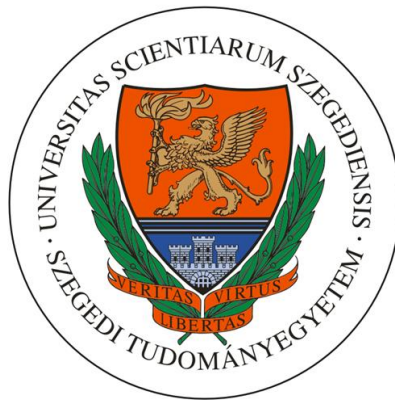


**Szöveti glikogéneloszlás és metabolikus változások  
a hipermuszkuláris, miosztatin mutáns  
*Compact* egérben**

**Dr. Kocsis Tamás, MD**

**Ph.D. tézis**



**SZTE ÁOK**

**Biokémiai Intézet**

**Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

**Témavezető: Dr. Keller-Pintér Anikó, MD, Ph.D.**

**Szeged**

**2017**

**KÖZLEMÉNYEK****1. A tézis alapjául szolgáló közlemények:**

**Kocsis T**, Baán J, Müller G, Mendler L, Dux L, Keller-Pintér A. Skeletal muscle cellularity and glycogen distribution in the hypermuscular *Compact* mice. *Eur J Histochem* 58: 2353, 2014. [IF: 2.042]

**Kocsis T**, Trencsenyi G, Szabo K, Baan JA, Muller G, Mendler L, Garai I, Reinauer H, Deak F, Dux L, Keller-Pinter A. Myostatin propeptide mutation of the hypermuscular *Compact* mice decreases the formation of myostatin and improves insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 312(3): E150-E160, 2017. [IF: 4.142\* (2016)]

**2. A tézishez nem kapcsolódó egyéb közlemény:**

Baán JA, **Kocsis T**, Keller-Pintér A, Müller G, Zádor E, Dux L, Mendler L. The *Compact* mutation of myostatin causes a glycolytic shift in the phenotype of fast skeletal muscles. *J Histochem Cytochem* 12: 889-900, 2013. [IF: 2.412]

## **BEVEZETÉS**

### **Miosztatin**

A miosztatin (mstn, Growth/Differentiation Factor 8) a TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) szupercsalád tagja és a vázizomtömeg meghatározó szabályzója. Hiánya a vázizom tömegének drámai megnövekedését eredményezi, valamint az izomrostok hipertrófiáját és hiperpláziáját okozza. Természetes körülmények között kialakult miosztatin génmutációkat írtak már le többek között emberben, egérben, valamint szarvasmarhában. Ezen állatok fenotípusának közös jellemzője a megnövekedett izomtömeg (ún. double-muscled fenotípus). A többi TGF- $\beta$  családtaghoz hasonlóan a miosztatin is egy inaktív prekursor protein formájában szintetizálódik, amely a szignálpeptidből, továbbá a promiosztatinból épül fel. A promiosztatin a proprotein konvertáz furin proteázok hatására az Arg-Ser-Arg-Arg szekvenciánál képes felhasadni egy N-terminális propeptidre és a C-terminálisan elhelyezkedő, a biológiai aktivitásért felelős miosztatinra.

### **Miosztatin jelpálya és a vázizomtömeg szabályzása**

A miosztatin a hatását a II típusú aktivin receptorokon keresztül fejti ki, amelyek egy heteromér komplexet képeznek az I típusú anaplasztikus limfóma kináz receptorokkal (ALK4 vagy ALK5), így aktiválva a miosztatin specifikus jelpályát. A miosztatin aktiválja Smad2/3 transzkripciós faktorokat, valamint befolyásolja a vázizom anabolikus és katabolikus folyamataira hatást gyakorló foszfatidil-inozitol 3-foszfát (PI3K)/Akt jelpálya aktivitását is. A miosztatin mellett a vázizomtömeget a pozitív regulátor BMP (Bone Morphogenic Protein) jelpálya is szabályozza. Ismert, hogy a BMP7 expressziójának a növekedése, vagy a BMP receptorok aktivitásának fokozódása a Smad1/5/8 jelpálya erősödésén keresztül izomhipertrófiát eredményez. A miosztatin és a BMP-jelpálya közös eleme a Smad4, amely szintén szerepet játszik az izomtömeg szabályzásában, valamint az izomatrófia kialakulásnak megelőzésében.

