

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A vázizom Ca^{2+} -homeosztázisának módosulása egyes regulatórikus fehérjék expressziójának megváltozása esetén

Bodnár Dóra

Témavezető:
Dr. Szentesi Péter



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

**DEBRECEN
2015**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke	4
Kulcsszavak:	6
Keywords:	6
Bevezetés	7
I. Irodalmi háttér	7
I.1. A mozgás evolúciója	7
I.2. Az izomsejtek általános tulajdonságai	7
I.3. A vázizom	9
I.4. A Ca^{2+} jelentősége és felszabadulása a vázizomban	12
I.5. A myostatin.....	17
I.6. Az MTM1 és különböző PtdInsP csoportok kapcsolata	24
I.7. Célkitűzések.....	27
II. Anyagok és módszerek.....	29
II.1. Állatok	29
II.2. Pároztatás és genotipizálás a <i>Cmpt</i> állatoknál	29
II.3. <i>In vivo</i> kísérletek.....	30
II.3.1. Futómalom	30
II.3.2. Grip-teszt	30
II.4. <i>In vitro</i> vizsgálatok	30
II.4.1. Az egyedi vázizomrostok előkészítése.....	30
II.4.2. Nyugalmi membránpotenciál mérés.....	31
II.4.3. Kontraktilis fehérjék Ca^{2+} érzékenységeinek vizsgálata	31
II.4.4. Teljes-sejtes Ca^{2+} koncentráció mérés.....	35
II.4.5. A depolarizációval kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változások mérése konfokális mikroszkóppal	37
II.4.6. Elemi kalcium-felszabadulási események detektálása	39
II.4.7. Az SR-ből történő kalciumfelszabadulás számítása.....	40
II.4.8. <i>In vivo</i> elektroporáció	41
II.4.9. Elektrofiziológia és membrán áram analízis	42
II.4.10. Adatelemzés és statisztika.....	42
III. Eredmények	43
III.1. A myostatin hiány funkcionális vizsgálata	43
III.1.1 <i>In vivo</i> kísérletek	43
III.1.2. <i>In vitro</i> kísérletek	44
III.2. A myotubularin PtdIns szubsztrátjainak hatása a feszültség-aktivált Ca^{2+} felszabadulásra vázizomban	55
III.2.1. PtdIns(3,5)P ₂ és PtdIns(3)P csökkenti a feszültség-aktivált Ca^{2+} felszabadulást.....	55
III.2.2. A PtdIns(3,5)P ₂ , PtdIns(3)P és PtdIns(5)P csökkentette az elemi kalciumfelszabadulási események számát permeabilizált izomrostokban	61
III.2.3. Az MTM1 overexpressziója nem befolyásolja a feszültség-aktivált kalciumfelszabadulást.....	64
IV. Megbeszélés	69
IV.1. A myostatin deficiencia hatása az EC-kapcsolatra.....	69
IV.2. A MTM1 módosulásának hatása az EC-kapcsolat működésére	73
V. Összefoglalás	76
VI. Summary.....	79

VII. Irodalomjegyzék.....	81
VIII. Közlemények listája.....	91
IX. Előadások, poszterek listája.....	92
IX.1. Angol nyelvű előadások	92
IX.2. Magyar nyelvű poszterek	92
IX.3. Angol nyelvű poszterek	93
X. Köszönetnyilvánítás.....	95

Rövidítések jegyzéke

[Ca²⁺]_e: extracelluláris kalcium koncentráció

[Ca²⁺]_i: intracelluláris kalcium koncentráció

Ach: acetilkolin

ActRIIB: aktivin receptor IIB típus

Akt: aktivin

ALK4: activin-like kinase-4

ALK5: activin-like kinase-5

ATP: adenosin trifoszfát

BMP-1: bone morphogenetic protein 1

BMP-2: bone morphogenetic protein 2

BMP-3: bone morphogenetic protein 3

BTS: N-benzil-p-toluenszulfonamid

C2C12: egér mioblaszt sejt vonal

CICR: kalcium indukálta kalciumfelszabadulás

CMC: 4-klóro-m-krezol

Cmpt: Mstn^{Cmpt-dl1Abc} egértörzs

CNM: centronukleáris miopátia

CSQ: calsequestrin

DHPR: dihidroporidin receptor

DNS: dezoxiribonukleinsav

EC-kapcsolat: excitációs-kontrakciós kapcsolat

EDL: extensor digitorum longus

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2

FDB: flexor digitorum brevis

FDHM: full duration at half maximum

FL: kalcium fluxus

FoxO: Forkhead boks protein

FTHM: maximális amplitúdó feléhez tartozó időtartam (full time at half maximum)

FWHM: térbeli szélesség (full width at half maximum)

GASP-1: growth and differentiation factor associated serum protein 1

GDF-1: growth differentiation factor-1

GFP: green fluorescent protein

IP₃R: inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor

KCl: kálium-klorid

K_d: disszociációs állandó

LTBP3: latent TGF-β binding protein 3

MAPK: mitogen activated protein kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAPKK: mitogen-activated protein kinase cascade

MEK: mitogen-activated protein kinase cascade

Mstn: myostatin

MSTN: myostatin

MTM1: myotubularin 1

mTOR: mammalian target of rapamycin

mtsai: munkatársai

MURF-1: muscle ring finger 1

myf5: miogén reguláló faktor

MyoD: miogén reguláló faktor

NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

nH: Hill koefficiens

NTY: normál Tyrode's oldat

p38: mitogén-aktivált-protein kinázok családja

pCa₅₀: félmaximális erőt eredményező kalcium koncentráció

PMCA: plazmamembrán Ca²⁺-ATPáz

PtdIns(3)P: foszfatidilinozitol 3-foszfát

PtdIns(3,5)P₂: foszfatidilinozitol 3,5-biszfoszfát

PtdIns(5)P: foszfatidilinozitol 5-foszfát

PtdInsP: foszfatidilinozitol foszfát

Raf: serine/threonine-specific protein kinases

Ras: protein of small GTPases

RyR: rianodin receptor

SERCA: szarko- endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz

SOL: musculus soleus

SR: szarkoplazmatikus retikulum

T_{active}: aktív izomerő

TAK-1: Transforming growth factor β activated kinase-1

TEA: tetraethylammonium

Tg: tapsigargin

TGF- β : transzformáló növekedési faktor-béta

TM: tropomiozin

TN-C: troponin-C

TN-I: troponin-I

T_{passive}: passzív izomerő

XLMTM: X-kötött miotubuláris miopátia

Kulcsszavak:

Myostatin, MTM1, spark, erő, vázizom, PtdInsP, kalcium tranziens

Keywords:

Myostatin, MTM1, spark, force, skeletal muscle, PtdInsP, calcium transient

Bevezetés

I. Irodalmi háttér

I.1. A mozgás evolúciója

A mozgás az alapvető életjelenségeink egyike, mely során a kémiai energia mechanikai energiává alakul át. Megkülönböztetünk hely- vagy helyzetváltoztató mozgást, attól függően, hogy az adott élőlény a térben elfoglalt helyét változtatja, vagy a helye nem, csupán az egyes testrészek illetve a szervezeten belüli szervek helyzete változik.

Gerincesekben az izom különböző feladatokat lát el, úgymint a test mozgásainak kivitelezése, a test helyzetének stabilizálása, testtartás biztosítása, a belső szervek térfogatának szabályozása, körkörös záróizmok felépítése, anyagok (vér, nyirok, vizelet, levegő, táplálék, folyadék, ondó) mozgatása a szervezeten belül, munkavégzés, izommunka, hőtermelés. Az állatok filogenetikai fejlődése során a külső vázat felváltotta a belső váz, mely a gravitációhoz való alkalmazkodásnak jobban megfelelt, könnyedebb volt, bár kevesebb védelmi funkciót látott el.

I.2. Az izomsejtek általános tulajdonságai

A gerincesekben található izomszövet sokrétű feladatnak tesz eleget, amit a benne található specializált, nagyfokú rendezettséget mutató, megnyúlt sejtek tesznek lehetővé. Az izomsejtek elsődleges funkciója az összehúzódás.

Az izomszöveteket az őket felépítő kontraktilis sejtek morfológiája alapján két fő csoportra oszthatjuk. Az első típus a harántcsíkolt izomszövet, melyben a sejtek harántcsíkoltat mutatnak a fénymikroszkópos vizsgálat során. A második típus a simaizomszövet, amelyben nem fedezhető fel harántcsíkolt struktúra (ld. lentebb).

A sejteket kívülről sejtmembrán, szarkolemma vesz körül. A szarkolemma integráns membránfehérjéket, ioncsatornákat és különböző receptorokat tartalmaz. Az izomsejtekben specializált endoplazmatikus retikulum van jelen, melyet szarkoplazmatikus retikulumnak (SR) nevezünk. Fő feladata a nagy mennyiségű Ca^{2+} raktározása.

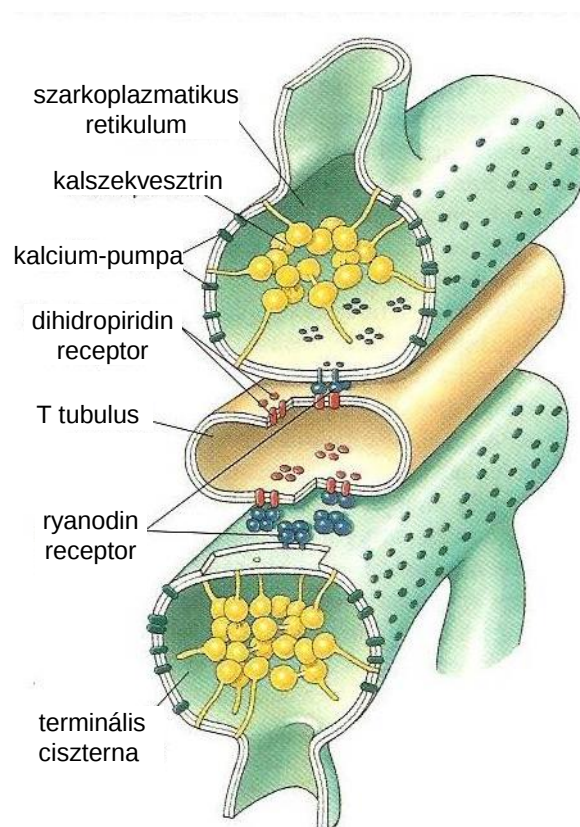
Az izomsejteket kontraktilis fehérjék, miofilamentumok építik fel, ezek biztosítják az összehúzódást. Megkülönböztetünk főleg aktin molekulákat tartalmazó vékony filamentumot, valamint miozintartalmú vastag filamentumot. E két filamentum típus hozza létre az ún. miofibrillumokat.

A kontrakció során a miofilamentumok elmozdulása nagy mennyiségű Ca^{2+} ion jelenlétét igényli, amelyet az SR fedez.

Mivel a kontrakció mechanizmusa igen energiaigényes folyamat, az izomsejtben nagy mennyiségű mitokondrium is található.

Az izomban egy egyedülálló struktúra, a transzverzális, azaz a T-tubulus rendszer található. A T-tubulus a sejtmembrán invaginációja, amely gyűrűszerűen körbeveszi az egyes miofibrillumokat a Z lemez mentén (szarkomerenként egy T-tubulus) vagy az A és az I csík határán (szarkomerenként két T-tubulus). A T-tubulus rendszer előbbiekben leírt speciális morfológiája faj specifikus, kételtűek (pl. béka vázizom) esetében szarkomerenként egy T-tubulus található, míg az emlős vázizomban kettő.

A T-tubulusok közvetlen közelében találhatók az izomrost tengelyével párhuzamosan futó longitudinális tubulusok kiszélesedett végei, a terminális ciszternák. A T-tubulus és két oldalról őt közreévő terminális ciszterna együtt triádot alkotnak (1.ábra). A T-tubulus és a terminális ciszterna membránja között egy alig 10-15 nm széles rés (junktó) található.



1. ábra. A triád struktúra felnőtt emlős harántcsíkolt izomban. A triád szerkezet háromdimenziós rekonstrukciója, a rianodinreceptorok, dihidropiridinreceptorok, kalszekvesztrin, triadin, junktin, és a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATP-ázok elhelyezkedésével. (Block és mtsai. 1988 alapján)

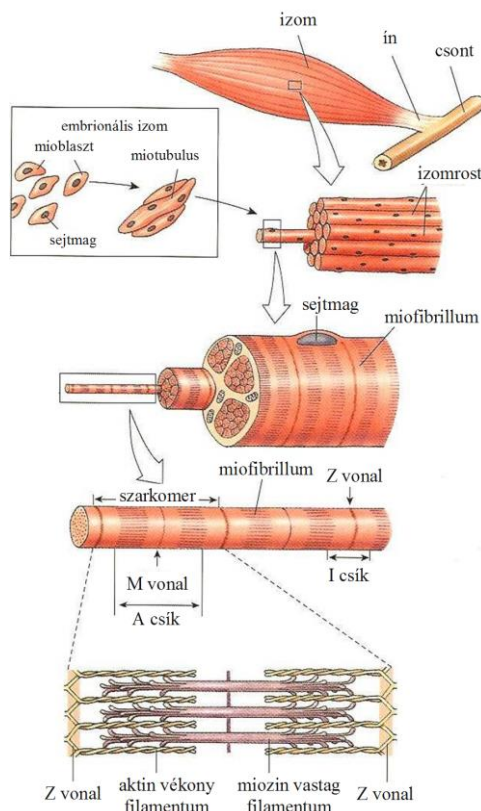
I.3. A vázizom

Az egyes izomtípusok az alapvető hasonlóságok ellenére különbségeket mutatnak mind morfológiailag (például a szarkoplazmatikus retikulumuk fejlettsége), mind az összehúzódás mechanizmusának lezajlása tekintetében. Az izom összehúzódása az izmot beidegző szomatikus ideg által az izomrosthoz szállított elektromos ingerre adott válaszreakciónak tekinthető. A sima-, szív- és vázizmok esetében a kontrakció mechanizmusa eltérő, bár egyes lépések alapvetően megegyeznek. A továbbiakban a főbb izomtípusok jellemzői kerülnek tárgyalásra, külön hangsúlyt fektetve a vázizom tulajdonságaira.

I.3.1. A vázizom jellemzői

Gerincesekben az izmok a belső vázrendszerhez inakkal kapcsolódnak. Az egyes izomkötegeket kötőszövetes burok veszi körül. A rostokat körülvevő kötőszövetnek fontos szerepe van az erőátvitelben, elhelyezkedésétől függően beszélünk endo-, peri- és epimíziumról. A vázizomra jellemző képlet az izomrost ami mioblasztok összeolvadásával kialakult többmagvú óriás sejt. Kifejlett állapotban sokszögletű képet mutat, átmérője körülbelül 10-100 μm , hossza néhány mm-től akár egy méterig is terjedhet. A vázizomrost magjai a szarkolemma alatt helyezkednek el.

A vázizomrost a benne található mioglobin és mitokondrium tartalom alapján három



2. ábra A harántcsíkolt izom felépítése gerincesekben. Az izomrost nagy részét az összhúzóköny elemekből felépülő miofibrillumok teszik ki. A miofibrillumok strukturális építőelemei a szarkomerek, melyek jellegzetes megjelenését, a harántcsíkolatért felelős struktúra felépítését mutatja be az ábra

csoportra osztható. A vörös rostok nagy mennyiségben tartalmaznak mioglobint, mitokondriumot, magas az oxidatív enzimek szintje. „Slow-twitch” izomnak is nevezik, mert lassabban fárad ki, azonban kisebb izomhúzóerőt képes kifejteni. A fehér vagy „fast-twitch” rostok ezzel ellentétben kevés mioglobint és mitokondriumot tartalmaznak, amelyek a gyors kifáradás ellenére nagy húzóerőt képesek kifejteni. Az intermedier rostokban található mioglobin, citokróm és mitokondrium mennyisége a fehér- és vörös rost közötti átmenetet képezi. Általában mindhárom izomtípus jelen van egy adott izomban, az egyes típusok aránya azonban változó az izom által betöltött funkció függvényében. A harántcsíkolt izom fő morfológiai jellemzője a polarizációs mikroszkóppal is megfigyelhető harántcsíkoltat, melyről a nevét is kapta. A harántcsíkoltat egyszerűen fénytörő világos, vagy izotróp (I) és kettős törést mutató sötét anizotróp (A) sávok váltakozása okozza. Az I-csíkban főleg vékony filamentumok, az A-csíkban vastag-, vékony filamentumok egymással átfedve találhatók. Az I-csíkot a Z-lemez választja két részre, míg az A-sávot a világosabb H-sáv keresztezi, melyben csak vastag filamentumok találhatók. A-H sávot az M-vonal vágja ketté. Az M-vonal területén az energia metabolismus szempontjából fontos enzimek találhatók. Kontrakció során az A-csík változatlan marad, miközben az I-csík rövidül. Ez az ún. csúszó filamentum modell.

Az izom összehúzódásnak legfontosabb jellemzője az aktin, miozin és az ATP kölcsönhatása. A kontrakció alapvető folyamatát a tropomiozin-troponin-C rendszer szabályozza.

Az összehúzódás során az izmot beidegző motoneuronon akciós potenciál terjed végig, amely a végbunkóhoz érve aktiválja az axon membránjában található feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákat, melyek megnyílása révén a végbunkóban megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció. Ennek hatására a végbunkó vezikuláiból acetilkolin (Ach) szabadul fel. A felszabadult Ach az izomrost membránjában elhelyezkedő nikotin típusú Ach-receptorhoz kapcsolódik, amely jellegét tekintve ionotróp, rajta keresztül lokális Na^+ beáramlás következik be, ami lokális depolarizáció kialakulásához vezet. Ha az depolarizáció eléri a küszöbértéket, akkor kialakul az akciós potenciál, mely végigterjedve a szarkolemmán és betérjedve a T-tubulusok területére végeredményben az izom összehúzódását eredményezi.

A T-tubulusokon feszültség érzékeny L-típusú Ca^{2+} csatornák találhatók, melyek a dihidropiridinre mutatott nagyfokú érzékenyséjük miatt a dihidropiridin receptor (DHPR) elnevezést kapták. Depolarizáció hatására megnyílnak, de ez a folyamat harántcsíkolt izomban annyira lassú, hogy az akciós potenciál lezajlása alatt nem jut be rajtuk Ca^{2+} (Brown és mtsai., 2007, Pouvreau és mtsai., 2007, Zhou és mtsai., 2006).

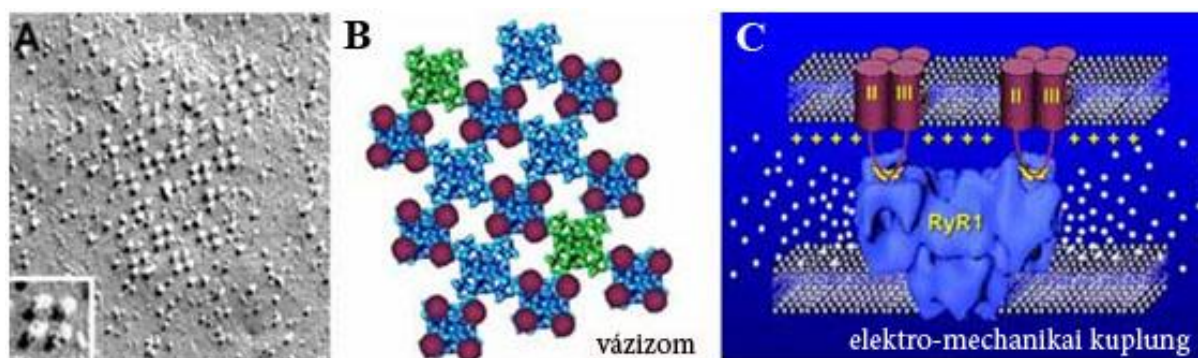
A tropomiozin-troponin-C rendszer igen fontos szerepet játszik a kontrakció szabályozásában. A nyugalomban lévő izomban a tropomiozin (TM) az aktin kettős hélixének azon részében helyezkedik el, ahol a miozinkötőhelyek találhatók, ezáltal nem engedi a miozin aktinhoz való kötődését. A tropomiozinhoz a troponin komplex troponin-T része kötődik. A troponin komplex másik két része, a troponin-C (TN-C) és troponin-I (TN-I). A Ca^{2+} felszabadulás után a vékony aktin filamentumhoz kapcsolódó tropomiozin-troponin komplex troponin-C komponenséhez kötődve létrejön a TN-C- Ca^{2+} komplex, amely megszünteti a troponin-T tropomiozin elmozdulását gátló hatását, valamint elmozdítja a TN-I-t az aktinon lévő inhibitorikus helyéről, ezáltal a miozin feji része az aktinhoz kötődhet.

A SR terminális ciszternáin is találhatóak receptorok, melyek nem szelektív Ca^{2+} csatornák. Ezeket rianodin receptoroknak (RyR) nevezik. Három egymástól különböző rianodin receptor izoformát különböztettek meg aminosav sorrendjük és tulajdonságaik alapján. A RyR1 harántcsíkolt izomban, simaizomban és neuronokban fordul elő, a RyR2 szívizom specifikus, ugyanakkor igen kis számban megtalálható simaizomban és idegsejtekben is, míg a RyR3 főleg idegsejtek membránjában, epitel sejtekben, simaizom sejteken, valamint emlős harántcsíkolt izomban fordul elő, a méhen belüli fejlődés alatt. Arra is fény derült, hogy a RyR-ok megjelenése nemcsak szövet, hanem faj specifikus is, illetve az egyes izoformák különböző eloszlásban együtt is előfordulhatnak. Például több nem-emlős csoportban, így kétélűek harántcsíkolt izmaiban kétféle rianodin receptor izoforma egyszerre fordul elő. Az egyik közvetlen kapcsolatban áll, a felszíni membránban elhelyezkedő feszültség érzékeny dihidropiridin receptorral, míg a receptor másik izoformája attól távolabb helyezkedik el, és az intracelluláris tér kalciumkoncentrációjának kismértékű megváltozására nyílik meg. Kifejlett emlős vázizomban ez utóbbi izoforma nem fordul elő (*Flucher és mtsai., 1999*), de az embrionális fejlődés során jelen van és csak a születés utáni időkben tűnik el. A DHPR-ok aktiválódása a velük szoros kapcsolatban álló RyR-okon keresztül kalciumkiáramlást okoz, a megnövekedett intracelluláris kalciumkoncentráció pedig aktiválja a távolabb elhelyezkedő, DHPR-okkal közvetlen kapcsolatban nem álló RyR-okat (kalcium indukált kalciumfelszabadulás), ami további kalciumfelszabadulást hoz létre. A nem-emlős harántcsíkolt izomban előforduló RyR izoformák aminosav szekvenciája és működése nagy hasonlóságot mutat az emlős sejteken tapasztaltakkal, a RyR α típus a RyR1-ral, míg a RyR β a RyR3-ral. Az α izoforma a RyR1-hoz hasonlóan szoros kapcsolatot mutat a membrán depolarizációt érzékelő DHPR-okkal, míg a β izoforma nem kapcsolt a DHPR-hoz, megnyílása nem depolarizáció-függő folyamat, viszont nagyon érzékeny az intracelluláris kalciumkoncentráció kismértékű változásaira is, így a szívizom RyR2-hoz hasonlóan felelős a

kalciumindukálta kalciumfelszabadulás folyamatáért (*Csernoch és mtsai., 2004, Lacampange és mtsai., 1998*).

A RyR-ok kettős sorokban helyezkednek el az SR terminális ciszternáin, míg a DHPR-ok a T-tubuluson ún. tetrádokba rendeződnek. Érdekesség, hogy a RyR mind a négy alegységéhez kötődik egy DHPR, de a kettős sorokba rendeződött RyR-ok közül csak minden második kapcsolódik DHPR-hoz.

A két receptor fehérje között mechanikai kapcsolat van. A DHPR térbeli szerkezete feszültség hatására konformáció változáson megy keresztül. Ez a változás az adott DHPR-hoz közel álló RyR konformáció változását okozza. A változás hatására a RyR megnyílik, rajta keresztül Ca^{2+} lép ki a szarkoplazmatikus térbe. Ez azonban csak az egyik módja a RyR megnyílásának. Egy másik lehetőség az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedésére bekövetkező aktiválódás. Ennek hátterében az áll, hogy a RyR érzékeny az intracelluláris ionok koncentrációjára, legfőképp a Ca^{2+} koncentrációra. A depolarizáció hatására megnyíló DHPR-on keresztül beáramló igen csekély mennyiségű Ca^{2+} aktiválhatja azon RyR-kat, amelyek nincsenek közvetlen kapcsolatban a DHPR-al.



3. ábra. A harántcsíkolt izomban megfigyelhető DHPR-RyR struktúra. Az A ábra részen tetrádokat formáló DHP receptorok láthatók harántcsíkolt izom eredetű BC3H1 sejtvonalon. B és C) mind a RyR1-k (kék színnel jelölve) mind a RyR2-k (világoszöld színnel jelölve) sorokba rendeződött, szabályos elrendeződést mutatnak. (*Protasi, 2002*).

I.4. A Ca^{2+} jelentősége és felszabadulása a vázizomban

A Ca^{2+} a vázizomban nagyrészt fehérjékhez vagy membránhoz kötött formában található meg, csak egy kis része van szabad ionos formában (*Pozzan és mtsai., 1994, Szabó 2004*). Az extracelluláris tér szabad Ca^{2+} -koncentrációja ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) kb. 1,2 mM, míg a citoszolé a legtöbb sejtben 100-200 nM között van. Ez a koncentráció több nagyságrenddel kisebb, mind az extracelluláris, mind a sejtorganellumokban található Ca^{2+} -koncentrációnál. Az alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ energetikailag kedvezővé teszi az ion másodlagos hírvivőként való

felhasználását, mivel viszonylag kis mennyiségű ion energiaigényes mozgatása nagy $[Ca^{2+}]$ változásokat eredményez. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) megváltozása kiemelkedően nagy fontossággal bír igen sok sejt folyamat irányításában, mint például a mozgás, az osztódás, a differenciálódás, a szekréció, a kontrakció, az apoptózis, szenzoros érzékelés és a neuronális jelátvitel (Berridge 1993, Yoshida & Imai 1997, Vermassen és mtsai., 2004). Az extracelluláris Ca^{2+} belépése és az SR-ben tárolt Ca^{2+} felszabadulása változatos és komplex Ca^{2+} -jelek kialakulását teszik lehetővé, amelyek nélkülözhetetlenek az előbb felsorolt folyamatok specifikus szabályozásához.

Az $[Ca^{2+}]_i$ szabályozásához és alacsonyan tartásához ezért elengedhetetlen a precízen hangolt rendszerek megléte. A plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz (PMCA) szinte minden szövettípusban megtalálható, nagy affinitású és kis kapacitású ionpumpa, ami az $[Ca^{2+}]_i$ csökkenését okozza. A Na^+/Ca^{2+} -antiport ideg- és szívizomsejtekben található, kis affinitású és nagy kapacitású transzporter. A Ca^{2+} az extracelluláris térből, különböző ioncsatornákon keresztül, a koncentráció gradienst kihasználva, szabályozottan juthat be a sejtbe. Ezek a csatornák lehetnek feszültség-vezéreltek, vagy ligandok és másodlagos hírvivők által vezéreltek. Az izomroston belül a Ca^{2+} az SR Ca^{2+} -raktáraiban található meg a legnagyobb koncentrációban. E raktárak Ca^{2+} -felvételét a szarko- endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz (SERCA) biztosítja, amely a nagy affinitású, nagy kapacitású transzporterekhez tartozik. A SERCA pumpák jelentősége olyan nagy, hogy vázizomban az SR membránfehérjéinek több mint 90%-át ők alkotják. Az SR-ből a Ca^{2+} -felszabadulás az inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptoron (IP_3R) és a RyR csatornákon keresztül történhet. Az SR-en kívül a mitokondriumok is jelentős, nagy kapacitású, de csekély affinitású Ca^{2+} -raktárak (Szabó 2004).

Az SR lumenében található Ca^{2+} egy része szabad marad, többsége azonban Ca^{2+} -ot raktározó fehérjékhez kötődik. Ezek közül a legfontosabbak a calsequestrin (CSQ) és a kalretikulin, melyek nagyszámú, csekély affinitású, nem specifikus Ca^{2+} -kötő hellyel rendelkeznek (20-50 Ca^{2+} /molekula, $K_d=1-4$ mM). A CSQ szinte kizárólag izomsejtekben található meg, míg a kalretikulin minden sejt típusban előfordul. A fő feladatuk a Ca^{2+} -raktárakban a Ca^{2+} -tárolás biztosítása, és az SR lumenében a $[Ca^{2+}]$ változások puffertolása. Az SR-ben a teljes $[Ca^{2+}]$ kb. 10 mM, amiből a szabad $[Ca^{2+}]$ néhány mM-t tesz ki. Ezt a szintet tartják állandó értéken a Ca^{2+} -kötő fehérjék. Az SR felszínén nem csak Ca^{2+} -csatornák, hanem nagy permeabilitású K^+ és Cl^- csatornák is találhatóak, amelyek a Ca^{2+} -felszabadulás és -visszavétel során létrejövő feszültség változásokat ki tudják egyenlíteni. Így az SR

membránon keresztüli Ca^{2+} -mozgás nem generál membránpotenciál-változásokat (Fonyó 1999).

Az intracelluláris raktárakból felszabadult Ca^{2+} nem marad a mioplazmában, a SR-ba való aktív visszavétele már a felszabadulás pillanatában megkezdődik Ca^{2+} pumpák segítségével. A csökkenő kalciumszint lesz az oka a kontrakció befejeződésének.

Ca^{2+} felszabadulás detektálása, vizsgálati módszerek

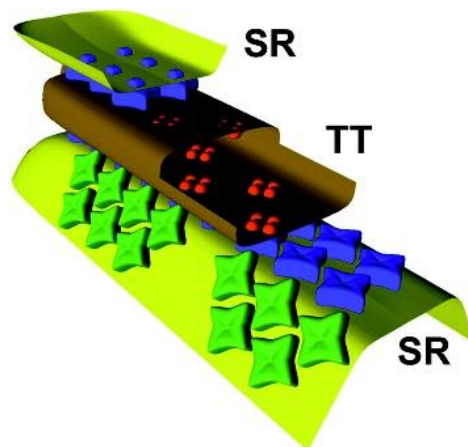
Harántcsíkolt izomban a Ca^{2+} felszabadulásnak két formáját különböztethetjük meg. Az izom összehúzódás hátterében egész sejtre kiterjedő, tranziens intracelluláris Ca^{2+} koncentráció-emelkedés áll, mely elemi eseményekből (*spark*) épül fel. Az elemi események megjelenését egy vagy néhány RyR megnyílása miatt a raktárakból felszabaduló Ca^{2+} hozza létre (Shirokova és mtsai., 1996, Shirokova & Ríos 1997, Ríos 1999, Zhou és mtsai., 2003).

A Ca^{2+} *spark*-okat először szívizomsejtekben írták le (Cheng és mtsai., 1996, Cannell és mtsai., 1997). Mind nyugalmi állapotban lévő, mind depolarizált sejteken detektálhatóak voltak. Ezek a megfigyelések vezettek ahhoz az elképzeléshez, miszerint a Ca^{2+} *spark*-okat az egyes RyR-okon keresztül az SR-ból felszabaduló Ca^{2+} hozza létre, míg az akciós potenciál hatására kialakuló tranziens az időben és térben egymáshoz közel keletkező *spark*-ok összeadódása hozza létre. Később simaizomban (Nelson 1995) illetve vázizomban is megfigyelték az elemi eseményeket (Tsugorka 1995, Baylor 2005).

A Ca^{2+} *spark* rövid ideig tartó, lokális $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ megemelkedés, amit kalcium-érzékeny fluoreszcens festékek segítségével konfokális lézer pásztázó mikroszkópon mérhetünk meg. A Ca^{2+} *spark*-ok kialakulását okozhatja egy RyR megnyílása, valamint az intracelluláris Ca^{2+} szint kismértékű, lokális emelkedése. A kalciumfelszabadulás során megjelenő események morfológiája és gyakorisága az eltérő sejt típusokban különbözik, illetve attól függően változik, hogy az izomrostok milyen állatból származnak. Az eltérés az SR kalcium csatornáinak különbségéből ered (Niggli és mtsai., 2007).

Ezek a megfigyelések ahhoz a hipotézishez vezettek, miszerint két különböző aktiváló mechanizmus léphet működésbe: az egyik feszültség vezérelt intracelluláris kalciumfelszabadulást eredményez a $\text{RyR}\alpha/1$ -n keresztül, attól függően, hogy kételtű vagy emlős vázizomról beszélünk, a másik a membránpotenciáltól független mechanizmus, kalcium indukálta kalcium útvonal, ami a $\text{RyR}\beta/3$ -n keresztül valósul meg. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal azt is sikerült kimutatni, hogy a $\text{RyR}\beta$ -k, illetve a $\text{RyR}\beta$ -k leggyakrabban nem a junkcionális részben, hanem attól elkülönülten, oldalirányban,

parajunkcionálisan helyezkednek el az SR membránban. Mint az elektronmikroszkópos eredmények alapján elkészített modellen is jól látható (4. ábra), a parajunkcionálisan elhelyezkedő receptorok nem kapcsolódnak DHP receptorokhoz és különbség van a receptorok elrendezésében is.



