

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A smoothelin-szerű fehérje 1 szerepének vizsgálata a vázizomban hipertireózis során**

Major Evelin

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



**DEBRECENI EGYETEM**

**Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

Debrecen, 2022

# **A smoothelin-szerű fehérje 1 szerepének vizsgálata a vázizomban hipertireózis során**

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

Írta: Major Evelin okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Lontay Beáta, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Hermanné Dr. Dienes Beatrix, PhD

Dr. Bugyi Beáta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora

tagok: Dr. Kristóf Endre, PhD

Dr. Kardos József, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2022. április 19. 10:00

## Bevezetés

### A pajzsmirigy túlműködése: hipertireózis

A szervezet szükségletét meghaladó mennyiségű szabad pajzsmirigyhormon által kiváltott állapotot hipertireózisnak nevezzük. Három leggyakoribb oka az autoimmun Graves-kór, a toxikus göbös strúma és a toxikus pajzsmirigy-adenóma. A hipertireózis következtében fellépő általános tünetek közé tartozik a puha, meleg bőr, hőintolerancia, intenzív izzadás, az anyagcsere fokozódása és a megtartott étvágy melletti fogyás. Gyakori a palpáció, a tachikardia, valamint az inzulinrezisztencia kialakulása. A betegek rendszerint idegesek, ingerlékenyek, tremoruk van. Az esetek 50%-ában proximális izomgyengeség lép fel.

### A hipertireózis hatása a vázizomra

A hipertireózis a szervezet valamennyi szövetére és szervére hat, különös tekintettel az ember testtömegének körülbelül 40%-át kitevő vázizomzatra, amely amellett, hogy biztosítja számunkra a testtartást, a mozgást, a légzést vagy a beszédet, olyan alapvető jelentőségű folyamatokban játszik meghatározó szerepet, mint az energiatermelés vagy a glükóz- és lipídhomeosztázis. Következésképpen bármely, a vázizmot érintő változás jelentős hatást gyakorol a szervezet egészének működésére.

A vázizom felépítési egysége a többmagvú, harántcsíkolt izomrost. Az emlősök vázizomrostjainak 4 fő típusát ismerjük: az 1, 2a, 2x és 2b. A kisebb átmérőjű 1-es típusú rostok miozin nehézlánc (MyHC) 1 fehérjét és 2a típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz (SERCA2a) expresszálnak, lassú összehúzódásúak, nem fáradékonyak, szarkoplazmás retikulumuk gyengén fejlett. Mitokondriumban gazdagok és kiterjedt kapilláris hálózattal rendelkeznek. A szarkoplazmában lévő nagy mennyiségű mioglobinnal adják jellegzetes vörös színüket. Ezen felül magas trigliceridtartalom és a szarkoplazma alacsony glikogéntartalma jellemzi. Döntően aerob anyagcserét folytatnak. Ezzel szemben glikolitikus kapacitásuk és foszfo kreatin szintjük alacsony. A nagyobb átmérőjű 2-es típusú rostok gyors összehúzódásúak, szarkoplazmás retikulumuk jól fejlett, SERCA1a-t expresszálnak, a rostokat kevésbé dús kapilláris hálózat veszi körül az 1-es típusú rostokhoz képest. Energiaszükségletüket anaerob glikolízisből fedezik, amely energetikailag kedvezőtlen, de gyors módja az ATP előállításának. Az ehhez szükséges glükóz az extracelluláris térből vagy a szarkoplazmában raktározott glikogénből származik, a folyamat végterméke laktát. A fehér színű, MyHC 2b-t expresszáló 2b típusú rostok igen magas glikogén- és foszfo kreatin-tartalmuknak köszönhetően nagy erőkifejtésre képesek, melyhez kevés számú,

kisméretű mitokondrium társul, ezért intenzív igénybevétel esetén hamar elfáradnak. Ezzel szemben a rózsaszín, MyHC 2a-t expresszáló 2a típusú rostok oxidatív és glikolitikus kapacitása egyaránt nagy, köszönhetően a magas mitokondrium-, foszfo kreatin- és mioglobin tartalomnak, ennél fogva kevésbé fáradékonyak, azonban kisebb erő kifejtésre képesek a 2b típusú rostokhoz képest. A 4 rosttípus közül a legkésőbb felfedezett, MyHC 2x-t fehérjét expresszáló 2x típusú rostok tulajdonságait tekintve átmenetet képeznek a 2a és 2b típusú rostok között. Bár léteznek olyan izmok, melyek szinte kizárólag egyféle rosttípusból épülnek fel, pl. a rágsálók *m. soleus* izma (1-es típus), a legtöbb emlős vázizomban az 1-es és 2-es típusú rostok kombinációja figyelhető meg, melyekben az expresszált MyHC fehérjék minősége és mennyisége jellemző az adott izomra.

Hipertireózis során a vérben keringő szuprafiziológiás mennyiségű pajzsmirigyhormon az izom rostösszetételét nagymértékben átalakítja: a kiindulási rosttípustól függően az MyHC 1-ből 2a, a 2a-ból 2x, a 2x-ből pedig 2b lesz. A gyors típusú rostok számának növekedése következtében a kontrakció és a relaxáció sebessége, illetve ebből eredően az energiatermelés és felhasználás sebessége is megnő. A pajzsmirigyhormonok ezen felül az izomsejtekben található nagy energiafogyasztó fehérjék, pl. SERCA és  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz (NKA) expresszióját és/vagy aktivitását is serkentik. Mindezek fenntartásához több ATP, gyorsabb előállítására van szükség, azonban a laktátelválasztás és a termogenezis emelkedése miatt az ATP termelés hatékonysága csökken, így a sejtek glükózigénye megnő. A megnövekedett glükóz iránti igényt egyrészt a raktározott glikogén fokozott lebontásából, másrészt az extracelluláris glükóz felvételének serkentéséből próbálja fedezni a sejt. Ennek ellenére hipertireózis során a vázizom normál inzulin koncentrációra adott csökkent válaszadó képességét figyelték meg, ami a vázizom inzulin mediált glükózfelvételének csökkenésében nyilvánul meg.

Bár számos genetikai és fiziológiai faktor közrejátszik az inzulinrezisztencia kialakulásában és súlyosbításában, humán alanyok bevonásával készült tanulmányok az inzulin receptor szubsztrát (IRS) megváltozott aktivitását jelölik meg, mint az inzulinrezisztencia háttérében álló közös mechanizmust. Az IRS1 a Tyr oldalláncok mellett Ser/Thr oldalláncokon is foszforilálódhat, utóbbiak pozíciótól függő módon serkentik vagy gátolják az IRS1 aktivitását. Az inzulin hatására aktiválódó protein kináz B (PKB)/Akt Ser foszforiláció például védelmet nyújt a tirozin foszfatázok ellen, pozitív visszacsatolási mechanizmussal aktív állapotban tartva az IRS1-t. Az inzulin azonban más Ser/Thr kinázokat is aktivál, pl. extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK), c-Jun N-terminális kináz (JNK), protein kináz C (PKC) és mammalian

target of rapamycin (mTOR), melyek meghatározott Ser oldalláncok foszforilálódását indukálják és negatív visszacsatolási mechanizmussal gátolják az IRS1 működését, ami az inzulinhatás megszűnésével jár. Az IRS1 pozitív Tyr/Ser foszforilációja és negatív Ser foszforilációja közötti egyensúly fontos szerepet játszik az IRS1 aktivitásának szabályozásában, ezáltal pedig a normál inzulinjelátvitelben. Ez az egyensúly különböző stresszhatások (pl. betegségek) és molekulák (pl. hormonok, aminosavak, citokinek, zsírsavak) hatására felborulhat, ami a negatív Ser foszforiláció túlsúlyba kerülését és inzulinrezisztencia kialakulását eredményezi.