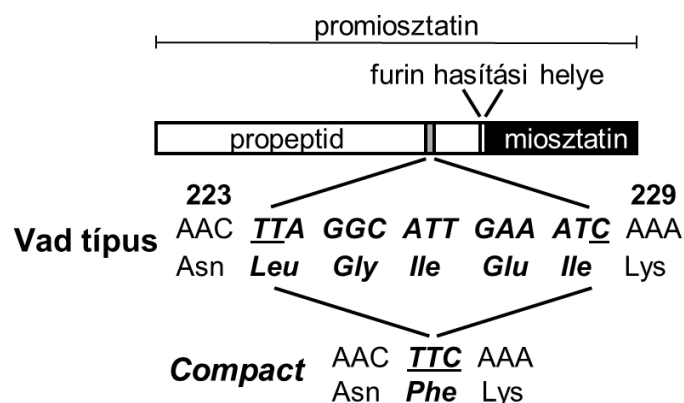
### **A miosztatin metabolikus hatásai**

A miosztatin hatása nem korlátozódik csupán a vázizomra, hanem szisztémás, metabolikus hatásai is vannak. A miosztatin génkiütött egerek a megnövekedett izomtömeg mellett csökkent zsírtömeeggel, és fokozott AMPK mediálta inzulin érzékenységgel

rendelkeznek. Összhangban a fokozott inzulin érzékenységgel, a miosztatin génkiütött egerek izmaira jellemző a GLUT4 (Glucose transporter type 4), pAkt, IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) szintek növekedése. Ismert, hogy a propeptid transzgenikus expressziója megelőzi a diéta-indukálta elhízást, és az így kialakuló inzulin rezisztenciát. A follisztatin 3 (TGF- $\beta$  faktorok inhibitora) overexpressziója vagy a miosztatin hatásának a gátlása domináns-negatív receptorokkal szintén javítja az inzulinérzékenységet. A miosztatin az autokrin és parakrin hatásai mellett endokrin hatásokkal is rendelkezik, befolyásolja a májban az IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) szintézisét és szekrécióját, ezáltal szabályozva a vérben keringő IGF-1 mennyiségét.

### A *Compact* mutáció és a *Compact* egér fenotípusa

A hiper-muszkuláris *Compact* egértörzs a Berliini Műszaki Egyetemen végzett, az egerek megnövekedett fehérjetartalmára irányuló szelektációs kísérletek során jött létre. Később géntérképezéssel a miosztatin gén propeptid régiójában 12 bázispárnyi deléciót [*Mstn(Cmpt-dl1Abc)*] azonosítottak, amely nem okoz kereteltolódást, valamint nem érinti a biológiailag aktív miosztatin régiót és a propeptid megrövidülését eredményezi (1. ábra). Ennélfogva a miosztatin aktivitásának a csökkenése nem magyarázható a biológiailag aktív szakasz diszrupciójával. Lehetséges azonban, hogy ez a deléció miszfoldinghoz vagy miosztatin szekréciójának a célszövetbe való jutattásában okozhat zavart.



1. ábra. A promiosztatin *Compact* mutációja.

A *Compact* egér fenotípusát azonban más, eddig még nem azonosított gének, ún. modifikátor gének is befolyásolják. Ezeknek a géneknek a lehetséges helyét genetikai térképezéssel az 1, 3, 5, 7, 11, 16 és X kromoszómákra lokalizálják.

A munkánkhöz a *Compact*, valamint vad típusú miosztatin allélt hordozó, de *Compact* genetikai háttérrel rendelkező, illetve vad típusú miosztatin alléllal és vad típusú genetikai háttérrel rendelkező egértörzseket használtunk. Ezáltal lehetővé vált a *Compact* miosztatin és a genetikai háttér hatásainak elkülönülten történő vizsgálata.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

A munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. A *Compact* egerek testfelépítésének vizsgálata
2. A szöveti glikogéntartalom és az izomrosttípusok glikogéntartalmának a vizsgálata
3. A *Compact* mutáció és a genetikai háttér metabolikus hatásának vizsgálata – hatás a glükóz anyagcserére
4. A *Compact* mutáció hatása a miosztatin képződésére
5. A *Compact* mutáció és genetikai háttér jelátvitelre gyakorolt hatásának vizsgálata – a fenotípus háttérében álló lehetséges jelátviteli utak analízise

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **Állatmodellek és mintagyűjtés**

