

**A miosztatin mutáns *Compact* egér izom-fenotípusa és
a miosztatin/IGF-I mRNS szintjei patológiás humán
szívekben**

Baán Júlia Aliz

Ph.D. tézis

(magyar nyelvű összefoglaló)

SZTE ÁOK

Biokémiai Intézet

Izomadaptációs Kutatócsoport

Témavezető: Dr. Mendler Luca Ph.D.

Szeged

2015

A miosztatin mutáns *Compact* egér izom-fenotípusa és a miosztatin/IGF-I mRNS szintjei patológiás humán szívekben

Az 1997-ben felfedezett miosztatin a TGF- β család tagjaként a vázizom növekedésének fontos negatív regulátora. Fokozott termelődése a vázizom tömegének csökkenését okozza, például cachexiás betegeknél, izomsorvadásban, illetve öregedéssel kapcsolatos izomvesztés kapcsán. Másrészt számos miosztatin mutációról van már tudomásunk, leírtak természetes mutációkat (Belgian Blue és Piedmontese szarvasmarhákban, szalonagárban, sertésben, birkában és emberben is), illetve létrehoztak mesterségesen génkiütött miosztatin egérmutánsokat is. A jelenleg ismert mutánsok mindegyike hipermuszkuláris fenotípust mutatott, így a miosztatin szintjének modulálása reménykeltő terápiás lehetőségnek tűnik izomvesztéssel járó patológiás állapotokban.

A miosztatin fő termelődési helye a vázizom, ugyanakkor kisebb mennyiségben a szívizomban is kifejeződik. Jelentős szerepet játszik a szív oxidatív metabolizmusának fenntartásában és a szívizomsejtek fiziológiás, illetve patológiás hipertrófiájának szabályozásában. Ennek mechanizmusa, illetve a szív patológiás állapotaiban betöltött szerepe még nem tisztázott. Szívelégtelenségben a szívben és a betegek szérumában is emelkedett miosztatin protein szintet mutattak ki, így biomarkerként, illetve terápiás célpontként való alkalmazására is lehetőség nyílhat.

Az Mstn génről szintetizált protein még éretlen, a biológiailag aktív molekula kialakulása több lépésben történik. Először promiosztatin keletkezik az endoplazmatikus retikulumban, mely vagy intracellulárisan tovább módosul, vagy promiosztatinként szekretálódik, és az extracelluláris mátrixban tárolódik. A promiosztatin hasításával létrejön az érett miosztatin, valamint egy propeptid, az ún. látens asszociált fehérje. A szekréció után, vagy az extracelluláris mátrixból felszabadulva a dimer miosztatin-propeptid komplex a keringésbe jut, ahol egyéb proteázok vagy mátrix metalloproteázok hatására a propeptid lehasad, az érett miosztatin dimer aktívvá válik és a célszervekhez jutva lokálisan és szisztémásan fejti ki hatását. A miosztatin IIB típusú aktivin receptorhoz (ActRIIB) kapcsolódik, amely a kötődés hatására foszforilálja az I-es típusú aktivin receptort (ActRI), és a két receptor dimerizálódik. A miosztatin kötése az ActRIIB-hez a Smad2 és -3 foszforilációját okozza, melynek hatására a Smad2/3 a Smad4-gyel heterodimert képez. A komplex a sejtmagba jutva gátolja a miogenikus faktorok kifejeződését az izomsejtekben,

ezzel gátolva a mioblaszt proliferációt és differenciációt, illetve gátolja a fehérjeszintézist és serkenti a fehérjék degradációját.

Az izomnövekedés szabályozásában a miosztatin mellett az inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I) is kiemelt jelentőséggel bír, azonban az IGF-I a váz- és szívizomzat növekedését pozitívan regulálja. Több szakirodalmi adat utal arra, hogy a miosztatin és az IGF-I kölcsönösen befolyásolják egymás jelátvitelét.

Kutatócsoportunk célja a miosztatin szerepének és hatásmechanizmusának vizsgálata váz- és szívizomban. PhD tanulmányaim keretében két modellrendszerben végeztem vizsgálatokat erre vonatkozólag:

- 1. A miosztatin *Compact* mutációját hordozó egerek vázizmaiban**
- 2. Egészséges és patológiás humán szívmintákban**

