

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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

Tartalomjegyzék

Rövidítések	6
Bevezetés	9
1. Irodalmi áttekintés	10
1.1. A pajzsmirigyhormonok szintézise, szekréciója és szabályozása	10
1.2. A pajzsmirigyhormonok hatásmechanizmusa	11
1.2.1. A pajzsmirigyhormonok felvétele a sejtekbe	11
1.2.2. A pajzsmirigyhormonok metabolizmusa.....	12
1.2.3. A pajzsmirigyhormonok genomi hatásai.....	13
1.2.4. A pajzsmirigyhormonok nem genomi hatásai	15
1.2.5. A pajzsmirigy túlműködése: hipertireózis	17
1.3. A hipertireózis hatása a vázizomra	19
1.4. A SMTNL1 mint a vázizom plaszticitás szabályozó eleme	26
2. Célkitűzések	32
3. Anyagok és módszerek	33
3.1. Vegyszerek	33
3.2. Antitestek	33
3.3. Sejttenyésztés	33
3.4. Sejttenyésztő edények kollagénezése	33
3.5. C2C12 sejtek tranziens transzfeckciója rekombináns SMTNL1 fehérjével	33
3.6. C2C12 sejtek differenciáltatása és kezelése	35
3.7. C2C12 sejtek feltárása	35
3.8. AlamarBlue életképességi esszé	36
3.9. Seahorse analízis	36
3.10. Immunprecipitáció	38
3.11. Immunfluoreszcencia	39
3.12. Morfológiai analízis	39

3.13.	Karcolási esszé	40
3.14.	Carbachol és tautomycetin (TMC) kezelés	40
3.15.	SDS-gélelektroforézis és western blot analízis	41
3.16.	A membránok sztrippelése	41
3.17.	A membránok HRP inaktiválása	42
3.18.	Eutireózis és hipertireózis humán vázizom biopsziák homogenizálása	42
3.19.	Teljes RNS izolálás humán vázizom biopsziákból microarray analízishez	42
3.20.	Proteome Profiler humán foszfo-kináz és foszfo-MAPK array	43
3.21.	Statisztikai analízis	43
4.	Eredmények	45
4.1.	A SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a vázizom anyagcseréjének szabályozásában hipertireózis során	45
4.1.1.	Eu- és hipertireózisos humán donorok neme, életkora és testtömegindexe	45
4.1.2.	A humán vázizom rostösszetételének változása hipertireózis esetén.....	45
4.1.3.	A SMTNL1 fehérje expressziója a vázizomban hipertireózis során	45
4.1.4.	Humán vázizom biopsziák globális génexpressziós profiljának vizsgálata és géntonológiai analízise	46
4.1.5.	A hipertireózis kulcsfontosságú szignalizációs útvonalakban szerepet játszó kináz enzimek regulációjára gyakorolt hatása humán vázizomban	48
4.1.6.	A T3 kezelés hatása a C2C12 sejtek differenciációjára és az endogén SMTNL1 expressziójára.....	50
4.1.7.	A T3 kezelés és a SMTNL1 overexpresszió befolyásolja a T3 hatásmechanizmusában szerepet játszó fehérjék expresszióját a C2C12 miotubulusokban.....	52
4.1.8.	A SMTNL1 overexpressziója T3 jelenlétében csökkenti az IRS1 Ser foszforilációját a miotubulusokban	55
4.1.9.	Az IRS1 kinázok SMTNL1 általi szabályozása T3 kezelés hatására a miotubulusokban.....	58

4.1.10. A SMTNL1 overexpressziója T3 jelenlétében növeli a GLUT4 és csökkenti a HK II expresszióját a miotubulusokban	60
4.1.11. A SMTNL1 overexpressziója antagonizálja a T3 savasodási rátára kifejtett hatását a mioblasztokban	61
4.2. A SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a C2C12 sejtek homeosztázisának és T3-függő miogenezisének szabályozásában.....	65
4.2.1. A SMTNL1 overexpressziója gátolja a mioblasztok migrációját	65
4.2.2. A SMTNL1 overexpressziója serkenti a MYPT1 és az MLC20 foszforilációját a mioblasztokban	65
4.2.3. A SMTNL1 overexpressziója elősegíti a C2C12 sejtek differenciációját....	67
4.2.4. A MP enzim expressziója a C2C12 sejtek differenciációja során és T3 jelenlétében	70
4.2.5. A MP regulátor alegységeinek eltérő szabályozása a T3 és a SMTNL1 hatására a miotubulusokban.....	73
4.2.6. A T3 és a SMTNL1 hatása egy alternatív MP szubsztrát, a NKA expressziójára és aktivitására	75
5. Megbeszélés	78
5.1. A SMTNL1 fehérje szerepe a vázizom anyagcseréjének szabályozásában hipertireózis során	78
5.1.1. A hipertireózis hatására csökken a SMTNL1 expressziója humán vázizomban	78
5.1.2. A hipertireózis kulcsfontosságú szignalizációs útvonalakat szabályoz a humán vázizomban	79
5.1.3. A T3 elősegíti a C2C12 sejtek differenciációját és gátolja az endogén SMTNL1 expresszióját	80
5.1.4. A T3 és a SMTNL1 csökkenti a TR α expresszióját a miotubulusokban	81
5.1.5. A SMTNL1 csökkenti az IRS1 gátló Ser foszforilációját a T3-kezelt miotubulusokban.....	83
5.1.6. A SMTNL1 a glikolízis gátlásán keresztül antagonizálja a T3 hatását a miotubulusokban.....	85

5.2. A SMTNL1 szerepe a C2C12 sejtek homeosztázisának és T3-függő miogenezisének szabályozásában	89
5.2.1. A SMTNL1 a MP enzim gátlásán keresztül blokkolja a C2C12 mioblasztok migrációját és elősegíti azok differenciációját.....	89
5.2.2. A SMTNL1 és a T3 szelektíven szabályozzák a MYPT1 és MYPT2 izoformát a miotubulusokban.....	91
5.2.3. A T3 és a SMTNL1 a MP enzim gátlásán keresztül csökkentik a NKA aktivitását a miotubulusokban.....	94
Összefoglalás	96
Summary	97
Tárgyszavak (Keywords).....	98
Irodalomjegyzék	99
Köszönetnyilvánítás.....	119
Függelék.....	120

Rövidítések

2-DG	2-deoxi-D-glükóz
8BrcAMP	8-bromoadenozin-3'-5'-ciklikus monofoszfát
AMPK	AMP-aktivált kináz
AP-1	aktivátor fehérje 1
ATP	adenozin-trifoszfát
BCA	bicinkoninsav
BMI	testtömegindex
BSA	borjú szérum albumin
CBD	kalmomodulinkötő domén
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CH	kalponin-homológia
CPT	karnitin-palmitoil-transzferáz
DBD	DNS-kötő domén
DIO	dejodináz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	ditiotritol
DUSP	kettős specificitású foszfatáz
ECAR	extracelluláris savasodási ráta
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ER	ösztrogén receptor
ERK	extracelluláris szignál által regulált kináz
FBS	foetális borjú szérum
FCCP	karbonil-cianid-p-trifluorometoxifenilhidrazon
GLUT	glükóz transzporter
HBD	hormonkötő domén
HCS	high content screening
HIF	hipoxia-indukált faktor
HK II	hexokináz II
HPT	hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely
HRP	torma-peroxidáz
HS	lósérum

IR	inzulin receptor
IRS1	inzulin receptor szubsztrát 1
JNK	c-Jun N-terminális kináz
KO	génkiütött
LAT	nagy neutrális aminosav transzporter család
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MC-LR	mikrocisztin-LR
MCT	monokarboxilát transzporter
mETC	mitokondriális elektrontranszportlánc
mGPDH	mitokondriális gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
MLC20	20 kDa miozin könnyűlánc
MLCK	miozin könnyűlánc kináz
MOCK	üres plazmiddal transzfektált kontroll
MP	miozin foszfataz
mTOR	mammalian target of rapamycin
MYF	miogén faktor
MYH	miozin nehézláncot kódoló gén
MyHC	miozin nehézlánc
MyoD1	mioblaszt determináló fehérje 1
MYPT	miozin foszfataz regulátor alegység
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPáz
nm-miozin	nem izom miozin
NTCP	nátrium-taurokolát kotranszporter polipeptid család
NT-FT-SMTNL1	N-terminális Flag jelölőt tartalmazó rekombináns SMTNL1
OATP	organikus anion transzporter polipeptid család
OCR	oxigénfogyasztási ráta
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat
PBST	Tween 20-at tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldat
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PIC	proteázgátló mix
PKA	protein kináz A
PKB/Akt	protein kináz B/Akt
PKC	protein kináz C

PKG	cGMP-függő protein kináz
PMSF	fenil-metil-szulfonil
PP1cδ	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység δ izoforma
PP2Aα	protein foszfatáz 2A katalitikus α alegység
PPIC	foszfatázgátló mix
PR	progeszteron receptor
RIPA	radioimmunprecipitációs esszé puffer
rT3	reverz trijód-tironin
RXR	retinoid X receptor
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SERCA	szarko-endoplazmatikus Ca ²⁺ -ATPáz
SH2	src homológia 2
sk-miozin	vázizom miozin
SMTN	smoothelin
SMTNL1	smoothelin-szerű fehérje 1
T2	dijód-tironin
T3	trijód-tironin
T4	tetrajód-tironin (tiroxin)
TBD	tropomiozin kötő domén
TBS	Tris pufferelt sóoldat
TBST	Tween 20-at tartalmazó Tris pufferelt sóoldat
TEAD	TEF1 transzkripció faktor
TF	transzkripció faktor
TMC	tautomycetin
TPO	pajzsmirigy-peroxidáz
TR	pajzsmirigyhormon receptor
TRE	pajzsmirigyhormon válaszadó elem
TRH	tireotropin felszabadító hormon
TSH	tireoida stimuláló hormon
UCP	szétkapcsoló fehérje
WT	vad típusú

Bevezetés

A szervezet szükségletét meghaladó mennyiségű szabad pajzsmirigyhormon által kiváltott állapotot hipertireózisnak nevezzük. A betegség nagy hatást gyakorol az ember testtömegének körülbelül 40%-át kitevő vázizomzatra [Kim és mtsai, 2016], ami amellet, hogy biztosítja számunkra a testtartást, a mozgást, a légzést vagy a beszédet, olyan alapvető jelentőségű folyamatokban is meghatározó szerepet játszik, mint az energiatermelés vagy a glükóz- és lipidhomeosztázis [Salvatore és mtsai, 2014; Lombardi és mtsai, 2015].

Az érett vázizom különböző kontraktilis és anyagcsere-tulajdonságú rostokból épül fel, melyek egymáshoz viszonyított aránya, ezáltal pedig az izom fenotípusa nagymértékben átalakul a hipertireózis során. A gyors típusú rostok számának növekedése következtében a kontrakció és a relaxáció sebessége, illetve az energiatermelés és felhasználás sebessége is megnő. A glikolízis és a laktáttermelés fokozódása miatt az izomnak több glükózra van szüksége, melyet a glikogénraktárak lebontásából, vagy az inzulin mediált glükózfelvétel serkentéséből próbál fedezni. Sokáig úgy vélték, hogy a hipertireózist gyakran kísérő inzulinrezisztencia csak a májra korlátozódik, azonban egyre nő azon tanulmányok száma, melyekben csökkent perifériális inzulinérzékenységről és glükóz intoleranciáról számolnak be [Shen és mtsai, 1988; Dimitriadis és mtsai, 1997; Mitrou és mtsai, 2010].

A vázizom inzulinrezisztenciájának egyik potenciális szabályozó eleme a vizsgálataink középpontjában álló smoothelin-szerű fehérje 1 (SMTNL1), amely transzkripciós kofaktorként képes a vázizom különböző stresszhatásokra bekövetkező adaptálódását szabályozni. Deléciója a vázizom rostösszetételének átalakítását és inzulinrezisztencia megjelenését indukálja nőstény egerekben [Lontay és mtsai, 2015], ezért doktori munkám első felében a SMTNL1 fehérjének a vázizom anyagcseréjében betöltött szabályozó szerepét vizsgáltam hipertireózis során.

A SMTNL1 egy Ser/Thr specifikus foszfatáz, a miozin foszfatáz (MP) enzim szabályozásában is részt vesz, melynek jelentősége a vázizom működésében egyelőre nem tisztázott. Korábbi tanulmányokból kitűnik, hogy a MP enzim aktivitása nemcsak a különböző sejtek migrációs képességét [Lontay és mtsai, 2005; Xia és mtsai, 2004; Horváth és mtsai, 2018], hanem a vázizom modellezésére használt C2C12 sejtek differenciációját is szabályozhatja [Wu és mtsai, 2003]. Mivel a migráció és a differenciáció a vázizom fejlődésében is fontos szerepet játszik, ezért doktori munkám második felében a SMTNL1 és a MP közötti kapcsolatot, valamint ezen fehérjék potenciális szabályozó szerepét vizsgáltam az említett folyamatokban a hipertireózis modellezésére szolgáló modellrendszerben.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A pajzsmirigyhormonok szintézise, szekréciója és szabályozása

A pajzsmirigy (*glandula thyreoidea*) a gégét alkotó pajzsporcot két oldalról határoló, vörösesbarna színű, lepke alakú endokrin mirigy, melyet kötőszövetes tok vesz körül. Két lebenyből áll, melyek egy mirigyszövetből álló vékony kötegen, az iztmuszon keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A pajzsmirigy állományát hólyagszerű képletekbe, ún. szekréciós folliculuszokba rendeződött sejtek alkotják, melyek jód tartalmú hormonokat, főként tiroxint (T4) és trijód-tironint (T3) szintetizálnak.

A táplálékkal, ivóvízzel bevitt jód I^- formájában szívódik fel a bélben, melyet a pajzsmirigysejtek Na^+/I^- szimporter segítségével, aktív transzporttal nyernek ki a vérből [De La Vieja és mtsai, 2000; Dohán és mtsai, 2003]. A felvett ionok a sejtek apikális membránjához diffundálva, egy I^-/Cl^- kotranszporterrel keresztül jutnak be a folliculuszok lumenébe [Yoshida és mtsai, 2002]. A pajzsmirigysejtekben intracellulárisan előállított jód-akceptor fehérje, a tireoglobulin, először glikozilálódik, majd még jódozatlan formában, szekréciós vezikulák közvetítésével az apikális membrán irányába szállítódik. Amint a vezikulák elérik a membránt, tartalmukat exocitózissal a folliculuszok lumenébe ürítik. Itt megy végbe a tireoglobulin bizonyos tirozil oldalláncokon történő jódozása, melyet a membránkötött pajzsmirigy-peroxidáz (TPO) enzim katalizál. Előbb a tirozil oldallánc egyik hidrogénatomja szubsztituálódik, ezáltal monojód-tirozin keletkezik. Ezt követi a monojód-tirozin jódozása, amely dijód-tirozint eredményez. A TPO enzim aktivitása nyomán keletkezett mono- és dijód-tirozinok egymáshoz térben közel kerülve, szintén a TPO enzim segítségével összekapcsolódnak egymással. Ha egy monojód-tirozin egy dijód-tirozinnal áll párba, akkor T3, a biológiailag aktív pajzsmirigyhormon forma képződik, ha két dijód-tirozin kapcsolódik össze, akkor pedig T4 jön létre. Ezután a jódozott tireoglobulin receptor-mediált endocitózissal kerül ismét a sejtek belsejébe, ahol proteolitikus enzimek hatására a tireoglobulinban lévő peptidkötések felbomlanak. A szabaddá váló T4 és T3 hormonok a pajzsmirigysejtek bazális végén található transzporterekkel keresztül távoznak el [Carvalho és mtsai, 2017]. A pajzsmirigyhormonok erősen hidrofób természetüknél fogva plazmafehérjékhez kötött állapotban szállítódnak a kapillárisokban. A T3 kötődése a transzportfehérjékhez kisebb, a vérplazma teljes T3 tartalmának 0,3%-a, míg a T4-nek csupán 0,03%-a van jelen szabad állapotban [Dunlap, 1990; Oppenheimer, 1968].

A pajzsmirigyhormonok a szervezet szinte minden sejtjére hatással vannak: növelik az alapanyagcserét, a hőtermelést, serkentik a fejlődést és növekedést, a glikogén lebontását, a koleszterin-anyagcserét, a kortizol- és katekolamin-anyagcserét, a bélmotilitást, a csont lebontását, valamint az agyi és perifériás idegek működését. Ezzel szemben gátolják a zsírraktározást, az izomfelépítést, az inzulinérzékenységet és a glikogén szintézisét [Mullur és mtsai, 2014]. A pajzsmirigy hormontermelésének szabályozásáért a hipotalamusz - hipofízis - pajzsmirigy (HPT) tengely a felelős. A hipotalamuszban termelődő tireotropin felszabadító hormon (TRH) fokozza a tireoida stimuláló hormon (TSH) elválasztását a hipofízis elülső lebenyében, amely serkenti a jódfelvételt, valamint a hormonok képződését és elválasztását a pajzsmirigyben. A vérben szabadon keringő hormonok negatív visszacsatolási mechanizmussal gátolják a hipotalamuszban a TRH, a hipofízisben pedig a TSH termelését [Chiamolera és mtsai, 2009; Ortiga-Carvalho és mtsai, 2016].

1.2. A pajzsmirigyhormonok hatásmechanizmusa

1.2.1. A pajzsmirigyhormonok felvétele a sejtekbe

Egészen az 1970-es évekig úgy gondolták, hogy -lipofil tulajdonságuknak köszönhetően- a pajzsmirigyhormonok koncentrációgrádiens által hajtott egyszerű diffúzióval jutnak át a sejtmembránon [Hennemann és mtsai, 2001]. Ma már ismert, hogy a töltéssel nem rendelkező, viszonylag nagy molekulaméretű pajzsmirigyhormonok valójában a foszfolipid kettősréteget átívelő integráns transzmembrán fehérjék közvetítésével kerülnek az intracelluláris térbe. Számos, átfedő ligandspecificitású fehérje képes a pajzsmirigyhormonok és származékaik transzportjára, melyek közül a legfontosabbak: a monokarboxilát transzporterek (MCT), az organikus anion transzporter polipeptidek (OATP), a nagy neutrális aminosav transzporterek (LAT) és a nátrium-taurokolát kotranszporter polipeptidek (NTCP) [Kinne és mtsai, 2011]. Ezen transzportfehérjék közül kiemelkedő jelentőségű az MCT 8 és 10. Az MCT8 és MCT10 olyan 12 transzmembrán doménnel rendelkező fehérjék, melyek homodimert alkotva kétirányú, Na⁺- és protonfüggetlen pajzsmirigyhormon transzportot tesznek lehetővé [Halestrap és mtsai, 2012]. Az MCT8 a májban, vesékben, agyban, szívben, vázizomban, placentában, pajzsmirigyben és a herékben expresszálódik. T4 és T3 iránti affinitása nagy, valamint különböző pajzsmirigyhormon származékokat, reverz trijód-tironint (rT3) és dijód-tironint (T2) is szállít [Friesema és mtsai, 2003]. Az MCT10 szintén megtalálható a májban, vesékben, szívben, vázizomban, placentában, ezeken túlmenően pedig a hasnyálmirigyben és a bélben is expresszálódik [Kinne és mtsai, 2011]. Az MCT10 aromás aminosavakat, pl. Phe-t, Tyr-t és

Trp-t, emellett pedig T3-t és T4-t transzportál. Az MCT10 transzporter hatékonysága a T3 esetén nagyobb, míg a T4 esetén kisebb az MCT8 transzporter hatékonyságával összevetve, azonban Friesema és munkatársai humán MCT8-at vagy MCT10-et overexpresszáló COS1 sejtekben kimutatták, hogy 1 mM Trp jelenléte több mint 50%-os gátlást okoz az MCT10, de nem az MCT8 által mediált T3 felvételben. Ez arra utal, hogy az MCT10-en keresztüli T3 és Trp transzport verseng egymással, míg az MCT8 általi T3 felvétel specifikus [Friesema és mtsai, 2008]. Az MCT8 jelentőségét jól példázza, hogy a fehérjét kódoló gén funkcióvesztéssel járó mutációinak következtében súlyos neurológiai rendellenességek és endokrin zavarok lépnek fel [Friesema és mtsai, 2004; Dumitrescu és mtsai, 2004; Schwartz és mtsai, 2007].

1.2.2. A pajzsmirigyhormonok metabolizmusa

A pajzsmirigy által legnagyobb mennyiségben előállított és szekretált hormon a T4, amely a biológiailag aktív pajzsmirigyhormon előalakjának tekinthető. Bár magában a pajzsmirigyben is megfigyelhető kismértékű T4-T3 átalakulás, a T4 T3-má történő konverziója nagyrészt a periférián játszódik le. A célsejtek membrántranszportereinek közvetítésével felvett pajzsmirigyhormonok intracelluláris koncentrációjának meghatározó elemei a dejodináz (DIO) enzimek. A DIO1, DIO2 és DIO3 olyan szelenocisztein tartalmú homodimer fehérjék, melyek a pajzsmirigyhormonok aktiválását és/vagy inaktiválását katalizálják. A DIO1 enzim a vesékben, májban és pajzsmirigyben expresszálódó integráns plazmamembrán fehérje, melynek aktív centruma a citoszolban található [Larsen és mtsai, 2012]. A kettős hatásmechanizmusú DIO1 a T4 négy jodid kötőhelye közül a külső fenolgyűrű 5' pozíciójában lévő jodidot hasítja, ezáltal a T3 képződését segíti elő. Ezzel szemben az enzim a T4 belső tirozil gyűrűjének 5-ös pozíciójában lévő I⁻ lehasításával a T4-et irreverzibilisen inaktiválja, melynek során rT3 keletkezik [Molnár és mtsai, 2021]. A DIO2 enzim a pajzsmirigyben, vázizomban, barna zsírszövetben, hipotalamuszban, hipofízisben, bőrben, oszteoblasztokban, asztrogliaokban, retinában, placentában, a belső fülben és az endotél sejtekben expresszálódik. Az endoplazmás retikulum membránjában lokalizálódik, aktív centruma a citoszolban található [Larsen és mtsai, 2012]. 5' dejodináz aktivitással rendelkezik, amely a T4 külső gyűrűjének monodejodinálásával T3-at képez. A DIO2 a pajzsmirigy hormontermelését szabályozó HPT tengely negatív visszacsatolási mechanizmusának kialakításában, a barna zsírszövet adaptív termogenezisében, továbbá a vázizom regenerációjában és differenciációjában is jelentős szerepet tölt be [GR Williams és mtsai, 2011]. A DIO3 enzim a placentában, uterusban, neuronokban, bőrben, alveoláris sejtekben, gliasejtekben, urotéliumban, gasztrointesztinális traktusban, hipotalamuszban és a vázizomban expresszálódik [Molnár és mtsai, 2021]. A DIO1-

hez hasonlóan egy transzmembrán doménnel rendelkezik, mely a plazmamembránba ágyazott. Érdekessége, hogy aktív centruma a sejtfelszínen található. A DIO3 a T3 belső gyűrűjének 5-dejodinációjával inaktív T2-t állít elő, valamint a T4-ből monodejodinációval rT3-at képez, megakadályozva annak aktiválódását. Szerepe a magzati fejlődésben és szövetregenerációban kritikus [Dentice és mtsai, 2011]. A DIO2 és DIO3 enzimek expresszióját dinamikus egyensúly jellemzi, melyben a két enzim expressziója koordináltan szabályozódik, ezáltal lehetővé téve az intracelluláris T4 és T3 koncentráció szoros kontroll alatt tartását.

Bár a pajzsmirigyhormonok metabolizmusa során keletkező pajzsmirigyhormon származékok/metabolitok is rendelkeznek biológiai aktivitással/hormonális hatással [Senese és mtsai, 2019], disszertációm tárgyánál maradva a következőkben a pajzsmirigyhormonok – különös tekintettel a T3– hatásainak bemutatására szorítkozom.

1.2.3. A pajzsmirigyhormonok genomi hatásai

A pajzsmirigyhormonok hatásmechanizmusai két nagy csoportra oszthatók: az egyik csoport a sejtmagban végbemenő, a 2-es típusú magreceptorok által mediált transzkripciós szintű vagy genomi szabályozás, amely hatás megjelenését időigényes mRNS- és fehérjeszintézis előzi meg. A másik nagy csoportot a sejtmagon kívüli, azonnal bekövetkező szignalizációs változások alkotják. Ezen változások vagy a magreceptoroktól (részben) függetlenül, vagy a magreceptorok alternatív splice variánsai közvetítésével valósulnak meg, és bizonyos esetekben akár transzkripciós szintű változásokat is eredményezhetnek (lásd később).

A pajzsmirigyhormonok genomi hatásainak közvetítői a pajzsmirigyhormon receptorok (TR), melyeket a humán 17-es és 3-as kromoszómán található c-erbA α és β protoonkogének kódolnak [Sap és mtsai, 1986; Laudet és mtsai, 1991]. E két génről átíródó primer transzkriptumok alternatív splicingjának eredményeként több izoforma jön létre: a TR α_1 , TR α_2 , TR α_3 , TR β_1 , TR β_2 és a TR β_3 , melyek közül az utóbbit egyelőre csak patkányokban azonosították [GR Williams, 2000]. A TR α és β izoformái más magreceptorokéhoz hasonló génszerkezettel rendelkeznek: egy N-terminálisan elhelyezkedő A/B régióval; az A/B régióban lokalizálódó, ligandfüggetlen transzaktiváló doménnel (AF-1); egy erősen konzervált DNS-kötő doménnel (DBD vagy C); egy flexibilis linker régióval (D); valamint egy hormonkötő domént (HBD) és egy ligandfüggő transzaktiváló domént (AF-2) tartalmazó C-terminális E/F régióval [Aranda és mtsai, 2001]. Az adott izoformától függően az A/B és/vagy D doménekben található a receptorok sejtmagba juttatását biztosító magi lokalizációs szignálok [Mavinakere

és mtsai, 2012; Lee és mtsai, 1993]. A C domén cink-ujj motívumai specifikus DNS szekvenciák felismerését és kötését, valamint receptor dimerizációt tesznek lehetővé. A D domén a DBD és HBD doméneket köti össze, továbbá a koregulátorokkal való interakció kialakításában vesz részt. A TR izoformák között nagyfokú szekvenciahomológiát mutató, multifunkciós HBD domén a pajzsmirigyhormonok felismeréséhez elengedhetetlen aminosav oldalláncokat, valamint a homo- és heterodimerizációhoz és más szabályozó fehérjékhez való kapcsolódáshoz szükséges interakciós felszíneket tartalmazza. HBD-jének alternatív splicing során végbemenő részleges eliminációja következtében a TR α_2 és TR α_3 nem képes pajzsmirigyhormonokat kötni [Lazar és mtsai, 1988; Koenig és mtsai, 1989].

A pajzsmirigyhormonok megkötésére képes három receptor, a TR α_1 , TR β_1 és TR β_2 különböző szöveti eloszlást mutat. A TR α_1 elsősorban a csontban, porcban, vázizomban, szívben, gasztrointesztinális traktusban és a központi idegrendszerben; a TR β_1 főként a májban és a vesékben; a TR β_2 pedig a hipotalamuszban, hipofízisben, belső fülben és a retinában expresszálódik [Cheng és mtsai, 2010]. Ezen receptorok sokkal nagyobb affinitással kötik a T3-at, mint a T4-et [Apriletti és mtsai, 1981]. A T3-hoz való kapcsolódása előtt a TR heterodimert alkot a retinoid x receptorral (RXR), azonban olyan esetek is ismertek, melyekben a TR monomer, homodimer vagy trimer formában kötődik a DNS-hez [Lazar és mtsai, 1991; Mengeling és mtsai, 2008]. Azokat a specifikus DNS szekvenciákat, melyekhez a TR-ok kötődni képesek tiroid válaszadó elemeknek (TRE) nevezzük. A TRE elemek a pajzsmirigyhormonok által szabályozott gének szabályozó régióiban találhatóak és két, ún. félhelyből állnak. Mindkét félhely tartalmaz egy 5'-(A/G)GGT(C/G)A-3' degenerált konszenzus szekvenciát, melyek egymáshoz viszonyított iránya szerint megkülönböztetünk azonos, palindróm, illetve fordított palindróm ismétlődést mutató TRE elemeket [Yen, 2001; Chen és mtsai, 2010]. A két félhelyet a bennük található hexamer szekvenciák irányultságától függően változó számú (0, 4 vagy 6) nukleotid köti össze. A természetben előforduló TRE elemekben található hexanukleotidok irányultságának és egymástól való távolságának variabilitása befolyásolja a TR izoformák kötődését, ezáltal pedig a célgének pajzsmirigyhormonokra adott válaszadó képességét [Cheng, 2010; Paquette és mtsai, 2014]. Az ismert TRE elemek többsége pozitív regulátor, amelyben a TR a TRE elemhez kötődve a hormon hiányában konstitutívan gátolja, míg a hormon jelenlétében aktiválja a transzkripciót (1. ábra). Hormon hiányában a TR korepresszor fehérjékkel komplexben kötődik a DNS-hez, melyek különféle, a kromatinszerkezet zárt állapotát fenntartó enzimaktivitással rendelkeznek. A hormon megjelenése és kötődése a TR-hoz konformációváltozást idéz elő, amely a

korepresszorok disszociációját okozza. Ezzel lehetővé válik a kromatinszerkezet fellazítását végző koaktivátorok kötődése, amely a transzkripció iniciációjának előfeltétele [Harvey és mtsai, 2002]. A TRE elemek között negatív regulátorokat is találunk, melyek az előbbiekkal ellentétesen működnek: a hormont nem kötött TR stimulálja, míg a hormont kötött TR gátolja a célgén expresszióját [Weitzel, 2008].

Az utóbbi évtizedekben világossá vált, hogy a fentebb részletezett, klasszikus hatásmechanizmuson felül a pajzsmirigyhormonok egyéb módokon is képesek kifejteni a hatásukat. Kromatin immunprecipitációt követő szekvenálási kísérletekben kimutatták, hogy a TR-ok a DNS-hez való indirekt kötődés útján is képesek a génexpressziót szabályozni úgy, hogy más transzkripciós faktorok működésére hatnak. Ezt a jelenséget a pajzsmirigyhormonok 2-es típusú hatásmechanizmusának nevezzük (1. ábra), melynek létjogosultságát folyamatosan növekvő számú kísérleti eredmény is alátámasztja. Iwaki és mtsai patkány kardiomioblaszt sejtekben kimutatták, hogy a T3-kötött TR α_1 és TR β_1 izoformák DBD doménjükkel a TEF1 transzkripciós faktorhoz (TEAD) kötődnek, ezen keresztül kihorgonyozódnak a miozin nehézlánc 7 (MYH7) gén promóteréhez. Mivel az említett transzkripciós faktor a MYH7 gén fő aktivátora, T3 koncentráció-függő gátlása a transzkripció transzaktiválásának elmaradását vonja maga után [Iwaki és mtsai, 2014]. A T3-kötött TR β_2 ugyanezzel a kihorgonyzó mechanizmussal a GATA-kötő fehérje 2 transzkripciós faktorhoz kapcsolódva képes gátolni a TSH β alegységét és a DIO2 fehérjét kódoló gének expresszióját a tirotróp sejtekben [Matsushita és mtsai, 2007; Matsunaga és mtsai, 2015].

1.2.4. A pajzsmirigyhormonok nem genomi hatásai

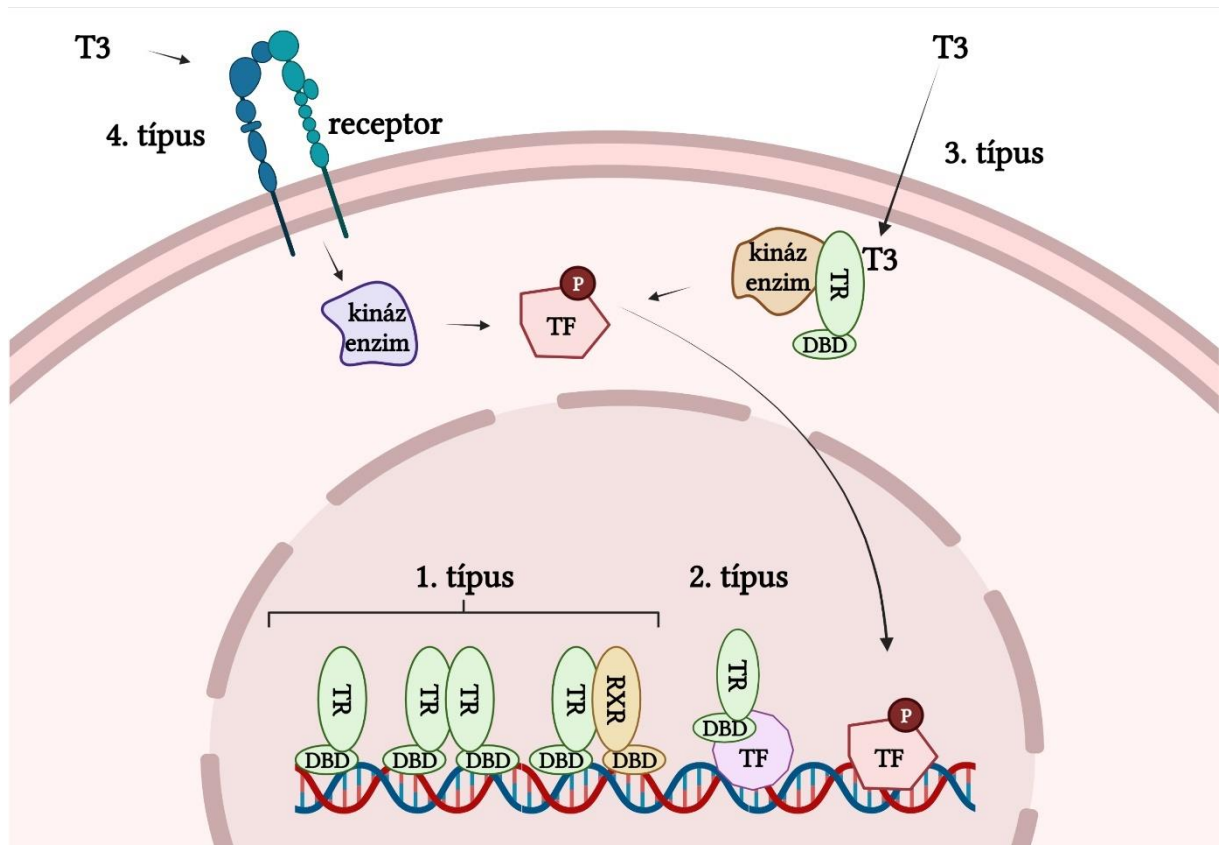
Számos tanulmányban olvashatunk a pajzsmirigyhormonok hatásmechanizmusának 3. típusáról (1. ábra), melynek lényege, hogy az ideiglenesen a citoszolban lévő TR-ok a plazmamembrán közelében található kináz enzimekkel interakcióba lépve aktiválják azokat, melynek eredményeképpen egyrészt maguk is foszforilálódhatnak, másrészt az adott kinázzal induló jelátviteli útvonalat indítanak be, így a DNS-hez való indirekt vagy direkt kötődés nélkül is képesek a legkülönbözőbb sejtbeli folyamatokat szabályozni [Flamant és mtsai, 2017]. Erre a jelenségre kiváló példa a T3-kötött TR β_1 és a membránkötött foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) p85 α alegysége között létrejövő interakció, amely a PI3K-ről induló jelátviteli kaskád gyors aktiválódásához és a glükóz metabolizmusban fontos szerepet játszó célfehérjék, mint a hipoxia-indukált faktor 1 α (HIF1 α), glükóz transzporter 1 (GLUT1) és az MCT4 expressziójának növekedéséhez vezet humán bőr fibroblasztokban [Cao és mtsai, 2005;

Moeller és mtsai, 2005]. Ezen felül a T3 a mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris szignál által regulált kináz (MAPK/ERK1/2) és PI3K útvonalakon keresztül a patkány alveoláris endotél sejtekben a Na^+/K^+ -ATPáz (NKA) [Lei és mtsai, 2008] és L6 mioblasztokban a Na^+/H^+ transzporter [D'Arezzo és mtsai, 2004] aktivitását is modulálja.

A pajzsmirigyhormonok hatásmechanizmusának 4. típusát (1. ábra) azok az esetek alkotják, melyekben a pajzsmirigyhormonok nem a klasszikus TR-okhoz, hanem más (receptor)fehérjékhez kötődve fejtik ki hatásukat. Az integrin $\alpha\beta 3$ receptor például két kötőhelyet is tartalmaz a pajzsmirigyhormonok számára, melyek más-más szabályozó funkciót látnak el: az S1 doménhez kötődő T3 hatására az Src és PI3K enzimek aktivitása nő, melynek eredményeként a $\text{TR}\alpha 1$ a sejtmagba transzlokálódik, ahol serkenti a $\text{HIF}1\alpha$ fehérjé kódoló gén expresszióját. A $\alpha\beta 3$ receptor S2 doménje T3-at és T4-et is köt, melyek a foszfolipáz C és protein kináz C (PKC) α enzimeken keresztül aktiválják a MAPK/ERK1/2-t, mely elősegíti az ösztrogén receptor (ER) α intracelluláris transzportját és a $\text{TR}\beta$ sejtmagba történő felvételét [Liu és mtsai, 2019].

Nem az integrin receptor az egyetlen fehérje a magreceptorokon kívül, melyhez a pajzsmirigyhormonok kötődni képesek a citoszolban. A $\text{TR}\alpha 1$ -et kódoló érett mRNS-ből származó 4 fehérje (p43, p33, p30 és p28) mindegyike az N-terminálisán trunkált, és más-más szubcelluláris lokalizációt mutat. Kalyanaraman és mtsai azt találták, hogy az oszteoblasztok proliferációja során a T3 a plazmamembrán-asszociált p30 fehérjéhez kötődik, amely az intracelluláris Ca^{2+} , nitrogén-monoxid és ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) koncentrációjának növelésén keresztül aktiválja a cGMP-függő protein kináz (PKG) II-t, elősegítve a sejtosztódás folyamatát [Kalyanaraman és mtsai, 2014]. Gél shift kísérletekben kimutatták, hogy a mitokondrium mátrixában található p43 fehérje hasonló affinitással képes felismerni a TRE elemeket, mint a teljes hosszúságú magreceptorok. Érdeemes megjegyezni, hogy a mitokondriális genom 4 TRE-szerű szekvenciát tartalmaz, melyhez a p43 képes kötődni. Továbbá, a p43 túlermelgetése serkenti a mitokondrium aktivását és a mitokondriogenezist, míg ez a hatás elmarad, amennyiben a fehérje DNS-kötő doménje hiányzik [Wrutniak-Cabello és mtsai, 2017].

Láthatjuk, hogy a pajzsmirigyhormonok általi szabályozás meglehetősen sokrétű, így belátható, hogy a fiziológias pajzsmirigyhormon koncentráció pozitív vagy negatív irányba történő tartós eltolódása egyaránt komoly következményekkel jár. A továbbiakban a toxikus vagy szuprafiziológias mértékben megemelkedett pajzsmirigyhormon koncentráció kiváltó okait és következményeit mutatom be, különös tekintettel vizsgálataink tárgyára, a vázizomra.



1. ábra: A pajzsmirigyhormonok hatásmechanizmusa. **1-es típus:** a TR monomer, homo- vagy heterodimer formában a TRE elemhez kötődve a hormon hiányában konstitutívan gátolja, míg a hormon jelenlétében aktiválja a transzkripciót. **2-es típus:** a TR-ok a DNS-hez való indirekt kötődés útján is képesek a génexpressziót szabályozni úgy, hogy más transzkripciós faktorok működésére hatnak. **3-as típus:** az ideiglenesen a citoszolban lévő TR-ok a plazmamembrán közelében található kináz enzimekkel interakcióba lépve aktiválják azokat, melynek eredményeképpen az adott kinázról induló jelátviteli útvonalat indítanak be, így a DNS-hez való indirekt vagy direkt kötődés nélkül is képesek a legkülönbözőbb sejtbeli folyamatokat szabályozni. **4-es típus:** a pajzsmirigyhormonok nem a klasszikus TR-okhoz, hanem más (receptor)fehérjékhez kötődve fejtik ki hatásukat. Az ábra a biorender.com felületén készült. TF: transzkripciós faktor; DBD: DNS-kötő domén; TR: tiroid receptor; T3: trijód-tironin

1.2.5. A pajzsmirigy túlműködése: hipertireózis

A szervezet szükségletét meghaladó mennyiségű szabad pajzsmirigyhormon által kiváltott állapotot tireotoxikózisnak nevezzük. Leggyakrabban a pajzsmirigy túlműködése következtében alakul ki, ezért hipertireózisnak is nevezik. Ritkább esetekben a hormontúlkínálatért nem a pajzsmirigy hiperfunkciója, hanem a tárolt pajzsmirigyhormon fokozott kiáramlása (tireoiditisz) vagy a pajzsmirigytől független szekréció felelős [De Leo és mtsai, 2016].

Szigorúan véve tehát a hipertireózis csupán a tireotoxikózis egyik (bár leggyakoribb) oka, a gyakorlatban ennek ellenére a két fogalmat egymás szinonimájaként használják. A tireotoxikózis számos betegség során kialakulhat. Három leggyakoribb oka a pajzsmirigy hiperfunkciójával jár: az autoimmun Graves-kór, a toxikus göbös strúma és a toxikus pajzsmirigy-adenóma [Kumar és mtsai, 2009; Doubleday és mtsai, 2019]. A továbbiakban ezen kórképek kialakulásának okait mutatom be röviden.

Robert Graves 1835-ben számolt be a nőbetegeknél tapasztalt intenzív és hosszantartó palpációérzésről, melyet a pajzsmirigy megnagyobbodása kísért [DL Williams, 2018]. Az orvostudomány vívmányainak köszönhetően később feltárták, hogy a betegséget a TSH-receptor elleni autoantitestek okozzák, melyek a TSH-receptorhoz kötődve az endogén hormon hatását mimikálva serkentik a jódfelvételt, a pajzsmirigyhormonok szintézisét és szekrécióját, valamint a pajzsmirigy folliculusz sejtjeinek proliferációját, ami a pajzsmirigy megnagyobbodásával jár [Davies és mtsai, 2020]. A kórképhez jellegzetes, ún. endokrin oftalmopátia társulhat, melyet a retrobulbáris zsírszövet felhalmozódása és a szemizmok gyulladása vált ki. A Graves betegség általában 30 és 50 éves kor között jelentkezik, a nők 6-szor gyakrabban érintettek, mint a férfiak [Smith és mtsai, 2016].

A diffúz vagy göbös strúma hátterében az esetek többségében csökkent jódfelvétel áll, amely elégtelen mennyiségű hormon elválasztásával a TSH szintjének emelkedését, ezen keresztül pedig a pajzsmirigy megnagyobbodását eredményezi. A megfelelően működő mirigyállomány felszaporodása képes kompenzálni a hormontermelés hiányát, így a hormonszint helyreáll, a beteg eutireózisos állapotba kerül. A TSH által indukált hiperplázia és hipertrófia kezdetben diffúz és szimmetrikus pajzsmirigy megnagyobbodáshoz vezet (*struma diffusa*). Ha a táplálékkal bevitt jód mennyisége hirtelen megnő, vagy a hormonigény csökken, a stimulált folliculuszhám visszafejlődik és kitágult, tömeges kolloidot tartalmazó mirigyek képződnek (*struma colloidosa*). A váltakozó involúciós és hiperplastikus periódusok következtében a megnagyobbodott mirigyállomány szabálytalanná válik és kialakul a göbös strúma. A göbös strómák nagy része hormonálisan inaktív, de kis részük tireotoxikózissal jár, melynek hátterében gyakran TSH-független, autonóm nodulusz kialakulása áll [Kumar és mtsai, 2009; Khalid és mtsai, 2021].

