

SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A disztrofin fehérjecsald:
lokalizáció és fiziológias szerep**

PhD értekezés

Készítette:

Hazai Diana

2006

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Dr. Jancsik Veronika, a biológiai tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövettani Tanszék

Témabizottsági tagok:

Dr. Halasy Katalin, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövettani Tanszék

Dr. Baska Ferenc, állatorvos-tudományok kandidátusa
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

Készült 8 példányban. Ez apéldány.

.....
Hazai Diana

TARTALOMJEGYZÉK

1. ÖSSZEFOGLALÁS	1
2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A Duchenne-féle izomdisztrófia története	3
2.2. A Duchenne-féle izomdisztrófia jellemzői és tünetei	4
2.3. A disztrofin gén és a disztrofin fehérjecsald	4
2.4. A disztrofin fehérjék szerkezete	5
2.5. A Duchenne-féle izomdisztrófia állatmodelljei. Az <i>mdx</i> egértörzsek és más disztrofinhiányos állatok	7
2.6. A disztrofin-asszociált fehérjekomplex szerkezete az izomszövetben	7
2.7. A disztrofin rokon fehérjék (Dystrophin Related Protein, DRP) és szerkezetük	9
2.8. A disztrofin-asszociált fehérjék (Dystrophin Associated Protein, DAP) szerkezete	12
2.9. A DAPC-hez kötődő extracelluláris mátrix fehérjék	14
2.10. Az agyban előforduló DAPC komplexek	14
2.10.1. DAPC az idegsejtekben	15
2.10.2. DAPC a gliasejtekben	15
2.10.3. DAPC a vér-agy gátban	16
2.10.4. DAPC a disztrofinhiányos egerek vér-agy gátjában	17
2.11. A DAPC egyéb szöveti gátokban	17
3. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
3.1. Kísérleti állatok	21
3.2. Transzkardiális perfúzió	21
3.3. Immunhisztokémiai és immuncitokémiai szövettani módszerek	21
3.3.1. Korrelált fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok	21
3.3.2. Fluoreszcens mikroszkóppal végzett egyszeres és többszörös jelöléses vizsgálatok	23
3.3.3. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok	24
4. EREDMÉNYEK	25
4.1. A Dp 71 lokalizációja az agyban	25
4.2. Az α -DB lokalizációja és karakterizálása az agyban	27
4.2.1. A DAPC egyes tagjai az agyi erekben	27
4.2.1.1. Az α -DB, β -DB és utrofin kimutatása az agyi erek falában	27
4.2.1.2. Az α -DB sejtszintű kimutatása vad típusú és <i>mdx</i> ^{βgeo} egér agy ereiben	28
4.2.2. Az α -DB lokalizációja és karakterizálása az agyi idegsejtekben	32
4.2.2.1. Az α -DB kimutatása az agyi idegsejtekben	32
4.2.2.2. Az α -DB karakterizálása a laterális hypothalamus idegsejtjeiben	33
4.2.2.3. Az α -DB2/ α -DB4 és egyes neuropeptidek illetve az nNOS kolokalizációjának vizsgálata a laterális hypothalamusban	33
4.2.2.4. Az α -DB2/ α -DB4 és β -DB kolokalizálása a laterális hypothalamusban	34
4.2.2.5. Az α -DB2/ α -DB4 és az utrofin lokalizációja a laterális hypothalamus idegsejtjeiben	34

4.2.2.6. Az α -DB kimutatása a <i>mdx^{βgeo}</i> egér agy idegsejtjeiben	34
4.3. Az α -DB lokalizációja barrierekkel rendelkező szövetekben	43
4.3.1. Az α -DB lokalizációja a herében	43
4.3.2. Az α -DB lokalizációja a tüdőben	43
5. MEGBESZÉLÉS	46
5.1. A Dp71f lokalizációja az agyban	46
5.2. Az α -DB lokalizációja és karakterizálása az agyban	47
5.2.1. A DAPC egyes tagjai az agyi erekben	47
5.2.2. Az α -DB kimutatása és karakterizálása a laterális hypothalamus idegsejtjeiben	48
5.3. Az α -DB lokalizációja barrierekkel rendelkező szövetekben	50
5.3.1. Az α -DB lokalizációja a herében	50
5.3.2. Az α -DB lokalizációja a tüdőben	51
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	52
7. IRODALOM	54
8. SAJÁT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	70
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	72

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

DMD: Duchenne-féle izomdisztrófia
DAPC: disztrofin-asszociált protein komplex
DAP: disztrofin-asszociált protein
Dp: disztrofin
DB: disztrobrevin
DG: disztroglikán
UTR: utrofin
SYN: szintrofin
SG: szarkoglikán
SS: szarkospán
nNOS: neuronális nitrogén-oxid szintetáz
MCH: melanin koncentrááló hormon
NPY: neuropeptid Y
PSD: posztszinaptikus denzitás
ES: ektoplazmatikus specializáció
PB: foszfát puffer
PBS: foszfát puffer+0.9% NaCl
BSA: szarvasmarha szérumalbumin
DAB: 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A Duchenne-féle izomdisztrófia (DMD) az izomrendszer sorvadásával járó, X-kromoszómához kötött örökletes betegség. A DMD ma még gyógyíthatatlan betegség, melynek kialakulásáért a disztrofin génben bekövetkező mutáció és közvetve, a mutáció miatt a disztrofin fehérje termelésének zavara a felelős. A disztrofin fehérje a harántcsíkolt izomrostot határoló membránban található fehérje komplex, a disztrofin-asszociált fehérje komplex (Dystrophin-Associated Protein Complex, rövidítve: DAPC) fontos tagja. A DAPC feladata, hogy összeköttetést biztosít az extracelluláris mátrix komponensei és az aktin alapú sejtvázas között és ezáltal stabilizálja az izomrostot az izomösszehúzódnások során. Ezen kívül a komplex számos jelátviteli fehérjét, receptorfehérjét, ioncsatornát képes a membránhoz kihorgonyozni, így jelátviteli utakat befolyásolni. A DMD betegek egy részében az izomsorvadás mellett enyhe, szelektív kognitív károsodások is megjelennek. A verbális IQ, az olvasási képesség, a szövegértés és a tanulási képesség érintett, emellett memóriazavarok is előfordulhatnak. Ezek a tünetek arra utalnak, hogy a DAPC az idegi működésben is fontos szerepű. Számos kutatás bizonyítja, hogy a központi idegrendszer ideg- és gliasejtjeiben a disztrofin mellett egyéb DAPC fehérjék is jelen vannak, melyek kölcsönhatásba lépnek egymással, kialakítva ezzel a különböző disztrofin-asszociált fehérje komplexeket. Az agyban leggyakrabban előforduló disztrofin fehérje a Dp71.

Az utrofin fehérje a disztrofin fehérje autoszomális homológja, szerkezetük nagyon hasonló és részben helyettesíthetik is egymást a DAPC-ben. A disztrofin-rokon és disztrofin-kötő disztrobrevinek (DB-ek) fontos tagjai a DAPC-nek, mert a jelátviteli utakban részt vevő adapter molekulákat, a szintrofinokat képesek a komplexhez hozzákapcsolni. A disztrobrevinek csak a disztrofinon, vagy az utrofinon keresztül tudnak a DAPC-hez kötődni. A komplexet alkotó fehérjék lokalizációjáról és kolokalizációjáról, azaz az agyban előforduló DAPC-k fehérje összetételéről és a komplex szerepéről még hiányosak az ismereteink. Érdekes kérdés ugyanezen DAPC-fehérjék előfordulásának vizsgálata a disztrofin fehérjét nem termelő mutáns egerekben. Mivel az agyon belül a vér-agy gát kialakításában szerepet játszó kapillárisok körül is számos DAPC fehérjét kimutattak, felmerül, hogy az egyéb szöveti gátakat létrehozó szervekben (mint a herében, tüdőben) vajon előfordulnak-e DAPC fehérjék.

PhD munkám során a DAPC egyes tagjainak lokalizációját és karakterizációját végeztük el vad típusú egér és patkány illetve az egyik disztrofin formát sem termelő *mdx^{βgeo}* egerek agyában, valamint vad típusú egerek heréjében és tüdejében. Morfológiai bizonyítékot szolgáltatunk a Dp71f disztrofin izoforma ultrastrukturális lokalizációjára a patkány hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum rétegében. A Dp71f fehérjét axo-dendritikus és tükesszinapszisok poszt-szinaptikus denzitálásában mutattuk ki. A jelölt és az ezektől morfológiailag megkülönböztethetetlen immunnegatív szinapszisok heterogén eloszlást mutattak. A moharostok terminálisai által adott szinapszisokban a Dp71f nem fordult elő. A szinaptikus helyeződésen kívül a Dp71f egyes mielinhüvely nélküli és mielinhüvelyes axonokban is megtaláltuk. A kötegeket képző mielinhüvely nélküli moharostokban az immunreakció az axonális membránt jelölte körbe, a mielinhüvelyes axonokban a jelölés az axoplazmában, a sejtvázas elemeihez kapcsolódott. Más, szerkezetileg hasonló mielinhüvelyes axonokban jelölés nem volt.

További kísérleteinkben néhány DAPC fehérje lokalizációját és kolokalizációját vizsgáltuk az agyi erekben vad típusú és *mdx^{βgeo}* egerekben. Az α -DB fehérje az agyi erek falában az asztrocita végtalpokban

van jelen, ezért feltételezhető, hogy szerepet játszik az itt kialakuló vér-agy gát működésében. Az α -DB és az utrofin fehérjék, illetve az α -DB és β -DB fehérjék vad típusú egérben minden vizsgált agyterületen a kapillárisok falában kolokalizálódtak. A disztrofin fehérjét nem termelő *mdx ^{β geo}* állatok és a vad típusú egerek összehasonlítása alapján az összes vizsgált agyterületre vonatkozóan a mutáns állatokban sokkal kevesebb ér volt immunpozitív. Ultrastrukturális vizsgálatokból derült ki, hogy az immunjelölés a perikapilláris asztrocita végtalpokban jól észrevehetően lecsökkent. Az α -DB fehérjét az agyi ereken kívül idegsejtekben is kimutattuk (Bregma -1,22 mm és -1,94 mm közötti területen) vad típusú és *mdx ^{β geo}* egerekben. Az immunpozitív idegsejtek túlnyomó részt a laterális hypothalamus területén szétszóródva, illetve egy kisebb csoport a hypothalamus dorso-mediális régiójában lokalizálódtak. A fehérje az idegsejtek sejttestében, nyúlványaiban és szinapszisaiban található meg. Az elektronmikroszkópos kísérleteinkben tisztáztuk, hogy az α -DB az erősen kitágult endoplazmatikus retikulum ciszternáinak membránjához kötődik. A jelölt sejttestek közelében immunpozitív és immunnegatív nyúlványokat és poszt-szinaptikus denzitásokat is találtunk. Valószínűsíthető, hogy az α -DB tartalmú nyúlványok és poszt-szinaptikus denzitások az immunpozitív sejttestekhez tartoznak. Bebizonyítottuk, hogy az általunk vizsgált α -DB izoformák közül csak az α -DB2 és/vagy az α -DB4 expresszálódik az immunpozitív idegsejtekben. Az α -DB2/ α -DB4 a neuronok citoplazmájában a β -DB-vel kolokalizálódott a laterális hypothalamus területén, egy körülhatárolható neuron csoportban. A β -DB a citoplazmán kívül a neuronok sejtmagjában is megjelent. A β -DB olyan neuronokban is kimutatható volt, amelyek α -DB2/ α -DB4-et nem tartalmaztak. Az α -DB2/ α -DB4 az utrofinnal, az nNOS-sal, NPY-al és a galaninnal nem kolokalizálódott, de bebizonyítottuk, hogy az α -DB2/ α -DB4 pozitív idegsejtek MCH neuropeptidet is expresszálnak vad típusú és *mdx ^{β geo}* egerek hypothalamusában. A vér-agy gátban megtalálható α -DB kimutatását egyéb szöveti gátakat képző szervekben, mint a herében és a tüdőben is elvégeztük egérben, ultrastrukturális szinten. Az α -DB a herében a vér-here, a tüdőben a vér-levegő gát egyes elemeiben jelent meg. A herében az α -DB-t a Sertoli sejtek plazmamembránjának alaphártyával érintkező és a csírasejtek felé néző részén, tüdőben az alveolusok falát felépítő 1-es típusú alveoláris epithel sejtek citoplazmájában detektáltuk. Összefoglalva, kísérleteink alapján elektronmikroszkópos bizonyítékot szolgáltatunk a Dp71f disztrofin izoforma megjelenésére szinapszisok poszt-szinaptikus denzitásban és egy olyan sejt-kompartimentben (axonokban), ahol eddig disztrofin fehérjéket még nem mutattak ki. A vad típusú és disztrofinhiányos egerek agyi ereivel kapcsolatos eredményeink új ismeretekkel szolgálnak az erekben felépülő DAPC -re vonatkozóan. Az α -DB2/ α -DB4 neuronális lokalizálása az irodalomban eddig nem szereplő, teljesen új eredmény. A DAPC fehérjékkel és neuropeptidekkel kapcsolatos eredményeink remélhetően jövőbeli kutatások alapjaként szolgálhatnak. A herében és a tüdőben általunk leírtak hozzájárulnak a vér-here és a vér-levegő gátban lévő DAPC sejt- és molekuláris szintű felépítésének tisztázásához.

2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A Duchenne-féle izomdisztrófia története

Az izomrendszer sorvadásával járó, örökletes betegségeket összefoglalva izomdisztrófiás megbetegedéseknek hívja az orvostudomány. Ennek a betegségcsoportnak a második leggyakrabban előforduló tagját, a gyermekkori, súlyos, gyógyíthatatlan izomsorvadást leírója, Guillaume Duchenne után Duchenne-féle izomdisztrófiának (DMD) nevezik.



1. ábra Guillaume Duchenne

A Duchenne-féle izomdisztrófiát az 1850-es évektől ismerjük, de még ma is gyógyíthatatlan betegség. Diagnózisában nagy előrelépést jelentett 1959-ben az a felismerés, hogy a beteg vérében megnő a kreatin-kináz enzim mennyisége. Ez az enzim a pusztuló izomból jut ki a vérpályába, ám ez más, szintén izomkárosodással járó betegségben is bekövetkezik, tehát a kimutatásra nem elég specifikus módszer. A diagnózis másik lehetősége a beteg izomból vett biopsziás minta szövettani vizsgálata. Az izomrost kontraktilis elemei és a kötőszöveti elemek közti összeköttetés károsodása ugyanis szövettanilag az izomrost degenerálódásaként, a membrán szétszakadozásaként illetve a sejtmagok centralizálódásaként jelenik meg. Ezzel a módszerrel már biztosabban igazolható a betegség. Az izomdisztrófia kutatásának nagy áttörése volt a betegség molekuláris hátterének tisztázása, melyre 1987-ben került sor, amikor Louis M. Kunkelnek és munkatársainak (1987, Koenig et al. 1987) sikerült klónozni a disztrofin gént. A gén termékét, a disztrofin fehérjét, Hoffman és munkatársai azonosították (1987). Bizonyítást nyert tehát, hogy a Duchenne-féle izomdisztrófia kialakulásáért a disztrofin génben történt mutáció a felelős, aminek következtében zavart szenved a disztrofin fehérje termelődése a szervezetben. Kevin P. Campbell 1989-ben írta le (1989), hogy a disztrofin fehérje a harántcsíkolt izomrostot határoló membránban, a szarkolemmában elhelyezkedő fehérjekomplex, az úgynevezett disztrofin-asszociált fehérjekomplex (Dystrophin-Associated Protein Complex, rövidítve: DAPC) egyik kulcsfontosságú tagja.

2.2. A Duchenne-féle izomdisztrófia jellemzői és tünetei

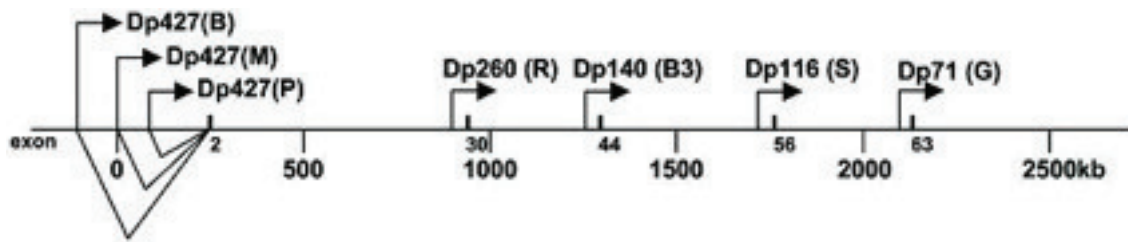
A Duchenne-féle izomdisztrófia letális, X-kromoszómához kötött, anyai ágon öröklődő betegség, mely 3500 fiúból 1-et érint (Hoffman, Kunkel 1989). Az emberen kívül a Duchenne-féle izomdisztrófia bizonyos kutyafajtáknál és egyes macskafajtáknál is jelentkezik (Shelton et al. 2001, Gaschen et al. 1999). Ha a szervezetben nem termelődik a disztrofin fehérje, azért az X-kromoszóma p21-es locus-án lévő disztrofin génben bekövetkezett mutáció a felelős. A DMD elsősorban a vázizomzatban okoz súlyos elváltozásokat, mert a disztrofin fehérjére szükség van a normális izomműködéshez. A disztrofin a legnagyobb mennyiségben a vázizomban, a szívizomban és a központi idegrendszer egyes régióiban mutatható ki, azonban sok más szövetben is expresszálódik.

Klinikailag a Duchenne-féle izomdisztrófiás fiúbetegekben a tünetek egészen hamar, már 2-5 éves korukban jelentkeznek, és drámai gyorsasággal súlyosbodnak (Dubowitz 1978). Az izomsorvadás főleg a törzsön, a váll- és medenceöv izmain és a végtagokon jelentkezik. Nehézséget okoz nekik a járás, a futás, sokszor indokolatlanul elesnek, az izomrendszerük hamar elfárad és nagyon gyenge. Gerincferdülés alakulhat ki a gerincoszlop izmainak elgyengülése miatt. A betegséget gyakran csak akkor ismerik fel, mikor az izomtömeg 40%-a elpusztult. A betegség gyorsan halad előre, és amikor a beteg már járni se képes, tolószékbe kerül. Tolószékben még lehet élni, ám a betegség minden esetben halállal végződik. A Duchenne-féle izomdisztrófiás kamaszkorú betegek halálának közvetlen oka, hogy a pusztulás eléri légző- vagy szívizmaikat is (Engel et al. 1994). A betegek egy részében az izomsorvadás mellett, enyhe, szelektív kognitív károsodások is fellépnek (Mehler et al. 2000, Blake, Kroger 2000). Főleg a rövid távú memória működése, a figyelem megtartása (nehézségeik adódnak a történetek visszaidézésében és azok megértésében), a verbális IQ (gyengébb teljesítményt nyújtanak a verbális kifejezőkészségben, a betűzésben, az olvasási készségben, a mondatértelmezésben) és a matematikai képességek károsodnak (Bresolin et al. 1994, Anderson et al. 2002). Ezek a járulékos tünetek arra utalnak, hogy a disztrofinnak az idegi működésben is fontos szerep jut, bár ez a szerep még ma sem tisztázott.

2.3. A disztrofin gén és a disztrofin fehérjecsalád

A Duchenne-féle izomdisztrófia kialakulásának oka a disztrofin fehérje termelődésének zavara, a hiánya, vagy nem megfelelő formában történő expressziója (Hoffman et al. 1987).

A disztrofin gén a legnagyobb humán gén, 2,5 Mb-ot és 79 kódoló exont tartalmaz (Koenig et al. 1987, Coffey et al. 1992). A génnek szokatlanul magas a mutációs rátája a nagy méretéből adódóan (Culligan et al. 2001). A disztrofin gén 7 önálló, szövet-specifikusan működő promoterral rendelkezik, melyekről az egymástól hosszúságban eltérő transzkriptumok íródhatnak át a különböző szövetekben (2. ábra). A transzkriptumok variabilitását az alternatív splicing folyamata is növeli. Mindezek következtében a disztrofin fehérjecsalád méretben és szerkezetben eltérő tagjai expresszálódnak (Ahn et al. 1993). A disztrofin gén hét promoterről átíródó fehérjék közül három 427 kDa molekulatömegű, a többi négy rövidebb: 260, 140, 116, és 71 kDa. Az agy (brain: B), izom (muscle: M) és Purkinje (Purkinje: P) promoterről háromféle 427 kDa molekulatömegű izoforma íródhat át: a Dp427 (M) a



2. ábra A humán disztrofin gén és a róla átíródó disztrofin fehérjék sematikus rajza.

A 2.5 Mb DMD gén 7 különböző fehérje izoformát kódol. Az NH₂-terminális szekvenciában egymástól eltérő 427 kDa molekulatömegű disztrofin transzkriptumok a nyilakkal jelölt promoterekről íródnak át a gén 5'-végén. Ezek: Dp427 (B), Dp427 (M) és a Dp427 (P), mely a szövet-specifikus expressziójukat jelöli, B az agyra, M az izomra, és a P a kisagyi Purkinje sejtekre utal. A kisebb molekulatömegű izoformák a távolabb elhelyezkedő promoterekről íródnak át, a retinában (R: Dp260), az agyban (B: Dp140), Schwann sejtekben (S: Dp116) illetve sokféle szövetben (G, general: Dp71) expresszálódnak. (Blake et al. 2002 alapján)

váz-, sima- és szívizomban (Schofield et al. 1993), Dp427 (B) az agyban, ezen belül elsősorban az agykéregben és a hippocampusban lévő neuronokban (Gorecki et al. 1992), a Dp427 (P) a kisagyi Purkinje idegsejtekben (Gorecki, 1992). A disztrofin génnek ezen kívül még négy belső promotere van, ezek a retina (retinal: R), agy3 (brain3: B3), Schwann sejt (Schwann cell: S) és általános (general: G) promoterek, melyekről a rövidebb disztrofin izoformák íródnak át. A Dp260 (R) specifikusan a retinában, a Dp140 (B) az agyi gliasejtekben (Lidov et al. 1995), míg a Dp116 (S) a Schwann sejtekben található (Byers et al. 1993). A rövidebb disztrofin formák főleg a központi- és perifériás-idegrendszerben expresszálódnak, a Dp140 a fejlődő vesében is (Durbeej et al. 1997), ezzel szemben a legkisebb méretű és a Dp427 izoformától leginkább eltérő szerkezetű disztrofin, a Dp71 (G) az agyon és az izomszöveten kívül számos más szövetben is előfordul, például a vesében, májban és tüdőben (Lederfein et al. 1992). Az agyszövetben a Dp71 (G), a Dp427 (B) és a Dp140 (B) fordul elő, ezek közül a Dp71 található meg a legnagyobb mennyiségben (Lidov 1996, Blake et al. 1999). A keletkező disztrofin fehérjék számát a disztrofin gén 3' végét érintő alternatív splicing is növeli (Feener et al. 1989).

2.4. A disztrofin fehérjék szerkezete

A 427 kDa molekulatömegű disztrofin fehérjének négy funkcionális doménje van, az NH₂-terminálisánál lévő aktin kötő domén, a központi bot domén, a cisztein-gazdag domén és a COOH-terminális domén. A 427 kDa molekulatömegű disztrofinban 220 aminosavból áll az aktin kötő NH₂-terminális régió. Centrálisan a bot domén található, amely 24, egyenként kb. 110 aminosavból álló α -helikális szerkezetű spektrin-szerű ismétlődő egységekből és 4 kapocs régióból áll. Ez a rész stabilizálja és flexibilissé teszi a molekulát az izomösszehúzódás alatt, illetve a bot domén 11-17. ismétlődő egységei egy második aktin kötő részt alkotnak (Rybakova et al. 1996, Amann et al. 1998,1999, Koenig, Kunkel 1990). Ezt közvetlenül követi egy 40 aminosav által alkotott β -redő szerkezetű fehérje kötő régió, az úgynevezett WW domén, ami számos jelátvivő és szabályozó molekulában is megtalálható (Bork, Sudol 1994). A WW domén és a cisztein-gazdag régió egy része



3. ábra A 427 kDa molekulatömegű disztrofin szerkezete és kötőhelyei.

A zölddel jelölt szerkezeti egység az aktin kötő NH₂-terminális régió. Centrálisan a bot domén látható, mely 24 sárga színnel jelölt spektrin-szerű egységből és 4, piros színnel jelölt kapocs régióból áll. Ezt követi a disztroglikán (DG) kötésért felelős, kézzel jelölt WW szerkezeti egység, és a lila színnel jelölt cisztein-gazdag domén (CYS). Türikizkékkel a molekula COOH-terminális doménje (CT) van jelölve, mely a szintrofint (SYN) és egyéb disztrofin fehérje család tagokat (DFB) képes kötni. (Blake et al. 2002 alapján)

biztosítja a kölcsönhatást a disztrofin és a DAPC membránon átívelő tagja, a β -disztroglikán (β -DG) között. A cisztein-gazdag domén (CYS) erősen konzervatív szerkezetű, képes a sejten belüli Ca²⁺-ot kötni. A molekula COOH-terminális doménje (CT) disztrobrevin (DB) kötőhelyet tartalmaz és biztosítja a kölcsönhatást a disztrofin és a szintrofin (SYN), illetve a disztrofin fehérjecsalád (DFB) egyes tagjai között (Roberts 2001). A Dp260, Dp140, Dp116 fehérjékből hiányzik a Dp427-re jellemző NH₂-terminális régió, illetve, a spektrin-szerű ismétlődő egységekből és a kapocs régióból álló bot doménjük rövidebb, mint a Dp427 fehérje bot doménje.

A Dp71 a Dp427 szerkezetétől leginkább eltérő disztrofin izoforma. Míg a Dp71 fehérje cisztein-gazdag régiója megegyezik a többi disztrofinéval, addig NH₂-terminálisába 7 új és csak erre a fehérjére jellemző aminosav épül be. Ráadásul a Dp71 mRNS-ének keletkezése során az alternatív splicing, a 71-74. és/vagy a 78. exont érintheti, ami a keletkező fehérjék számát tovább növeli (Austin et al. 1995). A 71-74. exon kiesése, vagy bennmaradása nem befolyásolja a fehérje COOH-terminálisának aminosav szekvenciáját. Ezért a 71-74. exon kiesésétől, vagy bennmaradásától függetlenül, amennyiben a 78. exon bennmarad, akkor a keletkező Dp71d-nek nevezett fehérje izoforma COOH-terminálisa ugyanolyan szerkezetű marad, mint az összes többi disztrofin fehérje COOH-terminálisa. Ha azonban a 78. exon esik ki, akkor a leolvasási keret megváltozása miatt az utolsó 13 aminosav helyett 31 új aminosav fog beépülni a COOH-terminálisba. Ezért az így keletkező Dp71f izoformának a COOH-terminálisa eltér a fehérjecsalád többi tagjától (Lederfein 1992). A Dp71 fehérje más módon kötődik az aktinhoz, mint a 427 kDa molekulatömegű disztrofin. Egyrészt az NH₂-terminálisából hiányzik a Dp427 fehérjére jellemző aktin kötő domén, másrészt szerkezetéből hiányoznak a fehérjének a flexibilitást biztosító spektrin-szerű ismétlődő egységek, így az aktinhoz mereven és egy csak rá jellemző módon kötődik. Howard és munkatársai szerint a Dp71 NH₂-terminálisa tartalmaz aktin kötő helyet (1998). Eltérést jelent még a β -disztroglikánhoz való kötődése is, mivel hiányzik belőle a többi fehérje esetében a kölcsönhatásban kulcsszerepet játszó WW domén egy része.

2.5. A Duchenne-féle izomdisztrófia állatmodelljei. Az *mdx* egértörzsek és más disztrofinhiányos állatok

A disztrofin fehérje hiányát egérben, kutyában és macskában spontán mutáció, vagy kémiai mutagenézis okozhatja (Sicinski et al. 1989). Ezek az állatok a humán Duchenne-féle izomdisztrófia modelljeként jöhetnek számításba. A legelterjedtebben modellként használt disztrofinhiányos *mdx* egerek szervezetéből hiányzik a 427 kDa molekulatömegű disztrofin fehérje, melynek oka a disztrofin gén 23. exonján történt spontán pont mutáció, ami egy stop-kodont generál (Sicinski et al. 1989). Az *mdx* egérben a többi disztrofin izoforma (a Dp71 is) termelődése zavartalan. Ezeknél az állatoknál az izomrendszert érintő, a humán DMD-hez hasonló tünetek figyelhetők meg, de az élettartamuk nem csökken nagy mértékben (Lynch et al. 2001). A kognitív tüneteket tekintve ezek az állatok sokkal gyorsabban felejtik el az újonnan megszerzett információt, mint normál, vad típusú társaik, azaz károsodik a rövidtávú memóriájuk (Vaillend et al. 1995, Vaillend, Ungerer 1999).

Ezen kívül léteznek a mesterségesen, kémiai mutagenézissel előállított további *mdx* egértörzsek (Cox et al. 1993, Im et al. 1996). Ilyenek például az *mdx^{2cv}*, *mdx^{3cv}*, az *mdx^{4cv}* és az *mdx^{5cv}* egértörzsek, amelyekben kémiai mutagenézissel pontmutációt állítottak elő. Az *mdx^{2cv}*, *mdx^{4cv}*, *mdx^{5cv}* egerek közös tulajdonsága, hogy bennük a 427 kDa molekulatömegű disztrofin nem lehet kimutatni az izomrendszerben és az agyban, míg a Dp71 expressziója nem tér el a kontroll társaiktól. Az *mdx^{3cv}* egértörzsben ezzel szemben a Dp71 fehérje hiányzik, míg a 427 kDa molekulatömegű disztrofin fehérje alacsony szinten termelődik, bár funkcióját nem képes ellátni (Cox et al. 1993). Mind az öt egértörzsben az izomrendszert érintő tünetek észlelhetők (Chapman et al. 1989).

Az eddigiekben említett spontán mutációval létrejött *mdx* egerek, illetve a kémiai mutagenézissel előállított *mdx* egértörzsek szervezetében valamelyik disztrofin fehérje termelődése mindig megmarad. Ez volt az oka, hogy kifejlesztettek egy olyan transzgénikus egértörzset, az *mdx^{βgeo}* törzset, melyben egy, a disztrofin génbe juttatott vektor beépülése miatt az összes disztrofin izoforma kiesik. Az inzerció a disztrofin gén 3' végénél a 63. exonon történik, érintve ezzel ez összes ismert disztrofin izoformát. Homozigóta *mdx^{βgeo}* egér izomdisztrófiás tüneteket mutat (Wertz, Füchtbauer 1998).

