

Thymosin beta-4 hatása a felnőtt emlős szív hipoxia indukálta fibrotikus elváltozásaira

Doktori (PhD) értekezés - Tézisfüzet

Dr. Maár Klaudia



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Programvezető: Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Témavezető: Dr. Bock-Marquette Ildikó

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

1. Bevezetés

1.1. Hipoxiás szívbetegség

A szívbetegségek és stroke statisztikák legfrissebb amerikai adatai szerint 2025-ben több mint 1,5 millió ember halt meg szív- és érrendszeri betegségek, illetve szívelégtelenség következtében [1]. Mindemellett az American Heart Association becslései szerint 2030-ra az Egyesült Államok lakosságának több mint 9%-a szenved majd szívkoszorúér betegségben [2]. A világ népességének gyors ütemű előregedése, valamint a sérült szív, az agy, illetve a vérerek működésének megőrzésére és helyreállítására irányuló terápiás eszközeink korlátozottsága miatt napjainkra elengedhetlenné vált az életet támogató új terápiás megközelítések feltérképezése. A megoldások közül a szív esetében az irreverzibilisen elveszített kardiomiociták pótlása kiemelt jelentőséggel bír. Bár a szívizomsejtek képesek bizonyos mértékű proliferációra, sajnálatos módon a szívszövet teljes regenerációs potenciálja azonban korlátozott [3]. A károsodások következtében a sérülés helyén végül egy fibrotikus hegszövet alakul ki, ami mechanikai szövődményekhez, aritmiához, kontraktilitási zavarokhoz és végül szívelégtelenség kialakulásához vezethet [4].

1.2. Szervi/szöveti fibrózis

A szervek strukturális és funkcionális integritásának fenntartása érdekében a sérüléseket követően gyakori válaszmechanizmus a fibrotikus aktiváció, amely eredményeképpen a károsodott területen hegszövet alakul ki. A folyamatot az extracelluláris mátrix (ECM) - főként kollagén - túlzott mértékű felhalmozódása jellemzi, amely elsősorban a mátrixfehérjék termelődése és lebontása közötti egyensúly felbomlásának következménye [5]. A szívben az akut nekrozis, például miokardiális infarktus, illetve különböző krónikus betegségek, például a magas vérnyomás vagy a cukorbetegség, sőt maga az öregedési folyamat is generálhat fibrotikus elváltozásokat [6, 7]. Az egészséges szívizomban a fibroblasztok folyamatosan alakítják az extracelluláris környezetet az ECM

komponenseinek kiegyensúlyozott termelése, illetve lebontása révén [4, 6, 8]. Szívkárosodások során azonban a fibroblasztok aktivációja egy új fenotípus, a miofibroblasztok megjelenését eredményezi [6]. A miofibroblaszt kifejezés egy heterogén sejtpopulációt takar. Ezek a sejtek gyakorlatilag valamennyi szerv gyógyulási folyamataiban részt vesznek. A miofibroblasztok legjellemzőbb tulajdonságai közé tartozik az aktin és miozin filamentum kötegek révén indukált kontraktilitás, illetve a sebgyógyulás és a szöveti érési folyamatok során megnyilvánuló metabolikus és funkcionális alkalmazkodóképesség [6, 9, 10].

A világszerte zajló intenzív kutatások ellenére a miofibroblasztok differenciálódását aktiváló pontos mechanizmusok és jelátviteli folyamatok mindmáig nem igazán tisztázottak. A legújabb eredmények szerint aktivációjuk következményeként a miofibroblasztok számos szekretált molekula, így a különböző hormonok, növekedési faktorok és pro-inflammatórikus citokinek hatására érzékenyítődnek, és ezen folyamatok következtében fokozódik proliferációs és migrációs aktivitásuk, illetve növekszik az extracelluláris mátrixot lebontó metalloproteinázok (MMP-k) szekréciója és a kollagénforgalom is, amelyek kulcsfontosságúak a patológiás hegszövet kialakulásában [6, 9]. A *TGF- β jelátviteli útvonal* a szívben zajló fibrotikus folyamatok egyik legintenzívebben tanulmányozott és alapvető szabályozó mechanizmusa. Ez a jelátviteli rendszer elsősorban a Mothers against decapentaplegic homolog-4 (SMAD) transzkripciós faktorok aktivációján keresztül serkenti az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéinek termelődését [8]. A jelátviteli útvonal sokrétű élettani szerepe miatt azonban a TGF- β gátlók klinikai alkalmazása jelenleg nem megvalósítható, mivel alkalmazásuk súlyos mellékhatásokkal jár [11]. A TGF- β mellett a szisztémás neurohumorális jelátviteli rendszerek, különösen a *renin-angiotenzin rendszer (RAS)* aktivációja szintén kulcsfontosságú szereppel bír a maladaptív, patológiás fibrotikus átépülési folyamatokban [12]. A RAS aktiválódása végső soron a vérnyomás emelkedéséhez vezet, míg a különböző jelátviteli mechanizmusokon keresztül befolyásolhatja a szív fibroblasztjainak proliferációját, migrációját, illetve azok miofibroblasztokká történő átalakulást [8, 13-16].

1.3. A sejtes mikrokönyezet hatása a fibroblasztok aktivációjára

Az utóbbi évek kutatásainak eredményeként a sejtes mikrokönyezet jelentőségének vizsgálata egyre nagyobb súlyt kapott. A fibroblasztok az extracelluláris környezettel egy összetett strukturális rendszer révén lépnek kölcsönhatásba, amely magában foglalja az extracelluláris mátrixot (ECM), az integrinekhez kapcsolódó fokális adhéziókat, valamint

az aktin-citoszkeletont. Ez a rendszer kulcsszerepet játszik a környezeti ingerek érzékelésében és azok transzkripciós válaszokká történő integrálásában [17, 18]. Ezen túlmenően, az aktin-citoszkeletális rendszer szerveződése is meghatározó jelentőségű a sejtek viselkedése, fenotípusos átalakulása, valamint a miofibroblasztokká történő differenciálódás folyamatainak szempontjából [19].

Ismert, hogy a *RhoGTPázok* képesek az aktin-citoszkeleton rendszer átrendezésére, ami a miofibroblasztokban elsősorban a simaizom-izofomák megjelenését eredményezi [20]. A legintenzívebben vizsgált RhoGTPázok a Rho, a Rac és a cell division control protein 42 homológ (CDC42), amelyek profibrotikus receptor-komplexek által aktiválódnak és olyan effektor fehérjéket szabályoznak, amik a citoplazmában a globuláris aktin (G-aktin) és a filamentózus aktin (F-aktin) polimerizációs egyensúlyát modulálják [20]. E szabályozó downstream célpontok közé tartoznak a Rho-asszociált kinázok: a ROCK1 (más néven ROK β), a ROCK2 (más néven ROK α) [21], valamint a diaphanous formin fehérjecsald tagjai (mDia), amelyek nélkülözhetetlenek a stresszrostok polimerizációjához és további összekapcsolásához. A ROCK izoformák megközelítőleg 65%-os szekvenciahomológiát és 92%-os kináz-homológiát mutatnak [22]. A ROCK fehérjék számos, specifikus foszforilált szubsztrátmolekula által meghatározott intracelluláris folyamatra vannak hatással, melynek következtében az útvonal központi szerepet játszik a stresszrostok kialakulásában és kontrakciójában, a citoszkeletális átrendeződésekben, valamint a sejt-szubsztrát és sejt-sejt adhézió, az apoptózis, a sejt migráció és a citokinézis folyamataiban [23, 24]. Az elmúlt években számos tanulmány foglalkozott a RhoA/ROCK jelátviteli útvonal kardiovaszkuláris hatásaival. Az eredmények szerint a ROCK fehérjék jelentős szerepet játszanak a különböző kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában, így például szívhipertrofia, hipertónia, ateroszklerózis és a fibrózis során [25]. Különösen figyelemre méltó az a megfigyelés, hogy a ROCK1 fehérje farmakológiai gátlása megakadályozza a citoszkeletális átrendeződést és a mátrixgének expresszióját TGF β által stimulált fibroblasztokban [26-28]. Az infarktusz ROCK1 knockout egerekben pedig alacsony fibrózis volt megfigyelhető [28], ami a molekula kulcsfontosságú szerepére utal a szív átépülése és a hegszövet kialakulása során. Molekuláris szempontjából az is különösen fontos, hogy a ROCK fehérjék a myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A) / Serum Response Factor (SRF) jelátviteli útvonalon keresztül képesek a fibrotikus folyamatok fokozására [29]. A folyamat során, sérülés, például miokardiális infarktus hatására a RhoA/ROCK jelátviteli útvonal aktiválódik, amely az F-aktin és a G-aktin egyensúlyának eltolódásához vezet [30]. A

citoplazmatikus G-aktin szintjének csökkenésével a G-aktin leválik az MRTF-A-ról. A szabad MRTF-A ezt követően a sejtmagba transzlokálódik, ahol hozzájárul a fibroblasztok kollagén szekréciójának indukciójához [27, 30]. További *in vivo* vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az MRTF aktivitásának gátlása képes blokkolni a dermális, bélrendszeri és pulmonális fibrózis kialakulását is [31-35]. Ezek az eredmények kétségtelenül arra utalnak, hogy a jelátvitelre érzékeny transzkripciós faktorok, mint például az MRTF-A célzott befolyásolása ígéretes lehet a fibroblaszt válasz szabályozásában.