4. ábra Triád modell. A junctionális RyR-ok kék színnel vannak jelölve, a zöld színnel jelölt parajunkcionális RyR-ok a junkcióhoz közel eső SR membránszakaszon helyezkednek el (*Felder & Franzini-Armstrong 2002*)

(A)



(B)



5. ábra Mikroszkópok. (A) Konfokális lézer szkennning mikroszkóp (Zeiss LSM 510 Meta), valamint **(B)** a nagy sebességű konfokális lézer szkennning mikroszkóp (LSM 5 LIVE)

Az LSM 510 META egy pont-szkennner konfokális mikroszkóp, amely alapját egy Axiovert invertált mikroszkóp adja. Hozzá tartozik két fotoelektron sokszorozó cső és egy META detektor, amely összegyűjti az emittált fluoreszcens fényt.

Az LSM 5 LIVE egy nagy sebességű konfokális lézer mikroszkóp, mely nagyban hasonlít a META felépítéséhez. A fő különbség abból adódik, hogy míg a META esetében pont-szkennerről beszélünk, a LIVE vonal-szkennner fejjel van ellátva. Ez a vonal-szkennner teszi lehetővé a nagy sebességű és jó minőségű képfelvételt. A nagy sebességből adódik, hogy akár 120 konfokális kép (512x512) is készíthető vele egy másodperc alatt. A vonal szkennelő sebesség akár a 60000 vonal/másodpercet is elérheti és az általunk mért élő sejt adta válaszok érzékelését egy ultra gyors vonal CCD-detektor teszi lehetővé

I.5. A myostatin

A myostatin (Mstn) egy extracelluláris citokin, amely a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β) szupercsalád egyik tagja, amely jelenlegi ismereteink szerint fontos szerepet játszik a vázizom növekedés negatív szabályozásában (*McPherron és mtsai., 1997*). Ez a fehérje egy 25kD molekulatömegű homodimer, melyben diszulfid kötések vannak a C-terminális régióban található monomerek között. A myostatin látens formában kering a vérben, amelyre az jellemző, hogy a fehérje N-terminális részéhez nem kovalensen egy propeptid kötődik. Ezen propeptid hasításában a metalloproteinázok közé tartozó bone morphogenetic protein (BMP)-1/tolloid család tagjai elengedhetetlenek, így biztosítva a myostatin funkciójának aktiválását (*Wolfman és mtsai., 2003*).

A myostatin vázizomban játszott szerepének tisztázásában a genetikailag módosított egerek vizsgálata hozott előrelépést. $Mstn^{-/-}$ állatok esetében szignifikáns izomtömeg növekedést valamint zsírszövet csökkenést figyeltek meg a kontroll állatokhoz képest (*McPherron és mtsai., 2002, Hamrick és mtsai., 2006*). Hasonló hatásokat tapasztaltak a Mstn természetes mutációjának jelenlétében is kutyák és szarvasmarhák valamint emberek esetében (*Mosher és mtsai., 2007, Grobet és mtsai., 1997, McPherron és mtsai., 1997, Clop és mtsai., 2006*), illetve a fehérje funkciójának gátlása esetén felnőtt egerekben (*Lee és mtsai., 2004*). Ezzel párhuzamosan, a túlzott Mstn termelés csökkent izomtömeget eredményez, ezzel sugallva, hogy a Mstn elengedhetetlen szerepet játszik az izomnövekedés negatív szabályozásában. Az embriogenezis során a Mstn fokozottan expresszálódik a vázizomban (*McPherron és mtsai., 1997*) annak érdekében, hogy megfelelően szabályozza a myoblastok differenciációját és proliferációját, azonban felnőtt korban a jelenléte nem csupán a vázizomra korlátozódik, hanem más szövetekben is kimutatható (például szív, zsírszövet, emlőmirigyek) (*McPherron és mtsai., 1997, Morissette és mtsai., 2006, Sharma és mtsai., 1999, Shyu és mtsai., 2006, Allen és mtsai., 2008*).

Mivel a Mstn egy extracelluláris citokin, a TGF- β család többi tagjához hasonlóan az aktivin receptorokhoz kapcsolódva mediálja a szignalizációs útvonalait (*Lee és mtsai., 2001*). A Mstn aktív formája főleg az aktivin receptorcsalád IIB (ActRIIB) típusához kötődik, ezzel beindítva a myoblastok differenciációjának és proliferációjának gátlását.

Az aktivin receptorcsalád tagjai alapvetően transzmembrán treonin/szerin kinázok, melyeknek két típusa ismert. Az egyes típusú receptorra (a Mstn esetében az ALK 4 és ALK 5) (*Rebbapragada és mtsai., 2003*) jellemző egy egyedülálló GS domén, mely az intracelluláris térhez közel helyezkedik el és szomszédos a kináz doménnel, mely hiányzik a

kettes típusú receptorból. A Mstn kapcsolódása az ActRIIB receptorhoz annak az egyes típusú receptorhoz való kapcsolódását, valamint a GS domén foszforilációját eredményezi. Ezáltal a Mstn útvonalát két receptor komplexén keresztül szabályozza (*Wrana és mtsai., 1994*).

A myostatin ActRIIB-n keresztüli szignalizációja elengedhetetlen az izom növekedésének szabályozásához. A természetes úton bekövetkező defektus az ActRIIB iránti érzékenységben szignifikáns izomtömeg növekedést eredményez emberek esetében (*Lee és mtsai., 2005*). Hasonló megfigyeléseket tettek azokban a kísérletekben, ahol a rágcsálókban található receptorokat blokkolták (*Lee és mtsai., 2005*).

A myostatin extracelluláris szabályozása

A myostatin, mint fentebb említésre került, látens formában kering a vérben egy komplex formájában, ahol az N-terminális régióhoz egy propeptid kötődik. Kísérletek során kimutatták, hogy ez a propeptid *in vivo* és *in vitro* körülmények között is kötődik az aktív myostatinhoz, valamint a propeptid overexpressziója egerekben megnövekedett izomtömeghez vezet (*Wolfman és mtsai., 2003, Lee és mtsai., 2001, Thies és mtsai., 2001*).

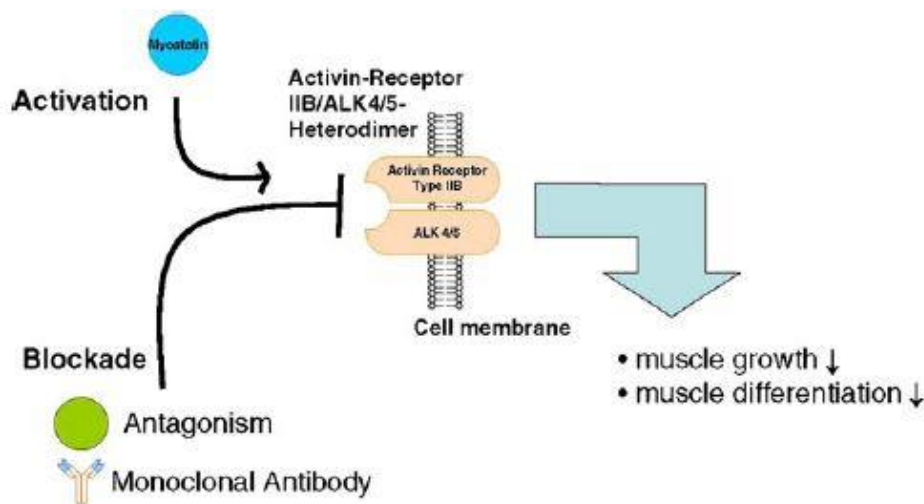
Specifikus inhibitorokkal meggátolható a myostatin ActRIIB receptorhoz való kötődése a szérumban. Az egyik ilyen inhibitor a follistatin, amely egy extracelluláris, ciszteinben gazdag glikoprotein, melynek struktúrája nem hasonlít a TGF-család tagjaiéhoz. A follistatin a myostatinhoz kötődve a myostatin receptorhoz való kötődését gátolja meg (*Zimmers és mtsai., 2002, Lee és mtsai., 2001*). A follistatin *in vivo* történő overexpressziója, hasonlóan a Mstn^{-/-} egereknél tapasztaltakhoz, a vázizom hipertrófiájához vezet (*Lee és mtsai., 2001*).

Egy másik inhibitor a follistatin-like 3 protein, amely 30% homológiát mutat a follistatinnal, és ahhoz hasonlóan a vérben cirkuláló myostatinhoz kötődik (*Hill és mtsai., 2002*).

A GASP-1 (growth and differentiation factor-associated serum protein 1) szintén a myostatint gátló fehérjék közé tartozik. A follistatin család tagjaival ellentétben nem mutat affinitást az aktív myostatinhoz (*Hill és mtsai., 2003*). A fentebb leírt inhibitorokkal összehasonlítva a struktúrája is eltérő, inkább egyes proteáz inhibitorokkal mutat hasonlóságot a szerkezetében. Érdekes módon a GASP-1 nem csupán az aktív myostatinhoz, hanem annak propeptidéhez is képes kötődni és valószínűleg a myostatin aktiválódását a proteolitikus hasításon keresztül szabályozza (*Hill és mtsai., 2003*).

Egy negyedik szabályozási lehetőség az LTBP3 (latent TGF- β binding protein 3) kovalens kötődése általi inaktiváció. Ez az inaktív myostatin/LTBP3 komplex a myostatin extracelluláris raktározásában játszik fontos szerepet (*Anderson és mtsai., 2008*).

Összefoglalva tehát, a myostatin működését legalább négy különböző inhibitor szabályozza az aktív vagy látens formához való kötődés által. Azonban a myostatin gátlásának pontos mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, ahogy az sem, hogy a különböző inhibitorok hogyan kommunikálnak egymással. A gátló intrinzik faktorok száma rámutat arra, hogy mennyire nagy jelentősége van a myostatin működésének szigorú szabályozásának.



6. ábra Myostatin útvonala. A myostatint az izomsejtek szintetizálják és szekretálják. Az aktív IIB/ALK 4/5 heterodimeren keresztül különböző útvonalatokat aktiválva csökkentik az izom növekedését és differenciálódását (Kung és mtsai., 2010).

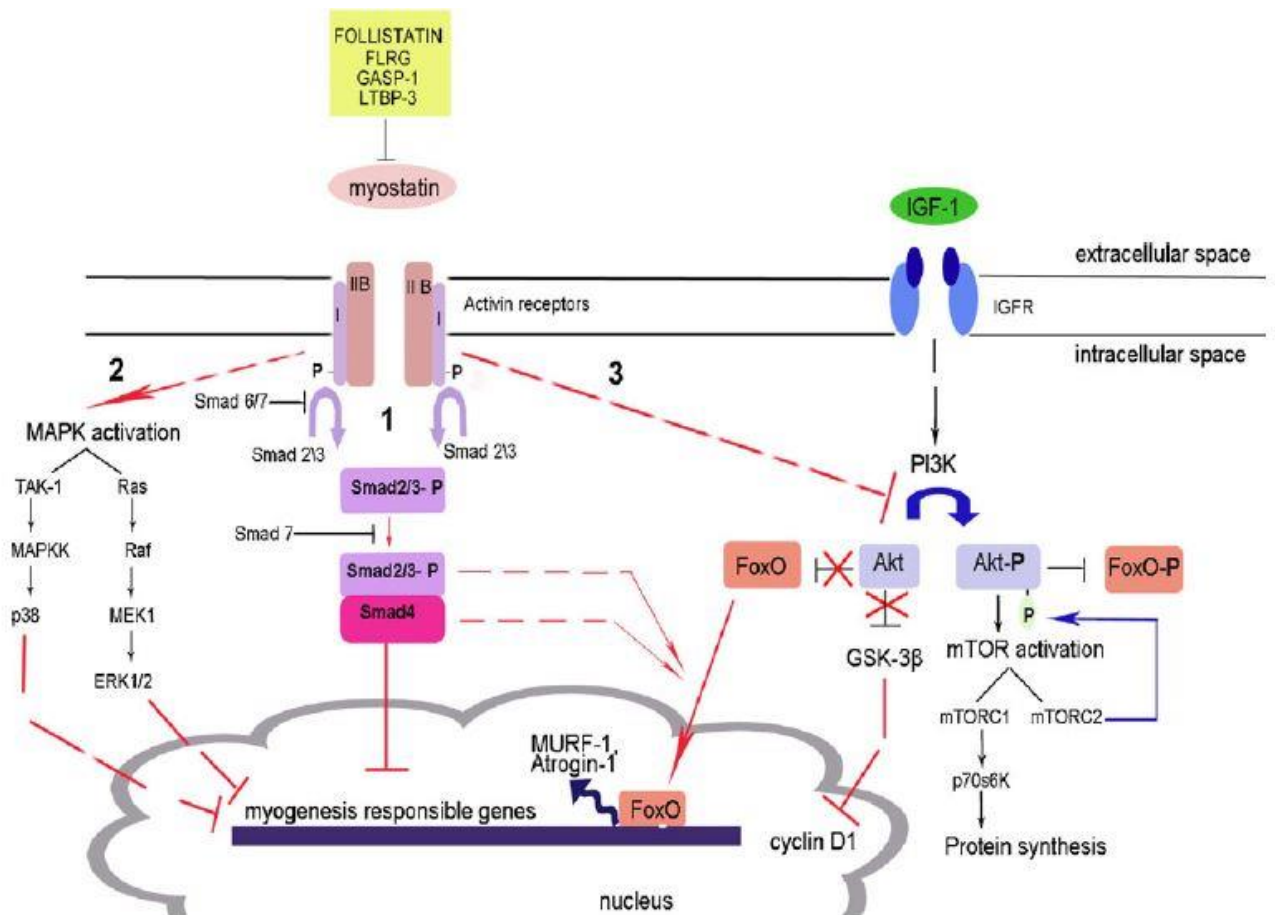
Intracelluláris válasz

A vázizom tömegének kialakulásában alapvetően két folyamat játszik döntő szerepet: a fehérje szintézis és a fehérje degradáció. A myostatin izomnövekedés szabályozásában betöltött szerepével kapcsolatos egyre bővülő ismereteink ellenére számos részlet az aktiválódását követő molekuláris mechanizmusokról még ismeretlen. Valószínűleg a myostatin ActRIIB receptorhoz való kötődése révén foszforilálja a Smad2 valamint a Smad3 COOH domént. Az így létrejött Smad2/3 kötődni tud a Smad4-hez, így létrehozva egy heterodimert, amely képes a target gének transzkripciójának elindítására (Joulia-Ekaza és mtsai., 2007, Kollias és mtsai., 2008, Patel és mtsai., 2005). A Smad jelátviteli út vonal egyik ismert downstream célpontja a MyoD, egy transzkripciós faktor, amely részt vesz a vázizom fejlődésében valamint egy esetleges sérülést követő regenerációban (Megeney és mtsai., 1996, Cornelison és mtsai., 2000, Guttridge és mtsai., 2000, Montarras és mtsai., 2000). A MyoD expressziójának downregulációja chaexia esetében *in vivo* és *in vitro* is megfigyelhető, valószínűleg a TNF α által az NF- κ B út vonalat indukálva (McFarlane és mtsai., 2006, Bakkar és mtsai., 2005).

A myostatin a Pax3 expresszióját is gátolja, amely valószínűleg a MyoD egyik célpontja (McFarlane és mtsai., 2006; Tajbakhsh és mtsai., 1997; Maroto és mtsai., 1997). Mi több, a Smad jelátviteli útvonalnak más célgénjei is vannak, többek között a myf5 és a myogenin, melyek igen fontos szerepet játszanak a myogenezisben (Langley és mtsai., 2002). Érdekes módon más Smad fehérjék (Smad6 és Smad7) agonistaként működnek. Kompetitív módon kötődnek az aktív I. típusú receptorhoz, meggátolva ezzel a TGF- β család tagjainak szignalizációját (Chen és mtsai., 1996; Zhao és mtsai., 2000). A myostatinról bebizonyosodott, hogy aktiválja a Smad7 transzkripcióját. Maga a Smad7 képes gátolni a Smad2/3 kötődését a Smad4 fehérjéhez (Nakao és mtsai., 1997; Hayashi és mtsai., 1997). Ezen felfedezések tükrében világossá válik, hogy a Smad útvonalat egy visszacsatoláson alapuló mechanizmus szabályozza (Forbes és mtsai., 2006).

A myostatin Smad útvonalon történő szignalizációját igen intenzíven vizsgálták, azonban nem ez az egyetlen útvonal, ami szóba jöhet. A TGF- β család tagjairól bebizonyították, hogy képesek aktiválni a MAPK-okat (mitogen-activated protein kinase), különösképp a p38-at és az ERK1/2-t (extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Hartsough és mtsai., 1995; Mulder és mtsai., 2000; Hanafusa és mtsai., 1999; Yu és mtsai., 2002). A p38 MAPK a stresszfaktorokra adott válaszok kialakulásáért felelős, valamint kimutatták, hogy a MAPKK-n (TAK-1/MAPK kináz kaszkád) keresztül a myostatin aktiválódik. A szignalizáció eredményeként a myogenezisért felelős gének downregulálódnak, azonban a Smad család működése érintetlen marad (Philip és mtsai., 2005).

Összegezve tehát a kutatási eredmények azt mutatják, hogy a myostatin részben az ERK1/2 aktivációján keresztül fejti ki a hatását. Ennek okán az eltérő válaszokat az ERK1/2-n keresztül a myostatin eltérő szintje okozhatja attól függően, hogy normál vagy patológiás állapot áll fenn. A MAPK kaszkád alapvetően a Ras/Raf/MEK1 aktivációjában fontos. Annak megállapítása érdekében, hogy a myostatin ugyanezt az útvonalat használja, azaz aktiválja az ERK1/2-t, C2C12 sejteken különböző MEK1 inhibitorokat használtak. Yang kimutatta, hogy ez a kináz szerepet játszik az ERK1/2 myostatin általi aktivációjában (Yang és mtsai., 2006). A Ras dominánsan negatív formájának jelenléte pozitívan hatott a MEK/ERK1/2-re a Raf downstream aktivációján keresztül. Tehát a myostatin a Ras/Raf/MEK1 útvonalon keresztül aktiválja az ERK1/2-t (Yang és mtsai., 2006).



7. ábra A myostatin szignalizáció különböző útvonalai. Az 1. számmal jelzett útvonal a Smad aktiváció hagyományos útvonala. A myostatin az ActRIIB receptorhoz kapcsolódva indukálja az activin type I receptorhoz való kötődést. A Smad2/3 foszforilációja a Smad4-hez való kötődést eredményezi és a kialakult komplex a nukleuszban gátolja a myogenezisért felelős gének transzkripcióját. A Smad6 és Smad7 egymással versenyeznek az activin type I receptorhoz való kötődésért. A Smad7 a Smad2/3 és Smad4 komplex kialakulásának meggátolásában is szerepet játszik. A 2. számmal jelzett útvonal a MAPK aktivációt mutatja. A MAPK aktivációja a myostatin által mediált, különböző útvonalakon keresztül: TAK-1/MAPKK, p38-MAPK, Ras/Raf/MEK1-ERK1/2. Ezen útvonalak aktiválódása egy sor, a myogenezisért felelős gén gátlásához vezet. A 3. számmal jelölt útvonal az Akt gátlását mutatja. Az Akt foszforilációját az inzulin és az IGF-1 jelenléte okozza. Normális esetben, az aktív Akt a mTOR szignált indukálja, ami protein szintézishez vezet; ugyanabban az időben, a FoxO nukleuszban történő gátlása is megtörténik, ahol a DNS-hez kötődve az E3 ubiquitin kinázok (MURF-1, Atrogin-1) transzkripcióját indukálja. A Smad3 és Smad4 nagy valószínűséggel részt vesz a FoxO szignalizációban. (Joulia-Ekaza és mtsai., 2007; Sandri és mtsai., 2004, Zhang és mtsai., 2009, Elkina és mtsai., 2011)

Szelekciós tanulmányok során megnövekedett izomtömegű állatokat szintén találtak a protein növekedés genetikai alapját vizsgálva (Varga és mtsai., 1997; Bünger és mtsai., 2001). Ezek között az állatok között található meg az úgynevezett „Compact” egerek (Varga és mtsai., 1997) mely állatokból származó Mstn gént szekvenálva egy 12 bp delécióra

bukkantak, ezért kapták a $Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ (Szabó és mtsai., 1998) nevet. Ez a delécio lehetővé tette, hogy módosuljon a myostatin expresszió vagy a downstream szignalizáció modulálódjon, így a hipermuszkuláris fenotípus megjelenhetett (Varga és mtsai., 2003).

Amthor és kutatócsoportja (2007) kimutatta, hogy a megnövekedett izomtömeg ellenére, a kontroll csoportokhoz képest, nem volt megnövekedett izomerő az elektromos ingerrel kiváltott tetanuszos összehúzódások során, sőt a $Mstn$ knock-out ($Mstn^{-/-}$) és $Cmpt$ állatokból származó extensor digitorum longus (EDL) izmok is gyengébbek voltak a vad típusú kontroll állatokhoz képest. Továbbá, a $Mstn^{-/-}$ állatok izmaiban határozottan megnőtt a IIb típusú rostok aránya a vad típusú kontrollhoz képest.

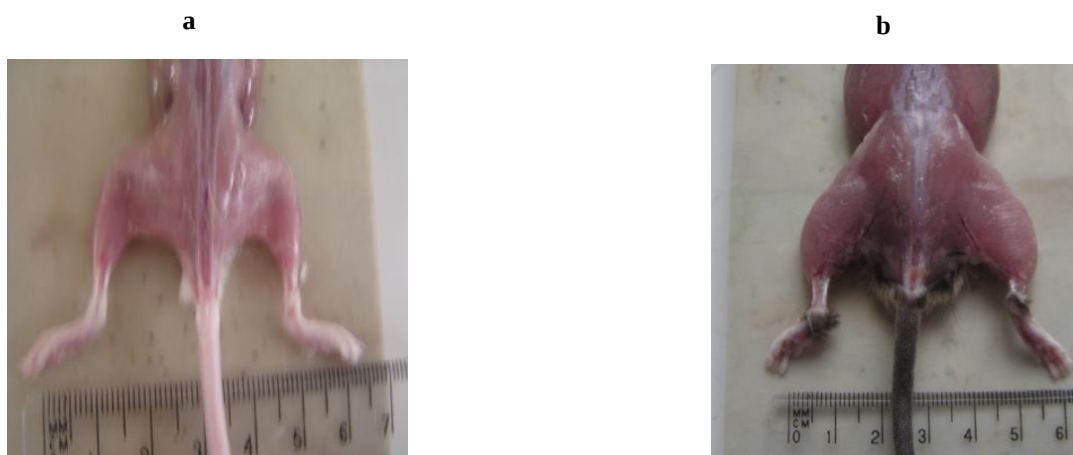
Ezek a rosttípusban és az izmokra jellemző oxidatív jellegekben bekövetkező változások megmagyarázhatják a $Cmpt$ állatokban a teljesítmény csökkenését, de nem adnak magyarázatot arra, hogy az erő miért csökken ezekben az állatokban. Ezért egy vagy több, az összehúzódásért felelős tényező módosulása (például az excitációs-kontrakciós kapcsolatkapcsolat) lehet a felelős ezekért a változásokért a $Cmpt$ állatokban. Ennek ellenére az EC-kapcsolat lépéseit eddig még nem vizsgálták részletesen ezekben az állatokban.



8. ábra $Cmpt$ és vad típusú (C57/BL6) egér. Azonos korú $Cmpt$ (fent) és a kísérleteink során kontrollként használt vad típusú C57/BL6 törzsből (lent) származó egerek láthatóak a képen. A két egér közötti méretbeli különbség a $Cmpt$ egyed izomtömegének növekedéséből származik.

A *Cmpt* állatoknak az állóképessége azonban elmarad az aktív myostatinnal rendelkező állatokétól. Ezek az állatok például könnyebben elfáradnak, nagyobb a hajlamuk a metabolikus acidózisra, illetve a respiratorikus és a cardiovascularis rendszerük sérülékenyebb. A nagyobb izomtömeggel rendelkező állatokban az izomszövet anyagcseréje a glikolízis felé tolódik el, az izomrostok nagyobb hányada pedig ún. gyors izom. Ezzel magyarázható a fáradékonyság, mivel ezen izomtípus hirtelen gyors összehúzódásokra képes, könnyebben elfárad, mint a lassú izmok. Bár az izmok anaerob körülmények között lejátszódó anyagcsere útvonalai aktívabbak, mégis fáradékonyabb, ami összefüggésbe hozható az érellátottsággal is.

A mutáns génnel rendelkező különböző genetikai egérmodellek esetében a hatalmas izomnövekedést a hyperplasia és/vagy hypertrophia idézi elő. A hyperplasia esetében az érintett szövet sejteinek a száma, jelen esetben az izomszövet rostjainak a mennyisége megnő, de az általuk képzett struktúrák a normálistól nem térnek el. Hypertrophiról akkor beszélünk, ha a szövet sejteinek a mérete nő meg. A megfigyelések szerint a myostatin gén postnatális inaktivációja egerekben főként hypertrophia-t idéz elő.



9. ábra Vad típusú és *Cmpt* egér. A képek jól reprezentálják a kontroll (a) és a *Cmpt* (b) egér közötti izomtömegbeli különbséget.

A myostatin tehát az izombetegségek, különösen az izom gyengeségével és degradációjával járó betegségek lehetséges targetje lehet. A következő fejezetben egy olyan izombetegség és az azt okozó molekuláris mechanizmusok kerülnek bemutatásra, amely több, nagy populációt érint és a következményei igen súlyosak lehetnek. A betegség kialakulásáért szintén egy fehérje, és az azt kódoló gén mutációja tehető felelőssé, de a myostatint gátló gén mutációjával ellentétben ez a mutáció az izom erő elvesztésével, nagy mértékű izomgyengeség kialakulásával jár együtt.

I.6. Az MTM1 és különböző PtdInsP csoportok kapcsolata

X-kapcsolt miotubuláris miopátia

Az X-kapcsolt miotubuláris (centronukleáris) miopátia (XLMTM) egy igen súlyos kongenitális rendellenesség, melyre jellemző az általános izomgyengeség és hipotónia. Ezen tünetek gyakran vezetnek a születést követő halálozáshoz. Az XLMTM a centronukleáris miopátiák (CNM) csoportjába tartozik, amelyek patológiai jellemzői a vázizom tekintetében megegyeznek. A CNM-k nevüket tehát az izomrostban abnormális módon centrálisan elhelyezkedő magvai miatt kapták, mivel fiziológias körülmények között a magok a rostok széleihez közel lokalizálódnak. Ráadásul a magok helyzetén kívül jellemző még a szervezetlen perinukleáris organellek jelenléte, valamint az oxidatív anyagcsere során bekövetkező abnormalitások.

Az izomrostok hipotrófok, kisméretűek, kerekded alakúak és a sejtmag pedig centrálisan helyezkedik el, előre jelezvén, hogy a rendellenesség az izom fejlődésének késői miogenezisének szakaszában okoz elváltozást.

A kísérő tünetek gyakran már közvetlenül a születés után megfigyelhetők csecsemőknél, vagy később a gyermekkorban. Ritka esetekben a tünetek nem jelentkeznek a felnőttkor eléréséig.

A rendellenesség egy X kromoszómához kötött recesszív állapotból származik, mivel a betegség dominánsan a férfi nemben jelenik meg, de a nőnemű hordozók esetében is megfigyelhetők néha az enyhébb tünetek megjelenése. Ritka esetekben azonban náluk is megjelenhetnek a férfi nemre jellemző súlyos tünetek.

Az XLMTM-ra jellemző specifikus tünetek és a súlyosság mértéke nagymértékben változhat az érintett egyének között. Az XLMTM klasszifikációjának egyik formája a súlyosság alapján történik. E szerint megkülönböztetünk súlyos (klasszikus), közepes és enyhe formát. A legtöbb érintett beteg esetében a súlyos forma jelentkezik, a közepes és enyhe formák kevésbé gyakoriak. A súlyos forma esetében az érintett csecsemőknél extrém mértékű izomgyengeség figyelhető meg már azonnal a születés után. A légzésért és nyelésért felelős izmok gyengesége légzési nehézségeket valamint evési problémákat okozhat. A csecsemők emiatt nem lesznek képesek önállóan szopni, nyelni vagy lélegezni. A csecsemőkorban megjelenő légzési problémák az esetleges fertőzések nagyobb valószínűséggel való megjelenésének kockázatát is magukban hordozzák, valamint hypoventilláció és hypoxia is kialakulhat. Néhány esetben az XLMTM az első pár hónap vagy év után akár halál bekövetkezéséhez is vezethet. Azonban vannak olyan esetek, ahol a betegeknél csak néha jelentkeznek a légzési nehézségek, vagy csupán időlegesen szorulnak lélegeztetésre (pl. alvás közben).

Az izomgyengeség és a szegényes izomfejlődés szintén okozhat problémákat a motoros működésben, hiszen a legtöbb érintett képtelen önállóan járni vagy sokkal hamarabb elfárad a feladatai elvégzése közben. Az érintett csecsemőknél megfigyelhető a magas homlok, az arc fejletlensége, az arcizmok gyengesége. Egyéb tünetek lehetnek például az abnormálisan hosszú ujjak és lábujjak, a reflexek hiánya (areflexia). A betegek koruk előrehaladtával egyre több tünet megjelenésétől szenvedhetnek. Gyakori lesz a hosszú csontok törése, a csípő eldeformálódása, a gerinc görbületének elváltozása (scoliosis). Ez utóbbi ronthat a légzési problémákon és azok, akik nem szorultak lélegeztetésre ismételten lélegeztető gépet kell igénybe venniük. Számos hosszú távú túlélő kerekesszékebe kerül, és nem tudja segítség nélkül elvégezni a mindennapi feladatait.

Az MTM1

A foszfoinozitolok funkciójának megismerése hosszú ideig a foszfoinozitol-4,5-biszfoszfát (PtdIns(4,5)P₂) szerepének megismerésére korlátozódott, mint a foszfolipáz-C szubsztrátja, ami az inozitol-triszfoszfát (Ins(1,4,5)P₃) és diacilglicerol produkciójáért felelős. Az elmúlt évtizedben hihetetlenül felerősödött az a koncepció, ami most már magában foglalja a 3-OH pozícióban foszforilált PtdInP-okat. Ezek számos celluláris funkciót kontrollálnak, többek között a citoszkeleton újraszerveződését, a fehérjék dokkolását vagy a membrántranszportot. Számos tanulmány rávilágított arra, hogy a PtdInsP-ok szerepet játszanak egyes ioncsatornák aktivitásának szabályozásában (*Logothetis és mtsai., 2010*).

Az MTM1 génben több mint 200 ún. loss-of-function, azaz funkcióvesztéssel járó mutáció következhet be, az MTM1 gén egyik termékének, a miotubularinnak minden doménjét érintve (*Laporte és mtsai., 1996*), amely igen súlyos izomgyengeségben, a születés után hetekkel bekövetkező halálozásban nyilvánul meg (*Pierson és mtsai., 2005*). A myotubularin egy foszfoinozitid (PI)3 foszfatáz, amely hatással van a foszfoinozitolokra. A foszfoinozitolok (PtdInsP) Ca²⁺ homeosztázis és EC kuplung befolyásolásában betöltött lehetséges szerepe az elmúlt évekig ismeretlen volt. Néhány friss kutatás szerint a PtdInsP-foszfatáz hiányos transzgenikus egerekből származó fehérjék, különösképpen a MTM1 (myotubularin) és fehérjéi, az MTMR-ek (myotubularin és myopátia kapcsolt foszfatázok) mélyebb betekintést engedtek a témába (*Bolis és mtsai., 2007*). Az MTM1 hiánya és az izomgyengeség közötti kapcsolat mindaddig rejtve maradt, amíg az MTM1-hiányos egerekből származó izomrostokon végzett kísérletekben súlyosan sérült EC kuplung mechanizmusra bukkantak (*Al-Qusairi és mtsai., 2009*). Egerekben az MTM1-hiányos izomrostok számos defektust mutattak a belső membránrendszer struktúrájában és szerveződésében, a DHPR és

RyR1 száma csökkent és a feszültség aktivált citoszolikus kalciumválaszok is erősen csökkentek. Ez a funkcionális változás nyilvánvaló oka az izomgyengeség kialakulásának. Al-Quesairi és munkatársai (*Al-Qusairi és mtsai., 2009*) azt is bebizonyították, hogy az SR kalciumtartalma, valamint a citoszolikus kalciumeltávolítás képesség nem változott MTM1 hiányos izomrostokban. Funkcionális szinten a betegség aktuális stádiuma azonban befolyásolhatja az SR kalcium kibocsátó képességét. A belső membrán szerkezetének hibái is szerepet játszhatnak ezen változás kialakulásában, de valószínűleg több magyarázat is létezik a problémára. A belső membrán stuktúrájának megváltozása számos izombetegségnél megfigyelhető és már fiatal MTM1 hiányos egerekben is megjelenik (*Al-Qusairi és mtsai., 2009*). Mi több, az EC kuplung MTM14 hiányban szenvedő zebraalakban szintén sérülnek bizonyult, viszont az MTM1 hiánya nem okozott semmilyen hibát a belső membránrendszer felépítésében (*Dowling és mtsai., 2010*). A RyR1 számának csökkenése is szerepet játszhat az izom gyengeségének kialakulásában, azonban jelenleg az a fő kérdés, hogy mennyi RyR1 jelenléte szükséges a megfelelő EC kuplung működéséhez, de erre a kérdésre még nincs pontos válasz. Fontos kiemelni azt is, hogy számos, RyR1 mutációval járó humán izombetegség esetén kimutatták a sokkal nagyobb mennyiségben csökkent RyR1 számot az MTM1 hiányában megfigyeltékhez képest. Más izmot érintő betegségek esetében tehát a súlyos RyR1 szám csökkenés nem vezetett az MTM1 esetében megfigyelt súlyosságú izomgyengeséghez és nem befolyásolta olyan nagy mértékben a betegek mindennapi életét (*Monnier és mtsai., 2003; Zhou és mtsai., 2007; Zhou és mtsai., 2010; Zhou és mtsai., 2006*).