Kísérleteinket hím 3-4 hónapos és 10 hónapos, homozigóta *Compact* (*Compact* miosztatin, *Compact* genetikai háttér), kongenikus vad típusú (vad típusú miosztatin, *Compact* genetikai háttér) és BALB/c (vad típusú miosztatin, vad típusú genetikai háttér) egereken végeztük a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával, összhangban a National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory animals (NIH Pub. No. 85-23, 1996) protokolljával. A kongenikus vad típusú egérvonal kialakításához a *Compact* állatokat a vad típusú miosztatin allélt hordozó BALB/c egerekkel kereszteztük. Az így kapott F1 nemzedék tagjait egymással keresztezve kaptuk meg az F2 nemzedéket, amelyből azokat a nőstényeket, amelyek heterozigóták voltak a miosztatin génben a 12 bp delécióra, kereszteztük hím homozigóta *Compact* egyedekkel, ez volt az első backcross keresztezés. További 4 backcross keresztezést követően a heterozigóták egymással történő párosításával

kaptuk a vad típusú miosztatinra homozigóta, *Compact* genetikai háttérű egyedeket. A munkáinkhoz a quadriceps femoris (QF), gastrocnemius (Gastro) és tibialis anterior (TA) izmokat valamint a belső szerveket (szív, vese, máj, hasi zsír) használtuk fel. A szerveket az eltávolítás után azonnal izopentánban hűtött folyékony nitrogénben fagyasztottuk és a további felhasználásig - 80°C-on tároltuk.

### **Teljes szöveti glikogén- és proteintartalom meghatározása**

Az izom és a máj glikogéntartalmát a minták savas hidrolízisét követően keletkező glükóz spektrofotometrás mérésével határoztuk meg. A folyékony nitrogénben porított mintákat 100°C-os sósavban emésztettük, így a szöveti glikogén glükózzá bomlott fel. A sósavas emésztést követően a sósavat ekvimoláris mennyiségű nátrium-hidroxiddal semlegesítettük, majd szobahőmérsékletűre hagytuk hűlni. A minták centrifugálását követően a felülúszót eltávolítottuk, amelyből hexokináz esszével (Roche, Mannheim, Németország) a gyártó utasításainak megfelelően meghatároztuk a glükóz koncentrációt. A teljes proteinmennyiség meghatározásához az izom és a májmintákat foszfatázgátlókkal és proteázinhibitor koktéllal kiegészített magas detergenstartalmú pufferben elhomogenizáltuk. A hideg pufferben való inkubálást követően a mintákat lecentrifugáltuk, majd a felülúszóból BCA Protein Assay-vel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) Fluostar Optima spektrofotométerrel (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) meghatároztuk a proteinkoncentrációt.

### **PAS-festés**

A szöveti glikogéntartalmat perjódsav - Schiff (PAS) festéssel határoztuk meg fagyasztott TA és máj metszeteken. A metszeteket etanolos formaldehidben fixáltuk majd perjódsavas oldatban inkubáltuk. A mosásokat követően a metszeteket Schiff reagensben inkubáltuk amelyet nátrium-metabiszulfid oldatban való áztatás követett. A metszeteket végül csapvízben, majd desztillált vízben, felszálló alkoholsorban és toloulban a víztelenítettük, végül a metszeteket Entallánnal fedtük.

## **Immunhisztokémia**

A rosttípus analízishez a TA izom középső részéből fagyasztott metszeteket készítettünk. Az aspecifikus kötőhelyeket blokkoltuk, majd a metszetet monoklonális egér elsődleges antitesttel inkubáltuk. BA-D5, sc-71, BFF3 elsődleges antitesteket használtunk, amelyek a Myosin Heavy Chain I (MyHCI), MyHCIIA és MyHCIIB epitópokra specifikusak. Ezt követően a metszketet peroxidáz-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk és az immukomplex által adott specikus jelet 3,3'-diaminobenzidinnel erősítettük fel. A metsztekben nem tudtunk BA-D5 pozitív (MyHCI) rostokat kimutatni, ennél fogva a rostok vagy MyHCIIA vagy MyHCIIB esetleg MyHCIIX típusak voltak.

## **A teljes keresztmetszetre vonatkoztatt glikogéntartalom és rostsám meghatározása**

A teljes izomkeresztmetszetet Nikon Labophot-2 mikroszkóp Olympus DP71 mikroszkópos kamerával látóterenként lefotóztuk majd a látóttereket Cell\*B szoftver segítségével panorámaképpé rekonstruáltuk (Olympus DP Soft software, Version 3.2., Soft Imaging System GmbH; Münster, Németország). Az egyedi izomrostok glikogéntartalmát a PAS-festés alapján mért átlagos intenzitás érték és a rostterület szorzataként határoztuk meg. A teljes keresztmetszeten az összes rost átlagos intenzitás értékeit (0-1 OD) és keresztmetszetét a PAS-festett szürkeskálára konvertált panorámaképeken határoztuk meg a rostok manuális körberajzolásával Digimizer szoftverrel (Medcalc software, Mariakelke, Belgium).

## **Rosttípusok glikogéntartalmának meghatározása**

A rosttípus-specifikus átlagos intenzitást és rostátmérőt 2-3 reprezentatív látótérből a felszíni és mély régiókból határoztuk meg a szürkeskálára konvertált PAS-festett metszetekből. A PAS-festett metszetekkel párhuzamosan készült sc-71 antitesttel (MyHCIIA) és BF-F3 antitesttel (MyHCIIB) festett metszetek megfelelő régiót hozzárendelve a fentiek szerint leírt módon megkaptuk a rosttípusonkénti glikogéntartalmat.

