

MTA Doktori Pályázat Doktori értekezés

# VÁZIZOM REGENERÁCIÓ ÉS TRANSZGENEZIS

Regenerálódó vázizom jellemzése és felhasználása transzgenikus modellként

## Zádor Ernő

egyetemi docens

Szeged, 2015

# $dc_{1047_{15}}$

Mottó:

"Semmit nem hasonlítok máshoz: minden az, ami."

ismeretlen bölcs

"A clever engineer can make a vacuum cleaner from the wreck of an automobil, but this does not show that cars contain vacuum cleaners. "

David Green

# dc\_1047\_<sup>ii</sup>15

# Tartalomjegyzék

MOTTÓi
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKEiv
ELŐSZÓvi
I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 1
I.1. Az izomregeneráció kísérletes előidézésének módozatai1
I.2. Az izomregeneráció forrásai, a szatellitasejtek2
I.3. A vázizom differenciálódás szabályozása: a miogenikus faktorok 4
I.4. A vázizom növekedése és a miogenikus reguláló faktorok6
I.5. A regenerációt befolyásoló autokrin-parakrin faktorok
I.5.1. A myostatin
I.5.2. A tumornekrózis faktor alfa (TNF-α)7
I.6. Az izomdifferenciálódási gének kifejeződése9
I.7. A beidegzés hatása az izomdifferenciálódásra12
I.8. Jelátviteli utak az izomdifferenciálódásban13
I.9. A vázizomrost mint transzfektálható sejt16
II. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÉRDÉSFELTEVÉSEK
III. MÓDSZERTANI ÖSSZEFOGLALÓ
III.1. Az állatok kezelése
III.2. Morfológiai vizsgálatok, immunhisztokémia és in situ hibridizáció
III.3. Az mRNS szintek kimutatása és összehasonlítása24
III.4. Fehérjék kimutatása és szintjük összehasonlítása27
IV. AZ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA
IV.1. A regeneráció a patkány soleus és extensor digitorum longus (EDL) izmaiban 31
IV.2. A miogenikus reguláló faktorok kifejeződése az izomregenerációs modellekben 33
IV.2.1. Soleus
IV.2.2. EDL
IV.3. A myoD jelentősége a soleus izom regenerációjában
IV.4. A miogenikus reguláló faktorok és a SERCA1 kifejeződése izomadaptációs
modellekben
IV.5. A myostatin kifejeződése41
IV.6. A tumornekrózis faktor alfa kifejeződése42

# dc\_1047<u>\_\_\_\_\_</u>5

IV	<i>V</i> .7.	A szarkoplazmás/endoplazmás retikulum Ca <sup>2+</sup> transzport adenozin trifoszfatáz	
		(SERCA) izoformáinak kifejeződése az izomregenerációs modellekben	44
	IV.	7.1. SERCA-k a soleus regenerációban	44
	IV.	7.2. SERCA-k az EDL izom regenerációjában	48
	IV.	7.3. A SERCA1b a soleus és az EDL izom regenerációjában	51
IV	V.8.	A SERCA kifejeződés idegi függése regenerálódó soleusban	52
IV	V.9.	A SERCA kifejeződés idegi függése normál soleusban	55
IV	V.10.	A SERCA2a kifejeződése független Ras-tól és kalcineurin-tól	58
IV	V.11.	A dnRas hatása a kalcineurinra regenerálódó soleusban – a rostnövekedés autokri	n-
		parakrin szabályozása	61
IV	V.12.	Néhány izomrost transzfektálása SERCA1b shRNS-t kifejező plazmiddal serkenti	i a
		növekedést az egész regenerálódó soleus izomban	64
IV	V.13.	A regenerálódó soleus izomrostok sejtmagjai főleg a plazmid injektálási hely	
		közelében transzfektálódnak	66
V.	ER	EDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	68
V	.1.A	soleus és az EDL regenerációja	68
V	.2.A	miogenikus faktorok és a regeneráció	69
V	.3.A	miogenikus faktorok izomadaptációs modellekben	70
V	.4.A	myoD szerepe a regenerációban	71
V	.5.A	myostatin kifejeződése a regenerációban	73
V	.6.A	TNF- $\alpha$ kifejeződés és jelentősége	74
V	.7.A	SERCA izoformák kifejeződése a regenerációban és passzív nyújtás során	78
V	.8.A	SERCA2a nem függ közvetlenül a beidegzéstől a soleus izomban	82
V	.9.A	Ras nem szabályozza direkt módon SERCA2a-t	83
V	.10.	A kalcineurin nem szabályozza direkt módon a SERCA2a kifejeződést	84
V	.11.	Hogyan szabályozódik a SERCA2a kifejeződés?	85
V	.12.	A ras és a kalcineurin lehetséges kapcsolata	86
V	.13.	A SERCA1b fejlődési szerepe a regenerálódó izomban	87
V	.14.	Az izomnövekedés szöveti szabályozása - egy új génterápiás lehetőség?	90
VI.	AZ	EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	92
VII.	SZA	AKIRODALOMJEGYZÉK	95
VIII.	. AZ	ÉRTEKEZÉSHEZ TARTOZÓ FOLYÓIRATCIKKEK 1	15
IX.	KÖ	SZÖNETNYILVÁNÍTÁS1	17

### $dc_{1047_{1}}^{iv}$ 15

#### **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

AChR: acetilkolin receptor AGPC: acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform **bHLH:** basic helix-loop helix BrdU: 5'- bromodeoxyuridine cAMP: ciklikus adenozin mono-foszfát Cn: kalcineurin **CSA:** cross-sectional area DAB: diaminobenzidin **DEP:** dethyl-pyrocarbonate **DHPR:** dihydropyridine receptor **DIG:** digoxigenin EC: excitation-contraction **ECF:** enhanced chemiluminescence **ECL:** enhanced chemifluorescence **EDL:** extensor digitorum longus FCS: fetal calf serum FIRE: fast intronic regulatory element FOXO1: forkhead box O1 GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GFP: green fluorescent protein GTF3: General transcription factor 3 HDAC: histone deacetilases **IB:** immunoblot Id: inhibitor of DNA binding **IFN:** interferon **IH:** in situ hybridization **IL:** interleukin MAPK: mitosis activated protein kinase MBNL muscle blind like DM1 myotonic dystrophy 1 MEF2: myocyte enhancer factor-2 MEK1: mitogen activated protein kinase kinase 1 **MMP:** matrix methaloprotease MRF: myogenic regulatory factor MyHC: myosin heavy chain **NFκB:** nuclear factor of kappa B cells NFAT: nuclear factor of activated T cells Orai: calcium release activated calcium channel protein **PI3K:** phosphatidyl inositol 3 kinase **PKC:** protein kinase C PKD: protein kinase D PW1: Peg3-dependent pathway 1 protein RT PCR : reverse transcription polymerase chain reaction **RYR:** ryanodine receptor **Smad:** TGFβ jelet továbbító intracelluláris fehérje SERCA: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ adenosine triphosphatase Smurf1: E3 ubiquitin ligáz fehérje **SOCE:** store operated calcium entry SR: sarcoplasmic reticulum SRF: serum response factor

dc\_1047\_v15

**STIM1:** stromal interaction molecule 1 **SURE:** slow upstream regulatory element **TEF-1:** translation elongation factor 1 **TGFβ:** transforming factor beta **TNF-α:** tumor necrosis factor alpha **TRAF2:** TNF receptor associated factor 2 **TRPC:** transient receptor potential channel

### ELŐSZÓ

Ez a munka - Zádor Ernő MTA doktori értekezése - az alapjául szolgáló tudományos folyóiratcikkek tartalmát foglalja össze. E cikkek témája egy vázizom regenerációs modell molekuláris jellemzése és transzgenikus felhasználása köré csoportosítható. A bennük szereplő kísérleti eredmények egy disszertáció elvárható terjedelmi keretei között nem mutathatók be részletesen, ezért csak a kutatás logikai menetéhez lényegesebbeket vettem sorra. Az izomregeneráció kutatásával két évtizede kezdtem el foglalkozni. Elsősorban az érdekelt, hogy lehetséges-e olyan fejlődésbiológiai rendszerré alakítani, amelyben a transzfektált gének hatása in vivo tanulmányozható. A regeneráció dinamikája és a neonatális fejlődéssel mutatott hasonlósága eleinte még a transzfektálás lehetőségénél is érdekesebbnek látszott. Ezért az első években elsősorban a regeneráció molekuláris folyamatainak leírása kötötte le a figyelmemet. Arra kerestem a választ, hogy a regenerálódó izom milyen mértékben ismétli meg az in vitro és in vivo izom differenciálódás algoritmusát, a sejtosztódás-differenciálódás és a szövetté alakulás lépéseit. Ebben a folyamatban latens szöveti sejtekből gyorsan osztódó sejtek jönnek létre, melyek több magvú miotubulusokká fuzionálnak végül kiterjedt izomrostokká fejlődnek. Az osztódásra képtelen kifejlett izomrostok posztmitotikus syncytiumnak tekinthetők és terminálisan differenciáltak, de korántsem állandóak, hanem továbbra is alkalmazkodnak a külső-belső környezeti hatásokhoz (pl. a beidegzés változása, terhelés, hormonok, növekedési faktorok). Az izom mérete is változik az alkalmazkodása során, sőt, olykor "transz-differenciálódik" is, azaz, a kontrakciós és metabolikus tulajdonságai eltolódnak a gyorsabb vagy a lassúbb irányba. Az általunk vizsgált regenerálódó izom differenciálódása nem csak morfológiai szempontból, hanem a folyamat molekuláris szabályozása tekintetében is eltér a kifejlett izométól. A kifejlett izmot, jóllehet kontrollként szolgálhat a regeneráció jellemzéséhez, valójában több fejlődési fázis is elválaszthatja egy adott stádiumú regenerálódó izomtól. A regeneráció egyes fázisait, először részletesen jellemezni kellett ahhoz, hogy megbízható térbeli és időbeli képet kapjunk, amelyből levezethető a kifejlett izom állapota. A morfológiai és molekuláris események feltérképezése után kerülhetett sor a folyamat belső összefüggéseinek felderítésére, a modellként történő alkalmazásra. Az általunk leírt regeneráció teljes volta és folyamatának reprodukálhatósága miatt olyan megfigyelések és összefüggések feltárását is lehetővé tette, amelyek más izomregnerációs rendszerekben, úgy látszik rejtve maradtak. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy az itt bemutatásra kerülő kísérleti rendszer az említett előnyei által eddíg is hozzájárult és később is hozzá fog járulni az izomregeneráció és fejlődés alaposabb megismeréséhez.

#### I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### I.1. Az izomregeneráció kísérletes előidézésének módozatai

Az emlős izomregenerációt főként a patkányban és egérben lejátszódása folyamatai alapján ismerjük. Mindenekelőtt az ép izomrostok sérülése idézi elő a folyamatot, melyben meghatározó, hogy hány rost és milyen mértékben sérül meg (Carlson 2008). A fizikai terhelésnek kitett (csontnövekedés által nyújtott) izomban is támadhat olyan mikrosérülés az izomrost szarkolemmáján, amely elegendő ahhoz, hogy a szarkolemma és a bazális lamina között elhelyezkedő szatellitasejtek aktíválódjanak, azaz mioblasztokat hozzanak létre (Järvinen et al. 2008). A mioblasztok a sérült izomrostba lépve génaktivitásukkal segítik a sérülés kijavítását. A rostok közötti térbe kiszabaduló molekulákat gyulladásos folyamatok távolítják el. Ha a rost több helyen sérül meg, akkor a sérült rost egy szakaszán a leépülés akár a bazális lamina részleges lebomlásáig is eljuthat. Ilyen mértékű változás is lejátszódhat fizikai terhelés hatására. A regeneráció a sérült bazális lamina mentén, a lebomlott rost épen maradt "keretében" indul meg, a következő pontban ismertetendő lépések szerint. Több rost, nagyobb kiterjedésű, de még mindig részleges sérülése esetén, nagyobb mennyiségű idegen anyag szabadul ki és emiatt a gyúlladásos folyamat hosszabb, a sérülés is nehezebben gyógyul, az izom regenerációja elhúzódik.

Regenerációt kísérletesen ki lehet kiváltani az izom csipesszel történő összeroppantásával vagy szárazjég izomfelszínre történő ráhelyezésével is. Ez a folyamat modellezheti azokat az izomsérüléseket, amelyek zúzódás és fagyás hatására következnek be és részben ezek alapján gondolhatták korábban, hogy a vázizom rosszul regenerálódik. A másik ok az izom transzplantációk sikertelensége lehetett, konkrétan az a megfigyelés, hogy a sérült izomba beültetett kompatíbilis ép izom a vártnál lassabb gyógyulást eredményezett. A vázizom regenerációjához ugyanis mioblasztok kellenek, ezek kialakulását pedig késlelteti a nagyszámú sérült rost jelenléte és a miattuk fennálló gyulladás. A regeneráció akkor a leggyorsabb, ha a rostok többségét a kiterjedt nekrózis és gyúlladás viszonylag gyorsan eltávolítja. Ez a tipusú regeneráció játszódik le anasztetikumok (bupivacain, marcain) és a természetben előforduló toxinok (pl. kígyómérgek, a méhfullánk mérge) hatására. A kísérletes izom regeneráció előidézésére anasztetikumok közül a bupivacaint (Benoit et al. 1970) a kígyómérgek közül az ausztráliai tigriskígyó mérgét (hatóanyaga notexin) használják leggyakrabban (Harris et al. 1975). Az egérben és patkányban történt alkalmazásuk alapján megállapítható, hogy a notexin a bupivacainnál kiterjedtebb nekrózist okoz és a rákövetkező regeneráció is teljesebb, jóllehet pár napos késéssel következik be (Plant et al. 2006). Az utóbbi években jelentős előrehaladás történt a notexin hatásmechanizmusának megértésében. A toxin foszfolipáz A2 analóg, s azonosítatlan

### $dc_{1047_{215}}$

membránreceptorokhoz kötődik az izomroston, membránsérülést okoz, és perturbációval kezdődően elősegíti a szarkoplazma Ca<sup>2+</sup> koncentráció növekedését, de érdekes módon a mioblasztok viabilitását nem károsítja (Montecucco et al. 2008, Cintra-Francischinelli et al. 2009). A miotoxikus hatása szelektíven érvényesül az I-es és IIA tipusú izomrostokra és nem hat az izom differenciálódás korábbi állapotaiban levő sejtekre (szatellita sejt, mioblaszt). Egy notexinhez hasonló miotoxin, a crotoxin hatása mérsékelhető a ciklosporin A-val (CSA). Montecucco és munkatársai (2008) szerint ez a tulajdonság értelmezhető annak alapján, hogy a CSA gátolja a mitokondrium belső membránján levő átmeneti permeábilitási pórusok nyitását. Az I-es és IIA oxidatív rostokban a mitokondriumok nagyobb jelentőséggel bírnak, mint a IIx és IIB tipusú glikolitikus jellegű rostokban. A notexin a bejutás helyétől viszonylag távol is képes izomnekrózist előidézni, de nem jut át a vér-agy gáton, ami magyarázhatja azt, hogy kezdetben a bőr alá injektálva használhatták (Whalen et al 1990). A notexin pl. a vipera méreggel ellentétben nem rendelkezik haemorrhagiás hatással sem, tehát az ereket viszonylag épen hagyja, ami szintén fontos a regenerációt kiváltó tulajdonságához.



**1.** *Ábra:* A szatellitasejt elhelyezkedése az izomrost és a körülvevő extracelluláris matrix rétegek között (Bischoff 1993).

#### I.2. Az izomregeneráció forrásai, a szatellitasejtek

A vázizom regeneráció szinte kizárólagos forrásai az úgynevezett szatellitasejtek, amelyek szorosan a lamina basalis és a szarkolemma között helyezkednek el (1. ábra) latens állapotban (G0 fázis). A "szinte" használata azért indokolt, mert a nagyobb mértékű regenerációk során csontvelő eredetű őssejtek is közreműködhetnek csekélyebb mértékben az izom újra alakulásában (Schulze et al. 2005). A szatellitasejteket Mauro (1961) fedezte fel és írta le először a nem regenerálódó

### $dc_{1047_{315}}$

normál izomban. Formájuk elnyújtott orsóra emlékeztet, a nagyméretű sejtmagjukban laza a kromatin struktúra (Mauro 1961, Moss and Leblond 1971). Az izom sejtmagjainak 3-8%-át jelentik (Bischoff 1993) miközben a sejtmagok legnagyobb része a sokmagvú izomrosthoz tartozik. A lassú izom több szatellitasejtet tartalmaz, mint a gyors izom (Gibson és Schultz 1982), ellentmondásos eredmények születtek arra vonatkozóan, hogy a szatellita sejtek determináltak-e a gyors vagy lassú izommá alakulásra vagy elsősorban a külső körülmények, pl. a rezidens izom tipusa, denervációja határozzák meg a belőle kialakuló izom tipusát (Feldman and Stockdale 1991, Schultz 1996, Yablonka-Reuveni and Rivera 1994, Düsterhöft et al. 1990, Düsterhöft and Pette 1993, McLennan 1994, Lagord et al. 1998, Zammit et al 2006). A szatellita sejteket izomsérüléssel aktíválódnak, a G0 -ból bejutnak a G1 fázisba és befejezik a mitózist, aktívan osztódó mioblasztokat eredményezve. Arra vonatkozó adat is született, hogy a mioblasztok kialakulhatnak csontvelő eredetű sejtekből (Ferrari et al. 1998, Schulze et al 2005) és nem izomrezidens fibroblasztokból is (Gibson et al. 1995). Ezek az atipikus progenitor sejtek olykor szerephez juthatnak, de a legnagyobb részben a szatellitasejtek hozzák létre az állandóan osztódó izomprekurzor sejteket. A prekurzorok mioblasztokká alakulnak, majd primitív, sokmagvú miotubulussá fúzionálva megteszik az izomdifferenciálódás első lépését. Izomspecifikus fehérjéket fejeznek ki (pl. miogenikus faktorok, dezmin, izom spec. kreatin kináz,  $\alpha$ -aktin, II-es tipusú miozin, SERCA1 és SERCA2a) (Shi and Garry 2006), végül kifejlett izomrostok lesznek.

A szatellita sejtek igazi szöveti őssejtként viselkednek, tehát biztosítják a saját megújulásukat is. Kialakulásuk is lehetséges az izomban található mezodermális eredetű sejtekből többek között a Pax7, Notch és Wnt utak közvetítésével (Zammit 2008). A szatellitasejtek mennyisége az életkor előrehaladtával különösen fontos az izomméret megörzéséhez (Shefer et al. 2007).



2. Ábra: A miogenikus reguláló kaszkád összegezése néhány ismert faktor viszonylagos helyének a feltüntetésével a vázizom lineáris fejlődése során (Ludolph and Konieczny 1995).

#### I.3. A vázizom differenciálódás szabályozása: a miogenikus faktorok

A vázizom kialakulása sok lépésben történik, amelyben a mezodermális eredetű sejtek serkentő hatásokra kiszelektálódnak, mioblasztokat hoznak létre, melyek a sejtciklusból kilépnek és differenciálódnak (2. ábra). A folyamat megértésében akkor következett be áttörés, amikor felfedezték a miogenikus szabályozó faktorokat (myogenic regulatory factors, MRF-k), vagy másnéven a myoD családot, melynek négy fő tagja ismert: myoD (myf-3 emberben), myf-5, myogenin (myf-4 emberben), és MRF4 (herculin vagy myf-6) (Vaidya et al. 1992, Miller et al. 1993, Olson and Klein 1994, Ludolph and Konieczny 1995, Maione and Amati 1997). Ezeket a faktorokat azon tulajdonságuk alapján azonosították, hogy képesek voltak fibroblasztokat és más nem izomjellegűsejteket mioblasztokká alakítani. Az MRF-k a "basic-helix-loop-helix" (bHLH) transzkripciós faktor családba tartozó DNS kötő fehérjék. Szekvencia specifikus DNS-kötő bázikus domaint, a homo- és heterodimerizációban szerepet játszó HLH- domaint tartalmaznak. A heterodimerizáció nem miogenikus HLH fehérjékkel történhet, a legtöbb sejtben az E proteinekkel. A heterodimerizáció fontos a miogenikus faktorok in vivo funkciójához. A bHLH fehérje kötő hely egy konszenzus szekvencia (CANNTAG), melyet E-boxnak neveznek és számos izomspecifikus gén (nikotinos acetilkolin receptor  $\alpha$  alegység, miozin könnyű lánc,  $\alpha$ - aktin, dezmin, troponin I, kreatin kináz, stb.) szabályozó régiójában megtalálható, és szükséges is a kifejeződésükhöz (Lowe et al. 1998). Az MRF-k aktivitását a HLH proteinek egy másik osztálya gátolja, amelyet Id-nek (inhibitor of DNA binding) neveznek. Az Id képes kompetálni az MRFekkel és Id-E-protein heterodimert alakít ki. Az Id nem rendelkezik bázikus domainnel, heterodimerje nem képes kötődni a DNS-hez (Miller et al. 1993, Ludolph and Konieczny 1995).

Bár mindegyik MRF képes kötődni ugyanahhoz a konszenzusos DNS szekvenciához és fibroblaszt kultúrában is mindegyik képes izomdifferenciáció indukálására, az egyes MRF-k eltérő szerepe feltételezhető a különböző térbeli és időbeli kifejeződésük (Olson and Klein 1994) és knock-out mutánsaik eltérő fenotipusa miatt (Olson et al. 1996, Rudnicki et al. 1993). Az MRF-k specifitása különböző transzaktivációs domainjukban keresendő (TAD), amely révén más transzkripciós faktorokkal kooperálnak. A myoD és myf-5 fontos szerepet játszik az izomdeterminációban: a somiták izom prekurzor sejtjei vagy myoD-t vagy myf-5-t fejeznek ki a korai embrionális differenciálódásban. Mind a két MRF képes a kromatin szerkezet remodellációjára úgy, hogy korábban csendes, izom-specifikus géneket tartalmazó lokuszokat aktíválnak (Gerber et al. 1997). Képesek arra is, hogy egymást bizonyos mértékig kompenzálják, mivel sem a myoD, sem a myf-5 knock-out egér nem mutat izom-defektív fenotipust, de a myoD és myf-5 kettős mutáns nem alakít ki izmot (Rudnicki et al. 1993). A miogenin és az MRF4

### $dc_{1047_{515}}$

később fejeződik ki, amikor a mioblasztok visszavonulnak a sejtciklusból és miotubulusokká fuzionálnak. A miogenin úgy tűnik, hogy főleg az izomspecifikus gének direkt aktívációjában játszik szerepet, bár azt is leírták, hogy bizonyos körülmények között helyettesíti a myf-5-öt (Wang and Jaenisch 1997). Az MRF szerepe is hasonló és képes helyettesíteni a miogenin funkcióját (Zhu and Miller 1997). Az általános MRF kölcsönhatásokról kialakult kép még ennél is összetettebb, mert auto- és kereszt-aktívációs loopok lehetségesek közöttük, mely szükségesnek látszik ahhoz, hogy az MRF-k fenntartsák szintjüket az izomdifferenciálódásban (Yun and Wold 1996). Kifejlett izomban a myoD/myogenin arány függ hormonális és idegi hatásoktól és csökkenése felismerhető a gyors -lassú izomrost transzformációban (Hughes et al. 1993)

Fontos említeni, hogy miogenikus faktorok szorosan együtt működnek a MADS transzkripciós faktorokhoz tartozó MEF-2 családdal az izomdifferenciálódásban ((Maione and Amati 1997, Naya and Olson 1999, Yun and Wold 1996). A MEF2 és az MRF-heterodimerek a DNS-kötő domain-juk segítségével kooperálhatnak. A MEF2 is felismer egy konzervált DNS szekvenciát, amely számos izomspecifikus gén szabályozó régiójában megtalálható és a gén bHLH miogenikus faktorok általi E-boxtól független aktívációját szabályozza. A MEF2 nem izom szövetekben is kifejeződik és számos más transzkripciós faktorral léphet kölcsönhatásba.

Összegezve tehát a myoD és a MEF2 család transzkripciós faktorai közvetlenül szabályozhatják az izomspecifikus génkifejeződést. Ezért minden bizonnyal a miogenikus differenciáció szabályozási útjainak találkozási pontján helyezkednek el. A mioblasztok osztódása és miogenikus differenciálódás egymást kölcsönösen kizáró események, ezért nem meglepő, hogy a miogenikus faktorok szoros kapcsolatban állnak a sejtciklus szabályozásával. A myoD, együtt a tumor szupresszor retinoblasztóma proteinnel (Rb), aktívan szabályozza a sejtciklus leállását (Maione and Amati 1997). Másrészt az Rb protein is képes a myoD kifejeződés serkentésére a sejtosztódás leállításával és a miogenikus differenciáció beindításával. A ciklinek gátolhatják ezt a funkcionális együttműködést а ciklin-dependens kinázok aktíválásával, melyek hiperfoszforillálják az Rb proteineket és elősegítik a sejt G1-ből S fázisba jutását. Ismert, hogy a myoD transzaktíválja ciklin-dependens kináz gátlását elősegítő faktorokat, mint a p21 fehérje, ezáltal akadályozza az Rb protein foszforillációját és inaktívációját.

#### I.4. A vázizom növekedése és a miogenikus reguláló faktorok

A vázizomrost hosszirányú növekedése minden bizonnyal a legkisebb funkcionális egységek, a szarkomerák kialakulásával történik (Griffin et al. 1971). A szarkomerák nyugalmi hossza viszonylag állandó, ezért az izomrost jelentős növekedése során új szarkomerák beépülése szükséges. Ezt igazolja, hogy a passzív nyújtásnak kitett növekvő izmok a végeiken nagyobb mértékben építették be a jelölt adenint mint a középső részen (Williams and Goldspink 1973). A vázizom nyújtása számos izomspecifikus gén kifejeződését növeli (Goldspink et al. 1995), pl. az MyHC1 mRNS szintjét is (Dix and Eisenberg 1990), amely később eloszlik a rostok hosszában (Dix and Eisenberg 1991a). Alapvető megfigvelés volt, hogy a különböző miogenikus reguláló faktorok mRNS szintje differenciáltan nő a különböző izmokban (Lougna and Brownson 1996, Lowe et al. 1998). A mi kísérletes munkánk előtt (Zádor et al. 1999) nem volt ismert, hogy hogyan oszlik el az MRF mRNS-ek szintje a nyújtásnak kitett, tehát növekvő rostok hosszában. Az ismert, hogy a regenerálódó izmok rostjainak hosszában a miozin RNS eloszlása viszonylag egyenletes (Dix and Eisenberg 1991b). Ez felvet egy érdekes kérdést, hogy vajon a differenciálódott izomrost hosszában hogyan aktíválódnak az egyes sejtmagok a génaktivitásuk alapján? A neuromuszkuláris junkciók, a motoros véglemezek közelében ismert, hogy az acetilkolin receptor α-alegység génje idegi hatásra indukálódik (Fontaine and Changeux 1989). Az izomrost minden pontján szüksége funkciók ellátását biztosító génaktivitás (pl. aktin transzkripció) azonban ennél bonyolultabb mintázatot követ. A transzkripció pulzusszerűen történik az izomrost különböző pontjain és ezek a pulzusszerű aktívitások idővel kiegyenlitődnek a rost teljes hossza mentén (Newlands et al. 1998).

#### I.5. A regenerációt befolyásoló autokrin-parakrin faktorok

Az izomregenerálódás tárgyalása közben elkerülhetetlen az autokrin-parakrin faktorok szerepének bemutatása, melyek közül a myostatin és a tumornekrózis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) kifejeződését tanulmányoztuk. A myostatinra elsősorban az újdonsága és izomspecifikus volta miatt esett a választás. A TNF- $\alpha$  azért érdekelt bennünket, mert izomregenerációs modellünkben jelenlevő nekrózis kiterjedt gyúlladásos folyamatra engedett következtetni, amelyben szükségszerűen jelen kell lennie ennek a pro-inflamációs citokinnek is.

#### I.5.1. A myostatin

A vázizom növekedésének és fejlődésének szabályozása magában foglalja a teljes izomtömeg és a testtömeg arányának kontrollját. Bár ez nyilván rendkívül összetett feladat és nem várható el, hogy egyetlen szabályozó faktor végezze el, mégis meglepő, hogy a myostatin, mennyire

alkalmasnak mutatkozik ennek a feladatnak az ellátására. A myostatin az izomnövekedés és fejlődés gátló faktora, melynek génje igen konzervált a különböző fajokban (McPherron et al. 1997). Az embriogenezis során először a csak a miotomában fejeződik ki, de később több különféle izomban is megtalálható. A myostatin knock-out egerek jelentősen nagyobbak a vad tipusúaknál, ami elsősorban méretesebb izmaiknak köszönhető, ezek az izmok a hipertrófia és a hiperplázia kombinációjának az eredményei. Bizonyos szarvasmarha vonalak (belga kék, piemonti) sajátosága, a "dupla-izmoltság" melyet szintén a myostatin gén mutációjára vezetnek vissza. Ez azt feltételezi, hogy a myostatin általános és alapvető szerepet játszik különböző fajok izomtömeg kialakításában (Grobet et al. 1997, Kambadur et al. 1997, Smith et al. 1997). Jóllehet a myostatin kifejeződés fejlődési mintázata más lehet a szarvasmarha és az egér embriogenezisében. Természetesen azt sem zárhatjuk ki, hogy a dupla izmú szarvasmarha tenyésztése során más gének is szelektálódtak, melyek a myostatin génnel együtt alakították ki a fenotipust. Az első emberi myostatin mutáció hatásának leírása egy fiúgyermekben (Schuelke et al. 2004) összhangban van az izomnövekedést gátló funkcióval.

A TGF-β családba tartozó myostatinról várható volt, hogy egy szerin/treonin kináz heteromer receptor családhoz kapcsolódik és a szerin/treonin aktivitást fogja szabályozni. Ennek megfelelően azt találták, hogy a myostatin aktivin receptoron hat (ActRII), amelynek domináns negatív mutációja egérben még túlzottabb izmoltságot eredményez, mint a myostatin KO (Lee and McPherron 2001). In vitro kimutatták, hogy az útvonal részeként a Smad2 és Smad3 fehérjék foszforillálódnak. A myostatin jel növelésében a Smad4, gátlásában pedig a Smad7 és Smurf1 játszik szerepet (Joulia-Ekaza and Cabello 2007).

A myostatin a G0/G1 fázisba kényszeríti a mioblasztokat és csökkenti az apoptózisba jutó sejtek arányát. Ennek a fordítottja érhető el, ha a myostatint antiszenz RNS-el gátoljuk. Ez a közelítés arra utalt, hogy a myostatin hatásának fő élettani célpontja a myogenin, a p21 és a ciklindependens kináz. Ez magyarázhatja a hiperpláziás hatást. A hipertrófia kialakulásának lehetséges háttere, hogy a myostatin befolyásolhatja az ubiquitin-proteoszoma komponenst és a FOXO1 transzkripciós faktort, mivel az utóbbit a myostatin befolyásolhatja elképzelhető, hogy a két útvonal között "crosstalk" alakul ki (Joulia-Ekaza and Cabello 2007).

#### I.5.2. A tumornekrózis faktor alfa (TNF-α)

Az izomkárosodás komplex gyulladásos folyamatot vált ki. Ennek során igen rövid idő alatt neutrophilek és macrophagok árasztják el a szövetet. Míg a neutrophilek valószínűleg csak a szövettörmelék eltakarításában vesznek részt, addig a macrophagok szerepe jóval összetettebb, mivel ezek a gyulladásos citokinek (köztük a TNF-α) fő forrásai (Layne and Farmer 1999, De

Bleecker et al. 1999). A TNF-α többféle módon is gyakorolhat hatást a regeneráció folyamatára.

#### A sérült szövetek eltávolítása

Kezdetben a neutrophilek oxidatív és proteolitikus úton bontják a károsodott szövetet, elősegítve ezzel a phagocytosist. A TNF-α mindegyik részfolyamatra pozitívan hat. A szöveteltakarítás fontosságát mutatja az a megfigyelés, hogy a gyengébb fagocitáló képességgel rendelkező egértörzsekben a regenerációs folyamat hosszabb időt vesz igénybe (Grounds 1987).

#### Migrációt serkentő hatás

Régóta ismert, hogy a TNF-α különböző sejttípusokban képes chemotaxist előidézni, ezt C2C12 sejteken is bizonyították. A hatás koncentrációfüggő, és a maximumát 200 U/µl-nél érte el. In vivo vizsgálatban megmérték az epimysium alá injektált myoblastok migrációját, s a TNF-α-val kezelt izomban a myoblastok távolabbra vándorolnak, mint a kontrollban (Torrente et al. 2003). A TNF-α migrációt serkentő hatása nem csak chemotaktikus képességének köszönhető, hanem szerepet játszik benne a mátrix-metalloproteázra (MPP) gyakorolt hatása is. Az MMP egy proteolitikus enzim, amely az extracelluláris mátrix bontásával segíti a myoblastok vándorlását. A TNF-α-val infundált izomban kimutatható a MMP-2 ill. a MMP-9 transzkripciójának fokozódása (Torrente et al. 2003).

#### Mitogén hatás

Régóta feltételezhető, hogy a TNF-α-nak szerepet játszik a normális izomtömeg fenntartásában és az izomregeneráció fiziológiás lezajlásában. Erre engedtek következtetni azok az eredmények, miszerint, ha vemhes egereket TNF-α-t közömbösítő antitestekkel kezeltek, akkor az újszülöttek növekedési retardációval születnek (De Kossodo et al. 1992). Ennek ellentmondóan a TNF-α vagy TNF-α receptor DKO egerek izomtömege mégis normális, ami lehet az egyéb citokinek (IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$ ) kompenzatórikus mennyiségi növekedésének az eredménye, mellyel helyettesíthetik a TNF-α hatásait (Hodge-Dufour et al. 1998). Erre utal az a megfigyelés is, miszerint a TNF-α KO és disztrofin hiányos egerek izomregenerációja, bár látszólag normálisan lezajlik, alacsonyabb izomtömeget eredményez (Spencer et al. 2000).

Az izomregeneráció kezdetén az izom prekurzor sejtek több sejtcikluson is keresztülmennek, ezáltal elegendő mennyiségű mioblaszt áll rendelkezésre az izomrost felépítéséhez. Bizonyos növekedési faktorok serkenthetik a folyamatot a szatellita sejtek aktiválódásával és a sejtciklusba való beléptetésével, valamint úgy is, hogy felgyorsítják a sejtciklust (Chambers et al. 1996). Feltételezhető, hogy a TNF-α mind a két hatással rendelkezik. A TNF-α hatására in vivo nő az

aktivált szatellita sejtek száma, másrészt C2C12 myoblast kultúrában növekszik a teljes DNS tartalom, ill. a BrdU beépülés, ami a DNS szintézis fokozódására utal (Li 2003). A hatás 2-6 ng/ml koncentráció alkalmazásakor figyelhető meg, fölötte már a citotoxikus jelleg érvényesül.

