt irányú differenciációjakor egy alternatív, de klinikai jelentőséggel is bíró megoldást jelent a multipotens kardiovaszkuláris progenitorsejtek létrehozása (Cao és mtsai, 2013). A 17. ábra a SSEA1/CD15<sup>+</sup> sejtek differenciációját mutatja be. A létrehozott sejtek terápiás jelentőségét az adja, hogy elsőként ezeket a sejteket használták fel hESC-alapú klinikai kardiológiai vizsgálatban (Menasche és mtsai, 2015). A sejtek progenitor fázisig való differenciáltatása a GSK3 $\beta$ , BMP és Activin/NODAL/TGF $\beta$  jelátvitel egyidejű gátlásával érhető el. A sejtek tartós proliferációs aktivitása is megfigyelhető ebben a stádiumban, miközben megőrzik képességüket, hogy simaizomsejtekké, endothelsejtekké és szívizomsejtekké alakuljanak tovább. Ezen átmeneti fázisban fenntartott



**17. ábra: Kardiális progenitorsejtek differenciációja.** (a) humán pluripotens őssejteket Nodal ligand Activin A-val és BMP4-gyel kezeltük, majd a differenciálódó kardiális progenitorsejteken meghatároztuk az SSEA1 expresszióját. (b) a létrehozott sejtekből 3D struktúrákat hoztunk létre függőcseppes metodikával. (c) A differenciálódó progenitor sejtek génexpressziós változásait kvantitatív PCR-rel határoztuk meg, ezt a hőtérkép mutatja.

sejtek lehetőséget jelenthetnek arra, hogy belőlük nagy mennyiségű sejterápiás terméket lehessen létrehozni, azonban a protokollok pontosításra és további validálásra szorulnak.

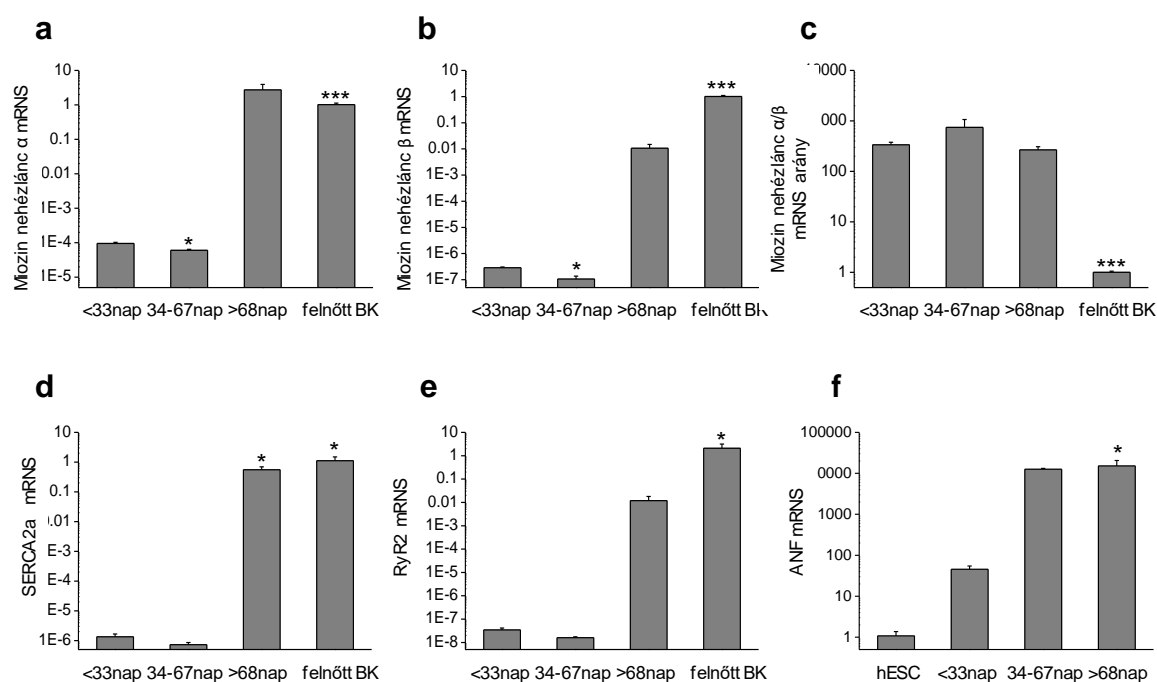
A felnőtt szívizomsejtekhez képest az őssejt eredetű szívizomsejtek mérete relatíve kicsi (20  $\mu\text{m}$ ), formájuk változó. Ezek a szívizomsejtek képesek spontán kontrakcióra, az összehúzódások frekvenciája magasabb a késői sejt kultúrákban. A strukturális érésre más bizonyítékot is találunk a tartós sejt kultúrában: ezekben a sejtekben már nemcsak szabálytalan myofibrillum, hanem rendezett szarkomer rendszer is látható (18. ábra). Ugyanakkor a sejteknek mindössze néhány százaléka ilyen érettebb forma, a sejtek jelentős többsége megőrzi valamiféle éretlen struktúrát még a késői kultúrákban is (19. ábra). Elektrofiziológiai vizsgálatokkal több szívizomsejt populáció is elkülöníthető a sejt kultúrában. Kamrai, pitvari, és nodalis/pacemaker sejtek egyaránt megtalálhatóak (Lee és mtsai, 2017).



**18. ábra: Humán ESC-eredetű szívizomsejtek jellemzése tartós kultúrában.** (a) Reprezentatív immunfluoreszcens képek a hESC-CM sejt kultúráról. A sejteket atriális nátriuretikus faktor (ANF), troponin I, miozin nehézlánc  $\alpha/\beta$  és szarkomerikus MF20 miozin antitestekkel jelöltük, fénymikroszkópos felvételek mellett, 30 nappal a differenciációt követően. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük. (b) Az oszlopdiagramok a sejtméretet (b), sejtek alakját (hossz/szélesség arány) (c), a sejtösszehúzódások frekvenciáját (d), valamint a rendezett szarkomer struktúrájú sejtek arányát (e) mutatják három időpontban a differenciáció után (15-40 nappal, világos szürke, n=6; 41-60 nappal, n=6, szürke; >60 nappal, n=6, sötétszürke). Átlag  $\pm$  SEM (egyutas ANOVA \*\*P  $\leq$  0.01, \*\*\*P  $<$  0.001 vs. korai időpont).

A szívizomsejtek differenciáltatása során egy fontos lépést jelent annak meghatározása, hogy a létrehozott sejtek milyen üregi specificitást mutatnak, a kamrai, pitvari, pacemaker sejtek hogyan különíthetők el a populációban. Az elkülönítésnek fontos terápiás jelentősége lehet, hiszen a kamrai sejtek transzplantációja az ischemiás szívbetegek kezelésében

játszhat szerepet, míg a nodális sejtek bejuttatása a ritmus- és vezetési zavarok sejterápiás megoldását jelenthetik. A differenciált hPSC eredetű kultúrában a kamrai sejtek dominálnak, a pitvari szívizomsejtek ~15–20%-ot, míg a nodális sejtek ~5%-ot tesznek ki. Az egyes altípusok elkülönítésére struktúrális, elektrofiziológiai és molekuláris markerek állnak rendelkezésre (Kane és mtsai, 2017). A fenotipizálás pontosításával a célzottabb, kamra-specifikus differenciáció is rutinszerűvé válhat.

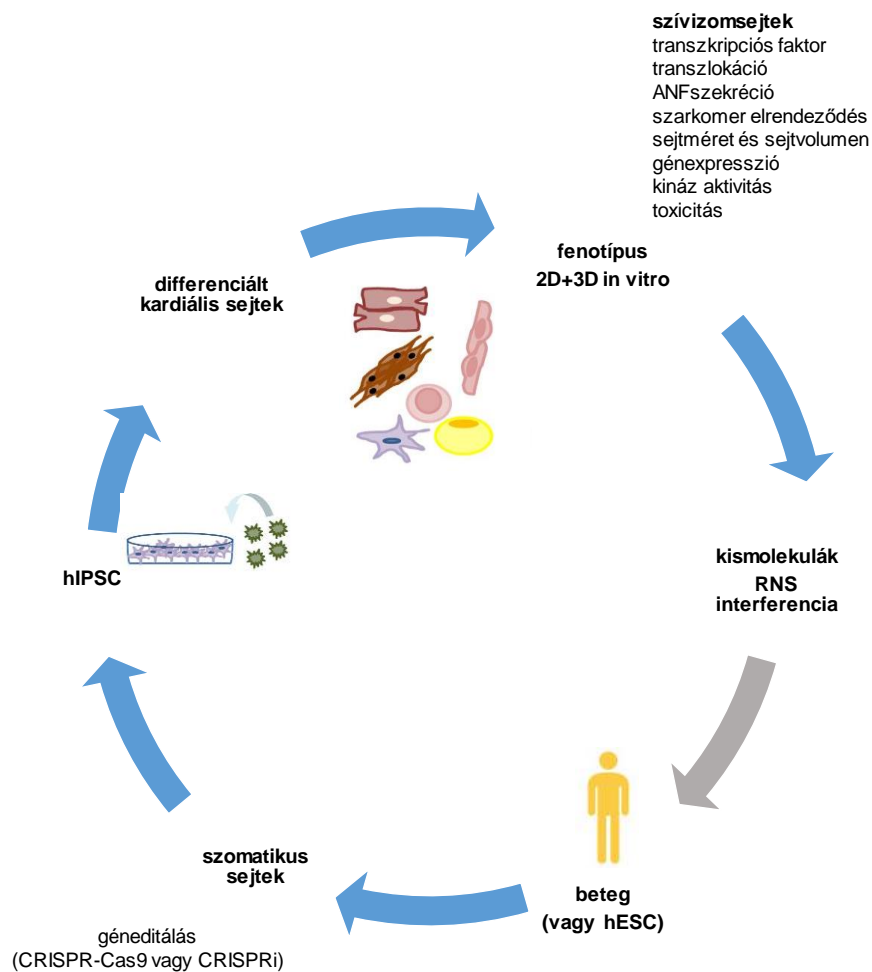


**19. ábra. Génexpressziós változások hESC-CM sejtkultúrában.** Kvantitatív PCR az α miozin-nehézlánc (a), β miozin-nehézlánc (b), α/β miozin-nehézlánc arány (c), SERCA2a (d), ryanodin receptor 2 (RyR2) (e), és ANF (f) mRNS szinteket mutatja a differenciációt követő korai hESC-CM sejtekben (11-33 nap), közepes érettségű (34-76 nap), késő differenciációs időpontban (>68 nap). Az expressziós változásokat felöltt bal kamrai mintához (a-e), illetve differenciálatlan hESC mintához hasonlítottuk (f) (n = 3). Az mRNS szinteket átlag±SEM-ként ábrázoljuk, egyutas ANOVA, \*P< 0.05, és \*\*\*P< 0.001 vs. korai csoport (a–e) illetve hESC (f).

#### 4.3.1. Beteg-specifikus szívizomsejtek

Az elmúlt évek új fontos iránya a humán pluripotens őssejtekből képzett kardiovaszkuláris sejtek (szívizomsejtek, endothelsejtek és simaizomsejtek) korai gyógyszervizsgálatokra és a szívbetegségek *in vitro* modellezésére való alkalmazása. A humán embrionális őssejtekből differenciált sejtek (hESC-CM) és az indukált pluripotens őssejtekből képzett sejtek (hiPSC-CM) betegség- és beteg-specifikus genotípussal és fenotípussal bírnak (Park és mtsai, 2008). Ezek a sejtek a natív, felöltt szívizomsejtek számos tulajdonságát mutatják és fenotípusuk hasonlósága biztosíték lehet arra, hogy az egyes humán szívbetegségeket *in vitro* körülmények között reprodukálni lehessen. A humán indukált pluripotens őssejteket alkalmazó betegségmodellezés alapja az, hogy a betegek testi sejtjeiből (leggyakrabban: a perifériás vér lymphocytái és bőr fibroblasztok) transzkripciós faktorok kívülről való bejuttatásával embrionális állapotba visszaprogramozott őssejteket (iPSC) hozunk létre. Ezt

követően az iPSC sejtekből a betegség által érintett sejtípusokat differenciáltatunk és ezeken vizsgáljuk a (kardiovaszkuláris) betegség megjelenését vagy egyes sejtszintű jellemzőit. Ennek az új és gyorsan fejlődő kutatási területnek jelenleg még sok szempontból kérdéses a felhasználhatósága és még nem láthatóak a korlátai. A humán pluripotens őssejtvonalak a laboratóriumban korlátlan ideig szaporíthatóak és a tenyésztési körülmények megváltoztatásával képesek a szervezetet felépítő sejtípusok létrehozására. A sémás protokollt, amely során a betegből nyert szomatikus sejtek újraprogramozhatóak, differenciáltathatóak, majd in vitro vizsgálhatóak, a 20. ábra mutatja. E tulajdonságaik alapján jó modellként szolgálnak az öröklött monogénes és számos szerzett kardialis



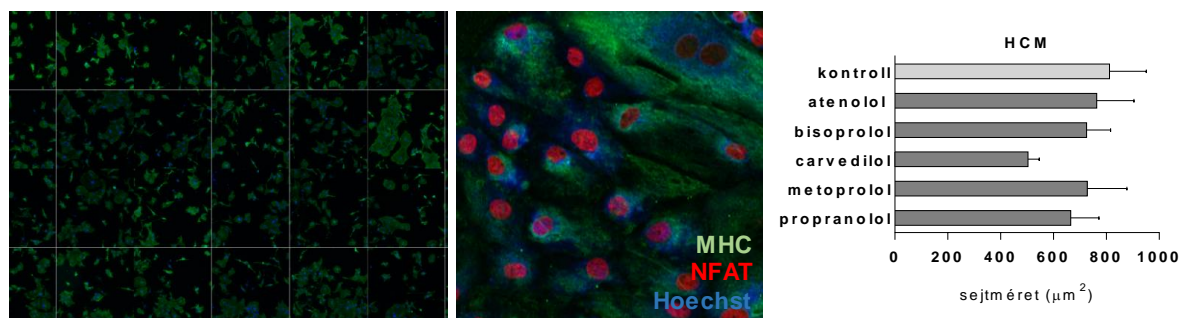
**20. ábra: Őssejt alapú betegségmodellezés és toxicitási vizsgálatok vázlatos algoritmusai.** A szomatikus sejtekből létrehozott őssejtek a megfelelő irányba differenciáltathatóak. A létrehozott kardiovaszkuláris sejtek fenotípusa in vitro körülmények között vizsgálható, erre kidolgozott assay-k alkalmazásával. A szívizomsejt-specifikus alkalmazások metodikai hátterét a Kriston-Vizi és mtsai, 2017 publikációnk részletezi.

megbetegedés mechanizmusának kutatására. Új tesztrendszerként alkalmazhatók a kardialis toxikológiai vizsgálatokban és a jövőben a sejt-alapú terápiák sejtforrásául szolgálhatnak. Nagy előnyük, hogy nemcsak az egészséges sejtek élettanát lehet kutatni a segítségükkel, hanem ha az őssejtvonalak létrehozásához betegekből származó sejteket használunk, akkor számos betegség is vizsgálhatóvá válik. Elsősorban azon betegségek, ahol az állatmodellek,

a rákos sejtvonalak, illetve a betegből származó primer sejttenyészetek vizsgálata nem hozott kellő eredményt.

Az első olyan, őssejtből-képzett szívizomsejt kultúra, amely szívbetegség fenotípusát mutatta, a hosszú QT szindróma 1. típusa volt. Ezt az úttörő lépést számos más öröklött - monogénes és poligénes - szívbetegség in vitro vizsgálata követte. A technika azt is lehetővé teszi, hogy a beteg genotípusát hordozó sejteken az egyes gyógyszerek hatását is vizsgálni lehessen. Ez a gyógyszeres kezelések személyre szabott optimalizálását, az egyes betegségekre való hajlam prognosztizálását, és új, még kísérleti fázisban levő kardiovaszkuláris gyógyszer-molekulák fejlesztését is segítheti. Emellett a humán iPSC sejt technológia és a genetikai módosító eljárások, például a CRISPR/Cas9-alapú génedítálás kombinálásával lehetővé válhat a jövőben, hogy egyes veleszületett kardiovaszkuláris rendellenességeket molekuláris szinten javítsanak ki.

Egyike az elsőként hiPSC modellben vizsgált kardiális megbetegedéseknek a familiáris hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) volt. A HCM autoszomálisan öröklődő familiáris megbetegedés, melyet az esetek 60-70 százalékában a szívizomsejtek kontraktilis szarkomer fehérjéit kódoló gének mutációi okoznak. Eddig több, mint 1500, főleg missense mutáció ismert; a mutációk kisebb része a frameshift kategóriába sorolható. A kardiovaszkuláris betegségek nagy részében 15 ilyen gén mutációjának valamelyikével kell számolni: a szarkomer fehérjék közül a miozin nehézlánc béta izoformája, a troponin T és I, a miozin könnyűlánc és a titin génjei emelhetők ki. Emellett szekvenálással további szarkomer fehérje gének mutációja is igazolható volt HCM-ben: így az alfa-aktinin, foszfolamban és a T-tubulusok kialakításáért felelős junctophilin 2. A familiáris HCM kifejeződése változó, penetranciája az életkorral mutat összefüggést. A betegség emellett új mutációk eredményeképpen, sporadikus formában is megjelenhet. Ebbe a csoportba sorolhatóak a szabályozó szerepet betöltő miozin-kötő fehérje C, a troponin T és az alfa-tropomyosin gének. A kontraktilis fehérjéket kódoló géneken kívül más gének is okozhatnak HCM megbetegedést. Ezek lehetnek a több szervrendszert is érintő szindrómák, mint a korábban részletezett Noonan-szindróma (RAS MAP kináz jelátvitel zavara), a myogén differenciálódást és kontraktilitást közvetetten moduláló LIM fehérje mutációja, az AMP-aktivált protein alegységének zavara (PRKAG2), a Danon-betegség (lizozóma-kapcsolt membránprotein, a LAMP2 gén mutációja) és egy tárolási betegség, a Fabry-betegség (amelyet az alfa-galaktozidáz A mutációja okoz). A most felsorolt kórképekben a miozin-kötő fehérje C mutációja a leggyakoribb (40-48%), de a HCM általában csak későn manifesztálódik. E késői megjelenés hátterében a renin-angiotenzin rendszer polimorfizmusával való kölcsönhatások állhatnak. További 25-40%-ot tesznek ki a miozin nehézlánc béta mutációk. A troponin T, troponin I, és alfa-tropomyosin együttesen pedig 5-10%-ot.



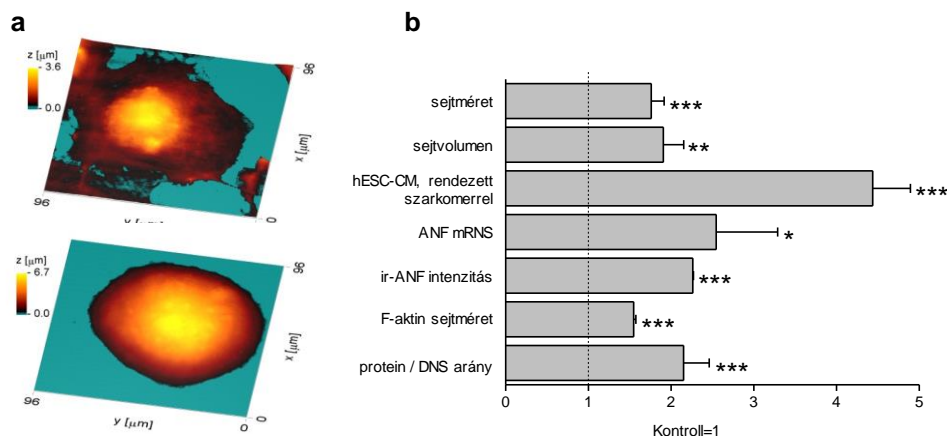
**21. ábra: Hypertrophiás cardiomyopathia modellezése hiPSC eredetű szívműködéseken.** Immuncytochemiás felvétel hiPSC eredetű szívműködésekről. NFAT transzkripciós faktor, piros, miozin nehézlánc, zöld. A hiPSC sejtek egy hypertrophiás cardiomyopathiás család tagjaiból készültek. (az alkalmazott őssejtvonalakról részletesen: Lan és mtsai. Cell Stem Cell 2013)

Az általunk vizsgált beteg esetében a  $\beta$ -myosin nehézlánc öröklött missense mutációját (Arg663His) sikerült igazolnunk. A betegspecifikus hiPSC-CM sejtekben az adrenerg receptorok expressziója kevésbé ismert. A receptorok szerepet játszhatnak a sejtek túlélésében, de ennek mechanizmusa nem tisztázott. A Stanford Egyetemen létrehozott hiPSC vonalakat (Lan és mtsai, 2013) együttműködésben differenciáltattuk szívműködésekké (21. ábra) és az adrenerg válaszkészséget ezeken a sejteken vizsgáltuk. Kontrollként a kereskedelmi forgalomban kapható iCell hiPSC-CM szívműködéseket használtuk, illetve a mutációt nem hordozó hozzátartozókból származó újraprogramozott sejteket. A kvantitatív PCR alapján nem volt időbeli változás a  $\beta$ -adrenerg 1 és 2 receptorok expressziójában (a kontroll mintákban igen). A felnőtt myocardiumból izolált RNS mintákhoz képest a kontroll és HCM hiPSC-CM béta-receptor expressziója jelentősen, hatvanszorosan alacsonyabbnak bizonyult. A klinikailag használt béta blokkolók (21. ábra) a HCM sejtek fenotípusát nem befolyásolták, a sejt mérete szignifikánsan nem változott. Carvedilol alkalmazásakor csökkenő tendenciát lehetett megfigyelni.

#### 4.4. A humán szívműködések hypertrophiás válaszkészségének vizsgálata *in vitro*

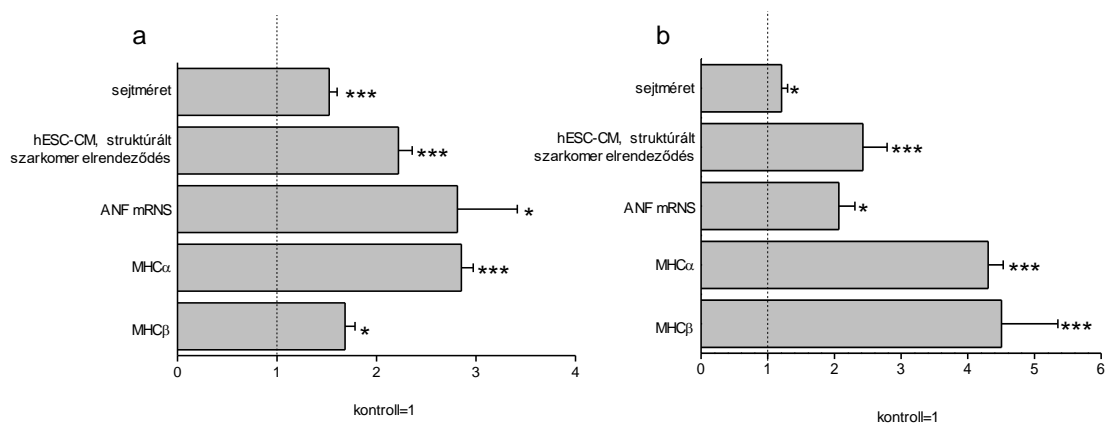
Az őssejt-eredetű szívműködések első *in vitro* alkalmazása az akut kardiális hatások modellezésére irányult: ezek a kontraktilitás vizsgálata, a frekvenciaváltozások detektálása, arrhythmiai vizsgálatok és a kardiotoxikus szerek hatásának vizsgálata. A szívhypertrophia nem akut, hanem hosszabb követést igénylő, klinikai jelentőséggel is bíró vizsgálati célkitűzés. Első őssejtmodelljeink azt igazolták, hogy a hESC-CM sejtek egyaránt képesek az ismert patológiás és fiziológias hypertrophiás stimulusokra választ adni (Földes és mtsai, 2011). Adrenerg stimulus hatására a hESC eredetű szívműködésekben az ANF génexpressziója jelentősen fokozódik, a sejtek teljes fehérjetartalma megnő; összességében egy érettebb, a felnőtt kamrai sejtekre sokban hasonlító sejt jön létre (22. ábra).