Összefoglalva tehát egyértelmű, hogy a TGF β /Smad/Scx (scleraxis) [36-38] illetve a Rho-ROCK/MRTF/SRF jelátviteli útvonalak [39, 40] célzott gátlása hatékonyan bizonyulhat a fibrózis progressziójának megakadályozásában. Természetesen az itt említett tényezőkön kívül az aktin felépülést számos más kismolekula és intracelluláris jelátviteli útvonal is befolyásolhatja, ilyenek lehetnek például a különböző mikroRNS-ek, vagy egyéb szekretált peptidok is.

1.4. Peptidek / Thymosin β 4 (TB4)

Napjainkban jelentős kutatás zajlik a pozitív vagy negatív fizikai, illetve pszichológiai stressz hatására létrejövő élettani változásokat kiváltó kismolekulák célzott azonosítására. Az ilyen jellegű információk hasznosítása ugyanis nagy lehetőségeket kínál az emberi szervezet különböző élettani és patológiás állapotainak azonosítására és azok esetleges visszafordítására. Különösen fontos, hogy ezek a kis, szekretált molekulák, amelyeket összefoglalóan biomarkereknek is nevezhetünk, egyben új terápiás célpontok azonosításához vezethetnek, segítve ezzel a klinikai gyakorlatban alkalmazható új kezelési stratégiák fejlesztését [41].

A Thymosin-ok kis szekretált fehérjék, amiket először egyetlen frakcióként borjú csecsemőmirigyből izoláltak 1996-ban [42]. A későbbi kutatások igazolták, hogy a tisztított thymuskivonat valójában biológiailag aktív vegyületek keveréke [43]. Az egyes komponenseket izoelektromos pontjuk szerint nevezték el: az alfa-thymosinok (pH < 5,0), a béta-thymosinok (pH 5,0–7,0), valamint a gamma-thymosinok (pH > 7,0)[44].

Jelenleg tizenhat béta-thymosin ismert a különböző élőlényekben, azonban ezek közül emberben mindössze három expresszálódik: a TB4, a thymosin β 10 (TB10) és a thymosin β 15 (TB15) [45]. Ezek közül a TB4 a legnagyobb mennyiségben jelenlévő izoforma, amely a sejtek teljes béta-thymosin tartalmának mintegy 70–80%-át teszi ki [46]. Számos felnőtt szövetben megtalálható viszonylag magas koncentrációban, így például a lépben, a tüdőben, a thymusban, az agyban és a szívben is [47]. Emellett jelen van még a

makrofágokban, tumorsejtekben, humán vérsejtekben, a szérumban, sebváladékban, valamint egyéb testfolyadékban, például nyálban [48-51].

A peptid szerepet játszik az aktin monomerek elérhetőségének szabályozásában is, ugyanis képes a G-aktin megkötésére. TB4 magas dózisú adagolása mellett végzett vizsgálatok azonban arra utalnak, hogy a molekulának további aktin szabályozási funkciói is vannak [52, 53]. Hasonlóan a capping fehérjékhez és a profilinhoz, a peptid ugyanis képes az aktin-összeépülés egyensúlyi állapotának szabályozására is. A profilinnal ellentétben azonban hatását mindkét filamentumvégen képes kifejteni [53].

1.5. TB4 szerepe a szívben

Az embrionális fejlődés során a TB4 a szívben és az erekben található meg elsősorban. Ez a kifejeződés egységes az egér [54], csirke [55] és az ember [56] esetében is. Ezen túlmenően, az emlős szív fejlődése során különösen magas expressziót mutat az interventrikuláris sövényben, a kamrák falában, valamint a szívizom külső proliferáló rétegeiben [54].

A molekula felnőtt szív regenerációjában és reparációjában betöltött szerepét először kutatócsoportunk tagjai írták le. Kimutattuk, hogy a peptid meghatározó szerepet játszik a szív működés támogatásában hipoxiás körülmények között [54]. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a TB4 exogén alkalmazása *in vitro* elősegíti a szívizomsejtek migrációját és túlélését embrionális szövetben, és ez a hatás a születést követően is fennmarad [54]. Egérmodellben, a koszorúér lekötését követően a peptid fokozta a kardiomiociták túlélését, csökkentette a hegszövet képződést, valamint javította a szív működést. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a molekula ígéretes új terápiás célpont lehet akut miokardiális károsodások - például szívinfarktus -, valamint egyéb szívizombetegségek kezelésében gyermekek és felnőttek esetében egyaránt [7]. Figyelemre méltó módon a javulás mértéke nem mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a peptid szisztémás, intraperitoneális adagolása és a kizárólag lokálisan, a szívinfarktus területébe való injektálása között, utalva arra, hogy a TB4 kedvező hatásai nagy valószínűséggel közvetlenül a szívsejtekre gyakorolt hatás révén érvényesülnek, nem pedig indirekt, más extrakardiális tényezőkön keresztül [54].

2. Célkitűzések

A szöveti regeneráció szempontjából a TB4 peptid egyik legfontosabb hatása a működésképtelen hegyszövet kialakulásának csökkentése, amit valószínűleg a gyulladással járó folyamatok mérséklésével [57-59], a sejthalál gátlásával (AKT jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül) [54], valamint a reparációs mechanizmusok általános serkentésével éri el [7, 60-62]. Különösen figyelemre méltó, hogy egyes in vitro kísérletek tanúsága szerint a TB4 képes a fibroblaszt/miofibroblaszt átmenet befolyásolására is, ami lehetőséget nyújthat a molekula, mint gyulladáscsökkentő terápiás ágens alkalmazására [63, 64].

Bár a TB4 által a szív reparációs folyamatai során kiváltott molekuláris mechanizmusokat széles körben vizsgálják [60, 63], számos kérdés továbbra is megválaszolatlan maradt a szívregenerációban betöltött szerepeivel kapcsolatban. Ennek értelmében **jelen értekezésünk általános célja olyan további célmolekulák és új mechanizmusok feltárása, amelyek révén a TB4 peptid mérsékelheti a hipoxiás felnőtt emlős szívben kialakuló patológiás hegyesedési folyamatokat.**

Mindezek tükrében a jelen **értekezésünk specifikus célkitűzései** a következők:

- 1. célkitűzés:** Hegyszövet képződéssel összefüggő változásokat mutató kismolekulák (miRNS-ek) azonosítása hipoxiának kitett felnőtt egérszívekben szisztémás TB4 kezelést követően.
- 2. célkitűzés:** Az azonosított miRNS célpontok megváltozott expressziója által szabályozott molekuláris szereplők és mechanizmusok meghatározása a hegyszövet képződés folyamatában.
- 3. célkitűzés:** A kiváltott molekuláris változások meghatározása és összehasonlítása a felnőtt egér és humán szív különböző sejttípusaiban a potenciális klinikai alkalmazhatóság meghatározása céljából.

3. Módszerek

3.1. Állatkísérletek

16 hetes (25–30 g) hím felnőtt C57BL/6J egerekben miokardiális infarktust indukáltunk a bal elülső leszálló (LAD) koszorúér lekötésével, a korábban leírt módszerek szerint [54].

Az állatkísérleti protokollokat a University of Texas Southwestern Medical School intézményi állatkísérleti etikai bizottsága felülvizsgálta és jóváhagyta, és azok teljes mértékben megfeleltek az NIH által közzétett, állatok kutatási célú felhasználására vonatkozó irányelveknek.

3.2. miRNS microarray

A miRNS microarray vizsgálatok elvégzéséhez öt TB4-kezelt, valamint öt PBS-kezelt szív mintáiból totál RNS-t izoláltunk a károsodott területből (area of risk), illetve a távoli egészséges régiókból TRIzol reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA) alkalmazásával szorosán követve a gyártó által előírt protokollokat (Invitrogen). A microarray analízist külső szolgáltató végezte (LC Sciences, USA).

3.3. Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)

Az egérszívből TRIzol reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA) felhasználásával RNS-t izoláltuk a gyártó protokolljának megfelelően (Invitrogen). Az RNS mennyiségi meghatározását követően a károsodott (core) és a távoli területekből származó mintákból cDNS-t szintetizáltunk TaqMan Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével. A szöveti miRNS, illetve mRNS expressziókat target specifikus mRNS és miRNS próbák felhasználásával (Applied Biosystems) analizáltuk az infarktust követő 1. és 3. napokon TB4 vagy PBS kezelésben részesült szív mintákból, a gyártó protokolljának megfelelően.

