

Válasz Dr. Kellermayer Miklós professzor úr bírálatára

Köszönöm a részletes bírálatát. Számomra is megtiszteltetés, hogy az Ön kritikája és észrevételeivel szemben próbálhatom megvédeni a munkámat és válaszolhatok a kérdéseire. A dolgozat mögötti munkásságot elismerő szavait köszönöm, ez külön bátorít a későbbiekben is.

Reflexióim a megjegyzésekre:

Sajnálom, hogy disszertációt nehézkes olvasmánynak találta, én igyekeztem olvashatóan megírni. Kétségtelen, hogy a tudományos munkám során szinte kizárólag angolul írok és olvasok. Ennek a hatása nyilván érezhető a magyar szakmai nyelvhasználatomon. Azt gondoltam, a magyar nyelv rugalmassága mindezt még elviseli. Többes szám első személyből egyes szám első személyre azért váltottam olykor, mert jelezni kívántam, hogy azt a munkát egyedül végeztem. Idegen szavakat igyekeztem többnyire a tartalmi pontosság érdekében átvenni. Sajnálom, hogy az „ascorbic acid” használatával önkéntelenül utalhattam arra, hogy a vegyület neve először nem magyarul született. A szemelvényekként felsorolt mondatértelmet zavaró betűhibákat sajnálom, ezek jó része elmaradt szöveggyűjtés, a szöveg egyik programból a másikba történő konvertálása (átalakítása?) miatt maradhettek rejtve. A 2. táblázatban a „pankreáz” az alatta következő sorban a „Langerhans-sziget sejtek”-el folytatódik. a 23. ábrán a vonal 100 μm -t jelent, az 50 véletlenül került oda. A 6. ábra jeleit a mellette levő 5. ábra aláírása magyarázza, nem a 4. ábráé, ahogy (hibásan) szerepel. A 49. oldalon jelzett rost asszociáció az azonos típusú (ez esetben I-es) izomrostok asszociációját jelenti. A két helyen előforduló „ubiquitos”-t az „ubikviter” jelentésnek megfelelően szándékoztam használni, sajnos ennél is becsúszott egy betűhiba.

Válaszaim a kérdésekre:

A válaszok alátámasztására használt referenciákat, ha a dolgozatomban is szerepelnek, csak szerzővel és évszámmal említem, egyébként részletesen feltüntettem a referencia forrását

1)A Bevezetés kitér az izomdifferenciálódási markerekre (p. 9), ide sorolva a dezmin, az alfa-aktint, a miozint és a SERCA fehérjét. Ugyanakkor számos fehérjéről ismert, hogy szinte kizárólag a harántcsíkolt izomban expresszálódnak (pl. titin, nebulin, stb.). Ezek felhasználhatóak differenciálódási markerként?

Igen, úgy gondolom, hogy a titin és a nebulin is felhasználhatóak a szarkomer differenciáció markereiként, sőt a titin mioblasztokban is kifejeződik (van der Ven et al. 1993 J Cell Sci 106:479-489, Moncman and Vang 1996). A titin kifejeződését együtt írták le a dezminével a notexin indukált regenerációban (Vater et al. 1992). Mi nem használtuk ezeket, ezért is hiányoznak az izomdifferenciációs géneket tárgyaló részből. Attól tartottam (Vater et al. 1992 alapján), hogy a notexin regenerációs modellben a nekrotizálódó izomrostokból felszabaduló

titin és nebulin stabillabbak maradnak, mint a dezmin és a háttérben zavarhatják a mioblasztokban és miotubulusokban kifejeződő titin és nebulin kimutatását. A másik ok, hogy húsz éve még nem állt rendelkezésünkre információ, antitestek a titin és nebulin neonatalis izoformák kimutatásához. A dezmin differenciációs markerként csak az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz bizonyult igazán hasznosnak, az immunobloton már kevésbé. A miozin nehéz lánc izoformái azonban már ismertek voltak és az antitestjeik is könnyebben voltak beszerezhetőek, ezért is használtuk inkább azokat.