I.7. Célkitűzések

Míg a myostatin mutációja megnövekedett izomtömeghez vezet, addig a miotubularint kódoló génben bekövetkező változások súlyos izomgyengeséget okoznak. Az MTM1 funkciójának megértése segíthetne a betegség minél célzottabb terápiájának megtalálásában. Ezek tükrében a következő célokat tűztük ki:

A Mstn deficiencia hatása az EC kapcsolatra

Számos kutatócsoport bebizonyította, hogy a megnövekedett izomtömeg nem jár együtt izomerő növekedéssel (*Amthor és mtsai., 2007*), azonban az EC kapcsolat szerepe ebben még nem tisztázott. Annak érdekében, hogy a megnövekedett izomtömeg és a csökkent specifikus erő között fennálló nyilvánvaló eltérést a *Cmpt* egerek esetében a kontrollhoz képest feltárjuk, azt feltételeztük, hogy az EC kapcsolat érintett lehet ezekben az állatokban. Ezért a célunk az volt, hogy fényt derítsünk a következő kérdésekre:

- Hatással van-e a mutáció az excitációs-kontrakciós (EC) kapcsolatra?
- Van-e különbség a sejtmembrán elektromos tulajdonságaiban?
- Van-e különbség a kontraktilis rendszer sajátjaiban?
- A mutációnak van-e hatása a kalciumhomeosztázisra?
- Változik-e valami a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) történő kalciumfelszabadulás folyamatában?

Ezen kérdések megválaszolására megmértük a *Cmpt* és vad típusú állatokból származó vázizom rostok nyugalmi membránpotenciálját, vizsgáltuk a rostok kalcium érzékenységet és a kontraktilis apparátus működését, teljes rostos végeztünk kalcium mérést rácíometrikus fluoreszcens kalcium indikátorral, depolarizációval kiváltott tranziensek tulajdonságait valamint az elemi kalciumfelszabadulási események paramétereit elemeztük.

MTM1 funkciójának hatása az EC kapcsolatra

A bevezetőben ismertetett eredmények azt sejtetik, hogy nem a RyR1 számának csökkenése a kritikus pont a myotubuáris myopátia súlyosságának kialakulásában. Egy kézenfekvő lehetőség az, hogy az EC kuplung defektushoz az izomban egy megváltozott PtdInsP metabolizmus vezet, az MTM1 PtdInsP foszfatázként betöltött funkciójának megváltozása által. Ezt az állítást alátámasztja Shen (*Shen és mtsai., 2009*) kutatócsoportja, megmutatván azt, hogy egy másik PtdInsP foszfatáz hiánya (MTMR14) felelős az izom intracelluláris kalciumhomeosztázisának megváltoztatásáért. Ezen adatok azt sugallják, hogy a vázizom

kalciumhomeosztázisának szabályozásában, valamint az EC kuplungban a PtdInsP-ok fontos szerepet töltenek be normális körülmények között, csak úgy, mint bizonyos izombetegségekben. Ennek tükrében a következő célokat tűztük ki:

- Egyértelmű bizonyítékok keresése, melyek rávilágítanak a PtdInsP szerepére a kalciumhomeosztázisban és EC kuplungban normál körülmények között.
- Az EC kuplung mely szereplői lehetnek érintettek PtdInsP kezelés esetén?
- Az MTM1 overexpressziója befolyásolja-e a PtdInsP formák hatását?

Ezen kérdések megválaszolása érdekében vizsgáltuk az elemi kalciumfelszabadulási események kinetikáját, a vázizom rostok elektrofiziológiai tulajdonságainak változását PtdInsP kezelés hatására, valamint az *in vivo* elektroporációval történő MTM1 overexpressziójának hatását.

II. Anyagok és módszerek

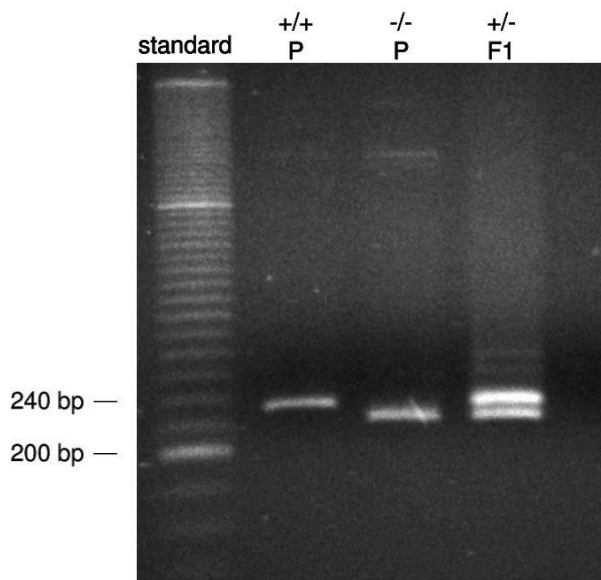
II.1. Állatok

Minden állatkísérlet megfelelt az Európai Unió irányelveinek (86/609/EEC). A kísérletek elvégzéséhez rendelkezünk a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság engedélyével (22/2011-DEMÁB, 31/2012-DEMÁB).

II.2. Párosztatás és genotipizálás a *Cmpt* állatoknál

A *Cmpt* állatok Dr. Müller Géza laboratóriumából származnak (Varga és mtsai., 2009). A *Cmpt* gén monitorozása érdekében heterozigóta állatokat hoztunk létre vad típusú kontroll és *Cmpt* állatok párosításával. A genotipizáláshoz az állatok farokvégéből származó mintát használtuk.

A myostatin génben található 12bp deléciót RT-PCR módszerrel detektáltuk (a myostatin génbank leltári száma: NM 010834). A következő primer párokat alkalmaztuk: myostatin forward 5'ACTGGAATCCGATCTCTGAAACTT 3', myostatin reverz 5'GACCTCTTGGGTGTGTCTGTCAC 3' (10. ábra).



10. ábra Az egerek genotipizálása. Az ábrán a myostatin gén kimutatása látható RT-PCR analízissel. Az első vonal a sztenderd, a második vonal a kontroll C57/BL6 (+/+), a harmadik vonal a *Cmpt* (-/-) és a negyedik vonal heterozigóta (+/-) állatok mintáiból származó eredmények. A P a szülői, míg az F1 az első generációból származó mintákat jelöli.

II.3. *In vivo* kísérletek

II.3.1. Futómalom

Az állatokat egyesével, önkéntes futtatómalommal ellátott ketrecbe helyeztük, melyben *ad libitum* táplálékhoz és vízhez is hozzáfértek. A kísérleteket 12/12 órás világos/sötét megvilágítás mellett végeztük szobahőmérsékleten. Háromnapos hozzászoktatást követően *Cmpt* (n=8) és vad típusú C57/BL6 (n=8) vonalból származó egerek mozgási szokásait figyeltük meg. Mértük az egerek futási mennyiségét, futási sebességét és azt, hogy mennyi időt töltenek egy nap átlagosan a malomban. A kerék számítógéppel volt összekötve, az adatok 20 perces intervallumonként kerültek rögzítésre, 14 napon keresztül folyamatosan.

II.3.2. Grip-teszt

Az egereket farkuknál fogva mellső mancsukkal megkapaszkodtak egy erőmérőhöz kapcsolt fém kerethez. Az állatokat a kerettel párhuzamosan tartottuk, hogy ne zárjanak be azzal szöveget a mérések alatt. A hátsó végtagok semmilyen felülettel nem érintkezhetek. Amikor az egerek mellső mancsukkal biztonságosan megkapaszkodtak a rendszer mérőrácsába, gyengéden elhúztuk az eszköztől a farkuknál fogva. Számítógép rögzítette azt a maximális erőt, amit akkor mértünk, mielőtt az állat elengedte volna a rácsot. A vizsgálatokat hozzászoktatást követően háromszor ismételtük meg minden egyed esetében. Ebben a kísérletsorozatban 5 *Cmpt* és 11 vad típusú egér vett részt.

II.4. *In vitro* vizsgálatok

II.4.1. Az egyedi vázizomrostok előkészítése

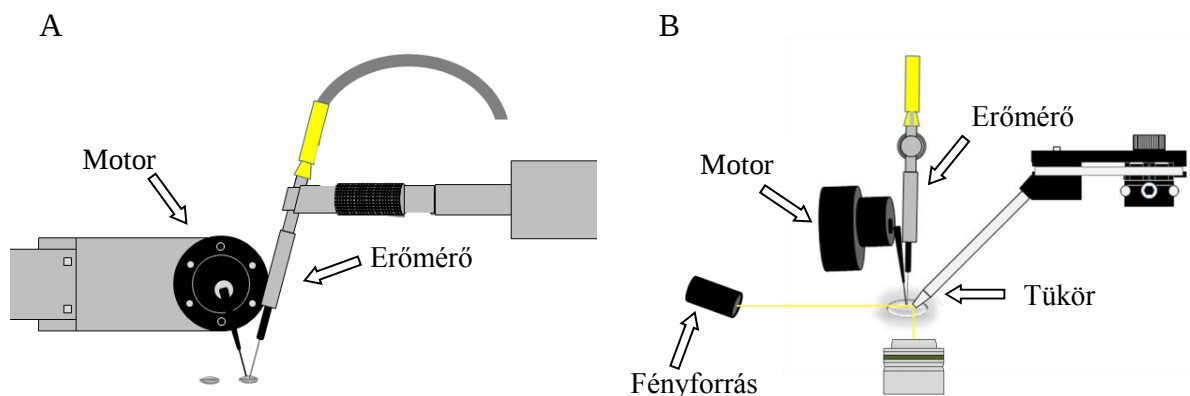
A kísérleteket vázizom rostokon végeztük, melyek az egerek *flexor digitorum brevis* (FDB), *extensor digitorum longus* (EDL) és *musculus soleus* (SOL) izmaiból származtak. Az egyedi rostokat enzimatikusan izoláltuk 37°C-on 50-55 percig kalciummentes módosított Tyrode oldatban (összetevők mM-ban: 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 11,8 Hepes, pH 7,4), amely 0,2% I. típusú kollagenázt tartalmazott (Sigma, St Louis, MO, USA) (*Csernoch és mtsai., 2008*). Az emésztés leállítását követően az izmokat normál Tyrode oldatban 4°C-on tároltuk felhasználásig. Az egyedi vázizom rostokat triturálással nyertük ki az izomból. A rostokat egy lamininrel fedett speciális üvegaljú petri csészébe helyeztük és 1-2 óra tapadási idő elteltével felhasználtuk.

II.4.2. Nyugalmi membránpotenciál mérés

Az FDB izomrostok oxigenált Tyrode oldatban (összetevők mM-ban: 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 11,8 Hepes-NaOH, 1g l⁻¹ glükóz, pH 7,4) voltak a mérés alatt, szobahőmérsékleten. Csupán az intakt membránnal és tisztán látható harántcsíkolattal rendelkező rostokon történt mérés. A membránpotenciál méréséhez 3M KCl oldattal töltött, 30-40 MΩ ellenállású pipettákat használtunk. Az elektródák Multiclamp-701A erősítőhöz voltak kötve (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) áram-clamp beállítást használva.

II.4.3. Kontraktilis fehérjék Ca²⁺ érzékenységének vizsgálata

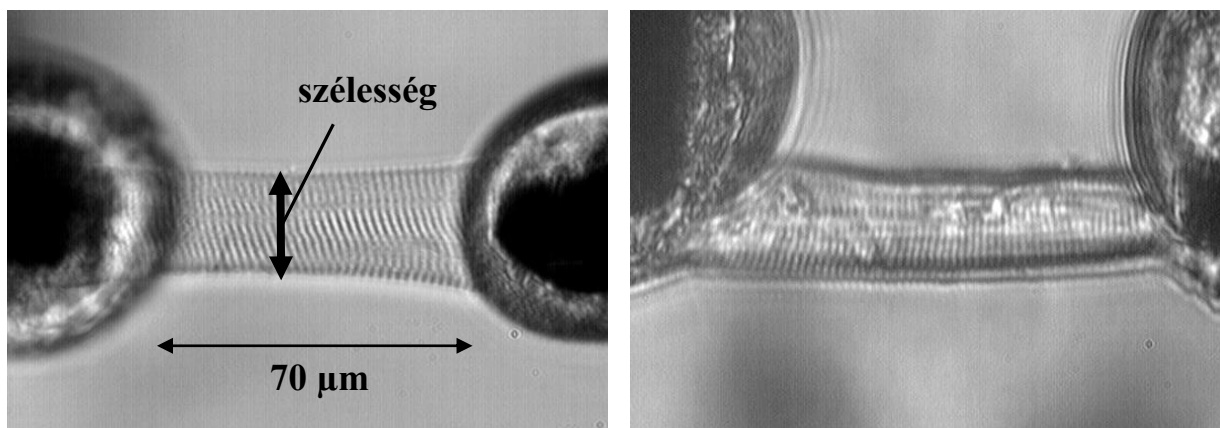
Az emésztett EDL és SOL izmokból különálló rostokat először kémiai, majd mechanikai izoláció segítségével preparáltunk. (pH 7,0; MgCl₂ 1 mmol/l, KCl 100 mmol/l, EGTA 2 mmol/l, ATP 4 mmol/l, imidazol 10 mmol/l), majd a mechanikailag izolált rost szegmentumokat mérés előtt 5 percig 0,5%-os Triton-X-100 kezelésnek vetettük alá. A Triton-X-100 kezelés eredményeként a sejtek membránrendszerei átjárhatóvá váltak („kémiaiilag nyúzott” izomrostok). A mechanikai mérőrendszerbe elhelyezett izomrostok egyik végét érzékeny erőmérőhöz, másik végét egy piezoelektromos motorhoz rögzítettük két vékony rozsdamentes acél rovartü segítségével (11. ábra).



11. ábra. Az izolált izomrostok kontraktilis tulajdonságainak mérésére szolgáló mérőrendszer vázlata elől- (A) és oldalnézetben (B). Az izomrost egy 15°C-os hőmérsékletű és a mikroszkóp tárgyasztalához rögzített mérőkád fölött helyezkedik el. A rost egyik vége olyan rovartűhöz van kapcsolva, mely egy érzékeny erőmérő toldaléka, másik vége egy piezoelektromos motorhoz rögzített. A rost Ca²⁺-tartalmú aktiváló oldatba történő átmenetét a mikroszkóp tárgyasztalának oldalirányú mozgásával lehet elérni (A). Az izomrost vastagságát egy oldalsó fényforrás és egy, a mérőrendszerhez csatolt tükör segítségével lehet megmérni (B).

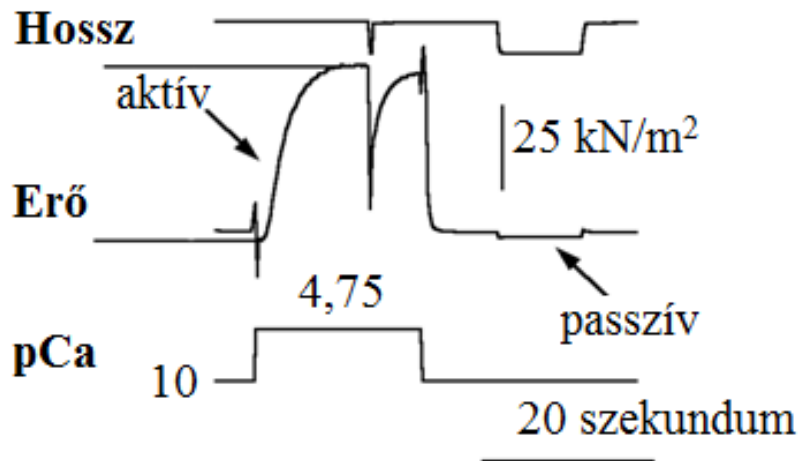
A vázizomrostok Ca²⁺-kontraktúráit izometriás körülmények között 15°C-on rögzítettük. A rostok aktiválása előtt a szarkomerek átlagos hosszát a mikroszkóphoz kapcsolt számítógépes videojel-feldolgozó rendszer segítségével 2,3 μm-es értékekre állítottuk be. A preparátum vastagságának megállapítása egy, a mérőrendszerhez csatolt tükör segítségével

történt (11/B. ábra). Az izomrost méreteinek mérése a keresztmetszeti terület kiszámolását tette lehetővé, és ezáltal a rostok abszolút erőit tudtuk kiszámolni.



12. ábra. A mechanikai mérőrendszerhez rögzített izolált és membránrendszerétől megfosztott izomrost felül (A)- és oldalnézetben (B). A rost két vége a kontraktilis rendszerben ébredő erő és az aktin-miozin rendszer kinetikai jellemzőinek méréséhez szükséges berendezésekhez (erőmérő és piezoelektromos motor) van rögzítve.

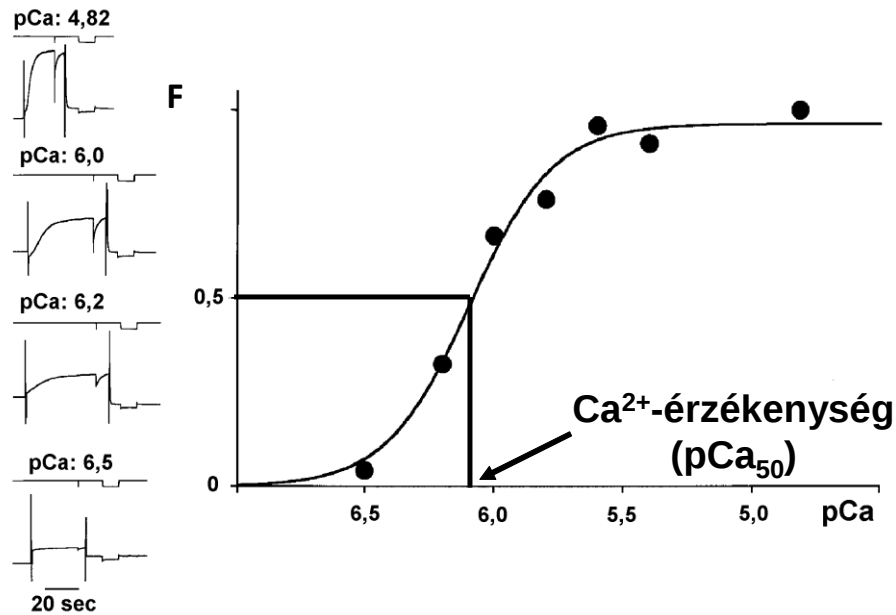
Méréseink során a mérőrendszerhez rögzített egyetlen izomrost szegmenst egymást követően csökkenő Ca^{2+} -koncentrációjú oldatokba tettük és a Ca^{2+} -kontraktúrák időbeli lefutását rögzítettük. A Ca^{2+} -koncentrációt ún. pCa egységekben fejeztük ki, amely a Ca^{2+} -koncentráció negatív 10-es alapú logaritmus. Eszerint, a legalacsonyabb értékű pCa egység jelenti a legmagasabb Ca^{2+} -koncentrációt. A mérésekhez szükséges relaxáló és aktiváló oldatok összetételét számítógépes program (Fabiato & Fabiato, 1979) szerint határoztuk meg. Az *alap relaxáló* (pH 7,2; BES 10 mmol/l; KCl 37,11 mmol/l; MgCl_2 6,41 mmol/l; EGTA 7 mmol/l; ATP 6,94 mmol/l; kreatin-foszfát 15 mmol/l) és *aktiváló oldatok* (pH 7,2; BES 10 mmol/l; KCl 37,34 mmol/l; MgCl_2 6,24 mmol/l; CaEGTA 7 mmol/l; ATP 6,99 mmol/l; kreatin-foszfát 15 mmol/l) Ca^{2+} -koncentrációja pCa 10 és pCa 4,75 volt. A pCa 4,75 értéknél kisebb Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló oldatokat az alap relaxáló és aktiváló oldatok megfelelő arányú keverésével állítottuk elő.



13. ábra. Az erő közvetlen mérése egyetlen izomroston. A Ca^{2+} -kontraktúrákat az izomrost relaxáló oldatból (pCa 10) Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatba (pCa 4,75) történő átvitelével idéztük elő. Az aktiváció alatti gyors hosszváltozást („release-retch” manőver a kontraktúra csúcsán) a kontraktilis erő megszűnése, majd gyors regenerációja kísérte. A relaxáló oldatban végrehajtott hosszváltozások révén a sejt passzív feszítettségét („passzív” erő) ítéltük meg.

Az izomrost szegmens relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átvitelét a kontraktilis erő fokozódása követte (13. ábra). A maximális kalcium aktiválta erő kifejlődése után egy úgynevezett „release-retch” manővert végeztünk, melynek során a rostot az eredeti hosszának 20%-ával megrövidítettük, majd ezt követően visszaállítottuk a kiindulási hosszat. A gyorsan lezajló (15 msec) hosszváltoztatás során a kialakult aktin-miozin keresztkötések döntő többsége felszakadt, majd azok újból felépültek. Ezt az eseményt a regisztrátumon a kontraktilis erő megszűnése, majd annak gyors regenerációja kísérte. Az erő regenerációjának üteme elsősorban az aktin-miozin ciklus sebességétől függ, melyet az erő görbék „release-retch” manővert követő részének illesztésével lehetett becsülni (k_{tr}). Az izometriás csúcserőt (mely az aktív és passzív komponensek összege) a gyors rövidüléssel párhuzamos hirtelen erőcsökkenésből határoztuk meg. A relaxáló oldatban lényegesen hosszabb ideig tartó hosszváltoztatás révén a sejtben kialakuló passzív erőkomponenst az aktivációs ciklust követően mértük.

A kontraktúra amplitúdóját számos, különböző Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló oldatban is meghatároztuk, melyek segítségével a Ca^{2+} -érzékenységi görbe szerkesztésére nyílt lehetőség (14. ábra). A félmaximális erőt eredményező Ca^{2+} -koncentráció, az úgynevezett pCa₅₀ érték, a Ca^{2+} -érzékenységet önmagában jellemző számadat.



14. ábra. Az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenységének mérése. A Ca^{2+} -kontraktúrákat az izomrost relaxáló oldatból különböző Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatokba (pCa 4,75 - pCa 6,5) történő átvitelével idéztük elő. Az ábra bal oldalán látható, hogy az egyre alacsonyabb Ca^{2+} -koncentrációk hatására egyre kisebb kontrakciós erőmaximumok jöttek létre. Az aktiváció következtében kialakuló aktív erőt a Ca^{2+} -koncentráció (pCa) függvényében ábrázolva minden egyes sejtre megszerkeszthető a jobb oldali Ca^{2+} -érzékenységi görbe. A félmaximális erő létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} -koncentráció (pCa_{50}) a sejt Ca^{2+} -érzékenységét közvetlenül jellemző adat.

Minden kísérleti protokoll egy szaturáló Ca^{2+} -koncentráción (pCa 4,75) elvégzett kontroll aktivációval kezdődött és végződött. Ez lehetővé tette a mért erők normalizálását és a preparátum úgynevezett „rundown”-jának, azaz mérés közbeni „elhasználódásának” meghatározását. Ehhez a maximális Ca^{2+} aktiválta aktív erőket hasonlítottuk össze (F_0). Minden kísérleti mérés végén összehasonlítottuk a sejt által létrehozott maximális erőt a kísérlet első hasonló értékével. Amennyiben a kísérlet végén a sejt az eredeti érték 80%-a alatt teljesített, úgy azon mérést elvetettük.

A Ca^{2+} -függő aktív izometrikus erő és annak Ca^{2+} érzékenysége valamint a Ca^{2+} -független passzív erő mérése a permeabilizált EDL és SOL izomrostokon mechanikai mérőrendszer segítségével történt 15°C-on (Papp és mtsai., 2002).

Az erő és pCa közötti összefüggést egy módosított Hill egyenletre illesztettük:

$$F_{\text{Ca}} = F_{\text{max}} \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]^{\text{nH}}}{(\text{pCa}_{50}^{\text{nH}} + [\text{Ca}^{2+}]^{\text{nH}})} \right) + F_{\text{min}}, \quad (1)$$

ahol F_{Ca} az adott kalciumkoncentrációnál kialakult maximális erő, F_{max} a maximális izometrikus erő szaturáló Ca^{2+} koncentráció esetében ($pCa=4,75$), a Hill koefficiens (nH) az összefüggés meredekségének mérésére szolgál, a pCa_{50} a maximális erő 50%-ának kialakulásához szükséges Ca^{2+} -koncentráció, és az F_{min} a minimális izometrikus erő, amit $pCa=9$ esetén mérhetünk.

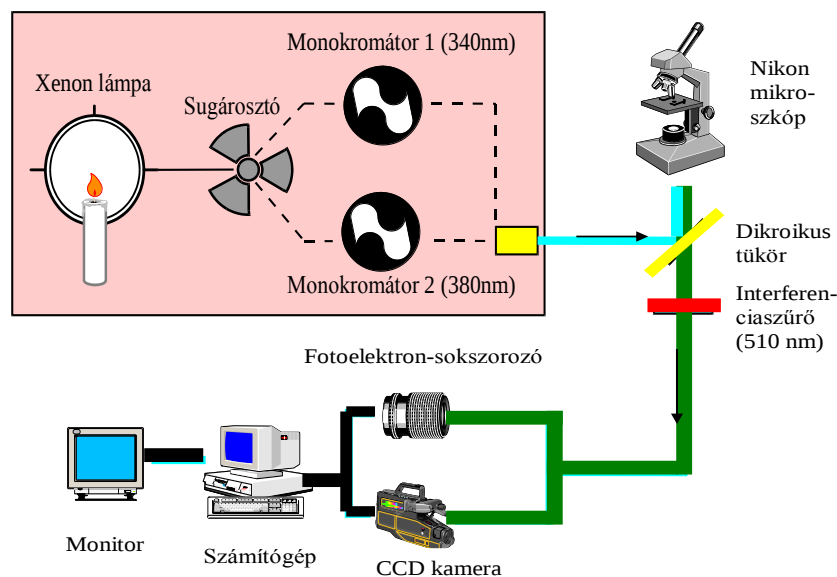
II.4.4. Teljes-sejtes Ca^{2+} koncentráció mérés

A mérés alapelve, hogy a Ca^{2+} -ot kötött fluoreszcens festék abszorpciós maximuma (340 nm) eltér a Ca^{2+} -ot nem kötött festékétől (380 nm), így a két különböző abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon gerjesztve a rostot, a két hullámhosszon való gerjesztést követően emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából az $[Ca^{2+}]_i$ kiszámolható (*Grynkiewicz és mtsai., 1985*).

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R), \quad (2)$$

ahol K_d a disszociációs állandó, R_{max} a fluoreszcencia hányados ha a festék Ca^{2+} -mal telített, R_{min} a fluoreszcencia hányados ha a festék egyáltalán nem köt Ca^{2+} -ot, R a mért fluoreszcencia értékek hányadosa, β a rendszerre jellemző állandó.

A rostokba juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM kettős monokromátoros berendezés biztosította. Fényforrásként egy xenonlámpája szolgál, amelynek a fényét egy forgótükrös sugárosztó két nyalábra osztja. A keletkező sugarak más-más monokromátoron haladnak át, melynek eredménye a méréseink során használt 340, illetve 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb. A monokromátorokból optikai szálak vezetik a fényt egy csatoló egységen, valamint egy dikroikus tükrön keresztül a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett sejtekre. A Fura-2-AM által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en, egy interferenciaszűrő közbeiktatásával, a fotoelektronsokszorozó segítségével detektáltuk. A jeleket 10 Hz gyakorisággal regisztráltuk, a háttérfluoreszcenciát a tárgylemezek sejtmentes helyein mértük, és ezt az értéket a program automatikusan levonta a mért fluoreszcenciaértékekből. A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) az irodalomból ismert egyenlet (*Grynkiewicz és mtsai., 1985*) alapján számítottuk ki az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkat:



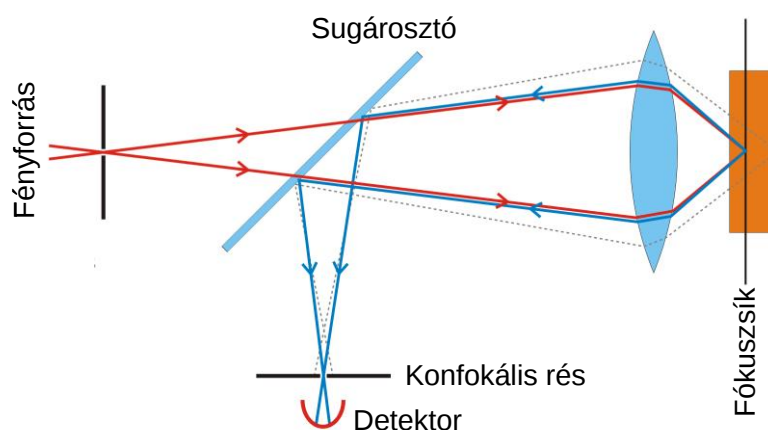
15. ábra. A PTI Delta Scan mérőrendszer felépítése. A sejtekben lévő Ca^{2+} -érzékeny festéket 340 és 380 nm hullámhosszon gerjesztjük, majd az emissziót 510 nm-en detektálva, a hányadosukból az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kiszámítható.

A méréseket 40X-es olajimmerziós objektívvel invertált fluoreszcens mikroszkóppal (Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan) végeztük. A vizsgálatokat normál Tyrode-oldatban végeztük. A rostokat folyamatosan perfundáltuk NTY-oldattal egy külső perfúziós rendszer segítségével. A mérőoldatokat közvetlenül a kiválasztott, az üveghez megfelelően letapadó rostokra juttattuk egy lokálperfúziós kapilláris tűn keresztül (Perfusion Pencil™; AutoMate Scientific, San Francisco, CA, USA) 0,35 ml/perc sebességgel, melynek az adagolását egy lokálperfúziós rendszerrel (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific) vezéreltük.

Tehát az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -ban bekövetkező változásokat Fura-2-AM, rációmetrikus fluoreszcens kalcium indikátorral feltöltött FDB rostokon mértük (Fodor és mtsai., 2008). Az egyedi izomrostokat lamininnel fedett fedőlemezekre tettük, majd 5 μM Fura-2-AM (acetoximetilészter forma) festékkal töltöttük 60 percig szobahőmérsékleten. Az extracelluláris észterázok gátlására neostigmint alkalmaztunk. A Ca^{2+} -tranzienseket KCl oldat segítségével váltottuk ki (Fodor és mtsai., 2008).

II.4.5. A depolarizációval kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ változások mérése konfokális mikroszkóppal

A konfokális mikroszkópia nagy előnye a jobb felbontóképesség, valamint az, hogy viszonylag vékony (1-2 μm) rétegekről alkothatunk vele képeket anélkül, hogy a mintát fel kellene szeletelni, tehát élő sejteket is lehet vizsgálni (Szabó 2004). A hagyományos mikroszkópiában gyakran problémát okoz a minta alatti és fölötti régiókból érkező fény, hiszen nem csak az általunk vizsgálni kívánt fókuszsíkból érkező fényt detektáljuk ezáltal, így nagy mértékben romolhat a képünk élessége. A konfokális mikroszkóp ezzel ellentétben egyszerre csak a minta egy-egy pontját világítja meg, és ezekből a képpontokból számítógépes adatfeldolgozás segítségével készül el a végső kép. Fényforrása egy nagyteljesítményű lézer dikroikus tükör segítségével a mikroszkóp objektív lencséjébe juttatja a fényt, ami azt a minta egy pontjára fókuszálja, és a minta által kibocsátott fluoreszcens fényt is összegyűjti. A minta egy adott síkjából jövő fény a mikroszkóp optikai rendszerén áthaladva a detektorba jut. A detektor előtt egy kisméretű lyukkal ellátott, a fényt nem áteresztő lemez található, ami azt a célt szolgálja, hogy a detektor csak akkor érzékelje a fényt, ha az pontosan a lyukba fókuszál. Így tehát a preparátum fókuszsíkon kívüli minden más síkjából érkező fény nagy része kirekesztődik a detektálásból (16. ábra). A lézert fényt pásztázó tükrök segítségével mozgatva, meghatározott területen, soronként pásztázva, a kapott adatokat számítógépes program segítségével összegezve lehet kialakítani a végleges képet (Röhlich 2006).



16. ábra. A konfokális mikroszkóp működési elve. A berendezés lehetővé teszi, hogy a mintánk egy vékony optikai szeletéről készítsünk felvételeket és ezáltal a hagyományos fluoreszcens mikroszkópoknál élesebb képet kapjunk.

Kísérleteink során a konfokális mikroszkópot kétféle üzemmódban használtuk. Kétdimenziós leképezés esetén a rendszer soronként végigpásztázza a vizsgált sejtet reprezentáló pixeleket, és az egyes fluoreszcencia-intenzitásokat x-y koordináta-rendszerben ábrázolja. Ilyen formában a sejtről a hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal készített képekhez hasonló – de annál élesebb és kontrasztosabb – kétdimenziós képet kapunk. Ezt az üzemmódot leginkább az immuncitokémiai vizsgálatoknál alkalmaztuk. Amikor line-scan üzemmódban használtuk a mikroszkópot, akkor a sejtről felvett kétdimenziós x-y képen egy, a sejtet keresztben átérő vonalat húztunk számítógépes program segítségével. A konfokális mikroszkóp lézere ezután ezen a vonalon pásztázott az általunk megadott beállítási paraméterek szerint. Az így kapott kép az adott vonalon a mérés alatt végbement fluoreszcencia-intenzitás-változást mutatja be az idő függvényében. A line-scan üzemmódban készített felvételeket az $[Ca^{2+}]_i$ megváltozásának nyomon követésére használtuk.