Ha a disztrofin gén kódoló szekvenciája helyébe egy detektálható „riporter” gén kódoló szekvenciáját építenek bele és ezt a rekombináns DNS-t bejuttatják a sejt genetikai állományába, akkor a “riporter” fehérje termelődéséből az eredeti disztrofin gén expressziós mintázatára lehet következtetni mind az embrióban, mind a felnőtt állatban. Ezzel az igen érzékeny módszerrel kimutatták, hogy az embriogenezis során az eddig hittnél korábban jelenik meg a disztrofin expresszió (Wertz, Füchtbauer 1998).

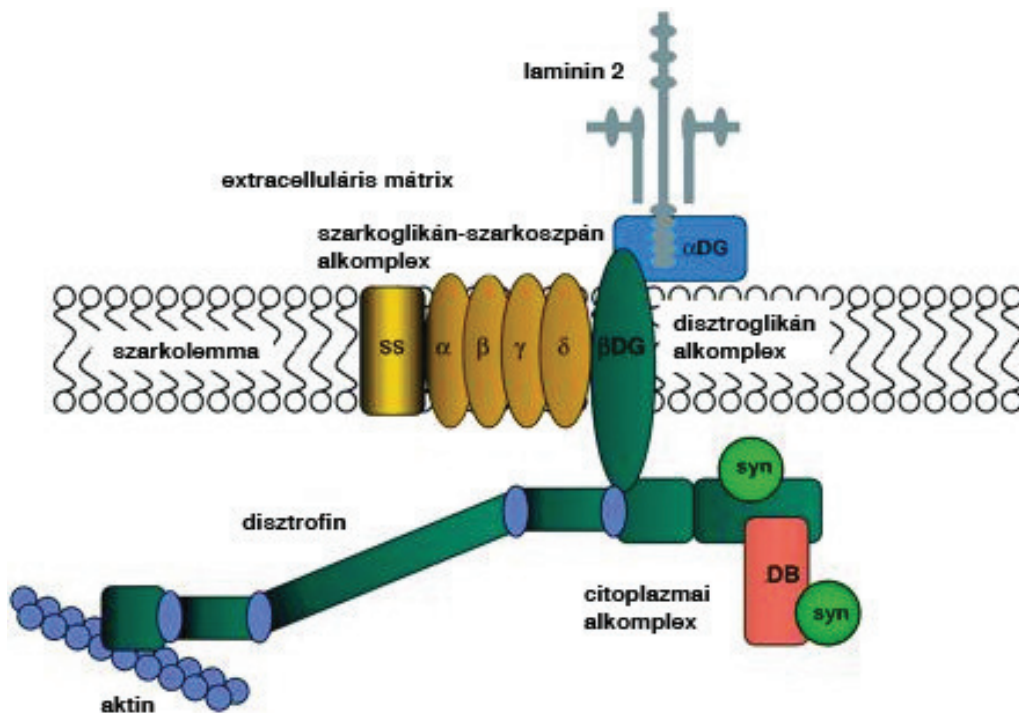
2.6. A disztrofin-asszociált fehérjekomplex szerkezete az izomszövetben

A disztrofin fehérje és a hozzákapcsolódó fehérjekomplex szerkezetét és lokalizációját főképp az izomszövetben ismerjük (Campbell, Kahl 1989). A disztrofin-asszociált fehérjekomplex, a DAPC a szarkolemmához kötött és a neuromuszkuláris junkcióban is megtalálható (Watkins et al. 1988, Blake, Kroger 2000). A DAPC a harántcsíktolt izomban egy hatalmas, membránon átívelő, legalább 10

fehérjetagból álló egység, amely összeköttetést biztosít az izomrost külső oldalán lévő extracelluláris mátrix fehérje komponensei és a sejten belüli aktin alapú sejtíváz között. Ez a molekuláris egység egyrészt stabilitást ad az izomrostnak az izomösszehúzóds közben, másrészt, ha hozzá jelátviteli fehérjék kötődnek, akkor ez sejten belüli jelátviteli utakat indít be.

A harántcsíkolt izomban előforduló DAPC leginkább elfogadott modellje szerint a komplex három alkompleyre osztható (4. ábra). Van egy membránon átívelő része, amit az α - és β -disztroglikán által alkotott disztroglikán alkomplex képez. Ehhez az alkomplexhez a sejten belül a disztrofin, vagy az utrofin fehérje, a sejten kívül pedig az extracelluláris mátrix egyes elemei (például a laminin-1, laminin-2, agrin, perlekán) kapcsolódhatnak. A szarkolemmán belül található a szarkoglikán-szarkoszpán alkomplex, ami az α -, β -, γ -, δ -szarkoglikán (SG) és a szarkoszpán (SS) fehérjékből áll. A harmadik alkomplex pedig a citoplazmai alkomplex, melyet a disztrofin, vagy utrofin fehérje, a disztrobrevin fehérjék (DB) és szintrofin molekulák (SYN) alkotnak. A szintrofin egy adapter molekula, melyen keresztül a komplex jelátviteli fehérjékkel, ionszatornákkal léphet kapcsolatba. A 427 kDa molekulatömegű disztrofin és az utrofin fehérjék egyrészt NH_2 -terminálisukon keresztül a DAPC-t az aktin alapú sejtívázhoz tudják hozzákapcsolni, másrészt összeköttetést biztosítanak a DAPC citoplazmai és a disztroglikán alkomplexe között.

ADAPC, mint az előző leírásból kitűnik, az extracelluláris mátrix és a sejt belsejében lévő sejtíváz között létesít közvetlen kapcsolatot. Fő funkciója a plazmamembrán strukturális stabilitásának biztosítása, továbbá jelátviteli utak szabályozása. Több jel mutat arra, hogy a komplex az izomrendszerben



4. ábra A disztrofin-asszociált fehérje komplex

(Dystrophin-Associated Protein Complex, DAPC) szerkezete a vázizomban.

A disztroglikán alkomplex tagjai: α -disztroglikán (α -DG), és a β -disztroglikán (β -DG). Az α -DG-hez az extracelluláris mátrix elemei (pl. laminin 2) tudnak kapcsolódni. A szarkolemmában lévő szarkoglikán-szarkoszpán alkomplex tagjai: α -, β -, γ -, δ -szarkoglikán (SG) és a szarkoszpán (SS). A citoplazmai alkomplex tagjai: a β -DG-hoz kapcsolódó disztrofin, szintrofin (SYN), és a disztrobrevin (DB). A disztrofin NH_2 -terminálisán keresztül az aktin alapú sejtívázhoz kötődik. (Blake et al. 2002 alapján)

fontos szerepet játszik az acetilkolin receptorok membránon belüli helyének meghatározásában is (Jacobson et al. 2001). Az előbbieken ismertetett DAPC, a komplex fehérje összetevőit illetően nem az egyetlen lehetséges modell. Számos vizsgálat mutatja, hogy a legtöbb szövetben különböző sejtspecifikus DAPC-k épülnek fel, és még a sejten belül is variációk fordulhatnak elő (Tinsley et al. 1994, Rivier et al. 1999).

2.7. A disztrofin rokon fehérjék (Dystrophin Related Protein, DRP) és szerkezetük

Léteznek a disztrofin fehérjével rokonságban álló fehérjék. Ilyenek az utrofin (UTR), a DRP-2 (Dystrophin Related Protein-2), illetve az α - és a β -disztrobrevin (DB). Szerkezetileg az utrofin fehérje hasonlít leginkább a disztrofin fehérjéhez, míg a DRP-2 és a disztrobrevin fehérjéknek a COOH-terminális régiója mutat hasonlóságot a disztrofin szerkezetével.

Az utrofin (UTR)

Az utrofin a disztrofin fehérje közeli rokona, annak autoszómális homológja, mely emberben a 6. (egérben a 10.) kromoszómán kódolt (Love et al. 1989). Az utrofinnak van teljes hosszúságú (Up395) és két rövidebb formája (Up116, Up71) (Culligan et al. 2001). A 395 kDa molekulatömegű utrofin, alapszerkezetében nagyon hasonlít a 427 kDa molekulatömegű disztrofinhoz. Az utrofin is rendelkezik aktin kötő NH_2 -terminálissal, bot doménnel, WW doménnel, cisztein-gazdag régióval, és a disztrofinhoz hasonló COOH-terminálissal (5. ábra). A két fehérje hasonló molekulákat tud megkötni (Peters et al. 1997), tehát az utrofin is képes a DAPC tagjaival kapcsolódni, és a disztrofint helyettesítve részt venni a DAPC felépítésében. A disztrofin és az utrofin funkcionálisan azonban valószínűleg csak részben helyettesítheti egymást (Tinsley et al. 1992), bár a disztrofinhiányos *mdx* egerekben megfigyelhető az utrofin expresszió erőteljes fokozódása (Gillis 2000). Az UTR sokkal szélesebb körben expresszálódik, mint a disztrofin, minden szövetben jelen van (Tinsley et al. 1994) és egyes feltevések szerint hasonló szerepet tölthet be, mint a 427 kDa molekulatömegű disztrofin az izomszövetben (Peters et al. 1997). Az utrofin lokalizációja az izomszövetben eltér a disztrofinétól. Az egyedfejlődés során az UTR előbb expresszálódik, mint a disztrofin, így először az UTR van jelen a szarkolemmában és a neuromuszkuláris junkcióban, de amikor a disztrofin megjelenik, lassan a neuromuszkuláris junkción kívül mindenhol kizorítja az utrofint (Clerk et al. 1993). Felnőtt egyedben a disztrofin a szarkolemmában és a neuromuszkuláris junkció redőinek bemélyedésében található, Na^+ -csatornák közelében (Love et al. 1991, Peters et al. 1997, Wilson et al. 1999), míg az utrofin kizárólag csak a neuromuszkuláris junkciókban, a szubneuronális oldalon a junkcionális redő tetején helyeződik, ahol nikotinos acetilkolin receptorokkal kolokalizálódik. Ez is azt mutatja, hogy a disztrofin és az utrofin bár rokon fehérjék és részben helyettesíthetik egymást, de mégis különböző DAPC-eket alkotnak, melyek szerepe még a szarkolemmán belül is eltér egymástól (Mizuno et al. 1993).

A DRP-2

A DRP-2 külön gén által kódolt fehérje. Szerkezete hasonlóságot mutat a disztrofin és az utrofin szerkezetével, van két spektrin-szerű ismétlődő egysége, WW doménje, és cisztein-gazdag régiója.

A DRP-2 képes DG-t, SYN-t, és a disztrofin család fehérjéit kötni. A DRP-2 nem expresszálódik a váz- vagy szívizomzatban (Roberts et al. 1996), de előfordul a központi idegrendszerben, ahol szinapszisok poszt-szinaptikus denzitásaiban lokalizálódik (Roberts, Sheng 2000). Sherman és munkatársai a mielinhüvelyt képző Schwann sejtek felszínén találtak disztroglikán-DRP-2 komplexet és ez, feltételezésük szerint a mielinhüvely vastagságának kialakításában játszik szerepet (2001).

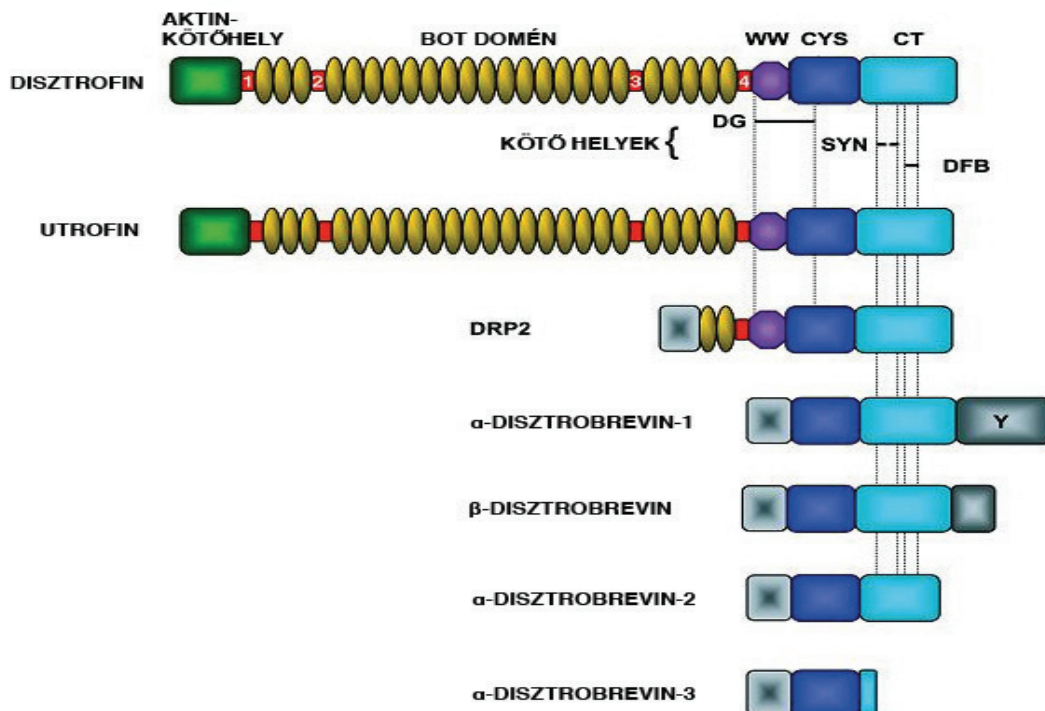
A disztrobrevin (DB)

A disztrobrevinek disztrofinnal rokon fehérjék (Blake et al. 2002) és szerkezetükben is hasonlóságokat mutatnak. A disztrobrevinek képesek a disztrofin fehérjecsalád tagjaihoz közvetlenül kötődni és ezáltal részt venni a DAPC felépítésében a különböző szövetekben, azonban a disztrofin/utrofin helyettesítésére nem képesek. A disztrobrevin család fehérjéi két külön génről, az α -DB (emberben és egérben a 18. kromoszómán található) és a β -DB (emberben a 2. és egérben a 12. kromoszómán található) génről íródnak át. A disztrobrevineknek is van cisztein-gazdag régiója, szintrofint és a disztrofin család fehérjéit kötő helye (kivéve az α -DB3-at), de szerkezetükből hiányoznak a spektrin-szerű ismétlődő egységek és WW domén, mely utóbbin keresztül a disztrofin a β -disztroglikánt tudja megkötni (5. ábra). Ezért a disztrobrevinek nem képesek közvetlenül a β -DG-hoz kapcsolódni. A disztrobrevinek az izom- és egyéb szöveti lokalizációjuk mellett a központi idegrendszerben is jelen vannak. (Blake et al. 1996, 1998, 1999, Peters et al. 1997)

Az α -DB génen 3 promoter található, melyek szövet-specifikus használata és a keletkező transzkriptumok alternatív splicingja során eltérő α -DB izoformák keletkeznek (Holzfeind et al. 1999). A váz- és szívizomszövetben a három legfontosabb, COOH-terminálisában eltérő α -disztrobrevin izoforma az α -DB1, α -DB2 és az α -DB3 (Blake et al. 1996), ezen kívül felnőtt szervezetben kimutatták a kisebb molekulatömegű izoformák, az α -DB4 és az α -DB5 létezését is, de ezek a fehérjék a vázizom sejtekben nincsenek jelen (Peters et al. 1998). Az α -DB1 COOH-terminálisán számos tirozin foszforilációs hely található. A többi α -DB formában nincsenek tirozin foszforilációs helyek. Az α -DB a disztrofinhoz, utrofinhoz és a szintrofinhoz kötődni képes citoplazmai fehérje, mely a DAPC tagja. Yoshida és munkatársai kutatása szerint azonban az α -DB-ek a DAPC szarkoglikán alkomplexéhez is tudnak kapcsolódni (2000), Chung és Campanelli pedig az α -DB és a β -DG közvetlen kölcsönhatását mutatták ki (1999). A különböző α -disztrobrevin izoformák eloszlását legrészletesebben az izomszövetben írták le. A különböző α -DB izoformák eltérő helyeken lokalizálódnak szív- és vázizomzatban (Nawrotzki et al. 1998, Peters et al. 1998). Az izomszövetben az α -DB1 a neuromuszkuláris junkcióban, az α -DB2 a szarkolemmában lokalizálódik (Nawrotzki et al. 1998). Az α -DB3 a váz- és szívizomban található, de a pontos helyeződése még nem tisztázott. A központi idegrendszerben az α -DB-1-et elsősorban gliasejtekben találták meg, míg jelenlétüket a neuronokban nem mutatták ki (Blake et al. 1999). Az α -DB1,2 hiányos egérben enyhe izomdisztrofias tünetek lépnek fel, a neuromuszkuláris junkció szerkezete károsodik, valószínűleg azért, mert az acetilkolin receptorok csoportjai instabillá válnak (Grady et al. 1999, 2000). Az α -DB1,2 hiányos egér egyértelmű központi idegrendszeri tüneteket azonban nem mutat, ami a szerzők szerint a β -DB esetleges kompenzáló funkciójának lehet a következménye (Grady et al. 2006).

A β -disztrobrevin génről a fehérje COOH-terminálisát érintő alternatív splicing által számos izoforma íródhat át (Blake et al. 1998). Az α - és β -disztrobrevinek hasonló az NH_2 -terminálissal rendelkeznek,

de nagy eltérés mutatkozik a COOH-terminálisuk szerkezetében. A β -DB-ek COOH-terminálisán nem található tirozin foszforilációs hely. A β -disztrobrevinek az izomszövetből hiányoznak, ám számos egyéb szövetben expresszálódnak, többek között az agyban is. Az egér és patkány agyban a β -disztrobrevint Blake idegsejtekben lokalizálta számos agyterületen (1999). Mivel a β -DB képes a szintrofinnal és a disztrofin család fehérjéivel (Dp71-el, Dp140-el, Dp427-el és utrofinnal) kölcsönhatásba lépni (Blake et al. 1998, 1999) ezért feltételezhető, hogy disztrofin-asszociált fehérjekomplexek felépítésében is részt vesz. Az agyban az α - és β -DB-ek azonban máshol expresszálódnak, és valószínűleg különböző DAPC-k felépítésében játszanak szerepet. A disztrobrevinek gliasejtekben való megoszlásáról egyes kutatócsoportok között vita folyik. Blake és munkatársai szerint az α -DB-1 az agyban kapillárisok körüli asztrocitákban, illetve más gliasejtekben (pl. Bergmann gliában a kisagyban) lokalizálódik, míg a β -DB az agyon belül hiányzik a kapillárisok falából, viszont kimutatható neuronokban (neuronok sejtmagjában is), az agykéreg, a hippocampus és a kisagy területén (1998, 1999). Ezzel szemben Grady és munkatársai a β -DB-t agyi kapillárisokban is lokalizálta (2006). Ugyanez a csoport létrehozott egy α - és β -DB kettős mutáns egértörzset, mely a disztrofinhiányos *mdx* egerekhez hasonló, de nem azonos viselkedésbeli tüneteket mutatott. Ezekben az állatokban szinaptikus károsodásokat lehetett kimutatni az idegrendszerben, ami bizonyítékul szolgál arra, hogy a disztrofin fehérjéken kívül más DAPC fehérjék hiánya is befolyásolhatja az agy szinaptikus struktúráját (Grady et al. 2006). Ueda és kutatócsoportja az összes disztrobrevint egyszerre felismerő ellenanyaggal azt mutatta ki, hogy a disztrobrevinek az erek körüli asztrocitákon kívül az endotélsejtekben is expresszálódnak (2000).



5. ábra A legfontosabb disztrofin-rokon fehérjék összehasonlított szerkezete.

Zöld: aktin kötő NH₂-terminális régió, sárga: spektrin szerű ismétlődő egységek, piros: a köztük lévő kapocs régiók, lila: a fehérjék WW doménje, kék: a cisztein-gazdag régió, türkizkék: a COOH-terminális domén. A β -DG, szintrofin (SYN), és disztrofin család fehérjéit kötő helyeket (DFB) a vonalak jelölik ki az egyes fehérjék szerkezetében. Az α -disztrobrevin-1 izoforma a COOH-terminális szekvenciában tirozin foszforilációs helyeket tartalmaz (Y-al jelölve). (Blake et al. 2002 alapján)

2.8. A disztrofin-asszociált fehérjék (Dystrophin Associated Protein, DAP) szerkezete

A disztroglikán (DG)

A disztroglikánok voltak az első klónozott DAP fehérjék (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992). A disztroglikán génről átíródó prekursor proteinből származik az extracelluláris α - és a transzmembrán β -disztroglikán fehérje. A prekursor protein először proteolízist szenved, majd a transláció után glikoziláción esik át (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1993). A glikozilációs mintázat az egyedfejlődés során szabályozott és összefüggésben áll azzal, hogy a kész fehérje milyen partnerekkel tud majd kapcsolódni a különböző szövetekben. A glikoziláció folyamata elengedhetetlen a fehérje normál funkciójának ellátásához (Barresi, Campbell 2006). A disztroglikánok széles körben, számos szövetben expresszálódnak (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992, 1993). Az α - és β -DG egymáshoz erősen kapcsolódik és számos más partnerrel is kölcsönhatásba tud lépni. Az α -disztroglikán egy extracelluláris perifériás membrán glikoprotein, amely több extracelluláris mátrix fehérjét, például a laminineket (laminin-1, laminin-2) (Ervasti, Campbell 1993), agrint (Campanelli et al. 1994), perlekánt (Peng et al. 1998) tud – eltérő affinitással – megkötni. A β -disztroglikán egy transzmembrán glikoprotein, amely az extracelluláris oldalon képes az α -disztroglikánt a membránhoz kihorgonyozni, a citoplazmai oldalra nyúló COOH-terminálisa pedig a disztrofin fehérjecsalád tagjaival léphet kölcsönhatásba (Jung et al. 1995). A β -disztroglikán COOH-terminálisa a disztrofin WW doménjéhez tud közvetlenül kötődni. A disztrofin rokon fehérjék közül a β -DG az utrofinnal és a DRP2 fehérjével is kölcsönhatásba tud lépni, illetve a β -DG és az α -DB között is kialakulhat közvetlen kapcsolat (Chung, Campanelli 1999). Az agyi erekben, patkányban az α -DG a kapillárisok alaphártyájában, β -DG az erek körüli asztrocita végtalpakban mutatható ki (Tian et al. 1996). A disztroglikánok számos extracelluláris ligand partnerrel tudnak kölcsönhatásba lépni, ami azt mutatja, hogy ezek a fehérjék receptorként játszanak fontos szerepet, illetve hogy az alaphártya felépülésében és fennmaradásában is lényeges feladatokat látnak el. A disztroglikán gén célzott károsítására irányuló vizsgálatok szerint a disztroglikán hiánya egérben korai embrionális letalitással jár (az 5.5. embrionális napon), melynek oka az extra-embrionális alaphártya (Reichert membrán) károsodása. Ebből következik, hogy a disztroglikán nélkülözhetetlen szerepet játszik számos alaphártya felépülésében, így a túlélésben (Williamson et al. 1997).

A szarkoglikán (SG)

A szarkoglikánokat elsősorban az izomrendszerből ismerjük. A váz- és szívizomzatban a DAPC szarkoglikán-alkomplexét négy transzmembrán szarkoglikán fehérje alkotja, az α -, β -, γ -, δ -SG (Crosbie et al. 1997). Az α -SG a váz- és szívizomzatban, míg a β -, γ -, δ -SG a simaizomzatban is expresszálódnak (Barresi et al. 2000). Azonosítottak egy ϵ -SG fehérjét, ami a feltevések szerint az α -SG-t helyettesíti a simaizomban kialakuló szarkoglikán-szarkozpán komplexben (Straub et al. 1999), illetve kimutatták, hogy ez a fehérje számos szövetben előfordul, többek közt az agyban (McNally et al. 1998). Az izomrendszeren kívül a β -, γ -, δ - és ϵ -SG-t az egér retinában is kimutatták (Fort et al. 2005). Vainzof és munkatársai szerint az α -, β -, δ -SG egymással vannak kölcsönhatásban, míg a γ -SG a disztrofinnal tud közvetlenül kötést létesíteni (1999). A szarkoglikánok a DAPC membránhoz való kikötése és stabilizása mellett a sejten belüli jelátvitelben is szerepet játszanak (Yoshida et al. 1998).

A szarkoglikán génekben történt mutáció különböző típusú izomdisztrofiákat okoz (Bushby 1999) és a szarkoglikán hiánya az nNOS eltűnésével jár együtt a szarkolemmában (Crosbie et al. 2002).

A szarkospán (SS)

Expressziója főleg a váz és szívizomban kimutatható, de rövidebb formái más szövetekben is előfordulnak (Ehmsen et al. 2002). Molekulatömege 25 kDa, négy transzmembrán doménnel, sejten belüli NH₂- és COOH-terminálissal rendelkezik és a DAPC szarkoglikán-szarkospán alkompleszének tagja (Crosbie et al. 1997). A szarkospán-hiányos egér mindegyik szarkoglikánját expresszálja a szarkolemmában, és nem alakul ki izomdisztrofiája (Lebakken et al. 2000).

A szintrofin (SYN)

A szintrofin fehérjecsaládot öt fehérje alkotja: az α -, β 1-, β 2, γ 1, γ 2-szintrofin (Adams et al. 1993, Ahn et al. 1994, 1996, Piluso et al. 2000). A szintrofinok erősen konzervatív COOH-terminálisának 57 aminosava kötő helyeket biztosít a disztrofin család tagjai számára. A szintrofinok közvetlenül képesek a disztrofinhoz, utrofinhoz, DRP2-hez, α -DB1-hez, α -DB2-hez és a β -DB-hez kapcsolódni. Kimutatták, hogy a DAPC összesen négy (disztrofin és az α -DB két-két) szintrofin kötő helyet tartalmaz (Newey et al. 2000). A szintrofinok képesek jelátviteli fehérjéket, ioncsatornákat a DAPC-hez hozzákötni az izomban és az agyban. A szintrofinok kötőpartnerei lehetnek (a DAPC tagjai mellett) a feszültségfüggő Na⁺-csatorna, nNOS, aquaporin-4 ioncsatorna (Inoue et al. 2002), mikrotubulushoz asszociált szerin/threonin kinázok és mechanikailag aktivált protein kináz-3 (Hasegawa et al. 1999, Gee et al. 1998). A szintrofinok különbözőképpen oszlanak meg az izomrendszerben. Az α -szintrofin minden izomrost szarkolemmájában (szív- és vázizomban), a β 1-szintrofin gyors-összehúzódnású 2-es típusú izomrostokban (Peters et al. 1997), míg a β 2-szintrofin a vázizomban a neuromuszkuláris junkciók szubneuronális oldalán található meg (Peters et al. 1994). Az α -szintrofin az izomszövetben a szarkolemmában az nNOS és az aquaporin-4 ioncsatorna megfelelő lokalizációjához járul hozzá. A neuromuszkuláris junkció szubneuronális oldalán pedig az acetilkolin receptorok és acetilkolin-észteráz lokalizációjához elengedhetetlen (Adams et al. 2000, 2001). Az α - és β -szintrofin a központi idegrendszerben szinapszisok posztzinaptikus denzitásaiban található meg nagy mennyiségben (Roberts. 2001), ahol az α -szintrofin, a β -disztrobrevinnel és a Dp427-el DAPC-t alkotva képes az nNOS-t posztzinaptikus oldalhoz kihorgonyozni (Blake et al. 1999). Inoue és munkatársai kimutatták, hogy az α -szintrofin és az aquaporin-4 ioncsatorna kolokalizálódik az agyi erek körüli asztrocita végtalpokban (2002). Szintrofin mutációval kapcsolatban nem ismerünk humán betegségeket. Az α -SYN hiányos egérben nem alakul ki izomdisztrofia, de ezekben az állatokban a neuromuszkuláris junkciók abnormálisak, csökken az acetilkolin receptorok és az acetilkolin észteráz enzim szintje a szarkolemmában és csökken az utrofin mennyisége a neuromuszkuláris junkcióban (Adams et al. 2000). Ezen kívül az nNOS és az aquaporin-4 is hiányzik ezen állatok szarkolemmájából (Kameya et al. 1999).

2.9. A DAPC-hez kötődő extracelluláris mátrix fehérjék

Az extracelluláris mátrix egyes tagjai kölcsönhatásba tudnak lépni a DAPC-vel.

Lamininek

A lamininek nagy méretű glikoproteinek, melyek az alaphártyák integráns részei. A lamininek α -, β -, γ -alegységekből felépülő heterotrimer felépítésű extracelluláris mátrix fehérjék, melyek egy nehéz- és két könnyű-láncból épülnek fel, és egy hosszú kart, illetve három rövid kart alkotnak. A lamininek szerkezetileg egymástól alegység összetételben térnek el (Engvall et al. 1990, Cheng et al. 1997, Tisi et al. 2000). A lamininek számos biológiai folyamatban részt vesznek, mint például a motilitás, proliferáció, differenciáció, stb. A lamininek más extracelluláris fehérjékkel is kölcsönhatásba tudnak lépni, így összekötő szerepük miatt fontos játszanak az alaphártyák kialakulásában. A disztrofin-asszociált fehérjekomplex szempontjából a laminineknek az a jelentősége, hogy több laminin forma képes hozzákapcsolódni a DAPC α -disztroglikánjához, és ha ez megtörténik, akkor ez sejten belül jelátviteli utakat aktivál (Zhou et al. 2005). Oak és munkatársainak (2003) eredményei szerint ha a szarkolemma sejten kívüli oldalán a laminin hozzákötődik az α -DG-hoz, akkor a Grb2 molekula a szarkolemma sejten belüli oldalán kapcsolódik a szintrofinhoz, ez a szintrofin tirozinjának foszforilációját okozza, ami a sejten belüli jelátviteli út beindulását eredményezi. A laminin egyik doménje az α -disztroglikánhoz képes kötni, így az α -DG laminin receptornak minősül. Ezt támasztja alá az is, hogy olyan antitest, ami az α -DG-hez való kötődés által blokkolja a laminin kapcsolódását, megakadályozza a szintrofin foszforilációt és ezáltal a jelátviteli út beindulását (Zhou et al. 2006).