A pajzsmirigy-adenómák a pajzsmirigy jóindulatú daganatai, a folliculuszok epitelsejtjeiből származó gömbölyded, szoliter elváltozások. Többségük inaktív, néhány százalékukban észlelhető hormontermelés (toxikus adenóma). A toxikus adenómák kialakulása elsősorban a TSH-receptort kódoló gén funkcionyerő szomatikus mutációjára vezethető vissza, melynek következtében a pajzsmirigyben belül, a TSH szabályozása alól kikerült göbök autonóm módon

termelik a pajzsmirigyhormonokat. Ezzel szemben a pajzsmirigy egyéb területeinek hormontermelése jelentősen csökken. A hormonfelesleg tünetekkel járó hipertireóizist vált ki, izotópos vizsgálattal pedig ún. „forró” göb mutatható ki. A TSH receptorról induló jelátviteli útvonalat érintő mutációk a toxikus adenómák több mint felében megfigyelhetők. Hasonló mutációkat a fentebb említett toxikus göbös strúmák egy részében is leírtak [Tonacchera és mtsai, 2003; Paschke és mtsai, 1996].

A pajzsmirigy hiperfunkciója következtében fellépő tireotoxikózis általános tünetei közé tartozik a puha, meleg bőr, hőintolerancia, intenzív izzadás, az anyagcsere fokozódása és a megtartott étvágy melletti fogyás. Gyakori a palpitáció és a tahikardia. A betegek rendszerint idegesek, ingerlékenyek, tremoruk van. Az esetek 50%-ban proximális izomgyengeség lép fel [Doubleday és mtsai, 2019; Kudrjavcev, 1978].

A hipertireóizis a klinikai tünetek és laboreredmények alapján diagnosztizálható. A kiváltó ok megállapítására a szérum TSH koncentrációjának meghatározása a legalkalmasabb, nagyfokú érzékenysége és specificitása miatt, és mert a TSH szintje már a betegség legkorábbi fázisában csökkenni kezd, amikor a klinikai tünetek még alig érzékelhetők [De Los Santos és mtsai, 1988]. Az alacsony TSH érték általában a szabad T4 szintjének emelkedésére utal, de bizonyos esetekben a tüneteket a nagyobb mennyiségben keringő T3 idézi elő. Ha a TSH és a szabad pajzsmirigyhormon szintje igazolta a tireotoxikózis fennállását, pajzsmirigy szcintigráfiával a kiváltó okot is tisztázni lehet [Kumar és mtsai, 2009; Mariani és mtsai, 2021].

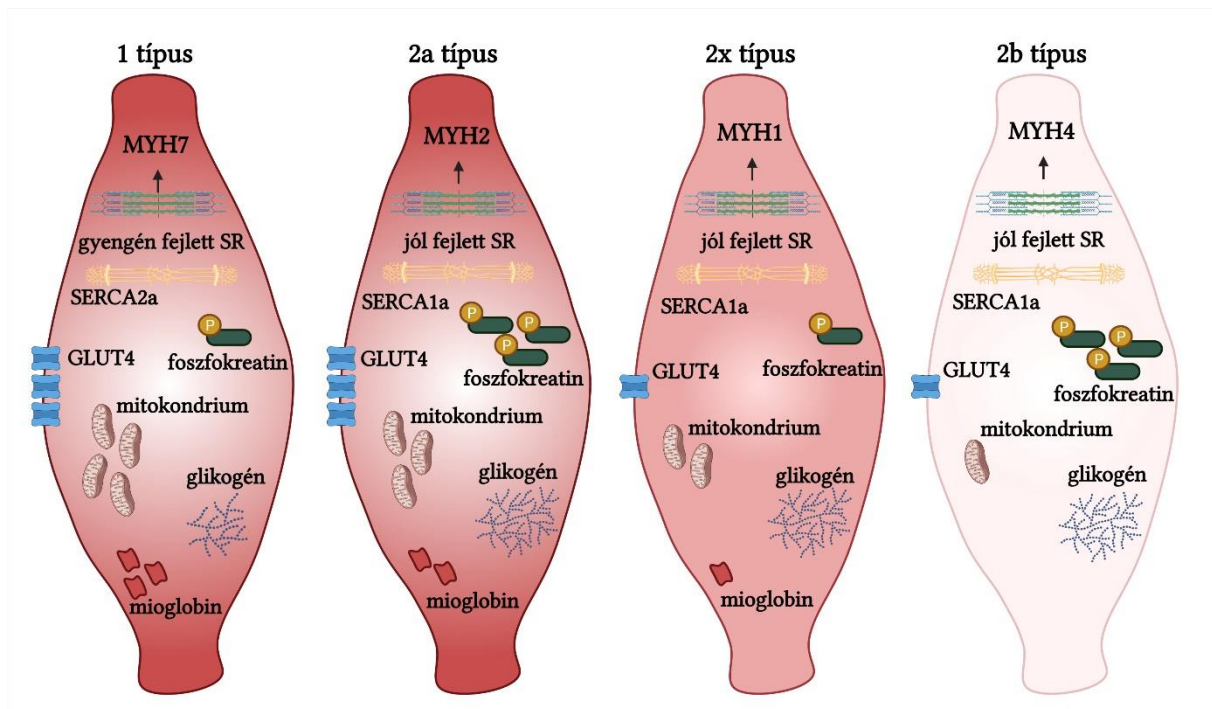
1.3. A hipertireóizis hatása a vázizomra

A hipertireóizis a szervezet valamennyi szövetére és szervére hat, különös tekintettel az ember testtömegének körülbelül 40%-át kitevő vázizomzatra [Kim és mtsai, 2016], amely - amellet, hogy biztosítja számunkra a testtartást, a mozgást, a légzést vagy a beszédet- olyan alapvető jelentőségű folyamatokban is fontos szerepet játszik, mint az energiatermelés vagy a glükóz- és lipidhomeosztázis [Salvatore és mtsai, 2014; Lombardi és mtsai, 2015]. Következésképpen bármely, a vázizmot érintő változás jelentős hatást gyakorol a szervezet egészének működésére.

A vázizom felépítési egysége a többmagvú, harántcsíktolt izomrost. Az emlősök vázizomrostjainak 4 fő típusát ismerjük: 1, 2a, 2x és 2b (2. ábra). Rágcsálók esetén a különböző típusú izomrostokat arab számmal, míg a humán eredetű izomrost típusokat római számmal szokás jelölni, így disszertációm megírásánál is ezt a jelölést alkalmaztam. A különböző típusú rostokat elsősorban a kontraktilis tulajdonságaikat meghatározó miozin nehézlánc (MyHC) izoforma és más kontraktilis fehérjék expressziója és aktivitása, valamint az anyagcseréjük

alapján különítjük el egymástól. A kisebb átmérőjű 1-es típusú rostok MyHC 1 és 2a típusú 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 mioglobin adja jellegzetes vörös színüket. Ezen felül magas triglicerid tartalom és a szarkoplazma alacsony glikogéntartalma jellemzi (2. ábra). Döntően aerob anyagcserét folytatnak, melynek üzemanyaga a glikolízisből származó piruvátból a piruvát-dehidrogenáz enzim aktivitása nyomán előállított, vagy a szabad zsírsavak β -oxidációjából keletkező acetyl-CoA, ami a mitokondriális oxidatív foszforilációban hasznosul. A folyamat során 36-38 mol ATP / mol glükóz keletkezik, biztosítva a kontrakció teljes ATP igényének hosszútávú fedezését. Ezzel szemben glikolitikus kapacitásuk és foszfo kreatin szintjük alacsony [Schiaffino és mtsai, 2011; Bloise és mtsai, 2018].

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, ami energetikailag kedvezőtlen, de gyors módja az ATP előállításának (2-3 mol ATP / mol glükóz). Az ehhez szükséges glükóz az extracelluláris térből vagy a szarkoplazmában raktározott glikogénből származik, a folyamat végterméke laktát. A fehér színű, MyHC 2b fehérjét expresszáló 2b típusú rostok igen magas glikogén- és foszfo kreatin tartalmuknak köszönhetően nagy erő kifejtésre képesek, melyhez kevés számú, kisméretű mitokondrium társul, ezért intenzív igénybevétel esetén hamar elfáradnak (2. ábra). Ezzel szemben a rózsaszín, MyHC 2a fehérjét 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 (2. ábra). A humán vázizmokban az MyHC 2b nem detektálható, annak ellenére, hogy a fehérjét kódoló gén (MYH4) megtalálható a genomban. A 4 rosttípus közül a legkésőbb felfedezett, MyHC 2x fehérjét expresszáló 2x típusú rostok tulajdonságait tekintve átmenetet képeznek a 2a és 2b típusú rostok között (2. ábra). Érdemes megjegyezni, hogy a patkány és egér 2x típusú rostokkal ellentétben a humán IIX típusú rostok rendelkeznek a legalacsonyabb oxidatív kapacitással a többi rosttípushoz viszonyítva [Schiaffino és mtsai, 2011; Bloise és mtsai, 2018]. 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.



2. ábra: A vázizmot felépítő különböző típusú rostok. Az 1-es típusú rostok MyHC 1 fehérjét (MYH7) és SERCA2a-t expresszálnak, szarkoplazmás retikulumuk gyengén fejlett. Mitokondriumban gazdagok és kiterjedt kapilláris hálózattal rendelkeznek, emellett foszfokreatin- és glikogéntartalmuk alacsony. A szarkoplazmában lévő nagy mennyiségű mioglobin adja jellegzetes vörös színüket. A 2-es típusú rostok gyors összehúzódásúak, szarkoplazmás retikulumuk jól fejlett, SERCA1a-t expresszálnak, a rostokat kevésbé dús kapilláris hálózat veszi körül. A fehér színű MyHC 2b-t (MYH4) expresszáló 2b típusú rostok igen magas glikogén- és foszfokreatin tartalmúak, melyhez kevés számú, kisméretű mitokondrium társul. Ezzel szemben a rózsaszín, MyHC 2a-t (MYH2) expresszáló 2a típusú rostok magas mitokondrium-, foszfokreatin- és mioglobin tartalommal rendelkeznek. A 4 rosttípus közül a legkésőbb felfedezett, MyHC 2x (MYH1) fehérjét expresszáló 2x típusú rostok tulajdonságait tekintve átmenetet képeznek a 2a és 2b típusú rostok között. Az ábra a biorender.com felületén készült. MYH: miozin nehézláncot kódoló gén; SR: szarkoplazmatikus retikulum; GLUT4: glükóz transzporter 4; SERCA: szarkoendoplazmatikus Ca^{2+} -ATPáz

Az érett vázizomrost MyHC összetétele és ezáltal a fenotípusa dinamikusan változó, melyet a beidegzés és a szervezet működésében betöltött funkció mellett számos hormonális faktor - különösképpen a pajzsmirigyhormonok - befolyásolnak. Az 1-es típusú rostokra jellemző lassú fenotípus kialakításáért és fenntartásáért nagyrészt a beidegző motorneuronoktól szinte folyamatosan érkező alacsony frekvenciájú stimulusok felelősek, míg a 2-es típusú rostok gyors fenotípusára jellemző tulajdonságok megjelenését a beidegzés csak kisebb részben befolyásolja [Gambke és mtsai, 1983; Pette és mtsai, 2001]. A pajzsmirigyhormonok a beidegzéssel

ellentétes hatást fejtenek ki, melyek a gyors fenotípusra jellemző kontraktilis fehérjék expressziójának transzkripciós szintű szabályozása révén a 2-es típusú rostok kialakulását indukálják. Hipertireózis során a pajzsmirigyhormonok magas koncentrációja a MyHC izoformák eltolódását okozza: a kiindulási rosttípustól függően az MyHC 1-ből 2a, a 2a-ból 2x, a 2x-ből pedig 2b lesz [Izumo és mtsai, 1986]. Ennek megfelelően a tisztán gyors típusú rostokból felépülő izmok kevésbé érzékenyek a pajzsmirigyhormonok mennyiségi változásaira, míg a lassú, illetve kevert típusú izmok rostösszetételét a pajzsmirigy megváltozott hormontermelése jelentős mértékben átalakíthatja. Az átalakuló izomban a MyHC fehérjék mellett más kontraktilis fehérjék, pl. a miozin könnyűlánc (MLC) család vagy a Ca^{2+} homeosztázist szabályozó rendszer tagjai, továbbá az energiaháztartásban és a glükóz homeosztázisban szerepet játszó enzimek expressziója és/vagy aktivitása is megváltozik [Pette és mtsai, 1997; Arai és mtsai, 1991]. A 2-es típusú rostokra jellemző SERCA1a izoforma expresszióját a pajzsmirigyhormonok nagymértékben stimulálják [Simonides és mtsai, 1996]. Az 1-es típusú rostokban található SERCA2a izoforma expressziója kezdetben szintén nő a pajzsmirigyhormonok hatására, viszont a tartósan magas hormonszintek végül ezen fehérjék represszállását eredményezik [van der Linden és mtsai, 1996]. Ily módon a gyors típusú MyHC és SERCA izoformák térnyerése a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} transzport kapacitásának, illetve a kontrakció és relaxáció sebességének növekedéséhez vezet, ami az energia képződésének és felhasználásának sebességére is kihat; ez magasabb nyugalmi energia „turnover”-ben és a kontrakció kisebb energetikai hatékonyságában nyilvánul meg a vázizomban hipertireózis esetén.

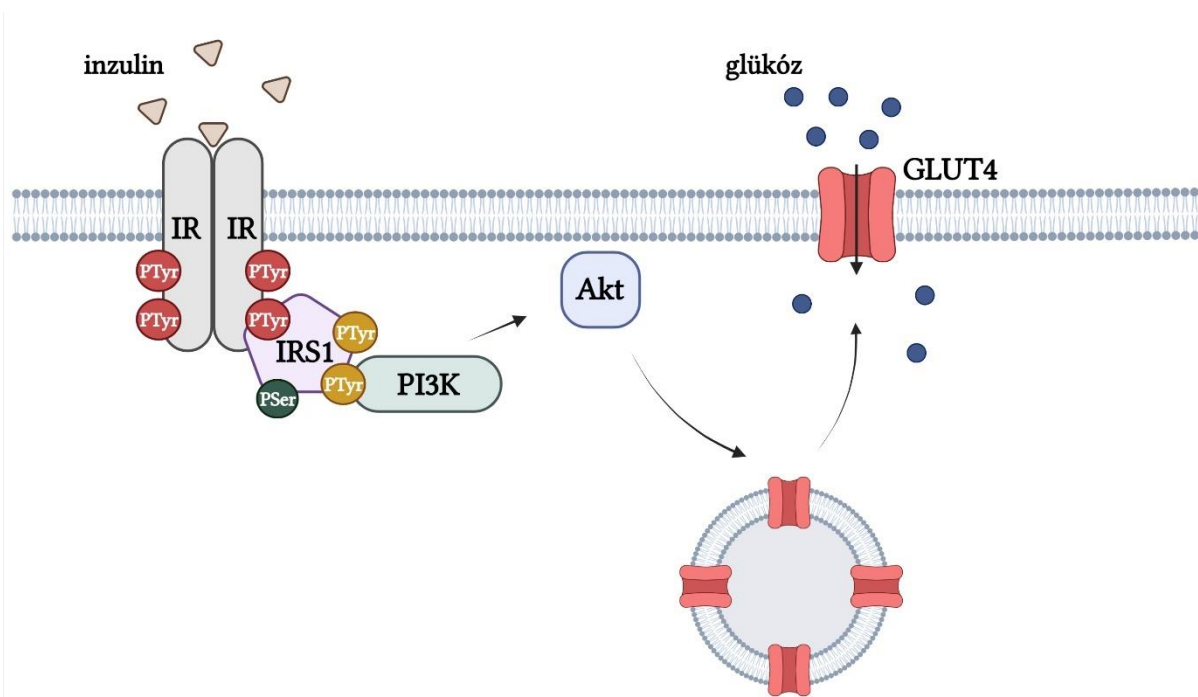
A pajzsmirigyhormonok által indukált megnövekedett ATP fogyasztással a vázizom az ATP termelő apparátus kapacitásának mennyiségi és minőségi változtatásaival próbál lépést tartani: a gyorsabb ATP-termelés iránti igényt részben a glikolitikus kapacitás emelkedése elégíti ki. Ennek során a glikolízisben keletkező NADH elsősorban a piruvát laktáttá történő redukálására fordítódik, viszont, ahogy azt az előzőekben is láttuk, ez energetikailag kedvezőtlenebb módja a piruvát felhasználásának és az ATP előállításának. Hipertireózis során a glikolízis meredek emelkedése okozta növekvő laktátszint és az ATP-termelés hatékonyságának csökkenése következtében az izom hamarabb elfárad, melyet a glikogén raktárak gyorsabb kimerülése kísér [Simonides és mtsai, 2008]. Fiziológiás állapotban, aerob körülmények között a citoszolikus NADH egy része a glicerofoszfát ingának köszönhetően a mitokondriális oxidatív foszforilációban hasznosul. A glicerofoszfát inga a mitokondriumhoz irányítja a redukáló ekvivalenseket, melyek nem az I-es, hanem a III-as komplexen keresztül lépnek be az elektrontranszportláncba, 3 helyett 2 mol ATP / NADH képződését eredményezve [Silva,

2006]. A különbség hő formájában szabadul fel, az energia izommunka szempontjából nem felhasználható. A pajzsmirigyhormonok az elektronok ubikinonra való transzferálását végző mitokondriális glicerol-3-foszfát dehidrogenáz (mGPDH) expressziójának fokozásán keresztül serkentik a glicerofoszfát inga működését [Dümler és mtsai, 1996; Weitzel és mtsai, 2001], ezáltal nő a hőtermelés, viszont a mitokondriális ATP-termelés hatékonysága csökken, ami hipertireózis állapotban még kifejezettebb. Ez a jelenség elsősorban a IIa típusú rostokban játszik fontos szerepet. Ez utóbbi mechanizmust fontos megkülönböztetni a pajzsmirigyhormonok által indukált mitokondriális protonszivárgástól, melyben a pajzsmirigyhormon-túlkínálat a mitokondriális légzés és az ATP szintézis szétkapcsolását végző uncoupling protein 3 (UCP3) expressziójának növelésén keresztül szintén rontja az oxidatív foszforiláció hatékonyságát, miközben hő szabadul fel [Queiroz és mtsai, 2004; Simonides és mtsai, 2008].

A pajzsmirigyhormonok nagy hatást gyakorolnak a sejtmembránban található ATP-fogyasztó heterotrimer pumpafehérjére, a NKA-ra is, ami 3 Na⁺-t pumpál ki a sejtől és 2 K⁺-t transzportál be a sejtbe koncentrációgrádiensükkel szemben. Az ion- és vízhomeosztázis szabályozásán felül a NKA gondoskodik a membránpotenciál fenntartásáról és egyes molekulák Na⁺-kapcsolt transzportjáról is. A NKA-nak kimondottan nagy jelentősége van a vázizomban, ugyanis itt található az egyik legnagyobb és legdinamikusabb NKA tartalom a szervezetben. A pajzsmirigyhormonok kétféle mechanizmuson keresztül serkentik a NKA aktivitását. Egyrészt fokozzák a Na⁺ és K⁺ fiziológiai körülmények között is megfigyelhető szivárgását [Pirkmajer és mtsai, 2016], melyek ezáltal passzívan áramlanak be a sejtbe és távoznak el a sejtől, ami azt vonja maga után, hogy a NKA-nak több ATP-re van szüksége feladata ellátásához. Másrészt a pajzsmirigyhormonok a NKA expresszióját is növelik a vázizomban, ami hipertireózisban tovább fokozódik [Riis és mtsai, 2005].

Mindent összevetve elmondható, hogy hipertireózis során a vérben keringő már-már toxikus mennyiségű pajzsmirigyhormon az izom rostösszetételét nagymértékben átalakítja. 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 (SERCA, NKA) expresszióját és/vagy aktivitását is serkentik. Mindezek fenntartásához több ATP gyorsabb előállítására van szükség, azonban a laktátkiválasztás 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.

A vázizom glükózfelvétele inzulin-függő (3. ábra). Fiziológias körülmények között a glükóz felvételének elősegítésén túl az inzulin fokozza a glükóz foszforilációját, a glikogén szintézisét, a glikolízist és a glükóz oxidációját a vázizomban [Dimitriadis és mtsai, 2004]. A vázizom inzulin által mediált glükózfelvétele során az inzulin kötődik a szarkolemmában található inzu-



3. ábra: A vázizom inzulin mediált glükózfelvétele. A vázizom inzulin által mediált glükózfelvétele során az inzulin kötődik a szarkolemmában található IR extracelluláris α alegységéhez, melynek hatására a β alegység meghatározott Tyr oldalláncokon autofoszforilálódik, majd foszforilálja a hozzá kapcsolódó IRS1 fehérjét. A Tyr oldalláncokon foszforilált IRS1 fehérje dokkoló helyet biztosít a PI3K számára. Az aktiválódott PI3K enzim membránban megjelenő produktumai a PKB/Akt enzim membránhoz való kötődését és aktiválódását idézik elő, ami az intracelluláris vezikulákban tárolt GLUT4 transzporter fehérjék szarkolemmába való transzlokációját indukálja. Az ábra a biorender.com felületén készült.

lin receptor (IR) extracelluláris α alegységéhez, ami olyan konformációváltozást idéz elő, melynek hatására a β alegység felszabadul a gátlás alól és meghatározott Tyr oldalláncokon autofoszforilálódik. Miután aktiválódott, a receptor számos szubsztrátot képes foszforilálni, köztük az IR foszfortirozin oldalláncaihoz kapcsolódó inzulin receptor szubsztrát 1 (IRS1) fehérjét. A Tyr oldalláncokon foszforilált IRS1 fehérje dokkoló helyet biztosít a regulátor alegységén src homológia 2 (SH2) doménnel rendelkező PI3K számára. A PI3K enzim a kötődés hatására konformációváltozást szenved és aktiválódik. Az aktiválódott PI3K enzim

membránban megjelenő produktumai a protein kináz B/Akt (PKB/Akt) enzim membránhoz való kötődését és aktiválódását idézik elő, ami az intracelluláris vezikulákban tárolt GLUT4 fehérjék szarkolemmába való transzlokációját indukálja [Abdul-Ghani és mtsai, 2010]. A GLUT4-ről ismert, hogy expressziója a T3 által transzkripciósan regulált [Zorzano és mtsai, 2005], ami hipertireózis hatására fokozódik a vázizomban [Casla és mtsai, 1990].

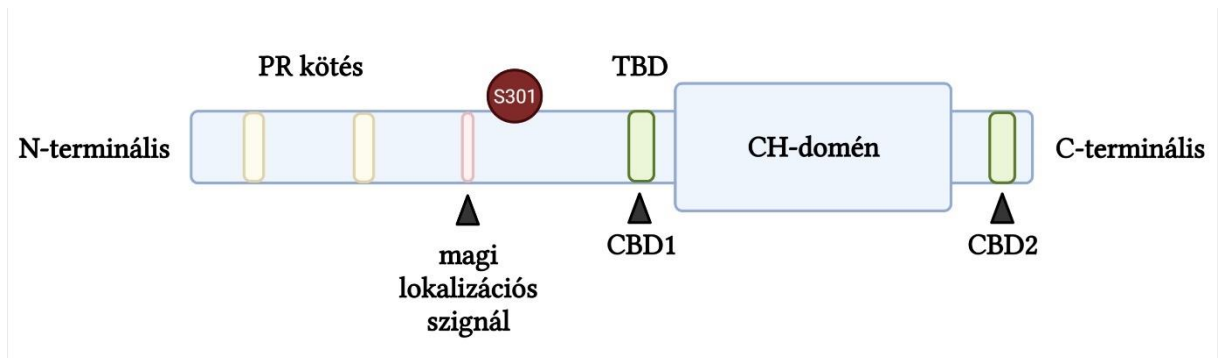
Az inzulinrezisztencia a szövetek normál inzulin koncentrációra adott csökkent válaszadó képességét jelenti. Bár számos genetikai és fiziológiai faktor közrejátszik az inzulinrezisztencia kialakulásában és súlyosbításában, humán alanyok bevonásával készült tanulmányok az IRS fehérjék megváltozott aktivitását jelölik meg, mint az inzulinrezisztencia hátterében álló közös mechanizmust [Copps és mtsai, 2012; Karlsson és mtsai, 2007]. Az IRS1 a Tyr oldalláncok mellett Ser/Thr oldalláncokon is foszforilálódhat, melyek pozíciótól függő módon serkentik vagy gátolják a fehérje aktivitását. Az inzulin hatására aktiválódó PKB/Akt általi Ser foszforiláció például védelmet nyújt a tirozin foszfatázok ellen, pozitív visszacsatolási mechanizmussal aktív állapotban tartva az IRS1-et [Paz és mtsai, 1999]. Az inzulin azonban más Ser/Thr kinázokat is aktivál, mint például az ERK-t, a c-Jun N-terminális kinázt (JNK), a PKC-t, vagy a mammalian target of rapamycint (mTOR), melyek meghatározott oldalláncok foszforilálódását indukálják és negatív visszacsatolási mechanizmussal gátolják az IRS1 működését, ami az inzulinhatás megszűnésével jár. Az mTOR és a JNK általi Ser307-es foszforiláció például gátolja az IR és az IRS1 közötti kölcsönhatást, míg a PI3K kötődésért felelős Tyr oldalláncok közelében található Ser612-es oldallánc ERK általi foszforilációja a PI3K kötődését akadályozza. Láthatjuk, hogy az IRS1 pozitív Tyr/Ser foszforilációja és negatív Ser foszforilációja közötti egyensúly milyen fontos szerepet játszik a fehérje aktivitásának szabályozásában, ezáltal pedig a normál inzulin-jelátvitelben. 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 [Tanti és mtsai, 2004].

Sokáig úgy vélték, hogy a hipertireózist gyakran kísérő inzulinrezisztencia csak a májra korlátozódik és a periférián található szerveket nem érinti, azonban egyre nő azon tanulmányok száma, melyekben csökkent perifériális inzulinérzékenységről és glükóz intoleranciáról számolnak be [Shen és mtsai, 1988; Dimitriadis és mtsai, 1997; Mitrou és mtsai, 2010]. Dimitriadis és mtsai kimutatták, hogy hipertireózis során a posztprandiális periódusban (fiziológiás inzulin koncentráció mellett) a vázizom nettó glükózfelvétele csökken, ami a véráramlás sebességének növekedése miatt rejtve marad [Dimitriadis és mtsai, 2008]. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a vázizom inzulin mediált glükózfelvételének hipertireózis során

bekövetkező rendellenességét az intracelluláris glükóz metabolizmusért felelős jelátviteli útvonal(ak) hibája okozza.

1.4. A SMTNL1 mint a vázizom plaszticitás szabályozó eleme

A vázizom inzulinrezisztenciájának egyik potenciális szabályozó eleme a vizsgálataink középpontjában álló SMTNL1 fehérje. A SMTNL1 vagy régebbi nevén CHASM (calponin homology-associated smooth muscle protein), a gasztrointesztinális simaizomból izolált fehérje, ami a smoothelin (SMTN) fehérjékkel mutat szekvenciahomológiát [Borman és mtsai, 2004]. A vékony- és vastagbélben, a húgyhólyagban, a szívben és az aortában is expresszálódik, de a vázizomban ezen belül is a IIa típusú rostokban expresszálódik a legjelentősebb mértékben mind az egerek mind az emberek esetén [Wooldridge és mtsai, 2008]. C terminálisán (342-459) a többi SMTN fehérjéhez hasonlóan kalponin homológia (CH) doménnel rendelkezik, míg N-terminális vége (1-341) rendezetlen, „bolyhos” szerkezetű (4. ábra). A CH domén a kalmodulinhoz, illetve a tropomiozinhoz való kötődéshez szükséges, azonban a SMTN családba tartozó fehérjékkel ellentétben F-aktinhoz nem kapcsolódik [Ishida és mtsai, 2008; Ulke-Lemée és mtsai, 2014; 2015].



4. ábra: A SMTNL1 fehérjeszerkezete. A SMTNL1 fehérje C terminálisán (342-459) CH doménnel rendelkezik, míg N-terminális vége (1-341) rendezetlen szerkezetű. A CH domén a kalmodulinhoz, illetve a tropomiozinhoz való kötődéshez szükséges, azonban F-aktinhoz nem kapcsolódik. A fehérje intracelluláris lokalizációját a CH domén közelében található Ser301-es oldallánc foszforilációs állapota szabja meg, ami a ciklikus nukleotid függő kinázok célpontja a sima- és vázizomban. A foszforiláció feltehetően olyan konformációváltozást idéz elő, ami a foszforilációs helytől N-terminálisan elhelyezkedő magi lokalizációs szignált exponálja. Az ábra a biorender.com felületén készült. PR: progeszteron receptor; TBD: tropomiozin kötő domén; CBD: kalmodulinkötő domén

A SMTNL1 fehérje intracelluláris lokalizációját a CH domén közelében található Ser301-es oldallánc foszforilációs állapota szabja meg, ami a ciklikus nukleotid függő kinázok, nevezetesen a protein kináz A és G (PKA/PKG) célpontja a sima- és vázizomban [Borman és mtsai, 2004; Wooldridge és mtsai, 2008] (4. ábra). A SMTNL1 HeLa sejtekben való overexpressziójának eredményeképpen a defoszforilált fehérje a citoszolban halmozódik fel, de β -adrenerg stimulációt követően a sejtmagba transzlokálódik. A foszforiláció feltehetően olyan változást idéz elő a fehérje konformációjában, ami a foszforilációs helytől N-terminálisan elhelyezkedő, a fehérje defoszforilált állapotában nem hozzáférhető magi lokalizációs szignált exponálja (4. ábra). A foszforilációs hely Ser aminosavának Ala-ra mutálása blokkolja a SMTNL1 transzlokációját a sejtmagba [Lontay és mtsai, 2010]. Emlős kéthibrid rendszerben és koimmunprecipitációs kísérletekkel három különböző sejtvonalban (HepG2, 293T, T47D) igazolták, hogy foszforilációját és sejtmagba való transzlokációját követően a SMTNL1 szelektíven, de ligandfüggő módon képes kötődni a progeszteron receptorhoz (PR) és transzkripció represszorként funkcionálva gátolja a PR által szabályozott gének kifejeződését [Bodoor és mtsai, 2011] (5. ábra).

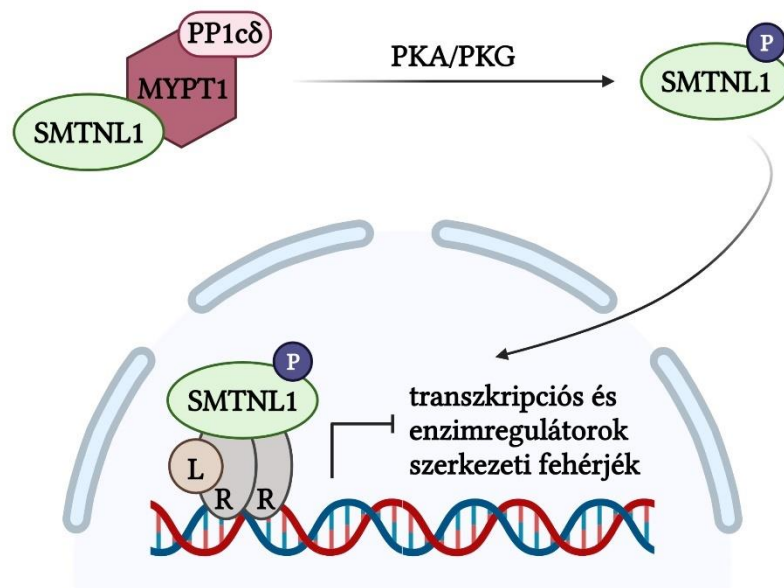
A SMTNL1 fehérje figyelemreméltó abban a tekintetben, hogy nemtől függően képes szabályozni a vázizom különböző stresszhatásokra (pl. edzés, vemhesség) bekövetkező adaptálódását. A SMTNL1 fiziológiai jelentőségének megállapítására a fehérje 3-8 exonjait (230-421 aminosavakat kódoló szakasz, ami tartalmazza a Ser301 foszforilációs helyet és a CH domént) célzott gendelációval eltávolították, SMTNL1 génkiütött (KO) egereket hozva létre. Az egerek embrionális fejlődése, az utódok mérete és alapaktivitása kezdetben normálisnak bizonyult [Wooldridge és mtsai, 2008], azonban több ezer szaporulatot követően Bodoor és mtsai megfigyelték, hogy az embrionális letalitás szignifikánsan nagyobb, az utódok kisebbek, a vemhesség nehezebben alakul ki és az újszülött hím utódok száma meghaladja a nőstények számát, ami összességében egy gyengébb reprodukciós fenotípusra, valamint a populáció reprodukciós fitneszének csökkenésére utal [Bodoor és mtsai, 2011]. A *m. soleus* izomból készített metszetek elektronmikroszkópos vizsgálata nem mutatott változást az izom ultraszerkezetében a SMTNL1 kiütésének hatására. A SMTNL1 KO egerek 5 hetes állóképességi edzése és az azt követő terheléses vizsgálatok rávilágítottak, hogy a hím KO egerek szignifikánsan később fáradnak el, többet futnak és a munkavégzésük is nagyobb a vad típusú (WT) társaikhoz képest, míg a nőstény KO egerek teljesítménye nem különbözik jelentősen a WT nőstényekétől. A vázizom rosttipizálásából kiderült, hogy a SMTNL1 delécióna a vázizom rostösszetételének átalakítását indukálja: a mozgásszegény KO egerek *m. plantaris* izma alapállapotban több 2a és kevesebb 2b rostot tartalmaz a WT egerekhez képest,

hasonlóan az 5 hetes tréningen átesett WT egerekhez, miközben a SMTNL1 deléciója az 1 és 2x típusú rostokra nincs hatással. A KO egereken végzett további vizsgálatok feltárták, hogy az egerek testsúlya, izomtömege, vérnyomása, glükóztoleranciája, szérumértékei nem változtak jelentősen, minden érték a normál tartományba esett [Wooldridge és mtsai, 2008].

A SMTNL1 a nőstény állatok izomzatának vemhességhez való adaptációjában is fontos szerepet játszik. A vemhes SMTNL1 KO nőstény egerek *m. plantaris* izmának western blot analízise és immunhisztokémiai tipizálása feltárta, hogy a MyHC 2b fehérjék expressziója szignifikánsan nő, a MyHC 2a fehérjék expressziója csökken, ami a 2b/2a típusú rostok arányának eltolódásával jár. A 2b típusú rostok számának emelkedése növeli az izomerőt, ezáltal képessé téve az anyaállatot a fejlődő magzat súlya jelentette teher jobb tolerálására a vemhesség késői szakaszában. A vázizom fizikai erejének, teherbírásának növelése ezért kiemelten fontos az anyaállat számára. A tanulmányt jegyző kutatók vemhes és nem vemhes SMTNL1 KO egerek légzési hányadosának meghatározását is elvégezték, melynek értékéből következtetni lehet a szervezet által felhasznált makrotápanyagok egymáshoz viszonyított arányára. 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 jelentősen kisebb volt a 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 GLUT4 és IRS1 expresszió következménye [Lontay és mtsai, 2015].

A SMTNL1-ről kimutatták, hogy 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 [Matsumura és mtsai, 2008; Somlyo és mtsai, 2007]. A MYPT regulátor alegységnek három izoformáját ismerjük (MYPT1, MYPT2, MYPT3), melyek feladata a katalitikus alegység különböző szubsztrátokhoz való irányítása, illetve a holoenzim aktivitásának szabályozása. Az izoformák közül a MYPT1-et a simaizomban azonosították, de a legtöbb eukarióta sejtben megtalálható, a MYPT2 és MYPT3 főként a szívben, a vázizomban és az agyban expresszálódik [Okamoto és mtsai, 2006]. A MP holoenzim aktivitásának szabályozására többféle mechanizmus jött létre, melyek közül a legalapvetőbb a MYPT regulátor alegység Ser/Thr kinázok általi foszforilációja, ami a holoenzim aktiválását vagy gátlását vonja maga után. A MYPT1/2 alegység Thr696-os pozíciójának foszforilálódása

például gátló hatású [Ichikawa és mtsai, 1996; Muranyi és mtsai, 2005]. A MP enzimaktivitás szabályozásának másik módja fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításán keresztül valósul meg. Ezen interakciós partnerek egyike a SMTNL1 fehérje, ami defoszforilált állapotában a MYPT1 alegységhez közvetlenül kötődik a citoszolban. Ez a jelenség az ismert rosttípusok közül egyelőre csupán a 2a típusú rostokban figyelhető meg, mivel jelenlegi tudásunk szerint a SMTNL1 és a MYPT1 is csak ezekben a rostokban expresszálódik. A Ser301-es oldallánc foszforilációja következtében a SMTNL1 disszociál a MYPT1-ről és a sejtmagba transzlokálódik, így a MP enzim felszabadul a gátlás alól (5. ábra). Az újszülött WT egerek *m. soleus* és *m. plantaris* izmában a SMTNL1 és a MYPT1 alacsony szinten expresszálódik, azonban az állatok fejlődése során sokszorosára nő. Ez az emelkedés mindkét fehérje esetén magasabb a kifejlett hím WT egerekben a nőstényekhez képest. Mind a hím, mind a nőstény SMTNL1 KO egerekben a MYPT1 expressziója fordított mintázatot mutat, tehát kezdetben magas majd a fejlődés előrehaladtával csökken, ami korrelál a holoenzim aktivitásával [Lontay és mtsai, 2010].

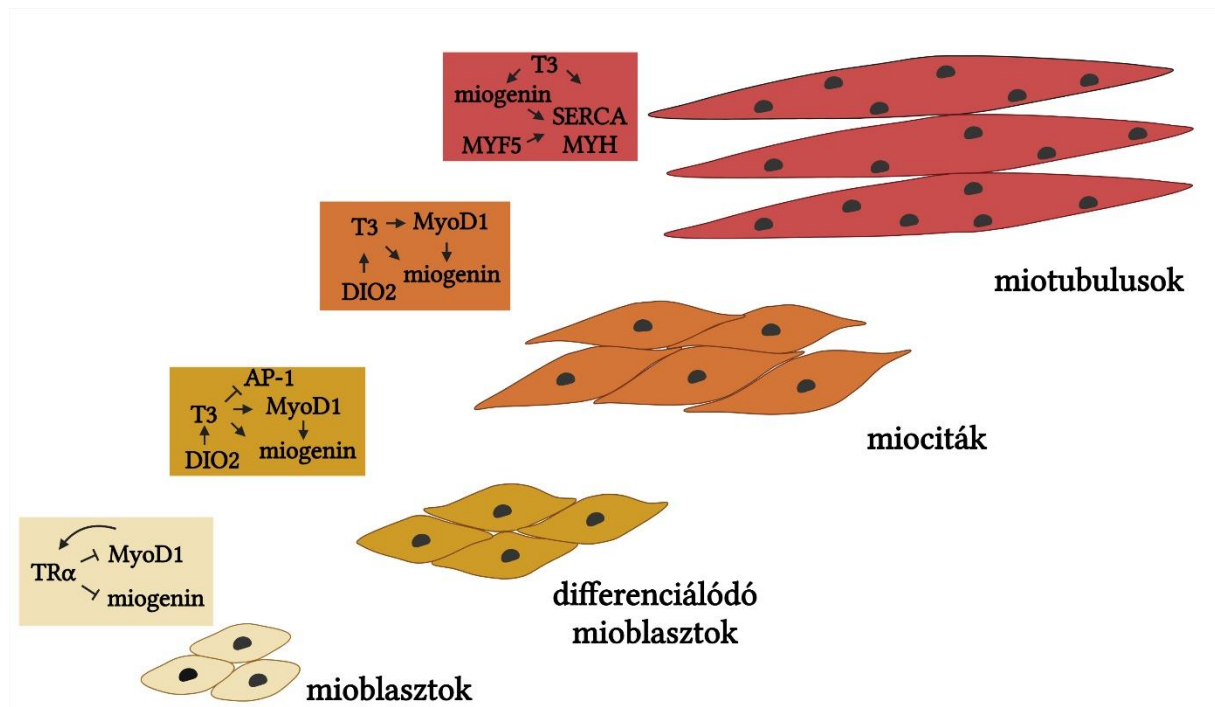


5. ábra: A SMTNL1 fehérje eddig ismert funkciói. A SMTNL1 fehérje defoszforilált állapotában a MYPT1 alegységhez közvetlenül kötődik a citoszolban. A Ser301-es oldallánc PKA/PKG általi foszforilációját követően disszociál a MYPT1-ről és a sejtmagba transzlokálódik, így a MP enzim felszabadul a gátlás alól. Foszforilációját és sejtmagba való transzlokációját követően a SMTNL1 transzkripciós represszorként funkcionálva számos gén expresszióját gátolja. Az ábra a biorender.com felületén készült. R: receptor; L: ligand

A MP enzim SMTNL1 általi szabályozásának jelentősége a vázizom működésében egyelőre nem tisztázott. A MP enzimiről különböző sejtvonalakban kimutatták, hogy regulátor alegységének foszforiláció általi gátlása (HepG2, máj), regulátor alegységének csendesítése (HeLa, méhnyak; HaCaT, bőr), valamint katalitikus alegységének farmakológiai gátlása (HaCaT, bőr) a sejtek migrációjának szignifikáns lassítását/blokkolását okozza [Lontay és mtsai, 2005; Xia és mtsai, 2004; Horváth és mtsai, 2018]. A vizsgált sejtvonalak nagyfokú különbözősége alapján úgy tűnik, hogy a MP enzim szabályozása sejttípustól függetlenül befolyásolja a sejtek migrációs képességét. Mivel a migráció a vázizom fejlődésében is fontos szerepet játszik és mert a vázizom progenitor sejtjeinek 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 [Wong és mtsai, 2020].

Munkám során a C2C12 sejtek migrációja mellett azok differenciációját is tanulmányoztam. Azt a folyamatot, amely magába foglalja a progenitor sejtek osztódását, migrációját és differenciációját és amely elengedhetetlen feltétele a vázizom megfelelő fejlődésének, miogenezisnek nevezzük. A miogenezis szabályozása különböző transzkripciós faktorok hierarchikus expresszióján keresztül valósul meg, melyet az extracelluláris faktorok és a sejt differenciációs állapota határoz meg [Bentzinger és mtsai, 2012]. A miogenezist kontrolláló faktorok közül kiemelkedő jelentősége van a pajzsmirigyhormonoknak és az ezek hatásmechanizmusában résztvevő fehérjéknek, különös tekintettel a DIO2 enzimre és a TR α izoformájára. A mioblaszt sejtek proliferatív fázisa során a TR α -a T3 jelenlététől függetlenül gátolja a differenciáció előrehaladását serkentő transzkripciós faktorok, mint a mioblaszt determináló fehérje 1 (MyoD1) és a miogenin expresszióját [Daury és mtsai, 2001], miközben a MyoD1 negatív visszacsatolási mechanizmussal a TR α transzkripciós aktivitását indukálja [Busson és mtsai, 2006]. A differenciálódó mioblasztokban a DIO2 expressziója nő, ami az intracelluláris T3 koncentráció növekedésével jár. Ez esszenciális a miogenezis előrehaladásához, amit a DIO2 KO egerek rendellenes vázizom fejlődése is alátámaszt [Dentice és mtsai, 2010]. A növekvő T3 szint következtében a differenciációt gátló hatású transzkripciós faktorok, mint amilyen az aktivátor fehérje 1 (AP-1) represszálódnak, ezáltal fokozódik a MyoD1 és a miogenin expressziója [Cassar-Malek és mtsai, 1996]. A miociták miotubulusokká történő terminális differenciációja során egyebek mellett a T3, a miogenin és a MYF5 jelenléte nélkülözhetetlen a vázizomrostok kontraktilis és anyagcsere-tulajdonságait meghatározó

fehérjék kifejeződéséhez, különös tekintettel az MyHC és SERCA fehérjékre [Ambrosio és mtsai, 2017; Marsili és mtsai, 2010] (6. ábra). Végül, de nem utolsósorban Wu és mtsai kimutatták, hogy a miozin foszforilációs állapota és ezáltal az ezt meghatározó fehérjék, mint a miozin könnyűlánc kináz (MLCK) és a MP is fontos szerepet játszanak a C2C12 miotubulusok kialakulásában. A miozin foszforilációjának megváltozása esetén a mioblasztok fúziója ugyan megengedett, de kisebb méretű miotubulusok alakulnak ki [Wu és mtsai, 2003].