### **A smoothelin-szerű fehérje 1 (SMTNL1), mint a vázizom plaszticitás fő szabályozó eleme**

A vázizom inzulinrezisztenciájának egyik potenciális szabályozó eleme a vizsgálataink középpontjában álló SMTNL1, amely nemtől függően képes szabályozni a vázizom különböző stresszhatásokra (pl. edzés, vemhesség) bekövetkező adaptálódását. Deléciója a vázizom rostösszetételének átalakítását indukálja: vemhes SMTNL1 génkiütött (KO) nőstény egerek *m. plantaris* izmának western blot analízise feltárta, hogy az MyHC 2b fehérjék expressziója szignifikánsan nő, az MyHC 2a fehérjék expressziója ezzel párhuzamosan csökken, ami a 2b/2a típusú rostok arányának eltolódásával jár. A tanulmányt jegyző kutatók vemhes és nem vemhes SMTNL1 KO egerek légzési hányadosának meghatározását is elvégezték és azt tapasztalták, hogy a nem vemhes SMTNL1 KO egerek főként a szénhidrátokat hasznosítják üzemanyagként a zsírsavakkal és fehérjékkel szemben. Ezen felül azt is megfigyelték, hogy a SMTNL1 KO egerek aktivitása jelentősebb kisebb a vad típusú (WT) egerekéhez képest, ami a metabolikus hatékonyság csökkenésére utal. Az intraperitoneális glükóztolerancia teszt kimutatta, hogy a SMTNL1 KO egerek csökkent glükóztoleranciával rendelkeznek. A csökkent glükóztolerancia eredményeképpen kialakuló inzulinrezisztencia feltehetően a SMTNL1 kiütése következtében lecsökkenő glükóz transzporter 4 (GLUT4) és IRS1 expresszió következménye.

### **A SMTNL1 fehérje és a miozin foszfatáz (MP) enzim kapcsolata**

A SMTNL1 fehérje a MP enzim szabályozásában is részt vesz a vázizom fejlődése során. A MP egy heterotrimer fehérje, ami egy 37 kDa katalitikus alegységből (PP1c), egy 110-130 kDa regulátor alegységből (MYPT) és egy máig ismeretlen funkciójú 20 kDa alegységből (M20) épül fel. A MYPT regulátor alegységnek három izoformáját ismerjük (MYPT1, MYPT2, MYPT3), melyek feladata a katalitikus alegység különböző szubsztrátokhoz való irányítása, illetve a holoenzim aktivitásának szabályozása. A MP holoenzim aktivitásának szabályozására többféle

mechanizmus jött lére, melyek közül a legalapvetőbb a MYPT alegység Ser/Thr kinázok általi foszforilációja, ami a holoenzim aktiválódását vagy gátlását vonja maga után. A MYPT1/2 alegység Thr696-os pozíciójának foszforilálódása például gátló hatású. A MP enzimaktivitás szabályozásának másik módja fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításán keresztül valósul meg. Ezen interakciós partnerek egyike a SMTNL1 fehérje, amely defoszforilált állapotában a MYPT1 alegységhez közvetlenül kötődik a citoszolban. A Ser301-es oldallánc foszforilációja következtében a SMTNL1 disszociál a MYPT1-ről és a sejtmagba transzlokálódik, így a MP enzim felszabadul a gátlás alól. A MP enzim SMTNL1 általi szabályozásának jelentősége a vázizom működésében egyelőre nem tisztázott. A MP enzim regulátor alegységének foszforiláció általi gátlása vagy csendesítése, valamint katalitikus alegységének farmakológiai gátlása a sejtek migrációjának blokkolását okozza. Mivel a migráció a vázizom fejlődésében is fontos szerepet játszik és mert a vázizom progenitor sejteinek migrációja hipertireózis során kevésbé tanulmányozott, ezért kutatásaimat ebben az irányban folytattam tovább, a SMTNL1 fehérje potenciális szabályozó szerepét is vizsgálva ezen folyamatokban. A vázizom modellezésére a normál felnőtt nőstény C3H egerek combizmából létrehozott, immortalizált C2C12 mioblaszt sejtvonalat használtam, ami egy széles körben használt modellrendszer a vázizom differenciációjának és metabolizmusának *in vitro* vizsgálatára.

Azt a folyamatot, amely magába foglalja a progenitor sejtek osztódását, migrációját és differenciációját és amely elengedhetetlen feltétele a vázizom megfelelő fejlődésének, miogenezisnek nevezzük. A miogenezist kontrolláló faktorok közül kiemelkedő jelentősége van a pajzsmirigyhormonoknak és az ezek hatásmechanizmusában résztvevő fehérjéknek, különös tekintettel a dejdináz 2 (DIO2) enzimre és a pajzsmirigyhormon receptor (TR)  $\alpha$  izoformájára. A C2C12 mioblaszt sejtek proliferatív fázisa során a TR $\alpha$  -a T3 jelenlététől függetlenül gátolja a differenciáció előrehaladását serkentő transzkripciós faktorok, mint például a mioblaszt determináló fehérje 1 (MyoD1) és a miogenin expresszióját. A differenciálódó mioblasztokban a DIO2 expressziója nő, ami az intracelluláris T3 koncentráció növekedésével jár. A növekvő T3 szint következtében a differenciációt gátló hatású transzkripciós faktorok, így például az AP-1, represszálódnak, ezáltal fokozódik a MyoD1 és a miogenin expressziója. A miociták miotubulusokká történő terminális differenciációja során a T3, a miogenin és a MYF4 jelenléte nélkülözhetetlen a vázizomrostok kontraktilis és anyagcsere-tulajdonságait meghatározó fehérjék kifejeződéséhez, különös tekintettel az MyHC és SERCA fehérjékre. Végül, de nem utolsósorban a miozin foszforilációs állapota és ezáltal az ezt meghatározó fehérjék, mint a miozin könnyűlánc

kináz (MLCK) és a MP is fontos szerepet játszanak a miotubulusok kialakulásában. A miozin foszforilációjának megváltozása esetén a mioblasztok fúziója ugyan megengedett, de kisebb méretű miotubulusok alakulnak ki.

## Célkitűzések

Mind a pajzsmirigy túlműködése, mind a SMTNL1 fehérje hiánya jelentős hatást gyakorol a vázizom felépítésére és működésére, amely kihatással van a teljes szervezet energiaháztartására is. A jelen értekezésben foglalt tanulmányok az elsők, melyek megkísérlik feltárni a hipertireózis és az azt kísérő inzulinrezisztencia, valamint a SMTNL1 fehérje kapcsolatát és ezek hatását a vázizom plaszticitására, különös tekintettel a miogenezisben szerepet játszó, a kontraktilis sajátságokat meghatározó és az anyagcserében résztvevő fehérjék expressziójára és aktivitására. Ezek alapján a kísérletes munka főbb célkitűzései a következők voltak:

- 1) A SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a vázizom anyagcseréjének szabályozásában hipertireózis során:
  - Az endogén SMTNL1 fehérje és a különböző típusú izomrostok markerfehérjének expressziós vizsgálata humán eutireózisos és hipertireózisos vázizom mintákban
  - A hipertireózis által érintett anyagcsere útvonalak és az ezen útvonalakban szerepet játszó gének és fehérjetermékek vizsgálata humán eu- és hipertireózisos vázizom mintákban
  - A T3 és a SMTNL1 fehérje hatásának vizsgálata az inzulin jelátvitelben szerepet játszó, valamint a glükóz metabolizmusban résztvevő fehérjék expressziójára és aktivitására sejtes modellrendszerben
  - A T3 és a SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a C2C12 sejtek metabolikus fenotípusának alakításában
  
- 2) A SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a C2C12 sejtek homeosztázisának és T3-függő miogenezisének szabályozásában:
  - A T3 és a SMTNL1 hatásának vizsgálata a mioblaszt sejtek migrációjára és differenciációjára
  - A T3 kezelés és a differenciáció szerepének vizsgálata a MP enzim regulátor- és katalitikus alegységeinek expressziójára
  - A T3 és a SMTNL1 fehérje szabályozó hatásának vizsgálata a MP enzim és szubsztrátjainak expressziójára és aktivitására mioblasztokban és miotubulusokban

## **Anyagok és módszerek**

### **Sejtenyésztés**

A p6-p9 passzázsszámú C2C12 egér mioblaszt sejteket 1000 mg/L glükózt, 2 mM L-glutamint, 10% (V/V) foetális borjú szérumot és fenolvöröst tartalmazó DMEM-ben (tenyésztő médium), 5% CO<sub>2</sub> szint mellett, 37 °C-on tenyésztették.