#### Izomregenerációt gátló hatás

A nagyfokú izomtömegveszteség (cachexia) a különböző krónikus gyulladásos betegségeknek gyakori szövődménye. Ebben a folyamatban megfigyelhető a TNF-α magas szintje, ami a citokin szerepét is felveti. Az egészséges izomszövet használatot követően jelentősebben megújul, mint passzívitás után (Wanek and Snow 2000). Ezt az állapotot a lebontás és a felépítés egyensúlya jellemzi. Az egyensúly megbomlása vezethet a cachexia kialakulásához, melynek során feltehetően nem csak a lebomlás fokozódik, hanem a regenerálódóképesség is csökken. Ennek oka elméletileg az lehet, hogy a szatellita sejtek aktiválódása nehezebb. ill. a már aktiválódott sejtek differenciációja is gátolt.

#### I.6. Az izomdifferenciálódási gének kifejeződése

A miogenikus reguláló faktorok inkább előre jelzői mintsem igazi markerei az izomdifferenciálódásnak, de már a megjelenésük alatt is megindul egy sereg izomra jellemző gén kifejeződése, melyek termékeit izomdifferenciálódási markerek néven foglalhatunk össze. Ezeknek a géneknek a szabályozása nem mindíg áll közvetlen kapcsolatban a miogenikus faktorokkal, illetve a szabályozásuk nem is ismert még teljes egészében. Mindenesetre idő és térbeli megjelenésük alapján köthetőek a miotubulusokhoz, az ún. primitív rostokhoz és a differenciálódott izomrostokhoz.

A dezmin egy nem kizárólagosan izomban kifejeződő, de a miotubulusok kialakulásához jól kapcsolható intermediális filamentum, amely a Z sávokban koncentrálódik (Li et al. 1997). Vitatható, hogy a dezmin kialakulása köthető-e a korai miogenikus faktorok aktivitásához, de bizonyosnak látszik, hogy a dezmin általános kifejeződése az izom keresztmetszetén mutatja az izomregeneráció teljességét és a nem izom elemek visszaszorulását (Vater et al. 1992). Ez azért lehetséges, mert bár a mioblasztok is dezmin pozitivitást mutatnak, a teljes izom keresztmetszetet a miotubulusok fogják elfoglalni, jóllehet a kétféle kifejeződés immunoblotton nem mutat szignifikáns különbséget.

**Az alfa-aktin** szkeletális formája egy izomspecifikus kontraktilis fehérje, amely leginkább a differenciált vázizomban található, ezért köthető az izom regeneráció előrehaladott állapotához. Kifejeződése transzkript szinten is dinamikusan nő az izomregenerációban (Mendler et al. 1998a).

# $dc_{1047}^{10}15$

A miozin nehéz lánc (MyHC) izoformák: az izomdifferenciálódás különbözö stádiumai és irányai jól jellemezhető a kifejeződésükkel. Az egyszerűség kedvéért miozinoknak is szokás emlegetni ezeket az izomban, (annak ismeretében, hogy mindegyik a II-es tipusú miozinok csoportjába tartozik). A miozin könnyű lánc izoformák ugyanis nem rendelhetők specifikusan a vázizom diferenciáltsági állapotaihoz, ezért kifejeződésük is kevesebb információt hordozhat a rostok minőségére vonatkozóan. A miozin nehéz lánc aktinnal játszott szerepe a kontrakciót és relaxációt meghatározó kereszthíd-ciklusban ismert. A miozin nehéz lánc egyik formája embrionális korban fejeződik ki (eMyHC), a másik neonatalis korban (neoMyHC). A kifejlett rostok differenciáltsági állapota, az un. fenotípus, mely az összehúzódás erejére és sebességére (gyors-lassú) és az anyagcsere aerob illetve anaerob jellegére vonatkozik (oxidatívtól glikolitikusig). Az izomrostok fenotipusai szintén megkülönböztethetők a kifejezett myozin nehéz lánc izoformák alapján. A lassú-oxidatív, ún. I-es tipusú rostok MyHC1-et, a gyors-oxidatív, IIA tipusú rostok MyHC2a-t, a gyors-oxidatív-glikolitikus, IIx/d tipusú rostok MyHC2x/d-t és a gyors-glikolitikus II b tipusú rostok tipikusan MyHC2b izoformát fejeznek ki (1. táblázat). A rosttípusok ezen elosztása a miozin nehézlánc ATP-áz aktivitása alapján valamint a citrátkör enzimeinek és a légzési elektrontranszport lánc enzimeinek kimutatása alapján született, de mint látható jól korrelál a különböző miozin izoformák kifejeződésével. A rostspecifitással összefüggésbe hozhatók még számos gén kifejeződésével, többek között jól ismertek a kontraktilitást szabályozó proteinek közül a troponin izoformák is (Bottinelli et al. 1994, Schiaffino and Reggiani 1996, Bassel-Duby and Olson 2006).

Név/típus	Miozin nehéz	Összehúzódási	Fáradságtűrés	Metabolizmus
	lánc kif.	sebesség		
Ι	MyHC1	ssú	gas	atív
IIA	MyHC2a	→ la	(→ma	oxida
IIx/d	MyHC2x/d	→ ST	sony.	ol. (+)
IIB	MyHC2b	gyo	alac	glik

1.	Táblázat:	Az izomrostok	tulajdonságai

A szarkoplazmás/endoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$  -ATP-ázok (SERCA-k) a váz- és a szívizom relaxációjáért jelentős mértékben felelős fehérjék. A szarkoplazmából eltávolítják és a szarkoplazmás retikulumba gyűjtik a  $Ca^{2+}$ -ot, ezáltal lehetővé teszik, hogy a troponin molekulák

## $dc_{1047}^{1}$

komplexe elfoglalja a miozin fej aktin kötő részét és gátolja az aktomiozin kialakulását. A SERCA molekulák a szarkoplazmás retikulum (SR) membránjában homotetramert alkotnak és elvben mind a négy molekula képes önálló pumpafunkcióra a transzmembrán domainjai által kialakított csatornán keresztül (Brandl et al. 1986, 1987, Korczak et al. 1988). Háromféle SERCA gént ismerünk: SERCA1-3-t (a humán nomenklatúra szerint ATP2A1-3), szerkezetük helyenként erős homológiát mutat, ami párhuzamos/paralóg fejlődésükre utal (2. táblázat). A SERCA1 gén teljes transzkriptjének kétféle splicingja lehetséges. A SERCA1a mRNS mindegyik exont tartalmazza és a gyors tipusú izomrostra specifikus SR kalcium pumpát kódolja. A SERCA1b mRNS a 22. exon intronba kerülésével (exon skiping) alakul ki, ennek következtében a 21. és 22. exon határán található stop kód elvész és egy távolabbi, a 23. exonban található stop kódon érvényesül és egy nyolctagú, DPEDERRK aminósavból álló, töltéssel rendelkező peptidszakasz transzlálódik a fehérje C-terminálisán.

Gén	Izoforma	Szöveti kifejeződés			
SERCA1	SERCA1a	Gyors-oxidatív, gyors glikolitikus izom			
	SERCA1b	meonatalis izom, mioblaszt, miotubulus			
SERCA2	SERCA2a	Lassú-oxidatív izom, szívizom			
	SERCA2b	Sima izom és nem izom szövet			
SERCA3	SERCA3a	Vérlemezkék, limfoid sejtek, hízósejtek,			
		endotél sejtek, Purkinje-neuronok, pankreáz			
		Langerhans-sziget sejtek, nyálmirígy			
	SERCA3b	Egér pankreáz Langerhans-szigetek, emberi vese			
	SERCA3c	Egér pankreáz Langerhans-szigetek, emberi			
		vese			

2. Táblázat: SERCA izoformák és szöveti kifejeződésük (Dode, 1998)

A SERCA1a a C-terminálison a fenti nyolc aminosav helyett csak glicint tartalmaz. A SERCA1b transzkript a neonatalis korban fejeződik ki, a róla készült fehérjét specifikus antitest hiányában egyedül a mi munkánk mutatta ki, melyet az eredmények részben ismertetünk (Zádor et al 2007). A SERCA1a és SERCA1b ATP-áz aktivitás és Ca<sup>2+</sup> affinitás tekintetében nem, vagy alig mutatnak különbséget (Maruyama and MacLennan 1988). A SERCA2 génről négyféle transzkript alakulhat ki, ezek közül a SERCA2a, mely a 22-24. exonok intronba kerülésével jön létre, a szív-és a lassú vázizom leggyakoribb SR Ca<sup>2+</sup> pumpájának a transzlációját teszi lehetővé. A többi

# $dc_{1047}^{12}$

háromféle splicing a 22. exon meghagyásával és az ott található stop kódon érvényesülésével a SERCA2b fehérjét kódolja, amely sokféle sejtben, kis mennyiségben, a vázizomban is, megtalálható, de mivel a szintje változik, nem igazi ubiquitos (Misquita et al. 2006). A SERCA2a jóval kisebb Ca<sup>2+</sup>-affinitású és nagyobb ATP-áz aktivitású, mint a SERCA2b.

A SERCA1a és a SERCA2a egymáshoz képest kismértékű affinitás és aktivitásbeli különbséget mutat az előbbi javára. A SERCA3 gén három mRNS izoformát eredményezhet (SERCA3a-c), ezek mindegyike kódol fehérjét, de kifejeződésük vázizomban nem jelentős. A SERCA3 különbségét hangsúlyozza az is, hogy a thapsigargin, egy a többi SERCA-t specifikusan gátló alkaloid, nem hat rá (MacLennan 2000).

#### I.7. A beidegzés hatása az izomdifferenciálódásra

Az idegi hatás kezdettől fogva igen jelentős a vázizom differenciációban. Hiányában a szatellita sejtek kevésbé aktíválódnak (Maier and Bornemann 2004, Kujawa et al. 2004), továbbá az izom atrofizál és megváltoztatja a fenotipusát (Jakubiec-Puka and Szczepanowska 1994). A neuromuszkuláris junkciók markereként ismert acetilkolineszteráz enzim izoformái is jellegzetesen változnak a soleus és az EDL regeneráció során (Kiss et al. 2004). Az idegi hatás két részre osztható: neurotropikus hatásra (vineblastinnal gátolható) és elektromos aktivitásra (bungarotoxinnal gátolható). Általánosan elfogadott, hogy az idegi aktivitás az, amelynek minősége nagymértékben meghatározza a vázizom fenotipusát, míg a neurotropikus faktorok szerepe csak kiegészítő jellegű (Midrio et al. 1998, Zhong et al. 2002, Midrio 2006). Fontos adalék volt a témakör felderítéséhez, hogy a neurotropikus faktorok célzottan hatnak a miogenikus reguláló faktorokra és a szatellitasejtek aktívációjára (Hyatt et al. 2003, 2006), csakhogy ennek a változásnak nincs közvetlen kapcsolata az izomfenotipus kialakulásával (Kalhovde et al. 2005). A beidegzés mintázata meghatározza, hogy melyik miozin nehézlánc fejeződik ki, különösen igaz ez a lassú miozinra (Ausoni et al. 1990, Whalen et al. 1990, Baldwin and Haddad 2001). A miozin nehézláncokat a leggyakrabban használják az izomrost típusok elkülönítésére, ám ezek nem az egyedüli markerei az izom fenotipusának (Schiaffino and Reggiani 1996, Hämäläinen and Pette 1997, 2001). Például miozin nehézláncokkal koordináltan fejeződnek ki a megfelelő SERCA, troponin T és I izoformák is (Schiaffino and Reggiani 1996, Berchtold et al. 2000).

Az izomrost típusára jellemző fehérjék közül különösen a miozin és a SERCA egymásnak megfelelő izoformái azok, amelyek feltűnően azonos fejlődési és rostspecifikus mintázat szerint fejeződnek ki. Ez érthető is, ha belegondolunk abba, hogy a kontrakció és a relaxáció két fontos eleméről van szó, melyeknek működésük során szinkronban kell lenniük. Amint azt már

# $dc_{1047}^{13}15$

említettem az ismertett miozin izoformák közül a lassú miozin (MyHC1) rendelkezik a legszembetűnőbb idegi függéssel, eddig úgy tudtuk, hogy szintje kizárólag a lassú tipusú idegi aktivitás hatására emelkedik (Ausoni et al. 1990, Jakubiec-Puka and Szczepanowska 1994, Murgia et al. 2000). Nemrég bizonyítást nyert, hogy mindez csak a patkány izmaiból leszürt következtetések túlzott általánosításán alapul. Az egér soleus izma az ideg átvágása után csökkent rostátmérőt, gyengébb összehúzódási paramétereket, és alacsonyabb citrát aktivitást mutatott, de nem változott a lassú miozin szintje (Agbulut et al. 2008). Mindebből az következik, hogy a lassú idegi stimuláció kizárólagos hatását a miozin kifejeződésére csak bizonyos modellekben érvényes és hogy a miozin kifejeződés és az izom fenotipus szabályozását érdemes további izmokban, modellekben kutatni.

Annál is inkább, mert az idegi hatás teljes mechanizmusa a patkány soleus izomban sem ismert MyHC1 génkifejeződésének szabályozására. A miozin nehéz lánc in vivo génkifejeződése a lassú beidegzés hatására transzkripciós szinten szabályozódik. Ebben a modellben sikerült olyan transzkripciós enhancer faktor 1 (TEF-1) kötőhelyet találni, amely szükséges a miozin transzkript denervációs csökkenéshez, de ennek közvetlen kapcsolata az idegi szabályozás mechanizmusához még ismeretlen (Huey et al 2002, 2003). Hasonló a helyzet a SERCA kifejeződés esetében is, azzal a különbséggel, hogy az izomspecifikus SERCA izoformák szintje a splicing és az mRNS stabilitás szintjén szabályozódik (Misquita 2006). Schulte és munkatársai (1994) kimutatták, hogy a SERCA2a (lassú izom specifikus) és a SERCA1a (gyors izom specifikus) formák szintje a megfelelő (lassú, ill. gyors) izomban denerváció hatására csökken. Ezzel ellentétben Leberer et al. (1986) kimutatta, hogy a denerváció hatása csak mérsékelten érvényesül ezen a Ca<sup>2+</sup> pumpák kifejeződésére. Látszik, hogy az innerváció hatása a SERCA kifejeződésre sem minden körülmények között egyforma. Elképzelhető, hogy az izomrostok fenotipusa az eltérő izmokban különböző szabályozási mechanizmusok által alakul ki, a környezet és a helyi determináltság függvényében. A környezet hatásait a jelátviteli utak közvetítik a sejtszintű döntések és a génkifejeződés szintjére.

#### I.8. Jelátviteli utak az izomdifferenciálódásban

Az utóbbi évtizedben ugrásszerűen megnőtt az érdeklődés a jelátviteli utak iránt a vázizomban (Schiaffino et al. 2007). Jelen munka az e téren mutatkozó fejlődés teljes bemutatására nem törekedhet, csak az értekezés kísérleti eredményeinek megértéséhez szükséges ill a legalapvetőbb jelutakat ismerteti. Ezen utaknak egy hasonló szempontú rövidített összefoglalóját korábbi cikkünkben is közöltük (Báthori et al. 2008).

### $dc_{1047}^{14}$ 15

#### A MEF2/HDAC egyensúly

A miogenezis szabályozása kapcsán már említettem, hogy a myocyte enhancer factor-2 (MEF2) a myogenikus reguláló faktorokkal kombinációban szerepet játszik az izomspecifikus gének aktíválásában. Négy MEF2 gén ismert gerincesekben: MEF2A,-B,-C,-D, melyek az A/T gazdag DNS szekvenciákhoz kötődnek (Black and Olson 1998). Szintjük az embrionális fejlődés során a miogenikus sejtvonalakban megnő (Subramanian and Nadal-Ginard 1996). A MEF2 DNSkötődése primer sejtvonalakban emelkedik az inzulin, hidrogén peroxid, ozmotikus stressz és cAMP-függő kináz serkentésére (Al-Khalili et al. 2004). A MEF2 működését a hozzájuk asszociálódó hiszton deacetilázok (HDAC-k) gátolják, s egyensúlyuk jelátviteli utat alkot, amellyel a sejt válaszol a külső hatásokra beáramló kalciumra. Ez az út fontos szerepet játszik az izomrostok transzformációjában. Különböző kinázok (pl. CAMK, PKC, PKD) foszforillálhatják a HDAC-okat, megváltoztatva ezzel a konformációjukat, ami intracelluláris chaperonok kötődését teszik lehetővé az HDAC-ok sejtmagi lokalizációját szabályozó szekvenciához. Ez a konformáció változás szabaddá teszi a sejtmagból történő export szekvenciát is, így az HDAC kijut a sejtmagból, ezzel elősegítve a MEF2 aktivitását. Úgy tűnik, hogy a class II HDAC jelfüggő szétválása a MEF2-től szerepet játszhat az izomdifferenciálódásban. A gyors rostokat lassúvá alakító 10 Hz-es frekvenciájú tartós stimuláció elősegíti a HDAC4 kijutását a sejtmagból a szarkoplazmába és növeli a MEF2 aktivitás mértékét a vázizomban (Bassel-Duby and Olson 2006).

A MEF2 aktivitás mértékét tartós fizikai terheléssel és lassú izomra jellemző stimulációval növelni lehet MEF2 indukálható riporter gént hordozó tanszgenikus egerekben (Wu et al. 2001). A MEF2 és a kalcineurin is növelik a lassú-izom-specifikus gének kifejeződését, mint például a mioglobin, az MyHC1 és a lassú troponin I. A MEF2 aktivitás fizikai terheléssel előidézett növekedését gátolni lehetett ciklosporin A-val, amely egy kalcineurin inhibítor. Ha a MEF-riporter egereket keresztezték a kalcineurint overexpresszáló egerekkel, akkor a lacZ riporter gén kifejeződött, igazolva a MEF2 aktivitás kalcium-függését. Ezek az eredmények nem csak a kalcineurin és a MEF2 szerepét támaszják alá az izom adaptációs folyamataiban, hanem a közöttük folyó cross-talk lehetőségét is igazolják (Bassel-Duby and Olson 2006).

#### Kalcineurin/NFAT szignál

A kalcineurin egy heterodimer szerin/threonin foszfatáz, mely a kisebb katalitikus A alegysége és a nagyobb  $Ca^{2+}$  kötő B alegységének összekapcsolódása után fejti ki aktivitását. A nagyobb alegység kötődését a hozzá kapcsolódó Ca-kalmodulin váltja ki. A kalcineurin-kalmodulin komplex kialakulását és a kalcineurin enzimatikus működését tartós kis amplitúdójú  $Ca^{2+}$ 

hullámok idézik elő (Dolmetsch et al. 1997). Az aktív kalcineurin defoszforillálja a "nuclear factor of T-cells" (NFAT) nevű transzkripciós faktort, amely ennek következtében a sejtmagba transzlokálódik. Számos izomspecifikus gén szerepel az NFAT célpontjai között, ezek többségéről ismert, hogy az NFAT más transzkripciós faktorokkal együtt, pl. a miocitákban MEF2-vel, szabályozza őket (Wu et al. 2000, 2001). Az NFAT-nek többféle izoformája ismert (Rao et al. 1997), melyek közül a vázizomban talán az NFATc1-4 a leggyakoribb. Egyre nyilvánvalóbb, hogy a szabályozásuk nem csak a kalcineurintól függ. Például az NFATc1 electromos stimuláció hatására kalcineurintól függően, nyugalmi állapotban kalcineurintól függetlenül is bejut az izomrost sejtmagjába, de ugyanerre az NFATc3 nem képes (Shen et al. 2006).

A kalcineurin túlzott kifejeződése mioblasztokban olyan gének kifejeződését indukálja, amelyek az I-es tipusú rostok kialakulásához szükségesek, pl. a mioglobin és a lassú troponin I génje (Chin et al. 1998, Delling et al 2000). A kalcineurin izom kreatin kináz promoterről történő izomspecifikus kifejezése növeli az oxidatív metabolizmusban fontos fehérjék pl. mioglobin szintjét és gyors-lassú transzformációt idéz elő a rostokban (Wu et al. 2000, Naya et al. 2000). Ennek ellentéteként a kalcineurin A alfa és béta hiányos egerek izmaiban kevesebb a lassú rost és a kalcineurin Aβ1 hiányos egerekben kisebb mértékű a MyHC1 és MyHC2a kifejeződése (Parsons et al. 2003). Érdekes, hogy az izomzat tömege kisebb azokban a transzgenikus egerekben, amelyek egész életükben minden szövetben kalcineurin Aβ1 hiánya nem befolyásolja az egerek izomtömegét (Parsons et al. 2004). A különbségért bizonyára a kalcineurin más sejtekben (beleértve az izomprekurzor sejteket és mioblasztokat) kifejtett hatása a felelős.

A kalcineurin szerepét a lassú-oxidatív izom fenotipusának kialakulásában és fenntartásában a gátlószereinek hatása is alátámasztotta. A ciklosporin A-val kezelt egerekben megnőtt a glikolitikus enzimek kifejeződése, kisebb lett a lassú tipusú miozin, és nagyobb a gyorstipusú kontraktilis fehérjék aránya (Chin et al. 1998, Nakagawa et al. 2005). A kalcineurin gátló cain fehérje regenerálódó soleus izomba történt transzfekciója gátolta a lassú miozin kifejeződését és növelte a gyors oxidatív-glikolitikus miozinok kifejeződését (Serrano et al. 2001). Az NFAT aktivitás szerepét szintetikus gátló peptidjével igazolták: transzfekciója szintén csökkentette a MyHC1 és növelte a gyors tipusú MyHC2x exptresszióját (McCullagh et al 2004). Valószínűnek látszik, hogy az NFAT a MEF2-vel interakcióban szabályozza a lassú izom specifikus géneket (Bassel-Duby and Olson 2006). Az NFAT képes gátolni a gyors tipusú géneket is. Az NFATc1 izoforma lassú tipusú ingerlésre kötődött a gyors tipusú intronikus szabályozó szekvenciához

### $dc_{1047}^{16}15$

(fast-specific intronic regulatory element: FIRE) és gátolta a gyors tipusú troponin I kifejeződését (Rana et al. 2008). Előzőleg már ismert volt hogy az NFAT stimulálja a lassú troponin I kifejeződést és indukálja a GTF3 kofaktort, amely ködődhet a troponin I gén lassú izomspecifikus reguláló eleméhez (slow-specific upsteram regulatory element:SURE). Ez igazolja, hogy az NFAT képes az egymástól viszonylag távoli izomfenotipusban fontos génkifejeződések alternatív szabályozására (Calvo et al. 1999, 2001).

#### Ras/MAPK jelút

A Ras/mitogén-aktívált protein kináz (MAPK) útvonal intenzív fizikai terhelésre és elektromos ingerlésre fokozott mértékben működik az izomban. In vivo kísérletek igazolták, hogy a regenerálódó soleus izomban a Ras függő útvonalak befolyásolják a rostok méretét és tipusát (Murgia et al. 2000). A denervált regenerálódó soleus izomrostjai nem fejezik ki a lassú miozint, de a konstitutívan aktív RasV12-t kifejező plazmid transzfekciója helyreállítja a lassú miozin kifejeződését. Fordítva, a domináns negatív Ras meggátolta a lassú miozin kifejeződést az innervált regenerálódó izomban és megemelte a gyors izom tipusú differenciálódásra jellemző MyHC2x szintjét. A Ras három fő útvonalat szabályoz, amelyek hatása egymástól eltérő folyamatokhoz fontos a regenerálódó izomban is (Murgia et al. 2000). Kettős mutációkkal, melyek a konstitutív kifejeződést biztosító V12 mellett szelektíven befolyásolják egyik vagy másik utat igazolták, hogy a lassú miozin kifejeződés a MAPK(ERK) útvonal aktivitásától függ. A másik útvonal, a foszfatidilinozitol-3-OH kinázon (PI3K) és a harmadik pedig a ralGDS-en, a guanin-disszociáció stimulátoron keresztül működik. A PI3k útvonalat stimuláló Ras mutáns a regenerálódó rostok rendkívüli megnövekedését okozta és kisebb mértékű, de kimutatható növekedéssel járt ralGDS út serekentése is. Ezt az eredményt megerősítette a PI3K-tól függő protein kináz B/Akt kifejező plazmiddal történt tarnszfekció is, mely rendkívüli mértékben megnövelte a rostok méretét, de nem befolyásolta a lassú miozin kifejeződését (Murgia et al. 2000, Pallafachina et al. 2002).

#### I.9. A vázizomrost mint transzfektálható sejt

A vázizom szomatikus géntranszferre történő felhasználása elsősorban génterápiás célzattal kezdődött. A transzfekció alacsony, legfeljebb a rostok néhány százalékában kimutatható hatásfoka miatt (Wolff et al. 1990) a módszer fejlődése azonban más irányt vett és inkább a kutatásban tejesedett ki (Goldspink 2003). A génbevitel kezdetben vírus eredetű vektorokkal történt, később felismerték a virális promotert hordozó plazmiddal végzett transzfekció előnyeit is pl. nagyobb gének vihetők be általa, valamint olcsóbb és kevésbé citotoxikus mint a vírus vektorok (Schertzer et al 2006). A plazmid transzfekció normál vázizomban legalább mintegy 60

# $dc_{1047}^{1}$

napig (Utvik and Gundersen 1999) más források szerint akár egy évig is detektálható (Wolff and Budker 2005). A regenerálódó vázizomban azonban már 30 nap múlva is jelentősen csökken a roston belüli transzfektált sejtmagok száma, elképzelhető, hogy a szekretálódó transzgén kiváltotta belső immunreakciók miatt (Vitadello et al. 1994). Érdekes módon a plazmid transzfekció az érrendszeren keresztüli bevitellel is működik és a hatásfok mintegy tízszeres javulását eredményezi, igaz a felhasznált DNS is 10-20-szorosa annak a mennyiségnek, ami az izom direkt transzfektálásakor minimálisan szükséges (Wolff and Budker 2005). Ez a módszer igen érdekes génterápiás szempontból és biztató jövője lehet a kutatásban is. Azonban a vizsgálatainkban nem ezt, hanem az intramuszkuláris plazmid transzfekciót használtuk, ezért az utóbbi hátterét igyekszem megvilágítani.

Az emlős izom in vivo plazmid transzfekciója jóval kisebb hatásfokú, mint például egyes immortalizált sejtkultúráké. A DNS mennyisége széles tartományban nem mutat összefüggést az izom transzfekció hatékonyságával, viszont izolált izomroston kimérték, hogy a plazmidban transzfektál riporter gének (GFP, lacZ) expressziójának megjelenéséhez legalább mintegy 10<sup>6</sup> plazmid molekula szükséges (Utvik et al. 1999). Kétféle plazmid együttes injektálása az izomba csaknem kizárólag ugyanazoknak a rostoknak a transzfekcióját eredményezte (Rana et al. 2004). Ha két GFP-t illetve a lacZ-et kifejező plazmidot 1:5 arányban illetve 5:1 arányban injektálták, az expressziót mutató rostok mintegy 80%-ban mind a két gén termékét egyformán mutatták, ami azt feltételezi, hogy az izomban a bevitt plazmidok igen csekély százaléka fejeződhet ki. A transzfektált plazmidok mindig a bevitel helyének közelében levő sejtmagokba jutottak és onnan nem vándoroltak tovább, ellentétben az injektált oligonukleotidokkal, melyek percek alatt diffundáltak a rostvégek irányába (Utvik et al. 1999).

Általánosságban a regenerálódó vázizom a miotubulusok kialakulásának kezdetén (talán a kötöszöveti elemek átjárhatósága miatt is) jobban transzfektálható mint a kialakult differenciálódott izom (Vitadello et al. 1994, Murgia et al. 2000). Az utóbbi a transzfekcióját éppen ezért hialuronidáz és elektroporáció felhasználásával is javítják (Molnar et al. 2004, Schertzer et al. 2006).

### $dc_{1047}^{18}15$

### II. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÉRDÉSFELTEVÉSEK

Munkánk elején az izomregeneráció kevésbé ismert folyamatait kívántuk összehasonlítani a részletesebben leírt miogenezissel és izomdifferenciációval, ezért általános célokat tűztünk ki. A regeneráció általános morfológiai és hisztokémiai jellemzése után konkrétabb célok következhettek, például egy gén kifejeződésének a leírása. Számítani lehetett arra, hogy a miogenezisben és az izomdifferenciálódásban fontos gének kifejeződése az izomregenerációban is dinamikusan fog változni. A génkifejeződések tanulmányozása során is gyűjtöttünk további általános ismeretet a regenerációról. Eközben - amint az a tudományos kutatásban gyakran előfordul – eltértünk az eredeti tervtől, változtak a célkitűzések. A kutatómunkánk folyamatossága érdekében szerencsésnek mondható, hogy a legtöbb új célkitűzés a korábbi általános irányba illeszkedett, és amikor ezek teljesültek, akkor sem kellett kutatási irányt váltanunk, de már mélyebbre ható kérdéseket is feltehettünk. Amikor már több gén kifejeződésének mintázatát is részletesen ismertük, feltehettük a kérdést, hogy hogyan történik az in vivo szabályozásuk és mi a funkciójuk a regeneráció folyamatában? Az izomregeneráció feltérképezése elég támpontot adott ahhoz, hogy manipulatív módszereket is alkalmazzunk, hiszen időközben a regenerációt olyan kísérleti rendszerré alakítottuk, amelynek a változásai molekuláris szinten is bizonyos fokig ismertek és viszonylag előre láthatóak. Kísérleteink kiszámíthatósága érdekében igyekeztünk a vizsgált történéshez közeli közeli támpontokat kiválasztani és az értelmezhetőség miatt fontosnak tartottuk, hogy az adott génkifejeződés dinamikusan növekvő szakaszát vizsgáljuk.

#### Célkitűzéseink a következő csoportokba sorolhatók:

- A génkifejeződés molekuláris vizsgálatához homogén és egyenletes izomregenerációt kívántunk előidézni, amely a kiindulási izom teljes nekrózisát követően kizárólag újonnan létrejött rostokat tartalmaz.
- Mivel a lassú és gyors típusú izomdifferenciáció eltér egymástól ezért célszerű volt a regenerációs modellt egy gyors (extensor digitorum longus, EDL) és egy lassú típusú (soleus) izomban is kialakítani és ezeket összehasonlítani.
- 3. A miogenikus reguláló faktorok (MRF-k; myoD, myf-5, myogenin, MRF4) szerepe alapvető a miogenezisben és izomdifferenciálódásban. A regenerálódó izom megismétli az embrionális és neonatalis izomfejlődés állomásait és bennük a fenti folyamatokat. Ezért célul tűztük ki az MRF-k kifejeződésének leírását a gyors és lassú izom regenerációjában.
- 4. A myoD egy korai miogenikus differenciálódási faktor és szintje az izomdifferenciálódásban is dinamikusan változott. Ezért elhatároztuk, hogy felderítjük a myoD soleus izom regenerálódásában játszott szerepét antiszenz gátlás alkalmazásával.

# $dc_{1047}^{19}15$

- 5. A túlterhelt vázizom növekszik és a növekedése feltételezhetően az izom-ín határon történik. A vázizomrost növekedéséhez új sejtmagokra van szükség, melyeket újabb mioblasztok beolvasztásával kaphat. A mioblasztok miogenikus faktorokat fejeznek ki, ezért megvizsgáltuk a miogenikus faktorok szintjét az izom túlterheltség egyik modelljében, a passzív nyújtásnak kitett soleus izom hosszában. Ugyanebben a modellben megvizsgáltuk a SERCA izoformák kifejeződési szintjét is.
- 6. A myostatin egy rendkívül hatásos TGF-β tipusú növekedésgátló a vázizomban. Az izomregeneráció során dinamikus változások mennek végbe, melynek során az izom eltűnik, és újra létrejön, tehát jelentős myostatin növekedés is tapasztalható. Ezért érdekelt bennünket a myostatin szintjének változása mind a két tipusú regenerációban.
- A vázizom regenerációt kiterjedt nekrózis előzi meg, amelyben kulcsszerepe van a gyulladásos folymatoknak. Ezért megvizsgáltuk a proinflamációs citokin a tumor nekrózis faktor alfa (TNF-α) és receptorainak kifejeződését a gyors és lassú izom regenerációja során.
- 8. A vázizom összehúzódásában fontos szerepet játszó miozin nehézlánc izoformák kifejeződési mintázata ismert és felhasználható a regeneráció stádiumainak azonosítására. Kevésbé ismert azonban az izom elernyedésben alapvető jelentőségű szarkoplazmás retikulum Ca<sup>2+</sup> ATP-áz (SERCA) izoformák kifejeződése. Ezért célul tűztük ki a SERCA izoformák kifejeződésének leírását a lassú és gyors izom regenerációjában.
- 9. A lassú izom kontrakciójáért nagymértékben felelős lassú miozin nehéz lánc (MyHC1) kifejeződése idegi szabályozás alatt áll a regenerálódó soleus izomban. A lassú SERCA2a a lassú miozinnal koordináltan fejeződik ki a regenerálódás során és a normál izomrostokban. Ezért megvizsgáltuk a lassú SERCA2a kifejeződés idegi függését a regenerálódó soleus izomban és ugyanezt megvizsgáltuk a normál izomban is.
- 10-11. A beidegzésnek a lassú miozin nehéz lánc kifejeződésére gyakorolt serkentő hatását két egymástól független jelút is közvetíti a regenerálódó soleus izomban. Az egyik jelút a Ras-on, a másik a kalcineurinon keresztül visz. Ezért megvizsgáltuk a SERCA2a kifejeződés Ras- és kalcineurin-függését a regenerálódó soleusban. Ehhez a munkához a lassú miozin kifejeződés gátlásában jól bevált plazmid transzfekciót alkalmaztunk.
- 12. A Ras és a kalcineurin két egymástól jól elkülönülő jelút eleme a vázizomban, de a kapcsolatuk ebben a szövetben még nem ismert. A regenerálódó soleus izom transzfekciója domináns negatív Ras-sal csupán a rostok néhány százalékában sikeres, de serkenti az egész izom növekedését. Mivel a kalcineurin szerepe autokrin-parakrin folyamatokban ismert, ez felvetette a Ras és kalcineurin kapcsolatának a lehetőségét.

# $dc_{1047}^{20}15$

Ezért célul tűztük a Ras és a kalcineurin összefüggésének vizsgálatát a regenerálódó soleus izomban.

- 13. A neonatali szarkoplaszmás retikulum kalcium ATP-ázról (SERCA1b) a kifejeződési mintázata alapján feltételeztük, hogy szerepe lehet a regenerációban, s ennek kiderítésére RNS interferencia módszert alkalmaztunk a regenerálódó soleus izomban.
- 14. Mivel a rostok kevesebb, mint 1%-ában érvényesülő jelút gátlások az egész izomra kiterjedő regenerációt serkentő hatást eredményeztek, alaposan megvizsgáltuk az izom transzfekció hatásfokát az egész regenerálódó soleusban.

#### III. MÓDSZERTANI ÖSSZEFOGLALÓ

A munkánk során felhasznált módszerek leírása az értekezés alapjául szolgáló 16 db kísérletes cikk módszertani részében található. Ezek együttesen meghaladják az értekezésbe illeszthető terjedelmet. Ezért a kísérleti metodika minden részletre kiterjedő ismételt bemutatása helyett csak a sajátosabb, de a munkánk szempontjából fontos módszerek ismertetésére szorítkozom.