**22. ábra: Phenylephrine-indukálta hypertrophia hESC-CM sejtekben.** (a) Scanning ion conductance mikroszkópos felvételek a hESC-CM sejtekről 30 nappal a differenciáció után phenylephrinnel kezelve (10  $\mu$ M, 48 óra, bal alsó panel), illetve anélkül (bal felső panel). (b) Az oszlopdiagram a sejtméret, sejtvolumen, rendezett szarkomer struktúrájú sejtek, ANF mRNS és intenzitás értékek, F-aktin sejtméret megoszlás és a teljes protein/DNS arány változásait mutatja phenylephrine hatására. A miozin-pozitív sejtek  $19.5 \pm 4.3$  %-a mutatott rendezett struktúrát, míg ez a phenylephrine kezelt csoportban  $65.2 \pm 5.6$  % volt,  $n = 6$  izolálás ( $n > 100$  MHC-pozitív sejt analízise alapján, ANOVA, átlag  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. kontroll csoport).

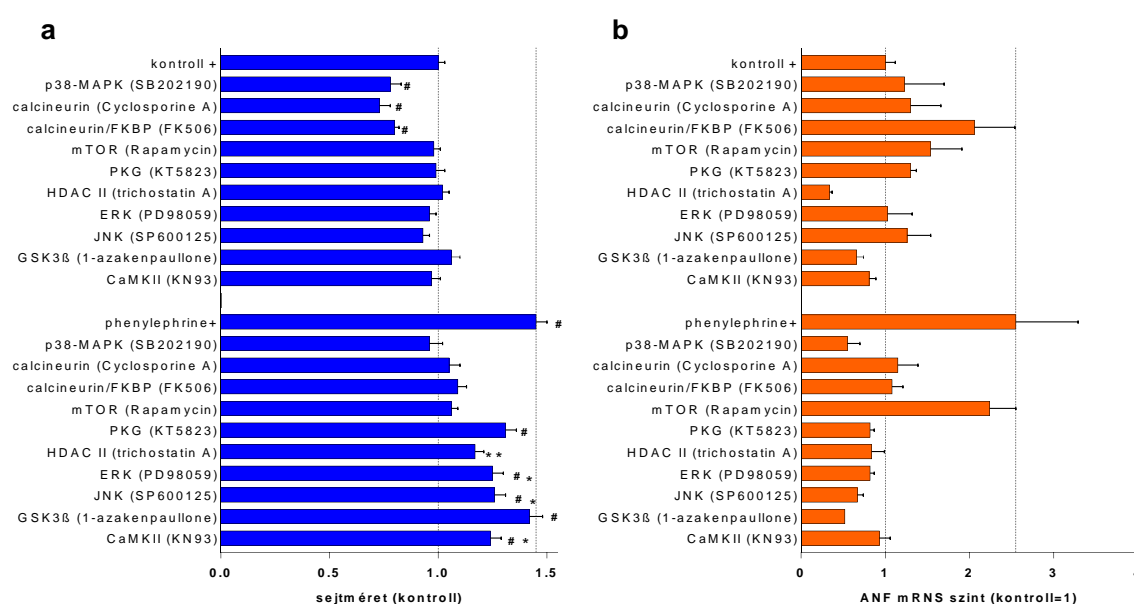
Egy mechanikus stimulust, a ciklikus feszítést alkalmazva (percenként 30x feszítés szilikon membránon, 24 órán át), hasonló változásokat regisztráltunk sejtek hypertrophiás válaszában, így a sejt méretében és szarkomer struktúrájának elrendeződésében (23. ábra).



**23. ábra: Ciklikus nyújtás és angiotenzin II növeli a sejtméretet, a szarkomer elrendeződést és a hypertrophiás gének aktiválódását.** 30 nappal a differenciáció végét követően a hESC-CM sejteket ciklikus nyújtással (A) (0.5 Hz, 10–25% sejt hossz növelésével, 24 óra), illetve angiotenzin II-vel stimuláltuk (1  $\mu$ M, 48 óra) (B). Az oszlopdiagramok a sejtméretet, szarkomer elrendeződést, ANF,  $\alpha$ MHC, és  $\beta$ MHC mRNS szinteket mutatják (a PCR normalizálására GAPDH standard gént használtunk). Átlag  $\pm$  SEM,  $n = 3$  biológiai ismétlés, ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. kontroll).

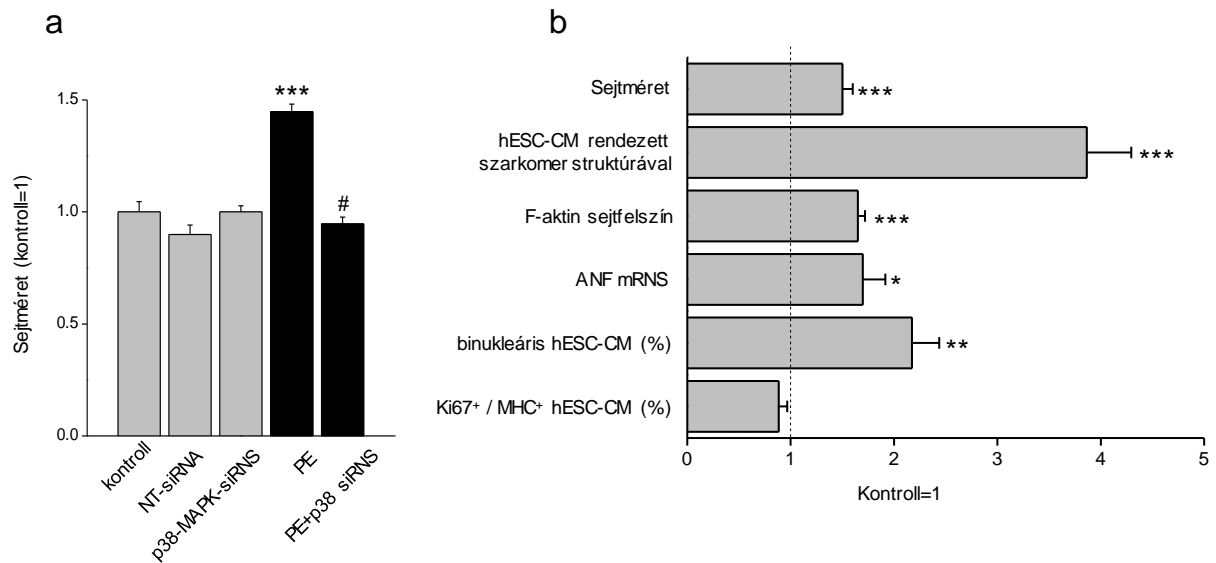
#### 4.4.1. Intracelluláris kinázok mediátor szerepe a szívizomsejtek hypertrophiájában

A hypertrophiás hatás létrejöttében számos MAP kináz és ezek közül leginkább a p38 MAP kináz mediáló szerepe igazolható (24. ábra). A p38 MAP kináz gátlása (SB202190 gátlószerezrel) egyaránt gátolta a bazális sejtnövekedést és a phenylephrine-indukálta hypertrophiát is. Emellett a HDAC II (trichostatin A), ERK (PD98059), JNK (SP600125), CaMK II (KN93), mTOR (rapamycin), calcineurin (cyclosporin A), és calcineurin/FKBP (FK506) gátlása is csökkentette a phenylephrine-indukálta sejtméret növekedését. Az itt bemutatott méréseink elsődlegesen az új jelátviteli támadáspontok feltárását szolgálták, az egyes hatékonynak bizonyult gátlószerek specificitásának és dózis-hatás összefüggésének meghatározására további vizsgálatokat végeztünk.



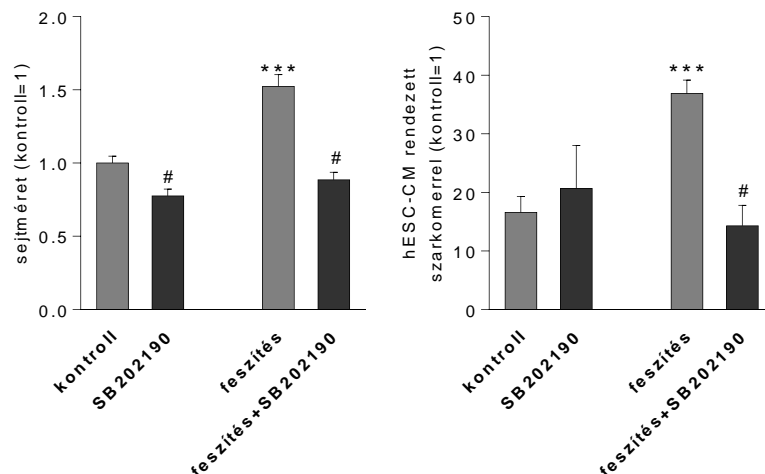
**24. ábra: Kinázgátlók a phenylephrine-indukálta hypertrophiában.** Kismolekulájú gátlószerek a hESC-CM hypertrophia modulálásában. Az oszlopdiagram a sejtméret (a) és ANF mRNS szintek (b) kontroll és phenylephrine kezeléshez viszonyított változásait mutatja 48 órás szelektív p38-MAPK gátló SB202190 (1 μM), PKG gátló KT5823 (1 μM), HDAC II gátló trichostatin A (0.25 μM), ERK gátló PD98059 (10 μM), JNK gátló SP600125 (1 μM), GSK3β gátló 1-azakenpauillone (10 μM), CAMK II gátló KN93 (10 μM), calcineurin gátló cyclosporine A (0.2 μM), mTOR gátló rapamycin (10 ng/ml), és calcineurin/FKBP gátló FK506 (0.1 μM) kezelése hatására (a sejtméretet, mintánként n > 100 MHC-pozitív sejt analízisével határoztuk meg, átlag ± SEM, n = 3 biológiai ismétlés. mRNS szinteket, 3 technikai ismétlés és 2 biológiai ismétlés mellett határoztuk meg. Egyutas ANOVA \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. PE csoport; #P < 0.001 vs. DMSO kontroll csoport).

A korábban részletezett patkány sejtekhez hasonlóan, a kiválasztott p38 MAP kináz szerepének jellemzésére kis molekulású p38 MAP kináz gátlószereket, siRNS-t vagy domináns-negatív p38 adenovírust alkalmaztunk, ezekkel a phenylephrine hypertrophiás hatása kivédhető volt. A p38 rendszer előzetes gátlásával az előkezelt sejtekben a hypertrophiás hatást sikerült teljesen megszüntetni (25. ábra).



**25. ábra: Phenylephrine-indukálta hESC-CM sejtméret változások a p38-MAPK siRNS jelenlétében.** Átlag  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs. Kontroll; # $P < 0.001$  vs. phenylephrine-kezelt (10  $\mu$ M, 48 óra) csoport. (b) Konstitutívan aktív MAP2K3b rekombináns adenovírus. (b) Az oszlopdiagram a sejtméretet, F-aktin eloszlást, binukleáris sejtek arányát, és Ki67-pozitív sejtek arányát mutatja az adenovírustal kezelt és kontroll csoportokban. Egyutas ANOVA, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. kontroll csoport,  $n = 3$ .

A MAP kináz kináz 3 (MKK3) a sejtméretet, az ANF génexpresszióját, a szarkomer és cytoskeleton elrendeződését fokozta, ezáltal a sejtek hypertrophiájához vezetett. A kinázhatás egy érdekes eleme volt, hogy bár az embrionális sejtek mononukleárisak, a p38 aktivitás hatására mégis binukleáris sejtek jöttek létre, amely tulajdonság már a felnőtt szívizomsejtek sajátossága. Érdeki változás a sejtek kontraktilitásában, ritmusában és alakjában nem volt. A sejtek proliferációs aktivitása sem változott meg a kezelések hatására. Hasonlóan: a sejtek mechanikus feszítése a p38 kináz gátlása mellett nem eredményezett hypertrophiát (26. ábra). Megfordítva, a MAP kináz rendszer más támadáspontú

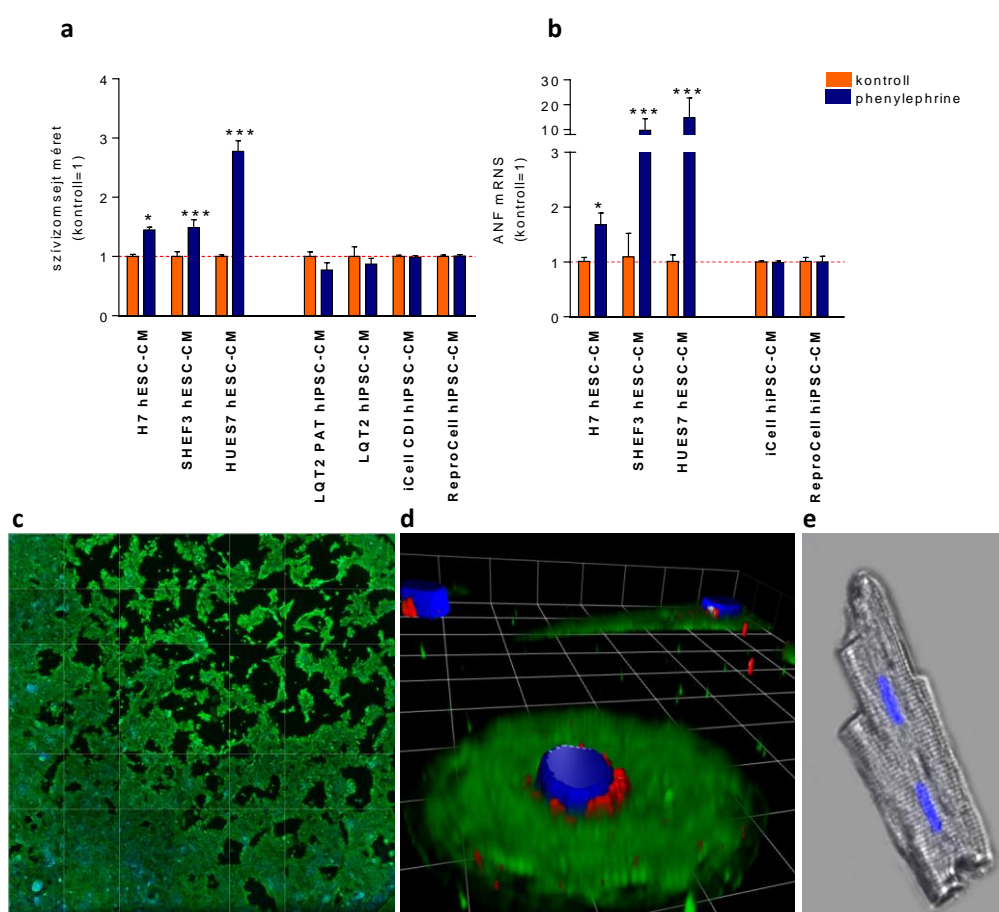


**26. ábra: p38 MAPK mediálja a ciklikus nyújtás-indukálta hypertrophiás választ.** 30 nappal a differenciáció végét követően a hESC-CM sejteket ciklikus nyújtással (0.5 Hz, 10–25% sejthossz növelésével, 24 óra), stimuláltuk. Az oszlopdiagramok a sejtméretet, szarkomer elrendeződést mutatják. Átlag  $\pm$  SEM,  $n = 3$  biológiai ismétlés, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. kontroll.

aktiválásával a hypertrophiás jelátvitel fokozható volt.

#### 4.4.2. A humán ESC és iPSC eredetű szívműködés eltérő hypertrophiás válaszáinak vizsgálata

A hiPSC rendszer alkalmazásával a genetikai hátterű szívbetegségek modellezése az elmúlt években sokkal pontosabbá vált. Ugyanakkor a kutatók a modellek korlátaira is felhívták már a figyelmet, különösen a hiPSC és a hESC közötti esetleges különbségek hangsúlyozásával (Ma és mtsai, 2014). Alapvető fontosságú annak tisztázása, hogy a hiPSC és hESC kultúrák mennyiben különböznek egymástól. Ezért vizsgálatainkat több össejtvonalra kiterjesztettük, és az újonnan kifejlesztett, automatizált in vitro assay-k alkalmazásával az eddigi MAP kinázokon kívül új intracelluláris jelátviteli célpontokat is vizsgáltunk.

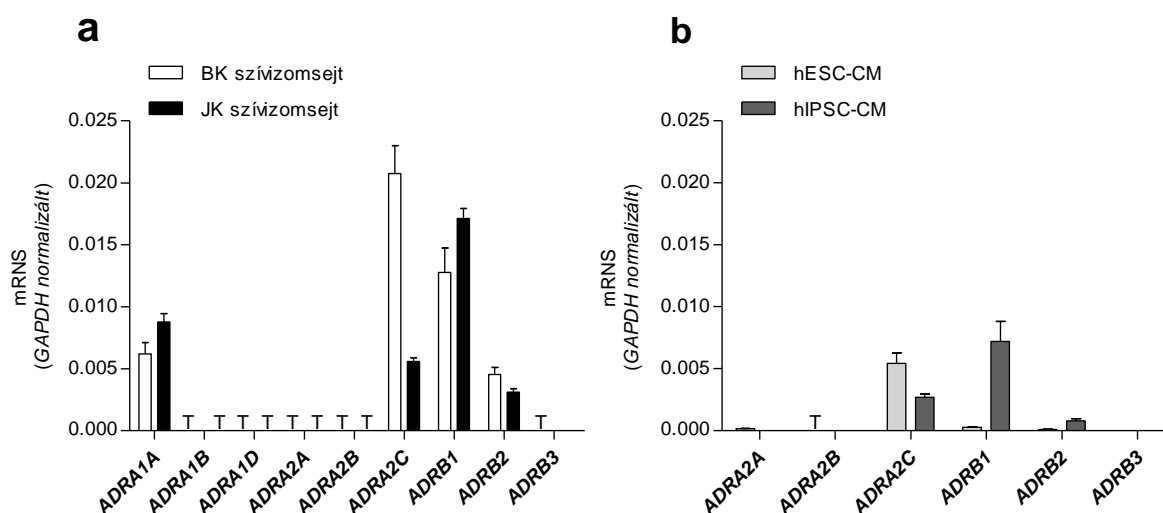


**27. ábra:** A hESC (H7, HUES7, és SHEF3) és hiPSC (LQT2, LQT2-PAT, CDI, és ReproCell) eredetű szívműködés eltérő hypertrophiás válasza phenylephrinre (10  $\mu$ M, 48 órás kezelés, a differenciáltatás után 30 nappal). Az oszlopdiagramok a szívműködés 2D méretét (a) és az ANF mRNS szinteket (b) mutatják phenylephrine kezelés mellett (kontroll érték=1, átlag $\pm$ SEM, n >100 MHC-pozitív sejt/well, 2-10 biológiai ismétlés, \*P<0.05, \*\*\*P<0.001, Student t teszt). Immunocyto-kémiai felvételek széles látószögű mikroszkóppal (c, 10x nagyítás) és konfokális mikroszkóppal és 3D képfeldolgozással (d). Kontrollként felnőtt szívből izolált kamrai szívműködés használtunk (e). Miozin nehézlánc  $\alpha/\beta$  (zöld), ANF (piros), DAPI (sejtmag, kék).

Az  $\alpha$ -adrenerg receptorok központi szerepet játszanak a sejtméret regulálásában, ideértve a hypertrophiás és proliferatív folyamatokat. Ezért alapvető fontosságú volt, hogy az újonnan létrehozott hESC-CM és hiPSC-CM sejteket az  $\alpha$ 1AR mintázatuk alapján is megvizsgáljuk. Eredményeink azt igazolták, hogy a klasszikus  $\alpha$ 1AR agonista phenylephrine hatékonyan

aktivál számos hypertrophiás változót, így a sejt méretet, sejt volument, ANF mRNS szinteket, szarkomer elrendeződést és a sejt protein/DNS arányát (Földes és mtsai, 2011). Míg a felsorolt változások mindegyikét észleltük a különböző őssejtvonalakból származtatott hESC-CM sejteken, addig meglepetésre a hiPSC eredetű szívizomsejtek phenylephrine-re nem reagáltak (27. ábra). A phenylephrine hatás feltűnő hiánya egyaránt független volt a sejtek differenciáltatáshoz alkalmazott kiindulási hiPSC vonalaktól, a sejt kultúra feltételeiktől, az újraprogramozás és differenciáltatás módjától. Ezeket az eredményeket más sejteken is reprodukálni tudtuk.

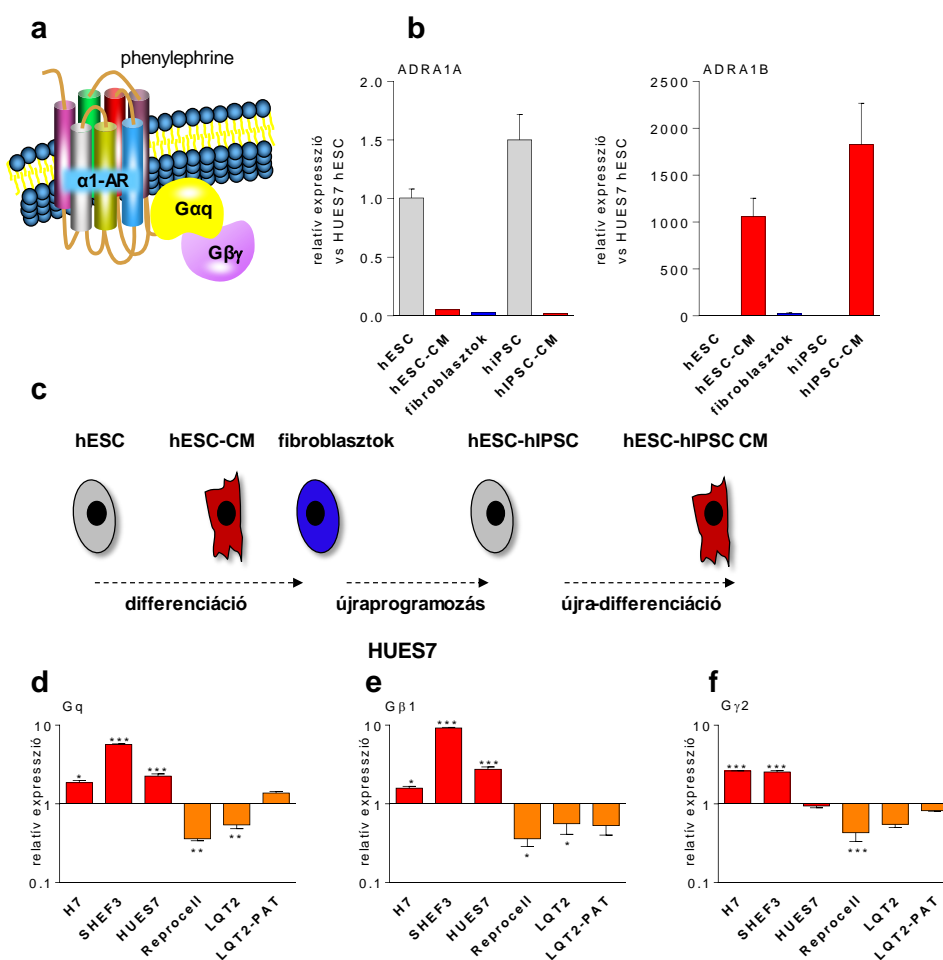
Évtizedek óta ismert, hogy a legtöbb fajban, a felnőtt szívben dominánsan expresszálandó G-protein kapcsolt  $\alpha$ -adrenerg receptor az  $\alpha 1$ -AR (Bruckner és mtsai, 1985) katekolaminokkal (receptor agonistákkal) való stimulálása patológiás hypertrophiát eredményez (Rokosh és mtsai, 1996; Zhong és mtsai, 1999). Az eddigi modellrendszerek ezért az  $\alpha 1$ AR aktiválásával kapott válaszokra fókuszáltak, hogy a hypertrophiás jelátviteli folyamatokat és az azokat befolyásoló esetleges terápiás faktorokat jobban megismerhessük. Az ADRA1A altípus mRNS szintje azonban szövetenként és sejt típusonként is eltérő lehet (Stewart és mtsai, 1994); az alkalmazható agonisták, amelyek az egyes sejtekben hatékonyan módosíthatják az ADRA1A mRNS szinteket, szintén különbözőek lehetnek (Rokosh és mtsai, 1996). A humán szívtranszplantációkor eltávolított szívekből izolált szívizomsejteken elvégzett méréseink azt igazolták, hogy az  $\alpha 1$ AR (ADRA1A gén) a felnőtt szív szövet és a kamrai szívizomsejtek dominánsan expresszálandó receptor altípusa (28. ábra).