Agrinok

Az agrinok az alaphártyában előforduló proteoglikánok, melyek képesek az α -disztroglikánon és a laminin-1-en keresztül a DAPC-hez kötődni különböző szövetekben (Gesemann et al. 1998, Cotman et al. 1999). Az agrin a neuromuszkuláris junkcióban is jelen van, ahol az ingerület-átvivő molekula az acetilkolin. Itt a motorneuronok által kiválasztott agrin szerepet játszik a diffúz nikotinos acetilkolin receptorok aggregációjának elősegítésében az idegsejt axon terminálisával szemközti oldalán (McMahan, 1990). Az agrin hiányában a posztszinaptikus differenciáció zavart szenved (Gautam et al. 1996). Az a felfedezés azonban, hogy az acetilkolin receptorok csoportosulása az agrin hiányos mutáns állatban, sőt neuronok nélküli izomban is kialakul, új kérdéseket vetett fel. Valószínűbbnek látszik, hogy az agrin elsődlegesen abban játszik szerepet, hogy a meglévő acetilkolin receptor csoportok szétvándorlását megakadályozza, ezáltal a junkció fenntartását segítse elő (Kummer et al. 2006).

2.10. Az agyban előforduló DAPC komplexek

Vajon mi a szerepe a disztrofin fehérjének az idegrendszerben?

Mivel a Duchenne-féle izomdisztrófiaklinikai megjelenésében idegrendszeri tünetek is megjelenhetnek, ezért feltehető, hogy a disztrofin az idegrendszerben a DAPC részeként -az izomrendszerben betöltött

szerepéhez hasonlóan- fiziológias feladatokat lát el. A disztrofin-asszociált fehérjekomplexek létezéséről, fehérje összetételéről és lokalizációjáról az agyban azonban még keveset tudunk. Az bizonyított, hogy a disztrofin mellett számos DAPC fehérje van jelen a központi idegrendszer ideg- és gliasejtjeiben, melyek az izomban megismert módon kölcsönhatásba léphetnek egymással, kialakítva ezzel különböző disztrofin-asszociált fehérjekomplexeket (Peters et al. 1997, Blake et al. 1998, 1999, Zaccaria et al. 2001, Levi et al. 2002).

2.10.1. DAPC az idegsejtben

Az agyban a disztrofin fehérjék közül legnagyobb mennyiségben a Dp71 van jelen, de kisebb mennyiségben a Dp427 és a Dp140 is kimutatható. A Dp71 és a Dp427 fehérjéket idegsejtek szinapszisainak posztszinaptikus denzitásban (PSD) lokalizálták (Lidov et al. 1990, Kim et al. 1992). Ezek a disztrofinok feltételezhetően fontos szerepet játszanak a szinapszisok felépülésében és működésében. A Dp 140 gliasejtben lokalizálódik, de az idegsejtben nem fordul elő (Lidov et al. 1995). Az disztrofinhoz kötő DAPC fehérjék közül a disztroglikán idegsejtben és gliasejtben is expresszálódik. Zaccaria és munkatársai a disztroglikánokat számos agyterületen szinapszisok posztszinaptikus denzitásában mutatta ki (2001). Blake és munkatársai β -disztrobrevint idegsejtben lokalizálták, ahol elsősorban a PSD-ban jelent meg nagy mennyiségben (1998, 1999). Mivel Blake kutatócsoportja a 427 kDa molekulatömegű disztrofin és a β -disztrobrevint hasonló neuron szubpopulációban mutatta ki a hippocampusban és az agykéregben, ezért feltételezik a közvetlen kapcsolatot a két fehérje között is (1998). A β -DB szintrofinnal is kolokalizálódik (Peters et al. 1997). Az agyi idegsejtek membránjában kialakuló egyik fajta DAPC felépítésében, Blake és munkatársai szerint, a 427 kDa molekulatömegű disztrofin, a β -DB, és a szintrofin vesz részt. Ehhez nNOS is kapcsolódik a PSD-ben (1999). Grady és kutatócsoportja kimutatta, hogy az α -DB, β -DB, és a disztrofin a kisagy Purkinje idegsejtek gátló szinapszisaiban koncentrálódik és kulcsszerepet játszik az ott kialakuló DAPC felépítésében. Ez a komplex a GABA_A receptor csoportok integritásának biztosításához szükséges a posztszinaptikus oldalon (2006). Levi és munkatársai bebizonyították, hogy hippocampalis sejt kultúrában az α -, β -disztroglikánból, a 427 kDa molekulatömegű, illetve rövidebb disztrofin izoformákból összeálló DAPC gátló GABAerg idegsejtek egy részhalmazának szinapszisaiban található meg, de csak a sejtenyésztés késői szakaszában (2002).

2.10.2. DAPC a gliasejtben

Az idegrendszer gliasejtjeiben különböző fehérje összetételű disztrofin-asszociált fehérjekomplexek alakulnak ki. Vannak olyan DAPC fehérjék, amelyek kizárólag gliasejtben expresszálódnak. Ilyen a Dp140 (Lidov et al. 1995) és az α -DB1, melyek szintén csak gliasejtben találhatóak meg, mint a perivaszkuláris asztrogliában és a Bergmann gliában. Blake és munkacsoportja kimutatta, hogy bár hasonló a lokalizációjuk, a Dp140 az α -DB1-el, vagy az utrofinnal mégsem kapcsolódik össze, velük nem képez fehérjekomplexet (1999). Az idegsejtek nyúlványait körbevevő Schwann sejtek membránjában megtalálható egy olyan DAPC, melynek felépítésében a Schwann sejtre specifikus

disztrofin izoforma, a Dp116, az α -, β -DG, és a laminin-2 vesz részt (Saito et al. 1999). A patkány retina Müller gliasejtjeiben expresszálódik a Dp71, utrofin, illetve számos más DAPC fehérje is, mint a β -disztroglikán, a γ -, δ -szarkoglikán, és az α 1-szintrofin. Claudepierre és munkatársai kimutatták, hogy a Müller gliasejtekben kialakuló DAPC felépítésében a Dp71 és/vagy utrofin, a β -disztroglikán, a δ -szarkoglikán és az α 1-szintrofin vesz részt. Bebizonyították, hogy a β -disztroglikán kölcsönhatásba tud lépni az α -disztrobrevin-1-el, illetve az α -szintrofinnal. Továbbá, hogy a Müller sejtben a Dp71 és/vagy az utrofin az aktinhoz, az α -disztroglikán pedig a lamininhoz tud hozzákapcsolódni (2000). Kiemelt jelentőségű az agyi kapillárisok körüli gliasejtben kialakuló DAPC, amely a vér-agy gát kialakulásában játszik szerepet.

2.10.3. DAPC a vér-agy gátban

A vér-agy gátat az agyi kapillárisok endotélsejtjei, a kapillárisokat kívülről körülvevő asztrociták végtalpai és a köztük lévő közös alaphártya képezi. Az agyi kapillárisok endotélsejtjei között zonula occludens, azaz szoros kapcsolat (tight junction) alakul ki. Ezek a struktúrák olyan közel tartják egymáshoz a sejteket, hogy megakadályozzák köztük a molekulák átjutását. Számos kutatás kimutatta, hogy a disztrofin, és egyes disztrofin rokon fehérjék az agyban a kapillárisok körüli asztrocitákban DAPC-ket alakítanak ki. A komplexek szerepe feltehetően az, hogy stabilizálja a permeabilitási barriert az agyi keringési rendszerben, hozzájárulva ezáltal a vér-agy gát kialakulásához és működéséhez.

A disztrofin fehérjék közül a Dp71 (Blake et al. 1999, Haenggi et al. 2004) és a Dp140 (Lidov et al. 1995), illetve az utrofin (Khurana et al. 1992) a központi idegrendszer erek körüli gliasejtjeiben is megtalálhatóak. Kutatócsoportunk korábban az agyi kapillárisok körüli asztrocita végtalpakban immunpozitivitást mutatott ki egy, az összes disztrofin fehérjét kimutató ellenanyag segítségével (Jancsik, Hajós 1999). Szabó és munkatársai pedig -a saját kutatásainkban is használt- 5F3 jelű, kizárólag a Dp71f izoformát felismerő ellenanyag segítségével az erek körüli asztrocitákban lokalizálta ezt a disztrofin izoformát. Megállapították, hogy az immunpozitivitás csak bizonyos asztrocita szubpopulációkban megfigyelhető (2004). Több DAPC-t felépítő fehérje, mint például a disztroglikán (Tian et al. 1996, Zaccaria et al. 2001), a disztrobrevinek (Blake et al. 1999, Haenggi et al. 2004), és az extracelluláris mátrix egyes elemei, a laminin-2 (Jucker et al. 1996) és az agrin (Barber, Lieth 1997) szintén az agyi erek körüli gliasejtben expresszálódnak és nagy valószínűséggel részt vesznek az itt kialakuló DAPC-k felépítésében (Blake et al. 1999). A β -DB agyi erekben való megjelenésével kapcsolatban az irodalomban ellentmondó adatok találhatóak. Blake munkacsoportja szerint ez a disztrobrevin fehérje kizárólag neuronokban expresszálódik (1998, 1999), míg Grady és munkatársai a β -DB az agyi erek falában is lokalizálta (2006). Az agyi víz-homeosztázis kialakulásában szerepet játszó aquaporin-4 vízcsatorna szintén az agyi erek körüli asztrocita végtalpakban lokalizálódik, ahol valószínűleg a DAPC-vel áll kölcsönhatásban (Neely et al. 2001). Bragg és munkatársai kutatásai szerint vér-agy gátban a disztrofin, az α -DB2, és a γ 2-szintrofin az α -szintrofinnal alkot komplexet a kapillárisok körüli glia végtalpakban, míg a β 1-szintrofin, β 2-szintrofin az utrofinnal építi fel a DAPC-t az endotélsejtben (2006). Blake és kutatócsoportja pedig kimutatta, hogy az agyi kapillárisok körüli asztrocitákban főleg a Dp71, az α -DB1 és a szintrofin vesz részt a DAPC felépítésében. Kisebb mennyiségben előfordul egy olyan komplex is, melynek felépítésében az utrofin és az α -DB1

vesz részt (1999). Ueda és kutatócsoportja az α - és a β -disztrobrevint együtt felismerő ellenanyag segítségével a disztrobrevineket az erek körüli asztrocitákban és az endotélsejtekben is lokalizálta patkányok kisagyában (2000). Haenggi és munkatársai három különböző disztrofin-asszociált fehérjekomplexet azonosított: az egyik felépítésében a Dp71 vesz részt, ez a komplex a vér-agy gát egyik komponensében, az erek körüli glia végtalpakban mutatható ki, a másik a Dp71 helyett utrofint tartalmaz és a vér-agy gát másik komponensében, erek endotélsejtjeiben lokalizálódik, míg a harmadik komplex szintén utrofint tartalmaz és a choroid plexus bazolaterális membránjában található (2004).

2.10.4. DAPC a disztrofinhiányos egerek vér-agy gátjában

A humán Duchenne-féle izomdisztrófia modelljeként használt *mdx* egerekben kimutatták, hogy az agyi erekben az endotél és az asztrocita sejteket, így a vér-agy gátat érintő károsodások lépnek fel. A szoros kapcsolatok kinyílása, az erek körüli asztrocita nyúlványok megduzzadása, a szoros kapcsolathoz asszociált fehérjék és az aquaporin-4 ioncsatorna lecsökkent expressziója figyelhető meg (Nico et al. 2005). *Mdx^{βgeo}* egerekben végzett kísérletekben szintén az aquaporin-4 ioncsatornák mennyiségének erőteljes lecsökkenése volt megfigyelhető az erek körüli asztrocita végtalpakban, amit feltételezhetően az ioncsatornák kötőhelyeinek hiánya okozott (Vajda et al. 2002). Mindezek a változások arra utalnak, hogy az *mdx* egerek szervezetében és feltehetően a DMD betegekben is a vér-agy gát működése is zavart szenved.

2.11. A DAPC egyéb szöveti gátakban

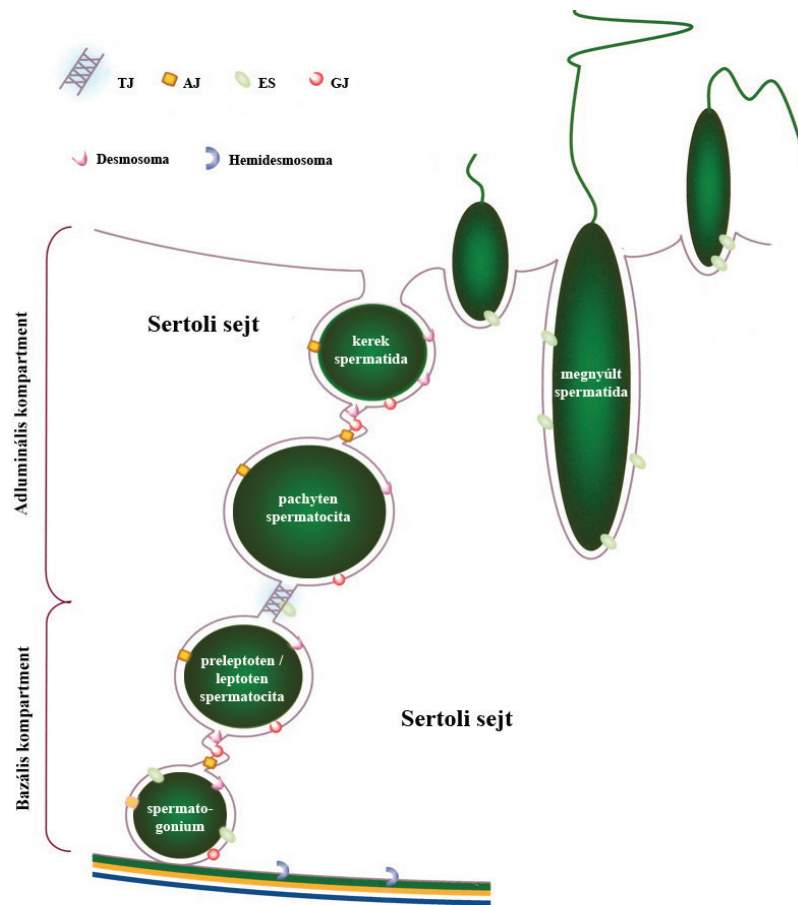
A vér-here gát

A vér-here barriereknek az a fiziológiai szerepe, hogy kompartmenteket választ el a spermatogenezis helyszínén, azaz a here kanyarultos herecsatornácskák epitéliumában, a csírahámban. A bazális és az adluminális kompartmentet a nyúlványaikkal érintkező Sertoli sejtek választják el egymástól (6A ábra). A csírahám bazális kompartmentjében találhatjuk a spermatogoniumokat, melyekből osztódással diploid primer spermociták, majd a meiózis során szekunder spermociták alakulnak ki. Az érés alatt a szekunder spermocitáknak megváltozik az antigén szerkezete és ezért ezeket a sejteket az immunrendszer testidegenként ismerheti fel. A meiotikus osztódásuk folyamán a leptotenből a pachyten meiotikus stádiumba lépő spermocita sejtek képesek átjutni a here epitéliumának adluminális kompartmentjébe. A vér-here gáton átjutott sejtek spermátidákká, később spermiumokká alakulnak. A vér-here gát a csírahám kompartmentjeinek szétválasztása révén a keringéstől elzárt speciális mikrokörnyezetet biztosít a fejlődő hímivarsejtek számára. Az immunológiai határként betöltött szerepe mellett a gát kis molekulák mozgását is szabályozza a két oldal között. A vér-here gát különlegessége az, hogy ez egy bazálisan található dinamikus struktúra, melynek periódusosan ki kell nyílnia a csírasejtek migrációja miatt (Cheng, Mruk 2002, Mruk, Cheng 2004). Az emlős herében a vér-here gát kialakulásában specializált szoros kapcsolatok és adherens kapcsolatok (adherens junction) vesznek részt. A herében a szoros kapcsolatok a csírahám alaphártyájának közelében, a Sertoli sejtek között alakulnak ki. Ezek a sejtkapcsoló struktúrák a sejteket annyira szorosan tartják, hogy a transzport folyamatok a sejtek között nem zajlanak, legfeljebb csak a sejteken át történhetnek

meg. A szoros kapcsolatok mellett a Sertoli sejtek, illetve a Sertoli sejtek és a spermatidák között adherens kapcsolatok is kialakulnak. A herében a speciális adherens kapcsolatokat ektoplazmatikus specializációknak nevezzük (ES). Az ES csak a herére jellemző sejt-sejt közti aktin-alapú adherens kapcsolat. Egyik típusa a Sertoli sejtek között kialakuló bazális ektoplazmatikus specializáció, a másik a Sertoli sejtek és a spermatidák közötti apikális ektoplazmatikus specializáció (Mruk, Cheng 2004). Bazális ES, a szoros kapcsolatokkal együtt a vér-here gát kialakításában vesz. Az apikális ES szerepe pedig a vér-here gát kialakítása mellett az, hogy megkönnyítse a spermatidák átjutását a csírahámon. Az apikális ES részt vesz a spermatidák Sertoli sejtekhez való hozzákapcsolásában, mielőtt azok a fejlődés következő szakaszában a herecsatorna lumenjébe kerülnének ki (Vogl et al. 2000, Cheng, Mruk 2002). Az apikális ES-t a Sertoli sejt plazmamembránja, az endoplazmatikus retikulum ciszternái és a köztük található hexagonális aktin gomolyag réteg alkotja. Az ektoplazmatikus specializáció tehát kulcsszerepet játszik a csírasedjtek fejlődésében, a sejtek mozgásában és orientációjában a spermatogenezis során, illetve alapvető szerepe van a vér-here gát kialakításában. Lien és munkatársai egérben kora embrionális kortól kezdve (E13,5) α -DB jelölést mutattak ki a herében, és az erős immunjelölés megmaradt az általuk vizsgált fejlődési szakaszokban is (2004).

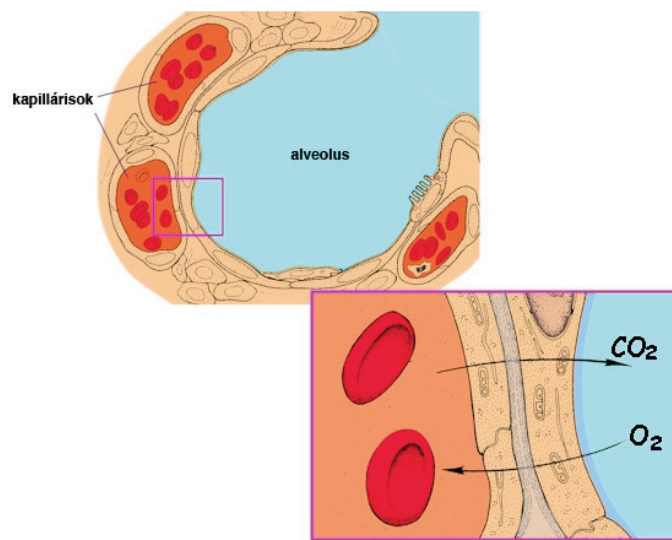
A vér-levegő gát a tüdőben

A vér-levegő barrier egy extrém módon vékony és erős szöveti gát, ami a tüdő alveolusaiban található és feladata a légzési és a keringési rendszer elválasztása (West, Mathieu-Costello 1999). Az alveolus-kapilláris barrier két vékony sejtréteg, a kapilláris endotéliuma, az 1-es típusú alveoláris epitelsejt, illetve a köztük lévő közös alaphártya alkotja (6B ábra). Ezen a barrieren keresztül zajlik a gázcsere a tüdőben. A vér-gáz gát erősségének fenntartásában elsősorban a két sejtípus közti extracelluláris mátrixban lévő közös alaphártyájuk felelős, ahol a kollagén IV-nek van kulcsszerepe (Maina et al. 2005). A tüdőben számos DAPC fehérje jelenlétét kimutatták. Durbeej és Campbell a tüdőben kétféle sejt-kompartimentben két eltérő összetételű DAPC-t azonosított. A simaizomban felépülő komplex tagjai a disztroglikán, disztrofin/utrofin, β -, δ -, ϵ -szarkoglikán és a szarkoszpán fehérjék, míg az epiteliális sejtekben a disztroglikán és az utrofin kolokalizálódik, de a komplex felépülésében a szarkoglikánok, és a szarkoszpán nem vesznek részt (1999). Az α -DB transzkriptumot már 1999-ben detektálták a felnőtt tüdőben (Holzfeind et al. 1999). Az α -DB fehérjét megtalálták a fejlődő tüdőben is (Lien et al. 2004) és a β -DB-t is megtalálták a tüdőben (Blake et al. 1998), de a fehérjék pontos lokalizációját még nem tisztázták. Jones és munkatársai a disztroglikánok jelenlétét a tüdő alveoláris epitelsejtjeiben mutatták ki (2005), míg egy másik kutatócsoport feltételezése szerint a tüdőben a DAPC képes a jelátviteli kaskád számos tagjával kölcsönhatásba lépni (Spence et al. 2004). Mivel egyes DAPC fehérjék a vér-here gátban és a vér-levegő gátban is lokalizálódnak, ezért feltételezhető, hogy hasonlóan a vér-agy gáthoz, ezekben a struktúrákban is felépülhetnek disztrofin-asszociált fehérjekomplexek.



6A. ábra A here csírahám sematikus rajza.

A vér-here gát felépítésében, kialakulásában a Sertoli sejtek között lévő specializált szoros kapcsolatok és adherens kapcsolatok vesznek részt. A kanyarulatós herecsatornácskák csírahámjában kialakuló vér-here gát szerepe az, hogy a here bazális és adluminális kompartmentjét egymástól elválassza. Rövidítések: TJ: tight junction, AJ: adherens junction, ES: ektoplazmatikus specializáció, GJ: gap junction (Mruk, Cheng 2004 alapján)



6B. ábra A vér-levegő barrier sematikus rajza.

A vér levegő gát az alveolus falában alakul ki, ahol a gázcseré megvalósul. A gátat a kapillárisok endotéliuma, az alveolus belső falát képző alveoláris epitélsejtek és a köztük lévő közös alaphártya alkotja. (<http://www.nurseminerva.co.uk/respire.html> alapján)

Célkitűzések

I. Az agyban leggyakrabban előforduló disztrofin, a Dp71 egyik splice-variánsának, a Dp71f fehérjének ultrastrukturális lokalizálása patkány agyban.

II. Az α -disztrobrevin fehérje kimutatása gliasejtekben vad típusú és disztrofin hiányos $mdx^{\beta geo}$ egér agyában, az agyi erekben. Egyes DAPC fehérjék, mint a β -DB és az utrofin kolokalizációjának vizsgálata α -DB-el gliasejtekben vad típusú egér agyi ereiben.

III. Miután az α -DB fehérjét idegsejtekben is sikerült kimutatnunk a laterális hypothalamus területén, ezért célul tűztük ki annak kiderítését, hogy az α -DB fehérjék közül mely izoformák lokalizálódnak az idegsejtekben a vad típusú és disztrofin hiányos $mdx^{\beta geo}$ egér agyában.

IV. A hypothalamus idegsejtjeiben kimutatott α -DB2/ α -DB4 kolokalizációjának vizsgálata β -DB, utrofin fehérjével, illetve a hypothalamusban termelődő egyes neuropeptidekkel, mint a galaninnal, neuropeptid Y-al, melanin koncentráló hormonnal és a neuronális nitrogén-oxid szintetázzal, vad típusú és disztrofin hiányos $mdx^{\beta geo}$ egér agyában.

V. Az α -DB fehérje lokalizációja egyes szöveti gátaikat képző szervekben, a vad típusú egér heréjében és a tüdejében.

3. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

A kísérletekben 250-350 grammos felnőtt, hím Wistar patkányokat, és 20-30 grammos felnőtt, hím *mdx^{geo}* transzgenikus, illetve C57BL/6 vad típusú egereket használtunk. Minden kísérletet legalább háromszor ismételtünk meg. Az állatokat 12/12 órás világos/sötét fényciklusú helységben tartottuk, vizet és normál rágcsálótápot ad libitum kaptak. Az állatok tartása, kezelése megfelelt a magyar (243/1998-as Állatvédelmi Törvény) és az európai (European Communities Council Directive, 86/609 EEC) előírásainak. A kísérleteket a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Állatkísérleti Etikai Bizottsága engedélyezte.

3.2. Transzkardiális perfúzió

Az állatokat mély altatásban transzkardiálisan perfundáltam. A szív bal kamráján át bevezetett kanül segítségével az érrendszert először fiziológiás sóoldattal mostam át, majd ezután Zamboni-féle fixálót juttattam be az állatok keringési rendszerébe. A Zamboni-féle fixáló összetétele: 4% paraformaldehid, 0,05% glutáraldehid, 16% telített pikrinsav, 0,1 M, pH 7.4 foszfát pufferben (PB).

3.3. Immunhisztokémiai és immuncitokémiai szövettani módszerek

A vizsgálatok során immunhisztokémiai és immuncitokémiai módszerek segítségével mutattam ki az egyes disztrofin, illetve disztrobrevin fehérjék lokalizációját különböző szervekben. Az úgynevezett avidin-biotin-peroxidáz módszer lényege az, hogy a fixált majd megfelelő vastagságúra lemetszett szövetet a keresett fehérjére specifikus primer ellenanyaggal inkubáljuk, majd miután az ellenanyag a keresett antigénhez hozzákötődött, a primer ellenanyag konstans régióját felismerő, biotinnal jelölt szekunder ellenanyaggal reagáltatjuk. A következő lépésben a biotinhoz avidinen keresztül biotinilált peroxidáz enzimet kapcsolunk. Ez a lépés a jel erősítését szolgálja. A peroxidáz enzim működését szubsztrát és csapadék képző anyag, 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB) hozzáadásával megindítjuk, és a keletkezett csapadékot detektáljuk, így láthatóvá válik a keresett fehérje pontos lokalizációja. Ezt a módszert a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok során használtam. A fluoreszcens kísérleteknél a második lépésnél a primer ellenanyag konstans régiójához fluorokrómmal jelölt szekunder ellenanyagot kötöttem, melyet aztán a fluoreszcens mikroszkóp segítségével lehetett detektálni.

3.3.1. Korrelált fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok

A perfúzió után az agyat, illetve az egyéb vizsgálandó szerveket Zamboni oldatban további két órán át szobahőmérsékleten utófixáltam. Az így fixált szervekből 50-80 µm-es metszeteket (az agyból koronális metszeteket) készítettem Pelco 101 típusú vibratom segítségével. A metszeteket a kísérlet

alatt végig 0.1 M PB-vel (pH 7.4) mostam. A szövetszeleteket az aldehidek maradékának eltávolítása érdekében 1% nátrium-borohidriddel 30 percig inkubáltam, majd az endogén peroxidáz aktivitást blokkoltam 15 perces, 2%-os hidrogén-peroxidázzal való kezeléssel. Az ellenanyag megfelelő penetrációjának biztosításához szükséges a szeletek folyékony nitrogénben való lefagyasztása. A károsodások elkerülésének érdekében a szeleteket egy éjszakán át, vagy amíg a szeletek az oldatban le nem süllyedtek, 25 %-os szaharózt és 8,7% glicerint tartalmazó PB-ben tartottam + 4°C-on. A folyékony nitrogénben történt lefagyasztás után a szeleteket PB-ben mostam, majd az antitestek nem specifikus kötésére hajlamos kötőhelyeit blokkoltam 5%-os, PB-ben oldott szarvasmarha szérumalbuminnal (BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma gyártmány) egy éjszakát át. Primer antiszérumként a Dp71-re specifikus monoklonális 5F3-t (Dr D. Mornet bocsátotta rendelkezésünkre, Fabbrizio et al. 1994), illetve az α -DB-1-et, α -DB2-t, és az α -DB4-et felismerő kecskében termeltetett specifikus poliklonális V-19 ellenanyagot (Santa Cruz Biotechnology) használtam. Az 5F3 ellenanyagot 1:10 arányban, az α -DB ellenanyagot pedig 1:1000 arányban hígítottam 0,5% BSA-t tartalmazó PB-vel, majd a szeleteket három éjszakán keresztül + 4 °C-on rázógépen inkubáltam. A nem kötődött ellenanyagot PB-vel való mosással távolítottam el. Szekunder ellenanyagként biotinilált anti-egér (Vector gyártmány, 1:200 hígításban), illetve biotinilált anti-kecske szérumot használtam (Amersham gyártmány, 1:200 hígításban, mindkettő PB-ben hígítva, egy éjszakán át inkubálva + 4 °C-on). A PB-vel végzett mosás után az ABC-kitben forgalmazott (Vector gyártmány) avidin-biotinilált peroxidáz komplexel inkubáltam a kezelt szeleteket (1:200 hígítás PB-ben, 2 óra szobahőn). Ezt követően alapos mosásra került sor, PB-ben. Az immuncsapadék képzése céljából a peroxidáz szubsztrátjaként DAB-ot és hidrogén-peroxidot használtam. A szeletekre DAB oldatot tettem (50 mg/100 ml koncentrációban), ezután 0,01 % hidrogén-peroxid adásával elindítottam az enzimreakciót, és azt mindaddig hagytam lejátszódnia, míg a szeletek határozott barnulását észleltem (3-5 perc). Ezután PB-vel kimostam a felesleges reagenseket. Kontroll mintákat is készítettem, ezeknél a primer ellenanyag helyett 0,5% BSA-t tartalmazó PB-vel való inkubálást alkalmaztam, a többi lépésben nem volt különbség. A fénymikroszkópos vizsgálatok céljára az így előhívott metszeteket desztillált vizes öblítés után zselatinózott tárgylemezekre húztam, és a felszálló alkoholsorban történt víztelenítés után DEPEX lefedőanyag (Fluka gyártmány) alkalmazásával fedőlemezzel lefedtem.