A depolarizáció által kiváltott kalcium tranzienseket 22°C-on, LSM 510 META konfokális lézerpásztázó mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével detektáltuk, miután a FDB rostokat 20 μ M Rhod-2-AM fluoreszcens kalcium indikátorral töltöttük 15 percen keresztül. Az egyedi akciós potenciálok kiváltásához ingerküszöb feletti, 2 ms hosszú négyszög impulzusokat használtunk (S88 Stimulator, Grass Technologies, Warwick, RI, USA). A mérés során a rostokhoz közel helyeztük el az impulzusok kiváltásához szükséges platina elektródokat. A tetanuszos depolarizációkat küszöb feletti, 2 ms hosszú és 100Hz frekvenciával ismétlődő négyszögimpulzusokkal váltottuk ki. Az impulzussorozatok mindegyike 500 ms hosszú volt. Az ún. „line-scan” képeket (512 pixel vonalanként) használtuk arra, hogy monitorozzuk a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező változásokat 1 ms/vonal sebességgel, 63x vizes objektívvel. A Rhod-2-AM gerjesztése hélium-ion lézerrel történt (543 nm), az emissziót pedig 550 nm-en detektáltuk. A Rhod-2 által detektálható fluoreszcens intenzitás változásának időbeliségét (F_{rhod}), a „line-scan” képek megfelelő adatpontjait (általában 10-15) átlagoltuk. A nyugalmi fluoreszcenciát a depolarizáció bekövetkezése előtt mért fluoreszcencia értékekből határoztuk meg. Az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változásokat a következő képlet alapján számoltuk ki:

$$[Ca^{2+}]_i = K_{d_{rhod}} \times (F_{rhod} - F_{rhod,min}) / (F_{rhod,max} - F_{rhod}), \quad (3)$$

ahol az $F_{rhod,max}$ meghatározása a laboratóriumunkban történt, míg a többi paraméter ($K_{d_{rhod}}$, $F_{rhod,min}$) értékeit Escobar és munkatársai határozták meg (1997).

II.4.6. Elemi kalcium-felszabadulási események detektálása

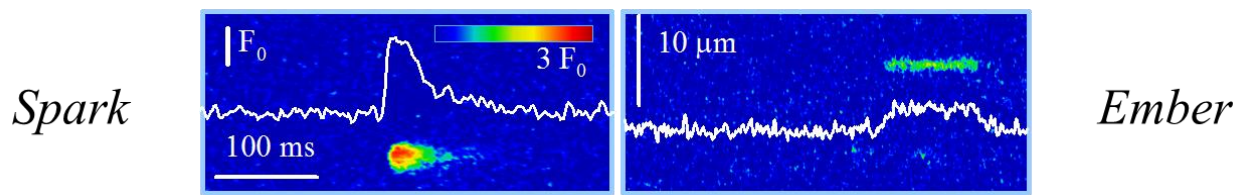
Kísérleteink során a lézer pásztázó konfokális mikroszkópot kétféle üzemmódban használtuk. Az elemi kalciumfelszabadulási események detektálására *Cmpt* és vad típusú egerekből származó rostok esetében a Zeiss LIVE mikroszkópot használtuk, line-scan üzemmódban, 22°C-on. Az egerek FDB izmaiból izolált izomrostokat Saponinnal történő előkezelést követően 50 μ M Fluo-3 AM fluoreszcens festékkel töltöttük fel. A fluoreszcens festék gerjesztése Argon ion lézerrel 488 nm hullámhosszon történt, a festék által kibocsátott fényt 510 nm-en mértük.

A PtdInsP csoportok hatásának vizsgálata során a képeket x,y módban rögzítettük. Az egyedi, Saponinnal permeabilizált rostokat 0,1mM Fluo-3-AM festékkel töltöttük.

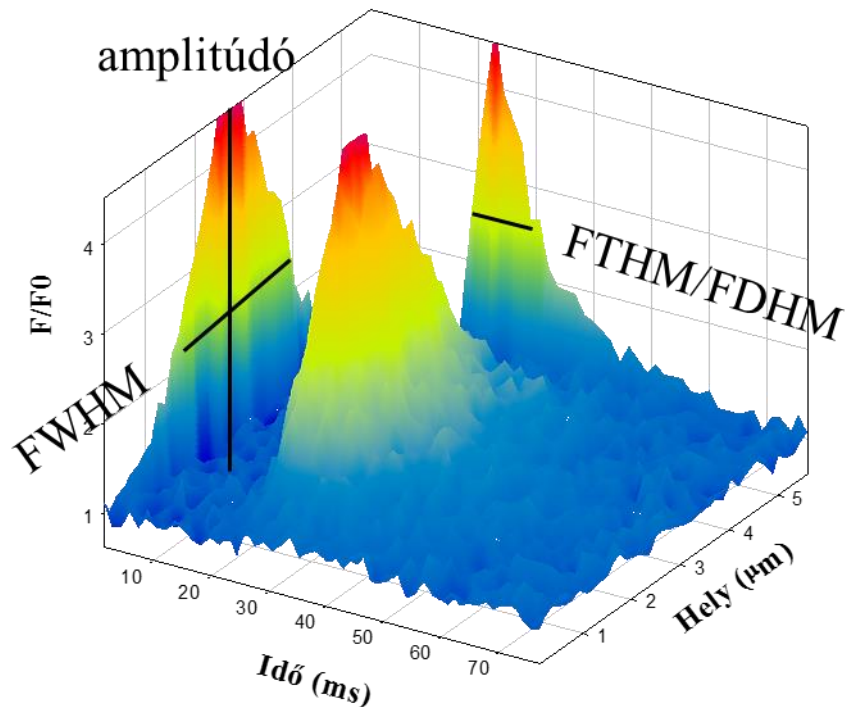
A line-scan képek esetén a kapott eredmények kielemezéséhez a kutatócsoport által kifejlesztett saját programot használtuk. Az analízis során a program először levonta a sejtmentes területen mért fluoreszcenciát a sejteken mért fluoreszcencia értékekből, majd a képek minden egyes pontjához tartozó fluoreszcencia intenzitás értékeket (F) elosztotta a *spark*-mentes területekhez tartozó háttér fluoreszcencia értékekkel (F_0). Az események amplitúdóját a program a két érték különbségéből számította, mégpedig úgy, hogy azt a háttér fluoreszcencia értékre normalizálta ($\Delta F/F_0$, ahol $\Delta F = F - F_0$). Az automatikus detektáló program az irodalomban használt kritériumokat használta a *spark*-ok megtalálására. A Ca^{2+} *spark*-ok frekvenciáját az eredmények pontosabb összehasonlíthatóság miatt az adott rost területére, illetve szarkomerre vonatkoztattuk (*spark*/ μ m/s, illetve *spark*/szarkomer/s).

Az x,y képek rögzítése után a rost régióját és a háttérteret a 200 képsorozat első képén jelöltük ki. A háttérteret a roston kívüli területen jelöltük ki. Az ezen területen található pixelek fluoreszcencia intenzitását átlagoltuk, majd ezen átlagokat kivontuk a rost területén mért fluoreszcencia intenzitásból. Ezután a Z-vonalakhoz tartozó intenzitást eltávolítottuk. A Z-vonalak azonosításához minden vonal frekvencia spektrumát Fourier transzformációval számítottuk ki. A képeket ezután zajmentesítettük (*Szabó és mtsai., 2010*) és detektáltuk a kalciumfelszabadulási eseményeket. Végül az amplitúdót és a FWHM értékét meghatároztuk. Minden kép esetén a fakulás korrekcióját végrehajtottuk.

A különböző kezelések, illetve a kontroll képekből ezután meghatároztuk a frekvenciát (összegeztük a 200 képsorozaton megtalálható eseményeket). Amennyiben az egymást követő képeken az adott esemény lokalizációja nem változott, úgy azt egy eseménynek vettük.



17. ábra Az elemi kalciumfelszabadulási jelenségek. A *spark*ok nagy amplitúdójú, de rövid ideig tartó kalciumfelszabadulási események, míg az *ember* egy kis amplitúdójú, de hosszú időtartamú esemény.



18. ábra Az elemi kalciumfelszabadulási események paraméterei: amplitúdó/átlagos amplitúdó (a csúcs alapvonalától vett távolsága), FTHM/FDHM (FullTime/Duration at Half Maximum, azaz az amplitúdó felénél mért időtartam), FWHM (Full Width at Half Maximum, azaz az amplitúdó felénél mért szélesség), signal mass (az amplitúdó és az FWHM négyzetének szorzata, a felszabadult Ca^{2+} mennyiséggel arányos).

II.4.7. Az SR-ből történő kalciumfelszabadulás számítása

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a fluoreszcencia intenzitások arányából ($R = F_{340}/F_{380}$) számolható ki *in vivo* kalibrációt használva ($R_{\min} = 0.2045$, $R_{\max} = 8.315$, $K_d \times \beta = 1183 \text{ nM}$) a korábban leírtak szerint (Grynkiewicz és mtsai., 1985). A Ca^{2+} -pumpa aktivitása és a Ca^{2+} -fluxus (a sejtekbe 1 másodperc alatt belépő Ca^{2+} mennyisége) meghatározásához a Ca^{2+} intracelluláris kötőhelyekhez történő kötődését és a sejtől történő eltávolítását modellezte munkacsoportunk, ahogyan erről már korábban beszámoltunk (Szappanos és mtsai., 2004). A fluxus (FI) számításához a következő képletet használtuk:

$$Fl = d(Ca_{tot} + Ca_{tran})/dt \quad (4)$$

ahol Ca_{tot} a teljes myoplazmatikus Ca^{2+} mennyiség, Ca_{tran} pedig a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok által szállított Ca^{2+} . A modellben a Ca^{2+} intracelluláris helyekhez, SERCA pumpához (Ca_{pump}), troponin C-hez (Ca_{tropC}), parvalbuminhoz (Ca_{parv}) és a festékhez (Ca_{dye}), történő kötődését és az eltávolítását valamint a szabad Ca^{2+} (Ca_{free}) mennyiségét vettük figyelembe.

$$Ca_{tot} = Ca_{free} + (Ca_{dye} + Ca_{tropC} + Ca_{parv} + Ca_{pump}) \quad (5)$$

A Ca^{2+} -pumpa maximális transzportkapacitása (PV_{max}) a Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárára illesztett görbéből határozható meg, az intézetünk által kifejlesztett, a legkisebb négyzetek módszerét használó számítógépes program segítségével. A modell többi paraméterét állandóként kezeltük az irodalomból vett adatokat felhasználva (*Schuhmeier és mtsai., 2003*).

A Ca_{tran} a kalcium visszavevő mechanizmusok (pumpák) által szállított Ca^{2+} mennyiség, melyet a pumpa relatív szaturációjának arányából kaptunk meg ($[Ca_{pump}]/[pump]$).

$$Ca_{tran}/PV_{max} * ([Ca_{pump}]/[pump]) \quad (6)$$

A visszavételezés paramétereit az irodalomból vettük (*Schuhmeier és mtsai., 2003, Jacquemond 2012*) és a korábbi, a munkacsoportunk által publikált módon használtuk (*Csernoch és mtsai., 1990, Szappanos és mtsai., 2004*).

II.4.8. In vivo elektroporáció

Az egerek izofuránnal történő altatását követően 20µl 2mg/ml koncentrációjú hialuronidáz tartalmú fiziológiás oldatot injektáltunk az állatok hátsó lábába. Az állatot egy óra elteltével újra elaltattuk és ezután a talpakba injektáltunk 10µg/µl Tyrode oldatban oldott plazmid DNS-t. Összesen 30-50µl végtérfogatot fecskendeztünk be lábanként különböző helyekre annak érdekében, hogy minél hatékonyabban el tudjuk találni az FDB és *musculus interosseus* izmokat. Az injektálást követően két arannyal bevont rozsdamentes acélból készült akupunktúrás tűt, mely az elektroporátor készülékhez volt csatlakoztatva (BTX ECM 830 square wave pulse generator, Harvard Apparatus, Holliston, USA), szúrtunk az állatok lábának bőre alá, és elindítottuk az elektroporáló impulzusokat. A protokoll alapján 20 pulzus alkalmaztunk, melyek amplitúdója 200V/cm, a hossza 20ms és az alkalmazott frekvencia 2Hz.

II.4.9. Elektrofiziológia és membrán áram analízis

A mérések során RK-400 patch-clamp amplifikátort használtunk teljes-sejtes áram-clamp konfigurációt alkalmazva. A rostokat szilikonnal bevont TEA-tartalmú extracelluláris oldatba helyeztük, majd az egyedi izomrostokat szilikonnal fedtük be úgy, hogy a rostok egyik végének egyharmada „kilógott” a szilikon alól (ezen a területen történt a mérés). Az áram pulzusok generálására pClamp9 programmal (Axon Instruments) irányított analóg-digitális konvertert (Digidata 1440A; Axon Instruments, Foster City, CA, USA) használtunk. A feszültség-clamp megvalósításához intracelluláris oldattal töltött pipettát használtunk. A pipetta hegyét a rost szilikonnal fedett részébe szúrtuk, majd hagytuk a belső oldatot a rostba diffundálni. A soros ellenálláson fellépő feszültség-hiba csökkentésére irányuló kompenzációt hajtottunk végre. A nyugalmi tartópotenciál -80mV volt, erről a szintről lépcsőzetes impulzusokkal depolarizáltuk a rost membránját.

II.4.10. Adatelemzés és statisztika

Minden értéket az átlagokkal $\pm$ az átlagok standard hibájával (SE) jellemeztünk. A statisztikai szignifikanciát Student-féle t-próbával számoltuk, $P < 0,05$ értékeket tekintve szignifikánsnak.

A *Cmpt* és vad típusú törzsek közötti statisztikai összehasonlítást egyváltozós variancia analízissel (ANOVA) valamint Student-Newman-Keuls módszerrel számítottuk ki.

III. Eredmények

III.1. A myostatin hiány funkcionális vizsgálata

III.1.1 *In vivo* kísérletek

A *Cmpt* állatok nagy izomtömeggel rendelkeztek és a súlyuk több mint kétszerese volt az azonos korú vad típusú kontroll társaikénak (1. táblázat). Annak érdekében, hogy *in vivo* megvizsgáljuk az izmok teljesítő képességét felnőtt állatokban, 12-16 hetes egereket használtunk a Grip-teszt elvégzéséhez mindkét állatcsoportból. Ahogyan az várható volt, a nagyobb izomtömeg megléte miatt a *Cmpt* állatok jobban teljesítettek a vad típusú társaiknál. Az általuk produkált maximális erő szignifikánsan nagyobb volt. Azonban, miután az abszolút erőt a testtömegre normalizáltuk, kompenzálva a megnövekedett izomtömeget, a vad típusú egerek esetében szignifikánsan nagyobb relatív erőt kaptunk a *Cmpt* állatokhoz képest (1. táblázat).

1. táblázat Grip-teszt eredmények

	Kontroll (n=11)	<i>Cmpt</i> (n=5) [#]
Testsúly (g)	20.7±0.7	56.0±3.3***
Abszolút erő (mN)	71.1±1.4	126.7±4.0***
Testsúlyra normalizált erő (mN/g)	3.48±0.07	2.36±0.09***

*** szignifikáns eltérés $p<0.001$ a kontrollhoz viszonyítva.

2. táblázat A futómalomban megtett távolság és sebesség

	Kontroll (n=8)	<i>Cmpt</i> (n=8) [#]
Távolság (m/nap)	7145±553	3387±283**
Átlag sebesség (m/min)	13.3±1.0	9.6±0.8**
Maximális sebesség (m/min)	23.1±1.0	18.6±1.0**
Időtartam (min/nap)	544±31	356±25**

** szignifikáns eltérés $p<0.001$ a kontrollhoz viszonyítva.

A futómalommal végzett kísérletek során is hasonló eredményekre jutottunk. Az átlagos és a maximális sebességet tekintve a vad típusú állatok jobban teljesítettek, csak úgy,

mint a megtett táv esetében. Ráadásul sokkal több időt töltöttek futással a *Cmpt* állatokhoz képest (2. táblázat).

Összegezve tehát ezek a kísérletek bizonyították, hogy a *Cmpt* állatok esetében megmutatkozó megnövekedett izomtömeg ellenére az általuk produkált erő messze elmaradt a várttól.

III.1.2. *In vitro* kísérletek

III.1.2.1. Nyugalmi membránpotenciál

Annak érdekében, hogy fényt derítsünk arra, hogy a sejt membrán elektromos tulajdonságaiban van-e különbség, a kontroll (n=4) és *Cmpt* (n=3) állatokból származó FDB rostok nyugalmi membránpotenciálját megmértük. Annak ellenére, hogy a nyugalmi membránpotenciál enyhén depolarizáltabb a *Cmpt* állatokban ($-77,8 \pm 0,2$ mV, n=18) a kontroll állatokból származó rostokhoz képest ($-79,2 \pm 0,3$ mV, n=13), nem találtuk az 1 mV körüli eltérést élettani szempontból relevánsnak.

III.1.2.2. A kontraktilis rendszer kalciumérzékenysége

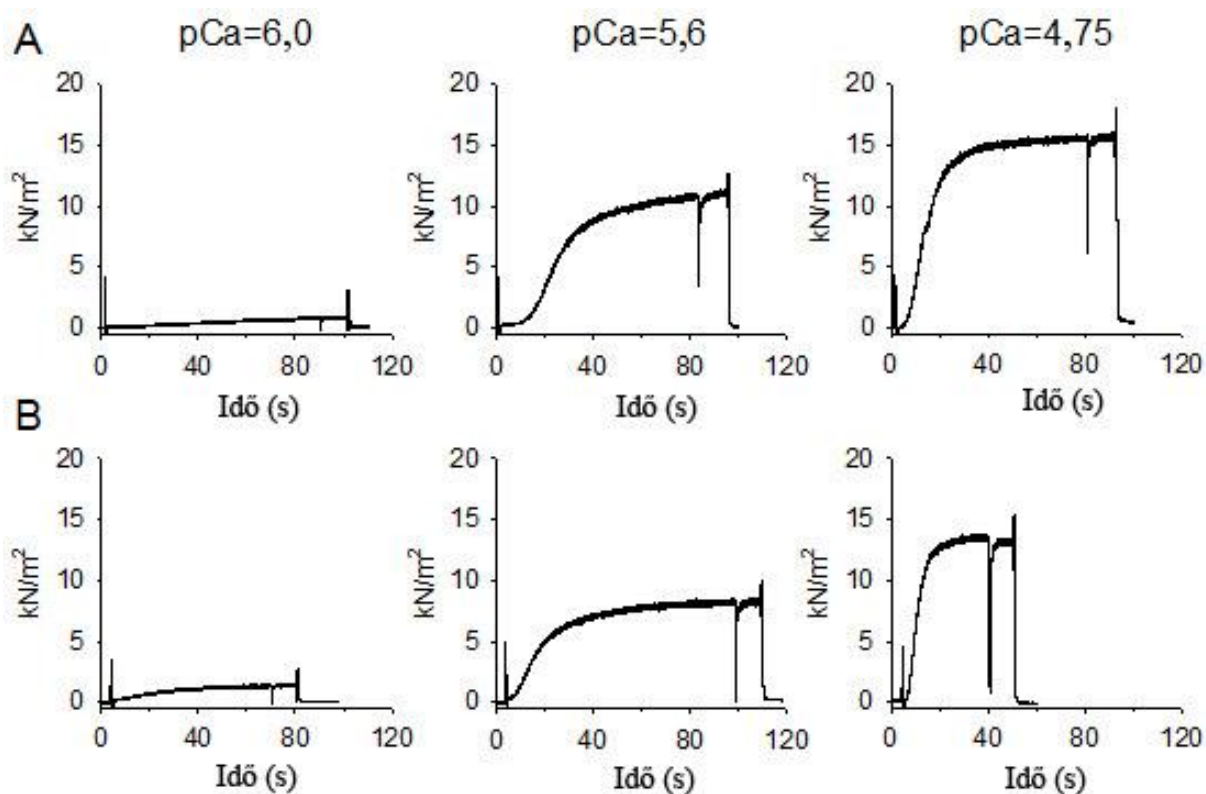
A nyugalmi membránpotenciál meghatározása utáni következő lépés a kontraktilis rendszer működésében fennálló esetleges különbségek felderítése volt. Az izometrikus kontrakciók alatt kialakuló erő mérése 31 rost szegmensben történt (a szegmensek hossza $80,7 \pm 5,1$ μ m), melyek EDL és SOL izomrostokból származtak négy kontroll és négy *Cmpt* állat felhasználásával.

3. táblázat Az izometrikus erő kalcium érzékenysége

	Kontroll		<i>Cmpt</i>	
	EDL (8)	Soleus (8)	EDL (7)	Soleus (8) [#]
Átmérő (μ m ²)	1887 $\pm$ 343	1714 $\pm$ 235	2602 $\pm$ 380	3303 $\pm$ 386**
T _{active} (kN/m ²)	26.14 $\pm$ 5.06	26.87 $\pm$ 3.98	25.25 $\pm$ 4.01	21.89 $\pm$ 2.18
T _{passive} (kN/m ²)	2.24 $\pm$ 0.58	2.07 $\pm$ 0.48	2.15 $\pm$ 0.47	2.86 $\pm$ 0.37
k _{Tr} (1/sec)	3.43 $\pm$ 0.39	1.98 $\pm$ 0.21	6.15 $\pm$ 0.65**	1.84 $\pm$ 0.40
pCa ₅₀	5.73 $\pm$ 0.02	5.73 $\pm$ 0.04	5.77 $\pm$ 0.03	5.78 $\pm$ 0.05
nH	3.21 $\pm$ 0.19	3.12 $\pm$ 0.29	3.15 $\pm$ 0.16	2.75 $\pm$ 0.20

** szignifikáns különbség p<0.05 a kontrollhoz viszonyítva.

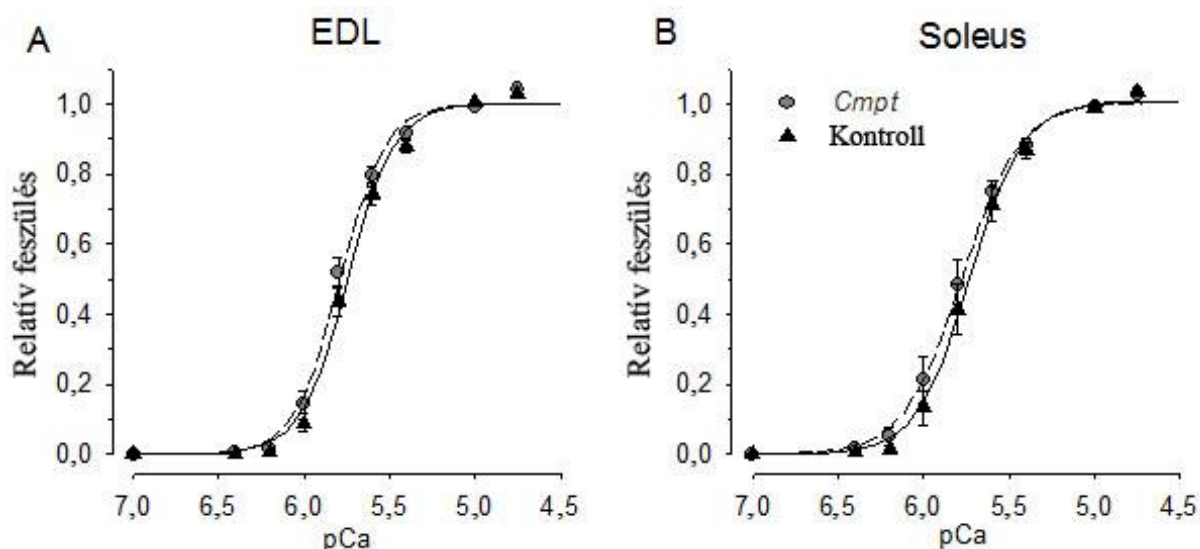
[#] Három kontroll és három *Cmpt* állatból származó rostok száma.



19. ábra Nyúzott rostok izometrikus erejének időfüggése. Kontroll (A) és *Cmpt* (B) állatokból származó kémiaiag nyúzott EDL rostokon mért izometrikus erő három különböző kalcium koncentrációt használva ($p_{Ca}=6,0$; 5,5 és 4,75). A rostokat a relaxáló oldatból ($p_{Ca}=9$) gyorsan áttettük a mérő oldatokba és az erő kifejtés időfüggését rögzítettük. Minden esetben végrehajtottunk egy gyors relaxációs és ismételt összehúzódást kiváltó manővert. Kísérleti körülmények: a rostok átmérője 1764 és 2074 μm^2 , hőmérséklet: 15°C.

A 19. ábrán reprezentatív izometrikus kontrakciók láthatók alacsony ($p_{Ca}=6,0$), közepes ($p_{Ca}=5,6$) és szaturáló ($p_{Ca}=4,75$) kalcium koncentrációk esetében.

A 3. táblázat bemutatja az átlagos maximális aktív és passzív izometrikus feszülés (T_{active} , $T_{passive}$) értékeit, melyeket úgy határoztunk meg, hogy a kapott erő értékeket a szegmensek átmérőjére normalizáltuk. Ebben nem találtunk szignifikáns különbséget a *Cmpt* és vad típusú állatok között, mint ahogy a kalcium érzékenységben sem. Meghatároztuk az erő regenerációjának ütemét (aktin-miozin ciklus sebessége), azaz a k_{tr} értékét. Itt a gyors típusú izmok esetében (EDL) különbséget figyeltünk meg a két törzs között, a mutáns állatokban szignifikánsan gyorsabbnak bizonyult a regeneráció. Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a *Cmpt* mutáció által esetlegesen az erő generálásában okozott változásának lehetőségébe, az EDL és SOL rostok izometrikus erejének kalcium érzékenységét összehasonlítottuk a két törzsben.

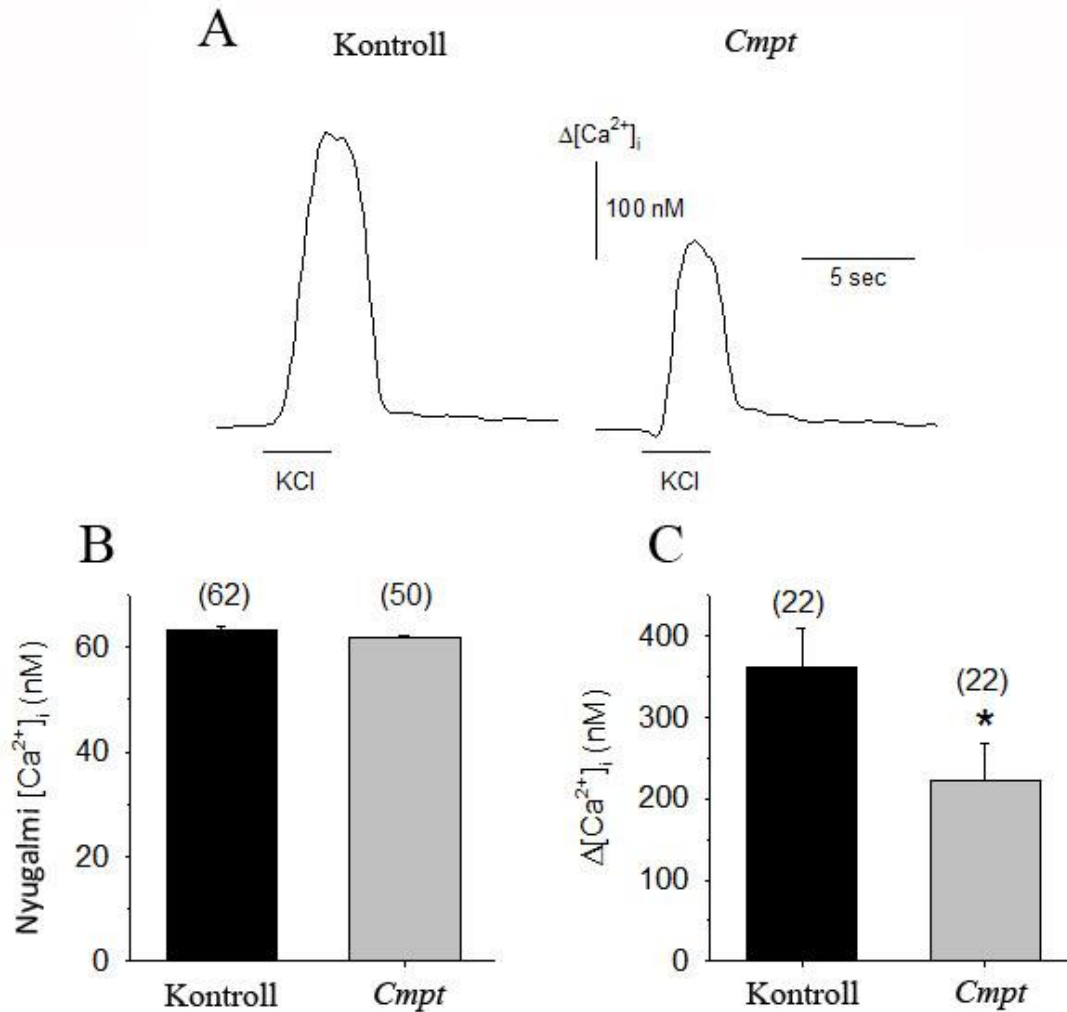


20. ábra Az izometrikus erő kalcium koncentráció függése. A maximális izometrikus erőt különböző kalcium koncentrációjú oldatok segítségével határoztuk meg kontroll (fekete háromszög) és *Cmpt* (szürke kör) állatokból származó EDL (A) és SOL (B) izomrostokon. Ezeket az értékeket a $pCa=4,75$ esetben mért értékekre normalizáltuk. A vonalak a Hill görbéket (1. egyenlet) mutatják, melyeket az adatpontokra illesztettünk (kontroll: folyamatos vonal, *Cpmt*: szaggatott vonal).

A 20. ábrán az adatpontokra egyenlet illesztését követően nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget sem a pCa_{50} sem pedig az nH értékekben (3. táblázat). Ezek az eredmények egyértelműen arra engednek következtetni, hogy a kontrakciós mechanizmus, beleértve a kalcium érzékenységet, nem változott a *Cmpt* állatokban a kontroll törzshöz képest.

III.1.2.3 Az intracelluláris kalciumkoncentrációban bekövetkező változások *Cmpt* állatok esetében

Mivel a kontraktilis fehérjék kalcium érzékenysége hasonló volt a vad típusú és *Cmpt* állatokban, a *Cmpt* mutáció feltehetően a kalciumhomeosztázisra lehet hatással. Ennek kiderítése érdekében a kalciumhomeosztázis 12-16 hetes kontroll és *Cmpt* állatokból izolált, egyedi FDB izomrostokon vizsgáltuk.



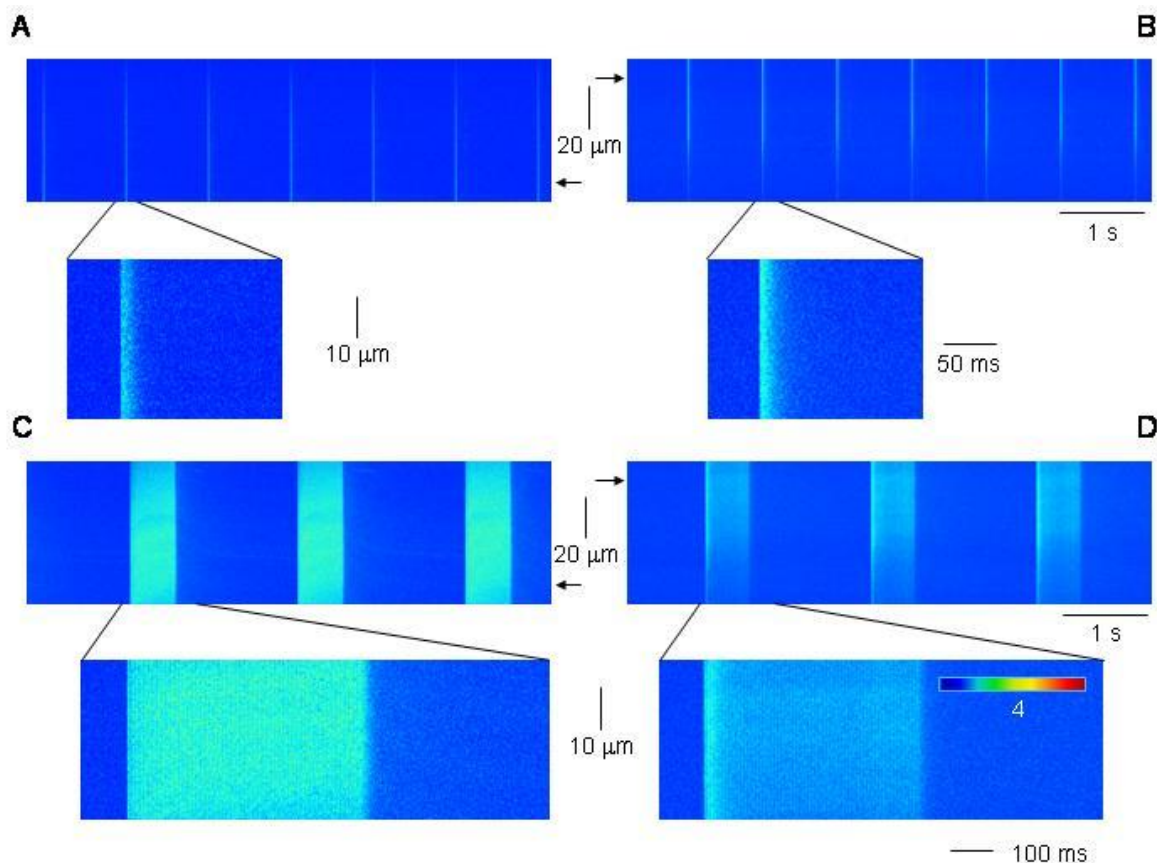
21. ábra A nyugalmi kalcium koncentráció és a KCl depolarizációval indukált $[Ca^{2+}]_i$ változás. A depolarizáció által kiváltott változások az intracelluláris kalciumkoncentrációban (A), FDB izomból származó intakt rostokon kontroll (baloldal) és *Cmpt* (jobb oldal) egerekben. A depolarizációt lokál perfúzió 3 másodpercig adagolt 120mM KCl oldattal váltottuk ki. Az átlagos mért nyugalmi kalcium koncentráció (B) és az intracelluláris kalcium koncentrációban bekövetkező változás mértéke (C). A zárójelekben szereplő számok a vizsgált rostok számát mutatják. *szignifikáns ($P < 0,05$) különbség a kontrollhoz képest. A méréseket 22°C-on végeztük.