#### III.1. Az állatok kezelése

A kísérleti patkányok tartása és kezelése érvényes engedélyek birtokában, a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, majd a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának és a Katholieke Universiteit Leuven állatkísérletes etikai előírásainak megfelelően történt.

Kísérleteinkhez 300-360 g-os hím Wistar laboratóriumi patkányokat használtunk, amelyeket ad libidum módon tápláltunk. Az állatok altatását a hatásos dózisú Na-pentobarbital vagy klorálhidrát oldat intraperitonealis injektálásával végeztük, melyet szükség esetén rövid éteres kábítás előzött meg. A soleus izmot feltártuk és az állat, ill. az izom méretének megfelelő 150-200 µl 100 ng/ml koncentrációjú notexint (Snake venom, Sigma) 0.9%-os NaCl oldatban intramuszkulárisan injektáltunk (Harris et al 1975, Zádor et al. 1996). Az EDL izom kezelése a feltárás után összesen 60 µg notexint tartalmazó 100 µl 0,9%-os NaCl oldattal történt. Ezeket a dózisokat az előkísérletek során végzet hatásvizsgálatok alapján állapítottuk meg.

A denervációs kezelés szintén altatásban történ. A végtag denerváció a csípőideg átvágása és kb. 1cm-es darabjának eltávolításával végeztük. A szelektív denerváció a soleus idegnek a vele párhuzamosan futó értől való elválasztásával és egy kb 3 mm-es darabkának az idegből való kivágásával történt.

Valamennyi kezelést követően a sebet bevarrtuk és az állatokat egyenként külön ketrecbe helyeztük.

A BrdU injektálását (1mg 200 µl NaCL-ben) a regeneráció különböző napjain a regenerálódó izom feltárása után intramuszkulárisan végeztük.

Az antiszenz és a plazmid intramuszkuláris injektálásának idejét és koncentrációját optimalizálás során állapítottuk meg, melyet a korábbi műtét helyén történő feltárás után a regeneráció különböző napjain végeztük el.

A regenerálódó soleus antiszenz kezelését a toxin injektálás után a harmadik napon steril fiziológiás sóoldatban feloldott 10<sup>-5</sup>- 10<sup>-7</sup> M tartomány kipróbálása után 2x10<sup>-5</sup> M oligókkal végeztük (Zádor et al. 2002). Foszforotioát oligókat használtunk, melyeket Dr. Bottka Sándor szintetizált az SZBK Növénybiológiai Intézetében.

# $dc_{1047}^{215}$

A plazmiddal történő transzfekció a regeneráció negyedik napján 20-50 μg DNS 50 μl 20%-os szukróz oldatban történő intramuszkuláris injektálással végeztük (Vitadello et al. 1994, Zádor et al. 2002, Zádor and Wuytack 2003). Két különböző plazmid külön transzfekciója 15-20 perc időeltéréssel ugyanazon soleus izomba történt (3. táblázat).

Az izmokat a megfelelő idő eltelte után sebészeti feltárással kimetszettük, nyugalmi hosszuknak megfelelően fogpiszkálóra rögzítettük és csepfolyós nitrogénben hűtött izopentánban fagyasztottuk, utána -70-90 C<sup>o</sup> -on tároltuk.

Név	Referencia	kifejeződés		
pRSV RasN17	al.	Domináns negatív Ras		
pDCR RasV12	998 998	Konstitutív Ras		
pDCR RasV12S35	nock 7, 1	Szelektíven MAPK-t stimuláló		
	Rat 199	konstitutív Ras		
pEGFP-C1	Owsianik G unpublished	EGFP		
cain	Lai et al. 1998	Kalcineurin gátló peptid		
pEGFP	Clontech	EGFP		
pDsRed	Clontech	DsRed		

3. Táblázat: A felhasznált plazmidok

#### III.2. Morfológiai vizsgálatok, immunhisztokémia és in situ hibridizáció

A kísérleti állatok tömegét a kezelés előtt és után is megmértük. Az adott vizsgálat sorozat céljától függően mértük a kimetszett regenerálódó és transzfektált izmok tömegét. A regeneráció stádiumainak követése céljából az izmok középső részéből harántirányú 15 µm vastagságú fagyasztott metszetet készítettünk, melyet hematoxilinnal és eozinnal festettük. A rostok keresztmetszeti területét, melyből a méretükre következtettünk, legalább 100-150 rost mérése után mikroszkópos program segítségével állapítottuk meg.

*Az immunhisztokémiai festést* a következő általánosan protokoll szerint végeztük: a tárgylemezre felhúzott metszetet kb 1-2 óráig szárítottuk, pH 7.5-os PBS-ben oldott 5%-os sovány tejporral 20 percig szobahőmérsékleten blokkoltuk, az 5% tejpor/ PBS-ben hígított elsődleges antitesttel (5. táblázat) overnight 4 C°-on inkubáltuk, 5% tejpor/ PBS-ben 10 percig szobahőn mostuk, 5% tejpor/ PBS-ben hígított másodlagos antitesttel kb 40-60 percig inkubáltuk, PBS-ben 3x 10 percig mostuk, DAB/peroxidáz módszerrel előhívtuk (0.05mg/ml DAB, 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS-ben). Ha

### $dc_{1047^{23}15}$

szükség volt az érzékenység növelésére az előhívó reakcióelegyhez 0,15% Ni-ammónium szulfátot adtunk. A metszeteket végül 50-100%-os propanol oldatokban végül toluolban víztelenítettük és Entellan®-nal lefedtük.

Az in situ hibriditációt Braissant and Wahli (1998) módszerével végeztük. Az erre használt metszeteket elkülönítve RN-áz mentes környezetben készítettük és diethylpyrocarbonáttal (DEPC) kezelt PBS-ben készült oldatokat használtunk. A TNF-α PCR fragmentjét (nt221-501) gélból eluáltuk és a Boehringer Gmbh (Mannheim, Germany) random priming digoxigenin (DIG) készlete segítségével megjelöltük. A metszeteket 4%-os paraformaldehid/PBS-ben fixáltuk, 2x 15 percig 0,1% aktív DEPC-t tartalmazó PBS-ben mostuk (a kontrol metszetet 15 percig 80 µg/ml RN-áz/PBS-ben tartottuk, utána 3x 5 percig PBS-ben mostuk). Az előhibridizálást 2 óráig 55 C°on 50%-os formamid, 5x SSC és 40 µg/ml lazac sperma DNS oldatában történt. Az overnight hibridizációt 40 µl prehibridizációs oldatban 500 ng/ml DIG-jelölt próbával fedőlemez alatt szintén 55 C°-on végeztük. A metszeteket 30 percig szobahőn, majd 1 óráig 65 C°-on 2x SSC-ben, utána 1 óráig 65 C°-on 0.1x SSC-ben mostuk majd 1-es pufferben equilibráltuk (100mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) és 2 óráig alkalikus foszfatázzal kapcsolt 1%-os Boehringer blokkolót tartalmazó hígított anti-DIG antitesttel (1:5000) inkubáltuk. A metszeteket 2x15 percig 1-es pufferben mostuk, 3-as pufferben (100mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) equilibráltuk és overnigh előhívtuk 10 ml-ben 45 µl NBT-t és 35 µl X-foszfátot tartalmazó 3-as pufferben. Az előhívást Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8 pufferben 15 percig leállítottuk. A nem specifikus hátteret 96%-os etanollal 1 óráig eltávolítottuk, a metszeteket 15 percig deszt vízben mostuk, majd dehidráltuk és lefedtük.

*Beta-galactozidáz festés:* a fagyasztott metszeteket 5 percig 2%-os paraformaldehidben vagy acetonban fixáltuk, 3x mostuk PBS-ben és x-gal pufferben (100 mM PBS, 5 mM KFe<sup>II</sup> –cianid, 5 mM KFe<sup>III</sup> –cianid, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM X-gal) éjszakán át 37 C°-on inkubáltuk. Utána PBS-ben 3x mostuk, eozinnal festettük és viztelenítés után lefedtük.

*A BrdU jelölés kimutatása:* A regeneráció különböző napjain történ BrdU injektálás után 16 órával az izmokat kimetszettük és 4 C°-on overnight 4%-os paraformaldehit/PBS-ben fixáltuk majd -20 C°-on tároltuk. A fagyasztva metszés előtt az izmokat a proximális és a disztális ín között hat egyenlő blokkra vágtuk. Mindegyik blokkból 3 véletlenszerűen kiválasztott metszetet használtunk fel az immunfestéshez. A sejtmagi DNS denaturálásához a metszeteket 30 percig 2n HCl-el kezeltük, 3x 10 percig 50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl–ben mostuk. Az endogén

# $dc_{1047^{24}15}$

peroxidáz aktivitást 5 percig 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS oldatban semlegesítettük, majd 2x 10 percig mosás következett PBS-ben. A metszeteket 20 percig 1% BSA, 5% normál kecske szérumban blokkoltuk, a blokkolóban oldott anti-BrdU-t (egér,Sigma, 1:100) 1 óráig és a biotinilált anti-egér antitestet (kecske, Vector Laboratories, 1:300) 30 percig tartottuk rajtuk. A két antitest között a blokkoló szérummal, a másodlagos antitest után PBS-el mostunk. Az immunokomplexet a Vectastain ABC Elite kittel (Vector Laboratories) tettük láthatóvá. A jelölt sejtmagokat mikroszkóppal számoltuk. A háttér korrekciójához nem regenerálódó kontroll izmokba is injektáltuk a BrdU-t és az ilyen izmokból kimetszett 3 metszeten számolt jelölt sejtmagok átlagát kivontuk a regenerálódó izomban számolt BrdU-jelölt sejtmagok számából.

#### III.3. Az mRNS szintek kimutatása és összehasonlítása

A teljes RNS tartalom kivonására eleinte Chomczynski and Sacchi (1987) módszerét, majd ennek rövidített változatát (Gauthier et al. 1997) használtuk, amelyek a széles körben elterjedt Trizol® kivonás alapját képezik. Mind a kettő acid-guanidium thiocianát-fenol-kloroform típusú kivonás, de az előbbi az utolsó feloldást és kicsapást kétszer ismétli meg. Röviden: az izmokat apróra vágtuk és 2 ml D-oldatban (4M guanidinium thiocianát, 25 mM Na-citrát pH 7.0, 0,5% N-lauroylsarcosine, 0,1 M 2-merkaptoetanol) üveg/teflon potterrel szobahőn homogenizáltuk majd 0,5 ml-enként Eppendorf-csövekbe osztottuk szét. A csövekhez 50 µl Na-acetátot (2M, pH4,0) adtunk, enyhén összeráztuk, 0,5 ml desztillált fenollal extraháltuk, majd az elegyhez 0,2 ml kloroformot adtunk,enyhén összeráztuk, 15 percig jégen inkubáltuk, hogy a fázisok szétváljanak és 10 000 g-vel 15 percig centrifugáltuk. A felülúszó vizes fázis tartalmazta az RNS-t, az interfázis a fehérjéket és a fenolos fázis a DNS-t. A felülúszót új csövekbe pipettáztuk és 0,5 ml izopropanolt adtunk hozzá, majd 15 percig 10 000 g-vel centrifugáltuk. A csapadékot vákuum/szobahőn szárítottuk és 24 µl DEP-kezelt deszt. vizben oldottuk és menyiségét UV spektrofotométeren mértük.

*A reverz transzkripciót* oligo dT primer felhasználásával, 1-2 μg RNS-ből a reverz transzkriptáz gyártók és a bevált leírások szerint végeztük (Wuytack et al 1994). Az egyszálú cDNS-ek kimutatásához a primereket az adatbankokban föllelhető szekvenciák és software-k segítségével terveztünk. A PCR körülmények megállapítása a primerek Tm-je alapján történt.

*Az RT-PCR* kísérletek elsődleges célja az mRNS szintek relatív mennyiségi összehasonlítása volt, ezért a termociklust és a reakcióelegy összetételét optimalizáltuk. A felhasznált primereket a 4. táblázat foglalja össze. A mérést az amplifikáció lineális fázisában végeztük és háztartási gén



**3.** *Ábra:* A SERCA mRNS izoformák kimutatásához használt primerek elhelyezkedése. A SERCA1, SERCA2 és SERCA3 géneket részlegesen ábrázoltuk. A boxok konstitutív exonokat, a vékony vonalak konstitutív intronokat jelölnek. A nagyobb boxok transzlálódott exonokat jelölnek. A SERCA1a/1b-t a 20-as és 23-as, a SERCA1/2-t a 8-as és a 9-es, a SERCA2a-t (class 1 mRNS) az Uf és C1, a SERCA2b-t (class 2-4 mRNS-k) az Uf és C2, a SERCA2/3-at a 12-es és 13-as primerek felhasználásával amplifikáltuk. a SERCA2 3' végen pAu és pAd az upstream és downstream poliadenilációs helyeket jelöli.(Zádor et al.1996)

transzkriptjére (GAPDH) normalizáltunk, amelyet szintén az amplifikáció lineáris fázisában detektáltunk. A SERCA izoformák (3. ábra) mRNS-einek arány RT PCR segítségével történő kimutatásakor az amplifikátumból 5 µl-t kivettünk ugyanolyan reakció elegyben, két ciklusban  $[\alpha^{-32}P]$  CTP –vel radioaktívan jelöltük, majd a fragmentek elkülönítésére alkalmas restrikciós enzimmel emésztettük. Az amplifikált ill. az emésztett fragmenteket 6%-os akrilamid gélen választottuk el. A géleket DNS kimutatásra alkalmas festékekkel (etidium bromid) tettük értékelhetővé. A rádioaktívan jelölt amplifikátumot tartalmazó géleket szárítottuk és PhosphorImager 425 ill. Storm<sup>TM</sup> 840 modelleken szkenneltük. A várt méretnek megfelelő fragmenteket, restrikciós emésztéssel és pGEM® T easy vektorba klónozás után szekvenálással azonosítottunk. A myostatin fragmentről ugyanebben a vektorban cDNS próbát készítettünk, melyet rádioaktívan jelöltük a transzkript kifejeződésének *Northern hibridizációs* kimutatásához. A TNF- $\alpha$  PCR fragmentet gélből történt izolálás és digoxigenin jelölés után használtuk *in situ hibridizációhoz*.

Transzkript	Ref.	Szekvencia $(5' \rightarrow 3')$	Fragment	PCR	T (°C)
név		szenz - antiszenz	hossz (bp)	ciklus	perc
myogenin		gacctgatggagctgtat	688	30	94-60-72
		agacaatctcagttgggc			1-1-1,5'
Myf-5	382	gagccaagagtagcagccttcg	441	29	94-60-72
		gttctttcgggaccagacaggg			1-1-1,5'
MyoD	ıl.	tggcgcgctgccttctacg	221	28	94-60-72
		acacggeegeactetteeetg		• •	1-1-1'
MRF4	er e		272	28	94-60-72
1.1	. Ipu		1 477	20	1-1-1
α–aktin	Aeı	atcatccccggcaaagccag	147	20	94-00-72
MuoD 5'		ggttgagcgagaagcagga	724	28	95-60-72
WIYOD 5	al	tgtagtaggcggcgtcgtag	124	28	1-1-1'
Id1	et	catgaaggtcgccagtcgcag	475	25	94-60-72
101	$\frac{1}{2}$	gtccatctggttcctcagtgc	475		1-1-1'
Id3	Zác 200	aaggcgctgagcccggtg	387		
N HOI		ctgcgttcgggaggtgcc	200	1 5	05 (0.72
MyHCI			288	15	95-60-72 1 1 1 ?
MuliCa	- 86	taaatagaatcacatggggaca	210	20	05 55 72
MynC2a	19	tatcctcaggcttcaagatttg	510	20	1-1-1'
MyHC2y	al.	tcccaaaqtcqtaaqtacaaaatqq	120	20	95-58-72
MyHC2X	et	cgcgaggttcacaccaaa	120	20	1-1-1'
MvHC2b	<u>ki</u>	ttgtgtgatttcttctgtcacct	197	22	94-55-72
	ins	ctgaggaacaatccaacgtc			1-1-1'
neoMyHC	sch	gcggcctcctcaagatgcgt	567	35	95-52-72
5	Jas	gaaggccaaraargccatya			1-1-1'
SERCA1a/b	Zádor et al.	ttccatctgcctgtccatgtc	248/206	21	94-60-72
	1996	ctggttacttccttctttcgtctt			1-1-1'
SERCA2a/	Van den Bosch et	ctccatctgcttgtccat	231	22	94-55-72
SERCA2b	al. 1994	gcggttactccagtattg			1-1-1'
SERCA1/	Zádor et al.	gactgagtttggggaacagct	194	21	94-60-72
SERCA2	1996	gaggtggtgatgacagcagg			1-1-1
SERCA2/	Wuytack et al.	tgcctggtagagaagatgaa	206/209	22	94-55-72
SERCA3	1994	cccttcacaaacatcttgct	200,209		1-1-1'
GAPDH	De Smedt et al.	tcctgcaccaccaactgcttagcc	376	21	95-60-72
Oni Dii	1994	tagcccaggatgccctttagtggg	570	21	1-1-1'
	Marlia at al. 1004	acuttoutotuaaacaucaatuuu	200	26	04 60 72
AChR-a	Merne et al. 1994	gccgtcataggtccaagtgccc	289	50	1-1-1'
subunit			150		05.54.70
MCIP1.4	al.		159	23	95-54-70
C A	et	agttgtcgactacggacag	265	20	95 50 72
CnA α	SI:	aagtcaaagaattgtccatgg	203	28	1-1-1'
~	- ve		105	2.6	05.50.72
CnA β	eny 20c	teagaaggateagaceacag	405	26	95-50-72 1 1 1?
	5 H				1-1-1
TNF-α	Zádor et al.	tggcccagaccctcacactc	281	35	95-59-72
	2001	ctcctggtatgaaatggcaaatc			1-1-1'
TNFR-60		gaacaccgtgtgtaactgcc	301	25	95-59-72
		attectteacetecacete			1-1-1'
TNFR-80	Bader & Nett.	gatgagaaatcccaggatgcagtagg	264	35	95-59-72
	1990	ιγεταταγατητιτατηατηταγη			1-1-1

### 4. Táblázat: A PCR reakcióhoz használt primerek

### $dc_{1047^{2}15}$

*Az antiszenz oligók stabilitásának mérés:* Az izomból teljes RNS kivonatot készítettünk, mely az injektált oligókkat is tartalmazta, ennek 1/10-részét [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP-vel az 5' végen T4 polinukleotid kinázzal megjelöltük (Sambrook et al. 1989) szerint. A reakció termékét 65 C°-on 5 percig denaturáltuk, azután 20 %-os urea-akrilamid gélre vittük. A gélt futtatás után szárítottuk és PhoszforImager-en analízizáltuk, az oligókat hosszuk alapján azonosítottuk.

#### III.4. Fehérjék kimutatása és szintjük összehasonlítása

A teljes fehérjetartalmat bicinkoninic acid és Bradford módszerrel mértük (Sambrook et al. 1989). Az izomkivonatok a tervezett vizsgálattól függő összetételű pufferoldatban és proteáz koktélban üveg-teflon vagy késes homogenizálóban készültek (Zádor et al. 1998, 1999, 2007, Mendler et al. 2000).

A szarkoplazmás retikulum (SR) izolálása, 4 C<sup>o</sup>-on : Az izmokat apróra vágtuk és esetenként proteináz gátló koktélt tartalmazó 2,5 ml 0.25 M szaharóz/5 mM HEPES pH 7,5 pufferben 4 C°on homogenizáltuk (amíg az oldat opálos nem lett). A kivonatot 1000 g-vel 10 percig ülepítettük majd a felülúszót 200 000 g-vel 30 percig centrifugáltuk. Erre azért volt szükség, mert előkísérleteink szerint a teljes SERCA tartalom 40-60%-ban oszlott meg a 20 perces 20 000 g-s és 1 órás 100 000 centrifugálás üledéke között. Ezt az g-s az egyesített (mitokondriális+mikroszómális) frakciót használtuk a SERCA-k kimutatására és szintjük mérésére.

*A miozin kivonásához* Hämäläinen and Pette (1997) leírása szolgált alapul, 4 C°-on: az izmot lemértük és folyékony nitrogénnel mozsárban porrá dörzsöltük, 8x térfogatú miozint kivonó oldattal (100 mM Na-pirofoszfát, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM KCl pH 8,5) felszuszpendáltuk. A szuszpenziót 20 percig forgattuk 4 C°-on és 10 percig 10 000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót 1 térfogat glicerinnel hígítottuk és -25 C°-on tároltuk.

*A miozin és SERCA kivonása ugyanazon izomból:* Az izmot SR izoláló pufferben homogenizáltuk és 10 percig 1000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszóból SERCA proteineket izoláltunk, a már ismertetett módon, az üledéket pedig folyékony nitrogénben porrá őröltük és a fenti módon miozint vontunk ki belőle.

Antitest	Antigén	Állat	Forrás	Hígítás	Felhasználás
A3	SERCA1	egér	Zubrzycka-	1:100	IB
		-	Gaarn et al.	1:30	IH
			1984		
A-1b	SERCA1b	nyúl	Eurogentec	1:2000	IB
	994-			1:100	IH
	DPEDERRK- 1001				
R15	SERCA2a	nyúl	Wuytack et al.	1:20 000	IB
		2	1989	1:5000	IH
R2-88	SERCA2b	nyúl	Egermont et	1:500	IB
		-	al. 1990,		
A-BrdU	BrdU	egér	Sigma	1:300	IH
myoD1	myoD	egér	Novocastra	1:250	IB
sc-760	myoD	nyúl		1:500	IB
Ab-1	pan Ras	egér	- zn.	1:20	IH
A-myostatin	myostatin	nyúl	- O-a- Sch	1:250	IB
			iote	1:50	IH
A-TNF-α	TNF-α	kecske	In B. S.	1:200	IB
A-MAC-387	MAC-387	egér	Novocastra	1:750	IB
	kalcineurin A	egér	Sigma	1:2500	IB
BA-D5	MyHC1	egér	et	1:50	IB
			_	1:20	IH
SC-71	MyHC2a	egér	- oui	1:100	IB
			aff 989	1:20	IH
BF-F3	MyHC2b	egér	. 1	1:10	IB
			al	1:10	IH
HA	hemaglutinin	egér	Calbiochem	1:200	IH
A-myc	myc	egér	Roche	1:25	IH
A-dezmin	dezmin	egér	Dako	1:300	IB
				1:20	IH

#### 5. Táblázat: Elsődleges antitestek (IB-immunoblot, IH-immunhisztokémia)

*A sejtmagi frakcióból* Zahradka et al. (1989) módszerének rövidített változatával vontuk ki a myostatint, a TNF-α-t és a myoD-t: az izom 31x térfogatának megfelelő mennyiségű pufferben (HEPES 10 mM pH 7,5, 5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM 2-merkaptoetanol, 0.32 M szaharóz) homogenizáltunk. A homogenizátumot gézen át vákuum segítségével szűrtük és 1000g-vel 8 percig centrifugáltuk. Az üledék lett a tisztítatlan sejtmagi frakció.

*A kalcineurin kivonása enzimaktivitás méréshez:* Mitsuhashi et al. (2000) módszere szerint kizárólag frissen kivett izmokból végeztük. Az izmot jéghideg 150 mM NaCl and 0.1 mM EGTA oldatban mostuk, majd négyszeres térfogatú pufferban (50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 250 mM

### $dc_{1047_{2}15}^{29}$

sucrose, 2 mM EGTA, 20 mg/ml Sigma proteáz inhibitor koktél, 10 mg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 0.15% b-mercaptoethanol, 5 mM ascorbic acid, and 0.5 mM DTT) homogenizáltuk.Ezután 20 000 g-vel 10 percig centrifugáltuk és a felülúszót használtuk az enzimaktivitás mérésére.Az enzim aktivitását a homogenátumból kolorimetriás esszé kit segítségével (Calbiochem) mértük a gyártó útmutatása alapján.



4. Ábra: Egy pan SERCA1 Ab (A53) SERCA1a specifitásának hiánya. A SERCA1b specifikus Ab a jobb oldali, a SERCA1 Ab a bal oldali immunoblotton. A SERCA cDNS-eket COS-1 sejtekben fejeztem ki és a tisztított membrán frakciót analizáltam. Az EGFP kifejeződés a transzfekció, a  $\beta$ -aktin a loading kontrollja volt. Az A53 Ab felismeri mind a két izoformát, míg a SERCA1b Ab nem ismeri fel a SERCA1a-t, csak a SERCA1b-t. (Zádor and Kósa 2015)

Immunoblott: A fehérjék elválasztásához Laemmli tipusú akrilamid gélelektroforézist használtunk. A gélekre mindenkor ismert fehérjetartalmú, de olykor nem a proteinre normalizáét, hanem az összehasonlításra kerülő izmok ugyanakkora hányadát tartalamazó mintát vittünk fel. A géleket nedves vagy semi-dry módon blottoltuk PVDF membránra. A membránok immunohibridizálását (5. táblázat) háromféle módszerrel - Ni-DAB, ECF és ECL - végeztük, melyek a gyártók előírása szerint a blokkolás módja, a mosások időtartama, a másodlagos antitestek hígítása és az előhívás módja tekintetében különböztek. Ezen módszerek érzékenysége NiDAB - ECF - ECL sorrendben nőtt. A leghosszabb linearitása miatt az ECF módszert tekintettük а mennyiségi összehasonlításra a legalkalmasabbnak. А mennyiségi öszehasonlításokat optimalizálás után a kimutatás lineáris fázisában végeztük.

*Sejtkultúra*: A BC3H1 és sol8 sejtek 2% L-glutamint, 2% penicilint és sterptomicint, 1% nem essszenciális aminosav keveréket (Gibco) és 20% foetalis borjú szérumot (FCS) tartalmazó DMEM-ben (Dulbecco's modified Eagle's medium) nőttek. A C2C12 sejtek ugyanabban a
# $dc_{1047}^{30}$ 15

mediumban nőttek, de ezuttal 10% FCS-t és 0,5%-os csirke embrió kivonatot adtunk hozzá. Mikor a kultura elérte a konfluens állapotát, a médiumot lecseréltük differenciálódási médiumra, amely kisebb növekedési faktor koncentrációt, azaz csak 0,5 % FCS-t tartalmazott. A sejteket feldolgozáshoz PBS-ben mostuk majd gumilapátka segítségével mechanikusan gyűjtöttük össze.

*Statisztikai módszer:* Ha az nem jelzett másként, a kísérleti minták (pl. izmok) száma 3-5 volt mérési pontonként. A különbséget P<0,05 küszöbértéknél tekintettünk szignifikánsnak. A párhuzamos összehasonlítások során nem szimetrikus T-próbát, a többoldalú összehasonlítás elemzéséhez Anova post hoc (Newman-Keuls) tesztet használtunk.

### IV. AZ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

### IV.1. A regeneráció a patkány soleus és extensor digitorum longus (EDL) izmaiban

A patkány soleus izom rostjai 150-200 µl (100µg/ml) kígyóméreg injektálásának hatására három nap alatt teljesen nekrotizáltak (5. ábra). A toxin optimális dózisát előkísérletekben állapítottuk meg. Az izomrostok mikroszkópikus határai valamint később a rostok maradványai is fokozatosan eltüntek, helyettük mononukleáris sejtek tömege volt látható az izom teljes keresztmetszetében (5. ábra). A harmadik napon jelentősen növekedett az izom BrdU-t beépítő képessége, ami jelezte a sejtosztódás megindulását (v.ö. 10B. ábra). A negyedik napon általánossá vált a dezmin kifejeződése az izom teljes keresztmetszetében, utalva a miotubulusok elterjedt kialakulására. Az ötödik napon az acetilkolineszterázra festődő pontok sokasága – véglemez-kezdemények jelentek meg a miotubulusok/primitív rostok membránja mentén, ami mutatta a beidegzés kialakulásának kezdetét. A hetedik napra a véglemezek száma megritkult, s amennyire az izom hoszmetszetén megfigyelhető volt, lényegében egyetlen véglemez idegzett be egyetlen rostot. Ezt követően a rostok, amelyek eddig is jelentős keresztmetszeti- és hosszirányú növekedésen mentek keresztül, tovább vastagodtak és négy hét múlva (28 nap) elérték a kezeletlen kontrol soleus rostkeresztmetszetének mintegy 80%-át. Ekkorra az izom tömege is lényegében megegyezett a kontrolléval. A regenerálódott izom rostjaiban a sejtmagok gyakrabban helyezkedtek el a rost közepén, mint a kontroll normál izomban, ahol a sejtmagok szinte kivétel nélkül perifériásan, a szarkolemma mellett voltak találhatók (5. ábra).



# $dc_{1047}^{32}$

A főbb lépések sorrendjét tekintve hasonló folyamat volt megfigyelhető az EDL regenerációja során is, melyben a teljes nekrózis előidézéséhez nagyobb dózisú (100 µl 600 µg/ml) notexin intramuszkuláris injekciójára volt szükséges. A nekrózis és a regeneráció eseményeinek időtartama hosszabb volt és kevésbé voltak elkülöníthetők egymástól. Jellemző volt, hogy a teljes nekrózis nem következett be a harmadik napon (6. ábra) mint a soleusban, hanem csak az ötödik napon. A beidegzés kezdeti stádiuma a hetedik napon, az egy rost/egy véglemez arány és a kifejlett véglemezek pedig a tizedik napon, azaz három nappal később voltak megfigyelhetők, mint a soleus regenerációban. Az EDL regenerációs folyamatai állatonként/izmonként is nagyobb változékonyságot mutattak. Ebben a túlnyomórészt gyors-glikolitikus izomban gyakran még az ötödik napon is jól kivehetőek voltak a nagy keresztmetszeti átmérőjű, gyors tipusú IIb rostok maradványai. A soleusban, amelyben a IIb rost hiányzott, a regeneráció harmadik napján sem volt a keresztmetszeten épp izomrost található.

Az izomspecifikus  $\alpha$ -aktin mRNS szintjének változása is jól mutatta a két izom regenerációja közötti különbségeket (7. ábra). Ez a kontraktilis fehérje transzkript a soleusban az első napon dramatikus csökkenéssel minimumot mutatott, majd fokozatosan emelkedve az ötödik napon lényegében elérte a normál izom szintjét és ott maradt a regeneráció végéig. Az EDL-ben a csökkenés csak a harmadik napon következett be és akkor is viszonylag jól detektálható volt, majd a 10. napon a normál izom szintjénél jóval magasabbra emelkedett, s csak a 28. napon jutott vissza a normál szintre. Ezen eredmények alapján, mivel célunk a teljes nekrózist követő alapszintről induló szinkronizált regeneráció jól tanulmányozása volt. elsősorban а soleus regenerációját tekintettük megfelelő kísérleti modellnek (Mendler et al. 1998ab, Zádor et al 2001, 2002).



7. Ábra: Az  $\alpha$ -aktin mRNS szint a soleus és EDL izom regenerációjában. N: normál izom; 1-28: napok a notexin injekció után n=3;\* p<0,05; \*\* p<0,01 a normál izomhoz képest .(Mendler et al. 1998a)

# $dc_{1047}^{33}15$

#### IV.2. A miogenikus reguláló faktorok kifejeződése az izomregenerációs modellekben

#### IV.2.1. Soleus

A miogenikus reguláló faktorok közül az első napon a myoD mRNS szintje kezdett emelkedni, ezzel egyidőben a myf-5, myogenin és MRF4 mRNS szintje lecsökkent (8. ábra). A harmadik napon a myoD transzkript szintje tovább nőtt, a myf-5 és a myogenin mRNS szint pedig hirtelen megemelkedett és a normál izoménál mintegy nagyságrenddel magasabb értéken maximumot mutatott. Az MRF4 transzkriptje a 3-5. napon növekedett, de nem haladta meg a normál szintet. Ez alapján feltételezhető, hogy a myoD, myf-5 és a myogenin a regeneráció korábbi szakaszában a mioblasztokban, az MRF4 pedig később, a miotubulusok és izomrostok kialakulásában játszik szerepet (Mendler et al. 1998a).



8. Ábra: Az MRF-k transzkript szintje a regenerálódó soleus izomban. A: myoD, B: myf-5, C: myogenin, D: MRF4. A GAPDH mRNS szintek a 19F ábrán. (Mendler et al. 1998a)

dc\_1047<u>3</u>45

### IV.2.2. EDL

Az EDL regenerációban a soleuséhoz hasonló, de ahhoz képest két-három nappal eltolódott változás jellemezte az MRF transzkript szinteket (9. ábra). A myoD és a myogenin hirtelen emelkedve a 3-5. napokon elhúzódó maximumot mutatott, majd visszacsökkent. A myf-5 az első napon a tizedrészére csökkent, a 3. napon emelkedő tendenciát mutatva az 5. napon maximumot ért el, majd a normál értékre állt vissza. Az MRF4 a 3. napon mutatott átmeneti csökkenést, majd a normál szinten maradt a regeneráció végéig (Mendler et al. 1998a).



9. Ábra: MRF transzkriptek az EDL regenerációban. A: myoD, B: myf-5, C: myogenin, D: MRF4, E: GAPDH (Mendler et al. 1998a)

Látható, hogy az MRF-k transzkript szintje a két különböző izomregenerációban igen hasonló mintázatot mutatott.

### dc\_1047<u>3</u>15

#### IV.3. A myoD jelentősége a soleus izom regenerációjában

A myoD transzkript szint változás szerepének pontosabb tisztázásához megmértük a myoD protein szintjét is a soleus izom regenerációja során (10. ábra). A transzkripciós faktor mennyisége már az 1. napon emelkedő tendenciát mutatott és a 3. napon a normál érték mintegy hatszorosán maximumot ért el, utána csökkenő tendenciát mutatva a normál izoménál magasabb szinten maradt. Ez alapján a regeneráció 3. napja a látszott a legmegfelelőbbnek a myoD kifejeződés gátlására annak érdekében, hogy kiderítsük, fontos-e ez a transzkripciós faktor a folyamatban.



**10.** *Ábra:* A myoD a szintjének változása (A) és a BrdU beépülése sejtmagokba (B) a regeneráció napjai (1-28) során. N – normál izom, 1-28 a regeneráció napjai. \* p<0.05, \*\* p<0.001 a normál izomhoz képest .(Zádor et al. 2002).

A három napos regenerálódó izomba foszforotioát oligonukleotidokat injektáltunk és két nappal később vizsgáltuk a hatást. Először három különböző oligo hatását hasonlítottuk össze a kontroll (random) oligomerével 10<sup>-5</sup>-10<sup>-7</sup> mol/l koncentrációban a dezmin kifejeződés intenzitására immunoblot segítségével. Ezek közül egyedül az anti-start oligo hatása mutatott dózisfüggést, az anti-cap site és az anti nt245-264 oligo viszont nem. Feltételezésünkkel összhangban az anti-start oligo a 3. napon volt a leghatásosabb, mert a 2. és a 4. napokhoz képest jobban gátolta a miotubulusok kialakulását. Az anti-start oligonukleotidot injektálása után a miotubulusok kialakulását jelző dezmin kifejeződését és az ideg-izom véglemezek megjelenését is figyeltük (11. ábra). Az antiszenz oligo mind a három jelleg kialakulását megakadályozta a kontroll (random oligomerrel injektált) regenerálódó izomhoz képest. A kontroll oligomerrel injektált izom nem mutatott lényeges eltérést az oligóval nem injektált és az ezzel járó (második) operációnak nem kitett állatokban regenerálódó izomhoz képest.