3.4. Western blot

A fehérje expresszió vizsgálatához a sejteket vagy szöveteket proteázgátlókat tartalmazó lízispufferben lizáltuk a teljes fehérjetartalom kinyerése érdekében. Minden mintából azonos mennyiségű fehérjét denaturáltunk, majd SDS-PAGE segítségével szétválasztottunk. A fehérjéket ezt követően PVDF membránra transzferáltuk. Tejfehérjéssel történő blokkolást követően a membránt célfehérje-specifikus primer antitesttel, majd HRP-konjugált szekunder antitestekkel inkubáltuk. A fehérje sávokat kemilumineszcens detektálási módszerrel tettük láthatóvá. A sávok intenzitását a relatív fehérjeexpresszió meghatározása céljából imageJ software segítségével elemeztük.

3.6. Sejtenyésztés és immunfestés - normoxiás és hipoxiás körülmények között

Felnőtt humán köldökvéna-endotélsejteket (HUVEC), felnőtt humán kardiális fibroblasztokat (HCFB) és felnőtt humán kardiomiocitákat (HCMC) (PromoCell GmbH,

Heidelberg, Németország) kollagénnel bevont fedőlemezeken (patkányfarok-kollagén, Roche) tenyésztettük. A sejteket sejttípus-specifikus tenyésztőközegben (a forgalmazó által biztosított kiegészítővel; PromoCell GmbH, Heidelberg, Németország) inkubáltuk mindaddig, amíg a konfluencia el nem érte a 30–60%-ot. Ezt követően TB4-et (n = 4), illetve kontrollként PBS-t (n = 4) adtunk közvetlenül a tenyésztőközeghez, majd a sejteket 24 órán keresztül standard sejttenyésztési körülmények között inkubáltuk (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂). A hipoxiás stressz vizsgálatára azonos számú, azonos kezelési feltételek mellett lévő sejteket inkubáltunk hipoxiás körülmények között (5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂). Az inkubációt követően a sejt kultúra kísérleteket 4%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk, majd immunfestést végeztünk célfehérje specifikus primer antitestek és fluorofórral konjugált szekunder antitestek alkalmazásával. A fehérje expressziót Zeiss LSM-710 konfokális mikroszkóppal dokumentáltuk.

3.7. Statisztikai analízisek

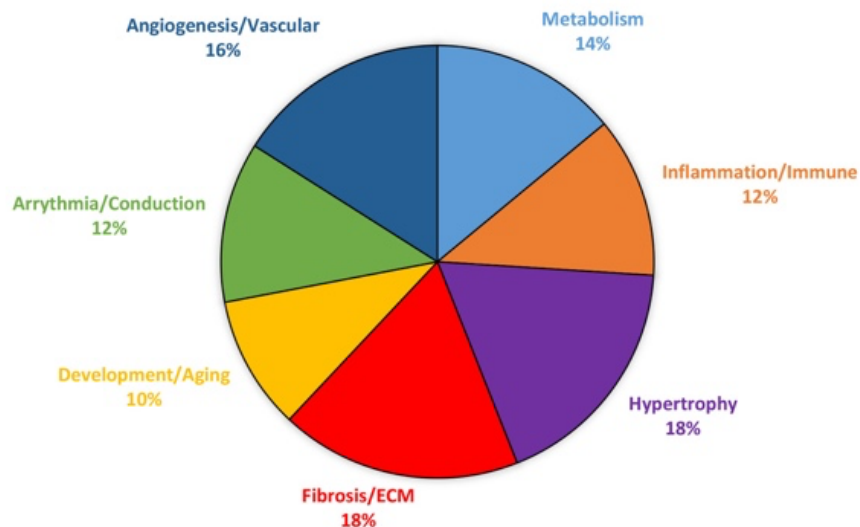
A miRNS microarray vizsgálatok statisztikai tesztjeit és klaszteranalízisét az LC Sciences biztosította a microarray szolgáltatás részeként. A jelértékeket háttérkorrekciót és normalizálást követően határozták meg. A detektálható transzkriptumokat további statisztikai adatfeldolgozásnak vetették alá, és a jelintenzitásokat az ismétlődő pontok átlagértékeként tüntették fel. A statisztikai szignifikancia meghatározására egyutas varianciaanalízist (one-way ANOVA) és t-próbát alkalmaztak. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az RT-PCR eredmények és a Western blot analízisek kvantifikációja Microsoft® Excel 16.96 vagy GraphPad® Prism 10.1.1 szoftverek segítségével történt. A kvantitatív eredményeket átlag \pm szórás (SD) formájában fejeztük ki. A $p < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak, míg a $p < 0,01$ értéket kiemelten szignifikánsnak tekintettük.

4. Eredmények

4.1. 1. célkitűzés: Hegszövet képződéssel összefüggő változásokat mutató kismolekulák (miRNS-ek) azonosítása hipoxiának kitett felnőtt egérszívekben szisztémás TB4 kezelést követően.

4.1.1. TB4 kezelt hipoxiás egér szívek MicroRNA microarray vizsgálata

Korábbi eredményeink utalásai szerint a sejthalál csökkentése az egyik, de nagy valószínűséggel nem az egyetlen olyan mechanizmus, ami a TB4 peptid szívből bekövetkező hipoxiás eseményeket követő kedvező hatásaiért felel [54]. A lehetséges további molekuláris mechanizmusok feltárása érdekében miRNS-microarray vizsgálatokat végeztünk a szívinfarktust követő 1. és 3. napokon, TB4-kezeléssel vagy anélkül, felnőtt egérszívek károsodott (core) és távoli (remote) régióiból származó minták felhasználásával (n = 4 core/remote, 1. nap/3. nap, csoportonként). Vizsgálataink kimutatták, hogy a megváltozott expressziót mutató miRNS-ek mintegy 18%-a potenciális szerepet játszhat a kardiális fibrózis kialakulásában és az extracelluláris mátrix (ECM) átépülésében (1. Ábra).



1. Ábra. Összefoglaló reprezentatív diagram az infarktust követően, az egérszívekben alkalmazott szisztémás TB4-kezelés hatására megváltozott miRNS-ek potenciális funkciójának bemutatására (Egy-egy miRNS-célpont több funkcionális kategóriába is besorolható volt) [65].

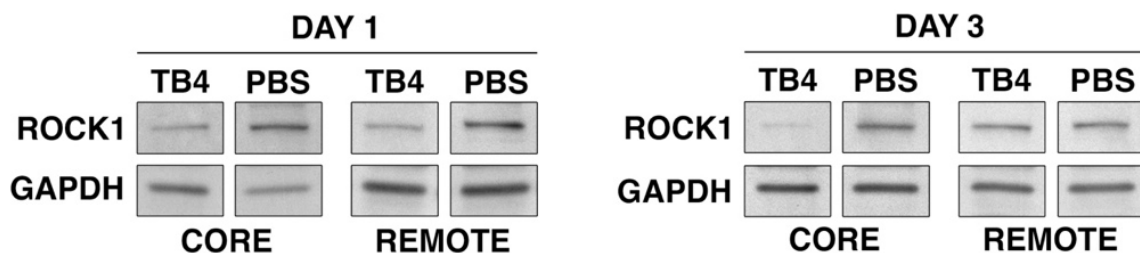
A miRNS microarray alapján (számos megváltozott potenciális miRNS-target mellett) azt találtuk, hogy a miR139-5p miRNS szintje szignifikánsan (1,5-szeresére) megemelkedik a szisztémás TB4-kezelést követő 1. és 3. napokon az infarktusz core területén a PBS-sel kezelt kontrollokhoz viszonyítva. A microarray eredményeinek megerősítésére valós idejű PCR vizsgálatot végeztünk miR139-5p-specifikus próbával a szív károsodott (core) és egészséges (remote) régióiból származó mintákon. Eredményeink szerint az infarktust követő 1. napon nem találtunk szignifikáns változást, azonban a 3. napon a miR139-5p

expressziója szignifikánsan megemelkedett mind a core, mind a remote régiókban a PBS-sel kezelt kontrollokhöz képest.

4.2. 2. célkitűzés: Az azonosított miRNS célpontok megváltozott expressziója által szabályozott molekuláris szereplők és mechanizmusok meghatározása a hegyszövet képződés folyamatában.

Munkánk követő lépésében, a szakirodalmi adatok áttekintésével párhuzamosan, a miR139-5p feltételezett célpontjait határoztuk meg TargetScan (targetscan.org) szoftver segítségével. Vizsgálataink során elsősorban azokra a molekulákra összpontosítottunk, amelyek a szívben expresszálódnak és amelyekről ismert, hogy kulcsszerepet játszanak a szív átépülési és a fibrotikus hegyszövet képződési folyamataiban. A kritériumoknak megfelelő egyik potenciális miRNS-célpont a ROCK1 fehérje volt, amelyet korábban Zhao és munkatársai részleteiben azonosítottak a miR139-5p lehetséges targetjeként [66]. A ROCK1 fehérje, mint tudjuk, az aktin-összeépülés folyamatainak jól ismert szabályozója különböző sejtípusokban [67].