A 21. ábra 120 mM KCl depolarizáció segítségével kiváltott kalciumtranzienseket mutat be. A mérés során normál (1,8 mM) extacelluláris kalciumkoncentrációt biztosítottunk. Az adatok összegzése alapján megállapítottuk, hogy a *Cmpt* mutációnak nincs hatása az intracelluláris nyugalmi kalciumkoncentrációra (21 B ábra). Ez azt sugallja, hogy az extracelluláris térből történő kalcium „leak”-et valamint az oda történő kalcium kipumpálást nem befolyásolják a *Cmpt* mutáció által létrehozott körülmények (21 B ábra). Azonban ha a kalcium tranziensek amplitúdóját vizsgáljuk, azt tapasztaljuk, hogy a tranziensek amplitúdója szignifikánsan

kisebnek bizonyult a *Cmpt* állatokból származó rostok esetében a kontrollhoz képest (21 C ábra).

III.1.2.4. Akciós potenciál által kiváltott kalcium tranziensek FDB izomrostokban

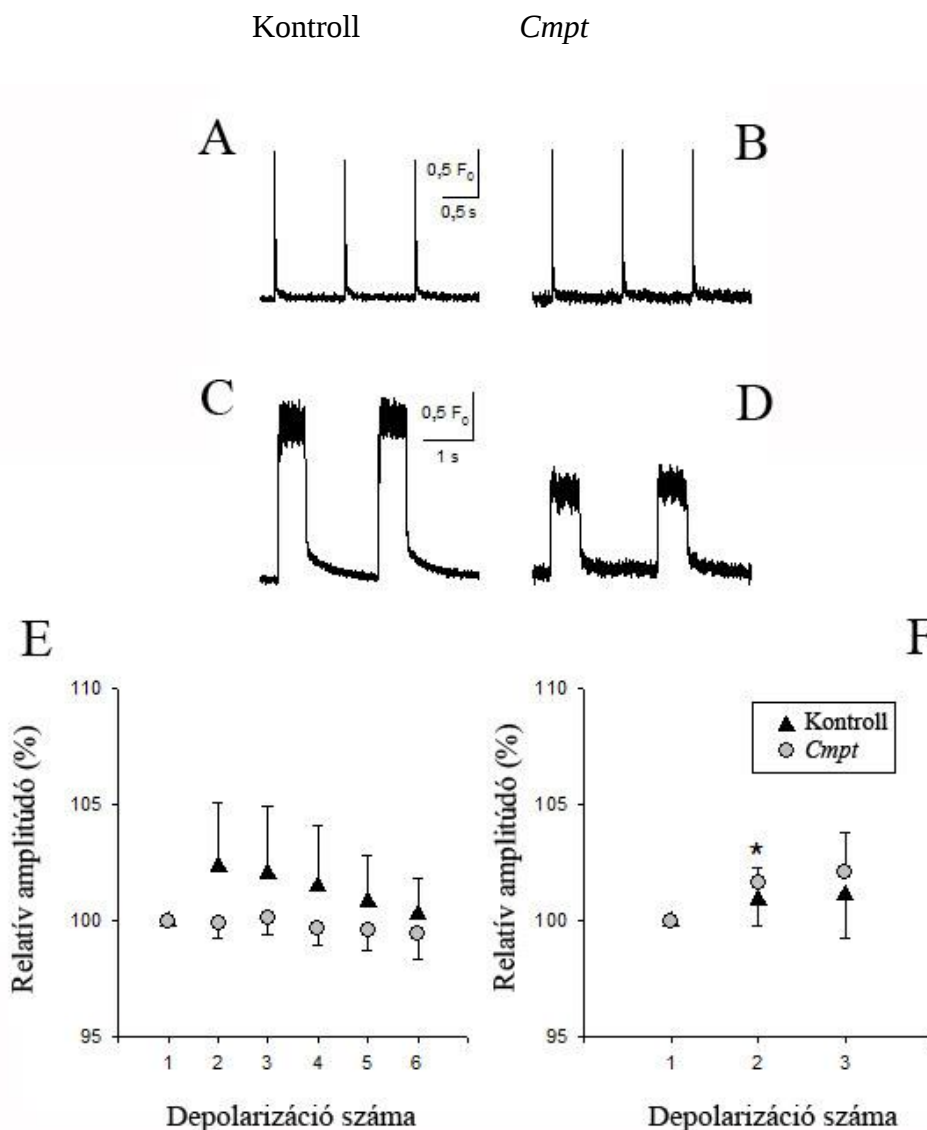
A téringerléssel kiváltott globális kalciumfelszabadulási események mérése ismételt FDB izomrostokon történt. Ezek a kalcium tranziensek rögzítése lézer scanning konfokális mikroszkóp segítségével történt „line-scan” módban.



22. ábra Téringerléssel kiváltott kalciumkoncentráció változások FDB izomrostokban Az FDB izmokból izolált intakt izomrostok feltöltése kalcium érzékeny fluoreszcens Rhod-2 festékkel történt. A küszöb felett impulzusokat akciós potenciálok kiváltására használtuk, a Rhod-2 fluoreszcenciájában bekövetkező változásokat konfokális mikroszkóppal line-scan módban rögzítettük. A fluoreszcencia változásokat depolarizáció hatására egyszeri impulzusok (A,B) és gyorsan ismétlődő impulzusok esetén (C,D) kontroll esetben az A és C ábra, míg *Cmpt* állatok esetében a B és D ábra mutatja. A nyilak azon térbeli pontokat jelölik, amelyeknél az időbeliséget a következő ábra szemlélteti. Mérési paraméterek: 4096 x 512 pixel, 1,53 ms vonal⁻¹, 0,14 μm pixel⁻¹, 22°C.

A 22. ábrán egyedi, valamint tetanuszos impulzusok által kiváltott reprezentatív kalciumtranziensek láthatók. A tranziensek térbeli profilja homogén volt mindkét törzs

esetében (22 A és 22 B ábrák), ami arra utal, hogy a T-tubulus rendszeren a depolarizáció fiziológiásan megy végbe.



23. ábra Az FDB izomrostokon depolarizáció hatására bekövetkező fluoreszcencia változás időbelisége. A depolarizációs impulzusok által kiváltott térbeli Rhod-2 fluoreszcencia változások átlagolt időfüggése (A-D), miután normalizáltuk az alap fluoreszcenciára (F/F_0). Az átlagokat 10 vonalból számoltuk azon a ponton, ahol az előző ábrán a nyilak találhatók. A háttér a depolarizáció bekövetkezte előtti mérési pontokból számoltuk. Az egymást követő impulzusok csúcsértékeit az első csúcsra normáltuk majd átlagoltuk az egyedi (E) és a sorozatos (F) depolarizációk esetén. A mérések 3 kontroll ($n=14$ rost) és 3 *Cmpt* ($n=13$ rost) állaton történtek. *Szigifikancia ($P<0,05$), az első csúcsához viszonyítva.

A kalcium tranziensek analizálásához, az ingerlés által kiváltott kalciumfelszabadulási jelek normalizálást követően egyedi és tetanuszos reprezentatív fluoreszcens tranzienseket kaptunk, melyeket a 23. ábra mutat be kontroll (baloldal) és *Cmpt* állatokban (jobb oldal). A

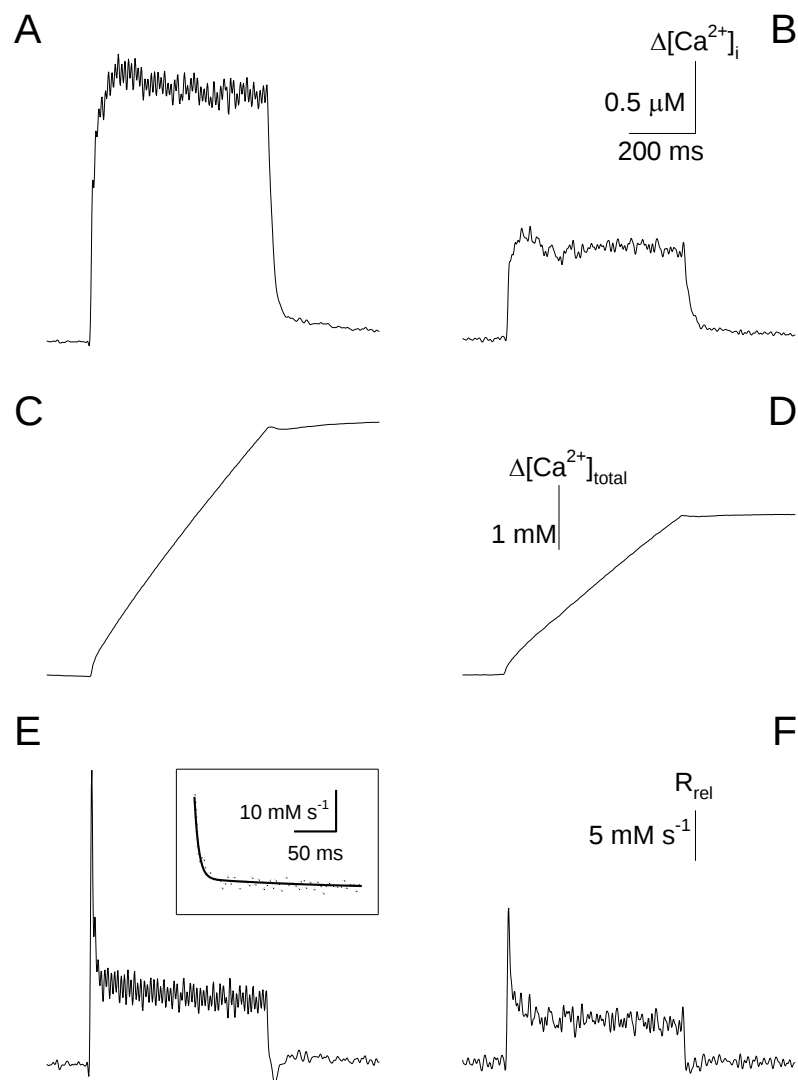
reprezentatív, normalizálást követően ábrázolt fluoreszcens tranzienseket egyedi impulzusokkal (23 A és 23 B) és sorozatokkal (23 C és 23 D) váltottuk ki. Az adatok analízisa során kiderült, hogy az egyszeri impulzusokkal kiváltott kalcium tranziensek átlagos amplitúdója szinte teljesen megegyezett a két törzs esetében ($2,37 \pm 0,12 F/F_0$, n= 25 kontroll esetben; $2,50 \pm 0,15 F/F_0$, n=26 *Cmpt* rostok esetében), azonban a sorozatingerlés alkalmazásakor az amplitúdó szignifikánsan lecsökkent a *Cmpt* állatokban (4. táblázat) a kontrollhoz képest.

4. táblázat A depolarizáció által kiváltott kalcium tranziensek paraméterei a kalciumfelszabadulás fluxusával összefüggésben

	Kontroll (n=14)	<i>Cmpt</i> (n=13)[#]
$\Delta F/F_0$	2.42 ± 0.03	$2.07 \pm 0.10^*$
$\Delta[Ca^{2+}]_T$ (mM)	3.06 ± 0.39	$2.08 \pm 0.23^*$
FL csúcs ($\mu M/ms$)	23.7 ± 3.0	$15.8 \pm 2.1^*$
FL nyugalmi szint ($\mu M/ms$)	5.7 ± 0.7	$3.7 \pm 0.5^*$
FL csúcs/nyugalmi szint	4.3 ± 0.4	4.6 ± 0.6
csúcs elérési idő R_{rel} (ms)	8.9 ± 0.3	8.9 ± 0.2
Inaktiváció Tauja (ms)	6.7 ± 0.9	8.8 ± 1.3

* szignifikáns különbség $p < 0.05$ a kontrollhoz viszonyítva.

[#] Három kontroll és három *Cmpt* állatból származó rostok száma.



24. ábra A depolarizáció által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ és az ahhoz tartozó kalciumfelszabadulás fluxusa.

Az A és B, az intracelluláris kalciumkoncentráció változások a 23. ábra C-D panel első tranzienseiből számolva a 3. egyenletet felhasználásával. A C és D, az SR-ből felszabadult kalcium mennyisége ($[Ca^{2+}]_T$; 5. egyenlet). Az E és F a hozzá tartozó kalciumfelszabadulás fluxusa (FL) a RyR csatornákon keresztül. Az E ábrán található keretben az FL kinagyított része látható, melyre az exponenciális függvényt illesztettük ($\tau = 5,1$ ms), amelyet az inaktiváció időállandójának meghatározására használtunk.

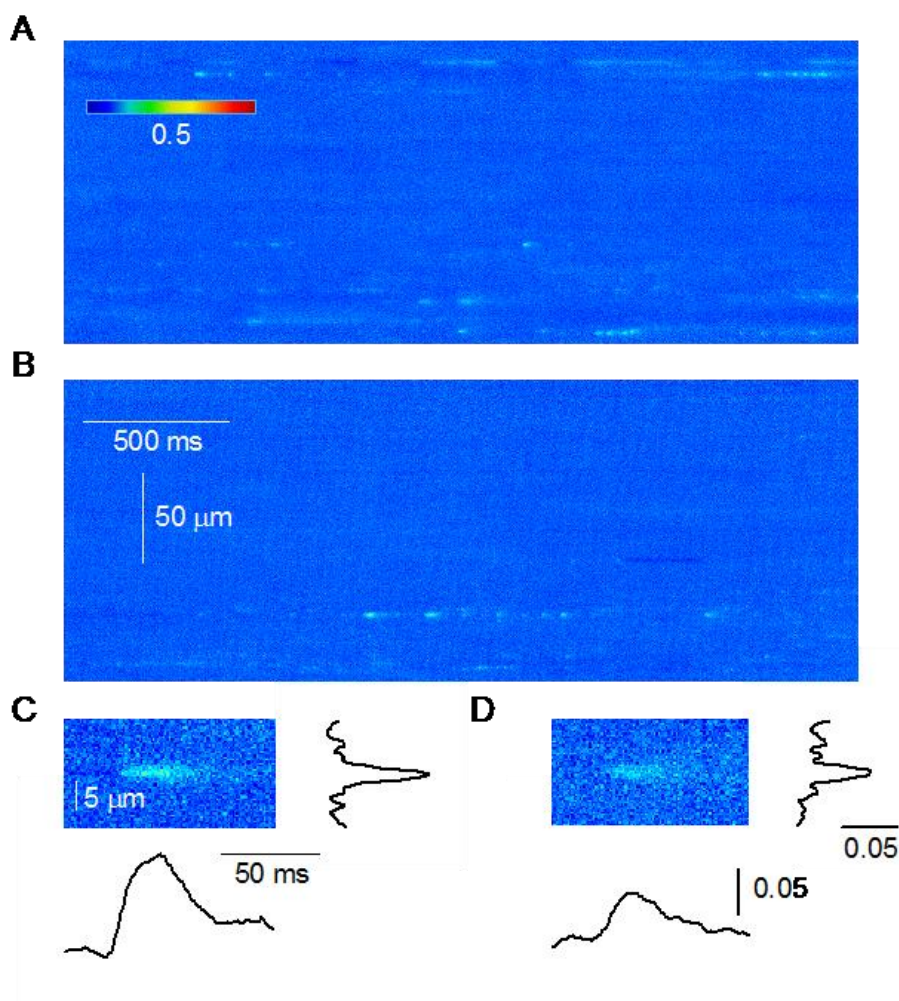
A mérések alatt 3-6 egyedi és tetanuszos tranziens került rögzítésre minden rost esetében. Kísérleteink során nem volt megfigyelhető szignifikáns csökkenés az egymást követő impulzusok amplitúdójában sem az egyedi, sem pedig a tetanuszos tranziensek esetében (23 E és 23 F ábra).

Az SR-ből történő kalciumfelszabadulás további analizálása során először a sorozatingerléssel kiváltott kalciumtranziensek normalizált fluoreszcencia értékeit kalcium koncentrációvá

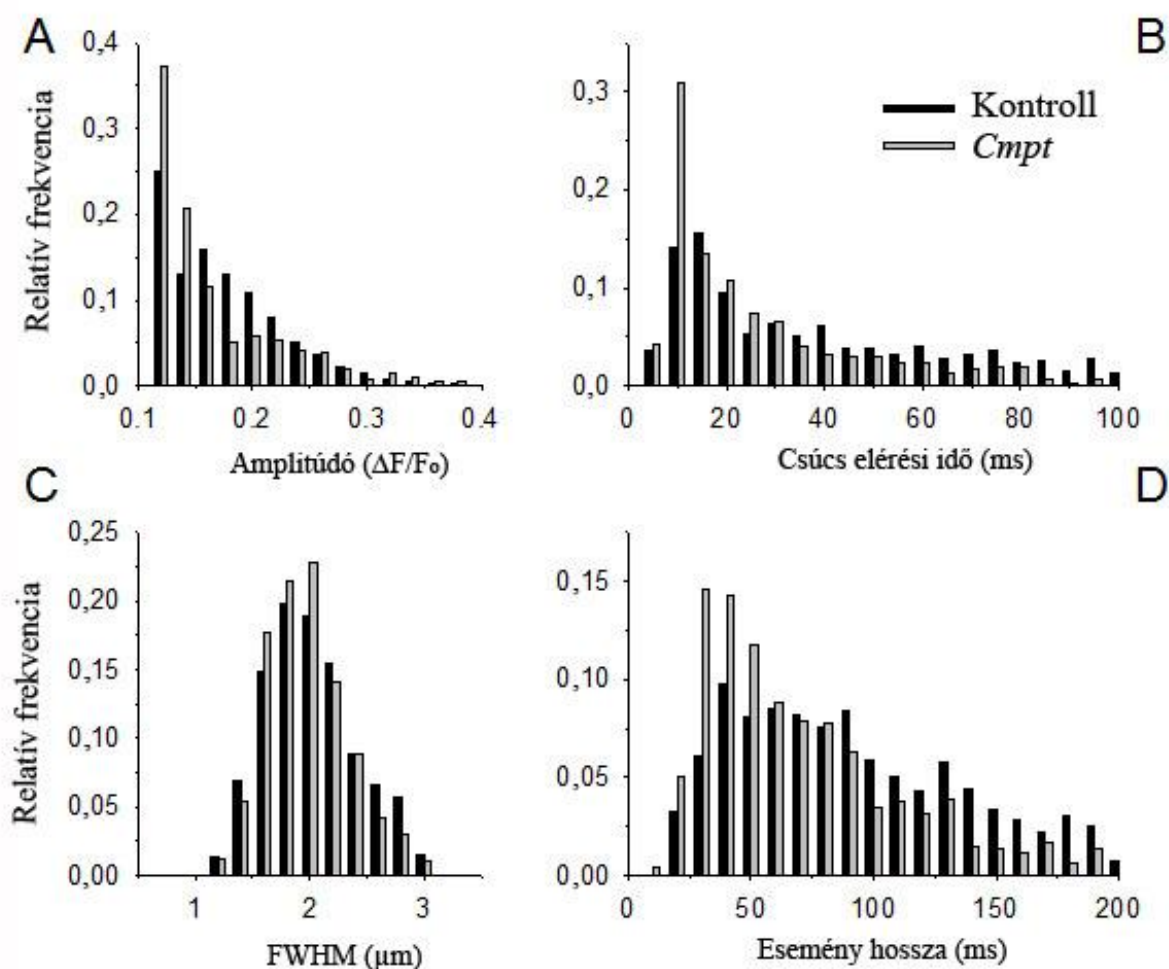
transzformáltuk a fentebb leírt egyenlet alapján, majd a teljes felszabadult kalcium mennyiségét ($[Ca]_T$) és a RyR csatornákon keresztül felszabaduló kalcium fluxusát (FL) is kiszámítottuk. A 24. ábrán jól látszik, hogy jelentős változás történt az intracelluláris kalcium koncentrációban (24 A és 24 B), csak úgy, mint a myoplasmába felszabaduló teljes kalcium mennyiségében (24 D ábra), és a hozzájuk tartozó kalciumfelszabadulás fluxusában (24 E és 24 F ábra). Mindezek csökkentek a *Cmpt* állatok esetében. $[Ca^{2+}]_T$ kiszámolásához használt paraméterek: $[festék]=20\ \mu M$, $k_{off,rhod}=130\ s^{-1}$, $k_{on,rhod}=82\ \mu M^{-1}\ s^{-1}$, $[parvalbumin]=2\ mM$, $Kd_{pumpa}=1\ \mu M$, $[Ca^{2+}]_{nyugalmi}=70\ nM$. A FL az impulzus leadását követő 9 ms eltelte után érte el a csúcstértékét és szignifikánsan kisebb volt a *Cmpt* rostokban (4. táblázat). Továbbá a FL fenntartott szintjében is eltéréseket figyeltünk meg. Másrészt viszont a csúcs-fenntartott szint aránya és az inaktiváció időállandója változatlan maradt. A felszabadult kalcium mennyiségében egy durván 30%-os csökkenés figyelhető meg a mutáns törzsnél. Ezek az adatok tisztán mutatják, hogy a depolarizáció által kiváltott kalciumfelszabadulás szignifikánsan kisebb volt a *Cmpt* állatokban.

III.1.2.5. Elemi kalciumfelszabadulási események *Cmpt* rostokon

Hogy megértsük a SR-ből történő kalciumfelszabadulás csökkenésének okát, elemi kalciumfelszabadulási eseményeket rögzítettünk kontroll és *Cmpt* állatokból származó FDB izomrostokon nagy sebességű lézer-pásztázó konfokális mikroszkóp segítségével. A rostokon kalcium *spark*-ok (kalciumfelszabadulási események nagy amplitúdóval és rövid időtartammal) és *ember*-ök (alacsony amplitúdójú és hosszú időtartamú események) alakultak ki. Megjegyzendő, hogy a *spark*-ok megjelenési valószínűsége lényegesen nagyobb volt az *ember*-ökénél. Annak ellenére, hogy a *Cmpt* rostok (25 B ábra) ugyanúgy generáltak *spark*-okat mint a kontroll rostok (25 A ábra) az események karakterisztikus tulajdonságaikban eltéréseket figyeltünk meg.



25. ábra Spontán kalciumfelszabadulási események FDB rostokon Kontroll (A) és *Cmpt* (B) állatokból származó rostokon készült line-scan képek. Az enzimatikusan izolált rostokat 0,01% Saponin segítségével permeabilizáltuk és Fluo-3 festékkel töltöttük fel. A C és D képek reprezentatív *sparkok* térbeli és időbeli lefolyását mutatják be kontroll (C) és *Cmpt* (D) rostokon. A térbeli és időbeli profilokat az események maximumánál rögzített öt egymást követő sor vagy oszlop átlagolásával kaptuk meg. Mérési paraméterek: 4069x512 pixel, 1 ms line⁻¹, 0,33 μm pixel⁻¹, 22°C



26. ábra A kalciumfelszabadulási események paramétereinek hisztogramjai. A kalciumfelszabadulási események amplitúdó (A), a csúcs eléréséhez szükséges idő (B), a FWHM (C) és az időtartam (D) hisztogramjai kontroll (fekete oszlopok, n=6) és *Cmp1* (szürke oszlopok, n=6) egerek esetében. A line-scan képeken látható eseményeket egy automatizált program segítségével azonosítottuk (lsd. Anyagok és módszerek). Azon eseményeket, melyek amplitúdója kisebb volt, mint $0,1 \Delta F/F_0$ illetve a FWHM nem érte el a $0,3 \mu m$ nagyságot, nem vettük számításba.

A *spark*-ok amplitúdóját bemutató hisztogram (26 A ábra) alapján elmondható, hogy a *Cmp1* mutációval a kisebb amplitúdójú *spark*-ok megjelenési frekvenciájában növekedést tapasztaltunk. A kontroll rostokon mért *spark*ok átlagos amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt a *Cmp1* rostokon mértékhez képest ($0,165 \pm 0,001$ vs. $0,154 \pm 0,002$, $P < 0,001$). Ehhez hasonlóan, relatív magasabb számban figyeltünk meg gyorsan kialakuló *spark*-okat a *Cmp1* állatokban a kontrollhoz képest (24B ábra), így az átlagos csúcs eléréséhez szükséges idő szignifikáns csökkenést mutatott ($34,7 \pm 0,9$ -ről $24,3 \pm 0,8$ ms-ra kontroll és *Cmp1* rostokon, $P < 0,01$). Bár a FWHM eloszlásának alakja nem változott a *Cmp1* mutáció hatására (26 C ábra), de szignifikánsan ($P < 0,01$) lecsökkentette az átlagos FWHM értéket a kontroll esetében

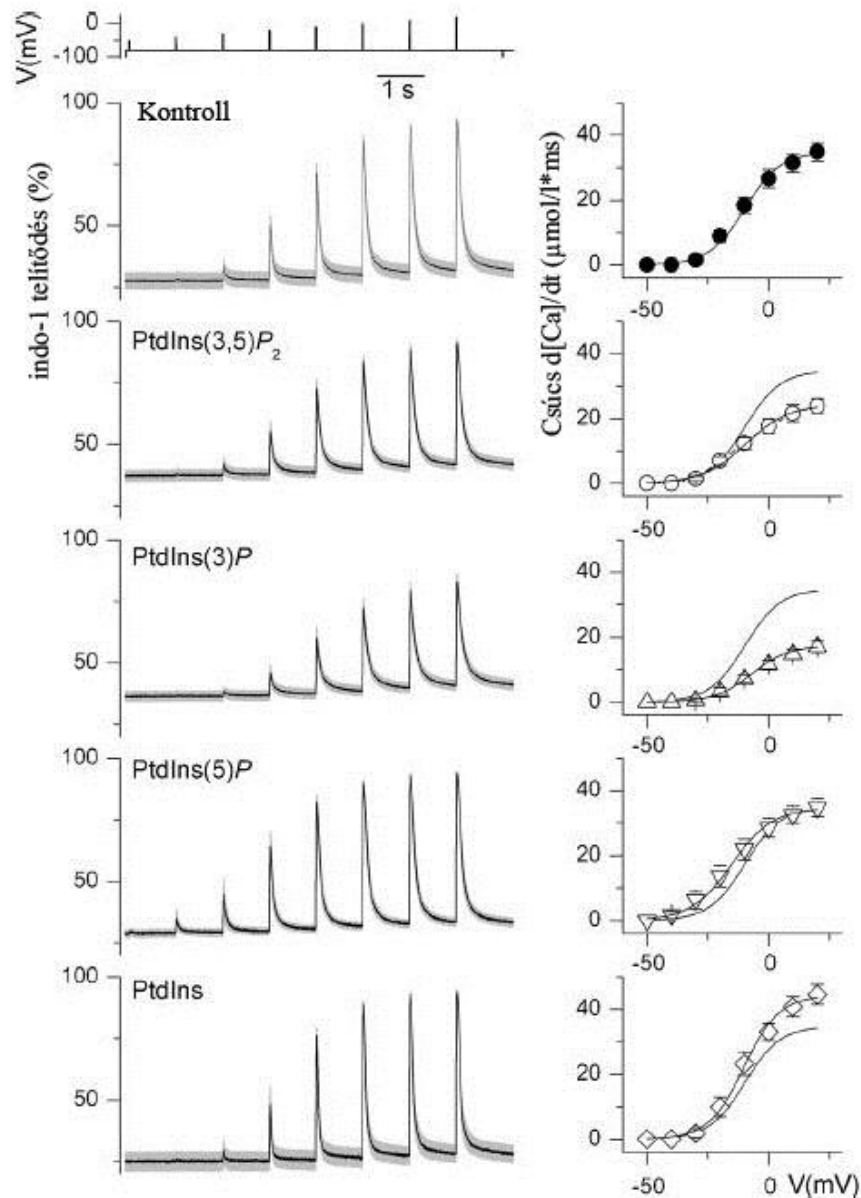
mért $1,92 \pm 0,01$ -ről $1,87 \pm 0,01$ μm -re. Az események időtartamának eloszlása szintén változott a mutáció hatására (26D ábra), relatíve magas frekvenciát mutatva a rövidebb ideig tartó események esetében *Cmpt* egerekben. Ráadásul a spontán elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciája szignifikánsan ($P < 0,001$) csökkent a *Cmpt* állatokból izolált izomrostok esetében ($6,2 \pm 0,5$ Hz) a kontroll állatokhoz ($33,0 \pm 2,7$ Hz) viszonyítva.

III.2. A myotubularin PtdIns szubsztrátjainak hatása a feszültség-aktivált Ca^{2+} felszabadulásra vázizomban

III.2.1. PtdIns(3,5)P₂ és PtdIns(3)P csökkenti a feszültség-aktivált Ca^{2+} felszabadulást

Mivel az MTM1 hiánya súlyos változásokat okoz az EC kapcsolatban (*Al-Qusairi és mtsai., 2009*), különösen érdekelt bennünket a foszfatáz aktivitását befolyásoló szubsztrátok illetve az aktivitás termékeinek hatása. A PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3)P és PtdIns(5)P és PtdIns oldható formáit ezért mikro-injektálás segítségével egyedi FDB izomrostokba juttattuk és az intracelluláris kalciumkoncentrációt feszültség-clamp körülmények között vizsgáltuk. A PtdInsP-ok injektálásánál ügyeltünk arra, hogy a rostokba kerülő végső koncentráció $100\mu\text{M}$ alatt maradjon. A nyugalmi kalciumkoncentráció nem különbözött a kontroll rostok ($0,15 \pm 0,02\mu\text{M}$, $n=16$) és a PtdIns(5)P formával injektált izomrost esetében. Azonban szignifikánsan változott azokban a rostokban, melyeket PtdIns(3,5)P₂-vel ($0,21 \pm 0,02\mu\text{M}$, $n=8$), PtdIns(3)P-vel ($0,20 \pm 0,02\mu\text{M}$, $n=8$) vagy PtdIns ($0,12 \pm 0,02\mu\text{M}$, $n=6$) formával injektáltuk.

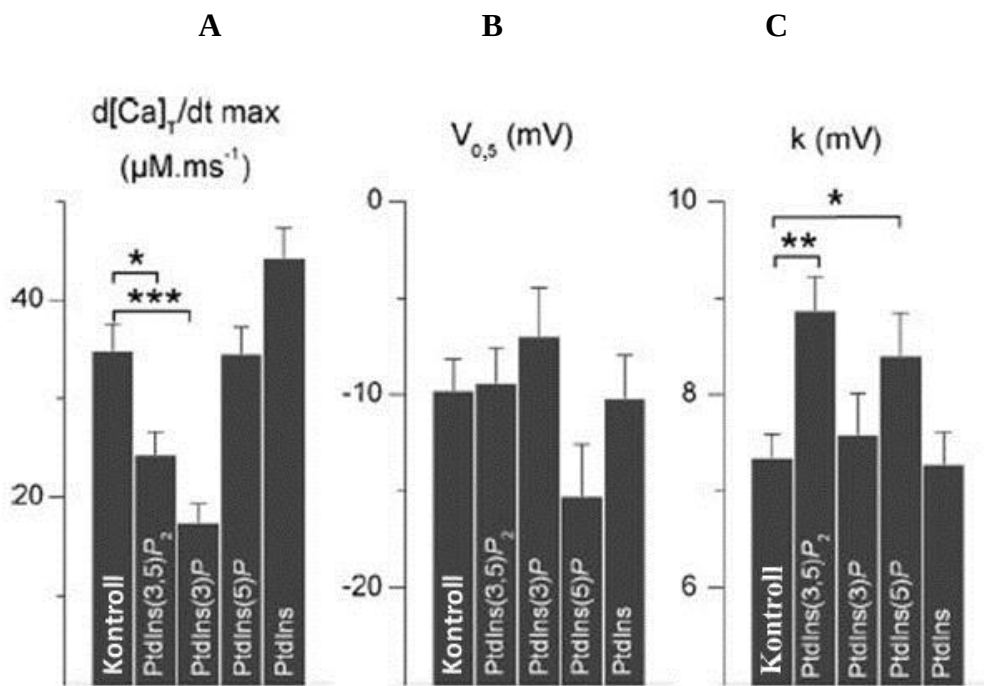
Annak érdekében, hogy megbecsüljük a PtdInsP formák hatását a kalciumtranziensekre és a kalciumfelszabadulásra, a rostokat feszültség-clamp protokollal aktiváltuk. A protokoll egymást követő, 20 ms hosszú depolarizáló pulzusokat tartalmazott, melyek amplitúdója folyamatosan emelkedett a kiinduló -80 mV-os alapszintről. Ezt a protokollt öt alkalommal ismételtük meg minden rost esetében, és a sorozatok eredményét átlagoltuk.