**11.** *Ábra:* A myoD antiszenz oligo hatása a regenerálódó izom mikroszkópos morfológiájára (miotubulus méret: a,b; dezmin kifejeződés: c,d; ideg-izom véglemez: e,f) két nappal az injektálás után. Bal oldalt a random/kontroll oligo (a,c,e) jobb oldalt pedig az anti-start oligo (b,d,f). A nyilak a regeneráció jellegzetes képleteit mutatják a kontrollban, melyek nagyobb részben hiányoznak az antiszenz-kezelt izomban. (Zádor et al. 2002)

 $dc_{1047}^{37}15$ 



**12.** *Ábra:* A regenerálódó soleus mRNS szintjei myoD antiszenz injektálása utáni időpontokban (1, 4 és 24h). Az üres oszlopok az anti-start, a fekete oszlopok a random kontroll oligoval injektált mintát jelölik. A myoD5' jelű amplifikátum a transzlációs start helyet közrefogó primerekkel készült. A myoD726 a cDNS középső régióját mutatta. A \* a kontroll oligóval kezelt regenerálódó izomhoz képest, a # az oligoval nem kezelt regenerálódó izomhoz képest jelent emelkedést. (Zádor et al. 2002)

Az antiszenz gátlás az injektálás után egy órával szelektíven csökkentette a myoD mRNS szintjét a teljes izomban (12. ábra), csökkent a myoD fehérje szint is, ez különösen az izolált sejtmagok kivonatában volt megfigyelhető (13. ábra). Az injektálás után 24 órával a myoD, a myf-5 és a

dc\_1047<u>3</u>15

myogenin mRNS szintje megnőtt a kontrollhoz képest. Nem változott viszont ilyenkor az MRF4 és a miogenikus faktorok gátlásában szerepet játszó Id1 és Id3 fehérjék mRNS szintje (12. ábra).



Ábra: *13*. A myoD kifejeződés gátlása a 3 napos regenerálódó izom sejtmagjaiban 1 órával az antiszenz oligo injektálása után. Az inszert mutatja az. *immunoblottot*. A kontrollok random oligóval injektált izmok \*\* p<0,01 a voltak. controllhoz képest. (Zádor et al. 2002)

Az antiszenz gátlás rövid időtartama bizonyára az oligo rövid élettartama miatt következett be, ezt igazolta az oligo regenerálódó izomból történő kimutatása is. Tehát a myoD lényeges faktora a vázizom regenerációnak és gátlása késlelteti a regeneráció menetét. Az antiszenz gátolt izom a regeneráció végén (28. nap) nem mutatott eltérést a rostipusok eloszlása tekintetében a kontrolltól, de a keresztmetszeti képén több kisméretű, késleltetett fejlődésre utaló rost volt megfigyelhető, mint a kontrollban. (Zádor et al. 2002).

### IV.4. A miogenikus reguláló faktorok és a SERCA1 kifejeződése izomadaptációs modellekben

Mivel a miogenikus faktorok és a SERCA1b elsősorban a mioblasztokban és a korai rostokban fejeződnek ki, ezért megvizsgáltuk az mRNS szintjüket a három napos passzív nyújtásnak kitett, tehát hipertrofizáló soleus izomban. A miogenikus faktorok (myoD, myf-5, myogenin és MRF4) és a SERCA1b transzkript szintje 3-6-szorosára nőtt a passzív nyújtásnak kitett soleus izomban. Hasonló tendencia érvényesült az acetilkolin receptor  $\alpha$ -alegységének (AChR) transzkript szintjére is, ami alátámasztotta a nyújtás tényét.

 $dc_{1047}^{39}15$ 



14. Ábra: a GAPDH, αés AChR aktin mRNS kummulatív szintjének eloszlása a passzív nyújtott (Str) és a nem nyújtott kontralaterális (Contr) soleus izom centrális (C) és terminális (T) részein. *p*<0,05; \*\* *p*<0,01 a másik részhez képest. (Zádor et al. 1999)

Ismert, hogy az izom elsősorban a miotendonális junkciókban növekszik, különösen várható ez a passzív nyújtás esetén (Dix and Eisenberg 1990). Ezért megvizsgáltuk a fenti transzkript szinteket az izom végein és a középső részén. Ennek érdekében öt egyenlő részre osztottuk a soleus izmot a proximális és disztális ínhatár között, melynek során az izom-ín határ a terminális részekbe jutott. A két terminális rész RNS kivonatát egyesítettük, ugyanígy jártunk el a három centrális résszel is. A szándékunk az volt, hogy a terminális és centrális részek GAPDH-ra és  $\alpha$ -aktinra normalizált mRNS szintjeit hasonlítsuk össze. Ehhez figyelembe vettük, hogy a centrális blokkok együttes tömege valamint totál RNS tartalma mintegy kétszerese volt a terminálisakénak (a soleus név is halformára utal). Ennek megfelelően alakult a GAPDH mRNS szintje is, az  $\alpha$ -aktin mRNS szint pedig mintegy háromszor akkora volt centrálisan, mint terminálisan (14. ábra). Ezért a normalizált mRNS-k eloszlását akkor tekintettük egyenletesnek a soleus hosszában, ha a centrális szintjük magasabb volt, mint a terminális, és terminálisnak tekintettük akkor, ha legalább azonosak voltak a két blokkcsoportban.



15. Ábra: A GAPDH-ra normalizált mRNS szintek a passzív nyújtott (Str) és kontralaterális (Contr) izmok középső inhatárokhoz (C)és közeli részén (T).*p*<0,05; \*\* p<0,01 a másik részhez képest. (Zádor et al. 1999)

### $dc_{10474015}$

E szerint az elbírálás szerint a GAPDH-ra normalizálás esetén az MRF-k mRNS szintje egyenletes eloszlású volt (15. ábra), az aktinra normalizálás esetén pedig a myoD és a myogenin egyenletes, a myf-5 és az MRF4 pedig terminális eloszlást mutatott (16. ábra) a kontroll izomban. A passzívan nyújtott izomban a GAPDH-ra normalizálva az MRF mRNS-k szintje centrális részen jobban nőtt, mint a terminális részeken, egyfajta egyenletes eloszlást biztosítva ezzel az izom hosszában. Az aktin mRNS-re normalizálva három MRF transzkript szintje növekedett a centrális részen nyújtás hatására, tovább csökkentve ezzel a terminális kifejeződés lehetőségét, kivéve a myogenint, amelynek szintje nem változott (15-16.ábra).



16. Ábra: Az  $\alpha$ -aktin mRNS-re normalizált mRNS szintek a passzív nyújtott (Str) és kontralaterális (Contr) izmok középső (C) és inhatárokhoz közeli részén (T) \* p<0,05; \*\* p<0,01 a másik részhez képest (Zádor et al. 1999)

A SERCA1b mRNS szintén mintegy ötszörösére nőtt a nyújtás hatására az egész izomban a SERCA1a mRNS szintje pedig a felére csökkent. Ugyanez a két mRNS a GAPDH-ra normalizálás esetén terminális eloszlást mutatott a kontroll izomban és az emelkedésének mértéke is egyenletesen volt az izom hosszában (15. ábra). Az aktinra normalizálva azonban a SERCA1a mRNS kifejeződése a terminális részen még magasabb volt a nyújtott, mint a kontroll izomban. A SERCA1b mRNS szintén aktinra normalizálva nem különbözött a két részen a kontrollban, de a nyújtott izom terminális részein igen szignifikánsan megemelkedett a centrális részhez képest (16. ábra). Fehérje szinten a myoD emelkedése kimutatható volt a nyújtás hatására, a myogeniné azonban nem. A myoD pozitív sejtmagok számolása az öt izomblokkból származó metszeten nem mutatott különbséget. A SERCA1a pozitív rostok száma lecsökkent a nyújtás hatására, tehát követte a transzkipt szintet (Zádor et al 1999). A SERCA1b fehérje ellenben ugyanolyan alacsony szinten volt a nyújtott izomban, mint a kontrollban, azaz nem követte a transzkriptjének szintjét (Zádor et al. 2007).

### dc\_1047\_415

Megvizsgáltuk a myoD és myogenin mRNS szintjét a patkány immobilizát és passzívan mozgatott gastrocnemius izmában is. A myogenin mRNS szint nőtt, a myoD mRNS szintje pedig csökkent mind a két esetben és ezt követte a myoD/myogenin protein arányának csökkenése is a kontrollhoz képest. Hasonlóan változott a myoD és myogenin kifejeződése patkányok diafragmájában, azzal az eltéréssel, hogy a mechanikusan lélegeztetés esetén még jobban csökkent a myoD mRNS és myoD/myogenin arány, mint a spontán lélegeztésben (Rácz et al. 2003). A mechanikus lélegeztetés közbe iktatott spontán lélegeztetés pedig mérsékelte myoD és a myogenin protein szintjének csökkenését (Gayan-Ramirez et al. 2005).



**17.** *Ábra:* A myostatin mRNS (bal oldal) és fehérje (jobb oldal) szintje a soleus (felül) és EDL izom (alul) regenerációjának napjai során. Az inszertek az amplifikációk gélképét, ill. az immunoblottokat mutatják. C – normál izom. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 a normál izomhoz képest, 1-28 – napok a toxin injektálása után. (Mendler et al. 2000).

### IV.5. A myostatin kifejeződése

A myostatin, egy TGF-β tipusú növekedést gátló faktor, mely igen hatásos a vázizom méretének meghatározásában. Ennek a, mintegy 18 kDa méretű fehérjének a változását más

# $dc_{10474215}$

laboratóriumokkal párhuzamosan, de így is az elsők között írtuk le az izom regenerációban. A normál soleus izomban kevés miosztatin volt, de az izomnekrózissal egyidejűleg ez a mennyiség a regeneráció első napján mintegy 16-szorosára emelkedett, majd fokozatosan visszacsökkent a normál izoméhoz közeli szintre (17. ábra). A normál EDL-ben szintén kis mennyiségű myostatin volt található, amely az első és harmadik napon jelentősen emelkedett, majd a későbbiek során izmonként nagy eltérést mutatva a normál szintre csökkent (17. ábra). Az EDL regeneráció azon sajátsága, hogy kevésbé szinkronizálható ebben az esetben is nehezítette az eredmény statisztikai értékelését. Sejtszinten a myostatin a normál soleus és az EDL mindegyik rostjában, majd a két izom regenerációjának első napjaiban a mononukleális sejtekben volt található, később a miotubulusokra és fiatal rostokra is kiterjedt a kifejeződése. Érdekes megjegyezni, hogy myostatin mRNS szintje a fehérje szinttel ellentétesen változott: a normál izomban és a regeneráció végén magas volt, a regeneráció első napjaiban pedig alacsony (17. ábra). Ezt az eredményt két módszerrel, RT PCR-rel és Northern blottal is megerősítettük (Mendler et al. 2000).

### IV.6. A tumornekrózis faktor alfa kifejeződése

A TNF- $\alpha$  mRNS és fehérje szinten is lényegében hasonló kinetika szerint változott a regenerációban, mint a myostatin fehérje: az első napokon ugrásszerűen emelkedett, azután a normál szintjére csökkent. A TNF R-60-as és R-80-as (más néven I-es és II-es) tipusú receptorának mRNS-e követte a citokin szintjét (18-19. ábra). A TNF- $\alpha$  nem fejeződött ki C2C12 és BC3H1 miogenikus sejtekben osztódásuk és differenciálódásuk idején. A nekrotizáló izomban a TNF- $\alpha$  mRNS maximális kifejeződése idején elsősorban "csomókban", feltehetően nekrotikus gócokban volt található, a miotubulusok megjelenésekor pedig azokon kívül, a dezminre nem festődő területeken fejeződött ki. A makrofágokra jellemző antigén (MAC 367) a citokin szintjével összhangban változott. Tehát a TNF- $\alpha$  kifejeződése nem az izom sejtekben, hanem feltehetően a makrofágokban történik. (Zádor et al. 2001). Látható, hogy a kétféle növekedésgátló faktor, a myostatin és a TNF- $\alpha$  bár hasonló kinetika szerint változott a regenerációban, sejtszinten azonban már különböző, izomspecifikus ill. nem izom specifikus kifejeződést mutattak.

dc\_1047<u>4</u>315



**18.** *Ábra:* A TNF- $\alpha$  és receptorainak mRNS szintje a soleus (bal oldal) és az EDL (jobb oldal) regenerációja során. Etc. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 a normál izomhoz (N) képest, 1-28 – napok a toxin injektálása után.(Zádor et al. 2001).



**19.** Ábra: A TNF- $\alpha$  szintje a kétféle regenerálódás során. Jelölések, mint az előző ábrán. Az inszertek egy-egy reprezentáns immunoblottot mutatnak. (Zádor et al. 2001).

### dc\_1047\_415

# IV.7. A szarkoplazmás/endoplazmás retikulum Ca<sup>2+</sup> transzport adenozin trifoszfatáz (SERCA) izoformáinak kifejeződése az izomregenerációs modellekben

#### IV.7.1. SERCA-k a soleus regenerációban

A homológ SERCA transzkriptek egymáshoz viszonyított mennyiségét arány RT PCR analízisel vizsgáltuk (20. ábra). A gyors-oxidatív és lassú-oxidatív tipusú rostokat mintegy 1:3 arányban tartalmazó soleus izom 1:3 arányban tartalmazza a SERCA1 és SERCA2 mRNS-t (Zador et al. 1996, Vangheluwe et al. 2005b). A SERCA1 transzkript mennyiségének mintegy 9/10-e felnőtt és gyors tipusú izomra jellemző SERCA1a izoforma, a többi a neonatalis SERCA1b. A SERCA2 lényegében a lassú-izom-tipusú SERCA2a, mert a SERCA2b szinte nem is detektálható mellette homológ primerekkel. Található még a soleusban a SERCA2-éhez viszonyítva kevés, a kimutathatóság szintje körüli (azaz legalább tízszer kevesebb) SERCA3 mRNS is. A kígyóméreg intramuszkuláris injektálásának hatására 24 óra múlva az izomspecifikus SERCA1a, SERCA1b és SERCA2a transzkriptek szintje dramatikusan csökken és 72 óráig nem változik. Ezzel ellentétben a nem-izom-specikus SERCA2b bár izmonként jelentős variabilitást mutat, nem különbözik átlagosan a normál izom szintjétől. A regeneráció beindulásával az ötödik napon emelkedni kezd az izomspecifikus SERCA mRNS-ek szintje. Először a SERCA1b éri el a maximumát az ötödik napon, majd folyamatosan csökken a normál izoméhoz közeli szintre. Utána a hetedik napon a SERCA1a mRNS mennyisége hirtelen nő a normál izoméhoz közeli értékre és a regeneráció 28-ik napjáig ugyanakkora marad. A SERCA2a mRNS szintje fokozatosan nő a 21-ik napig, majd utána csökkenő tendenciát mutat.

A SERCA fehérjék lényegében követik a transzkriptjeik szintjének csökkenését és emelkedését a soleus nekrózisa és regenerációja során (21. ábra). Ebben az esetben arányt nem, csak az egyes SERCA szintek változását mértük. A SERCA1a specifikus antitest nem lévén, ennek az izoformának a mennyiségére a pán SERCA1 és a SERCA1b változásából következtettünk. A SERCA1b fehérje szintje alig volt kimutatható a normál izomból, azután elsőként nőtt és ért el maximumot a 5-10 napon, majd csökkent a normál izoméhoz közeli szintre. A 10. napon a SERCA1b csökkenése után a SERCA1a szintje feltehetően nőtt, mivel a SERCA1 szint (=SERCA1a+SERCA1b) nem különbözött a 10. és a 21. továbbá a 28. napon sem. A SERCA2a szintje a 3-10. napokon nem változott majd a 10. és a 21. nap között hirtelen nőtt a normál izom szintjére és ott is maradt. A nem izom specifikus, sokféle sejtben kifejeződő SERCA2b a 10. napon mintegy harmadára csökkent a normál izom szintjének, utána a 21. napon ismét a normál izom szintjére emelkedett.

dc\_1047<u>4</u>15



**20. ábra:** A SERCA és a GAPDH mRNS szintek változása a soleus izom regenerációja során. N - normál izom, 1-28 – napok a toxin injektálása után. Az y tengelyek értékei relatívek, ezért egymás között nem hasonlíthatók össze. (A) A SERCA1-t kezdeti emelkedése után felváltja a SERCA2a. (B) A regeneráció kezdeti fázisában elsősorban a SERCA1b mRNS emelkedik. A SERCA2a mRNS szint (C) nagyobb vátozást mutat, mint a SERCA2b-é (D). (E) A SERCA2 és SERCA3 arányában a SERCA2 dominál, a SERCA3 csak a normál, 21 és 28 napos izomban magasabb a detektálás szintjénél. (Zádor et al. 1996)







21. Ábra: A SERCA proteinek szintje a soleus izom regenerációja során. Az inszert reprezentatív immunoblottokat mutat. A: SERCA1; B: SERCA2a; C: SERCA2b; N – normál izom, 1-28 a regeneráció napja. (Zádor et al. 1998)

A SERCA1a a normál soleusban a gyors-oxidatív rostjaiban fejeződik, melyeket a miozin nehéz láncának (MyHC) 2a tipusával azonosítottunk (21. ábra). A SERCA2a a lassú-oxidatív rostokban található, melyeke a rájuk jellemző MyHC1-el mutattunk ki. Az izomregeneráció során SERCA1a és SERCA2a rost specifikus kifejeződése csak a 21. napon áll helyre, de a 28. napon még tovább differenciálódik. Eltérés mutatkozik azonban a SERCA-k rostszintű kifejeződésében a regenerálódott és a normál izom között: regenerálódott izom a rostok 98% ban SERCA2a-t és 12%-ban SERCA1a-t fejeznek ki a normál izom 81 és 26%-ával szemben (22. és 23. ábra). A SERCA1b az 5-10. napon kimutathatóan minden regenerálódó rostban kifejeződik. A lassú miozint kifejező rostok túlnyomó aránya lényegében 5 hónap múlva is jellemző volt a regenerálódott soleus izomban.

## dc\_1047<u>4</u>15



**22.** *Ábra:* A SERCA izoformák kifejeződése a normál soleus izom rostjaiban. A : SERCA1; B: SERCA2a; C: MyHC2a; D:MyHC1. o - gyors, (-) – lassú, + - hibrid rost. Vonal: 50 μm. (Zádor et al 1998)



**23.** *Ábra:* A SERCA izoformák kifejeződése a 28 napos regenerálódott soleus izom rostjaiban. A: SERCA1; B: SERCA2a; C: MyHC2a; D: MyHC1. A rostok többsége SERCA2a-t és MyHC1-et, némely rost SERCA1-et és MyHC2a-t is kifejez (v). Vonal: 100 50 μm.(Zádor et al.1998)

#### IV.7.2. SERCA-k az EDL izom regenerációjában

A túlnyomóan gyors tipusú rostokat tartalmazó EDL-ben a notexin injekció után, feltehetően az izom degradáció lassabb lejátszódása miatt, az első napon nem változott a SERCA transzkriptek szintje, csak a harmadik napon csökkent dramatikusan (24. ábra). Az EDL-ben is a SERCA1b mRNS szintje emelkedett először, majd a SERCA1a emelkedése követte. A SERCA2 (túlnyomórészt SERCA2a) csak nyomokban volt kimutatható és szintje jobban ingadozott, mint a soleusban.



**24.** Ábra: A SERCA mRNS szintek változása az EDL regenerációja során (A-D) és a GAPDH mRNS szintje. "A" diagramon az üres oszlopok a SERCA1b, a sötét oszlopok a SERCA1a mRNS-t jelölik. A "B"-jelű diagramon az üres oszlopok a SERCA2 (főleg SERCA2a), a sötét oszlopok a SERCA1 (főleg SERCA1a) mRNS-t mutatják. N – normál EDL, 3-28: a regeneráció napjai. + p<0,05 a normál izomhoz képest.(Mendler et al.1998b)

dc\_1047<u>4</u>915

A SERCA fehérjék követték transzkriptjeik szintjének változását (25. ábra). A normál EDL izomban rosttípusának megfelelően elsősorban a SERCA1a volt található. A SERCA1a szintje a harmadik napon csökkent, a 10. napig alacsony maradt, majd a 21. és 28. napon a normál szintre emelkedett. A SERCA2a alacsony volt detektálható a normál izomban is, s a 3. napon már alig volt kimutatható, de az 5. napon jelentősen megnőtt, majd tendenciaszerűen csökkent a regeneráció végéig a normál izom szintjére.





**25.** Ábra: A SERCA izoformák szintváltozása a regenerálódó EDLben. A balodali oszlopdiagram három izom átlagát  $\pm$  SE, a jobboldali inszert reprezentatív immunoblottokat mutatja. N – normál EDL, 3-28: a regeneráció napjai. + p < 0,05 a normál izomhoz képest. (Mendler et al. 1998b)

A regenerálódott EDL-ben mintegy kétszer annyi rost fejezett ki SERCA2a-t mint a kontrollban (26. ábra), de ezeknek mintegy fele SERCA1-re is pozitív tehát ebből a szempontból hibrid rost volt. Az ilyen, lassú miozint is kifejező, s így I-esnek látszó rostok gyakrabban asszociálódtak, mint a kontroll izomban, amely az axon-kollaterálisokra utal (Mendler et al. 1998b,)

 $dc_{1047}^{50}15$ 



**26.** *ábra:* A SERCA és MyHC izoformák kifejeződése a normál (A-E) és 28 napig regenerálódott (F-K) EDL izom rostjaiban. SERCA2a (A,F), MyHC1 (B,G), SERCA1 (C,H), MyHC2a (D,J), MyHC2b (E,K). I: I-es tipusú rost, SERCA2a + és MyHC1 +; a: IIA tipusú rost, SERCA1 + és MyHC2a +; b: IIb tipusú rost, MyHC2a + és SERCA1 + ; x: kevert rost, SERCA1 +, SERCA2a +, MyHC2a + és MyHC1 +. A + a kifejeződést jelenti. Skála: 100 μm. (Mendler et al. 1998b)

# dc\_1047<u>5</u>15

#### IV.7.3. A SERCA1b a soleus és az EDL izom regenerációjában

A SERCA1b a soleus regeneráció 5-10. napján mutatott jól reprodukálható emelkedést. Az EDL regenerációban jellemző módon ez később és egyenetlenebbül következett be (27. ábra). Mindez követte a SERCA1b mRNS szint változását és valószínűsítette (tekintettel az alacsony SERCA1a mRNS szintre is), hogy a korai SERCA1 szintemelkedést egyedül a SERCA1b okozza.



**27.** *Ábra:* A SERCA1b fehérje és mRNS szint változása a soleus és EDL regenerációban. Inszert: egy reprezentatív immunoblot. n=3; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 a normál izomhoz képest.

## $dc_{1047}^{52}15$

### IV.8. A SERCA kifejeződés idegi függése regenerálódó soleusban

A regeneráció 12. napján a miozin lassú izoforma (MyHC1) és a SERCA2a egyöntetűen kifejeződik a soleus izom rostjaiban. Ha a végtagot vagy a soleust szelektíven denerváltuk a SERCA2a továbbra is kifejeződött az izomrostokban, a lassú miozin izoforma (MyHC1) viszont gyakorlatilag alig volt kimutatható (28. ábra).



**28. ábra:** Az MyHC1 (A,C) és a SERCA2a (B,D) kifejeződése innervált regenerálódó (A,B) és denervált regenerálódó (C,D) soleus izom rostjaiban 12 nappal a méreg injektálása után. A \* azonos rostokat jelöl a párhuzamos metszeteken. 10x objektív. (Zádor and Wuytack 2003)

Megvizsgáltuk a SERCA izoformák idegi függését is a regeneráció 7., 10. és 21. napján. A SERCA2a mRNS szintje csak a 10. napon kezdett el csökkeni a denervált regeneráció során (29. ábra), érdekes módon a SERCA2a protein szintje viszont emelkedett a hetedik napon (amikor a motoros véglemeznek kellett volna kialakulnia) az innervált regenerálódó izomhoz képest (29. ábra). A SERCA1 mRNS szintje a 7. napon dramatikusan lecsökkent, később nem különbözött a kontrollétól (29B ábra). A SERCA1 fehérje viszont hasonló vagy magasabb szintű (10. nap) volt a kontrollhoz képest (30. ábra). Az MyHC1 mRNS és fehérje a kontrollhoz képest jóval alacsonyabb szintet mutattak. Megállapítottuk, hogy a kifejeződés tekintetében a SERCA2a és SERCA1 nem függenek direkt módon a beidegzéstől olyan mértékben, mint az MyHC1 (Zádor and Wuytack 2003).

 $dc_{1047}^{53}15$ 



**29.** Ábra: A: SERCA2a (a) és MyHC1 (b) mRNS szintje az innervált és denervált regenerálódó soleusban. **B**: A SERCA2 és SERCA1 mRNS-k aránya és a SERCA1 mRNS szintje ugyanazokban az izmokban. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 szintű szignifikans különbség a regeneráció során. Az A diagramon o p < 0,05, oo p < 0,01 a **B** diagramon +++ p < 0,001 szintű szignifikáns különbség az ugyanaddig regenerálódott denervált és innervált minták között. **B** inszertje a SERCA2/1 arány RT PCR gélképét mutatja restrikciós emésztés után. Az Mse I a SERCA2, az Nco I a SERCA1 cDNS-t hidrolizálja. A SERCA transzkriptek szintjére az emésztetlen fratgmentből következtettünk. (Zádor and Wuytack 2003)

Regenerálódó soleus izomban a részleges tenotómia szintén kimutatta, hogy a SERCA2a kifejeződés nem változik, míg a MyHC1 kifejeződés lecsökken, azaz a terhelés hiányára, melyet az ín átvágása előidézett, a két fehérje szintje eltérően reagál (31. ábra) (Zádor et al. 2005).

dc\_1047<u>54</u>15



**30.** *Ábra:* A SERCA2a (A), MyHC1 (B) és SERCA1 (C) a denervált és innervált regenerálódó soleus izomban. A szignifikancia szintek jelölése ugyanaz, mint az előző ábrán. ooo p<0,001 az innervált regenerált izomhoz képest. (Zádor and Wuytack 2003)

### $dc_{1047}^{51}$



**31.** *Ábra: MyHC1* (a) és SERCA2a (b) kifejeződés a részlegesen tenotomizált 12 napos regenerálódó soleus rostjaiban. + azonos hely a párhuzamos metszeteken. A nyíl azonos rostokra mutat. (Zádor et al. 2005)

#### IV.9. A SERCA kifejeződés idegi függése normál soleusban

Felvetődhet, hogy a SERCA2a kifejeződés ideg-függése a regenerálódó izomban másmilyen, mint a normál soleus izomban. Ezért a denervált normál izomban is megvizsgáltuk a SERCA kifejeződést az innervált normál izomhoz képest. Kétféle denervációt is alkalmaztunk, az egyik esetben az egész hátsó végtagot, a másik esetben csak a soleus izmot denerváltuk. A szelektív denervációja lehetővé tette a soleus passzív mozgatását a többi végtag izom által. A végtagi denerválás viszont gyakorlatilag a mozgatás teljes hiányát eredményezte. Mind a két esetben igyekeztünk a denerválás krónikus hatását kiküszöbölni, ezért csak két hétig követtük a folyamatot. Szelektív denerválás kisebb mértékű atrófiát, teljesebb lassú-gyors transzformációt, továbbá a megfelelő SERCA és MyHC izoformák lazább koordinációját eredményezte. Ennek következtében a szelektív denervált izomban még kifejezettebb lett az, ami a végtag denervált izomban is látható, hogy a SERCA2a mRNS nem függ a beidegzéstől olyan mértékben, mint az MyHC1 (32. ábra). Az utóbbi ugyanis csökkent mind a két denerváltságban, a SERCA2a mRNS pedig még növekedett is a szelektív denerváció 7. napján. A fehérje szinteken is hasonló különbség volt a jellemző, azzal az eltéréssel, hogy a SERCA2a nem emelkedett szignifikánsan (33. ábra). Végeredményben megállapítottuk, hogy a vizsgált izoformák közül a SERCA2a kifejeződése függ a legkevésbé és az MyHC1 kifejeződés függ a legjobban a beidegzéstől. Mindez a regenerálódó izomban kapott eredménnyel összhangban azt mutatja, hogy a SERCA2a és a MyHC1 kifejeződését nem egyformán szabályozza az idegi hatás (Szabó et al. 2008).

dc\_1047<u>5</u>95



**32.** Ábra: Az MyHC és SERCA izoformák mRNS szint változása végtag denervált (HD) és szelektíven denervált (SD) soleus izmokban. Az A-E diagramok az egyedi GAPDH mRNS szintekre normalizált értékeket mutatják. A GAPDH mRNS-t F-en külön összesítettük. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 a normál izomhoz (N) képest. + p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001 a végtag denervált izomhoz képest. Az inszertek reprezentatív gélképet mutatnak. (Szabó et al. 2008)

dc\_1047<u>5</u>15



**33.** *Ábra:* A SERCA és MyHC proteinek szintje végtag denervált (HD) és szelektív denervált (SD) soleus izomban. A: MyHC1, B: SERCA2a, C: MyHC2a, D: SERCA1. A jelölések, mint az előző ábrán. o p<0,05; ooo p<0,001 a denerváció előző stádiumához képest. (Szabó et al. 2008)

# $dc_{1047}^{58}15$

### IV.10. A SERCA2a kifejeződése független Ras-tól és kalcineurin-tól

A patkány soleus regenerációban a Ras-útvonal közvetíti a lassú beidegzés hatását az MyHC1 kifejeződésre és a lassú izom differenciálódásra (Murgia et al. 2000). A SERCA2a kifejeződés, az MyHC1-től eltérően, nem függ a denervációtól, ezért megvizsgáltuk, hogy függ-e a Ras-tól.



**34.** *Ábra: MyHC1 és SERCA2a kifejeződése Ras transzfektált regenerálódó soleus izom rostjaiban (nyilak). A domináns negatív RasN17 meggátolta (Aa), a V12RasS35 pedig indukálta (Ba) az MyHC1 kifejeződését, anélkül, hogy hatással lett volna a SERCA2a kifejeződésre (Ab és Bb). A RasN17-t innervált regenerálódó, a RasS35-t denervált regenerálódó izomba ranszfektáltuk. A RasN17-t anti-panras (Ab-1), a H-Ras V12S35-t anti-hemaglutinin (HA) antitesttel azonosítottuk (Bc). (Zádor and Wuytack 2003)* 

### dc\_1047<u>5</u>15

A domináns negatív Ras fehérjét kifejező innervált regenerálódó izomrostok nem fejeztek ki miozint, viszont nem mutattak eltérést a SERCA2a kifejeződés tekintetében (34. ábra). Összhangban ezzel, a denervált regenerálódó izomban, amelyben a MyHC1 nem fejeződik ki, a MAPK utat specifikusan serkentő RasV12S35 mutánssal transzfektált rostok kifejezték a lassú miozint és a SERCA2a-t is. Tehát a SERCA2a kifejeződése ellentétben az MyHC1-ével nem függ közvetlenül a Ras útvonaltól (Zádor and Wuytack 2003).

A kalcineurin szintén jelentős közvetítő útvonal egyik eleme a lassú tipusú beidegzés és a lassú miozin kifejeződés szabályozásában. A kalcineurin aktív alegysége (kalcineurin A) fehérje szinten szabályozódik a soleus regenerációban és szintjének emelkedése, valamint aktivitásának növekedése az újrabeidegzés idején történik (35. ábra). A denerváltan regenerálódó soleus izomban ez az emelkedés elmaradt (Fenyvesi et al. 2004).



**35.** *Abra:* A kalcineurin aktív alegységének (CnA) protein szintje a regenerálódó soleusban (A). A kalcineurin A protein szintje (B) és enzimaktivitása (C) normál beidegzés (üres oszlop) és denerváció (fekete oszlop) esetén a soleus regeneráció 5. és 10. napján. \* - p<0.05, \*\*\* - p<0.001 a normál izomhoz képest. + - p<0.05, +++ - p<0.001 az innervált regenerálódó izomhoz képest. (Fenyvesi et al. 2004)

A cain kalcineurin aktivitást gátló peptid szakaszát kifejező plazmiddal transzfektált rostok nem mutattak lassú miozin kifejeződést, ezzel ellentétben kifejezték a lassú SERCA2a-t (36. ábra). Ez azt mutatja, hogy a SERCA2a a lassú miozinnal ellentétben nem függ direkt módon a kalcineurin

# dc\_1047<u>6</u>15

aktivitásától. Érdekes volt továbbá, hogy a caint kifejező rostok környékén a nem cain pozitív rostokban sem volt lassú miozin kifejeződés. (Zádor et al. 2005)



**36.** *Ábra:* A cain/cabin-1 meggátolja az MyHC1 kifejeződést, de nem befolyásolja a SERCA2a kifejeződést a regenerálódó soleus izom rostjaiban. A nyilhegyek azonos rostokat jelölnek a párhuzamos metszeteken. A kontroll ugyanúgy készült, mint a SERCA2a immunfestés, de nem adtunk hozzá elsődleges antitestet. (Zádor et al. 2005)

### dc\_1047<u>6</u>15

### IV.11. A dnRas hatása a kalcineurinra regenerálódó soleusban – a rostnövekedés autokrinparakrin szabályozása

A dnRas transzfekciója a regenerálódó soleus mintegy 15-30 rostjába megnövelte az egész izom tömegét és a többi rost átmérőjét a regeneráció 12. napján (37. ábra), holott a regenerálódó soleus az izomhas keresztmetszetén mintegy 2500 rostot tartalmaz. Ez a serkentő hatás a 21. napra megszünt. (Zádor et al. 2005). A serkentés ideje és nyilvánvalóan autokrin-parakrin jellege felvetette a Ras és kalcineurin út közvetlen kapcsolatát. Ezért együttesen transzfektáltam a dnRast t és a cain-t, hogy vajon ugyanazon rostokban a cain gátolja-e a dnRas hatását (38. ábra).