Annak meghatározására, hogy a TB4 peptid általánosságban befolyásolja-e a ROCK1 fehérje expresszióját, Western blot analízist végeztünk az infarktust követő 1. és 3. napokon gyűjtött egér szív minták felhasználásával szisztémás TB4, vagy PBS kezelést követően. A vizsgálatokhoz a szív károsodott (core) és távoli, ép (remote) régióiból származó fehérjemintákat használtuk, amelyek ugyanabból a szövetekből származtak, amelyeket a microarray analízisekhez is felhasználtunk. Eredményeink kimutatták, hogy a TB4 fehérje szignifikánsan csökkenteti a ROCK1 szintjét mind a károsodott, mind a távoli szívterületeken az infarktust követő 1., illetve 3. napokon (2. Ábra).



2. Ábra. TB4 in vivo csökkenti a ROCK1 fehérje szintjét szívinfarktust követően. Reprezentatív Western blot eredmények a károsodott (core) és az ép (remote), szívterületekről ROCK1-specifikus primer antitest felhasználásával [65].

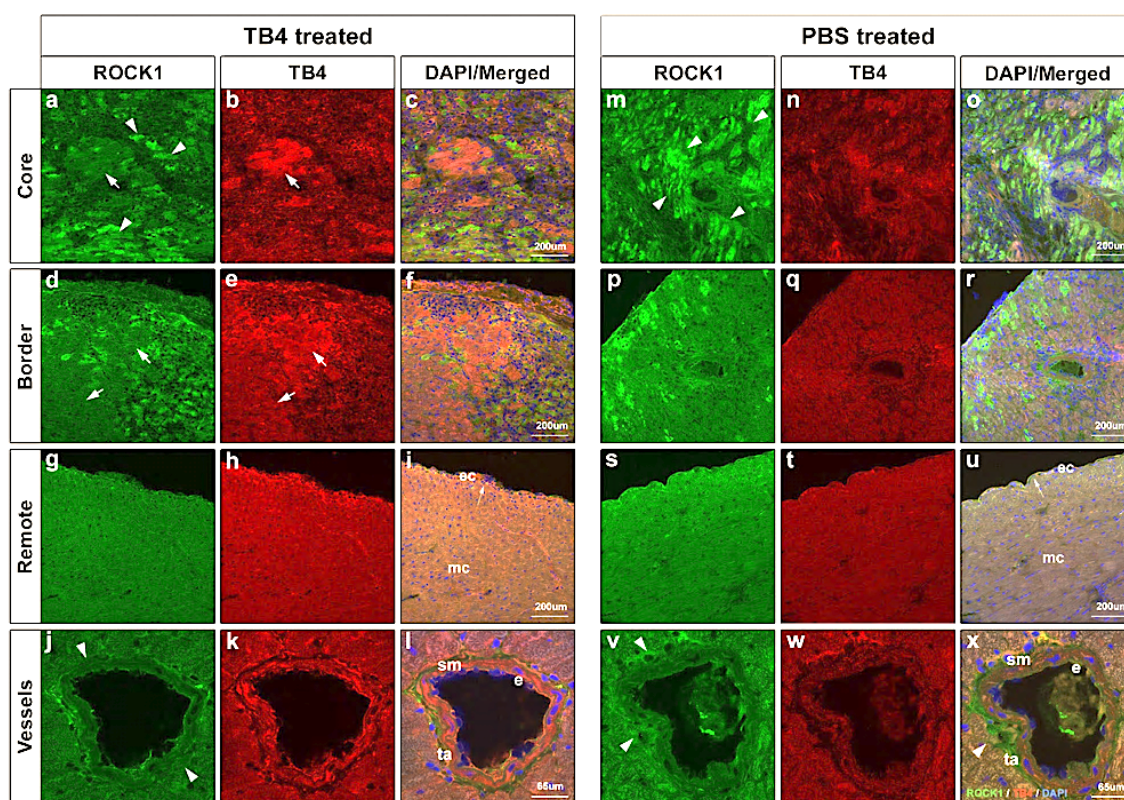
Mivel a ROCK1 és ROCK2 kinázok doménjei között mintegy 92%-os szekvencia homológia áll fenn, megvizsgáltuk, hogy a TB4 peptid hatása mennyire specifikus a

ROCK1 fehérjére. Kísérleteinkben a ROCK1 esetében megfigyelt eredményekkel ellentétben a ROCK2 specifikus primer antitesttel végzett Western blot vizsgálatok nem mutattak szignifikáns változást szisztémás TB4 kezelést követően infarktusos egérszívekben. Ezen túlmenően, mivel Western blot eredményeink az infarktust követő első napon a ROCK1 fehérjeszint csökkenését jelezték, míg a miR139-5p expressziója nem változott szignifikánsan, olyan további lehetséges mechanizmusokat kerestünk, amelyek a ROCK1 szintjének módosulásáért felelősek lehetnek. Eredményeink azt mutatták, hogy a ROCK1 mRNS szintjei az infarktust követő első 24 órában a szisztémás TB4-kezelést követően mind a károsodott core, mind a remote régiókban mérsékelten csökkentek, azonban ezek a változások nem mutattak statisztikai szignifikát. Fontos megjegyezni, hogy a TB4 kezeléshez tartozó RQ értékek minden vizsgált régióban és kezelési csoportban közel álltak, illetve hasonlóak voltak a sham-műtéten átesett állatokban mért értékekhez.

4.3. 3. célkitűzés: A kiváltott molekuláris változások meghatározása és összehasonlítása a felnőtt egér és humán szív különböző sejttypusaiban a potenciális klinikai alkalmazhatóság meghatározása céljából.

4.3.1. TB4 csökkenti a ROCK1 fehérje szintjét a hipoxiás felnőtt emlős egérszívben in vivo - immunhisztokémiai vizsgálatok

Annak megértése és meghatározása érdekében, hogy mely sejttypusokban és milyen lokalizációban változik a ROCK1 fehérje expressziója, immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk krioprezervált, hipoxiát követő egér szívmintákon. Western blot eredményeinkkel összhangban azt találtuk hogy a ROCK1 fehérje szintje egyaránt csökkent a károsodott (core), a határzónai (border), valamint a távoli (remote) régiókban TB4 kezelést követően. A core és border területeken megfigyeltük, hogy a fokozott TB4 pozitivitást mutató kardiomiocitákban a ROCK1 fehérjeszint alacsonyabb volt, mint az csökkent TB4 expressziót mutató sejtekben. A távoli, nem infarktusos régiókban szintén csökkent ROCK1-szint volt megfigyelhető a TB4 kezelt szívekben. A következő lépésben megvizsgáltuk a ROCK1 expresszió változásait a szív érett ereiben is. A legjelentősebb különbségeket az erek legkülső rétegében, a tunica adventitiában figyeltük meg, ahol a ROCK1 jelenléte a hipoxiás, nem kezelt szívekben láthatóan fokozott volt. A simaizomsejtrétegben a TB4 expressziója emelkedett, azonban a ROCK1 szintje mind a TB4, mind a PBS kezelt érett szíverekben alacsony maradt. Végül megfigyeltük, hogy bár az endotel réteg ROCK1 pozitivitást mutatott, ebben a sejttypusban immunhisztokémiai módszerrel nem detektáltunk jelentős változásokat a kezelt és kontroll mintákban (3. Ábra).



3. Ábra. Immunhisztokémiai vizsgálatok TB4- és PBS-kezelt felnőtt egérszívekben a miokardiális infarktust követő harmadik napon. (e: érendotel; ta: tunica adventitia; sm: simaizom; mc: myocardium; ec: epicardium) (n = 3 / kezelési csoport) [65].

4.3.2. A TB4 *in vitro* hatása a ROCK1, az aktin és az MRTF-A szintjeire felnőtt humán szívsejtekben

Mivel immunhisztokémiai eredményeink arra utaltak, hogy a TB4 peptid módosítja a ROCK1 fehérje szintjét a hipoxiás egér szívek endotel, miokardiális és fibroblaszt sejtjeiben, kíváncsiak voltunk, hogy vajon ezek a hatások *in vitro* humán szívsejtekben is kimutathatók-e. Emellett a TB4 által kiváltott ROCK1 változások lehetséges downstream következményeinek feltárása érdekében megvizsgáltuk az aktin és az MRTF-A expresszióját is a fent említett sejtípusokban [68, 69].