### **C2C12 sejtek tranziens transzfekciója rekombináns SMTNL1 fehérjével**

A mioblaszt sejtek tranziens transzfekciója során a szérummentes DMEM-ben lévő GeneJuice transzfekciós reagenshez 3:1 arányban hozzáadtuk a Flag jelölővel ellátott rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló plazmid DNS-t (NT-FT-SMTNL1), majd 15 percig inkubáltuk. A 15 perces inkubáció lejárta után a transzfekciós mixet cseppenként adagolva hozzáadtuk a megfelelő térfogatú sejtsuszpenzióhoz és 10 percig inkubáltuk az elegyet. Ezt követően a sejteket előre kollagénezett sejtenyésztő edénybe tettük és egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on. A transzfekció sikerességét a Flag jelölő elleni antitesttel, western blot analízissel ellenőriztük.

### **C2C12 sejtek differenciáltatása és kezelése**

Körülbelül 90%-os konfluenciánál a C2C12 sejteket 1000 mg/L glükózt, 2 mM L-glutamint és 2% (V/V) lószérumot tartalmazó, fenolvörös nélküli DMEM-ben (differenciáltató médium) tenyésztették 6 napon át. A differenciáció 1. napjának vagy 4. napjának kezdetétől a differenciáltató médiumot 10 nM-os végkoncentrációjú 3,3',5'-trijód-tironinnal (T3) is kiegészítettük. A kontroll minden esetben 1 nM T3-at tartalmazott. A differenciációs mértékének szemikvantitatív mérése differenciációs markerek elleni antitestekkel, western blot analízissel valósult meg. A PKA agonista (8-bromoadenozin-3'-5'-ciklikus monofoszfát; 8BrcAMP) kezelés NT-FT-SMTNL1 fehérjét expresszáló, differenciáltatott sejteken történt, 10 µM-os végkoncentrációban, 24 óráig.

### **C2C12 sejtek feltárása**

A sejteket radioimmunprecipitációs esszé (RIPA) pufferben [25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% nátrium deoxikolát, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 1% Triton-X 100, 1 mM fenil-metil-szulfonil (PMSF), 10x proteázgátló mix (PIC), 50x foszfatázgátló mix (PPIC), 1 µM mikrocisztin-LR (MC-LR)] lizáltuk, majd 30 másodpercig szonikáltuk és 10 percig 16 000 x g-

n, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszók fehérjekoncentrációját bicinkoninsav (BCA) esszével határoztuk meg.

### **AlamarBlue életképességi esszé**

Kísérleteinkben az NT-FT-SMTNL1 plazmida transzfektált mioblaszt sejteket (20 000 sejt/lyuk) kollagénezett 96 lyukú tenyésztőlemezen miotubulusokká differenciáltattuk. A 72 órás 10 nM-os T3 kezelést követően 20 µM végkoncentrációjú alamarBlue reagenssel inkubáltuk a sejteket 4 órán át 37 °C-on. A fluoreszcenciát 530/590 nm-en mértük le.

### **Seahorse analízis**

A mioblaszt sejteket NT-FT-SMTNL1 plazmida transzfektáltuk és kollagénezett XF96 sejtenyésztő lemezen növesztettük (10 000 sejt/lyuk). A sejtek 72 órás 10 nM-os T3 kezelését követően 180 µl XF Assay médiumot mértünk a sejtekre, amit előzetesen 1000 mg/L glükózzal egészítettünk ki. A sejteket 1 órára oxigénezett, 37 °C-os inkubátorba tettük, majd a hidratált szenzor cartridge-ot a következő inhibitorokkal töltöttük fel az injektálás sorrendjében: 1) 50 µM etomoxir; 2) 2 µM oligomycin; 3) 4 µM FCCP; 4) 10 µM antimycin + 100 mM 2-deoxi-D-glükóz. Az alapvonal felvételéhez, valamint minden injektálás után 5 mérési pontot vettünk fel. Ne gatív kontrollként az XF96 sejtenyésztő lemez négy sarkában lévő sejtet nem tartalmazó lyukakat használtuk. Minden esetben 23 technikai párhuzamossal dolgoztunk. A mérés végétével 1 N NaOH-ban oldottuk fel a sejteket és BCA esszével teljes fehérjekoncentrációt mértünk.

### **Immunprecipitáció**

A rekombináns SMTNL1 fehérje tisztítására és kölcsönható partnereinek vizsgálatára használt Anti-Flag M2 Affinity Gel gyöngyöket az aspecifikus kötődések minimalizálása érdekében 5% (m/V) BSA/ 1x TBS oldatban folyamatos kevertetés mellett blokkoltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Az NT-FT-SMTNL1 plazmida transzfektált, 24 órás T3 (10 nM) vagy 30 perces 8BrcAMP (10 µM) kezelt sejteket jéghideg lízispufferben [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1% Triton-X 100, 1 mM PMSF, 10x PIC], jégen tártuk fel. A sejlizátumok előtisztításához a mintákat protein A sepharose-zal, folyamatos kevertetés mellett inkubáltuk 4 °C-on, 1 órán át. Az előtisztított lizátumokból 200 µl-t adtunk az előzetesen blokkolt gyöngyökhöz, és folyamatos kevertetés mellett, 4 °C-on, 2 órán keresztül inkubáltuk.

A NKA és MYPT immunprecipitációjához előzetesen 30 percig, 1x TBS-ben duzzasztott protein A sepharose-t használtunk, melyhez hozzáadtuk a kötőpufferben [50 mM Tris, pH 7,0] 1:60 arányban hígított, az immunprecipitálni kívánt fehérjét kötő antitestet és 2 órán keresztül, folyamatos kevertetés mellett 4 °C-on inkubáltuk. A gyöngy-antitest komplexet 1x TBS-sel mostuk, majd 5% (m/V) BSA/1x TBS oldatban blokkoltuk 4 °C-on, 2 órán keresztül. Ezt követően a gyöngyöket 1x TBS-sel mostuk és az előtisztított C2C12 lizátummal 4 °C-on, folyamatos kevertetés mellett egy éjszakán át inkubáltuk.

Mindkét immunprecipitáció esetén az eluálás során a gyöngyökre forró, 1x SDS mintapuffert pipettáztunk és 100 °C-on, 5 percig főztük. Végül a mintákat western blot analízissel vizsgáltuk, hogy igazoljuk a vizsgált fehérjék közötti interakció meglétét vagy hiányát.

### **Immunfluoreszcencia**

A NT-FT-SMTNL1 plazmida transzfektált mioblaszt sejteket (20 000 sejt/ lyuk) kollagénezett, fekete falú OptiPlate96 sejtenyésző lemezen 5 napon keresztül differenciáltattuk. A differenciáció 0., 3. és 5. napján a sejteket 4% (m/V) paraformaldehid/1x PBS oldatban, 15 perc alatt fixáltuk. Permeabilizálás céljából a sejtekhez 0,2% (V/V) Triton-X 100/1x PBS oldatot adtunk és 4 percig inkubáltuk. A sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd 1% (V/V) lószérum/1x PBS oldatban blokkoltuk 1 órán keresztül, 4 °C-on. A rekombináns SMTNL1 fehérje és a differenciációs marker vizualizálására anti-Flag (1:100) és anti-dezmin (1:100) antitesteket használtunk, melyeket 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltunk. Másnap a fluorofórral konjugált másodlagos antitesteket, illetve az F-aktin festésére szolgáló Texas-Red Phalloidint blokkoló oldatban 200x hígítottuk és 2 óráig szobahőn inkubáltuk a sejtekkel. A fluoreszcens jeleket automatizált HCS készülékkel 10x nagyítású száraz objektívvel tettük láthatóvá.