2) BrdU jelölés kimatása (p. 23 legalja). Miért véletlenszerűen kiválasztott blokkokat alkalmaztak az immunfestéshez? Mi indokolja, hogy nem használták a teljes izommintát?

Egy kis félreértést érzek a kérdésben: nem a véletlenszerűen kiválasztott blokkokat, hanem mindegyik blokkból három véletlenszerűen kiválasztott metszetet alkalmaztunk a BrdU jelölés kimutatására. A BrdU jelölt sejtmagok számolásához azért nem a teljes (soleus) izmot használtuk, mert akkor már hematoxin és eozin festéssel feltérképeztük a nekrosis és regeneráció mértékét és időbeliségét az izomban és láttuk, hogy a harmadik napra annak eloszlása egyenletes az izom hosszában. Azzal, hogy hosszában hat egyenlő hosszúságú blokkra osztottuk az izmot még részletesebb képet kaptunk a sejtszétválásról. A számolást e blokkok mindegyikének véletlenszerűen kiválasztott három metszetén végeztük, melyekből levontuk a kontroll izom értékét és összeadtuk ezeket. Úgy láttuk, ez kellően reprezentálta az egész izomban bekövetkezett BrdU jelölést. Egyébként, ha a teljes izommintát felszeleteljük, az jóval több munka lett volna, s úgy véltük számolni kell majd olyan hibákkal is, hogy a blokkok keresztmetszetének eltérése befolyásolhatja a mikroszkópi metszet vastagságát, s ez utóbbi a metszetbe került sejtmagszámot. Ezért inkább a jelölés véletlenszerűen kiválasztott metszeteken történő értékelése mellett döntöttünk. Véleményem szerint jól, mert az eredmény konzisztensnek mutatkozott nem csak az abban a cikkben szereplő többi adattal, hanem a későbbi évek során mért paraméterek értékével és interpretálásával is. Felvetődhet még, hogy lehetett-e volna „whole mount” preparátumot készíteni az egész izomból, de problémát jelentett volna a sejtmagok, a kromatin „feltárása” a BrdU immunhisztokémia számára (2n HCL-es kezelés). Tudomásom szerint patkány soleusra nem közöltek erre alkalmas módszert.

3) A regenerálódott izom ultrastrukturája (szarkomerikus, miofilamentális szerkezete) milyen az eredeti, nekrozist megelőző izomszerkezethez képest (5-6. ábrákhoz kapcsolódóan).

A notexin regenerációs modellben nem vizsgáltuk az ultrastruktúra változását. A rostméret a vizsgált, többnyire egy hónapos periódusban nem érte el teljesen a kontroll rostméretet, de 3-6 hónap múlva már igen. A neuromuszkuláris véglemezek a normál izom keresztmetszeten átlós irányban rendeződtek, míg a regenerált izomban szórtaabb elhelyezkedést mutattak (Kósa and Zádor 2013). A szakirodalom szerint (Whalen et al. 1990, Harris 2003) a szarkomerikus miofilamentális szerkezet lényegében helyre állítódott, az A és I sávok szélessége, a szarkomerméret azonos lett, mint a kontroll izomban. Érdekes módon a miofilamentális

szerkezet kialakulásának kezdetéhez még nincs szükség beidegzésre. Ugyanakkor a regenerálódó izomban gyakoribbak a rostelágazások és a centrálisan elhelyezkedő sejtmagok, mint a normál izomban és az endomízium is mutathat a normál izométól eltérő deformációkat (Allbrook 1981, Muscle Nerve 4:234-245, Whalen et al. 1990, Head et al. 2014, Exp Physiol 99(4):664-674).

4) Mi az oka annak, hogy a MyoD transzkript időfüggő változásai (8.A ábra) késnek a fehérjéhez képest (10.A ábra)? Nem fordítva várnánk? Jóllehet erről olvashatunk egy lehetséges magyarázatot (72. oldal), miszerint szatellitasejtek vagy miogenikus prekursorok vándorolnak a nekrotizáló izomba, ez a lehetőség kísérletesen tesztelhető. Történt-e ilyen próbálkozás, avagy spekulációról van szó?