Az elektronmikroszkópos megfigyelés céljából az immunreakció lezajlása után utófixálást végeztem 1% ozmium-tetroxidban (Merck gyártmány), elszívó fülkében, szobahőmérsékleten 30 percig. A metszeteket ezután felszálló alkoholsorban (50-70-90-100%-os etanol, mindegyikben 10 perc) végül propilén-oxidban (20 perc) víztelenítettem. A 70%-os etanolban való inkubálás után végeztem el az első kontrasztosítási lépést, ami 30 perces, 70% etanolban oldott 1%-os uranil-acetátos, sötétben végzett kezelést jelentett. Az uranil-acetát 70% etanollal való leöblítése után folytattam a víztelenítést. A mintákat ezután Durcupan ACM epoxy gyantába (Fluka gyártmány) ágyaztam. A metszeten való tájékozódás megkönnyítése céljából a „lapos beágyazás” módszerét alkalmaztam. A víztelenített mintákat 30 percig inkubáltam Durcupan/propilénoxid 1:1 arányú keverékében, majd a mintákat egy éjszakára Durcupanba helyeztem. A gyantával átítatott metszeteket fapálcikák segítségével tárgylemezre tettem, majd fedőlemezzel lefedtem, és a gyanta polimerizálódásának érdekében két napra 56 °C-os termosztátba raktam. Az így előkészített minta fénymikroszkóppal vizsgálható, a

keresett struktúra kiválasztható. A megfelelő orientációjú és a vizsgálatra alkalmas metszeteket ezután blokkokba ágyaztam át, a következő módon. A vékony Durcupan lapba ágyazott mintából a keresett metszetrészt szikével kivágtam és azt laposan egy újabb tárgylemezre helyeztem, majd erre egy kb. 1 cm magas, 8-10 mm átmérőjű műanyag hengert állítottam. A hengert Durcupannal feltöltöttem, a tetejére egy fedőlemezt helyeztem, majd két napra 56 °C-os termosztátba tettem. A tárgylemez, a fedőlemez és a műanyag henger eltávolítása után rendelkezésemre állt az ultramikrotómos metszetkészítésre alkalmas blokk. Ezekből a blokkokból Reichert Ultracut2 ultramikrotóm segítségével készítettem el a 60-70 nm vastagságú ultravékony metszeteket, amelyeket Formvar hártárával bevont egylyukú, vagy rácsos rézgridekre (Sigma) húztam fel, majd ólom-nitráttal (133 mg/5 ml koncentrációban, Analar gyártmány) kontrasztoltam. E célból az ólom-nitrátot egy Petri csészében lévő Parafilmre cseppentettem, majd a grideket a metszetet tartalmazó oldalával erre a csepre helyeztem, a Petri csészét lezártam, majd 1 perc után a grideket desztillált vízzel leöblítettem. Az így elkészített mintákat JEOL JEM 1011B elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltam és fotóztam.

3.3.2. Fluoreszcens mikroszkóppal végzett egyszeres és többszörös jelöléses vizsgálatok

A túlaltatott és transzkardiálisan perfundált $mdx^{beta_{geo}}$ és C57BL/6 típusú egerekből eltávolított agyagból a posztfixálás után vibratómmal 40 μ m-es koronális metszeteket készítettem. A szabadon úszó metszeteket 0.1 M PBS mosás után immunhisztokémiai módszerrel jelöltem. Első lépésben az anyagot 20% normál kecske szérummal inkubáltam egy éjszakán át, + 4°C-on, azért, hogy a nem specifikus antigén kötődését blokkoljam. Ezután a primer ellenanyagokkal való kezelés következett, 3 éjszakán keresztül, + 4°C-on. A használt primer ellenanyagok: α -DB: kecske poliklonális ellenanyag (V-19, Santa Cruz Biotechnology), 1:100 titerben hígítva, MCH: nyúl poliklonális ellenanyag (H070-47, Phoenix Pharmaceuticals), 1:100 titerben hígítva, NPY: nyúl poliklonális ellenanyag (Calbiochem), 1:80 titerben hígítva, ncNOS (NOS1): egér monoklonális ellenanyag (sc5302, Santa Cruz Biotechnology), 1:50 titerben hígítva, galanin: nyúl poliklonális ellenanyag (PEPA31, Serotec), 1:80 titerben hígítva, utrofin: egér monoklonális ellenanyag ((NCL-DRP2, Novocastra) 1:5 titerben hígítva. A primer ellenanyagokat 0.5% Triton X-100-at tartalmazó 0.1 M PBS-ben hígítottam fel. Alapos 0.1 M PBS-es mosás után a fluorokrómokkal jelölt szekunder ellenanyagokkal való inkubálás lépése következett, ami szobahőn 3 órát tartott. A használt szekunder ellenanyagok: FITC-konjugált szamár anti-kecske IgG, 1:50 titerben hígítva és Cy3-konjugált szamár anti-nyúl IgG, 1:100 titerben hígítva (Jackson Laboratories) illetve Texas Red-konjugált anti-egér IgG, 1:50 titerben hígítva (Vector Laboratories). A kettős fluoreszcens jelölések esetén a két primer, illetve a két szekunder ellenanyaggal egyszerre inkubáltam az agyszeleteket. Végül a 0.1 M PBS-es mosás után a szeleteket tárgylemezre húztam és lefedő médium (Sigma gyártmány) segítségével fedőlemezzel lefedtem őket. Az így elkészített mintákról fényképeket készítettem. A kettős immunfluoreszcens reakció lejátszódása után a fluoreszcens mikroszkópban (Zeiss Axiophot típus) ugyanarról az agyterületről először az egyik, majd a másik fehérjéhez kapcsolt fluorokrómra jellemző gerjesztési hullámhosszt használva a kétféle szűrővel elkészített képeket egymásra vetítettem (Photoshop segítségével), hogy az esetleges kolokalizációt bizonyíthassam.

3.3.3. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

Angliai kollaborációs partnerünk, Dr. Darek Gorecki és munkatársai a konfokális mikroszkópos kettős jelöléses vizsgálatokat az általunk lemetszett és az azonosítás után kiküldött egér agy metszeteken végezte el LSM 510 META konfokális mikroszkóp segítségével (Carl Zeiss, Jena, Németország). A használt ellenanyagok: az α -DB-ek kimutatására a V19 (Santa Cruz Biotechnology), amely az α -DB1-et, az α -DB2-t és az α -DB4-et is felismeri, az α -DB1 kimutatására az α 1-CT-FP (Blake et al. 1998), a β -DB kimutatására a β -521 (Blake et al. 1998) és az utrofin kimutatására a Mupa-2, amely az Up71-en kívül az összes utrofint felismeri (Jimenez-Mallebrera et al. 2003). A 18. ábrán látható fehér színű magfestés a Topro3 (Molecular Probes, Inc. Eugene, Or) reagenssel történt.

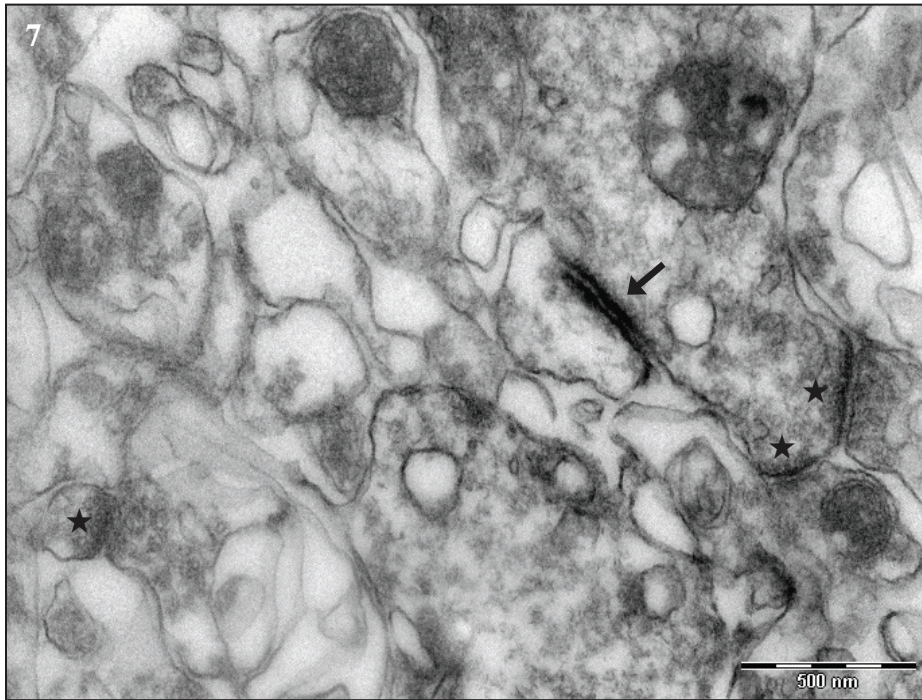
4. EREDMÉNYEK

4.1. A Dp 71 lokalizációja az agyban

A Dp71 ultrastrukturális szinten való lokalizációja fontos lépés annak a kérdésnek a tisztázásában, hogy az agyban milyen disztrofin-asszociált fehérjék alkotnak komplexet. A disztrofin fehérjék közül a központi idegrendszerben a Dp71 van jelen legnagyobb mennyiségben. A Dp71f izoforma COOH-terminálisának szerkezete eltér a többi disztrofinétól, ami megkönnyíti a kimutatását. Kísérleteinkben a Dp71f fehérjét felismerő monoklonális 5F3 ellenanyagot használtuk (Fabrizio et al. 1994), és a patkány hippocampusban végeztünk vizsgálatokat. Ez az agyterület a központja a primer információ feldolgozásának, kapcsolatban áll a memóriával, és valószínűleg a Duchenne-féle izomdisztrófia betegségben is érintett. A hippocampuson belül a CA3-as régió stratum lucidum rétegét választottuk, ahol a hippocampuson belüli információ átadási rendszer kapcsolatai nyomon követhetők.

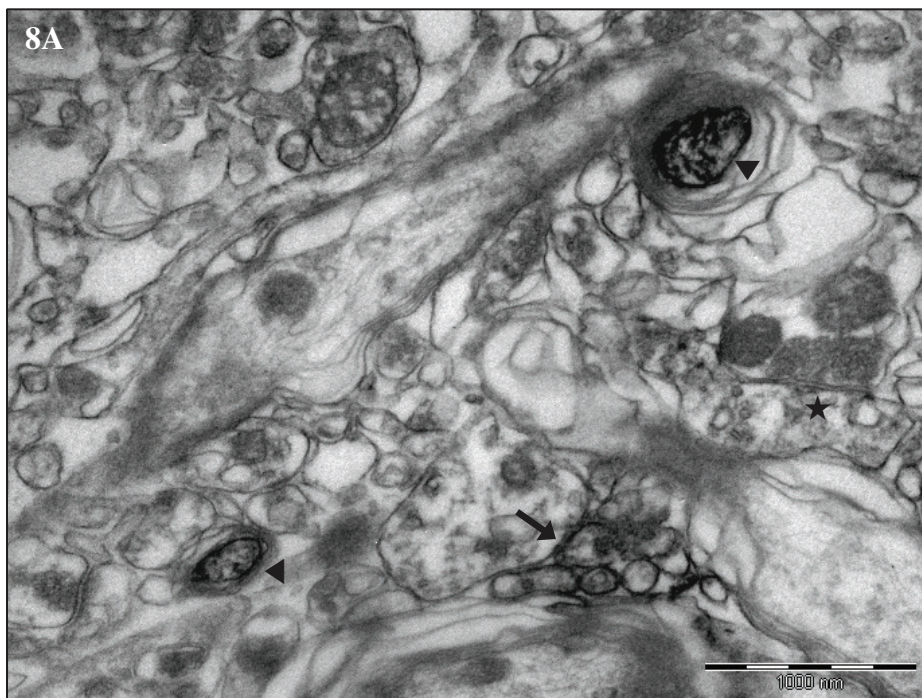
A kísérletek első szakaszában a szinapszisokat vizsgáltuk. A szinapszisok posztszinaptikus megvastagodása az elektronmikroszkópos képeken immunjelölés nélkül is erőteljes, elektrodenz struktúra. Ugyanabban a látómezőben összevetve a szinapszisok elektrodenzitását, pozitívként értékeltük az erősebb, szemcsés textúrájú immuncsapadékot tartalmazó posztszinaptikus megvastagodásokat. Ugyanezt a kritériumot használtuk minden olyan eredményünk kiértékelésénél, ahol szinapszisok posztszinaptikus denzitását immunpozitívnak találtuk (lásd az α -DB2/ α -DB4 kimutatása vad típusú egér agyában -16B ábra- és mdx^{bgeo} egér agyában). Az átvizsgált területeken immunreaktívnak találtunk asszimmetrikus dendritekre adott szinapszisok és a tükörszinapszisok posztszinaptikus megvastagodásait, de előfordultak ezekkel morfológiailag azonos immunnegatív szinapszisok is (7. ábra). Az immunpozitív és immunnegatív szinapszisok heterogén eloszlást mutattak. 36 elektronmikroszkópos képen elvégezve a számolást, összesen 300 szinapsziszól a jelölt és jelöletlen posztszinaptikus denzitások arányának átlaga 0.446, ennek a standard hibája (szórása) +/- 0.0415 volt. A jelölt szinapszisok aránya átlagosan 28.8% volt, melynek standard hibája: +/- 2.075%. A dolgozatban szereplő összes statisztikai elemzéshez az R 2.2.1 verzióját használtuk (R Development Core Team, 2006, <http://www.R-project.org>).

A minták további elemzésekor megállapítottuk, hogy egyes mielinhüvely nélküli axonok membránjai immuncsapadékkal élesen kirajzolódtak (8A ábra). A jelölt axonok az esetek nagy részében csoportokat, „kötegeket” képeztek. A CA3 régió szerkezeti felépítése alapján ezek az immunreaktív axonok a moharostok intervarikozitásaiként azonosíthatóak. A moharostok jellegzetesen nagyméretű terminálisai a hippocampus CA3-as területen lévő piramis sejtekkel képeznek szinapszist. A moharost szinapszisoknak a posztszinaptikus oldala minden esetben immunnegatív volt (8. ábra). Továbbá néhány mielinhüvelyes axon is tartalmazott szemcsés immuncsapadékot az axoplazmájában (8A, 8B ábra), ellentétben a mielinhüvely nélküli moharostokkal, ahol az immuncsapadék a sejtmembránhoz kapcsolódott. Mivel az axonok váza elsősorban citoskeletális elemeket tartalmaz (mikrotubulus, neurofilamentum), ezért feltételezhető, hogy a Dp71f ezen elemekhez kötődik.



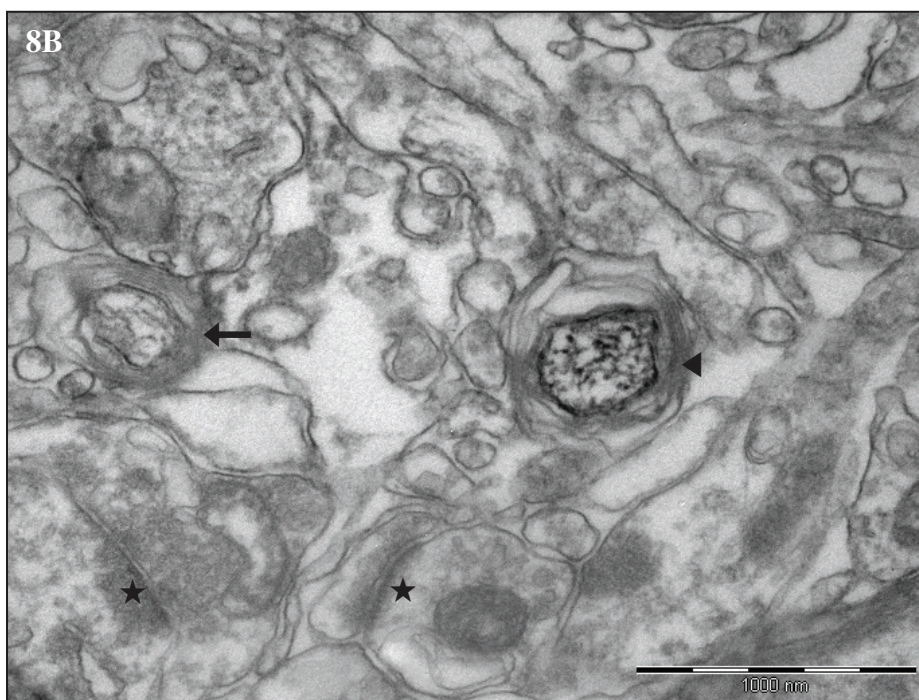
7. ábra 5F3 immunpozitív és immunnegatív szinapszisok a hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum rétegében.

Egy immunpozitív szinapszis nyíllal, az immunnegatív szinapszisok csillaggal jelölve.



8. ábra Az 5F3 immunpozitív axonok a hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum rétegében.

8A: nyíl az immuncsapadékkal erőteljesen körbejelölt mielinhiüvely nélküli moharost kötegre, a nyílhegyek mielinizált axonokra mutatnak, melyeknek immunpozitív az axoplazmájuk. A moharost által adott szinapszis immunnegatív (csillaggal jelölve).



8. ábra Az 5F3 immunpozitív axonok a hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum rétegében. 8B: nyílhegygel egy immunpozitív mielinizált axont, nyíllal pedig egy hasonló szerkezetű, de immunnegatív axont jelöltünk. Az immunnegatív moharost szinapszisok csillaggal jelölve láthatóak.

4.2. Az α -DB lokalizációja és karakterizálása az agyban

Kísérlet-sorozatunk második szakaszában a disztrobrevin fehérjék agybeli lokalizációját tűztük ki célul. Vizsgálataink során egy olyan ellenanyagot választottunk (V-19, Santa Cruz Laboratory), amely az α -DB1, α -DB2 és az α -DB4 izoformát együtt ismeri fel. Angliai kollaborációs partnerünk, Dr. Darek Gorecki segítségével emellett az α -DB1-et specifikusan felismerő ellenanyaggal (α 1-CT-FP, Blake et al. 1998) is készültek vizsgálatok. Ennek alapján a három α -DB izoforma elkülönített lokalizációjára is következtethettünk. Továbbá kísérleteket folytattunk a β -DB-t felismerő (β -521, Blake et al. 1998), illetve az összes utrofin izoformát, kivéve az Up71-et felismerő (Mupa-2, Jimenez-Mallebrera et al. 2003) ellenanyaggal is. Lehetőségünk nyílt a C57BL/6, vad típusú egerek agyában lefolytatott kísérletek eredményeit az egyik disztrofin fehérjét sem termelő *mdx^{βgeo}* egértörzsön (Wertz, Füchtbauer 1998) végzett vizsgálatokkal összehasonlítani.

4.2.1. A DAPC egyes tagjai az agyi erekben

4.2.1.1. Az α -DB, β -DB és utrofin kimutatása az agyi erek falában

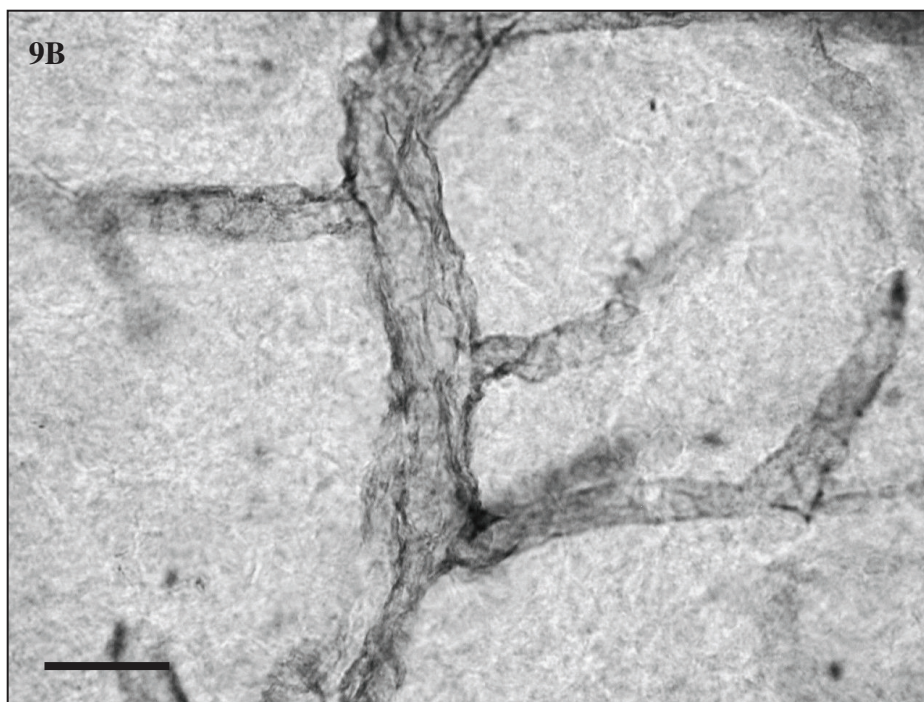
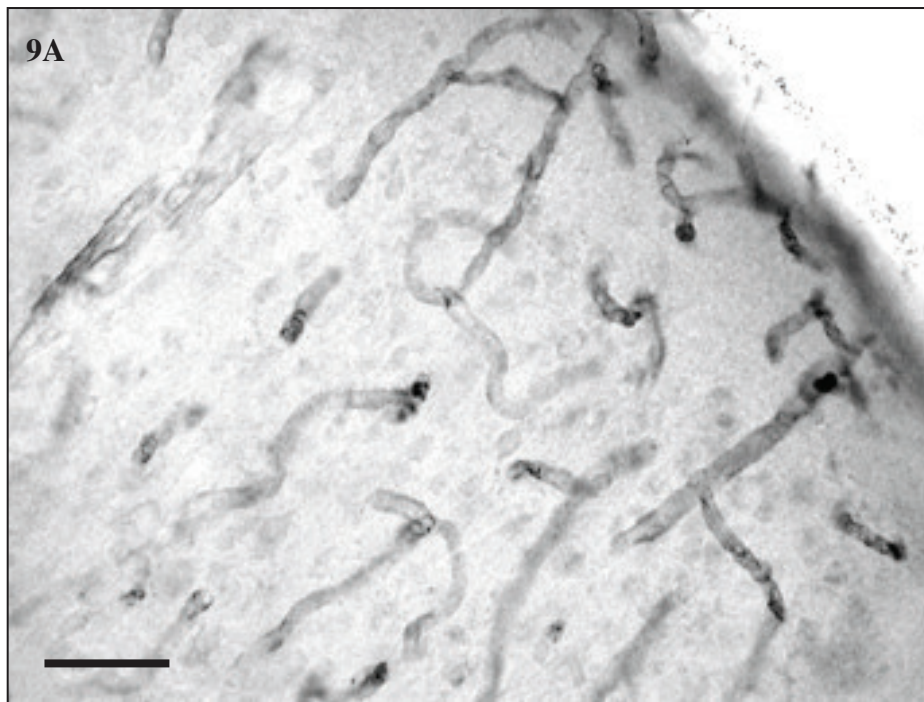
Korábbi irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az α -DB és az utrofin fehérjék megtalálhatóak az agyi érrendszerben. A β -DB lokalizációjával kapcsolatban azonban különböző kutatócsoportok között ellentmondás van. Blake és munkatársai szerint a β -DB az agyi kapillárisok falából hiányzik (1998, 1999), míg Grady és kutatócsoportja a β -DB-t lokalizálta az agyi erek falában (2006). Ennek

tisztázása érdekében, illetve az α -DB és az utrofin lokalizációjának alátámasztására saját, és angliai kollaborációs partnereink által végzett kísérletekre került sor.

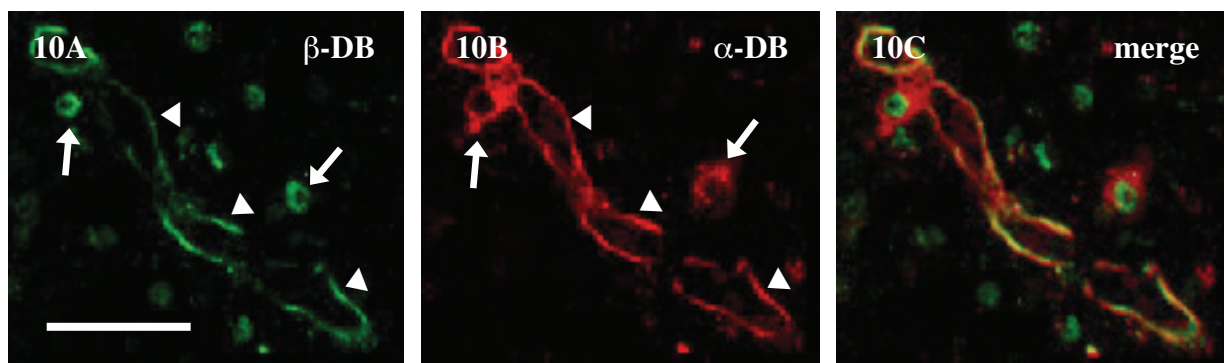
Fénymikroszkópos megfigyeléseink alapján a három α -DB izoformát felismerő ellenanyaggal immunjelölést találtunk az agyi kapilláris rendszerben minden vizsgált agyterületen. Az agykéreg, a thalamus és a hypothalamus területén végzett részletesebb vizsgálataink alátámasztották, hogy az α -DB valóban az erek falában lokalizálódik (9. ábra). Annak eldöntésére, hogy az erekben a három, V-19 által felismert α -disztrobrevin izoforma közül melyik fejeződik ki, angliai kollaborációs partnereink az általunk elküldött agyszeleteken az α -DB1 izoformát elkülönülten felismerő ellenanyag, az α 1-CT-FP segítségével konfokális immunfluoreszcens módszerrel kísérleteket végzett el. Az α 1-CT-FP ellenanyaggal az agyi kapillárisok ugyanúgy körbejelölődtek, mint a három disztrobrevint együtt kimutató V-19-el (17. ábra). A V-19 és a β -DB-t felismerő β -521 ellenanyagok segítségével az α -DB és a β -DB együttes lokalizációjának tisztázására került sor. Kiderült, hogy az agyi kapillárisokban a két DB fehérje kolokalizálódik az erek falának bazolaterális régiójában (10. ábra). Végül az α -DB és az utrofin immunfluoreszcens kolokalizálására került sor (11. ábra). A kapott eredmények szerint az agyi erekben a két fehérje kolokalizálódott, ami szintén az ismert irodalmi adatokat támasztja alá.

4.2.1.2. Az α -DB sejtszintű kimutatása vad típusú és $mdx^{\beta geo}$ egér agy ereiben

Ismert, hogy az α -DB az agyi kapillárisokban termelődik. Vizsgálataink célja a fehérje helyének pontosabb, sejtszintű lokalizációjának tisztázása volt. A három α -DB izoformát a V-19 ellenanyaggal ultrastrukturális szinten, elektronmikroszkópos vizsgálatokkal mutattuk ki vad típusú egerek agyában. A kapott eredmények szerint az α -DB az ereket körülölelő gliasejtekben, a perikapilláris asztrocita végtalpakban lokalizálódik (12. ábra). Az immunjelölés az endotélsejteket folytonosan veszi körbe és elsősorban az alaphártya felé néző oldalon koncentrálódik. Az agyi erekben előforduló α -DB-t a V-19 ellenanyaggal az $mdx^{\beta geo}$ egér agyban is megvizsgáltuk. A fénymikroszkópos eredmények alapján elmondhatjuk, hogy összehasonlítva a vad típusú egerek agyában talált erek körüli jelöléssel, a transzgénikus egér agyában sokkal kevesebb ér jelölődött, kevésbé erőteljesen (21. ábra). Az elektronmikroszkóppal végzett vizsgálatokban tisztáztuk, hogy az α -DB immuncsapadék nem folyamatosan, hanem szaggatott módon jelent meg az alaphártyával érintkező asztrocita végtalpakban az agyi kapillárisok körül (13. ábra). A kísérleteink egyértelművé tették, hogy az $mdx^{\beta geo}$ egerek agyi ereiben az α -DB expresszió erőteljesen lecsökkent.



9. ábra Erőteljes α -DB immunreaktivitás az erek falában különböző agyi régiókban.
9A: agykéreg, 9B: thalamus
Mérce: 9A:50 μ m, 9B:20 μ m.



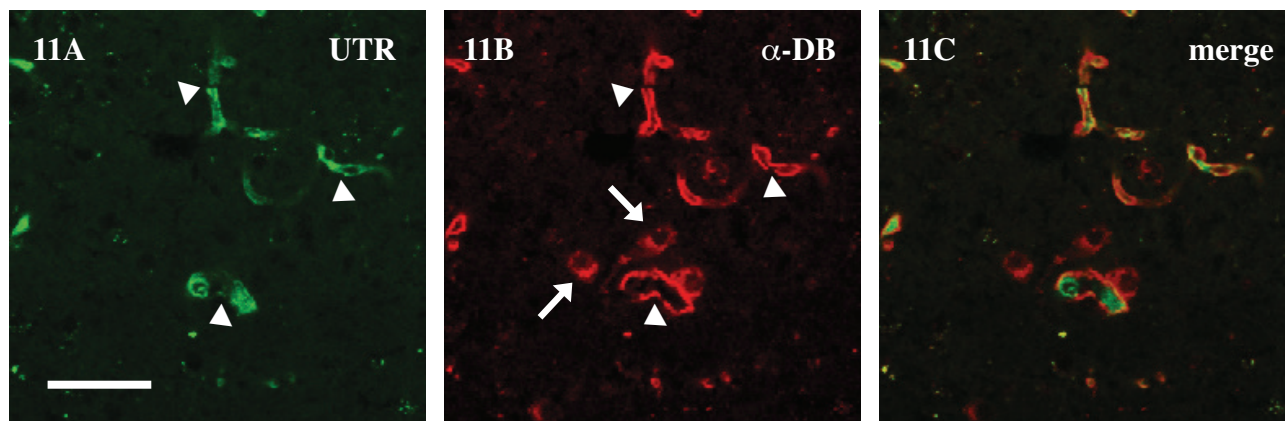
10. ábra Az α -DB és β -DB kolokalizáció az agyi kapillárisokban.

10A: β -DB jelölés β -521 ellenanyaggal a kapilláris falában (nyílhegyekkel jelölve) és idegsejtekben (nyíllal jelölve),

10B: α -DB jelölés V-19 ellenanyaggal, kapilláris falában (nyílhegyekkel jelölve) és idegsejtekben (nyíllal jelölve),

10C: β -DB és α -DB kolokalizációja a kapilláris falában.

Mérce: 50 μ m.