### **Morfológiai analízis**

Az NT-FT-SMTNL1 plazmida transzfektált mioblasztokat 5 napon keresztül differenciáltattuk. A differenciáció 0., 3. és 5. napján 10x nagyítású száraz objektív segítségével fénymikroszkópos képeket készítettünk a differenciálódó sejtekről, hogy ezt követően ImageJ szoftverrel vizsgáljuk az overexpresszió hatására a sejtek morfológiájában bekövetkező változásokat. Az analízis során látóterenként 15-15 mioblaszt sejtet (0. nap) vagy miotubulust (3. és 5. nap) választottunk ki véletlenszerűen, melyeket körberajzoltunk és meghatároztuk az átlagos

területet és kerületet, melyekből a miotubulusok méretére és mennyiségére következtettünk. Ezen felül a látótérben található összes miotubulust is megszámláltuk.

### **Karcolási esszé**

A mioblaszt sejtek mosását és tripszinezését követően a sejteket szérummentes, 5 µl/ml DiI festék tartalmú médiumban vettük fel, majd 15 percen keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a sejteket háromszor átmostuk az előmelegített tenyésztő médiummal, majd NT-FT-SMTNL1 plazmával transzfektáltuk és kollagénezett, fekete falú OptiPlate96 sejttenyésztő lemezen növesztettük (20 000 sejt/ lyuk). 48 óra elteltével a sejteket szinkronizálás céljából 5 órán keresztül szérummentes médiumban éhezettük. Ezt követően 10 µl-es pipettahegy segítségével függőleges karcolatot ejtettünk minden lyukban. A karcolás után 1x PBS-sel átmostuk a sejteket a felvált sejtcsomók eltávolítására és a sejteket 10 nM T3-mal kiegészített médiumban tenyésztettük további 24 óráig. A változásokat valós időben, HCS készülékkel, 10x nagyítású száraz objektívvel detektáltuk az első lépésben hozzáadott, erősen lipofil karbocianin festék (DiI) segítségével.

### **Carbachol és tautomycetin (TMC) kezelés**

A 12 hetes NMRI egerek *m. plantaris* izmából származó preparátumot Krebs oldatot [118 mM NaCl; 4,75 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 25 mM NaHCO<sub>2</sub>; 11,5 mM glükóz] tartalmazó, 37 °C-os, 95% O<sub>2</sub>-nel és 5% CO<sub>2</sub>-dal ellátott szervfürdőbe helyeztük. A PP1 inhibitorok izompreparátumra kifejtett hatásának vizsgálatához 10 µM végkoncentrációjú TMC-vel inkubáltuk a mintát 30 percig, melyet egy 10 percig tartó 10 µM-os carbacholos kezelés követett. A kezelést követően a mintákat módosított RIPA pufferben [25 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitolt (DTT), 1 mM PMSF, 10x PIC, 50x PPIC, 1 µM MC-LR] tártuk fel. A homogenizátumokat 16 000 x g-n, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, a felülúszókat új csövekbe mértük át és BCA esszével teljes fehérjekoncentrációt mértünk. Végül a mintákat western blot analízisnek vetettük alá. Minden, az értekezésben szereplő állatokon végzett kísérlet megfelel az állatkísérletekre vonatkozó magyarországi és európai uniós etikai szabályoknak, valamint a Debreceni Egyetem etikai kódexének.

## **SDS-gélelektroforézis és western blot analízis**

A sejtek feltárását vagy a szövetek homogenizálását követően a mintákat 4x SDS mintapufferben 5 percig főztük, majd mindegyikből 30 µg fehérjét tartalmazó térfogatot vittünk fel 4-20%-os Criterion gélekre. A fehérjék méret szerinti elválasztását 200 V-on végeztük el. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk át 100 V-on, 75 perc alatt. A membránok aspecifikus kötőhelyeinek elfedésére 5% (m/V) BSA / 1x TBST-ben inkubáltuk a membránokat szobahőn, 1,5 órán át. Az elsődleges antitesteket szintén 5% (m/V) BSA/1x TBST oldatban hígítottuk és a membránokkal együtt inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Másnap a membránokat 1x TBST-vel mostuk és a blokkoló oldatban hígított, torna-peroxidáz (HRP)-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk szobahőn, 1,5 órán át. Az immunoreakciókat kemilumineszcenciás (ECL) módszerrel tettük láthatóvá.

## **Humán eutireózis és hipertireózis vázizom biopsziák homogenizálása**

Az eu- és hipertireózisos nöbetegek *m. sternohyoideus* izmából vett biopsziák homogenizálását módosított RIPA pufferben [25 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10x PIC, 50x PPIC, 1 µM MC-LR] jégen, Potter-Elvehjem szövethomogenizáló eszköz segítségével végeztük el. A homogenizátumokat 16 000 x g-n, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, majd BCA esszével teljes fehérjekoncentrációt mértünk. A humán eredetű szövetmintákat tartalmazó kísérletek megfelelnek a Debreceni Egyetem Regionális és Kutatásetikai Bizottsága (DEOEC RKEB/IKEB 3517-2011) valamint az Európai Unió Tanácsa által előírt etikai szabályoknak. A donorok írásos beleegyező nyilatkozatot írtak alá a jelen értekezésben foglalt tanulmányban való részvételre.

## **Teljes RNS izolálás humán eu- és hipertireózis biopsziákból microarray analízishez**

Az eutireózis és hipertireózis vázizom biopsziákat guanidin-izotiocianát tartalmú pufferben, TissueRuptor-ral homogenizáltuk, majd a mintákat proteináz K-val kezeltük 55 °C-on, 10 percig. A sejtörmeléket 10 000 x g-n, 3 percig tartó centrifugálással távolítottuk el, majd a felülúszókat 96-100%-os etanollal alaposan szuszpendáltuk. A DNS maradványokat DNáz I emésztéssel, RNeasy oszlopon távolítottuk el 30 °C-on, 15 perc alatt, majd átmostuk az oszlopot. Az RNS-t az eluálást követően RNáz mentes vízben vettük fel és tisztaságának, valamint koncentrációjának meghatározását spektrofotométerrel végeztük el. Az eu- és hipertireózis vázizom minták génexpressziós mintázatának vizsgálatát Affymetrix Human Gene 1.0 ST

microarray analízissel hajtottuk végre. A microarray analízis nyers adatai a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisban tekinthetők meg (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE178996>).

### **Proteome Profiler humán foszfo-kináz és foszfo-MAPK array**

A humán eu- és hipertireózisos vázizom mintákat a proteáz és foszfatáz inhibitorokkal kiegészített Lysis Buffer 6 pufferben homogenizáltuk és Array Buffer 1-ben megfelelő koncentrációjúra hígítottuk. A foszfo-kináz array-hez a mintákat a membránokkal együtt inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Másnap a membránokat detektálás céljából biotinilált antitest koktélaban inkubáltuk, 2 órán keresztül. A foszfo-MAPK array során a mintákat a detektálásra szolgáló antitest koktélaban inkubáltuk 1 óráig. Az ilyen módon előkészített minta-antitest keveréket a membránokra mértük és 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk. Mindkét array lezárásaként a membránokat Streptavidin-HRP-ben 30 percig inkubáltuk. A fehérjesávokat a kitben lévő Chemi Reagent Mix segítségével, röntgenfilmen tettük láthatóvá.

### **Statisztikai analízis**

A foszforilált fehérjéket a nem foszforilált fehérjékre, a nem foszforilált fehérjéket pedig a belső kontrollra normalizáltuk. Két csoport összehasonlítására párosítatlan kétmintás t-próbát, 4 vagy több csoport összehasonlítására egyutas ANOVA-t vagy kétutas ANOVA-t használtunk, kiegészítve a megfelelő *post hoc* teszttel. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak értékeltük, amennyiben  $p < 0,05$  volt.

