

**Transzfekciós hatékonyság patkány soleusban és  
SERCA1b kifejeződése humán vázizomban**

*Értekezés tézisei*

**Dr. Kósa Magdolna**

*Témavezető: Dr. Zádor Ernő*

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai Intézet

2014

## Bevezetés

A vázizom regeneráció egy igen intenzíven kutatott terület, mivel olyan klinikai és fejlődésbiológiai jelenségek alapját képezi, amelyek megismerésével új patomechanizmusok, illetve terápiás irányelvek állíthatóak fel. A szarko/endoplazmás retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz 1-es típusának neonatális formája (SERCA1b) laboratóriumunk korábbi kísérletei alapján jelentős szerepet tölthet be az izomregenerációban. A szarko/endoplazmás retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázok (SERCA molekulák) szerepe izomban alapvetően az izomrost depolarizációját követően megnövekedett citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  visszapumpálása a szarkoplazmás retikulumba, ATP felhasználás terhére. Nem izom sejtekben a megnövekedett citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  eliminációja ezzel analóg módon az endoplazmás retikulumba juttatással történik. Vizsgálataink középpontjában a vázizomban kifejeződő SERCA1 áll, melynek az „a” izoformája adult, gyors izomrostokra, a „b” típusa neonatális/fejlődő izomra jellemző. Az eddig csak rágcsálókban igazolt fejlődésfüggő izoforma-váltás felveti a SERCA1b izom-differenciációban betöltött szerepét. Laboratóriumunk korábbi kísérletei azt mutatták, hogy amikor a patkány regenerálódó soleus izmát SERCA1b siRNS-t

kifejező plazmival injektálták, nem csak a transzfektált, hanem valamennyi izomrost keresztmetszeti területe és az izom friss tömege is gyorsabban elérte a normál méretet. A génterápiás kutatások egyik módszere, hogy a fentihez hasonlóan idegen gént kifejező plazmidot juttatnak transzfekcióval az izomrostokba, mely által a regeneráció folyamata befolyásolható. Az említett kísérletekhez használt egyszerű transzfekciós módszer tényleges hatékonysága azonban ismeretlen, csupán az izom injektálásának helyén álltak rendelkezésre adatok a transzfektált rostok viszonylag alacsony, 1-2%-os arányáról. Ezen kívül arról sem volt információ a kutatók birtokában, hogy vajon expresszáldódik-e a SERCA1b a humán vázizomban, és ha igen, melyik fejlődési stádiumban és milyen körülmények között.

### **Célkitűzések**

- A SERCA1b siRNS bejuttatásához használt módszer tényleges transzfekciós hatékonyságának felmérése az izom teljes térfogatában, hogy fény derüljön a SERCA1b silencing autokrin-parakrin hatásának tényleges mértékére

- A SERCA1b potenciális szerepének felmérése humán izomban: fehérje és RNS expresszió foetalis és neonatalis vázizomban
- A SERCA1b expresszió vizsgálata dystrophiás humán izmokban (Duchenne izomdystrophia, dystrophia myotonica 1-es típusa, dystrophia myotonica 2-es típusa)

## **Anyag és Módszer**

### *Vázizom transzfekció és regeneráció*

Transzfekciós kísérleteinkhez a patkány soleus izmának regenerációját indukáltuk sebészi feltárást követően intramuscularis notexin injektálással. Négy nappal a seb zárását követően a regenerálódó izmot 20%-os szukrózos oldatban pEGFP, vagy pDsRed plazmidokkal injektáltuk. A regeneráció 11. napján az izmokat eltávolítottuk,  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, fagyasztva metszettük, végül a transzfekciós hatékonyságot vizsgáltuk. Az utóbbihoz az izmokat hat megközelítőleg egyenlő szegmentumra osztottuk, valamennyi szegmentumból keresztmetszetek készültek, amelyeken a transzfektált rostok számát fluoreszcens mikroszkóp segítségével kvantitáltuk.