**28. ábra: Kvantitatív RT-PCR az adrenerg receptor altípusok sejt-specifikus eloszlását mutatja.** Humán jobb (fekete oszlopok) és bal (fehér oszlopok) kamrai izolált szívizomsejtekben (a), valamint pluripotens őssejt-eredetű szívizomsejtekben hESC-CM (H7 hESC-CM, világosszürke) és hiPSC-CM (iCell, Cellular Dynamics, sötétszürke) (b). Az mRNS szinteket GAPDH segítségével normalizáltuk, átlag $\pm$ SEM.

Ugyanakkor az őssejtből differenciált szívizomsejtekben ez a receptortípus nem mutatható ki. ADRA1A mRNS alacsony expressziója ugyan mérhető volt a differenciálatlan hESC és hiPSC őssejtekben, de a szívizomsejt és fibroblaszt irányú differenciálódás kezdetén ennek

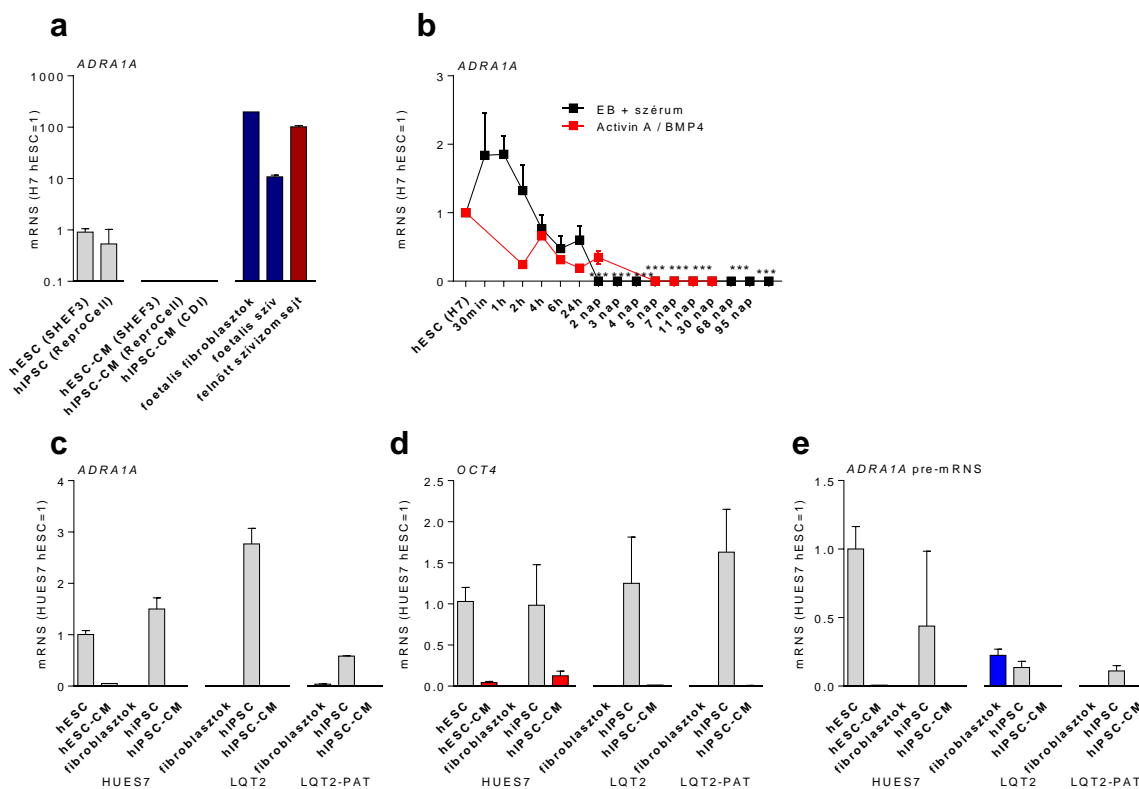
szintje gyorsan mérhetetlenül alacsonyra csökken (30. ábra). Szoros párhuzamosságot találtunk az őssejtek pluripotencia génjeinek csendesedése és az ADRA1A receptor kikapcsolódása között; ez a folyamat független volt a használt sejtvonaltól és az újraprogramozás módjától is. Ennek igazolására hESC (HUES7) sejteket differenciáltunk fibroblasztokká és szívizomsejteké, majd a differenciált sejtek újraprogramozásával új hiPSC vonalat hoztunk létre, amelyet aztán ismét fibroblasztokká és szívizomsejteké alakítottunk (hESC→fibroblaszt→hiPSC→szívizomsejt). Így egy olyan „zárt” rendszert hoztunk létre, amelyben az így generált, azonos genotípusú differenciálatlan őssejteket és az azokból differenciált kardiális sejteket hasonlítottuk össze (29. ábra).



**29. ábra: ADRA1A génextpresszió csendesítés hESC és hiPSC kardiális differenciációja alatt.** (b) Az oszlopdiagramok az ADRA1A mRNS szinteket mutatják a differenciálatlan hESC, hiPSC sejtekben (szürke), hESC-CM és hiPSC-CM sejt kultúrákban (piros), felnőtt és foetális szívizomsejtekben és fibroblasztokban (kék). (c) Kísérleti felállás diagramja a sejt differenciációról és újraprogramozásról. (d,e,f) A differenciálódás során a G proteinek expressziója az egyes sejt típusokban eltérően változik (piros, hESC és narancssárga, hiPSC). G $q$  (d), G $\beta 1$  (e), és G $\gamma 2$  (f) mRNS szintek hESC és hiPSC differenciáció alatti változásait ábrázolják. Az értékeket a hESC ill. hiPSC vonalhoz viszonyított változásként mutatjuk, átlag $\pm$ SEM; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; t próba. Az egyes méréseket három biológiai ismétlés alapján határoztuk meg. A sejteken további altípusok is mérhetőek voltak, így az ADRA1D és a ADRA2C. A phenylephrine adott hiányzó válasz arra utal ugyanakkor, hogy ezek jelenléte önmagában nem elegendő (Földes és mtsai, 2015).

A  $\alpha_1$ -AR csendesedése mind a hESC-CM, mind a hESC eredetű hiPSC-CM sejteken megfigyelhető volt. A további  $\alpha$ -adrenerg receptor altípusok vizsgálatával azt is igazoltuk, hogy a differenciálódás során egy egyedi, nem pedig az ontológias ADRA1A receptor altípus

aktiválódik. Az aktiválódás eltolódik egy domináns ADRA1B altípus irányába mind a hiPSC-CM, mind a hESC-CM sejtekben (31. ábra). Ez a párhuzamos aktiválódás ugyanakkor szintén nem magyarázza a két sejtípus eltérő válaszkészségét és egyelőre megválaszolatlan maradt az eredeti kérdés, hogy a hESC-CM-ben mérhető hypertrophiás válaszkészség és a hiPSC-CM-ben látható válasz teljes hiánya milyen egyéb jelátviteli utak részvételének eredménye.



**30. ábra: Az ADRA1A csendesítése hESC és hiPSC szívomsejt irányú differenciációja során.** (a) Az oszlopdiaagramok az ADRA1A mRNA szinteket mutatják differenciálatlan hESC és hiPSC sejtekben, hESC-CM és hiPSC-CM szívomsejtben, valamint felelőtt és foetalis szívben és fibroblasztokban. (b) A diagram az ADRA1A csendesítés időbeliségét mutatja a H7 vonal differenciációja során, szérúmmentes és szérúm-alapú EB tenyésztési környezetben (átlag±SEM, 4 biológai ismétlés, \*\*\*P< 0.001 vs. kontroll csoport; egyutas ANOVA /Dunnett's post hoc teszt). (c–e) A diagram a sejt differenciáció és az újraprogramozás lépéseit mutatja. Az oszlopdiaagram az ADRA1A mRNA (c), OCT4 mRNA (d) és ADRA1A pre-mRNA (e) szinteket mutatja be HUES7-hESC, HUES7-hiPSC, és HUES7-hiPSC-eredetű szívomsejteken és fibroblasztokon, felelőtt bőr fibroblasztokon, és hiPSC eredetű szívomsejteken (LQT2 szindrómás betegből és egészséges rokonából, LQT2-PAT). A differenciálatlan sejteket szürkével, a differenciált szívomsejteket pirossal, a felelőtt szívomsejteket bordóval, míg a felelőtt fibroblasztokat sötétkékkel jelöltük. Az eredményeket a differenciálatlan hESC-hez viszonyított relatív változásként ábrázoltuk (H7 A és B paneleken; HUES7 a C–E paneleken), átlag±SEM. A mintákat háromszor mértük, két biológai ismétlésből (Földes és mtsai, 2015).

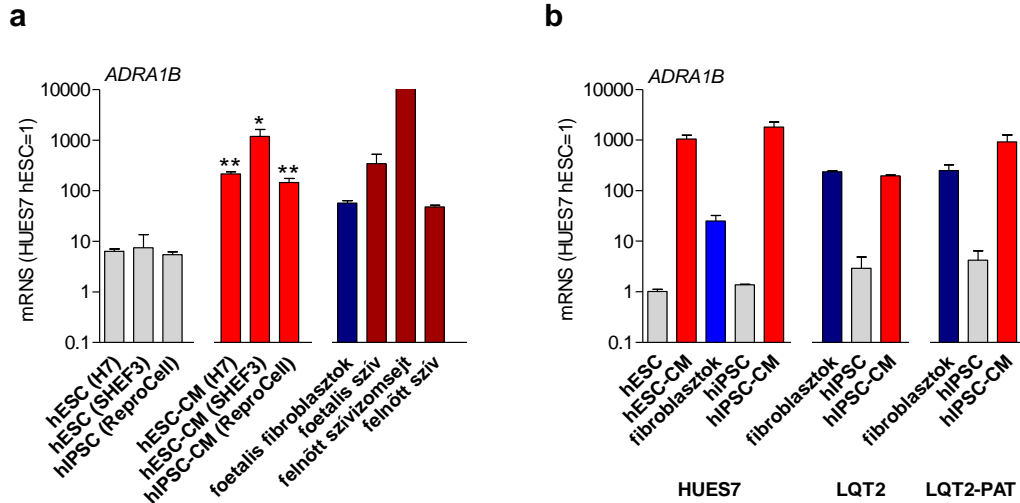
Az  $\alpha$ -AR expressziója a hiPSC-CM sejtekben, ahogy ezt kimutattuk, korai növekedést mutat a differenciáció elején, majd egy ellentétes irányú rapid csökkenés következik az ADRA1A expresszióban hiPSC-CM és hESC-CM sejt kultúrákban (30. ábra). Ezzel párhuzamosan az ADRA1B szintek növekednek, feltételezhetően egy kompenzatorikus mechanizmus részeként. A további  $\alpha$ -AR altípusok, az ADRA1D és ADRA2C szintén kimutathatók a sejtekből, de ezek expressziójának mértéke és a társuló  $G_q$ ,  $G_{\beta 1}$ , és  $G_{\beta 2}$  G-proteineké nem elégséges, hogy a phenylephrine hypertrophiás választ tudjon kiváltani (Földes és mtsai,

2014a). A  $\alpha_1$ -receptorok pontos elhelyezkedését keresve a felnőtt szívizomsejtekben, egy vizsgálat ezeket a sejtmagban is megtalálta, nem csak a cytoplazmában, talán ennek is szerepe lehet a látott válaszkésztségi különbségekben (Wu és mtsai, 2015b).

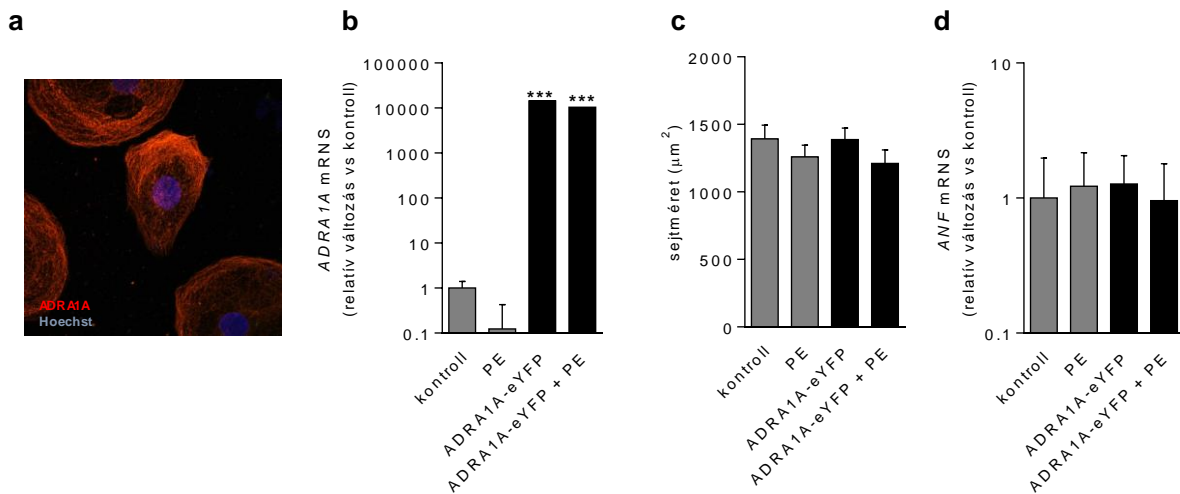
A G $\alpha$ , G $\beta$ , és G $\gamma$  proteinek szintje a differenciálatlan hESC és hiPSC kultúrákban egymáshoz hasonló volt (és a felnőtt szívizomsejtekkel is megegyező), a differenciálódás során egyértelmű különbségeket találtunk. A hESC differenciálódása G $\alpha$ , G $\beta$ 1, és G $\gamma$ 2 mRNS szintek fokozott expresszióját eredményezte, ugyanakkor a hiPSC sejtek differenciálódása során (a legtöbb őssejtvonalnál) ezek expressziója változatlan maradt vagy akár csökkent is (29. ábra). Ez egy olyan érdemi különbség a két őssejtípus között, amely a hypertrophiás válasz elmaradásához feltétlenül hozzájárulhat. Fontos azonban, hogy más G-protein kapcsolt hypertrophiás faktorok (endothelin-1 és angiotenzin II) az egyes sejttípusokban csak minimális sejtméret növekedést okoznak, de az ANF és a BNP expresszióját jelentősen növelik, még a hiPSC-CM sejtekben is. Ez arra utal, hogy a G-protein kapcsolt receptor jelátvitel nem teljesen inaktív ezekben a sejtekben. A sejtméret növekedése az iCell hiPSC-CM sejtekben valamivel kifejezettebb volt endothelin-1 hatására egy korábbi publikációban (24% *versus* az általunk mért 10%) (Carlson és mtsai, 2013). Ez a tanulmány a kifejezettebb BNP jelet választotta elsődleges hypertrophiás markerként - ez hasonlónak bizonyult a mi méréseinkhez. Az ADRA1A receptort overexpresszáztattuk a szívizomsejtekben, remélve, hogy a receptor „pótlása” a válaszkésztséget növeli.

A tény, hogy ez a beavatkozás és a magas receptor expresszió nem növelte a phenylephrine hypertrophiás hatását arra utalhat, hogy a jelátvitel későbbi lépcsőinek defektusa, illetve valamely sejtszintű elem aktív gátló beavatkozása is közrejátszhat a phenylephrine hatás elmaradásában (32. ábra). Az  $\alpha_1$ AR-mediálta hypertrophia intracelluláris válaszának következő elemeit a G-proteinek jelentik; az agonista receptorhoz való kötődésekor a G $\alpha$  protein aktiválódik a G $\beta\gamma$  proteinek disszociációját követően.





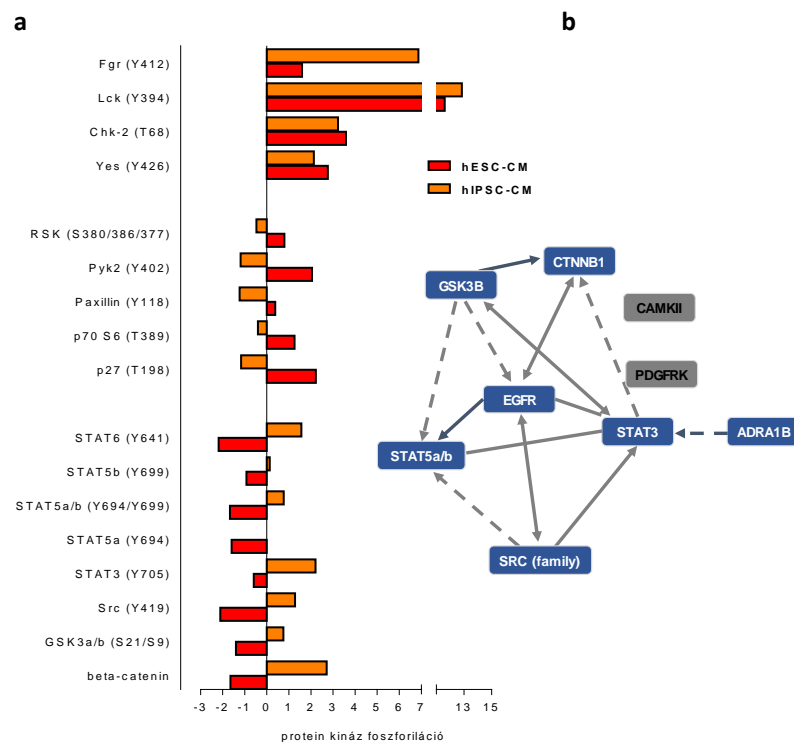
**31. ábra: Fokozott ADRA1B expresszió a hESC és hiPSC differenciációja során.** (a) Az ADRA1B kvantitatív RT-PCR értékei differenciálatlan hESC, hiPSC, differenciált hiPSC-CM és hESC-CM, felnőtt bal kamrai izolált szívizomsejt, felnőtt szív, foetalis szív és fibroblaszt mintákban. A differenciálatlan sejteket szürkével, a differenciált szívizomsejteket pirossal, a differenciált fibroblasztokat kézzel, a felnőtt szívizomsejteket bordóval, míg a felnőtt fibroblasztokat sötétkékkel jelöltük. Az eredményeket a differenciálatlan hESC-hez vagy hiPSC-hez viszonyított relatív változásként ábrázoltuk, átlag±SEM. A mintákat háromszor mértük. \*\*\*P<0.001 vs. differenciálatlan sejtek, t próba (Földes és mtsai, 2015).



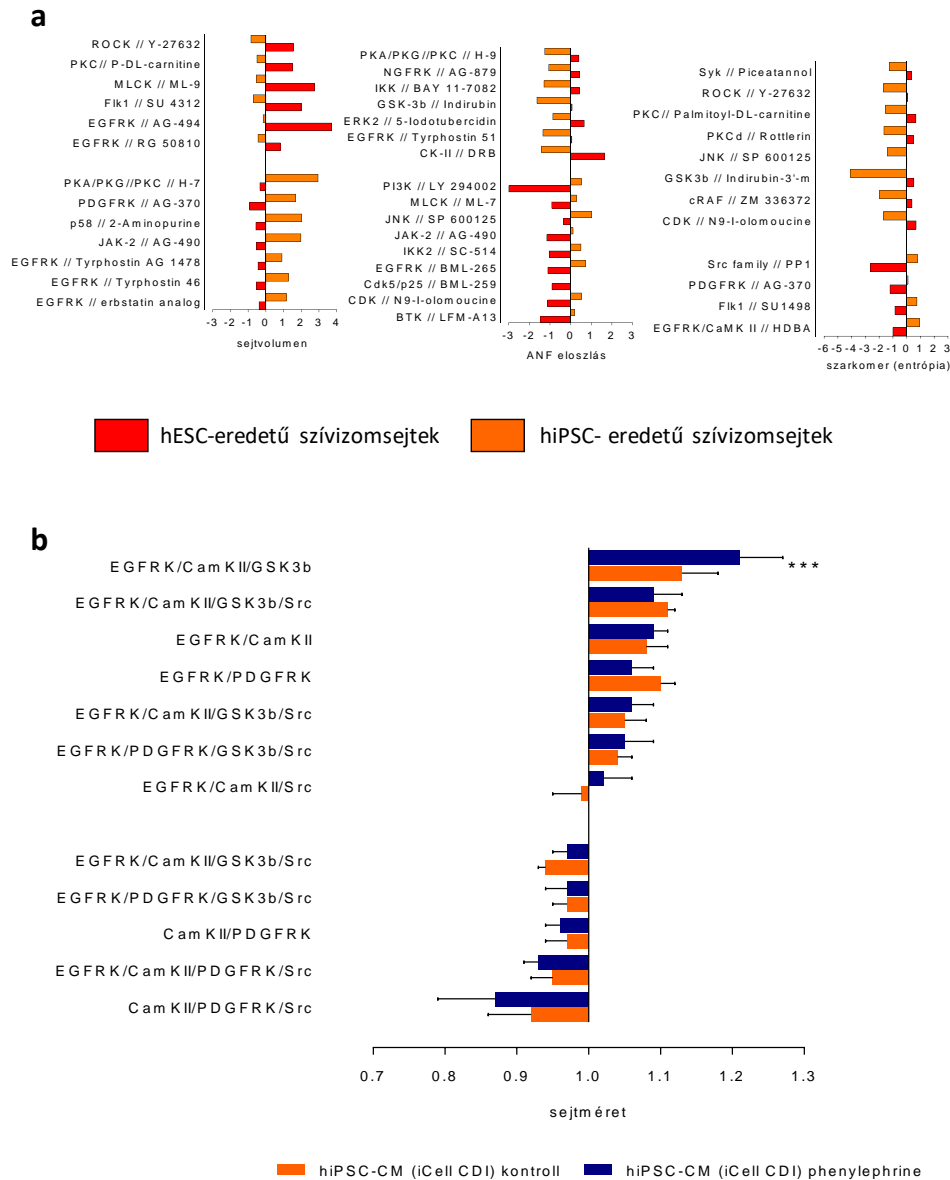
**32. ábra: Az ADRA1A overexpressziója hiPSC-CM sejtekben.** (a) Az ADRA1A intracelluláris lokalizációja ADRA1A-eYFP-vel transzfektált hiPSC-CM sejtekben. A fehér skála=20 μm. Az oszlopdiagramok az ADRA1A mRNA szinteket (b), sejtterületet (c) és ANF mRNA szinteket mutatják (d) az ADRA1A-val transzfektált sejtekben, phenylephrine (48 óra) jelenlétében vagy anélkül. Átlag±SEM; 6 biológiai ismétlés. \*\*\*P<0.001 vs. kontroll; (Földes és mtsai, 2015).