## Eredmények és következtetések

### A SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a vázizom anyagcseréjének szabályozásában hipertireózis során

#### **A humán vázizom rostösszetételének és a SMTNL1 fehérje expressziójának változása hipertireózis esetén**

Pajzsmirigyműtéten átesett eu- és hipertireózisos nöbetegektől származó *m. sternohyoideus* biopsziák western blot analízisének összehasonlítása során az MyHC I és MyHC IIa fehérjék expressziójának számottevő csökkenését figyeltük meg. Mivel szignifikáns izomtömeg-csökkenést nem írtunk le, ezért feltételezhető, hogy az MyHC I és IIa rostok csökkenése mellett az MyHC IIx rostok száma nőtt, ami az oxidatív(abb) rostok csökkenése miatt egy összességében glikolitikusabb fenotípust eredményez. Érdekes módon az endogén SMTNL1 expressziója hatodára csökkent a hipertireózisos mintákban az eutireózisos mintákhoz viszonyítva, ami arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 szerepet játszik a hipertireózisos vázizom patofiziológiájában.

#### **A hipertireózis kulcsfontosságú szignalizációs útvonalak regulációjára gyakorolt hatása humán vázizomban**

Az eu- és hipertireózisos biopsziák globális génexpressziós profiljának összehasonlítása és az adatok génontológiai analízise feltárta, hogy az mTOR, AMP-aktivált protein kináz (AMPK), foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K)/Akt és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) szignalizációban résztvevő gének expressziója változott a legjelentősebb mértékben a hipertireózis hatására. Ezek többek között olyan biológiai folyamatokban játszanak szerepet mint a sejtszerkezet és szerveződés, a sejt- és szövetfejlődés, a lipid metabolizmus, az anyagcsere és energiatermelés, valamint ezek zavarai.

A microarray analízis során azonosított jelátviteli útvonalak hipertireózis által indukált fehérjeszintű változásainak tanulmányozására számos kináz relatív foszforilációs szintjét is megvizsgáltuk humán vázizomban. A Proteome Profiler foszfo-kináz és foszfo-MAPK array-k segítségével nyert eredményekből kiderül, hogy egyebek mellett az Akt2<sup>S474</sup> és az mTOR<sup>S2448</sup> foszforilációja és ezáltal az aktivitása szignifikánsan csökkent, míg az ERK1/2<sup>T202/Y204,T185/Y187</sup>, AMPK $\alpha$ 2<sup>T172</sup> és a JNK<sub>pan</sub><sup>T183/Y185,T221/Y223</sup> aktivitása szignifikánsan nőtt a hipertireózisban szenvedő betegektől származó mintákban az eutireózisos mintákhoz viszonyítva. A microarray

és a Proteome Profiler array-k eredményeit összegezve elmondható, hogy a hipertireózisnak jelentős befolyása van a vázizom anyagcseréjére az ezen folyamatokban szerepet játszó fehérjék expressziójának vagy aktivitásának módosításán keresztül.

### **A T3 kezelés hatása a C2C12 sejtek differenciációjára és az endogén SMTNL1 expressziójára**

A kifejlett vázizom modellezésére a mioblaszt sejteket miotubulusokká differenciáltattuk. A 4. naptól kezdődően egyik differenciációs marker expressziója sem változik szignifikánsan, ami azt mutatja, hogy a 4. napra teljesen végbement a differenciáció. A normál differenciáció beállítását követően a szuprafiziológiás T3 kezelés C2C12 differenciációra kifejtett hatását tanulmányoztuk. Ennek érdekében a mioblasztokat 6 napon keresztül szuprafiziológiás (10 nM) T3 koncentráció mellett differenciáltattuk. A szuprafiziológiás T3-mal kezelt sejtekben a 4. naptól kezdődően nincs szignifikáns változás a differenciációs markerek expressziójában, tehát a 4. napra kialakultak az érett miotubulusok, ahogy azt a normál differenciáció esetén is láttuk. A T3-mal kezelt sejtekben a dezmin expressziója 1 nappal korábban jelent meg a kontrollhoz képest. A 2. naptól kezdve mindkét marker magasabb szinten expresszálódik: a 4. napon a dezmin, a 6. napon pedig az MyHC expressziója szignifikánsan, 57 és 46%-kal volt magasabb a kontrollhoz képest. Ez arra utal, hogy a T3 elősegíti, gyorsítja a mioblasztok miotubulusokká történő differenciálódását.

A normál differenciáció során a SMTNL1 fehérje expressziója fokozatosan nő, azonban ez az emelkedés nem szignifikáns. A szuprafiziológiás T3 kezelés hatására a SMTNL1 expressziójának markáns növekedése látható az 1. napon, ami ezt követően fokozatosan csökken egészen a 6. napig, amikor expressziója már 4-szer kisebb a kontrollhoz képest. Érdekes módon a már differenciálódott sejteket 72 órán át 10 nM T3-mal kezelve a SMTNL1 expressziója 33%-os csökkenést mutat. Eredményeink további bizonyítékot jelenthetnek a humán mintákon látottakra, miszerint a hosszútávú T3 expozíció a SMTNL1 expressziójának csökkenését okozza.

A szuprafiziológiás, 72 órás T3 kezelés és a transzfekció C2C12 miotubulusok életképességére kifejtett hatását alamarBlue esszével vizsgáltuk. Tapasztalataink azt mutatják, hogy sem a SMTNL1 overexpressziója, sem a szuprafiziológiás T3 kezelés nem befolyásolja a miotubulusok életképességét.

## **A T3 kezelés és a SMTNL1 overexpresszió hatása a pajzsmirigyhormon-receptor izoformák expressziójára a miotubulusokban**

Sem a szuprafiziológiás T3 koncentráció, sem a SMTNL1 fehérje nem okozott szignifikáns eltérést a monokarboxilát transzporter 8 (MCT8) és a DIO2 expressziójában, ami azt mutatja, hogy a SMTNL1 fehérje sem a pajzsmirigyhormonok transzportjának sem azok intracelluláris koncentrációjának szabályozásában nem vesz részt. Ezzel szemben az effektor funkciót ellátó TR $\alpha$  expressziója drámaian, 67 és 52%-kal csökkent a T3 kezelés, valamint a SMTNL1 overexpresszió hatására, amit a kombinált kezelés még tovább fokozott. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1 nem antagonizálja a T3 TR  $\alpha$ -ra gyakorolt hatását. Érdekes módon a T3 kezelés a TR $\beta$  expresszióját szignifikánsan megemelte, melyre a SMTNL1 fehérje overexpressziójának önmagában nem volt hatása, azonban a T3 kezeléssel kombinálva képes volt a T3 által indukált emelkedést meggátolni.

A rekombináns SMTNL1 fehérje immunprecipitációja során kimutattuk, hogy a SMTNL1 és a TR-ok között nincs közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatás. A SMTNL1-t overexpresszáló miotubulusokat 8BrcAMP-vel kezelve azt tapasztaltuk, hogy a TR $\alpha$  expressziója a kombinált kezelés következtében 42%-kal csökkent a csak SMTNL1-et overexpresszáló miotubulusokhoz képest. Mindez arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 transzkripció szinten szabályozza a TR $\alpha$  expresszióját.

A MyoD1 maga is egy transzkripció faktor, ami a 2-es típusú izomrostokra jellemző gének átírásának szabályozásában vesz részt. A T3 kezelés önmagában 55%-kal, a SMTNL1 overexpressziójával kombinálva pedig 49%-kal növelte a MyoD1 expresszióját a miotubulusokban, miközben a SMTNL1 fehérjének nem volt hatása. A MyoD1 szuprafiziológiás T3 kezelésre bekövetkező expressziós növekedése a jelen modellrendszerben azt sugallja, hogy a C2C12 miotubulusok MyHC összetétele is változik a 2-es típusú rostok javára, amely hozzájárul a hipertireózis során is tapasztalható glikolitikusabb fenotípus kialakulásához. Mivel T3 kezelés hatására a MyoD1 expresszió szignifikáns növekedését, ezzel párhuzamosan pedig az SMTNL1 expresszió szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, ezért úgy gondoljuk, hogy a T3 a MyoD1-en keresztül hathat a SMTNL1 expressziójára. A szuprafiziológiás T3 kezelés hatására bekövetkező TR $\alpha$ /TR $\beta$  arány eltolódása, valamint a SMTNL1 overexpresszió általi TR $\alpha$  lereguláció azt sugallja, hogy a TR-ok közül a  $\beta$  izoforma az, amelyik a MyoD1-en keresztül a SMTNL1 expresszióját szabályozza.