## **Western blot**

A különböző fehérjék expressziós szintjét M. gastrocnemius és máj mintákból határoztuk meg. A mintákat proteáz inhibitor koktéllal és foszfatáztgátlókkal kiegészített

pufferral elhomogenizáltuk. A feltárást, a centrifugálást és a koncentráció-meghatározást követően a mintákat 10 %-os SDS poliakrikamid gélen szeparáltuk, majd Protran nitrocellulóz membránra transzferáltuk (Amersham, GE Healthcare). A blokkolást követően a membránt primer antitesttel festettük meg, majd HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az immunreakciót kemilumineszcencián alapuló reakcióval röntgen filmen jelenítettük meg. A filmeket digitalizáltuk, majd analizáltuk.

### **Szöveti alanin-aminotranszferáz enzimaktivitás meghatározása**

A májszöveti alanin-aminotranszferáz (ALT) enzimaktivitást laktát-dehidrogenenáz kapcsolt kolorimetrikus esszével határoztuk meg (Diagnosticum Inc., Budapest).

### **Intraperitoneális piruvát-, glükóz- és inzulintolerancia meghatározása**

A piruvátterhelési tesztet 3-4 hónapos, éheztetett hím állatokon végeztük. Az intraperitoneális (ip.) piruvát injekciót követően (2 mg piruvát / 1 g testtömeg) a vénás vércukorszinteket a 15, 30, 45, 60, 90 és 120 perces időpontokban határoztuk meg. A glükózterhelést és az inzulintolerancia tesztet hím 3-4 és 10 hónapos éhezett állatokon végeztük. Az ip. glükózinjekciót (2 mg glükóz / 1 g testtömeg) követően a vénás vércukorszinteket a 30, 60, 90 és 120 perces időpontokban mértük meg, míg az ip. inzulin bólus (1.0 U / 1 kg testtömeg; Humulin R, Eli Lilly, B.V Grootslag, Hollandia) beadását követően a 15, 30, 45, 60, 90 és 120 perces időpontokban.

### **Szöveti glükózfelvétel vizsgálata kisállat PET/MRI-vel**

A vizsgálathoz 10 hónapos hím egereket farki vénájába  $^{18}\text{F}$ FDG-t (2-deoxi-2- $^{18}\text{F}$ fluoro-D-glükóz) injektáltunk. A teljestest PET scan felvételek készítéséhez nanoScan PET/MRI rendszert használtuk. A szervek anatómiai lokalizációjának vizsgálatához T1-súlyozott MRI felvételeket készítettünk, amelyekre PET térfogatok kerültek megjelenítésre, a Ordered Subsets Expectation Maximization (3D-OSEM) szoftverrel végzett 3 dimenziós rekonstrukciós algoritmus eredményeként (Tera-Tomo, Mediso Ltd., Magyarország). A rekonstruált, reorientált felvételeket InterView™ FUSION (Mediso Ltd.) szoftverrel értékeltük ki. A beadott izotópfelvételt az idő függvényében a stardardized uptake values (SUVs) értékekkel fejeztük ki. Az ellipszoidális, 3 dimenziós vizsgálandó területeket



(Volumes of Interest, VOI) manuálisan rajzoltuk körbe a InterView™ FUSION szoftver segítségével.

### **Statisztikai kiértékelés**

A statisztikai kiértékelést egyutas ANOVA és Newman-Keuls post-test alkalmazásával vagy párosítatlan t-próbával végeztük el a Prisma statisztikai szoftver felhasználásával (GraphPad Software Inc., USA).

## **EREDMÉNYEK**

### **A *Compact* egerek testfelépítésének jellemzése**

A *Compact* genetikai hátteret és vad típusú miosztatint allélt hordozó kongenikus vad típusú egerek nagyobb tömegűek voltak mint a BALB/c állatok. A TA, Gastro izmok abszolút tömege közel kétszer akkora volt a *Compact* egerekben, mint a kongenikus vad típusúakban, míg ugyanezen izmok a BALB/c állatokban voltak a legkisebbek. A testtömegre normalizált izomtömegek a *Compact*ok esetében voltak a legnagyobbak, míg a kongenikus vad típusú állatokban voltak a legkisebbek. A hasi zsír abszolút tömege ~30 %-kal volt nagyobb a 3-4 hónapos és ~50 %-kal a 10 hónapos kongenikus vad típusú állatokban mint a *Compact*okban, a BALB/c egerek abszolút hasi zsírtömege pedig markánsan kisebb volt a *Compact*okhoz viszonyítva. A máj/testtömeg értékek a *Compact*ok esetén kisebbek voltak a kongenikus vad típusúhoz viszonyítva, mind a 3-4 illetve a 10 hónapos állatok esetén. Azonban a hasi zsír/testtömeg értékek körülbelül azonosak voltak mind a *Compact* és BALB/c állatoknál, azonban a kongenikus vad típusú egerek hasi zsír/testtömeg értéke közel kétszerakkora volt a többi genotípushoz viszonyítva. A testtömegre normalizált szív és vese tömegek a *Compact*ok esetén voltak a legkisebbek és míg a BALB/c egereknél voltak a legnagyobbak.