A 10. A ábrán valóban látható egy oszlop, amely a myoD fehérje normál izomban mért értékénél nagyobb, azonban nagy a szórás és a különbség statisztikai módszerrel nem szignifikáns, amint azt jelzem is a szövegben és az ábra magyarázatában. A myoD fehérje átlagos szintje azért alakulhatott ilyenre, mert egy-két regenerálódó izom myoD szintje a normálnál magasabb volt. A nekrosis alatti magas myoD szint lehetséges magyarázataként a 72-73 oldalon idézek három olyan közleményt (Bischoff, 1997, Seale and Rudnicki 2000, Schulze et al. 2005), amelyek leírtak aktivált szatellitasejt vagy, ha úgy tetszik miogenikus prekursor vándorlást a környező normál izmokból a nekrotizálódó izomba. Úgy vélem ez nem spekuláció, hanem mások tudományos megfigyelésével alátámasztott említése egy lehetséges indoknak. Másrészről a myoD transzkript szintjét ugyanazon a napon szintén egy a normál izoménál magasabb oszlop jelzi a 8. a ábrán, de ez a különbség sem szignifikáns. Nem mondható tehát, hogy a myoD fehérje szintje megelőzné az mRNS szintjének emelkedését, inkább az látszik, hogy együtt változnak. A nekrosis és a regeneráció vizsgálata során nem volt lehetséges többszöri mintavétel ugyanazon izomból, ezért a molekulaszintek gyors változása, mint például a myoD esetében is, a feldolgozás időpontjában az egyes izmokban jelentős eltérésekhez vezetett. Ezért fordulhatott elő ilyen. Igen, voltak próbálkozásaim arra, hogy a rendelkezésemre álló Novocastra myoD antitesttel immunhisztokémiai módszerrel is kimutassam a nekrosis-regeneráció első napjain myogenikus prekursor sejteket. Azonban metszetenként olyan kevés és változó mennyiségű myoD pozitív sejtmagot találtam, hogy látszott: így jóval nehezebb lesz mennyiségi különbséget kimutatni, mint immunobloton. Végül, amint az immunobloton is látszik, az első napon nem volt szignifikáns a myoD emelkedése, így az nem bizonyítja, hogy más izmokból származó aktivált szatellita sejtek bevándorlása a regenerálódó izomba jellemző lenne az első napon.

5) Passzívan nyújtott izomban változott-e az egy miofibrillum mentén elhelyezkedő szarkomerek száma? Más szóval, változott-e az átlagos szarkomerhossz? Ugyancsak ide tartozik, hogy a passzív nyújtási/terhelési kísérletekben milyen szerepet tulajdonít az izom rugalmas elemeinek (titin, mikrotubulusok, kollagén)?

Ilyen kísérletet nem végeztünk. Általában nem vizsgáltuk a miofibrillumokat és az azokat alkotó szarkomereket. Így nem tudom, csak a szakirodalom alapján feltételezem, hogy változott a szarkomerek száma, de nem változott az átlagos szarkomerhossz, a miofibrillumok mentén a patkány soleus izomban a passzív nyújtás során. Az egyik alapvető munka szerint (Williams and

Goldspink 1973, J Anat 116: 45-55) a felnőtt egér soleus izmának egy hetes passzív nyújtása legalább tíz százalékkal növelte a miofibrillumok mentén a szarkomerek számát a kontrollhoz képest. A forrás régi, de nem találtam a cáfolatát. Már a múlt század hetvenes éveiben is leírták: alapvető, hogy neonatalis vagy felnőtt korú-e az adott izom és hogy mennyi ideig tartott a passzív nyújtás. A kísérleteinkben alkalmazott felnőttnek tekinthető soleus izom három napos és egy hetes passzív nyújtás hatására hipertrofizált, hosszabb lett, több lassú, I-es típusú rostot tartalmazott mint a kontroll. Mindez jelentős átépüléssel kellett, hogy járjon, ami összhangban van a szarkomerszám növekedéssel. Ennek alapján a hét napig nyújtott izomban nem feltételezném a szarkomerhossz átlagos növekedését a nem nyújtott izomhoz képest, legalábbis kisebb mértékben, mint a három napos vagy (az általunk nem vizsgált) rövidebb ideig, percekig, órákig passzívan nyújtott izomban. Az említett korai munkák is úgy interpretálják a szarkomerszám változást, hogy az izom ezzel tartja meg az optimális szarkomerhosszt a passzív nyújtás (vagy rövidítés) alatt bekövetkező miofibrillum hosszváltozáskor.