## **A SMTNL1 csökkenti az IRS1 gátló Ser foszforilációját a T3 kezelt miotubulusokban**

A hipertireózisos vázizom inzulinrezisztenciájának hátterében álló molekuláris mechanizmus felderítésére az inzulin jelátvitel kritikus elemeinek expresszióját és foszforilációját tanulmányoztuk, különös tekintettel a SMTNL1 szabályozó szerepére ezen folyamatokban. Bár az IRS1 expressziója egyik kezelés hatására sem változott számottevően, a fehérje 307-es és 612-es Ser foszforilációja 1,6 és 1,8 szorosára nőtt a T3 kezelésnek köszönhetően a nem kezelt kontrollhoz viszonyítva. A SMTNL1 overexpressziója önmagában és a T3 kezeléssel kombinálva is nagymértékű csökkenést idézett elő az IRS1 Ser307 és Ser612 foszforilációjában. Az inzulin jelátvitel egy másik fontos eleme az aktivált IRS1 fehérje foszfitirozin oldalláncához kötődő PI3K, melynek 85 kDa katalitikus alegységét kódoló gén expressziója szignifikánsan csökken a hipertireózisos humán vázizom mintákban a microarray analízis értelmében, melyet a szuprafiziológiás T3-mal kezelt miotubulusokban, fehérjeszinten is sikerült igazolnunk. Eredményeink bizonyítékkal szolgálhatnak arra vonatkozóan, hogy a T3 túlkínálat zavart okoz az inzulin jelátvitelben egyrészt az IRS1 307-es és 612-es Ser foszforilációjának növelése által, ami a fehérje inaktiválódását vonja maga után, másrészt a PI3K expressziójának csökkentésén keresztül, ami a serkentő PKB/Akt általi foszforiláció csökkenését eredményezi. Ezek együttesen a negatív Ser foszforiláció túlsúlyba kerüléséhez járulnak hozzá, ami inzulinrezisztencia kialakulását indukálja. Az IRS1 gátló Ser foszforilációjának mérséklése révén a SMTNL1 fehérje azonban képes lehet a vázizom inzulinra adott normál válaszadó képességét visszaállítani.

## **Az IRS1 Ser foszforilációjáért felelős kinázok SMTNL1 általi szabályozása a T3 kezelt miotubulusokban**

A humán vázizom mintákon nyert Proteome Profiler eredmények részletezésénél láttuk, hogy a hipertireózis hatással van az IRS1 negatív Ser foszforilációjának emelkedéséért potenciálisan felelős kináz enzimek (mTOR, ERK1/2, JNK) aktivitására, azok posztranszlációs módosításán keresztül. Az eredmények validálására és a SMTNL1 szabályozó hatásának tanulmányozására C2C12 miotubulusokban vizsgáltuk a T3 kezelés és a SMTNL1 fehérje hatását ezen Ser/Thr kinázok expressziójára és foszforilációjára. A SMTNL1-et overexpresszáló, szuprafiziológiás T3-mal kezelt miotubulusokban az mTOR, ERK1/2 és JNK defoszforilált formájának expressziója nem változott jelentősen egyik kezelés hatására sem. Ezzel szemben a szuprafiziológiás T3 kezelést követően az ERK1/2 foszforilációja 57%-kal, a JNK foszforilációja pedig 18%-kal nőtt, miközben az mTOR foszforilációjában elhanyagolható változást

tapasztaltunk. Figyelemreméltó módon a SMTNL1 overexpressziója már önmagában is jelentős mértékű csökkenést eredményezett mind az ERK1/2, mind a JNK foszforilációjában, valamint képest volt a T3 által indukált emelkedést meggátolni a kombinált kezelés során. Ezen eredmények összhangban vannak az IRS1 Ser foszforilációjának változásaival. Ez alól az mTOR kivétel, hiszen a kombinált kezelésnek köszönhetően az mTOR Ser2448 foszforilációja jelentősen megemelkedett a T3-mal kezelt sejtekhez képest. Bár a Proteome Profiler array-n nem szerepelt, az IRS1 gátló foszforilációjának serkentéséért a PKC $\delta$  is felelős lehet, ezért e fehérje expresszióját is megvizsgáltuk a jelen modellrendszerben. A PKC $\delta$  expressziója T3 hatására változatlan maradt, viszont 38 és 50%-kal csökkent a SMTNL1 overexpressziójának következtében a T3 hiányától vagy jelenlététől függően. A kapott adatok magyarázatot jelenthetnek a szuprafiziológiás T3 koncentráció által előidézett gátló IRS1 Ser foszforiláció fokozódására, továbbá alátámasztják a SMTNL1 fehérje inzulinérzékenyítő hatását, ami képes az említett kinázok expressziójának vagy foszforilációjának, ezen keresztül pedig azok aktivitásának csökkentésére.

### **A SMTNL1 növeli a GLUT4 és csökkenti a hexokináz II (HK II) expresszióját a miotubulusokban**

Bár a GLUT4 expressziója a szuprafiziológiás T3 kezelés hatására nőtt a C2C12 miotubulusokban, inzulin által mediált transzlokációja a sejtmembránba valószínűleg kisebb az IRS1 inaktiválódása és a PI3K expressziójának csökkenése miatt. Továbbá, a GLUT4 transzlokációjában fontos szerepet játszó Akt2 Ser474 foszforilációjának szignifikáns csökkenése a hipertireózisos humán vázizom mintákban is erre utal. A SMTNL1 overexpressziója a GLUT4 expresszióját szignifikánsan növelte, ami az előzőekben tárgyalt IRS1 gátló Ser foszforiláció csökkentése mellett a SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatásáról tanúskodik.

A C2C12 miotubulusokban a HK II expressziója 43%-kal nőtt a T3 kezelés hatására, ami a glikolízis fokozódására enged következtetni. A SMTNL1 túltermelése a HK II expresszióját 25%-kal csökkentette mind önmagában, mind a T3 kezeléssel kombinálva. A vázizom glükózmetabolizmusának szabályozásában az AMPK enzimnek is kardinális szerepe van. Mind a hipertireózisos humán vázizombiopsziák, mind a szuprafiziológiás T3-mal kezelt miotubulusok esetén az AMPK Thr172 foszforiláció szignifikáns emelkedését tapasztaltuk. Az AMPK foszforilációjának tartós megemelkedése a fehérje defoszforilációját végző protein foszfatáz 2A katalitikus alegység  $\alpha$  (PP2A $\alpha$ ) expressziójának csökkenésével magyarázható, ugyanis a humán

vázizom minták microarray analízise feltárta, hogy a PP2A $\alpha$ -t kódoló gén expressziója szignifikánsan csökken a hipertireózis során, melyet a szuprafiziológiás T3-mal kezelt miotubulusokban fehérjeszinten is igazoltunk. Ezzel szemben a SMTNL1 overexpressziója sem az AMPK, sem a PP2A $\alpha$  fehérjék expresszióját és foszforilációját nem befolyásolta. Az irodalmi adatok és a saját eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a T3 túlkínálat hatására az AMPK aktivitása nő, ami a HK II expressziójának növelésén keresztül serkenti a glikolízist. A glikolízis fokozódásának a SMTNL1 szab határt a HK II expressziójának mérséklése által.