2D és 3D *high content* mikroszkópos analízissel azt vizsgáltuk ezt követően, hogy a hypertrophiás jelátviteli utak hESC-CM és hiPSC-CM sejtekben hogyan kapcsolódnak össze, és mennyiben befolyásolják a phenylephrine-indukálta kinázok foszforiláltságát. Az eredetileg vizsgált néhány kinázgátlót (Földes és mtsai, 2014a) egy nagyobb, kinázgátló könyvtárral egészítettük ki. A 33. ábrán látható, hogy ezek között számos gátlószernek több támadáspontja is van: bioinformatikai analízissel különítettük el az egyes érintett jelátviteli hálózatokat. Ugyan a phenylephrine hypertrophiás hatása a gátlószerrel nem volt

teljesen egyértelmű, de számos hypertrophiás paraméter esetében a kinázgátlók negatív hatása igazolódott. Ide sorolhatóak a p38-MAPK, ERK1/2, és mTOR inhibitorok a hESC-CM sejtekben (hasonlóan az első vizsgálatunkhoz, (Földes és mtsai, 2011)). Más gátlószerek, így például a GSK3 $\beta$  és EGFRK-re hatók hasonlóan növelték a sejt méretet és felületet, ami arra utal, hogy egy tonikus/bazális gátlás akadályozza a sejt növekedést (34. ábra). A kísérletek alapján a hESC-CM és hiPSC-CM válaszai eltérőek voltak, így például sejt volumen növekedése az EGFRK-gátló és STAT aktivátor JAK2-vel jelenlétében csak hiPSC-CM sejteken volt kimutatható. Ez együttesen egy kifejezettebb tonikus gátlást jelent az ADRA1B hypertrophiás válasza hiPSC-CM sejtekben. A phenylephrine-függő kináz foszforiláció kimutatására proteom mérést alkalmaztunk (33. ábra). A mérés sorozat elsősorban az src kinázcsalád aktiválódását mutatta mindkét sejt típusban. Az src nem-receptor tirozin kináz csoport szerepét korábban a G-protein-függő receptor internalizációban, valamint sejtproliferációban, sejtvez átépülésben igazolták (Laflamme és mtsai, 2007).

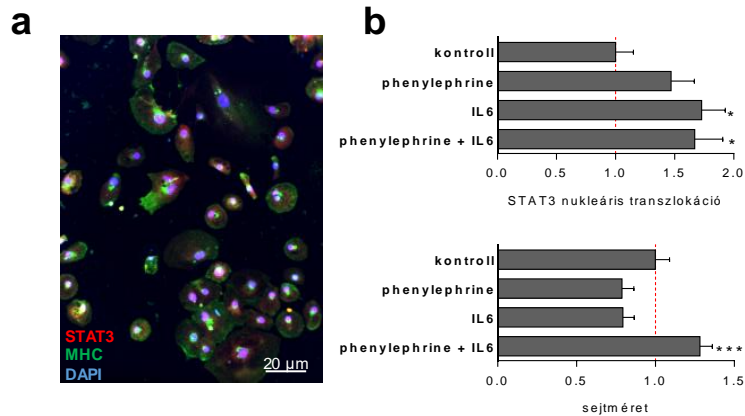


**33. ábra: Foszfokináz proteom és kináz-gátló analízisek a phenylephrine-indukálta jelátviteli folyamatokról a hESC-CM és hiPSC-CM sejt kultúrákban.** (a) Foszfoprotein szintek relatív változása PE hatására (10  $\mu$ M, 48 óra) hESC-CM (H7, narancssárga) és hiPSC-CM (iCell, piros). (b) Ingenuity Pathway analízis a meghatározott sematikus jelátviteli utak közül a STAT család, a GSK3 $\beta$ /  $\beta$ -catenin, epidermalis növekedési faktor (EGFR) és az Src kinázok kapcsolatát igazolta. A csomópontok közötti nyilak a direkt (sima vonal) és az indirekt (szaggatott) kapcsolatokat jelölik az Ingenuity Pathway Knowledge Base alapján.



**34. ábra: A kinázgátlók hatásának vizsgálata a szívizomsejtek hypertrophiás válaszában.** Humán ESC (H7) és iPSC (iCell, ReproCell) eredetű szívizomsejteket phenylephrinnel kezeltük kinázgátlók jelenlétében. (a) Az oszlopdigramok az egyes gátlók direkt hatásait (sejtméret, sejtbeli ANF eloszlás, szarkomer elrendeződés) mutatják, automatizált high content mikroszkópos képfeldolgozás alapján (robust z érték). (b) Az oszlopdigramokon a hiPSC eredetű szívizomsejtek 2D mérete látható, phenylephrine hatására a GSK3 $\beta$ /EGFRK/CAMKII/src/PDGFRK kinázgátlók különböző kombinációi mellett (mindegyik 1  $\mu$ M,  $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ , 4 biológiai ismétlés, egyutas ANOVA, Tukey post hoc teszt).

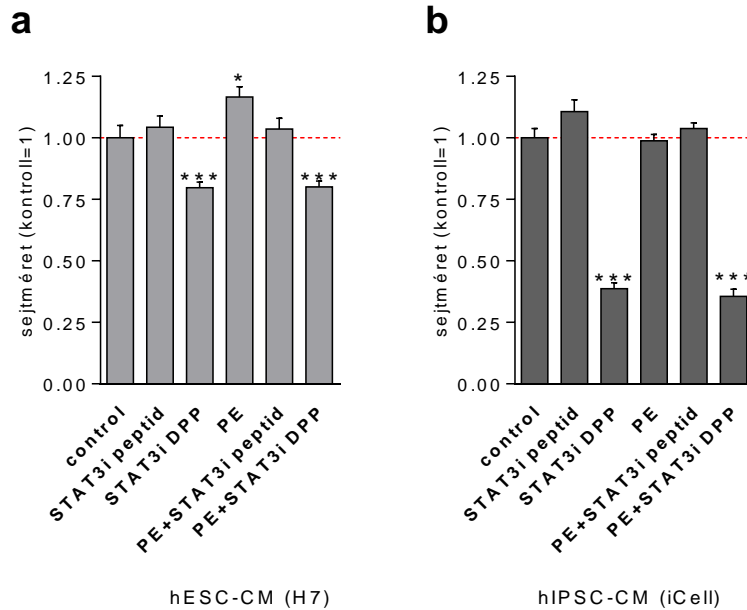
Az adatokat az Ingenuity Pathway Analysis algoritmusával értékeltük: ez az ADRA1B aktiválódását és az általa indukált hypertrophiás választ egy EGFR/Src/GSK3 $\beta$ /STAT3 kinázhálózat moduláló szerepével kapcsolta össze. Ebből a hálózathoz a STAT3 egyike azoknak a faktoroknak, amelyek már korábban bizonyítottan az ADRA1B jelátvitelhez kapcsolódnak (Han és mtsai, 2008). Ez a megfigyelés megfelel annak a korábbi vizsgálati eredménynek is, amely szerint az Src-függő ADRA1 jelátvitel és az EGF jelátvitel kardiális hypertrophiában összekapcsolódik (Asakura és mtsai, 2002; Li és mtsai, 2011; Zitron és mtsai, 2008).



**35. ábra: A STAT3 nukleáris transzlokációja, valamint a hiPSC-CM sejt méretének változásai interleukin-6 (100 ng/ml) hatására.** A hiPSC-CM méretének változásai phenylephrine és kombinált gátlók hatására. Átlag  $\pm$  SEM; 4 biológiai ismétlés; egyutas ANOVA és Tukey post hoc teszt.

Ezt támogatja saját megfigyelésünk is, miszerint a STAT3 gátlása közvetlenül csökkentette a bazális és phenylephrine által indukált sejt méret növekedést a hESC-CM sejtekben, valamint a bazális sejt méretet a hiPSC-CM sejtekben (36. ábra). A STAT3 aktiváló interleukin-6 (IL6) a phenylephrine-indukálta sejt méret növekedést szignifikánsan fokozta (35. ábra). Azt találtuk, hogy a phenylephrine a STAT3 nukleáris transzlokációt jelentősen fokozta, de a hiPSC-CM sejtek méretét csak IL6 jelenlétében tudta növelni. A phenylephrine hatására bekövetkező transzlokáció és ezt követően az EGFRK/GSK3 $\beta$  STAT3-n szimultán aktiválódása okozza a sejt méret végleges változását. Egy kombinált kinázgátlást használtunk (az eddig vizsgált közel 100 gátlószerből kiválasztva egy fókuszáltabb, kisebb kinázgátló panelt), hogy meghatározzuk a hiPSC-CM-ben látott anti-hypertrophiás hatásért felelős legfontosabb faktorokat és kombinációjukat. A mérés igazolta, hogy az EGFRK/GSK3 $\beta$  gátlók kombinációja, együtt a CamKII inhibitorokkal optimális összeállítás lehet a sejt méret növelésére. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a hiPSC-CM sejtekben az  $\alpha_1$ AR stimulálását követően észlelt hiányzó válasz elsősorban a tonikus anti-hypertrophiás jelátvitel (így az EGFRK, GSK3 $\beta$ , és CamKII) aktiváltságára vezethető vissza (34. ábra).

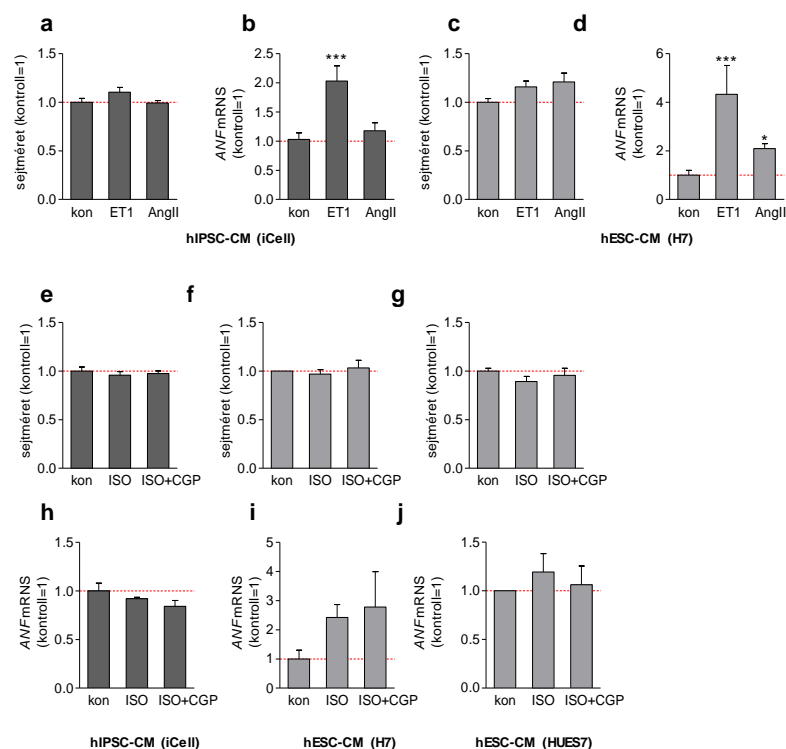
Kimutattuk, hogy a hESC-CM mérete phenylephrine hatására megnő, ennek intracelluláris mediátora részben a p38 MAPK útvonal (Földes és mtsai, 2011). A katekolaminokon kívül az endothelin-1, az angiotenzin II és a ciklikus mechanikus nyújtás hatását is igazoltuk hESC-CM sejtekben (Földes és mtsai, 2011; Földes és mtsai, 2014a). A hypertrophiás válaszkészségben több megoldatlan kérdés is maradt. A hESC-CM sejtekkel ellentétben a hiPSC-CM phenylephrinere nem reagál, a sejt méret és ANF expresszió változatlan a kezelt sejtekben és a kontrollokban (Földes és mtsai, 2014a). Emellett az endothelin-1 és az angiotenzin II is hatástalan a sejt méretre; a mért ANF és BNP mRNS szintek csak az endothelin-1 hatására mutatnak változást (37. ábra).



**36. ábra: A STAT3 gátlás hatása a hESC-CM (a) és hiPSC-CM (b) sejtek növekedésére.** Az oszlopdiagramok STAT3-gátló VIII, 5,15-DPP sejt méretet csökkentő hatását mutatják kontroll és phenylephrine-kezelt sejtekben. Hasonló tendencia volt igazolható a sejt-permeábilis STAT-gátló proteinek esetében is hESC-CM sejtekben. Ugyanakkor a gátló proteinek a hiPSC-CM méretére nem volt hatása. Átlag±SEM, 3 biológiai ismétlés. \*\*\*P<0.001 vs. gátlószer-mentes csoportok, ANOVA / Tukey post hoc teszt.

A kereskedelmi forgalomban elérhető hiPSC-CM esetében is az endothelin-1 ANF-re gyakorolt hatását vizsgálják (Aggarwal és mtsai, 2014). Ezekkel a vizsgálatokkal igazolást nyert, hogy a humán PSC-CM sejtekben az ET<sub>A</sub> fokozza a hypertrophiás gének expresszióját, így a nátriuretikus peptid (BNP és ANF) szinteket (Carlson és mtsai, 2013; Földes és mtsai, 2014a). Más munkacsoportok vizsgálatai szerint is a phenylephrine hiPSC-CM sejt méretre gyakorolt hatása alacsony vagy nem mérhető (~10% vagy kevesebb), az endothelin-1 méretnövelő hatása pedig 25% alatt marad (Tanaka és mtsai, 2014).

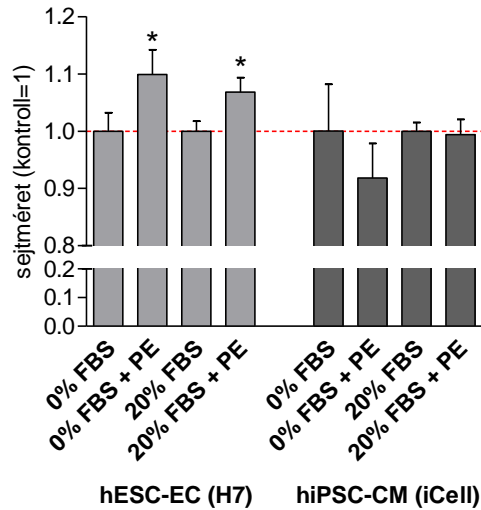
A béta-adrenerg jelátvitel szerepe szintén ellentmondásos hypertrophiában. A hiPSC-CM sejtekben a  $\beta$ -AR stimuláció nem váltott ki hypertrophiás választ (Földes és mtsai, 2014a). Ugyanakkor Zhi és mtsai ennek az ellentétét tapasztalták (Zhi és mtsai, 2012). A sejt kultúra médium szérumszintje közrejátszhat a vizsgálatokban tapasztalt csökkent válaszkészségben (Dambrot és mtsai, 2014). Nekünk ezt az összefüggést nem sikerült kimutatnunk (38. ábra) (Földes és mtsai, 2014a). A hESC-CM és hiPSC-CM sejt típusok eltérő válaszkészségéért inkább a hypertrophiás és anti-hypertrophiás jelátvitel egyensúlyának zavara tehető felelőssé. A jelátviteli zavar korrekciójával a phenylephrine-re adott válasz is jelentősen fokozható hiPSC-CM sejtekben.



**37. ábra: Nem-adrenergikus stimulációk hatása a hiPSC-CM és hESC-EC hipertrophiás válaszreakciójára.** Az oszlopdiagramok (a, c) azt mutatják be, hogy az endothelin-1 (ET-1, 1  $\mu$ M, 48óra) egyik sejttípusban sem növeli a sejtméretet, az ANF expressziót viszont igen (b,d). Az angiotenzin II (AngII, 100 nM, 48 óra) azonban a sejtméretet nem befolyásolta a sejtekben; az ANF mRNS szintek növekedése pedig csak hESC-CM sejtekben volt igazolható. Átlag $\pm$ SEM, 5 biológiai ismétlés. A  $\beta$ -adrenergikus isoprenaline a szelektív  $\beta$ 1 gátlószer CGP20712A jelenlétében vagy nélküle nem befolyásolja a hipertrophiás választ szignifikánsan (iCell hiPSC (e és h), H7 (f és i), HUES7(g és j)). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. kontroll.

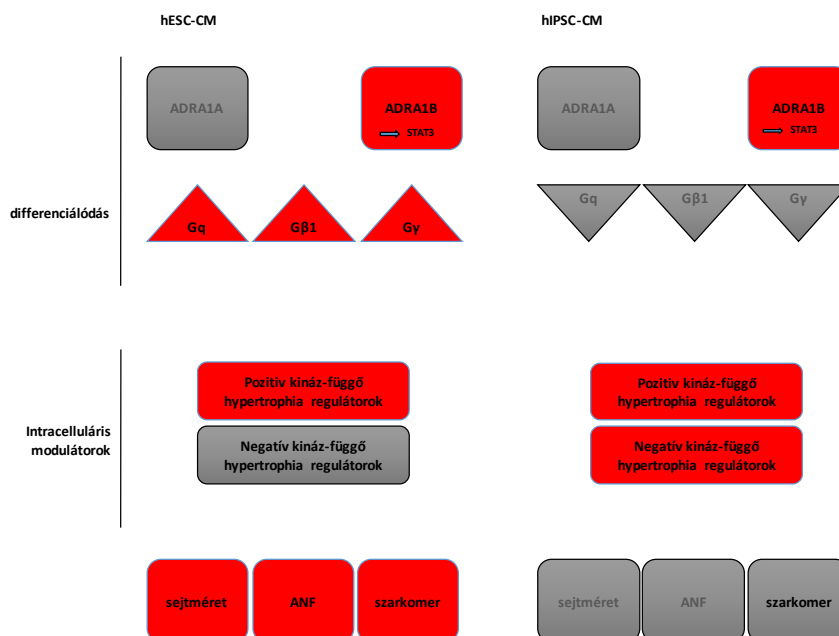
A jelátvitel és az ebben résztvevő, egymást átfedő elemek kombinációjának az eddigénél pontosabb meghatározásához azonban nagyobb számú kinázgátló és high throughput assay alkalmazására lenne szükség. Szintén kérdés maradt, hogy minden hiPSC vonal esetében hasonló kináz kombinációt kell-e gátolni. Ez azért is központi probléma, mert azok a genetikai vagy epigenetikai változások, amelyek az egyes kiindulásként szolgáló szomatikus sejtek újraprogramozása során következnek be, szintén befolyásolhatják a hipertrophiás/antihypertrophiás egyensúlyt. Fontos, hogy bár a hESC-CM sejtekben az  $\alpha$ 1AR-indukálta sejtméret növekedés egyértelmű, a sejtek által használt  $\alpha$ AR altípusa a differenciálódás során érdemben változik.

Ezen kísérletekben igazolható volt, hogy a felnőtt sejtek domináns ADRA1A receptora helyett az őssejt eredetű sejtek egy másik, nevezetesen az ADRA1B izoformát expresszálnak. Kimutatható volt az is, hogy míg a humán embrionális őssejtből differenciált sejtek adrenergikus válaszreakciója megtartott, addig az  $\alpha$ -adrenergikus phenylephrine stimulusra a hiPSC eredetű szívizomsejtek nem reagálnak (a béta-adrenergikus receptorokra adott hipertrophiás válasz is minimális). A különbségért és az alacsony válaszreakcióért az eltérő receptor mintázaton túl, a receptorokhoz társuló, többszintű jelátviteli rendszer módosult aktivitása is felelőssé



**38. ábra: A humán pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtek (hiPSC-CM és hESC-EC) adrenerg stimulusokra adott eltérő hypertrophiás válaszkészségét a sejt kultúra médium szérumszintje nem befolyásolja.** PE, phenylephrine. PE hatására a H7 hESC-CM mérete megnő ( $p$  értékek 0.027 és 0.04 vs. kontroll, 5 független kísérlet alapján). 20% foetalis szérumszint nem befolyásolja a hiPSC-CM méretét ( $p=0.83$  és 0.5 vs. kontroll, 5 független kísérlet alapján,  $t$  próba).

tehető. A két sejt típusban többek között így eltérően expresszálódik és eltérő aktivitású több G-protein és protein kináz, például az EGFRK-src-GSK3b-HDACII-STAT3 hálózat. Ennek megfelelően a kiválasztott kináz gátlók kombinációjával a tonikus antihypertrophiás hatást meg lehet szüntetni, miáltal a sejtek mérete és génexpressziós aktivitása megnövelhető.



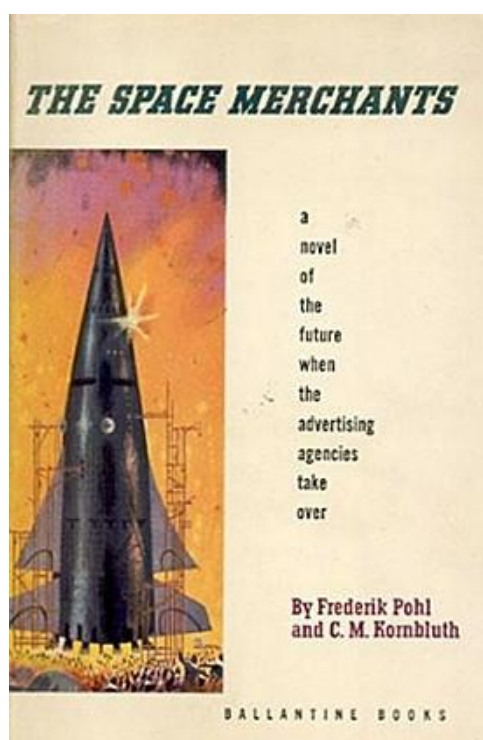
**39. ábra: Sematikus összefoglaló a pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtek (hiPSC-CM és hESC-EC) adrenerg stimulusokra adott eltérő hypertrophiás válaszkészségéről.** Pirossal jelölve az aktív/aktiválódó komponensek, szürkével az inaktív, csendesített jelátviteli elemek.

Eredményeink alapján a hiPSC-CM és a hESC-CM sejtek számos tulajdonságukban eltérnek egymástól, a különbségeként a több ponton eltérő szabályozó mechanizmusok felelősek, ideértve a receptorok expresszióját és a kinázok hatásmechanizmusát (39. ábra). A humán pluripotens őssejtekből képzett szívizomsejtek terápiás szövetpótlásra, gyógyszervizsgálatokra és a szívbetegségek modellezésére való alkalmazása új lehetőséggé vált az elmúlt évtizedben. Az *in vitro* sejtmodell alkalmas lehet a kardiális hypertrophia jelátviteli mechanizmusainak vizsgálatára. A hypertrophiás vizsgálataink azt mutatják, hogy a humán pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtek alkalmasak lehetnek a humán szívbetegségek, így a szívmeagnagyobbodás és szívszöveti átépülés modellezésére *in vitro* körülmények között. Olyan új intracelluláris jelátviteli utakat írtunk le, amely utak befolyásolása terápiás jelentőségű is lehet és a létrehozott sejtek érettségét is fokozhatja. Az itt alkalmazott szívizomsejt modellek arra is lehetőséget teremtettek, hogy a genetikai hátterű szívbetegségben szenvedő betegek sejtjeiből újraprogramozott, beteg-specifikus hiPSC sejteket hozzunk létre. Ugyanakkor azt találtuk, hogy az őssejtekből képzett szívizomsejtek hypertrophiájáért felelős intracelluláris jelátviteli utak, a látszólagos hasonlóságok ellenére, eltérnek a felnőtt kamrai szívizomsejtétől. Az eltérésnek a gyógyszerfejlesztésben lehet fontos szerepe, hiszen a pluripotens őssejtekből származtatott szívizomsejtek válaszkészsége jelentősen különbözhet számos helyzetben. A humán iPSC sejtek kardiovaszkuláris származékain a hypertrophia, sejtthalózis és kalcium egyensúly sejt szintű mechanizmusának egyes lépései jól vizsgálhatóak lehetnek. A mindezekhez társuló új technológiák alkalmazása pedig egy fontos interdiszciplináris terület megerősödését is jelenti.