**37.** Ábra: A dnRas transzfekciója az izom viszonylag kevés rostjába megnövelte a friss súlyt (A) és a rostátmérőt (B) az egész regenerálódó izomban. 12d és 21d a napok száma a regeneráció során. \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 az üres vektorral transzfektált regenerálódó izomhoz képest. ++ p<0.01, +++ p<0.001 az azonos vektorral transzfektált regenerálódó izomhoz képest. (C) A pRSVlacZ vektorral transzfektált rostokat beta-galaktozidáz, a RasN17-el transzfektált rostokat pan Ras festéssel tettem láthatóvá. Skála: 200 µm. (Zádor 2008)



**38.** *Ábra:* A dnRas (RasN17) és a cain kotranszfekciója ugyanazokba a rostokba (C,D) nem változtatja a friss tömeget (A) és a rostátmérőt (B), de a külön rostokba történt transzfekciójuk (E,F) növeli mind a két paramétert (A,B) a 12 napos regenerálódó soleus izomban. A dnRas-t a pan Ras (C), a cain-t a myc-tail elleni antitesttel mutattam ki (D). Az egymás után transzfektált izomból készült reprezentatív párhuzamos metszetek pan Ras (E) és MyHC1 festése (F) – a cain kifejeződését az MyHC1 hiányos rostok jelentik. Vector – a cain üres vektora. + a két vektor együttes és () egymás utáni transzfekciója. \* p<0.05, \*\* p<0.001, \*\*\* p<0.001az üres cain/cabin1 vektorhoz képest. A csillagok F mikrográfon azokat a rostokat jelölik, amelyek E-n dnRas-t fejeznek ki. F-n több MyHC1 negatív rost található, mint ahány dnRas pozitív rost van E-n, jelezve a cain pozitív rostokat. Skála: 100  $\mu$ m.(Zádor 2008)

### $dc_{1047}^{63}15$



**39.** Ábra: A dnRas interleukin (IL-4) közreműködésével stimulálja az izomregenerációt. (A) Az Il-4 mennyisége immunoblotton hasonló 3-3 dnRas ill. pRSVlacz transzfektált izomban. A dnRas transzfektált izomrost (B) több IL-4-t fejez ki (C) mint a nem transzfektált rostok. A kontrol pRSVLacz vektorral transzfektált rostok (D) nem fejeznek ki több IL-4-t (E) mint a nem transzfektált rostok ugyanabban az izomban. A csillag ugyanazon rostot jelöl a párhuzamos metszeteken. (F) Az IL-4 ellenes antitest meggátolja az izomregeneráció autokrin-parakrin stimulációját a dnRas transzfektált izomban. A-IL-4 – anti-interleukin-4, IgG – unreleváns egér IgG. \*\*\*p<0,001 a másik oszlophoz képest. Skála 100 µm. (Zádor 2008)

### dc\_1047\_6415

Az ilyen kotranszfekció kivitelezhető plazmid keverék injektálásával (Rana et al. 2004). A kotranszfekció esetén elmaradt a dnRas által stimulált növekedés és a regeneráló izom hasonló mértékben nőtt, mint a kontroll (38. ábra). A cain a dnRas-t csak ugyanazokban a rostokban volt képes semlegesíteni, ugyanis, amikor külön injektáltam a két plazmidot és ezek külön rostokba transzfektálódtak, a regenerálódó soleus rostnövekedés-stimulációja helyreállt, azaz a dnRas ismét kifejtette a hatását. Levonható tehát az a következtetés, hogy a dnRas hatása a kalcineurin közvetítésével érvényesült.

A dRas által transzfektált rostok körül valamellyest intenzívebb IL-4 festődés volt látható ugyanazon izom nem transzfektált rostjaihoz képest (39. ábra). Az IL-4 antitest izom környéki injektálása megakadályozta a dnRas növekedés serkentő hatását, de nem csökkentette tovább a növekedést a kontroll regenerálódó izomhoz képest. Ebből arra következtettünk, hogy a dnRas a kalcineurin-NFAT-IL-4 út stimulálásával indítja be a hatását, mely a regenerációt autokrin-parakrin módon serkenti (Zádor 2008).

# IV.12. Néhány izomrost transzfektálása SERCA1b shRNS-t kifejező plazmiddal serkenti a növekedést az egész regenerálódó soleus izomban

A dnRas autokrin-parakrin rostnövelő hatása kalcineurin közvetítésével érvényesült, ezért megvizsgáltuk, hogy a SERCA1b lecsendesítése RNS interferencia segítségével kifejt-e hasonló hatást a soleus regenerációban (Zádor et al. 2011). A SERCA1b fehérje szint a miotubulus állapot kialakulásakor, a regeneráció 4-5. napján maximális (Zádor et al. 2007), s az ilyen állapotú izom jól transzfektálható (Zádor and Wuytack 2003). Az shRNS-t kifejező plazmid, amely szintén alacsony hatékonysággal transzfektálódott, a transzfektált rostokban nem okozott növekedést a környező rostokhoz képest, viszont általános növekedésserkentést eredményezett az egész regenerálódó izomban az üres plazmiddal transzfektált kontroll regenerálódó izom rostjaihoz képest (40. ábra). Ez a hatás az shRNS mismatch kontrolljával nem volt előidézhető. A növekedésserkentés valószínűleg autokrin-parakrin stimuláció révén jött létre és a regeneráció 21 napjára megszűnt. A kalcineurin gátló cain peptid kotranszfekciója (41. ábra) és az IL4 specifikus antitest izomkörnyéki injektálása, egymástól függetlenül megszüntette a SERCA1b shRNS előidézte növekedésserkentést Mindez arra utalt, hogy a SERCA1b gátlása is a kalcineurin-NFAT-IL4 jelúton keresztül érvényesül és a

dc\_1047<u>6</u>15



**40.** Ábra: A SERCA1b shRNS transzfekciója az izom viszonylag kevés rostjába megnövelte a friss súlyt (A) és a rostátmérőt, CSA-t (B) az egész regenerálódó izomban. 7d, 12d, 21d és 28d a napok száma a regeneráció során. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 az üres vektorral transzfektált regenerálódó izomhoz képest. A mismatch RNAi egy nukleotidban tért el a SERCA1b shRNS-től. (Zádor et al. 2011)



**41.** *Ábra:* A calcineurin gátló cain protein kotranszfekciója (cain+RNAi) nem tette lehetővé az izomtömeg (A) és a rostméret (B) SERCA1b shRNS transzfekció általi növekedésserkentését. Az üres vektorral történt kotranszfekciónak (RNAi+cv) nem volt ilyen hatása. A cain SERCA1b shRNS utáni transzfekciója (cain//RNAi) szintén hatástalan volt. A többi jelölés, mint a 40. ábrán.(Zádor et al. 2011)
### dc\_1047\_6915

transzfektált rostokból kiindulva gyorsítja az egész izom rostnövekedését s ezáltal a regenerációt (Zádor et al. 2011).

# IV.13. A regenerálódó soleus izomrostok sejtmagjai főleg a plazmid injektálási hely közelében transzfektálódnak

A dnRas és a SERCA1b shRNS aránylag kevés rostban sikeres transzfekciója által előidézett általános, az egész izomra kiterjedő hatás nyomán felmerülhet, hogy vajon kiterjedhet-e a transzfekció nagyobb mértékben a regenerálódó izomra, mint azt a transzfekció helyéről készült keresztmetszeti képen becsülni lehetett?



**42.** *Ábra:* A transzfektált rostok száma a regenerálódó soleus izom hosszában. A zöld (EGFP) és a vörös (DsRed) plazmid egyaránt a transzfektálás helyének közelében, a 3-as szegmentben, az izomhason jutott be a legtöbb rostba. A vízszintes tengely a proximálisdisztális szegment felosztást mutatja. A függőleges boxok magassága az IQR (interquartile range) értéket jelöli (Tukey módszer alapján), a "bajuszvonalak" a minimum és maximum értéket kötik össze. Az "o" olyan kívül eső érték, amely a boxok végétől számítva 1,5 IQR és 3 IQR közötti. \* p<0,05 (Bonferroni post hoc teszt), n=6 (EGFP), n=5 (DsRed).(Kósa and Zádor 2013)

### dc\_1047<u>6</u>15

Ennek kiderítésére íntól ínig tüzetesen átvizsgáltuk a GFP-t kifejező plazmiddal transzfektált regenerálódó izmokat (Kósa and Zádor 2013). Megállapítható volt, hogy a rostok elsősorban a transzfektáláshoz közeli régióban, az izom centrális részén fejezték ki a GFP-t, míg a terminális (miotendonális) részeken alig vagy egyáltalán nem mutattak pozitivitást (42. ábra). Hasonló eredményre jutottunk a vörös fluoreszcens fehérjét kifejező plazmidokkal is. Mindez azt mutatja, hogy a transzfekció hatásfoka az egész izomra vonatkoztatva jóval kisebb volt annál, mint amit a transzfektálás helyéhez közeli keresztmetszeteken becsülni lehetett, azaz a transzfektált rostoknak is csak egy kis részlete lehetett pozitív a bevitt plazmidra.

A kotranszfekció és az egymást követő transzfekció hatékonyságát is igazoltuk vörös és zöld fluoreszcens plazmidokkal. Az együttes transzfekció ugyanazon rostokban eredményezett kettős fluoreszcens jelölést, s az egymás utáni transzfekció pedig eltérő rostokban okozott zöld illetve vörös fluoreszcenciát (Kósa and Zádor 2013).

#### V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

#### V.1. A soleus és az EDL regenerációja

Az ausztráliai tigriskígyó mérge a soleus és az EDL izmok roncsolódását idézi elő. Ezt a hatást a teljes de novo izomkialakulás folyamatának előidézésére kívántuk felhasználni. Előkísérletek alapján a méreg intramuszkulárisan injektálva a szakirodalomban leírtnál mintegy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben (Harris et al. 1975, Whalen et al. 1990) a soleus teljes nekrózisát idézte elő. A teljes nekrózist EDL-ben a soleusénál háromszor nagyobb mennyiségű méreg injektálásával, 2-3 nappal hosszabb idő alatt sikerült elérni az izmok mintegy felénél. A felhasznált kígyóméreg a notexint, több foszfolipáz A2 (PLA2) tipusú fehérje keverékét tartalmazza, amelyek a miotoxikus hatásért felelősek (Harris 2003). A notexin elsősorban a lassú oxidatív rostokat károsítja, de molekuláris hatásmechanizmusa - mint a PLA2 típusú toxinoké általában - nem ismert (Gutiérrez and Lomonte 2013). A soleus izom mintegy 75% lassú-oxidatív (I-es), 20% gyors-oxidatív (IIa) rostot tartalmaz, míg a gyors-gikolitikus-oxidatív (IIx/d) rostok aránya mindössze 1% körüli. A fennmaradó 3-4 % ot az un. hibrid rostok teszik ki. Ennek megfelelően a notexin hatására viszonylag gyors és teljes nekrózis ment végbe. A notexin lassú izom specifikus hatása alapján nehezen értelmezhető, hogy miért következik be az esetek többségében, igaz, három napos késéssel, az EDL nekrózisa is. Az egyik lehetséges ok, hogy a nagyobb méretű, a notexinnek jobban ellenálló gyors-glikolitikus rostok a kiterjedt gyulladásos folyamat hatására megsérülnek és folyamataik elindulnak a nekrózis irányába. A gyulladás ideje valóban hosszabb ideig tartott az EDL-ben mint a soleusban és a mononukleális sejtek felszaporodása már az első napon látható volt mind a két izomban. Az izomrostokat körülvevő endomysium körvonalai az EDL-ben jobban kivehetőek, mint a soleusban, jelezve az eltérést a degradáció fokában. Feltételezhető, hogy a notexin szelektíven toxikus az izomrostokra, bizonyos esetekben az idegvégződésekre (Harris et al 2000), ennek megfelelően nem hat más sejtekre, így a vázizom regeneráció forrását jelentő szatellitasejteket és a mioblasztokat viszonylag épen hagyta (Lomonte et al. 1999) és ezek aktivációja beindíthatta a regenerációt. A notexin hatása az EDL gyors glikolitikus rostjaira még nem ismert, de megfigyelték, hogy a szarkolemmához ködődve léziókat idéz elő, ami Ca<sup>2+</sup> beáramlást és hiperkontrakciót idéz elő, amelynek nyomán a rostok lebomlási folyamatai beindulnak (Dixon and Harris 1996).

A nekrózist követő első regenerációs esemény, amelyet a soleus izom regenerációjában vizsgáltunk, a sejtosztódás beindulása. A BrdU beépülés azt mutatta, hogy a sejtosztódás első maximuma a toxin beadása utáni harmadik napon volt (Zádor et al. 2002). Ehhez társultan sporadikusan megjelentek a dezmin pozitív mioblasztok majd a miotubulusok is, melyek rohamos fúziójukkal elérték, hogy a 4. napon az izom teljes keresztmetszetében domináljanak, amint azt a

### dc\_1047\_6915

dezmin kifejeződés is mutatta. A 3-ról a 4. napra lezajló dramatikus változás, amit dezmin pozitív mioblasztok miotubulusokká alakulása jelzett, nem járt az izom teljes dezmin kifejeződésének növekedésével. Az immunoblotton mérhető dezmin mennyisége ugyanis még csak tendenciaszerűen emelkedett a 4. napon és a regeneráció folyamatainak szinkronba kerülésével csak az 5. napon lett szignifikánsan magasabb, mint a normál izomban (Zádor et al. 2002). Az EDL-ben a 3. naptól volt megfigyelhető a dezmin pozitív mioblasztok sporadikus jelenléte az izomkeresztmetszeten a maradvány rostok között és a nekrózis utáni endomysiális helyeken. Ebben az izomban a miotubulusok a 6-7 napon váltak általánossá a keresztmetszeti képen, ekkorra a sérült, maradvány rostok is nagyrészt vagy teljes egészében hiányoztak az izomból.

A beidegzés kialakulását jelző iniciális véglemezek a korábbi munkákkal összhangban (Whalen et al. 1990, Grub et al. 1991) az 5. napon jelentkeztek a soleusban. A véglemez potenciálok 7. napon bekövetkező változása (Grub et al. 1991) is összhangban volt a véglemezek számának csökkenésével, amelytől kezdve egy roston csak egy véglemez volt megfigyelhető. A véglemez kialakulás e két állomása lezajlott az EDL-ben is, csak később, mint a soleusban, a 7 és a 10. napon. A véglemezek fejlődésével összhangban alakult az acetilkolineszteráz formák mennyisége is mind a kétféle regeneráció során (Kiss et al. 2004). A beidegzés elnyerésével a regenerálódó rostok növekedése felgyorsult, s ez mérhető volt a teljes regenerálódó izom tömegén is (Zádor and Wuytack 2003, Zádor 2008).

#### V.2. A miogenikus faktorok és a regeneráció

Annak ellenére, hogy a soleus és az EDL regenerációja eltért, és a myoD és a myogenin akkumulációja is különböző volt a normál soleus és EDL izmokban, a korai miogenikus faktorok (myoD és myf-5) hasonló változást mutattak mRNS szintjükben a két izom újraalakulása során. A toxin injektálása utáni első napon a soleusban és az EDL-ben is a myoD mRNS nagyságrenddel nőtt, ez bizonyára a szatellita sejtek aktivációját jelezte (Grounds et al 1992, Füchtbauer and Westpal 1992, Cornelison and Wold 1997). A myoD hasonló szintváltozása a kétféle regenerációban azért volt érdekes, mert az EDL-ben a nekrózis csak két nappal később fejeződött be. Ez arra utalt, hogy a notexin okozta sérülés mind a kétfajta izomban aktíválta a szatellitasejteket. A myf-5 szintje, amelyről ugyancsak ismert, hogy emelkedik a miogenezisben (Olson and Klein, 1994, Ludolph and Konieczny, 1995), furcsa módon csökkent a regeneráció során. Ismert, hogy a myoD funkcionális génjére hiányos egérben a myf-5 szintje emelkedett a kontrollhoz képest (Rudnicki et al. 1993). Lehetséges, hogy a regeneráció első napjaban és a vége felé, a 28. napon hasonló mechanizmus alapján lesz a két transzkripciós faktor szintváltozása

## $dc_{1047}^{-70}$ 15

ellentétes irányú. Ettől eltekintve, a myoD és a myf-5 egymáshoz hasonló változása a szatellitasejtek hasonló ütemű aktívációját feltételezi mind a két izomregenerációban.

A késői miogenikus reguláló faktorok, a myogenin és az MRF4 transzkript szintje különböző módon változott a soleus és az EDL regenerációban. Amíg ez a két MRF szint dramatikusan csökkent a soleus regeneráció első napjaiban, addíg az EDL regenerációban nem változtak a normál izomhoz képest. Ez valószínűleg azzal volt összefüggésben, hogy az EDL-ben több volt a túlélő rost és bennük megmaradhattak a transzkriptek. A 3. napon a soleus regenerációban, amikor a mioblasztok aktíválódni kezdtek a myogenin és az MRF4 transzkriptje jelentősen emelkedni kezdett. Az EDL-ben csak a myogenin mRNS szintje nőtt, bizonyára a nekrotizált rostokat helyettesítő mioblasztok és miotubulusok hatására, míg az MRF4 mRNS szintje a normál értéken maradt.

A reinnerváció lényeges stádiuma a regenerációnak (Sesodia and Cullen 1991). A myoD és a myogenin transzkript szintjét a denerváció emeli, a reinnerváció pedig csökkenti (Eftimie et al. 1991, Adams et al. 1995, Hughes et al. 1993). Ennek megfelelően a myoD és a myogenin mRNS szint csökkent a beidegződés kialakulását követően – soleusban a 7. naptól, az EDL-ben a 10. naptól – a regeneráció 28. napjáig, a normálhoz hasonló szintre. Az előbbiekhez hasonlóan a myf-5 is csökkent, de az MRF4 nem változott a regeneráció hátralevő részében.

Általánosan elfogadott, hogy a korai miogenezisben a myogenikus faktorok aktíválódási sorrendje: myf-5/myoD, myogenin, majd MRF4 (Sabourin and Rudnicki 2000). Mind a két izom regenerációjában azt találtuk, hogy a myoD transzkript a myf-5-nél korábban mutatott emelkedő tendenciát. A sorrend további része nagyjából érvényes volt. A leglényegesebb különbség a két izom között a myogenin és az MRF4 3. napon mért szintjében mutatkozott, amelynek az oka az EDL elhúzódóbb nekrózisa lehet. Érdemes megjegyezni azt is, hogy a miogenikus faktorok mRNS szintje megelőzte a legtőbb izomspecifikus gén kifejeződését.

#### V.3. A miogenikus faktorok izomadaptációs modellekben

A miogenikus faktorok szintje változott a különféle izomadaptációs modellekben is. A soleus izom passzív nyújtása során nem alakult ki az MRF-k szelektív akkumulációja az izom-ín határ közelében, ahogyan vártuk. Ehelyett az izom egész hosszában nőtt a szintjük, alátámasztva, hogy az egész izomrost hosszában szükséges a kifejeződésük. Továbbá az MRF-k mRNS szintje nem nem differenciáltan, hanem nagyjából egyformán emelkedtek.

## dc\_1047<u>7</u>15

Protein szinten viszont megfigyelhető volt a differenciált emelkedés, a MyoD emelkedett, a myogenin nem. Ez ellentmondásban volt azzal, hogy a passzív nyújtott izom rostjaiban itt is gyors lassú transzformáció játszódott le, hiszen az ilyen esetben a myoD/myogenin arány csökkenése az általánosabb (Hughes et al. 1993, Mozdziak 1999).

A passzivitás/immobilizáció és a passzív mozgatás sajátos módon differenciáltan hatott a myoD és a myogenin szintjére: lényegében csökkentette a myoD/myogenin arányát a gastrocnemiusban. Tulajdonképpen ugyanez történt a rost típusát tekintve hasonló, de valójában allotipikus vázizomnak tartott diafragmában is. Hasonló változás tapasztalható a lassú tipusú ingerlésre bekövetkező gyors-lassú izom transzformáció során, illetve az ezzel ellentétes irányú, a thyroid hormon kezeléssel előidézett lassú-gyors transzformáció következtében (Hughes et al. 1993). A diafragma összehúzódási erejének csökkenése korrelál a myoD/myogenin arány csökkenésével és mind a kettő mérséklődik mechanikus ventillációban a közbeiktatott spontán lélegeztetés hatására. Feltehetően ez a transzkripciós faktor arány jelzi az összehúzódási erő gyengűlésének irányába történő változást, mert ugyanez nem nyilvánul meg a miozin és a SERCA fehérjék szintjében (Gayan-Ramirez et al. 2005). Tehát ezekben a modellekben is igaz, hogy az MRF-k már az izomspecifikus gének előtt reagálnak a változás irányára.

#### V.4. A myoD szerepe a regenerációban

Annak érdekében, hogy felderítsük a myoD funkcionális jelentőségét antiszenz oligonukleotidot injektáltunk a regenerálódó izomba a 3. napon, amikor a myoD transzkript és fehérje szintje a maximális volt. Az egyik antiszenz oligó, amely a transzlációs start helyhez hibridizált késleltette a miotubulusok kialakulását, a dezmin kifejeződést és az iniciális véglemezek kialakulását, azaz a regeneráció menetét. Az antistart oligó az injektálása után egy órával drámaian csökkentette a myoD mRNS és fehérje szintjét. Ez összhangban volt a myoD mRNS és fehérje miogenikus sejtkulturában kimért magas turnoverével (Bisbal et al. 2000, Abu Hatoum 1999). Érdekes módon a myf-5 mRNS szintje nem növekedett azonnal, ami azt mutatta, hogy a két transzkripciós faktor kifejeződésének szabályozása ilyenkor nem kapcsolódik közvetlenül egymáshoz, ellentétben a myoD hiányos egérben (Sabourin et al. 1999, Yablonka-Reuveni et al. 1999) és a myoD antiszenz gátolt mioblaszt sejtvonalban leírtakkal (Montaras et al. 1996).

Az antiszenz oligonukleotid hatása bizonyára a myoD start helyhez történő hibridizáció és az RNáz H általi degradáció révén valósult meg (Phillis and Gyurko 1997). A myoD cDNS

### $dc_{1047}^{72}15$

különböző szakaszainak eltérő amplifikálódása arra utalt, hogy az antiszenzhez hibridizáló szakasz könnyebben degradálódott, míg a nem hibridizáló szakasz nem változott. Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy az antiszenz oligok nem csak az mRNS transzlációjának gátlásával hatnak, hanem a transzkript célzott szakaszainak degradációjával is. Az a tény, hogy az oligoban TCC szekvencia volt található, valószínű növelte a hatékonyságát, mert ez a szekvencia a nagyszámú hatékonynak talált antiszenz oligók 44%-ban volt jelen (Tu et al. 1998) és a hatását stimulálónak találták az RNáz H aktivitására. Kétségtelen viszont, hogy a legtöbb kísérletben az említett szekvencia intronikus volt, míg a mi kísérletünkben nyilvánvalóan exonban helyezkedett el. A másik lehetséges magyarázat, hogy a myoD cDNS szakaszok eltérő amplifikálhatósága technikai okból történt: az RNS-sel kivonódott anti-start oligo a vele komplementer szakaszon gátolta a rever transzkripciót.

Az antiszenz oligó négy óra alatt kimutathatóan degradálódott és ennek megfelelően a myoD mRNS is visszaállt a kontrol szintjére. Meglepetésre, 24 órával az antiszenz adása után a myoD mRNS egy emelkedést mutatott, amely valószínűleg kompenzációs jellegű volt és ezzel párhuzamosan a myoD, myf-5 és myogenin mRNS szintje is nőtt. A miogenikus faktorok esetében leírták, hogy mRNS szinjük denerváció hatására mérsékelten emelkedik (Walters et al. 2000), melyet nem követ szükségszerűen növekedés a fehérjéik szintjén is (Sakuma et al. 1999). A regeneráció során a reinnervációval ezen a transzkriptek mennyisége visszacsökken az eredeti szintre (Mendler et al. 1998a). Elképzelhető tehát, hogy az antiszenzzel kezelt regenerálódó izmok reinnervációjának késlekedése összefügg azzal a kompenzációs mechanizmussal, melyet a miogenikus faktorok transzkriptjének átmeneti emelkedése jelez.

A myoD, a myf-5 és a myogenin transzkript szintjének koordinált emelkedését az a kölcsönös pozitív feedback magyarázhatja, amelyet az MRF-ek fejtenek ki egymás transzkripciójára (Sabourin and Rudnicki 2000). Annak kicsi a valószínűsége, hogy az említett mRNS-k szintje a mioblasztok számbeli növekedése miatt lett nagyobb, mert ha így lett volna, akkor velük együtt változott volna az MRF4, az Id1, Id3,  $\alpha$ -aktin és a SERCA1b transzkriptek szintje. A myoD, a myf-5 és a myogenin transzkript szintjének ez a szoros és párhuzamos regulációja ismert a szatellitasejtekben (Cornelison and Wold 1997) és mi is ezt tapasztaltuk a kontroll regenerálódó izomban (Mendler et al. 1998a).

A myoD protein már a regeneráció első napján megemelkedett. Az ilyen korai emelkedés az aktívált szatellitasejtek/miogenikus prekurzorok vándorlását jelzi a környező izmokból a nekrotizáló izomba (Bischoff, 1997, Seale and Rudnicki 2000). Azaz, összhangban az újabb

### $dc_{1047}^{73}15$

adatokkal (Schulze et al. 2005) lehetséges, hogy a modellünkben a regenerációt nem csak az izom saját szatellitasejtjei segítik.

Öszefoglalva az antiszenz gátlás eredményét: a myoD szerepe eszenciális a regeneráció koordinációjához, hiszen a viszonylag rövid ideig tartó, 4 óránál rövidebb idejű gátlása is létrehozott mintegy két napos késést a regenerációban és olyan hosszan tartó következménnyekkel is járt, mint a kisméretű rostok megmaradása a 28. napig (Schmalbruch 1976). Mindez bizonyára nem csak a mioblasztok sejtciklusból való kilépésének a késleltetése miatt történt (Perry and Rudnicki 2000), hanem a fúziójukat is gátolhatta, amint azt a myoD -/- mioblasztok esetében is megfigyelték (Yablonka-Reuveni et al 1999). A myoD ugyanis képes a mioblasztok fúziójában kulcsszerepet játszó M-cadherin génjének indukciójára is (Seale and Rudnicki 2000).

#### V.5. A myostatin kifejeződése a regenerációban

A myostatin kifejeződése izomregenerációban összhangban áll a faktor izomnövekedést gátló szerepével, mivel a szintje a nekrózis fázisában rendkívül megnövekedett és a regeneráció beindulása után fokozatosan csökkent. Közlésünkkel párhuzamosan hasonló következtetésre jutottak Yamanouchi és mtsai is (2000), akik a myostatin mRNS-t in situ hibridizációval követték szöveti metszeteken. Ellentmondásnak látszik viszont a mi eredményeinkkel szemben, hogy az ő rendszerünkben a myostatin mRNS magas volt a regeneráció kezdetén. A különbség bizonyára a kimutatási módszerben keresendő. Esetünkben a kivont mRNS degradálódhatott, míg máshol (Yamanouchi et al. 2000) kimutatható maradt a sejteken belül. Az említett szerzők nem részletezték milyen mértékű nekrózis és regeneráció jellemezte az izmot a myostatin kimutatása idején. Ez azért is lényeges, mert ők bupivacain-nal idézték elő a regenerációt, amelyről ismert, hogy kevésbé nekrotizálja a rostokat (Plant et al. 2006) mint az általunk használt notexin. Lehetséges, hogy a myostatin transzkript a myoblastokban ugyan emelkedett, de ennek a mennyisége elhanyagolható volt az izomrostok nekrózisával degradálódó transzkript tömegéhez képest.

Mindenesetre a myostatin transzkript szint emelkedése és protein szintjének csökkenése a regeneráció során ellentmond egymásnak. Ezt magyarázhatja az, hogy a myostatin tárolódhat inaktív formában más fehérjékhez vagy az extracelluláris matrixhoz kötődve. Ezzel összhangban a myostatint mind a kétféle regenerálódó izomban az un. nukleáris frakcióból sikerült kimutatnunk, amely a sejtmagi fehérjék mellett a kontraktilis fehérjéket és az extracelluláris matrix elemeit is tartalmazza számottevő arányban. A TGF-béta csalát tagjairól ismert, hogy az extracelluláris matrixhoz kötődnek (Munger et al. 1997, Taipale and Keski-Oja 1997), hovatovább a myostatin

## dc\_1047\_415

koncentrálódása kimutatható az izom-ideg junkciókban, ahol az alapmembrán "összegyürt" (Wehling et al. 2000). A proteinekhez kötődés eltakarhatja a myostatin immunogén részeit, melyeket így az antitestek nem ismernek fel. Az izomrostok nekrózisa azonban lehet, hogy felszabadítja a myostatint és könnyebben kimutathatóvá teszi.

Előfordulhat az is, hogy a kimutatott myostatin nem a detektálás helyén, hanem a regenerálódó izmon kívül termelődött. A myostatin lehet autokrin-parakrin jellegű és detektálható a szérumban (Gonzalez-Cadavid et al. 1998). A keringő myostatin azután a regeneráció helyére transzportálódik és ott növekedést kontrolláló faktorként akkumulálódik (Lee and McPherron, 1999). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy kísérleteinkben a myostatint nem sikerült vérplazmából kimutatni azokban az állatokban, amelyeknek volt regenerálódott izmuk, sem azokban, amelyeknek nem volt regenerálódó izmuk, azaz a mi adataink nem támasztják alá a myostatin cirkuláló faktor jellegét. Ezen a feltételezések alapján a teljes myostatin mennyisége importált, tárolt és in situ szintetizált komponensekből állhat, ami megmagyarázhatja, hogy ennek a növekedésgátló faktornak a szintje miért különbözik a saját mRNS szintjétől. A transzkript szin alapján feltételezhetjük, hogy az izomdifferenciálódással együtt nő a myostatin in situ szintézise, ezzel összhangban a friss miotubulusok intenzíven festődtek myostatinra. Ugyanakkor a myostatin akkumulációja az egész izom homogenátban és a mononukleáris sejtekben arra utal, hogy a mioblasztok osztódását szabályozza a regeneráció korai stádiumában. Ezzel összhangban, egy későbbi munkában (McCroskery et al. 2003) kimutatták, hogy a myostatin gátolja a szatellitasejtek aktívációját és megújulását. A soleus regenerációban a myostatin csökkenése együtt járt a sejtosztódás növekedésével, a fokozott szatellitasejt aktívációval és az izomrostok növekedésével. Ugyanakkor a kezdeti gátló hatás úgy tűnik, igen fontos a későbbi regeneráció alakulásához is, mert a myostatin hiányos egerekben az izomregeneráció több IIb (gyorsglikolitikus) rostot hozott létre, mint amennyi a kiindulási izomban volt és kevesebb lett a mitokondriumuk is (Amthor et al. 2008).

#### V.6. A TNF- $\alpha$ kifejeződés és jelentősége

A soleus és az EDL regenerációja során a TNF- $\alpha$  az mRNS és a fehérje szinten is dramatikusan megnőtt a notexin injektálás utáni 1-3 napon, mielőtt még a voltaképpeni regeneráció elkezdődött volna. Ezzel párhuzamoson változott a TNF receptorok mRNS szintje is. A regeneráció további szakaszaiban ezek a paraméterek általában egyenletesen csökkentek vissza a normál izom szintjére, kivéve a TNF- $\alpha$  és a TNFR 60 receptor mRNS szintjeit, amelyek átmenetileg emelkedtek a 7. napon a beidegzés idején, ez utóbbi azonban nem mutatkozott meg a TNF- $\alpha$ 

## dc\_1047<sup>\_7</sup>15

fehérje szintjén. A TNF-α növekedését valószínűleg a szövetbe áramló makrofágok és a gyulladásban résztvevő sejtek okozzák, amelyek feladata a sejttörmelék és az elroncsolódott izomrostok maradványainak eltakarítása.

Lehetséges, különösen az EDL esetében, hogy az apoptózis is szerepet játszik, különösen azoknak a rostoknak a lebomlásában, amelyek túlélték nekrózis első hullámát. A nekrozis és apoptózis pontos arányára nem következtethetünk ezekből a kísérletekből, de ismert, hogy mind a két folyamat bekövetkezik a makrofágok hatására izomban (Majno and Joris 1995, McLennan 1996, Robertson et al. 1993, Tews and Goebel 1997). A citokinnek és receptorának az EDL-hez képest korábbi és kifejezettebb növekedése a soleusban összhangban van a két izom nekrózisának és regenerációjának különböző ütemével, s amint azt más paraméterek esetében is igaz, visszavezethető a soleus izom notexinnel szembeni nagyobb érzékenységére. A korai regenerációs kísérletekből kiderült, hogy a mitokondriumban gazdag rostok kevésbé ellenállóak ezzel a toxinnal szemben, mint a mitokondriumban szegények (Harris et al. 1975, Harris and Johnson 1978). Amint a hatásmechanizmusról ismertettük, a patkány soleus izma az EDL-el ellentétben Ies és IIA tipusú rostokat tartalmaz, amelyek a notexin hatására egy-két napon belül nekrotikussá válnak, míg az EDL-ben számos rost, főleg a IIb és IId tipusúak jobban ellenállnak a nekrózisnak, ill. apoptózis játszódik le bennük. Végeredményben a soleus 1-2 nap alatt kiterjedő nekrózisa olyan mértékű, hogy a szatellitasejtek 3 napon bekövetkező aktívációja szinkronizálttá válhat. Ezzel ellentétben az EDL-ben a IIb és IId típusú rostok elhúzódó rezisztenciája az új mioblasztok megjelenésével kombinálódik és a degeneráció és regeneráció átfedését eredményezi az első héten.

Érdemes megemlíteni, hogy a TNF-α és a receptor mRNS szintjének emelkedése egybe esik a regeneráció intenzív fázisával, s a beidegzéssel a soleusban (Mendler et al 1998ab, Zádor et al. 1996, 1998). Ez nyitva hagyja a lehetőséget, hogy a citokin részt vesz a tulajdonképpeni regenerációban is. Ennek a második TNF hullámnak három forrása lehet: a neuronok, a mioblasztok és a makrofágok. Kimutatták, hogy a TNF-α és β felszabadul azokból a axonokból, amelyek sérülés folytán elvesztik véglemezüket (Creange et al. 1997), de ezt a lehetőséget kevésbé tartjuk valószínűnek a regenerációban, mert egyrészt a TNF- $\beta$  nem növekedett meg a TNF-α-val együtt, sőt nem is volt detektálható a folyamat során. Az a lehetőség, hogy a TNF- $\alpha$  a mioblasztokból szabadul fel, ugyancsak számba vehető (Li 2003), de esetünkben ez kevésbé valószínű, mivel egyrészt a citokint nem sikerült demonstrálnunk a C2C12 mioblaszt kultúrából a miotubulusokká történő differenciáltatás során, másrészt a fagyasztással okozott roncsolás hatására a TNF- $\alpha$  kevésbé nőtt az izmokban, mint a notexin injekció után (Zádor et al. 2001). A

### $dc_{1047}^{-79}$ 15

citokin emelkedése együtt változott a nekrózis mértékével, ami jóval nagyobb volt a notexininjektált izom esetén, mint a fagyasztva roncsolt izomban. Azt, hogy a TNF- $\alpha$  nem az izom sejtekben termelődik, alátámasztja, hogy in situ hibridizáció után a citokin pozitív sejtmagok nem a dezmin pozitív területeken találhatók, hanem éppen ellenkezőleg, a dezmin hiányos részeken. Mindent összevetve a TNF- $\alpha$  legvalószínűbb forrásai a makrofágok, amelyek a regenerálódó izomban a citokint típusra jellemzően, szabályozó faktorként termelik (Tidbal et al 2010).