6. ábra: A C2C12 sejtek differenciációjának fázisai. A mioblaszt sejtek proliferatív fázisa során a TR α gátolja a differenciáció előrehaladását serkentő MyoD1 és miogenin expresszióját, miközben a MyoD1 negatív visszacsatolási mechanizmussal a TR α transzkripciós aktivitását indukálja. 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 (AP-1) represszálódnak, ezáltal fokozódik a MyoD1 és a miogenin expressziója. A miociták miotubulusokká történő terminális differenciációja során egyebek mellett a T3, a miogenin és a MYF5 jelenléte nélkülözhetetlen az MyHC és SERCA fehérjék kifejeződéséhez. Az ábra a biorender.com felületén készült.

2. Célkitűzések

Mind a pajzsmirigy túlműködése következtében a vérben feleslegben lévő szabad pajzsmirigyhormonok, mind a SMTNL1 fehérje hiánya jelentős hatást gyakorol a vázizom felépítésére és működésére, ami 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 (remodellingjére), 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 markerfehérjéinek 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

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vegyszerek

A használt vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől szereztük be. Amennyiben ettől eltértünk, azt a vegyszer neve után zárójelben tüntettük fel.

3.2. Antitestek

A western blot analízisekhez használt antitestek listájáért lásd 1. táblázat.

3.3. Sejtenyésztés

A p6-p9 passzázsszámú C2C12 mioblaszt sejteket (ECACC 91031101) 1000 mg/L glükózt, 2 mM L-glutamint (Lonza; Basel, Switzerland), 10% (V/V) foetális borjú szérumot (FBS) és fenolvöröst tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Medium-ban (DMEM) (tenyésztő médium), 5% CO₂ szint mellett, 37 °C-on tenyésztettük.

3.4. Sejtenyésztő edények kollagénezése

Az adherens sejtek megfelelő tapadásának elősegítése érdekében a sejtenyésztő edényeket kollagéneztük. Ehhez patkányfarokból származó I-es típusú kollagént (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) 20 mM-os ecetsavban, 5 µg/cm² mennyiségben hígítottuk, majd az oldatot a sejtenyésztő edény vagy Petri-csésze (VWR International; West Chester, PA, USA) megfelelő lyukaiba pipettáztuk és 1 órán át, szobahőn inkubáltuk. Ezt követően a lyukakat kétszer mostuk 1x foszfáttal puffereelt sóoldattal (PBS) az ecetsav eltávolítására. A második mosást követően az 1x PBS-t leszívtuk, a sejtenyésztő edényeket megszáritottuk és felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

3.5. C2C12 sejtek tranziens transzfekciója rekombináns SMTNL1 fehérjével

A mioblaszt sejtek tranziens transzfekcióját GeneJuice transzfekciós reagenssel végeztük el a gyártó utasításai szerint. Ennek során a szérummentes DMEM-ben lévő transzfekciós reagenshez 3:1 arányban cseppenként hozzáadtuk a plazmid DNS-t (*pM11-NT-FT-SMTNL1*: M11 vektorba klónozott, N terminálisán Flag jelölőt tartalmazó rekombináns SMTNL1 fehérje; NM_024230.2; GeneCopoeia Inc.; Rockville, MD, USA), illetve az üres vektort (*pcDNA3.1*; V790-20; Thermo Fisher Scientific), majd szuszpendálást követően 15 percig szobahőn inkubáltuk. Eközben a sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd 0,25% (m/V) tripszin/ etilén-diamin-

1. táblázat: A western blot analízisek során használt antitestek

Antitest neve	A foszforiláció típusa	Rövidítés	Hígítás	Referencia
AMP-Activated Kinase		AMPK	1:2000	Cell Signaling Technology (#5831)
Desmin			1:1500	Cell Signaling Technology (#5332)
Flag Octapeptide (DYKDDDDK-tag)		Flag	1:2000	Sigma-Aldrich (#F7425)
GAPDH (G-9)		GAPDH	1:10 000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-365062)
Glucose Transporter 4 (SLC2A4)		GLUT4	1:1000	Cell Signaling Technology (#2213)
Hexokinase II		HK II	1:1000	Cell Signaling Technology (#2867)
HRP-Linked Anti-Goat			1:5000	Sigma-Aldrich (#A5420)
HRP-Linked Anti-Mouse			1:5000	Cell Signaling Technology (#7076)
HRP-Linked Anti-Rabbit			1:5000	Sigma-Aldrich (#A0545)
Insulin Receptor Substrate 1		IRS1	1:1000	Cell Signaling Technology (#3407)
Iodothyronine Deiodinase 2		DIO2	1:1500	Novus Biologicals (#NBP1-00178)
Mammalian Target of Rapamycin		mTOR	1:1000	Cell Signaling Technology (#2983)
Monocarboxylate Transporter 8 (SLC16A2)		MCT8	1:1500	Proteintech (#20676-1-AP)
MyoD1		MyoD1	1:1000	Cell Signaling Technology (#13812)
Myosin Heavy Chain		MyHC	1:1500	R&D Systems (#MAB4470)
Myosin Heavy Chain I		MyHC I	1:1000	Schiaffino et al. 1988
Myosin Heavy Chain IIa		MyHC IIa	1:1000	Schiaffino et al. 1988
Myosin Light Chain 20		MLC20	1:1000	Cell Signaling Technology (#3672)
Myosin Phosphatase Target Subunit (1-38)		MYPT1 ¹⁻³⁸	1:1000	Wu et al. 2003
Myosin Phosphatase Target Subunit 1		MYPT1	1:1000	BD Transduction Tech. (#612164)
Myosin Phosphatase Target Subunit 2		MYPT2	1:1000	Fujioka et al. 1998
Myosin Phosphatase Target Subunit (1-296)		MYPT1 ¹⁻²⁹⁶	1:1000	Lontay et al. 2004
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase		NKA	1:1000	Cell Signaling Technology (#3010)
p44/42 MAPK (Erk1/2)		ERK1/2	1:2000	Cell Signaling Technology (#4695)
Phospho-Mammalian Target of Rapamycin (Ser2448)	aktiváló	mTOR-P ^{S2448}	1:1000	Cell Signaling Technology (#5536)
Phosphatidylinositol 3-Kinase		PI3K	1:650	Merck Millipore (#ABS234)
Phospho-AMP-Activated Kinase (Thr172)	aktiváló	AMPK-P ^{T172}	1:2000	Cell Signaling Technology (#2535)
Phospho-Insulin Receptor Substrate 1 (Ser307)	gátló	IRS1-P ^{S307}	1:500	Thermo Fisher Scientific (#PA1-1054)
Phospho-Insulin Receptor Substrate 1 (Ser612)	gátló	IRS1-P ^{S612}	1:1000	Cell Signaling Technology (#3203)
Phospho-Myosin Light Chain 20 (Ser19)	aktiváló	MLC20-P ^{S19}	1:500	Cell Signaling Technology (#3671)
Phospho-Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (Thr696)	gátló	MYPT1-P ^{T696}	1:1000	Merck Millipore (#ABS45)
Phospho-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Ser16)	gátló	NKA-P ^{S16}	1:250	Cell Signaling Technology (#4020)
Phospho-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Ser23)	gátló	NKA-P ^{S23}	1:500	Cell Signaling Technology (#4006)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	aktiváló	ERK1/2-P ^{T202/Y204}	1:2000	Cell Signaling Technology (#9101)
Phospho-Stress-activated Protein Kinase/Jun Amino-terminal Kinase (Thr183/Tyr185)	aktiváló	SAPK/JNK-p ^{T183/Y185}	1:1000	Cell Signaling Technology (#9251)
Protein Kinase C delta		PKCδ	1:1000	Cell Signaling Technology (#2058)
Protein Phosphatase 2A Catalytic Subunit alpha		PP2Aα	1:1000	BD Transduction Technologies (#610556)
Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit delta		PP1cδ	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-365678)
Smoothelin-Like Protein 1		SMTNL1	1:1000	Santa Cruz (#sc-390369)
Stress-activated Protein Kinase/Jun Amino-terminal Kinase		SAPK/JNK	1:1000	Cell Signaling Technology (#9252)
Thyroid Hormone Receptor alpha		TRα	1:1500	Abcam (#ab53729)
Thyroid Hormone Receptor alpha/beta		TRα/β	1:650	Santa Cruz (#sc-772)
Thyroid Hormone Receptor beta		TRβ	1:1000	Thermo Fisher Scientific (#MA1-216)
α-actinin			1:8000	Sigma-Aldrich (#A2543)
α-tubulin			1:1000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-53646)
β-actin			1:20 000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-47778)

tetraecetsav (EDTA) oldattal választottuk fel a sejtenyésző flaska aljáról. A sejtszámot Bürker kamra segítségével határoztuk meg. Ezt követően -az adott kísérlettől és az ehhez használt sejtenyésző edény méretétől függően- a megfelelő térfogatú sejtszuspenziót 15 ml-es Falcon csövekbe mértük. A 15 perces inkubáció lejárta után a transzfekeciós mixet cseppenként adagolva hozzáadtuk az imént kimért sejtszuspenzióhoz és szuszpendálás után 10 percig, szobahőn inkubáltuk az elegyet. Ezt követően a sejteket előre kollagénezett sejtenyésző lemezre vagy Petri-csészébe tettük és egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on. Kontrollként minden esetben az üres plazmiddal transzfekektált (MOCK) sejteket használtuk. A transzfekeció sikerességét a Flag jelölő elleni antitesttel, western blot analízissel ellenőriztük.

3.6. C2C12 sejtek differenciáltatása és kezelése

A mioblaszt sejtek szélesztését és/vagy transzfekecióját követő napon, kb. 90%-os konfluenciánál a C2C12 sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd differenciáltatás céljából a tenyésző médiumot 1000 mg/L glükózt, 2 mM L-glutamint és 2% (V/V) lószérumot tartalmazó, fenolvörös nélküli DMEM-re (differenciáltató médium) cseréltük, és a sejteket ebben tenyésztettük, melynek során a differenciáltató médiumot naponta cseréltük. A differenciáció 1. napjának (11., 24., 25. ábrák) vagy 4. napjának (13-18., 26., 28. ábrák) kezdetétől a differenciáltató médiumot 1 M sósav és etanol (HCl:EtOH) 1:4 arányú oldatában oldott, 10 nM-os végkoncentrációjú T3 hormonnal is kiegészítettük. A kontroll minden esetben 1 nM T3-at tartalmazott. Ezt követően a T3-mal kiegészített differenciáltató médiumot naponta cseréltük 6 napon (11., 24., 25. ábrák) vagy 3 napon (13-18., 26., 28. ábrák) keresztül. A sejtek állapotát, valamint a differenciáció következtében végbemenő morfológiai változásukat fénymikroszkóp alatt követtük nyomon; a differenciáció mértékének szemikvantitatív mérése kétféle differenciációs marker elleni antitesttel, western blot analízissel valósult meg. A 14B ábrán bemutatott PKA agonista, 8-bromoadenozin-3'-5'-ciklikus monofoszfát (8BrcAMP) kezelés NT-FT-SMTNL1-gyel vagy üres plazmiddal transzfekektált miotubulusokon történt, 10 µM-os végkoncentrációban, 24 óráig.

3.7. C2C12 sejtek feltárása

A differenciáció 6. napjának végén a transzfekektált és/vagy kezelt sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd proteáz és foszfatáz inhibitorokkal kiegészített radioimmunprecipitációs esszé (RIPA) pufferben [25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% nátrium-deoxikolat, 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)], jégen kapartuk

fel. A sejtsuszpenziókat Branson 250 szonikátorral (Thermo Fisher Scientific) tártuk fel 30 másodpercig, majd 10 percig $16\ 000 \times g$ -n, $4\ ^\circ\text{C}$ -on centrifugáltuk. A felülúszókból bicinkoninsav (BCA) esszével (Thermo Fisher Scientific) teljes fehérjekoncentrációt mértünk, melyhez RIPA pufferben oldott borjú szérum albumin (BSA) hígítási sort használtunk standardként.

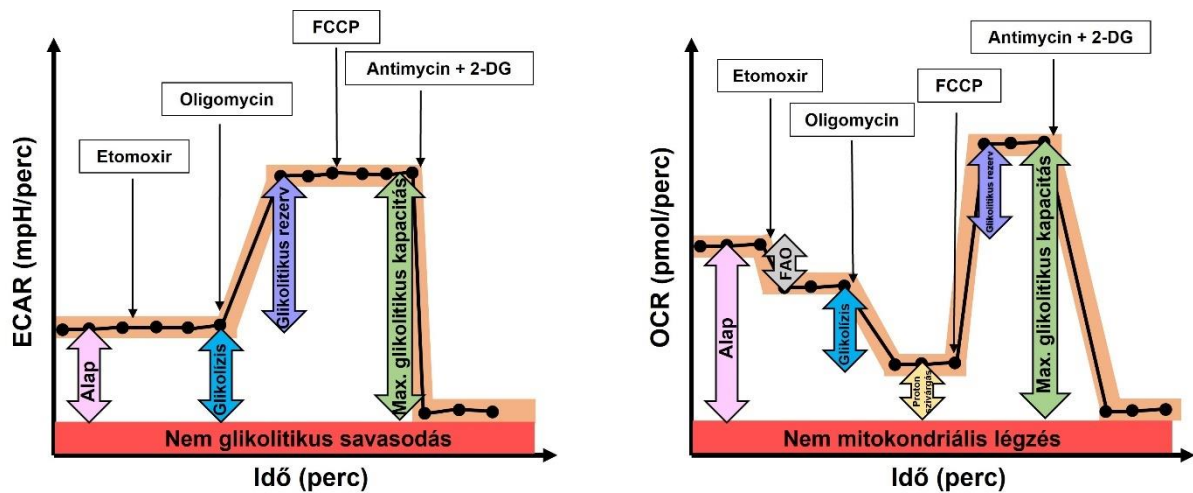
3.8. AlamarBlue életképességi esszé

A rezaurin egy nem toxikus, redox indikátor, ami fluoreszcens és kolorimetriás változásokkal jelzi a sejtek anyagcseréje során végbemenő redukáló folyamatokat. Ezen tulajdonsága miatt széles körben alkalmazzák a sejtek életképességének és citotoxicitásának kvantitatív mérésére. Kísérleteinkben az NT-FT-SMTNL1-gyel vagy az üres plazmival transzfektált mioblaszt sejteket ($20\ 000$ sejt/ lyuk) kollagénezett 96 lyukú sejtenyészítő lemezen tenyésztettük. A 72 órás T3 kezeléssel kombinált 6 napos differenciációt követően $20\ \mu\text{M}$ végkoncentrációjú alamarBlue reagenst pipettáztunk a sejtekhez, majd egy 2 perces, közepes erősségű rázatást követően a sejtenyészítő lemezeket 4 órán át $37\ ^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. A fluoreszcenciát 530/590 nm-en, Spark multimode reader-rel (Tecan Group Ltd.; Mannedorf, Switzerland) mértük. A fluoreszcencia intenzitás arányos az élő sejtek számával. Negatív kontrollként kollagénezett, de sejteket nem tartalmazó lyukakba azonos térfogatú, alamarBlue reagens tartalmú médiumot pipettáztunk. Minden csoport esetén 8 technikai párhuzamossal dolgoztunk.

3.9. Seahorse analízis

Kísérleteinkben a laktáttermelés és a mitokondriális oxidatív foszforiláció vizsgálatát az extracelluláris savasodási ráta (ECAR), illetve az oxigénfogyasztási ráta (OCR) mérésén keresztül, Seahorse analízissel végeztük el, melyhez különböző inhibitorokat használtunk (7. ábra). A 2-deoxi-D-glükóz (2-DG) egy olyan glükóz analóg, melynek foszforilált formáját a foszfo-glükóizomeráz enzim nem képes metabolizálni. A 2-DG-6-foszfát intracelluláris felhalmozódása a glikolízis sebességmeghatározó lépését katalizáló hexokináz (HK) enzimet negatív visszacsatolási mechanizmussal gátolja, ezért jelenléte a glikolízis kompetitív gátlásához vezet. Az antimycin A a mitokondriális elektrontranszportlánc (mETC) III-as komplexén keresztüli elektronáramlást gátolja azáltal, hogy blokkolja az elektronok citokróm b-ről citokróm c-re történő átadását. Az oligomycin a mETC V-ös komplex protoncsatornájának gátlásán keresztül az ADP ATP-vé történő oxidatív foszforilációját akadályozza. A karbonil-cianid-p-trifluorometoxifenilhidrazon (FCCP) egy szétkapcsoló ágens, mely átjárhatóvá teszi a mitokondrium belső membránját a protonokra, ezzel arra

kényszerítve a mitokondriumot, hogy a membránpotenciál fenntartása érdekében növelje az elektronok áramlását, ami a terminális oxidáció fokozódásával jár. Az etomoxir egy széles körben használt kismolekulájú inhibitor, mely irreverzibilisen gátolja a mitokondrium külső membránjában található karnitin-palmitoil transzferáz 1 (CPT1) enzimet. A CPT1 enzim a hosszú szénlácú zsírsavak mitokondriumba való transzportjáért felelős, ezért etomoxir általi gátlása blokkolja a zsírsavak β -oxidációját a mitokondriumban.



7. ábra: Az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) és az oxigénfogyasztás (OCR) mértékének vizsgálata. Kísérleteinkben a laktáttermelés és a mitokondriális oxidatív foszforiláció vizsgálatát az ECAR, illetve az OCR mérésén keresztül, Seahorse analízissel végeztük el, melyhez különböző inhibitorokat használtunk. Az etomoxir egy kismolekulájú inhibitor, mely irreverzibilisen gátolja a zsírsavak β -oxidációját. Az oligomycin a mETC V-ös komplex protoncsatornájának gátlásán keresztül fejt ki hatását. Az FCCP egy szétkapcsoló ágens, mely átjárhatóvá teszi a mitokondrium belső membránját a protonokra, ami a terminális oxidáció fokozódásával jár. Az antimycin A a mETC III-as komplexét gátolja, míg a 2-DG egy olyan glükóz analóg, melynek jelenléte a glikolízis kompetitív gátlásához vezet.

A kísérlet kivitelezése során a mioblaszt sejteket NT-FT-SMTNL1-gyel vagy üres plazmival transzfektáltuk és kollagénezett XF96 sejtenyésztő lemezen (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) növesztettük (10 000 sejt/ lyuk). A sejtek 72 órás T3 kezelést differenciáltató médiumban végeztük el, majd 1x PBS-sel mostuk át a sejteket. Ezután 180 μ l XF Assay médiumot (Agilent Technologies) mértünk a sejtekre, amihez előzetesen 1000 mg/L glükózt adtunk. A sejteket 1 órára oxigénezett, 37 °C-os inkubátorba tettük. Közben a korábban egy éjszakán át desztillált vízben áztatott szenzor cartridge-ot (Agilent Technologies) a már említett

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-DG. Ezt követően a szenzor cartridge-ot oxigénezett inkubátorba tettük 1 órára 37 °C-ra. Az alapvonal felvételéhez, valamint minden injektálás után 5 mérési pontot vettünk fel. Negatív kontrollként az XF96 sejtenyésző lemez négy sarkában lévő kollagénezett, de sejtet nem tartalmazó lyukakat használtuk. Minden esetben 23 technikai párhuzamossal dolgoztunk. A mérés végeztével 1 N NaOH-ban oldottuk fel a sejteket és BCA esszé kittel (Thermo Fisher Scientific) teljes fehérjekoncentrációt mértünk. Az adatok kiértékeléséhez használt műveleteket a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat: A Seahorse analízis kiértékelése során alkalmazott eljárások

ECAR	OCR
anaerob glikolízis = etomoxir – antimycin+2-DG	aerob glikolízis = etomoxir – oligomycin
maximális glikolízis = oligomycin – antimycin+2-DG	maximális légzés = FCCP – antimycin+2-DG
glikolitikus rezerv = oligomycin – alap	zsírsav oxidáció= alap – etomoxir
	glikolitikus rezerv = maximális légzés – zsírsav oxidáció – aerob glikolízis

3.10. Immunprecipitáció

Az NT-FT-SMTNL1 fehérje tisztítása során az Anti-Flag M2 Affinity Gel gyöngyöket háromszor, 1x Tris-pufferelt sóoldattal (TBS) mostuk a glicerol eltávolítására, majd proteáz inhibitorokkal kiegészített, 5% (m/V) BSA/ 1x TBS oldatban folyamatos kevertetés mellett blokkoltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Az NT-FT-SMTNL1-gyel transzfektált, 24 órás T3 (10 nM) vagy 30 perces 8BrcAMP (10 μM) kezelt sejteket jéghideg lizispufferben [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 1 mM PMSF, 10x PIC], jégen tártuk fel a 3.7. részben leírt módon. A sejt-lizátumok előtisztításához a mintákat protein A sepharose-zal (GE Healthcare, Chicago, IL, USA; #17-0780-01), folyamatos kevertetés mellett inkubáltuk 4 °C-on, 1 órán át. A gyöngyök blokkolása és a lizátumok előtisztítása az aspecifikus kötődések kivédése, minimalizálása érdekében történt. Az előtisztított lizátumokból 200 μl -t adtunk az előzetesen blokkolt gyöngyökhöz, majd folyamatos kevertetés mellett, 4 °C-on, 2 órán keresztül inkubáltuk, elég időt hagyva a Flag jelölővel ellátott célfehérjének a Flag elleni antitestet tartalmazó gyöngyökhöz való kikötődésre.

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

háromszor átmostuk, majd 5% (m/V) BSA/ 1x TBS oldatban blokkoltuk 4 °C-on, 2 órán keresztül. Ezt követően a gyöngyöket 1x TBS-sel háromszor mostuk és a SMTNL1-et overexpresszáló és/vagy T3-mal kezelt, előtisztított C2C12 lizátummal 4 °C-on, folyamatos kevertetés mellett egy éjszakán át inkubáltuk.

Mindkét immunprecipitáció esetén az eluálás során a gyöngyöket háromszor 1x/ TBS-sel mostuk, majd a szárazra szívott gyöngyökre forró 1x SDS mintapuffert pipettáztunk és 100 °C-on, 5 percig főztük. A célfehérjék lehetséges interakciós partnereit western blot analízissel vizsgáltuk 10-10 µl (NT-FT-SMTNL1), illetve 30-30 µl minta (NKA, MYPT) felhasználásával, a 3.15. bekezdésben részletezett módon. Negatív kontrollként a gyöngyök mellett csak puffert (NF-FT-SMTNL1), vagy puffert és másodlagos antitestet (anti-egér; 1:100) (NKA, MYPT) tartalmazó mintákat használtuk.

3.11. Immunfluoreszcencia

A NT-FT-SMTNL1-gyel vagy üres plazmiddal transzfektált mioblaszt sejteket (20 000 sejt/lyuk) kollagénezett, fekete falú OptiPlate96 sejtenyészítő lemezeken (PerkinElmer; Waltham, MA, USA) 5 napon keresztül differenciáltattuk. A differenciáció 0., 3. és 5. napján a sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd 4% (m/V) paraformaldehid/1x PBS oldatában 15 percig, szobahőn fixáltuk. A fixáló oldat leszívása és háromszori 1x PBS-sel történő mosást követően a sejtekhez 0,2% (V/V) Triton-X 100/ 1x PBS oldatot adtunk és 4 percig, szobahőn inkubáltuk permeabilizálás céljából. A permeabilizáló oldat eltávolítását követően a sejteket kétszer, 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 sejteket háromszor mostuk 1x PBS-sel, majd a fluorofórral konjugált másodlagos antitesteket, illetve az F-aktin festésére szolgáló Texas-Red Phalloidint blokkoló oldatban 200x hígítottuk és 1,5-2 óráig szobahőn inkubáltuk. A fluoreszcens jeleket automatizált, high-content screening (HCS) készülékkel (PerkinElmer) 10x nagyítású száraz objektívvel tettük láthatóvá. Kontrollként a 0. napos, üres plazmiddal transzfektált sejteket használtuk.

3.12. Morfológiai analízis

Az NT-FT-SMTNL1-gyel vagy üres plazmiddal transzfektált mioblasztokat (300 000 sejt/lyuk) kollagénezett, 3,5 cm átmérőjű Petri csészében 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, fenotípusában bekövetkező változásokat. Az analízis során látóterenként 15-15 mioblaszt sejtet (0. nap) vagy miotubulust (3. és 5. nap) választottunk ki véletlenszerűen, melyeket szabad kézzel körberajzoltunk és meghatároztuk az átlagos területet és kerületet, melyekből a miotubulusok méretére és mennyiségére következtettünk. Ezen felül a látótérben található összes miotubulust is megszámláltuk.

3.13. Karcolási esszé

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

3.14. Carbachol és tautomycetin (TMC) kezelés

A Debreceni Egyetem állatháza által rendelkezésünkre bocsátott 12 hetes NMRI egereket laboratóriumi körülmények között tartottuk, biztosítva számukra a folyamatos ivóvíz- és táplálékellátást (*ad libitum* etetés). Az eutanizált egerek *m. plantaris* izmából származó preparátumot Krebs oldatot [118 mM NaCl; 4,75 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 2,5 mM CaCl₂; 25 mM NaHCO₂; 11,5 mM glükóz] tartalmazó, 37 °C-os, 95% O₂-nel és 5% CO₂-dal ellátott szervfürdőbe helyeztük. A PP1 inhibitorok izompreparátumra kifejtett hatásának vizsgálatához 10 µM végkoncentrációjú TMC-vel inkubáltuk a mintát 30 percig, amelyet 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], Potter-Elvehjem homogenizátorral 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 megfelelt az állatkísérletekre vonatkozó magyarországi és európai uniós etikai szabályoknak, valamint a Debreceni Egyetem etikai kódexének.

3.15. SDS-gélelektroforézis és western blot analízis

A sejtek feltárását és a szövetek homogenizálását követően a mintákat 4x SDS mintapufferben (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) 5 percig főztük, majd mindegyikből 30 µg fehérjét tartalmazó térfogatot vittünk fel 4-20%-os Criterion gélekre (Bio-Rad Laboratories). A fehérjék méret szerinti elválasztását egy PowerPac HC tápegységgel (Bio-Rad Laboratories) 200 V-on végeztük el. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk át 100 V-on, 75 perc alatt egy Criterion blotter készülékben (Bio-Rad Laboratories). A membránok aspecifikus kötőhelyeinek elfedésére 5% (m/V) BSA/ 0,1% Tween 20-at tartalmazó 1x TBS-ben (1x TBST) 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 háromszor 10 percig 1x TBST-vel mostuk és a blokkoló oldatban hígított, torma-peroxidáz (HRP)-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk szobahőn, 1,5-2 órán át. Az immunreakciókat kemilumineszcenciás módszerrel, WesternBright ECL reagens (Advansta Inc.; San Jose, CA, USA) 1:1 arányú elegyét alkalmazva, ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories) készülék segítségével tettük láthatóvá. A foszforilált fehérjék esetén az előhívás után a membránokat sztrippeltük és a megfelelő nem foszforilált fehérjék elleni antitestekkel újra megjelöltük. Az ugyanazon membrándarabon lévő, de eltérő molekulatömegű és/vagy eredetű fehérjék esetén sztrippelés helyett a másodlagos antitesthez kapcsolt HRP inaktiválását végeztük el a 3.17. bekezdésben részletezett módon.

3.16. A membránok sztrippelése

A western blot membránokat 3x 5 percig 1x TBST-vel mostuk, majd sztrippelő pufferben [0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS, β-merkaptóetanol] 50 °C-on, 30 percig Thermo Shakerben (Biosan Laboratories Inc., Warren, MI, USA) rázattuk. Ezt követően a membránokat 6x 5 percig 1x TBST-vel mostuk, majd egy ismételt blokkolási lépés következett 5% (m/V) BSA/ 1x TBST oldattal szobahőn, 1 órát át. Az elsődleges és másodlagos antitestek hígítása és alkalmazásának, valamint a sávok detektálásának módja a 3.15. bekezdésben olvasható.

3.17. A membránok HRP inaktiválása

Ezt a módszert Sennepin és munkatársai fejlesztették ki [Sennepin és mtsai, 2009], melynek lényege az elsődleges vagy másodlagos antitestekhez kötött HRP enzim H_2O_2 jelenlétében történő irreverzibilis inaktiválása. Ezáltal lehetővé válik a membránok többszöri újrajelölése anélkül, hogy jelentős mennyiségű fehérjét veszítenénk. Ehhez a membránokat 3x 5 percig 1x TBST-vel mostuk, majd 1 ml 30%-os (m/V) H_2O_2 oldatban 37 °C-on, 15 percig, rázatás nélkül inkubáltuk. Ezt követően a membránokat 6x 5 percig 1x TBST-vel mostuk, majd 5% (m/V) BSA/1x TBST-ben blokkoltuk szobahőn, 1 órán át. Az elsődleges és másodlagos antitestek hígítása és alkalmazásának, valamint a sávok detektálásának módja a 3.15. részben már kifejtésre került.

3.18. Eutireózis és hipertireózisos humán vázizom biopsziák homogenizálása

Az eu- és hipertireózisos donorok *m. sternohyoideus* izmából vett biopsziát a begyűjtés pillanatában folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd -70 °C-on tároltuk. A donorokat elsősorban nemük és betegségük alapján választottuk ki. Minden biopszia *struma nodosában* (eutireózis), illetve Graves-kórban vagy *struma nodosa colloides*-ben (hipertireózis) szenvedő nőtől származik. Törekedtünk rá, hogy minden feltárássra kerülő minta 60 év alatti páciensből származzon. A minták 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 μ M MC-LR] jégen, üvegből készült Potter-Elvehjem szövethomogenizáló eszköz segítségével végeztük el. A homogenizátumokat 16 000 x g-n, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszókat új csövekbe mértük. A minták teljes fehérjekoncentrációját BCA esszével állapítottuk meg, majd előkészítettük western blot analízisre a fentebb részletezett módon. A betegek adataiból statisztikai analízist is készítettünk, melyhez 73 donor adatait használtuk fel. A humán eredetű szövetmintákat tartalmazó kísérletek megfeleltek 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.

3.19. Teljes RNS izolálás humán vázizom biopsziákból microarray analízishez

A mintákból a gyártó előírásai alapján teljes RNS-t izoláltunk az RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen; Hilden, Germany) segítségével. Ehhez az eu- és hipertireózisos vázizom mintákat egy guanidin-izotiocianát tartalmú pufferben, TissueRuptor-ral (Qiagen) homogenizáltuk, majd a

mintákat proteínáz K-val kezeltük 55 °C-on, 10 percig. A sejtörmelékét 10 000 x g-n, 3 percig tartó centrifugálással távolítottuk el, majd a felülúszókat 96-100%-os EtOH-lal szuszpendáltuk. Az RNS szilika membránhoz való kötését követően a DNS maradványokat DNáz I emésztéssel, RNeasy oszlopon távolítottuk el 30 °C-on, 15 perc alatt. Ezt követően a DNáz I és egyéb lehetséges szennyezők eltávolítása érdekében átmostuk az oszlopot. Az RNS-t az eluálást követően RNáz mentes vízben vettük fel és tisztaságának, valamint koncentrációjának meghatározását NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) végeztük el. Az eu- és hipertireózisos vázizom minták génexpressziós mintázatának vizsgálatát Affymetrix Human Gene 1.0 ST microarray analízissel hajtottuk végre a korábban már leírt módon [Dedinszki és mtsai, 2015]. A microarray analízis nyers adatai a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisban tekinthetők meg (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE178996>).

3.20. Proteome Profiler humán foszfo-kináz és foszfo-MAPK array

A humán foszfo-kináz (ARY003B) és foszfo-MAPK (ARY002B) array kitéket (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) a gyártó utasításaihoz igazodva, a következőképpen alkalmaztuk: első lépésként az eu- és hipertireózisos humán vázizom mintákat a proteáz és foszfatáz inhibitorokkal kiegészített Lysis Buffer 6 pufferben homogenizáltuk a 3.18. bekezdésben leírt módon. A foszfo-kináz array-hez a mintákat az Array Buffer 1-ben hígítottuk és a membránokkal együtt inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át, majd a membránokat detektálás céljából biotinizált antitest koktélaban inkubáltuk szobahőn, 2 órán keresztül. A foszfo-MAPK array esetén a mintákat Array Buffer 1-ben hígítottuk, majd a detektálásra szolgáló antitest koktélaban inkubáltuk szobahőn, 1 óráig. Az ilyen módon előkészített minta-antitest keveréket a membránokhoz adtuk, melyeket 4 °C-on, egy éjszakán át rázattunk. Mindkét array lezárásaként a membránokat hígított Streptavidin-HRP-ben inkubáltuk szobahőn, 30 percig, majd a sávokat kemilumineszcenciásan, a kitben lévő Chemi Reagent Mix segítségével, röntgenfilmen tettük láthatóvá.

3.21. Statisztikai analízis

Az immunoblottok és fehérje array-k eredményeinek denzitometrállását ImageJ (National Institutes of Health, MD, USA) szoftverrel végeztük. Az oszlopdiagrammok elkészítéséhez, valamint a statisztikai analízisekhez GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szoftvert használtunk. 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 vagy kétutas varianciaanalízist (ANOVA) használtunk, kiegészítve a megfelelő *post hoc* teszttel. Minden eredmény esetén az adatok átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk, ahol „*n*” az egymástól független kísérletek számát jelzi. A kiugró értékeket Thompson-Tau teszttel és Grubbs’s teszttel szűrtük ki. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak értékeltük, amennyiben $p < 0,05$ (*) volt.

4. Eredmények

4.1. A SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a vázizom anyagcseréjének szabályozásában hipertireózis során

4.1.1. Eu- és hipertireózisos humán donorok neme, életkora és testtömegindexe

Pajzsmirigyműtéten átesett eutireózisos (44) és hipertireózisos (29) donoroktól származó *m. sternohyoideus* biopsziák felhasználásával 73 mintából álló szövetbankot hoztunk létre. A donorok tájékozott beleegyezésüket adták, hogy személyes adataikat is felhasználjuk, így ezekből statisztikát készítettünk a donorok osztályozása céljából. A nem- és életkoreloszlásból kitűnik, hogy a tanulmányba bevont eutireózisos donorok 77%-a, a hipertireózisos donorok 79%-a nő. A hipertireózisos nöbetegek többsége (39%-a) 36 és 50 éves kor közötti (3. táblázat). A donorok neme, kora, magassága és testtömege alapján számított testtömegindex (BMI) elemzés rávilágított, hogy az eutireózisos donorok több, mint fele (59%-a) túlsúlyos vagy elhízott, míg a hipertireózisos betegek jellemzően normál testalkatúak (3. táblázat).

4.1.2. A humán vázizom rostösszetételének változása hipertireózis esetén

A bevezetésben említésre került, hogy a pajzsmirigy megváltozott hormontermelése az MyHC expressziójának transzkripció szintű szabályozása révén képes a vázizom rostösszetételét jelentős mértékben átalakítani [Izumo és mtsai, 1986]. A humán vázizom biopsziák western blot analízise feltárta, hogy a Ila típusú rostok markerfehérjéje, az MyHC Ila expressziója szignifikánsan csökkent, melyet az MyHC I fehérje expressziójának számottevő csökkenése kísért a hipertireózisos mintákban az eutireózisos mintákkal összevetve (8A és B ábra), ám szignifikáns izomtömeg-csökkenés nem volt megfigyelhető a tanulmányba bevont személyeknél, ami azt feltételezi, hogy a vázizom rostösszetétele változott.

4.1.3. A SMTNL1 fehérje expressziója a vázizomban hipertireózis során

A SMTNL1 KO egerek tanulmányozása során fény derült rá, hogy a Ila típusú rostokban expresszálódó SMTNL1 deléciója a vázizom rostösszetételének átalakítását indukálja, amely a nőstény egerek esetén a hipertireózishoz nagyon hasonló következményekkel jár [Lontay és mtsai, 2015], ezért az endogén SMTNL1 fehérje expressziójának hipertireózis általi érintettségét a humán vázizom minták szemikvantitatív western blot analízisével vizsgáltuk. A SMTNL1 expressziója hatodára csökkent a hipertireózisos mintákban az eutireózisos

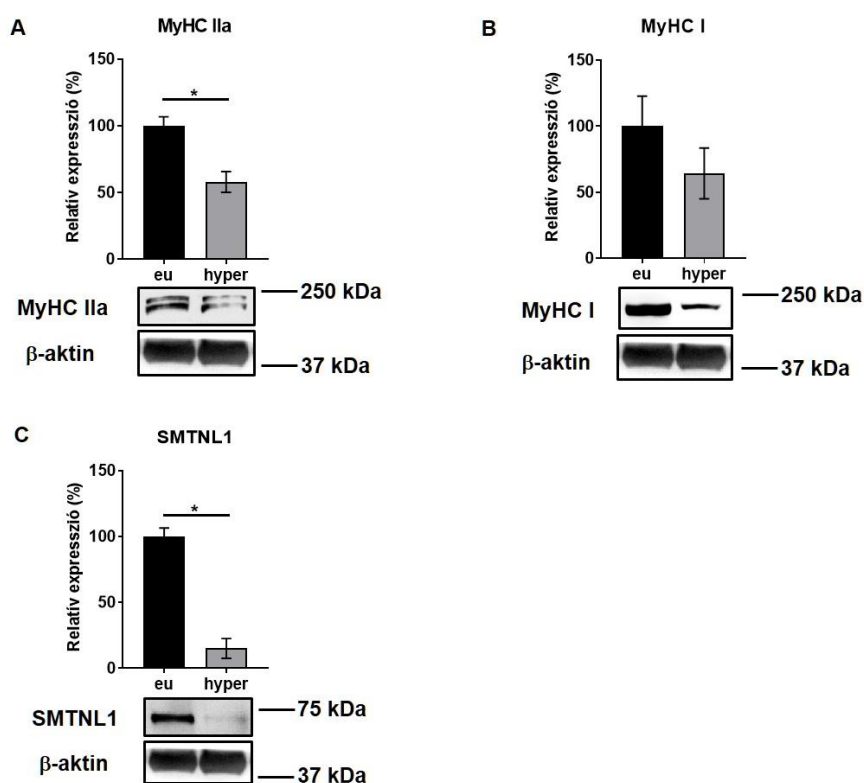
mintákhoz viszonyítva (8C ábra), ami arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 szerepet játszik a hipertireózisos vázizom patofiziológiájában.

		Eutireózisos		Hipertireózisos	
nem	nő	férfi	nő	férfi	
donorok száma	34	10	23	6	
átlagéletkor	54 +/- 14.2	52 +/- 14.1	53 +/- 14.3	53 +/- 15.1	
életkor eloszlás	Min: 26 Max: 81 20-35: 3% 36-50: 16% 51-65: 52% 66- : 29%	Min: 44 Max: 65 20-35: 0% 36-50: 33% 51-65: 67% 66- : 0%	Min: 23 Max: 78 20-35: 26% 36-50: 39% 51-65: 18% 66- : 17%	Min: 28 Max: 67 20-35: 20% 36-50: 20% 51-65: 40% 66- : 20%	
BMI	Eutireózisos (%)		Hipertireózisos (%)		
vékony	11		15		
normál	30		58		
túlsúlyos	43		15		
elhízott	16		12		

3. táblázat: Eutireózisos és hipertireózisos donorok adatainak statisztikai elemzése. A rendelkezésünkre álló adatok felhasználásával meghatároztuk az eu- és hipertireózisos donorok nem és életkor szerinti eloszlását, illetve a donorok testtömegindexét, a páciensek nemét, magasságát, testsúlyát és életkorát is figyelembevéve.

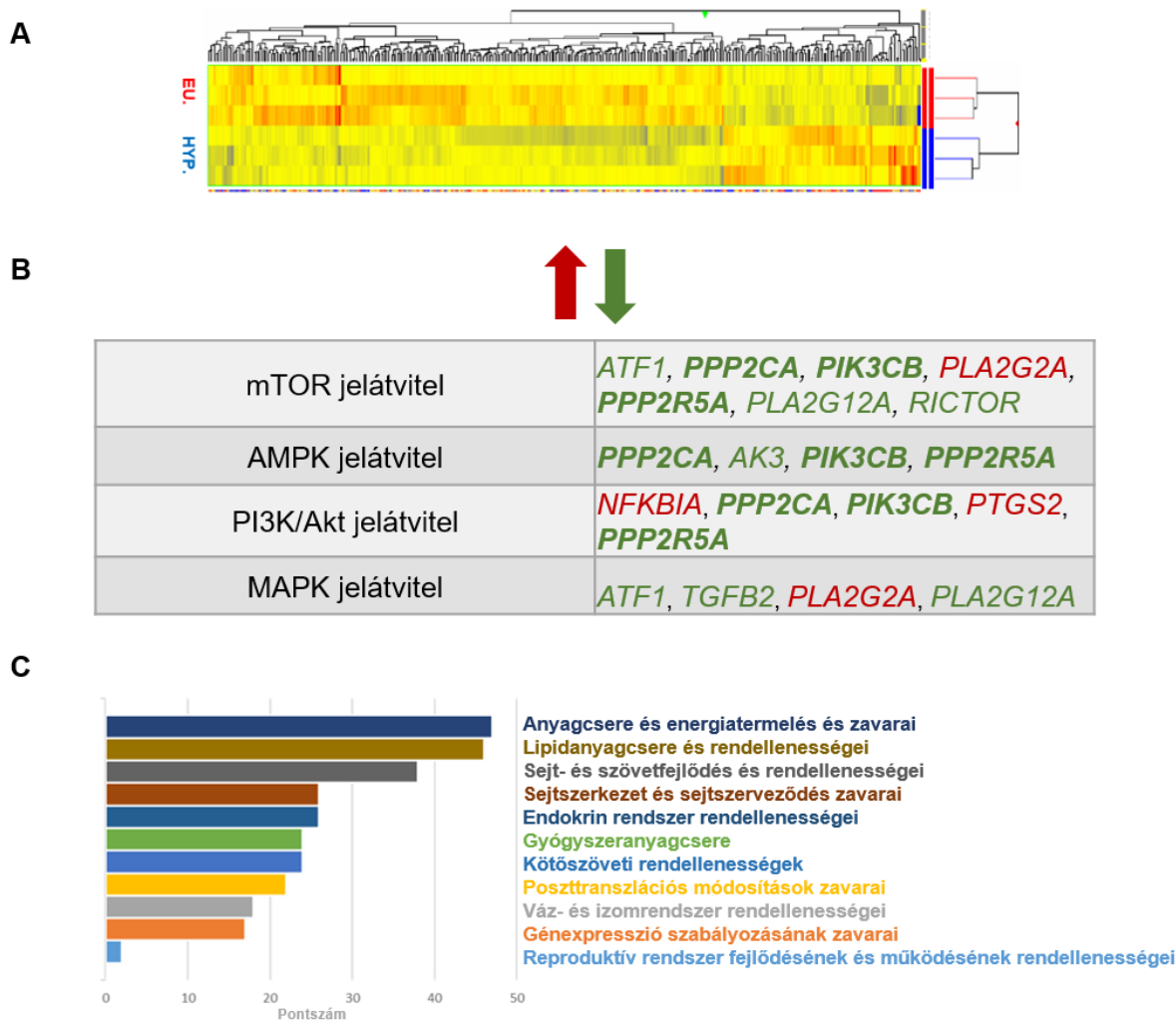
4.1.4. Humán vázizom biopsziák globális génexpressziós profiljának vizsgálata és génontológiai analízise

A hipertireózis hatására átalakuló izomban az MyHC fehérjék mellett más kontraktilis fehérjék, továbbá az energiaháztartásban, inzulin jelátvitelben és a glükóz homeosztázisban szerepet játszó enzimek expressziója és/vagy aktivitása is megváltozik [Pette és mtsai, 1997; Arai és mtsai, 1991]. Az eu- és hipertireózisos minták transzkriptómjának meghatározása és összehasonlítása érdekében a nem, életkor és a hipertireózist kiváltó ok alapján kiválasztott váz-



8. ábra: MyHC IIa, MyHC I és SMTNL1 expresszió az eu- és hipertireózisos humán vázizomban. A vázizom biopsziák homogenizálásával nyert fehérjéket western blot analízissel vizsgáltuk. Az MyHC IIa (A), MyHC I (B) és a SMTNL1 (C) elleni specifikus antitestekkel kapott sávok denzitását elosztottuk a belső kontroll denzitásával, majd a hipertireózisos értékeket az eutireózisos értékek átlagára normalizáltuk. A 3-3 eu- és hipertireózisos donor mintáinak analíziséből származó relatív fehérje expressziót oszlopdiaqramon ábráztuk (átlag \pm SEM). A csoportokat kétmintás párosítatlan *t*-próbával hasonlítottuk össze, ahol $p < 0,05$ (*) volt.

izom biopsziákból teljes RNS-t izoláltunk a 3.19. részben részletezett módon, majd a mintákat elküldtük microarray analízisre. Ennek során a mintákat a több mint 39 000 transzkriptumot tartalmazó Affymetrix Human Gene 1.0 ST array-vel vizsgálták, mely a teljes genomot hivatott reprezentálni. A 9A ábra hőterképe azt a 393 gént mutatja, melyek expressziója szignifikáns eltérést mutatott ($p < 0,05$) –pozitív vagy negatív irányba– a hipertireózisos mintákban az eutireózisos mintákkal összevetve. Az adatok bioinformatikai elemzése feltárta, hogy az intracelluláris jelátviteli útvonalak közül az mTOR, az AMP-aktivált kináz (AMPK), a PI3K/Akt és a MAPK szignalizációban résztvevő gének expressziója változott a legjelentősebb mértékben (9B ábra). Ezen gének fehérjetermékei többek között olyan biológiai folyamatokban játszanak szerepet, mint a sejt- és szövetfejlődés és ezek zavarai, a lipid metabolizmus és zavarai, valamint az anyagcsere és energiatermelés és ezek zavarai (9C ábra).