#### 4.5. Szívizomsejt proliferáció

Az első megfigyelés, hogy az embrionális szívizomsejtek osztódni képesek több mint száz éves. 1908-ból származik Alexis Carrell Nobel-díjas élettanász megfigyelése, hogy az embrionális csirkeszívsejtek évekig is életben maradtak a tápkultúrában. Az eredmény természetesen nagy publicitást kapott (Carrel, 1912). A 40. ábrán a részben ezekből a kísérletekből is merítő, 1952-ben publikált science fiction címlapja látható, amiben a jövőbeli város lakóit az osztódó csirkehús ízű növekvő masszával, a Chicken Little-lel élelmezik. Az elmúlt évekből származik viszont már az a megállapítás, hogy a korábban dogmaként elfogadottakkal szemben a felnőtt szív endogén regenerálódási kapacitással rendelkezik. Az első példák a zebrahalból és a tarajos gőtéből származnak, sérült szívizomzatuk hibátlanul regenerálódik. A természetes kardiális regeneráció mechanizmusai a felnőtt emberi szívben

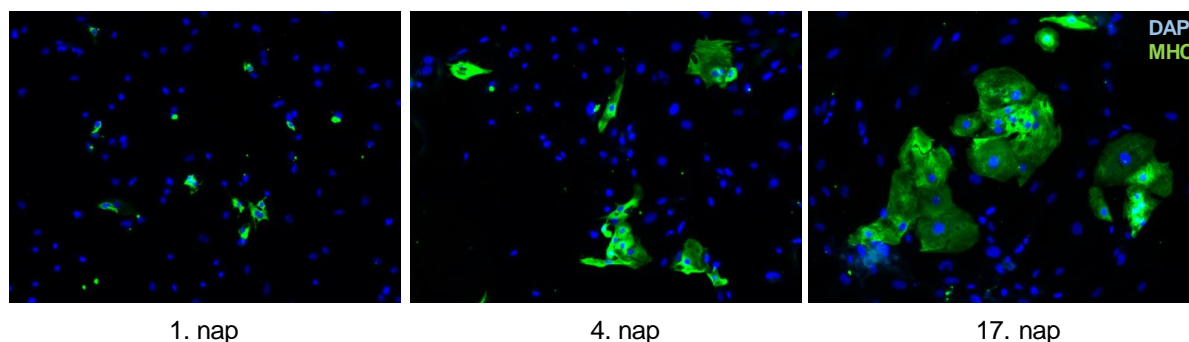


**40. ábra: The Space Merchants.** Frederik Pohl és Cyril M. Kornbluth. Space Merchants, Ballantine Books, 1953

is megtalálhatóak: a szívizomsejtek 50 %-a lecserélődik az élet során (Bergmann és mtsai, 2009; Bergmann és mtsai, 2015). Nemcsak arra van adatunk, hogy felnőtt szívizomsejtek osztódni képesek, de több mechanizmus szerepe is körvonalazódni látszik, amelyekbe beavatkozva a folyamatot aktívan befolyásolni lehet. Számos olyan endogén faktort ismertünk meg, amely képes arra, hogy fokozza a felnőtt szívizomsejtek mitotikus és proliferatív aktivitását. Egy ilyen támadáspont lehet a periostin, a BMP10 vagy a p38 MAPK rendszer modulálása (Xin és mtsai, 2013). További bizonyítékot a felnőtt szív proliferatív aktivitására Mohamed és munkatársai szolgáltatottak. Azt találták, hogy fiatal szívizomsejtekben a sejtciklust reguláló gének olyan kombinációja fordul elő, amelyek egér, patkány és emberi szívben is fokozzák a szívizomsejtek proliferációját és infarktust követően a szív regenerációját is (Mohamed és mtsai, 2018). A ciklin-dependens kináz 1, ciklin B1 és

aurora kináz B együttes overexpressziója primer egér szívizomsejt kultúrában drámaian megnöveli a szívizomsejt populáció sejtszámát és egyben a foszfo-hisztón H3 proliferációs markert expresszáló sejtek arányát is. 60 napos hiPSC-CM kultúrában hasonló hatás volt igazolható. A humán sejtek esetében CDK1/CCNB és a CDK4/CCND komplexek voltak a leghatékonyabbak, hatásukra a sejtek mintegy ötöde kezdett proliferálni. Noha van a szívnek saját regenerációs kapacitása, de ez igen limitált és az infarktushoz társuló jelentős szívizomzat károsodás pótlására nem elegendő. Az egyik megoldási lehetőség új exogén szívizomzat létrehozása és növekedésének kontrollált serkentése. Az őssejtekből érett humán szívizomsejtek képzése, majd azok proliferációjának stimulálása egy olyan kombinált terápiás stratégia lehet, amelyet a sérült szívizomzat regenerációjában is alkalmazhatunk.

Az embrionális őssejtekből és hiPSC-ből képzett szívizomsejtek is képesek osztódni. A differenciáltatás utáni korai szakaszban a sejtek nagy százaléka még proliferál. A tartósan fenntartott sejt kultúrában a proliferáló sejtek aránya jelentősen csökken, mivel a sejtek kilépnek a sejt ciklusból és G0 fázisba kerülnek. A hESC eredetű szívizomsejtek proliferációs aktivitása a differenciációt követő első hetekben jelentősen nagyobb, mint a felnőtt sejteké, a sejt ciklusban lévő sejtek aránya azonban ezt követően gyors csökkenést mutat - párhuzamosan a rendezett szarkomer struktúrák kialakulásával (Földes és mtsai, 2011). A sejtek morfológiája kezdetben valóban szabálytalan, de tartós sejt kultúrában és a külső mechanikai behatásokra ez rendeződik. A 41. ábrán egy proliferációs assay reprezentatív immunfluoreszcens képei láthatóak. A vizsgálat során az egyes szívizomsejteket tenyésztőedénybe helyezve, azok proliferációs aktivitása igazolható volt. A létrejött klónok és a sejtszám több időpontban történt mérésével kiderült, hogy átlagosan 10 napra tehető a sejtszám megkettőződéséhez szükséges idő.



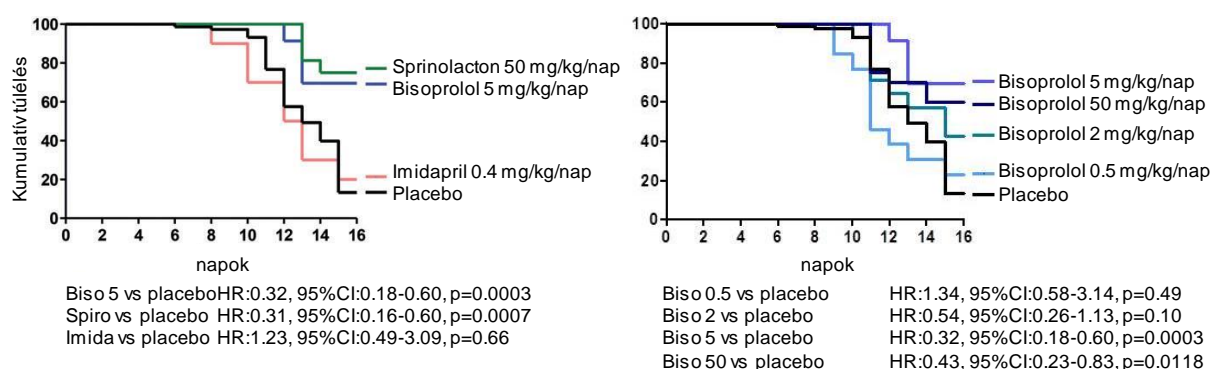
**41. ábra: Proliferáló hESC eredetű szívizomsejt populáció.** A kolónia-formációt myosin nehézlánc és DAPI immunocytochemiai jelölésekkel ábrázoltuk és kvantifikáltuk. A kultúrában tartott sejteknél kimutatható volt a sejtszaporodás, amelyet Ki67 proliferációs marker jelenléte is igazolt.

#### 4.6. In vivo vizsgálatok

A tumoros és myocardialis jelátviteli szabályozásokban fellelhető párhuzamosságokat eddig már több vizsgálat igazolta. Először vastagbél daganatos egérmódelben írták le a kardiális funkció párhuzamos csökkenését. A jelenség kialakulásában többek között az NFκB transzkripciós faktor mediátor szerepét mutatták ki (Wysong és mtsai, 2011). A szívizom leépülés folyamatában a katabolikus hatású ubiquitin-proteaszóma rendszer (UPS) aktivációja is szerepet játszik (Zhou és mtsai, 2010). Nem teljesen tisztázott azonban, hogy

ez a mechanizmus mennyiben jelenti azt a domináns jelátvitelt, ami a szívszövet csökkenéséhez vezet; Leinwand és munkatársai az autofágiás utat gondolják jellemző központi elemnek a kardiális atrophia létrejöttében (Casper és mtsai, 2011). Érdekes módon azonban, a myocardium érintettsége nem fordul elő minden tumoros betegben, ami felveti további elemek szerepét is a folyamatban.

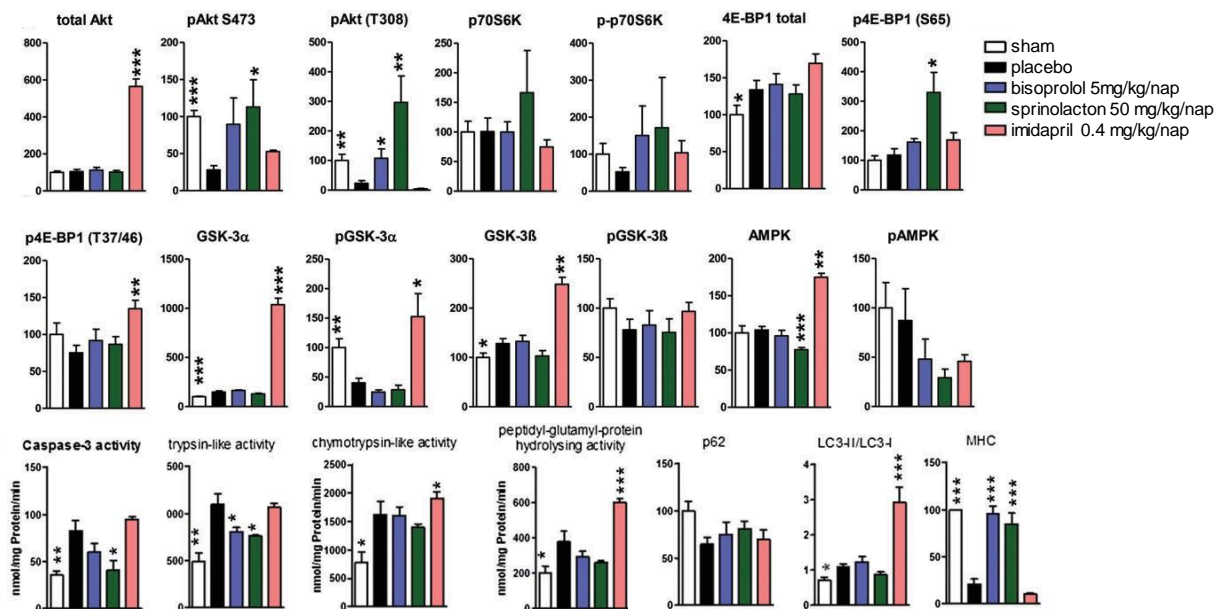
A szívszöveti átépülés és az onkogén jelátvitel többszörös átfedését a mi in vivo vizsgálataink is megerősítették. Patkányokban az AH-130 hepatoma modellt alkalmaztuk a sejthalálózásban és a myocardialis átépülésben szereplő jelátvitel vizsgálatára. A betegség előrehaladtával a hepatomával beoltott állatokban súlyos cachexia fejlődött ki, amely étvágytalanságban, progresszív testsúlycsökkenésben és a zsírszövet megfogyásában nyilvánult meg. Az AH-130 hepatoma modellben a tumor növekedése összevethető volt a korábbi beszámolóknak közötti változásokkal (Costelli és mtsai, 1995). A súlycsökkenés az egyes szerveknél is bekövetkezett, így a teljes szív és bal kamra tömege a teljes testsúly fogyásával párhuzamosan csökkent. Az AH-130 állatokban ez a kardiális funkció romlását is eredményezte.



**42. ábra: Túlélési arányok hepatomával inokulált patkányokban.** Az állatokat 5 mg/kg/nap (n = 23) bisoprolollal, 50 mg/kg/nap (n = 16) spironolactonnal, 0.4 mg/kg/nap (n = 9) Imidaprillal, illetve placeboval kezeltük (n = 73). A bisoprolol kezelés dóziszfüggő hatását külön is bemutatjuk a jobb oldali panelen. A Kaplan Meier görbék a placebo csoport magas halálozási arányát mutatják (87%), ezt mind a bisoprolol, mind a spironolacton kezelés szignifikánsan csökkentette. HR, hazard ratio, relatív kockázat.

Ebben a modellben határoztuk meg a szívelégtelenség kezelésére rutinszerűen használt klinikai gyógyszerek kardiális hatását, elsősorban a szívizomszövet csökkenésére és az állatok mortalitására fókuszálva. Elsődleges célunk annak tisztázása volt, hogy a szívelégtelenség standard terápiájában alkalmazott gyógyszerek közül melyeknek lehet szerepe az átépülés és funkció javításában. Kísérleteinkben a szelektív  $\beta_1$  antagonistá bisoprolol (0.5, 2, 5, és 50 mg/kg/nap), az aldosteron antagonistá spironolacton (2, 5, 50 mg/kg/nap), és egy ACE-gátló, az imidapril (0.4, 1, 10 mg/kg/nap) kardiális funkcióra kifejtett hatását vizsgáltuk. Az imidapril minden dózisban hatástalannak bizonyult, de a bisoprolol és spironolacton nemcsak kivédte a funkció romlását, de az AH130 patkányok túlélését is javította (42. ábra).

A hepatomás állatokban a kardiális dysfunctioval együtt a BNP szintek átmenetileg megemelkedtek. A bisoprolol és spironolacton a bal kamrai tömegvesztését is kivédte, de az imidaprilnak nem volt hatása az atrophias folyamatra. A szívizomszövet vesztéssel egyidejűleg a plazma troponin I és T szintek is megnöttek, ami a szívizomban zajló nekrosis jelének tekinthető. Az apoptotikus útvonalak aktiválódását a megnövekedett kaszpáz3 szintek igazolták. A bisoprolol és a spironolacton csökkentette a cachexiához társuló kaszpáz3 szint növekedést a myocardiumban. Az UPS emelkedett aktivitása az AH130 patkányok szívében a tumor implantáció 11. napjától kezdve kimutatható volt. Csökkent tripszin-szerű aktivitást eredményezett a bisoprolol és spironolacton kezelés a hepatomás állatokban. Ezzel ellentétben a peptidil-glutamil peptid hidrolizáló aktivitás megnövekedett az imidapril csoportban a placeboval kezelt állatokhoz képest; az imidapril szintén növelte a proteoszómák kimotripszin-szerű aktivitását (43. ábra).

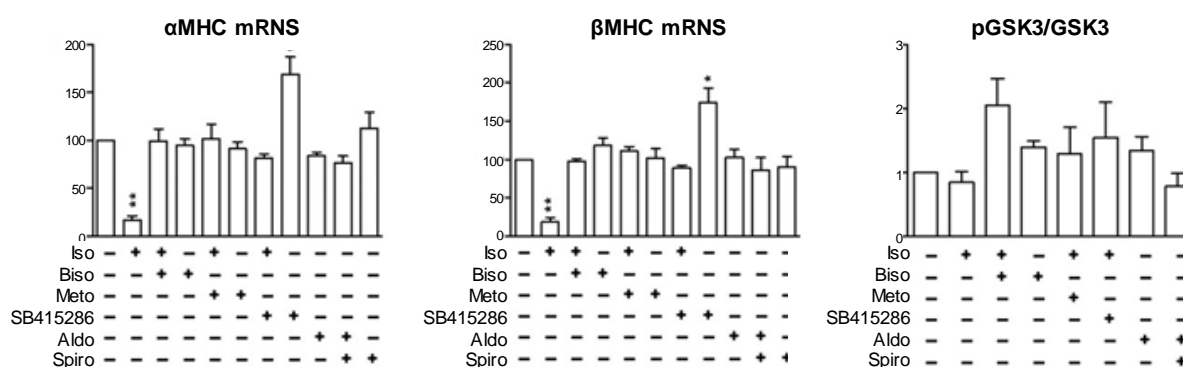


**43. ábra: A kezelések hatása a jelátviteli folyamatokra hepatoma modellben.** A hepatomás állatok anabolikus folyamatait a szívben a bisoprolol és spironolacton kezelések fokozzák: ezt a növekvő Akt foszforiláció mutatja. Az imidapril kezelésnek nem volt hatása az anabolikus folyamatokra. A spironolacton kezelés csökkenti a kaszpáz3 aktivitást. A proteoszómák csökkent tripszin-szerű aktivitása mind a bisoprolol, mind a spironolactone csoportokban tapasztalható, az imidapril viszont növeli a proteoszóma aktivitását. A p62/nucleoporin csökkenő szintjét a kezelések nem befolyásolták, az LC-3 II /LC-3 I aránya emelkedést mutatott imidapril kezelés mellett, ez a fokozódó autofágiára utal. A hepatomához társuló cachexia a miozin nehézlánc csökkenő szintjét mutatja a myocardiumban. Ezt a csökkenést a bisoprolol és spironolacton kivédte, az imidaprilnak nem volt hatása. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. placebo.

A myocardialis szövetvesztéshez kapcsolódóan a miozin nehézlánc protein szintjében is kifejezett csökkenés volt kimutatható a tumoros állatokban: mRNS szinten mind az  $\alpha$ -MHC, mind a  $\beta$ -MHC csökkenő expressziót mutatott. Spironolacton és bisoprolol adása a MHC szintek csökkenését kivédte. Az imidaprilnak ilyen hatása nem volt. Ezek a hatások, együttesen a GSK-3 $\alpha$  és GSK-3 $\beta$  foszforilációjában látott csökkenéssel, a protein szintézist reguláló mTORC1 csökkent aktivitását eredményezhetik. In vivo, a bal kamra tömegének csökkenéséért összességében több mechanizmus is felelőssé tehető. A megnövekedett UPS aktivitás, fokozott (kaspáz3-mediálta) apoptózis, nekrosis (emelkedett troponin szintek) és

autofágia (emelkedett LC-3 II/I arány és csökkent p62 szintek). A  $\beta$ 1-gátlószer, így a bisoprolol valamint az aldosteron antagonistá spironolacton dózis-függő preventív hatását igazoltuk. Velük ellentétben az ACE-gátló imidapril nem javította a túlélést. Bisoprolol adásával a testsúly, étvágy, szövetek tömege és zsírszövet mennyisége megtartott maradt; az állatok lokomotoros aktivitása és kardiális funkciója szintén javult. A bal kamra súlyvesztését a bisoprolol és spironolacton egyaránt kivédte.

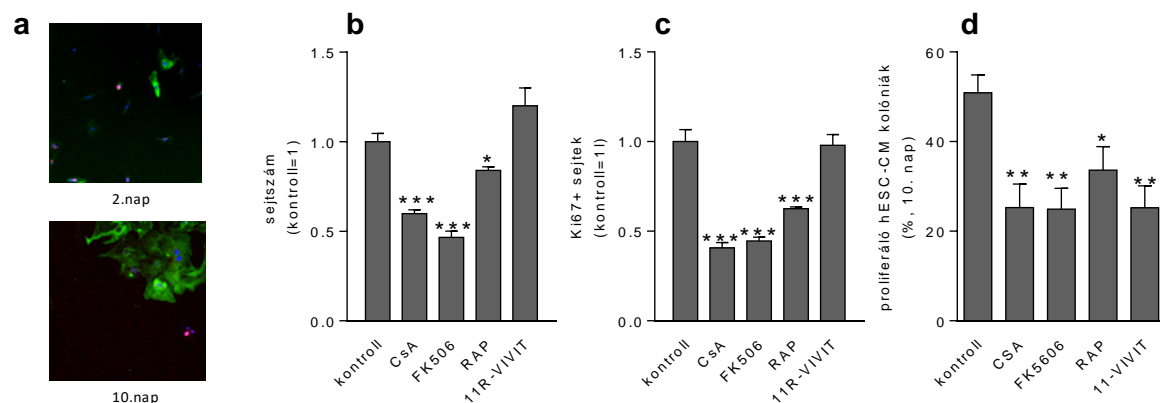
Azt feltételeztük, hogy a spironolacton és a bisoprolol kardiális atrophíát csökkentő, kedvező hatását direkt vagy indirekt módon elsősorban a szívizomsejteken fejtheti ki. Elképzelésünk bizonyítására 5 napos szérumentes tenyésztést követően neonatális patkány szívizomsejteket kezeltünk isoprenalinnal és a klinikai szerekekkel (44. ábra). Az isoprenalin hatására az  $\alpha$ - és  $\beta$ -MHC mRNS szintek csökkentek ( $-83.0 \pm 0.1$  és  $-81.2 \pm 0.1\%$ ,  $P < 0.01$ ). Ezt a hatást a bisoprolol, a metoprolol és a GSK3-gátló SB425286 kivédte. A spironolacton és aldosteron nem befolyásolta a szívizomsejtek MHC expressziós profilját, sem a GSK3 $\alpha/\beta$  foszforilációját szérumentes sejt kultúrában, ami arra utal, hogy hatásukat elsősorban mégsem a szívizomsejteken fejtik ki, hanem például fibroblasztokon (Messaoudi és mtsai, 2012). Emellett a bisoprolol indukálta a GSK3 $\alpha/\beta$  foszforilációt (=gátlást) a kontroll és isoprenalin stimulált neonatális szívizomsejtekben ( $+29 \pm 16\%$ , vs. kontroll,  $P=0.03$ ), rámutatva, hogy a  $\beta$ -adrenerg jelátvitel a cachectikus szarkomer protein veszteségben közvetlen szerepet játszik.



**44. ábra: Isoprenalin kezelés hatására a patkány neonatális szívizomsejtek csökkent  $\alpha$ - és  $\beta$ -miozin nehézlánc expressziót mutatnak.** Ezt a hatást bisoprolol (Biso), metoprolol (Meto) és GSK3-inhibitor SB 425286 kivédi. Az aldosteron (Aldo) és spironolacton (Spiro) adása nem befolyásolta az mRNS szinteket. A GSK3 foszforilációja bisoprolol mellett növekvő tendenciát mutat, míg metoprolol mellett ez a hatás kevésbé kifejezett. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs. kontroll (Iso) csoport.

#### 4.7. Immunszuppressziós szerek pleiotrop hatásai

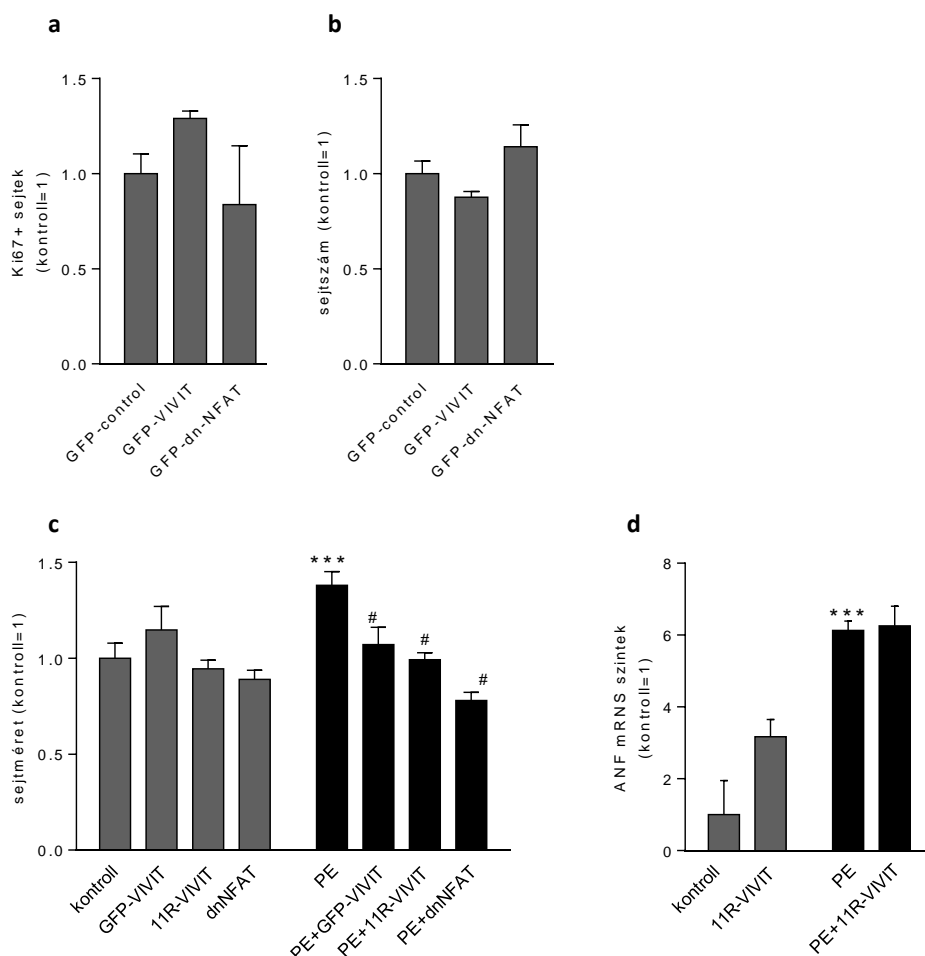
A 4.1.3 fejezetben az immunszuppresszív szerek sejthalálózást befolyásoló hatásait írtuk le. A szívtranszplantációban alkalmazott (és a jövőben humán őssejt-származékokból szövetépítéssel készült kardiális konstruktumok esetében is szükségessé válhat) főbb immunszuppresszáns szerek, így a cyclosporin A, a tacrolimus és a rapamycin más pleiotrop hatását is igazolni tudtuk azonban. Ezek a klinikai szerek az immunválasz modulálása mellett számos kardiális jelátviteli utat befolyásolnak (47. ábra), így a szívizomsejt hypertrophia és proliferáció folyamatait is módosították.