A passzívan nyújtott soleus izom említett intra- és extracelluláris rugalmas elemeit (titin, mikrotubulus, kollagén) sem vizsgáltuk, így ennél is a szakirodalomra szeretnék utalni. A kollagén szintézise megnőtt a nyúl passzívan nyújtott tibialis anterior izmában (Williams et al. 1997, J Anat 193:131-138), a szerzők részben ennek tulajdonítják a hosszabb időtartamú passzív nyújtás után bekövetkező merevséget. A titinről feltételezik, hogy a strukturális integritás és a nem kontraktilis izomerő alakítása mellett, mint biomechanikai szenzor is működik (Ganzier et al. 2014, Proc Natl Acad Sci U S A.111(40):14589-94). Ennek a molekulának az ekcentrikus kontrakcióban kulcsszerepet tulajdonítanak (Herzog et al. 2015 Frontiers in Physiol 6:174). A titin génexpresszió növekedésére nem találtam adatot, de úgy vélem együtt jár a szarkomerszám növekedéssel. Az Ankrd2 (titin kötő fehérje) szintje passzív nyújtás hatására jelentősen megnőtt az egér soleus izmában, de kevésbé a gyors típusú tibialis anterior izomban (Mckoy et al. 2005). Mindez a lassú típusú transzformáció részeként megy végbe. A passzív nyújtás által hipertrofizált izomban nyilván növekszik a mikrotubulusok mennyisége is. A mikrotubulusoknak alapvető szerepe van a mechanikus stressz reakcióban: közvetítenek az oxigén szabadgyökök termelődés és a Ca^{2+} jelutak felé, az alfa-tubulin posztranszlációs változása például szabályozza a citoskeleton merevségét. Feltételezik, hogy ennek a Duchenne típusú disztrofia (egy degeneratív-regeneratív jellegű izombetegség) pathomechanizmusában is fontos szerepe lehet (Kerr et al.2015, Nat commun 6:8526).

6) Mi lehet a molekuláris mechanizmusa annak, hogy bizonyos SERCA izoformák mRNS-e a notexin adást követő egy napon belül gyakorlatilag eltűnik (20. ábra)? mRNS lebomlás? Transzkripció gátlás?

A módszerünk, az RT PCR az mRNS szint kimutatására volt alkalmas. Az izomspecifikus SERCA izoformák mRNS-e bizonyára lebontódik az izomnekrózis és a masszív inflamáció során az endogén vagy a neutrofil eredetű RN-ázok által, hiszen a PCR nem mutatta ki ezeket. Alkalmas módszer hiányában nem vizsgáltuk, de feltehető, hogy a fogyatkozó izomsejtmagokban sem folyik transzkripció, hogy pótolja ezeket a nekrotizáló rostokban. Viszont megmarad, ill. esetenként emelkedik a SERCA2b mRNS szint, ami feltehetően a gyulladásban részvevő sejtektől származik. Ahol gyulladás van, ott nukleázok is felszabadulhatnak a nekrosis részeként. Ennél többet nem tudok mondani, mert valójában nem a nekrosis folyamatát igyekeztem vizsgálni. Az

egy nap utáni mintavételre csak azért volt szükség, hogy mutassa az izom degenerálódásának mértékét.

7) Milyen gyors a SERCA fehérjék normális kicserélődése (*turnover*) (21-25. ábrákhoz)? Más szóval, miért és hogyan lehetséges, hogy a SERCA fehérje a saját mRNS-ével szinkron módon tűnik el?