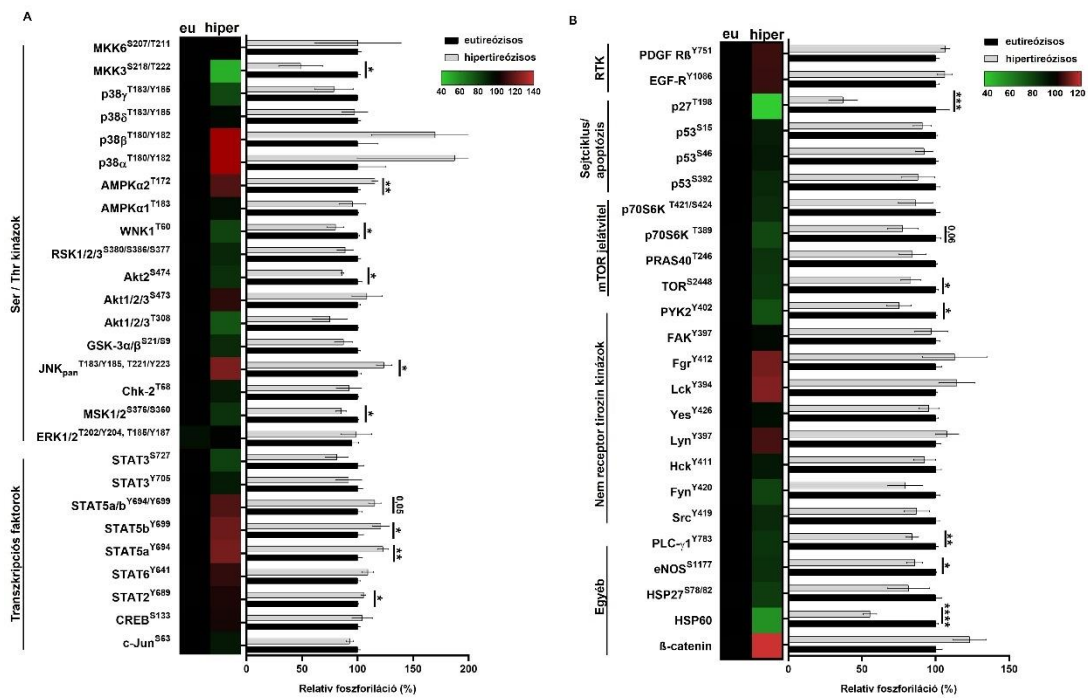


9. ábra: Humán eu- és hipertireózisos vázizom biopsziák microarray analízise. Három-három eu- és hipertireózisos biopsziából teljes RNS-t izoláltunk, majd a globális génexpressziós profilt microarray analízissel határoztuk meg. A hő térképen (A) pirossal az indukált gének, késsel pedig a represszált gének láthatók. A szignifikáns változást mutató, funkcionálisan összetartozó gének a táblázatban (B) jelölt jelátviteli útvonalakban játszanak szerepet, melyben zölddel a leszabályozott, pirossal pedig a felszabályozott géneket jelöltük. A génontológiai elemzés eredményeképpen leginkább felülreprezentált kategóriákat a (C) panel mutatja.

4.1.5. A hipertireózis kulcsfontosságú szignalizációs útvonalakban szerepet játszó kináz enzimek regulációjára gyakorolt hatása humán vázizomban

A microarray analízis során azonosított jelátviteli útvonalak hipertireózis által indukált fehérjeszintű változásainak tanulmányozására számos kináz foszforilációs állapotát is megvizsgáltuk, melyek ismeretében következtetni lehet az enzimek aktivitására és az általuk szabályozott jelátviteli útvonalak aktiválódására vagy inaktiválódására. A kereskedelmi

forgalomban elérhető humán foszfo-kináz és foszfo-MAPK array-k segítségével számos fehérje relatív foszforilációs vagy expressziós szintjének egyidejű, gyors és érzékeny detektálását végeztük el ugyanazon betegminták felhasználásával. A humán eutireózisos és hipertireózisos vázizom minták összehasonlításával nyert eredményeket a könnyebb átláthatóság érdekében hőtésképen és oszlopdigramon is ábrázoltuk (10. ábra). A transzkripciós faktorok közül a STAT2^{Y689}, STAT5a^{Y694} és a STAT5b^{Y699} foszforilációja jelentősen megemelkedett a hipertireózisos mintákban (10A ábra). A Ser/Thr kinázok csoportján belül az MSK1/2^{S376/S360},



10. ábra: Humán eu- és hipertireózisos vázizom biopsziák vizsgálata foszfo-kináz és foszfo-MAPK array-vel. A minták homogenizálását követően számos fehérje relatív foszforilációs szintjének meghatározását végeztük el a humán foszfo-kináz és foszfo-MAPK array-k segítségével (A, B). A hőtésképeken pirossal a foszforiláció emelkedését, zölddel a foszforiláció csökkenését jelöltük. A denzitometriás kiértékelést és a háttérkorrekciót követően az oszlopdigramokon szürkével az eutireózisos értékek átlagára normalizált hipertireózisos értékeket tüntettük fel, míg az eutireózisos értékek feketével láthatók. A foszfo-MAPK array esetén 2-2, a foszfo-kináz array esetén 3-3 eu- és hipertireózisos donor mintáit használtuk és az ebből származó eredmények átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A csoportokat kétmintás párosítatlan t-próbával hasonlítottuk össze, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) volt. RTK: receptor tirozin kinázok

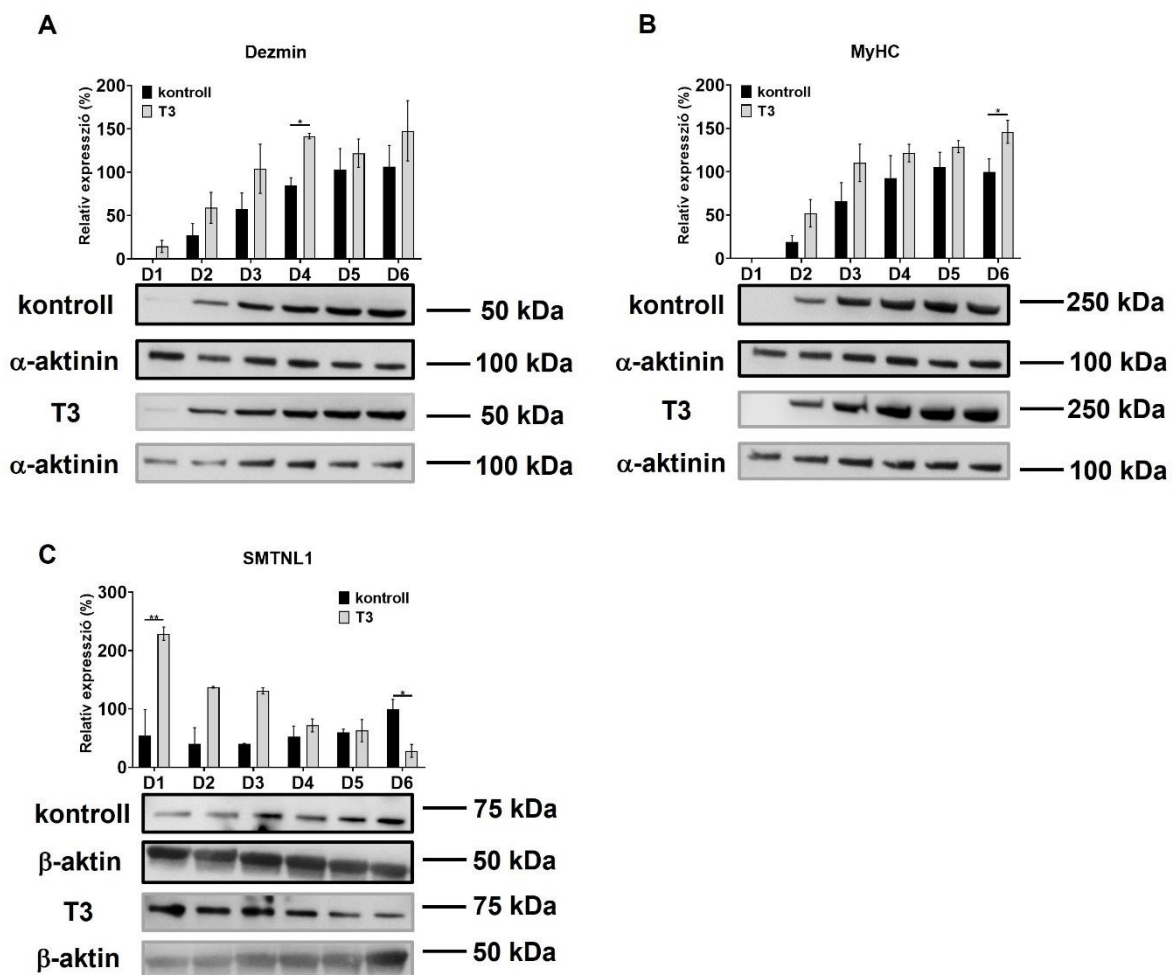
Akt2^{S474}, WNK1^{T60} és az MKK3^{S218/T222} foszforilációja szignifikánsan csökkent, míg az ERK1/2^{T202/Y204, T185/Y187}, AMPK α 2^{T172} és a JNK_{pan}^{T183/Y185, T221/Y223} foszforilációja

szignifikánsan nőtt a hipertireózisos mintákban az eutireózisos mintákhoz viszonyítva (10A ábra). Az mTOR^{S2448}, PLC- γ 1^{Y783} és az eNOS^{S1177} foszforilációja, továbbá a HSP60 expressziója lényegesen csökkent a hipertireózisos betegektől származó mintákban. A sejtciklus és az apoptózis szabályozásában résztvevő fehérjék közül csupán a p27^{T198} foszforilációja változott a hipertireózis hatására (10B ábra). 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 foszforilációjának módosításán keresztül.

4.1.6. A T3 kezelés hatása a C2C12 sejtek differenciációjára és az endogén SMTNL1 expressziójára

A C2C12 egér mioblaszt sejtvonal egy széles körben használt modellrendszer a vázizom metabolizmusának *in vitro* vizsgálatára [Wong és mtsai, 2020], melyet a humán vázizom biopsziákon kapott eredmények validálásán túl a SMTNL1 fehérje hipertireózis során kifejtett hatásának hátterében álló molekuláris mechanizmus felderítésére használtunk. Vizsgálati rendszerünkben a kifejlett vázizom modellezésére a mioblaszt sejteket miotubulusokká differenciáltattuk. Mivel az irodalomban többféle C2C12 differenciáltatási protokoll is fellelhető, melyek a differenciáltatás időtartamában különböznek egymástól [Muscat és mtsai, 1994; Chen és mtsai, 2015; Liu és mtsai, 2018; Dehoux és mtsai, 2004], ezért első lépésként meghatároztuk a differenciáció teljes végbemeneteléhez és az érett miotubulusok kifejlődéséhez szükséges napok számát a saját rendszerünkben, melyet a hosszútávú T3 kezelés C2C12 differenciációra kifejtett hatásának tanulmányozásával egészítettünk ki. Ehhez a mioblasztokat 6 napon keresztül a hipertireózisos állapotnak megfelelő szuprafiziológiás (10 nM) T3 koncentráció mellett differenciáltattuk. A differenciáció előrehaladását dezmin és MyHC differenciációs markerek segítségével, western blot analízissel monitoroztuk. A dezmin egy intermedier filamentum fehérje, mely a differenciáció korai szakaszában kis mennyiségben van csak jelen, azonban expressziója a differenciáció előrehaladtával nő [Li és mtsai, 1994]. Az MyHC expressziója meredeken emelkedik a normál differenciáció során [Nie és mtsai, 2017]. Eredményeink tükrében kijelenthetjük, hogy a 4. naptól kezdődően egyik marker expressziója sem változik szignifikánsan, ami azt mutatja, hogy a 4. npra teljesen végbement a differenciáció. A fiziológiás (kontroll) és a szuprafiziológiás koncentrációjú T3-mal kezelt csoportok összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a T3-mal kezelt sejtekben a 4. napon a dezmin, a 6. napon pedig az MyHC expressziója szignifikánsan, 57 és 46%-kal magasabb volt a kontrollhoz képest (11A és B ábra), ami arra utal, hogy a T3 elősegíti a C2C12 mioblasztok

differenciálódását. Ezt követően az endogén SMTNL1 expresszióját is megvizsgáltuk a fent említett körülmények között. A normál differenciáció során a fehérje expressziója fokozatosan nő, azonban ez az emelkedés nem szignifikáns. Érdekes módon a T3 kezelés hatására a SMTNL1 expressziójának drámai növekedése látható az 1. napon, amely ezt követően fokozatosan csökken egészen a differenciáció végéig, amikor expressziója már 4-szer kisebb a



11. ábra: A szuprafiziológiás T3 kezelés hatása a C2C12 sejtek differenciációjára és az endogén SMTNL1 expressziójára. A mioblasztokat alacsony szérumkoncentráció mellett, 10 nM T3 jelenlétében 6 napon át tenyésztettük. A kontroll fiziológiás koncentrációjú (1 nM) T3-at tartalmazott. Az érett miotubulusokat lizáltuk, majd a mintákat western blot analízissel, a dezmin (A), MyHC (B) és SMTNL1 (C) elleni specifikus antitestekkel vizsgáltuk. A fehérjesávok denzitometriás kiértékelését és a belső kontrollra való normalizálását követően az adatokat a D6 kontrolllok átlagához viszonyítva adtuk meg. Az $n=3-4$ kísérletből származó eredményeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel. A csoportokat kétutas ANOVA-val hasonlítottuk össze, melyet Tukey post hoc teszttel egészítettünk ki, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) volt.

kontrollhoz képest (11C ábra). Mindezek alapján elmondható, hogy a SMTNL1 expressziója bizonyos mértékig fordítottan arányos a T3 kezelés időtartamával, ami tovább erősíti, hogy a hosszútávú T3 expozíció a SMTNL1 expressziójának csökkenését okozza.

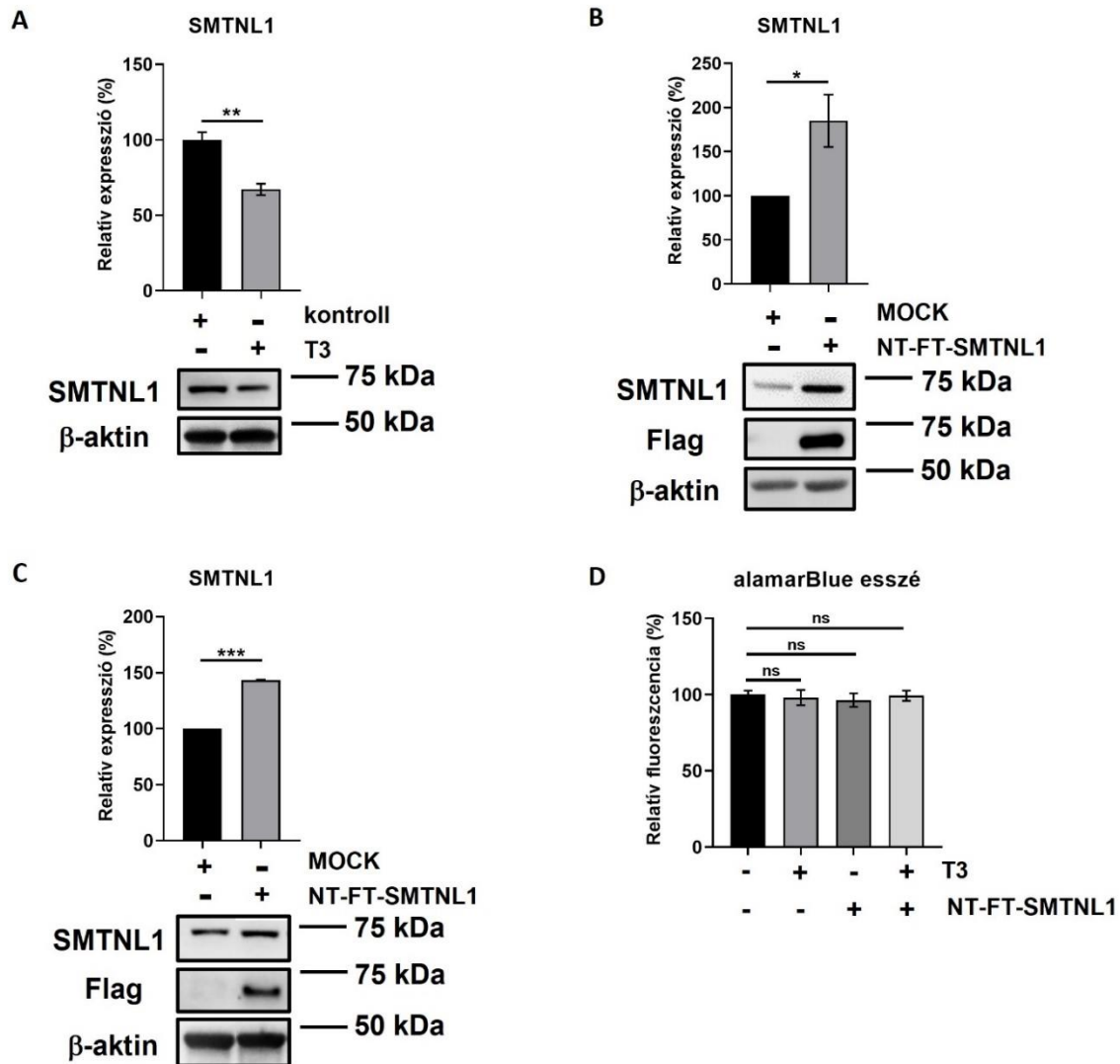
Egy másik kísérleti elrendezésben arra voltunk kíváncsiak, hogy egy 3 napos T3 kezelés milyen mértékű visszaesést idéz elő az endogén SMTNL1 expressziójában a kifejlett miotubulusokban. Ennek érdekében a már differenciálódott sejtek kezelését 10 nM T3 hozzáadásával egészítettük ki a 4. nap kezdetétől és így tenyésztettük a sejteket további 72 órán át. Azt találtuk, hogy a fehérje expressziója szignifikánsan, mintegy 33%-kal csökkent a T3 kezelésnek köszönhetően (12A ábra), ezért innentől kezdve ebben a kísérleti elrendezésben dolgoztunk tovább.

A SMTNL1 funkciójának tanulmányozására a rekombináns fehérjét kódoló plazmidot mioblasztokba transzfektáltuk, majd a sejteket miotubulusokká differenciáltattuk. A differenciálatlan mioblasztok és a differenciálódott miotubulusok feltárása után a transzfekeció sikerességét és a rekombináns fehérje kifejeződését a rekombináns fehérjén lévő Flag jelölőre specifikus antitesttel, illetve az endogén és rekombináns fehérjét is felismerni képes SMTNL1 elleni antitesttel, western blot analízissel ellenőriztük. A transzfekeció a mioblasztok esetén 85%-os növekedést produkált a SMTNL1 expressziójában (12B ábra). Ez az érték a sejtek differenciációját követően kb. felére (43%-ra) csökkent, ami azonban még így is jelentősnek tekinthető (12C ábra).

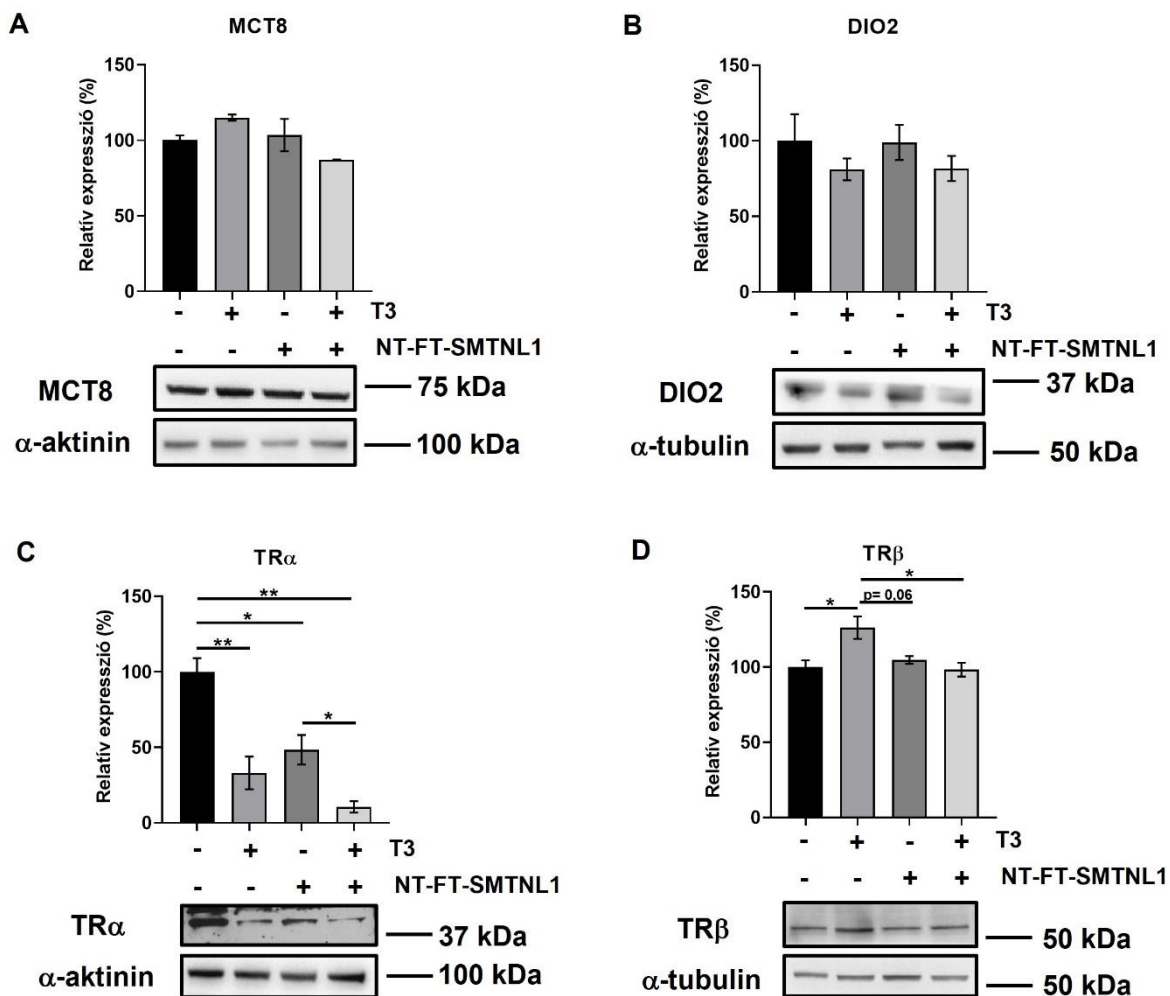
A szuprafiziológiás, 72 órás T3 kezelés és a transzfekeció C2C12 miotubulusok életképességére kifejtett hatását alamarBlue esszével vizsgáltuk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a különböző kezelésekre hatására bekövetkező változások nem a csökkenő sejtszámnak tudhatók be. Tapasztalataink azt mutatják, hogy sem a SMTNL1 overexpressziója, sem a szuprafiziológiás T3 kezelés nem befolyásolja a miotubulusok életképességét (12D ábra).

4.1.7. A T3 kezelés és a SMTNL1 overexpresszió befolyásolja a T3 hatásmechanizmusában szerepet játszó fehérjék expresszióját a C2C12 miotubulusokban

A T3 hatásmechanizmusának kialakításában kardinális szerepük van a pajzsmirigyhormonok sejtmembránon való átjuttatását végző transzportereknek, az intracelluláris térbe került hormonok aktivációját vagy inaktivációját végző konvertáló enzimeknek és az aktív hormonok célbajuttatását végző és effektor funkciót ellátó receptorfehérjéknek. Ezen transzportereknek, konvertáló enzimeknek és receptoroknak több különböző izoformája ismert, melyek szövetspecifikus expressziót mutatnak. A vázizomban a transzporterek közül az MCT8, a prohormonok aktivációját végző konvertáló enzimek közül a



12. ábra: A *SMTNL1* overexpresszió és 72 órás szuprafiziológiás T3 kezelés hatása a C2C12 miotubulusok életképességére. A miotubulusokat 10 nM T3-mal 72 óráig kezeltük, majd a teljes sejtes lizátumokat western blot analízissel, az endogén *SMTNL1* fehérje elleni specifikus antitesttel vizsgáltuk (A). A mioblasztokat üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns *SMTNL1* fehérjét tartalmazó plazmiddal (NT-FT-*SMTNL1*) transzfektáltuk, majd miotubulusokká differenciáltattuk. A *SMTNL1* overexpressziójának sikerességét a rekombináns Flag jelölőt tartalmazó fehérje elleni antitesttel, mind a mioblasztok (B) mind a miotubulusok (C) esetén western blot analízissel ellenőriztük, melynek eredményét denzitometriás kiértékeléssel kvantifikáltuk. A transzfekció és a szuprafiziológiás T3 kezelés hatását alamarBlue életképességi esszével tanulmányoztuk. (D). Az $n=3-4$ kísérletről származó eredmények átlag \pm SEM értékét oszlopdiaqramon ábrázoltuk, ahol az adatokat előbb a belső kontrollra normáltuk, majd az üres plazmiddal transzfektált (B, C) és/vagy az 1 nM T3-at kapott (A, D) kontrollhoz viszonyítva adtuk meg. A csoportokat kétmintás párosítatlan *t*-próbával (A-C) és egyutas ANOVA-val (D) hasonlítottuk össze, utóbbit Tukey post hoc teszttel egészítettünk ki, ahol ns=nem szignifikáns, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) volt.



13. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológiás T3 kezelés hatása a T3 jelátvitelben szerepet játszó regulátor fehérjék expressziójára. A mioblasztokat üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns SMTNL1-et tartalmazó plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektáltuk, majd differenciáltattuk. Az érett miotubulusokhoz a 4. naptól kezdődően 10 nM T3-at adtunk, melyet naponta frissre cseréltünk 72 órán keresztül. A teljes sejtes lizátumokat western blot analízissel, az MCT8 (A), DIO2 (B), TR α 1 (C) és TR β 1 (D) elleni specifikus antitestekkel vizsgáltunk. A fehérjesávok denzitometriás kiértékelését és az adatok belső kontrollra való normalizálását követően az eredményeket az 1 nM T3-mal kezelt MOCK kontrollok átlagához viszonyítva adtuk meg. Az $n=3-5$ kísérletből származó eredmények átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A csoportokat egyutas ANOVA-val hasonlítottuk össze, melyet Tukey post hoc teszt követett, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) volt.

DIO2, a receptorok közül elsősorban a TR α 1 és TR β 1 található meg, melyek egyaránt meghatározó szerepet töltenek be a pajzsmirigyhormonok által közvetített jel továbbításában, ezért utánajártunk, hogy szuprafiziológiás T3 koncentráció mellett a SMTNL1 fehérjének milyen hatása van –ha van egyáltalán- ezen fehérjék expressziójára. Ehhez a SMTNL1 fehérjét

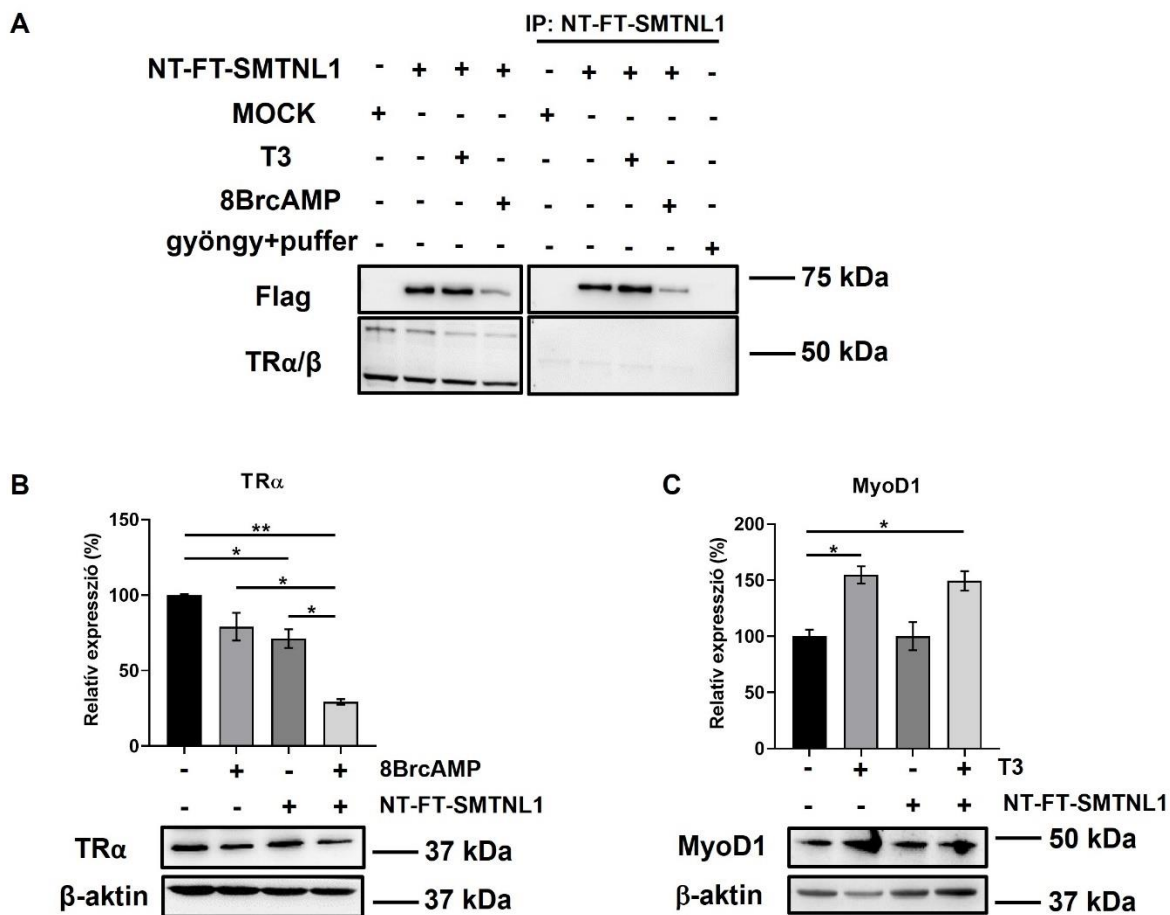
overexpresszáló miotubulusokat 10 nM T3-mal 72 óráig kezeltük. Az így kapott mintákat western blot analízissel elemeztük és megállapítottuk, hogy sem az MCT8, sem a DIO2 expressziójában nem történt lényeges változás (13A és B ábra), ellenben a TR α 1 expressziója drámaian, 67 és 52%-kal csökkent a T3 kezelés és a SMTNL1 overexpresszió hatására. Kezdetben úgy gondoltuk, hogy a SMTNL1 fehérje képes a T3 hatását antagonizálni, ezért meglepődve tapasztaltuk, hogy a kombinált kezelés a TR α 1 expresszió további visszaeséséhez vezetett, ami 37%-kal kisebb a SMTNL1 overexpressziója által előidézett csökkenéshez képest, és ami a T3 kezelés okozta csökkenéshez képest nem szignifikáns (13C ábra). Ezzel ellentétben a T3 kezelés a TR β 1 expresszióját szignifikánsan megemelte, melyre a SMTNL1 fehérje overexpressziójának önmagában nem volt hatása, azonban T3 kezeléssel kombinálva képes volt a T3 által indukált növekedést meggátolni (13D ábra).

A rekombináns SMTNL1 fehérje immunprecipitációja során kimutattuk, hogy a SMTNL1 és a TR-ok nem kötődnek egymáshoz közvetlenül (14A ábra). Mivel a SMTNL1-ről bebizonyosodott, hogy a PKA általi foszforilációját követően a sejtmagba transzlokálódik [Lontay és mtsai, 2010] valamint, hogy a sejtmagban transzkripció represszorként működik [Bodoor és mtsai, 2011], ezért a SMTNL1-t overexpresszáló miotubulusokat PKA agonistával (8BrcAMP) kezeltük és ilyen feltételek mellett is megvizsgáltuk, hogy hogyan alakul a TR α 1 expressziója. Eredményeink azt mutatják, hogy a kombinált kezelés következtében 42%-kal csökkent a TR α 1 expressziója a csak SMTNL1-et overexpresszáló miotubulusokhoz képest (14B ábra), ami arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 transzkripció szinten szabályozza a TR α 1 kifejeződését.

A MyoD1 fehérje egyike a miogenezist kontrolláló fő fehérjéknek, melynek expressziója T3 által transzkripció szinten pozitívan regulált [Muscat és mtsai, 1994; Carnac és mtsai, 1992]. Eredményeink is ezt támasztják alá, hiszen a T3 kezelés önmagában 55%-kal, a SMTNL1 overexpressziójával kombinálva pedig 49%-kal fokozta a MyoD1 expresszióját a miotubulusokban, miközben a SMTNL1 fehérjének önmagában nem volt hatása (14C ábra). Modellrendszerünkben a SMTNL1-t overexpresszáló miotubulusok esetén a differenciáció már végbement mikor a sejtek T3 kezelését megkezdjük, így ebben az esetben a MyoD1 felregulálásának feltételezhetően más jelentősége van.

4.1.8. A SMTNL1 overexpressziója T3 jelenlétében csökkenti az IRS1 Ser foszforilációját a miotubulusokban

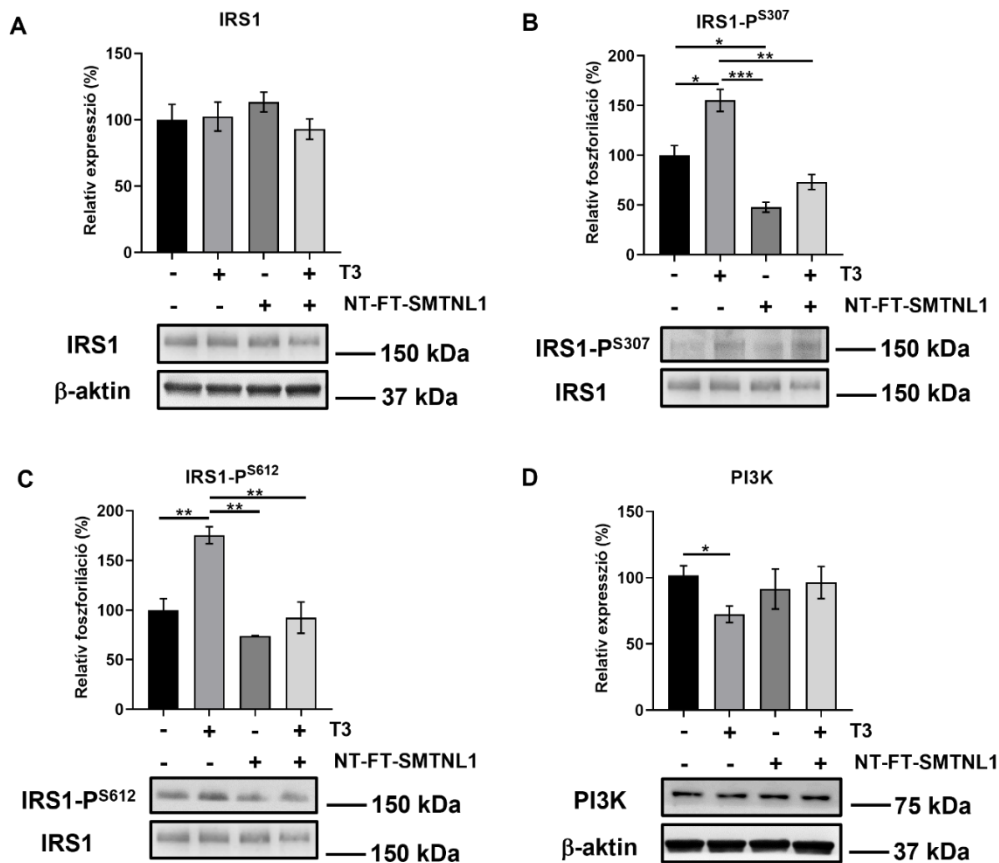
Hipertireózis során a vázizom normál inzulin koncentrációra adott csökkent válaszadó képességét feltehetően az intracelluláris glükóz metabolizmusért felelős jelátviteli útvonal(ak)



14. ábra: A SMTNL1 és a TR izoformák közötti kapcsolat. A rekombináns SMTNL1 fehérje immunprecipitációját Anti-FLAG M2 Affinity Gel segítségével, 10 nM T3-mal vagy 10 μ M 8BrcAMP-vel kezelt miotubulusokon végeztük el, majd western blot analízis keretében TR α / β elleni specifikus antitesttel vizsgáltuk a fehérjék közötti interakció meglétét vagy hiányát (A). Az üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns fehérjét kifejező plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektált mioblasztokat miotubulusokká differenciáltattuk, majd 10 μ M 8BrcAMP-vel kezeltük 24 órán át (B) vagy 10 nM T3-mal kezeltük 72 órán át (C). Az így kapott mintákat feltárás után western blot analízisnek vetettük alá a TR α (B) és a MyoD1 (C) elleni specifikus antitesteket alkalmazva. A fehérjesávok denzitometriás kvantifikációját és az adatok belső kontrollra való normalizálását követően az adatokat az 1nM T3-at kapott MOCK kontrollok átlagához viszonyítva tüntettük fel. Az $n=3$ kísérletből származó adatok átlag \pm SEM értékét oszlopdiagramon ábrázoltuk. A csoportokat egyutas ANOVA és Tukey post hoc teszt kombinációjával hasonlítottuk össze, ahol $p < 0,05$ (*) és $p < 0,01$ (**) volt.

hibája okozza [Dimitriadis és mtsai, 2008]. Figyelemreméltó módon nőstény SMTNL1 KO egerek esetén szintén csökkent glükóztolerancia figyelhető meg, melyet a csökkenő IRS1 szintekkel hoztak összefüggésbe [Lontay és mtsai, 2015]. Ezen megfigyeléseket alapul véve megvizsgáltuk a SMTNL1 fehérje és a T3 kezelés hatását az inzulin jelátvitel kritikus

elemeinek expressziójára és foszforilációjára a fenti hipotézis bizonyítására. Ehhez a SMTNL1-et overexpresszáló, differenciáltatott C2C12 sejteket 10 nM T3-mal 72 óráig kezeltük, majd a megfelelő fehérjékre és/vagy azok foszforilációs helyeire specifikus antitesttel western blot analízist végeztünk. Bár az IRS1 expressziója egyik kezelés hatására sem változott számottevően (15A ábra), a fehérje polipeptidláncának 307-es és 612-es pozíciójában található



15. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológiás T3 kezelés hatása az inzulin jelátvitel kritikus elemeinek expressziójára és foszforilációjára. Az üres plazmiddal (MOCK) vagy a rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektált mioblasztokat miotubulusokká differenciáltattuk, majd 72 órán át 10 nM T3 jelenlétében tenyésztettük. A teljes sejtes lizátumból származó fehérjéket western blot analízissel vizsgáltuk, az IRS1 (A), IRS1-P^{S307} (B), IRS1-P^{S612} (C) és PI3K (D) elleni specifikus antitestek segítségével. A fehérjesávok denzitometriás kvantifikációját és az adatok belső kontrollra (A, D) vagy nem foszforilált fehérjére (B, C) való normalizálását követően az eredményeket az 1 nM T3-mal kezelt MOCK kontrollok átlagához viszonyítva adtuk meg. Az n=3-6 kísérletből származó adatok átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A statisztikai analízis során a csoportokat egyutas ANOVA-val hasonlítottuk össze, melyet Tukey post hoc teszt követett, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) volt.

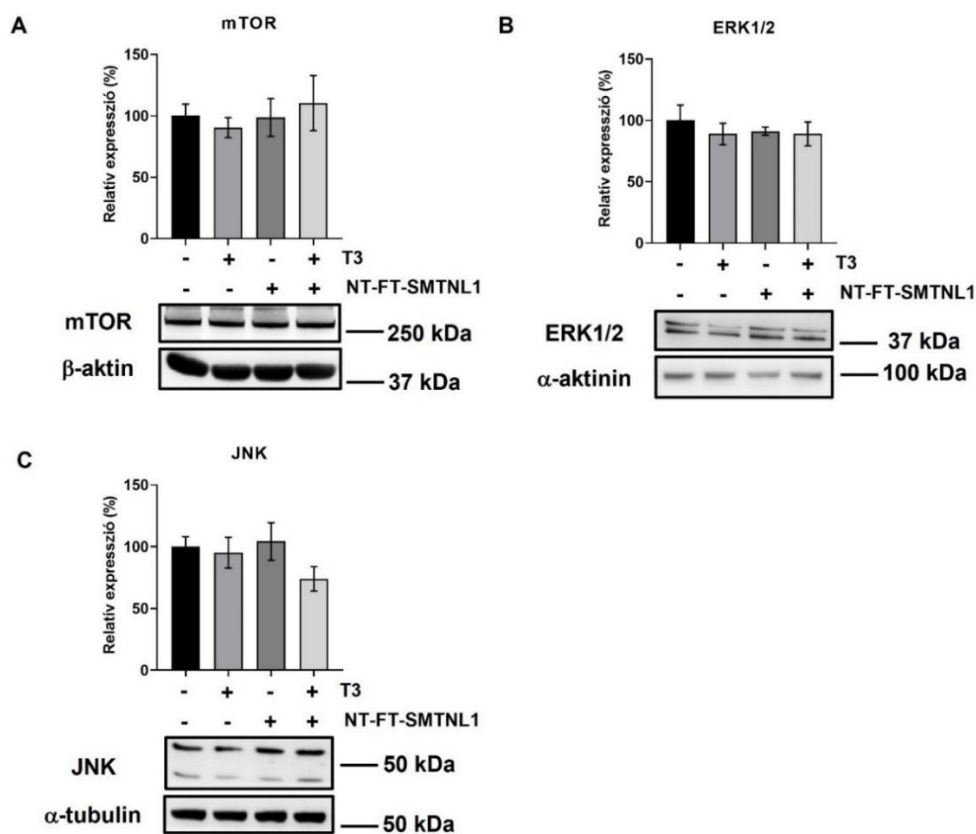
Ser oldalláncok foszforilációja 1,6 és 1,8 szorosára nőtt a T3 kezelésnek köszönhetően a nem kezelt kontrollhoz viszonyítva (15B és C ábra). Az IRS1 Ser307-es foszforilációja a SMTNL1 overexpresszióját követően 48, a kombinált kezelést követően pedig 73%-ra esett vissza a nem kezelt kontrollal összevetve (15B ábra). A kombinált kezelést követően az IRS1 Ser612 foszforilációjában 83%-os visszaesés tapasztalható a T3 kezeléshez képest (15C ábra). Az inzulin jelátvitel egy másik fontos eleme az IRS1 fehérje foszfortirozin oldalláncához kötődő PI3K, melynek 85 kDa katalitikus alegységének expressziója szignifikánsan kisebb volt a T3-mal kezelt mintákban a kontrollhoz viszonyítva, míg a többi kezelés ezt nem befolyásolta (15D ábra). Eredményeink bizonyítékul szolgálhatnak arra vonatkozóan, hogy a T3 túlkínálat zavart okoz az inzulin jelátvitelben az IRS1 gátló Ser foszforilációjának emelése révén, melyet a SMTNL1 fehérje azonban képes mérsékelni.