### **A *Compact* mutáció hatása a szöveti glikogén- és proteintartalomra**

A *Compact* izmok tartalmazták a legtöbb glikogént, míg a kongenikus vad típusú és BALB/c izmok glikogéntartalma között nem volt különbség. A muszkuláris glikogénkoncentrációban nem volt eltérés a *Compact* és a kongenikus vad típusú csoportok között, azonban a BALB/c állatok glikogénkoncentrációja bizonyult a legnagyobbnak. A máj abszolút glikogéntartalmát meghatározva nem volt különbség a *Compact* és a kongenikus vad

típusú csoportok között. Ezzel ellentétben a májtömegre normalizált glikogéntartalom a BALB/c állatokban ~2,5-szer volt kisebb, amelyet PAS-festett máj metszetekkel is megerősítettünk.

A teljes proteintartalmat meghatározva a vizsgált alsó végtagi izmokban azt találtuk, hogy a *Compact* izmok tartalmazták a legtöbb proteint, míg a kongenikus vad típusú és a BALB/c izmok kisebb proteintartalmúak voltak, összhangban a teljes glikogénmennyiséggel. A *Compact* májak tartalmazták a legnagyobb mennyiségű proteint, míg a kongenikus vad típusú egerek mája a legkisebb mennyiséget.

### **A rostonkénti glikogéntartalom jellemzése a M. tibialis anterior izomban**

A *Compact* izomrostoknak sem az átlagos intenzitása sem a területe nem mutatott eltérést a vad típusú rostokhoz képest. A rostonkénti glikogéntartalmat összehasonlítva nem találtunk szignifikáns eltérést a *Compact* és a vad típusú rostok között. A rostszaám a *Compact* izomban ~1,7-szer volt nagyobb a vad típusú izomhoz képest.

A rostonkénti átlagos glikogéntartalom értékeket megszorozva a rostszaámmal a teljes izomkeresztmetszetre vonatkoztatott glikogéntartalmat kaptuk meg, amely jól korrelált a spektrofotometriás mérésekkel: a PAS-festett *Compact* izomkeresztmetszetek kétszerakkora mennyiségű glikogént tartalmaztak mint a vad típusúak. Így megállapíthatjuk, hogy a *Compact* izomban a rostonkénti glikogéntartalom változatlan maradt, míg a rostszaám megemelkedett, így ez magyarázhatja a *Compact* izom megnövekedett glikogéntartalmát.

### **A rosttípusonkénti glikogéntartalom és eloszlásának jellemzése a M. tibialis anterior izomban**

A *Compact* tibialis anterior izmok rostfestéseit elvégezve, összhangban az irodalommal, nem tudtunk MyHCI festődésű rostot kimutatni. A IIB típusú rostok aránya lényegesen nagyobb volt a *Compact* izomban és ezzel összhangban csökkent a IIX és IIA rostok aránya, jelezve a *Compact* izom rostösszetételének glikolitikus irányba történt eltolódását. Mivel a *Compact* izomban a IIA rostok száma rendkívül alacsony volt, ezért ezt a továbbiakban nem vizsgáltuk. A különféle rosttípusok keresztmetszetét összehasonlítva a rostátmérőkben különbségek voltak megfigyelhetőek. A vad típusú izomban a IIB rostok keresztmetszete ~1,44-szer volt nagyobb mint a IIX rostoké valamint a IIX rostok ~1,52-szer

voltak nagyobbak mint a IIA típusúak. A *Compact* izomban hasonló eredményt találtunk: a IIB rostok keresztmetszete ~1,62-szer volt nagyobb mint a IIX rostoké. A *Compact* és vad típusú IIB valamint IIX rostok területét összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget. A IIB és IIX rostok méreteit hisztogrammon ábrázolva, a görbék hasonló alakot mutattak mind *Compact* mind a vad típusú rostok esetén. Mind a *Compact* mind a vad típusú IIX rostok területének hisztogramma egy jobbra ferde típusú eloszlást mutatott, míg a IIB rostok területeinek hisztogrammjának alakja a mindkét egértörzs esetén harangalakú volt. A felszínes és mély régiók rostjainak összehasonlításánál mind a *Compact* mind vad típusú izmok esetében a fentiekhez hasonló eredményt találtunk.