4.3.2.1. Humán köldökvéna-endotélsejtek (HUVECs)

Első lépésben HUVEC sejteket kezeltünk TB4-gyel, illetve kontrollként PBS-sel normoxiás és hipoxiás körülmények között. Eredményeink azt mutatták, hogy normoxiás körülmények között a TB4 peptid nem okozott szignifikáns változást a ROCK1 fehérje expressziójában, míg PBS jelenlétében az aktin filamentumok fokozott megnövekedése volt megfigyelhető. Hipoxiás körülmények között viszont a TB4 csökkentette a ROCK1 szintjét a HUVEC

sejtekben, amit az aktin filamentumok lebomlására utaló jól látható eltolódás kísért. Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy a TB4 befolyásolja az MRTF-A sejtmagba történő transzlokációját, és ezáltal aktivációját [70]. Az MRTF-A egy transzkripciós faktor, amely képes kölcsönhatásba lépni a G-aktinnal, illetve SRF-fel együttműködve kulcsszerepet játszik a profibrotikus gének aktiválásában [68, 69]. Mindezek tükrében következő lépésként megvizsgáltuk a TB4 hatását az MRTF-A expressziójára és sejten belüli lokalizációjára HUVEC sejtekben. Eredményeink szerint az MRTF-A elhelyezkedése nem változott, mind normoxiás, mind hipoxiás körülmények között kizárólag a sejtek sejtmagjában volt kimutatható.

4.3.2.2. Felnőtt humán kardiomiociták (hCMs)

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a TB4 miként befolyásolja a felsorolt molekulák viselkedését humán kardiomiocitákban (hCM). A felnőtt egérszívekben kapott eredményeinkhez hasonlóan a hCM sejtek immunfestése jól látható ROCK1 szintcsökkenést mutatott mind normoxiás, mind hipoxiás körülmények között. Ezt a jelenséget a TB4 kezelt sejtekben az aktin filamentum struktúrák csökkenése is alátámasztotta a PBS kezelésű kontrollokhoz képest.

4.3.2.3. Felnőtt humán szív fibroblasztok (hCFBs)

Végül megvizsgáltuk a TB4 peptid hatását felnőtt humán szív fibroblasztokban is (hCFB). A korábban vizsgált molekulák mellett elemeztük az alfa-simaizom aktin (α -SMA) expressziójának változásait is, amely a szívben a fibroblaszt–miofibroblaszt átalakulás jól ismert és elfogadott markere [71, 72]. Eredményeink jelentős ROCK1 fehérjeszint csökkenést mutattak TB4 kezelést követően, amely különösen hipoxiás körülmények között volt kifejezett. A ROCK1 fehérje változásaira vonatkozó megfigyeléseinket tovább erősítette az aktin filamentum struktúrák arányos csökkenése a TB4 kezelt hCFB sejtekben, különösen hipoxiás körülmények között. Az α -simaizom aktin (α -SMA) vizsgálata során úgy találtuk, hogy a fehérje szintje TB4 kezelés hatására mind normoxiás, mind hipoxiás körülmények között csökkent. Figyelemre méltó, hogy a TB4 fibroblaszt–miofibroblaszt átalakulást gátló hatása különösen kifejezett volt a hipoxiának kitett hCFB sejtekben. Végezetül, a humán kardiomiocitákkal (hCM) ellentétben, a hCFB sejttípusban nem tapasztaltunk látható különbséget az MRTF-A lokalizációjában TB4-kezelést követően, mivel az MRTF-A TB4 hatására is elsősorban a hCFB sejtek sejtmagjában lokalizálódott.

5. Megbeszélés

A kardiovaszkuláris betegségek és működési zavarok csoportja a legintenzívebben kutatott egészségügyi problémák közé tartozik, és világszerte továbbra is a halálozások egyik vezető okaként szerepel. Többtenyezős eredetéből fakadóan a gyulladós folyamatok kialakulása, valamint az őket gyakran követő hegszövet képződés jelentős mértékben hozzájárulnak a szív következményes működési zavaraihoz és teljesítményének csökkenéséhez. Ennek megfelelően a patológiás hegesedés csökkentését célzó, különböző molekuláris szignálmechanizmusokra ható terápiás beavatkozások fontos klinikai jelentőséggel bírnak.

Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a 43 aminosav hosszúságú szisztémásan alkalmazott TB4 peptid képes a szív működés javítására felnőtt egerekben és sertésekben egyaránt [54, 73, 74]. Adagolásával a sejthalál gátlása és az érképződés aktiválása mellett a szív működés helyreállítását mindkét fajban a hegszövet térfogatának jelentős csökkenése kísérte [73, 74]. Annak megértése érdekében, hogy a TB4 milyen mechanizmusokon keresztül képes ezeket a változásokat előidézni, kutatásaink során különböző szűrővizsgálatokat, például miRNS microarray analízist végeztünk, elsősorban a szív átépülésében szerepet játszó fehérjéket befolyásoló célpontokra fókuszálva. Vizsgálataink eredményeként jelen munkánkban egy olyan új mechanizmust azonosítottunk, amelyen keresztül a TB4 mérsékelheti a hipoxiát követő hegszövet képződést a felnőtt emlős szívben. Eredményeink szerint a peptid in vivo, infarktust követően képes közvetlenül vagy közvetve modulálni a ROCK1 fehérje szintjét. A gátló hatás leginkább a károsodott (core) és a határzónában (border) volt megfigyelhető, ahol a TB4-pozitív sejtek, vagy sejtcsoportok láthatóan alacsonyabb ROCK1 szintet mutattak. Emellett a ROCK1 mind az infarktusz core területeken, mind a távoli normoxiás régiókban is csökkenést mutatott, ami arra utal, hogy a megfigyelt jelenség nem kizárólag hipoxia függő. Az érett erek vizsgálata során az endotel sejtek, valamint az adventitia sejtrétegének érintettségét is azonosítottuk, amely egy kollagénben gazdag kötőszöveti mátrixba ágyazva fibroblasztokat és ősz/progenitor sejteket tartalmaz [75].

A miRNS microarray és a valós idejű PCR eredményeink arra utaltak, hogy a miR139-5p nevű microRNS expressziójának fokozódása az egyik lehetséges mechanizmus, amelyen keresztül a TB4 befolyásolja a ROCK1 szintjét a szívben [76]. Ugyanakkor a TB4 közvetlen hatásának pontos mechanizmusa a ROCK1 mRNS átíródására továbbra sem teljesen tisztázott, és jelenleg is vizsgálataink tárgyát képezi. Mindezek mellett, a munkánk

során alkalmazott viszonylag alacsony mintaszám okán az elemszám bővítése is kiemelten fontos lesz annak érdekében, hogy eredményeink klinikai környezetben is általánosíthatók és alkalmazhatók legyenek.

A ROCK1 fehérje jelentőségét és szerepét a szív átépülési (cardiac remodeling) és hegesedési folyamatokban számos kutatás vizsgálja napjainkban [25, 28, 39, 77]. A fehérje kulcsszerepet játszik az aktin-dinamikában, amely alapvető jelentőséggel bír a sejtfiziológia számos folyamatának szabályozásában, ideértve a sejt migrációt, a proliferációt, a neuritnövekedést és a vezikuláris transzportot [78]. A folyamatok szorosan összefüggenek az aktin polimerizációjával és az aktin stresszrostokba való szerveződésével [20]. A kialakult molekuláris struktúrák a plazmamembránhoz a fokális adhéziókban kapcsolódva rögzülnek, és a filamentális aktin miozin által közvetített, antiparallel irányú mozgása révén kontraktilis erőt hoznak létre. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a ROCK1 expressziójának gátlása a stresszrostok kialakulásának és a fokális adhéziók szerveződésének csökkenéséhez vezet [79, 80], míg a fehérje túlzott expressziója növeli a rostok számát, ezáltal fokozza a kontraktilitást [78, 79]. A knockout, vagy egyéb gátlási kísérletekben megfigyelt eredményekkel összhangban a TB4 peptiddel végzett jelen vizsgálatainkban is jól látható csökkenést észleltünk az aktin filamentumok mennyiségében, különösen humán kardiális fibroblasztokban és kardiomiocitákban.

Azon felül, hogy a fibroblasztok az egészséges szív extracelluláris mátrixának fő forrásai, szorosan kapcsolatban állnak a szerkezeti hegszövet kialakulásával is. Az iszkémiás szívben szintén kulcsszerepet játszanak, ahol a jelentős kardiomiocita veszteséget kardiális fibroblasztok pótolják, amik azután képesek miofibroblasztokká differenciálódni [28, 77, 81-83]. A differenciált sejtekben a kontraktilis fehérjék, mint például az α -simaizom aktin (α -SMA) expressziója fokozódik, miközben nő a mátrix-metalloproteinázok (MMP-k) és a kollagénrostok mennyisége és szekréciója is [84], és amely folyamatok végső soron kardiális fibrózis kialakulásához vezetnek. Mindezen patológiás és funkcionálisan kedvezőtlen folyamatok befolyásolása érdekében a ROCK1 aktivitás modulálása széles körben javasolt. Jelen vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a TB4 exogén alkalmazása humán kardiális fibroblasztokban jelentős α -SMA szintcsökkenést eredményez nemcsak hipoxiás, de normoxiás körülmények között is, ami arra utal, hogy a peptid befolyásolhatja a fent említett sejt differenciációt és az ehhez kapcsolódó további sejtszintű patológiás folyamatokat az emberi szívben.