4.1.9. Az IRS1 kinázok SMTNL1 általi szabályozása T3 kezelés hatására a miotubulusokban

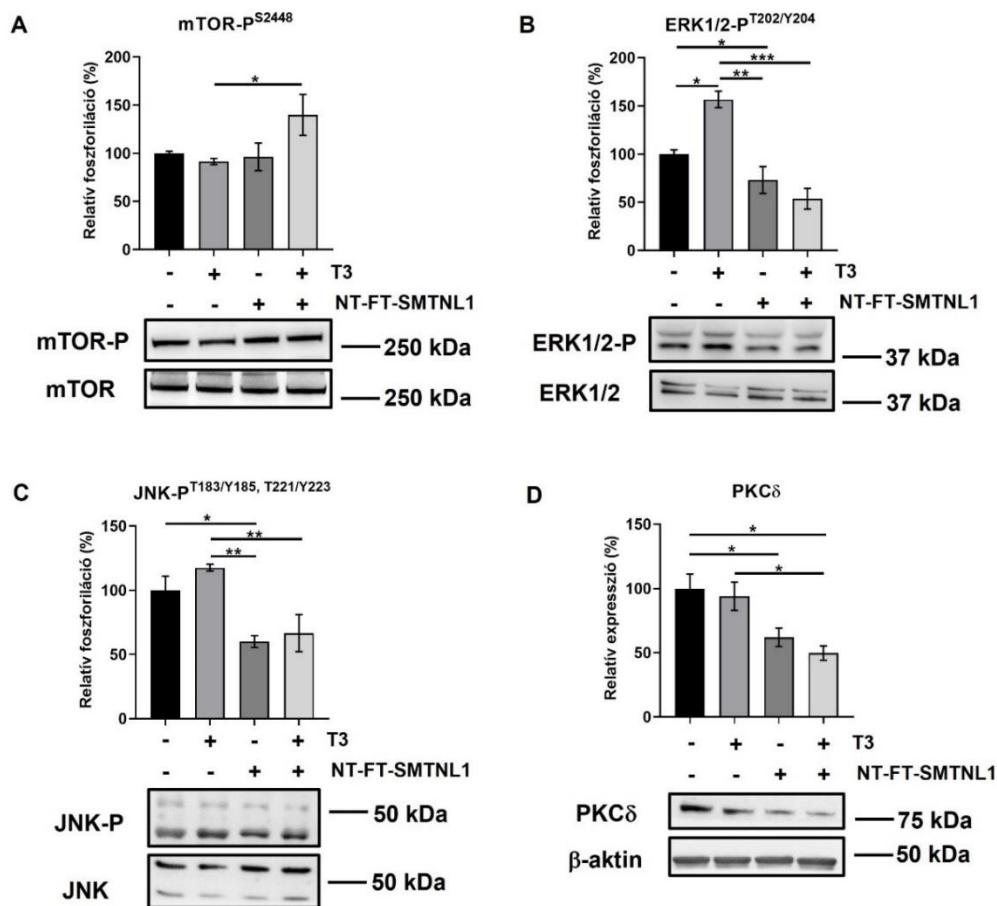
A továbbiakban az IRS1 Ser foszforiláció emelkedéséért potenciálisan felelős protein kináz enzimek aktivitását vizsgáltuk meg. Az mTOR, az ERK1/2, a JNK és a PKC δ enzimekben közös, hogy fiziológias körülmények között is aktiválódnak az inzulin jelátvitel során, hogy aztán negatív visszacsatolási mechanizmussal az IRS1-et meghatározott Ser oldalláncokon foszforilálva leállítsák annak működését [D'Alessandris és mtsai, 2007; Waraich és mtsai, 2008; Glynn és mtsai, 2008]. A humán mintákon nyert Proteome Profiler eredmények részletezésénél láttuk, hogy a hipertireózis ezen Ser/Thr kinázok közül többre is hatással van azok poszttranszlációs módosításán keresztül (10. ábra), ezért a következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy ezen Ser/Thr kinázok aktivitása miként módosul a T3 kezelés és a SMTNL1 fehérje hatására. Ennek érdekében a SMTNL1-t overexpresszáló miotubulusokat 72 órán át szuprafiziológias T3 koncentráció mellett tenyésztettük. Az mTOR, ERK1/2 és JNK enzimek defoszforilált formájának expressziója egyik kezelés hatására sem változott jelentősen (16A-C ábra).

A T3 kezelés és a SMTNL1 overexpressziójának hatására az mTOR Ser2448 foszforilációjában nem történt változás, a kombinált kezelésnek köszönhetően azonban jelentősen megemelkedett a T3-mal kezelt sejtekhez képest (17A ábra). Az ERK1/2 foszforilációja a T3 kezelést követően 57%-kal emelkedett, míg a SMTNL1 overexpressziója 27%-os csökkenést okozott a kontroll értékéhez mérten (17B ábra). A JNK foszforilációja T3 kezelésre 18%-kal nőtt. Ezzel szemben a SMTNL1 overexpressziója már önmagában is 40%-os visszaesést eredményezett, továbbá képes volt a T3 által indukált emelkedést meggátolni

(17C ábra). A PKC δ izoforma expressziója T3 hatására változatlan maradt, azonban 38 és 50%-kal csökkent a SMTNL1 overexpressziójának következtében a T3 hiányától vagy jelenlététől függően (17D ábra). Mivel az IRS1 a jelen bekezdésben tárgyalt kinázok célpontja, a kapott adatok magyarázatot jelenthetnek a szuprafiziológiás T3 koncentráció által előidézett gátló IRS1 Ser foszforiláció fokozódására, illetve alátámasztják a SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatását, ami képes az említett kinázok expressziójának vagy foszforilációjának, ezen keresztül pedig azok aktivitásának csökkentésére.



16. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológiás T3 kezelés hatása az IRS1 kinázok expressziójára. A mioblasztokat üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektáltuk, majd miotubulusokká differenciáltattuk. A miotubulusokat ezt követően 10 nM T3-mal, 72 óráig kezeltük, majd western blot analízist alkalmazva megvizsgáltuk az mTOR (A), ERK1/2 (B) és a JNK (C) fehérjék expresszióját az említett fehérjékre specifikus antitestekkel. A fehérjesávok kvantifikálása és a belső kontrollra való normalizálás után az eredményeket az 1 nM T3-at kapott MOCK kontrolllok átlagához viszonyítva adtuk meg. Az oszlopdiagramon n=5-6 kísérletből származó eredmények átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A statisztikai analízis során egyutas ANOVA és Tukey post hoc teszt kombinációjával hasonlítottuk össze a különböző csoportokat.



17. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológias T3 kezelés hatása az IRS1 kinázok expressziójára és foszforilációjára. A mioblasztokat üres plazmiddal vagy rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló plazmiddal transzfektáltuk és miotubulusokká differenciáltatásukat követően 72 óráig 10 nM T3-mal kezeltük. A miotubulusok feltárása után a mintákat western blot analízissel, az mTOR-P^{S2448} (A), ERK1/2-P^{T202/Y204} (B), JNK-P^{T183/T185, T221/Y223} (C) és a PKCδ (D) elleni specifikus antitestekkel vizsgáltuk. A fehérjesávok denzitometriás kiértékelése és az adatok belső kontrollra (D) vagy nem foszforilált fehérjére (A-C) való normalizálása után az eredményeket az 1 nM T3-mal kezelt MOCK kontrollok átlagához viszonyítva tüntettük fel. Az n=4-6 kísérletből származó eredményeket átlag ± SEM formában ábrázoltuk. A négy csoportot egyutas ANOVA-val vetettük össze egymással, Tukey post hoc tesztet alkalmazva, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) volt.

4.1.10. A SMTNL1 overexpressziója T3 jelenlétében növeli a GLUT4 és csökkenti a HK II expresszióját a miotubulusokban

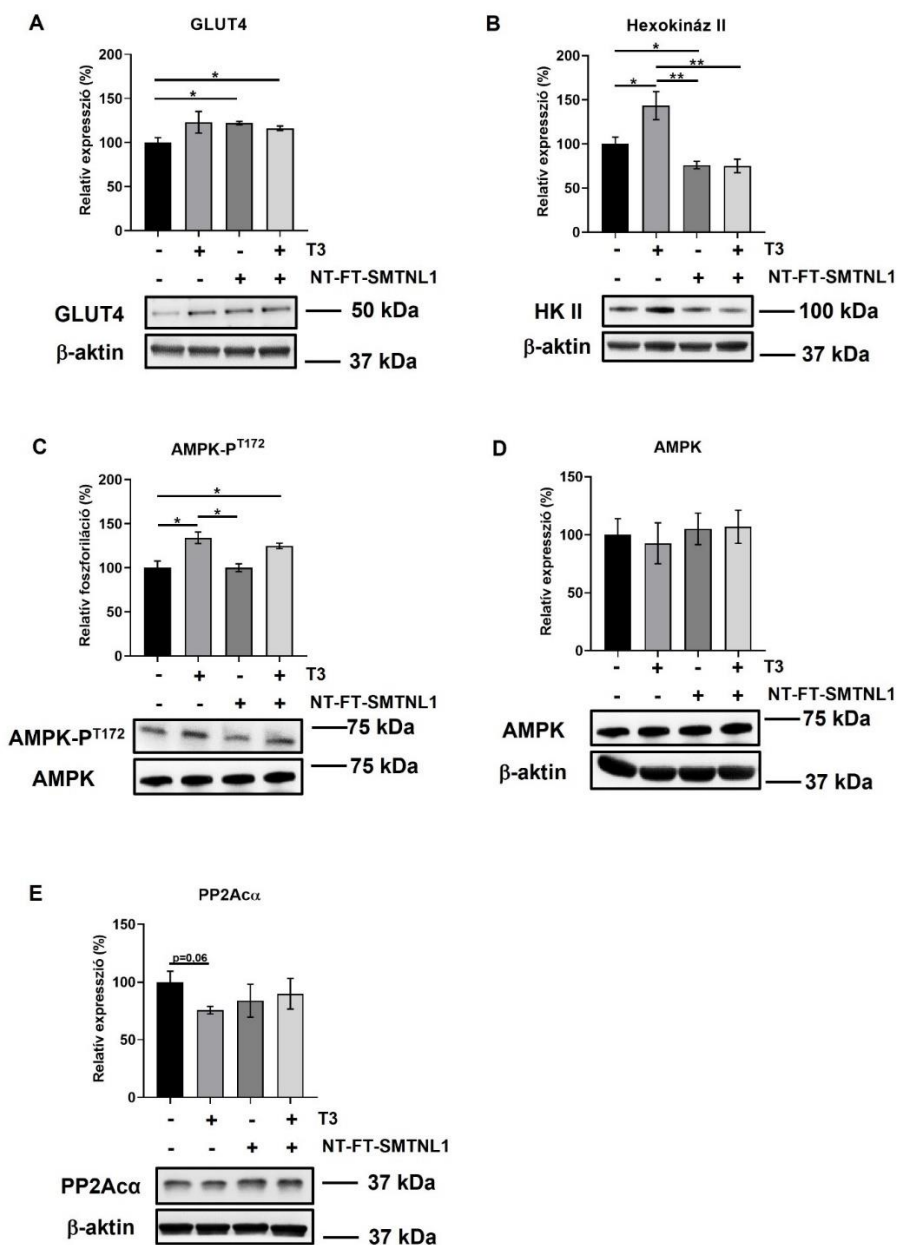
Az intracelluláris glükóz metabolizmus két másik fontos pillére a vázizom inzulin mediált glükózfelvételét ellátó GLUT4, illetve a transzporter segítségével az intracelluláris térbe került glükóz foszforilációját végző HK II enzim. A hipertireózis egy felfokozott anyagcserével és

ezzel összefüggésben megnövekedett glükózfelhasználással járó állapot, melyben a GLUT4 emelkedett expressziójáról és a glikolízis fokozódásáról számoltak be [Mitrou és mtsai, 2010]. Nőtény KO egerek vizsgálata során fény derült arra, hogy a SMTNL1 kiütése is a glikolízis gerjesztésével jár, ám a GLUT4 expressziója paradox módon nem nő, hanem csökken a KO állatok vázizmában [Lontay és mtsai, 2015]. Ezen megfigyeléseket szem előtt tartva a SMTNL1 és a T3 kezelés glükóz metabolizmusban szerepet játszó fehérjékre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. A GLUT4 expressziója a T3 kezelést követően tendenciájában nőtt, a SMTNL1 overexpresszió és a kettő kombinációja esetén pedig szignifikánsan megemelkedett (18A ábra). A glikolízis sebességhatározó lépését katalizáló HK II enzim expressziója 43%-kal nőtt a T3 kezelésnek köszönhetően, viszont a SMTNL1 overexpressziója és a kombinált kezelés kb. 25%-kal csökkentette azt a kontrollhoz képest (18B ábra).

A vázizom glükózmétabolizmusának rövid- és hosszútávú szabályozásában az AMPK- nak is kardinális szerepe van [Winder és mtsai, 2003]. A Proteome Profiler eredmények részletezésénél láttuk, hogy az AMPK $\alpha 2$ alegység aktivitását a hipertireózis nagymértékben befolyásolja, így megvizsgáltuk az enzim expresszióját és foszforilációját a C2C12 modellrendszerben is, ahol a SMTNL1 hatását is tanulmányoztuk. Azt tapasztaltuk, hogy az AMPK Thr172-es oldallánc foszforilációja kb. 30%-kal emelkedett mind a szuprafiziológiás T3 kezelésnek, mind a kombinált kezelésnek köszönhetően, miközben a nem foszforilált fehérje expressziója minden kísérleti elrendezésben változatlan maradt (18C és D ábra). Ezen felül egy upstream regulátor, az AMPK defoszforilációját végző protein foszfatáz 2A katalitikus α alegységének (PP2A α) expresszióját is megvizsgáltuk, mivel a humán vázizom minták microarray analízise feltárta, hogy a PP2A α -t kódoló gén expressziója szignifikánsan csökken a hipertireózis során (9B ábra). A PP2A α fehérjeszintű expressziója T3 kezelés hatására marginálisan szignifikáns csökkenést mutatott, míg a SMTNL1 overexpressziójának önmagában nem volt hatása a fehérje expressziójára, azonban a kombinált kezelést követően képes volt a T3 indukált csökkenést megakadályozni (18E ábra). Mindezek alapján elmondható, hogy a T3 túlkínálat a glükózmétabolizmusban központi szerepet játszó fehérjék expressziójának vagy aktivitásának növelésével serkenti a glikolízist, melynek a SMTNL1 szab határt.

4.1.11. A SMTNL1 overexpressziója antagonizálja a T3 savasodási rátára kifejtett hatását a mioblasztokban

A hipertireózis által indukált megnövekedett ATP fogyasztással a vázizom az ATP termelő apparátus kapacitásának mennyiségi és minőségi változtatásaival próbál lépést tartani. A gyor-

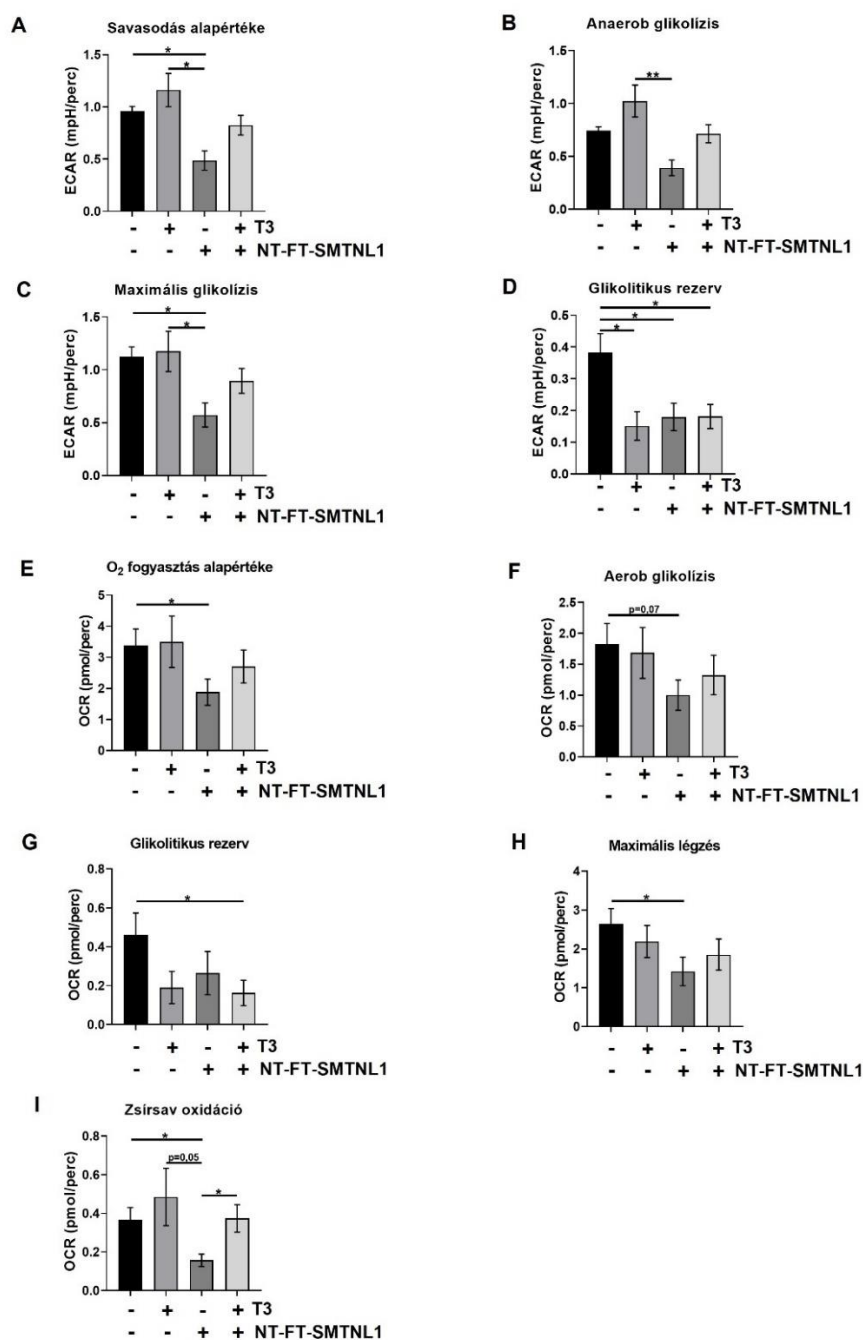


18. ábra: A *SMTNL1* overexpresszió és a szuprafiziológiás T3 kezelés hatása a glükóz metabolizmusban szerepet játszó fehérjék expressziójára és foszforilációjára. A mioblasztokat üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns *SMTNL1* fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-*SMTNL1*) transzfektáltuk, ezt követően pedig miotubulusokká differenciáltattuk. A miotubulusokat 10 nM T3-mal 72 óráig kezeltük, majd a mintákat western blot analízisnek vetettük alá, melynek során a GLUT4 (A), HK II (B), AMPK-P^{T172} (C), AMPK (D) és a PP2A α (E) expresszióját, illetve foszforilációját vizsgáltuk. A fehérjesávok denzitometriás kiértékelését és az adatok belső kontrollra (A, B, D, E) vagy nem foszforilált fehérjére (C) való normalizálását követően az eredményeket az 1 nM T3-at kapott MOCK kontrollok átlagához viszonyítva adtuk meg. Az n=3-4 kísérletből származó eredmények átlag \pm SEM értékét oszlopdiaqramon ábrázoltuk. A csoportokat egyutas ANOVA-val hasonlítottuk össze, melyet Tukey post hoc teszt követett, melyben $p < 0,05$ (*) és $p < 0,001$ (**) volt.

sabb ATP-termelés iránti igényt részben a glikolitikus kapacitás emelkedése elégíti ki. Nem meglepő tehát, hogy a glikolízis mellett a laktáttermelés, a glükóz oxidáció és a glikogenolízis is felerősödnek a hipertireózisos vázizomban [Mitrou és mtsai, 2010]. Érdekes módon ez meglehetősen hasonlít a SMTNL1 kiütésének hatásához, ami a trikarbonsav ciklus (=glükóz oxidáció), a glikolízis, a glikogenolízis és a zsírsav lebontás fokozódásával jár [Lontay és mtsai, 2015]. Ezen hasonlóságok a hipertireózis és a SMTNL1 kiütése között arra sarkalltak, hogy megvizsgáljuk a SMTNL1 túltermeltetés és a T3 kezelés hogyan befolyásolja a sejtek metabolikus fenotípusát. A laktáttermelés és a mitokondriális oxidatív foszforiláció vizsgálatát az ECAR, illetve az OCR mérésén keresztül, Seahorse analízissel végeztük el, melyből a glikolízis anaerob vagy aerob voltára következtethetünk.

A savasodás alapértéke a kontrollhoz képest tendenciájában nőtt a T3 kezelés hatására, míg a SMTNL1 túltermeltetése szignifikánsan csökkentette (19A ábra). A laktáttermelés indikátora, az anaerob glikolízis a T3 túlkínálat következtében 28%-kal nőtt, azonban a SMTNL1 overexpressziója felére csökkentette azt a kontrollhoz képest. Mi több, a SMTNL1 overexpressziója képes volt megakadályozni az anaerob glikolízis T3 hatására bekövetkező emelkedését (19B ábra). A maximális glikolízis mértéke T3 hatására változatlan maradt, viszont a SMTNL1 overexpressziója önmagában szignifikánsan csökkentette (19C ábra). A glikolitikus rezerv minden esetben lényegesen csökkent a kontrollhoz viszonyítva (19D ábra). Az oxigénfogyasztás alapértékét a T3 kezelés nem befolyásolta, azonban a SMTNL1 overexpressziója szignifikánsan csökkentette (19E ábra). Az aerob glikolízis mértéke a T3 kezelés hatására nem változott, azonban a SMTNL1 46%-kal csökkentette azt (19F ábra). A glikolitikus rezerv minden kísérleti elrendezésben számottevően csökkent, azonban csak a kombinált kezelés hatása bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (19G ábra). A maximális légzés mértéke is szignifikánsan visszaesett a SMTNL1 túltermeltetésének hatására (19H ábra).

A zsírsavak lebontása során is keletkezhet acetyl-CoA vagy más intermedier molekulák, melyek az ATP szintézisben hasznosulnak. Eredményeink szerint a magas koncentrációban jelenlévő T3 fokozza a zsírsav oxidáció-függő OCR-t, míg a SMTNL1 fehérje jelenléte következtében 58%-kal csökken (19I ábra). A kapott adatok fényében elmondható, hogy a feleslegben lévő T3 lényegesen növeli az ECAR-t, miközben a SMTNL1 overexpressziója a glikolitikus anyagcsere mérséklése által antagonizálja a T3 hatását.



19. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológias T3 kezelés hatása az ECAR és az OCR mértékére. Az üres plazmida (MOCK) vagy a rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló (NT-FT-SMTNL1) plazmida transzfektált, T3-mal kezelt mioblasztokat etomoxir (50 μ M), oligomycin (2 μ M), FCCP (4 μ M) és antimycin (10 μ M) + 2-DG (100 nM) inhibitorokkal kezeltük. A protonkoncentráció emelkedését (A-D) és az oxigénkoncentráció csökkenését (E-I) Seahorse analízissel mértük. Minden csoportban 23 technikai párhuzamossal dolgoztunk. Az $n=2$ kísérletből származó eredmények átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk, az adatokat minden esetben a fehérjemennyiségre normalizáltuk. A csoportokat együttes ANOVA és Tukey post hoc teszt kombinációjával hasonlítottuk össze, ahol $p < 0,05$ (*) és $p < 0,01$ (*) volt.

4.2. A SMTNL1 fehérje szerepének vizsgálata a C2C12 sejtek homeosztázisának és T3-függő miogenezisének szabályozásában

4.2.1. A SMTNL1 overexpressziója gátolja a mioblasztok migrációját

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a MYPT1 csendesítése, illetve foszforiláció általi gátlása a migráció blokkolását eredményezi több különböző sejttypusban egyaránt [Lontay és mtsai, 2005; Xia és mtsai, 2004; Horváth és mtsai, 2018]. Figyelembe véve a SMTNL1 deléciójának markáns hatását a MYPT1 expressziójára és aktivitására a vázizomban utánajártunk, hogy a SMTNL1 túltermeltetése és a szuprafiziológiás T3 kezelés hogyan befolyásolja a C2C12 mioblasztok migrációját, hiszen ez a tulajdonság a vázizom miogenezis szempontjából kiemelt jelentőséggel bír [Louis és mtsai, 2008; Lehka és mtsai, 2020]. Ennek érdekében a rekombináns SMTNL1 fehérjével transzfektált mioblasztokat lipofil természetű fluoreszcens festékekkel jelöltük, egységesen megkarcoltuk és szuprafiziológiás T3 koncentráció mellett tenyésztettük tovább az élő sejtek migrációjának valós idejű követésével. Megállapítottuk, hogy a SMTNL1 overexpressziója önmagában és a T3 kezeléssel együtt is jelentősen lelassította a karcolatok záródását, míg a T3 kezelésnek önmagában kismértékű hatása volt csupán (20A ábra). Ezt alátámasztandó, a migráció kinetikájának monitorozása során lényegesen alacsonyabb migrációs rátát detektáltunk a SMTNL1-et overexpresszáló sejtekben a kontroll sejtekhez és a T3-mal kezelt sejtekhez képest is, mely a T3 és SMTNL1 együttes alkalmazása esetén még kifejezettebb volt (20B ábra). A 20C ábra oszlopdiagramjáról leolvasható, hogy a sejtek migrációs képessége tendenciájában enyhén csökkent a T3 hatására, miközben a SMTNL1 overexpressziója 27 és 34%-os csökkenést okozott a kontrollhoz képest a T3 hiányától vagy jelenlététől függően. Úgy tűnik tehát, hogy a SMTNL1 túltermeltetése negatívan befolyásolja a mioblasztok migrációját, melyet feltételezhetően a MP enzim akár több ponton való gátlásával ér el, hiszen a SMTNL1 fehérjéről ismert, hogy egyrészt a citoszolban közvetlenül kötődik a MP holoenzimhez gátolva annak működését, valamint a MYPT1 regulátor alegység transzkripciójára is negatív hatást fejt ki [Lontay és mtsai, 2010].

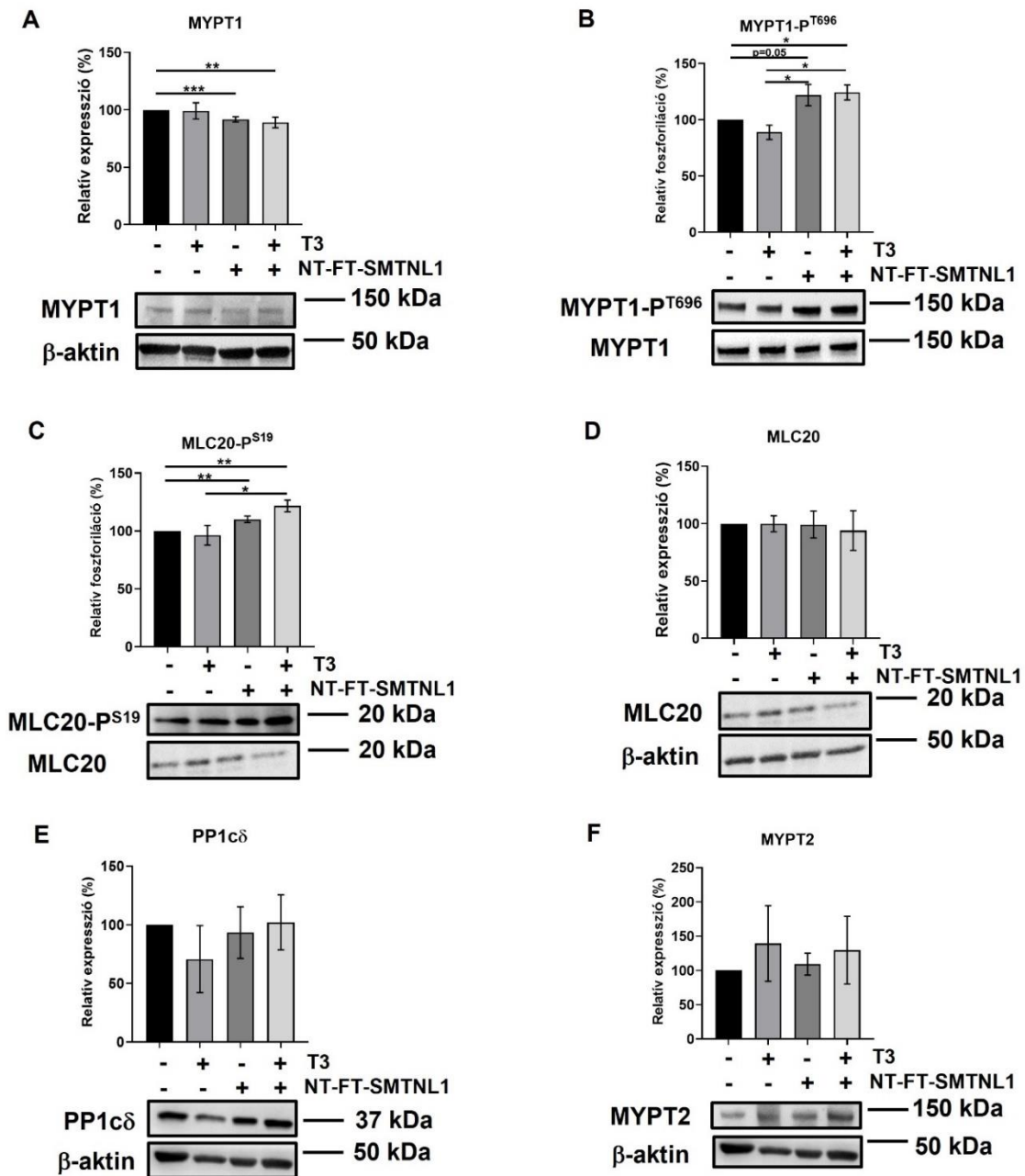
4.2.2. A SMTNL1 overexpressziója serkenti a MYPT1 és az MLC20 foszforilációját a mioblasztokban

A MP enzim SMTNL1 általi gátlásának igazolására a SMTNL1-et overexpresszáló mioblasztok által alkotott monolayeren ismét egységes karcolatot ejtettünk. A sejtek T3 kezelését és feltárását követően a mintákat western blot módszerrel elemeztük, melynek során

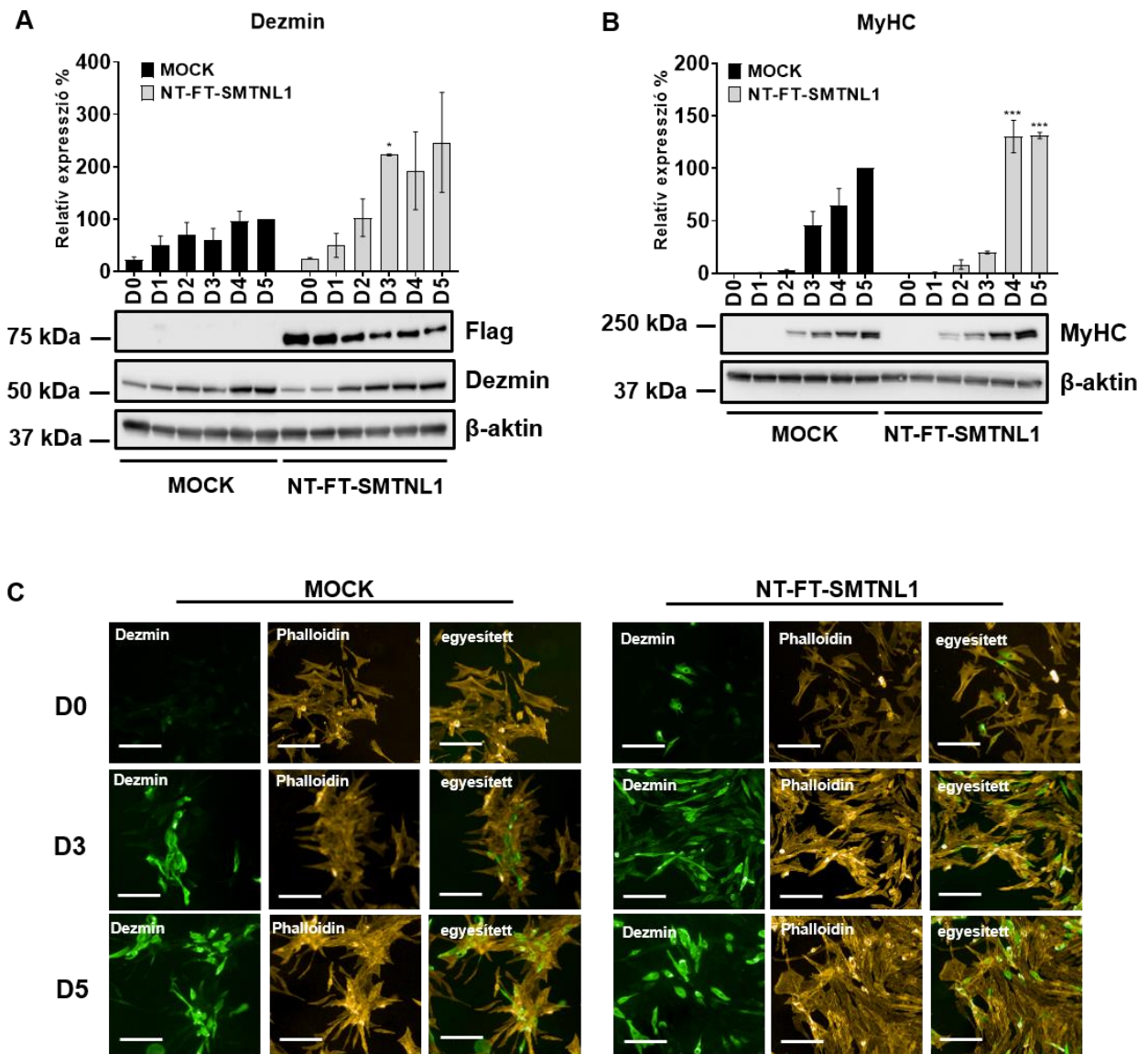
nem csak a MP-t felépítő alegységek, de a holoenzim szubsztrátjának, az MLC20-nak az expresszióját és foszforilációját is megvizsgáltuk. Az MLC20 egy régóta ismert és jól karakterizált szubsztrátja a MP-nak, melynek foszforilációs állapota hűen tükrözi az enzim aktivitását. A C2C12 mioblasztokon nyert eredményeink szerint a T3 kezelés a MYPT1 expressziójára nem volt hatással, viszont a fehérje 696-os pozíciójában lévő gátló Thr oldallánc foszforilációjának enyhe, statisztikailag nem szignifikáns csökkenését idézte elő (21A és B ábra). Ezzel szemben a SMTNL1 overexpressziója önmagában és a T3 kezeléssel kombinálva is szignifikánsan csökkentette a MYPT1 expresszióját, és 22, valamint 24%-kal növelte a Thr696-os oldallánc foszforilációját (21A és B ábra). Figyelemreméltó módon a MYPT1 gátló foszforilációjának növekedését mindkét esetben az MLC20 Ser19-es oldallánc foszforilációjának szignifikáns emelkedése kísérte (21C ábra). Az MLC20 és PP1c δ szintek egyik kezelés hatására sem változtak jelentősen (21D és E ábra). Bár a mioblasztokban a MYPT különböző izoformái közül a MYPT1 van jelen a legjelentősebb mértékben [Wu és mtsai, 2003], a kifejlett miotubulusokra jellemző MYPT2 izoforma expresszióját is megvizsgáltuk a jelen kísérleti elrendezésben, tekintve, hogy a T3 a MYPT1-et nem befolyásolta. Azt tapasztaltuk, hogy a T3 kezelés önmagában és a SMTNL1-gyel kombinálva statisztikailag nem szignifikánsan, de látványosan megemelte a MYPT2 expresszióját, míg a SMTNL1 overexpressziójának önmagában nem volt hatása (21F ábra). 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.

4.2.3. A SMTNL1 overexpressziója elősegíti a C2C12 sejtek differenciációját

A vázizom miogenezisének következő lépcsőfokát jelentő differenciáció egy szigorúan szabályozott folyamat, mely nélkülözhetetlen az izom megfelelő fejlődéséhez. Az előzőekben láttuk, hogy a SMTNL1 túltermeltetése milyen drasztikus változásokat okoz a mioblasztok migrációjában, ezért megvizsgáltuk a fehérje lehetséges szabályozó szerepét a mioblasztok differenciációjában is. A SMTNL1 tranziens transzfekcióját követően a C2C12 mioblasztokat differenciáltattuk, majd western blot analízissel és immunfluoreszcens festéssel detektáltuk a differenciációs markerek expressziójában bekövetkező változásokat. Meglepő módon a differenciáció 3. napján a dezmin expressziója szignifikánsan nőtt a SMTNL1 overexpresszió hatására az üres plazmiddal transzfektált kontrollhoz képest, a 4. és 5. napon azonban már nem volt jelentős eltérés a csoportok között (22A ábra). Az MyHC esetén azt tapasztaltuk, hogy relatív expressziója a 4. és 5. napon szignifikánsan magasabb volt a SMTNL1-t overexpresszáló miotubulusokban (22B ábra). A dezmin SMTNL1 overexpresszió által indukált expressziós nö-



21. ábra: A SMTNL1 overexpresszió miozin foszfatáz enzimre és szubsztrátjára kifejtett hatása. Az üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektált mioblasztokat 10 nM T3 jelenlétében, 24 órán át inkubáltuk és western blot analízissel vizsgáltuk, a MYPT1 (A), MYPT1-P^{T696} (B), MLC20-P^{S19} (C), MLC20 (D), PP1cδ (E) és MYPT2 (F) elleni antitestekkel. A fehérjesávok denzitometriás kiértékelését és az adatok belső kontrollra (A, D, E) vagy nem foszforilált fehérjére (B, C) való normalizálását követően az eredményeket az 1 nM T3-at kapott MOCK kontrollhoz viszonyítva adtuk meg. Az n=3 kísérletből származó adatok átlag ± SEM értékét oszlopdiagramon ábrázoltuk. A csoportok közötti különbségek megállapítására egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc teszt kombinációját alkalmaztuk, ahol p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) és p < 0,001 (***) volt.



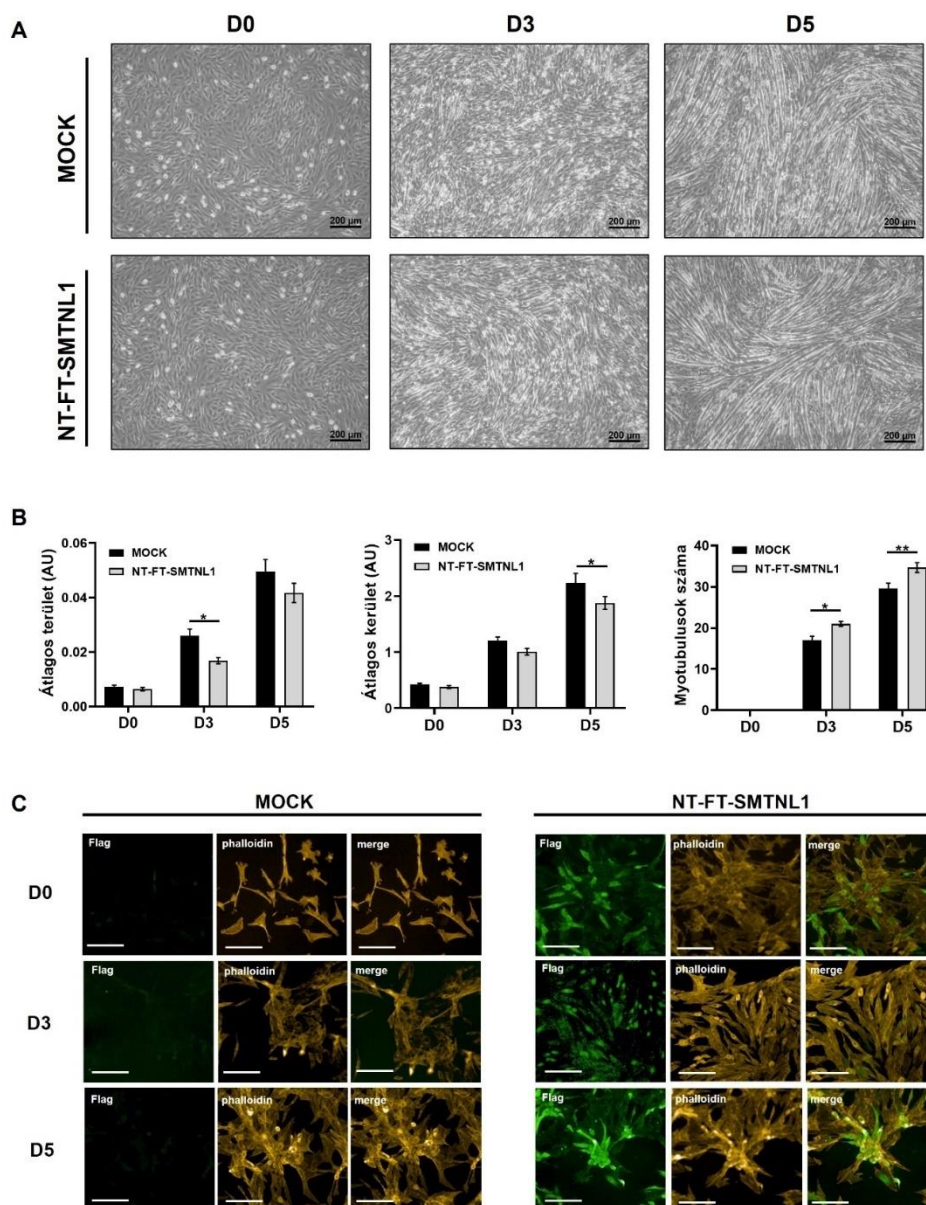
22. ábra: A *SMTNL1* overexpresszió a dezmin és MyHC fehérjék expressziójára gyakorolt hatása a differenciáció során. Az üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns fehérjét kifejező plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektált differenciáltatott sejtek lizátumát western blot analízissel vizsgáltuk, a dezmin (A) és az MyHC (B) fehérjék elleni antitestekkel. A transzfekció hatékonyságát és a rekombináns fehérje kifejeződését a Flag jelölő elleni antitesttel ellenőriztük. A fehérjesávok denzitometriás kiértékelését és az adatok belső kontrollra való normalizálását követően az eredményeket a MOCK D5 mintákhoz viszonyítva adtuk meg. Az oszlopdiagramon az $n=3$ kísérletből származó eredmények átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A csoportok összehasonlítására Tukey-féle post hoc teszttel kombinált kétutas ANOVA-t használtunk, melyben $p < 0,05$ (*) és $p < 0,001$ (***) volt. A (C) panelen a differenciáció 0., 3. és 5. napján immunfluoreszcenciásan jelölt üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns *SMTNL1* fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektált sejtekről készült felvételek láthatók. Az immunfestéshez dezmin elleni specifikus antitestet (zöld) és az aktin citoszkeletont jelölő Texas-Red Phalloidint (vörös) használtuk. A beosztás hossza: 500 μ m.

vekedésének további bizonyítására immunfluoreszcens festést alkalmaztunk a SMTNL1-gyel és az üres plazmiddal transzfektált sejteken. Ahogy azt a 22C ábra mutatja, a SMTNL1-et overexpresszáló sejtekben már a differenciáció 3. napján is erősebb volt a fluoreszcens festődés a kontrollhoz viszonyítva, ami az 5. napra még kifejezettebbé vált.