Előzetes kísérleteinkben a TNF- $\alpha$  gátló gyógyszer (infliximab) izom környéki injektálása megnövelte a miotubulusok keresztmetszetét és dezmin kifejeződését, tehát serkentette a regenerációt a soleusban. Ez a hatás nem járt együtt a regenerált izom növekedésével, ellenkezőleg, a 28 napon a rostméret némileg kisebb volt, mint a kezeletlen regenerált kontrollban (Kovács and Zádor 2005). Mindez összhangban van a citokin regenerációt egyensúlyban tartó pleiotrop funkciójával, amely nem csak gátolhatja a regenerációt, hanem serkentően is hat rá (Coletti et al 2002, Schwarzkopf et al. 2007).

Egy sejt túlélése szövetben nagyrészt azon múlik, hogy milyen megerősítő jeleket kap más sejtektől (Thompson 1995) és az ilyen jelek hiánya apoptózist válthat ki (Shindoh 1995, Stangel 1996). A regenerálódó izomban a makrofágok jelenlétét jóval a nekrózis lejátszódása után is kimutatták a kötőszövetben, az újonnan kialakult rostok közelében (McLennan 1996). A TNF-α a makrofágokból felszabadulva részt vehet az izomsejtek parakrin szabályozásában (Layne and Farmer 1999, Buck and Chojkier 1996) és, bár ismert az izomdifferenciációt gátló hatása (Szalay et al. 1997), magára a differenciálódott izomra nem toxikus (Miller et al. 1988). Ismert, hogy a TNF-α változtatni tudja a TNFR-60 szintjét (Bader and Nettesheim 1996) és ennek a receptornak a megnövekedett kifejeződését a regenerálódó izom sejtmagjaiban is kimutatták (De Bleecker 1999). Érdekes, hogy a reinnerváció idején a kísérleteinkben a TNFR-60 mRNS szintje megnőtt, míg a TNFR-80 mRNS szintje nem változott. A két receptorról ismert, hogy kölcsönhatásba lépnek a ligand egymásnak történő továbbításával (Tartaglia et al. 1993) vagy a TNF asszociálódott faktor-2 közvetítésével (Weis et al. 1997). A rostok eltávolításának egyik mechanizmusa a myoD és a kontraktilis fehérjék eltávolítása az ubiquitin-függő proteoszóma komplex által (Li et al. 1998, Ciechanover 1999). A TNF valószínűleg indukálja az ubiquitin gént (Llovera et al. 1997) az izomban kifejeződő NF-κB transzkripciós faktor által (Garcia-Martinez et al. 1993, Li et al. 1998). Az NF-κB indukciója okozhat protein veszteséget mioblaszt kultúrában és normál izomrostokban (Li et al. 1998). Kimutatták, hogy a curcumin, az NF-κB farmakológiai gátlója (és a cury hatóanyaga) stimulálja az izomregenerációt az izom mechanikus sérülése (összeroppantása) után, anélkül, hogy a mioblasztok számát növelné (Thaloor et al. 1999).

### $dc_{1047}^{7}15$

Adataink összességébe véve összhangban vannak azzal a hipotézissel, hogy a citokin főleg a TNFR-60 receptorhoz kötődés útján segíti elő az NF-κB aktívációját és kontrollálja a regenerációt.

A miogenikus differenciáció magába foglalja a sejtciklus elhagyását, az izomspecifikus gének kifejeződését és a miotubulusok kialakulását. A myoD a miogenikus differenciáció egyik legfontosabb szabályozó faktora. Regenerálódó izomba a myoD mennyisége jelentősen növekszik, de ez elmaradhat a TNF-α kezelés hatására (Langen et al. 2004). Feltételezik, hogy a TNF-α a myoD szint szabályozása révén fejti ki gátló hatását, s ezzel összhangban a hatás valóban a molekula stabilitásán mutatkozott, a myoD féléletideje TNF-α kezelést követően csökkent (Langen et al. 2004). A destabilizáció lehetséges útja az NFkB felhasználásával történik. Az NFκB egy transzkripciós faktor, amely kötött állapotban található a citoplazmában. Különböző hatások, köztük a TNF-α, a kötő molekula bomlásához vezetnek, elősegítve a NFκB sejtmagba kerülését. A poli-ubiquitin gén átíródása NfkB függő folyamat, a gén egyik terméke, az E3 ubiquitin ligáz pedig nélkülözhetetlen a myoD proteaszomális lebontásához (Abu Hatoum et al. 1998). A mechanizmusal összhangban, a proteaszóma gátlása TNF-α jelenlétében is nagyrészt visszaállítja a myoD stabilitását (Langen et al 2004). Összegezve tehát a TNF-α izomregenerációt gátló és – részben ebből kifolyólag – cachexiát okozó hatásában szerepe van a myoD NFκB függő proteaszomális lebontásának. Emellett feltételezhető, hogy az NFkB aktivációja a sejtciklusba beavatkozása révén gátolja, hogy a mioblasztok elhagyják a sejtciklust (Langen et al. 2004).

A TNF- $\alpha$  miogenikus differenciációt gátló hatása azonban nem csak az NF $\kappa$ B-n keresztül valósul meg. Erre az hívta fel a figyelmet, hogy a kaszpázok gátlása TNF- $\alpha$  jelenlétében helyreállítja az izomregeneráció menetét (Coletti et al. 2002). A kaszpázoknak szerepük van a sejthalál előidézésében. Egyrészt belső jelátviteli úton, a p53-on keresztül aktiválódhatnak, másrészt külső hatásra, pl. a TNF- $\alpha$  receptorhoz kötődése útján. A TNF- $\alpha$  függő kaszpáz aktivációnak korábban csak az apoptosis folyamatában tulajdonítottak szerepet, újabb eredmények alapján ennek is része lehet az izomregeneráció gátlásában. A kapcsolat hatása valószínűleg igen összetett és részleteiben nem ismert. Ha ugyanis a TNF- $\alpha$  hatására egyszerűen csak elpusztulna a differenciálódó sejtek egy része, akkor jelentős sejtszám csökkenéssel lenne, ami azonban nem figyelhető meg (Coletti 2002). Az apoptosisért felelős jelátviteli rendszernek tehát speciális szerep tulajdonítható az izomregenerációban, mert a regenerálódó izom a többi szövettől eltérő módon reagál az apoptótikus utak aktiválódására. A folyamatban fontos szabályozó szerepet játszhat a PW1 molekula. A PW1 kezdetben azért került az érdeklődés középpontjába, mert megfigyelték, hogy fejlődő izomban nagy mennyiségben van jelen. Később felmerült, hogy a TNF- $\alpha$  jelátvitelt és a p53 függő apoptotikus szabályozást kapcsolja össze. Kifejeződése az embrionális

### $dc_{1047}^{-78}$ 15

mesodermában kezdődik, majd a differenciálódás során megszűnik és a p53 függő sejthalálhoz kapcsoltan jelenik meg ismét. Szatellita sejtekben és a vázizom kötőszöveti sejtjeiben azonban az egész élet folyamán konstitutívan expresszálódik, anélkül, hogy apoptosist okozna (Schwarzkopf et al. 2007). Közvetítő szerepére utal, hogy az F3 miogenikus sejtek, melyekben nincs PW1, más miogenikus sejtekkel ellentétben érzéketlenek a TNF-α izomdifferenciálódást gátló hatására, de a PW1 kifejeződés indukálása érzékennyé teszi őket erre (Coletti et al. 2002). A PW1 valószínűleg előidézi a bax a mitokondrumba való transzlokációját. A bax-ról ismert, hogy képes ioncsatornákat kialakítani a mitokondriumban és ezáltal destabilizálja a külső membránt. Ez mitokondriális funkciózavar bizonyítottan gátolja a fejlődő izom differenciációját (Coletti et al. 2002).

A PW1 emellett a TRAF2-vel kapcsolódva is képes aktiválni az NFKB függő folyamatokat.

(Coletti et al. 2002). A közös effektor mechanizmus eredménye – és egyben bizonyítéka is – hogy olyan hatások, amelyek a p53 út aktiválódását idézik elő (pl.: a DNS-repair enzim funkciózavara), súlyos izomatrófiával járnak (Schwarzkopf et al. 2007).

Érdemes megjegyezni, hogy a p53-PW1 rendszer pozitív feedbacken alapuló szabályozó kört is alkot, amivel feltehetően a szatellita sejt populációt is szabályozza a vázizomban. Ennek eredményeként magas PW1 jön létre, s ez gátolja a szatelliták túlzott felszaporodását. A PW1 defektusa esetén ez a szabályozás nem jön létre, ami a szatellita sejtek funkciózavarához vezet (Schwarzkopf et al. 2007).

#### V.7. A SERCA izoformák kifejeződése a regenerációban és passzív nyújtás során

A szarkoplazmás retikulum igen lényeges az izom funkció kialakulásához. A SERCA szerepét a patkány izmokban az is hangsúlyozza, hogy a foszfolamban és a szarkolipin, melyek fontos SERCA reguláló proteinek, hiányoznak a soleus és EDL izmokból (Vangheluwe et al. 2005b). Várható volt, hogy a SERCA izoformák szintje változni fog mind a kétféle izom nekrózis/regenerációja során, s ennek megfelelően dramatikus eltéréseket tapasztaltunk.

A normál soleus izomban a SERCA2 transzkript szintje mintegy két és félszer magasabb, mint a SERCA1 transzkriptté. A szakirodalom kissé ellentmondásos ebben a vonatkozásban. Néhány szerző hasonló SERCA arányt talált (Simonides et al. 1990), mások több SERCA1-et mint SERCA2-t mutattak ki a soleusból (Wu et al. 1995, Wu and Lytton 1993). Ez bizonyára a különböző módszerek alkalmazása miatt fordulhat elő. Az arány RT PCR, amelyet mi

### $dc_{1047}^{79}15$

alkalmaztuk (a SERCA1/SERCA2 vagy a SERCA2/SERCA3 mérésére) a "state of the art" szerint a legmegbízhatóbb módszerek közé tartozott, amikor kísérleteinket kiviteleztük és ma is megbízható (Zádor et al. 1996, Vangheluwe et al. 2005b). Ennek a módszernek a lényege, hogy azonos primereket alkalmazunk, amelyek azonos affinitással kötődtek a kétféle transzkript cDNSéhez. A két cDNS között ugyan volt némi szekvencia-eltérés, de nem a primerekkel homológ régiókban és a gyakorlatban ez nem befolyásolta az amplifikációt, ugyanakkor viszont lehetővé tette a fragmentek megkülönböztetését pl. restrikciós emésztésekkel.

A frissen nekrotizálódott soleus izomból a normál felnőtt izom SERCA izoformái (SERCA1a és SERCA2a) szinte eltüntek és lényegében nem is volt más forma detektálható, mint az ubiquitos SERCA2b. Ez tovább erősítette azt a megfigyelést, hogy a regenerációt a vázizomrostok teljes nekrózisa előzi meg.

Elsőként a neonatális izom specifikus SERCA1b szintje kezdett el a 3-5. napokon emelkedni, majd fokozatosan átadta helyét a felnőtt splice variáns SERCA1a-nak. A továbbiakban a SERCA1a/SERCA1b váltás is egybe esett a reinnervációval és a SERCA2a emelkedésével a 7. napon. Ez is mutatta, hogy az SR  $Ca^{2+}$  pumpák kifejeződése valamilyen módon függ a beidegzéstől.

A legnagyobb mértékű növekedést a SERCA1 mRNS (lényegében SERCA1b) mutatta az 5. napon. Ez szintén egybe esett az innerváció kezdeti stádiumával és azt feltételezte, hogy a denervált izomban is létezik egy viszonylag alacsony mértékű SERCA kifejeződés, de az igazán nagymérvű kifejeződés az idegi hatáshoz köthető. A SERCA1a/SERCA1b arány RT PCR kimutatta, hogy az 5. napon mért emelkedés nagyrész a SERCA1b izoformának tulajdonítható.

A következő esemény a SERCA1a izoforma SERCA1b-vel szembeni dominanciájának kialakulása volt a 7-10 napokon. Ez egyidejű volt az innerváció közel végleges formájának kialakulásával. Utána a regeneráció további szakaszában a SERCA1a mRNS szintje nem változott, viszont ehhez képest a SERCA2a transzkript szint fokozatosan nőtt és a 21. napon érte el a legmagasabb szintet. Hasonló izoforma váltást a gyors izom hosszan tartó lassú izom tipusú ingerlésével is elő lehet idézni (Briggs et al. 1990, Leberer et al. 1989). A neonatális-gyors és lassú SERCA kifejeződés sorrendje és végül a lassú izoforma dominanciája párhuzamot mutat a megfelelő miozin izoformák kifejeződési sorendjével a soleus notexin-nekrózis által előidézett regenerációjában (Whalen et al. 1990). A denervált soleus izom regenerációjában viszont ez a folyamat csak a gyors izoformák kifejeződéséig ment végbe. A jelenséget Whalen és munkatársai

### $dc_{1047}^{80}15$

(1990) azzal magyarázták, hogy a regeneráció olyan homogén populációjú mioblasztokkal kezdődött, amelyek csak a gyors miozin izoforma kifejeződésére voltak determinálva, de a lassú tipusú beidegzés hatására fokozatosan képessé váltak a lassú miozin kifejeződésére. Az ellenkező irányú, lassú-gyors SERCA izoforma váltásra a soleus izomban nincs példa, de a túlnyomórészt gyors tipusú quadriceps izom korai fejlődésében érdekes módon ez a mintázat fordul elő (Arai et al. 1992). A quadriceps kialakulásakor a SERCA1a kifejeződése alacsonyabb, mint a SERCA2a szintje, később a SERCA1b kezd emelkedni, majd fokozatosan átadja helyét a SERCA1a-nak, eközben a SERCA2a szintje lecsökken.

A gyors tipusú EDL izomban a SERCA1a és a SERCA2a mRNS aránya mintegy 9:1. Az EDL nekrózisa, amint azt a SERCA1a mRNS szintjének több mint tízszeres csökkenése is mutatta, a toxin beadása utáni 3. napon lett teljes. Az ezt követő regenerációban a legnagyobb arányú növekedés érdekes módon a SERCA2a mRNS szintjében következett be, mindjárt az 5. napon, és ezzel párhuzamosan nőtt a SERCA1b mRNS szintje is. Az EDL reinnervációjának lejátszódása alatt a 7-10 napon a SERCA1a a domináns izoformává vált és elérte a normál szintet, míg a többi izomspecifikus SERCA szintje lecsökkent.

A nem izomspecifikus SERCA2b csak tendenciaszerűen változik mind a két izomregeneráció során, elsősorban a nekrózis lejátszódása alatt, bizonyára a gyulladást irányító sejtek izomba áramlása következtében.

A SERCA izoformák kifejeződése a regenerálódó izmokban a transzkript és fehérje szinten is dinamikus volt. Az adott forma fehérje szintű megjelenése általában egyidejű volt illetve 2-3 nappal később követte a saját transzkriptjének szintjének emelkedését. Ez a SERCA1a proteinre is igaz, amelyet, specifikus antitest hiányában, a teljes SERCA1 és a SERCA1b fehérje különbségeként követtünk. Végeredményben a 28 napos regenerálódott soleus és az EDL izom is ugyanolyan arányban fejezte ki a SERCA izoformákat mint a normál kontroll izmok.

A SERCA protein szintek normál izomban tapasztalható arányának a kialakulása többnyire már a 21 napon megtörtént. Ekkortól valósult meg a SERCA1a és SERCA2a kifejeződés rostszintű, azaz a megfelelő miozin izoformákéval párhuzamos elkülönülése is. A soleus izom 28 napos regenerációjának végén 98%-ban lassú rostot tartalmazott, s ez az arány 5 hónap múlva sem változott számottevően. Az MyHC1 pozitív lassú rostok szinte mindegyike kifejezett SERCA2a-t is, de mintegy 10%-uk kifejezte a gyors SERCA1a-t is, tehát ez utóbbiak kevert tipusú rostok voltak. Ezzel összhangban nagyobb részük, de nem mindegyik, kifejezett MyHC2a-t is. A lassú

### dc\_1047<u>8</u>15

tipusú rostok számának növekedése a regeneráció következtében feltételezhetően a lassú idegvégződésének dominanciájával magyarázható (Whalen et al. 1990, Grub et al. 1991).

Az EDL izom rostjaiban a SERCA1a izoformák kifejeződése az MyHC2a, MyHC2x/d és a MyHC2b formákkal együtt valósult meg, a SERCA2a pedig a MyHC1-el azonos rostokban jelent meg. Lényegében hasonló módon kordinálódott az SR Ca<sup>2+</sup> pumpák és a miozinok kifejeződése a regeneráció 28. napján is. Szembetűnő eltérés volt, hogy a lassú tipusú rostok a regenerálódott izomban jobban asszociálódnak, mint a normál EDL-ben, ez bizonyára axon kolaterálisok által történt beidegzésnek köszönhető. Ismert, hogy denervációs neuropátia kialakulását hasonló, kényszerű reinnervációra utaló rostasszociációk jellemzik (Snow et al. 2005).



**43.** *Åbra:* Az izomregenerációban vizsgált génkifejeződések vázlatos össszefoglalása. A nevek az MRF, SERCA, myostatin, TNF-α az mRNS-k/fehérjék feltűnésének idejét mutatják a regeneráció jellegzetes morfológiai változásaival egy időben. A soleus és EDL regeneráció között jellemző különbség, hogy a SERCA2a csak a soleusban marad domináns forma a regeneráció végére, míg az EDL-ben a SERCA1a lesz a tipikus SR pumpa.

A passzív nyújtás az izom túlterhelés elterjedt modellje, amelyet a kifejlett izomrostok gyors-lassú transzformációja jellemez (Goldspink et al. 1995). Ennek megfelelően a kísérleteinkben a SERCA2a mRNS szintje megnőtt és a SERCA2a rostok száma is megemelkedett a SERCA1a pozitív rostok rovására. Érdekes módon ez együtt járt a SERCA1b mRNS szint mintegy 5-szörösére történő emelkedésével és a SERCA1a mRNS mintegy felére csökkenésével. Ugyanakkor viszont nem következett be a SERCA1b protein szintjének emelkedése, ami arra utal, hogy a SERCA1b protein a normál izomrostokban nem képes kifejeződni (Zádor et al. 2007). Ennek megfelelően ez a neonatalis SERCA izoforma nem követte transzkriptjének emelkedését a denervált soleusban sem. Részletes analízisünk kimutatta, hogy a SERCA1b protein szintű kifejeződése kötődik a miotubulus és primitív rost állapothoz, s ezért nem található a normál

### $dc_{1047}^{82}15$

adaptálódó izomban, annak ellenére, hogy a splicing-ja ilyenkor jelentős mértékben végbemegy (Zádor et al. 1999, 2007, Szabó et al. 2008). A SERCA1b neonatalis transzkript létrejöttében, a 22. exon elvesztésében a muscleblind-like (MBNL) fehérjék is szerepet játszanak. Ezek a splicingban közreműködő proteinek kötődnek a CUG ismétlődésekhez és közreműködnek az I-es tipusú miotónikus disztrófia (DM1) kialakulásában (Ho et al. 2004, Kimura et al. 2005, Hino et al. 2007). A DM1-ben a myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) génjének 3' végén található CTG ismétlődések expanziója alakul ki, amely köti a muscleblind-like 1 (MBNL1) fehérjét. Ezek után kisebb az esélye annak, hogy az MBNL1 kapcsolódjon a SERCA1 22. exonjától 3' irányban található öt darab kötőhelyhez (Hino et al. 2007). A SERCA1b transzkript emelkedése és a SERCA1a transzkript csökkenése kimutatható a DM1-ben, de ez érdekes módon nem változtatja az össz SERCA1 fehérje mennyiségét (Kimura et al. 2005). Ez alapján érdekes lehet, hogy a muscle blind like protein vajon szerepet játszhat-e a passzív nyújtás splicingra gyakorolt hatásában.

#### V.8. A SERCA2a nem függ közvetlenül a beidegzéstől a soleus izomban

A SERCA izoformák figyelemre méltó kordinált kifejeződést mutattak a megfelelő miozinokkal a regeneráció során. Alaposabb vizsgálat után azonban, a szintjeik változása ugyanazon izomban mérve jól elkülöníthető volt egymástól. Feltünt, hogy a lassú miozin gyorsabban emelkedett a reinnerváció idején, mint a SERCA2a (Fenyvesi et al. 2004). Ezért az analízist elvégeztük denerváltan regenerálódó izmokban is. Már az immunhisztokémiai festés is azt mutatta, hogy a lassú miozin hiányzik, a SERCA2a pedig jelen van a 12 napig denerváltan regenerálódó izmokban. Mennyiségi vizsgálatokban a lassú miozin mRNS és fehérje a 7-21. napon dramatikusan csökkent, míg a SERCA2a transzkript és fehérje a 7. napon nem változott, ill. emelkedett a denervált-regenerálódó izomban a kontrollhoz képest. Tehát az mRNS és fehérje szintű változások a kontrakciós és relaxációs fehérje kifejeződésének különböző szabályozására utaltak.

Különösen figyelmet felkeltő volt a SERCA2/SERCA1 mRNS-ek arányának drasztikus emelkedése a 7. napon, ez elsősorban a SERCA1 mRNS minimális szintre csökkenésének volt köszönhető. A SERCA2a fehérje szint is a kontroll többszörösére emelkedett a denervált-regenerálódó izomban, ami semmi esetre sem lehetett az innerváció direkt hatása. Hasonló SERCA2a emelkedés az apoptozisban tapasztalható, a friss tömeg és a fehérje nagyarányú vesztesége esetén (Kuo et al. 1998). Lehetséges, hogy ez esetben is a denerváció másodlagos hatásaként érvényesülő atrófiával függ össze. A továbbiakban a SERCA2a mRNS, bár a 21. napon emelkedett a 10. naphoz képest, mindíg alacsonyabb maradt, mint a kontroll. A fehérje

## $dc_{1047}^{83}15$

szint csökkenő tendenciát mutatott a 10. és 21. napon. Megállapítottuk tehát, hogy a SERCA2a kifejeződés, a lassú miozinéval ellentétben, nem függ direkt módon a beidegződéstől, bár hosszú távon az idegi befolyás módosíthatja. A SERCA1 transzkript szintje sokkal közvetlenebb idegi függést mutatott a 7. napon, mint a SERCA2a transzkript, ez azonban nem mutatkozott meg a protein szintjén, mely csak minimálisan változott a denervált regenerációban. Egy másik fajta denervációt, a soleus ideg átvágását is alkalmaztuk a denerválás végtagbénító mellékhatásának a kiszűrésére. A lassú miozin ekkor sem fejeződött ki, míg a SERCA2a mRNS és fehérje szintje nem különbözött a kontrollétól (Zádor és Wuytack 2003).

Vizsgálatainkat (Szabó et al. 2008) megelőzően a normál izomból nyert adatok alapján feltételezték, hogy az idegi hatás meghatározza a SERCA2a kifejeződést (Schulte et al. 1994). Jóllehet, a normál izom és a regenerálódó izom génkifejeződési kontrollja jelentős mértékben különbözhet egymástól (Moreno et al. 2003), mégis számos adat utal arra, hogy a SERCA és MyHC izoformák kifejeződése a normál izomban is eltérő mértékbe függ a beidegzéstől. A gerinvelő léziójával bénított macskában és patkányban (Zhong et al 2002, Talmadge and Paalani 2007), a túlterhelt egér soleus izmában (Awede et al. 1999) és a denervált soleus izomban (Leberer et al. 1986, Hamalainen and Pette 2001, Roy et al. 2002) is mutattak ki eltérő kifejeződést a kontrakció és relaxáció e fontos fehérjéje esetében. A csípő ideg ideg átvágása azonban a hátsó végtag bénulásával is együtt jár, ezért a soleus izmot szelektíven is denerváltuk, aminek következtében a környező izmok működése csökkentette a denerváció aspecifikus hatásait, például az atrófia mértékét. A normál izom végtagi és szelektív denerválása is azt mutatta, hogy lassú miozin idegi befolyás hiányában lecsökken, míg a SERCA2a kifejeződési szintje nem változik vagy növekszik. A kétféle denerváció között mutatkoztak eltérések, hiszen a lassú idegi hatás elvesztésével lejátszódó lassú-gyors transzformáció a szelektív denervált izomban gyorsabban ment végbe. Mindez abban is megmutatkozott, hogy több kevert tipusú, ún. hibrid rost volt található a szelektíven denervált soleus izomban, mint a végtagi denerváltban.

#### V.9. A Ras nem szabályozza direkt módon SERCA2a-t

A Ras/MAPK útvonal igen jelentős szerepet játszik a sejten kívüli szignálok sejten belüli jelekké történő alakításában. A lassú beidegzés szerepe meghatározó a lassú izom differenciációban és a lassú miozin kifejeződésében, s a hatását a Ras/MAPK útvonal közvetíti (Murgia et al. 2000). A Ras domináns negatív mutánsával történő transzfekció megakadályozta a lassú miozin kifejeződését a regenerálódó vázizom rostjaiban, de nem befolyásolta a SERCA2a kifejeződést.

### $dc_{1047}^{84}$ 15

A kísérletet elvégeztük a Ras pozitívan ható mutációival is. A denervált regeneráló soleus nem fejez ki lassú miozint, de az overexpresszáló Ras V12 mutánssal történt transzfekció serkentette a lassú miozin kifejeződését az izomrostokban, miközben a SERCA2a kifejeződés nem változott. Ez azt mutatta, hogy a SERCA2a kifejeződése nem szabályozódik direkt módon a Ras által.

A Ras három útvonalat képes befolyásolni, a Ras V12 ezek mindegyikére hat. A három útvonal közül az, amelyik a MAPK-n keresztülvezet, specifikusan serkenti a lassú miozin nehéz láncának kifejeződését. A Ras V12 S35 mutációja ezt az útvonalat serkenti és transzfektála elősegíti az MyHC1 kifejeződést a denervált regenerálódó soleus izomban is, a SERCA2a kifejeződését viszont nem befolyásolja. Ez megerősíti, hogy az MyHC1 kifejeződése a SERCA2a-étől különböző jelúton szabályozódik.

#### V.10. A kalcineurin nem szabályozza direkt módon a SERCA2a kifejeződést

A kalcineurinnak kulcsszerepe van az in vitro izomdifferenciálódásban (Chin et al. 1998) és az in vivo izomregeneráció során is alapvető fontosságú az izomrostok lassú tipusának kialakulásához (Serrano et al. 2001). A kalcineurin jelentősége abban rejlik, hogy a lassú idegi stimuláció során létrejövő a Ca<sup>2+</sup>-hullámokat képes génkifejeződést befolyásoló jellé alakítani (Dolmetsch et al. 1997, Bassel-Duby and Olson 2003). Ezért a regenerálódó soleusban megvizsgáltuk a kalcineurin szerepét a lassú izomra specifikus SERCA2a kifejeződésének szabályozásában.

A kalcineurin aktivitása és az aktív alegységének, a kalcineurin A-nak a szintje, valamint a kalcineurin aktivitás mértékét követő MCIP1.4 mRNS szintje emelkedett az izomregeneráció során. Ez az emelkedés megelőzte a lassú miozin és a lassú SERCA2a növekedését. A kalcineurin maga is függ az idegi hatástól. A kalcineurin aktivitása és az aktív alegységének, a kalcineurin A-nak a szintje, valamint a kalcineurin in situ aktivitását tükröző MCIP1.4 mRNS (Rothermel et al. 2003) mennyisége is csökkent a denervált regenerálódó izomban az innervált regenerálódó kontrollhoz képest (Fenyvesi et al. 2004).

A lassú izom differenciálódás azonosítójának tartott MyHC1 kifejeződés megszüntethető ciklosporin A-val, amely a kalcineurin gátlója (Chin et al. 1998, Serrano et al. 2001). A kalcineurin gátló peptid, a cain transzfekciója a bupivacain injektálása után regenerálódó izomrostokban megszünteti az MyHC1 kifejeződést és utat ad a gyors tipusú miozin izoformák (MyHC2x, MyHC2a) kifejeződésének (Serrano et al. 2001). Kísérleteink a notexin indukálta regeneráció során is bizonyították az MyHC1 kifejeződés kalcineurin függését, miközben a SERCA2a kifejeződése nem változott a cain transzfektált, lassú miozin negatív izomrostokban.

### dc\_1047<u></u><sup>85</sup>15

Ez egyértelműen bizonyította, hogy a SERCA2a kifejeződése, ellentétben a lassú miozin kifejeződésével, nem függ direkt módon a kalcineurintól (Zádor et al. 2005).

A cain-t kifejező rostok mellett, azok közelében olykor más rostok sem fejezték ki az MyHC1-t. Ez azt feltételezi, hogy a cain a kimutatási szintje alatti, ill. a kimutatást megelőző és utána megszűnő expressziója is képes a lassú miozin kifejeződés gátlására. A másik lehetőség, hogy parakrin faktorok alakíthatják a lassú miozin kifejeződését a cain-t kifejező izomrostok szomszédaiban, ilyen miozint szabályozó mechanizmusra azonban a legjobb tudomásunk szerint nincs direkt bizonyíték a szakirodalomban.

#### V.11. Hogyan szabályozódik a SERCA2a kifejeződés?

A SERCA2a kifejeződés idegi függése és a jelutak által szabályozása nyilvánvalóan eltér a lassú miozinétól. Ez felveti a kérdést, hogy létezik-e olyan hatás v. jelátvitel út a lassú vázizomban, amely ennek az SR Ca2+ ATPáznak a megjelenését elsődlegesen befolyásolja. Kísérleteinkben előfordult, hogy a SERCA2a protein szintje mintegy háromszorosára nőtt a végtag denervált izom regenerációjának 7. napján. Hasonló tendencia mutatkozott a nem regenerálódó denervált izomban is a kezelés 3. napján. Ugyanez viszont nem fordult elő szelektíven denervált soleus regenerációja és a normál solus szelektív denervációja során. Ez arra utal, hogy a végtagi denerváció fehérje szinten stimulálja a SERCA2a kifejeződését, a szelektív denervációnak viszont nincs ilyen hatása. Ez a hatás nem érvényesül az mRNS szintjén, ami ellentétes azzal az általános képpel, hogy a SERCA2a kifejeződés a transzkript szintjén szabályozódik (Misquita et al 2006). Összeegyeztethető viszont azzal, hogy a végtagi denerváció nagymértékű tömegveszteséggel jár, ami apoptózist feltételez. Az apotózisról pedig ismert, hogy növeli a SERCA2a szintjét (Kuo et al. 1998). Az apoptózis azonban nyilvánvalóan eltér azoktól a lassú beidegzés által beindított folyamatoktól, amelyek a regeneráció során fellendítik a SERCA2a kifejeződést. A SERCA2a-ra gyakorolt idegi hatás ugyanis amellett, hogy indirekt, bizonyára sokféle tényező együttes hatásaként érvényesül (Vangheluwe et al. 2005a). Ezt alátámasztják a SERCA2a mRNS és protein ellentétes irányú változásai a denervált izom regenerációja során (az mRNS eleinte változatlan majd emelkedik, protein szintje eleinte emelkedik a normál többszörösére. majd a normál szint alá csökken).

Feltételezhetjük tehát, hogy a lassú SR Ca<sup>2+</sup> pumpa szintjének szabályozása a lassú izom differenciálódásban transzkripciós és poszttranszkripciós szinten is végbemegy, és ezek a szintek különböző mértékben függenek a beidegzéstől. Ezzel ellentétben a lassú miozin kifejeződés szabályozási szintjeinek idegi függése hasonló, vagy legalábbis párhuzamos irányú, melynek

### $dc_{1047}^{89}15$

következtében az mRNS és fehérje is párhuzamosan csökken a denerváció hatására. Fontos megjegyezni azonban, hogy ez a megállapítás nem érvényes minden emlős izomban. Agbulut és munkatársai (2008) kimutatták, hogy a lassú miozin nehéz lánc kifejeződése az egér soleus izmában, amely típusát tekintve gyors és lassú rostokból áll, nem függ a beidegzéstől. Ez összhangban áll azzal a korábbi feltételezéssel, hogy a vázizom típusát kialakító gének kifejeződésének szabályozása rendkívül sok tényezőtől függ és az egyes esetekben igen változatosan alakulhat a különböző izmokban (Zhong et al. 2002).

#### V.12. A ras és a kalcineurin lehetséges kapcsolata

Amint láthattuk a lassú miozin kifejeződés szabályozását és a lassú izom identitását két alapvető jelátviteli út alakítja ki, az egyik a Ras-on, a másik a kalcineurinon keresztül vezet. Enne a két útnak a kapcsolatát vázizomban korábban még nem mutatták ki. A regenerálódó soleus izom transzfekciója során egy érdekes jelenség volt megfigyelhető. A domináns negatív Ras, amellet, hogy megszüntette a lassú miozin kifejeződést a transzfektált rostokban, serkentette az egész izom növekedését is, tehát a transzfektált és nem transzfektált rostokat is megnövelte. A növekedés stimulációja nem járt hipertrófiával, mert a regeneráció lelassult, majd megállt a kontroll regenerált izom méretén. Ez a hatás az autokrin-parakrin rendszer közreműködését feltételezte (Zádor 2008).

Ha a kalcineurin gátló cain-t és a dnRas keverékét transzfektáltuk az izomba és ugyanazok a rostok fejezték ki mind a két plazmidot, már nem volt serkentő hatás megfigyelhető a regenerációban. Ez arra utalt, hogy a kalcineurin aktivitása szükséges a regeneráció stimulációjához a dnRas transzfektált rostokban. A kalcineurin az NFAT transzkripciós faktor defoszforillációjával megváltoztathatja az izomspecifikus gének traszkripcióját (Bassel-Duby and Olson 2006). Az NFAT-ről ismert, hogy a többi transzkripciós faktortól különböző, a membránpotenciál változástól függő Ca<sup>2+</sup> útvonal aktíválja (Valdés et al 2008), tehát szenzorként működhet. A kalcineurin-NFAT-IL-4 útvonal rostnövelő hatását Horsley et al. (2003) írta le, mely szerint az interleukin-4 kiválasztódik a miotubulusokból és kapcsolódik a mioblasztok felszínén található receptorához. Az eredmény a mioblasztok miotubulusokba olvadása és az izomrost növekedése. Ezzel összhangban a dnRas egész izomra gyakorolt rostnövelő hatása gátolható volt IL-4 antitest izomkörnyéki injektálásával, de ez nem csökkentette az izom méretét kontrollénál kisebbre. Mindez azt feltételezi, hogy a dnRas stimulálja az IL-4 termelődését a transzfektált rostokban, s a kiválasztott IL-4 beindítja az egész izom autokrin-parakrin növekedését. Normális esetben a Ras bizonyára gátolja kalcineurin aktivitását a regenerálódó izomban, de a Ras gátlása

### $dc_{1047}^{87}15$

felszabadítja a kalcineurin aktivitását is, s ez a megnövelt aktivitás képes az NFAT-t defoszforillálni olyan mértékben, hogy sor kerül az IL-4 fokozott indukciójára.

A másik lehetőség, hogy a Ras a kalcineurinnal kompeticiót folytat a  $Ca^{2+}$ -ért és a Ras gátlásával több  $Ca^{2+}$  lesz elérhető a kalcineurin számára. Ennek a lehetőségét az veti fel, hogy a Ras és a kalcineurin is  $Ca^{2+}$  függőnek bizonyul az in vitro miotubulusokban (Horsley et al. 2001, Estrada et al. 2003).

