

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**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**

A vázizom Ca²⁺-homeosztázisának módosulása egyes regulatórikus fehérjék expressziójának megváltozása esetén

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

Írta: Bodnár Dóra okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szentesi Péter, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Várnai Péter, az MTA doktora
Dr. Sárközi Sándor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Orvosi Vegytani
Intézet
2015. május 05. 11 óra

A doktori szigorlat időpontja: 2015. május 05.

Az értekezés bírálói:

Dr. Varga Zoltán, PhD
Dr. Zsembery Ákos, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Várnai Péter, az MTA doktora
Dr. Sárközi Sándor, PhD
Dr. Varga Zoltán, PhD
Dr. Zsembery Ákos, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2015. május 05. 13 óra

Bevezetés

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. 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 sejt organellekben található Ca^{2+} -koncentrációnál. Az alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ energetikailag kedvezővé teszi az ion másodlagos hírvivőként való felhasználását, mivel viszonylag kis mennyiségű ion energiaigényes mozgása nagy $[\text{Ca}^{2+}]$ változásokat eredményez. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 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. 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 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 helyvel 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 $[\text{Ca}^{2+}]$ változások pufferolása. Az SR-ben a teljes $[\text{Ca}^{2+}]$ kb. 10 mM, amiből a szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ 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 feszültségkülönbségeket ki tudják egyenlíteni. Így az SR membránon keresztüli Ca^{2+} -mozgás nem generál membránpotenciál-változásokat.

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.

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 negatívan szabályozásában. 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.

Szelekciós tanulmányok során megnövekedett izomtömegű állatokat szintén találtak a protein növekedés genetikai alapját vizsgálva. Ezek között az állatok között található meg az úgynevezett „Compact” egerek mely állatokból származó Mstn gént szekvenálva egy 12 bp delécióra bukkantak, ezért kapták a $Mstn^{Cmpt-d11Abc}$ nevet. Ez a deléció lehetővé tette, hogy módosuljon a myostatin expresszió vagy a downstream szignalizáció modulálódjon, így a hipermuszkuláris fenotípus megjelenhetett.

Amthor és kutatócsoportja 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. Ennek ellenére az EC-kapcsolatkapcsolat lépéseit eddig még nem vizsgálták részletesen ezekben az

A $Cmpt$ állatoknak az állóképessége azonban elmarad az aktív myostatinnal rendelkező állatokétól. Ezek az állatok például könnyebben elfáradnak, nagyobb a hajlamuk a metabolikus acidózisra, ill. a respiratorikus és a cardiovascularis rendszerük sérülékenyebb. A dupla izommal rendelkező állatokban az izomszövet anyagcséréje 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 sejtjeinek a száma, jelen esetben az izomszövet rostjainak a mennyisége megnő, de az általuk képzett struktúrák a normálistól nem térnek el. Hypertrophiáról akkor beszélünk, ha a szövet sejtjeinek a mérete nő meg. A megfigyelések szerint a myostatin gén postnatális inaktivációja egerekben főként hypertrophiát idéz elő.

Az MTM1 és különböző PtdInsP csoportok kapcsolata

Az X-kapcsolt miotubuláris (centronukleáris) miopátia (XLMTM) egy igen súlyos kogenitális rendellenesség, melyre jellemző egy általános izomgyengeség és hipotónia. Ezen tünetek gyakran vezetnek a születést követő halálozással. 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 organelumok jelenléte, valamint az oxidatív állapotban 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-kötött recesszív állapotból származik, mivel a betegség dominánsan a férfi nemben jelenik meg, de a nőnemű hordozók esetében is megfigyelhetőek néha az enyhébb tünetek megjelenése. Ritka esetekben azonban náluk is megjelenhetnek a férfi nemre jellemző súlyos tünetek.

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. 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, amely igen súlyos izomgyengeségben a születés után hetekkel bekövetkező halálozásban nyilvánul meg. A myotubularin egy foszfoinozitid (PI)3 foszfatáz amely hatással van a foszfoinozitolokra.

A foszfoinozitolok (PtdInsP) Ca^{2+} homeosztázis és EC kuplung befolyásolásában betöltött lehetséges szerepe az elmúlt évekig ismeretlen volt. Néhány friss kutatás szerint a PtdInsP-foszfátáz hiányos transzgenikus egerekből származó fehérjék, különösképpen a MTM1 (myotubularin) és fehérjéi, az MTMR-ek (myotubularin és myopátia kapcsolt foszfátázok) mélyebb betekintést engedtek a témába. 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. Mi több, az EC kuplung MTM14 hiányban szenvedő zebraalakban szintén sérültnak bizonyult, viszont az MTM1 hiánya nem okozott semmilyen hibát a belső membránrendszer felépítésében. 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 és 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 megfigyeltekhez 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.