### *A regenerálódó izom rostosságának meghatározása*

Emlősökben az érett vázizom rostot egyetlen motoros véglemez idegzi be. Ebben a neuromuszkuláris junkcióban található acetilkolin észteráz hisztokémiai festése indirekt módon lehetőséget ad a fejlődő, és a normál izom innervációs mintázatának összehasonlítására. Ha a mintázat megegyezik, akkor a regenerációt követően sem alakul ki több rövidebb izomrost a regenerált izom hosszában, mint a normál izomban.

*SERCA1b kimutatás humán vázizom mintákból: immunhisztokémia, Western-blot, PCR*

Humán mintáinkat a Szegedi Tudományegyetem, a Veronai Egyetem, valamint a Leuveni Egyetem etikai bizottságának engedélyével dolgoztuk fel. Összesen öt egyedből (SZTE) származtak post mortem foetalis vagy csecsemő vázizom minták a m. biceps brachii-ból, m. vastus lateralisból, m. gluteus maximusból és a diaphragmából. Az izmokból fagyasztott metszeteken anti-SERCA1b és anti-SERCA1 antitestekkel immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, majd a minták egy részét homogenizáltuk, az izolált mitokondriális-mikroszomális (összmembrán) frakcióból anti-SERCA1b, majd anti-SERCA1 ellenanyagokkal Western-blotot készítettünk. A SERCA1a-t és SERCA1b-t egyaránt

felismerő közös primer párral RT-PCR-t végeztünk (SERCA1a esetén hosszabb, 248 bp-os, SERCA1b esetén 206 bp-os fragment keletkezett). A belgiumi ill. olaszországi minták Duchenne-féle izomdystrophiában, ill. dystrophia myotonica 1-es és 2-es típusában szenvedő betegek m. quadriceps femorisából, m. deltoideusából, valamint m. tibialis anteriorból származó biopsziás anyagok, vagy teljes homogenátumok voltak. melyekből a kis mintamennyiség illetve a minták állapota miatt csak Western-blotot készítettünk.

Mivel SERCA1a antitest készítése az egyetlen SERCA1b-től különböző molekularészlet, a C-terminális glicin ellen nem látszott megbízhatónak, kidolgoztunk egy olyan módszert, amelyben a tisztán SERCA1b-t tartalmazó regenerálódó patkány soleusnak, valamint tisztán SERCA1a-t tartalmazó normál patkány soleusnak, illetve ezen minták homogenátumainak keverékével bebizonyítottuk, hogy meghatározható egy ismeretlen összetételű minta SERCA1a vagy SERCA1b dominanciája. Ehhez SERCA1 és SERCA1b antitestet felhasználva az adott izom immunhibridizációs jelintenzitásából statisztikai módszerekkel kiszámoltuk a SERCA1b/SERCA1 hányadost, s azt viszonyítottuk a tisztán SERCA1b-t tartalmazó regenerálódó soleus

SERCA1b/SERCA1 arányához. A szignifikáns különbség elmaradása esetén valószínűsíthető, hogy a vizsgált izomban a SERCA1b a domináns vagy a kizárólagos SERCA1 izoforma, hasonlóan a regenerálódó soleushoz.

## **Eredmények**

### *Transzfekciós hatékonyság patkány soleusban*

A patkány regenerálódó soleus izmát injektáltuk vörös, vagy zöld fluoreszcens fehérjét (DsRed-t vagy EGFP-t) kifejező plazmiddal. A fluoreszcens jelet folyamatos párhuzamos keresztmetszeteken követni lehetett az izom teljes hosszában. Mivel a kísérleti modellként használt soleus izom fuziform jellegű, azaz a rostok az izom hossz tengelyével párhuzamosak, ez a vizsgálat egyúttal teljes képet adott a rostok mentén történt transzfekcióról is. Az eredmények szerint a transzgén kifejeződése az injektálás helyétől a rostok végei felé csökkent. Voltaképpen a transzgén az izom még kisebb hányadában fejeződik ki, mint azt a transzfekció helyéhez közeli izomkeresztmetszetek alapján gondolni lehetett.