**45. ábra: Immunszuppresszív szerek hatása a hESC eredetű szívizomsejtek számára és proliferatív aktivitására.** (a) Reprezentatív immuncytokémiás felvétel a hESC-CM kolóniák de novo képződéséről. Sejtszám (b), Ki67-pozitív sejtek % aránya (c) és a proliferáló hESC-CM kolóniák aránya (d). A tenyésztés 2. és 4. napján már megfigyelhető a sejtek kezdődő proliferációja, a 10. napon jelentős sejtszámú telepek is láthatóak. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 12$  ismétlés / 3 biológiai preparátum. A sejteket a szélesztést követő, illetve a 10. napon számláltuk.

A gyógyszereket klinikai terápiás dózisban adva a sejtenyészetekhez, azok jelentősen gátolják a hESC-CM populáció proliferációs aktivitását. A két mechanizmus gátlása együttesen az embrionális szívizomsejtek számának jelentős csökkenését eredményezi a kontroll (DMSO) kezeléshez képest (45. ábra). A CsA és FK506 anti-proliferatív hatása valószínűsíthetően független az NFAT jelátviteltől, mert a VIVIT gátlásnak nem volt közvetlen hatása a hESC-CM proliferációjára. Sem a domináns-negatív NFAT vektor alkalmazása, sem a GFP-VIVIT overexpresszálása nem változtatta meg a proliferációs aktivitást és így a Ki67-pozitív sejtek arányát sem (Ki67<sup>+</sup>/MHC  $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> sejtek és sejtszám), ami arra utal, hogy a calcineurin jelátvitel az NFAT-től független módon képes a sejtosztódást befolyásolni. A calcineurin/NFAT kapcsolat gátlása VIVIT-tel, de a calcineurin egyéb hatásai nélkül, egy lehetőség arra, hogy a hESC derivátumok transzplantációját érdemben javítsuk – úgy, hogy a sejtek proliferációját azonban ne gátoljuk. A rapamycin anti-proliferatív hatása szintén ismert (Juhászova és mtsai, 2009); ez a hESC-CM sejteken is igazolható volt. A rapamycin az mTOR gátlásán keresztül kivédi vagy gátolja a szívizomsejtek sejtciklusát az S fázis előtt (Sciarretta és mtsai, 2014).

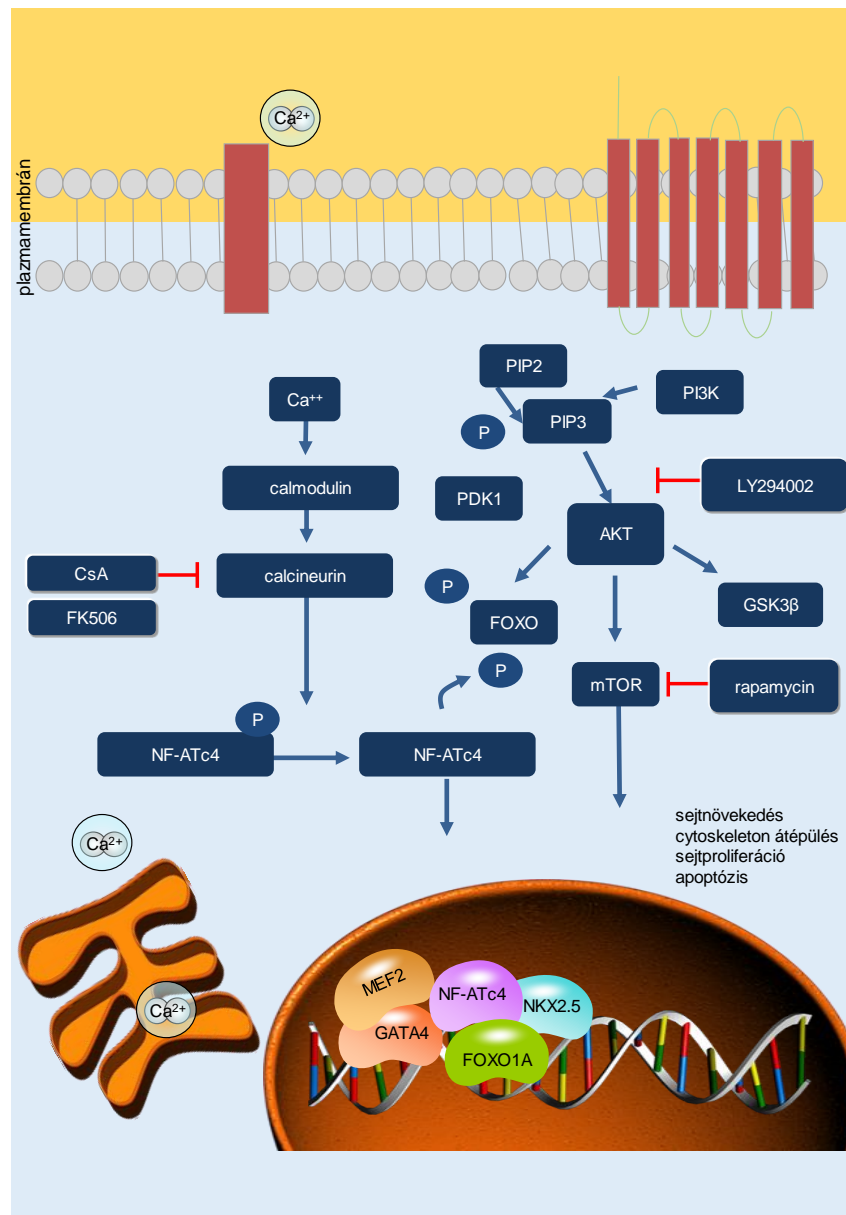
Az általunk vizsgált immunszuppresszáns szerek (CsA, FK506, rapamycin és a GFP-VIVIT fúziós protein) további pleiotropiás hatásai közé sorolható, hogy gátolják a phenylephrine által kiváltott szívizomsejt hypertrophiát. Kimutattuk, hogy az immunszuppresszív hatású cyclosporin A, FK506 és rapamycin szignifikánsan csökkenti a phenylephrine-indukálta hypertrophia mértékét is, amely a hypertrophiás és viabilitási jelátviteli utak átfedését igazolta ismét (Földes és mtsai, 2011).



**46. ábra: Az NFAT transzkripció faktor gátlása módosítja a phenylephrine által indukált hypertrophiás választ és sejtnövekedést hESC-CM sejtekben.** (A, B) Ki67<sup>+</sup>/MHC  $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> sejtek és sejtszám. (C) A hESC-CM sejtek domináns-negatív NFAT1C vagy GFP-VIVIT konstruktumokkal való transzfektálása, valamint sejt-permeabilis 11R-VIVIT,  $P < 0.05$  vs. pBJ5 „üres” expressziós vektor). (D) ANF mRNS szintek. \*\*\* $P < 0.001$  vs. kontroll, # $P < 0.05$  vs. PE-kezelt sejtek.  $n=9$ , két független kísérletből.

A hypertrophiában igazoltan szerepet játszó NFAT transzkripció faktor direkt jelátviteli szerepét is megvizsgáltuk egy további kísérlet során. Erre a célra a calcineurin-NFAT interakciót szelektíven gátló (a calcineurin foszfatáz aktivitását nem befolyásoló), membrán-permeabilis 11R-VIVIT proteint, illetve GFP-VIVIT plazmid konstruktumot alkalmaztunk. A humán ESC-CM sejteket ezenkívül az NFAT1c domináns-negatív verziójával transzfektáltuk egy kísérleti csoportban. Az NFAT jelátvitel gátlása 11R-VIVIT-tel, a GFP-VIVIT overexpressziójával és a domináns negatív NFAT1c forma expressziójával egyaránt gátolja a hESC-CM hypertrophia kialakulását ( $P < 0.001$ ) (46. ábra). Ez egybehangzik azokkal a

korábbi kísérletekkel, amelyek igazolták, hogy a GFP-VIVIT a felnőtt szívizomsejtek PE-indukálta hypertrophiáját is gátolja (Pu és mtsai, 2003). Elgondolkasztó, de egyelőre nem ismert a mechanizmusa annak, hogy a phenylephrine-indukálta ANF mRNS szint növekedések magasak maradnak a 11R-VIVIT gátlás ellenére is.



**47. ábra: Az immunosuppresszáns jelátviteli utak szerepe a hypertrophiás és proliferatív válasz mediálásában hESC-CM sejtekben.** A feltüntetett immunosuppresszánsok: CsA, cyclosporine A; FK506, tacrolimus; rapamycin. Ezek a kalcium-calmodulin és PI3K/AKT rendszerek modulálásával befolyásolják a szívizomsejtek növekedését és átépülését. Az ebben szerepet játszó transzkripciós faktorok a FOXO1, GATA4, NKX2.5 és MEF2. Aktiváció kék nyíl, gátlás piros nyíl.

Ezen megfigyelések klinikai jelentősége tisztázásra vár. Fontos kérdés egyfelől, hogy a szükséges immunosuppresszív kezelés mellett hogyan csökkenthető a sejterápia során a sejtpusztulás mértéke ischemiás környezetben, másfelől hogyan javítható a sejtek integrációja és növelhető egyben a transzplantált kardiovaszkuláris konstruktum mérete.



A nagy mennyiségben létrehozott sejtek emellett a közepes és párhuzamos nagyteljesítményű gyógyszeresztelések alapját is képezhetik, amelynek során például kalcium jelet, kontraktilitást, cytotoxicitást és jelátviteli utakat lehet meghatározni az egyes kezeléseket követően (Mioulane és mtsai, 2012; Stoehr és mtsai, 2014). A humán szívizomsejtekben zajló biológiai folyamatok szimultán vizsgálata, így a sejthalálozás, sejtnövekedés, sejtciklus változásai, a gyógyszerfejlesztés és kardiovaszkuláris biológia fontos új, eddig nem hozzáférhető elemét jelenti. Az őssejt-eredetű kardiovaszkuláris sejtek alkalmasak lehetnek így számos állatkísérletes modell kiváltására és azoknál pontosabb humán élettani válaszok és betegségek modellezésére.

## 5. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. Elsőként alkalmaztunk humán pluripotens őssejtekből differenciált szívizomsejteket a hypertrophia jelátvitelének vizsgálatára. Eredményeink szerint a létrehozott sejtek alkalmasak a humán hypertrophiás jelátvitel vizsgálatára és új terápiás célpontok azonosítására.
2. High content mikroszkóp-alapú kardiotoxicitás assay-eket dolgoztunk ki a kardiotoxikus szerek hatásának vizsgálatára, amelyekkel a humán sejtípusok válaszkészségét lehet meghatározni. A markerek kombinált alkalmazásával pontos képet kaphatunk az egyes szerek időbeli toxikus és funkcionális hatásairól humán szívizomsejteken.
3. Eredményeink bizonyítják, hogy a szívizomsejtek eltérő válaszkészsége az adrenerg jelátviteli rendszer komplex, többszintű különbségeire vezethető vissza. Az őssejtekből létrehozott humán szívizomsejtek több eltérést is mutatnak a felnőtt kamrai szívizomsejtekkel összehasonlítva.
4. Kimutattuk, hogy a felnőtt kamrai szívizomsejtek domináns ADRA1A receptora helyett az őssejt eredetű sejtek az ADRA1B izoformát expresszálják. Míg a humán embrionális őssejtből differenciált sejtek adrenerg válaszkészsége megtartott marad, addig az adrenerg stimulusokra a hiPSC eredetű szívizomsejtek nem reagálnak. A sejtek közötti különbségért és az alacsony válaszkészségért egy többszintű szabályozórendszer felelős a két sejtípusban. Eltérő aktivitású több G-protein és protein kináz is, így például az EGFRK-src-GSK3b-HDACII-STAT3 hálózat. Mindezt figyelembe véve kombinált kináz gátlók alkalmazásával a tonikus anti-hypertrophiás hatás megszüntethető, és ezáltal a sejtek mérete és hypertrophiás génexpressziós aktivitása megnövelhető.
5. Kimutattuk, hogy a szívizomsejtek hypertrophiás válaszkészségéért a sejtmagtranszport megváltozott jelátviteli folyamatai és az import/export változásai felelősek. A folyamatok mediálásában a mitogén aktivált kinázok játszanak szerepet.
6. In vivo és in vitro modellben igazoltuk, hogy a szívizomzat és a szívizomsejtek átépüléséért felelős jelátviteli folyamatok több ponton átfedést mutatnak a tumoros szöveti folyamatok szabályozásával. Az adrenerg és aldosteron-függő klinikai terápiák a tumor-indukálta szívszöveti atrophíát és szívizomsejt átépülést gátolják.

## **6. A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége**

A humán iPS sejtekből a betegségben érintett sejttípusok hozhatóak létre, ma már rutinszerűen. Ezek a sejtek az elmúlt években hozzájárultak a kardiovaszkuláris betegségek molekuláris hátterének pontosabb megértéséhez. Eredményeink igazolták az alkalmazott eljárás számos előnyét és egyben rávilágítottak több kardiális megbetegedésben, így a hypertrophia esetében is a módszer jelenleg még fennálló korlátaira. Ennek az új és dinamikus fejlődő kutatási területnek a felhasználhatósága ma még sok szempontból valóban kérdéses. A humán pluripotens őssejtvonalak képesek a szervezetet felépítő sejttípusok létrehozására laboratóriumi körülmények között. E tulajdonságuk alapján jó modellként szolgálnak öröklött monogénes és számos szerzett kardiális megbetegedés mechanizmusának megválaszolására, emellett új tesztrendszerként alkalmazhatók toxikológiai vizsgálatokban és a jövőben a sejt-alapú terápiák sejtforrásául szolgálhatnak kardiovaszkuláris megbetegedésekben. Nagy előnyük továbbá, hogy általuk nem csak az egészséges sejtek élettanát lehet kutatni, hanem a beteg- és betegség-specifikus sejtek is vizsgálhatóvá váltak. Ennek különleges fontossága van azokon a területeken, ahol az állatmodellek, illetve a betegből származó primer sejttenyészetek eddig nem hoztak áttörést.

## 7. Irodalomjegyzék

Abdelwahid E, Kalvelyte A, Stulpinas A, de Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Földes G. Stem cell death and survival in heart regeneration and repair. *Apoptosis* 2016;21:252-268.

Aggarwal P, Turner A, Matter A, Kattman SJ, Stoddard A, Lorier R, Swanson BJ, Arnett DK, Broeckel U. RNA expression profiling of human iPSC-derived cardiomyocytes in a cardiac hypertrophy model. *PLoS One* 2014;9:e108051.

Akhter SA, Milano CA, Shotwell KF, Cho MC, Rockman HA, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Transgenic mice with cardiac overexpression of alpha1B-adrenergic receptors. In vivo alpha1-adrenergic receptor-mediated regulation of beta-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 1997;272:21253-21259.

Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De FS, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:14-25.

Alfaro MP, Pagni M, Vincent A, Atkinson J, Hill MF, Cates J, Davidson JM, Rottman J, Lee E, Young PP. The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18366-18371.

Andreka P, Zang J, Dougherty C, Slepak TI, Webster KA, Bishopric NH. Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2001;88:305-312.

Arenas-Hernandez M és Vega-Sanchez R. Housekeeping gene expression stability in reproductive tissues after mitogen stimulation. *BMC Res Notes* 2013;6:285.

Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M, Higashiyama S. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 2002;8:35-40.

Asano K, Bohlmeier TJ, Westcott JY, Zisman L, Kinugawa K, Good M, Minobe WA, Roden R, Wolfel EE, Lindenfeld J, David PJ, Perryman MB, Cleveland J, Lowes BD, Bristow MR. Altered expression of endothelin receptors in failing human left ventricles. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:833-846.

Bajpai VK és Andreadis ST. Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18:405-425.

Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 2004;109:2296-2301.

Behr TM, Nerurkar SS, Nelson AH, Coatney RW, Woods TN, Sulpizio A, Chandra S, Brooks DP, Kumar S, Lee JC, Ohlstein EH, Angermann CE, Adams JL, Sisko J, Sackner-Bernstein JD, Willette RN. Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation* 2001;104:1292-1298.

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98-102.

Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, Sjöström SL, Szewczykowska M, Jackowska T, Dos RC, Malm T, Andra M, Jashari R, Nyengaard JR, Possnert G, Jovinge S, Druid H, Frisen J. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 2015;161:1566-1575.

Bosman A, Letourneau A, Sartiani L, Del LM, Ronzoni F, Kuziakiv R, Tohonen V, Zucchelli M, Santoni F, Guipponi M, Dumevska B, Hovatta O, Antonarakis SE, Jaconi ME.

- Perturbations of heart development and function in cardiomyocytes from human embryonic stem cells with trisomy 21. *Stem Cells* 2015;33:1434-1446.
- Bossuyt J. Nuclear remodelling: a consequence of nucleocytoplasmic traffic run amok? *Cardiovasc Res* 2015;105:6-7.
- Bruckner R, Mugge A, Scholz H. Existence and functional role of alpha 1-adrenoceptors in the mammalian heart. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:639-645.
- Buikema JW, Mady AS, Mittal NV, Atmanli A, Caron L, Doevendans PA, Sluijter JP, Domian IJ. Wnt/beta-catenin signaling directs the regional expansion of first and second heart field-derived ventricular cardiomyocytes. *Development* 2013a;140:4165-4176.
- Buikema JW, Zwetsloot PP, Doevendans PA, Sluijter JP, Domian IJ. Expanding mouse ventricular cardiomyocytes through GSK-3 inhibition. *Curr Protoc Cell Biol* 2013b;61:23.
- Bupha-Intr T, Haizlip KM, Janssen PM. Role of endothelin in the induction of cardiac hypertrophy in vitro. *PLoS One* 2012;7:e43179.
- Burridge PW, Holmstrom A, Wu JC. Chemically Defined Culture and Cardiomyocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Hum Genet* 2015;87: 21.3.1-15.
- Cao DJ, Wang ZV, Battiprolu PK, Jiang N, Morales CR, Kong Y, Rothermel BA, Gillette TG, Hill JA. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4123-4128.
- Cao F, Wagner RA, Wilson KD, Xie X, Fu JD, Drukker M, Lee A, Li RA, Gambhir SS, Weissman IL, Robbins RC, Wu JC. Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 2008;3:e3474.
- Cao N, Liang H, Huang J, Wang J, Chen Y, Chen Z, Yang HT. Highly efficient induction and long-term maintenance of multipotent cardiovascular progenitors from human pluripotent stem cells under defined conditions. *Cell Res* 2013;23:1119-1132.
- Carlson C, Koonce C, Aoyama N, Einhorn S, Fiene S, Thompson A, Swanson B, Anson B, Kattman S. Phenotypic screening with human iPS Cell-derived cardiomyocytes: hts-compatible assays for interrogating cardiac hypertrophy. *J Biomol Screen* 2013. 18:1203-11.
- Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* 1912;15:516-528.
- Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, Yang L, Kaplan AD, Adler ED, Rozov R, Ge Y, Cohen N, Edelmann LJ, Chang B, Waghay A, Su J, Pardo S, Lichtenbelt KD, Tartaglia M, Gelb BD, Lemischka IR. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010;465:808-812.
- Castaldi A, Zaglia T, Di M, V, Carullo P, Viggiani G, Borile G, Di SB, Schiattarella GG, Gualazzi MG, Elia L, Stirparo GG, Colorito ML, Pironti G, Kunderfranco P, Esposito G, Bang ML, Mongillo M, Condorelli G, Catalucci D. MicroRNA-133 modulates the beta1-adrenergic receptor transduction cascade. *Circ Res* 2014;115:273-283.
- Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beermann F, Cotecchia S. Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11589-11594.
- Chahine MN, Blackwood DP, Dibrov E, Richard MN, Pierce GN. Oxidized LDL affects smooth muscle cell growth through MAPK-mediated actions on nuclear protein import. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:431-441.
- Chahine MN, Mioulane M, Sikkil MB, O'Gara P, Dos Remedios CG, Pierce GN, Lyon AR, Földes G, Harding SE. Nuclear pore rearrangements and nuclear trafficking in cardiomyocytes from rat and human failing hearts. *Cardiovasc Res* 2015;105:31-43.
- Chen A, Ting S, Seow J, Reuveny S, Oh S. Considerations in designing systems for large scale production of human cardiomyocytes from pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:12.

Chen Y, Amende I, Hampton TG, Yang Y, Ke Q, Min JY, Xiao YF, Morgan JP. Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1653-H1658.

Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:16694-16700.

Communal C, Colucci WS, Singh K. p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *J Biol Chem* 2000;275:19395-19400.

Communal C, Sumandea M, de TP, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6252-6.

Concas V, Laurent S, Brisac AM, Perret C, Safar M. Endothelin has potent direct inotropic and chronotropic effects in cultured heart cells. *J Hypertens Suppl* 1989;7:S96-S97.

Cosper PF és Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer Res* 2011;71:1710-1720.

Costelli P, Garcia-Martinez C, Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Agell N, Tessitore L, Baccino FM, Argiles JM. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J Clin Invest* 1995;95:2367-2372.

Dambrot C, Braam SR, Tertoolen LG, Birket M, Atsma DE, Mummery CL. Serum supplemented culture medium masks hypertrophic phenotypes in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2014;18:1509-1518.

Davies CH, Davia K, Bennett JG, Pepper JR, Poole-Wilson PA, Harding SE. Reduced contraction of isolated human ventricular myocytes in ischaemic cardiomyopathy. *Circulation* 1994;90:1397.

Davies CH, Davia K, Bennett JG, Pepper JR, Poole-Wilson PA, Harding SE. Reduced contraction and altered frequency response of isolated ventricular myocytes from patients with heart failure. *Circulation* 1995;92:2540-2549.

Davis J, Davis LC, Correll RN, Makarewich CA, Schwanekamp JA, Moussavi-Harami F, Wang D, York AJ, Wu H, Houser SR, Seidman CE, Seidman JG, Regnier M, Metzger JM, Wu JC, Molkentin JD. A Tension-Based Model Distinguishes Hypertrophic versus Dilated Cardiomyopathy. *Cell* 2016;165:1147-1159.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-472.

del Monte F, O'Gara P, Poole-Wilson PA, Yacoub MH, Harding SE. Cell geometry and contractile abnormalities of myocytes from failing human left ventricle. *Cardiovasc Res* 1995;30:281-90.

del Monte F és Hajjar RJ. Intracellular devastation in heart failure. *Heart Fail Rev* 2008;13:151-162.

Depre C, Kim SJ, John AS, Huang Y, Rimoldi OE, Pepper JR, Dreyfus GD, Gaussin V, Pennell DJ, Vatner DE, Camici PG, Vatner SF. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium. *Circulation Research* 2004;95:433-40.

Diez J, Gonzalez A, Lopez B, Querejeta R. Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;2:209-16.

Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:2414-2424.