Célkitűzés

Míg a myostatin mutációja megnövekedett izomtömeghez vezet, addig a myotubularint 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

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 membrénpotenciálját, vizsgáltuk a rostok kalcium érzékenységét és a kontraktilis apparátus működését, teljes roston végeztünk kalcium mérést rációmetrikus 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 kézen fekvő 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.

Anyagok és módszerek

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).

Pároztatás 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 farkvégéből származó mintát használtuk.

***In vivo* kísérletek**

Futómalom

Az állatokat egyesével, önkéntes futatómalommal ellátott ketrecbe helyeztük, melyben *ad libitum* táplálékhoz és vízhez is hozzáfértek. A kísérleteket 12/12 órás világos/sötét megvilágítás mellett végeztük szobahőmérsékleten. A kerék számítógéppel volt összekötve, az adatok 20 perces intervallumonként kerültek rögzítésre, 14 napon keresztül folyamatosan.

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. Számítógép rögzítette azt a maximális erőt, amit akkor mértünk, mielőtt az állat elengedte volna a rácsot. Ebben a kísérletsorozatban 5 *Cmpt* és 11 vad típusú egér vett részt.

***In vitro* vizsgálatok**

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's oldatban, amely 0,2% I. típusú kollagenázt tartalmazott (Sigma, St Louis, MO, USA). Az emésztés leállítását követően az izmokat normál Tyrode's oldatban, 4°C-on tároltuk felhasználásig. Az egyedi vázizom rostokat triturálással nyertük ki az izomból. A rostokat egy lamininnel fedett speciális üvegaljú petribe helyeztük és 1-2 óra tapadási idő elteltével használtuk fel.

Nyugalmi membránpotenciál mérés

Az FDB izmok oxigenált Tyrode's oldatban 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 M Ω ellenállású pipettákat használtunk. Az elektródák Multiclamp-7001A amplifikátorhoz voltak kötve (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) áram-clamp beállítást használva.

Kontraktilis fehérjék Ca²⁺ érzékelységének vizsgálata

A Ca²⁺-függő aktív izometrikus erő és annak Ca²⁺ érzékenysége valamint a Ca²⁺-független passzív erő mérése a permeabilizált EDL és SOL izomrostokon mechanikai mérőrendszer segítségével történt 15°C-on. A Ca²⁺ kontraktúrák kiváltása úgy történt, hogy a rostokat a relaxáló oldatból aktiváló oldatba transzferáltuk. Az egyedi Ca²⁺ kontraktúrák alatt, amikor az erő eléri a maximumot, egy gyors, ún. „release-re-strech” manővert hajtottunk végre az aktiváló oldatban. Ezen közbelépés eredményeként, az erő a csúcértékről nullára csökkent, így meg tudtuk kapni a totál maximális erőt (F_{total}), ezután az erő újra nőhet. Ezt a növekedés egy egyedi exponenciális függvényre illesztve megkaptuk az erő újra növekedésének állandóját (k_r). A rost ezután ismét a relaxáló oldatba került, ahol az összehúzódás 80%-a volt az eredeti hosszának, így következtethettünk a passzív erőre (F_{passive}). Az aktív izometrikus erő (F_{active}) a totál maximális erő és a passzív erő különbségéből adódik. Az aktív és passzív erő értékeit a rostok keresztmetszetére normalizáltuk, melyet a rost szélességéből és hosszából kaptunk. Az izometrikus erő értékek a Ca²⁺-aktivált aktív erőre normalizáltuk, és a Ca²⁺-erő közötti összefüggésekből következtethetünk az izometrikus erő produktumának Ca²⁺-függésére.

Teljes-sejtes Ca²⁺ koncentráció mérés

Az intracelluláris Ca²⁺-ban bekövetkező változásokat Fura-2-AM, rácíometrikus fluoreszcens kalcium indikátorral feltöltött FDB rostokon mértük. Az egyedi FDB izomrostokat lamininnel fedett fedőlemezekre tettük, majd 5 μ M Fura-2-AM festékkel töltöttük 60 percig. A Ca²⁺-tranzienseket KCl oldattal váltottuk ki. Az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációban bekövetkező változásokat a mért fluoreszcens intenzitások hányadosának (F₃₄₀/F₃₈₀) kiszámításával kaptuk.