A szívizomsejtekben a Ras konstitutíven aktív formája (V12ras) serkentette az NFAT3 sejtmagi transzlokációját és ez a folyamat ciklosporin A-val gátolható volt, tehát a Ras a kalcineurin előtt hatott a folyamatban. Ugyanez a munka kimutatta, hogy a phenilephrin-stimulált kalcineurin aktivitás gátolható dnRas-al, MEK1 inhibítorral, dominás negatív c-raf-al és domináns negatív ERK2-vel. Ez azt mutatja, hogy a Ras a kardiomiocitákban a mitogén-aktívált protein kinázok közvetítésével szabályozza az NFAT3 aktivitását (Ichida and Finkel 2001). Ennek a lehetőségnek a felderítése még nem történt meg a regenerálódó vázizomban.

Érdekes, hogy a Ras és a kalcineurin párhuzamos inaktívációja nem gátolta az izomregenerációt a kontrollhoz képest. Ez azt mutatja, hogy mind a két útvonal lecsendesítése néhány rostban nem gátolja a regenerációt, ellenben a Ras és a kalcineurin együttműködési egyensúlyának felborulása jelentős serkentő hatást okoz. Az IL-4 emelkedése csekély mértékű volt, csak a dnRas transzfektált rostok környékén mutatkozott, ami arra enged következtetni, hogy a citokin inkább iniciálja a regeneráció más növekedési faktorok általi stimulációját, mintsem egyedül vinné azt véghez. Ennek megvan a lehetősége, hiszen a potenciálisan kiválasztásra kerülő fehérjék száma igen nagy a vázizomban (Bortoluzzi et al. 2006).

#### V.13. A SERCA1b fejlődési szerepe a regenerálódó izomban

A SERCA1b shRNS néhány rostban történő gátlása, a Ras gátlásához hasonlóan, az egész regenerálódó izomra kiterjedően serkentette a rostok és az izomtömeg növekedését (Zádor et al. 2011). A neonatalis kalcium pumpa in vivo gátlásának hatása ugyanúgy megszüntethető volt kalcineurin gátló cain kotranszfekciójával és anti-IL4 antitest injektálással, mint a Ras gátlásé. Ez alapján feltételezhető, hogy a SERCA1b szerepet játszik a kalcineurin-NFAT-IL4 jelút szabályozásáben. A transzfekciós hatékonyság vizsgálata a rostok hosszában technikai akadályok miatt nehezen kivitelezhető, s noha létjogosultsága vitathatatlan, mindössze néhány példa akad rá a szakirodalomban (Vitadello et al. 1994, Doh et al. 1997, Utvik et al. 1999). Esetünkben ennek

## dc\_1047\_815

elvégzését megkönnyítette, hogy a modellként alkalmazott 3-4 hónapos soleus izom rostjainak lefutása fuziform jellegű volt. Zöld és vörös fluoreszcens plazmidokkal kimutattuk, hogy a regenerálódó soleus transzfekciója jóval kisebb mértékű volt az egész izomban, mint amekkorára a transzfektálás helyén következtetni lehetett. A rostok részleges transzfekciója úgy is létrejöhetett, hogy a regeneráció negyedik napján, amikor a transzfektálás történt, a transzfektálódott miotubulusok még rövidek voltak és csak néhány sejtmagot tartalmaztak. Ezek a transzfektált sejtmagok a miotubulusok fuzionálásával a nem transzfektált izomsejtmagokkal közös fejlődő rostokba kerültek, s akkor már az összes izomsejtmagnak csak igen kis hányadát adták. Még ez a kevés sejtmag is elegendő shRNS-t fejezett ki, hogy csendesítse a SERCA1b kifejeződést, amely az SR kalcium pumpa funkciója csökkenése miatt emelheti a szarkoplazmás kalcium szintjét, s ezáltal serkentheti a calcineurin-NFAT-IL4 jelutat.

Egy debreceni kutatócsoporttal végzett együttműködésben kimutattuk, hogy a (regenerációban alkalmazott) SERCA1b shRNS szekvenciát permanensen kifejező C2C12 miogenikus sejtek SERCA1b kifejeződése gátolt volt, és ezek a sejtek több defektust is mutattak az in vitro izomdifferenciációban (Tóth and Fodor et al. 2015). Ez az "ab ovo" csendesítés igazolta, hogy a SERCA1b szerepet játszik a kalcium homeosztázisban, az SR-ből történő kalcium felszabadítás mértékében, a felszabadítható kalcium szint fenntartásában, a mioblasztok osztódásában, a miotubulusok érésében és a SOCE (store operated calcium entry) működéséhez fontos két protein (kalszekvesztrin és STIM1) szintjének fenntartásában. A SERCA1b szükségesnek bizonyult a kalcineurin szintjéhez és aktivitásához is. A SOCE alapvető jelentőségét igazolták a korai izomdifferenciációban (Stiber et al. 2008), viszont nem vagy kevésbé szükséges a kifejlett izom működéséhez (Cully et al. 2013). A SOCE elmélete szerint, mely a fejlődő vázizomban is elfogadott (Stiber et al. 2012) az ER/SR membránban elhelyezkedő STIM1 intralumináris részével érzékeli a [Ca<sup>2+</sup>] csökkenését, dimereket alkot, melyek citoplazmás doménje kölcsönhatásba lép a plazmamembrán Orai csatornájával, megnyitja azt, s lehetővé tészi az extracelluláris Ca<sup>2+</sup> beáramlását a szarkoplazmába. A Ca<sup>2+</sup> a SERCA által továbbítódik az SR lumenébe. A SERCA1b a legnagyobb kapacitású és legintenzívebben expresszálódó kalcium pumpa a regenerálódó soleus izomban, mivel a felnőtt SERCA1a és SERCA2a izoformák még nem vagy alig fejeződnek ki (áttekintés: Zádor and Kósa 2015). A SERCA1b azon felül, hogy az ER/SR-be pumpálja a SOCE által felvett kalciumot, kötődhet a STIM1-hez, s ezzel szabályozhatja azt (Lee et al. 2014). Ezzel összhagban a SERCA és gátlója a szarkolipin ellentétes ellentétes szerepet játszik a SOCE-ban (Seth et al. 2012). A SERCA1b fejlődési szerepét az (44. ábra) ábra foglalja össze.



**44. Ábra:** A SERCA1b lehetséges szerepe a miotubulusokban és fejlődő izomrostokban. A sejttípus valószínűleg legnagyobb mértékben kifejeződő SR  $Ca^{2+}$  pumpájaként meghatározó lehet az elernyedésben. Ezen kívül közreműködhet a SOCE-ban a szarkoplazmába beáramló  $Ca^{2+}$  SR-ba történő továbbításával. A jelölések a rövidítés jegyzékben (Zádor and Kósa 2015).

A szakirodalomban számos közlemény jelent meg arról, hogy a miotubulusokban és a primitív (fejletlen) izomrostokban SERCA1a fejeződik ki és olyan interpretációk terjedtek el, hogy a SERCA1a a fő izoforma. Mind ennek bizonyítására immundetektálást alkalmaztak. Az antitestek specifitását azonban nem bizonyították, sőt a legtöbb esetben már ismert volt, hogy azok SERCA1 felismerő tulajdonsággal rendelkeznek, azaz a SERCA1a és SERCA1b izoformákhoz egyaránt hibridizálnak. Tekintettel arra, hogy a SERCA1a csak egyetlen C-terminális glicinjével tér el a SERCA1b-ben található aminosav szekvenciától, nehéz elképzelni a SERCA1a specifikus antitestet, hiszen más fehérjék is rendelkezhetnek C-terminális glicinnel. Ezzel szemben a SERCA1b-ben nyolc aminosav alkotta peptid található a SERCA1a C-terminális glicinje helyett, ami ellen már készíthető antitest (s mi készíttettünk is ilyet) (Zádor et al. 2007). A módszertani részben a 4. ábra az egyik pan SERCA1 antitest specifitását mutatja differenciál immunoblotton, melynek az elismert SERCA kutató csoportok közül többen is tévesen SERCA1a specifitást tulajdonítottak (pl. Fajardo et al. 2013). A SERCA1a kimutathatóságával kapcsolatban terjedő tévhiteket Lee et al. (2014) Pflügers Archive–ban

### dc\_1047<u>9</u>15

megjelent cikkének hatására először egy "letter to the editor" formájában akartam cáfolni, de szerkesztői kérésre egy "invited review"-t írtunk belőle. Ebben az izoforma azonosítás és kifejeződés problémakörén túl a SERCA1b szerepére is részletesen kitértünk (Zádor és Kósa 2015).

Ezzel párhuzamosan közöltük, hogy a humán SERCA1b, az egér és a patkány SERCA1b-től eltérően, nem vagy alig fejeződik a neonatalis izomban. Azaz, a humán izmokban a SERCA1a hamarabb átveszi a dominanciát, mint ahogy az említett rágcsálók tanulmányozott izmaiban ismeretes (Kósa et al. 2015). Az egészséges felnőtt humán izmok szintén SERCA1a-t fejeznek ki elsősorban, de egy bizonyos patológiás állapotban a II-es típusú disztrófia miotónikában (DM2) a SERCA1b átveheti a dominanciát a SERCA1a fölött. További kérdés, hogy milyen mértékű regenerációval jár ez együtt a felnőtt izomban és mennyire tér el a humán izom SERCA1b fehérjéjének kifejeződése a rágcsáló modellekétől (Kósa et al. 2015).

#### V.14. Az izomnövekedés szöveti szabályozása - egy új génterápiás lehetőség?

A dnRas és a SERCA1b shRNS transzfekció autokrin-parakrin növekedés serkentő hatása a regenerálódó soleusban felhívta a figyelmet egy, a legjobb tudomásom szerint eddíg felderítetlen összefüggésre az izomrostméret szöveti szintű szabályozását illetően. Eszerint a fejlődésben levő rost belső folyamatai állandó kapcsolatot tartanak fenn a környező rostokkal/sejtekkel. Ez a kapcsolat olyan szoros és sokrétű lehet, hogy ennek következtében a rost némely alapvető belső folyamatának manipulációja nem elsősorban a rost saját növekedését serkenti, hanem kiegyenlítetten a többi rost és az egész regenerálódó izom méretét. Ennek a soleus izomregeneráción túli általános fejlődési vonatkozása is lehet, ha más izomban is igazolódik, és kiegészítheti a szöveti fejlődéséről kialakult általános képet. Az eddigi szemlélet eddig kevésbé számolt a sejtek/rostok közötti egyenlőtlenséggel, mint a fejlődés potenciális befolyásolójával. A jelenséget a terápiás alkalmazás szemszögéből sem érdektelen, hiszen a módszer egyben a vázizom génterápia új lehetőségét is felveti.

Amíg korábban elsősorban a sejtszintű problémákat (pl. disztrofin hiány) igyekeztek az izomtranszfekcióval kiküszöbölni, addíg újabban kísérletek történtek a kiválasztható növekedési faktorok (IGF-I, IL-4) mesterséges kifejeztetésére az izom néhány rostjában (Schertzer et al. 2006). A dnRas és a SERCA1b shRNS hatása ennél is szövetbarátabbnak tűnik, mert nem kívülről bevitt, hanem az endogén növekedési faktorok és azok természetes felszabadulásához hasonlóbb módon serkenti a regenerációt. Ehhez mindössze néhány rost transzfekciójára van szükséges, ami a regenerálódó izomban, még az alacsony transzfekciós hatékonyság mellet is könnyen kivitelezhető. Annak a kérdésnek, hogy ez a módszer alkalmazható-e más izmokban, mint a

## dc\_1047<u>9</u>15

soleus, a megválaszolása alighanem nehéz lesz, mert a szakirodalmat áttekintve a legtöbb izom a soleusnál kevésbé tűnik alkalmasnak teljes és szinkronban végbemenő regeneráció kiváltására. Ismert azonban, hogy a kalcineurin-NFAT út általában megtalálható a fejlődő izomrostokban (Horsley et al. 2003), hatása és szintje (Fenyvesi et al. 2004, Launay et al. 2006) függ a lassú beidegzéstől és változik a különböző fenotipusú izmokban (Mitchell et al. 2002, Talmadge et al. 2004). Nemrég közölték, hogy kalcineurin aktív alegységének egyik izoformája, a kalcineurin-Aa kifejeztetése serkentette a túlnyomórészt gyors tipusú izom (tibialis anterior) regenerációját (Stupka et al. 2007). Ez azt mutatja, hogy a kalcineurin különböző fenotipusú izmok regenerációjában is lényeges lehet, tehát elképzelhető, hogy a növekedés autokrin-parakrin szabályozásában játszott szerepe is általános. Az, hogy mennyire függ a regeneráció jellegétől a dnRas és a SERCA1b shRNS serkentő hatása, egy részleges és kevésbé szinkronizált regenerációs folyamatban nem lesz olyan pontosan mérhető (a megmaradó kifejlett rostok zavaró hatása miatt), mint a soleus regenerációban. Mindenesetre, ha megvalósul a rostnövekedés serkentése, a heterogénebb regenerálódó izom számára is feltehetően nagyobb teherbírást jelent a külső igénybevétellel szemben. Kétségtelen azonban, hogy a regenerált izom a kiindulási normál izom méretének elérése után sem közelíti meg a normál összehúzódási paramétereket. А növekedésében lelasult és fenotipusa alapján már regenerálódott soleus izom összehúzódási amplitúdója még mindíg hasonló neonatalis izoméhoz, azaz a külső kalcium koncentrációtól függ, ellentétben a kifejlett izommal (Louboutin et al. 1995). Mindez azt jelzi, hogy a helyreállítódási folyamatok még nem zajlottak le teljesen, annak ellenére, hogy a regenerálódó izom elérte a kontroll izoméhoz közeli méretet. Mivel a dnRas és SERCA1b shRNS transzfektált soleus a regeneráció 28. napján nem mutat méretbeli különbséget a kontroll regenerált izomhoz képest, ezért nem várható, hogy felülmúlja annak kontrakciós tulajdonságait. A dnRas és a SERCA1b shRNS transzfekciójának hatása tehát valószínűleg inkább az izom összehúzódási képességének regenerálódás alatti javulásában mutatkozhat meg, mivel lerövidíti azt a kritikus periódust, amelynek során a regenerálódó izom kevésbé teherbíró és érzékenyebb, mint a regeneráció végén.

#### VI. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- A notexin kiváltotta teljes nekrózist követő izom regeneráció laboratóriumi patkányokban alkalmas *in vivo* modell kialakítására, amely megismételve a neonatalis izomdifferenciálódás állomásait, 28 nap alatt teljes egészében újra alakul. Ez a regeneráció szinkronitása miatt alkalmas az izomspecifikus génkifejeződés változásának tanulmányozására. A modellt gyors (extensor digitorum longus EDL) és lassú (soleus) izomban is kipróbáltuk, ami lehetővé teszi a kétféle izomregeneráció összehasonlítását.
- 2. Megállapítottuk, hogy a differenciálódási jellemzők (az alfa-aktin mRNS szintje, a miotubulusok és a beidegzés) időbeli megjelenése alapján a notexin-nekrózis utáni lassú és a gyors izomregeneráció eltérnek egymástól; a lassú izom két-három nappal korábban mutatja a regeneráció jellemző állapotait. A differenciálódási események nagyobb szinkronitása miatt a lassú izom regeneráció megfelelőbbnek látszik a modellként történő alkalmazásra és a kísérletes manipulációra (antiszenz gátlás, transzfekció) mint a gyors izom regenerációja.
- 3. A miogenikus reguláló faktorok (MRF: myoD, myf-5, myogenin, MRF4) mRNS szintjeiben a regenerálódó gyors és a lassú izomban jelentős változás történik. A változás folyamata különböző az egyes MRF-k esetében, de hasonló a kétféle regeneráció során. Következtetésként levonhatjuk, hogy a kétféle nekrózis-regeneráció eltérése ellenére is kiszámítható a miogenikus faktorok mRNS szintjének változása, mivel növekedésük a mioblaszt aktívációval, csökkenésük a reinnervációval esik egybe.
- 4. A myoD protein maximális szintje egybe esik a sejtosztódás első maximumával az izomregenerációban. A myoD szerepe igen fontos, mert a myoD antiszenz oligonukleotid viszonylag gyors, már egy óra alatt kimutatható, de négy óránál rövidebb ideig tartó gátló hatása a myoD kifejeződésre napokkal késleltette a dezmin expressziót, a miotubulusok kialakulását és az innervációt, tehát a regeneráció menetét.
- 5. A miogenikus faktor mRNS-ek és a myoD protein szintje egyenletes eloszlású és egyenletesen növekszik passzív nyújtás hatására a soleus izom-ín határok közötti hosszában. A SERCA1a és SERCA1b transzkriptek inkább az ínhatárok közelében találhatók. A SERCA1a mRNS eloszlása passzív nyújtásra nem változik, de a neonatalis SERCA1b mRNS-ből még több lesz az ínhatárok közelében, de ez nem jár együtt a SERCA1b protein szint emelkedésével.
- 6. A myostatin, mint az izom növekedésgátló faktora, kismenyiségben található meg a normál izomban, de az izomnekrózis alatt a szintje rendkívül megnő, majd később, az izomregeneráció tényleges szakaszában lecsökken. Ebben a tekintetben a lassú és gyors

### $dc_{1047}^{93}15$

izom nem mutat más különbséget azon kívül, mint ami a kétféle regeneráció szinkronitása és időbeli lefolyása alapján várható. A myostatin mRNS szint azonban mind a kétféle regenerációban lényegében a protein szintjével ellentétesen változik, azaz nekrózisban alacsony és a regenerációban megnő. Mindez a myostatin kifejeződés protein szintű szabályozására utal a regenerálódó vázizomban.

- 7. A TNF-α mRNS és fehérje szintje hasonló módon változik izom regenerációban: a nekrózis ideje alatt rendkívül megnő és a miotubulusok megjelenése után pedig a normálhoz közeli értékre csökken. Hasonlóan változik a TNF receptorok mRNS szintje is. Ezek a változások kevésbé szinkronizáltak a gyors EDL izom regenerációja során, mint a lassú soleus izoméban. A TNF-α mRNS nem mutatható ki a differenciálódó mioblaszt kultúrában. A regenerálódó izomban a dezminre pozitív sejtek és miotubulusok sem fejezik ki a citokint és annak szintje a makrofág/limfocita specifikus MAC-387 antigénnel korrelál. Ezért valószínű, hogy a regenerálódó izomban is a makrofágok fejezik ki TNF-α-t.
- 8. A szarkoplazmás/endoplazmás retikulum Ca<sup>2+</sup> -adenozin trifoszfatázok (SERCA) izoformáinak változása az izom regenerálódás során megismétli a neonatális fejlődés állomásait. Az SERCA formák fehérje szintje követi a transzkript szint változásait az izomregenerációban. A SERCA-k megjelenési sorrendje a gyors és lassú izom regenerációban is neonatális izoformával kezdődik, majd az izom jellegével ellentétes izoformával folytatódik, végül az izomra jellemző izotípus dominál. A SERCA-k általában koordináltan fejeződnek ki a miozin nehézlánc izoformákkal a lassú típusú izom regenerációja során és a regenerálódott izomrostokban, de a lassú típusú SERCA2a kifejeződése az innerváció alatt kevésbé növekszik, mint a lassú mioziné. A lassú miozin és a lassú SERCA kifejeződése gyakran tér el egymástól a részlegesen tenotomizált notexin-nekrózis után regenerálódó soleus izom rostjaiban is.
- 9. A SERCA2a kifejeződése a lassú miozinéval ellentétben nem függ direkt módon a beidegzéstől az izomregeneráció során. Hasonlót tapasztaltunk a nem regenerálódó (normál) denervált soleus izomban is, ahol a SERCA2a kifejeződés növekszik, míg a lassú mioziné drámaian csökken.
- 10. Az innervált regenerálódó soleus izom domináns negatív Ras-t kifejező plazmiddal történt transzfekciója nem befolyásolta SERCA2a kifejeződést, ellentétben a lassú miozin kifejeződésével, amelyet meggátolt. A denervált regenerálódó soleusban a MAPK útvonalat serkentő Ras indukálja a lassú miozin kifejeződését, de a SERCA2a kifejeződése ettől nem változik. Tehát a SERCA2a kifejeződése a regenerálódó lassú izomban nem függ közvetlenül a Ras-tól, ellentétben a lassú miozinnal, amely Ras függő.

### dc\_1047<u>94</u>15

- 11. A regenerálódó soleus izom kalcineurin gátló cain peptidet kifejező plazmiddal történt transzfekciója során a lassú miozin kifejeződés gátolt, de a SERCA2a kifejeződés nem változik. Tehát a SERCA2a kifejeződése nem függ közvetlenül a kalcineurintól a regenerálódó soleus izom rostjaiban.
- 12. A lassú izom differenciálódás két kulcsfontossággú jelátviteli útjának szereplője, a Ras és a kalcineurin között lehetséges a kapcsolat. A regenerálódó soleus izom mindössze 10-30 izomrostjának transzfekciója domináns negatív Ras-sal stimulálja a növekedést az egész (mintegy 2500 rostot tartalmazó) izomban. A dnRas transzfektálása nem eredményez méretnövekedést (hipertrófiát) a regenerálódás végén, csak gyorsítja a kifejlett méret elérését. A dnRas stimuláló hatása elmarad a kalcineurin gátló cain-nal történt együttes transzfektálás vagy interleukin-4 antitest izom környéki injektálása esetén. Mindez összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy a Ras gátlása stimulálja a kalcineurin aktivitását, mely az NFAT sejtmagba juttatásával indukálja az IL-4 termelődését, s ezzel autokrin-parakrin módon elindítja a rostok növekedésének serkentését.
- 13. A SERCA1b kifejeződés csendesítése mindössze néhány izomrostban, a Ras gátláshoz hasonlóan, az egész regenerálódó izomra kiterjedő növekedésserkentő hatást eredményezett. Ennek a (nyilvánvalóan autokrin-parakrin módon megvalósuló) növekedésserkentésnek is előfeltétele, hogy aktív legyen a calcineurin-NFAT-IL4 jelút a SERCA1b csendesített izomrostokban.
- 14. A transzfekció hatásfokának vizsgálata a regenerálódó izomban kimutatta, hogy a pozitív rostokban kevesebb izomsejtmag fejezte ki a transzgént, mint az az injektálás helyén becsülni lehetett. Ez méginkább hangsúlyozta a regenerációban kiváltott növekedés serkentő hatás autokrin-parakrin jellegét.

#### VII. SZAKIRODALOMJEGYZÉK

- Abu Hatoum O, Gross-Mesilaty S, Breitschop K, Hoffman A, Gonen H, Ciechanover A and Bengal E (1998) Degradation of myogenic transcription factor myoD by the ubiquitin pathway in vivo and in vitro: regulation by specific DNA binding. Mol Cell Biol 18: 5670– 5677
- Adams L, Carlson BM, Henderson L and Goldman D (1995) Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. J Cell Biol 131: 1341-49
- Agbulut O, Vignaud A, Hourde C, Mouisel E, Fougerousse F, Butler-Browne GS and Ferry A (2009) Slow myosin heavy chain expression in the absence of muscle activity. Am J Physiol-Cell Physiol 296: C205-514
- Al-Khalili L, Chibalin AV, Yu M, Sjödin B, Nylén C, Zierath JR, Krook A (2004) MEF2 activation in differentiated primary human skeletal muscle cultures requires coordinated involvement of parallel pathways. Am J Physiol-Cell Physiol 286: C1410-16
- Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, Voit T, Muntoni F, Vrbóva G, Partridge T, Zammit P, Bunger L, Patel K. (2007) Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. Proc Natl Acad Sci USA 104: 1835-40
- Arai M, Otsu K, McLennan DH and Periasamy M (1992) Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. Am J Physiol-Cell Physiol 262: C614-620
- Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K and Lomo T (1990) Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. J Neurosci 10: 153–160
- Awede B, Berquin A, Wuytack F, Lebacq J (1999) Adaptation of mouse skeletal muscle to a novel functional overload test: changes in myosin heavy chains and SERCA and physiological consequences. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 80: 519–526
- Bader T and Nettesheim P (1996)Tumor necrosis factor-alpha modulates the expression of its p60 receptor and several cytokines in rat tracheal epithelial cells. J Immunol 157: 3089–96
- Baldwin KM and Haddad F (2001) Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. J Appl Physiol 90: 345–357
- Bassel-Duby R, Olson EN (2003) Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. Biochem Biophys Res Commun 311: 1133–41
- Bassel-Duby R and Olson EN (2006) Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. Annu Rev Biochem 75: 19-37

- Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki Á and Zádor E (2008) Phytoecdysteroids and Anabolic-Androgenic Steroids Structure and Effects on Humans. Curr Med Chem 15: 75-91
- Benoit PW and Belt WD (1970) Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). J Anat 107:547-56
- Berchtold MW, Brinkmeier H and Müntener M (2000) Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. Physiol Rev 80: 1215–65
- Bisbal C, Silhol M, Laubenthal H, Kaluza T, Carnac G, Milligan L, Le Roy F and Salehzada T (2000) The 2V–5Voligoadenylate/RNase L/RNase L inhibitor pathway regulates both myoD mRNA stability and muscle cell differentiation. Mol Cell Biol 20: 4959– 69
- Bischoff R (1993) The satellite cell and muscle regeneration. in: Myology. Basic and Clinical. vol.1: pp97-118 (Engel AG and Franzini-Armstrong C, eds) 2nd ed. McGraw-Hill, Inc.
- Bischoff R (1997) Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. Dev Dyn 208: 505–515
- Black BL and Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 167-96
- Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S and Reggiani C (1994) Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil 15: 413-419
- Bortoluzzi S, Scannapieco P, Cestaro A, Danieli GA and Schiaffino S (2006) Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome, Proteins 62: 776–792
- Braissant O and Wahli R (1998) A simplified in situ hybridization protocol using nonradiactively labelled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. Biochemica 1: 10-16
- Brandl CJ, Green NM, Korczak B and MacLennan DH (1986) Two Ca2+ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. Cell 44: 597–607.
- Brandl CJ, DeLeon S, Martin DR and MacLennan DH (1987) Adult forms of the Ca2+ ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. J Biol Chem 262: 3768–74
- Briggs FN, Lee KF, Fehér JJ, Wechsler AS, Ohlendick K and Campbell K (1990) Ca-ATPase isozyme expression in sarcoplasmic reticulum is altered by chronic stimulation of skeletal muscle. FEBS Lett 259: 269-272
- Buck M and Chojkier M (1996) Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. EMBO J 15: 1753–65

### dc\_1047<u>9</u>15

- Calvo S, Venepally P, Cheng J and Buonanno A (1999) Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements. Mol Cell Biol 19: 515-25
- Calvo S, Vullhorst D, Venepally P, Cheng J, Karavanova I and Buonanno A (2001) Molecular dissection of DNA sequences and factors involved in slow muscle-specific transcription. Mol Cell Biol 21: 8490-503
- Carlson BM (2008) Muscle regeneration in animal models. in: Skeletal Muscle Repair and Regeneration (Springer; eds. Schiaffino S. and Partridge T.) pp. 163-180
- Chambers RL and McDermott JC (1996): Molecular basis of skeletal muscle regeneration. Can J Appl Physiol 21: 155-84
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R and Williams RS. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. Genes Dev 12: 2499-509
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159
- Ciechanover A, Breitschopf K, Hatoum OA and Bengal E (1999) Degradation of myoD by the ubiquitin pathway: regulation by specific DNA-binding and identification of a novel site for ubiquitination. Mol Biol Rep 1: 59–64
- Cintra-Francischinelli M, Pizzo P, Rodrigues-Simioni L, Ponce-Soto LA, Rossetto O, Lomonte B, Gutiérrez JM, Pozzan T and Montecucco C (2009) Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. Cell Mol Life Sci 66:1718-28
- Coletti D, Yang E, Marazzi G and Sassoon D (2002): TNF-α inhibits skeletal myogenesis through a PW1-dependent pathway by recruitment of caspase pathways; EMBO J 21: 631-42
- Cornelison DDW and Wold BJ (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle cells, Dev. Biol. 191: 270–283
- Creange A, Barlovatz-Meimon G and Gherardi RK (1997) Cytokines and peripheral nerve disorders. Eur Cytokine Networks 8: 145–151
- Cully TR and Launikonis BS (2013) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is not required for store refilling in skeletal muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol. 40(5):338-44
- De Bleecker JL, Meire VI, Declerq W and Van Aken EH (1999) Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies. Neuromusc Disord 9: 239–246
- De Kossodo S, Grau GE, Daneva T, Pointaire P, Fossati L, Ody C, Zapf J, Piguet PF, Gaillard RC and Vassalli P (1992): TNF-α is involved in mouse growth and lymphoid tissue development; J Exp Med 176: 1259-64

- De Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Bootman MD, Mertens L, Van Den Bosch L and Casteels R (1994) J. Biol. Chem. 269: 21691-98
- Delling U, Tureckova J, Lim HW, De Windt LJ, Rotwein P and Molkentin JD. (2000) A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. Mol Cell Biol 20: 6600-11
- Dix DJ and Eisenberg BR. (1990) Myosin mRNA accumulation and myofibrillogenesis at the myotendinous junction of stretched muscle fibers. J Cell Biol 111: 1885-94
- Dix DJ and Eisenberg BR (1991a) Redistribution of myosin heavy chain mRNA in the midregion of stretched muscle fibers. Cell Tissue Res 263: 61-69
- Dix DJ and Eisenberg BR. (1991b) Distribution of myosin mRNA during development and regeneration of skeletal muscle fibers. Dev Biol 143: 422-6
- Dixon RW and Harris JB. (1996) Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. J Neuropathol Exp Neurol 55: 1230-7
- Doh SG, Vahlsing HL, Hartikka J, Liang X and Manthorpe M. (1997). Spatial-temporal patterns of gene expression in mouse skeletal muscle after injection of lacZ plasmid DNA. Gene Ther 4: 648-663.
- Dode L (1998) Identification and characterization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 (SERCA3) gene. Ph.D. thesis. Acta Biomedica Lovaniensia 178, Leuven University Press.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC and Healy JI. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca2+ response amplitude and duration. Nature 386: 855-8
- Düsterhöft S and Pette D (1993) Satellite cells from slow rat muscle express slow myosin under appropriate culture conditions. Differentiation 53: 25-33
- Düsterhöft S, Yablonka-Reuveni Z and Pette D (1990) Characterization of myosin isoforms in satellite cell cultures from adult rat diaphragm, soleus and tibialis anterior muscles. Differentiation 45: 185-191
- Eftimie R, Brenner HR and Buonanno A (1991) Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. Proc Natl Acad Sci USA 88: 1349-53
- Eggermont JA, Wuytack F, Verbist J and Casteels R. (1990) Expression of endoplasmicreticulum Ca2(+)-pump isoforms and of phospholamban in pig smooth-muscle tissues Biochem J 271: 649-53
- Estrada M, Espinosa A, Müller M and Jaimovich E. (2003) Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. Endocrinology 144: 3586-97

- Fajardo VA, Bombardier E, Vigna C, Devji T, Bloemberg D, Gamu D, Gramolini AO, Quadrilatero J, and Tupling AR (2013) Co-expression of SERCA isoforms, phospholamban and sarcolipin in human muscles. Plos One 8:e84304.
- Feldman JL and Stockdale FE (1991) Skeletal muscle satellite cell diversity: satellite cells from fibers of different type in cell culture. Dev Biol 143: 320-334
- Fenyvesi R, Rácz G, F. Wuytack and E. Zádor (2004) The calcineurin activity and MCIP1.4 mRNA levels are increased by innervation in regenerating soleus muscle. Biochem Biophys Res Com 320: 599-605
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G and Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279: 1528-30
- Fontaine B and Changeux J-P (1989) Localization of nicotinic acetylcholine receptor asubunit transcripts during myogenesis and motor endplate development in the chick. J Cell Biol 108: 1025-37
- Füchtbauer E-M and Westphal H. (1992) MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. Dev Dynamics 193: 34–39
- Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ and Argiles JM. (1993) Acute treatment with tumor necrosis factor-a induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle. Mol Cell Biochem 125: 11–18
- Gauthier ER, Madison SD and Michel RN (1997) Rapid RNA isolation without the use of commercial kits: application to small tissue samples. Pflugers Arch 433: 664-8
- Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Maes K, Racz GZ, Cadot P, Zador E, Wuytack F and Decramer M. (2005) Intermittent spontaneous breathing protects the rat diaphragm from mechanical ventilation effects. Crit Care Med 33: 2804-09
- Gerber AN, Klesert TR, Bergstrom DA and Tapscott SJ (1997) Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. Genes Dev 11: 436-450
- Gibson AJ, Karasinski J, Relvas J, Moss J, Sherratt TG, Strong PN and Watt DJ (1995) Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. J Cell Sci 108: 207-214
- Gibson MC and Schultz E (1982) The distribution of satellite cells and their relationship to specific fibre types in the soleus and extensor digitorum longus muscles. Anat Rec 202: 329-337
- Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves LA, Osbaldeston NJ, Lee DM and Mantle D (1995) Muscle growth in response to mechanical stimuli. Am J Physiol 268: E288-97
- Goldspink G (2003) Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 17: 211-22

- Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S and Bhasin S (1998) Organisation of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. Proc Natl Acad Sci USA 95: 14938-43
- Griffin GE, Williams PE and Goldspink G (1971) Region of longitudinal growth in striated muscle fibres. Nat New Biol 232: 28-9
- Grobet L, Royo Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R and Georges M (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. Nat Genet 17: 71-74
- Grounds MD (1987) Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by the strain, age, and sex of host mice. J Pathol 153: 71-82
- Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE and Beilharz MW (1992) Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. Cell Tissue Res 267: 99–104
- Grubb B, Harris J and Schofield I (1991) Neuromuscular transmission of newly formed neuromuscular junctions in the regenerating soleus muscle. J Physiol 441: 405–421
- Gutiérrez JM and Lomonte B (2013) Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. Toxicon. 62: 27-39
- Hämäläinen N and Pette D (1997) Coordinated fast-to-slow transitions of myosin and SERCA isoforms in chronically stimulated muscles of euthyroid and hyperthyroid rabbits. J Muscle Res Cell Motil 18: 545–554
- Hämäläinen N and Pette D (2001) Myosin and SERCA isoform expression in denervated slow-twitch muscle of euthyroid and hyperthyroid rabbits. J Muscle Res Cell Motil 22: 453–457
- Harris JB (2003) Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. Toxicon 42: 933-45
- Harris JB, Grubb BD, Maltin CA and Dixon R (2000) The neurotoxicity of the venom phospholipases A(2), notexin and taipoxin. Exp Neurol 161: 517-26
- Harris JB, Johnson MA and Karlsson E (1975) Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2: 383–404
- Harris JB and Johnson MA (1978) Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. Clin Exp Pharmacol Physiol 5: 587–600
- Hino S, Kondo S, Sekiya H, Saito A, Kanemoto S, Murakami T, Chihara K, Aoki Y, Nakamori M, Takahashi MP and Imaizumi K (2007) Molecular mechanisms responsible

### $dc_{1047}^{1015}$

for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. Hum Mol Genet 16: 2834-43