### **A SMTNL1 T3 antagonizáló hatása az extracelluláris savasodási rátára (ECAR) a mioblasztokban**

Modellrendszerünkben a laktáttermelés indikátorai, a savasodás alapértéke és az anaerob glikolízis 1,4 szeresére nőtt a szuprafiziológiás T3 kezelés hatására a kontrollhoz képest, amit a glikolitikus rezerv szignifikáns csökkenése kísért. Ezzel szemben az oxigénfogyasztás (OCR) alapértéke és az aerob glikolízis mértéke nem változott számottevően a 72 órás T3 kezelés hatására. Az ECAR mellett a magas koncentrációban jelenlévő T3 a zsírsav oxidáció-függő OCR értékét is fokozta, ami feltehetően az AMPK emelkedett aktivitására vezethető vissza. Ezzel szemben a SMTNL1 overexpressziója nemcsak, hogy meggátolta a T3-indukált anaerob glikolízis és zsírsav oxidáció fokozódását, de az aerob glikolízis mértékét is szignifikánsan csökkentette. A kapott adatok fényében elmondható, hogy a feleslegben lévő T3 az ECAR és a zsírsav oxidáció-függő OCR fokozódását indukálja, miközben a SMTNL1 a különböző anyagcserefolyamatok, főként a glikolízis szabályozásán keresztül antagonizálja a T3 hatását.

### **A SMTNL1 szerepének vizsgálata a C2C12 sejtek homeosztázisának és T3-függő miogenezisének szabályozásában**

#### **A SMTNL1 a MYPT1 gátlásán keresztül blokkolja a C2C12 mioblasztok migrációját**

A SMTNL1 overexpressziója a mioblaszt sejtek migrációs képességét jelentős mértékben visszavetette. A jelenséget a SMTNL1 MP enzimet gátló hatásával magyarázzuk, melynek igazolására nem csak a MP-t felépítő alegységek, hanem az enzim szubsztrátjának (20 kDa miozin könnyűlánc, MLC20) expresszióját és foszforilációját is megvizsgáltuk. A C2C12 mioblasztokon nyert eredményeink értelmében a SMTNL1 overexpressziója önmagában és a T3 kezeléssel kombinálva a MYPT1 expresszióját szignifikánsan csökkentette, míg a Thr696-os oldallánc

foszforilációját szignifikánsan növelte. A MYPT1 gátló foszforilációjának növekedését mindkét esetben az MLC20 Ser19-es oldallánc foszforilációjának szignifikáns emelkedése kísérte. A MP enzim Thr696 foszforiláció általi gátlása a nem izom miozin foszforilációjának lassabb turnoverét eredményezheti, ezáltal stabilabb adhéziós struktúrák jönnek létre, amik akadályozzák a sejtek citoskeletonjának átrendeződését és a sejtek migrációját.

A SMTNL1 fehérjével ellentétben a szuprafiziológiás T3 kezelés a MYPT1 expresszióját jelentősen nem befolyásolta, miközben gátló foszforilációja és ezzel együtt a sejtek migrációs képessége enyhén csökkent csupán. Úgy gondoljuk, hogy bár a rövidtávú, szuprafiziológiás T3 kezelés és a SMTNL1 overexpresszió is a SMTNL1 fehérje expressziójának növekedését eredményezi, a kezelések MYPT1 expresszióra kifejtett hatásában tapasztalható eltérés oka a kétféle kezelés különböző érzékenységében keresendő. A MYPT1 expresszió stagnálását azzal magyarázzuk, hogy a szuprafiziológiás T3 kezelés által előidézett endogén SMTNL1 expresszió növekedés nem elegendő a MYPT1 expressziójának befolyásolásához, míg a SMTNL1 overexpressziója (fiziológiás T3 koncentráció mellett) olyan mértékű növekményt eredményez, ami már képes hatékonyan gátolni a MP regulátor alegységének expresszióját, ezáltal pedig a mioblasztok migrációját. A szuprafiziológiás T3 kezelés az MLC20 foszforilációjának kismértékű csökkenését idézte elő, ami összhangban van a MYPT1 gátló foszforilációjának csökkenésével. Eredményeink további bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a SMTNL1 a MYPT1 expresszióját és aktivitását negatívan regulálja, illetve, hogy a MP enzim gátlása a sejtek migrációját blokkolja. A kifejlett miotubulusokra jellemző MYPT2 izofoma expresszióját is megvizsgáltuk a mioblasztokban. Azt tapasztaltuk, hogy a T3 kezelés önmagában és a SMTNL1-gyel kombinálva is nagymértékben emelte a MYPT2 expresszióját, míg a SMTNL1 overexpressziójának önmagában nem volt hatása.

### **A SMTNL1 elősegíti a C2C12 sejtek differenciációját**

A SMTNL1 által előidézett drasztikus változások a mioblasztok migrációjában arra ösztönöztek, hogy megvizsgáljuk a fehérje lehetséges szabályozó szerepét a vázizom miogenezisének következő lépcsőfokát jelentő differenciáció folyamatában is. Fiziológiás T3 koncentráció mellett a SMTNL1 overexpressziója a dezmin és MyHC differenciációs markerek felregulálódását okozza: a 2. naptól kezdve mindkét marker magasabb szinten expresszálódik, ami tendenciájában a szuprafiziológiás T3 kezelés dezmin és MyHC expresszióra kifejtett hatására emlékeztet. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1 overexpressziója a

szuprafiziológiás T3 kezelés hatását mimikálja. Ez arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 segíti a C2C12 mioblasztok miotubulusokká történő differenciációját. A molekuláris szintű változásokon túlmenően a differenciáció során bekövetkező morfológiai változásokat is nyomon követtük. Megfigyeléseink szerint a SMTNL1 overexpressziója kisebb méretű, de nagyobb számú miotubulus kialakulását indukálja, ami támogatja a SMTNL1 fehérje differenciációt elősegítő hatásáról alkotott hipotézisünket.

### **A MP regulátor alegységeinek eltérő szabályozása a T3 és a SMTNL1 hatására a miotubulusokban**

A mioblasztok differenciációjának vizsgálatánál a SMTNL1 túltermeltetése mellett a T3 hatását is tanulmányoztuk, különös tekintettel a T3 hatásmechanizmusának kialakításában szerepet játszó regulátor fehérjék (DIO2, TR $\alpha$ ) expressziójára. Modellrendszerünkben a DIO2 expressziója fiziológiás körülmények között egészen a 4. napig növekvő tendenciát mutat (ami egybeesik az érett miotubulusok kifejlődésével), majd ettől kezdve már nem változik szignifikánsan. A szuprafiziológiás T3 kezelés a 3. napig fokozatosan emelte a DIO2 expresszióját, ami a 4. naptól kezdődően azonban látványos csökkenésnek indult, egy negatív visszacsatolási mechanizmus bekapcsolását feltételezve. A TR $\alpha$  expressziója már a mioblasztokban is detektálható; szintje a fiziológiás T3 koncentráció mellett nőtt a differenciáció során, míg szuprafiziológiás T3 kezelés hatására a 4., 5. és 6. napon (tehát a kifejlett miotubulusokban) szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz viszonyítva, ami összhangban van az érett miotubulusok 72 órás T3 kezelése során kapott eredményekkel.

Fiziológiás T3 koncentráció mellett a MYPT2 expressziójának növekedését, míg a MYPT1 expressziójának nem szignifikáns visszaesését tapasztaltuk a 6 napos kísérleti periódus végére, miközben a PP1c $\delta$  expressziója a teljes időtartam alatt változatlan maradt. Az eredményekből kitűnik, hogy míg a mioblasztokban a PP1c $\delta$  inkább a MYPT1 izoformával alkot komplexet, addig az érett miotubulusokban elsősorban a MYPT2 az, amely a PP1c $\delta$ -val közösen vesz részt a MP holoenzim felépítésében. Érdekes módon a szuprafiziológiás T3 kezelés a differenciálódó mioblasztokban a MYPT2 expresszióját növelte, míg a PP1c $\delta$  és a MYPT1 expressziójára nem volt hatással, ahogy azt a proliferatív fázisban lévő mioblasztok vizsgálatánál is tapasztaltuk.