27. ábra Feszültség-aktivált kalciumfelszabadulás PtdInsP injektált FDB rostokon. A baloldalon az indo-1 fluoreszcencia változásainak változásai láthatók (szürke árnyékolás) azon izomrostok esetében, melyeket fentről lefelé, PtdInsP jelenléte nélkül injektáltunk indo-1 festékkel ($n=16$), valamint azon rostoknál, ahol az indo-1 mellett alkalmaztunk még: PtdIns(3,5) P_2 ($n=8$), PtdIns(3) P ($n=8$), PtdIns(5) P ($n=7$) illetve PtdIns ($n=6$) formákat. Az y tengely minden esetben az indo-1 szaturációját mutatja. A feszültség-clamp protokoll az ábra tetején látható. A kalciumfelszabadulás csúcsértékeinek feszültségfüggését a jobb oldalon feltüntetett ábrák mutatják. Az y tengely a csúcsértéket mutatja. A kísérletek kivitelezésében részt vettem.

A 27. ábra bemutat egy jellemző kontroll indo-1 fluoreszcencia változást, amit az ábra tetején látható ingerlő protokollal váltottunk ki. Az ábra bal oldalán láthatóak az átlagos indo-1 fluoreszcencia változások, különböző rostcsoportok esetében. A kvalitatív kinetikai sajátosságokban nem volt nyilvánvaló változás egyik PtdInsP forma jelenlétében sem.

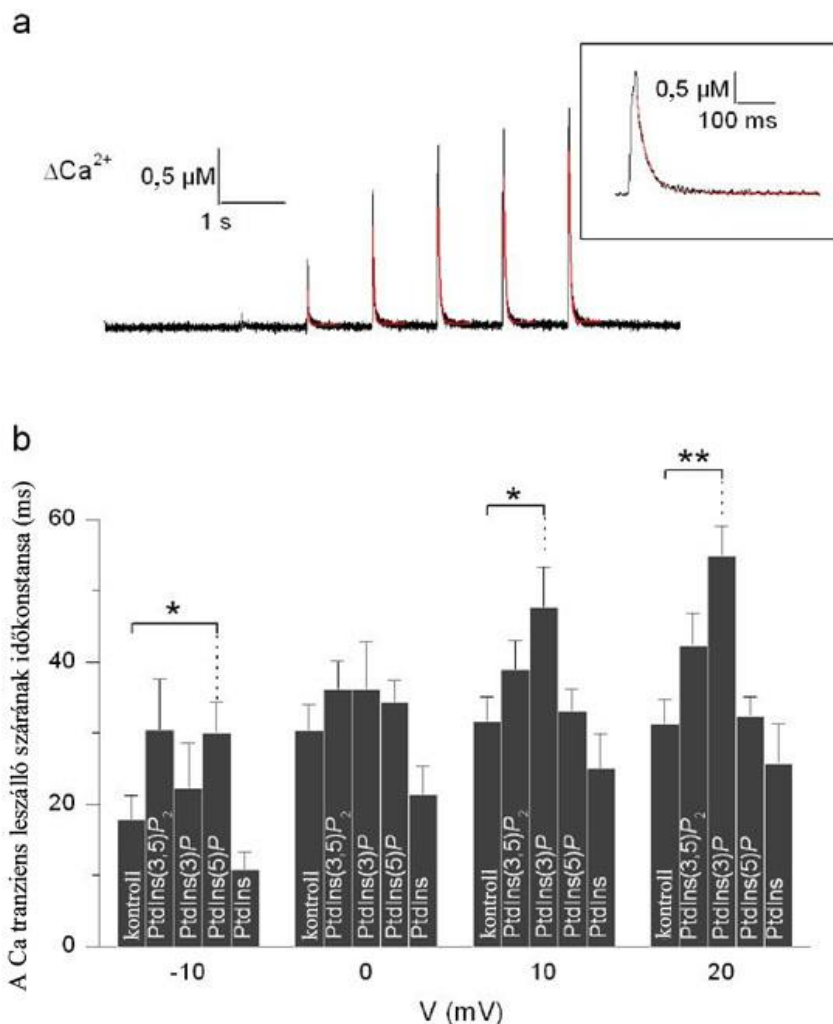
Azonban a csúcs amplitúdó csökkent a PtdIns(3)P jelenlétében, a PtdIns(3,5)P₂ alkalmazása során pedig a kiterjedés mértéke volt kisebb. A 27. ábra jobb oldalán látható a kalciumfelszabadulások csúcsértének feszültség függése kontroll és PtdInsP alkalmazását követően. A csúcs kalciumfelszabadulás feszültségfüggését minden rost esetében Boltzmann függvénnel illesztettük meg.



28. ábra A feszültség-aktivált kalciumfelszabadulás Boltzmann függvény paraméterei PtdInsP injektált rostokban. A kalciumfelszabadulás maximális csúcs hányadosának átlaga, a fél-aktivációs feszültség és meredekség meghatározása a csúcs kalciumfelszabadulásra vs. a feszültség adatokra illesztett Boltzmann állandó meghatározásával történik a különböző PtdInsP formákkal injektált, valamint kontroll rostok esetében. Az **A** panel a maximális kalciumfelszabadulás, a **B** panel a feszültség, míg a **C** panel a meredekség.

A maximális kalciumfelszabadulás csúcsértékeit ($d[Ca]_T/d_T \text{ max}$), az 50%-os aktivációhoz tartozó feszültséget ($V_{0.5}$) és a meredekséget (k) mutatja be a 28. ábra. A kontrollhoz viszonyítva a maximális kalciumfelszabadulás 30-50%-os csökkenést mutatott a PtdIns(3)P ($p < 0,001$) és PtdIns(3,5)P₂ ($p = 0,02$) injektált rostok esetében, míg a meredekség bár kis mértékben, de szignifikánsan növekedett a PtdIns(3,5)P₂ ($p = 0,001$) és PtdIns(5)P ($p = 0,03$) jelenlétében. Annak ellenére, hogy az indo-1 magas affinitást mutat a kalcium iránt és kinetikai sajátásaiból adódóan nem megbízható a nagy és gyors kalciumkoncentráció változások detektálásában, amikor feszültség-clamp módszerrel kombináltuk, a kismértékű depolarizációra adott kalciumválaszok mérésére alkalmas volt, mivel a szaturációs határ alatt maradt a felszabaduló kalcium mennyisége. Így az indo-1 használatát limitáló

tulajdonságoknak nem lehet hatása a vizsgált PtdInsP kalcium koncentrációra kifejtett hatásaira.



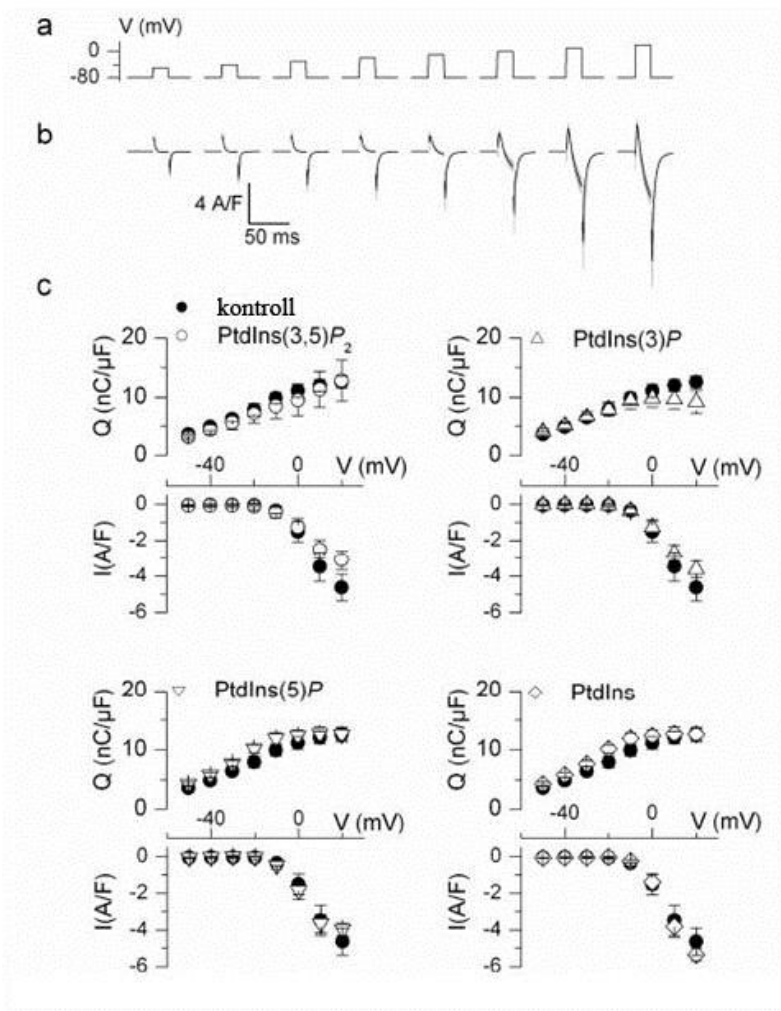
29. ábra PtdInsP injektált izomrostokon mért kalcium transziensek leszálló szárának elemzése. Az **a** panelen rövid impulzusokra válaszul kapott kalcium transzienseket az indo-1 szignálból kalkuláltuk kontroll rostok esetében. A piros vonalak a leszálló szárra illesztett exponenciális görbét mutatják. A baloldalon bekeretezve egy kalcium transziens felnagyított képe látható. A **b** panelen a kalcium visszavétel időállandójának átlagos értékei láthatók különböző kezelések esetében. A membrán depolarizálása -10 és +20mV között történt.

A kalciumtransziensek leszálló szárának elemzése során (29. ábra) a citoszolikus kalcium eltávolítás szignifikánsan lassabbnak bizonyult a PtdIns(3)P injektált rostok esetében.

Fontos kérdésként felmerült, hogy vajon a csökkent kalciumfelszabadulást a csökkent SR kalcium tartalma okozza e. A kérdés megválaszolása érdekében számos kísérletet végeztünk az SR kalcium tartalmának meghatározására kontroll és különböző, a leghatásosabb

kalciumfelszabadulást okozó PtdInsP formákkal injektált rostok esetében. Az egyik kísérlet során egy olyan ingerlési protokollt alkalmaztunk, melyben nagy mennyiségű EGTA-t tartalmazó citoszolba ürítettük az SR kalcium tartalmát. A mérések $n=5$ kontroll rostokon és $n=6$ $0,1 \text{ mM PtdIns(3)P}$ formával ekvilibrált rostokon történt. Az SR kalcium tartalma a kontroll rostok esetében $2,1 \pm 0,5$, míg az injektált rostoknál $2,6 \pm 0,4$, ami statisztikai szempontból nem szignifikáns. Ezek az adatok tehát kizárták annak a lehetőségét, hogy a csökkent kalciumfelszabadulás az SR csökkent kalcium tartalma miatt alakult volna ki.

Mivel nem az SR kalcium tartalma okozza a csökkent választ, a következő szóba jöhető lehetőség a DHPR érintettsége lehet. A következő lépésünk során tehát ki kellett deríteni, hogy valóban a DHPR játszik-e szerepet a csökkent kalciumfelszabadulás kialakulásában. Ennek érdekében analizáltuk a feszültség-clamp mérések során rögzített membrán áramokat.

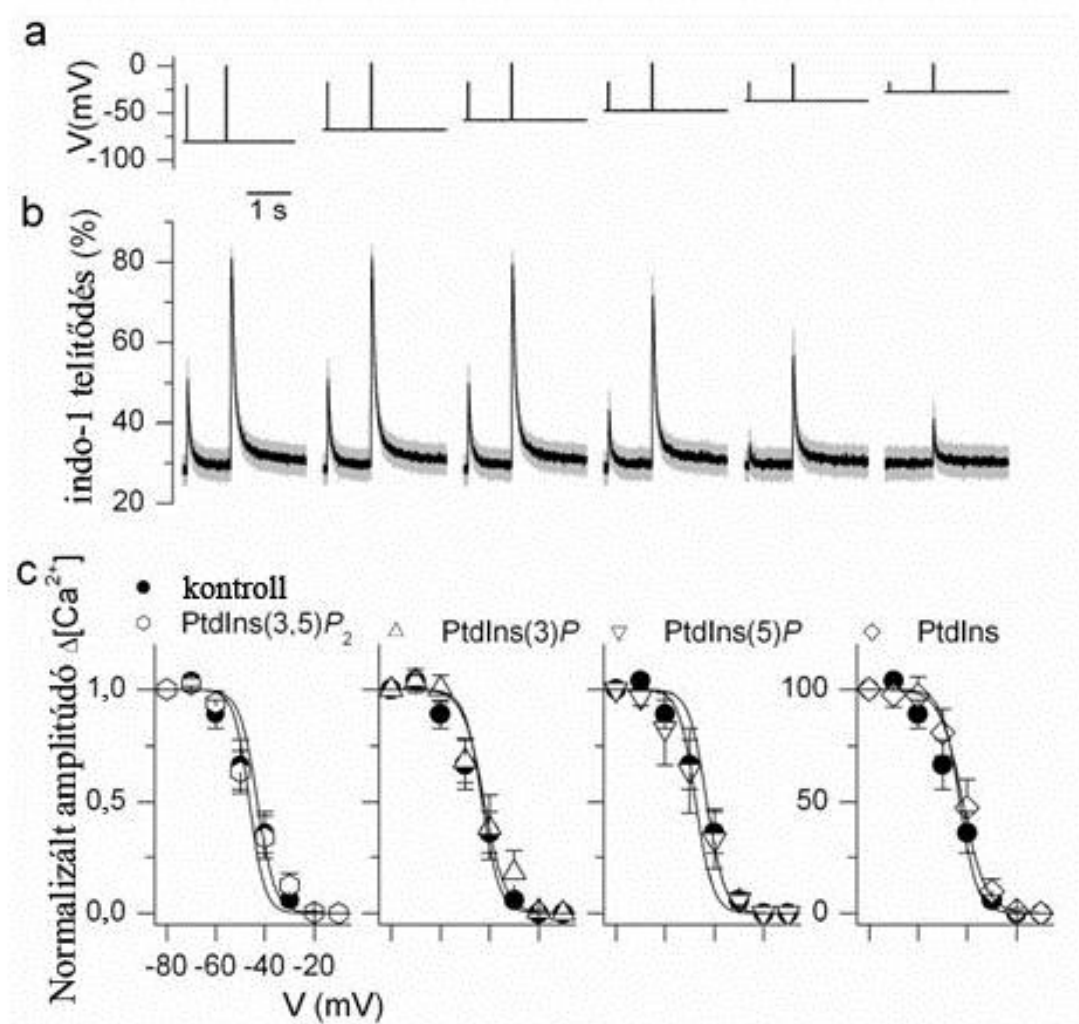


30. ábra A PtdInsP formákkal injektált rostokon mért feszültség-aktivált membrán áramok nem-lineáris változásai. Az **a** panelen a feszültség-clamp protokoll látható. A **b** panelen a membrán áramában bekövetkező változások átlagos ($\pm$ S.E.M., szürke árnyalás) impulzusának képe látható kontroll rostokon. A **c**

panelen a töltés alatti és a depolarizációs impulzus végén mért membrán áram átlagos értékeinek feszültség függése.

A 30. ábra ábrán láthatók ezek a mérések. Az eredmények azt mutatják, hogy sem a DHPR feszültség érzékenységét, sem pedig a kalciumcsatornaként betöltött szerepét nem befolyásolták a PtdInsP formák jelenléte.

A PtdInsP formák kalcium tranziensekre gyakorolt hatásának vizsgálata során felmerült a kérdés, miszerint a kalciumfelszabadulás feszültségfüggő inaktiválódása vajon érintett-e. Hogy választ kapjunk a kérdésre, kalcium tranzienseket rögzítettünk, melyeket 20 ms hosszú - 20 és 0 mV közötti impulzusokkal váltottunk ki.



31. ábra. A Ca^{2+} -felszabadulás feszültség-függő inaktivációja PtdInsP kezelt rostokban. Az a panelen a feszültség-clamp protokoll látható. A b panelen az átlagos ($\pm$ S.E.M., szürke árnyalás) indo-1 szaturációs jel látható kontroll rostok esetében (n=12) az a panelen látható protokollt alkalmazva. A c panelen a kalciumfelszabadulás inaktivációjának feszültség-függése látható azon rostok esetében, melyeket PtdIns(3,5)P₂ (n=6), PtdIns(3)P (n=6), PtdIns(5)P (n=6) és PtdIns (n=6) formákkal injektáltunk. A kontroll rostokon mért

adatokat (fekete körök) is feltüntettük a c panelen. A $V_{0,5}$, a fél-inaktivációhoz tartozó áram és a meredekségi faktor adataira Boltzmann-függvényt illesztettünk. A kísérletek elvégzésében részt vettem.

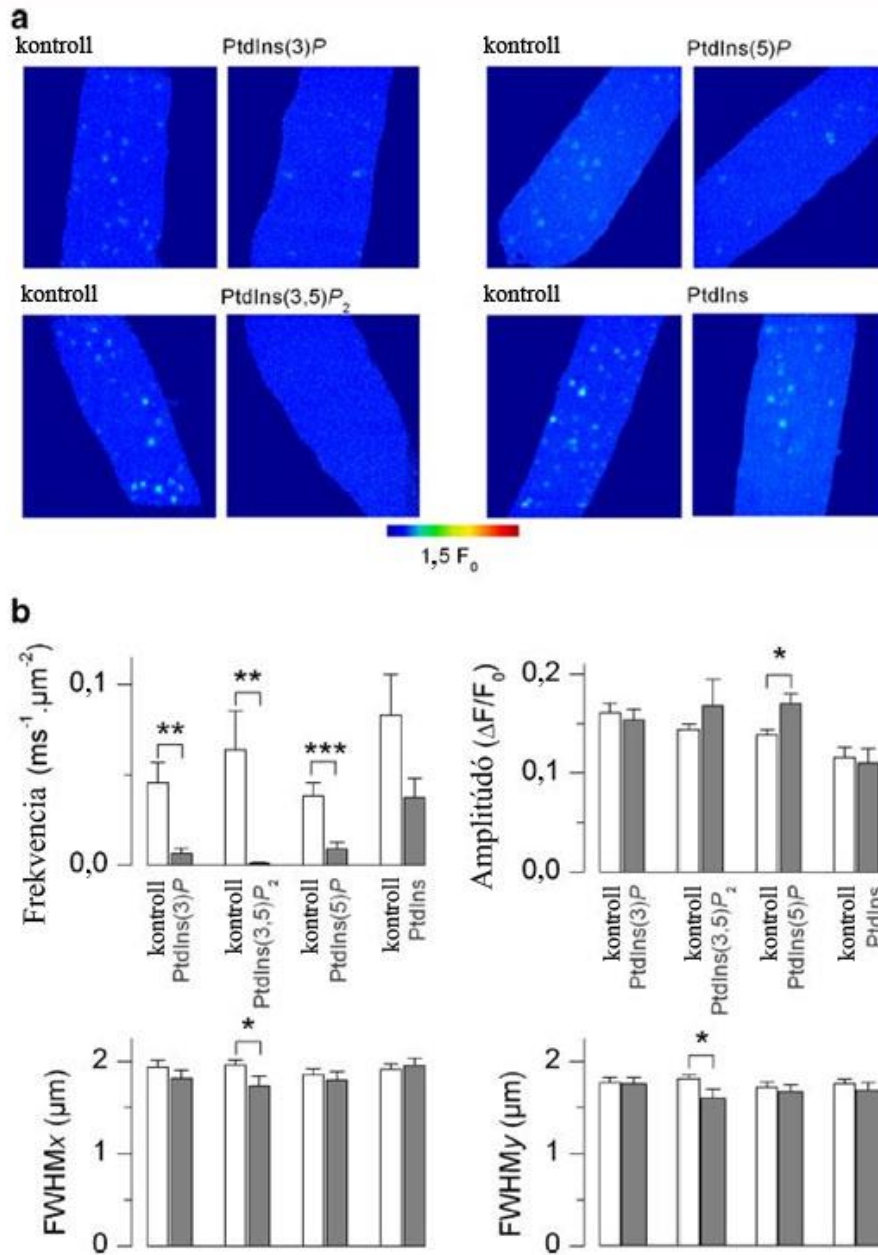
Az impulzus protokoll és a hozzá tartozó átlagos ($\pm$ S.E.M.) indo-1 szaturációs sorozatokat a 31 a és 31 b ábra mutatja be. Minden rost esetében a csúcs kalciumtranziens amplitúdóját az indo-1 jelből számoltuk ki, melyeket a nyugalmi feszültség (-80mV) alatt mért értékekre normalizáltunk. Nem találtuk annak jelét, hogy bármely alkalmazott PtdInsP hatással lett volna az inaktiváció folyamatára, ezt a 31 c ábra illusztrálja, ahol a kalcium tranziensek normalizált csúcsamplitúdóit hasonlítottuk össze különböző izomrost csoportok esetében. Boltzmann-függvényt illesztve az adatokat, nem találtunk különbséget a kontroll és bármely PtdInsP formával injektált rostok között a fél-inaktivációs feszültségére és meredekségére vonatkozóan.

III.2.2. A PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3)P és PtdIns(5)P csökkentette az elemi kalciumfelszabadulási események számát permeabilizált izomrostokban

A permeabilizált izomrostokon mért spontán elemi kalciumfelszabadulási események lehetőségét biztosítanak a RyR funkcionális tulajdonságainak natív környezetben történő tanulmányozására anélkül, hogy a DHPR bármilyen kontrollt gyakorolna rá (*Kirsch és mtsai., 2001; Lukács és mtsai., 2008*). Ezen lehetőséget kihasználva megvizsgáltuk, hogy a PtdInsP formák gyakorolnak-e bármiféle direkt hatást a RyR szabályozott kalciumfelszabadulási aktivitásra, így betekintést kaphatunk a jelenség mögött álló mechanizmusba. A spontán kalciumfelszabadulási eseményeket gyors konfokális (x,y) képalkotó eljárással rögzítettük, 15 perces PtdInsP előkezelést követően, és a mérési eredményeket azon kontroll rostokon mért eseményekkel vetettük össze, melyeket ugyan olyan körülmények között inkubáltuk, azonban standard mérési oldatban.

A 32. ábra egy reprezentatív (x,y) konfokális mikroszkóppal felvett mérés eredményét mutatja be. Minden képet 200 egymás után rögzített kép összegeként kaptunk. Azon rostok esetében, amelyeket PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3)P és PtdIns(5)P formákkal inkubáltuk, a detektált események száma csökkenést mutatott, a legnagyobb hatást a PtdIns(3,5)P₂ esetében figyelhettük meg. A 27 b ábra a mért elemi események számolt paramétereinek átlagos értékét mutatja. Az események megjelenési frekvenciája erősen csökkent, a PtdIns formán kívül a másik három tesztelt PtdInsP forma jelenlétében, a PtdIns(3,5)P₂ esetében ez a csökkenés a 98%-ot is elérte a kontroll rostokon mért események frekvenciájához képest. Az események amplitúdója a PtdIns(5)P jelenlétében bár kissé, de szignifikánsan emelkedett, míg az FWHM

értéke mind x, mind y irányban körülbelül 10 % csökkenést mutatott PtdIns(3,5)P₂ jelenlétében.



32. ábra PtdInsP hatásai a spontán elemi kalciumfelszabadulási eseményekre. Az **a** panelen összegzett elemi kalciumfelszabadulási események láthatóak, melyeket Fluo-3 festék segítségével mértünk, 200 egymást követő képsorozat rögzítésével kontroll rostokon valamint PtdInsP különböző formáival ekvilibrált rostok esetében. A **b** panelen az elemi kalciumfelszabadulási események paramétereinek átlagát látjuk különböző izomrost csoportokban (kontroll n=27, PtdIns(3,5)P₂ n=28, PtdIns(3)P n=29, PtdIns(5)P n=40, PtdIns n= 11). Minden kép mérete 84x84μm. A kísérletek elvégzésében illetve az adatok elemzésében részt vettem.

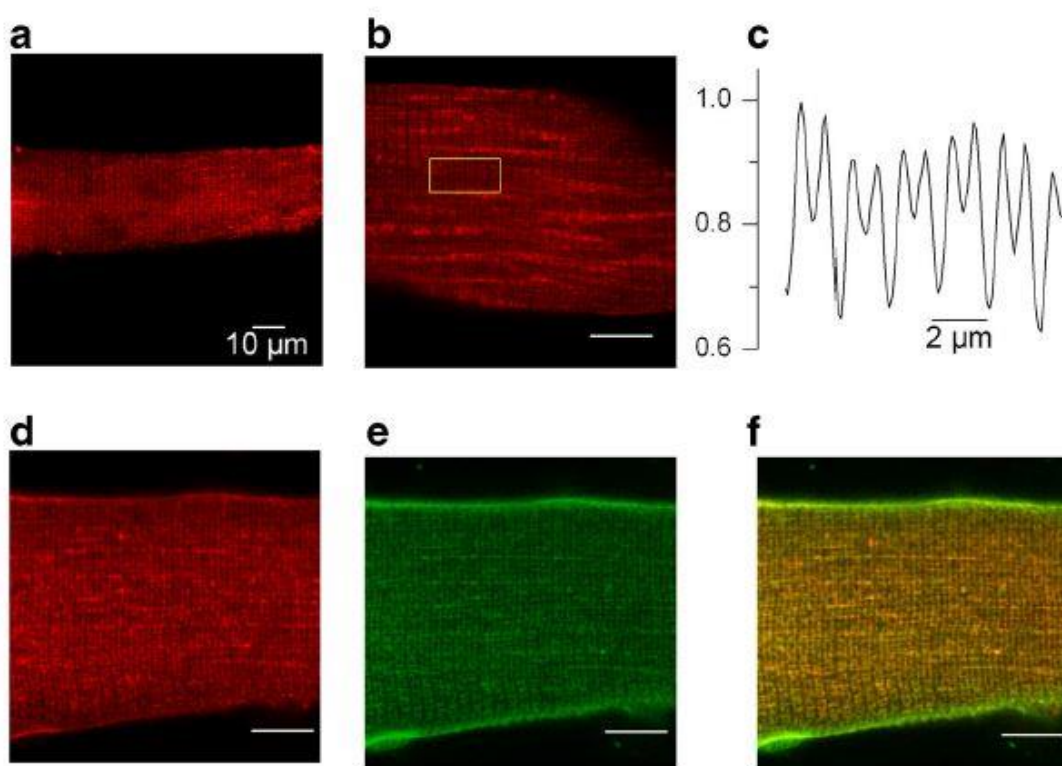
Összegezve megállapíthatjuk, hogy a vizsgált PtdInsP formák szerényen hatással vannak az individuális események amplitúdójára és térbeli paramétereire. A PtdInsP formák az események előfordulási valószínűségét igen nagymértékben csökkentik, azaz a kezelt rostok esetében a kalciumfelszabadulási események frekvenciája erős csökkenést mutatott a kontroll rostokon tapasztaltakhoz képest. Ezen mérési sorozatokból azt is megfigyeltük, hogy az események frekvenciájában bekövetkező csökkenés a három forma esetében már a mérés kezdeti szakaszán is megmutatkozott. Például PtdIns(3,5)P₂ alkalmazását követően az első 200 képsorozat rögzítése során az átlagos esemény frekvencia 92%-al csökkent a kontroll izomrostokon mért eseményszámmal összehasonlítva. Az elemi kalciumfelszabadulási események aktivitásának tanulmányozása érdekében specifikus kísérleteket végeztünk. A célunk az volt, hogy kiderítsük, vajon az elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciájára legnagyobb hatást gyakoroló PtdIns(3,5)P₂ által esetlegesen indukált korai tranziens növekedés a spark aktivitásban megtörténhet-e a kísérleteink során, mert ha igen, akkor az SR-ben kalcium depléciót okoz, amely az elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciájának csökkenéséhez vezet. Mivel a fentebb leírt kísérletek protokollja szerint a rostokat 15 percig inkubáltuk a PtdInsP formákkal a mérés megkezdése előtt, ezen idő alatt lehetséges, hogy bekövetkezik az SR kalcium tartalmának csökkenése miatti frekvenciacsökkenés. A feltételezésünk igazolása érdekében 3 perccel azután, hogy a mérőoldattal az inkubációt megkezdjük (mind kontroll, mind a PtdInsP formákat tartalmazó oldatok esetében), 200 képből álló sorozatokat vettünk fel minden harmadik percben. Az eseményeket minden sorozatnál megszámoltuk. A mérések eredményeként az 5 kontroll és 3 PtdIns(3,5)P₂ formával inkubált rost esetében nem találtunk szignifikáns változást az idő függvényében a sparkok megjelenésében. Az abszolút értékek esetében a frekvenciában a PtdIns(3,5)P₂ formával inkubált 3 rost esetében 65-80% csökkenés volt megfigyelhető a kontrollhoz képest. Bár ez a csökkenés kissé elmarad a 27. ábrán bemutatottól, az eredmény egyértelmű bizonyíték arra, hogy nem volt jele bármilyen PtdIns(3,5)P₂ által kiváltott stimuláló hatásnak az elemi kalciumfelszabadulási események aktivitása szempontjából.

Végül, de nem utolsó sorban a PtdIns(3,5)P₂ formával inkubált 2 rost esetében a kísérlet végén a mérőoldatot kicseréltük 0,4 mM 4-kloro-m-cresol (CMC), 4 μ M tapsigargin (Tg) és 50 μ M N-benzyl-p-toluenesulfonamid (BTS) tartalmú mérőoldatra annak érdekében, hogy globális kalciumfelszabadulás történjen. A BTS alkalmazására az izomrost összehúzódásának megakadályozása miatt volt szükség. Mindkét rost esetében igen jelentős fluoreszcencia

intenzitásbeli növekedés volt megfigyelhető, amely azt bizonyítja, hogy az SR belsejében található kalcium továbbra is akadály nélkül hozzáférhető volt.

III.2.3. Az MTM1 overexpressziója nem befolyásolja a feszültség-aktivált kalciumfelszabadulást

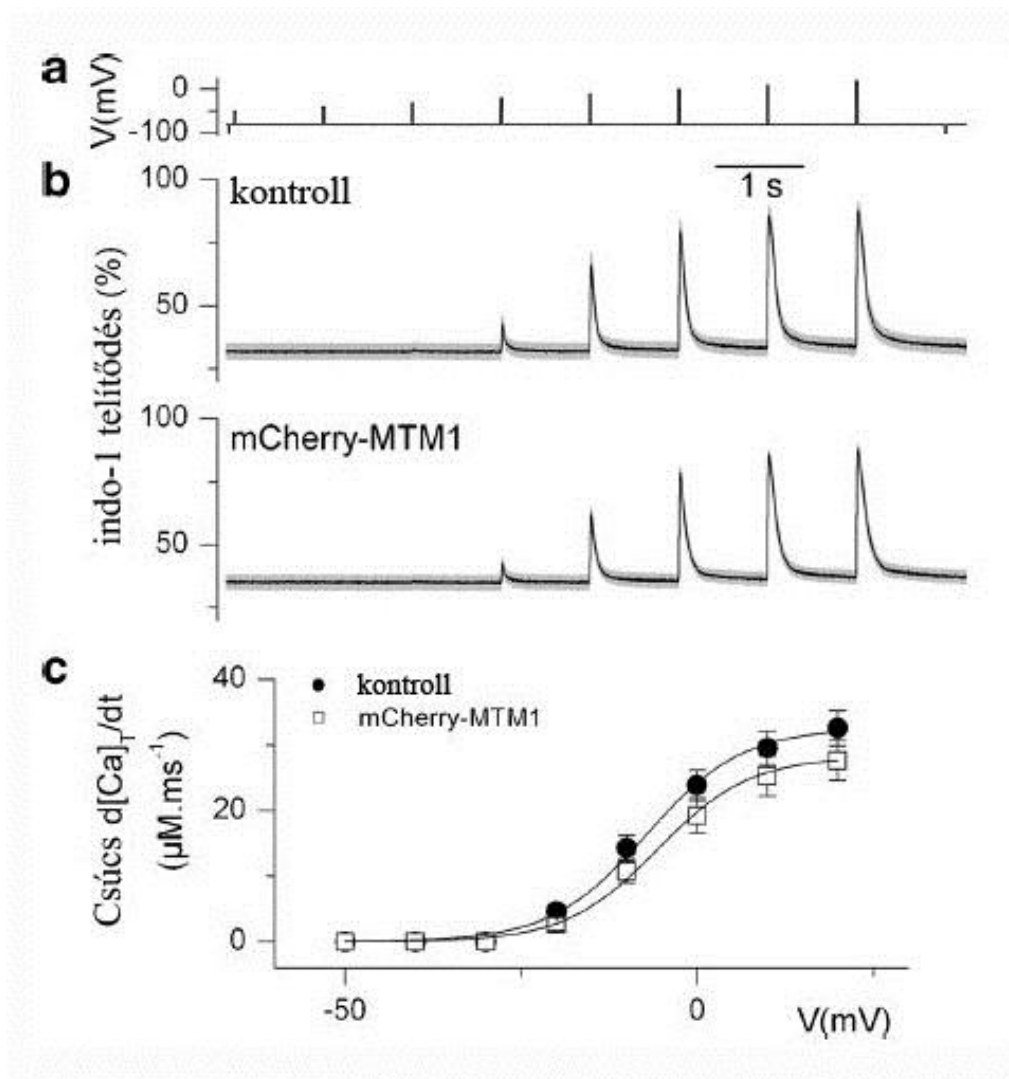
Az MTM1 PtdInsP foszfatáz fő szubsztrátjai a PtdIns(3,5)P₂ és a PtdIns(3)P. Az egyik alternatív lehetőség ezen szubsztrátok szintjének csökkentésére az MTM1 overexpressziója lehet. E lehetőség meglehetősen nagy figyelmet kapott, mivel ezen foszfatázként betöltött szerepének aktivitásbeli csökkenése számos patológiás EC kapcsolat kialakulásáért felelős (Al-Qusairi és mtsai., 2009).