- Ho TH, Charlet-B N, Poulos MG, Singh G, Swanson MS and Cooper TA (2004) Muscleblind proteins regulate alternative splicing. EMBO J 23: 3103-12
- Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, Strieter RM, Noble PW, Hunter CA and Pure E (1998): Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potencial mechanism for the anti-inflammatory activities of TNF-α. Proc Natl Acad Sci USA 95: 13806-11
- Horsley V, Friday BB, Matteson S, Kegley KM, Gephart J and Pavlath GK (2001) Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. J Cell Biol 153: 329-38
- Horsley V, Jansen KM, Mills ST and Pavlath GK (2003) IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. Cell 113: 483-94
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ and Peterson CA (1993) Selective accumulation of myoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. Development 118: 1137-47
- Huey KA, Haddad F, Qin AX and Baldwin KM (2003) Transcriptional regulation of the type I myosin heavy chain gene in denervated rat soleus. Am J Physiol-Cell Physiol 284: C738-48
- Huey KA, Roy RR, Haddad F, Edgerton VR and Baldwin KM (2002) Transcriptional regulation of the type I myosin heavy chain promoter in inactive rat soleus. Am J Physiol-Cell Physiol 282: C528-37
- Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM and Edgerton VR (2003) Nerve activityindependent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. Am J Physiol-Cell Physiol 285: C1161–73
- Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Wernig A and Edgerton VR (2006) Activity-unrelated neural control of myogenic factors in a slow muscle. Muscle Nerve 33: 49–60
- Jaschinski F, Schuler M, Peuker H and Pette D (1998) Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. Am J Physiol-Cell Physiol 274: C365–C370
- Ichida M and Finkel T (2001) Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. J Biol Chem 276: 3524-3530
- Jakubiec-Puka A and Szczepanowska J (1994) Comparison of myosin in denervated and immobilized muscles. Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl. S105–S106
- Järvinen TAH, Kääriäinen M, Äärimaa V and Järvinen M (2008) Skeletal muscle repair after exercise-induced injury. in: Skeletal Muscle Repair and Regeneration (Springer; eds. Schiaffino S. and Partridge T.) pp. 217-242
- Joulia-Ekaza D and Cabello G. (2007) The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. Curr Opin Pharmacol 7: 310-315
- Kalhovde JM, Jerkovic R, Sefland I, Cordonnier C, Calabria E, Schiaffino S and Lomo T (2005) "Fast" and "slow" muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. J Physiol 562: 847–857
- Kambadur R, Sharma M, Smith TPL and Bass JJ (1997) Mutations in *myostatin* (*GDF-8*) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. Genome Res 7: 910-916
- Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin P, Aoike F, Fujimura H, Dirksen RT, Takahashi MP, Dulhunty AF and Sakoda S (2005) Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase in myotonic dystrophy type 1. Hum Mol Genet 14: 2189-200
- Kiss G, Zádor E, Szalay J, Somogyi F and Vér A (2004) Molecular forms of acetylcholinesterase in rat extensor digitorum longus and soleus muscles regenerating from notexin induced necrosis. J Muscle Res Cell Motil 25: 509-514
- Korczak B, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Ingles CJ, Green MN and MacLennan DH (1988) Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca2+ ATPase gene. J Biol Chem 263: 4813–19
- Kósa M and Zádor E (2013) Transfection efficiency along the regenerating soleus muscle of the rat. Mol Biotechnol 54:220-7
- Kósa M, Brinyiczki K, van Damme P, Goemans N, Hancsák K, Mendler L, Zádor E.(2015) The neonatal sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gives a clue to development and pathology in human muscles. J Muscle Res Cell Motil 36:195-203
- Kovács E and Zádor E (2005) The effect of a TNF-α inhibiting drug on skeletal muscle regeneration. (XXXIV. European Muscle Conference, Hungary, Hortobágy) J Muscle Res Cell Motil 26:p89 (Abstract)
- Kujawa M, Baran W and Jankowska-Steifer E (2004) Morphometric ultrastructural analysis of satellite cells in denervated rat soleus muscle. Exp Mol Pathol 76: 166-72
- Kuo TH, Kim HR, Zhu L, Yu Y, Lin HM and Tsang W (1998) Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl2. Oncogene 17: 1903–10
- Lagord C, Soulet L, Bonavoud S, Bassaglia Y, Rey C, Barlovatz-Meimon G, Gautron J and Martelly I (1998) Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed *in vitro*. Cell Tissue Res 291: 455-468
- Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw H and Snyder SH (1998) Cain, a novel phsysiologic inhibitor of calcineurin. J Biol Chem 273: 18325–31
- Langen RC, Van der Velden JL, Schols AM, Kelder MC, Wouters EF and Janssen-Heininger YM (2004): Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD

## $dc_{1047}^{1015}$

protein destabilization. FASEB J 18: 227-37

- Launay T, Noirez P, Butler-Browne G and Agbulut O (2006) Expression of slow myosin heavy chain during muscle regeneration is not always dependent on muscle innervation and calcineurin phosphatase activity. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol. 290: R1508-14
- Layne MD and Farmer SR (1999)Tumor necrosis factor-a and basic fibroblast growth factor differentially inhibit the insulin-like growth factor-I induced expression of myogenin in C2C12 myoblasts. Exp Cell Res 249: 177–187
- Leberer E, Seedorf U and Pette D (1986) Neural control of gene expression in skeletal muscle. Biochem J 239: 295–300
- Leberer E, Hartner K-T, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH and Pette D (1989) Slow/cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase and phospholamban mRNAs are expressed in chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. Eur J Biochem 185: 51–54
- Lee KJ, Hyun C, Woo JS, Park CS, Kim do H and Lee EH. (2014) Stromal interaction molecule (STIM1) regulates sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 1a (SERCA1a) in skeletal muscle. Pflügers Arch 466: 987-1001
- Lee SJ and McPherron AC (1999) Myostatin and the control of skeletal muscle mass. Curr Opin Genet Dev 9: 604-607
- Lee SJ and McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc Natl Acad Sci USA 98: 9306-11.
- Li Y-P (2003): TNF-α is mitogen in skeletal muscle. Am J Physiol-Cell Physiol 285: C370-376
- Li Y, Schwartz RJ, Wassell ID, Holloway BR and Reid MR (1998) Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygenmediated NF-kB activation in response to tumor necrosis factor alpha. FASEB J 12: 871–80
- Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell L-E, Babinet C and Paulin D (1997) Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, di€erentiation and fusion of skeletal muscle. J Cell Biol 139: 129-44
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano F and Argiles JM (1997) TNF can directly induce the expression of ubiquitindependent proteolytic system in rat soleus muscles. Biochim Biophys Res Commun 230: 238–241
- Louboutin J-P, Fichter-Gagnepain V and Noireaud J (1995) Comparison of contractile properties between developing and regenerating soleus muscle: influence of external calcium concentration upon contractility. Muscle Nerve 18: 1292-1299
- Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, Daniele JJ, Geoghegan P and Gutiérrez JM. (1999) Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic

# $dc_{1047}^{1015}$

phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. Toxicon 37: 145-58

- Loughna PT and Brownson C (1996) Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle specific response to disuse and passive stretch in adult rats. FEBS Lett 390: 304-306
- Lowe DA, Lund T and Alway SE (1998) Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. Am J Physiol-Cell Physiol 275: C155-166
- Ludolph DC and Konieczny SF (1995) Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. FASEB J 9: 1595-604
- MacLennan DH (2000) Ca2+ signalling and muscle disease. Eur J Biochem 267: 5291-7
- McLennan DH, Toyofuku T and Lytton J (1992) Structure-function relationship in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca2+ pumps. Ann NY Acad Sci. 671: 1-10
- Maier A and Bornemann A. (2004) M-cadherin transcription in satellite cells from normal and denervated muscle. Am J Physiol-Cell Physiol 286: C708-12
- Maione R and Amati P (1997) Interdependence between muscle differentiation and cell cycle control. Biochim Biophys Acta 1322: M19-M30
- Majno G and Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 146: 3–15
- Maruyama K and MacLennan DH (1988) Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca2+ transport activity of the Ca2+-ATPase expressed in COS-1 cells. Proc Natl Acad Sci USA 85: 3314–18.
- Mauro A (1961) Satellite cells of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol 9: 493-495
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M and Kambadur R. (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. J Cell Biol 162: 1135-47
- McCullagh KJ, Calabria E, Pallafacchina G, Ciciliot S, Serrano AL, Argentini C, Kalhovde JM, Lømo T and Schiaffino S (2004) NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching Proc Natl Acad Sci USA 101: 10590-5
- McLennan IS (1994) Neurogenic and myogenic regulation of skeletal muscle formation: a critical re-evaluation. Progress in Neurobiology 44: 119-140
- McLennan IS (1996) Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. J Anat 188: 17–28
- McPherron AC and Lee SJ (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc Natl Acad Sci 94: 12457-61

## $dc_{1047}^{1015}$

- McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. Nature 387: 83-90
- Merlie JP, Mudd J, Cheng TC and Olson EN (1994) Myogenin and acetylcholine receptor alpha gene promotors mediate trancriptional regulation in response to motor innervation. J Biol Chem 28: 2461–67
- Mendler L, Zádor E, Dux L and Wuytack F (1998a) mRNA levels of myogenic regulatory factors in rat slow and fast muscles regenerating from notexin-induced necrosis. Neuromusc Disorders 8: 533-41
- Mendler L\*, Szakonyi G\*, Zádor E\*, Görbe A, Dux L and Wuytack F (1998b) Expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPases in the rat extensor digitorum longus (EDL) muscle regenerating from notexin-induced necrosis. J. Muscle Res. Cell Mot. 19: 777-85 \*Authors contributing equally
- Mendler L, Zador E, Ver Heyen M, Dux L and Wuytack F (2000) Myostatin in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. J. Muscle Res. and Cell Mot. 21: 551-563
- Midrio M (2006) The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. Eur J Appl Physiol 32: 2176–78
- Midrio M, Danieli-Betto D, Esposito A, Megighian A, Carraro U, Catani C and Rossini K (1998) Lack of type 1 and type 2A myosin heavy chain isoforms in rat slow muscle regenerating during chronic nerve block. Muscle Nerve 21: 226–232
- Miller JB, Everitt EA, Smith TH, Block NE and Dominov JA (1993) Cellular and Molecular Diversity in Skeletal Muscle Development: News from in vitro and in vivo. BioEssays 15: 191-195
- Miller SC, Ito H, Blau HM and Torti FM (1988) Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro. Mol Cell Biol 8: 2295–301
- Mitchell PO, Mills ST and Pavlath GK. (2002) Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles. Am J Physiol-Cell Physiol 282: C984-92
- Misquitta CM, Chen T and Grover AK (2006) Control of protein expression through mRNA stability in calcium signalling. Cell Calcium 40: 329-46
- Mitsuhashi S, Shima H, Kikuchi K, Igarashi K, Hatsuse R, Maeda K, Yazawa M, Murayama T, Okuma Y and Nomura Y (2000) Development of an assay method for activities of serine/threonine protein phosphatase type 2B (calcineurin) in crude extracts, Anal. Biochem 278: 192–197
- Montarras D, Aurade F, Johnson T, Ilan J, Gros F and Pinset C (1996) Autonomous differentiation in the mouse myogenic cell line, C2, involves a mutual positive control between insulin-like growth factor II and myoD, operating as early as at the myoblast stage. J. Cell Sci 109: 551–560

- Montecucco C, Gutiérrez JM and Lomonte B. (2008) Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. Cell Mol Life Sci 65: 2897-912
- Molnar MJ, Gilbert R, Lu Y, Liu AB, Guo A, Larochelle N, Orlopp K, Lochmuller H, Petrof BJ, Nalbantoglu J and Karpati G (2004) Factors influencing the efficacy,longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. Mol Ther 10:447-55
- Moreno H, Serrano AL, Santalucía T, Gumá A, Cantó C, Brand NJ, Palacin M, Schiaffino S, Zorzano A (2003) Differential regulation of the musclespecific GLUT4 enhancer in regenerating and adult skeletal muscle. J Biol Chem 278: 40557–64
- Moss FP and Leblond CP (1971) Satellite cells as a source of nuclei in muscles of growing rats. Anat Rec 170: 421-436
- Mozdziak PE, Greaser ML and Schultz E. (1999) Myogenin, MyoD, and myosin heavy chain isoform expression following hindlimb suspension. Aviat Space Environ Med 70:511-6
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I and Rifkin DB (1997) Latent transforming growth factor-b: structural features and mechanisms of activation. Kidney Int 51: 1376-82
- Murgia M, Serrano AL, Calabria E, Pallafacchina G, Lomo T and Schiaffino S (2000) Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. Nat Cell Biol 2: 142-7
- Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I and Olson EN (2005) Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. Genes Dev 19: 2066-77.
- Naya F and Olson E (1999) MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. Curr Op Cell Biol 11: 683-688
- Naya FJ, Mercer B, Shelton J, Richardson JA, Williams RS and Olson EN (2000) Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. J Biol Chem. 275: 4545-8
- Newlands S, Levitt LK, Robinson CS, Karpf ABC, Hodgson VRM, Wade RP and Hardeman EC (1998) Transcription occurs in pulses in muscle fibers. Genes & Dev 12: 2748-58
- Olson EN, Arnold HH, Rigby PW and Wold BJ (1996) Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. Cell 85: 1-4
- Olson EN and Klein WH (1994) bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. Genes and Devel 8: 1–8
- Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalhovde JM and Schiaffino S (2002) A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification Proc Natl Acad Sci USA 99: 9213-8

- Parsons SA, Millay DP, Wilkins BJ, Bueno OF, Tsika GL, Neilson JR, Liberatore CM, Yutzey KE, Crabtree GR, Tsika RW, and Molkentin JD (2004) Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. J Biol Chem 279: 26192-200
- Parsons SA, Wilkins BJ, Bueno OF and Molkentin JD (2003) Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice. Mol Cell Biol 23: 4331-43
- Perry RLS and Rudnicki MA (2000) Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. Front Biosci 5: 750–767
- Phillis MI and Gyurko R (1997) Antisense oligonucleotides: new tools for physiology. News Physiol Sci 12: 99–105
- Plant DR, Colarossi FE and Lynch GS (2006) Notexin causes greater myotoxic damage and slower functional repair in mouse skeletal muscles than bupivacaine. Muscle Nerve 34: 577-85
- Rácz GZ, Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Cadot P, De Paepe K, Zador E, Wuytack F and Decramer M (2003) Early changes in rat diaphragm biology with mechanical ventilation. Am J Respir Crit Care Med 168: 297-304
- Ramocki MB, Johnson SE, White MA, Ashendel CL, Konieczny SF and Taparowsky EJ (1997) Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. Mol Cell Biol 17: 3547–55
- Ramocki MB, White MA, Konieczny SF and Taparowsky EJ (1998) A role for RalGDS and a novel Ras effector in the Rasmediated inhibition of skeletal myogenesis. J Biol Chem 273: 17696–701
- Rana ZA, Ekmark M and Gundersen K (2004) Coexpression after electroporation of plasmid mixtures into muscle in vivo. Acta Physiol Scand. 181: 233-8
- Rana ZA, Gundersen K and Buonanno A (2008) Activity-dependent repression of muscle genes by NFAT Proc Natl Acad Sci USA 105: 5921-6
- Rao A, Luo C and Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu Rev Immunol 15: 707-47
- Robertson TA, Maley MAL Grounds MD and Papadimitriou JM. (1993) The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. Exp Cell Res 207: 321–331
- Rothermel BA, Vega RB and Williams RS (2003) The role of modulatory calcineurininteracting proteins in calcineurin signaling. Trends Cardiovasc Med 13:15–21
- Roy RR, Zhong H, Hodgson JA, Grossman EJ, Siengthai B, Talmadge RJ, Edgerton VR (2002) Influences of electromechanical events in defining skeletal muscle properties. Muscle Nerve 26: 238–251

### $dc_{1047}^{1045}$

- Rudnicki MA, Schnegelsberg PNJ, Stead RH, Braun T, Arnold H-H and Jaenisch R (1993) MyoD and myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. Cell 75: 1351–59
- Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A and Rudnicki MA (1999) Reduced differentiation potential of primary myoD -/- myogenic cells derived from adult skeletal muscle. J Cell Biol 144: 631–643
- Sabourin LA and Rudnicki MA (2000) The molecular regulation of myogenesis. Clin. Genet. 57: 16–25
- Sambrook J, Fritsch EF., Maniatis T (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Sakamoto K and Totsuka T (1999) The adaptive response of myoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat soleus muscles. BBA-Gen Subjects 1428: 284–292
- Schertzer JD, Plant DR and Lynch GS (2006) Optimizing plasmid-based gene transfer for investigating skeletal muscle structure and function. Mol Ther 13: 795-803
- Schiaffino S and Reggiani C (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiol Rev 76: 371-423
- Schiaffino S, Sandri M and Murgia M (2007) Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. Physiology (Bethesda) 22: 269-278
- Schiaffino S, Gorza E, Sartore S, Saggin L, Ansoni S, Vianello M, Gundersen K and Lomo T (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. J Muscle Res Cell Motil 10: 197–205
- Schmalbruch H (1976) The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. Tissue Cell 8: 673–692
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF and Lee SJ (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med 350: 2682-8
- Schulte L, Peters D, Taylor J, Navarro J and Kandarian S (1994) Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump expression in denervated skeletal muscle. Am J Physiol-Cell Physiol 267: C617–622
- Schultz E (1996) Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. Dev Biol 175: 84-94
- Schulze M, Belema-Bedada F, Technau A and Braun T (2005) Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion. Genes Dev 19: 1787-98
- Schwarzkopf M, Coletti D, Sassoon D and Marazzi G (2007): Muscle cachexia is regulated by a p53-PW1/Peg3-dependent pathway. Genes Dev 20: 3440-52

- Seale P and Rudnicki MA (2000) A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. Dev Biol 218:115–124
- Seth M, Li T, Graham V, Burch J, Finch E, Stiber JA and Rosenberg PB (2012) Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) stores by stromal interaction molecule 1 and sarcolipin during muscle differentiation. Dev Dyn 241:639-647
- Serrano AL, Murgia M, Pallafacchina G, Calabria E, Coniglio P, Lømo T and Schiaffino S (2001) Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 13108-13
- Sesodia S and Cullen MJ (1991) The effect of denervation on the morphology of regenerating rat soleus muscles. Acta Neuropathol 82: 21-32
- Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB and Yablonka-Reuveni Z (2007) Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. Dev Biol 294: 50-66
- Shen T, Liu Y, Cseresnyés Z, Hawkins A, Randall WR, and Schneider MF (2006) Activityand calcineurin-independent nuclear shuttling of NFATc1, but not NFATc3, in adult skeletal muscle fibers. Mol Biol Cell 17: 1570-82
- Shi X and Garry DJ (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. Genes Dev 20: 1692-708
- Shindoh C, Hida W, Ohkawara Y, Yamauchi K, Ohno I, Takashima T and Shirato K (1995) TNF-a mRNA expression in diaphragm muscle after endotoxin administration. Am J Respir Crit Care Med 152: 1690–96
- Simonides WS, Van der Linden GC and Van Hardeveld C (1990) Thyroid hormone differentially affects mRNA levels of Ca-ATPase isozymes of sarcoplasmic reticulum in fast and slow skeletal muscle. FEBS Lett 274: 73-6
- Smith TPL, Lopez-Corrales NL, Kappes SM and Sonstegard TS (1997) Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. Mamm Genome 8: 742-744
- Snow LM, Sanchez OA, McLoon LK, Serfass RC and Thompson LV (2005) Myosin heavy chain isoform immunolabelling in diabetic rats with peripheral neuropathy. Acta Histochem 107: 221-9
- Spencer MJ, Marino MW and Winckler WM (2000) Altered pathological progression of diaphragm and quadriceps muscle in TNF-deficient, dystrophin-deficient mice. Neuromuscul Disord 10: 612-9
- Stangel M, Zettl UK, Mix E, Zielasek J, Toyka KV, Hartung H-P and Gold R (1996) H2O2 and nitric oxide-mediated oxidative stress induce apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts. J Neuropathol Exp Neurol 55: 36–43
- Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P. (2008) STIM1 signalling controls store-

# $dc_{1047}^{119}5$

operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. Nat Cell Biol 10: 688-97

- Stiber JA and Rosenberg PB (2011) The role of store-operated calcium influx in skeletal muscle signaling. Cell Calcium 49:341-9
- Stupka N, Schertzer JD, Bassel-Duby R, Olson EN and Lynch GS (2007) Calcineurin-A alpha activation enhances the structure and function of regenerating muscles after myotoxic injury. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol 293: R686-94
- Subramanian SV and Nadal-Ginard B (1996) Early expression of the different isoforms of the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) protein in myogenic as well as non-myogenic cell lineages during mouse embryogenesis. Mech Dev 57: 103-12
- Szabó A, Wuytack F and Zádor E (2008) The Effect of Passive Movement on Denervated Soleus Highlights a Differential Nerve Control on SERCA and MyHC Isoforms. J Histochem Cytochem 56: 1013-22
- Szalay K, Razga Z and Duda E (1997) TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin. Eur J Cell Biol 74: 391–398
- Taipale J and Keski-Oja J (1997) Growth factors in the extracellular matrix. FASEB J 11: 51-59
- Talmadge RJ, Paalani M (2007) Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pump isoforms in paralyzed rat slow muscle. Biochim Biophys Acta 1770: 1187–1193
- Talmadge RJ, Otis JS, Rittler MR, Garcia ND, Spencer SR, Lees SJ and Naya FJ (2004) Calcineurin activation influences muscle phenotype in a muscle-specific fashion. BMC Cell Biol 5: 28
- Tartaglia LA, Pennica D and Goeddel DV (1993) Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. J Biol Chem 268: 18542–48
- Tews DS and Goebel HH (1997) DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. Neuropathol Appl Neurobiol 23: 331–338
- Thaloor D, Miller KJ, Gephart J, Mitchell PO and Pavlath GK (1999) Systemic administration of the NF-kB inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. Am J Physiol-Cell Physiol 277: C320–329
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267: 1456–62
- Tidball JG and Villalta SA (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 298: R1173-87

# $dc_{1047}^{11}$

- Torrente Y, El Fahime E, Caron NJ, Del Bo R, Belicchi M, Pisati F, Tremblay JP and Bresolin N (2003) Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) stimulates chemotactic response in mouse myogenic cells. Cell Transplant 12: 91-100
- Tóth A, Fodor J, Vincze J, Oláh T, Juhász T, Zákány R, Csernoch L and Zádor E (2015)The Effect of SERCA1b Silencing on the Differentiation and Calcium Homeostasis of C2C12 Skeletal Muscle Cells. PLoS One. Apr 20;10(4):e0123583
- Tu G-C, Cao Q-N, Zhou F and Yedy I (1998) Tetranucleotide GGGA motif in primary RNA transcripts. Novel target site for antisense design. J Biol Chem 273: 25125–31
- Utvik JK, Njå A and Gundersen K (1999) DNA injection into single cells of intact mice. Hum Gene Ther 10: 291-300
- Valdés JA, Gaggero E, Hidalgo J, Leal N, Jaimovich E and Carrasco MA (2008) NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells. Am J Physiol-Cell Physiol 294: C715-25
- Van den Bosch L, Eggermont J, De Smedt H, Mertens L, Wuytack F and Casteels R (1994) Regulation of splicing is responsible for the expression of the muscle-specific 2a isoform of the sarco/endoplasmic-reticulum Ca(2+)-ATPase. Biochem J 302: 559-66
- Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L and Wuytack F (2005a) Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. Cell Calcium 38: 291-302
- Vangheluwe P, Schuermans M, Zador E, Waelkens E, Raeymaekers L and Wuytack F (2005b) Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. Biochem J 389: 151-159
- Vater R, Cullen MJ and Harris JB. (1992) The fate of desmin and titin during the degeneration and regeneration of the soleus muscle of the rat. Acta Neuropathol 84: 278-88
- Vitadello M, Schiaffino MV, Picard A, Scarpa M and Schiaffino S (1994) Gene transfer in regenerating muscle. Hum Gene Ther 5: 11-8
- Vaidya TB, Rhodes SJ, Moore JL, Sharman DA, Konieczny SF and Taparowsky EJ (1992) Isolation and structural analysis of the rat myoD gene. Gene 116: 223-230
- Walters EH, Stickland NC and Loughna PT (2000) The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. J Muscle Res Cell Motil 21: 647–653
- Wanek LJ and Snow MH (2000) Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle. Anat Rec 258: 176-85

- Wang Y and Jaenisch R (1997) Myogenin can substitute for Myf5 in promoting myogenesis but less efficiently. Development 124: 2507-13
- Wehling M, Cai B and Tidball JG (2000) Modulation of myostatin expression during modified muscle use. FASEB J 14: 103-110
- Weiss T, Grell M, Hessabi B, Bourtelle S, Muller G, Scheurich P and Wajan H (1997) Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80. J Immunol 158: 2398–04
- Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS and Sesodia S (1990) Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. Dev Biol 141: 24–40
- Williams PE and Goldspink G (1973) The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. J Anat 116: 45-55
- Wolff JA and Budker V (2005) The mechanism of naked DNA uptake and expression. Adv Genet 54: 3-20
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A and Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 247: 1465-8
- Wu K-D, Lee W-S, Wey J, Bungard D and Lytton J (1995) Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. Am J Physiol-Cell Physiol 269: C775-784
- Wu KD and Lytton J (1993) Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoforms in rat muscles. Am J Physiol-Cell Physiol 264: C333-341
- Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN and Williams RS. (2000) MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. EMBO J 19: 1963-73
- Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, Hutcheson KA, DiMaio JM, Olson EN, Bassel-Duby R and Williams RS (2001) Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. EMBO J 20: 6414-23
- Wuytack F, Eggermont JA, Raeymaekers L, Plessers L and Casteels R. (1989) Antibodies against the non-muscle isoform of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-transport ATPase. Biochem J 264: 765-9
- Wuytack F, Papp B, Verboomen H, Raeymaekers L, Dode L, Bobe R, Enouf J, Bokkala S, Authi KS and Casteels R. (1994) A sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca2+ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. J Biol Chem 269: 1410-6
- Yablonka-Reuveni Z and Rivera AJ (1994) Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibres. Dev Biol 164: 588-603

# $dc_{10471135}$

- Yablonka-Reuveni Z, Rudnicki MA, Rivera AJ, Primig M, Anderson JE and Natans P (1999) The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking myoD. Dev Biol 210: 440–455
- Yamanouchi K, Soeta C, Naito K and Tojo H (2000) Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. Biochem Biophys Res Com 270: 510-516
- Yun K and Wold B (1996) Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. Curr Opin Cell Biol 8: 877-889
- Zádor E (2008) dnRas stimulates autocrine-paracrine growth of regenerating muscle via calcineurin-NFAT-IL-4 pathway. Biochem Biophys Res Com 375: 265-70
- Zádor E and Kósa M (2015) The neonatal sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1b): a neglected pump in scope. Pflugers Arch 467:1395-401
- Zádor E and Wuytack F (2003) Expression of SERCA2a is independent of innervation in regenerating soleus muscle. Am J Physiol -Cell Physiol 285: C853-861
- Zádor E, Bottka S and Wuytack F (2002) Antisense inhibition of myoD expression in regenerating rat soleus muscle is followed by an increase in the mRNA levels of myoD, myf-5 and myogenin and by a retarded regeneration. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1590:52-63
- Zádor E, Fenyvesi R and Wuytack F (2005) Expression of SERCA2a is not regulated by calcineurin or upon mechanical unloading in skeletal muscle regeneration. FEBS Letters 579:749-752
- Zádor E, Mendler L, Takács V, De Bleecker J and Wuytack F (2001) Regenerating soleus and EDL muscles of the rat show elevated levels of TNF-α and its receptors, TNFR-60 and TNFR-80. Muscle and Nerve 24:1058-67
- Zádor E, Owsianik G and Wuytack F (2011) Silencing SERCA1b in a few fibers stimulates growth in the entire regenerating soleus muscle. Histochem Cell Biol 135: 11-20
- Zador E, Vangheluwe P and Wuytack F (2007) The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum Ca(2+) pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. Cell Calcium 41: 379-88
- Zador E, Dux L and Wuytack F. (1999) Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. J. Muscle Res. and Cell Mot. 20:395-402
- Zádor E, Mendler L, Ver Heyen M, Dux, L. and Wuytack F (1996) Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPase isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. Biochem J 320: 107-113
- Zádor E, Szakonyi G, Rácz G, Mendler L, Ver Heyen M, Lebacq J, Dux L and Wuytack F (1998) Expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase protein

# $dc_{1047}^{11}$

isoforms during regeneration from notexin induced necrosis of rat muscle. Acta Histochem 100: 355-369

- Zahradka P, Larson DE and Sells BH (1989) RNA polymerase II-directed gene transcription by rat skeletal muscle nuclear extracts. Exp Cell Res 185: 8-20.
- Zammit PS, Partridge TA and Yablonka-Reuveni Z (2006) The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. J Histochem Cytochem 54: 1177-91
- Zammit PS. (2008) All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? J Cell Sci 121: 2975-82
- Zhong H, Roy RR, Hodgson JA, Talmadge RJ, Grossman EJ and Edgerton VR (2002) Activity-independent neural influences on cat soleus motor unit phenotypes. Muscle Nerve 26: 252–264
- Zhu Z and Miller JB (1997) MRF4 can substitute for myogenin during early stages of myogenesis. Dev Dynamics 209: 233-241
- Zubrzycka-Gaarn E, MacDonald G, Phillips L, Jorgensen AO and MacLennan DH. (1984) Monoclonal antibodies to the Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum identify polymorphic forms of the enzyme and indicate the presence in the enzyme of a classical high-affinity Ca<sup>2+</sup> binding site. J Bioenerg Biomembr 16: 441-464.

# $dc_{1047}^{11}$

#### VIII. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ TARTOZÓ FOLYÓIRATCIKKEK

- Zádor E, Mendler L, Ver Heyen M, Dux L and Wuytack F (1996) Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPase isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. Biochem J 320: 107-113 IF:3.687 25 idézet
- 2. Mendler L, **Zádor E**, Dux L and Wuytack F (1998) mRNA levels of myogenic regulatory factors in rat slow and fast muscles regenerating from notexin-induced necrosis. Neuromusc Disorders 8: 533-541

IF:2.582 25 idézet

3. Mendler L\*, Szakonyi G\*, Zádor E\*, Görbe A, Dux L and Wuytack F (1998) Expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPases in the rat extensor digitorum longus (EDL) muscle regenerating from notexin-induced necrosis. J Muscle Res Cell Mot 19: 777-785 \*Azonos mértékben közreműködő szerzők

IF:2.905

5 idézet

4. **Zádor E**, Szakonyi G, Rácz G, Mendler L, Ver Heyen M, Lebacq J, Dux L and Wuytack F (1998) Expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase protein isoforms during regeneration from notexin induced necrosis of rat muscle. Acta Histochem 100: 355-369

IF:0.878 8 idézet

- Mendler L, Zador E, Ver Heyen M, Dux L and Wuytack F (2000) Myostatin in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. J Muscle Res Cell Mot 21: 551-563

IF:2.117 40 idézet

 Zádor E, Mendler L, Takács V, De Bleecker J and Wuytack F (2001) Regenerating soleus and EDL muscles of the rat show elevated levels of TNF-α and its receptors, TNFR-60 and TNFR-80. Muscle and Nerve 24:1058-1067

IF:2.316 35 idézet

8. Zádor E, Bottka S and Wuytack F (2002) Antisense inhibition of myoD expression in regenerating rat soleus muscle is followed by an increase in the mRNA levels of myoD, myf-5 and myogenin and by a retarded regeneration. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1590:52-63

IF:3.016 12 idézet

9. Zádor E and Wuytack F (2003) Expression of SERCA2a is independent of innervation in regenerating soleus muscle. Am J Physiol -Cell Physiol 285: C853-C861

IF:4,103 8 idézet

# dc\_1047<sup>11</sup> 15

10. Fenyvesi R, Rácz G, Wuytack F and Zádor E (2004) The calcineurin activity and MCIP1.4 mRNA levels are increased by innervation in regenerating soleus muscle. Biochem Biophys Res Commun 320: 599-605 14 idézet

IF:2,904

11. Zádor E, Fenyvesi R and Wuytack F (2005) Expression of SERCA2a is not regulated by calcineurin or upon mechanical unloading in skeletal muscle regeneration. FEBS Letters 579:749-752

> IF:3.415 6 idézet

12. Zador E, Vangheluwe P and Wuytack F. (2007) The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum Ca(2+) pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. Cell Calcium 41:379-88

> IF: 4.338 5 idézet

- 13. Zádor E (2008) dnRas stimulates autocrine-paracrine growth of regenerating muscle via calcineurin-NFAT-IL-4 pathway. Biochem Biophys Res Com 375:265-70 IF: 2.648 2 idézet:
- 14. Szabó A, Wuytack F and Zádor E (2008) The Effect of Passive Movement on Denervated Soleus Highlights a Differential Nerve Control on SERCA and MyHC Isoforms. J Histochem Cytochem. 56:1013-22

IF: 2.823 2 idézet

- 15. Zádor E, Owsianik G, Wuytack F (2011) Silencing SERCA1b in a few fibers stimulates growth in the entire regenerating soleus muscle. Histochem Cell Biol 135: 11-20. IF: 2,588 2 idézet
- 16. Kósa M and Zádor E (2013) Transfection efficiency along the regenerating soleus muscle of the rat. Mol Biotechnol 54:220-7.

0 idézet IF: 2,275

17. Zádor E, Kósa M. (2015) The neonatal sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1b): a neglected pump in scope. Pflügers Arch 467: 1395-401. IF:3,073 (2013) 0 idézet

Összesen:

**IF: 47.882** 

független idézet: 209

#### IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatómunkám során sokan mutattak érdeklődést elgondolásaim iránt és jó néhányan segítettek a kísérletek kivitelezésében és a közlemények elkészítésében. Közülük dr. Mendler Luca, Dr. Rácz Gábor, Dr. Szabó A. Zsófia és Dr. Kósa Magdolna PhD hallgatóként kapcsolódtak be a munkába, együttműködésüket köszönöm. Frank Wuytack professzornak, a Leuveni Katolikus Egyetem Ca<sup>2+</sup> transzport ATP-áz laboratórium vezetőjének a téma kezdetétől számított tizennégy évig tartó együttműködésért jár köszönet. Ez az együttműködés Dr. Dux László intézetvezető professzor támogatásával alakult ki. A társszerzőségen túl szeretnék köszönetet mondani prof. Peter Vangheluwe-nak és a néhai Dr. Bottka Sándornak. Prof. Ghislaine Gayan-Ramirez-nek és prof. Marc Decramer-nek azért, hogy lelkesen alkalmazták a légzőizom kutatásban a regenerációban szerzett tapasztalatainkat. Dr. Kiss Gábornak, Dr. Vér Ágotának a regenerációhoz kapcsolódó témában, prof. Báthori Máriának és Dr. Tóth Noéminek az ekdiszteroid hatáshoz kapcsolódó együttműködésért szeretnék köszönetet mondani. Dr. Fodor Jánosnak prof. Csernoch László izomkutató csoportjából azért, hogy velük alkalmam nyílt folytatni a SERCA1b kutatást. Feleségem és családom türelme és támogatása mindig ott volt a háttérben.