A Rho/ROCK jelátviteli útvonal aktivációja a G-aktin polimerizációját indítja el, amelynek következtében az MRTF fehérjék felszabadulnak az aktinhoz kötött állapotukból,

majd a sejtmagba transzlokálódnak. A sejtmagban az SRF aktiválásán keresztül különböző profibrotikus gének expresszióját indukálják. Az SRF egy MADS-box típusú transzkripciósfaktor, amely számos izomspecifikus gén, többek között az ANF és az α -skeletális aktin szabályozásában is részt vesz azáltal, hogy a gének promóter- vagy enhancer-régióiban található CArG-box elemekhez kötődik [85, 86]. Az utóbbi években számos vizsgálat kimutatta, hogy a ROCK/MRTF/SRF jelátviteli útvonal gátlása megakadályozza a miofibroblasztok aktivációját, illetve elősegíti azok apoptózisát, korlátozva ezáltal a fibrózis kialakulását többek között a szívben és a tüdőben is [29, 39, 87, 88]. TB4 és az MRTF/SRF jelátviteli útvonal közötti potenciális kapcsolat is leírásra került, amely szerint a citoszolban megemelkedett TB4 szint az MRTF sejtmagba történő transzlokációját indíthatja el azáltal, hogy kompetitíven megköti a G-aktint, és így felszabadítja az MRTF-A-t a G-aktinhoz való kötődéséből [68, 69]. Jelen eredményeink azonban arra utalnak, hogy a TB4 által kiváltott MRTF-A transzlokáció erősen sejttípus függő jelenség. Míg a peptid exogén hozzáadása felnőtt humán kardiomiocitákhoz mind hipoxiás, mind normoxiás körülmények között felgyorsította az MRTF-A sejtmagba történő transzlokációját, addig HUVEC sejtekben és kardiális fibroblasztokban nem észleltünk hasonló változást. Éppen ellenkezőleg, ezekben a sejtekben az MRTF-A túlnyomórészt a sejtmagban lokalizálódott a TB4 jelenlététől függetlenül, miközben a ROCK1 szintje mindkét sejttípusban csökkent. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a TB4 kezelt felnőtt fibroblasztokban megfigyelt α -simaizom aktin (α -SMA) szintcsökkenés ezekben a sejtekben valószínűleg egy MRTF-A-tól független mechanizmusokon keresztül valósul meg. A humán fibroblasztokban és endotélsejtekben megfigyelt eltérések, különösen a ROCK1 expresszió, az α -SMA expresszió és az MRTF-A viselkedése közötti különbségek a kardiomiocitákhoz képest azt sugallják, hogy a TB4 peptid downstream ROCK vonatkozású jelátviteli hatásainak további vizsgálata általános jelentőségű lehet. A további mechanizmusok feltárása ennek megfelelően jelenlegi kutatásaink tárgyát képezi. Végezetül megjegyeznénk, hogy az általunk vizsgált rendszerekben a TB4 fehérje alkalmazásakor megfigyelt csökkent ROCK1 szint a ROCK1 mRNS szintézisének mérséklődésével is magyarázható, amely hatást feltehetően tovább erősíti a miR139-5p microRNS expressziójának szignifikáns emelkedése az infarktust követő harmadik napon. Mivel az exogén módon alkalmazott TB4 képes eljutni a sejtek sejtmagjába is [89], a TB4 peptid ROCK1 mRNS transzkripciójára gyakorolt hatásának pontos molekuláris mechanizmusait tisztázó további részletes vizsgálatok kifejezetten értékesek lehetnek a jövő kutatásai szempontjából.

6. Összefoglalás

A szívregeneráció egy igen összetett folyamat, amelynek célja a szív működés helyreállítása sérülést követően. Mivel a felnőtt emlős szív regenerációs képessége sajnálatos módon korlátozott, a károsodások eredményeképpen kialakuló miokardiális fibrózis patológiás átépüléshez és végső soron szívelégtelenség kialakulásához vezethet [4, 8, 90]. E kedvezőtlen folyamatok ellensúlyozásához kulcsfontosságú a hiányzó, funkcionális helyreállítást is meghatározó molekuláris kiváltó tényezők és jelátviteli hálózatok azonosítása. A jelenlegi eredmények szerint azok a terápiás megközelítések, amelyek olyan kulcsfontosságú profibrotikus jelátviteli útvonalakat céloznak, mint például a ROCK jelátvitel, feltétlenül ígéretesnek bizonyultak a szöveti regeneráció hatásos támogatásában [39]. A stratégiák továbbfejlesztéséhez és a lehetséges mellékhatások csökkentéséhez azonban további kutatásokra van szükség. Mindezek tükrében, jelen disszertációnk a TB4 kisfehérje ROCK1 fehérjén keresztüli antifibrotikus folyamatokra gyakorolt hatásának feltárásával kétségtelenül ígéretes jelöltet állít a folyamat jövőbeni klinikai regenerációs alkalmazhatósága szempontjából.

7. Az értekezés új tudományos eredményei

- I. A TB4 peptid szisztémás alkalmazása megváltoztatja a hipoxiás emlős szív miRNS-expressziós mintázatát.
- II. A TB4 fehérje szisztémás alkalmazása az infarktust követő harmadik napon fokozza a miR139-5p expresszióját a hipoxiás egérszívben.
- III. A TB4 peptid szisztémás alkalmazást követően csökkenti a miR139-5p célpontjaként ismert ROCK1 fehérje szintjét a hipoxiás emlős szívben.
- IV. A TB4 molekula szisztémás in vivo alkalmazása csökkenti a ROCK1 szintjét kardiális endotélsejtekben, fibroblasztokban és miokardiális sejtekben egérmódban.
- V. A TB4 peptid szisztémás in vivo alkalmazása nem befolyásolja szignifikánsan a ROCK2 fehérje szintjét infarktuszó egérszívben.
- VI. A TB4 fehérje szisztémás in vivo alkalmazása nem okoz szignifikáns változást a ROCK1 mRNA szintjében a hipoxiás egérszívben.

VII. A TB4 peptid csökkenti a ROCK1 fehérje in vitro expresszióját hipoxiás humán kardiális endotélsejtekben, kardiomiocitákban és fibroblasztokban.

VIII. A TB4 molekula csökkenti az α -simaizom aktin (α -SMA) szintjét humán kardiális fibroblasztokban.

IX. A TB4 peptid csökkenti a filamentózus aktin (F-aktin) szerveződését humán kardiomiocitákban, endotélsejtekben és fibroblasztokban.

X. A TB4 molekula által kiváltott MRTF-A citoplazmából sejtmagba történő transzlokációja sejttípus specifikus jelenség a humán szívsejtekben.

8. Publikációk és konferencia részvételek

8.1. A tézishoz közvetlenül kapcsolódó publikációk

Maar, Klaudia; Thatcher, Jeffrey E.; Karpov, Egor; Rendeki, Szilard; Gallyas, Ferenc; Bock-Marquette, Ildiko; Thymosin Beta-4 Modulates Cardiac Remodeling by Regulating ROCK1 Expression in Adult Mammals. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 26: 9 Paper: 4131, 21 p. (2025) (Q1/D1) IF: 4.9

Maar, Klaudia; Hetenyi, Roland; Maar, Szabolcs; Faskerti, Gabor; Hanna, Daniel; Lippai, Balint; Takatsy, Aniko; Bock-Marquette, Ildiko; Utilizing Developmentally Essential Secreted Peptides Such as Thymosin Beta-4 to Remind the Adult Organs of Their Embryonic State-New Directions in Anti-Aging Regenerative Therapies. *CELLS* 10: 6 Review Paper: 1343, 15 p. (2021) (Q1) IF: 7.666

Bock-Marquette, Ildiko; **Maar, Klaudia**; Maar, Szabolcs; Lippai, Balint; Faskerti, Gabor; Gallyas, Ferenc Jr; Olson, Eric; Srivastava, Deepak; Thymosin beta-4 denotes new directions towards developing prosperous anti-aging regenerative therapies *INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY* 116 Review Paper: 109741, 10 p. (2023) (Q1) IF: 4.8

Total IF / releváns publikációk: 17.366

8.2. A tézishez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

Toldi, Janos; Kelava, Leonardo; Marton, Sandor; Muhl, Diana; Kustan, Peter; Feher, Zsolt; **Maar, Klaudia**; Garai, Janos; Pakai, Eszter; Garami, Andras; Distinct patterns of serum and urine macrophage migration inhibitory factor kinetics predict death in sepsis: a prospective, observational clinical study. *SCIENTIFIC REPORTS* 13: 1 Paper: 588, 15 p. (2023) (Q1) IF: 3.8

Total IF összes publikáció: 21.166

8.3. A tézishez közvetlenül kapcsolódó citálható absztraktok

Bock-Marquette, I.; **Maar, K.**; Maar, S.; Lippai, B.; Faskerti, G.; Hanna, D.; Thatcher, J.; Olson, E. N.; Gallyas, F.; Enhancing cardiac regenerative therapies by reminding the adult heart on its embryonic state. *EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE* 24 pp. 281-282., 2 p. (2022) (Q1/D1) IF: 18.2