A *Compact* és a vad típusú izomban is meghatároztuk a különféle rosttípusok átlagos intenzitását. A teljes keresztmetszetre vonatkoztatva azt találtuk, hogy a IIA>IIX>IIB sorrendben változott az átlagos intenzitás mindkét típusú genotípusú izomban. Ugyanez a tendencia volt megfigyelhető a felszínes és a mély régiókban is. Azonban a rosttípusok átlagos intenzitásának hisztogramma különböző volt a *Compact* és a vad típus között: a *Compact* TA izom tartalmazott egy magasabb átlagos intenzitású IIX rostpopulációt, valamint egy alacsonyabb és egy magasabb átlagos intenzitású IIB rostpopulációt. Ezen rostpopulációk egy szélesebb hisztogrammot eredményeztek a *Compactok* esetén.

A továbbiakban összehasonlítottuk mindkét egértörzs rostjainak a glikogéntartalmát. A teljes keresztmetszetre vonatkoztatva nem volt szignifikáns eltérés a különböző genotípusú rostok glikogéntartalma között. A két egértörzs izmainak felszínes és mély régióit összehasonlítva hasonló tendencia volt megfigyelhető, mint a teljes keresztmetszet esetén. Azonban a vad típusú izom a felszínes régiójában a IIB rostok átlagos glikogéntartalma nagyobb volt mint a IIA rostoké. A rostokénti átlagos glikogéntartalmat hisztogramma alapján a *Compact* TA izom tartalmaz egy magasabb glikogéntartalmú IIX rostpopulációt illetve egy alacsonyabb és magasabb glikogéntartalmú IIB rostpopulációt.

A TA izom különböző rosttípusaiban jelenlevő teljes glikogéntartalom meghatározásához glikogénindexet számoltunk. A IIB rostok glikogénindexe volt a legnagyobb, ami alapján a IIB rostok tartalmazzák a legtöbb glikogént a *Compact* és BALB/c izomban. A IIX rostok glikogénindexe ~2,7-szer nagyobb volt a BALB/c állatok TA izmában mint a *Compactok* viszonyítva. Ezzel ellenétben a *Compact* IIB rostok glikogénindexe ~1,5-

szőr volt nagyobb mint a BALB/c állatoké, összhangban a *Compact* izomban a IIB rostok nagyobb arányával.

### **A *Compact* miosztatin javítja a glükóztoleranciát és az inzulinérzékenységet, míg a genetikai háttér rontja**

A három állatcsoportot éhomi vércukor értékeit összehasonlítva nem találtunk szignifikáns változást sem a 3-4 hónapos, sem a 10 hónapos csoportban. Azonban az exogén módon beadott glükózra a különböző genotípusok eltérő választ adtak. A *Compact* és a BALB/c egerek mind a 3-4 és 10 hónapos csoportban jobb glükóztoleranciával rendelkeztek, mint a kongenikus vad típusú egerek. A glükóztolerancia tesztek során mért vércukorkoncentrációkból számolt AUC (Area Under Curve) értékek magasabbak voltak mindkét életkorú állatcsoportban a kongenikus vad típus esetén.

Az inzulinérzékenység megállapítása céljából inzulintolerancia tesztekét végeztünk. Az inzulin beadását követően mindkét életkorú csoportban és mindhárom egértörzsben csökkentek a vércukorértékek. Mind a 3-4 és 10 hónapos csoportokban a kongenikus vad típusú egerek csökkent inzulinérzékenységet mutattak a *Compact* és BALB/c csoportokhoz viszonyítva. Azonban a terhelési görbék alapján számolt AUC értékek mindkét életkorú csoportban a kongenikus vad típus esetén voltak a legnagyobbak.

### **A *Compact* miosztatin fokozza a glükózfelvételt a vázizomban, fehér zsírszövetben és a májban**

A vázizom  $^{18}\text{FDG}$ -felvétele nagyobb volt *Compact* és BALB/c állatokban a kongenikus vad típusú egerekhez képest. A fehér zsírszövet izotópfelvétele hasonló volt a vázizomhoz: a glükózfelvétel nagyobb volt a *Compact* és BALB/c állatokban a kongenikus vad típusú egerekhez képest. A *Compact* máj mutatta a legnagyobb SUVmean értéket, majd csökkenő sorrendben a kongenikus vad típus és a BALB/c következett.