Az $[Ca^{2+}]_i$ változásainak detektálása konfokális mikroszkópia segítségével

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 tetanusos depolarizációkat küszöb feletti, 2 ms hosszú és 100Hz frekvenciával ismétlődő négyszögimpulzusokkal váltottuk ki. Az impulzusok mindegyike 500 ms hosszú volt. A depolarizáció által kiváltott kalcium tranzienseket 22°C-on, konfokális lézer scanning mikroszkóp (Zeiss 5 Live, Oberkochen, Germany) segítségével detektáltuk, miután a FDB rostokat 20 μ M Rhod-2-AM fluoreszcens kalcium indikátorral töltöttük 15 percen keresztül. Az ún. „line-scan” képeket (512 pixel vonalanként) használtuk arra, hogy monitorozzuk a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező változásokat 1 ms per vonalanként, 40x vizes objektívet használva. 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 bekövetkezte előtt mért fluoreszcencia értékekből határoztuk meg.

Elemi kalcium-felszabadulási események detektálása

Kísérleteink során a lézer pásztázó konfokális mikroszkópot kétféle üzemmódban használtuk. Az elemi kalcium felszabadulási 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, 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.

***In vivo* elektroporáció**

Az egerek izofuránnal történő altatását követően 20 μ l 2mg/ml koncentrációjú hialuronidáz tartalmú fiziológiás oldatot injektáltunk az állatok hátsó lábába. Az állatot egy óra elteltével újra elaltattuk és ezután a talpakba injektáltunk 10 μ g/ μ l Tyrode's oldatban oldott

plazmid DNS-t. Összesen 30-50 μ l végtérfigatot 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.

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. Az ellenállás csökkentéséhez analóg kompenzációt alkalmaztunk. A nyugalmi tartópotenciál -80mV volt, erről a szintről lépcsőzetes impulzusokkal depolarizáltuk a rost membránját.

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.

Eredmények

A myostatin hiány funkcionális vizsgálata

In vivo kísérletek

A *Cmpt* állatok nagy izomtömeggel rendelkeztek és a súlyuk több mint kétszerese volt az azonos korú vad típusú kontroll társaikénak. 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.

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.

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

In vitro kísérletek

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.

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 szegmens hossz 80,7 \pm 5,1 μ m), melyek EDL és SOL izomrostokból származtak négy kontroll és négy *Cmpt* állat felhasználásával.

Az intracelluláris kalciumkoncentrációban bekövetkező változások *Cmpt* állatok esetében

Mivel a kontraktilis fehérjék kalciumérzékenysége hasonló volt a vad típusú és *Cmpt* állatokban, a *Cmpt* mutáció talán a kalcium homeosztázisra van hatással. Ennek kiderítése érdekében a kalcium homeosztázis 12-16 hetes kontroll és *Cmpt* állatokból izolált, egyedi FDB izomrostokon vizsgáltuk. A 120 mM KCl depolarizáció segítségével kiváltott kalciumtranziensek mérése során normál (1,8 mM) extracelluláris kalciumkoncentrációt biztosítottunk. Az adatok összegzése alapján megállapítottuk, hogy a *Cmpt* mutációnak nincs hatása az intracelluláris nyugalmi kalciumkoncentrációra. 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.

Akciós potenciál által kiváltott kalcium tranziensek FDB izomrostokban

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

Az adatok analizálása során kiderült, hogy az egyszeri impulzusokkal kiváltott kalcium tranziensek átlagos amplitúdója szinte teljesen megegyezett a két törzs esetében ($2,37 \pm 0,12$ F/F₀, n= 25 kontroll esetben; $2,50 \pm 0,15$ F/F₀, n=26 *Cmpt* rostok esetében), azonban a sorozatingerlés alkalmazásakor az amplitúdó szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest.

Az SR-ből történő kalcium felszabadulás további analizálása során először a sorozatingerléssel kiváltott kalciumtranziensek normalizált fluoreszcencia értékeit kalciumkoncentrációvá 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. Jelentős változás történt az intracelluláris kalciumkoncentrációban, csak úgy, mint a myoplasmába felszabaduló teljes kalcium mennyiségében, és a hozzájuk tartozó kalcium felszabadulás fluxusában. Mindezek csökkentek a *Cmpt* állatok esetében. A FL az impulzus leadását követő 9 ms eltelte után érte el a csúcsertékét és szignifikánsan kisebb volt a *Cmpt* rostokban. Továbbá az R_{rel} 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.