Maar, K.; Thatcher, J.; Gallyas, F.; Bock-Marquette, I.; Thymosin beta-4 alters hypoxia induced ROCK1 expression in the adult mammalian heart. *EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE* 24 pp. 282-282., 1 p. (2022) (Q1/D1) IF: 18.2

Bock-Marquette, I.; Gallyas, F.; **Maar, K.**; Utilizing Secreted Peptides To Remind the Adult Organs on Their Embryonic State – New Directions in Anti-Aging Regenerative Therapies. *SCRIPTA MEDICA* 52: Suppl. 1 Paper: S67 (2021)

Maar, K.; Thatcher, JE.; Olson, EN. Gallyas, F.; Bock-Marquette, I.; Thymosin beta-4 alters ROCK1 expression in the adult hypoxic mammalian heart. *SCRIPTA MEDICA* 52: Suppl. 1 Paper: S74 (2021)

Szabolcs, Maar; Lilla, Adrienn Czuni; Szilard, Rendeki; Aniko, Takatsy; **Klaudia, Maar**; Gabor, Faskerti; Ferenc, Gallyas; Ildiko, Bock-Marquette; Identification of potential physical and psychological stress-initiated peptides in support of tissue regeneration and repair in humans. *SCRIPTA MEDICA* 52: Suppl. 1 Paper: S73 (2021)

Bock-Marquette, I.; Hinkel, R.; Ball, H.; Thatcher, J.; Faskerti, G.; **Maar, K.**; Olson, E. N.; Kupatt, C.; The effect of thymosin beta-4 domains on post-hypoxic cardiac regeneration and repair. *EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE* 22 pp. 263-264., 2 p. (2020) (Q1/D1) IF: 15.534

Total IF összes citálható absztrakt: 51.93

Cumulative IF összes publikáció: 73.096

8.4. További konferencia absztraktok és posterek (7)

Bock-Marquette, Ildikó; **Maar, Klaudia**; Maar, Szabolcs; Fáskert, Gábor; Lippai, Bálint Takatsy Anikó; Gallyas, Ferenc; Enhancing cardiac regenerative therapies by reminding the adult heart on its embryonic state. In: István, Baczkó; Norbert, Nagy; Péter, Bencsik (szerk.) *8th European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences: September 28 – October 1, 2022, Szeged, Hungary*: Programme and Abstract Book Szeged, Magyarország: Szegedi Tudományegyetem (2022) 126 p. pp. 58-58., 1 p. - poster presentation

Maar, Klaudia; Jeffrey, E. Thatcher; Eric, N. Olson; Ferenc, Gallyas; Bock-Marquette, Ildikó; Thymosin beta-4 alters miR-139-5p expression in the hypoxic mammalian heart. In: István, Baczkó; Norbert, Nagy; Péter, Bencsik (szerk.) *8th European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences: September 28 – October 1, 2022, Szeged, Hungary*: Programme and Abstract Book Szeged, Magyarország: Szegedi Tudományegyetem (2022) 126 p. pp. 100-100., 1 p.- poster presentation

Klaudia, Maar; Jeffrey, E. Thatcher; Santwana, Shrivastava; Michael, DiMaio; Eric, N. Olson; Ferenc, Gallyas; Ildiko, Bock-Marquette; Thymosin β 4 increases mmu-mir-1196 expression in hypoxic adult mammalian hearts. In: Csiszár, Beáta; Hankó, Csilla; Kajos, Luca Fanni; Mező, Emerencia (szerk.) *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences 2021*: Book of Abstracts Pécs, Magyarország: University of Pécs, Doctoral Student Association (2021) 128 p. pp. 112-112., 1 p. - poster presentation

Maar, K., Thatcher, J., Olson, EN., Gallyas, F., Bock-Marquette, I. Thymosin Beta-4 Alters ROCK1 Expression in the Adult Hypoxic Mammalian Heart. *7th Meeting of*

European Section and 8th Meeting of North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS) (Bosznia és Hercegovina 2020) - poster presentation

Maar, K., Thatcher, J., Shivastava, S., DiMaio, JM., Olson, EN., Gallyas, F., Bock-Marquette, I. Thymosin Beta-4 influences miR1196 expression following cardiac infarction in adult mice. *6th Meeting of European Section and 7th Meeting of North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS) (Szerbia 2019) - poster presentation*

Faskerti, G., Czuni, L., Takatsy, A., Ronai, D., Nagy, Z., Rendeki, S., Rendeki, M., Koltai, A., **Maar, K.**, Gallyas, F., Bock-Marquette, I. Identification of potential exercise initiated small molecules to support organ regeneration and repair in humans. *6th Meeting of European Section and 7th Meeting of North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS) (Szerbia 2019) - poster presentation*

Bock-Marquette, I., Hinkel, R., Ball, H., Thatcher, J., Faskerti, G., **Maar, K.**, Olson, EN., Kupatt, C., Gallyas, F. The effect of Thymosin beta-4 domains on post-hypoxic cardiac regeneration and repair. *6th Meeting of European Section and 7th Meeting of North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS) (Szerbia 2019) - oral presentation*

8.5. Díjak, elismerések

2021 **Első hely:** 2nd Poster section, Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MedPECS 2021) conference

9. Referenciák

1. Martin, S.S., et al., *2025 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association*. *Circulation*, 2025. **151**(8): p. e41-e660.
2. Heidenreich, P.A., et al., *Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2011. **123**(8): p. 933-44.

3. Beltrami, A.P., et al., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2001. **344**(23): p. 1750-7.
4. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens*. Circ Res, 2016. **118**(6): p. 1021-40.
5. Ma, Z.G., et al., *Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis*. Int J Biol Sci, 2018. **14**(12): p. 1645-1657.
6. Kurose, H., *Cardiac Fibrosis and Fibroblasts*. Cells, 2021. **10**(7).
7. Maar, K., et al., *Utilizing Developmentally Essential Secreted Peptides Such as Thymosin Beta-4 to Remind the Adult Organs of Their Embryonic State-New Directions in Anti-Aging Regenerative Therapies*. Cells, 2021. **10**(6).
8. Frangogiannis, N.G., *Cardiac fibrosis*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(6): p. 1450-1488.
9. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(2): p. 255-78.
10. Younesi, F.S., et al., *Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024. **25**(8): p. 617-638.
11. Nanthakumar, C.B., et al., *Dissecting fibrosis: therapeutic insights from the small-molecule toolbox*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(10): p. 693-720.
12. Weber, K.T., et al., *Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart*. Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(1): p. 15-26.
13. Forrester, S.J., et al., *Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology*. Physiol Rev, 2018. **98**(3): p. 1627-1738.
14. Swaney, J.S., et al., *Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 437-42.
15. Gurantz, D., et al., *IL-1beta and TNF-alpha upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(3): p. 505-15.
16. Gurantz, D., et al., *Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 272-9.
17. Wang, H., et al., *Redirecting valvular myofibroblasts into dormant fibroblasts through light-mediated reduction in substrate modulus*. PloS one, 2012. **7**(7): p. e39969.
18. Wang, H., et al., *Hydrogels preserve native phenotypes of valvular fibroblasts through an elasticity-regulated PI3K/AKT pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(48): p. 19336-19341.
19. Olson, E.N. and A. Nordheim, *Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 353-65.
20. Stempien-Otero, A., D.H. Kim, and J. Davis, *Molecular networks underlying myofibroblast fate and fibrosis*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 153-61.
21. Noma, K., N. Oyama, and J.K. Liao, *Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(3): p. C661-8.
22. Nakagawa, O., et al., *ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice*. FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 189-93.

23. Amano, M., M. Nakayama, and K. Kaibuchi, *Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(9): p. 545-54.
24. Riento, K. and A.J. Ridley, *Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 446-56.
25. Rikitake, Y., et al., *Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1+/- haploinsufficient mice*. Circulation, 2005. **112**(19): p. 2959-65.
26. Akhmetshina, A., et al., *Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 2008. **58**(8): p. 2553-2564.
27. Small, E.M., et al., *Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction*. Circ Res, 2010. **107**(2): p. 294-304.
28. Haudek, S.B., et al., *Rho kinase-1 mediates cardiac fibrosis by regulating fibroblast precursor cell differentiation*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(3): p. 511-8.
29. Dai, Y., W. Luo, and J. Chang, *Rho kinase signaling and cardiac physiology*. Curr Opin Physiol, 2018. **1**: p. 14-20.
30. Small, E.M., *The actin-MRTF-SRF gene regulatory axis and myofibroblast differentiation*. J Cardiovasc Transl Res, 2012. **5**(6): p. 794-804.
31. Jiang, C., et al., *Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(7): p. 8293-8307.
32. Knipe, R.S., A.M. Tager, and J.K. Liao, *The Rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis*. Pharmacol Rev, 2015. **67**(1): p. 103-17.
33. Han, Q.J., et al., *Fasudil prevents liver fibrosis via activating natural killer cells and suppressing hepatic stellate cells*. World J Gastroenterol, 2021. **27**(24): p. 3581-3594.
34. Lescoat, A., et al., *New promising drugs for the treatment of systemic sclerosis: pathogenic considerations, enhanced classifications, and personalized medicine*. Expert Opin Investig Drugs, 2021. **30**(6): p. 635-652.
35. Holvoet, T., et al., *Treatment of Intestinal Fibrosis in Experimental Inflammatory Bowel Disease by the Pleiotropic Actions of a Local Rho Kinase Inhibitor*. Gastroenterology, 2017. **153**(4): p. 1054-1067.
36. Saadat, S., et al., *Pivotal Role of TGF-beta/Smad Signaling in Cardiac Fibrosis: Non-coding RNAs as Effectual Players*. Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 588347.
37. Vistnes, M., *Hitting the Target! Challenges and Opportunities for TGF-beta Inhibition for the Treatment of Cardiac fibrosis*. Pharmaceuticals (Basel), 2024. **17**(3).
38. Parichatikanond, W., et al., *Therapeutic Targets for the Treatment of Cardiac Fibrosis and Cancer: Focusing on TGF-beta Signaling*. Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 34.
39. Shimizu, T. and J.K. Liao, *Rho Kinases and Cardiac Remodeling*. Circ J, 2016. **80**(7): p. 1491-8.