33. ábra MTM1 expresszió egér vázizom rostokban. A reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült képeken a PtdInsP foszfatázként működő mCherry-MTM1 expressziója az **a-b** paneleken látható. A **c** ábra a **b** képen sárga négyzettel határolt terület fluoreszcens profilját mutatja. A **d-f** paneleken az mCherry és di-8-ANEPPs kolokalizációja figyelhető meg. A képeken a fehér skálavonalak 10 µm hosszúságot jelölnek. A kísérletek elvégzésében részt vettem.

A 33. ábrán az MTM1 mCherry kapcsolt expressziós mintázata figyelhető meg FDB izomrostokon, *in vivo* transzfekciót követően. A 33 A- 33 C ábrák azt mutatják, hogy az mCherry-MTM1 a rost egész területén megjelenik és érdekes módon a fluoreszcencia egy tisztán kivehető transzverzálisan csíkozott dupla sorokba rendeződve jelenik meg, a vonalak

közötti távolság pedig nagyjából $2\ \mu\text{m}$, a mintázatuk pedig a triád régióra emlékeztet. Ezen hasonlóságról való megbizonyosodás érdekében a T-tubulusokat megjelenítő di-8-ANEPPs (33 D-33 F ábra) fluoreszcens festékkel kolokalizáltuk az mCherry által kibocsátott fluoreszcenciát, ami teljes átfedést mutatott.



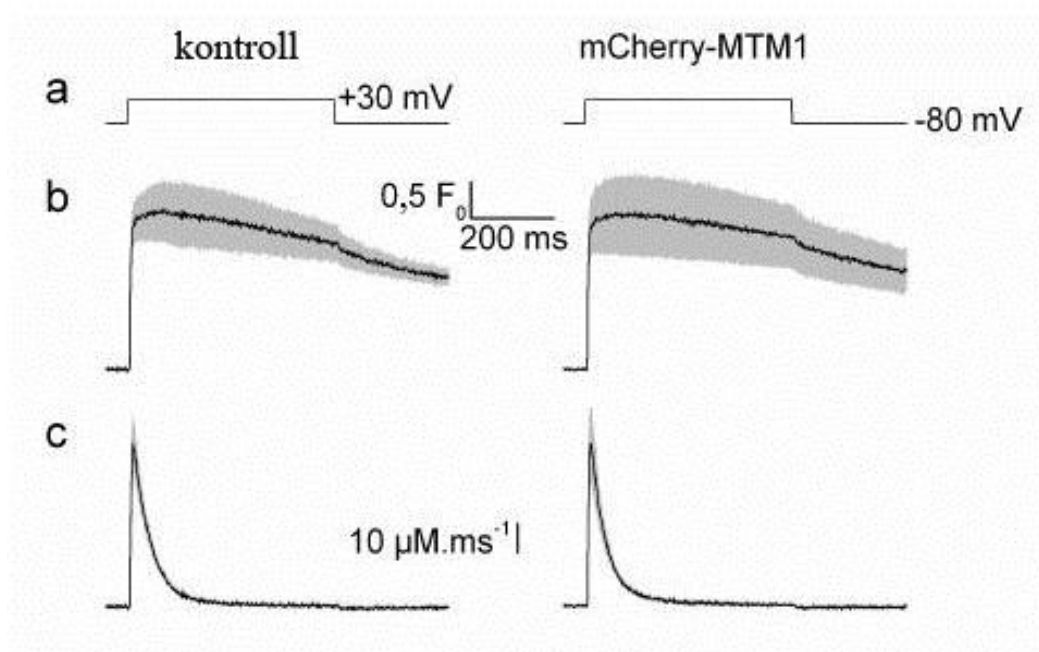
34. ábra mCherry kapcsolt MTM1 expresszáló rostok feszültség-függő kalciumfelszabadulása. Az **a** panel a feszültség-clamp protokollt mutatja. A **b** panel az átlagos ($\pm\text{SEM}$, szürke árnyékolás) indo-1 fluoreszcenciaváltozás görbe kontroll ($n=11$) és mCherry-MTM1 pozitív rostok ($n=11$) esetében. A **c** panelen a kalciumfelszabadulás csúcsához tartozó feszültség függés látható a két rosttípus esetében.

A 34. ábra mutatja az exogén MTM1 expresszió hatását az indo-1 segítségével mért feszültségaktivált kalciumfelszabadulásra. A 34 B mutatja az átlagos ($\pm\text{SEM}$) indo-1 fluoreszcenciaváltozás átlagát $n=11$ kontroll és $n=11$ mCherry-MTM1 expresszáló rostokból a 34a ábrán bemutatott pulzus protokollra adott válaszok esetében. A 34 C ábrán a csúcs kalciumfelszabadulás feszültségfüggését mutatja be. Annak ellenére, hogy egy gyenge

csökkenés figyelhető meg a csúcs kalciumfelszabadulásban az MTM1-et overexpresszáló rostok esetében a kontroll rostokhoz képest, a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

Az adatokra Boltzmann függvényt illesztve megkaptuk a maximális csúcs kalciumfelszabadulást ($32,5 \pm 3 \mu\text{M ms}^{-1}$ vs $28,2 \pm 3 \mu\text{M ms}^{-1}$), az 50%-os aktiváció feszültségét ($-7,2 \pm 1 \text{ mV}$ vs $-5,6 \pm 1 \text{ mV}$), valamint a meredekséget ($6,8 \pm 0,2 \text{ mV}$ vs $6,5 \pm 0,4 \text{ mV}$) kontroll, és MTM1 overexpresszáló rostok esetében.

Az indo-1 egy magas affinitású festék, amely nagy lépésben történő depolarizáció esetében hamar szaturál. Ez a jelenség gátolhatja az esetleges MTM1 overexpresszió kalciumfelszabadulást erősítő hatását. Ennek elkerülése érdekében a transzfektált rostok kalciumtranzienseit Fluo-4 nem rációmetrikus fluoreszcens kalciumindikátorral való töltéssel valamint magas EGTA tartalmú külső oldat alkalmazásával is rögzítettük. Nem találtunk arra utaló jelet, hogy az MTM1 overexpressziója hatással lenne a feszültségaktivált kalciumfelszabadulásra (35. ábra).

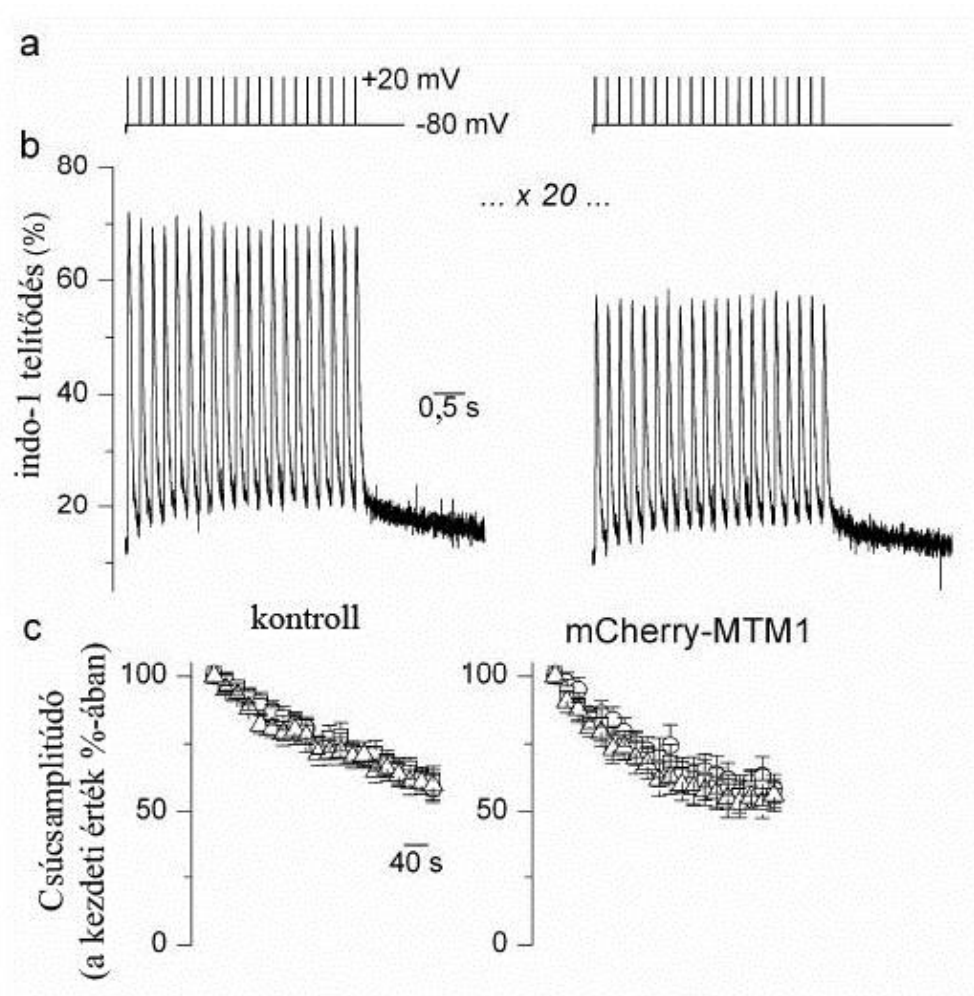


35. ábra mCherry kapcsolt MTM1 expesszáló rostok feszültség aktivált Ca^{2+} felszabadulása. Az **a** panelen a feszültség-clamp stimulációs protokoll látható. A **b** panelen az átlagos ($\pm\text{SEM}$, szürke árnyékolás) Fluo-4-AM F/F_0 görbéi láthatók kontroll (baloldal, $n=7$) és mCherry-MTM1 pozitív rostok (jobb oldal, $n=7$) esetében. A **c** panelen az átlagolt ($\pm\text{SEM}$, szürke árnyékolás) kalciumfelszabadulás görbéi láthatók a két esetben.

Azon lehetőség kizárása érdekében, hogy az mCherry tag valamilyen módon befolyásolja az MTM1 aktivitását, tehát akadályozza funkciójának ellátásában, olyan rostokon is váltottunk ki kalciumtranzienseket, melyeket MTM1 tag-free, valamint eGFP kódolt plazmiddal

transzfektáltunk. A feszültségaktivált kalciumtranziensek ezeken a rostokon, összehasonlítva a csupán eGFP-t expresszáló rostokon mért tranziensekkel azt mutatták, hogy a tag-free MTM1 nem bizonyult hatásosabbnak az mCherry kapcsolt MTM1-et overexpresszáló rostokon mértékhez képest. Tehát az mCherry semmilyen módon nem volt hatással az MTM1 működésére.

Végül olyan kísérleteket is végeztünk, melyek meggyőzhettek minket arról, hogy az exogén MTM1 jelenléte befolyásolja-e a kalciumfelszabadulást az izom funkcióinak szigorúbb vizsgálati körülményei között. Ezért a kalciumtranzienseket oly módon mértük, hogy ismételt stimulusokat alkalmaztunk, annak érdekében, hogy a membránt depolarizáljuk.



36. ábra A feszültség-aktivált indo-1 Ca^{2+} tranziensek kontroll és mCherry-MTM1 pozitív rostok esetében. Az a panel a stimuláló protokoll, ahol 20 egymást követő, egyenként 10 ms hosszúságú impulzusokat alkalmaztunk minden 20. másodpercben. A b panelen egy illusztrált indo-1 szaturációs sorozat látható kontroll esetben ahol a baloldali ábrán az első, míg a jobb oldalon az utolsó sorozatra adott válasz látható. A c panelen az indo-1 kalciumtranziensek relatív csúcsamplitúdójának időfüggése látható az első sorozat (körök), a 10. sorozat

(négyzetek) és a 20. sorozat (háromszögek) esetében kontroll (baloldal, n=10) és mCherry-MTM1 pozitív (jobb oldal, n=8) rostoknál.

A 36. ábra szolgál bizonyítékkal arra, hogy MTM1 overexpressziója nincs hatással a kalcium tranziensekre.

IV. Megbeszélés

IV.1. A myostatin deficiencia hatása az EC-kapcsolatra

A myostatin knock-out, csak úgy, mint a *Cmpt* egerek, a megnövekedett izomtömegük ellenére a kontroll állatokhoz képest csökkent izomerővel rendelkeznek (*Amthor és mtsai.*, 2007). Annak ellenére, hogy ezekben az egerekben a rostok minőségi összetételében és metabolikus állapotukban változások következnek be (*Girgenrath és mtsai.*, 2005), egyértelmű magyarázatot a kontraktilis funkcióban bekövetkező változásokra még nem ismerünk. Munkánk során egyrészt megerősítettük a más kutatócsoportok által korábban leírt *in vivo* kísérletek eredményeit, másrészt bizonyítani próbáltuk azt, hogy nem a kontrakciós mechanizmus aktivációjának változása, hanem a kalcium szignalizációban bekövetkező változások magyarázzák az erő kifejtésében kifejeződő csökkenést.

Az *in vivo* eredményeink szinkronban vannak a korábban *Mstn*^{-/-} állatokon publikált (*Amthor és mtsai.*, 2007, *Savage & McPherron*, 2010) és *Cmpt* egereken (*Amthor és mtsai.*, 2007) végzett kísérletekkel, ahol az állatok csökkent fizikai teljesítményt mutattak, hiszen a *Cmpt* állatok kevésbé mutatkoztak agilisnak a futómalomban végzett kísérleteink során. Ezt erősíti az a megfigyelésünk is, hogy a Grip-teszt elvégzésekor kapott normalizált erő (az abszolút erőt normalizáltuk a testtömegre) csökkent a vad típusú kontroll állatokhoz képest. Ezen tesztek során bebizonyosodott az az állítás is, hogy a *Cmpt* állatok a megnövekedett izomtömegük ellenére nem bizonyultak erősebbnek a kontroll társaikhoz képest. Ez a megfigyelés, mivel *in vivo* kísérletekről van szó, nem korlátozódhat csupán a vázizom teljesítményében bekövetkező csökkenésre. A csökkent aktivitás egyéb okai közé tartozhat a kardio-vaszkuláris vagy a respiratorikus rendszerben bekövetkező változások, így ezekkel együtt magyarázható a futómalomban nyújtott gyengébb teljesítmény a *Cmpt* állatok esetében. Ezen feltételezett okok mellett a mi elképzelésünk is helyt állhat, miszerint az EC kapcsolatban bekövetkező változások és módosulások nagymértékben befolyásolhatják a gyengébb teljesítményt.

A későbbi kutatások alapján a megváltozott metabolizmus az izomrostokban összefüggésben áll a myostatin mutációjával, ide tartozik az oxidatív állapot felé elcsúszás is (*Girgenrath és mtsai.*, 2005; *Baán és mtsai.*, 2013) csak úgy, mint a kontrakció során felhasznált ATP mennyiségének hatalmas megnövekedése (*Giannesini és mtsai.*, 2013). Ezen eredmények azt sugallják, hogy a csökkent specifikus erőért a megváltozott aktin-miozin kölcsönhatás a felelős, mivel a miozin expresszióban módosulások következtek be. Ezen feltételezéssel ellentétben nem találtunk semmilyen változást a pCa függő erő generálásban kémiai

nyúzott izomrost szegmensek vizsgálata során. Sem a gyors, sem pedig a lassú típusú rostok esetében sem figyeltünk meg változást a kalcium érzékenység-feszültség összefüggésében. Ráadásul a maximálisan kiváltható erő mértéke hasonló volt a kontroll és a *Cmpt* állatokban. Másrészt az akcióspotenciál által kiváltott intracelluláris kalciumkoncentrációban bekövetkező csökkenés magyarázhatja a tenzióban történő jelentős csökkenést, mivel az akcióspotenciál sorozatok a fizioiógias körülmények között, azaz *in vivo* bekövetkező összehúzóást imitálják. Megjegyzendő, hogy az intracelluláris kalcium koncentrációban bekövetkező csökkenés és a következétesen fennálló alacsonyabb erőszint, a feszülés-pCa függésének mérései alapján, arányosan kisebb volt, mint az izom átmérőjének növekedése ($2,35 \pm 0,19$ vs. $6,93 \pm 0,32$ mm² kontroll (n=13), és *Cmpt* (n=19) törzsekben, EDL esetén ($P < 0,001$), nem számolva teljesen a Grip-teszt esetében mért nagyobb erővel.

Az SR kalciumfelszabadulás fluxusa a globális kalcium tranziensekből volt kiszámolva, és egy 33% nagyságú csökkenés volt megfigyelhető a csúcs és a fenntartott fluxus esetében. Mivel a csúcstértékről a fenntartott értékre történő visszatérés aránya nem változott a *Cmpt* egerekben az SR-ből történő kalciumfelszabadulás fluxusának görbéje esetén, a kalciumcsatornák aktivációs és inaktivációs kinetikájának változása valószínűleg nem érintett a *Cmpt* törzsben.

Ezt a megfigyelést további eredményeink is megerősítették, melyek szerint az SR kalciumfluxusának a csúcs eléréséhez szükséges idő, valamint az inaktiváció konstansának aránya egyáltalán nem változott. Az utóbbiban egy enyhe, de nem szignifikáns, növekedés volt megfigyelhető, amely összhangban van azon korábbis eredményekkel, melyek szerint a lassabb inaktivációt a csökkent SR-ből történő kalciumfelszabadulás okozza (*Sárközi és mtsai.*, 1996). Mi több, az akcióspotenciállal kiváltott kalciumtranziens során az SR-ből felszabaduló kalcium mennyiségében is megfigyeltek csökkenést.

Ezek a megfigyelések három lehetőséget kínálnak az eredményeink magarázatára, de az is előfordulhat, hogy ezen lehetőségek kombinációja áll fenn.

Egyrészt, az SR kalcium tartalmában csökkenés figyelhető meg, másrészt csökken a RyR csatornák permeabilitása/konduktanciája, harmadrészt pedig az aktivált RyR csatornák száma is csökkent. Azonban hangsúlyozni kell azt, hogy ezen változások jelentősége nem lehet túl széleskörű, vagy pedig az inaktiváció kinetikájában bekövetkező változások velejárói a csökkent SR kalciumfelszabadulásnak.

Valójában az SR kalciumfelszabadulás fluxusában bekövetkező csökkenés összhangban van az előzetes tanulmányokkal, melyek az SR deplécióját az SR kalciumfelszabadulását vizsgálták (*Klein és mtsai.*, 1988). A csökkent RyR permeabilitás vagy SR kalcium tartalom

magyarázhatja a metabolikus arányban bekövetkező változásokat, mivel a RyR redukció érzékenységét már számos alkalommal leírták (pl.: Liu és mtsai., 1994, Bull és mtsai., 2007, Petrotchenko és mtsai., 2011). Ezek a közlemények arra engednek következtetni, hogy a redukzív állapotok átformálják a csatornát és annak a kinyílása kevésbé lesz valószínű, míg az oxidatív kondíciók ennek a kinyílásnak a lehetőségét megnövelik, így nagyobb lesz a valószínűsége annak, hogy a RyR kinyílik (Marengo és mtsai., 1998). Ebből adódóan, a redukált állapot felé való eltolódás a mioplazmában egy csökkent aktivációt eredményezhet, míg az oxidatív állapot felé való elmozdulás egy magasabb nyugalmi SR szivárgáshoz és ezáltal csökkent SR kalcium tartalomhoz vezet (Oba és mtsai., 2002). Ezek szinkronban vannak az általunk megfigyeltekkel. Annak érdekében, hogy meghatározzuk, vajon a RyR csatornák érintettek-e a *Cmpt* törzsben, a csatornán történő közvetlen mérések lennének szükségesek.

Jelen munkánkban megpróbáltam betekintést nyerni a csatorna funkciójába Saponinnal „nyúzott” rostokon és meghatározni a kalciumfelszabadulási események tulajdonságait.

Habár ezekkel az eseményekkel óvatosan kell bánni, mivel intakt rostokban hihetetlenül alacsony frekvenciával jelennek meg, ez a módszer tűnik a legalkalmasabbnak a RyR csatorna nativ környezetben való tanulmányozására (Klein & Schneider, 2006). A fent említett egyértelmű korlátok miatt csupán a csatornák legegyszerűbb tulajdonságait vizsgáltuk.

Egyértelművé vált az eredményeinkből, hogy az elemi kalciumfelszabadulási események megjelenési frekvenciája alacsonyabb a *Cmpt* állatokban a vad típusú kontrollhoz képest (26. ábra). Ráadásul ezen események amplitúdója és FWHM értékei alacsonyabbak a kontrollhoz viszonyítva. Annak ellenére, hogy nem tudtuk bizonyítani azt, hogy a *Cmpt* állatokból származó izomrostok másként reagálnak a saponin kezelésre, valószínűnek tűnik, hogy a megfigyelt változások a kalciumfelszabadulást érintő módosulások miatt következtek be. Ezt megerősíti az a tény, miszerint a kalciumfelszabadulás paramétereiben megjelenő változások összhangban vannak az intakt rostokon mért globális kalcium tranziensek paramétereiben bekövetkezett változásokkal. Bővebben, az események csökkent száma és a kibocsátott kalcium mennyisége eseményenként megmagyarázza azt a megfigyelést, hogy miért kisebbek a kalcium tranziensek a *Cmpt* állatokban. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy azon változások, melyek magyarázatot adnak a *Cmpt* törzs fenotípusára a csökkent erőt is beleértve, a kalciumfelszabadulás folyamatának változása miatt következhetnek be.

Mindezek alapján a csökkent kalciumfelszabadulás legvalószínűbb magyarázata az SR kalcium tartalmának csökkenése. Ez legalább két úton tudná befolyásolni a kalciumfelszabadulás folyamatát. A RyR csatornák aktiválódása az SR kalcium

koncentrációjától függ, azaz egy alacsonyabb intraluminális kalcium koncentráció alacsonyabb aktiválódási szintet okoz a csatornában (Laver, 2005). Ráadásul az alacsonyabb SR kalciumkoncentráció miatt a csatornákon átfolyó áram is csökken. Ezen hatások kombinációja megmagyarázhatja az alacsonyabb *spark* frekvenciát valamint a kalciumfelszabadulási események kisebb amplitúdóját és legvégül a csökkent kalciumtranzienseket. Habár jelenleg nincs egyértelmű magyarázatunk arra, hogy a mutáció hogyan befolyásolja az SR kalcium tartalmának csökkenését, minden adat azt az elképzelést támasztja alá, miszerint a csökkent specifikus erő a *Cmpt* állatokban ezen változások eredménye.

VI.2. A MTM1 módosulásának hatása az EC-kapcsolat működésére

Munkánk második részében egy még kevésbé ismert aspektusból vizsgáltuk az EC kapcsolatot, mely meghatározó számos súlyos izmot érintő betegségekben. Valójában a jelenlegi felfedezés, miszerint a myotubuláris myopátia összefüggésben áll a kalciumfelszabadulás mechanizmusának súlyos megváltozásával rávilágított arra, hogy a PtdInsP formák metabolizmusának szabályozása potenciálisan kritikus pont lehet. Azonban az, hogy a PtdInsP-ok hogyan vesznek részt az EC kapcsolat szabályozásában, sajnálatos módon meglehetősen rejtélyes.

Jelen munkánkban bemutatásra került, hogy a PtdIns(3,5)P₂ vagy a PtdIns(3)P intracelluláris jelenléte csökkenti a globális feszültség-aktivált kalciumfelszabadulást intakt vázizom rostokban. Azonban az is bemutatásra került, hogy azokban a kísérletekben, ahol ezen két PtdInsP OH-foszforilált formája csökkent, nem változott a kalciumfelszabadulás a kontrollhoz viszonyítva. Tehát a PtdInsP-ok szintjének csökkenése nem befolyásolta a kalciumfelszabadulást, ezzel azt sugallva, hogy normális körülmények között, azaz fiziológias állapotban ezek alacsony szinten vannak az intracelluláris térben. Arra vonatkozóan igen kevés jelenleg a bizonyíték, hogy a PtdInsP-ok szerepet játszhatsanak a vázizom kalciumhomeosztázisának és/vagy az EC kapcsolat szabályozásában. Főleg azon kísérletek, melyek az egyedi RyR csatornák aktivitásán, az SR vezikulákból történő kalciumfelszabadulásán és nyúzott rostokon történő erőmérésen történtek utalnak arra, hogy a PtdIns(4,5)P₂ rendelkezik a RyR1 aktivitás befolyásolásának képességével (*Chu és mtsai., 1991, Kobayashi és mtsai., 1989, Ohizumi és mtsai., 1999*), de ezzel kapcsolatban bármilyen egyértelmű fiziológiai összefüggést még nem találtak.

Az érdeklődésünk középpontjában azon PtdInsP formák álltak, melyek az MTM1 hidrolizált termékei. Ezzel összefüggésben, Shen és kutatócsoportja (*Shen és mtsai., 2009*) lényeges adatokat gyűjtöttek: egyrészt a PtdIns(3,5)P₂ myotubulus sejtkultúrákban az SR-ben helyezkedik el, másrészt a PtdIns(3,5)P₂, a PtdIns(3,4)P₂, és PtdIns(3)P formák alkalmazása során a myotubulusokban a kalcium szignalizáció károsodik, harmadrészt minden PtdInsP, de főként a PtdIns(5)P hozzákötődik a RyR1 csatornához, negyedrészt pedig a PtdIns(3,5)P₂ 10-100µM koncentrációban alkalmazva direkt módon megemeli a RyR1 aktivitását.

Ezek az adatok azonban kevés betekintést engedtek abba a mechanizmusba, amely megmutatná, hogy a PtdInsP-ok vajon hogyan hatnak, ha egyáltalán hatnak, a RyR funkciójára és az EC kapcsolatra felnőtt egér vázizom natív funkcionális környezetében.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a PtdInsP-ok kalciumfelszabadulásra gyakorolt hatásait. Ezt a hatást elemi kalciumfelszabadulási események detektálásával figyelhettük meg alaposabban.

Normális esetben, az elemi kalciumfelszabadulási események emlős vázizomban nincsenek jelen olyan frekvenciában, amely lehetővé tenné analizálásukat. Másrészt azonban ezen események analízise egy olyan lehetőség, mellyel a RyR1 funkciójában bekövetkező eltérésekre *in vitro*, de mégis a lehető legfiziológiásabb körülmények között deríthetünk fényt. A fiziológiásan megjelenő elemi kalciumfelszabadulási események emlős vázizomban a globális kalcium tranzienseket okoznak. Vizsgálatuk még mindig a legjobban használható módszer a RyR1-en keresztüli kalciumfelszabadulás tulajdonságainak leírására *in situ*.

A PI(3,5)P₂ és PI(3)P feszültség aktivált kalciumfelszabadulás csúcsának csökkentése mellett azt is megfigyeltük, hogy a permeabilizált rostokon ezen formák a spontán kalciumfelszabadulási események megjelenési frekvenciáját csökkentették. A PtdIns(5)P forma azonban intakt rostokon történő mérések során szintén hatásosnak bizonyult. A kalciumfelszabadulási események frekvenciája alapján, a RyR1 csatorna által szabályozott kalciumfelszabadulásban bekövetkező változások valószínűleg a csatorna ritkább megnyílásának következménye, nem pedig a csatorna vezetőképességének megváltozása áll a háttérben.

Az intakt és a permeabilizált rostokon mért adatok között nem találtunk teljes konzisztenciát. Például a PtdIns(5)P-nek nem volt szignifikáns hatása a feszültség-aktivált kalciumfelszabadulásra, azonban az elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciáját csökkentette. Másrészt a PtdIns(3,5)P₂ az elemi kalciumfelszabadulási eseményekre erőteljesebben hatott, mint a PtdIns(3)P vagy a PtdIns(5)P. Eredményeink azonban jól illeszkednek a Shen és kutatócsoportja (*Shen és mtsai., 2009*) által közölt adatokhoz.

Az eredményeinkbeni eltérések rámutatnak a RyR1 csatorna aktivitásának és a PtdInsP formák általi modulálásának komplexitására. Például arra, hogy natív intakt izomrostban a RyR1 a DHPR kontrollja alatt áll, míg a permeabilizált rostokban a RyR1 spontán aktivitása elemi kalciumfelszabadulási események kialakulásában nyilvánul meg.

Felmerülhet az a kérdés, hogy vajon csak a RyR1 lehet a PtdInsP formák célpontja az egyedi rostok szintjén. A DHPR célpontként való megjelenését a membránáramok mérése során készített regisztrátumok elemzése során kizártuk. Mi több, a tény, hogy az elemi kalciumfelszabadulási esemény feltételezések szerint a DHPR befolyása alól mentes RyR1

csatornák aktivitását mutatja, a PtdInsP esetében a DHPR nem tölt be célpontként szolgáló szerepet.

In vitro megfigyelt PtdInsP indukált RyR1 aktivitás (*Shen és mtsai., 2009*) valószínűleg összefügg egy specifikus hatással, amely a RyR1 nyugalmi aktivitására hat intakt rostokban. Érdekes módon a feszültség-aktivált kalciumfelszabadulás csökkent amplitúdója ellenére a PtdIns(3,5)P₂ és PtdIns(3)P formákkal injektált rostokban, a nyugalmi kalcium koncentráció szintje megváltozott.

Összegezve tehát, habár annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a PtdInsP-ok hogyan hatnak a kalciumfelszabadulásra *in situ*, még több erőfeszítést igényel, de a bemutatott eredmények fontos első lépésnek tekinthetők e kérdés megválaszolása felé vezető úton.

Szintén fontos megjegyezni, hogy az adatok rávilágítanak arra a lehetőségre, hogy az MTM1 szubsztrátok akkumulálódása potenciálisan csökkenti a kalciumfelszabadulást és ezáltal az EC kapcsolat hibás működéséhez vezethet MTM1 hiányos körülmények között (*Al-Qusairi és mtsai., 2009*). A résztvevő mechanizmus(ok) és az aktuális PtdInsP cél(ok) még nem teljesen ismert(ek) és jelenleg nincsenek ismereteink arról, hogy a PtdInsP-ok másként viselkednének a sejten belül, attól függően, hogy a triád régióról, vagy már térrésről beszélünk. Azonban, mint ahogy az a PtdIns(4,5)P₂ esetében látszik, plazmamembránban elhelyezkedő ioncsatornák miatt, a PtdIns(3,5)P₂ és PtdIns(3)P valószínűleg direkt módon a RyR1 csatornákra hatva fejtik ki hatásukat. Ezt a tényt támasztja alá az, hogy számos PtdInsP kötődik a RyR1-hez (*Shen és mtsai., 2009*). Az is lehetséges, hogy a PtdInsP-ok más targeteket is előnyben részesítenek vagy a RyR1 szomszédságában lévő más proteinekhez kötődnek. Sőt az is előfordulhat, hogy szerkezeti változásokat okozhatnak a triád junkciójában a membrán görbületének megváltoztatásával (*Amoasii és mtsai., 2013*), ami ezután felelős lehet a megfigyelt hatásokért.

V. Összefoglalás

A futómalmokban végzett kísérleteink során a kontroll C57/BL6 állatok jobban teljesítettek a mutáns állatoknál a sebesség, és a megtett út szempontjából. Az előzetesen leírt *Cmpt* állatokban megfigyelhető alacsonyabb erő ellenére, a kalcium érzékenység-erő összefüggés, melyet kémiaiag nyúzott rost részeken mértünk, nem mutatott szignifikáns különbséget a két egértörzs között. Míg az egyedi, intakt, flexor digitorum brevis (FDB) izomból származó, Fura-2 fluoreszcens kalciumérzékeny indikátorral feltöltött rostok nyugalmi intracelluláris kalcium koncentrációja ($[Ca^{2+}]$) hasonló volt a kontrollhoz, a KCl segítségével kiváltott kalcium tranziensek kisebbek voltak a mutáns állatokban. Hasonló eredményeket kaptunk a Rhod-2 AM festékkel töltött rostokon végzett tetanuszt imitáló stimuláció során, ebben az esetben is kisebbek voltak a kalcium tranziensek a *Cmpt* állatokban. A szarkoplazmatikus retikulumból (SR) történő kalciumfelszabadulás fluxusa ezen tranzienseknek csökkent csúcsértéket és csökkent nyugalmi szintet mutatott, azonban nem volt különbség a csúcs-nyugalmi szint rációjában. A permeabilizált FDB rostokon mért elemi kalciumfelszabadulási események amplitúdója és az időbeli terjedése szintén kisebb volt a mutáns állatokban a kontrollhoz viszonyítva. Az eredményeink alapján tehát azt feltételezzük, hogy a *Cmpt* állatok esetében tapasztalt csökkent izomerő hátterében a csökkent SR kalcium tartalma állhat.