### ***Compact* egerek májfunkciójának jellemzése**

Ismert, hogy a miosztatin génkiütött egerek abszolút májtömege nem változik valamint alacsonyabb máj/testtömeg aránnyal rendelkeznek és a testtömegre normalizált májszöveti ALT aktivitásuk is csökkent. Mivel a sem az abszolút, sem a testtömegre normalizált

májtömeg nem volt nagyobb a hipermuszkuláris *Compact* állatokban, ezért feltételeztük a májszöveti ALT aktivitás változását. Az eredményeink alapján a testtömegre vonatkoztatott májszöveti ALT aktivitás a *Compact* állatokban volt a legalacsonyabb míg a BALB/c egerekben volt a legnagyobb. Az intraperitoneális piruvát teszt alapján azt találtuk, hogy a hepatikus glükoneogenezis a *Compact* és a kongenikus vad típusú állatokban nagyobb volt a BALB/c egerekhez viszonyítva.

### **A *Compact* mutáció hatása a miosztatin képződésére**

Mivel a *Compact* mutáció 12-bp nagyságú, kereteltolódást nem okozó mutáció, a biológiailag aktív növekedési faktor domént nem érinti, így potenciálisan lehetővé teheti a miosztatin képződését. A *Compact* harántcsíktolt izomban western blottal ki tudtuk mutatni a miosztatin dimert. Western blot eredmények alapján, az izomtömegekkel összhangban, a *Compact* izomban volt a legkisebb, míg a BALB/c izomban a legmagasabb a szintje. Az általunk használt propeptid ellenes antitest felismeri a mutáns propeptidet is. A detektált propeptid szintek minden állatcsoportban arányban volt a miosztatin szintekkel, így a *Compact* izmokban volt a legalacsonyabb.

### **A *Compact* miosztatin és a genetikai háttér hatása az izom- és a májtömeg szabályzására**

A pSmad2 szint a *Compact* izomban volt a legmagasabb a csökkent miosztatin szint ellenére, jelezve más TGF- $\beta$  faktorok szerepét a Smad2 aktivációjában. A májban a pSmad2 szintje a *Compact* állatokban volt a legnagyobb, míg a BALB/c állatokban volt a legalacsonyabb. Az izomban pSmad1/5/8 szintje megnövekedett a *Compact* egerekben a kongenikus vad típusú állatokhoz viszonyítva. Azonban máj a pSmad1/5/8 szintek nem mutattak szignifikáns különbséget a három egértörzs között. A Smad4 szintek egyenletesek voltak mindegyik egértörzs izmában és májában. A májban a pAkt<sup>Ser473</sup>/Akt arány a *Compact* állatok esetén mutatta a legnagyobb értéket, míg a kongenikus vad és a BALB/c csoportok között nem volt eltérés. Azonban a pAkt<sup>Ser473</sup>/Akt arány a *Compact* izmokban magasabb volt a BALB/c-hez viszonyítva, összhangban a miosztatin szintekkel.

### ***Compact* miosztatin és a genetikai háttér hatása a glükózfelvétel szabályzására**

AS160 (Akt substrate of 160 kDa) egy Rab GTP-ázokat aktiváló protein, felelős a GLUT4 glükóz transzporternek az inzulin hatására a sejtmembránba történő transzlokációjáért.

A pAS160 szintje a kongenikus vad típusú izmokban volt a legalacsonyabb a *Compact* és vad típusú állatokhoz viszonyítva. A GLUT4 expressziós szintje közel egyforma volt a *Compact* és kongenikus vad típusú állatok izmában és a legalacsonyabb a BALB/c izmokban volt.

### **ÚJ EREDMÉNYEK, ÖSSZEFOGLALÁS**

Munkánk során a *Compact* mutáció hatását vizsgáltuk a vázizom morfológiájára, a szöveti glikogéneloszásra, az anyagcserére, valamint a jelátvitelre. Kísérleteinkhez a *Compact* állatokon kívül vad típusú miosztatin allélt hordozó, de *Compact* genetikai háttérrel rendelkező kongenikus vad típusú, valamint vad típusú miosztatin allélt hordozó és vad típusú genetikai háttérrel rendelkező BALB/c egértörzseket használtunk.

Elsőként írtuk le a *Compact* mutáció hatását a szöveti glikogéneloszlásra, cukor-anyagcserére, valamint az egyes izom- és májnövekedésben, glükózfelvételben szerepet játszó jelátviteli utakra, valamint a hatását promiosztatin proteolízisére (**2. ábra**).

1. A *Compact* mutáció és a genetikai háttér is szerepet játszik a vázizom tömegének a növekedésében.
2. A *Compact* egerek izomtömeg-növekedését a megnövekedett glikogén- és proteintartalom okozza.
3. A glikogéntartalom növekedésének háttérében a *Compact* izom hiperpláziája, a IIB és IIX rostok számának növekedése áll, mivel a rostokénti glikogéntartalom nem változik.
4. A *Compact* miosztatin mutáció és a genetikai háttér is rendelkezik szisztémás metabolikus hatásokkal.