A molekuláris szintű változásokon túlmenően a differenciáció során bekövetkező morfológiai változásokat is nyomon követtük. Ennek során azonos beállítások mellett a 0., 3. és 5. napokon fénymikroszkópos képeket készítettünk a differenciálódó sejtekről (23A ábra), melyek felhasználásával kiszámítottuk a kifejlett miotubulusok átlagos területét és kerületét, valamint a miotubulusok számát is meghatároztuk az egyes csoportokban. Megfigyeléseink szerint a differenciáció 3. napján a miotubulusok átlagos területe, a differenciáció 5. napján a miotubulusok átlagos kerülete szignifikánsan csökken a SMTNL1 overexpresszió hatására, miközben a miotubulusok száma mindkét napon jelentősen nagyobb a kontrollal összevetve (23B ábra). A 23C ábra igazolja, hogy a Flag jelölővel ellátott rekombináns fehérje végig kifejeződik a differenciáció során és a kifejlett miotubulusokban is megtalálható. Az eredményeket összegezve az látszik, hogy a SMTNL1 overexpressziója a differenciációs markerek felregulálásán keresztül gyorsítja a differenciációt, melynek során nagyobb számú, de rövidebb miotubulus alakul ki.

4.2.4. A MP enzim expressziója a C2C12 sejtek differenciációja során és T3 jelenlétében

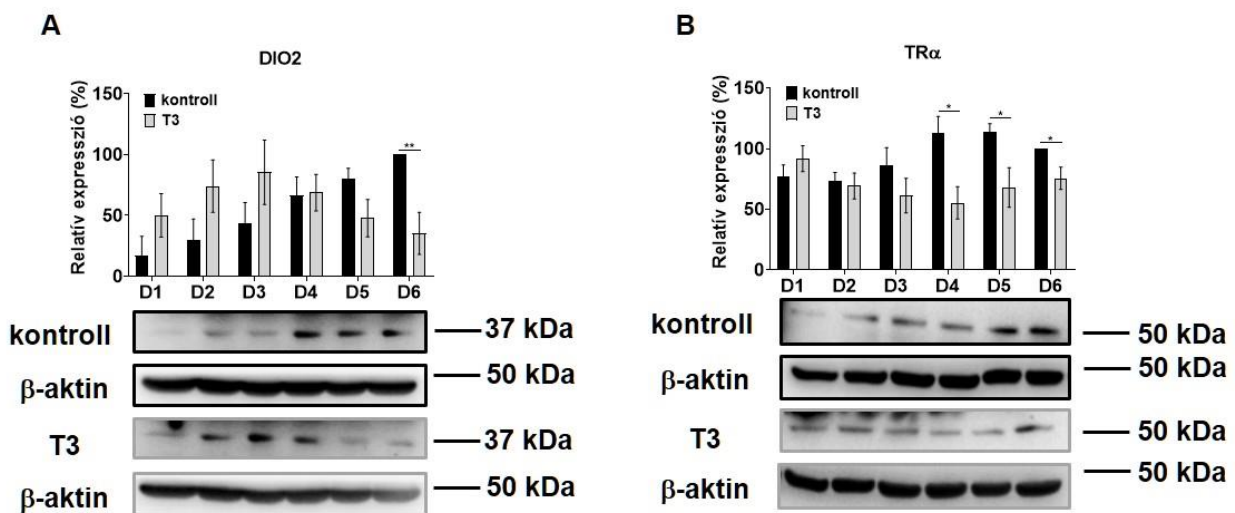
A mioblasztok migrációjának és differenciációjának vizsgálatánál a SMTNL1 fehérje mellett a T3 hatását is tanulmányoztuk, melynek során azt tapasztaltuk, hogy a T3 a mioblasztok migrációját nem befolyásolta (20. ábra), a mioblasztok miotubulusokká történő differenciációját azonban -a SMTNL1-hez hasonlóan- gyorsította (11A és B ábra). A T3 mellett a hormon hatásmechanizmusának kialakításában szerepet játszó fehérjék (DIO2, TR α) is központi szerepet játszanak a differenciáció folyamatában, hiszen ezen regulátor fehérjék és a T3 jelátvitel megfelelő működése nélkül a normál fejlődés elképzelhetetlen lenne [Bloise és mtsai, 2018]. Ezen felül Wu és mtsai leírták a miozin foszforiláció jelentőségét a C2C12 differenciáció során, melyről tudvalevő, hogy részben a MP enzim aktivitásától függ [Wu és mtsai, 2003]. Mindezen tudás birtokában megvizsgáltuk a szuprafiziológiás T3 hatását az említett regulátor fehérjék kifejeződésére a differenciáció során a 4.1.6. bekezdésben alkalmazott kísérleti elrendezésben. A DIO2 expressziója a 4. napig növekvő tendenciát mutatott, ezt követően viszont nem változott jelentősen a normál differenciáció során. A T3 ke-



23. ábra: A *SMTNL1* overexpresszió hatására bekövetkező morfológiai változások a miotubulusokban. Az üres plazmiddal (MOCK) vagy a rekombináns fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektált mioblasztok differenciációja során a 0., 3. és 5. napon fénymikroszkópos felvételeket készítettünk (A), melyek segítségével ImageJ szoftverrel meghatároztuk a miotubulusok átlagos területét, kerületét és számát (B). A beosztás hossza: 200 μm . Az $n=3$ kísérletből nyert eredmények átlag \pm SEM értékét oszlopdiagramon ábrázoltuk. A statisztikai analízis során kétutas ANOVA és Tukey post hoc teszt kombinációjával határoztuk meg a csoportok közötti különbségeket, melyben $p < 0,05$ (*) és $p < 0,01$ (**) volt. A (C) panelen az üres plazmiddal (MOCK) vagy a rekombináns *SMTNL1*-et expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektált, differenciálódó sejtek immunfluoreszcenciás festése látható a 0., 3. és 5. napon, melyhez a Flag jelölő elleni antitestet (zöld) és az aktin citoskeletonot festő Texas-Red Phalloidint használtuk. A beosztás hossza: 500 μm .

zelés a 3. napig fokozatosan növelte a DIO2 expresszióját, ami a 4. naptól kezdődően azonban látványos csökkenésnek indult, a 6. npra már 65%-kal kisebb volt a kontrollhoz képest (24A ábra). A TR α expressziója a 3. napról a 4. npra tendenciájában nőtt, viszont ettől kezdve nem változott jelentősen fiziológiás körülmények között. A szuprafiziológiás T3 kezelés hatására a TR α szintje a 4., 5. és 6. napon szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz viszonyítva (24B ábra).

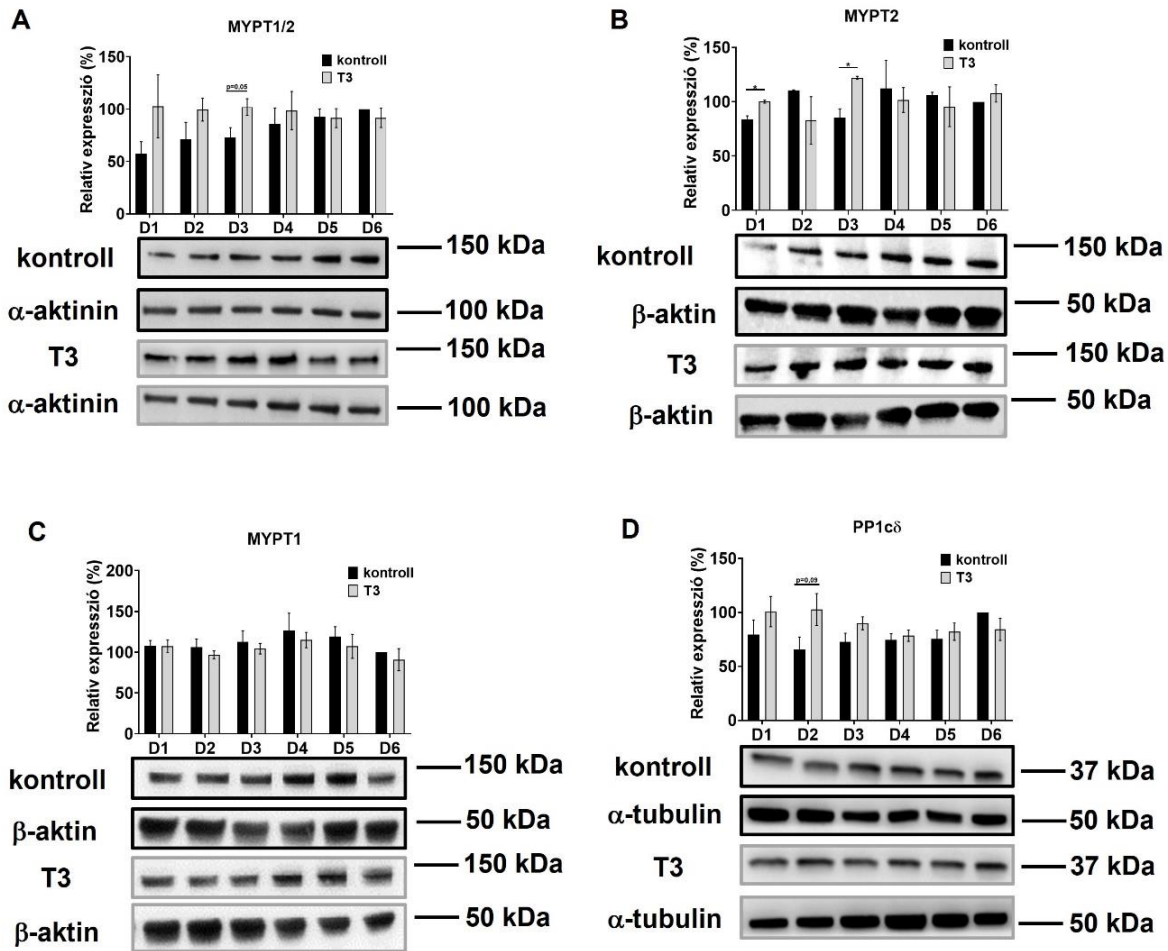
A MYPT1/2 és MYPT2 expressziója a normál differenciáció során fokozatosan emelkedett, ami a MYPT2 esetén T3 jelenlétében fokozottabb volt (25A és B ábra). A normál differenciáció első napjaiban tapasztalható MYPT1 növekedés ellenére a fehérje expressziója a 6. npra kismértékben csökkent a kontrollhoz képest, míg a T3 kezelés nem befolyásolta azt (25C ábra). A PP1c δ expressziója mérsékelten nőtt a normál differenciáció során, melynek tendenciájában a T3 kezelés hatására sem történt jelentős változás (25D ábra).



24. ábra: A DIO2 és TR α expressziójának alakulása a differenciáció során és szuprafiziológiás T3 jelenlétében. A mioblasztokat 1 nM (kontroll) vagy 10 nM T3 jelenlétében 6 napon át inkubáltuk, majd a lizátumokat western blot analízisnek vetettük alá, melyhez DIO2 (A) és TR α (B) elleni specifikus antitesteket használtunk. A fehérjesávok denzitometriás kvantifikációját és az adatok belső kontrollra való normalizálását követően az eredményeket a D6 kontroll értékéhez viszonyítva adtuk meg. Az eredmények n=4-5 kísérletből származnak, melyek átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A csoportok közötti különbségeket párosítatlan kétmintás t-próbával és kétutas ANOVA-val vizsgáltuk Tukey-féle post hoc teszttel kiegészítve, melyben a $p < 0,05$ (*) és $p < 0,01$ (**) volt.

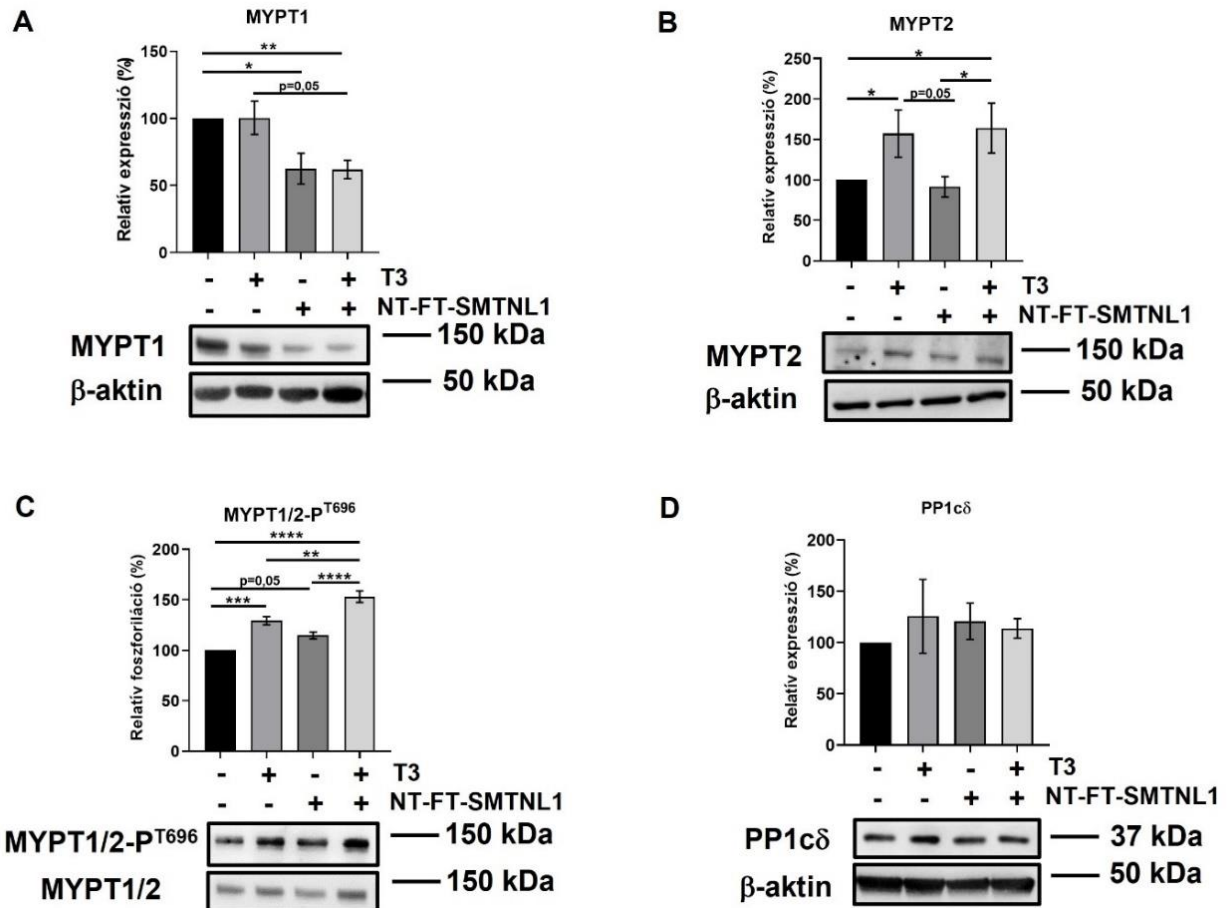
4.2.5. A MP regulátor alegységeinek eltérő szabályozása a T3 és a SMTNL1 hatására a miotubulusokban

Egy korábbi tanulmány szerint (melyet az előző bekezdésben ismertetett eredményeink is alátámasztanak, ld. 25. ábra) a mioblasztok miotubulusokká alakulása során izoformaváltás történik a MP enzim regulátor alegységeinek expressziójában: a differenciáció előrehaladtával a MYPT1 expressziója kis mértékben, de fokozatosan csökken, míg a MYPT2 expressziója kis



25. ábra: A MYPT izoformák és a PP1c δ expressziója a differenciáció során és szuprafiziológiás T3 koncentráció mellett. A mioblasztokat 1 nM (kontroll) vagy 10 nM T3-mal 6 napig kezeltük, és a differenciálódott sejtek lizátumát western blot analízissel vizsgáltuk, melyhez MYPT¹⁻²⁹⁶ (A) MYPT2 (B), MYPT¹⁻³⁸ (C), és PP1c δ (D) elleni antitesteket használtunk. A fehérjesávok denzitometriás kiértékelését és az adatok belső kontrollra való normalizálását követően az eredményeket a D6 kontrollhoz viszonyítva adtuk meg. A feltüntetett eredmények n=4 kísérletből származnak, melyekben a kapott adatok átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A csoportok közötti különbségeket kétmintás párosítatlan t-próbával és Tukey post hoc teszttel kombinált kétutas ANOVA-val vizsgáltuk, ahol $p < 0,05$ (*) volt.

mértékben, de fokozatosan nő [Wu és mtsai, 2003]. Továbbá, Lontay és mtsai arról számoltak be, hogy a fejlődő izomban a SMTNL1 kiütése a MYPT2 expressziós szintjét nem befolyásolja [Lontay és mtsai, 2010], ezért differenciáltatott C2C12 sejtekben is megvizsgáltuk ezen regulátor alegység izoformákat, különös tekintettel a SMTNL1 túltermeltetésének MYPT2-re

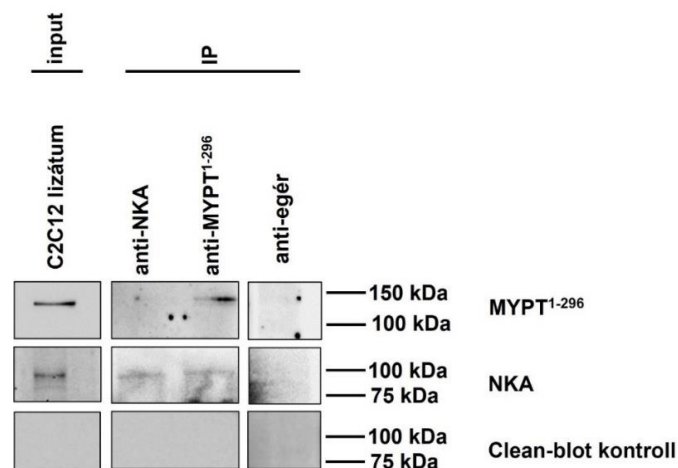


26. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológiás T3 kezelés MP enzim alegységeinek expressziójára és foszforilációjára gyakorolt hatása a miotubulusokban. A mioblasztokat üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektáltuk. A differenciálódott sejteket 10 nM T3-mal kezeltük, majd western blot analízissel vizsgáltuk. Ehhez a MYPT1 (A), MYPT2 (B), MYPT1/2-P^{T696} (C) és PP1cδ (D) fehérjéket felismerni képes antitesteket használtuk. A fehérjesávok denzitometriás kvantifikációját és az adatok belső kontrollra (A, B, D) vagy nem foszforilált fehérjére (C) való normalizálását követően az eredményeket az 1 nM T3-at kapott MOCK kontrollhoz viszonyítva adtuk meg. Az eredmények n=3 független kísérletről származnak, melyekben az adatok átlag ± SEM értékét tüntettük fel. A statisztikai analízis során a csoportokat Tukey-féle post hoc teszttel kombinált egyutas ANOVA-val elemeztük, ahol p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***) és p < 0,0001 (****) volt.

gyakorolt hatására. A mioblasztokon tapasztalt eredményekhez hasonlóan a MYPT1 expressziója T3 kezelés hatására nem változott, de a SMTNL1 overexpressziója 37%-os, míg a kombinált kezelés 38%-os visszaesést okozott a fehérje relatív expressziójában a miotubulusokban (26A ábra). Ezzel szemben a MYPT2 expressziója drámaian, 54 és 56%-kal emelkedett a T3 kezelés, valamint a kombinált kezelés hatására, miközben a SMTNL1 overexpressziója nem volt hatással rá (26B ábra). A MYPT1/2 Thr696-os oldalláncának foszforilációja 29%-kal emelkedett a T3 kezelést követően, míg a kombinált kezelés már 53%-os növekményt eredményezett. A SMTNL1 overexpressziója önmagában marginálisan szignifikáns emelkedést produkált (26C ábra). A PP1c δ expressziója statisztikailag nem szignifikáns mértékben, de nőtt a T3 kezelés és/vagy a SMTNL1 overexpressziójának következtében (26D ábra). 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.

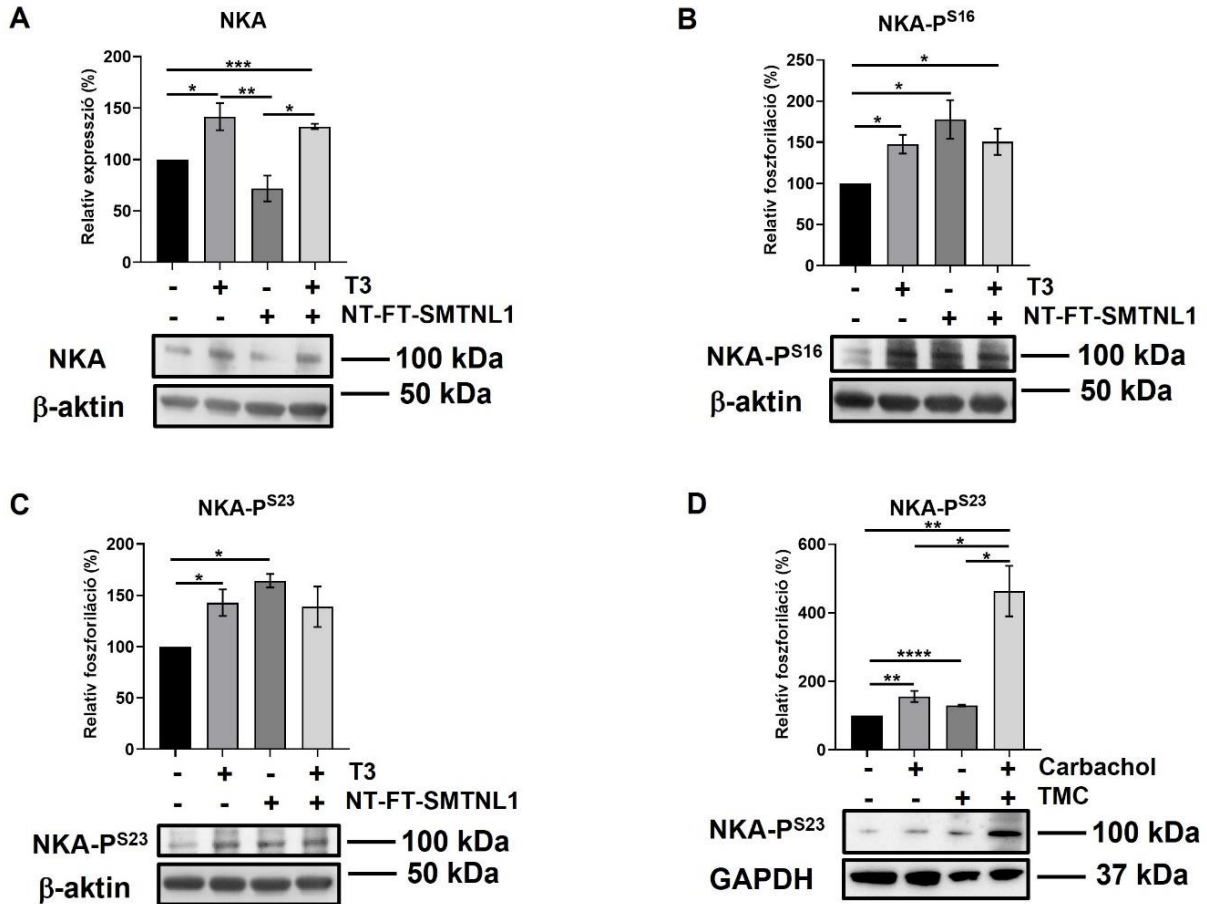
4.2.6. A T3 és a SMTNL1 hatása egy alternatív MP szubsztrát, a NKA expressziójára és aktivitására

Mivel az MLC20 jelentősége a vázizom mimikálására szolgáló miotubulusokban csökken, ezért utánajártunk, hogy milyen kölcsönható partnerei, szubsztrátjai léteznek még a MP emzim-



27. ábra: A NKA és a MYPT közötti interakció kimutatása C2C12 sejtekben. A NKA és a MYPT immunprecipitációját protein A sepharose-hoz kapcsolt NKA α 1 és MYPT¹⁻²⁹⁶ elleni specifikus antitesttel végeztük el a C2C12 mioblasztok lizátumából. Negatív kontrollként egér IgG elleni másodlagos antitestet használtunk. A precipitátumokat western blot analízissel elemeztük, az immunprecipitációhoz használt antitestek segítségével.

nek, melyek a vázizom és az általunk vizsgált betegség szempontjából relevánsak lehetnek. A kiindulási pontot a MYPT1 szabályozó alegység egér szinaptoszóma kivonatból tömegspektrometriával kombinált pull down esszével meghatározott interaktómja adta, amely-



28. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológiás T3 kezelés hatása a NKA expressziójára és foszforilációjára a miotubulusokban. A C2C12 mioblasztokat üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektáltuk, majd differenciáltattuk. A miotubulusokat 10 nM T3-mal kezeltük és western blot analízist végeztünk a NKA (A), NKA-P^{S16} (B) és NKA-P^{S23} (C) elleni specifikus antitestekkel. Egerek *m. plantaris* izmából készített preparátumot 10 μ M TMC-vel kezeltünk 30 percig, amit egy 10 perces 10 μ M-os carbacholos kezelés követett. A mintákat homogenizáltuk, majd western blot analízist végeztünk a NKA-P^{S23} elleni specifikus antitesttel (D). A fehérjesávok denzitometriás kiértékelését és az adatok belső kontrollra való normalizálását követően az eredményeket a nem kezelt kontrollhoz (D) vagy az 1 nM T3-at kapott MOCK kontrollhoz (A-C) viszonyítva adtuk meg. A kapott eredmények $n=3$ kísérletből származnak, melyek átlag \pm SEM értékét ábrázoltuk. A csoportok közötti különbségeket Tukey-féle post hoc teszttel kombinált egyutas ANOVA-val elemeztük, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) és $p < 0,0001$ (****) volt.

ben munkacsoportunk korábban azonosította a NKA-t, mint MYPT1 interakciós partnert [Lontay és mtsai, 2012]. A bevezetőben láttuk, hogy a NKA milyen fontos szerepet játszik a vázizom működésében és hogyan változik a hipertireózis során, ezért jelen modellrendszerünkben is megvizsgáltuk a NKA expresszióját és aktivitását, valamint MP-hoz fűződő viszonyát. Első lépésként a C2C12 sejtvonalban is igazoltuk a NKA és a MYPT közötti interakció meglétét: a NKA és a MYPT koprecipitálták egymást az immunprecipitáció során (27. ábra), ami arról árulkodik, hogy a NKA képes a MP-hoz kötődni, feltételezhetően annak regulátor alegységén keresztül.

Azt is megvizsgáltuk, hogy miként változik a NKA expressziója és aktivitása a T3 kezelés és/vagy a SMTNL1 overexpressziójának hatására a miotubulusokban. A T3 kezelés önmagában és a SMTNL1 túltermeltetésével kombinálva 41 és 32%-kal serkentette a NKA expresszióját, míg a SMTNL1 overexpressziója nem befolyásolta azt (28A ábra). A NKA Ser16-os és Ser23-as oldalláncainak foszforilációja minden kísérleti elrendezésben szignifikánsan emelkedett (28B és C ábra), ami a T3 kezelés esetén 45%-os, a SMTNL1 overexpressziója esetén pedig kb. 70%-os növekedést jelent. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy mind a T3 mind a SMTNL1 szabályozza a NKA aktivitását a fehérje foszforilációjának növelése által, melyet a különböző MYPT izoformák gátlásán keresztül érnek el, így a MP holoenzim nem képes a NKA-t defoszforilálni. Ennek a bizonyítására egérből izolált *m. plantaris* izmot PP1 szelektív inhibitorral (TMC) és pozitív kontrollként carbachollal kezelve a NKA foszforilációjában bekövetkező változásokat vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy mind a carbachol, mind a TMC hatására nőtt a NKA $\alpha 1$ alegységének Ser23-as foszforilációja (28D ábra).

5. Megbeszélés

5.1. A SMTNL1 fehérje szerepe a vázizom anyagcseréjének szabályozásában hipertireózis során

A vizsgálataink középpontjában álló transzkripciós kofaktor, a SMTNL1 fehérje figyelemreméltó abban a tekintetben, hogy képes szabályozni a vázizom különböző stresszhatásokra bekövetkező adaptálódását, ezért doktori munkám során a SMTNL1 fehérjének a vázizom anyagcseréjében betöltött szabályozó szerepét vizsgáltam hipertireózis során.

5.1.1. A hipertireózis hatására csökken a SMTNL1 expressziója humán vázizomban

A SMTNL1 KO egerek tanulmányozása során napvilágot látott, hogy a 2a típusú rostokban expresszálandó SMTNL1 deléciója a vázizom rostösszetételének átalakítását indukálja [Wooldridge és mtsai, 2008]. A vemhes SMTNL1 KO nőstény egerek *m. plantaris* izmának analízise feltárta, hogy a SMTNL1 deléciója a 2a/2b típusú rostok arányának eltolódását eredményezi, ami egy összességében glikolitikusabb fenotípus kialakulását vonja maga után [Lontay és mtsai, 2015]. A SMTNL1 fehérje kiütése mellett a pajzsmirigy megváltozott hormontermelése is képes a vázizom rostösszetételét jelentős mértékben átalakítani az MyHC expressziójának transzkripciós szintű szabályozása révén. Hipertireózis során a kiindulási rosttípustól függően az MyHC 1-ből 2a, a 2a-ból 2x, a 2x-ből pedig 2b lesz [Izumo és mtsai, 1986]. Pajzsmirigyműtéten átesett eutireózisos és hipertireózisos nöbetegektől származó *m. sternohyoideus* biopsziák western blot analízisének összehasonlítása során az MyHC IIa és MyHC I fehérjék expressziójának számottevő csökkenését figyeltük meg (8A és B ábra). 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. Bár az MyHC I fehérje expressziója is számottevően csökken, ez a változás statisztikailag nem szignifikáns, ami humán adatok hiányában a patkány *m. sternohyoideus* rostösszetételével magyarázható: fiziológiás körülmények között az 1-es típusú rostok aránya mindössze 9%, míg a 2a típusú rostoké 24,2%, a 2x típusú rostoké pedig 20,8%. A legmagasabb arányban a 2b típusú rostok vannak jelen (44,2%), azonban ez az izoforma a rágcsálókkal ellentétben a humán vázizmokban nem detektálható [Schiaffino és mtsai, 2011], így ezt nem vizsgáltuk. A nőstény KO egerek

esetén láttuk, hogy a SMTNL1 deléciójának a hipertireózisos állapothoz nagyon hasonló következményei vannak a vázizom (metabolikus) fenotípusára nézve [Lontay és mtsai, 2015], ezért megvizsgáltuk az endogén SMTNL1 fehérje expressziójának hipertireózis általi érintettségét. Érdekes módon a SMTNL1 expressziója drámaian csökkent a hipertireózis során (8C ábra), ami arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 szerepet játszik a hipertireózisos vázizom patofiziológiájában.

5.1.2. A hipertireózis kulcsfontosságú szignalizációs útvonalakat szabályoz a humán vázizomban

A hipertireózis hatására átalakuló izomban az MyHC fehérjék mellett más kontraktilis fehérjék (pl. MLC, SERCA), továbbá az energiaháztartásban, inzulin jelátvitelben és a glükóz homeosztázisban szerepet játszó enzimek expressziója és/vagy aktivitása is megváltozik [Pette és mtsai, 1997; Arai és mtsai, 1991]. Az eutireózisos és hipertireózisos biopsziák globális génexpressziós profiljának összehasonlítása és az adatok génontológiai analízise feltárta, hogy az mTOR, AMPK, PI3K/Akt és a 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 (9. ábra). Eredményeinket más kutatócsoportok által közölt tanulmányok is alátámasztják. Postler és mtsai felnőtt hím és nőstény patkányokat 25 µg/ 100 g testsúly dózisu intraperitoneális T3 injekcióval kezelték 6 héten át, majd az ezáltal hipertireózisban szenvedő állatok *m. externi bulbi oculi* és *m. tibialis anterior* izmain végeztek microarray analízist [Postler és mtsai, 2009]. Clément és mtsai vizsgálatának alanyai egészséges kaukázusi férfiak voltak, akik 14 napon keresztül 75 µg dózisu T3-t kaptak tablettá formában, majd az *m. vastus lateralis* biopsziákat microarray analízisnek vetették alá [Clément és mtsai, 2002]. Az említett tanulmányokban is azt tapasztalták, hogy hipertireózis hatására olyan gének expressziója változott szignifikánsan, melyek pl. a sejtszerkezet és szerveződésben, a lipid metabolizmusban és az energiatermelésben játszanak szerepet, azonban a jelen értekezésben foglalt tanulmány az első, melyben régóta fennálló hipertireózisban szenvedő betegeket vizsgáltunk.

A microarray analízis során azonosított jelátviteli útvonalak hipertireózis által indukált fehérjeszintű változásainak tanulmányozására számos kináz relatív foszforilációs szintjét is megvizsgáltuk a hipertireózisban szenvedő donorok vázizmában. A Proteome Profiler eredményekből kiderül, hogy a Ser/Thr kinázok csoportján belül egyebek mellett az mTOR^{S2448} és az Akt2^{S474} foszforilációja és ezáltal az aktivitása szignifikánsan csökken, míg az

ERK1/2^{T202/Y204,T185/Y187}, AMPK α 2^{T172} és a JNK_{pan}^{T183/Y185,T221/Y223} aktivitása szignifikánsan nő a hipertireózis során (10A ábra). A microarray és a Proteome Profiler array-k eredményeiből kitűnik, hogy a hipertireózisnak jelentős befolyása van a vázizom anyagcseréjére az ezen folyamatokban szerepet játszó fehérjék expressziójának vagy aktivitásának módosításán keresztül.

5.1.3. A T3 elősegíti a C2C12 sejtek differenciációját és gátolja az endogén SMTNL1 expresszióját

A kifejlett vázizom modellezésére használt C2C12 egér mioblaszt sejt vonal a humán vázizom biopsziákon kapott eredmények validálásán túl a SMTNL1 fehérje hipertireózis során betöltött szabályozó szerepének felderítésére szolgált. A mioblaszt sejtek miotubulusokká differenciáltatása során a 4. naptól kezdődően egyik differenciációs marker expressziója sem változik szignifikánsan, ami azt mutatja, hogy a 4. napra teljesen végbement a differenciáció (11A és B ábra). A differenciációs markerek mRNS szintű expressziójában is hasonló tendencia figyelhető meg. Chen és mtsai C2C12 mioblasztokat 6 napon keresztül differenciáltattak, majd többek között a dezmin és MYH2 (=MyHC 2a) mRNS szintű expresszióját vizsgálták RT-qPCR segítségével. Azt tapasztalták, hogy a dezmin expresszió a differenciáció előrehaladtával nő, a 4. napon tetőzik, azonban a 4. és 6. nap között már nincs jelentős különbség. Ezzel ellentétben a MYH2 expressziójának folyamatos növekedését figyelték meg egészen a 6. napig [Chen és mtsai, 2015]. A különbséget Chen és mtsai valamint a saját eredményeink között az mRNS és fehérje különbözőségén túlmenően az okozza, hogy egyrészt a kínai-finn munkacsoport csak az MyHC 2a izoformát kódoló gén mRNS szintjét vizsgálta, mi pedig olyan antitesttel dolgoztunk, amelyik az MyHC fehérje mindegyik izoformáját felismeri. Másrészt Brown és mtsai munkájából kiderül, hogy az 1-es típusú izoforma mRNS-ének expressziója előbb nő, majd számottevően csökken a C2C12 sejtek differenciációja során, amit a 2-es típusú izoformák folyamatos, de eltérő mértékű növekedése kísér [Brown és mtsai, 2011]. Mivel a különböző izoformák expressziója nem ugyanolyan irányban és mértékben változik, ezért az általunk kapott szignál ezek eredőjeként értelmezhető.

A C2C12 sejtek differenciációját tekintve a szuprafiziológiás T3-nak a 4. naptól kezdődően nincs szignifikáns hatása a differenciációs markerek expressziójára, 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 nőtt a kontrollhoz képest (11A és B ábra).

Ez arra utal, hogy a T3 elősegíti a mioblasztok miotubulusokká történő differenciálódását, amit más csoportok által végzett tanulmányok is megerősítenek, nem csak a C2C12 sejtvonal [Milanesi és mtsai, 2016; Carneiro és mtsai, 2008; Carnac és mtsai, 1992], hanem más modellrendszerek vonatkozásában is [Marchal és mtsai, 1995].

Az endogén SMTNL1 expressziója a normál differenciáció során fokozatosan nő, azonban ez az emelkedés nem szignifikáns (11C ábra). Jelenlegi tudásunk szerint a SMTNL1 fehérje expresszióját előtünk még nem vizsgálták a C2C12 sejtek differenciációja során, azonban a SMTNL1-gyel szekvenciahomológiát mutató SMTNL2 expressziójáról vannak rendelkezésre álló adatok: a SMTNL2 a proliferatív fázisban lévő mioblasztokban nem detektálható, de a differenciáció indukálását követően expressziója megnő és magas is marad [Gordon és mtsai, 2013]. Érdekes módon az általunk végzett szuprafiziológiás T3 kezelés hatására a SMTNL1 expressziójának számottevő növekedése látható az 1. napon, amely ezt követően fokozatosan csökken egészen a 6. napig, amikor expressziója már 4-szer kisebb a kontrollhoz képest (11C ábra). A már differenciálódott sejteket 72 órán át 10 nM T3-mal kezelve a SMTNL1 expressziója 33%-os csökkenést mutat (12A ábra). Eredményeink tükrében kijelenthetjük, hogy a SMTNL1 expressziója bizonyos mértékig fordítottan arányos a szuprafiziológiás T3 kezelés időtartamával, majd plató fázisba kerül miután már nem csökken tovább. Ez további bizonyítékot jelenthet a humán mintákon látottakra, miszerint a hosszútávú T3 expozíció a SMTNL1 expressziójának csökkenését okozza. Sem a szuprafiziológiás T3 kezelés, sem a SMTNL1 fehérje túltermeltetése nem befolyásolja a miotubulusok életképességét (12D ábra). Ez összhangban van a Proteome Profiler eredményekkel, melyek azt demonstrálják, hogy a hipertireózis az apoptózist kiváltó fehérjék aktivitását jelentősen nem befolyásolja (10B ábra).

5.1.4. A T3 és a SMTNL1 csökkenti a TR α expresszióját a miotubulusokban

A T3 szignál továbbításáért felelős fehérjék közül az MCT8 és a DIO2 expressziója a szuprafiziológiás T3 koncentrációtól és a SMTNL1-től is független, ami azt mutatja, hogy a SMTNL1 fehérje sem a pajzsmirigyhormonok transzportjának, sem azok intracelluláris koncentrációjának szabályozásában nem vesz részt (13A és B ábra). A szuprafiziológiás T3 kezelés hatásának elmaradását van Hardeveld és Kassenaar munkája indokolja, melyben azt találták, hogy a hipertireózisos nőstény patkányok kevert rostösszetételű vagy tipikusan 2b rostokból felépülő izmaiban (*m. vastus lateralis*, *m. gastrocnemius*, *m. caudo femoralis*) a pajzsmirigyhormonok felvétele, illetve a T4 T3-má történő konverziója nem változott szignifikánsan az eutireózisos állatok értékeivel összehasonlítva [van Hardeveld és mtsai, 1978].

Ezzel szemben az effektor funkciót ellátó TR α expressziója 67%-kal csökkent a T3 kezelés hatására. Ez a jelenség összhangban van egy korábbi tanulmánnyal, mely szerint a pajzsmirigyhormonok a TR α proteaszómális degradációját indukálják, ezáltal csökkentve a fehérje mennyiségét a különböző szövetekben [Dace és mtsai, 2000; Kenessey és mtsai, 2015]. Érdekes módon a SMTNL1 overexpressziójának köszönhetően a TR α expressziója 52%-kal csökkent, amit a kombinált kezelés még tovább fokozott (13C ábra). Ezzel ellentétben a T3 kezelés a TR β expresszióját szignifikánsan megemelte, melyre a SMTNL1 fehérje overexpressziójának önmagában nem volt hatása, a kombinált kezelés során azonban képes volt a T3 indukált növekedést meggátolni (13D ábra). A T3 kezelés okozta TR α csökkenés és TR β növekedés korrelál azon megfigyeléssel, miszerint hipertireózis során a TR α /TR β arány eltolódik a TR β receptorok javára, ami az izom rostösszetételétől független [Haddad és mtsai, 1998]. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1 –a korábbi feltevésünkkel ellentétben- nem antagonizálja a T3 TR α izoformájára gyakorolt hatását.

A rekombináns SMTNL1 fehérje immunprecipitációja során kimutattuk, hogy a SMTNL1 és a TR-ok között nincs közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatás (14A ábra). A SMTNL1-t overexpresszáló miotubulusokat PKA agonistával kezelve a TR α expressziója 42%-kal csökkent a csak SMTNL1-et overexpresszáló miotubulusokhoz képest (14B ábra). Mindez arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 transzkripciós szinten szabályozza a TR α expresszióját, hiszen a SMTNL1-ről ismert, hogy PKA általi foszforilációját követően a sejtmagba transzlokálódik és ott transzkripciós kofaktorként különböző gének expressziójáért felel [Lontay és mtsai, 2010]. Ezek az eredmények összhangban vannak a SMTNL1 KO egerek *m. plantaris* izmának microarray analízise során végzett megfigyelésekkel, miszerint a SMTNL1 kiütésének hatására változó gének 50%-ának a transzkripció szabályozásában van szerepe, illetve, hogy a SMTNL1 kiütése a magreceptorok jelátviteli pályáinak felregulálódásával jár [Lontay és mtsai, 2015].

Ismert, hogy a MyoD1 fehérje expressziója a T3 által transzkripciós szinten pozitívan szabályozott [Muscat és mtsai, 1994; Carnac és mtsai, 1992]. Leal és mtsai azt találták, hogy felnőtt hím patkányok *m. soleus*-ában a MyoD1 mRNS expressziója változatlan marad a hipertireózis kiváltását követően, azonban a fehérje mennyisége szignifikánsan nő a kontrollhoz viszonyítva [Leal és mtsai, 2014]. Eredményeink is ezt támasztják alá, hiszen 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 (14C ábra). A MyoD1 maga is egy transzkripciós faktor, amely az izomspecifikus génexpresszió *in vivo* és *in vitro* szabályozásában is részt vesz [Weintraub és mtsai, 1993;

Buckingham és mtsai, 1994]. Hughes és mtsai azt tapasztalták, hogy a MyoD1 fehérje 6-szor nagyobb mértékben expresszálódik az egerek gyors típusú, *m. extensor digitorum longus* izmában a lassú típusú *m. soleus*-hoz képest. Ennek az az oka, hogy a MyoD1 fehérje a gyors típusú rostok közül elsősorban a 2x és 2b típusú rostokban található meg. A fehérjét kódoló gén kiütése esetén a MyoD1 KO nőstény egerek gyors típusú izmainak MyHC- és rostösszetétele átalakul, az 1 és a 2a rostok száma szignifikánsan megnő, a 2b típusú rostok száma pedig lecsökken, melynek mértéke az adott izomtól függően változik. Ez arra utal, hogy a MyoD1 a 2x/2b típusú rostok fenntartásában vesz részt [Hughes és mtsai, 1996]. Mindezek alapján a MyoD1 szuprafiziológiás T3 kezelésre bekövetkező expressziós növekedése a jelen modellrendszerben azt sugallja, hogy a C2C12 miotubulusok MyHC összetétele is változik, a 2x és 2b izoformák mennyisége nő, amely hozzájárul a hipertireózis során is tapasztalható glikolitikusabb fenotípus kialakulásához. Ugyanakkor, a MyoD1 fehérje más szempontból is érdekes lehet számunkra. Ulke-Lemée és mtsai kimutatták, hogy a SMTNL1 promóterében található számos transzkripciós faktor kötőhely közül az egyik a MyoD1 felismerési szekvenciájával egyezik meg [Ulke-Lemée és mtsai, 2011]. Mivel T3 kezelés hatására a MyoD1 expresszió szignifikáns növekedését (14C ábra), ezzel párhuzamosan pedig az SMTNL1 expresszió szignifikáns csökkenését tapasztaltuk (12A ábra), ezért úgy gondoljuk, hogy a T3 a MyoD1-en keresztül hat a SMTNL1 expressziójára. A szuprafiziológiás T3 kezelés hatására bekövetkező TR α /TR β arány eltolódása (13C és D ábra), valamint a SMTNL1 overexpresszió általi TR α lereguláció (13C ábra) azt sugallja, hogy a TR-ok közül a β izoforma az, amelyik a SMTNL1 expresszióját szabályozza, feltehetően a bevezetőben részletezett kihorgonyzó mechanizmuson keresztül [Miner és mtsai, 1991; Flamant és mtsai, 2017], de ezen hipotézisek bizonyítása további kísérleteket kíván.