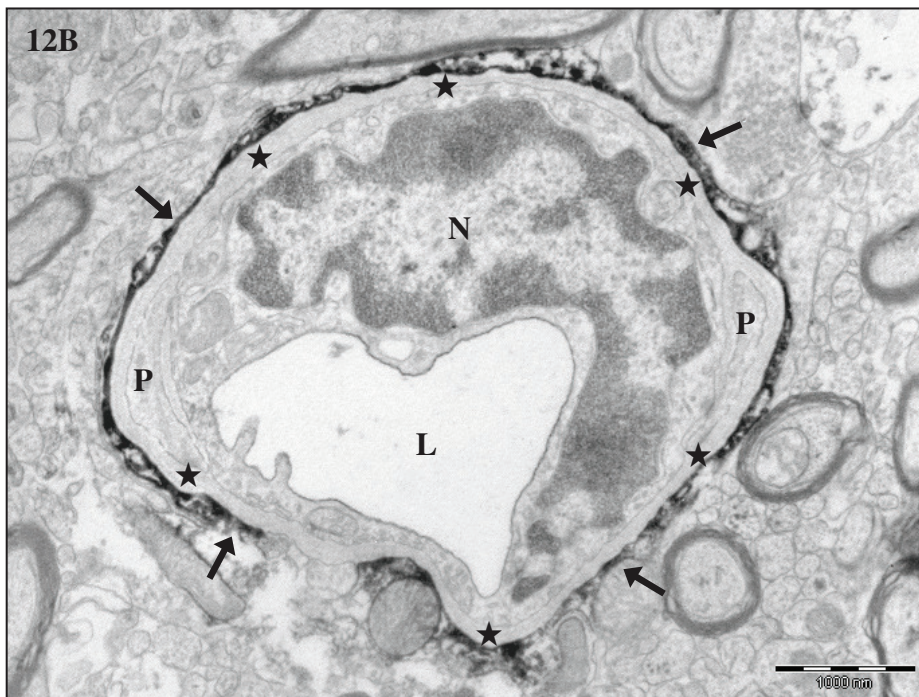
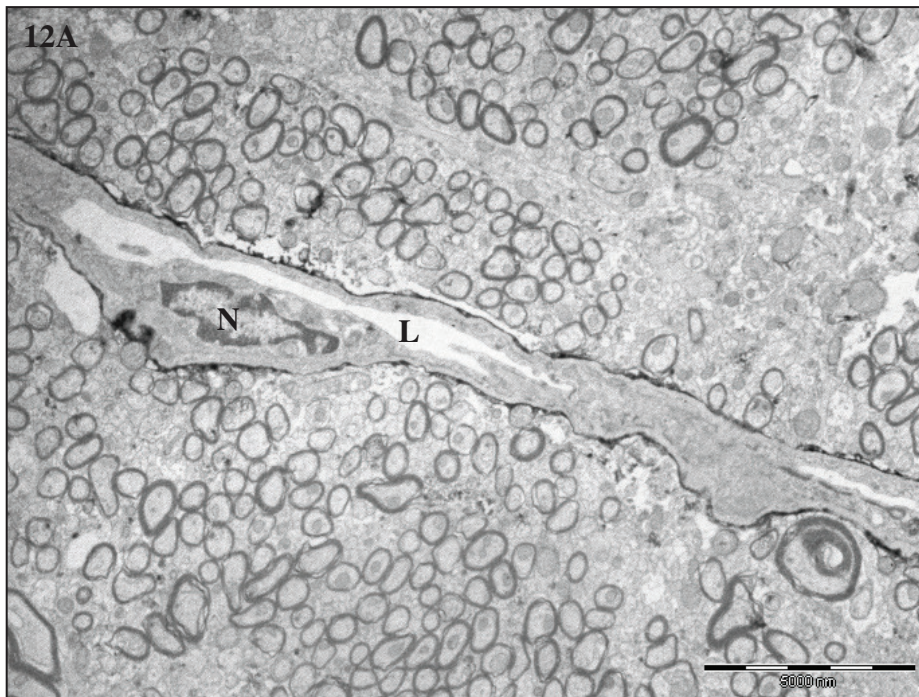
11. ábra Az α -DB és utrofin kolokalizációja az agyi kapillárisokban.

11A: utrofin jelölés Mupa-2 ellenanyaggal, kapillárisok falában (nyílhegygel jelölve),

11B: α -DB jelölés V-19 ellenanyaggal, kapilláris falában (nyílhegyekkel jelölve) és idegsejtekben (nyíllal jelölve),

11C: utrofin és α -DB kolokalizációja az agyi erekben.

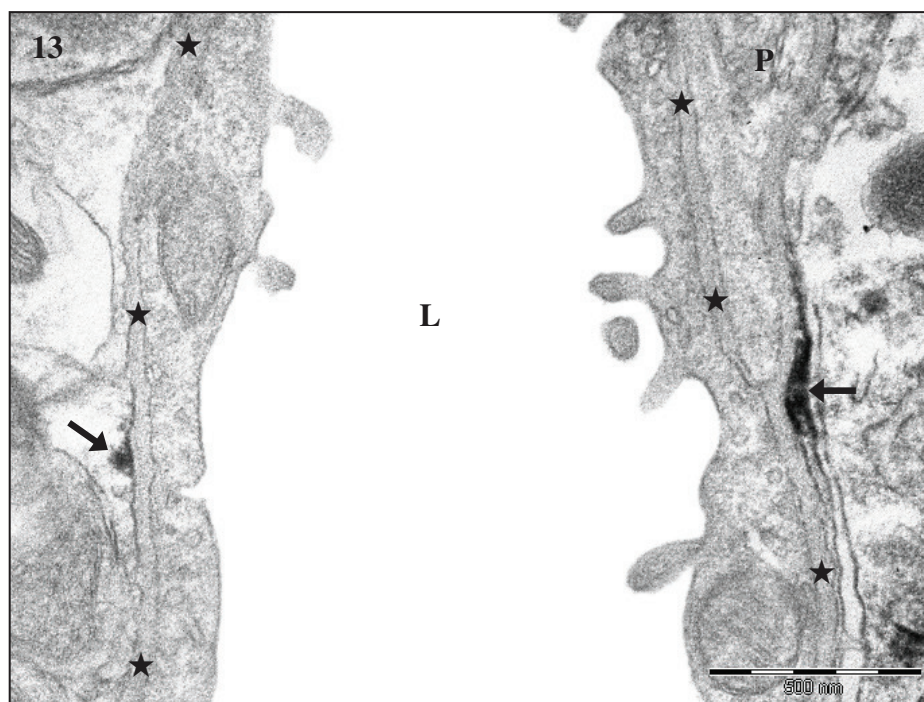
Mérce: 50 μ m.



12. ábra Az α -DB jelölés az agyi kapillárisokban.

12A: kis nagyítású hosszszelvényi kép, 12B: nagyobb nagyítású, keresztmetszeti kép egy immuncsapadékkal körbejelölt kapillárisról. Csillaggal az alaphártyát, a nyilakkal pedig az immunjelölt perikapilláris asztrocita végtalpakat jelöltük.

Rövidítések: N: endotél sejt magja, L: kapilláris lumen, P: pericita



13. ábra Az α -DB jelölés az $mdx^{\beta geo}$ egér agyi kapillárisaiban.

Csillaggal az alaphártyát, nyilakkal pedig az immunjelölt perikapillaris asztrocita végtalpakat jelöltük. Összehasonlítva a vad típusú egér kapillárisaival, szembetűnő, hogy az immuncsapadék az eret nem folytonosan, hanem szaggatottan veszi körül.

Rövidítések: L: kapillaris lumen, P: pericyta

4.2.2. Az α -DB lokalizációja és karakterizálása az agyi idegsejtekben

4.2.2.1. Az α -DB kimutatása az agyi idegsejtekben

Az erek körüli jelölésen kívül a koronális agyszeletek átvizsgálása során a laterális hypothalamus területén neuronok egy csoportját is immunpozitívnak találtuk. Mivel a szakirodalom szerint felnőtt agyban az α -DB nem fordul elő idegsejtekben, ezért részletes vizsgálatokat végeztünk el. Az immunpozitív neuron szubpopuláció pontosabb behatárolása érdekében sorozatmetszeteket készítettünk az egész egér agyból, és minden metszetet a V-19 ellenanyaggal kezeltünk az α -DB kimutatása céljából. A jelölt neuronokat tartalmazó agymetszeteket az egér agy atlasz (Paxinos, Franklin 2001) segítségével azonosítottuk be. A különböző formájú és méretű csoportokat képző α -DB immunpozitív idegsejtek a koronális metszeten a fej-farok irányban a látóidegek kereszteződése utáni szétválásától körülbelül 7 mm-re, a Bregma -1,22 mm és -1,94 mm közötti területen oszlottak el a laterális hypothalamus területén szétszóródva (14. ábra), illetve néhány α -DB-pozitív idegsejtet a hypothalamus dorso-mediális régiójában is találtunk. A nagyobb nagyítású fénymikroszkópos képeken megfigyeltük, hogy a szemcsés jelölés a sejtestben és a sejtest közelében lévő nyúlványokban koncentrált (15. ábra). Az α -DB immunjelölés sejten belüli helyeződésének tisztázása érdekében ezután elektronmikroszkópos szinten folytattuk a vizsgálatainkat (16. ábra). Az immuncsapadék a durva felszínű endoplazmatikus retikulum ciszternáinak membránjához kapcsolódott (16A ábra).

Figyelemre méltó, hogy ezek a ciszternák, a környéken található más, nem jelölt neuronokban lévő endoplazmatikus retikulum ciszternáival összevetve, feltűnően kitágult állapotban vannak. A jelölt sejttestek közelében immunpozitív és immunnegatív nyúlványok és posztszinaptikus denzitások (16B ábra) egyaránt előfordulnak. Az α -DB tartalmú nyúlványok és posztszinaptikus denzitások feltételezhetően az immunpozitív sejttestekhez tartoznak. 29 elektronmikroszkópos képen elvégezve a számolást, összesen 188 szinapsziszból a jelölt és jelöletlen asszimmetrikus szinapsziszok arányának átlaga 0.229, ennek a standard hibája (szórása) ± 0.031 volt. A jelölt szinapsziszok előfordulási aránya átlagosan 17.235% volt, melynek standard hibája: $\pm 2.075\%$.

4.2.2.2. Az α -DB karakterizálása a laterális hypothalamus idegsejtjeiben

Tisztázni akartuk, hogy a laterális hypothalamusban talált idegsejtekben a V-19 által felismert α -DB1, α -DB2 és α -DB4 izoforma közül melyik fordul elő. Az α -DB1 izoformát elkülönülten felismerő ellenanyag (α 1-CT-FP) segítségével lehetővé vált az α -DB pozitív idegsejt szubpopuláció további csoportosítása. A korábbi kísérletekben azonosított idegsejt csoportot tartalmazó koronális agyseleteket kettévágtuk medio-sagittális irányban, majd az egyik agyfelet a V-19 (17A ábra), a másikat α 1-CT-FP (17B ábra) ellenanyaggal kezeltük. Az előhívás immunfluoreszcens módszerrel, a megfigyelések konfokális mikroszkóppal történtek. A három disztrobrevin izoformára specifikus V-19 ellenanyag az agyi ereket és a laterális hypothalamus területén található neuronokat is jelölte. Az α 1-CT-FP ellenanyaggal csak az agyi erek jelölődtek, idegsejt-jelölést nem lehetett látni. A kísérletek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a laterális hypothalamusban lévő neuronokban csak az α -DB2, vagy az α -DB4 fehérje termelődik, az α -DB1 nem (17. ábra). Az α -DB2/ α -DB4 fehérje az idegsejt sejttestében és nyúlványaiban mutatható ki, a konfokális képeken megjelenő pontszerű jelölésből a DB fehérje szinaptikus lokalizációjára következtettünk (18. ábra). Az α -DB2 és az α -DB4 fehérje elkülönítésére a V19 ellenanyag használatával nem volt lehetőségünk.

4.2.2.3. Az α -DB2/ α -DB4 és egyes neuropeptidok illetve az nNOS kolokalizációjának vizsgálata a laterális hypothalamusban

A hypothalamus az idegrendszer legfontosabb táplálkozást és étvágyat szabályozó központja. A laterális hypothalamusban termelődő neuropeptidok részt vesznek a táplálékfelvétel szabályozásában. Felmerült, hogy az α -DB2/ α -DB4 fehérjének ez a specifikus lokalizációja vajon összefüggésben áll-e a laterális hypothalamus neurohormonjaival, illetve a sejten belüli jelátvitelben kulcsszerepet játszó és a több szövetben bizonyítottan a DAPC-hez kapcsolódó neuronális nitrogén-oxid szintetázzal (nNOS). Ennek kiderítése érdekében kettős immunfluoreszcenciás vizsgálatokat végeztünk. Megvizsgáltuk, hogy az α -DB2/ α -DB4 kolokalizálódik-e az nNOS-al, illetve a melanin koncentráló hormonnal (MCH), a neuropeptid Y (NPY), és a galanin neuropeptidekkel (19. ábra). Az egyik neuropeptid laterális hypothalamusbeli megjelenése teljesen megegyezett az α -DB2/ α -DB4 lokalizációjával. Ez a neuropeptid az MCH volt. Ezzel szemben az nNOS, NPY, és a galanin nem kolokalizálódott az α -DB2/ α -DB4-t termelő neuronokkal. A laterális hypothalamus α -DB2/ α -DB4-pozitív idegsejtjei tehát MCH-t is expresszálnak.

4.2.2.4. Az α -DB2/ α -DB4 és β -DB kolokalizálása a laterális hypothalamusban

Kísérletsorozatunk következő lépése az α -DB2/ α -DB4 és a β -DB együttes lokalizációjának tisztázása volt. Megvizsgáltuk, hogy a laterális hypothalamus neuronjai között ezek a fehérjék hogyan oszlanak el. Konfokális mikroszkóppal végzett kettős immunfluoreszcens vizsgálatok alapján kiderült, hogy a laterális hypothalamus területén a β -DB-t kifejező neuronok egy csoportja α -DB2/ α -DB4-t is expresszál. Az α -DB2/ α -DB4 az idegsejtek citoplazmájában lokalizálódik, míg a β -DB a neuronok sejtplazmájában és sejtmagjában is expresszálódik, de a magi jelölés sokkal erőteljesebb (20A-C). Megállapítottuk tehát, hogy a laterális hypothalamus területén van egy β -DB pozitív neuron szubpopuláció, ami több idegsejtet foglal magába, mint az α -DB2/ α -DB4 pozitív neuron csoport. Minden α -DB2/ α -DB4 pozitív idegsejt egyúttal β -DB-t is termel, de emellett kimutathatók α -DB2/ α -DB4-t nem tartalmazó β -DB-t expresszáló idegsejtek is.

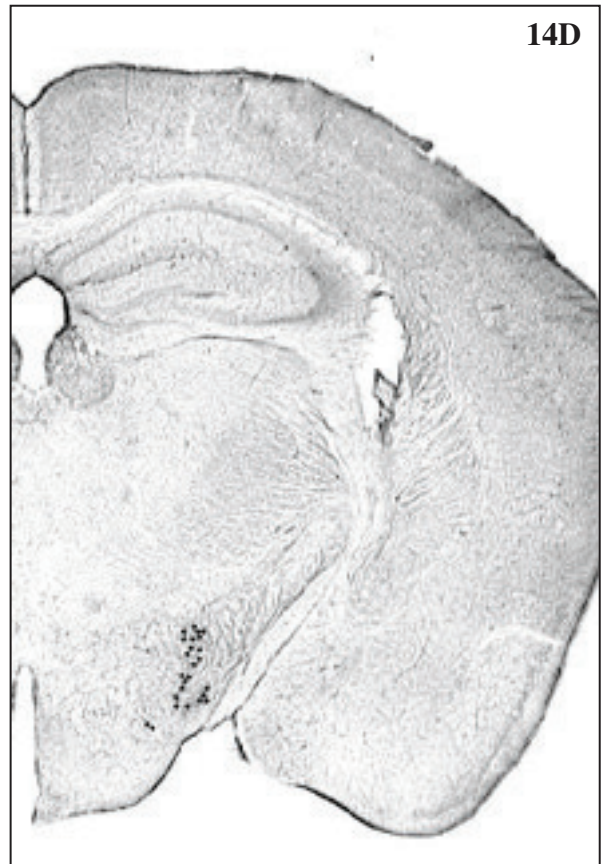
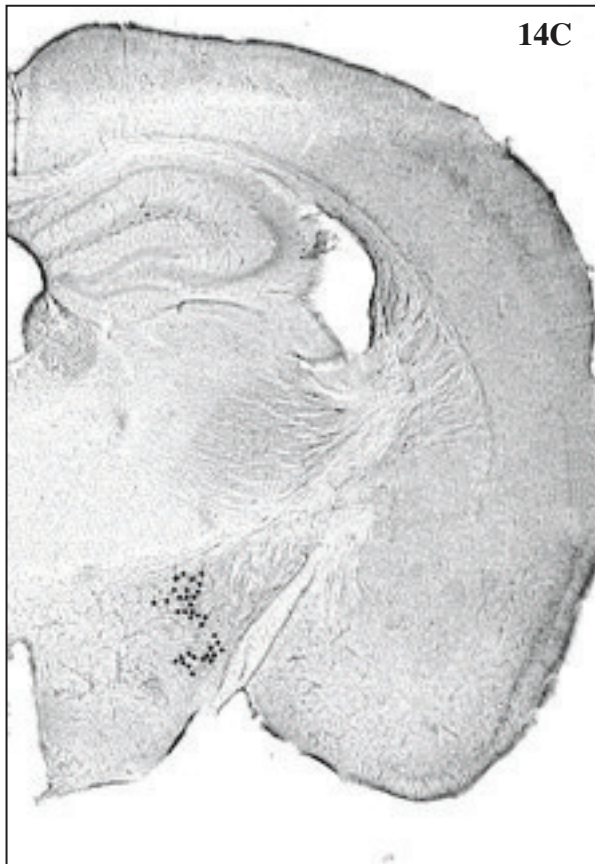
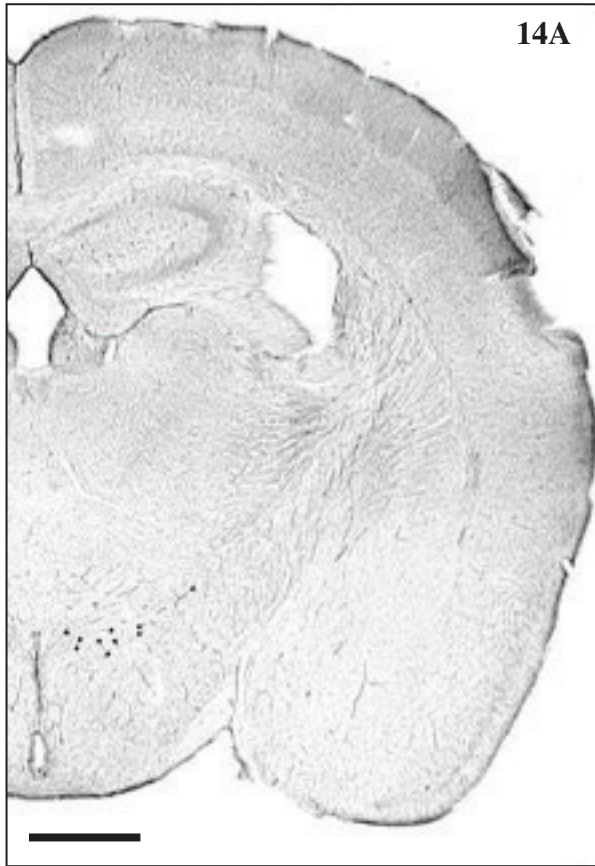
4.2.2.5. Az α -DB2/ α -DB4 és az utrofin lokalizációja a laterális hypothalamus idegsejtjeiben

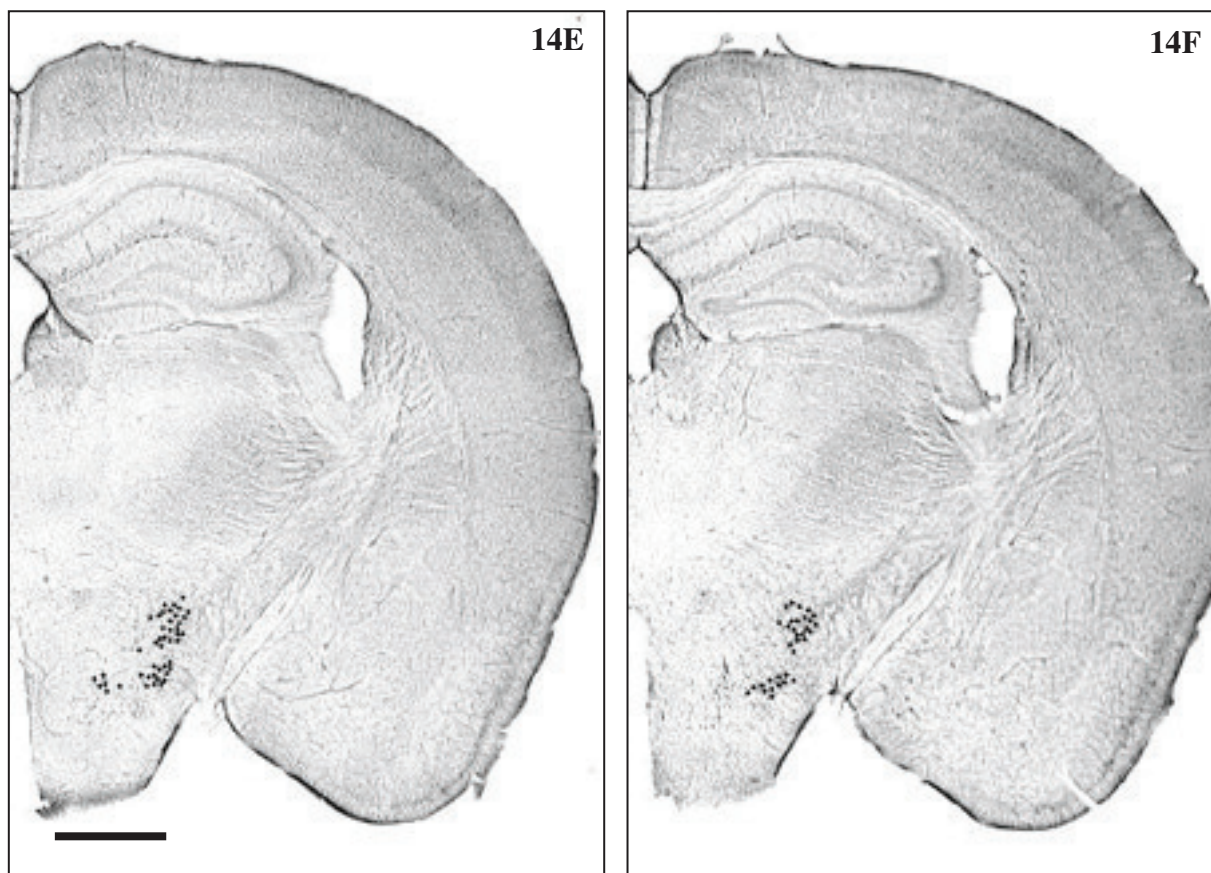
A hypothalamusban lévő kapillárisokat vizsgáló kísérletek alapján (lásd: 4.2.1.1) felvetődött, hogy a laterális hypothalamusban lévő neuronokban esetlegesen felépülő DAPC-ben az utrofin fehérje vajon az erekhez hasonló módon kolokalizálódik-e az α -DB2/ α -DB4-vel. Ennek a tisztázása érdekében az α -DB2/ α -DB4 és az utrofin kolokalizációjának megvizsgálására került sor az egér agyban. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az α -DB2/ α -DB4 pozitív neuronok utrofint nem expresszálnak (21. ábra).

4.2.2.6. Az α -DB kimutatása a $mdx^{\beta geo}$ egér agy idegsejtjeiben

Ebben a vizsgálatban az α -DB kimutatását tűztük ki célul olyan disztrófiás $mdx^{\beta geo}$ egerekben, amelyek szervezetéből minden disztrófin fehérje hiányzik (Wertz, Füchtbauer 1998). Az $mdx^{\beta geo}$ egerek laterális hypothalamusában, a vad típusú egerekhez hasonlóan, megtaláltuk az α -DB2/ α -DB4 pozitív neuron csoportot. A fénymikroszkópos képeken látszik, hogy a mutáns egér agyában a neuron jelölés megmaradt. Bár az immuncsapadék az erek falából sem tűnt el teljes mértékben, de ez sokkal kevésbé erőteljes, mint a vad típusú egér agyi ereiben (22. ábra). A jelölt idegsejtek mellett a transzgénikus egerekben is találtunk immunpozitív és immunnegatív szinapszisokat (nem bemutatott eredmény). 31 elektronmikroszkópos képen elvégezve a számolást, összesen 172 szinapsziszból a jelölt/jelöletlen szinapszisok posztzinaptikus denzitásainak arányának átlaga 0.262, ennek a standard hibája (szórása) +/- 0.035 volt. A jelölt szinapszisok előrordulása átlagosan 19.32028%, ennek standard hibája: +/- 1.845% volt.

Miután tisztáztuk, hogy a $mdx^{\beta geo}$ egerek agyában a laterális hypothalamus területén a neuronok egy csoportja α -DB2/ α -DB4-t tartalmaz, a vad típusú egér agyban kapott eredmények alapján kettős immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk az α -DB2/ α -DB4 és MCH kolokalizáció kiderítésére. A transzgénikus egerekben kapott eredmények megegyeznek a vad típusú egérben találtakkal (23. ábra).

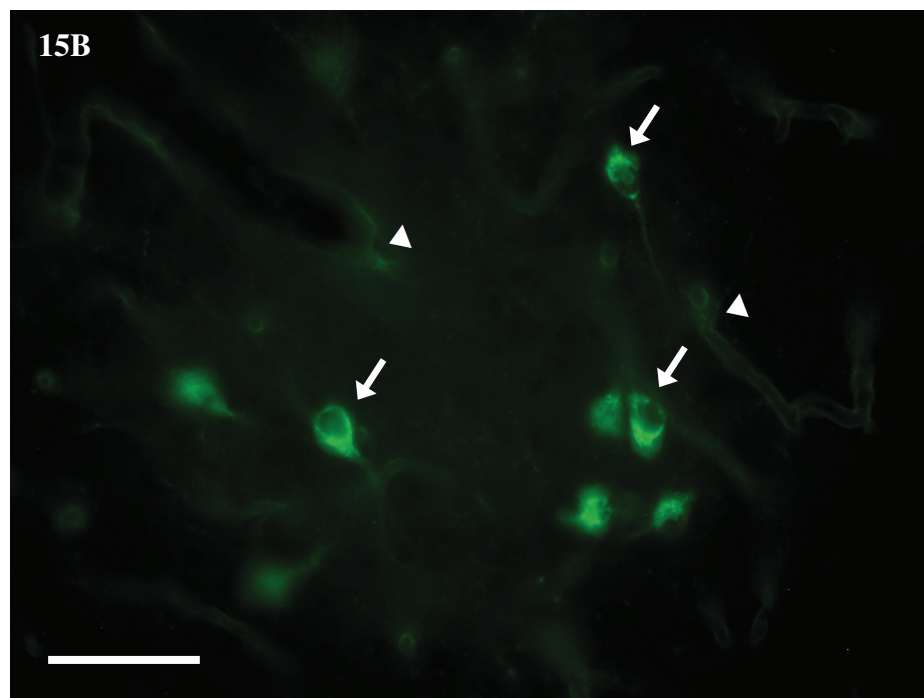
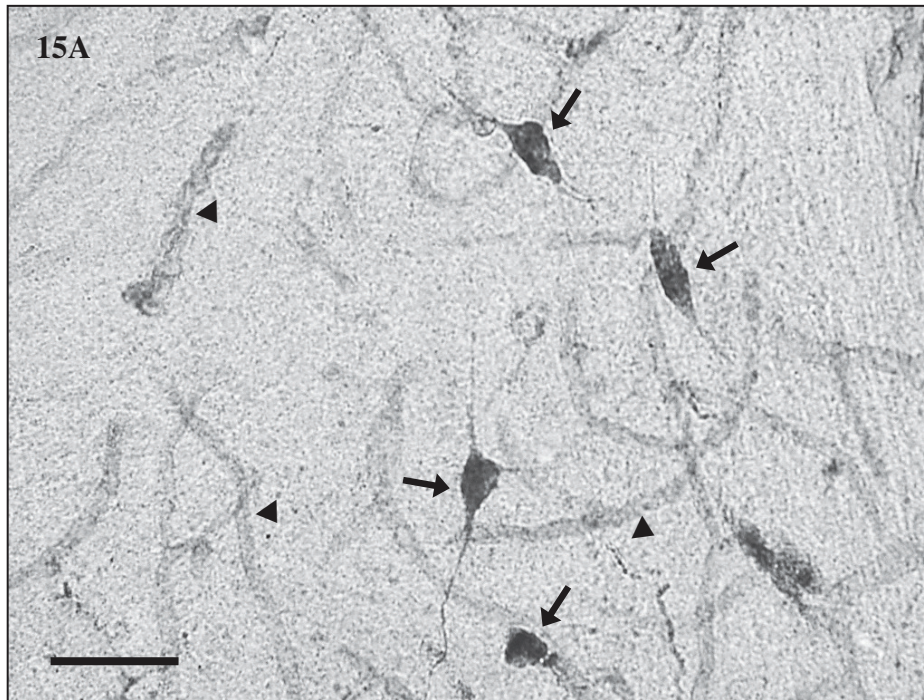




14. ábra Neuronális α -DB jelölés a laterális hypothalamusban.

14A-F: kis nagyítású fénymikroszkópos átnézeti képek, melyeken megfigyelhető az α -DB tartalmú neuron szubpopuláció eloszlása a laterális hypothalamusban fej-farok irányban, a Bregma -1,22 mm és -1,94 mm közötti területen. Az α -DB korábbi saját eredményeink és irodalmi adatoknak megfelelően az agyi kapillárisokat is erőteljesen jelölte. A jobb láthatóság érdekében az ábrákon a jelölt idegsejteket fekete csillagokkal emeltük ki. A jelölt sejtek nagyobb nagyítással a 15. ábrán láthatóak.