Összegezve a megfigyeléseinket először is a myostatin génben bekövetkező természetes mutáció (amit a *Cmpt* állatokban leírtak) megnövekedett izomtömeghez vezet, azonban a specifikus erő csökkent. Másodszorra a kontraktilis apparátus kalcium érzékenységében a kémiaiag „nyúzott” rostokon, izometrikus feltételek között nem találtunk különbséget a két egértörzs között. Harmadrészt bár a nyugalmi kalcium koncentrációra nem volt hatással a mutáció, a depolarizációval kiváltott intracelluláris kalcium koncentrációban csökkenést figyeltünk meg. Negyedrészt a spontán elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciája és amplitúdója is alacsonyabb volt a *Cmpt* állatokban.

Összegezve tehát:

- A futómalomban és a Grip-teszt során a vad típusú törzs jobban teljesített a *Cmpt* törzsnél.
- A nyugalmi membránpotenciálban nem volt eltérés.

- Sem a kontraktilis rendszerben, sem a kalciumérzékenységben nem találtunk különbséget.
- A rostok nyugalmi kalciumszintje nem különbözött a két törzsben, azonban depolarizációval kiváltott kalciumtranziensek amplitúdója kisebbnek bizonyult Cmpt állatokban.
- A spontán elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciája és amplitúdója alacsonyabb volt a Cmpt állatokban.

Az X-kapcsolt miotubuláris miopátia egy igen súlyos izombetegség, melyet a miotubularinért felelős génben bekövetkező mutációk okoznak. A miotubularin egy PtdIns foszfatáz, melynek megváltozott működése a PtdInsP csoportok szintjének növekedéséhez vezethet. A vázizomban az EC-kapcsolat számos PtdInsP deficiens modellben változást szenved és ezen modellekben leírták a RyR csatornák aktivitásának változását is. Kísérleteink során megmértük az intracelluláris kalcium tranzienseket különböző kezeléseken átesett és kontroll rostokon. Az egyedi, intakt izomrostokat a miotubularin foszfatáz MTM1 PtdInsP szubsztrátjaival (PtdIns(3,5)P₂ és PtdIns(3)P) vagy termékeivel (PtdIns(5)P és PtdIns) mikroinjektáltunk. Nem figyeltünk meg szignifikáns változást a PtdIns(5)P vagy PtdIns jelenlétében, azonban az SR-ből történő kalciumfelszabadulás csúcsértéke egy kb 30%-os csökkenést mutatott a PtdIns(3,5)P₂ vagy PtdIns(3)P jelenlétében, a rostok nagyjából 50%-ánál. A mérések során nem tapasztaltunk eltéréseket a membrán áramok jeleiben. Ez azért fontos, mert az áramgörbék elemzésével következtetni tudunk a DHPR vagy a kalciumfelszabadulás inaktivációjának érintettségére.

A permeabilizált izomrostokban, a spontán elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciája a PtdInsP három foszforilált formájának jelenléte esetén csökkent, különös tekintettel a PtdIns(3,5)P₂ jelenléte során bekövetkező depresszióra, mivel szinte teljes egészében megszűntek az események az ezen formával kezelt rostok esetében, a kontroll rostokhoz viszonyítva. Ezen eredményeink megerősíthetik az a feltételezést, miszerint az MTM1 szubsztrátjainak patológiás felhalmozódása akutan csökkenti a rianodin receptor mediált kalciumfelszabadulást.

Összegezve tehát:

- PtdIns(5)P és PtdIns injektált rostok esetében nem figyeltünk meg eltérést a depolarizációval kiváltott kalciumtranziensekben.
- PtdIns(3,5)P₂ és PtdIns(3)P esetében a tranziensek csúcsértéke nagyjából 30%-os csökkenést mutatott.

- A DHPR és a kalciumfelszabadulás inaktivációja nem érintett.
- Az elemi kalciumfelszabadulási események megjelenési frekvenciája csökkent a kezelt rostok esetében, különösen a PtdIns(3,5)P₂ jelenlétében.

VI. Summary

Myostatin, a member of the transforming growth factor β family was shown to be a potent negative regulator of skeletal muscle growth, as myostatin deficient mice have a great increase in muscle mass. Yet, the physical performance of these animals is not improved but suppressed. As an explanation, alterations in the steps in excitation-contraction coupling were hypothesized and tested for on mice with the 12-bp deletion in the propeptide region of the myostatin precursor ($Mstn^{Cmpt-dl1Abc}$ or *Cmpt*). In voluntary wheel running control C57/BL6 mice performed better than the mutant animals in both maximal speed and total distance covered. Despite the previously described lower specific force of *Cmpt* animals, the pCa-force relationship, determined on chemically permeabilized fibre segments did not show any significant difference between the two mouse strains. While resting intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) measured on single intact *flexor digitorum brevis* (FDB) muscle fibres using Fura-2 AM was similar to control (72.0 ± 1.7 vs. 78.1 ± 2.9 nM, $n=38$ and 45), the amplitude of KCl-evoked calcium transients was smaller (360 ± 49 vs. 222 ± 45 nM, $n=22$) in the mutant strain. Similar results were obtained using tetanic stimulation and Rhod-2 AM which gave calcium transients that were smaller (2.42 ± 0.11 vs. 2.06 ± 0.10 $\Delta F/F_0$, $n=14$ and 13 , respectively) on *Cmpt* mice. SR calcium release flux, calculated from these transients showed a reduced peak (23.7 ± 3.0 vs. 15.8 ± 2.1 mMs^{-1}) and steady level (5.7 ± 0.7 vs. 3.7 ± 0.5 mMs^{-1}) with no change in the peak-to-steady ratio. The amplitude and spatial spread of calcium release events detected on permeabilized FDB fibres were also significantly smaller in mutant mice.

These results suggest that reduced SR calcium release underlies the reduced muscle force in *Cmpt* animals.

Skeletal muscle excitation–contraction (E–C) coupling is altered in several models of phosphatidylinositol phosphate (PtdInsP) phosphatase deficiency and ryanodine receptor activity measured in vitro was reported to be affected by certain PtdInsPs, thus prompting investigation of the physiological role of PtdInsPs in E–C coupling. We measured intracellular Ca^{2+} transients in voltage-clamped mouse muscle fibres microinjected with a solution containing a PtdInsP substrate (PtdIns(3,5)P₂ or PtdIns(3)P) or product (PtdIns(5)P or PtdIns) of the myotubularin phosphatase MTM1. No significant change was observed in the presence of either PtdIns(5)P or PtdIns but peak SR Ca^{2+} release was depressed by ~30% and

50% in fibres injected with PtdIns(3,5)P₂ and PtdIns(3)P, respectively, with no concurrent alteration in the membrane current signals associated with the DHPR function as well as in the voltage dependence of Ca²⁺ release inactivation. In permeabilized muscle fibres, the frequency of spontaneous Ca²⁺ release events was depressed in the presence of the three tested phosphorylated forms of PtdInsP with PtdIns(3,5)P₂ being the most effective, leading to an almost complete disappearance of Ca²⁺ release events. Results support the possibility that pathological accumulation of MTM1 substrates may acutely depress ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release. Overexpression of a mCherry-tagged form of MTM1 in muscle fibres revealed a striated pattern consistent with the triadic area. Ca²⁺ release remained although unaffected by MTM1 overexpression.

VII. Irodalomjegyzék

Allen D.L., Cleary A.S., Speaker K.J., Lindsay S.F., Uyenishi J., Reed J.M., Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2008) **294**:E918–27.

Al-Qusairi L., Weiss N., Toussaint A., Berbey C., Messaddeq N., Kretz C., Sanoudou D., Beggs A.H., Allard B., Mandel J.L., Laporte J., Jacquemond V., Buj-Bello A., T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubulatin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**:08763-18768.

Amoasii L., Hnia K., Chicanne G., Brech A., Cowling B.S., Müller M.M., Schwab Y., Koebel P., Ferry A., Payrastre B., Laporte J., Myotubularin ant PtdInd3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J Cell Sci.* (2013) **126**:1806-1819.

Anderson S.B., Goldberg A.L., Whitman M., Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J Biol Chem.* (2008) **283**:7027–35.

Baán J.A., Kocsis T., Keller-Pintér A., Müller G., Zádor E., Dux L. & Mendler L., The compact mutation of myostatin causes a glycolytic shift in the phenotype of fast skeletal muscles. *J Histochem Cytochem.* (2013) **61**, 889–900.

Bakkar N., Wackerhage H., Guttridge D., Myostatin and NF- κ B regulate skeletal myogenesis through distinct signaling pathways. *Signal Transduction.* (2005) **5**:202–10.

Baylor S. M., Calcium sparks in skeletal muscle fibers. *Cell Calcium* (2005) **37** 513–530.

Block B. A., Imagawa T., Campbel K. P., Franzini-Armstrong C.: Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biology.*(1988) **107**(6) 2587-2600.

Bolis A., Zordan P., Coviello S., Bolino A., Myotubularin-related(MTMR) phospholipid phosphatase protein sin the peripheral nervous system. *Mol Neurobiol.* (2007) **35**:308-316.

Brown L. D., Rodney G. G., Hernández-Ochoa E., Ward W. C., Schneider M. F., Ca²⁺ sparks and T tubule reorganization in dedifferentiating adult mouse skeletal muscle fibers. *J Physiol Cell Physiol.* (2007) **292**:1156-1166.

Bull R., Finkelstein J.P., Humeres A., Behrens M.I. & Hidalgo C., Effects of ATP, Mg²⁺, and redox agents on the Ca²⁺ dependence of RyR channels from rat brain cortex, *Am J Physiol Cell Physiol.* (2007) **293**, C162–C171.

Cannell M. B., Soeller C., Numerical analysis of ryanodine receptor activation by L-type channel activity in the cardiac muscle diad. *Biophys.J.* (1997) **73** 112–122.

Chen Y., Lebrun J.J., Vale W., Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) **93**:12992–7.

Cheng H., Lederer M. R., Xiao R. P., Gomez A. M., Zhou Y. Y., Ziman B., Spurgeon H., Lakatta E. G., Lederer W. J., Excitation–contraction coupling in heart: new insights from Ca^{2+} sparks. *Cell Calcium.* (1996) **20** 129–140.

Chu A., Stefani E., Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum terminal cisternal membranes. Ca^{2+} flux and single channel studies. *J Biol Chem.* (1991) **262**:740-744.

Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe B., A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.* (2006) **38**:813–8.

Cornelison D.D., Olwin B.B., Rudnicki M.A., Wold B.J., MyoD^(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol.* (2000) **224**:122–37.

Csernoch L., Kovács L., Nilius B., Szűcs G., Caffeine and the myoplasmic calcium removal mechanism in cut frog skeletal muscle fibres. *Gen Physiol Biophys.* (1990) **9**, 251–266.

Csernoch L., Pouvreau S., Ronjat M., Jacquemond V., Voltage-activated elementary calcium release events in isolated mouse skeletal muscle fibers. *J Membr Biol.* (2008) **226**, 43–55.

Csernoch L., Zhou J., Stern M. D., Brum G., Ríos E., The Elementary Events Of Ca^{2+} Release Elicited By Membrane Depolarization In Mammalian Muscle, *J. Physiol.* (2004) 43-58.

Dowling J.J., Low S.E., Busta A.S., Fwldman E.L., Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Hum Mol Genet.* (2010), **19**:2668-2681.

Elkina Y., von Haehling S., Anker S.D., Springer J., The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* (2011) **2**, 143–151.

Escobar A.L., Velez P., Kim A.M., Cifuentes F., Fill M ., Vergara J.L., Kinetic properties of DM-nitrophen and calcium indicators: rapid transient response to flash photolysis. *Pflugers Arch.* (1997) **434**, 615–631.

Fabiato A., Fabiato F., Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol.* (1979) **41**:473-84.

Fodor J., Gönczi M., Sztretye M., Dienes B., Oláh T., Szabó L., Csoma E., Szentesi P., Szigeti G.P., Marty I., Csernoch L., Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture. *J Physiol.* (2008) **586**, 5803–5818.

Fonyó A. (szerk.) Az orvosi élettan tankönyve. Második, átdolgozott kiadás. *Medicina Könyvkiadó RT., Budapest* (1999).

Forbes D., Jackman M., Bishop A., Thomas M., Kambadur R., Sharma M., Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J Cell Physiol.* (2006) **206**:264–72.

Franzini-Armstrong C. & Protasi F., Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev.* (1997) **77**, 699–729.

Giannesini B., Vilmen C., Amthor H., Bernard M., Bendahan D., Lack of myostatin impairs mechanical performance and ATP cost of contraction in exercising mouse gastrocnemius muscle *in vivo*. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2013) **305**, E33–E40.

Girgenrath S., Song K., Whittemore L.A., Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve.* (2005) **31**, 34–40.

Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., A deletion in the bovine myostatin gene causes the doublemuscle phenotype in cattle. *Nat Genet.* (1997) **17**:71–4.

Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y., A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* (1985) **260**, 3440-3450.

Guttridge D.C., Mayo M.W., Madrid L.V., Wang C.Y., Baldwin Jr A.S., NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science.* (2000) **289**:2363–6.

Hamrick M.W., Pennington C., Webb C.N., Isales C.M., Resistance to body fat gain in ‘double-muscled’ mice fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond).* (2006) **30**:868–70.

Hanafusa H., Ninomiya-Tsuji J., Masuyama N., Nishita M., Fujisawa J., Shibuya H., Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem.* (1999) **274**:27161–7.

Hartsough M.T., Mulder K.M., Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem.* (1995) **270**:7117–24.

- Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y.Y., Grinnell B.W.,** The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* (1997) **89**:1165–73.
- Hill J.J., Davies M.V., Pearson A.A., Wang J.H., Hewick R.M., Wolfman N.M.,** The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem.* (2002) **277**:40735–41.
- Hill J.J., Qiu Y., Hewick R.M., Wolfman N.M.,** Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol.* (2003) **17**:1144–54.
- Joulia-Ekaza D., Cabello G.,** The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr Opin Pharmacol.* (2007) **7**:310–5.
- Kirsch W.G., Uttenweiler D., Fink R.H.,** Spark- and ember-like elementary Ca^{2+} release events in skinned fibers of adult mammalian skeletal muscle. *J Physiol* (2001) **537**:379–389.
- Klein M. G., Schneider M. F.,** Ca^{2+} sparks in skeletal muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (2006) **92** 308–332.
- Klein M.G. & Schneider M.F.,** Ca^{2+} sparks in skeletal muscle. *Progr Biophys Mol Biol.* (2006) **92**, 308–332.
- Klein M.G., Simon B.J., Szucs G., Schneider M.F.,** Simultaneous recording of calcium transients in skeletal muscle using high- and low-affinity calcium indicators. *Biophys J.* (1988) **53**, 971–988.
- Kobayashi M., Muroyama A., Ohizumi Y.,** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* (1989) **163**:1487–1491
- Kollias H.D., McDermott J.C.,** Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* (2008) **104**:579–87.
- Kung T., Szabo T., Springer J., Doehner W., Anker S.D., von Haehling S.,** Cachexia in heart disease: highlights from the ESC 2010. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* (2011) **2**:63–9.
- Lacampagne A., Schneider M. F.,** Modulation of the Frequency of Spontaneous Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release Events (Ca^{2+} Sparks) by Myoplasmic $[\text{Mg}^{2+}]$ in Frog Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* (1998) 207–224
- Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., Kambadur R.,** Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.* (2002) **277**:49831–40.

Laporte J.T., Kretz C., Mandel J.K., Kioschis P., Coy J.F., Klauck S.M., Poustka A., Dahl N., A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet.* (1996) **13**:175-182

Laver D.R., Coupled calcium release channels and their regulation by luminal and cytosolic ions. *Eur Biophys J.* (2005) **34**, 359–368.

Lee S.J., McPherron A.C., Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2001) **98**:9306–11.

Lee S.J., Reed L.A., Davies M.V., Girgenrath S., Goad M.E., Tomkinson K.N., Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2005) **102**:18117–22.

Lee S.J., Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (2004) **20**:61–86.

Liu G., Abramson J.J., Zable A.C., Pessah I.N., Direct evidence for the existence and functional role of hyperreactive sulfhydryls on the ryanodine receptor-triadin complex selectively labeled by the coumarin maleimide 7-diethylamino-3-(4-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin. *Mol Pharmacol.* (1994) **45**:189–200.

Lukács B., Sztretye M., Almássy J., Sárközi S., Dienes B., Mabrouk K., Simut C., Szabó L., Szentesi P., De Waard M., Ronjat M., Jóna I., Csernoch L., Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophys J.* (2008) **95**:3497-3509

Lukács B., Sztretye M., Almássy J., Sárközi S., Dienes B., Mabrouk K., Simut C., Szabó L., Szentesi P., De Waard M., Ronjat M., Jóna I., Csernoch L., Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophys J.* (2008) **95**, 3497–3509.

Marengo J.J., Hidalgo C., Bull R., Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys J.* (1998) **74**, 1263–1277.

Maroto M., Reshef R., Munsterberg A.E., Koester S., Goulding M., Lassar A.B., Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell.* (1997) **89**:139–48.

McFarlane C., Plummer E., Thomas M., Hennebry A., Ashby M., Ling N., Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1- dependent mechanism. *J Cell Physiol.* (2006) **209**:501–14.

McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J., Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* (1997) **387**:83–90.

McPherron A.C., Lee S.J., Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1997) **94**:12457–61.

McPherron A.C., Lee S.J., Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest*. (2002) **109**:595–601.

Megeney L.A., Kablar B., Garrett K., Anderson J.E., Rudnicki M.A., MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev*. (1996) **10**:1173–83.

Monnier N., Ferreiro A., Marty I., Labarre-Vila A., Mezin P., Lunardi J., A homozygous splicing mutation causing a depletion of skeletal muscle RYR1 is associated with multi-minicore disease congenital myopathy with ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet*. (2003) **12**:1171-1178

Montarras D., Lindon C., Pinset C., Domezne P., Cultured myf5 null and myoD null muscle precursor cells display distinct growth defects. *Biol Cell*. (2000) **92**:565–72.

Morissette M.R., Cook S.A., Foo S., McKoy G., Ashida N., Novikov M., Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ Res*. (2006) **99**:15–24.

Mosher D.S., Quignon P., Bustamante C.D., Sutter N.B., Mellersh C.S., Parker H.G., A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*. (2007) **3**:e79.

Mulder K.M., Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. (2000) **11**:23–35.

Nakao A., Imamura T., Souchelnytskyi S., Kawabata M., Ishisaki A., Oeda E., TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J*. (1997) **16**:5353–62.

Niggli E., Shirokova N., A guide to sparkology: The taxonomy of elemental cellular Ca²⁺ signaling events. *Cell Calc*. (2007)

Oba T., Murayama T., Ogawa Y., Redox states of type 1 ryanodine receptor alter Ca²⁺ release channel response to modulators. *Am J Physiol Cell Physiol*. (2002) **282**, C684–C692.

Ohizumi Y., Hirata Y., Suzuki A., Kobayashi M., Two novel types of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Can J Physiol Pharmacol*. (1999) **77**(4):276-85.

Papp Z., Szabo A., Barends J.P., Stienen G.J.M., The mechanism of the force enhancement by Mg-ADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. (2002) **543**, 177–189.

Patel K., Anthor H., The function of myostatin and strategies of myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscul Disord.* (2005) **15**:117–26.

Petrotchenko E.V., Yamaguchi N., Pasek D.A., Borchers C.H., Meissner G., Mass spectrometric analysis and mutagenesis predict involvement of multiple cysteines in redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor ion channel complex. *Res Rep Biol.* (2011) **2011**, 13–21.

Philip B., Lu Z., Gao Y., Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell Signal.* (2005) **17**:365–75.

Pierson C.R., Tomczak K., Agrawal P., Moghadaszadeh B., Beggs A.H., X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2005) **64**:555–564.

Pouvreau S., Royer L., Yi J., Brum G., Meissner G., Ríos E., Ca²⁺ sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *PNAS* (2007) 5235–524.

Rebbapragada A., Benchabane H., Wrana J.L., Celeste A.J., Attisano L., Myostatin signals through a transforming growth factor betalike signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol.* (2003) **23**:7230–42.

Ríos E., Stern M. D., González A., Pizarro G., Calcium Release Flux Underlying Ca²⁺ Sparks of Frog Skeletal Muscle. *J. Physiol.* (1999) 31–48.

Romero-Suarez S., Shen J., Brotto L., Hall T., Mo C., Valdivia H.H., Andresen J., Wacker M., Nosek T.M., Qu C.K., Brotto M., Muscle-specific inositide phosphatase (MIP/MTMR14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis. *Aging.* (2010) **2**:504–513.

Röhlich P. (szerk.) Szövektan. Semmelweis Kiadó, Budapest (2006).

Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* (2004) **117**:399–412.

Sárközi S., Szentesi P., Jona I., Csernoch L., Effects of cardiac glycosides on excitation–contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* (1996) **495**, 611–626.

Savage K.J., McPherron A.C., Endurance exercise training in myostatin null mice. *Muscle Nerve.* (2010) **42**, 355–362.

Schuhmeier R.P., Dietze B., Ursu D., Lehmann-Horn F., Melzer W., Voltage-activated calcium signals in myotubes loaded with high concentrations of EGTA. *Biophys. (2003) J* **84**, 1065–1078.

Sharma M., Kambadur R., Matthews K.G., Somers W.G., Devlin G.P., Conaglen J.V., Myostatin, a transforming growth factorbeta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol. (1999) 180*:1–9.

Shen J., Yu W.M., Brotto M., Scherman J.A., Guo C., Stoddard C., Nosek T.M., Valdivia H.H., Qu C.K., Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca^{2+} homeostasis. *Nat Cell Biol. (2009) 11*:769–776.

Shirokova N., García J., Pizarro G., Ríos E., Ca^{2+} Release from the Sarcoplasmic Reticulum Compared in Amphibian and Mammalian Skeletal Muscle. *J. Physiol. (1996) 1*-18.

Shirokova N., Rios E., Small event Ca^{2+} release: a probable precursor of Ca^{2+} sparks in frog skeletal muscle. *J. Physiol. (1997) 502*:3-11.

Shyu K.G., Lu M.J., Wang B.W., Sun H.Y., Chang H., Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volumeoverload heart failure. *Eur J Clin Invest. (2006) 36*:713–9.

Szabó G., Dallmann G., Müller G., Patthy L., Soller M., Varga L., A deletion in the myostatin gene causes the compact (*Cmpt*) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome. (1998) 9*, 671–672.

Szabó L.Z., Vincze J., Csernoch L., Szentesi P., Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *J Theor Biol. (2010) 264*, 1279–1292.

Szappanos H., Cseri J., Deli T., Kovács L., Csernoch L., Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Methods. (2004) 59*, 89–101.

Szentesi P., Szappanos H., Szegedi C., Gönczi M., Jona I., Cseri J., Kovács L., Csernoch L., Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. *Biophys J. (2004) 86*, 1436–1453.

Tajbakhsh S., Rocancourt D., Cossu G., Buckingham M., Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell. (1997) 89*:127–38.

Thies R.S., Chen T., Davies M.V., Tomkinson K.N., Pearson A.A., Shakey Q.A., GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors. (2001) 18*:251–9.

Tsugorka A., Rios E., Blatter L. A., Imaging elementary events of calcium-release in skeletal-muscle cells. *Science* (1995) **269**:1723–1726.

Varga L., Müller G., Szabó G., Pinke O., Korom E., Kovács B., Patthy L., Soller M., Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (*MstnCmpt-dl1Abc*) compact mouse. *Genetics*. (2003) **165**, 257–267.

Varga L., Szabó G., Darvasi A., Müller G., Sass M., Soller M., Inheritance and mapping of *Compact* (*Cmpt*), a new mutation causing hypermuscularity in mice. *Genetics*. (1997) **147**, 755–764.

Wolfman N.M., McPherron A.C., Pappano W.N., Davies M.V., Song K., Tomkinson K.N., Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003) **100**:15842–6.

Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., Massague J., Mechanism of activation of the TGF-beta receptor, *Nature*. (1994) **370**:341–7.

Yang J., Ratovitski T., Brady J.P., Solomon M.B., Wells K.D., Wall R.J., Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol Reprod Dev*. (2001) **60**:351–61.

Yu L., Hebert M.C., Zhang Y.E., TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J*. (2002) **21**:3749–59.

Zhang Y.E., Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*. (2009) **19**:128–39.

Zhao J., Shi W., Chen H., Warburton D., Smad7 and Smad6 differentially modulate transforming growth factor beta-induced inhibition of embryonic lung morphogenesis. *J Biol Chem*. (2000) **275**:23992–7.

Zhou H., Jungbluth H., Sewry C.A., Feng L., Bertini E., Bushby K., Straub V., Roper H., Rose M.R., Brockington M., Kinali M., Manzur A., Robb S., Appleton R., Messina S., D'Amico A., Quinlivan R., Swash M., Müller C.R., Brown S., Treves S., Muntoni F., Molecular mechanisms and phenotypic variation in RYR1-related congenital myopathies. *Brain*. (2007) **130**:2024–2036.

Zhou H., Lillis S., Loy R.E., Ghassemi F., Rose M.R., Norwood F., Mills K., Al-Sarraj S., Lane R.J., Feng L., Matthews E., Sewry C.A., Abbs S., Buk S., Hanna M., Treves S., Dirksen R.T., Meissner G., Muntoni F., Jungbluth H., Multi-minicore disease and atypical periodic paralysis associated with novel mutations in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscul Disord*. (2010) **20**:166–173.

Zhou H., Yamaguchi N., Xu L., Wang Y., Sewry C., Jungbluth H., Zorzato F., Bertini E., Muntoni F., Meissner G., Treves S., Characterization of recessive RYR1 mutations in core myopathies. *Hum Mol Genet*. (2006) **15**:2791–2803.

Zhou J., Brum G., González A., Launikonis B. S., Stern M. D., Ríos E., Ca^{2+} Sparks and Embers of Mammalian Muscle. Properties of the Sources. *J. Physiol.* (2003) 95-114.

Zhou J., Yi J., Royer L., Launikonis B. S., Gonzalez A., Garcia J., Ríos E., A probable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca^{2+} sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *Am. J. Physiol.* (2006) **290**: C539–C553.

VIII. Közlemények listája



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/41/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bodnár Dóra
Neptun kód: QOKFTK
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10048878

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bodnár, D.**, Geyer, N., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., Hegyi, B., Sztretye, M., Fodor, J., Dienes, B., Balogh, Á., Papp, Z., Szabó, L., Müller, G., Csernoch, L., Szentesi, P.: Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signaling.
J. Physiol.-London. 592 (6), 1353-1365, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261958>
IF:4.544 (2013)
2. González Rodríguez, E., Lefebvre, R., **Bodnár, D.**, Legrand, C., Szentesi, P., Vincze, J., Poulard, K., Bertrand-Michel, J., Csernoch, L., Buj-Bello, A., Jacquemond, V.: Phosphoinositide substrates of myotubularin affect voltage-activated Ca^{2+} release in skeletal muscle.
Pflügers Arch. 466 (5), 973-985, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1346-5>
IF:3.073

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora: 7,617

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,617

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

Debrecen, 2015.02.23.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu

IX. Előadások, poszterek listája

IX.1. Angol nyelvű előadások

D. Bodnár, O. Ruzsnavszky, É. Ungvári, I. Benkő, J. Prokisch, L. Csernoch, P. Szentesi (2011) Effects of selenium on the contractile properties of mouse skeletal muscles. MODI Symposium

D. Bodnár, O. Ruzsnavszky, N. Geyer, B. Dienes, M. Sztretye, Á. Balogh, Z. Papp, P. Szentesi, L. Csernoch (2012) Modified EC coupling in myostatin deficient (MSTN-/-) mice. MODI Symposium

D. Bodnár, O. Ruzsnavszky, É. Ungvári, I. Benkő, J. Prokisch, L. Csernoch, P. Szentesi (2013) Effects of selenium on the contractile properties of mouse skeletal muscles. MODI Symposium

D. Bodnár, A.G. Szöllösi, N. Vasas, L. Ambrus, Á. Angyal, N. Balogh and T. Bíró (2014) Co-cultures of sensory neurons and epidermal keratinocytes as a model of intercellular crosstalk. ESDR Copenhagen

IX.2. Magyar nyelvű poszterek

Bodnár D., Ruzsnavszky O., Oláh T., Mosca B., Fodor J., Dienes B., Zorzato F., Szentesi P., Csernoch L (2011) Egy újonnan izolált izomeredetű fehérje in vitro és in vivo overexpresszióját követő lokalizációs vizsgálatok. A Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, a Magyar Anatómus Társaság XVI. Kongresszusa, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciója és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös tudományos konferenciája (FAMÉ). Pécs

Bodnár D., Ruzsnavszky O., Ungvári É., Benkő I., Prokisch J., Csernoch L., Szentesi P. (2011) Szelénvegyületek hatása egerek vázizmáinak kontraktilis tulajdonságaira. A Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, a Magyar Anatómus Társaság XVI. Kongresszusa, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciója és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös tudományos konferenciája (FAMÉ). Pécs

Bodnár D., Vincze J., Szentesi P., Csernoch L., Cserné Dr Szappanos H. (2010) Elemi kalciumfelszabadulási események emlős és kétéltű harántcsíkolt izmokon

Bodnár D., Vincze J., Dienes B., Szentesi P., Romain L., Jacquemond V., Csernoch L. (2013) A foszfatidil-inozitol-foszfátok (PtsInsP) hatása a kalciumfelszabadulási eseményekre emlős vázizomban

IX.3. Angol nyelvű posztterek

D. Bodnár, J. Vincze, P. Szentesi, L. Csernoch, H. Cserné Szappanos (2010) Elementary calcium release events on mammal and amphibian skeletal muscle fibers. *Acta Physiologica Hungarica*, 97, 429-430.

P. Szentesi, R. Lefebvre, **D. Bodnár**, J. Vincze, B. Dienes, V. Jacquemond, L. Csernoch (2011) Effects of phosphatidyl-inositol-phosphates (PtdInsP) on calcium release events in mammalian skeletal muscle fibres. *European Biophysics Journal*, 40, Suppl. 1. S71.

P. Szentesi, J. Vincze, **D. Bodnár**, L. Szabó, B. Dienes, H. Cserné-Szappanos, M.F. Schneider, L. Csernoch (2011) Caffeine and depolarization alters the morphology of calcium spark in amphibian skeletal muscle. *European Biophysics Journal*, 40, Suppl. 1. S71.

J. Vincze, P. Szentesi, **D. Bodnár**, L.Z. Szabó, B. Dienes, H. Cserné Szappanos, M.F. Schneider, L. Csernoch (2012) Caffeine Treatment and Depolarization Alter the Spatial and Temporal Characteristics of Calcium Sparks on Intact Amphibian Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*, 102, 310a-311a.

A. Jenes, **D. Bodnár**, O. Ruzsnavszky, N. Geyer, B. Dienes, A. Balogh, Z. Papp, P. Szentesi, L. Csernoch (2012) Modified EC coupling in myostatin deficient (MSTN^{-/-}) mice. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 33, 242-243.

L. Csernoch, **D. Bodnár**, O. Ruzsnavszky, N. Geyer, B. Hegyi, B. Dienes, M. Sztretye, P. Szentesi. (2013) Myostatin Deficient Mice Display Altered Calcium Signaling. *Biophysical Journal*, 104, 289a.

D. Bodnár, A.G. Szöllösi, N. Vasas, L. Ambrus, Á. Angyal, N. Balogh and T. Bíró (2014) Co-cultures of sensory neurons and epidermal keratinocytes as a model of intercellular crosstalk. *ESDR Copenhagen*

Á. Angyal, N. Vasas, L. Ambrus, **D. Bodnár**, I.L. Szabó, A.G. Szöllösi and T. Bíró (2014) Modeling atopic dermatitis in vitro using Staphylococcus enterotoxin B and thymic stromal lymphopoietin treatment of keratinocytes. ESDR Copenhagen

I. Szabó, E. Shitrit, A. Oláh, N. Balogh, **D. Bodnár**, Á. Angyal, E. Hollósi, T. Bíró and E. Lisztes (2014) Effects of adenosine on human hair follicles and hair follicle derived outer root sheath keratinocytes. ESDR Copenhagen

L. Ambrus, E. Lisztes, **D. Bodnár**, N. Balogh, C.C. Zouboulis, T. Biro and A. Oláh (2014) Identification of the signaling pathway mediating the anti-inflammatory effects of cannabidiol on human sebocytes. ESDR Copenhagen

X. Köszönetnyilvánítás

Itt szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, és a mögötte rejlő elméleti tudásom megszerzésében.

Szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Szentesi Péternek, a Ph.D-s éveim alatti segítségét és útmutatásait.

Köszönettel tartozom továbbá, Dr. Csernoch László professzor úrnak, a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának, aki az irányítása alatt álló intézetben lehetővé tette és útmutatásával segítette munkámat.

Köszönöm a sok segítséget Dr. Dienes Beatrixnak, akitől a munkámhoz szükséges elméleti és gyakorlati tudás nagy részét elsajátítottam, és akihez kérdéseimmel mindig bátran fordulhattam.

Köszönet Őri Róza asszisztensnőnek, aki a kísérletek elvégzéséhez szükséges kiváló technikai háttérrel biztosította.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet valamennyi dolgozójának a kísérletek során nyújtott segítségükért, és a baráti légkörért, amiben dolgozhattam, valamint a külföldi és hazai kollaborációs partnereinknek is az eredményes közös munkáért.

Ezen felül köszönettel tartozom családomnak, barátaimnak a támogatásukért, türelmükért és töretlen bizalmukért.

A munka a következő anyagi támogatásokkal valósulhatott meg: TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025, OTKA NN-107765