1. A *Compact* (*Cmpt*) mutáció a miosztatin génjének természetes mutációja, amely hosszú szelekció, majd beltenyésztés következtében fixálódott az ún. *Cmpt* egerekben. Ezen egerek genetikai háttere komplex: a mutáció nem a miosztatin aktív régióját, hanem a propeptidet érinti, amelyben 12 bázispárnyi, kereteltolódást nem okozó deléció történik. Jelenleg még nem tisztázott, hogy a propeptid *Cmpt* mutációja milyen mechanizmussal eredményezi a miosztatin hatásának elmaradását, de a mutáció ún. modifikátor gén jelenlétében jelentős mértékű izomtömeg-növekedést okoz az egerekben. A modifikátor gén és hatásai még szintén nem ismertek. Munkánk során a *Cmpt* egerek részletes morfológiai és rosttípus-összetétel vizsgálatát végeztük el hím, vad típusú BALB/c egerek analízisével párhuzamosan, és eredményeinket összehasonlítottuk a miosztatin génkiütött egér izmainak szakirodalomból ismert adataival. Megvizsgáltuk, hogy a megnövekedett izomtömeg hátterében a rostok számának (hiperplázia) vagy a rostok méretének (hipertrófia) növekedése áll-e, a rosttípus összetétel esetében pedig a különböző MHC (miozin nehéz lánc/myosin heavy chain) izoformák (gyors típusú MHCII izoformák: glikolitikus MHCIIIB, glikolitikus-oxidatív MHCIIIX, oxidatív MHCIIA és a lassú típusú MHCI) immunhisztokémiai analízisét végeztük el. Továbbá mértük az MHC izoformák transzkript szintjét is qRT-PCR segítségével.

Eredményeink alapján a hipermuszkuláris *Cmpt* egerek gyors típusú tibialis anterior (TA) és extensor digitorum longus (EDL) izmaiban a rostszám szignifikánsan megemelkedett, míg az izomrostok mérete (az EDL izom IIB rostjain kívül) számottevően nem változott. A

kevert típusú soleus (SOL) izom másképpen viselkedett, a kis mértékű hiperplázia mellett inkább az izomrostok mérete nőtt meg jelentősen. A *Cmpt* egerek TA és EDL izmában a glikolitikus IIB rostok száma szignifikánsan megnőtt, míg az oxidatívabb IIX ill. IIA rostok száma szignifikánsan lecsökkent. Ezzel szemben a SOL izomban a lassú típusú I rostok aránya szignifikánsan megemelkedett, míg a gyors oxidatív IIA rostok aránya jelentősen lecsökkent a vad típushoz képest. A qRT-PCR-rel mért MHC transzkript szintek a rostszintű fehérjekifejeződéssel összhangban változtak, tehát a izmok rostösszetételének változása elsősorban transzkript szinten regulálódott. Az általunk leírt glikolitikus rosttípus-váltás a miosztatin génkiütött egerek izmaiban is megfigyelhető volt, így nagy valószínűséggel a miosztatin hatás elmaradásának tulajdonítható. Ennek alapján a miosztatin hasonló metabolikus hatással rendelkezhet a vázizomban, mint a szívizomban, ahol a miosztatin a szív oxidatív anyagcseréjét támogatja, és hiányában a szív anyagcseréje patológiás (glikolitikus) irányba tolódik. Ugyanakkor a *Cmpt* egerek izmainak a génkiütött egerektől eltérő jellemzői (például a hiperplázia dominanciája) arra utalnak, hogy a *Cmpt* egér genetikai háttere (modifikátor gének) is befolyásolja az izmok fenotípusát. Ezen gén vagy gének azonosítása további információval szolgálhat az izomnövekedés mechanizmusával kapcsolatban, és új terápiás célpontokat jelenthetnek az izombetegségek kezelésében.

2. A miosztatin és az IGF-I fontos szerepet játszhat a humán szívelégtelenség patomechanizmusában, ugyanakkor a szakirodalomból hiányzik ezen faktorok és receptorainak összehasonlító génexpressziós vizsgálata egészséges és patológiás szívek különböző régióiban. PhD projektem keretében humán szívminák régiók szerinti qRT-PCR analízisét végeztem el. A bal kamra, jobb kamra és szeptum szívminák egészséges kontrollokból, és dilatatív (DCM), illetve iszkémiás (ICM) kardiomiopátiás páciensekből származtak, melyekből mértük a miosztatin, az aktív receptor IIB (ActRIIB), az IGF-I és az IGF-I receptor (IGF-IR) transzkript szintjét, valamint a miosztatin mRNS mennyiségét negatívan szabályozó miR-208 expresszióját. A mért transzkript szintek egymáshoz viszonyított arányaiból komplex paramétereket képeztünk, és a miosztatin és IGF-I jelátvitelre vonatkozóan vontunk le következtetéseket.