Indirekt izomrosthossz meghatározás során a neuromuszkuláris junkció helyét jelölő acetilkolin észteráz a regeneráció során is a normál izoméhez hasonlóan helyezkedett el. Ezzel kizárhatóvá vált, hogy a regenerációt

követően több rövidebb rost töltene ki a normál izomban íntól-  
íngig húzódó, egész izmon átívelő rostok helyét.

### *SERCA1b expresszió humán vázizomban*

Foetalis és csecsemő minták SERCA1b analízise immunhisztokémiai, Western-blot, majd PCR módszerekkel történt. Összesen négyféle korai fejlődési stádiumú izmot vizsgáltam 5 egyedből post mortem mintákon. Immunhisztokémiai vizsgálatok -különböző antitesthígításokkal, változó blokkolókkal tesztelve- azt mutatták, hogy nem lehetséges specifikus jelet detektálni post mortem humán mintákon, annak ellenére, hogy a metszetek alacsony aspecifikus háttérrel adó fagyasztva metszés technikájával készültek. Ennek magyarázata az is lehet, hogy a cadavereket a mintavétel előtt gyakran napokig 5-8°C között tárolták, ami lehetőséget adott az autoproteolitikus folyamatok beindulására. Ellenben a Western-blot módszer, amelyben ugyanazon izmok microsomalis frakcióit dolgoztuk fel, tiszta, specifikus jelet adott. Kimutattunk egy erőteljes korfüggő expressziós mintázatot, amelyben a foetalis, vagy korrigált gestációs kor alapján immaturus mintáink, az anatómiai értelemben vett vázizmok (azaz: m. biceps brachii, m. gluteus maximus, m. vastus lateralis) valamennyien kifejezték a vizsgált Ca<sup>2+</sup>-pumpa fehérjét. Érett csecsemőkben azonban



kizárólag a felnőtt típusú, SERCA1a izoforma volt jelen. A diaphragmák valamennyi vizsgált humán mintából kizárólag SERCA1a-t expresszáltak fehérje szinten. A kifejlesztett szemikvantitatív módszerrel SERCA1b és SERCA1 antitest felhasználásával (SERCA1a specifikus antitest hiányában), eldönthető volt, hogy SERCA1a vagy a SERCA1b a domináns SERCA1 fehérje izoforma az adott izomban. Ennek lényege, hogy ismert, tisztán SERCA1a-t, illetve tisztán SERCA1b-t expresszáló izmok membrán kivonatát, ill. azok ismert arányú keverékét blotokon immunhibridizáltuk SERCA1b majd SERCA1 antitesttel, majd kiszámoltuk a SERCA1b/SERCA1 hányadosokat. Az ismert SERCA1a-SERCA1b összetételekhez számolt hányadosok egy „kalibrációs” lehetőséget adtak az ismeretlen SERCA1a-SERCA1b összetételű mintáink izoforma arányainak megbecsüléséhez. Az imént említett módszert alkalmazva megmutattuk, hogy a SERCA1a a domináns izoforma foetusok/éretlen csecsemők vázizmában. Eredményeink alátámasztásához, ill. kibővítéséhez RT-PCR-t állítottunk be SERCA1 specifikus primerekkel. Mivel a két RNS között alternatív splicing következtében csupán egy exon különbség van (a SERCA1 összesen 23 exonjából a SERCA1b mRNS-ben hiányzik a 22-es exon, míg a SERCA1a mRNSben az is jelen van), ezért közös SERCA1 primerekkel lehetséges egyetlen RT-PCR

reakcióban vizsgálni a két izoformát. RT-PCR eredményeink egybehangzóan alátámasztották a Western-blottal nyert adatokat. Mindezeken túl dystrophia myotonica 1-ben (DM1), dystrophia myotonica 2-ben (DM2), ill. Duchenne-féle izomdystrophiában (DMD) szenvedő betegek biopsziás mintáiból készült homogenátumok elemzése is megtörtént Western-blottal. Kísérleteink egybehangzóan igazolják, hogy a SERCA1b DM2-ben a domináns SERCA1 izoformaként expresszálódik, míg DM1-ben és DMD-ben csak a SERCA1a fejeződik ki.