40. Shi, J., et al., *Disruption of ROCK1 gene attenuates cardiac dilation and improves contractile function in pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(3): p. 551-60.
41. Bock-Marquette, I., et al., *Novel Approaches in Reversing Environmental Stress Initiated Pathological Processes to Accelerate Organ Repair—The Power of Small Molecules*, in *Environmental Factors in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases*, D.M. Djuric and D.K. Agrawal, Editors. 2024, Springer Nature Switzerland: Cham. p. 587-607.
42. Goldstein, A.L., F.D. Slater, and A. White, *Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **56**(3): p. 1010-7.
43. Goldstein, A.L., Y. Asanuma, and A. White, *The thymus as an endocrine gland: properties of thymosin, a new thymus hormone*. Recent Prog Horm Res, 1970. **26**: p. 505-38.
44. Low, T.L. and A.L. Goldstein, *Thymosin fraction 5 and 5A*. Methods Enzymol, 1985. **116**: p. 219-33.
45. Huff, T., et al., *beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(3): p. 205-20.
46. Jo, J.O., et al., *Thymosin beta4 expression in human tissues and in tumors using tissue microarrays*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011. **19**(2): p. 160-7.
47. Mora, C.A., et al., *Biodistribution of synthetic thymosin beta 4 in the serum, urine, and major organs of mice*. Int J Immunopharmacol, 1997. **19**(1): p. 1-8.
48. Hannappel, E., *beta-Thymosins*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1112**: p. 21-37.
49. Hannappel, E., et al., *Thymosin beta 4: a ubiquitous peptide in rat and mouse tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(7): p. 2172-5.
50. Xu, G.J., et al., *Synthesis of thymosin beta 4 by peritoneal macrophages and adherent spleen cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(13): p. 4006-9.
51. Hannappel, E. and W. Leibold, *Biosynthesis rates and content of thymosin beta 4 in cell lines*. Arch Biochem Biophys, 1985. **240**(1): p. 236-41.
52. Yu, F.X., et al., *Effects of thymosin beta 4 and thymosin beta 10 on actin structures in living cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 1994. **27**(1): p. 13-25.
53. Carlier, M.F., et al., *Tbeta 4 is not a simple G-actin sequestering protein and interacts with F-actin at high concentration*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9231-9.
54. Bock-Marquette, I., et al., *Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair*. Nature, 2004. **432**(7016): p. 466-72.
55. Dathe, V. and B. Brand-Saber, *Expression of thymosin beta4 during chick development*. Anat Embryol (Berl), 2004. **208**(1): p. 27-32.
56. Saunders, V., et al., *Expression and localisation of thymosin beta-4 in the developing human early fetal heart*. PLoS One, 2018. **13**(11): p. e0207248.
57. Gupta, S., et al., *Thymosin β 4 and cardiac protection: implication in inflammation and fibrosis*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1269**: p. 84-91.

58. Renga, G., et al., *Thymosin β 4 limits inflammation through autophagy*. Expert Opin Biol Ther, 2018. **18**(sup1): p. 171-175.
59. Sosne, G., P. Qiu, and M. Kurpakus-Wheater, *Thymosin beta 4: A novel corneal wound healing and anti-inflammatory agent*. Clin Ophthalmol, 2007. **1**(3): p. 201-7.
60. Kleinman, H.K., V. Kulik, and A.L. Goldstein, *Thymosin β 4 and the anti-fibrotic switch*. International Immunopharmacology, 2023. **115**: p. 109628.
61. Hinkel, R., et al., *Cardioprotective Potential of Thymosin β 4 in a Preclinical Pig Model of Ischemia/Reperfusion Injury*. J Stem Cells Regen Med, 2007. **2**(1): p. 98-9.
62. Hinkel, R., et al., *C-terminal variable AGES domain of Thymosin β 4: the molecule's primary contribution in support of post-ischemic cardiac function and repair*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **87**: p. 113-25.
63. Ehrlich, H.P. and S.W. Hazard, 3rd, *Thymosin beta4 enhances repair by organizing connective tissue and preventing the appearance of myofibroblasts*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1194**: p. 118-24.
64. Ehrlich, H.P. and S.W. Hazard, *Thymosin β 4 affecting the cytoskeleton organization of the myofibroblasts*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1269**: p. 74-8.
65. Maar, K., et al., *Thymosin Beta-4 Modulates Cardiac Remodeling by Regulating ROCK1 Expression in Adult Mammals*. Int J Mol Sci, 2025. **26**(9).
66. *How practical is RNAlater solution?* 2022, Thermo Fisher Scientific.
67. *Schematic drawing of the features of stable and vulnerable plaques in the coronary arteries*.
68. Hinkel, R., et al., *MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3970.
69. Kupatt, C., et al., *Thymosin β 4 and MRTF-A mitigate vessel regression despite cardiovascular risk factors*. Int Immunopharmacol, 2023. **117**: p. 109786.
70. Blomme, B., et al., *Mechanical strain induces a pro-fibrotic phenotype in human mitral valvular interstitial cells through RhoC/ROCK/MRTF-A and Erk1/2 signaling pathways*. J Mol Cell Cardiol, 2019. **135**: p. 149-159.
71. Akhmetshina, A., et al., *Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(8): p. 2553-64.
72. Tarbit, E., et al., *Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells*. Heart Fail Rev, 2019. **24**(1): p. 1-15.
73. Bock-Marquette, I., et al., *Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(5): p. 728-38.
74. Hinkel, R., et al., *C-terminal variable AGES domain of Thymosin beta4: the molecule's primary contribution in support of post-ischemic cardiac function and repair*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **87**: p. 113-25.
75. Majesky, M.W., et al., *The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): p. 1530-9.

76. Zhao, X., et al., *MicroRNA-139-5p improves sepsis-induced lung injury by targeting Rho-kinase1*. *Exp Ther Med*, 2021. **22**(4): p. 1059.
77. Hartmann, S., A.J. Ridley, and S. Lutz, *The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 276.
78. Schofield, A.V. and O. Bernard, *Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013. **48**(4): p. 301-16.
79. Asp, P., et al., *Expression of BRG1, a human SWI/SNF component, affects the organisation of actin filaments through the RhoA signalling pathway*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 13): p. 2735-46.
80. Ishizaki, T., et al., *p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions*. *FEBS Lett*, 1997. **404**(2-3): p. 118-24.
81. Brown, R.D., et al., *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. **45**: p. 657-87.
82. Luo, S., et al., *ZYZ-168 alleviates cardiac fibrosis after myocardial infarction through inhibition of ERK1/2-dependent ROCK1 activation*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 43242.
83. Harvey, K.A., et al., *Diverse signaling pathways regulate fibroblast differentiation and transformation through Rho kinase activation*. *J Cell Physiol*, 2007. **211**(2): p. 353-63.
84. Klingberg, F., B. Hinz, and E.S. White, *The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis*. *J Pathol*, 2013. **229**(2): p. 298-309.
85. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 45-79.
86. Knipe, R.S., et al., *Myofibroblast-specific inhibition of the Rho kinase-MRTF-SRF pathway using nanotechnology for the prevention of pulmonary fibrosis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2023. **324**(2): p. L190-L198.
87. Santos, G.L., et al., *Inhibition of Rho-associated kinases suppresses cardiac myofibroblast function in engineered connective and heart muscle tissues*. *J Mol Cell Cardiol*, 2019. **134**: p. 13-28.
88. Sisson, T.H., et al., *Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis*. *Am J Pathol*, 2015. **185**(4): p. 969-86.
89. Ouldali, N., et al., *Association of Intravenous Immunoglobulins Plus Methylprednisolone vs Immunoglobulins Alone With Course of Fever in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*. *JAMA*, 2021.
90. Lopez, B., et al., *Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches*. *Nat Rev Cardiol*, 2021. **18**(7): p. 479-498.