Elemi kalcium felszabadulási események *Cmpt* rostokon

Hogy megértsük a SR-ből történő kalcium felszabadulás csökkenésének okát, elemi kalcium felszabadulási eseményeket rögzítettünk kontroll és *Cmpt* állatokból származó FDB izomrostokon nagy sebességű lézer-pásztázó konfokális mikroszkóp segítségével. A rostokon kalcium *spark*-ok (kalcium felszabadulási 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 ugyanúgy generáltak *spark*-okat mint a kontroll rostok, az események karakterisztikus tulajdonságaikban eltéréseket figyeltünk meg.

A *spark*-ok amplitúdója a *Cmpt* mutáció esetében csökken. A kontroll rostokon mért *spark*ok átlagos amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt a *Cmpt* rostokon mértékhez képest ($0,165 \pm 0,001$ vs. $0,154 \pm 0,002$, $P < 0,001$). Ehhez hasonlóan, relatíve magasabb számban figyeltünk meg gyorsan kialakuló *spark*-okat a *Cmpt* állatokban a kontrollhoz képest, 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 *Cmpt* rostokon, $P < 0,01$). Bár a FWHM eloszlásának alakja nem változott a *Cmpt* mutáció hatására, 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, relatíve magas frekvenciát mutatva a rövidebb ideig tartó események esetében *Cmpt* egerekben. Ráadásul a spontán elemi kalcium felszabadulási 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.

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

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, különösen érdekelt minket a foszfatáz aktivitásából származó szubsztrátok hatása. A PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3)P, 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 PtdInsP formával injektált izomrost

esetében. Azonban szignifikánsan változott azokban a rostokban, melyeket PtdIns(3,5)P₂-vel (0,21 ± 0,02 μM, n=8), PtdIns(3)P-vel (0,20 ± 0,02 μM, n=8) vagy PtdIns (0,12 ± 0,02 μM, n=6) formával injektáltuk.

A maximális kalcium felszabadulás csúcserőit ($d[Ca]_T/dT$ max), az 50%-os aktivációhoz tartozó feszültséget ($V_{0.5}$) és a meredekséget (k) mutatja be a 28. ábra. A kontrollhoz viszonyítva a maximális kalcium felszabadulás 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 sajátágaiból 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 kalciumkoncentrációra kifejtet hatásaira.

A kalciumtranziensek leszálló szárának elemzése során a citoszolikus kalciumeltávolítás szignifikánsan lassabbnak bizonyult a PtdIns(3)P injektált rostok esetében, mivel a kalcium felszabadulást az egyedi kalciumeltávolítás sajátágaiból számoltuk minden egyes rost esetében.

A PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3)P és PtdIns(5)P csökkentette az elemi kalcium felszabadulási események számát permeabilizált izomrostokban

A permeabilizált izomrostokon mért spontán elemi kalcium felszabadulási események lehetőséget biztosítanak a RyR funkcionális tulajdonságainak natív környezetben történő tanulmányozására anélkül, hogy a DHPR bármilyen kontrollt gyakorolna rá. Ezen lehetőséget kihasználva megvizsgáltuk, hogy a PtdInsP formák gyakorolnak-e bármiféle direkt hatást a RyR szabályozott kalcium felszabadulási aktivitásra, így betekintést kaphatunk a jelenség mögött álló mechanizmusba. A spontán kalcium felszabadulási 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.

Az MTM1 overexpressziója nem befolyásolja a feszültség aktivált kalcium felszabadulást

Annak ellenére, hogy egy gyenge csökkenés figyelhető meg a csúcs kalcium felszabadulásban az MTM1-et overexpresszáló rostok esetében a kontroll rostokhoz képest, a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

A kapott adatokra Boltzmann függvényt illesztve megkaptuk a maximális csúcs kalcium felszabadulást ($32,5 \pm 3 \mu\text{M ms}^{-1}$ 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 kalcium felszabadulást 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 kalcium felszabadulásra.

Megbeszélés

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. Annak ellenére, hogy ezekben az egerekben a rostok minőségi összetételében és metabolikus állapotukban változások következnek be, egyértelmű magyarázatot a kontraktilis funkcióban bekövetkező változásokra még nem ismerünk. Munkám 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 meglévő csökkenést.