Mérce: 0,16 mm

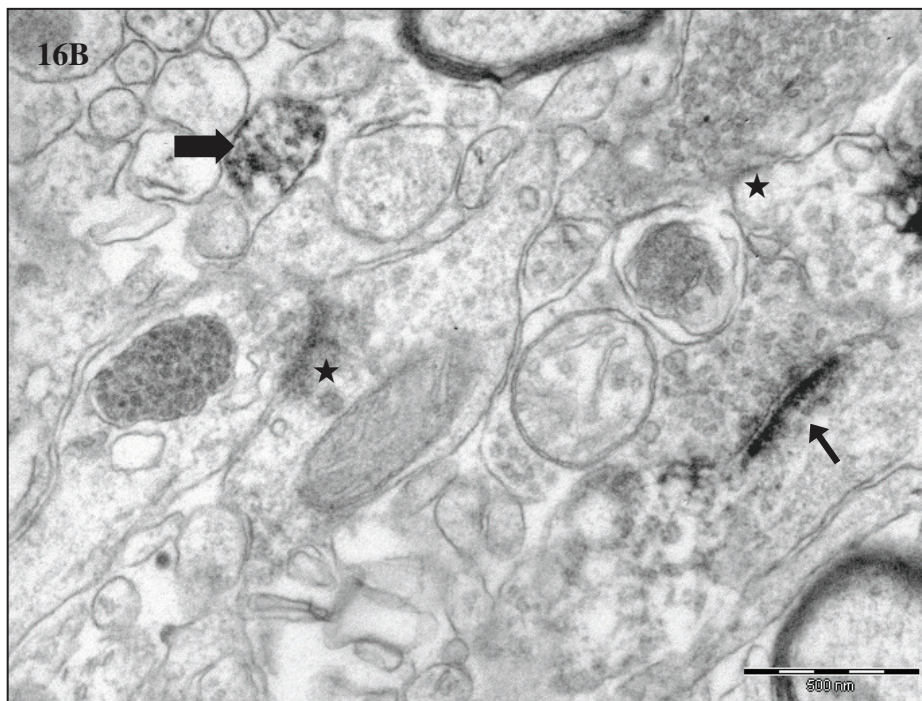
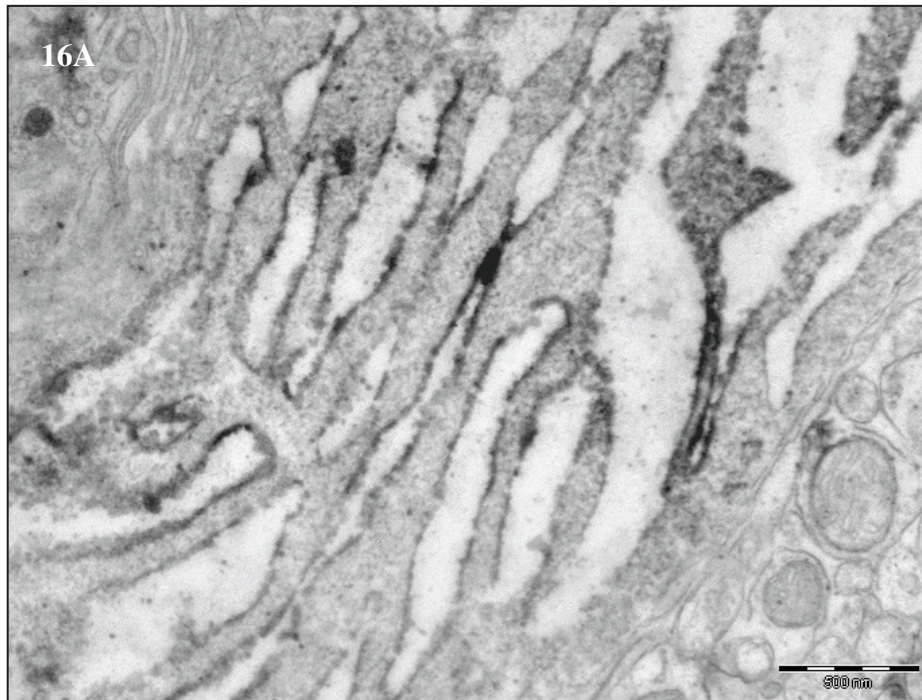


15. ábra α -DB immunjelölés neuronokban a laterális hypothalamus területén.

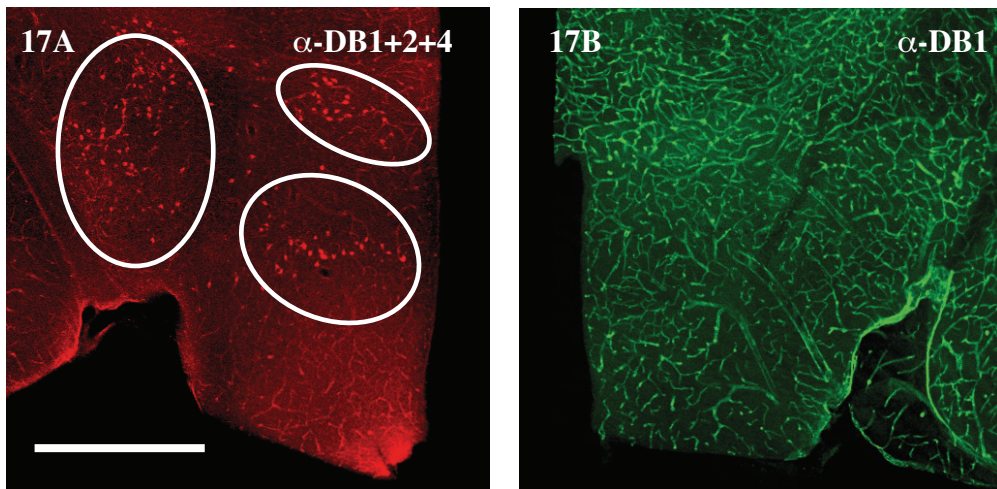
15A: a neuronok sejtteste mellett (nyilak) a nyúlványaik is kirajzolódnak. A nyílhegyek egyes α -DB pozitív ereket jelölnek.

15B: az immunfluoreszcens módszerrel jelölt α -DB pozitív neuronokra nyilak, egyes erekre nyílhegyek mutatnak.

Mérce: 15A:50 μ m, 15B: 50 μ m



16. ábra α -DB immunjelölés idegsejt-testekben és szinapszisokban a laterális hypothalamusban.
 16A: az erőteljesen kitágult endoplazmatikus retikulum ciszternáinak membránja immuncsapadékkal van körberajzolva.
 16B: α -DB pozitív és negatív asszimmetrikus szinapszisok, illetve egy immunpozitív idegnyúlvány. A vékonyabb nyíl az immuncsapadékkal jelölt posztszinaptikus denzitást, a csillagok immunnegatív szinapszisokat, a vastagabb nyíl egy immunpozitív nyúlványt jelöl.

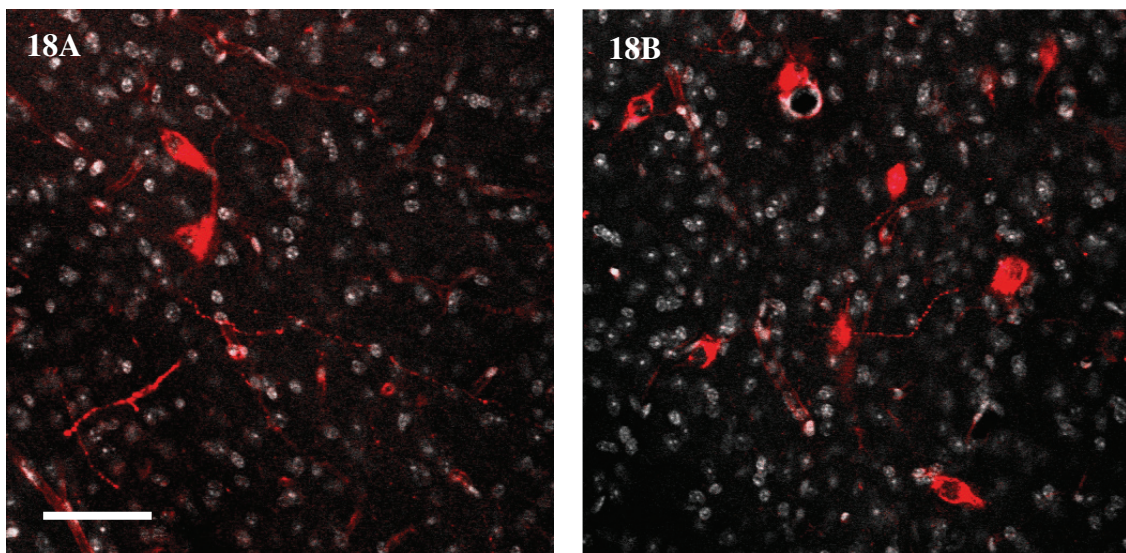


17. ábra α -DB immunjelölés a laterális hypothalamus területén.

17A: az α -DB1, α -DB2 és α -DB4 izoforma együttes kimutatása a V-19 ellenanyag segítségével, amely az agyi erekon kívül a laterális hypothalamus területén lévő neuron csoportot is felismerte. Az immunpozitív idegsejtek csoportjait bekarikázással emeltük ki.

17B: az α -DB1 lokalizációja α 1-CT-FP ellenanyaggal a laterális hypothalamusban. Az ellenanyag erőteljesen jelöli az agyi érrendszert, neuronális jelölés azonban nem észlelhető.

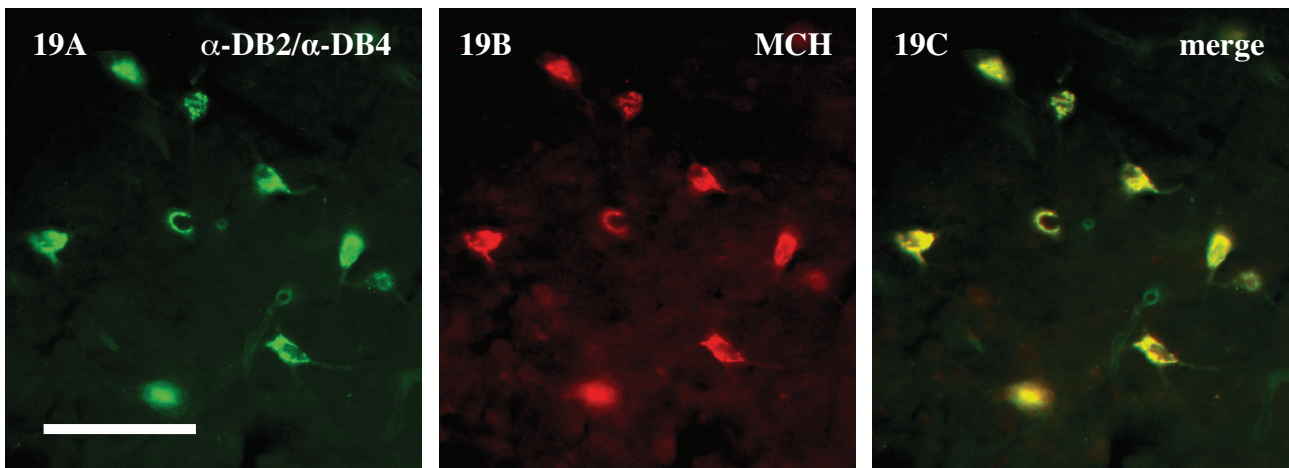
Mérce: 500 μ m



18. ábra α -DB immunjelölés V-19 ellenanyaggal a laterális hypothalamus területén.

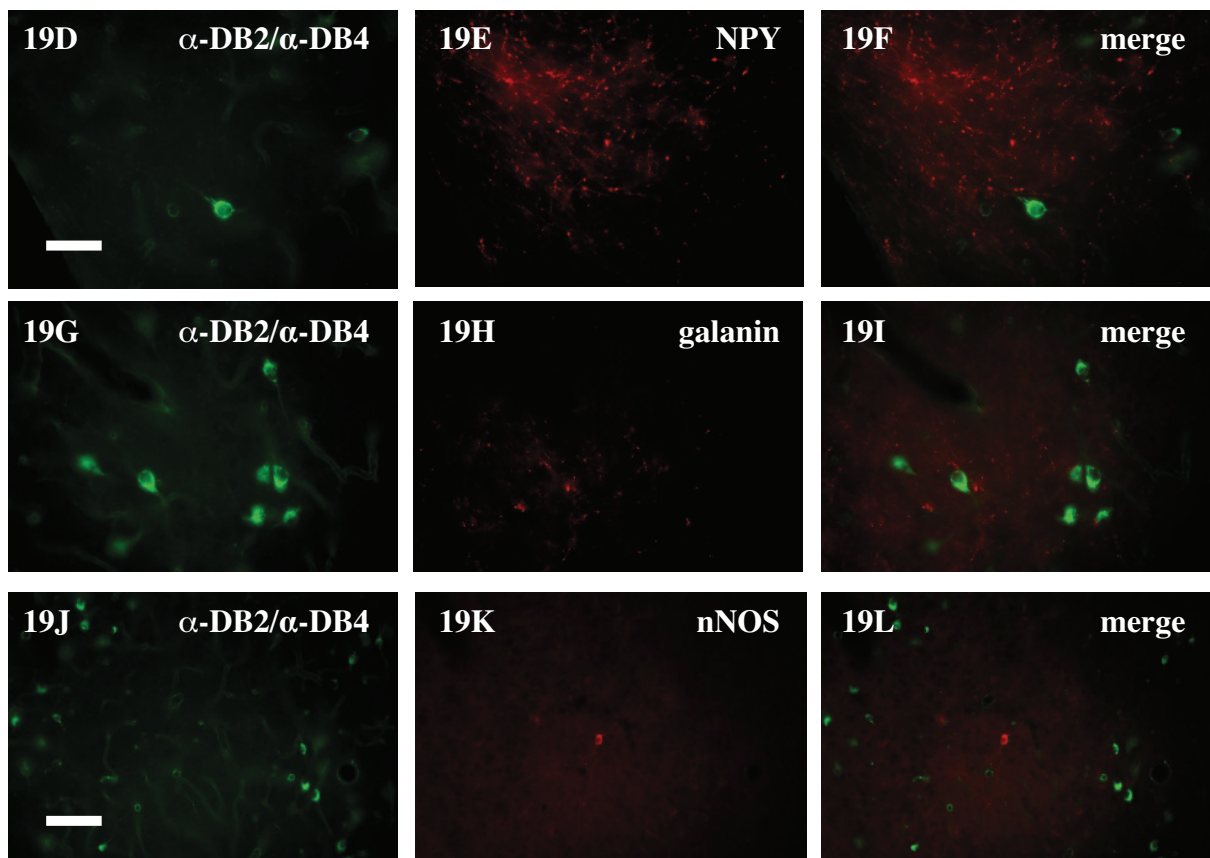
18A,B: Megfigyelhető, hogy az idegsejtek sejtestjei mellett nyúlványaik is jelölődtek. A pontszerű immuncsapadék szinapszisoknak felel meg. A fehér színű magfestés a Topro3 (Molecular Probes, Inc. Eugene, Or) reagenssel történt.

Mérce: 40 μ m



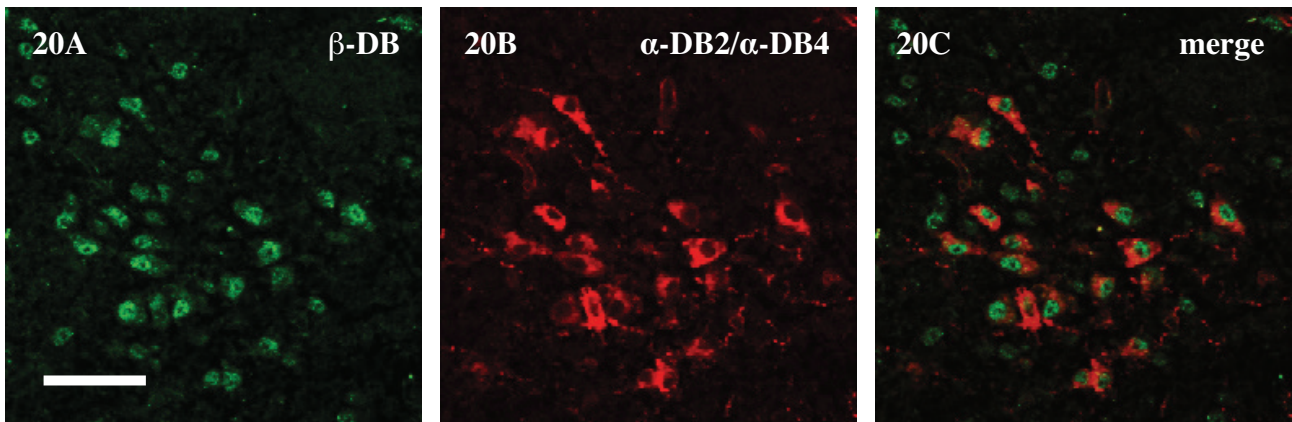
19. ábra α -DB2/ α -DB4 és az MCH immunfluoreszcens kolokalizációja a laterális hypothalamusban.

19A: α -DB2/ α -DB4 lokalizáció, 19B: MCH lokalizáció, 19C: α -DB2/ α -DB4 és MCH kolokalizáció.
Mérce: 50 μ m



19. ábra Immunfluoreszcens festések az α -DB2/ α -DB4 és a laterális hypothalamusban expresszáló néhány neuropeptid (NPY, galanin) illetve az nNOS kolokalizációjának kimutatására.

19D,G,J: α -DB2/ α -DB4 lokalizáció, 19E: NPY lokalizáció, 19F: α -DB2/ α -DB4 és NPY kolokalizáció, 19H: galanin lokalizáció, 19I: α -DB2/ α -DB4 és galanin kolokalizáció, 19K: nNOS lokalizáció, 19L: α -DB2/ α -DB4 és nNOS kolokalizáció.
Mérce: 19J,K,L: 27,5 μ m, 19D,E,F,G,H,I: 50 μ m



20. ábra α -DB2/ α -DB4 és β -DB kolokalizációja a hypothalamusban.

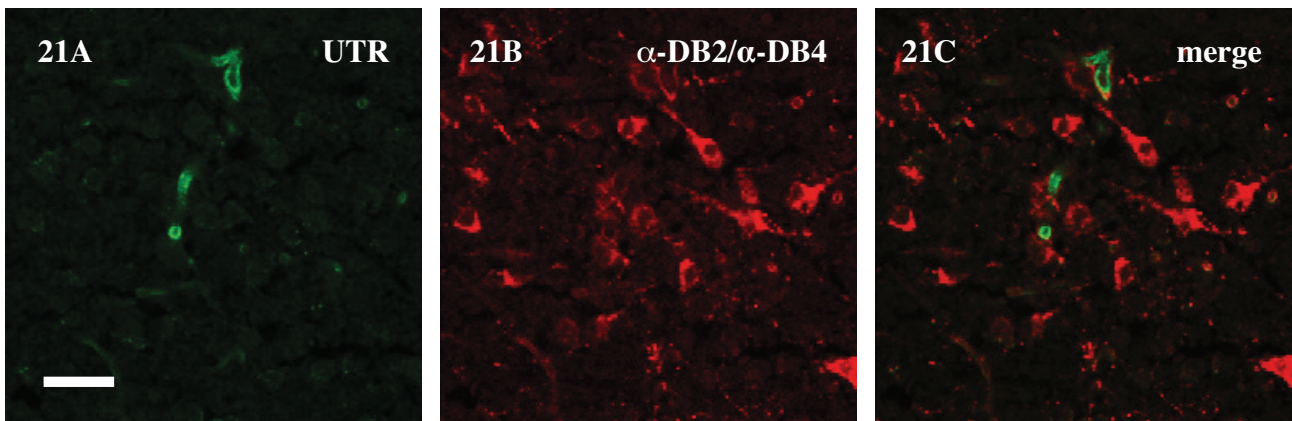
Az α -DB2/ α -DB4 és a β -DB egy részben átfedő neuron szubpopulációban lokalizálódik. Az α -DB2/ α -DB4 a neuronok sejttestjét, a β -DB a sejttestet és a magot jelöli.

20A: β -DB lokalizáció β -521 ellenanyaggal,

20B: α -DB2/ α -DB4 lokalizáció V-19 ellenanyaggal,

20C: β -DB és α -DB2/ α -DB4 kolokalizációja a hypothalamusban.

Mérce: 50 μ m.



21. ábra α -DB2/ α -DB4 és utrofin kolokalizációja a hypothalamusban.

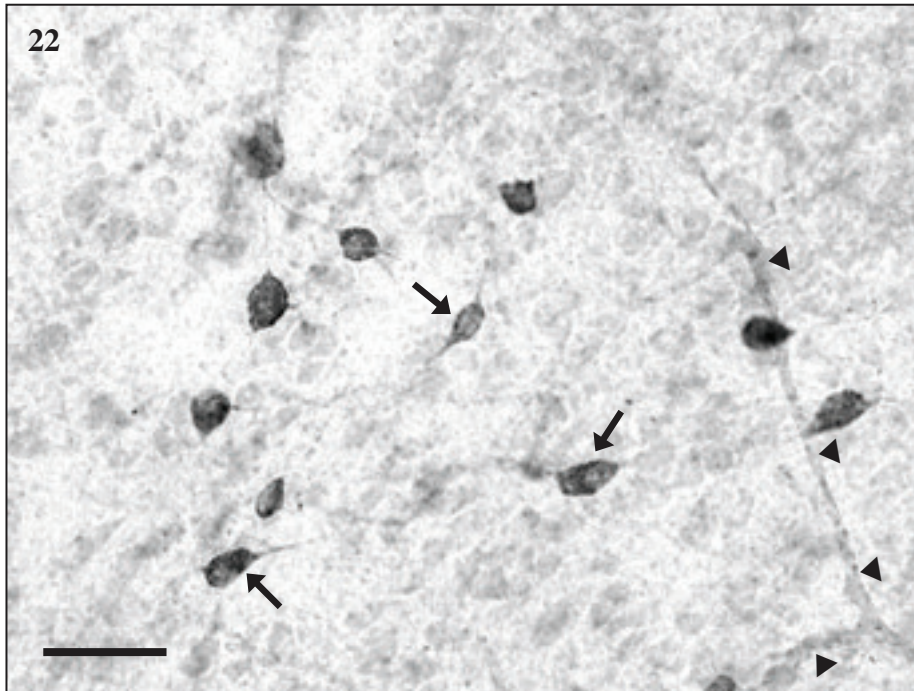
Az utrofin megjelent a kapillárisok falában és kolokalizálódott az α -DB2/ α -DB4-el, a neuronok csak α -DB2/ α -DB4-et tartalmaztak, utrofint nem.

21A: utrofin lokalizáció Mupa-2 ellenanyaggal,

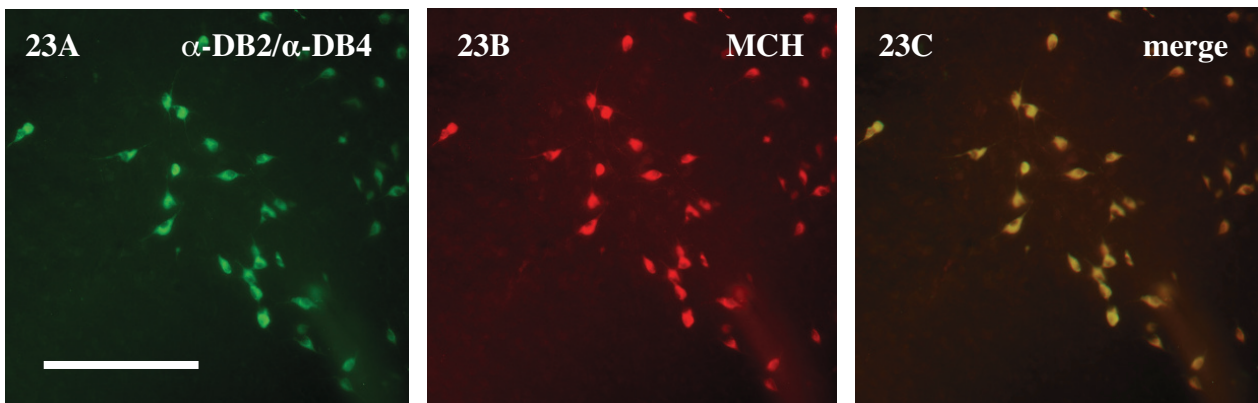
21B: α -DB2/ α -DB4 lokalizáció V-19 ellenanyaggal,

21C: utrofin és α -DB2/ α -DB4 együttes kimutatása.

Mérce: 50 μ m.



22. ábra α -DB2/ α -DB4 immunjelölés neuronokban $mdx^{\beta geo}$ egéragy laterális hypothalamusában. A nyilak az immunsapadékkal megjelölt neuronokra mutatnak. Megfigyelhető, hogy a neuronok sejtestije mellett nyúlványaik is kirajzolódnak. A nyílhegyek egy alpha-DB pozitív eret jelölnek. Mércse: 50 μ m



23. ábra Kettős immunfluoreszcens festés az $mdx^{\beta geo}$ egér laterális hypothalamusában. α -DB2/ α -DB4 és az MCH neuropeptid idegsejtekben való kolokalizációjának kimutatása.
23A: α -DB2/ α -DB4 lokalizáció, 23B: MCH lokalizáció, 23C: α -DB2/ α -DB4 és MCH kolokalizáció.
Mércse: 25 μ m

4.3. Az α -DB lokalizációja barrierekkel rendelkező szövetekben

Irodalmi adatok és saját, korábban bemutatott vizsgálataink alapján az α -DB, a disztrofin-asszociált fehérjekomplex tagjaként, az agyban részt vesz a vér-agy gát felépítésében. Ki akartuk deríteni, hogy ez a fehérje más szöveti gátakat képző szervekben jelen van-e.

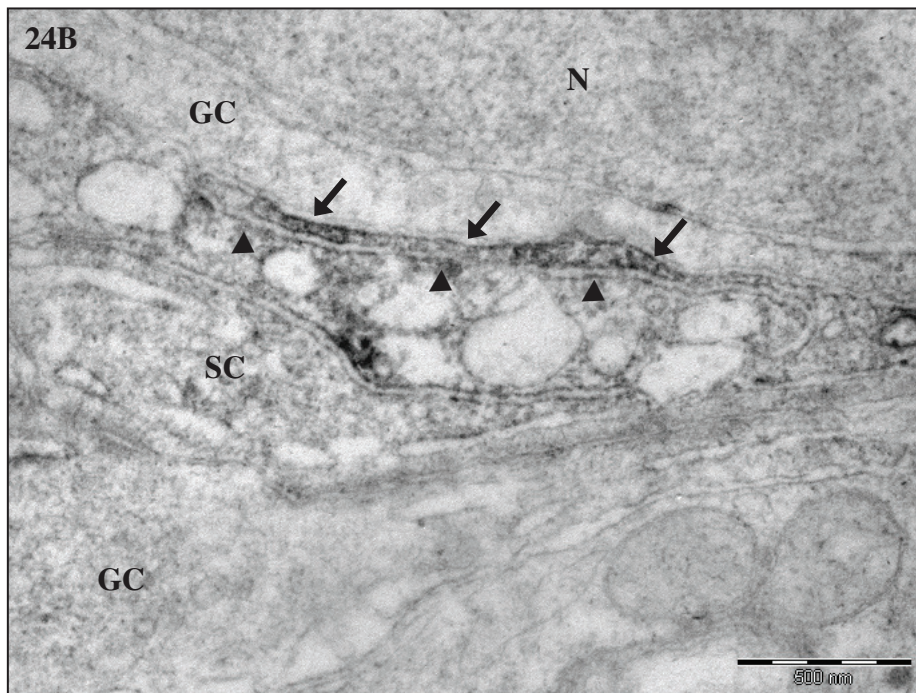
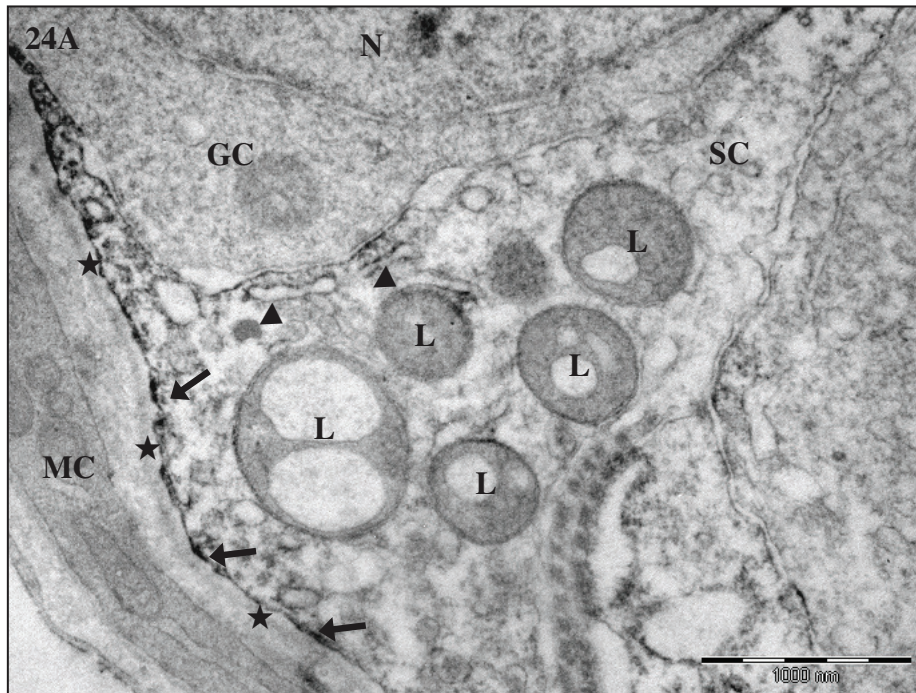
4.3.1. Az α -DB lokalizációja a herében

Felnőtt, vad típusú egerek heréjében erőteljes α -DB immunreaktivitás jelenik meg a kanyarulatot herecsatornácskák bazális régiójában. Az α -DB az alaphártya lumen felőli oldalán, a herecsatorna epitéliumában, a csírahámban expresszálódik. Ebben a rétegben a Sertoli sejtek és a spermatogóniumok találhatóak. Kísérleteinkben az α -DB sejtszintű lokalizációját elektronmikroszkópos vizsgálatokkal mutattuk ki. Vizsgálataink egyértelművé tették, hogy az α -DB kizárólag a Sertoli sejtekben fordul elő (24. ábra). Kétféle helyen találtunk α -DB pozitivitást. Legszembetűnőbb a Sertoli sejtek membránjának az alaphártyával érintkező részén megjelenő folyamatos, de nem egyforma intenzitású immunjelölés volt. Feltételezzük, hogy ez a szakaszonként erőteljesen megjelenő immuncsapadék a Sertoli sejt hemidezmoszómáihoz kötődik (24A ábra).

A másik helyszín, ahol kevésbé folyamatos, inkább foltoszerű immuncsapadék detektálható, a Sertoli sejtek csírasejtekkel határos membránjánál volt, ott, ahol a közelben a Sertoli sejt endoplazmatikus retikulumának ciszternái helyeződtek (24B ábra). Nagyobb nagyítással nyilvánvalóvá vált, hogy az α -DB a Sertoli sejt membránja és az endoplazmatikus retikulumának ciszternái között található meg. Ez a struktúra a herére jellemző, úgynevezett ektoplazmatikus specializációval azonosítható, melyek aktin alapú sejt-sejt közti adherens kapcsolatnak felel meg. Mivel a Sertoli sejtek kapcsoló struktúráinak szerepe van a vér-here gát kialakításában, feltételezzük, hogy az α -DB részt vesz ennek a barriernek a felépítésében.

4.3.2. Az α -DB lokalizációja a tüdőben

Az α -DB fénymikroszkóppal a tüdőben a tracheák és bronchusok epitéliumának bazolaterális oldalán, az alaphártya közelében mutatható ki (kollaborációs partnerünk nem bemutatott eredménye). A tüdő parenchymájában a jelölés az alveolusok falában jelent meg. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során tisztáztuk, hogy az α -DB a tüdőben a vér-levegő gátat alkotó struktúrákhoz kapcsolódik. Ezt a szöveti barrieret az alveoláris epitélium, a kapillárisok endotéliuma és a köztük húzódó alaphártya alkotja. Kimutattuk, hogy az α -DB kizárólag az 1-es típusú alveoláris epitelielsejtek epitéliumában található meg (25. ábra).