## **Összefoglalás**

Munkám során kimutattuk, hogy az izomregeneráció során a SERCA1b silencingre használt alap transzfekciós módszer hatékonysága az egész izomban az injektáláshoz közeli keresztmetszethez képest jóval alacsonyabb mértékű, mert az izomrostok hosszában csökken.

A SERCA1b-nek a patkány izomhoz hasonlóan, a humán izomfejlődés kezdetén is jelentős szerepe lehet, mivel fejletlen izmokban fehérje szinten is expresszálódik, azonban eltűnése (azaz a SERCA1a dominánssá válása) a születés után korábbra tehető, mint azt a rágszálókban tapasztalták. A vizsgált humán

izombetegségek közül dystrophia myotonica 2-es típusában kimutattuk a SERCA1b fehérje jelenlétét a vizsgált izmokhoz tartozó betegek magas életkora (kb. 40 év) ellenére.

Mivel SERCA1a specifikus antitest nem hozható létre, munkám során olyan módszert fejlesztettünk ki, melynek segítségével SERCA1b specifikus és SERCA1 antitesteket felhasználva becsülhetővé vált, hogy a SERCA1a vagy a SERCA1b a dominánsan expresszált SERCA1 izoforma.

Egy további következtetés, hogy a specifikus SERCA1b antitestünk post mortem humán izommetszeteken nem működik, azonban membrán preparátumból végzett Western-blothez kitűnően használható. Összességében a fenti eredmények új területet nyitottak a humán SERCA1b kutatásban, felvetve a molekula humán izomfejlődésben, valamint dystrophia myotonica 2 patomechanizmusában betöltött szerepét.

### **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Zádor Ernő tanár úrnak a TDK-s és a PhD munkám során nyújtott segítségével, hasznos tanácsaiért, prof. Dr. Dux Lászlónak

támogatásáért, a lehetőségért, hogy intézetében kutathattam, oktathattam, valamint Dr. Bereczki Csaba tanár úrnak, jelenlegi főnökömnek, hogy rezidensi munkám mellett támogatta tudományos fokozatszerzésem.

Köszönöm Dr. Mandler Lucának szakmai segítségét és empátiáját, Hancsák Károlynak, Dr. Brinyiczki Kittinek, Dr. Varga Zoltánnak a munkám SERCA1b kimutatásra irányuló részében való közreműködését és tanácsaikat, külföldi kooperációs partnereinknek (Dr. Gaetamo Vattemi, Dr. Philip van Damme, Dr. Nathalie Groemans) az izom biopsziás mintákat, valamint a Biokémiai Intézet valamennyi munkatársának, akik javaslataikkal, ötleteikkel, vagy akár csak egy-egy jó szóval támogattak és segítettek tovább lépni munkám nehezebb pillanataiban. Az egyik legnagyobb köszönet azonban családomat, azon belül is anyukámat illeti, aki mindvégig mögöttem állt és ahol lehetett segített.

Munkám pályázati támogatása:

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Az értekezéshez szorosan kapcsolódó közlemények:

- I. **M. Kósa**, E. Zádor (2013) Transfection Efficiency Along the Regenerating Soleus Muscle of the Rat. *Mol Biotechnol.* 2013 54(2):220-7.  
IF: 2.262
  
- II. V. Guglielmi, G. Vattei, F. Gualandi, N. C. Voermans, M. Marini, C. Scotton, E. Pegoraro, A. Oosterhof, **M. Kósa**, E. Zádor, E. M. Valente, D. De Grandis, M. Neri, V. Codemo, A. Novelli, T. H. van Kuppevelt, B. Dallapiccola, B. G. van Engelen, A. Ferlini, G. Tomelleri (2013) Serca1 protein expression in muscle of patients with Brody disease and Brody syndrome and in cultured human muscle fibers. *Mol Genet Metab* 110(1-2):162-9.  
IF: 2.834
  
- III. **M. Kósa**, K. Brinyiczki, P. van Damme, N. Goemans, K. Hancsák, L. Mendler, E. Zádor (2014) The neonatal sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase gives a clue to development and pathology in human muscles. (bírálat alatt)