Egészséges kontroll szívekben az izomnövekedés szabályozásában ellentétes hatású miosztatin/IGF-I expresszió aránya szignifikánsan magasabb volt a bal kamra/szeptum régióban, mint a jobb kamrában. A miosztatin transzkript szintje a DCM betegekből származó mintákban jelentősen megnövekedett mindegyik szív régióban, ugyanakkor az egészséges szívekre jellemző aszimmetria (miosztatin expressziós dominancia a bal szívfélben, IGF-I

dominancia a jobb szívfélben) a DCM-es mintákban is megmaradt. Ezzel szemben az ICM-es betegeknel nem változott jelentős mértékben a miosztatin mRNA szintje, ugyanakkor szignifikáns változásokat detektáltunk az IGF-I expressziójában. A miosztatin transzkripcióját negatívan reguláló miR-208 kismértékű emelkedést mutatott mind DCM, mind ICM szívek bal kamrájában, tehát nem az eltérő miR-208 mintázat volt felelős a két betegcsoport jelentősen különböző miosztatin mRNA szintjéért, hanem valószínűleg az eltérő transzkripció reguláció.

Konklúzió/Tézisek

A miosztatin jelátvitel különböző aspektusait írtuk le váz- és szívizomban, két modellrendszer alkalmazva: (i) a miosztatin mutáns hiperizmolt *Cmpt* egeret, és (ii) egészséges, illetve patológiás humán szív mintákat.

1. A *Cmpt* egerek glikolitikus (TA, EDL) és oxidatív (SOL) izmainak részletes morfológiai analízise alapján az egerek megnövekedett izomtömegének hátterében minden esetben hiperplázia (rostszám növekedés) áll, míg rost-hipertrofiát (rostméret növekedést) a TA izomban nem tapasztaltunk, az EDL izom esetében a rostméret növekedése specifikusan a glikolitikus IIB rostokra korlátozódott, az oxidatív SOL izomban pedig az összes rosttípus esetében megfigyelhető volt. A *Cmpt* egerekben tett megfigyelések a miosztatin hiány izomspecifikus morfológiai hatásaira utalnak.
2. A *Cmpt* egerek gyors-típusú glikolitikus izmai (TA, EDL) szignifikánsan több glikolitikus IIB rostot, illetve megnövekedett MHCIIB transzkript szintet mutattak. Irodalmi adatok alapján a miosztatin génkiütött egerekben hasonló glikolitikus eltolódást figyeltek meg, amely valószínűsíti, hogy ezekért a változásokért a miosztatin hiánya a felelős mind a *Cmpt*, mind a génkiütött egerekben. A genetikai háttér (modifikátor gének) szerepére utalhat azonban, hogy a *Cmpt* egerek oxidatív SOL izmában nem jelenik meg glikolitikus irányú változás.
3. A humán szívekkel kapcsolatos tanulmányunk eredményei alapján egészséges humán szív minták bal kamrájában a miosztatin jelátvitel dominál az IGF-I felett, szemben a jobb kamrai IGF-I dominanciával. A miosztatin/IGF-I expressziós arány térbeli asszimmetriája valószínűleg fontos szerepet játszik a bal és jobb kamra növekedésének eltérő szabályozásában.

4. A miosztatint mint erőteljesen up-regulált gént azonosítottuk DCM-ben, amely egy potenciális kompenzáló mechanizmus részének tekinthető a szívelégtelenség patomechanizmusában; ugyanakkor ICM-ben ilyen jellegű változást nem detektáltunk.
5. A miR208b mérsékelt up-regulációja patológiás humán szívekben a miosztatinnal ellentétes szabályozó mechanizmusként szolgálhat. Mivel a miR-208b expressziója hasonló volt DCM és ICM szívekben, a DCM-ben tapasztalt emelkedett miosztatinnal mRNS szintet a transzkripció fokozódása okozhatja.

A tézis alapjául szolgáló közlemények

I. Baán JA, Kocsis T, Keller-Pintér A, Müller G, Zádor E, Dux L, Mendler L (2013) The Compact mutation of myostatin causes a glycolytic shift in the phenotype of fast skeletal muscles. *J Histochem Cytochem.* 61:889-900.

IF: 2.403

II. Baán JA[#], Varga VZ[#], Leszek P, Kusmierczyk M, Baranyai T, Dux L, Ferdinandy P, Braun T, Mendler L (2015) Myostatin and IGF-I signaling in end-stage human heart failure: a qRT-PCR study. *Journal of Translational Medicine.* 13(1):1-9. DOI: 10.1186/s12967-014-0365-0

IF:3.99

[#] megosztott első szerzők