5.1.5. A SMTNL1 csökkenti az IRS1 gátló Ser foszforilációját a T3-kezelt miotubulusokban

A hipertireózis egy felfokozott anyagcserével járó állapot, melyben a sejtek megnövekedett glükózigényét az intracelluláris glikogénraktárak fokozott lebontásából és/vagy a glükózfelvétel serkentéséből próbálja fedezni a sejt, azonban egyre nő azon tanulmányok száma, melyekben csökkent perifériális inzulinérzékenységről és glükóz intoleranciáról számolnak be hipertireózis során [Shen és mtsai, 1988; Dimitriadis és mtsai, 1997; Mitrou és mtsai, 2010]. Dimitriadis és mtsai kimutatták, hogy hipertireózisban a posztprandiális periódusban a vázizom nettó glükózfelvétele csökken [Dimitriadis és mtsai, 2008]. Ennek oka a vázizom inzulin mediált glükózfelvétele szabályozó jelátviteli útvonal, ezen belül az IRS

fehérjék megváltozott aktivitásában keresendő [Coppes és mtsai, 2012; Karlsson és mtsai, 2007]. 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, hiszen nőstény SMTNL1 KO egerek esetén szintén csökkent glükóztolerancia figyelhető meg, melyet a csökkenő IRS1 szintekkel hoztak összefüggésbe [Lontay és mtsai, 2015].

Bár az IRS1 expressziója egyik kezelés hatására sem változott számottevően (15A ábra), 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 (15B és C ábra). A SMTNL1 overexpressziója önmagában és a T3 kezeléssel kombinálva is nagymértékű csökkenést idézett elő az IRS1 Ser307 és az IRS1 Ser612 foszforilációjában (15B és C ábra). Az inzulin jelátvitel egy másik fontos eleme az aktivált IRS1 fehérje foszfortirozin oldalláncához kötődő PI3K, melynek 85 kDa katalitikus alegységét kódoló gén expressziója szignifikánsan csökken a hipertireózisos humán vázizom mintákban a microarray analízis értelmében (9B ábra), melyet a szuprafiziológiás T3-mal kezelt miotubulusokban, fehérjeszinten is sikerült igazolnunk (15D ábra). Eredményeink bizonyítékkul 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 és a PI3K disszociációját 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 glükóz transzport inzulinra adott normál válaszadó képességét visszaállítani.

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 is, azok poszttranszlációs módosításán keresztül (10A és B ábra). 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 (16A-C ábra). Ezzel szemben az ERK1/2 foszforilációja 57%-kal, a JNK foszforilációja pedig 18%-kal nőtt, miközben az mTOR foszforilációjában elhanyagolható változást tapasztaltunk (17A-C ábra). 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 (17B és C ábra). Ezen eredmények összhangban

vannak az IRS1 Ser foszforilációjának változásaival. Mivel az SMTNL1 overexpressziója a JNK expressziót nem befolyásolta, ezért úgy gondoljuk, hogy az IRS1 307-es Ser foszforilációjának változása a kettős specificitású foszfatáz (DUSP) 9 megváltozott expressziójával és/vagy aktivitásával magyarázható, melyet a SMTNL1 fehérje pozitívan szabályoz [Bodoor és mtsai, 2011] és amely a JNK defoszforilálásán keresztül csökkenti az IRS1 307-es Ser foszforilációját.

Bár a Proteome Profiler array-n nem szerepelt, az IRS1 gátló foszforilációjának serkentéséért a PKC δ is felelős lehet, ezért e fehérje expresszióját is megvizsgáltuk a jelen modellrendszerben. A PKC δ expressziója T3 hatására változatlan maradt, viszont 38 és 50%-kal csökkent a SMTNL1 overexpressziójának következtében a T3 hiányától vagy jelenlététől függően (17D ábra). Ezek alapján a SMTNL1 túltermelése következtében csökkenő IRS1 és ERK1/2 foszforiláció a PKC δ expressziójának visszaesésével magyarázható, amely egyrészt a 307-es Ser oldalláncot foszforilálja az IRS1-en [Greene és mtsai, 2004], másrészt az ERK1/2 aktiválásáért is felelős [Ueda és mtsai, 1996]. A T3 által feltehetően nem genomi útvonalon aktivált ERK1/2 az IRS1 Ser612 foszforiláció fokozódásáért tehető felelőssé. A kapott adatok magyarázatot jelenthetnek a szuprafiziológiás T3 koncentráció által előidézett gátló IRS1 Ser foszforiláció fokozódására, továbbá alátámasztják a SMTNL1 fehérje inzulinérzékenyítő hatását, melyet az IRS1 gátló Ser foszforilációjának emelkedéséért felelős kináz enzimek expressziójának vagy aktivitásának csökkentésével ér el.

5.1.6. A SMTNL1 a glikolízis gátlásán keresztül antagonizálja a T3 hatását a miotubulusokban

Az intracelluláris glükózmétabolizmus két másik fontos pillére a vázizom inzulin mediált glükózfelvételét végző GLUT4 transzporter, illetve a glikolízis sebességmeghatározó lépését katalizáló HK II enzim. Hipertireózisos patkányokból izolált vázizomból kimutatták, hogy a GLUT4 transzporterek száma és az intracelluláris vezikulákból a szarkolemmába történő transzlokációja inzulin hatására nő [Weinstein és mtsai, 1994]. Bár a GLUT4 expressziója a szuprafiziológiás T3 kezelés hatására tendenciájában nőtt a C2C12 miotubulusokban (18A ábra), inzulin által mediált transzlokációja a sejtmembránba valószínűleg kisebb az IRS1 inaktiválódása (15B és C ábra) és a PI3K expressziójának csökkenése miatt (15D ábra). Továbbá, a GLUT4 transzlokációjában fontos szerepet játszó Akt2 Ser474 foszforilációjának szignifikáns csökkenése a hipertireózisos humán vázizom mintákban is erre utal (10A ábra). A SMTNL1 overexpressziója a GLUT4 expresszióját szignifikánsan növelte, ami egyrészt

párhuzamba állítható a nőstény SMTNL1 KO egerek esetén tapasztalt GLUT4 expresszió csökkenésével [Lontay és mtsai, 2015], másrészt az előzőekben tárgyalt IRS1 gátló Ser foszforiláció csökkentése mellett a SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatásáról tanúskodik.

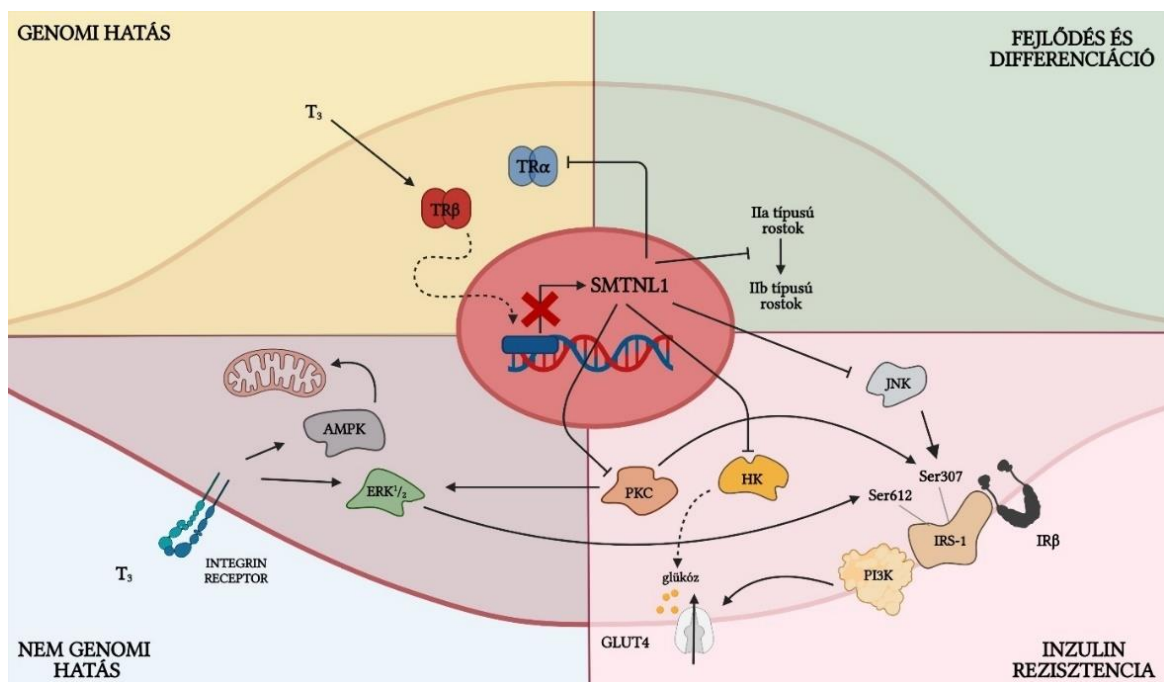
Hipertireózis során az inzulin által stimulált glikogén szintézis mértéke is csökken [Randin és mtsai, 1985], ezért az extracelluláris térből felvett glükóz a glikolízisben hasznosul, melynek sebességhatározó lépésében a HK enzimek aktivitása nyomán foszforilálódik és glükóz-6-foszfáttá alakul. Hipertireózisos egerek *m. gastrocnemius* izmának valós idejű PCR és western blot analízise feltárta, hogy a vázizomban legnagyobb mennyiségben előforduló HK II mRNS szinten nem változik, míg a fehérje expressziója és aktivitása szignifikánsan nő a hipertireózisos egerekben az eutireózisos mintákkal összehasonlítva [Pecanha és mtsai, 2017], ami magyarázatot jelent a hipertireózisban megfigyelt emelkedett glükóz foszforilációra [Dimitriadis és mtsai, 1997]. A C2C12 miotubulusokban a HK II expressziója 43%-kal nőtt a T3 kezelés hatására, ami a fentiek alapján a glikolízis fokozódására enged következtetni. A SMTNL1 túltermeltetése a HK II expresszióját 25%-kal csökkentette mind önmagában, mind a T3 kezeléssel kombinálva a C2C12 miotubulusokban (18B ábra), ami összhangban van a nőstény SMTNL1 KO egerekben tapasztalt megnövekedett HK II expresszióval ezen keresztül pedig a glikolízis fokozódásával [Lontay és mtsai, 2015].

A vázizom glükózmetabolizmusának szabályozásában az AMPK enzimnek is kardinális szerepe van [Nakano és mtsai, 2006]. Az enzim krónikus aktiválása a GLUT4, a HK [Holmes és mtsai, 1985], valamint az elektrontranszportláncban és a citrát ciklusban szerepet játszó fehérjék [Winder és mtsai, 2000] expresszióját növeli, míg a glikogén szintéziséért felelős glikogén szintáz enzimet inaktíválja [Hardie és mtsai, 2006] a vázizomban. Ezen felül az aktivált AMPK inzulintól független módon elősegíti a GLUT4 transzlokációját a membránba és ezáltal a sejtek glükózfelvételét növeli [Kurth-Kraczek és mtsai, 1999]. Mind a hipertireózisos humán vázizom biopsziák, mind a szuprafiziológiás T3-mal kezelt miotubulusok esetén az AMPK Thr172-es oldallánc foszforilációjának szignifikáns emelkedését tapasztaltuk (18C ábra). Branvold és mtsai is hasonló eredményre jutottak hím patkányok *m. soleus* izmának vizsgálatakor, akik azt találták, hogy az AMPK $\alpha 2$ alegység Thr172 foszforilációja és ezáltal az aktivitása még nyugalmi állapotban is szignifikánsan magasabb a hipertireózisos mintákban a kontroll állatok mintáihoz viszonyítva [Branvold és mtsai, 2008]. Az AMPK foszforilációjának tartós megemelkedése a fehérje defoszforilációját végző PP2A α expressziójának csökkenésével magyarázható [Joseph és mtsai, 2015], ugyanis a humán vázizom minták microarray analízise feltárta, hogy a PP2A α -t kódoló gén expressziója szignifikánsan csökken a hipertireózis során (9B ábra), melyet a szuprafiziológiás

T3-mal kezelt miotubulusokban fehérjeszinten is igazoltunk (18E ábra). Ezzel szemben a SMTNL1 overexpressziója sem az AMPK, sem a PP2A α fehérjék expresszióját és foszforilációját nem befolyásolta (18C-E ábra). Az irodalmi adatok és a saját eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a tartósan magas T3 koncentráció 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 glikolízis mellett a glükóz oxidáció, de legfőképpen a laktáttermelés is felerősödnek a hipertireózisos vázizomban [Mitrou és mtsai, 2010], utóbbi részben a glikogenolízis fokozódásának köszönhető [Dimitriadis és mtsai, 1991]. Modellrendszerünkben a laktáttermelés indikátora, az anaerob glikolízis 1,4 szeresére nőtt a szuprafiziológiás T3 kezelés hatására, amit a glikolitikus rezerv nagymértékű csökkenése kísért (19B és D ábra). Megfigyeléseinket Sagliocchi és mtsai munkája is alátámasztja, melyben kimutatták, hogy a DIO2 overexpresszió következtében növekvő intracelluláris T3 koncentráció az anyagcsere glikolízis irányába történő eltolódását, ezzel párhuzamosan pedig az ECAR emelkedését eredményezi a C2C12 sejtekben [Sagliocchi és mtsai, 2019]. Az aerob glikolízis mértéke nem változott számottevően a 72 órás szuprafiziológiás T3 kezelés hatására (19F ábra), ami feltételezhetően a kezelés időtartamának tulajdonítható, ugyanis patkányokat 2, 5 és 10 napig 0,65 $\mu\text{g/g}$ testsúly T3-mal kezelve a glükóz oxidáció mértéke 2 nap elteltével gyakorlatilag nem változott, csak az 5. és a 10. napon mutatott szignifikáns eltérést [Dimitriadis és mtsai, 1988]. A laktáttermelés mellett a magas koncentrációban jelenlévő T3 a zsírsavak oxidációját is fokozza (19I ábra). Ez a jelenség az AMPK emelkedett aktivitására vezethető vissza, ugyanis az AMPK-ról ismert, hogy T3 általi aktivációja a malonil-CoA mennyiségének csökkentésén keresztül fokozza a zsírsavak oxidációját a vázizomban [Miklosz és mtsai, 2012]. A hipertireózishoz hasonlóan a SMTNL1 kiütése is a glikogenolízis fokozódásával jár [Lontay és mtsai, 2015]. Ezzel szemben a SMTNL1 overexpressziója nemcsak, hogy meggátolja a T3-indukált anaerob glikolízis fokozódását, de az aerob glikolízis és a zsírsav oxidáció mértékét is szignifikánsan csökkenti (19B, F és I ábra). A kapott adatok fényében elmondható, hogy a feleslegben lévő T3 a laktáttermelés és a zsírsav oxidáció fokozódását indukálja, miközben a SMTNL1 a különböző anyagcserefolyamatok, főként a glikolízis szabályozásán keresztül antagonizálja a T3 hatását.

Összefoglalva a SMTNL1 általi szabályozás ígéretes lehet a hipertireózis és az azt kísérő inzulinrezisztencia gyógyításában a következő okok miatt: 1) a SMTNL1 szelektíven képes gátolni a TR α expresszióját, ami a T3 által indukált jelátvitel egyik fő effektora; 2) a SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatást fejt ki egy inzulintól független, heterológ útvonalon, a JNK aktivitásának gátlásán keresztül; 3) a SMTNL1 gátolja a T3 nem genomi hatásait az ERK1/2

aktivitásának PKC δ -n keresztül való csökkentése által; 4) a SMTNL1 a HK II enzim szabályozásán keresztül a glükóz foszforiláció és a glikolízis szabályozásában is részt vesz; 5) a SMTNL1 ellensúlyozza a T3 által indukált glikolitikus fenotípus kialakulását. Mindezen tulajdonságai miatt a SMTNL1 overexpressziója vagy -alternatív megoldásként- egy membránpermeábilis SMTNL1 mimikáló peptid inzulinérzékenyítő hatása révén képes lehet a hipertireózis során fellépő kezdődő inzulinrezisztencia ellensúlyozására a vázizomban (29. ábra).



29. ábra: A SMTNL1 szerepe a vázizom anyagcseréjének szabályozásában hipertireózis során. A SMTNL1 a következő mechanizmusokon keresztül képes a hipertireózis által indukált anyagcsereváltozások megelőzésére a vázizomban: 1) ellensúlyozza a szuprafiziológiás T3 által kiváltott glikolitikus irányú eltolódást; 2) inzulinérzékenyítő hatását a JNK gátlásán keresztül fejtí ki; 3) gátolja a T3 nem genomi útvonalaának eredményeképpen aktiválódó ERK1/2-t a PKC δ expressziójának szabályozásán keresztül; 4) a SMTNL1 a HK II enzim szabályozásán keresztül a glükóz foszforiláció és a glikolízis szabályozásában is részt vesz és 5) szelektíven gátolja a TR α expresszióját, amely a T3 fő effektora.

5.2. A SMTNL1 szerepe a C2C12 sejtek homeosztázisának és T3-függő miogenezisének szabályozásában

A miogenezis egy szigorúan szabályozott folyamat, amely magába foglalja a progenitor sejtek osztódását, migrációját és differenciációját, és amely elengedhetetlen feltétele a vázizom megfelelő fejlődésének. Mivel a vázizom progenitor sejtjeinek migrációja és differenciációja hipertireózis során kevésbé tanulmányozott, ezért kutatásaimat ebben az irányban folytattam, a SMTNL1 fehérje és a MP enzim közötti kölcsönhatás, valamint ezen fehérjék potenciális szabályozó szerepét is vizsgálva ezen folyamatokban.

5.2.1. A SMTNL1 a MP enzim gátlásán keresztül blokkolja a C2C12 mioblasztok migrációját és elősegíti azok differenciációját

A nem izom miozinnak (nm-miozin) alapvető szerepe van a sejtek alak- és helyváltoztatásával járó folyamataiban, mint amilyen a sejtadhézió, sejt migráció, morfogenezis és a sejtosztódás, melyből adódóan a nm-miozin foszforilációs állapotát meghatározó MP enzim is megkerülhetetlen ezekben a folyamatokban [Matsumura és mtsai, 2008]. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a MYPT1 izoforma csendesítése, illetve foszforiláció általi gátlása a migráció blokkolását eredményezi [Xia és mtsai, 2004; Lontay és mtsai, 2005; Horváth és mtsai, 2018]. Figyelembevéve a SMTNL1 markáns hatását a MYPT1 expressziójára és aktivitására a vázizom fejlődése során [Lontay és mtsai, 2010] utánajártunk, hogy a SMTNL1 túltermeltetése és a szuprafiziológias T3 kezelés hogyan befolyásolja a C2C12 mioblasztok migrációját. Megállapítottuk, hogy a SMTNL1 overexpressziója jelentős mértékben visszavetette a sejtek migrációs képességét (20. ábra). A jelenséget a SMTNL1 MP enzimet gátló hatásával magyaráztuk, melynek igazolására nem csak a MP-t felépítő alegységek, hanem az enzim szubsztrátjának (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 (21A és B ábra). A MYPT1 gátló foszforilációjának növekedését mindkét esetben az MLC20 Ser19-es oldallánc foszforilációjának szignifikáns emelkedése kísérte (21C ábra). Eredményeinket alátámasztja, hogy a SMTNL1 KO egerekben a MYPT1 expressziójának növekedése mellett csökkent MLC20 Ser19 foszforilációt detektáltak az állatok simaizmában [Lontay és mtsai, 2010]. A MP enzim Thr696 foszforiláció általi gátlása a nm-miozin foszforilációjának lassabb „turnover”-ét eredményezheti, ezáltal stabilabb adhéziós struktúrák

jönnek létre, amik akadályozzák a sejtek citoskeletonjának átrendeződését és a sejtek migrációját.

Disszertációm első felében bemutatásra került, hogy a rövidtávú, szuprafiziológiás T3 kezelés a SMTNL1 expresszióját növeli a mioblasztokban (11C ábra), ezért azt vártuk, hogy a MYPT1 expressziója és ezáltal a sejtek migrációja -a SMTNL1 overexpresszió hatásához hasonlóan- csökken a 24 órás T3 kezelést követően. Ennek ellenére a szuprafiziológiás T3 kezelés a MYPT1 expresszióját jelentősen nem befolyásolta, miközben gátló foszforilációja és ezzel együtt a sejtek migrációs képessége tendenciájában enyhén csökkent csupán (20., 21A és B ábra). 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 a mioblasztokban, míg a SMTNL1 overexpressziója (fiziológiás T3 koncentráció mellett) olyan mértékű növekedést eredményez, ami már képes hatékonyan gátolni a MP regulátor aleggységének expresszióját, ezáltal pedig a sejtek migrációját. A MYPT1 gátló foszforilációjának 24 óra elteltével tapasztalható kismértékű csökkenésére Kondo és mtsai munkája adhat magyarázatot, akik oszteoblaszt-szerű sejteket 10 nM T3-mal kezelve a MYPT1 foszforilációjának időfüggését figyelték meg, amely 2 óra elteltével éri el a csúcst, ezt követően pedig csökken [Kondo és mtsai, 2013]. Ezen túlmenően hipertireózisos egerek tüdőszövetében leírták, hogy a pajzsmirigyhormonok az MLC20 foszforilációját csökkentik az eutireózisos egerekkel összehasonlítva, ám ez statisztikailag nem szignifikáns [Pajouhi és mtsai, 2015]. Munkacsoportunk is hasonló eredményre jutott a mioblasztok vizsgálata során, miszerint a szuprafiziológiás T3 kezelés az MLC20 foszforilációjának kismértékű csökkenését idézte elő (21C ábra), ami összhangban van a MYPT1 gátló foszforilációjának csökkenésével. Eredményeink további bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a SMTNL1 a MYPT1 expresszióját és aktivitását negatívan szabályozza, illetve, hogy a MP enzim gátlása a sejtek migrációját blokkolja. Jelenlegi tudásunk szerint munkacsoportunk az első, akinek C2C12 mioblaszt sejtekben sikerült az említett jelenségeket kimutatnia és igazolnia.

Bár a mioblasztokban a MYPT különböző izoformái közül a MYPT1 van jelen a legjelentősebb mértékben [Wu és mtsai, 2003], a kifejtett miotubulusokra jellemző MYPT2 izoforma expresszióját is megvizsgáltuk a mioblasztokban. Azt tapasztaltuk, hogy a T3 kezelés önmagában és a SMTNL1-gyel kombinálva is tendenciájában látványosan megemelte a

MYPT2 expresszióját, míg a SMTNL1 overexpressziójának önmagában nem volt hatása (21F ábra).

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. A differenciáció során a mioblasztok fúziójával többmagvú, spontán kontrakcióra képes miotubulusok jönnek létre, a miotubulusok kontraktilitásának és anyagcseréjének szabályozását végző specifikus fehérjék expressziója mellett. Az előzőekben láttuk, hogy a normál differenciáció során az endogén SMTNL1 expressziója nem szignifikánsan, de fokozatosan nő, míg szuprafiziológiás T3 kezelés hatására előbb nő a kontrollhoz képest, majd a differenciáció előrehaladtával csökken, miközben a differenciációs markerek expressziója fokozódik (11. ábra). A SMTNL1 tranziens overexpressziója során a fehérje expressziója kezdetben nagyon magas, majd a differenciáció progressziójával párhuzamosan csökken (22A ábra). Fiziológiás T3 koncentráció mellett a SMTNL1 overexpressziója a vizsgált 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 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 (23. ábra), ami támogatja a SMTNL1 fehérje differenciációt elősegítő hatásáról alkotott hipotézisünket. Ahogy az a bevezetőben említésre került, a kisebb méretű miotubulusok kialakulásának oka lehet például az MLCK aktivitásának gátlása [Wu és mtsai, 2003], azonban az enzim egyre növekvő koncentrációjú SMTNL1-gyel történő inkubálása során nem tapasztalható változás a kináz aktivitásában, még a legmagasabb (30 μ M) tesztelt SMTNL1 koncentráció jelenlétében sem [Wooldridge és mtsai, 2008], így ezen változás okának felderítése a jövő feladata.

5.2.2. A SMTNL1 és a T3 szelektíven szabályozzák a MYPT1 és MYPT2 izoformát 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 α) expressziójára. Irodalmi adatok szerint a proliferatív fázisban lévő mioblasztokban a T3 intracelluláris koncentrációja alacsony, amely a

differentiáció során a DIO2 expressziójának növekedésével párhuzamosan nő [Dentice és mtsai, 2010]. Modellrendszerünkben a DIO2 expressziója fiziológias körülmények között egészen a 4. napig növekvő tendenciát mutat (ami egybeesik az érett miotubulusok kifejlődésével, ld. 11A és B ábra), majd ettől kezdve már nem változik szignifikánsan. A szuprafiziológias T3 kezelés a 3. napig fokozatosan emelte a DIO2 expresszióját, ami a 4. naptól kezdődően azonban látványos csökkenésnek indult (24A ábra), egy negatív visszacsatolási mechanizmus bekapcsolását feltételezve. A TR α expressziója már a mioblasztokban is detektálható; szintje a fiziológias T3 koncentráció mellett nőtt a differentiáció során, míg szuprafiziológias T3 kezelés hatására a 4., 5. és 6. napon (tehát a kifejlett miotubulusokban) szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz viszonyítva (24B ábra). A miotubulusok 72 órás T3 kezelése során is hasonló eredményre jutottunk (13C ábra).

Wu és mtsai korábban már vizsgálták a MYPT izoformák és a PP1c δ expresszióját, valamint a MP holoenzim aktivitását a C2C12 sejtek normál differentiációja során. Megfigyeléseik szerint a MYPT1 expressziója a 4. napig nem változik, viszont a 6. napra lecsökken, a MYPT2 expressziója a 4. napig fokozatosan nő és ezt követően magas is marad, a PP1c δ expressziója pedig nem mutat számottevő változást [Wu és mtsai, 2003]. Munkacsoportunk eredményei, melyeket hasonló kísérleti elrendezésben és ugyanazon antitestek (MYPT¹⁻³⁸ [Wu és mtsai, 2003], MYPT2 [Fujioka és mtsai, 1998]) alkalmazása mellett kaptunk, megfeleltethetők a Wu és mtsai által közölt adatoknak: fiziológias T3 koncentráció mellett a MYPT2 expressziójának növekedését, míg a MYPT1 expressziójának nem szignifikáns visszaesését tapasztaltuk a 6 napos kísérleti periódus végére, miközben a PP1c δ expressziója a teljes időtartam alatt változatlan maradt (25. ábra). Az eredményekből kitűnik, hogy míg a mioblasztokban a PP1c δ inkább a MYPT1 izoformával alkot komplexet, addig az érett miotubulusokban elsősorban a MYPT2 az, amely a PP1c δ -val közösen vesz részt a MP holoenzim felépítésében [Moorhead és mtsai, 1998]. Érdekes módon a szuprafiziológias T3 kezelés a differenciálódó mioblasztokban a MYPT2 expresszióját növelte, míg a PP1c δ és a MYPT1 expressziójára nem volt hatással, ahogy azt a proliferatív fázisban lévő mioblasztok vizsgálatánál is tapasztaltuk (21. ábra).

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 (26A ábra). 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 (26B ábra). A

PP1c δ expressziója tendenciájában kis mértékben nőtt a T3 kezelés és/vagy a SMTNL1 overexpressziójának következtében (26D ábra). Ezen eredmények összecsengenek azzal, hogy a SMTNL1 kiütése a MYPT2 expressziós szintjét nem befolyásolja a vázizomban [Lontay és mtsai, 2010]. 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.

Mivel a MYPT1 (PPP1R12A) és MYPT2 (PPP1R12B) fehérjéket kódoló gének más-más kromozómán találhatóak, ezért expressziójuk eltérő, egymástól független szabályozása nem elképzelhetetlen [Fujioka és mtsai, 1998]. A MYPT1 expressziója a SMTNL1 overexpressziójának köszönhetően szignifikáns csökkenést mutat, ami a mioblasztokban és a miotubulusokban is független a T3 jelenlététől. Ez rezonál a SMTNL1 kiütése következtében megfigyelhető MYPT1 expresszió fokozódására a vázizomban [Lontay és mtsai, 2010]. Ezzel szemben a MYPT2 expressziója a SMTNL1 túltermelésétől független, ami azzal magyarázható, hogy míg a SMTNL1 és a MYPT1 jelenlegi tudásunk szerint kizárólag a 2a típusú rostokban expresszálódik, addig a MYPT2 izoforma homogén eloszlást mutat a különböző rosttípusok között [Lontay és mtsai, 2010].

A MP enzim alegységeinek (MYPT1/2, PP1c δ) nagy koncentrációja ellenére az enzim kevésbé aktív a differenciálódó mioblasztokban és a kifejlett miotubulusokban, hiszen a nm-miozin és a vázizom miozin (sk-miozin) foszforilációja egyaránt nő és magas is marad a 6 napos kísérleti periódus során. A MYPT1/2 aktivitásának gátlása és ezáltal a nm-miozin és sk-miozin foszforilációjának konzervációja fontos szerepet játszik a C2C12 mioblasztok miotubulusokká válása során végbemenő szarkomer struktúra kialakulásában [Wu és mtsai, 2003]. A publikációk megjelenéséig nem állt rendelkezésünkre a MYPT2 Thr646-os foszforilációs helye elleni specifikus antitest, ám a mioblasztokon is alkalmazott anti-phosphoMYPT1^{Thr696} a nagyfokú szekvenciahomológia miatt [Fujioka és mtsai, 1998] keresztreagál a MYPT2 Thr646-os gátló foszforilációs helyével; eredményeink és irodalmi adatok alapján a miotubulusokban a MYPT izoformák közül a MYPT2 van jelen a legjelentősebb mértékben (25B és C ábra), így a MYPT2 foszforiláció tanulmányozására is az említett antitestet használtuk. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy bár a MYPT1 expressziója csökken a differenciáció során, a MYPT1/PP1c komplex a miotubulusokban is működőképes [Wu és mtsai, 2003]. A MYPT1/2 Thr696-os oldalláncának gátló foszforilációja szignifikánsan emelkedett mind a T3, mind a kombinált kezelésnek köszönhetően, míg a SMTNL1 overexpressziója önmagában marginálisan szignifikáns növekedést produkált a miotubulusokban (26C ábra). A mioblasztokban és a miotubulusokban tapasztalt T3 és/vagy SMTNL1 általi MP enzimgátlás is

igazolja, hogy a T3 és a SMTNL1 differenciációt elősegítő hatásának megjelenésében a differenciációs markerek felregulálásán felül a MP enzim gátlásának is szerepe lehet.

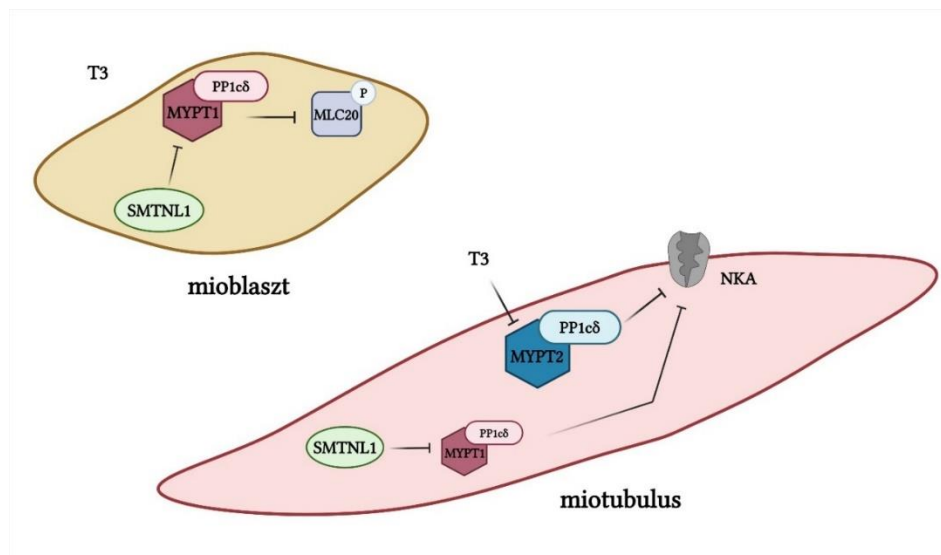
5.2.3. A T3 és a SMTNL1 a MP enzim gátlásán keresztül csökkentik a NKA aktivitását a miotubulusokban

Előzetes eredmények alapján potenciális MP szubsztrát a NKA [Lontay és mtsai, 2004], ami a MP regulátor alegységéhez kötődik a C2C12 sejtekben (27. ábra). A NKA expressziója a szuprafiziológiás T3 kezelés hatására kb. 40%-kal megemelkedett, míg a SMTNL1 overexpressziója kismértékben csökkentette azt (28A ábra). Eredményeink összhangban vannak Riis és mtsai munkájával, melyben hipertireózisos betegek methimazole kezelése előtt és után vételezett *m. vastus lateralis* izomból származó biopsziákat vizsgáltak és azt találták, hogy a NKA expressziója 89%-ban megemelkedett a hipertireózisban szenvedő betegek mintáiban az eutireózisos donorok mintáival összehasonlítva [Riis és mtsai, 2005]. A NKA Ser16-os és Ser23-as foszforilációs helyeinek vizsgálatokor mind a szuprafiziológiás T3 kezelés, mind a SMTNL1 overexpresszió következményeként szignifikánsan emelkedett foszforilációt mutattunk ki (28B és C ábra). Ez vélhetően a MP enzim megnövekedett gátló foszforilációjának köszönhető, amely így nem képes a NKA-t defoszforilálni. Ezt a megfigyelést egerek *m. plantaris* izmából készített preparátum PP1 szelektív inhibitorral (TMC) való kezelése is alátámasztja, melyben fokozott NKA α 1 Ser23-as foszforilációt detektáltunk (28D ábra). 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.

Arról, hogy a NKA α 1 Ser23 és Ser16 foszforilációja milyen hatással van a fehérje aktivitására nincs egységes álláspont az irodalomban, de a publikációk többségében az α alegység PKA és PKC általi foszforilációja gátló hatású [Bertorello és mtsai, 1991; Logvinenko és mtsai, 1996; Vasilets és mtsai, 1999]. Továbbá, differenciáltatott L6 patkány sejtekben a PP1c/PP2A okadánsavval és kalikulin-A-val történő gátlása is a NKA aktivitásának csökkenését eredményezte [Ragolia és mtsai, 1997]. Fontos megjegyezni, hogy a NKA hipofunkciója egyaránt hátrányos következményekkel jár az izomfunkcióra nézve: a NKA hiperfunkciója hiperpolarizáló hatású, ami a membránpotenciált még negatívabbá teszi, melyben nehezebb elérni a feszültségfüggő Na⁺ csatornák nyitására és a Ca²⁺ felszabadulásához szükséges küszöböt, ezáltal az izom ingerlékenysége csökken, ami izomgyengeség kialakulásához vezet. A pumpafehérje hipofunkciója esetén a membránpotenciál pozitívabb, a sejtmembrán depolarizáltabb, emiatt a feszültségfüggő Na⁺

csatornák egy része inaktivált állapotba kerül, ezért az akciós potenciál amplitúdója kisebb, kevesebb Ca^{2+} szabadul fel, ami kisebb mértékű összehúzódást, ezáltal pedig izomgyengeséget eredményez. Láthatjuk, hogy mindkét esetben kisebb a Ca^{2+} felszabadulás mértéke, ami gyorsabban visszavevődik a szarkoplazmatikus retikulumba a feleslegben lévő T3 által okozott SERCA expresszió emelkedése miatt [Simonides és mtsai, 1996; van der Linden és mtsai, 1996], ami súlyosbító tényezőként tovább rontja az izom összehúzódásának hatékonyságát.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a MP enzim különbözőképpen szabályozódik az eltérő differenciációs állapotú sejtekben. A nem differenciált mioblasztokban a MP felépítésében a PP1c δ mellett a MYPT1 izoforma vesz részt, melynek expresszióját és aktivitását, ezen keresztül pedig a sejtek citoszkeletális átrendeződését és migrációját a SMTNL1 fehérje szabályozza. Ezzel szemben a miotubulusokban a PP1c δ elsősorban a MYPT2 izoformával alkot komplexet, melynek aktivitása T3 által szabályozott és amely lehetséges szabályozó eleme a NKA-nak, a fehérje foszforilációs állapotának befolyásolásán keresztül (30. ábra). Ezen eredmények hozzájárulhatnak a hipertireózis során fellépő izomgyengeség jobb megértéséhez. Ez potenciális célpont(ok) azonosításán keresztül segítheti egy jövőbeni gyógyszeres terápia kifejlesztését, ami a betegek életminőségének javítását szolgálja.



30. ábra: A MP enzim felépítése és szabályozása a mioblasztokban és a miotubulusokban. A nem differenciált mioblasztokban a MP felépítésében a PP1c δ mellett a MYPT1 izoforma vesz részt, melynek expresszióját és aktivitását, ezen keresztül pedig a sejtek citoszkeletális átrendeződését és migrációját a SMTNL1 fehérje szabályozza. A miotubulusokban a PP1c δ elsősorban a MYPT2 izoformával alkot komplexet, melynek aktivitása T3 által regulált és amely lehetséges szabályozó eleme a NKA-nak.

Összefoglalás

Vizsgálataim során a vázizom adaptálódását szabályozni képes transzkripciós kofaktor, a SMTNL1 fehérje 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 α /TR β arány csökkenését, a MyoD1 szignifikáns növekedését, valamint megemelkedett IRS1 gátló Ser foszforilációt és a PI3K expresszió visszaesését detektáltuk a szuprafiziológiás T3 kezelés hatására, míg a SMTNL1 overexpressziója a TR α expresszióját, valamint az IRS1 Ser foszforilációját markánsan csökkentette. A megnövekedett IRS1 Ser foszforiláció a szuprafiziológiás T3 kezelés következtében aktiválódott IRS1 kinázok, mint a 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 α expressziójának csökkenése az AMPK foszforiláció tartós megemelkedését vonta maga után, ami a HK II expressziójának indukálásán keresztül fokozta a glikolízist. A mioblasztok 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 antagonistázó 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 mioblasztokban a MP felépítésében a PP1 δ 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 δ elsősorban a MYPT2 izoformával alkot komplexet, melynek aktivitása T3 által szabályozott. 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.

Summary

During my PhD work, I have studied the regulatory role of a transcriptional cofactor, SMTNL1, in the metabolism of hyperthyroid muscle and in the myogenesis and homeostasis of C2C12 cells.

Western blot analysis of human euthyroid and hyperthyroid skeletal muscle biopsies revealed that SMTNL1 expression was dramatically decreased in response to hyperthyroidism, which was accompanied by a marked decrease in the amount of I and IIa fiber markers. We observed that the TR α /TR β ratio was decreased, MyoD1 expression and the inhibitory Ser phosphorylation of IRS1 were significantly increased and there was a decline in PI3K expression upon supraphysiological T3 treatment, while SMTNL1 overexpression reduced the expression of TR α and IRS1 Ser phosphorylation in differentiated C2C12 cells. The elevated Ser phosphorylation of IRS1 was the result of the activation of IRS1 kinases, such as ERK1/2 and JNK, upon T3 treatment which was supported by the Proteome Profiler data on human hyperthyroid muscle biopsies. SMTNL1 could compensate for the effects of IRS kinases in myotubes. In T3-treated myotubes, a decline in PP2A α expression led to a persistent increase in AMPK phosphorylation, which enhanced glycolysis by inducing the expression of GLUT4 and HK II. Seahorse analysis of myoblasts shed light on the increase of lactate production and fatty acid oxidation in response to supraphysiological T3, which were reversed by SMTNL1. Based on these results, we can conclude that SMTNL1 is capable of alleviating hyperthyroidism and the associated insulin resistance through its insulin sensitizing and T3 antagonizing effects.

We proved that MP consists of MYPT1 and PP1c δ in myoblasts. By inhibiting MP, SMTNL1 overexpression significantly slowed down the migration of myoblasts. Similarly to T3, SMTNL1 promoted the differentiation of myoblasts into myotubes by inducing the expression of differentiation markers. In differentiated myotubes, we found that PP1c δ is in complex with MYPT2, the activity of which was regulated by T3. The inhibition of MP by T3 or SMTNL1 caused a notable increase in the phosphorylation of NKA, which blocked the activity of the cation pump, contributing to the development of muscle weakness during hyperthyroidism.

Tárgyszavak (Keywords)

Tárgyszavak:

inzulinérzékenység
vázizom
hipertireózis
inzulin jelátvitel
inzulin receptor szubsztrát 1
glükóz metabolizmus
SMTNL1
pajzsmirigyhormon
C2C12 sejtmigráció
miogenezis
miozin foszfataz
Na⁺/K⁺-ATPáz

Keywords:

insulin sensitivity
skeletal muscle
hyperthyroidism
insulin signaling
insulin receptor substrate 1
glucose metabolism
SMTNL1
thyroid hormone
C2C12 cell migration
myogenesis
myosin phosphatase
Na⁺/K⁺-ATPase

Irodalomjegyzék

- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:476279. doi: 10.1155/2010/476279. Epub 2010 Apr 26. PMID: 20445742; PMCID: PMC2860140.
- Ambrosio R, De Stefano MA, Di Girolamo D, Salvatore D. Thyroid hormone signaling and deiodinase actions in muscle stem/progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Dec 25;459:79-83. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.014. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28630021.
- Apriletti JW, Eberhardt NL, Latham KR, Baxter JD. Affinity chromatography of thyroid hormone receptors. Biospecific elution from support matrices, characterization of the partially purified receptor. *J Biol Chem.* 1981 Dec 10;256(23):12094-101. PMID: 6271772.
- Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M. Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ Res.* 1991 Aug;69(2):266-76. doi: 10.1161/01.res.69.2.266. PMID: 1830516.
- Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001 Jul;81(3):1269-304. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1269. PMID: 11427696.
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Feb 1;4(2):a008342. doi: 10.1101/cshperspect.a008342. PMID: 22300977; PMCID: PMC3281568.
- Bertorello AM, Aperia A, Walaas SI, Nairn AC, Greengard P. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11359-62. doi: 10.1073/pnas.88.24.11359. PMID: 1662394; PMCID: PMC53134.
- Bloise FF, Cordeiro A, Ortiga-Carvalho TM. Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. *J Endocrinol.* 2018 Jan;236(1):R57-R68. doi: 10.1530/JOE-16-0611. Epub 2017 Oct 19. PMID: 29051191.
- Bodoor K, Lontay B, Safi R, Weitzel DH, Loiselle D, Wei Z, Lengyel S, McDonnell DP, Haystead TA. Smoothelin-like 1 protein is a bifunctional regulator of the progesterone receptor during pregnancy. *J Biol Chem.* 2011 Sep 9;286(36):31839-51. doi: 10.1074/jbc.M111.270397. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21771785; PMCID: PMC3173130.