Diwan A, Krenz M, Syed FM, Wansapura J, Ren X, Koesters AG, Li H, Kirshenbaum LA, Hahn HS, Robbins J, Jones WK, Dorn GW. Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest* 2007;117:2825-2833.

Dorn GW, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 2003;92:1171-1175.

Drawnel FM, Boccardo S, Prummer M, Delobel F, Graff A, Weber M, Gerard R, Badi L, Kam-Thong T, Bu L, Jiang X, Hoflack JC, Kiialainen A, Jeworutzki E, Aoyama N, Carlson C, Burcin M, Gromo G, Boehringer M, Stahlberg H, Hall BJ, Magnone MC, Kolaja K, Chien KR, Bailly J, Iacone R. Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells. *Cell Rep* 2014;9:810-821.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.

English K és Wood KJ. Immunogenicity of embryonic stem cell-derived progenitors after transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011;16:90-95.

Exton JH. Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. *Am J Physiol* 1985;248:E633-E647.

Földes G, Harding SE, Ali NN. Cardiomyocytes from embryonic stem cells: towards human therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:1473-1483.

Földes G, Matsa E, Kriston-Vizi J, Leja T, Amisten S, Kolker L, Kodagoda T, Dolatshad NF, Mioulane M, Vauchez K, Aranyi T, Ketteler R, Schneider MD, Denning C, Harding SE. Aberrant alpha-adrenergic hypertrophic response in cardiomyocytes from human induced pluripotent cells. *Stem Cell Reports* 2014a;3:905-914.

Földes G, Mioulane M, Kodagoda T, Lendvai Z, Iqbal A, Ali NN, Schneider MD, Harding SE. Immunosuppressive agents modulate function, growth, and survival of cardiomyocytes and endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2014b;23:467-476.

Földes G, Mioulane M, Wright JS, Liu AQ, Novak P, Merkely B, Gorelik J, Schneider MD, Ali NN, Harding SE. Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: a testbed for studying human cardiac hypertrophy? *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:367-376.

Gao Q, Guo M, Jiang X, Hu X, Wang Y, Fan Y. A cocktail method for promoting cardiomyocyte differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2014;2014:162024.

Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le MH. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996;98:556-562.

Gellér L, Merkely B, Szokodi I, Szabo T, Vecsey T, Juhasz-Nagy A, Toth M, Horkay F. Electrophysiological effects of intrapericardial infusion of endothelin-1. *Pacing Clin Electrophysiol* 1998;21:151-156.

Geng YJ. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:687-697.

Geng YJ, Ishikawa Y, Vatner DE, Wagner TE, Bishop SP, Vatner SF, Homcy CJ. Apoptosis of cardiac myocytes in Galpha transgenic mice. *Circ Res* 1999;84:34-42.

Gessert S és Kuhl M. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res* 2010;107:186-199.

Gong H, Sun H, Koch WJ, Rau T, Eschenhagen T, Ravens U, Heubach JF, Adamson DL, Harding SE. Specific  $\beta$ 2AR blocker ICI 118,551 actively decreases contraction through a Gi-coupled form of the  $\beta$ 2AR in myocytes from failing human heart. *Circulation* 2002;105:2497-2503.

Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, Stern MD, Silverman HS. Protective effects of low and high doses of cyclosporin A against reoxygenation injury in isolated rat cardiomyocytes are associated with differential effects on mitochondrial calcium levels. *Cell Calcium* 2000;27:87-95.

Haider N, Arbustini E, Gupta S, Liu H, Narula N, Hajjar R, Moorjani N, Westaby S, Semigran MJ, Dec GW, Chandrashekar Y, Narula J. Concurrent upregulation of endogenous

proapoptotic and antiapoptotic factors in failing human hearts. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009;6:250-261.

Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:821-831.

Halmosi R, Deres L, Gal R, Eros K, Sumegi B, Toth K. PARP inhibition and postinfarction myocardial remodeling. *Int J Cardiol* 2016;217 Suppl:S52-S59.

Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Hirata K, Yano M, Kohno M, Matsuzaki M. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1210-1215.

Han C, Bowen WC, Michalopoulos GK, Wu T. Alpha-1 adrenergic receptor transactivates signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) through activation of Src and epidermal growth factor receptor (EGFR) in hepatocytes. *J Cell Physiol* 2008;216:486-497.

Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehrioglu B, Schwoerer AP, Uebeler J, Eschenhagen T. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 2010;107:35-44.

Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I. Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* 1999;100:2093-2099.

Harding SE, Brown LA, Wynne DG, Davies CH, Poole-Wilson PA. Mechanisms of beta-adrenoceptor desensitisation in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 1994;28:1451-1460.

Harding SE, Jones SM, O'Gara P, del MF, Vescovo G, Poole-Wilson PA. Isolated ventricular myocytes from failing and non-failing human heart; the relation of age and clinical status of patients to isoproterenol response. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:549-564.

Heineke J és Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:589-600.

Hertelendi Z, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Édes I, Tósaki Á, Papp Z. The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2009;13:2200-2209.

Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)* 2007;112:417-428.

Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, Polacheck WJ, Benson CC, Swist S, Gorham J, Yang L, Schafer S, Sheng CC, Haghighi A, Homys J, Hubner N, Church G, Cook SA, Linke WA, Chen CS, Seidman JG, Seidman CE. Heart Disease. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science* 2015;349:982-986.

Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, Schaaf S, Bornchen C, Muller C, Schulz H, Hubner N, Stenzig J, Stoehr A, Neuber C, Eder A, Luther PK, Hansen A, Eschenhagen T. Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 2014;74:151-161.

Hong F, Lee J, Song JW, Lee SJ, Ahn H, Cho JJ, Ha J, Kim SS. Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *FASEB J* 2002;16:1633-1635.

Ivashchenko CY, Pipes GC, Lozinskaya IM, Lin Z, Xiaoping X, Needle S, Grygielko ET, Hu E, Toomey JR, Lepore JJ, Willette RN. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit temporal changes in phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305:H913-H922.

Jeter JR, Jr. és Cameron IL. Cell proliferation patterns during cytodifferentiation in embryonic chick tissues: liver, heart and erythrocytes. *J Embryol Exp Morphol* 1971;25:405-422.



- Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection. *Circ Res* 2009;104:1240-1252.
- Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, Doevendans PA, Jones F, Kimball TF, Molckentin JD. Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:15524-15530.
- Kane C és Terracciano CMN. Concise Review: Criteria for chamber-specific categorization of human cardiac myocytes derived from pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2017;35:1881-1897.
- Karakikes I, Stillitano F, Nonnenmacher M, Tzimas C, Sanoudou D, Termglinchan V, Kong CW, Rushing S, Hansen J, Ceholski D, Kolokathis F, Kremastinos D, Katoulis A, Ren L, Cohen N, Gho JM, Tsiapras D, Vink A, Wu JC, Asselbergs FW, Li RA, Hulot JS, Kranias EG, Hajjar RJ. Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy. *Nat Commun* 2015;6:6955.
- Khan S, Salloum F, Das A, Xi L, Vetrovec GW, Kukreja RC. Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:256-264.
- Kijlstra JD, Hu D, Mittal N, Kausel E, van der Meer P, Garakani A, Domian IJ. Integrated analysis of contractile kinetics, force generation, and electrical activity in single human stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* 2015;5:1226-1238.
- Kirshenbaum LA és de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997;96:1580-1585.
- Kohout TA, Takaoka H, McDonald PH, Perry SJ, Mao L, Lefkowitz RJ, Rockman HA. Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation* 2001;104:2485-2491.
- Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J, Clouthier SG, Wicha MS. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* 2009;7:e1000121.
- Kovács K, Hanto K, Bognar Z, Tapodi A, Bognár E, Kiss GN, Szabó A, Rappai G, Kiss T, Sümegi B, Gallyas F, Jr. Prevalent role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca(2+) channel- and beta-adrenergic receptor blockers. *Mol Cell Biochem* 2009;321:155-164.
- Kyoi S, Otani H, Matsuhisa S, Akita Y, Tatsumi K, Enoki C, Fujiwara H, Imamura H, Kamihata H, Iwasaka T. Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster. *Cardiovasc Res* 2006;69:888-898.
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007;25:1015-1024.
- Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, Han L, Yen M, Wang Y, Sun N, Abilez OJ, Hu S, Ebert AD, Navarrete EG, Simmons CS, Wheeler M, Pruitt B, Lewis R, Yamaguchi Y, Ashley EA, Bers DM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2013;12:101-113.
- Lee JH, Protze SI, Laksman Z, Backx PH, Keller GM. Human pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes develop from distinct mesoderm populations. *Cell Stem Cell* 2017;21:179-194.
- Lee Y és Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 2009;14:536-548.
- Lee YK, Ng KM, Chan YC, Lai WH, Au KW, Ho CY, Wong LY, Lau CP, Tse HF, Siu CW. Triiodothyronine promotes cardiac differentiation and maturation of embryonic stem cells via the classical genomic pathway. *Mol Endocrinol* 2010;24:1728-1736.

Li Y, Zhang H, Liao W, Song Y, Ma X, Chen C, Lu Z, Li Z, Zhang Y. Transactivated EGFR mediates alpha(1)-AR-induced STAT3 activation and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H1941-H1951.

Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E1848-E1857.

Lieu DK, Fu JD, Chiamvimonvat N, Tung KC, McEnerney GP, Huser T, Keller G, Kong CW, Li RA. Mechanism-based facilitated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6:191-201.

Liggett SB. Beta-adrenergic receptors in the failing heart: the good, the bad, and the unknown. *J Clin Invest* 2001;107:947-948.

Lin B, Li Y, Han L, Kaplan AD, Ao Y, Kalra S, Bett GC, Rasmusson RL, Denning C, Yang L. Modeling and studying mechanism of dilated cardiomyopathy using induced pluripotent stem cells derived from Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients. *Dis Model Mech* 2015;8:457-466.

Lin F, Owens WA, Chen S, Stevens ME, Kesteven S, Arthur JF, Woodcock EA, Feneley MP, Graham RM. Targeted alpha(1A)-adrenergic receptor overexpression induces enhanced cardiac contractility but not hypertrophy. *Circ Res* 2001;89:343-350.

Ljubojevic S, Radulovic S, Leitinger G, Sedej S, Sacherer M, Holzer M, Winkler C, Pritz E, Mittler T, Schmidt A, Sereinigg M, Wakula P, Zissimopoulos S, Bisping E, Post H, Marsche G, Bossuyt J, Bers DM, Kockskamper J, Pieske B. Early remodeling of perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores and nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation* 2014;130:244-255.

Lorenzen JM és Thum T. Long noncoding RNAs in kidney and cardiovascular diseases. *Nat Rev Nephrol* 2016;12:360-373.

Luxan G, Casanova JC, Martinez-Poveda B, Prados B, D'Amato G, MacGrogan D, Gonzalez-Rajal A, Dobarro D, Torroja C, Martinez F, Izquierdo-Garcia JL, Fernandez-Friera L, Sabater-Molina M, Kong YY, Pizarro G, Ibanez B, Medrano C, Garcia-Pavia P, Gimeno JR, Monserrat L, Jimenez-Borreguero LJ, de la Pompa JL. Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Nat Med* 2013;19:193-201.

Ma H, Morey R, O'Neil RC, He Y, Daughtry B, Schultz MD, Hariharan M, Nery JR, Castanon R, Sabatini K, Thiagarajan RD, Tachibana M, Kang E, Tippner-Hedges R, Ahmed R, Gutierrez NM, Van DC, Polat A, Sugawara A, Sparman M, Gokhale S, Amato P, Wolf DP, Ecker JR, Laurent LC, Mitalipov S. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 2014;511:177-183.

Mackay K és Mochly-Rosen D. Involvement of a p38 mitogen-activated protein kinase phosphatase in protecting neonatal rat cardiac myocytes from ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1585-1588.

Matsa E és Denning C. In vitro uses of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5:581-592.

McKinsey TA és Kass DA. Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:617-635.

Menasche P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, Parouchev A, Benhamouda N, Tachdjian G, Tosca L, Trouvin JH, Fabreguettes JR, Bellamy V, Guillemain R, Suberbielle BC, Tartour E, Desnos M, Larghero J. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 2015;36:2011-2017.

Merkely B, Gara E, Lendvai Z, Skopál J, Leja T, Zhou W, Kosztin A, Várady G, Mioulane M, Bagyura Z, Németh T, Harding SE, Földes G. Signaling Via PI3K/FOXO1A Pathway

modulates formation and survival of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells Dev* 2015;24:869-878.

Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C, Jaisser F. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol* 2012;350:266-272.

Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N. A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell Rep* 2012;2:1448-1460.

Mioulane M, Földes G, Ali NN, Schneider MD, Harding SE. Development of high content imaging methods for cell death detection in human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5:593-604.

Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, Zhou P, Huang Y, Efenbein A, Foley A, Magnitsky S, Srivastava D. Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration. *Cell* 2018;173:104-116.

Molina-Navarro MM, Rosello-Lleti E, Tarazon E, Ortega A, Sanchez-Izquierdo D, Lago F, Gonzalez-Juanatey JR, Garcia-Pavia P, Salvador A, Montero JA, Portoles M, Rivera M. Heart failure entails significant changes in human nucleocytoplasmic transport gene expression. *Int J Cardiol* 2013;168:2837-2843.

Molkentin JD és Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 2001;63:391-426.

Montaigne D, Marechal X, Preau S, Baccouch R, Modine T, Fayad G, Lancel S, Neviere R. Doxorubicin induces mitochondrial permeability transition and contractile dysfunction in the human myocardium. *Mitochondrion* 2011;11:22-26.

Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res* 2008;103:343-351.

Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, Li ST, Kobayashi N, Matsumoto S, Tanaka K, Tanaka N, Matsui H. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 2004;10:305-309.

Nosedá M, Peterkin T, Simoes FC, Patient R, Schneider MD. Cardiopoietic factors: extracellular signals for cardiac lineage commitment. *Circ Res* 2011;108:129-152.

Oerlemans MI, Goumans MJ, van MB, Clevers H, Doevendans PA, Sluijter JP. Active Wnt signaling in response to cardiac injury. *Basic Res Cardiol* 2010;105:631-641.

Oka T, Xu J, Molkentin JD. Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18:117-131.

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 2004;110:705-712.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 2006;367:356-367.

Otsu K, Yamashita N, Nishida K, Hirotani S, Yamaguchi O, Watanabe T, Hikoso S, Higuchi Y, Matsumura Y, Maruyama M, Sudo T, Osada H, Hori M. Disruption of a single copy of the p38alpha MAP kinase gene leads to cardioprotection against ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:56-60.

Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313:1137-1140.

Pálfia Z. és Kristof Z. A sejtbiológia alapjai. 2013.  
[elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/Sejtbiologia/index.html](http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/Sejtbiologia/index.html)

- Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:931-936.
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134:877-886.
- Pearl JI, Lee AS, Leveson-Gower DB, Sun N, Ghosh Z, Lan F, Ransohoff J, Negrin RS, Davis MM, Wu JC. Short-term immunosuppression promotes engraftment of embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2011;8:309-317.
- Petrich BG és Wang Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:50-55.
- Predmore JM, Wang P, Davis F, Bartolone S, Westfall MV, Dyke DB, Pagani F, Powell SR, Day SM. Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation* 2010;121:997-1004.
- Pu WT, Ma Q, Izumo S. NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro. *Circ Res* 2003;92:725-731.
- Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeier H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev* 2007;12:331-343.
- Rao C, Prodromakis T, Kolker L, Chaudhry UA, Trantidou T, Sridhar A, Weekes C, Camelliti P, Harding SE, Darzi A, Yacoub MH, Athanasiou T, Terracciano CM. The effect of microgrooved culture substrates on calcium cycling of cardiac myocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials* 2013;34:2399-2411.
- Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeier H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* 2001;104:2923-2931.
- Rehm M, Dussmann H, Janicke RU, Tavaré JM, Kogel D, Prehn JH. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *J Biol Chem* 2002;277:24506-24514.
- Ren R, Oakley RH, Cruz-Topete D, Cidlowski JA. Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. *Endocrinology* 2012;153:5346-5360.
- Ribeiro MC, Tertoolen LG, Guadix JA, Bellin M, Kosmidis G, D'Aniello C, Monshouwer-Kloots J, Goumans MJ, Wang YL, Feinberg AW, Mummery CL, Passier R. Functional maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in vitro - Correlation between contraction force and electrophysiology. *Biomaterials* 2015;51:138-150.
- Richard MN, Deniset JF, Kneesh AL, Blackwood D, Pierce GN. Mechanical stretching stimulates smooth muscle cell growth, nuclear protein import, and nuclear pore expression through mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2007;282:23081-23088.
- Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:567-581.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002;415:206-212.
- Rohrbach S, Troidl C, Hamm C, Schulz R. Ischemia and reperfusion related myocardial inflammation: A network of cells and mediators targeting the cardiomyocyte. *IUBMB Life* 2015;67:110-119.
- Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7375-7380.
- Rokosh DG, Stewart AF, Chang KC, Bailey BA, Karliner JS, Camacho SA, Long CS, Simpson PC. Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo.

Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. *J Biol Chem* 1996;271:5839-5843.

Romano S, Di PA, Sorrentino A, Bisogni R, Sivero L, Romano MF. FK506 binding-proteins as targets in anticancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10:651-656.

Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D, Morikawa K, Teles D, Yazawa M, Vunjak-Novakovic G. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* 2018;556:239-243.

Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev* 2010;90:1507-1546.

Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:304-312.

Ryall KA, Holland DO, Delaney KA, Kraeutler MJ, Parker AJ, Saucerman JJ. Network reconstruction and systems analysis of cardiac myocyte hypertrophy signaling. *J Biol Chem* 2012;287:42259-42268.

Saito S, Hiroi Y, Zou Y, Aikawa R, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. beta-Adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000;275:34528-34533.

Saito T, Asai K, Sato S, Hayashi M, Adachi A, Sasaki Y, Takano H, Mizuno K, Shimizu W. Autophagic vacuoles in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy with initially decompensated heart failure predict improved prognosis. *Autophagy* 2016;12:579-587.

Salazar NC, Chen J, Rockman HA. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:1006-1018.

Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, Eder A, Stohr A, Hirt MN, Rau T, Zimmermann WH, Conradi L, Eschenhagen T, Hansen A. Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One* 2011;6:e26397.

Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res* 2014;114:549-564.

Senapedis WT, Baloglu E, Landesman Y. Clinical translation of nuclear export inhibitors in cancer. *Semin Cancer Biol* 2014;27:74-86.

Severs NJ. The cardiac muscle cell. *Bioessays* 2000;22:188-199.

Sharma PP, Greenlee RT, Anderson KP, Chyou PH, Osorio HJ, Smith PN, Hayes JH, Vidaillet H. Prevalence and mortality of patients with myocardial infarction and reduced left ventricular ejection fraction in a defined community: relation to the second multicenter automatic defibrillator implantation trial. *J Interv Card Electrophysiol* 2007;19:157-164.

Sharov VG, Todor A, Suzuki G, Morita H, Tanhehco EJ, Sabbah HN. Hypoxia, angiotensin-II, and norepinephrine mediated apoptosis is stimulus specific in canine failed cardiomyocytes: a role for p38 MAPK, Fas-L and cyclin D1. *Eur J Heart Fail* 2003;5:121-129.

Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1135-1142.

Soonpaa MH és Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 1998;83:15-26.

Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von HS, Lal H, Grzesiak A, Kaschina E, Palus S, Potsch M, von WK, Hoher B, Latouche C, Jaisser F, Morawietz L, Coats AJ, Beadle J, Argiles JM, Thum T, Földes G, Doehner W, Hilfiker-Kleiner D, Force T, Anker SD. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *Eur Heart J* 2014;35:932-941.

Stewart AF, Rokosh DG, Bailey BA, Karns LR, Chang KC, Long CS, Kariya K, Simpson PC. Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1994;75:796-802.

Stoehr A, Neuber C, Baldauf C, Vollert I, Friedrich FW, Flenner F, Carrier L, Eder A, Schaaf S, Hirt MN, Aksehirlioglu B, Tong CW, Moretti A, Eschenhagen T, Hansen A. Automated analysis of contractile force and Ca<sup>2+</sup> transients in engineered heart tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;306:H1353-H1363.

Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez OJ, Navarrete EG, Hu S, Wang L, Lee A, Pavlovic A, Lin S, Chen R, Hajjar RJ, Snyder MP, Dolmetsch RE, Butte MJ, Ashley EA, Longaker MT, Robbins RC, Wu JC. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2012;4:130ra47.

Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006;355:1018-1028.

Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, Inada M. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res* 1993;73:439-447.

Swijnenburg RJ, Schrepfer S, Govaert JA, Cao F, Ransohoff K, Sheikh AY, Haddad M, Connolly AJ, Davis MM, Robbins RC, Wu JC. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:12991-12996.

Syed F, Odley A, Hahn HS, Brunskill EW, Lynch RA, Marreez Y, Sanbe A, Robbins J, Dorn GW. Physiological growth synergizes with pathological genes in experimental cardiomyopathy. *Circ Res* 2004;95:1200-1206.

Szebeni J, Bedőcs P, Urbanics R, Bunger R, Rosivall L, Tóth M, Barenholz Y. Prevention of infusion reactions to PEGylated liposomal doxorubicin via tachyphylaxis induction by placebo vesicles: a porcine model. *J Control Release* 2012;160:382-387.

Tallawi M, Rai R, Boccaccini AR, Aifantis KE. Effect of substrate mechanics on cardiomyocyte maturation and growth. *Tissue Eng Part B Rev* 2015;21:157-165.

Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e001263.

Tarazon E, Rivera M, Rosello-Lleti E, Molina-Navarro MM, Sanchez-Lazaro IJ, Espana F, Montero JA, Lago F, Gonzalez-Juanatey JR, Portoles M. Heart failure induces significant changes in nuclear pore complex of human cardiomyocytes. *PLoS One* 2012;7:e48957.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231-241.

Terracciano CMN, Harding SE, Adamson DL, Koban M, Tansley P, Birks EJ, Barton PJ, Yacoub MH. Changes in sarcolemmal Ca entry and sarcoplasmic reticulum Ca content in ventricular myocytes from patients with end-stage heart failure following myocardial recovery after combined pharmacological and ventricular assist device therapy. *European Heart Journal* 2003;24:1329-1339.

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the Human Heart: A Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure. *Circulation* 2007;116:258-267.

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000;288:870-874.

Tseng AS, Engel FB, Keating MT. The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chem Biol* 2006;13:957-963.

Uchida S és Dimmeler S. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circ Res* 2015;116:737-750.

Uri K, Fagyas M, Manyine S, I, Kertész A, Csanadi Z, Sándorfi G, Clemens M, Fedor R, Papp Z, Édes I, Tóth A, Lizanecz E. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure. *PLoS One* 2014;9:e87845.

Wan KF, Chan SL, Sukumaran SK, Lee MC, Yu VC. Chelerythrine induces apoptosis through a Bax/Bak-independent mitochondrial mechanism. *J Biol Chem* 2008;283:8423-8433.

Wang G, McCain ML, Yang L, He A, Pasqualini FS, Agarwal A, Yuan H, Jiang D, Zhang D, Zangi L, Geva J, Roberts AE, Ma Q, Ding J, Chen J, Wang DZ, Li K, Wang J, Wanders RJ, Kulik W, Vaz FM, Laflamme MA, Murry CE, Chien KR, Kelley RI, Church GM, Parker KK, Pu WT. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nat Med* 2014;20:616-623.

Watabe T és Miyazono K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* 2009;19:103-115.

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003;111:1497-1450.

Wenzel S, Muller C, Piper HM, Schluter KD. p38 MAP-kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling. *Eur J Heart Fail* 2005;7:453-460.

Woll PS, Morris JK, Painschab MS, Marcus RK, Kohn AD, Biechele TL, Moon RT, Kaufman DS. Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Blood* 2008;111:122-131.

Wu H, Lee J, Vincent LG, Wang Q, Gu M, Lan F, Churko JM, Sallam KI, Matsa E, Sharma A, Gold JD, Engler AJ, Xiang YK, Bers DM, Wu JC. Epigenetic regulation of phosphodiesterases 2A and 3A underlies compromised beta-adrenergic signaling in an ipsc model of dilated cardiomyopathy. *Cell Stem Cell* 2015a;17:89-100.