Kétségtelenül érdekes, hogy a lecserélt proteinek vajon miért nem „élnek túl”, és miért bomlanak le velük a transzkriptjeik is. Az említett ábrákon látható izoforma váltások a neonatalis-gyors-lassú differenciáció következtében mennek végbe, ezért bizonyára nem hasonlítanak a fehérjék normál izomban, a saját rosttípusukban végbemenő kicserélődésére. A turnover-t ez esetben is bizonyára a szintézis és lebontás sebessége szabja meg, radioaktív aminosav adása után a jelölt fehérje kivonása és tökéletes tisztítása utáni specifikus aktivitás félléletideje alapján lehetne megállapítani. Ilyen vizsgálatot nem végeztünk. Fel sem merült, hogy végezzünk. Ha belegondolok, azt várnám, hogy a turnover, minden fejlődési állapotban, rosttípusban (netán izomban) más lehet. A SERCA1b kicserélődése (27. ábra) a regenerálódó soleus izomban bizonyára rövidebb, mint 2-3 hét, de a regenerálódó EDL-ben csak mintegy hét napos. Az izoforma váltások, amelyre kíváncsiak voltunk, a turnover nélkül is láthatóak. Az egyes géntermékek, izoformák esetén más és más lehet a stabilitást és lebontást szabályozó szint és mechanizmus. A SERCA1b és SERCA1a izoforma váltás esetén a SERCA1 transzkript splicingja látszik meghatározónak. A SERCA1 gén már a mioblaszt-miotubulus-fejlődő izomrost állapotokban kifejeződik és a fejlődő rost állapotig a SERCA1b mRNS splicingja megy végbe, ez a message transzlálódik (a felnőtt nyújtott és a denervált izomban, ez az mRNS-t nem íródik át). Az SR fejlődésével a SERCA1b lecserélődik SERCA1a-ra. Ebben szerepet játszhat az is, hogy a beidegzés kialakulásával párhuzamosan domináns lesz a SERCA1a típusú splicing. Fontos lehet továbbá, hogy az intraluminális calcium szint emelkedése jobban gátolja a SERCA1b-t, mint a SERCA1a-t, s ennek következtében a SERCA1b csak fele olyan hatékonyan működik (Zhao et al. BBA 2015, 1852(10 Pt A):2042-7). A SERCA2 esetében az mRNS izoformák stabilitása eltérő: a SERCA2a mRNS 3' szakaszának köszönhetően jóval stabilabb, mint a SERCA2b-t transzláló mRNS-ek (melyek ugyanazon sejtállapotban kifejeződnek) (Misquitta et al. 2008, Cell Calcium 40:329-348). Az előbbi mechanizmus a szívizomban is érvényesül. A szívizomban kimutatták, hogy a SUMO1 conjugációja megnöveli a SERCA2a pumpa stabilitását és a pumpa SUMO-iláció mértéke lecsökkent a leálló szívekben (Kho et al. 2011, Nature 477:601-605). Általában úgy látszik, hogy az izom növekedését serkentő IGF-I –Akt-mTOR jelút vonal és a növekedését gátló myostatin SMAD2/3 jelút vonal tart egyensúlyt az izomnövekedés állapotában (Schiaffino et al. 2013, FEBS J 280:4294-314). Atrofia, denerváció, cachexia esetén főleg a proteoszómalis és az autofágiás fehérjelebontás szabályozza az izom méretét és valószínűleg a típusát is (Schiaffino et al. 2013, FEBS J 280:4294-314). Feltételezhető, de nem ismert, hogy ezek folyamatok érvényesülnek a regenerálódó izom átépülése rosttípus kialakulása során is (Schiaffino and Reggiani 2011).

8) Mi állhat az innerváció és a miozin nehézlánc expresszió közötti szoros összefüggés hátterében? Mi lehet a molekuláris mechanizmus?

Az innerváció hatását a legismertebb módon kalcineurin-NFAT jelút szenzorként közvetíti a lassú miozin nehézlánc kifejeződésére (Chin et al. 1998, Wu et al. 2000). Úgy látszik ez a regenerálódó soleus izomban is igaz (Serrano et al. 2001; McCullagh et al. 2004). Egy újabb közlemény vázizom specifikus KO egerek felhasználásával is megerősíti azt, hogy az NFATC1 serkenti a lassú miozin kifejeződést oly módon, hogy fizikai kapcsolatba lép a myoD N-terminálisán található C/H domainnal és ezzel gátolja ennek hatását a p300 hiszton aciltranszferázra és más kromatin szabályozó faktorokra, és ezáltal gátolja a gyors miozin kifejeződést (Ehlers et al. 2014, Cell Rep 8(6):1639-48). Hogy eközben közvetlenül mi szabályozza a lassú miozin gén kifejeződését, arra nem találtam egyszerűbb választ a szakirodalomban.