Az *in vivo* eredményeink szinkronban vannak a korábban *Mstn*^{-/-} állatokon publikált és *Cmpt* egereken végzett kísérletekkel, ahol az állatok csökkent fizikai teljesítményt mutattak, mivel a *Cmpt* állatok kevésbé mutatkoztak agilisek a futómalomban végzett kísérleteink során. Ezt erősíti az a megfigyelés 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, 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, csak úgy, mint a kontrakció során felhasznált ATP mennyiségének hatalmas. 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 kémiaiag nyúzott izomrost szegmensek vizsgálata során. Sem a gyors, sem pedig a lassú típusú rostok esetében sem figyeltünk meg változást a kalciumérzékenység-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 fiziológias körülmények között, azaz *in vivo* bekövetkező összehúzódást imitálják. Megjegyzendő, hogy az intracelluláris kalciumkoncentrációban bekövetkező csökkenés, és a következetesen fennálló alacsonyabb erőszint, a pCa-feszülés 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 kalcium felszabadulás fluxusa a globális kalciumtranziensekből volt kiszámolva, és egy 33% nagyságú csökkenés volt megfigyelhető a csúcs és a fenntartott fluxus esetében. Mivel a csúcsertékről a fenntartott értékre történő visszatérés aránya nem változott a *Cmpt* egerekben az SR-ből történő kalcium felszabadulás 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 kalcium fluxusának a csúcs eléréséhez szükséges idő, valamint az inaktiváció konstansának aránya egyáltalán nem változott. Az utóbbiban egy enyhe, de nem szignifikáns, növekedés volt megfigyelhető, amely összecseng azon korábbi eredményekkel, melyek szerint a lassabb inaktivációt a csökkent SR-ből történő kalciumfelszabadulás okozza. Mi több, a fentiekkel

összhangban, az akcióspotenciállal kiváltott kalciumtranziens során az SR-ből felszabaduló kalcium mennyiségében is megfigyeltek csökkenést.

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

Egyrészt, az SR kalciumtartalmában 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 kalcium felszabadulásnak.

Valójában az SR kalcium felszabadulás fluxusában bekövetkező csökkenés összevethető előzetes tanulmányokkal, melyek az SR deplécióját az SR kalcium felszabadulását vizsgálták. A csökkent RyR permeabilitás vagy SR kalciumtartalom magyarázhatja a metabolikus arányban bekövetkező változásokat, mivel a RyR redukció érzékenységet már számos alkalommal leírták. Ezek a közlemények arra engednek következtetni, hogy a csökkent 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. Ebből adódóan, a redox 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 kalciumtartalomhoz vezet. Ezek szinkronban vannak az általunk megfigyeltekkel. Annak érdekében, hogy meghatározzuk, vajon a RyR csatornák per se érintettek-e a *Cmpt* törzsben, a csatornán történő közvetlen mérések lennének szükségesek.

Egyértelművé vált az eredményekből, hogy az elemi kalcium felszabadulási események megjelenési frekvenciája alacsonyabb a *Cmpt* állatokban a vad típusú kontrollhoz képest. 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 kalcium felszabadulást érintő módosulások miatt következtek be. Ezt megerősíti az a tény, miszerint a kalcium felszabadulás paramétereiben megjelenő változások összhangban vannak az intakt rostokon mért globális kalciumtranziensek paramétereiben bekövetkezett változásokkal. Bővebben, az események csökkent száma és a kibocsátott kalcium mennyisége eseményenként megmagyarázza azt a megfigyelést, hogy miért kisebbek a kalciumtranziensek a *Cmpt* állatokban. Mindezek alapján a csökkent kalcium felszabadulás legvalószínűbb magyarázata az SR kalciumtartalmának csökkenése. Ez legalább két úton tudná befolyásolni a

kalcium felszabadulás folyamatát. A RyR csatornák aktiválódása az SR kalciumkoncentrációjától függ, azaz egy alacsonyabb intraluminális kalciumkoncentráció alacsonyabb aktiválódási szintet okoz a csatornában. Ráadásul az alacsonyabb SR kalciumkoncentráció miatt a csatornákon átfolyó áram is csökken. Ezen hatások kombinációja megmagyarázhatja az alacsonyabb *spark* frekvenciát valamint a kalcium felszabadulási események kisebb amplitúdóját és legvégül a csökkent kalciumtranzienseket. Habár jelenleg nincs egyértelmű magyarázatunk arra, hogy a mutáció hogyan befolyásolja az SR kalciumtartalmának csökkenését, minden adat azt az elképzelést támasztja alá, miszerint a csökkent specifikus erő a *Cmpt* állapotokban ezen változások eredménye.