A miotubulusok vizsgálatánál is hasonló eredményre jutottunk: a MYPT1 expressziója T3 kezelés hatására nem változott, de a SMTNL1 overexpressziója és a kombinált kezelés szignifikáns visszaesést okozott a fehérje relatív expressziójában. Ezzel szemben a MYPT2

expressziója drámaian, 56 és 54%-kal emelkedett a T3 kezelés, valamint a kombinált kezelés hatására, miközben a SMTNL1 overexpressziója nem volt hatással rá. A PP1c  $\delta$  expressziója kis mértékben nőtt a T3 kezelés és/vagy a SMTNL1 overexpressziójának következtében. A mioblasztokon és a miotubulusokon nyert eredményeket összegezve úgy tűnik, hogy a T3 és a SMTNL1 szelektíven szabályozzák a különböző MYPT izoformák kifejeződését mind a differenciálatlan, mind a már differenciálódott sejtekben.

A MYPT1/2 Thr696-os oldalláncának gátló foszforilációja szignifikánsan megemelkedett mind a T3, mind a kombinált kezelésnek köszönhetően, míg a SMTNL1 overexpressziója önmagában marginálisan szignifikáns növekedést produkált a miotubulusokban. A mioblasztokban és a miotubulusokban tapasztalt T3 és/vagy SMTNL1 általi MP enzimgátlás azt mutatja, hogy a T3 és a SMTNL1 differenciációt elősegítő hatásának megjelenésében a differenciációs markerek felregulálásán felül a MP enzim gátlásának is szerepe lehet.

### **A T3 és a SMTNL1 hatása egy alternatív MP szubsztrát, a NKA expressziójára és aktivitására a miotubulusokban**

A C2C12 mioblasztokban kimutattuk a NKA és a MYPT koprecipitációját, ami arról árulkodik, hogy a NKA képes a MP-hoz kötődni annak szabályozó alegységén keresztül. A T3 kezelés önmagában és a SMTNL1 túltermelésével kombinálva 41 és 32%-kal serkentette a NKA expresszióját, míg a SMTNL1 overexpressziója nem befolyásolta azt. A NKA Ser23-as és Ser16-os gátló foszforilációs helyeinek vizsgálatakor mind a szuprafiziológiás T3 kezelés, mind a SMTNL1 overexpresszió következményeként szignifikánsan emelkedett foszforilációt mutattunk ki. Ez vélhetően a MP enzim megnövekedett gátló foszforilációjának köszönhető, amely így nem képes defoszforilálni a NKA-t. Ezt a megfigyelést egérből izolált *m. plantaris* izompreparátum PP1 szelektív inhibitorral (TMC) való kezelése is alátámasztja, melyben fokozott NKA $\alpha$ 1 Ser23-as foszforilációt detektáltunk. Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy mind a T3 mind a SMTNL1 a különböző MYPT izoformák, ezáltal pedig a MP holoenzim gátlásán keresztül részt vesz a NKA foszforilációs állapotának szabályozásában. A pumpafehércé hipofunkciója esetén a membránpotenciál pozitívabb, a sejtmembrán depolarizáltabb, emiatt a feszültségfüggő Na<sup>+</sup> csatornák egy része inaktívált állapotba kerül, ezért az akciós potenciál amplitúdója kisebb, kevesebb Ca<sup>2+</sup> szabadul fel ami kisebb mértékű összehúzódást, ezáltal pedig izomgyengeséget eredményez, ami magyarázhatja a hipertireózisos betegek izompanaszait.

## Összefoglalás

Vizsgálataim során a vázizom adaptálódását szabályozni képes transzkripciós kofaktor, a SMTNL1 fehérjének a hipertireózisos vázizom anyagcseréjében betöltött, valamint a C2C12 sejtek miogenezisében és homeosztázisában játszott szabályozó szerepét tanulmányoztam.

Humán eu- és hipertireózisos vázizom biopsziák western blot analízise feltárta, hogy a SMTNL1 expressziója drámaian csökken a hipertireózis hatására, az I és IIa típusú rostok markerfehérjéinek számottevő csökkenése mellett. A differenciáltatott C2C12 sejtekben a TR $\alpha$ /TR $\beta$  arány csökkenését, a MyoD1 szignifikáns növekedését, valamint megemelkedett IRS1 gátló Ser foszforilációt és a PI3K expresszió visszaesését detektáltuk a szuprafiziológias T3 kezelés hatására, míg a SMTNL1 overexpressziója a TR $\alpha$  expresszióját, valamint az IRS1 Ser foszforilációját markánsan csökkentette. A megnövekedett IRS1 Ser foszforiláció a szuprafiziológias T3 kezelés következtében aktiválódott IRS1 kinázok, mint az ERK1/2 és a JNK tevékenységének eredménye, melyet a hipertireózisos humán minták Proteome Profiler elemzése is alátámaszt. Az IRS1 kinázok hatását a SMTNL1 overexpressziója képes volt semlegesíteni a miotubulusokban. A T3-mal kezelt sejtekben a PP2A $\alpha$  expressziójának csökkenése az AMPK foszforiláció tartós megemelkedését vonta maga után, ami a HK II expressziójának indukálásán keresztül fokozta a glikolízist. A mioblastok Seahorse analízise rávilágított, hogy T3 kezelésre fokozódik a laktáttermelés és a zsírsav oxidáció, melyeket a SMTNL1 overexpressziója eredményesen gátol. Eredményeink alapján a SMTNL1 fehérje inzulinérzékenyítő és T3 antagonistáló hatása révén képes a hipertireózis és az azt kísérő inzulinrezisztencia mérséklésére, melyet többek között az IRS1 kinázok aktivitásának, valamint a HK II enzim expressziójának csökkentésén keresztül ér el.

Bizonyítottuk, hogy a C2C12 mioblastokban a MP felépítésében a PP1 $\delta$  mellett a MYPT1 izoforma vesz részt. A sejtek karcolási esszéje során azt tapasztaltuk, hogy a SMTNL1 overexpressziója a MP enzim gátlásán keresztül a sejtek migrációját szignifikánsan lassítja, míg miotubulusokká történő differenciációjukat -a T3 kezeléssel egyetemben- elősegíti a differenciációs markerek expressziójának növelésén keresztül. Megállapítottuk, hogy a kifejlett miotubulusokban a PP1 $\delta$  elsősorban a MYPT2 izoformával alkot komplexet, melynek aktivitása T3 által regulált. A MP T3 és SMTNL1 általi gátlásának köszönhetően az NKA foszforilációja jelentős mértékben nő, ami a pumpafehérje blokkolását okozza, ezzel hozzájárulva a hipertireózis során tapasztalható izomgyengeség kialakulásához.



Nyilvántartási szám: DEENK/497/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Major Evelin  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Major, E.**, Győry, F., Horváth, D., Keller, I., Tamás, I., Uray, K., Fülöp, P., Lontay, B.: Smoothelin-like protein 1 regulates development and metabolic transformation of skeletal muscle in hyperthyroidism.  
*Front Endocrinol (Lausanne)*. 12, 1-17, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.751488>  
IF: 5.555 (2020)
2. **Major, E.**, Keller, I., Horváth, D., Tamás, I., Erdődi, F., Lontay, B.: Smoothelin-like Protein 1 Regulates the Thyroid Hormone-Induced Homeostasis and Remodeling of C2C12 Cells via the Modulation of Myosin Phosphatase.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (19), 1-18, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910293>  
IF: 5.923 (2020)

### További közlemények

3. Uray, K., **Major, E.**, Lontay, B.: MicroRNA Regulatory Pathways in the Control of the Actin-Myosin Cytoskeleton.  
*Cells*. 9 (7), 1-32, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9071649>  
IF: 6.6
4. Horváth, D., Sipos, A., **Major, E.**, Kónya, Z., Bátori, R. K., Dedinszki, D., Szöllősi, A. G., Tamás, I., Iván, J., Kiss, A., Erdődi, F., Lontay, B.: Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin.  
*Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* 1864 (10), 3268-3280, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.013>  
IF: 4.328





5. Iván, J., Major, E., Sipos, A., Kovács, K., Horváth, D., Tamás, I., Bai, P., Dombrádi, V., Lontay, B.:  
The Short-Chain Fatty Acid Propionate Inhibits Adipogenic Differentiation of Human Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells Through the Free Fatty Acid Receptor 2.  
*Stem Cells Dev.* 26 (23), 1724-1733, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2017.0035>  
IF: 3.315

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,721**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
11,478**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.11.19.