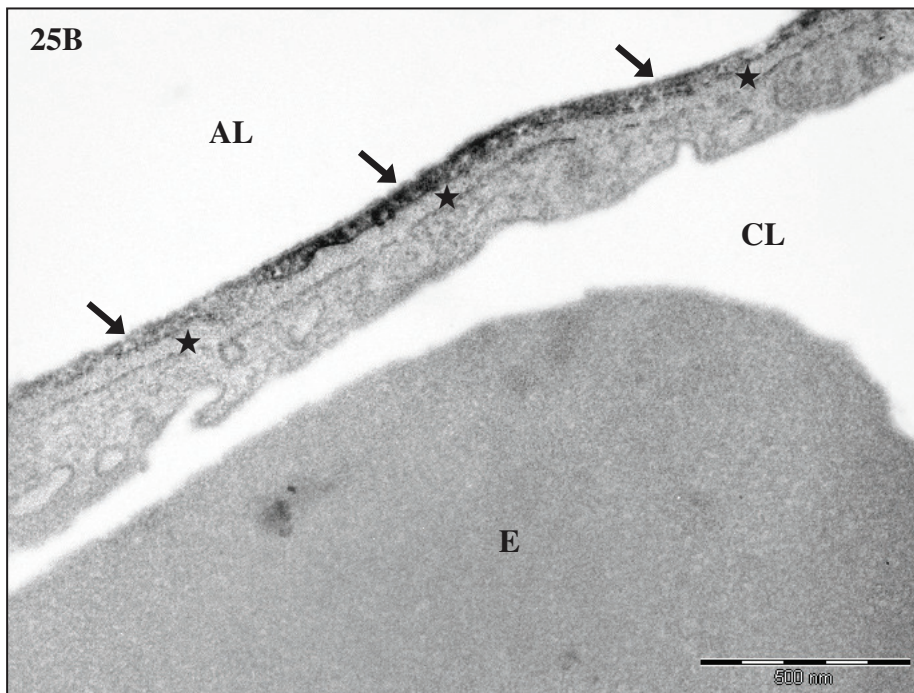
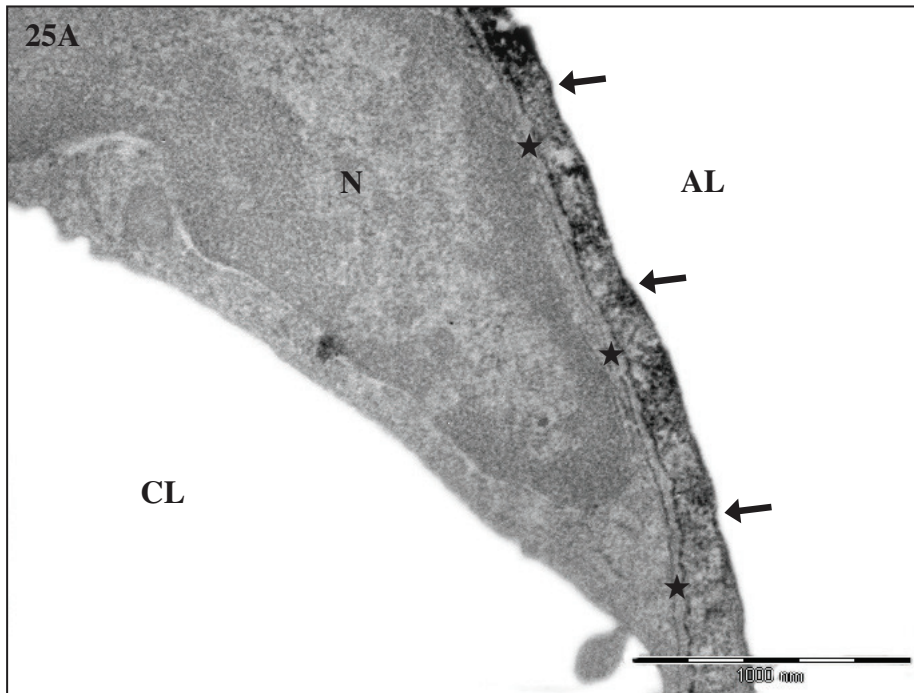


24. ábra α -DB jelölés vad típusú egér heréjében.

24A: a Sertoli sejtek alaphártyával érintkező membránjánál detektált immuncsapadékra nyilak, az endoplazmatikus retikulum cisztérnái és a plazmamembrán között lokalizált jelölésre nyílhegyek mutatnak. Csillagokkal az alaphártyát jelöltük.

24B: az α -DB jelölés a Sertoli sejt csírasejttel határos plazmamembránjánál nagyobb nagyításban. A nyilak a plazmamembrán alatti immuncsapadékot, a nyílhegyek az endoplazmatikus retikulum cisztérnáit jelölik.

Rövidítések: SC: Sertoli sejt, GC: csírasejt, MC: mioid sejt, N: sejtmag, L: lipid vezikula



25. ábra α -DB jelölés vad típusú egértüdő vér-levegő gátjában.

25A,B: immunsapadékkal erőteljesen kitöltött alveolus epitéliumra nyilak mutatnak, az alaphártya csillaggal van jelölve. Az endotélium nem tartalmaz α -DB-t.

Rövidítések: AL: alveoláris lumen, CL: kapilláris lumen, E: vörösvérsejt, N: sejtmag

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A Dp71f lokalizációja az agyban

A disztrofin fehérjék a központi idegrendszerben a posztszinaptikus denzitás integráns komponensei (De Stefano et al. 1997, Jancsik et al. 1998, Kim et al. 1992, Lidov et al. 1990), de az erre vonatkozó kutatások az itt jelen lévő disztrofin izoformák típusait csak részlegesen azonosították. Az agyban a disztrofin fehérjék közül a 70-75 kDa molekulatömegű izoformából, a Dp71-ből expresszálódik a legtöbb. A Dp71 mRNS-ét *in situ* hibridizációs vizsgálattal több agyrégióban is kimutatták és a hippocampusban találták meg a legnagyobb mennyiségben. A fehérje sejten belüli lokalizációját ez a vizsgálat azonban nem mutatta ki (Gorecki et al. 1995). A Duchenne-féle izomdisztrófiás betegekben kognitív károsodások is fellépnek, ezért feltételezhető, hogy a betegségben a hippocampus is érintett, mivel ez az agyterület a primer információ feldolgozásának fontos központja. A tervezett vizsgálat helyszínéül ezért a hippocampust választottuk. A Dp71-nek két izoformája az alternatív splicing során keletkező Dp71d és a Dp71f, melyek COOH-terminális régiójuk alapján elkülöníthetők (Feener et al. 1989). Az 5F3 monoklonális ellenanyag (Fabrizio et al. 1994) kizárólag a Dp71f COOH-terminális régiójára specifikus. Mindezek alapján kísérleteket végeztünk a Dp71f disztrofin izoforma lokalizációjára a hippocampus CA3 régiójában. Az elvégzett vizsgálatokban morfológiai bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozólag, hogy a Dp71f a hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum rétegében kis axo-dendritikus és tükesszinapszisok posztszinaptikus denzitásában lokalizálódik, míg a moharostok terminálisai által adott szinapszisokból hiányzik (7, 8. ábra).

Az immunpozitívnak talált szinapszisok morfológiailag megegyeznek a piramis sejtek és az azokat beidegző enthorinalis afferens, komisszurális, és asszociációs rostok (Freund, Buzsáki 1996) valamint az interneuronok és az azokat beidegző szemcsesejtek „en passant” szinaptikus elemei (Acsády et al. 1998) között kialakuló szinapszisokkal, de a szinapszisok azonosításához ezek a morfológiai adatok nem elegendők.

Figyelemre méltó, hogy a kis méretű axo-dendritikus és a moharost szinapszisok posztszinaptikus elemei egyaránt a piramis sejtek dendritjei, de a moharostok szinapszisaik mégsem tartalmaztak Dp71f immuncsapadékot. Az, hogy szinapszisok között a Dp71f tartalom szempontjából heterogenitás figyelhető meg, alátámasztja korábbi hipotézisünket (Jancsik et al. 1998), mely szerint az axonális komponens szerepet játszik a posztszinaptikus denzitás szerveződésében. E szerint a hipotézis szerint a szinapszisokban a disztrofin izoformák posztszinaptikus jelenlétét a neurotranszmitter jellege és ehhez kapcsolódóan a posztszinaptikus oldalon lévő neurotranszmitter receptor fajtája befolyásolja. A szinaptikus helyeződésen kívül a Dp71f-et egyes mielinhüvely nélküli és mielinhüvelyes axonokban is megtaláltuk. A kötegeket képző mielinhüvely nélküli moharostok esetében az immunreakció az axonális membránhoz kapcsolódott. Ezen kívül egyes mielinhüvelyes axonok axoplazmájában is jelölést találtunk. Az immunjelölés az axon nyúlvány sejtvezékének elemeihez kapcsolódott (8. ábra). Más, szerkezetileg hasonló mielinhüvelyes axonokban jelölés nem volt kimutatható. Feltételezzük, hogy a Dp71f az axonális elemekben (a membránban, illetve az sejtvezékben) stabilizáló szerepet lát el. Irodalmi adatok alapján a disztrofin fehérjecsalád tagjait a neuronokon belül eddig a sejttestekben

és dendritekben mutatták ki. Eredményünk tehát azt bizonyítja, hogy a Dp71f disztrofin izoforma a szakirodalomban leírtakon kívül más sejtkompartmentben is jelen van, ami a fehérje multifunkcionális szerepére utalhat. A Dp71 ultrastrukturális szinten való lokalizációja egyik fontos lépés annak a kérdésnek a tisztázásához, hogy az agyban milyen fehérje összetételű disztrofin-asszociált fehérjekomplexek állnak össze.

5.2. Az α -DB lokalizációja és karakterizálása az agyban

Az α -disztrobrevin fontos tagja a disztrofin-asszociált fehérjekomplexnek, mert képes a disztrofin és az utrofin fehérjével közvetlen kapcsolatot létesíteni. Az α -DB ezen kívül szintrofin molekulákat tud a disztrofin-asszociált fehérjekomplexhez kihorgonyozni. Ennek az a jelentősége, hogy ezáltal, a szintrofinon keresztül számos jelátviteli fehérje, receptor és ioncsatorna léphet kölcsönhatásba a DAPC-vel (Inoue et al. 2002, Hasegawa et al. 1999, Gee et al. 1998, Adams et al. 2000, 2001).

5.2.1. A DAPC egyes tagjai az agyi erekben

Az egyes DAPC fehérjék agyi érrendszerben való lokalizációjával kapcsolatban számos irodalmi adatot ismerünk, melyek néhol ellentmondásosak. Grady szerint a β -DB az agyi kapillárisokban is megtalálható (2006), ezzel szemben Blake a β -DB-t kizárólag neuronálisan lokalizálta (1998). Bragg és munkatársai szerint a kapillárisok körüli glia végtalpakban a disztrofin, az α -DB2, a γ 2-SYN és az α -szintrofin képez komplexet, míg az endotélsejtekben az utrofin a β 1- és β 2-szintrofinnal építi fel a DAPC-t (2006). Blake és munkatársai az agyi kapillárisok körüli asztrócitákban a Dp71-et, az α -DB1-et és a szintrofint tartalmazó komplexet írták le, mint a leggyakrabban előforduló DAPC-t, emellett a ritkábban előforduló, az utrofint és az α -DB1-et tartalmazó komplexet is kimutatták (1999). Ueda és kutatócsoportja a disztrobrevineket az erek körüli asztrócitákon kívül az endotélsejtekben is kimutatta (2000). Haenggi és munkatársai három különböző disztrofin-asszociált fehérjekomplexet azonosítottak az agyi erekben: az erek körüli glia végtalpakban a DAPC felépítésében a Dp71 vesz részt, a erek endotélsejtjeiben a Dp71 helyett az utrofin szerepel, és a harmadik komplex szintén utrofint tartalmaz a choroid plexus bazolaterális membránjában (2004).

Kísérleteink célja az egyes DAPC fehérjék agyi erekben való előfordulásának kimutatása volt. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat fénymikroszkópos kísérletek előzték meg. Ezen eredmények szerint az immunreakció az erek körül az α -DB1-re specifikus, illetve az α -DB1-et, az α -DB2-t és az α -DB4-et együtt kimutató ellenanyaggal is megjelent, ami alapján megállapítottuk, hogy az agyi erek falában az α -DB1 biztosan termelődik, de az α -DB2 és az α -DB4 fehérje lokalizációjára a kapillárisokban ezek alapján nem tudtunk következtetni (17. ábra). Egyes DAPC fehérjékkel kolokalizációs kísérleteket is végeztünk. Az α -DB és az utrofin fehérjéket az egérben minden vizsgált agyterületen a kapillárisok falában mutattuk ki és a két fehérje fény- és konfokális mikroszkópos szinten kolokalizálódott (11. ábra). Arra, hogy a két fehérje az erekben belül milyen sejtekben található, illetve, hogy közös DAPC-t alkotnak-e, kísérleteink alapján nem kaptunk választ, de ennek lehetősége nem kizárható. A kérdés eldöntésére további elektronmikroszkópos vizsgálatokra lesz szükség.

A β -DB lokalizációjára vonatkozó fény- és konfokális mikroszkópos eredményeink szerint az α -DB és a β -DB az agyi kapillárisokban kolokalizálódik. Az érfalban, az adott kísérleti körülmények között az α -DB immunjelölés jóval erőteljesebbnek tűnt, mint a β -DB jelölés (10. ábra). Ez az eredmény összhangban áll Grady és munkatársai által leírtakkal, akik az α -és a β -DB-t az agyi kapillárisokban lokalizálták és az α -DB kimutatható szintjét nagyobbak találták, mint a β -DB-ét (2006). Mindezek azonban ellentmondásban állnak Blake kutatócsoportjának eredményével, mely szerint a β -DB kizárólag idegsejtekben mutatható ki minden vizsgált agyterületeken, az erek falából hiányzik (1998, 1999). A fénymikroszkópos vizsgálatainkat követő elektronmikroszkópos kísérleteink morfológiai bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az agyi erekben az α -DB a kapillárisok körüli asztrociták végtalpaiban expresszálódik (12. ábra). Több kutatás az α -DB mellett számos egyéb DAPC fehérjét is kimutatott a kapillárisokat körülvevő asztrocitákban (Khurana et al. 1992, Jancsik, Hajós 1999, Szabó et al. 2004, Haengghi et al. 2004), ami arra enged következtetni, hogy az agyi kapillárisok falában is összeállnak disztrofin-asszociált fehérjekomplexek. Az általunk detektált immuncsapadék az asztrocita végtalpak alaphártyával érintkező felszínén volt detektálható, ahol Inoue és munkatársai az aquaporin-4 vízcsatornát lokalizálták (2002). Mivel a DAPC más szövetekben szerepet játszik ioncsatornák és receptorok megkötésében (Inoue et al. 2002, Hasegawa et al. 1999, Gee et al. 1998, Adams et al. 2000, 2001), ezért feltételezzük, hogy az agyi kapillárisok falában felépülő DAPC szerepet játszik a vér-agy gát működéséhez elengedhetetlenül szükséges aquaporin-4 vízcsatornák kihorgonyzásában. Nico és munkatársai disztrofinhiányos egerekben a vér-agy gát működésében súlyos zavarokat észleltek (2003, 2004), ami szintén a disztrofin fehérjék fontosságát támasztja alá. Felmerült a kérdés, hogy a disztrofinhiányos állatok agyi kapillárisaiban a vér-agy gát mely komponensei szenvednek károsodást és ezért célul tűztük ki az α -DB expresszió változásának tisztázását a disztrofinhiányos szervezetben. A kísérleteinkben $mdx^{\beta geo}$ egereket használtuk, mely állatok szervezetéből az összes disztrofin forma hiányzik (Wertz, Füchtbauer 1998). Fénymikroszkópos eredményeink szerint a disztrofint nem termelő $mdx^{\beta geo}$ állatokban, összehasonlítva a vad típusú egerekben találtakkal, az összes vizsgált agyterületre vonatkozóan sokkal kevesebb ér volt immunpozitív, és a jelölt kapillárisok kevésbé erőteljesen jelölődtek (22. ábra). Ultrastukturális szinten összehasonlítva a vad típusú és a mutáns agyat, szembetűnő a különbség. Az agyi erek körüli asztrocita végtalpak az $mdx^{\beta geo}$ egerek agyában csak szórványosan tartalmaztak immuncsapadékot (13. ábra). Megállapítottuk, hogy az α -DB expressziója a disztrofinhiányos állatban jelentősen lecsökken. Hipotézisünk szerint az α -DB mennyiségének megváltozását közvetve a Dp71 hiánya okozza, mivel az α -DB így nem képes a DAPC-hez kötődni. Az, hogy az α -DB mégsem tűnik el teljesen az erek falából, talán az utrofin disztrofint helyettesítő hatásával magyarázható. Feltételezésünk szerint a nem megfelelően összeálló és működő DAPC nem képes az aquaporin-4 csatornát megkötni, ami a vér-agy gát permeabilitásának megnövekedését okozza az agyi kapillárisok körüli asztrocita végtalpakban.

5.2.2. Az α -DB kimutatása és karakterizálása a laterális hypothalamus idegsejtjeiben

Korábbi irodalmi adatok szerint az α -DB fehérjét felnőtt állatok idegrendszerében kizárólag gliasejtek expresszálják, neuronális lokalizációját nem bizonyították. Lien és munkatársai kimutatták, hogy az

α -DB-1-et neuronok csak az embrionális fejlődés alatt termelik (2004). PhD munkám során az α -DB fehérjét a laterális hypothalamusban egy körülbelül 7 mm széles területen (Bregma -1,22 mm és -1,94 mm között) szórványosan megjelenő idegsejtek sejttestében és nyúlványaiban találtuk meg, egy kisebb idegsejt csoportot pedig a hypothalamus dorso-mediális régiójában azonosítottunk (14, 15. ábra). Ez az első bizonyíték az α -DB fehérje neuronális megjelenésére. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján tisztáztuk, hogy az α -DB az idegsejtekben az erősen kitágult endoplazmatikus retikulum ciszternáinak membránjához kötődik (16A. ábra). A jelölt sejttestek közelében immunpozitív nyúlványokat és posztszinaptikus denzitásokat találtunk (16B ábra), melyek nagy valószínűséggel az α -DB-pozitív sejttestekhez tartoznak. A jelölt szinapszisok jelenlétét a konfokális képeken is megfigyeltük (18. ábra). További kísérletekkel igazoltuk, hogy a három disztrobrevin izoforma közül csak az α -DB2/ α -DB4 fehérje expresszálódik ezekben a neuronokban (17. ábra). Az eredmények elemzése alapján nyilvánvaló, hogy a három α -DB izoforma expressziós mintázata nem azonos, az α -DB1 gliasejtekben, míg az α -DB2/ α -DB4 az idegsejtekben lokalizálódik, de ez utóbbi fehérjéknek a gliában való jelenléte sem zárható ki. Feltételezésünk szerint amennyiben a három α -DB fehérje részt vesz a DAPC felépítésében, akkor eltérő fehérje összetételű komplexek tagjai. Kimutattuk továbbá, hogy az α -DB2/ α -DB4 a laterális hypothalamus területén az idegsejtek citoplazmájában a β -DB-el kolokalizálódik (19. ábra). Van azonban egy olyan neuron csoport is, amelyben kizárólag a β -DB mutatható ki, így feltételezhető, hogy amennyiben az idegsejteken belül kialakul DAPC, akkor a két fehérje legalább kétféle, egymástól eltérő fehérje-összetételű DAPC felépítésében vesz részt és ez két neuron szubpopuláció között oszlik meg. A β -DB-t a sejttesten kívül az idegsejt magjában is kimutattuk, amiből a funkciójára vonatkozólag arra következtettünk, hogy a fehérje vagy a nukleoszkeleton felépítésében vesz részt, vagy a sejtmagban zajló transzkripció folyamatában játszik szabályozó szerepet. Különböző DAPC fehérjéket a sejtmagban korábban is kimutattak: a Dp71-et (Gonzalez et al. 2000), az α 1-DB-t (Kulyte et al. 2002), a β -DB-t (Blake et al. 1999) és az α -, β -, γ 1-SYN-eket (Hogan et al. 2001). HeLa sejtek sejtmagjában Fuentes-Mera és munkatársai találtak DAPC fehérjéket (Dp71, β -SG, β -DG, α - és β -SYN, α 1- és β -DB és nNOS), illetve azonosítottak és karakterizáltak a Dp71, β -DG, α 1-, β -DB fehérjékből és az nNOS-ból összeálló disztrofin-asszociált komplexet (2006). Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a laterális hypothalamus neuronjaiban jelenlévő α -DB2/ α -DB4 és β -DB fehérjék eltérő, bár részben átfedő idegsejt populációkban és az idegsejten belül eltérő, de részben átfedő sejt-kompartmentekben találhatóak meg. Amennyiben ezek a fehérjék a DAPC tagjai, akkor feltételezhetően eltérő fehérje-összetételű DAPC-k felépítésében vesznek részt, melyek eltérő fiziológiai feladatokat látnak el. Megállapítottuk továbbá, hogy a laterális hypothalamus idegsejtjeiben nem található utrofin, vagyis ha itt jelen van DAPC, annak felépítésében az utrofin nem vesz részt (21. ábra). A laterális hypothalamus a táplálékfelvétel, az energia háztartás és számos más fiziológiai folyamat szabályozásában fontos szerepet játszó agyi központ. Az α -DB2/ α -DB4 fehérje általunk leírt specifikus neuronális lokalizációja alapján felvetődött, hogy vajon van-e összefüggés a laterális hypothalamusban termelődő specifikus neuropeptidekkel, mint a melanin-koncentráló hormont (MCH), NPY-t, galanint és az nNOS-t és α -DB-t termelő idegsejtek között? A kolokalizációs vizsgálataink egyértelműen kimutatták, hogy az α -DB2/ α -DB4 minden MCH immunpozitív idegsejtben expresszálódik a laterális hypothalamus területén, míg a többi vizsgált peptid hormon, illetve az nNOS az α -DB2/ α -DB4-vel nem kolokalizálódik (19. ábra).

Ha feltételezzük, hogy az α -DB ezekben a neuronokban is a DAPC részeként fordul elő, akkor a komplex MCH-termelő idegsejtekben van jelen. MCH tartalmú idegsejtek kulcsszerepet játszanak a hypothalamus energia homeosztázis szabályozó feladatának ellátásában, így a kolokalizáció felveti annak lehetőségét, hogy az α -DB2/ α -DB4-re szükség van ennek a speciális fiziológiai funkciónak az ellátásához. Az α -DB lokalizációját *mdx^{βgeo}* egerek agyában is megvizsgáltuk. A fénymikroszkóppal az α -DB2/ α -DB4-et a mutáns egér agyban, a vad típushoz hasonlóan a laterális hypothalamus neuron csoportjában is kimutattuk (22. ábra). Miután tisztáztuk, hogy az *mdx^{βgeo}* egerek agyában a laterális hypothalamus területén lévő neuronokban az α -DB2/ α -DB4 expresszió a disztrofin hiánya ellenére fennmarad, és α -DB2/ α -DB4 itt is MCH-t termelő neuronokban található meg (23. ábra), ezek alapján arra következtettünk, hogy a disztrofin fehérje jelenléte, vagy hiánya nem befolyásolja az itt kialakuló DAPC-t, vagy az α -DB2/ α -DB4 nem a DAPC tagjaként van jelen az MCH neuronokban.

5.3. Az α -DB lokalizációja barrierekkel rendelkező szövetekben

Az utóbbi évek eredményei alapján a disztrobrevin fehérjék sokkal több szövetféleségben vannak jelen, mint ahogy ezt korábban feltételezték. Az izomrendszeren és az idegrendszeren kívül a szervezetben a disztrobrevinek jelen vannak a herében, a tüdőben, a vesében, májban, gyomorban is, ahol a hámsejtekben lokalizálódnak, de a fiziológiás szerepük még nem ismert. Mivel a DAPC a kutatások szerint (Khurana et al. 1992, Jancsik, Hajós 1999, Szabó et al. 2004, Haengghi et al. 2004) szerepet játszik a vér-agy gát felépítésében, ezért feltételeztük, hogy az egyéb szövetekben kialakuló gátakban szintén megtalálhatók a DB fehérjék. A herében és a tüdőben végzett vizsgálataink az α -DB izoformák specifikus lokalizációját mutatta ki, ami sajátos szerepkörökre utalhat.

5.3.1. Az α -DB lokalizációja a herében

Lien és munkatársai egérben kora embrionális kortól kezdve (E13,5) kimutatták az α -DB jelenlétét a herében, és az erős immunjelölés megmaradt a vizsgált fejlődési szakaszokban is (2004).

Az általunk megvizsgált felnőtt egérben az α -DB a here csírahámján belül a Sertoli sejtek bazolaterális oldalán volt megtalálható. A vér-here gátat a Sertoli sejtek alkotják. Sertoli sejtek a csírahám teljes szélességében kinyúlnak, és miközben az alaphártyához tapadnak, nyúlványaikkal körbeölelik a fejlődő spermatogén sejteket. Az egymás melletti Sertoli sejtek, illetve a Sertoli sejtek és a csírarsejtek között különleges sejtkapcsoló struktúrák, a specializált adherens kapcsolatok, az úgynevezett ektoplazmatikus specializációk és a herére jellemző szoros kapcsolatok alakulnak ki (Cheng, Mruk 2002, Mruk, Cheng 2004). Ezek a kapcsoló struktúrák funkcionálisan fontos szerepet töltenek be, mivel általuk válik lehetővé, hogy a here epitéliuma elkülönült mikrokörnyezettel rendelkező eltérő kompartmenteket biztosítson: a bazális rész a spermatogoniumokat, spermaticitákat míg az adluminális rész a fejlődés későbbi stádiumában lévő spermaticitákat, spermaticidákat és spermiumokat tartalmazza. Azaz a Sertoli sejtek kapcsoló struktúrái alakítják ki a vér-here gátat.

A herében végzett vizsgálatainkban az α -DB sejtszintű lokalizációjának tisztázását tűztük ki célul. Kísérleteink alapját Gorecki és munkatársai konfokális mikroszkópos vizsgálatai képezték. Először az

α -DB és az alaphártyát kijelölő kollagén IV kolokalizációját végezték el, ami alapján kiderült, hogy az α -DB a bazális membrán lumen felőli oldalán, a herecsatorna epitéliumban, vagyis a csírahámban expresszálódik. A sejt denzitás és a morfológia alapján azt a hipotézist állították fel, hogy az α -DB-t a Sertoli sejtek termelik. Ennek bizonyítására második lépésben a Sertoli sejteket felismerő specifikus ellenanyaggal, a GATA-1-el (Jarvis et al. 2005) és az α -DB1 és α -DB-2 izoformát kimutató V-19 ellenanyaggal végeztek kettős jelöléses vizsgálatokat, melyek kimutatták, hogy a herecsatornában az α -DB valóban a Sertoli sejtekben fordul elő. Az általunk elvégzett elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint az α -DB a Sertoli sejtek plazmamembránjának alaphártyával érintkező részén lokalizálódik. Az immuncsapadék szaggatott megjelenése alapján azt feltételezzük, hogy a fehérje az itt található hemidezmoszómakhoz kötődik. A másik régióban, ahol az α -DB-t kimutattuk, a Sertoli sejt sejtkepcsoló struktúrái, az ektoplazmatikus specializációk vannak (24. ábra). Az α -DB jelenléte a vér-here barrier részét képező ektoplazmatikus specializációkban a fehérje funkcionális jelentőségére utal. Az még nem tisztázott, hogy az α -DB-nek, egyedül, vagy más DAPC tagokkal együtt szerepe van-e a spermatogenezisben. Az α -DB és utrofin knock-out egér fertilis, és a fehérjének, vagy a DAPC-nek a hiánya úgy tűnik nem befolyásolja erőteljesen a here funkcióját. Feltevéseink alapján elképzelhető, hogy a β -DB esetleg képes helyettesíteni az α -DB fehérjét, de ennek bizonyításához további kísérletek szükségesek.

5.3.2. Az α -DB lokalizációja a tüdőben

A tüdőben több DAPC fehérjét is kimutattak. Az α -DB transzkriptumot már 1999-ben detektálták a felnőtt tüdőben (Holzfeind et al. 1999), és az α -DB fehérjét megtalálták a fejlődő tüdőben is (Lien et al. 2004), de a fehérje pontos lokalizációját még nem állapították meg. A β -DB előfordulását is leírták a tüdőben (Blake et al. 1998), Jones és munkatársai pedig a disztroglikánok jelenlétét a tüdő alveoláris epitelsejtjeiben mutatták ki (2005). Egy másik kutatócsoport feltételezi, hogy a tüdőben a DAPC képes a jelátviteli kaszkád számos tagjával kölcsönhatásba lépni (Spence et al. 2004). Durbeej és Campbell a tüdőben kétféle DAPC-t azonosított, a tüdő simaizom elemeiben felépülő komplex tagjai a disztroglikán, disztrofin/utrofin, β -, δ -, ϵ -szarkoglikán és a szarkoszpán, míg az epiteliális sejtekben a disztroglikán és az utrofin koexpresszálódik, de a komplex felépülésében a szarkoglikánok, és a szarkoszpán nem vesznek részt (1999). A tüdőben a gázcsere lebonyolító vér-levegő gátat az alveolusok falát felépítő 1-es típusú alveolaris epitelsejtek, a hozzájuk simuló kapillarisok endotelsejtjei és a köztük lévő közös alaphártya alkotja. Ez egy extrém erős és ugyanakkor vékony struktúra, mely tulajdonságokért elsősorban az extracelluláris mátrix a felelős (Maina et al. 2005). Kísérleteink célja az α -DB fehérje sejt szintű lokalizációjának kiderítése volt a tüdőben. Eredményeink alapján felnőtt egér tüdejében α -DB az 1-es típusú alveolaris epiteliális sejtekben található, míg az endotelsejtek α -DB-t nem expresszálnak (25. ábra). A vér-levegő gátban feltételezésünk szerint a DAPC vagy a szöveti gát szerkezetének stabilizálásában, és/vagy sejten belüli jelátviteli utak szabályozásában játszik szerepet.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A Dp71 fehérjék közül a Dp71f disztrofin izoforma lokalizációját a hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum rétegében vizsgáltuk. A Dp71f fehérje axo-dendritikus és tükkeszinapszisok posztszinaptikus denzitásában jelent meg, de a moharostok terminálisai által adott szinapszisokban nem volt megtalálható. A szakirodalomban vannak adatok egyes disztrofin fehérjék kimutatására szinapszisok posztszinaptikus denzitásaiban, de az az első bizonyíték a Dp71f fehérje posztszinaptikus lokalizálására. Eredményünk újabb adatokkal támasztja alá kutatócsoportunk korábbi hipotézisét, mely szerint az agyi szinapszisokban a disztrofin izoformák jelenlétét a neurotranszmitter jellege és a neurotranszmitter receptorok határozzák meg, és ez ad magyarázatot a különböző disztrofin fehérjék szinapszisokban való eloszlásának heterogenitására.