Wu L, Jia Z, Yan L, Wang W, Wang J, Zhang Y, Zhou C. Angiotensin II promotes cardiac differentiation of embryonic stem cells via angiotensin type 1 receptor. *Differentiation* 2013;86:23-29.

Wu SC és O'Connell TD. Nuclear compartmentalization of alpha1-adrenergic receptor signaling in adult cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015b;65:91-100.

Wysong A, Couch M, Shadfar S, Li L, Rodriguez JE, Asher S, Yin X, Gore M, Baldwin A, Patterson C, Willis MS. NF-kappaB inhibition protects against tumor-induced cardiac atrophy in vivo. *Am J Pathol* 2011;178:1059-1068.

Xiang Y és Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* 2003;300:1530-1532.

Xiao F, Wang H, Fu X, Li Y, Wu Z. TRAF6 promotes myogenic differentiation via the TAK1/p38 mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *PLoS One* 2012;7:e34081.

Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G-protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 1995;47:322-329.

Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:529-541.

Xu C. Differentiation and enrichment of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:1203-1212.

Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91:501-508.

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 1999;19:8469-8478.

Yamamoto S, Seta K, Morisco C, Vatner SF, Sadoshima J. Chelerythrine rapidly induces apoptosis through generation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1829-1848.

Yan L, Jia Z, Cui J, Yang H, Yang H, Zhang Y, Zhou C. Beta-adrenergic signals regulate cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells via mitogen-activated protein kinase pathways. *Dev Growth Differ* 2011;53:772-779.

Yan Y, Liu J, Wei C, Li K, Xie W, Wang Y, Cheng H. Bidirectional regulation of Ca<sup>2+</sup> sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2008;77:432-441.

Yang KC, Yamada KA, Patel AY, Topkara VK, George I, Cheema FH, Ewald GA, Mann DL, Nerbonne JM. Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNAs in failing human heart and remodeling with mechanical circulatory support. *Circulation* 2014a;129:1009-1021.

Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR(+) embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 2008;453:524-528.

Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, Sniadecki NJ, Ruohola-Baker H, Murry CE. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2014b;72:296-304.

Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009;104:e30-e41.

Zhao Y, Hou G, Zhang Y, Chi J, Zhang L, Zou X, Tang J, Liu Y, Fu Y, Yin X. Involvement of the calcium-sensing receptor in cyclosporin A-induced cardiomyocyte apoptosis in rats. *Pharmazie* 2011;66:968-974.

Zhi D, Irvin MR, Gu CC, Stoddard AJ, Lorier R, Matter A, Rao DC, Srinivasasainagendra V, Tiwari HK, Turner A, Broeckel U, Arnett DK. Whole-exome sequencing and an iPSC-derived cardiomyocyte model provides a powerful platform for gene discovery in left ventricular hypertrophy. *Front Genet* 2012;3:92.

Zhong H és Minneman KP. Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 1999;375:261-276.

Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL, Han HQ. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 2010;142:531-543.

Zilinyi R, Czompa A, Czeglédi A, Gajtko A, Pituk D, Lekli I, Tószaki A. The cardioprotective effect of metformin in doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of autophagy. *Molecules* 2018;23:1184.

Zitron E, Gunth M, Scherer D, Kiesecker C, Kulzer M, Bloehs R, Scholz EP, Thomas D, Weidenhammer C, Kathofer S, Bauer A, Katus HA, Karle CA. Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic alpha1A receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:84-94.



## 8. Saját közlemények

### 8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### 8.1.1. Eredeti közlemények

- I. Chahine MN, Mioulane M, Sikkell MB, O'Gara P, Dos Remedios CG, Pierce GN, Lyon AR, **Földes G\***, *Harding SE\**. Nuclear pore rearrangements and nuclear trafficking in cardiomyocytes from rat and human failing hearts. *Cardiovasc Res* 2015;105:31-43.  
**IF: 5.465**
  - II. **Földes G**, Matsa E, Kriston-Vizi J, Leja T, Amisten S, Kolker L, Kodagoda T, Dolatshad NF, Mioulane M, Vauchez K, Arányi T, Ketteler R, Schneider MD, Denning C, Harding SE. Aberrant  $\alpha$ -adrenergic hypertrophic response in cardiomyocytes from human induced pluripotent cells. *Stem Cells Reports* 2014;3:905-914.  
**IF: 5.365**
  - III. **Földes G**, Mioulane M, Kodagoda T, Lendvai Z, Iqbal A, Ali NN, Schneider MD, Harding SE. Immunosuppressive agents modulate function, growth, and survival of cardiomyocytes and endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23:467-476.  
**IF: 3.727**
  - IV. Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, Kaschina E, Palus S, Pötsch M, von Websky K, Hocher B, Latouche C, Jaisser F, Morawietz L, Coats AJ, Beadle J, Argiles JM, Thum T, **Földes G**, Doehner W, Hilfiker-Kleiner D, Force T, Anker SD. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *Eur Heart J* 2014;35:932-941.  
**IF: 15.203**
  - V. **Földes G**, Mioulane M. High-content imaging and analysis of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Methods in Molecular Biology. Imaging and Tracking Stem Cells: Methods. Springer* 2013;1052:29-39.  
**IF: 1.29**
  - VI. Mioulane M, **Földes G**, Ali NN, Schneider MD, Harding SE. Development of high content imaging methods for cell death detection in human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5:593-604.  
**IF: 3.062**
  - VII. **Földes G**, Mioulane M, Wright JS, Liu AQ, Novak P, Merkely B, Gorelik J, Schneider MD, Ali NN, Harding SE. Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: a testbed for studying human cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:367-376.  
**IF: 5.166**
  - VIII. **Földes G**, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sármán B, Seres L, Skoumal R, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Comm.* 2003;308:480-485.  
**IF: 2.836**
- #### 8.1.2. Összefoglaló közlemények
- IX. Abdelwahid E, Kalvelyte A, Aurimas Stulpinas A, Guarita-Souza LC, Athayde Teixeira de Carvalho K, **Földes G**. Stem cell death and survival in heart regeneration and repair. *Apoptosis* 2016;21:252-268.  
**IF: 3.833**

- X. Dolatshad NF, Hellen N, Jabbour R, Harding SE, **Földes G**. G-Protein coupled receptor signalling in pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells: implications for disease modelling. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:76.  
**IF: 3.19**

- XI. **Földes G**, Harding SE, Ali NN. Cardiomyocytes from embryonic stem cells: towards human therapy. *Expert Opin Biol Therapy*. 2008;8(10):1473-1483.  
**IF: 3.475**

### 8.1.3. Könyvfejezet

- XII. Kriston-Vizi J, Harding SE, **Földes G**: Structural Toxicity: Hypertrophy Models of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. Chapter 14. 271-291. In: Clements M; Roquemore L (eds): *Stem Cell-Derived Models in Toxicity. Methods in Pharmacology and Toxicology*. Humana Press. New York, 2017;14:271-291.
- XIII. Kosztin A, Gara E, Harding SE, **Földes G**: Stem Cell Therapy to Treat Heart Failure. Chapter BMED: 04239. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. 2014;1-18.
- XIV. **Földes G**, Mioulane M. Differentiation and use of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. in *Stem Cells And Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications In Disease And Injury*. Springer. part II /7. 2012;77-80. In: Hayat MA (ed): *Stem Cells and Cancer Stem Cells. Volume 9. Therapeutic Applications in Disease and Injury*. Springer Netherlands. Dordrecht, 2013.
- XV. **Földes G**; Harding SE: 5.32. Stem Cell Therapy to Treat Heart Failure. In: Moo-Young M (ed): *Comprehensive Biotechnology*. 2nd edition. Elsevier B.V. Pergamon. Amsterdam-Oxford-Waltham, 2011;5(157):407-423

## 8.2. A PhD értekezésben nem szereplő további közlemények

### 8.2.1. Eredeti közlemények

- XVI. Karhu ST, Välimäki MJ, Jumppanen M, Kinnunen SM, Pohjolainen L, Leigh RS, Auno S, Földes G, Boije Af Gennäs G, Yli-Kauhaluoma J, Ruskoaho H, Talman V. Stem cells are the **most** sensitive screening tool to identify toxicity of GATA4-targeted novel small-molecule compounds. *Arch Toxicol* 2018;92(9):2897-2911.  
**IF: 5.728**
- XVII. Kosztin A, Széplaki G, Kovács A, **Földes G**, Szokodi I, Nagy KV, Kutyifa V, Fórizs É, Végh EM, Gellér L, Becker D, Aradi D, Merkely B. Impact of CT-apelin and NT-proBNP on identifying non-responders to cardiac resynchronization therapy. *Biomarkers* 2017;22:279-286.  
**IF: 1.976**
- XVIII. Williams DJ, Archer R, Archibald P, Bantounas I, Baptista R, Barker R, Barry J, Bietrix F, Blair N, Braybrook J, Campbell J, Canham M, Chandra A, **Földes G**, Gilmanshin R, Girard M, Gorjup E, Hewitt Z, Hourd P, Hyllner J, Jesson H, Kee J, Kerby J, Kotsopoulou N, Kowalski S, Leidel C, Marshall D, Masi L, McCall M, McCann C, Medcalf N, Moore H, Ozawa H, Pan D, Parmar M, Plant AL, Reinwald Y, Sebastian S, Stacey G, Thomas RJ, Thomas D, Thurman-Newell J, Turner M, Vitillo L, Wall I, Wilson A, Wolfrum J, Yang Y, Zimmerman H. Comparability: manufacturing, characterization and controls, report of a UK Regenerative Medicine Platform Pluripotent Stem Cell Platform Workshop, Trinity Hall, Cambridge, 14-15 September 2015. *Regen Med* 2016;11:483-492.  
**IF: 2.868**

- XIX. Ebner N, **Földes G**, Schomburg L, Renko K, Springer J, Jankowska EA, Sharma R, Genth-Zotz S, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Lipopolysaccharide responsiveness is an independent predictor of death in patients with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2015;87:48-53.  
**IF: 4.874**
- XX. Jacquet L, Neueder A, **Földes G**, Karagiannis P, Hobbs C, Jolinon N, Mioulane M, Sakai T, Harding SE, Ilic D. Three Huntington's disease specific mutation-carrying human embryonic stem cell lines have stable number of CAG repeats upon in vitro differentiation into cardiomyocytes. *PLoS One* 2015;10:e126860.  
**IF: 3.057**
- XXI. Merkely B\*, Gara E\*, Lendvai Z, Skopál J, Leja T, Zhou W, Kosztin A, Várady G, Mioulane M, Bagyura Z, Németh T, Harding SE, **Földes G**. Signalling via PI3K/FOXO1A pathway modulates formation and survival of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells Dev* 2015;24:869-878.  
**IF: 3.777**
- XXII. Reed DM, **Földes G**, Kirkby NS, Ahmetaj-Shala B, Mataragka S, Mohamed NA, Francis C, Gara E, Harding SE, Mitchell JA. Morphology and vasoactive hormone profiles from endothelial cells derived from stem cells of different sources. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 455:172-177.  
**IF: 2.371**
- XXIII. Reed DM, **Földes G**, Gatheral T, Paschalaki KE, Lendvai Z, Bagyura Z, Nemeth T, Skopal J, Merkely B, Telcian AG, Gogsadze L, Edwards MR, Gough P, Bertin J, Johnston SL, Harding SE, Mitchell JA. Pathogen sensing pathways in human embryonic stem cell derived-endothelial cells: Role of NOD1 receptors. *PLoS One*. 2014;9:e91119.  
**IF: 3.234**
- XXIV. Ebner N, **Földes G**, Szabo T, Tacke M, Fülster S, Sandek A, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Assessment of serum cotinine in patients with chronic heart failure: self-reported versus objective smoking behaviour. *Clin Res Cardiol*. 2013;102(2):95-101.  
**IF: 4.167**
- XXV. Reed DM, **Földes G**, Harding SE, Mitchell JA. Stem cell derived endothelial cells for cardiovascular disease: a therapeutic perspective. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75(4): 897-906.  
**IF: 3.688**
- XXVI. **Földes G**, Liu A, Badiger B, Paul-Clark M, Moreno L, Lendvai Z, Wright JS, Ali NN, Harding SE, Mitchell JA. Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. *PLoS One*. 2010; 5: e10501.  
**IF: 4.411**
- XXVII. Sheikh Abdul Kadir SH, Ali NN, Mioulane M, Brito-Martins M, Abu-Hayyeh S, **Földes G**, Moshkov AV, Williamson C, Harding SE, Gorelik J. Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model to study fetal arrhythmia related to maternal disease. *J Cell Mol Med*. 2009;13:3730-41.  
**IF: 5.228**
- XXVIII. Okonko DO, Grzeslo A, Witkowski T, Mandal AK, Slater RM, Roughton M, **Földes G**, Thum T, Majda J, Banasiak W, Missouriis C, Poole-Wilson PA, Anker SD, Ponikowski P. Effect of intravenous iron sucrose on exercise tolerance in anemic and nonanemic patients with symptomatic chronic heart failure and iron deficiency FERRIC-HF: a randomized, controlled, observer-blinded trial. *JACC* 2008; 51: 103-112.

**IF: 11.438**

- XXIX. **Földes G**, von Haehling S, Okonko DO, Jankowska EA, Poole-Wilson PA, Anker SD. Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2008; 124: 80-85. **IF: 3.121**
- XXX. Skoumal R, Szokodi I, Aro J, **Földes G**, Gööz M, Seres L, Sármán B, Lakó-Futó Z, Papp L, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Involvement of endogenous ouabain-like compound in the cardiac hypertrophic process in vivo. *Life Sciences*. 2007; 80:1303-1310. **IF: 2.257**
- XXXI. **Földes G**, Vajda S, Lakó-Futó Z, Sármán B, Skoumal R, Ilves M, deChâtel R, Karádi I, Tóth M, Ruskoaho H, Leprán I. Distinct modulation of angiotensin II-induced early left ventricular hypertrophic gene programming by dietary fat type. *J Lipid Res*. 2006;47:1219-26. **IF: 4.357**
- XXXII. Ruzicska É, **Földes G**, Lakó-Futó Z, Sármán B, Wellmann J, Szenási G, Tulassay Z, Ruskoaho H, Tóth M, Somogyi A. Cardiac gene expression of natriuretic substances is altered in streptozotocin-induced diabetes during angiotensin II-induced pressure overload. *J Hypertens*. 2004;22:1191-1200. **IF: 4.871**
- XXXIII. Lakó-Futó Z, Szokodi I, Sármán B, **Földes G**, Tokola H, Ilves M, Vuolteenaho O, Skoumal R, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Evidence for a functional role of angiotensin II type 2 receptor in the cardiac hypertrophic process in vivo in the rat heart. *Circulation*. 2003;108:2414-2422. **IF: 11.164**
- XXXIV. Szokodi I, Tavi P, **Földes G**, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuhola J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel, endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*. 2002; 91:434-440. **IF: 9.694**
- XXXV. Suo M, Hautala N, **Földes G**, Szokodi I, Tóth M, Leskinen H, Uusimaa P, Vuolteenaho O, Nemer M, Ruskoaho H. Posttranscriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2002;39:803-808. **IF: 5.013**
- XXXVI. CHART Program, **Földes G**, *együtműködőként*. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *Eur Heart J*. 2017;38:648-660.

**8.2.2. Összefoglaló közlemények**

- XXXVII. **Földes G**. Stem cells in rhythmology: Short communication. *Interv Med Appl Sci* 2011;3:110-112.
- XXXVIII. **Földes G**, von Haehling S, Jankowska EA, Anker SD. Targeting the Toll-system in cardiovascular sciences. *Recent Patents on Inflammation and Allergy*. 2007;1:57-67.
- XXXIX. **Földes G**, von Haehling S, Anker SD. Toll-like receptor modulation in cardiovascular disease: a target for intervention? *Expert Opin Invest Drugs*. 2006;15(8): 857-871. **IF: 3.174**

- XL. Ebner N, **Földes G**, Schomburg L, Renko K, Springer J, Jankowska EA, Sharma R, Genth-Zotz S, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Importance of selenium status in patients with chronic heart failure. *Perspectives in Science* 2015; 3(1-4):34-35. *extended abstract*.

### 8.2.3. Könyvfejezet

- XLI. Gara E; Xia Z; Bishop J; **Földes G**: Isolation, Expansion and Application of Human Mesenchymal Stem Cells. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64149-1. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2017. Paper 641491.16 p.

### 8.2.4. Magyar nyelvű közlemények

- XLII. Gara E, Merkely B, **Földes G**. Össejtek és érrendszeri megbetegedések. Hogyan készítsünk ereket? *Élet és Tudomány* 2013; 68(15): 470-471.
- XLIII. **Földes G**. Toll receptorok a szív- és érrendszerben. *Orvosképzés* 2007; 82(3): 115-123.
- XLIV. **Földes G**, Tóth M. [Role of novel G-protein-coupled receptors and their ligands in the cardiovascular system]. *Orv Hetil* 2004; 145(11): 561-566.
- XLV. **Földes G**, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Sármán B, Seres L, Skoumal R, Ruskoaho H, Tóth M, deChatel R. Apelin, az APJ árvareceptor endogén ligandja szívelégtelen betegek szívében és plazmájában. *Magy Belorv Arch* 2003; 56(2): 75-81.
- ### 8.2.5. Hozzászólás
- XLVI. Heart Failure: Molecules, Mechanisms and Therapeutic Targets - No.274: 68-72 *Novartis Foundation*. Wiley, London. 2006.
- XLVII. **Földes G**, Anker SD, von Haehling S. Letter to the Editor: Atorvastatin modulates Th1/Th2 response in patients with chronic heart failure. *J Card Failure*. 2009;15:551.
- XLVIII. Gara E, Molnár AÁ, Merkely B, Földes G. Assessing the therapeutic readiness of stem cells for cardiovascular repair. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17: 911-914.  
**IF: 3.974**

### 8.3. Összesített tudományometriai adatok

Földes Gábor tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2018.09.05.)				
Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	38	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	27	1159	1367
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	2	0	0
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként <sup>3</sup>	---	1	2	4
összefoglaló közlemény	---	7	49	62
rövid közlemény	---	1	0	0
<b>II. Könyv</b>	0	---	---	---
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv</b>	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
<b>b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként</b>	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
<b>III. Könyvrészlet</b>	6	---	---	---
idegen nyelvű	---	6	2	2
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		0	0	0
<b>Tudományos közlemények összesen (I-IV.)</b>	---	44	1212	1435
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)</b>	44	---	1212	1435
<b>V. További tudományos művek</b>	3	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	3	1	1
<b>VI. Idézett absztraktok<sup>5</sup></b>	4	---	5	6
<b>Idézettség száma<sup>1</sup></b>	---	---	1218	1442
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	17	---	---	---
<b>g index<sup>6</sup></b>	36	---	---	---
<b>Speciális tudományometriai adatok</b>	Száma	Összes hivatkozás		
Első szerzős folyóiratcikkek száma <sup>2a</sup>	15	407		
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma <sup>2a</sup>	3	25		
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002 -) teljes tudományos folyóiratcikkek	34	916		
Az utolsó 10 év (2008-2018) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	24	637		
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	439	30,44%		
További, az MTMT-ben nyilvántartott idézetek száma, amelyek nem szerepelnek a WOS és/vagy Scopus rendszerben	43			
Jelentés, guideline	0	0		
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő <sup>7</sup>	0	0		
*Az MTMT nem tudja szolgáltatni a megosztott első és megosztott utolsó szerzőség adatokat. Ezeket a kérelmezőnek a doktori eljárás folyamán a 3. sz. adatlapon kell feltüntetnie.				
Megjegyzések:				
<sup>1</sup> kizárólag a WOS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott idézetek száma az egyéb adatbázisokból, egyéb típusú idézőkből, valamint disszertációkból az MTMT-be feltöltött, azonosítózámmal rendelkező idézők nélkül				
<sup>2</sup> lektorált, tudományos folyóiratban				
<sup>3</sup> a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja				
<sup>4</sup> konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben				
<sup>5</sup> nem idézett absztrakt itt nem kerül az összesítésbe				
<sup>6</sup> a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli összes idézővel számolva				
<sup>7</sup> közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények idézettsége külön értékelendő, és nem számítható be az összesített idézetek közé				

## 9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Merkely Bélának az önzetlen támogatását. Neki köszönhetem azt a különleges lehetőséget, hogy megálmodta és segítségével 2009-ben létrehozhattuk és azóta sikeresen működtethetjük az őssejtlaboratóriumunkat. Köszönöm azt a töretlen bizalmát és lelkesedését, hogy az itt létrehozott őssejtek közvetlenül is a szívbetegek gyógyulását fogják szolgálni.

Köszönettel tartozom szakmai és emberi támogatásáért PhD témavezetőmnek és mentoromnak, Tóth Miklósnak, aki sok évvel a posztgraduális tanulmányaim befejezése után, most is folyamatosan segítségemre van.

Kiemelt köszönettel tartozom nagyszerű munkatársaimnak, Gara Editnek, Skopál Juditnak, Radovits Tamásnak, Molnár Andrea Ágnesnek, Kékesi Violetának, Nemes Annamáriának, Husvéth-Tóth Máriának, Kosztin Annamáriának, Berecz Tündének, Apáti Ágotának.

Köszönetemet szeretném kifejezni Heikki Ruskoahonak, a Magyar Tudományos Akadémia tiszteleti tagjának és Szokodi Istvánnak, hogy bevezettek a kardiovaszkuláris kutatásokba és világszínvonalú és egyben fantasztikus vidám környezetet biztosítottak számomra a finnországi Ouluban sok éven keresztül, és azóta is segítik a már önálló kutatói pályafutásomat. Köszönöm az Ouluban végzett közös munkáért Risto Kerkela, Sampsa Pikkarainen, Heikki Tokola, Jaana Rysa, Kati Lampinen és Marja Arbelius segítségét.

Köszönöm korábbi munkahelyemnek, a SE I. Belgyógyászati Klinikájának és számos munkatársamnak, és mindenekelőtt Járai Zoltánnak, Máthé Domokosnak, Lakó-Futó Zoltánnak, Skoumal Rékának, Sármán Baláznak a közös munkát és barátságukat. Néhai deChâtel Rudolfnak köszönhetem, hogy az alapkutatást és klinikai munkát az ott töltött évek alatt még kezdő orvosként is összekapcsolhattam.

Köszönöm Spät Andrásnak és Várnai Péternek, TDK témavezetőimnek, hogy bevezettek a kutatómunkába, nagy örömmel gondolok ma is a Puskin utcai Élettani Intézetben és a laborban töltött évekre.

A pluripotens őssejtekről mindent a National Heart and Lung Institute-ban tanultam meg. Köszönöm az intézet és az Imperial College számos munkatársának, de elsősorban Sian Hardingnak a támogatást és inspirációt. Köszönöm londoni kollégáim, Maxime Mioulane, Anna Randi, Peter O’Gara, Daniel Reed, Nicola Hellen, Thusharika Kodagoda, Nadire Ali, Jane Mitchell, Cesare Terracciano, Carolina Pinto Ricardo, Katerina Lawlor, Dusko Ilic (King’s College London), Michael D. Schneider és Kriston-Vizi János (University College London) segítségét. Köszönetet mondok Stefan D Ankernak, Stephan von Haehlingnek, Thomas Thumnak, Obi D Okonkonak, Jochen Springernek az évtizedes együttműködésért.

A dolgozat az elmúlt több mint 10 év kutatómunkáján alapul, köszönöm az Országos Tudományos Kutatási Alap, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, a British Heart Foundation, a Medical Research Council és a Fondation Leducq pénzügyi támogatását.

Köszönöm feleségemnek, Kálmán Juditnak és szüleimnek, Földes Ivánnak és Zsuzsának, hogy mindig mindenben mellettem állnak és hogy időközben ilyen jól kitanulták az őssejtkutatás részleteit. A dolgozatom kevésbé színes ábráit Földes Daninak és Lolának ajánlom további feldolgozásra.