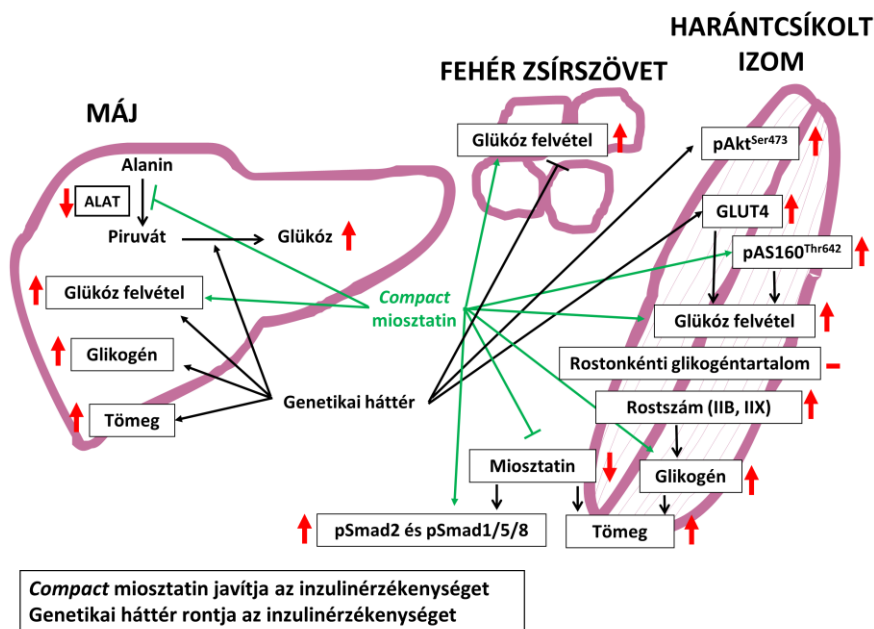
5. Az izomtömeg növekedését nem kíséri a belső szervek (szív, vese, máj, hasi zsír) abszolút tömegének növekedése a *Compact* mutáció hatására.

6. A genetikai háttér növeli a máj abszolút tömegét, glikogéntartalmát, fokozza a glükóz felvételt és a hepatikus glükoneogenezist.

7. A *Compact* miosztatin a zsírszövet méretének csökkenését eredményezi, javítja az inzulinérzékenységet, fokozza az izom és a zsírszövet glükózfelvételét, míg a genetikai háttér hatása ellentétes.

8. A *Compact* mutáció nem gátolja meg a promiosztatin proteolízisét, de a miosztatin csökkent képződéséhez vezet, amely a Smad2, Smad1/5/8 és Akt utak megváltozott aktivitását eredményezi.

9. Az AS160<sup>Thr642</sup> foszforilációjának a *Compact* mutáció hatására bekövetkező növekedése hozzájárulhat a vázizom glükózfelvételének fokozódásához.



2. ábra. A tézis eredményeinek összefoglalása. A *Compact* miosztatin és a genetikai háttér egymást kompenzálva hat a cukoranyagcserére.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkánk az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg, a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt, az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-17-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00006 és a GINOP-2.3.2-15-2016-00040 projektek keretében.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dux László Professzor Úrnak, hogy lehetőséget adott és támogatott abban, hogy részt vehessek a Biokémiai Intézet oktató és kutató munkájában.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Keller-Pintér Anikónak, a témavezetői munkájáért, valamint a segítségéért mind az egyetemi éveim mind a PhD munkám alatt. Külön köszönettel tartozom, hogy bevezetett tudományos munkába és gondolkodásba.

Szeretném köszönetem kifejezni szerzőtársaimnak, különösen Dr. Trencsényi Györgynek a PET/MRI mérések elvégzéséért és kiértékeléséért, valamint Dr. Müller Gézának az egértörzsek kialakításában nyújtott tanácsaiért, továbbá Prof. Dr. Deák Ferencnek a kéziratok megírásában nyújtott kritikai észrevételeiért.

Köszönettel tartozom Szabó Kittinek a kritikus kísérletek során nyújtott segítségéért. Külön köszönettel tartozom Csontos Lászlóné, Erzsikének a munkám során nyújtott asszisztensi munkájáért és támogatásáért, valamint Balásházy Istvánné és Makráné Felhő Zita asszisztensnőknek.

Szeretnék köszönetet mondani a Biokémiai Intézetben minden korábbi munkatársamnak a segítségéért és támogatásáért.

Végezetül szeretném köszönetem kifejezni a családomnak, hogy támogatták a munkámat.