A másik fontos jelút, a Ras MAPK(ERK) is közvetíti a lassú beidegzés hatását a lassú miozin kifejeződésre (Murgia et al. 2000). Ennek további részletei nem ismertek pontosan. További megválaszolatlan kérdés, hogy miként kapcsolódik a két jelút a folyamatban egymáshoz.

9) A mechanikai terhelés megváltoztatása (tenotomia) megváltoztatta-e egyéb fehérjék szintjének megváltozását is?

A teljes tenotómiát nem, csak a részleges (néhány rostot érintő) formáját idéztük elő a regenerálódó soleus izom proximális ínkötegének részleges átvágásával. Ezekben a rostokban is csak a lassú izomra specifikus miozin és SERCA kifejeződését vizsgáltuk. Nyilvánvaló, hogy ezek a rostok passzív mozgatásnak is ki voltak téve a tenotómia mellett. A passzív mozgatás, ha a rosttípus váltást nem is befolyásolta alapvetően, bizonyára mérsékelte az izom leépülést – ezt a szelektíven denervált regenerálódó soleus mérsékeltebb friss súly csökkenése alapján gondolom a végtagi denervált regenerált soleuséhoz képest. A teljes tenotómia lényegében megszünteti az izomrost természetes nyújtását-rövidülését, ezáltal a passzív rövidüléshez hasonló állapotot eredményez. Ennél is fontos, hogy mennyi ideig tart. Egy hét után a lassú miozin kifejeződés leépülése és az MyHC2a és MyHC2x nehézláncok kifejeződése várható, s a szarkomerszám is csökkenhet (Tabary et al. 1972 J Physiol 224: 231-244; Williams and Goldspink 1973) a szarkomer alkotó fehérjék leépülésével, kifejeződésének változásával együtt. Megnőhet a tropomiozin alfa / béta izoformák és a gyors típusú troponin izoformák aránya is (Yu et al. 2007, Am J Phys 292:C1192-1203).

10) Hogyan történt a fehérjék kvantifikálása a fénymikroszkópos felvételeken (22, 23, 26, 28, 31, 34, 36. ábrák)?

Az említett ábrákon rostfestések láthatók, ilyenkor nem a fehérjék kvantitálását végeztük el, mert a módszer erre nem alkalmas, hanem a festődő rostok számolását. A környező rostokhoz viszonyítva döntöttük el, hogy egy rost festődik-e, vagy sem. A festődő rostok számát használtuk az összehasonlításhoz, illetve azt is vizsgáltuk, hogy párhuzamos metszeten kifejeznek-e másik fehérjét (pl. a miozin és SERCA korreláció vizsgálatakor). A kifejeződő fehérjék mennyiségi mérésére immunoblotot használtunk, általában ugyanazon izomra, amelyből a rostsámolást is végeztük.

11) Mi lehet a mechanizmusa annak, hogy a transzfekció távoli izomrostokban is érezteti hatását (37, 40. ábrák)? Üres vektorral történő transzfekció miért vezet izomtömeg és

rostátmérő növekedéshez (40. ábra)? Mi az a "friss súly" (37. ábra) és miben különbözik a "friss tömegtől" (38. Ábra)?