A szinaptikus helyeződésen kívül a Dp71f fehérjét kötegeket képző mielinhüvely nélküli axonok membránjában és mielinhüvelyes axonok axoplazmájában is lokalizáltuk. Más, szerkezetileg hasonló mielinhüvelyes axonokban immuncsapadékot nem találtunk. Új eredményünk, hogy a Dp71f fehérjét idegsejtek axonjában mutattuk ki, egy olyan sejtkompartimentben, ahol disztrofin fehérjét eddig még nem írták le.

Kimutattuk egyes DAPC fehérjék (α -DB, β -DB, utrofin) eloszlását és kolokalizációját vad típusú és *mdx* ^{β geo} egerek agyi ereiben. Az α -DB fehérjét az agyi erek falában, az asztrocita végtalpokban lokalizáltuk. Az immuncsapadék a kapillárisok alaphártyáját teljesen körülölelte. Az α -DB és az utrofin fehérjék, illetve az α -DB és β -DB fehérjék minden vizsgált területen a vad típusú egér agyi ereinek falában kolokalizálódtak. A disztrofinhiányos *mdx* ^{β geo} állatokban az immunpozitív erek száma lecsökkent, és az immunjelölés az erek körüli asztrocita végtalpokban szaggatottan jelent meg, amit azzal magyarázunk, hogy disztrofin nélkül az α -DB nem tud a komplexhez kapcsolódni. Az, hogy a fehérje nem tűnik el teljesen az erek falából, az utrofin disztrofin helyettesítő hatásával indokolható. Feltételezésünk szerint az agyi erek falában az α -DB, β -DB és utrofin fehérjék -és esetleg egyéb, általunk nem vizsgált DAPC fehérjék- által alkotott DAPC a vér-agy gát működésében vesz részt. Új eredményeink az egyes DAPC fehérjék kimutatása vad típusú és disztrofinhiányos egerek agyi ereiben, melyek új adatokkal járulnak hozzá az erekben felépülő DAPC szerkezetének tisztázásához.

Új megállapításunk, hogy az α -DB2/ α -DB4 fehérje az agyi erekben kívül az idegsejtek egy speciális csoportjában is lokalizálódik, főként a laterális hypothalamusban, de egy kisebb neuron csoport a hypothalamus dorso-mediális régiójában is jelölődik. A szétszórtan elhelyezkedő α -DB2/ α -DB4 fehérjét termelő idegsejtek a Bregma -1,22 mm és -1,94 mm közötti területen találhatóak meg, vad típusú és *mdx* ^{β geo} egerekben. A fehérje az idegsejtek sejttestében, nyúlványaiban és szinapszisainak posztszinaptikus denzitásában expresszálódik. Az idegsejtek sejttestében az α -DB2/ α -DB4 az endoplazmatikus retikulum erősen kitérített állapotban lévő ciszternáinak membránjához kapcsolódik. Az immunpozitív nyúlványok és posztszinaptikus denzitások valószínűleg a jelölt sejttestekhez tartoznak. Bebizonyítottuk, hogy az α -DB2/ α -DB4 fehérje a β -DB fehérjével kolokalizálódik a laterális hypothalamusban detektált idegsejtekben. A β -DB a citoplazmán kívül a neuronok

sejtmagjában is megjelent. Találtunk egy olyan idegsejt csoportot, amelyik csak β -DB-t tartalmazott. Kimutattuk, hogy az α -DB2/ α -DB4 tartalmú neuronok MCH neuropeptidet is expresszálnak vad típusú és *mdx* ^{β geo} egerekben, míg az α -DB2/ α -DB4 az utrofinnal, az nNOS-sal, NPY-al és a galaninnal nem kolokalizálódott.

Az α -DB2/ α -DB4 fehérje neuronális megjelenése az irodalomban eddig még nem leírt új eredmény. A laterális hypothalamus idegsejtjeiben lokalizált DAPC fehérjéssel, illetve az α -DB2/ α -DB4 fehérje és az MCH neuropeptid közös idegsejtekben való megjelenésével kapcsolatos eredményeink remélhetőleg új kutatási irányok kiindulási alapját fogja képezni.

A vér-agy gáton kívül α -DB fehérje eloszlását két szöveti gátat képző szervben, a herében és a tüdőben is megvizsgáltuk vad típusú egérben. Az α -DB a herében a vér-heré, a tüdőben a vér-levegő gát egyes elemeiben mutatható ki. Morfológiai bizonyítékot szolgáltatunk, hogy a herében az α -DB fehérje a Sertoli sejtek plazmamembránjának alaphártyával érintkező és a csírasejtek felé néző részén, a tüdőben az alveolusok falát felépítő 1-es típusú alveolaris epitelsejtek citoplazmájában detektálható. A herében és a tüdőben leírt új eredményeink hozzájárulnak a vér-heré és a vér-levegő gátban lévő DAPC sejt- és molekuláris szintű felépítésének tisztázásához.

Az egyes DAPC fehérjék lokalizációja és kolokalizációja hozzájárul a központi idegrendszerben, a herében és a tüdőben felépülő disztrofin-asszociált fehérje komplexek szerepéről meglévő ismeretek bővüléséhez és hosszú távon közelebb visz a Duchenne-féle izomdisztrófia fiziológiai és patológiai mechanizmusainak megértéséhez.

7. IRODALOM

Acsády L, Kamondi A, Freund T, Buzsáki Gy. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus.

The Journal of Neuroscience 1998 18(9):3386-3403.

Adams ME, Butler MH, Dwyer TM, Peters MF, Murnane AA, Froehner SC: Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. Neuron. 1993 11(3):531-40.

Adams ME, Kramarcy N, Krall SP, Rossi SG, Rotundo RL, Sealock R, Froehner SC. Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. J Cell Biol. 2000 150(6):1385-98.

Adams ME, Mueller HA, Froehner SC. In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. J Cell Biol. 2001 155(1):113-22.

Ahn, AH, and Kunkel, LM. The structural and functional diversity of dystrophin. Nature Genet. 1993 3:283-291.

Ahn AH, Yoshida M, Anderson MS, Feener CA, Selig S, Hagiwara Y, Ozawa E, Kunkel LM. Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 91(10):4446-50.

Ahn AH, Feener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM. The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. J Biol Chem. 1996 271(5):2724-30.

Anderson JL, Head SI, Rae C, Morley JW. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. Brain. 2002 125(1):4-13.

Amann KJ, Renley BA, Ervasti JM. A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. J Biol Chem. 1998 273(43):28419-23.

Amann KJ, Guo AW, Ervasti JM. Utrophin lacks the rod domain actin binding activity of dystrophin. J Biol Chem. 1999 274(50):35375-80.

- Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71.
Hum Mol Genet. 1995 4(9):1475-83.
- Barber AJ, Lieth E. Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier.
Dev Dyn. 1997 208(1):62-74.
- Barresi R, Moore SA, Stolle CA, Mendell JR, Campbell KP. Expression of gamma-sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex.
J Biol Chem. 2000 275(49):38554-60.
- Barresi R, Campbell KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease
Journal of Cell Science 2006 119:199-207.
- Blake DJ, Nawrotzki R, Peters MF, Froehner SC, Davies KE. Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein.
J Biol Chem. 1996 271(13):7802-10.
- Blake DJ, Nawrotzki R, Loh NY, Gorecki DC, Davies KE. Beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family.
Proc Natl Acad Sci USA. 1998 95(1):241-6.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. Different Dystrophin-like Complexes Are Expressed in Neurons and Glia
The Journal of Cell Biology 1999 147(3):645-657.
- Blake DJ, Kroger I. The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?
Trends Neurosci. 2000 23:92-99.
- Blake DJ. Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in DMD?
Neuromuscular Disorders 2002 12:110-117.
- Blake DJ, Rendon EM. Intermediate Filaments and the Function of the Dystrophin-Protein Complex
Trends Cardiovasc Med. 2002 12(5):224-8.

- Bragg AD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Adams ME, Froehner SC. Assembly of a perivascular astrocyte protein scaffold at the mammalian blood-brain barrier is dependent on alpha-syntrophin. *Glia*. 2006 53(8):879-90.
- Bresolin N, Castelli E, Comi GP, Felisari G, Bardoni A, Perani D, Grassi F, Turconi A, Mazzucchelli F, Gallotti D. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1994 4:359-69.
- Bork P, Sudol M. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci*. 1994 19(12):531-3.
- Bushby KM. The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet*. 1999 8(10):1875-82.
- Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet*. 1993 4(1):77-81.
- Campanelli JT, Roberds SL, Campbell KP, Scheller RH. A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell*. 1994 77(5):663-74.
- Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*. 1989 338(6212):259-62.
- Chapman VM, Miller DR, Armstrong D, Caskey CT. Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 86(4):1292-6.
- Cheng YS, Champliaud MF, Burgeson RE, Marinkovich MP, Yurchenco PD. Self-assembly of laminin isoforms. *J Biol Chem*. 1997 272(50):31525-32.
- Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002 82:825-874.
- Chung W, Campanelli JT. WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999 2(3):162-71.

Claudepierre T, Dalloz C, Mornet D, Matsumura K, Sahel J, Rendon A. Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells.

J Cell Sci. 2000 113(19):3409-17.

Clerk A, Morris GE, Dubowitz V, Davies KE, Sewry CA. Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle.

Histochem J. 1993 25(8):554-61.

Coffey AJ, Roberts RG, Green ED, Cole CG, Butler R, Anand R, Giannelli F, Bentley DR. Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach.

Genomics. 1992 12(3):474-84.

Cotman SL, Halfter W, Cole GJ. Identification of extracellular matrix ligands for the heparan sulfate proteoglycan agrin.

Exp Cell Res. 1999 249(1):54-64.

Cox GA, Phelps SF, Chapman VM, Chamberlain JS. New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin.

Nat Genet. 1993 4(1):87-93.

Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex.

J Biol Chem. 1997 272(50):31221-4.

Crosbie RH, Barresi R, Campbell KP. Loss of sarcolemma nNOS in sarcoglycan-deficient muscle.

FASEB J. 2002 16(13):1786-91.

Culligan K, Glover L, Dowling P, Ohlendieck K. Brain dystrophin-glycoprotein complex: Persistent expression of β -dystroglycan, impaired oligomerization of Dp71 and up-regulation of utrophins in animal models of muscular dystrophy

BMC Cell Biol. 2001 2:2.

De Stefano ME, Zaccaria ML, Cavaldesi M, Petrucci TC, Medori R, Paggi P. Dystrophin and its isoforms in a sympathetic ganglion of normal and dystrophic mdx mice: immunolocalization by electron microscopy and biochemical characterization.

Neuroscience 1997 80(2):613-624.

Dubowitz V. Muscle disorders in childhood.

Major Probl Clin Pediatr. 1978 16:1-282.

Durbeej M, Jung D, Hjalt T, Campbell KP, Ekblom P. Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis.

Dev Biol. 1997 181(2):156-67.

Durbeej M, Campbell KP. Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex.

J Biol Chem. 1999 274(37):26609-16.

Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex.

Journal of Cell Science 2002 115:2801-2803.

Engel AG, Yamamoto M, Tischbeck KH. Dystrophinopathies.

Myology 1994, 1133-1187.

Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR. Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits.

Cell Regul. 1990 1(10):731-40.

Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin.

The Journal of Cell Biology 1993 122:809-823.

Fabbrizio E, Nudel U, Hugon G, Robert A, Pons F, Mornet D. Characterization and localization of a 77 kDa protein related to the dystrophin gene family.

Biochem J. 1994 299(2):359-65.

Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus.

Nature. 1989 338(6215):509-11.

Fort P, Estrada FJ, Bordais A, Mornet D, Sahel JA, Picaud S, Vargas HR, Coral-Vazquez RM, Rendon A. The sarcoglycan-sarcospan complex localization in mouse retina is independent from dystrophins.

Neurosci Res. 2005 53(1):25-33.

Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus.

Hippocampus 1996 6:347-470.

Fuentes-Mera L, Rodriguez-Munoz R, Gonzalez-Ramirez R, Garcia-Sierra F, Gonzalez E, Mornet D, Cisneros B. Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Exp Cell Res.* 2006 312(16):3023-35.

Gaschen L, Lang J, Lin S, Ade-Damilano M, Busato A, Lombard CW, Gaschen FP. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J Vet Intern Med* 1999 13:346-56.

Gesemann M, Brancaccio A, Schumacher B, Ruegg MA. Agrin is a high-affinity binding protein of dystroglycan in non-muscle tissue. *J Biol Chem.* 1998 273(1):600-5.

Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell.* 1996 85(4):525-35.

Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci.* 1998 18(1):128-37.

Gillis JM. An attempt of gene therapy in Duchenne muscular dystrophy: overexpression of utrophin in transgenic mdx mice. *Acta Neurol Belg.* 2000 100(3):146-50.

Gonzalez E, Montanez C, Ray PN, Howard PL, Garcia-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett.* 2000 482(3):209-14.

Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet.* 1992 1(7):505-10.

Gorecki DC, Barnard EA. Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport.* 1995 6:893-6.

Grady RM, Grange RW, Lau KS, Maimone MM, Nichol MC, Stull JT, Sanes JR. Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol.* 1999 1(4):215-20.

Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. *Neuron*. 2000 25(2):279-93.

Grady RM, Wozniak DF, Ohlemiller KK, Sanes JR. Cerebellar synaptic defects and abnormal motor behavior in mice lacking alpha- and beta-dystrobrevin. *J Neurosci*. 2006 26(11):2841-51.

Haenggi T, Soontornmalai A, Schaub MC, Fritschy JM. The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of the brain. *Neuroscience*. 2004 129(2):403-13.

Haenggi T, Schaub MC, Fritschy JM. Molecular heterogeneity of the dystrophin-associated protein complex in the mouse kidney nephron: differential alterations in the absence of utrophin and dystrophin. *Cell Tissue Res*. 2005 319(2):299-313.

Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini MG, Thomas GM, Buee-Scherrer V, Cohen P, Goedert M. Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem*. 1999 274(18):12626-31.

Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987 51:919-928.

Hoffman, EP, Kunkel, LM: Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989, 2:1019-1029.

Hogan A, Shepherd L, Chabot J, Quenneville S, Prescott SM, Topham MK, Gee SH. Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem*. 2001 276(28):26526-33.

Holzfeind PJ, Ambrose HJ, Newey SE, Nawrotzki RA, Blake DJ, Davies KE. Tissue-selective expression of alpha-dystrobrevin is determined by multiple promoters. *J Biol Chem*. 1999 274(10):6250-8.

Howard PL, Klamut HJ, Ray PN. Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform.

FEBS Lett 1998 441: 337-41.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix.

Nature. 1992 355(6362):696-702.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik T, Yang B, Koepnick K, Francke U, Campbell KP. Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization.

Hum Mol Genet. 1993 (10):1651-7.

Im WB, Phelps SF, Copen EH, Adams EG, Slightom JL, Chamberlain JS. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations.

Hum Mol Genet. 1996 5(8):1149-53.

Inoue M, Wakayama Y, Liu JW, Murahashi M, Shibuya S, Oniki H. Ultrastructural localization of aquaporin 4 and alpha1-syntrophin in the vascular feet of brain astrocytes.

Tohoku J Exp Med. 2002 197(2):87-93.

Jacobson C, Cote PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S. The Dystroglycan Complex Is Necessary for Stabilization of Acetylcholine Receptor Clusters at Neuromuscular Junctions and Formation of the Synaptic Basement Membrane.

J Cell Biol. 2001 152:435-450.

Jancsik V, Hajós F. Differential distribution of dystrophin in postsynaptic densities of spine synapses.

NeuroReport 1998 9:2249-2251.

Jancsik V, Hajos F. The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes.

Brain Res. 1999 831(1-2):200-5.

Jarvis S, Elliott DJ, Morgan D, Winston R, Readhead C. Molecular markers for the assessment of postnatal male germ cell development in the mouse.

Hum Reprod. 2005 20(1):108-16.

Jimenez-Mallebrera C, Davies K, Putt W, Edwards YH. A study of short utrophin isoforms in mice deficient for full-length utrophin.

Mamm Genome. 2003 14(1):47-60. Erratum in: Mamm Genome. 2003 14(5):357.

Jones JC, Lane K, Hopkinson SB, Lecuona E, Geiger RC, Dean DA, Correa-Meyer E, Gonzales M, Campbell K, Sznajder JI, Budinger S. Laminin-6 assembles into multimolecular fibrillar complexes with perlecan and participates in mechanical-signal transduction via a dystroglycan-dependent, integrin-independent mechanism.

J Cell Sci. 2005 118(12):2557-66.

Jucker M, Tian M, Norton DD, Sherman C, Kusiak JW. Laminin alpha 2 is a component of brain capillary basement membrane: reduced expression in dystrophic dy mice.

Neuroscience. 1996 71(4):1153-61.

Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan.

J Biol Chem. 1995 270(45):27305-10.

Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I, Ikemoto T, Endo M, Hanaoka K, Nabeshima Y, Takeda S. Alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration.

J Biol Chem. 1999 274(4):2193-200.

Khurana TS, Watkins SC, Kunkel LM. The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain.

J Cell Biol. 1992 119(2):357-66.

Kim TW, Wu K, Xu JL, Black IB. Detection of dystrophin in the postsynaptic density of rat brain and deficiency in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992 89:11642-11644.

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals.

Cell. 1987 50(3):509-17.

Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility.

J Biol Chem. 1990 265(8):4560-6.

- Kulyte A, Navakauskiene R, Treigyte G, Gineitis A, Bergman T, Magnusson KE. Characterization of human alpha-dystrobrevin isoforms in HL-60 human promyelocytic leukemia cells undergoing granulocytic differentiation.
Mol Biol Cell. 2002 13(12):4195-205.
- Kummer TT, Misgeld T, Sanes JR. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost.
Curr Opin Neurobiol. 2006 16(1):74-82.
- Kunkel LM, Monaco AP, Hoffman E, Koenig M, Feener C, Bertelson C. Molecular studies of progressive muscular dystrophy (Duchenne).
Enzyme. 1987 38(1-4):72-5.
- Lebakken CS, Venzke DP, Hrstka RF, Consolino CM, Faulkner JA, Williamson RA, Campbell KP. Sarcospan-deficient mice maintain normal muscle function.
Mol Cell Biol. 2000 20(5):1669-77.
- Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues.
Proc Natl Acad Sci USA. 1992 89(12):5346-50.
- Levi S, Grady RM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR, Craig AM. Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation.
J Neurosci. 2002 22(11):4274-85.
- Lidov HG, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons.
Nature 1990 348, 725-728.
- Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus.
Hum Mol Genet. 1995 4(3):329-35.
- Lidov HGW. Dystrophin in the nervous system.
Brain Pathol. 1996 6: 63-77.
- Lien CF, Vlachouli C, Blake DJ, Simons JP, Gorecki DC. Differential spatio-temporal expression of alpha-dystrobrevin-1 during mouse development.
Gene Expr Patterns. 2004 4(5):583-93.

Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh FS, Edwards YH, Davies KE. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*. 1989 339(6219):55-8.

Love DR, Morris GE, Ellis JM, Fairbrother U, Marsden RF, Bloomfield JF, Edwards YH, Slater CP, Parry DJ, Davies KE. Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 88(8):3243-7.

Lynch GS, Hinkle RT, Chamberlain JS, Brooks SV, Faulkner JA. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *J Physiol*. 2001 535(2):591-600.

Maina JN, West JB. Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol Rev*. 2005 85(3):811-44.

McMahan UJ. The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1990 55:407-18.

McNally EM, Ly CT, Kunkel LM. Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhelin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett*. 1998 422(1):27-32.

Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Rev*. 2000 32(1):277-307.

Mizuno Y, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E. Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects. *J Neurol Sci*. 1993 (119)1: 43-52.

Mruk DD, Cheng CY. Cell-cell interactions at the ectoplasmic specialization in the testis *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2004 15(9).

Nawrotzki R, Loh NY, Ruegg MA, Davies KE, Blake DJ. Characterisation of alpha-dystrobrevin in muscle. *J Cell Sci*. 1998 111 (17):2595-605.

- Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 98(24):14108-13.
- Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol*. 2000 10(20):1295-8.
- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia*. 2003 42(3):235-51.
- Nico B, Paola Nicchia G, Frigeri A, Corsi P, Mangieri D, Ribatti D, Svelto M, Roncali L. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience*. 2004 125(4):921-35.
- Nico B, Roncali L, Mangieri D, Ribatti D. Blood-brain barrier alterations in MDX mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy. *Curr Neurovasc Res*. 2005 2(2):185.
- Oak SA, Zhou YW, Jarrett HW. Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J Biol Chem*. 2003 278(41):39287-95.
- Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 2001.
- Peng HB, Ali AA, Daggett DF, Rauvala H, Hassell JR, Smalheiser NR. The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes Commun*. 1998 5(6):475-89.
- Peters MF, Kramarcy NR, Sealock R, Froehner SC. Beta2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *Neuroreport*. 1994 5(13):1577-80.
- Peters MF, O'Brien KF, Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM, Adams ME, Froehner SC. Beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J Biol Chem*. 1997 272(50):31561-9.

Peters MF, Adams ME, Froehner SC. Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex.

J Cell Biol. 1997 138(1):81-93.

Peters MF, Sadoulet-Puccio HM, Grady MR, Kramarcy NR, Kunkel LM, Sanes JR, Sealock R, Froehner SC. Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle.

J Cell Biol. 1998 142(5):1269-78.

Piluso G, Mirabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GA, Nigro V. Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells.

J Biol Chem. 2000 275(21):15851-60.

Rivier F, Robert A, Royuela M, Hugon G, Bonet-Kerrache A, Mornet D. Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle.

J Muscle Res Cell Motil. 1999 20(3):305-14.

Roberts RG, Freeman TC, Kendall E, Vetrie DL, Dixon AK, Shaw-Smith C, Bone Q, Bobrow M. Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue.

Nat Genet. 1996 13(2):223-6.

Roberts RG, Sheng M. Association of dystrophin-related protein 2 (DRP2) with postsynaptic densities in rat brain.

Mol Cell Neurosci. 2000 16(5):674-85.

Roberts RG. Dystrophins and dystrobrevins.

Genome Biology 2001 2(4):3006.1-3006.7.

Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin.

J Cell Biol. 1996 135(3):661-72.

Saito F, Masaki T, Kamakura K, Anderson LV, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in schwann cells.

J Biol Chem. 1999 274(12):8240-6.

Schofield J, Houzelstein D, Davies K, Buckingham M, Edwards YH. Expression of the dystrophin-related protein (utrophin) gene during mouse embryogenesis.

Dev Dyn. 1993 198(4):254-64.

- Shelton GD, Liu LA, Guo LT, Smith GK, Christiansen JS, Thomas WB, Smith MO, Kline KL, March PA, Flegel T, Engvall E. Muscular dystrophy in female dogs.
J Vet Intern Med. 2001 15:240-4.
- Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy.
Neuron. 2001 30(3):677-87.
- Sicinski, P, Geng, Y, Ryder-Cook, AS, Barnard, EA, Darlison, MG, Barnard, PG. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: point mutation.
Science 1989 244:1578-1580.
- Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP. Epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex.
J Biol Chem. 1999 274(39):27989-96.
- Szabo A, Jancsik V, Mornet D, Kalman M. Immunofluorescence mapping of dystrophin in the rat brain: astrocytes contain the splice variant Dp71f, but this is confined to subpopulations.
Anat Embryol (Berl). 2004 208(6):463-77.
- Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, Jucker M. Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells.
Eur J Neurosci. 1996 8(12):2739-47.
- Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers GK, Love DR, et al. Primary structure of dystrophin-related protein.
Nature. 1992 360(6404):591-3.
- Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994 91:8307-8313.
- Tisi D, Talts JF, Timpl R, Hohenester E. Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin.
EMBO J. 2000 19(7):1432-40.
- Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Fujii Y, Takayama I, Mei X, Ohno S. Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat cerebellum.
Neurosci Lett. 2000 283(2):121-4.

- Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M. Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes.
J Biol Chem. 1998 273(3):1583-90.
- Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Sasaoka T, Ozawa E. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy.
Hum Mol Genet. 2000 9(7):1033-40.
- Vaillend C, Rendon A, Misslin R, Ungerer A. Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks.
Behav. Genet. 1995 25:569-579.
- Vaillend C, Ungerer A. Behavioral characterization of mdx 3cv mice deficient in C terminal dystrophins.
Neuromusc. Disord. 1999 9:296-304
- Vainzof M, Moreira ES, Ferraz G, Passos-Bueno MR, Marie SK, Zatz M. Further evidence for the organisation of the four sarcoglycans proteins within the dystrophin-glycoprotein complex.
Eur J Hum Genet. 1999 7(2):251-4.
- Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer EM, Wertz K, Stodkilde-Jorgensen H, Sulyok E, Doczi T, Neely JD, Agre P, Frokiaer J, Nielsen S. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice.
Proc Natl Acad Sci USA. 2002 99(20):13131-6.
- Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland DJ, Kimel G, Guttman J. Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations.
Arch Histol Cytol 2000 63:1-15.
- Watkins SC, Hoffman EP, Slayter HS, Kunkel LM. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in miofibres.
Nature. 1988 333:863-866.
- West JB, Mathieu-Costello O. Structure, strength, failure, and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier.
Annu Rev Physiol. 1999 61:543-72.
- Wertz K, Fuchtbauer EM. Dmd (mdx-beta geo): a new allele for the mouse dystrophin gene.
Dev. Dyn. 1998 212 (2):229-241.

Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice.

Hum Mol Genet. 1997 6(6):831-41.

Wilson J, Putt W, Jimenez C, Edwards YH. Up71 and up140, two novel transcripts of utrophin that are homologues of short forms of dystrophin.

Hum Mol Genet. 1999 8(7):1271-8

Zhou YW, Oak SA, Senogles SE, Jarrett HW. Laminin-alpha1 globular domains 3 and 4 induce heterotrimeric G protein binding to alpha-syntrophin's PDZ domain and alter intracellular Ca²⁺ in muscle.

Am J Physiol Cell Physiol. 2005 288(2):C377-88.

Zhou YW, Thomason DB, Gullberg D, Jarrett HW. Binding of laminin alpha1-chain LG4-5 domain to alpha-dystroglycan causes tyrosine phosphorylation of syntrophin to initiate Rac1 signaling.

Biochemistry. 2006 45(7):2042-52.

Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC. Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study.

Neuroscience. 2001 104(2):311-24.

8. SAJÁT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Közlemények:

Diana Hazai, Katalin Halasy, Dominique Mornet, Ferenc Hajós, Veronika Jancsik: Dystrophin splice variants are distinctly localized in the hippocampus
Acta Biologica Hungarica Volume 57, Number 2 / 2006 pp. 141 - 146

Hazai Diána: A Duchenne-féle disztrófia, örökletes izomsorvadás
Élet és Tudomány, 2006/3, 86-87

Chung Fu Lien, Diana Hazai, Davy Yeung, Tan Juraini, Ernst-Martin Füchtbauer, Veronika Jancsik, Dariusz C. Górecki: Expression of alpha-dystrobrevin in blood-tissue barriers: sub-cellular localisation and molecular characterisation in normal and dystrophic mice
Cell and Tissue Research. 2007 327(1):67-822006.

Diana Hazai, Chung Fu Lien, Katalin Halasy, Ferenc Hajos, Darius C. Górecki, Veronika Jancsik: Synaptic expression of alpha-dystrobrevin: localisation of a short α -dystrobrevin isoform in melanin-concentrating hormone neurons of the hypothalamus.
közlésre beküldve

Nemzetközi kongresszusokon való részvétel:

Jancsik Veronika, Halasy Katalin, Hazai Diána, Hajós Ferenc: Differential distribution of dystrophin splice variants in the brain.
16th European Cytoskeletal Forum Meeting, Maastricht, HOLLANDIA, 2001.

Hazai Diána, Jancsik Veronika: Members of the dystrophin glycoprotein complex in the hippocampus.
International IBRO Workshop, Budapest, 2004.
Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle 57. évfolyam, 1. különszám, p. 24

Hazai Diána, Górecki Darius C, Halasy Katalin, Hajós Ferenc, Jancsik Veronika: Characterization of the alpha-dystrobrevin immunoreactive neurons in the lateral hypothalamus.
International IBRO Workshop, Budapest, 2006.
Clinical Neuroscience/ Ideggyógyászati Szemle 59. évfolyam, 1. különszám, p. 26

Hazai kongresszusokon való részvétel:

Hazai Diána, Halasy Katalin, Mornet Dominique, Jancsik Veronika: Distribution of Dp71f, a dystrophin family protein, in hippocampal neurons.

Magyar Idegtudományi Társaság IX. Kongresszusa, Balatonfüred, 2003.

Hazai Diána, Jancsik Veronika, Kis Zsuzsanna, Kacs Kovics Imre: Preparation and characterization of a new anti-DP71 antibody

Magyar Tudományos Akadémia, Állatorvos-tudományi Bizottság Akadémiai Beszámoló ülése, Budapest, 2004.

Hazai Diána, Jancsik Veronika, Górecki Darius C: Alpha-dystrobrevin immunoreactivity in the adult mouse brain; occurrence in glial endfeet and in a subpopulation of hypothalamic neurons.

A Magyar Idegtudományi Társaság XI. Kongresszusa, Pécs, 2005.

Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle 58. évfolyam, 1. különszám, p. 40

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Jancsik Veronikának a támogatásáért, szakmai tanácsaiért, értékes észrevételeiért és kritikáiért. Köszönöm Prof. Sótonyi Péternek, a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Anatómiai és Szövettani Tanszék tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a disszertáció elkészítését. Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Halasy Katalinnak, aki értékes tanácsai mellett a laboratóriumi munka során is rengeteg segítséget nyújtott. Köszönöm Dr. Német Lászlónak a támogatást, Dr. Baranyai Tibornak és Dr. Fekete Csabának a dolgozatban szereplő fénymikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítséget, az Állatorvos-tudományi Kar Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékének pedig az elektronmikroszkóp használatának lehetőségét. Ezúton köszönöm meg Pető Klára és Szász Olga asszisztensnőknek a munka egésze alatt nyújtott segítséget. Végül, de nem utolsósorban szeretném hálámat kifejezni családomnak és barátaimnak a türelmükért és támogatásukért.