Az MTM1 módosulásának hatása az EC-kapcsolat működésére

Munkám második részében egy még kevésbé ismert aspektusból vizsgáltam az EC kapcsolatot, mely meghatározó bizonyos súlyos izmot érintő betegségekben. Valójában a jelenlegi felfedezés, miszerint a myotubuláris myopátia összefüggésben áll a kalcium felszabadulás 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.

A PtdIns(3,5)P₂ vagy a PtdIns(3)P intracelluláris jelenléte csökkenti a globális feszültség-aktivált kalcium felszabadulást intakt vázizom rostokban. Az is bemutatásra kerül, hogy azokban a kísérletekben, ahol ezen két PtdInsP OH-foszforilált formája csökkent, nem változott a kalcium felszabadulás a kontrollhoz viszonyítva. Tehát a PtdInsP-ok szintcsökkenése nem befolyásolta a kalcium felszabadulást, ezzel azt sugallva, hogy normális körülmények között, azaz fiziológiás állapotban ezek alacsony szinten vannak az intracelluláris térben. Arra vonatkozóan igen kevés jelenleg a bizonyíték, hogy a PtdInsP-ok szerepet játszhatnak a vázizom kalcium homeosztázisának és/vagy az EC kapcsolat szabályozásában. Főleg azon kísérletek, melyek az egyedi RyR csatornák aktivitásán, az SR vezikulákból történő kalcium felszabadulásán és nyúzott rostokon történő erőmérésen történtek utalnak arra, hogy a PtdIns(4,5)P₂ rendelkezik a RyR1 aktivitás befolyásolásának képességével, de ezzel kapcsolatban bármilyen egyértelmű fiziológiai összefüggést még nem találtak.

Normális esetben, az elemi kalcium felszabadulási 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 leg fiziológiásabb körülmények között deríthetünk fényt. A fiziológiásan megjelenő elemi kalcium felszabadulási események emlős vázizomban a globális kalciumtranzienseket okozzák. Vizsgálatuk még mindig a legjobb használható módszer a RyR1-en keresztüli kalcium felszabadulás tulajdonságainak leírására *in situ*.

A PtdIns(3,5)P₂ és PtdIns(3)P feszültség aktivált kalcium felszabadulás csúcának csökkentése mellett azt is megfigyeltük, hogy a permeabilizált rostokon ezen formák a spontán kalcium felszabadulási események megjelenési frekvenciáját csökkentették. A PtdIns(5)P forma azonban intakt rostokon történő mérések során szintén hatásosnak bizonyult. A kalcium felszabadulási események frekvenciája alapján, a RyR1 csatorna által szabályozott kalcium felszabadulásban 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 kalcium felszabadulásra, azonban az elemi kalcium felszabadulási események frekvenciáját csökkentette. Másrészt a PtdIns(3,5)P₂ az elemi kalcium felszabadulási eseményekre erőteljesebben hatott, mint a PtdIns(3)P vagy a PtdIns(5)P. Eredményeink azonban hasonlóak a Shen és kutatócsoportja által közölt adatokkal.

Az eredményeinkben tapasztalt 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 kalcium felszabadulási 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 kalcium felszabadulási esemény feltételezések szerint a DHPR befolyása alól mentes RyR1 csatornák aktivitását mutatja, a PtdInsP esetében a DHPR nem tölt be célponti szerepet.

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

Az adatok rávilágítanak arra a lehetőségre, hogy az MTM1 szubsztrátok akkumulálódása potenciálisan csökkenti a kalcium felszabadulást és ezáltal az EC kapcsolat hibás működéséhez vezethet MTM1 hiányos körülmények között. 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 egy sejt más térrészében, mint a triád régióban. 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. Az is lehetséges, hogy a PtdInsP-ok más célokat 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, ami ezután felelős lehet a megfigyelt hatásokért.

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 ([Ca²⁺]) 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 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 csúcscsökkentése 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 csúcscsökkentése nagyjából 30%-os csökkenést mutatott.
- A DHPR és a **Közlemények** kalciumfelszabadulás inaktivációja nem érintett.

- Az elemi kalciumfelszabadulási események megjelenési frekvenciája csökkent a kezelt rostok esetében, különösen a PtdIns(3,5)P₂ jelenlétében.

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 Ca²⁺ release in skeletal muscle.
Pflugers Arch. 466 (5), 973-985, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1346-5>
IF:3.073

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,617

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

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetria 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