A néhány rostba transzfektált domináns ras és a SERCA1b siRNS egész izomra, tehát a távoli rostokra is kifejtett hatásáról egyelőre nem igen tudok többet annál, mint amit a disszertációban is leírtam: bizonyára autokrin-parakrin jellegű, valószínű, hogy a rostok környékén kimutatható interleukin 4 közvetíti és a citokin antitestje megszünteti. A mechanizmusra csak feltételezéseim vannak, nem jutottam el a kísérletekig. Újabb adat, hogy a denervált regenerálódó izomban ez a hatás nem érvényesül. Abból indulok ki, hogy a transzfektált gén hatása először egy az egész regenerálódó izomban érvényesülő rostméretet fenntartó mechanizmusra hat, melynek elemei a transzfektált rosttól távolodva nem feltétlenül ugyanazok. Ez a mechanizmus túlkompenzál, és ezért növekszik átmenetileg a friss tömeg és a rostméret. A 40. ábrán én nem látom, hogy az üres vektorral transzfektált regenerálódó izom tömege és rostmérete nagyobb lett volna a nem transzfektált regenerálódó soleusénál, mert a nem transzfektált regenerálódó izom nincs is feltüntetve ezen az ábrán. Az első ilyen tárgyú cikkemben (Zádor 2008) található egy táblázat, mely összefoglalja a friss tömeg és rostméret növekedését a regeneráció során. Ezeket az értékeket a cikk ábráival összehasonlítva látható, hogy az üres vektorral transzfektált regenerálódó izom tömegében és rost méretében nem különbözött a nem transzfektált regenerálódó izomtól. A friss súly ebben az esetben is lényegében egyenlő a friss tömeggel, az izom kimetszés utáni súlyát/tömegét jelenti.

12) Az izomnekrózis tetőfokán mi biztosítja a szövet mechanikai kontinuitását?

A notexint azért tartják alkalmasnak izomregeneráció beindítására, mert a megfelelő dózisban szelektíven nekrotizálja a soleus izomrostjait és megkíméli a kötőszövetet, az ereket és a szatellita sejteket (Harris et al. 1975, Montecucco et al. 2008, Cintra-Francischini et al. 2009). A szövet mechanikai folyamatosságát az biztosíthatta, hogy az izomnekrózis tetőfokán, a toxin injektálás utáni 1 és 2.nap. között is megmarad a kötőszövet (endomízium) nagyobb része. Ez azért is lényeges, mert az első dezmin pozitív sejtek (mioblasztok) a nekrotizálódott felnőtt rostok méretéhez igazodó endomízium megmaradt hálózatahoz tapadnak. Ez a kötőszövet, az endomízium hisztokémiai metszeteken látható méretváltozása alapján láthatóan gyorsan átépül, igazodik a miotubulusok és a fejlődő izomrostok méretéhez (Whalen et al. 1990).

13) A miozin és SERCA kifejeződés milyen szinten (pl. gén, transzkripció, szabályozás) és milyen mechanizmussal koordinálódik?

Úgy tűnik, hogy aligha lehet egyetlen mechanizmust és gén expressziós szintet kiemelni a fenti koordinációs szerepét illetően. Erre utal a dolgozatom egyik megállapítása is: a lassú miozin nehéz lánc és SERCA izoformák kifejeződésének szabályozása nem egyformán függ a beidegzéstől és a beidegzést közvetítő Ras és calcineurin NFAT jelutaktól a regenerálódó soleus izomban. Ennek kimutatását a lassú miozin és SERCA izoforma kifejeződési koordinációjának megszakításával lehetett megoldani. Ezért, ha más szempontból nézzük, a koordinálódás a beidegzés hatására, s az ennek közvetítésében alapvető szerepet játszó Ras és a calcineurin-NFAT jelutak által történik. A beidegzés más-más mértékben és génexpressziós szinten

szabályozza a lassú miozin és a lassú SERCA kifejeződését. Elképzelhető, hogy más izmokban, más izom típusban és más fejlődési és alkalmazkodási állapotban, ahol a lassú miozin nem függ a lassú beidegzéstől (Launay et al. 2006, Schiaffino and Reggiani 2011) a miozin és SERCA kifejeződés koordinálódhat másként is, nemcsak a beidegzés által vezérelt jelutak révén.

Remélem a kérdésekre adott válaszaim kielégítőek voltak és így a megtiszteltetés érzése mellé a sikeres válaszadás fölötti örömöm is társulhat.

Szeged, 2016. május 17.

Tisztelettel:

Zádor Ernő