- Borman MA, MacDonald JA, Haystead TA. Modulation of smooth muscle contractility by CHASM, a novel member of the smoothelin family of proteins. *FEBS Lett.* 2004 Aug 27;573(1-3):207-13. doi: 10.1016/j.febslet.2004.08.002. PMID: 15327999.
- Branvold DJ, Allred DR, Beckstead DJ, Kim HJ, Fillmore N, Condon BM, Brown JD, Sudweeks SN, Thomson DM, Winder WW. Thyroid hormone effects on LKB1, MO25, phospho-AMPK, phospho-CREB, and PGC-1alpha in rat muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2008 Oct;105(4):1218-27. doi: 10.1152/jappphysiol.00997.2007. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18669938.
- Brown DM, Parr T, Brameld JM. Myosin heavy chain mRNA isoforms are expressed in two distinct cohorts during C2C12 myogenesis. *J Muscle Res Cell Motil.* 2012 Mar;32(6):383-90. doi: 10.1007/s10974-011-9267-4. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22012579.
- Buckingham ME. Muscle: the regulation of myogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Oct;4(5):745-51. doi: 10.1016/0959-437x(94)90142-p. PMID: 7849514.
- Busson M, Daury L, Seyer P, Grandemange S, Pessemesse L, Casas F, Wrutniak-Cabello C, Cabello G. Avian MyoD and c-Jun coordinately induce transcriptional activity of the 3,5,3'-triiodothyronine nuclear receptor c-ErbAalpha1 in proliferating myoblasts. *Endocrinology.* 2006 Jul;147(7):3408-18. doi: 10.1210/en.2006-0101. Epub 2006 Mar 23. PMID: 16556763.
- Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol.* 2005 Jan;19(1):102-12. doi: 10.1210/me.2004-0093. Epub 2004 Sep 23. PMID: 15388791.
- Carnac G, Albagli-Curiel O, Vandromme M, Pinset C, Montarras D, Laudet V, Bonniou A. 3,5,3'-Triiodothyronine positively regulates both MyoD1 gene transcription and terminal differentiation in C2 myoblasts. *Mol Endocrinol.* 1992 Aug;6(8):1185-94. doi: 10.1210/mend.6.8.1406697. PMID: 1406697.
- Carneiro I, Castro-Piedras I, Muñoz A, Labandeira-García JL, Devesa J, Arce VM. Hypothyroidism is associated with increased myostatin expression in rats. *J Endocrinol Invest.* 2008 Sep;31(9):773-8. doi: 10.1007/BF03349256. PMID: 18997488.

- Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Dec 15;458:6-15. doi: 10.1016/j.mce.2017.01.038. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28153798.
- Casla A, Rovira A, Wells JA, Dohm GL. Increased glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 31;171(1):182-8. doi: 10.1016/0006-291x(90)91374-2. PMID: 2203344.
- Cassar-Malek I, Marchal S, Rochard P, Casas F, Wrutniak C, Samarut J, Cabello G. Induction of c-Erb A-AP-1 interactions and c-Erb A transcriptional activity in myoblasts by RXR. Consequences for muscle differentiation. *J Biol Chem*. 1996 May 10;271(19):11392-9. doi: 10.1074/jbc.271.19.11392. PMID: 8626694.
- Chen Y, Stegaev V, Kouri VP, Sillat T, Chazot PL, Stark H, Wen JG, Kontinen YT. Identification of histamine receptor subtypes in skeletal myogenesis. *Mol Med Rep*. 2015 Apr;11(4):2624-30. doi: 10.3892/mmr.2014.3073. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25500891; PMCID: PMC4337477.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010 Apr;31(2):139-70. doi: 10.1210/er.2009-0007. Epub 2010 Jan 5. PMID: 20051527; PMCID: PMC2852208.
- Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1091-6. doi: 10.1210/en.2008-1795. Epub 2009 Jan 29. PMID: 19179434.
- Clément K, Viguerie N, Diehn M, Alizadeh A, Barbe P, Thalamas C, Storey JD, Brown PO, Barsh GS, Langin D. In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res*. 2002 Feb;12(2):281-91. doi: 10.1101/gr.207702. PMID: 11827947; PMCID: PMC155277.
- Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, West BL, Hanover JA, Cheng S. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1;97(16):8985-90. doi: 10.1073/pnas.160257997. PMID: 10908671; PMCID: PMC16808.
- D'Alessandris C, Lauro R, Presta I, Sesti G. C-reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser 612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that promotes glucose transport. *Diabetologia*. 2007 Apr;50(4):840-9. doi: 10.1007/s00125-006-0522-y. Epub 2007 Feb 6. PMID: 17279354.

- D'Arezzo S, Incerpi S, Davis FB, Acconcia F, Marino M, Farias RN, Davis PJ. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):5694-703. doi: 10.1210/en.2004-0890. Epub 2004 Sep 2. PMID: 15345678.
- Daury L, Busson M, Casas F, Cassar-Malek I, Wrutniak-Cabello C, Cabello G. The triiodothyronine nuclear receptor c-ErbAalpha1 inhibits avian MyoD transcriptional activity in myoblasts. *FEBS Lett*. 2001 Nov 16;508(2):236-40. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03063-0. PMID: 11718722.
- Davies TF, Andersen S, Latif R, Nagayama Y, Barbesino G, Brito M, Eckstein AK, Stagnaro-Green A, Kahaly GJ. Graves' disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Jul 2;6(1):52. doi: 10.1038/s41572-020-0184-y. PMID: 32616746.
- De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev*. 2000 Jul;80(3):1083-105. doi: 10.1152/physrev.2000.80.3.1083. PMID: 10893432.
- De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2016 Aug 27;388(10047):906-918. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00278-6. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27038492; PMCID: PMC5014602.
- De Los Santos ET, Mazzaferri EL. Sensitive thyroid-stimulating hormone assays: clinical applications and limitations. *Compr Ther*. 1988 Sep;14(9):26-33. PMID: 3064960.
- Dedinszki D, Sipos A, Kiss A, Bátori R, Kónya Z, Virág L, Erdódi F, Lontay B. Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jan;1852(1):22-33. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.11.005. Epub 2014 Nov 8. PMID: 25446992.
- Dehoux M, Van Beneden R, Pasko N, Lause P, Verniers J, Underwood L, Ketelslegers JM, Thissen JP. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogen-1/MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology*. 2004 Nov;145(11):4806-12. doi: 10.1210/en.2004-0406. Epub 2004 Jul 29. PMID: 15284206.
- Dentice M, Marsili A, Ambrosio R, Guardiola O, Sibilio A, Paik JH, Minchiotti G, DePinho RA, Fenzi G, Larsen PR, Salvatore D. The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):4021-30. doi: 10.1172/JCI43670. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20978344; PMCID: PMC2964991.

- Dentice M, Salvatore D. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol.* 2011 Jun;209(3):273-82. doi: 10.1530/JOE-11-0002. Epub 2011 Mar 11. PMID: 21398344.
- Dimitriadis G, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P, Maratou E, Brunel P, Raptis SA. Restoration of early insulin secretion after a meal in type 2 diabetes: effects on lipid and glucose metabolism. *Eur J Clin Invest.* 2004 Jul;34(7):490-7. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01377.x. PMID: 15255786.
- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Boutati E, Maratou E, Koukkou E, Panagiotakos D, Tountas N, Economopoulos T, Raptis SA. Insulin-stimulated rates of glucose uptake in muscle in hyperthyroidism: the importance of blood flow. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jun;93(6):2413-5. doi: 10.1210/jc.2007-2832. Epub 2008 Mar 18. PMID: 18349060.
- Dimitriadis G, Parry-Billings M, Bevan S, Leighton B, Krause U, Piva T, Tegos K, Challiss RA, Wegener G, Newsholme EA. The effects of insulin on transport and metabolism of glucose in skeletal muscle from hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Clin Invest.* 1997 Jun;27(6):475-83. doi: 10.1046/j.1365-2362.1997.1380688.x. PMID: 9229227.
- Dimitriadis GD, Leighton B, Vlachonikolis IG, Parry-Billings M, Challiss RA, West D, Newsholme EA. Effects of hyperthyroidism on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in the soleus muscle of the rat. *Biochem J.* 1988 Jul 1;253(1):87-92. doi: 10.1042/bj2530087. Erratum in: *Biochem J* 1988 Nov 1;255(3):following 1061. PMID: 3048254; PMCID: PMC1149261.
- Dimitriadis GD, Richards SJ, Parry-Billings M, Leighton B, Newsholme EA, Challiss RA. Beta-adrenoceptor-agonist and insulin actions on glucose metabolism in rat skeletal muscle in different thyroid states. *Biochem J.* 1991 Sep 1;278 (Pt 2)(Pt 2):587-93. doi: 10.1042/bj2780587. PMID: 1680321; PMCID: PMC1151384.
- Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev.* 2003 Feb;24(1):48-77. doi: 10.1210/er.2001-0029. PMID: 12588808.
- Doubleday AR, Sippel RS. Hyperthyroidism. *Gland Surg.* 2020 Feb;9(1):124-135. doi: 10.21037/gs.2019.11.01. PMID: 32206604; PMCID: PMC7082267.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a

- monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet.* 2004 Jan;74(1):168-75. doi: 10.1086/380999. Epub 2003 Dec 5. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2004 Mar;74(3):598. PMID: 14661163; PMCID: PMC1181904.
- Dümmeler K, Müller S, Seitz HJ. Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochem J.* 1996 Aug 1;317 (Pt 3)(Pt 3):913-8. doi: 10.1042/bj3170913. PMID: 8760382; PMCID: PMC1217572.
- Dunlap DB. Thyroid Function Tests. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 142. PMID: 21250093.
- Flamant F, Cheng SY, Hollenberg AN, Moeller LC, Samarut J, Wondisford FE, Yen PM, Refetoff S. Thyroid Hormone Signaling Pathways: Time for a More Precise Nomenclature. *Endocrinology.* 2017 Jul 1;158(7):2052-2057. doi: 10.1210/en.2017-00250. PMID: 28472304; PMCID: PMC6283428.
- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41):40128-35. doi: 10.1074/jbc.M300909200. Epub 2003 Jul 18. PMID: 12871948.
- Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet.* 2004 Oct 16-22;364(9443):1435-7. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17226-7. PMID: 15488219.
- Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol.* 2008 Jun;22(6):1357-69. doi: 10.1210/me.2007-0112. Epub 2008 Mar 12. PMID: 18337592; PMCID: PMC5419535.
- Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, Ito M. A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics.* 1998 Apr 1;49(1):59-68. doi: 10.1006/geno.1998.5222. PMID: 9570949.

- Gambke B, Lyons GE, Haselgrove J, Kelly AM, Rubinstein NA. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.* 1983 Jun 13;156(2):335-9. doi: 10.1016/0014-5793(83)80524-9. PMID: 6852266.
- Glynn EL, Lujan HL, Kramer VJ, Drummond MJ, DiCarlo SE, Rasmussen BB. A chronic increase in physical activity inhibits fed-state mTOR/S6K1 signaling and reduces IRS-1 serine phosphorylation in rat skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Feb;33(1):93-101. doi: 10.1139/H07-149. PMID: 18347658; PMCID: PMC2706125.
- Gordon EA, Whisenant TC, Zeller M, Kaake RM, Gordon WM, Krotee P, Patel V, Huang L, Baldi P, Bardwell L. Combining docking site and phosphosite predictions to find new substrates: identification of smoothelin-like-2 (SMTNL2) as a c-Jun N-terminal kinase (JNK) substrate. *Cell Signal.* 2013 Dec;25(12):2518-29. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.004. Epub 2013 Aug 24. PMID: 23981301; PMCID: PMC4132694.
- Greene MW, Morrice N, Garofalo RS, Roth RA. Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta. *Biochem J.* 2004 Feb 15;378(Pt 1):105-16. doi: 10.1042/BJ20031493. PMID: 14583092; PMCID: PMC1223928.
- Haddad F, Qin AX, McCue SA, Baldwin KM. Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state. *Am J Physiol.* 1998 Jun;274(6):E1018-26. doi: 10.1152/ajpendo.1998.274.6.E1018. PMID: 9611151.
- Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life.* 2012 Feb;64(2):109-19. doi: 10.1002/iub.572. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22162139.
- Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda).* 2006 Feb;21:48-60. doi: 10.1152/physiol.00044.2005. PMID: 16443822.
- Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid.* 2002 Jun;12(6):441-6. doi: 10.1089/105072502760143791. PMID: 12165104.
- Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev.* 2001 Aug;22(4):451-76. doi: 10.1210/edrv.22.4.0435. PMID: 11493579.

- Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* (1985). 1999 Nov;87(5):1990-5. doi: 10.1152/jappl.1999.87.5.1990. PMID: 10562646.
- Horváth D, Sipos A, Major E, Kónya Z, Bátori R, Dedinszki D, Szöllősi A, 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*. 2018 Oct;1864(10):3268-3280. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.013. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30010048.
- Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs AM. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev*. 1997 Jan;61(1-2):151-63. doi: 10.1016/s0925-4773(96)00631-4. PMID: 9076685.
- Ichikawa K, Ito M, Hartshorne DJ. Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*. 1996 Mar 1;271(9):4733-40. doi: 10.1074/jbc.271.9.4733. PMID: 8617739.
- Ildikó Molnár (March 22nd 2021). Deiodinase Enzymes and Their Activities in Graves' Hyperthyroidism [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.97007. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/75859>
- Ishida H, Borman MA, Ostrander J, Vogel HJ, MacDonald JA. Solution structure of the calponin homology (CH) domain from the smoothelin-like 1 protein: a unique apocalmodulin-binding mode and the possible role of the C-terminal type-2 CH-domain in smooth muscle relaxation. *J Biol Chem*. 2008 Jul 18;283(29):20569-78. doi: 10.1074/jbc.M800627200. Epub 2008 May 12. PMID: 18477568.
- Iwaki H, Sasaki S, Matsushita A, Ohba K, Matsunaga H, Misawa H, Oki Y, Ishizuka K, Nakamura H, Suda T. Essential role of TEA domain transcription factors in the negative regulation of the MYH 7 gene by thyroid hormone and its receptors. *PLoS One*. 2014 Apr 29;9(4):e88610. doi: 10.1371/journal.pone.0088610. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(8):e106385. PMID: 24781449; PMCID: PMC4004540.
- Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*. 1986 Feb 7;231(4738):597-600. doi: 10.1126/science.3945800. PMID: 3945800.

- Joseph BK, Liu HY, Francisco J, Pandya D, Donigan M, Gallo-Ebert C, Giordano C, Bata A, Nickels JT Jr. Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}. *J Biol Chem*. 2015 Apr 24;290(17):10588-98. doi: 10.1074/jbc.M114.626259. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25694423; PMCID: PMC4409226.
- Kalyanaraman H, Schwappacher R, Joshua J, Zhuang S, Scott BT, Klos M, Casteel DE, Frangos JA, Dillmann W, Boss GR, Pilz RB. Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Sci Signal*. 2014 May 20;7(326):ra48. doi: 10.1126/scisignal.2004911. PMID: 24847117; PMCID: PMC6504257.
- Karlsson HK, Zierath JR. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochem Biophys*. 2007;48(2-3):103-13. doi: 10.1007/s12013-007-0030-9. PMID: 17709880.
- Kenessey A, Ojamaa K. Ligand-mediated decrease of thyroid hormone receptor-alpha1 in cardiomyocytes by proteasome-dependent degradation and altered mRNA stability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Feb;288(2):H813-21. doi: 10.1152/ajpheart.00804.2004. Epub 2004 Oct 21. PMID: 15498821.
- Khalid N, Can AS. Plummer Disease. 2021 Jul 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 33351415.
- Kim KM, Jang HC, Lim S. Differences among skeletal muscle mass indices derived from height-, weight-, and body mass index-adjusted models in assessing sarcopenia. *Korean J Intern Med*. 2016 Jul;31(4):643-50. doi: 10.3904/kjim.2016.015. Epub 2016 Jun 22. PMID: 27334763; PMCID: PMC4939509.
- Kinne A, Schülein R, Krause G. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res*. 2011 Aug 3;4 Suppl 1(Suppl 1):S7. doi: 10.1186/1756-6614-4-S1-S7. PMID: 21835054; PMCID: PMC3155113.
- Koenig RJ, Lazar MA, Hodin RA, Brent GA, Larsen PR, Chin WW, Moore DD. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature*. 1989 Feb 16;337(6208):659-61. doi: 10.1038/337659a0. PMID: 2537467.
- Kondo A, Tokuda H, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase negatively regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Biochimie*. 2013 Apr;95(4):719-24. doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.020. Epub 2012 Nov 2. PMID: 23123502.

- Kudrjavcev T. Neurologic complications of thyroid dysfunction. *Adv Neurol.* 1978;19:619-36. PMID: 742545.
- Kumar, Vinay-Abbas, Abdul K.-Aster, Jon C. (2009): *Robbins: A patológia alapjai.* Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt., pp. 755-768.
- Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes.* 1999 Aug;48(8):1667-71. doi: 10.2337/diabetes.48.8.1667. PMID: 10426389.
- Larsen PR, Zavacki AM. The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *Eur Thyroid J.* 2012;1(4):232-242. doi: 10.1159/000343922. PMID: 23750337; PMCID: PMC3673746.
- Laudet V, Begue A, Henry-Duthoit C, Joubel A, Martin P, Stehelin D, Saule S. Genomic organization of the human thyroid hormone receptor alpha (c-erbA-1) gene. *Nucleic Acids Res.* 1991 Mar 11;19(5):1105-12. doi: 10.1093/nar/19.5.1105. PMID: 1850510; PMCID: PMC333788.
- Lazar MA, Berrodin TJ, Harding HP. Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol.* 1991 Oct;11(10):5005-15. doi: 10.1128/mcb.11.10.5005-5015.1991. PMID: 1922030; PMCID: PMC361489.
- Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW. Identification of a rat c-erbA alpha-related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone. *Mol Endocrinol.* 1988 Oct;2(10):893-901. doi: 10.1210/mend-2-10-893. PMID: 2903438.
- Leal AL, Albuquerque JP, Matos MS, Fortunato RS, Carvalho DP, Rosenthal D, da Costa VM. Thyroid hormones regulate skeletal muscle regeneration after acute injury. *Endocrine.* 2015 Feb;48(1):233-40. doi: 10.1007/s12020-014-0271-5. Epub 2014 May 6. PMID: 24798447.
- Lee Y, Mahdavi V. The D domain of the thyroid hormone receptor alpha 1 specifies positive and negative transcriptional regulation functions. *J Biol Chem.* 1993 Jan 25;268(3):2021-8. PMID: 8420976.
- Lehka L, Rędowicz MJ. Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay. *Semin Cell Dev Biol.* 2020 Aug;104:81-92. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.02.004. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32063453.
- Lei J, Mariash CN, Bhargava M, Wattenberg EV, Ingbar DH. T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial

- cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Apr;294(4):L749-54. doi: 10.1152/ajplung.00335.2007. Epub 2008 Jan 25. PMID: 18223161.
- Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *J Cell Biol*. 1994 Mar;124(5):827-41. doi: 10.1083/jcb.124.5.827. PMID: 8120103; PMCID: PMC2119944.
- Lin Y, Sun Z. Thyroid hormone potentiates insulin signaling and attenuates hyperglycemia and insulin resistance in a mouse model of type 2 diabetes. *Br J Pharmacol*. 2011 Feb;162(3):597-610. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01056.x. PMID: 20883475; PMCID: PMC3041250.
- Liu D, Li S, Cui Y, Tong H, Li S, Yan Y. Podocan affects C2C12 myogenic differentiation by enhancing Wnt/ β -catenin signaling. *J Cell Physiol*. 2019 Jul;234(7):11130-11139. doi: 10.1002/jcp.27763. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30652305.
- Liu YC, Yeh CT, Lin KH. Molecular Functions of Thyroid Hormone Signaling in Regulation of Cancer Progression and Anti-Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 9;20(20):4986. doi: 10.3390/ijms20204986. Erratum in: *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 30;21(9): PMID: 31600974; PMCID: PMC6834155.
- Logvinenko NS, Dulubova I, Fedosova N, Larsson SH, Nairn AC, Esmann M, Greengard P, Aperia A. Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase affects its conformational equilibrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 20;93(17):9132-7. doi: 10.1073/pnas.93.17.9132. PMID: 8799166; PMCID: PMC38607.
- Lombardi A, Moreno M, de Lange P, Iossa S, Busiello RA, Goglia F. Regulation of skeletal muscle mitochondrial activity by thyroid hormones: focus on the "old" triiodothyronine and the "emerging" 3,5-diiodothyronine. *Front Physiol*. 2015 Aug 21;6:237. doi: 10.3389/fphys.2015.00237. PMID: 26347660; PMCID: PMC4543916.
- Lontay B, Bodoor K, Sipos A, Weitzel DH, Loiselle D, Safi R, Zheng D, Devente J, Hickner RC, McDonnell DP, Ribar T, Haystead TA. Pregnancy and Smoothelin-like Protein 1 (SMTNL1) Deletion Promote the Switching of Skeletal Muscle to a Glycolytic Phenotype in Human and Mice. *J Biol Chem*. 2015 Jul 17;290(29):17985-17998. doi: 10.1074/jbc.M115.658120. Epub 2015 Jun 5. PMID: 26048986; PMCID: PMC4505045.

- Lontay B, Bodoor K, Weitzel DH, Loisel D, Fortner C, Lengyel S, Zheng D, Devente J, Hickner R, Haystead TA. Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development and pregnancy. *J Biol Chem.* 2010 Sep 17;285(38):29357-66. doi: 10.1074/jbc.M110.143966. Epub 2010 Jul 15. PMID: 20634291; PMCID: PMC2937968.
- Lontay B, Kiss A, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F. Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal.* 2005 Oct;17(10):1265-75. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.01.008. Epub 2005 Mar 3. PMID: 16038801.
- Lontay B, Pál B, Serfőző Z, Kőszeghy Á, Szücs G, Rusznák Z, Erdődi F. Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system. *J Neurochem.* 2012 Oct;123(1):84-99. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07882.x. Epub 2012 Aug 14. PMID: 22817114.
- Louis M, Zanou N, Van Schoor M, Gailly P. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci.* 2008 Dec 1;121(Pt 23):3951-9. doi: 10.1242/jcs.037218. Epub 2008 Nov 11. PMID: 19001499.
- Marchal S, Cassar-Malek I, Magaud JP, Rouault JP, Wrutniak C, Cabello G. Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the cAMP pathway. *Exp Cell Res.* 1995 Sep;220(1):1-10. doi: 10.1006/excr.1995.1285. PMID: 7664826.
- Mariani G, Tonacchera M, Grosso M, Orsolini F, Vitti P, Strauss HW. The Role of Nuclear Medicine in the Clinical Management of Benign Thyroid Disorders, Part 1: Hyperthyroidism. *J Nucl Med.* 2021 Mar;62(3):304-312. doi: 10.2967/jnumed.120.243170. Epub 2020 Oct 2. PMID: 33008929.
- Marsili A, Ramadan W, Harney JW, Mulcahey M, Castroneves LA, Goemann IM, Wajner SM, Huang SA, Zavacki AM, Maia AL, Dentice M, Salvatore D, Silva JE, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase levels are higher in slow-twitch than fast-twitch mouse skeletal muscle and are increased in hypothyroidism. *Endocrinology.* 2010 Dec;151(12):5952-60. doi: 10.1210/en.2010-0631. Epub 2010 Sep 29. PMID: 20881246; PMCID: PMC2999482.
- Martins Peçanha FL, Dos Santos RS, da-Silva WS. Thyroid states regulate subcellular glucose phosphorylation activity in male mice. *Endocr Connect.* 2017 Jul;6(5):311-

322. doi: 10.1530/EC-17-0059. Epub 2017 May 8. PMID: 28483784; PMCID: PMC5510448.
- Matsumura F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Apr 25;369(1):149-56. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.090. Epub 2007 Dec 26. PMID: 18155661; PMCID: PMC2367208.
- Matsunaga H, Sasaki S, Suzuki S, Matsushita A, Nakamura H, Nakamura HM, Hirahara N, Kuroda G, Iwaki H, Ohba K, Morita H, Oki Y, Suda T. Essential Role of GATA2 in the Negative Regulation of Type 2 Deiodinase Gene by Liganded Thyroid Hormone Receptor β 2 in Thyrotroph. *PLoS One.* 2015 Nov 16;10(11):e0142400. doi: 10.1371/journal.pone.0142400. PMID: 26571013; PMCID: PMC4646574.
- Matsushita A, Sasaki S, Kashiwabara Y, Nagayama K, Ohba K, Iwaki H, Misawa H, Ishizuka K, Nakamura H. Essential role of GATA2 in the negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone and its receptors. *Mol Endocrinol.* 2007 Apr;21(4):865-84. doi: 10.1210/me.2006-0208. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17244762.
- Mavinakere MS, Powers JM, Subramanian KS, Roggero VR, Allison LA. Multiple novel signals mediate thyroid hormone receptor nuclear import and export. *J Biol Chem.* 2012 Sep 7;287(37):31280-97. doi: 10.1074/jbc.M112.397745. Epub 2012 Jul 19. PMID: 22815488; PMCID: PMC3438959.
- Mengeling BJ, Lee S, Privalsky ML. Coactivator recruitment is enhanced by thyroid hormone receptor trimers. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Jan 2;280(1-2):47-62. doi: 10.1016/j.mce.2007.09.011. Epub 2007 Oct 6. PMID: 18006144; PMCID: PMC2197157.
- Miklosz A, Chabowski A, Zendzian-Piotrowska M, Gorski J. Effects of hyperthyroidism on lipid content and composition in oxidative and glycolytic muscles in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2012 Aug;63(4):403-10. PMID: 23070090.
- Milanesi A, Lee JW, Kim NH, Liu YY, Yang A, Sedrakyan S, Kahng A, Cervantes V, Tripuraneni N, Cheng SY, Perin L, Brent GA. Thyroid Hormone Receptor α Plays an Essential Role in Male Skeletal Muscle Myoblast Proliferation, Differentiation, and Response to Injury. *Endocrinology.* 2016 Jan;157(1):4-15. doi: 10.1210/en.2015-1443. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26451739; PMCID: PMC4701883.

- Miner JN, Diamond MI, Yamamoto KR. Joints in the regulatory lattice: composite regulation by steroid receptor-AP1 complexes. *Cell Growth Differ.* 1991 Oct;2(10):525-30. PMID: 1751408.
- Mitrou P, Raptis SA, Dimitriadis G. Insulin action in hyperthyroidism: a focus on muscle and adipose tissue. *Endocr Rev.* 2010 Oct;31(5):663-79. doi: 10.1210/er.2009-0046. Epub 2010 Jun 2. PMID: 20519325.
- Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Dec;19(12):2955-63. doi: 10.1210/me.2004-0542. Epub 2005 Jul 28. PMID: 16051672.
- Moorhead G, Johnson D, Morrice N, Cohen P. The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett.* 1998 Nov 6;438(3):141-4. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01276-9. PMID: 9827534.
- Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 2014 Apr;94(2):355-82. doi: 10.1152/physrev.00030.2013. PMID: 24692351; PMCID: PMC4044302.
- Murányi A, Derkach D, Erdodi F, Kiss A, Ito M, Hartshorne DJ. Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett.* 2005 Dec 5;579(29):6611-5. doi: 10.1016/j.febslet.2005.10.055. Epub 2005 Nov 9. PMID: 16297917.
- Muscat GE, Mynett-Johnson L, Dowhan D, Downes M, Griggs R. Activation of myoD gene transcription by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. *Nucleic Acids Res.* 1994 Feb 25;22(4):583-91. doi: 10.1093/nar/22.4.583. PMID: 8127707; PMCID: PMC307847.
- Nakano M, Hamada T, Hayashi T, Yonemitsu S, Miyamoto L, Toyoda T, Tanaka S, Masuzaki H, Ebihara K, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Otaka A, Fushiki T, Nakao K. $\alpha 2$ isoform-specific activation of 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose at a physiological level activates glucose transport and increases glucose transporter 4 in mouse skeletal muscle. *Metabolism.* 2006 Mar;55(3):300-8. doi: 10.1016/j.metabol.2005.09.003. PMID: 16483872.

- Nie Y, Chen H, Guo C, Yuan Z, Zhou X, Zhang Y, Zhang X, Mo D, Chen Y. Palmdelphin promotes myoblast differentiation and muscle regeneration. *Sci Rep*. 2017 Feb 2;7:41608. doi: 10.1038/srep41608. PMID: 28148961; PMCID: PMC5288731.
- Okamoto R, Kato T, Mizoguchi A, Takahashi N, Nakakuki T, Mizutani H, Isaka N, Imanaka-Yoshida K, Kaibuchi K, Lu Z, Mabuchi K, Tao T, Hartshorne DJ, Nakano T, Ito M. Characterization and function of MYPT2, a target subunit of myosin phosphatase in heart. *Cell Signal*. 2006 Sep;18(9):1408-16. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.11.001. Epub 2006 Jan 23. PMID: 16431080.
- Oppenheimer JH. Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. *N Engl J Med*. 1968 May 23;278(21):1153-62. doi: 10.1056/NEJM196805232782107. PMID: 4172185.
- Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012 Oct;55(10):2565-2582. doi: 10.1007/s00125-012-2644-8. Epub 2012 Aug 8. PMID: 22869320; PMCID: PMC4011499.
- Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Compr Physiol*. 2016 Jun 13;6(3):1387-428. doi: 10.1002/cphy.c150027. PMID: 27347897.
- Pajouhi N, Owji M, Naghibalhossaini F, Omrani GH, Varedi M. Modulation by thyroid hormone of myosin light chain phosphorylation and aquaporin 5 protein expression in intact lung. *J Physiol Biochem*. 2015 Mar;71(1):99-106. doi: 10.1007/s13105-015-0386-z. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25649359.
- Paquette MA, Atlas E, Wade MG, Yauk CL. Thyroid hormone response element half-site organization and its effect on thyroid hormone mediated transcription. *PLoS One*. 2014 Jun 27;9(6):e101155. doi: 10.1371/journal.pone.0101155. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(9):e109226. PMID: 24971931; PMCID: PMC4074170.
- Paschke R, Van Sande J, Parma J, Vassart G. The TSH receptor and thyroid diseases. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jan;10(1):9-27. doi: 10.1016/s0950-351x(96)80266-7. PMID: 8734449.
- Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M, Kanety H, Seger R, Zick Y. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem*. 1999 Oct 1;274(40):28816-22. doi: 10.1074/jbc.274.40.28816. PMID: 10497255.

- Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol.* 1997;170:143-223. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61622-8. PMID: 9002237.
- Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 2001 May;115(5):359-72. doi: 10.1007/s004180100268. PMID: 11449884.
- Pirkmajer S, Chibalin AV. Na,K-ATPase regulation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 Jul 1;311(1):E1-E31. doi: 10.1152/ajpendo.00539.2015. Epub 2016 May 10. PMID: 27166285.
- Postler TS, Budak MT, Khurana TS, Rubinstein NA. Influence of hyperthyroid conditions on gene expression in extraocular muscles of rats. *Physiol Genomics.* 2009 May 13;37(3):231-8. doi: 10.1152/physiolgenomics.00023.2009. Epub 2009 Mar 10. PMID: 19276241; PMCID: PMC2685502.
- Queiroz MS, Shao Y, Ismail-Beigi F. Effect of thyroid hormone on uncoupling protein-3 mRNA expression in rat heart and skeletal muscle. *Thyroid.* 2004 Mar;14(3):177-85. doi: 10.1089/105072504773297849. PMID: 15072699.
- Ragolia L, Cherpalis B, Srinivasan M, Begum N. Role of serine/threonine protein phosphatases in insulin regulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity in cultured rat skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):23653-8. doi: 10.1074/jbc.272.38.23653. PMID: 9295306.
- Randin JP, Scazziga B, Jéquier E, Felber JP. Study of glucose and lipid metabolism by continuous indirect calorimetry in Graves' disease: effect of an oral glucose load. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985 Dec;61(6):1165-71. doi: 10.1210/jcem-61-6-1165. PMID: 3840492.
- Riis AL, Jørgensen JO, Møller N, Weeke J, Clausen T. Hyperthyroidism and cation pumps in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Jun;288(6):E1265-9. doi: 10.1152/ajpendo.00533.2004. Epub 2004 Dec 14. PMID: 15598668.
- Sagliocchi S, Cicatiello AG, Di Cicco E, Ambrosio R, Miro C, Di Girolamo D, Nappi A, Mancino G, De Stefano MA, Luongo C, Raia M, Ogawa-Wong AN, Zavacki AM, Paladino S, Salvatore D, Dentice M. The thyroid hormone activating enzyme, type 2 deiodinase, induces myogenic differentiation by regulating mitochondrial metabolism and reducing oxidative stress. *Redox Biol.* 2019 Jun;24:101228. doi: 10.1016/j.redox.2019.101228. Epub 2019 May 22. PMID: 31153038; PMCID: PMC6543119.
- Salvatore D, Simonides WS, Dentice M, Zavacki AM, Larsen PR. Thyroid hormones and skeletal muscle--new insights and potential implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2014

- Apr;10(4):206-14. doi: 10.1038/nrendo.2013.238. Epub 2013 Dec 10. PMID: 24322650; PMCID: PMC4037849.
- Sap J, Muñoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennström B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*. 1986 Dec 18-31;324(6098):635-40. doi: 10.1038/324635a0. PMID: 2879242.
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011 Oct;91(4):1447-531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010. PMID: 22013216.
- Schwartz CE, Stevenson RE. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;21(2):307-21. doi: 10.1016/j.beem.2007.03.009. PMID: 17574010; PMCID: PMC2094733.
- Senese R, Cioffi F, Petito G, Goglia F, Lanni A. Thyroid hormone metabolites and analogues. *Endocrine*. 2019 Oct;66(1):105-114. doi: 10.1007/s12020-019-02025-5. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31359245.
- Sennepin AD, Charpentier S, Normand T, Sarré C, Legrand A, Mollet LM. Multiple reprobing of Western blots after inactivation of peroxidase activity by its substrate, hydrogen peroxide. *Anal Biochem*. 2009 Oct 1;393(1):129-31. doi: 10.1016/j.ab.2009.06.004. Epub 2009 Jun 10. PMID: 19523435.
- Shen DC, Davidson MB, Kuo SW, Sheu WH. Peripheral and hepatic insulin antagonism in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Mar;66(3):565-9. doi: 10.1210/jcem-66-3-565. PMID: 3280588.
- Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):435-64. doi: 10.1152/physrev.00009.2005. PMID: 16601266.
- Simonides WS, Brent GA, Thelen MH, van der Linden CG, Larsen PR, van Hardeveld C. Characterization of the promoter of the rat sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1 gene and analysis of thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem*. 1996 Dec 13;271(50):32048-56. doi: 10.1074/jbc.271.50.32048. PMID: 8943255.
- Simonides WS, van Hardeveld C. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid*. 2008 Feb;18(2):205-16. doi: 10.1089/thy.2007.0256. PMID: 18279021.
- Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. *N Engl J Med*. 2016 Oct 20;375(16):1552-1565. doi: 10.1056/NEJMra1510030. PMID: 27797318.
- Somlyo AV. Cyclic GMP regulation of myosin phosphatase: a new piece for the puzzle? *Circ Res*. 2007 Sep 28;101(7):645-7. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.161893. PMID: 17901367.

- Tanti JF, Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T, Barrès R, Le Marchand-Brustel Y. Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2004 Feb;65(1):43-8. doi: 10.1016/s0003-4266(04)95629-6. PMID: 15122091.
- Tonacchera M, Vitti P, De Servi M, Agretti P, De Marco G, Chiovato L, Pinchera A. Gain of function TSH receptor mutations and iodine deficiency: implications in iodine prophylaxis. *J Endocrinol Invest*. 2003;26(2 Suppl):2-6. PMID: 12762632.
- Ueda Y, Hirai Si, Osada Si, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem*. 1996 Sep 20;271(38):23512-9. doi: 10.1074/jbc.271.38.23512. PMID: 8798560.
- Ulke-Lemée A, Ishida H, Chappellaz M, Vogel HJ, MacDonald JA. Two domains of the smoothelin-like 1 protein bind apo- and calcium-calmodulin independently. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1844(9):1580-90. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.05.011. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24905744.
- Ulke-Lemée A, Turner SR, MacDonald JA. In situ analysis of smoothelin-like 1 and calmodulin interactions in smooth muscle cells by proximity ligation. *J Cell Biochem*. 2015 Nov;116(11):2667-75. doi: 10.1002/jcb.25215. PMID: 25923522.
- Ulke-Lemée A, Turner SR, Mughal SH, Borman MA, Winkfein RJ, MacDonald JA. Mapping and functional characterization of the murine smoothelin-like 1 promoter. *BMC Mol Biol*. 2011 Feb 27;12:10. doi: 10.1186/1471-2199-12-10. PMID: 21352594; PMCID: PMC3050715.
- van der Linden CG, Simonides WS, Muller A, van der Laarse WJ, Vermeulen JL, Zuidwijk MJ, Moorman AF, van Hardeveld C. Fiber-specific regulation of Ca(2+)-ATPase isoform expression by thyroid hormone in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1996 Dec;271(6 Pt 1):C1908-19. doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.6.C1908. PMID: 8997192.
- van Hardeveld C, Kassenaar AA. Thyroid hormone uptake and T4 derived T3 formation in different skeletal muscle types of normal and hyperthyroid rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1978 Jun;88(2):306-20. doi: 10.1530/acta.0.0880306. PMID: 580832.
- Vasilets LA, Postina R, Kirichenko SN. Mutations of Ser-23 of the alpha1 subunit of the rat Na⁺/K⁺-ATPase to negatively charged amino acid residues mimic the functional effect of PKC-mediated phosphorylation. *FEBS Lett*. 1999 Jul 16;455(1-2):8-12. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00851-0. PMID: 10428461.

- Waraich RS, Weigert C, Kalbacher H, Hennige AM, Lutz SZ, Häring HU, Schleicher ED, Voelter W, Lehmann R. Phosphorylation of Ser357 of rat insulin receptor substrate-1 mediates adverse effects of protein kinase C-delta on insulin action in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2008 Apr 25;283(17):11226-33. doi: 10.1074/jbc.M708588200. Epub 2008 Feb 19. PMID: 18285345.
- Weinstein SP, O'Boyle E, Haber RS. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. *Diabetes.* 1994 Oct;43(10):1185-9. doi: 10.2337/diab.43.10.1185. PMID: 7926286.
- Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993 Dec 31;75(7):1241-4. doi: 10.1016/0092-8674(93)90610-3. PMID: 8269506.
- Weitzel JM. To bind or not to bind - how to down-regulate target genes by liganded thyroid hormone receptor? *Thyroid Res.* 2008 Oct 11;1(1):4. doi: 10.1186/1756-6614-1-4. PMID: 19014660; PMCID: PMC2583983.
- Williams DL. A history of Graves and St. John's. *Eye (Lond).* 2019 Feb;33(2):174-175. doi: 10.1038/s41433-018-0267-0. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30390054; PMCID: PMC6367459.
- Williams GR, Bassett JH. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. *J Endocrinol.* 2011 Jun;209(3):261-72. doi: 10.1530/JOE-10-0448. Epub 2011 Feb 3. PMID: 21292729.
- Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol.* 2000 Nov;20(22):8329-42. doi: 10.1128/MCB.20.22.8329-8342.2000. PMID: 11046130; PMCID: PMC102140.
- Winder WW, Hardie DG, Mustard KJ, Greenwood LJ, Paxton BE, Park SH, Rubink DS, Taylor EB. Long-term regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans.* 2003 Feb;31(Pt 1):182-5. doi: 10.1042/bst0310182. PMID: 12546681.
- Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2000 Jun;88(6):2219-26. doi: 10.1152/jappl.2000.88.6.2219. PMID: 10846039.
- Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical

- stage. *J Pharm Pharmacol*. 2020 Dec;72(12):1667-1693. doi: 10.1111/jphp.13359. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32812252.
- Wooldridge AA, Fortner CN, Lontay B, Akimoto T, Nepl RL, Facemire C, Datto MB, Kwon A, McCook E, Li P, Wang S, Thresher RJ, Miller SE, Perriard JC, Gavin TP, Hickner RC, Coffman TM, Somlyo AV, Yan Z, Haystead TA. Deletion of the protein kinase A/protein kinase G target SMTNL1 promotes an exercise-adapted phenotype in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 2008 Apr 25;283(17):11850-9. doi: 10.1074/jbc.M708628200. Epub 2008 Feb 29. PMID: 18310078; PMCID: PMC2431077.
- Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Mitochondrial T3 receptor and targets. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Dec 15;458:112-120. doi: 10.1016/j.mce.2017.01.054. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28167126.
- Wu Y, Erdodi F, Murányi A, Nullmeyer KD, Lynch RM, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase and myosin phosphorylation in differentiating C2C12 cells. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24(8):499-511. doi: 10.1023/b:jure.0000009810.36038.53. PMID: 14870965.
- Xia D, Stull JT, Kamm KE. Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly. *Exp Cell Res*. 2005 Apr 1;304(2):506-17. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.11.025. Epub 2004 Dec 30. PMID: 15748895.
- Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1097-142. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1097. PMID: 11427693.
- Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE, Green ED, Kohn LD, Suzuki K. Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul;87(7):3356-61. doi: 10.1210/jcem.87.7.8679. PMID: 12107249.
- Zorzano A, Palacín M, Gumà A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2005 Jan;183(1):43-58. doi: 10.1111/j.1365-201X.2004.01380.x. PMID: 15654919.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Lontay Beátának a sokéves közös munka során nyújtott segítségéért és szakmai iránymutatásáért.

Köszönettel tartozom kollaborátorainknak, Dr. Győry Ferenc sebésznek és Dr. Fülöp Péter belgyógyásznak, akik a beteganyag kiválasztásában és a szövetbank létrehozásában segédkeztek.

Köszönöm Dr. Virág László professzor úrnak, intézetünk igazgatójának, hogy lehetővé tette, hogy PhD éveimet az Orvosi Vegytani intézet falai közt tölthessem el.

Köszönet illeti Dr. Póliska Szilárdot (UD Genomed) a microarray analízis elvégzéséért és kiértékelésért.

Köszönettel tartozom Dr. Uray Karennek és Dr. Erdődi Ferenc professzor úrnak az értekezés alapjául szolgáló publikációk nyelvi és szakmai lektorálásáért.

Köszönöm Dr. Docsa Tibornak az egérkísérletben való közreműködését.

Köszönöm Dr. Keller Ilkának a karcolási esszében és a HCS mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm kollégáimnak, Docsa Andreának és Kelemenné Szántó Ágotának a mindennapi kísérletes munka során nyújtott technikai segítségüket és kellemes társaságukat.

Köszönöm Tamás Istvánnak a Seahorse analízis kiértékelésében és a differenciációs kísérletekben való részvételét, valamint, hogy pályafutásom kezdetén bevezetett a labormunka rejtelmeibe, illetve, hogy precizitásával és munkamoráljával példát mutatott.

Köszönöm Horváth Dánielnek az RNS izolálás során végzett munkáját és az immunprecipitációs kísérletekben való közreműködését, valamint, hogy PhD éveim alatt bármikor fordulhattam hozzá segítségért.

Köszönöm barátnőimnek, Adrinak és Mesinek, hogy értő figyelmükkel és értékes meglátásaikkal átsegítettek a nehéz időszakokon.

Köszönettel tartozom vőlegényemnek, Dénesnek, hogy végtelen szerelemmel, türelemmel és megértéssel kísérte végig az utamat.

Hálás vagyok a testvéremnek és szüleimnek, hogy feltétlen szeretetükről biztosítva erőt adtak, hogy elérjem a célom.

Munkámat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal FK125043 pályázat, valamint a Debreceni Egyetem Mecenatúra pályázat és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 projekt támogatta, ami az Európai Unió támogatásával és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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.**, Györy, 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.

