

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A citoszkeletális Szeptin7 fehérje szerepének vizsgálata C2C12 sejt kultúrákon

Dr. Ráduly Zsolt

Témavezető: Dr. Szentandrásyné Gönczi Mónika



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2023

A citoszkéletális Szeptin7 fehérje szerepének vizsgálata C2C12 sejtkultúrákon

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

Írta: Dr. Ráduly Zsolt okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szentandrásyné Gönczi Mónika

Az értekezés bírálói:

Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
Dr. Kristóf Endre Károly, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Virág László, az MTA Doktora
tagok:	Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
	Dr. Kristóf Endre Károly, PhD
	Dr. Demény Máté Ágoston, PhD
	Trencsényiné Dr. Balázs Bernadett Éva, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2024. január 31. 14 óra

1. Bevezetés

A vázizomsérülések során a gyors regenerációnak kiemelt egészségügyi-, szociális- és gazdasági szerepe van. A legtöbb új gyógyszer engedélyezésekor a mellékhatásprofilban mindig fel kell tüntetni a vázizmot érintő mellékhatásokat, mivel komoly farmakovigilanciái kockázattal bírnak. Bármilyen új információ a vázizommal kapcsolatban egy lehetséges terápiás irány lehet az emberek életének jobbá tételében. A citoszkeletális rendszert a XX. század végére már leírták és jellemezték, így az aktin, intermedier filamentumok vagy a mikrotubulusok szerepe viszonylag jól ismert. Az elmúlt 50 év kutatásai ugyanakkor rávilágítottak arra a tényre, hogy egy másik nagy fehérjeszerveződés, a szeptinek csoportja is kiemelkedő szereppel bír a citoszkeleton felépítésében és szabályozásában. Kutatásaink során egy olyan, ezidáig ismeretlen területet vizsgáltunk, ahol a szeptinek, részletesebben pedig a Szeptin7 szerepét térképeztük fel vázizomban. Munkacsoportunk először írta le szerepüket vázizomban *in vitro* és *in vivo*, mely a vázizomfejlődés és regeneráció folyamatainak megértésében új irányt ad a tudomány számára. Jelen dolgozatban az *in vitro* eredmények kerülnek bemutatásra, melyek C2C12 sejteken végzett kísérletek adataiból származnak.

2. Irodalmi Áttekintés

2.1 A vázizom és a miogenezis

A vázizom kötegekbe rendezett izomrostokból épül fel, melyet kötőszöveti réteg vesz körül. A vázizomrostok mérete különböző, átmérőjük 10 és 80 μm között változhat, hosszuk viszont néhány mm-től akár 25 cm-ig is terjedhet. A harántcsíkolt többmagvú izomrostok alkotják a vázizom celluláris és funkcionális egységeit. Az izomrostok kialakulása a prenatalis ontogenezis során egy szigorúan programozott, jelátviteli folyamatok sokaságával szabályozott eseménysorozat eredménye, mely folyamatot miogenezisnek nevezünk.

A mioblasztok a miociták (más néven izomsejtek) embrionális prekursorai. A miogenezis során a mioblasztok többmagvú mikrotubulusokká egyesülnek (fúzionálnak), amelyek később izomrostokká alakulnak megfelelő beidegzést követően.

A vázizom fejlődése nemcsak a prenatalis időszakra korlátozódik, hiszen ez a szervünk nagyfokú regenerációs képességgel rendelkezik. A folyamat során a meglévő rendszer javítása a nyugvó szatellita sejtek (SC) segítségével történik, melyek fő szerepe az izomszövet regenerálása és a nyugvó SC populáció fenntartása. Ennek eléréséhez az SC-k szimmetrikusan

és aszimmetrikusan is képesek osztódni. Egy aszimmetrikus folyamat során egyetlen SC létrehozhat egy önmegújuló leánysejtet, megtartva annak Pax7 expresszióját, és elnyomva a MyoD-t ($\text{Pax7}^{\text{magas}}/\text{MyoD}^{\text{alacsony}}$), továbbá egy elkötelezett sejtet, amelyben elnyomja a Pax7-et és kifejezi a MyoD-t ($\text{Pax7}^{\text{alacsony}}/\text{MyoD}^{\text{magas}}$). Az önmegújulás és az elkötelezettség közötti finom egyensúly felborulása a regenerációs folyamat kudarcához és/vagy az összejtéskészlet kimerüléséhez vezethet. Az elkötelezett SC-nek a fúzió és a differenciálódás mellett nagyon fontos, hogy a megfelelő helyre eljussanak, amit a sejtmigrációs folyamatok segítségével érnek el.

2.2 A vázizom citoskeletális rendszerének felépítése és szerepe a migrációban

A vázizom fejlődése és regenerációja során a citoskeletális elemek átrendeződése és a sejtadhéziós folyamatok szignalizációs szabályozása a migrációs folyamatok fő hajtóereje. A citoskeleton egy komplex rendszer, melyben a mikrotubulusokon, intermedier filamentumokon és a mikrofilamentumokon kívül a szeptinek a rendszer negyedik elemeként számon tartott fehérjék.

A mioblasztok migrációjában számos szabályozó tényező vesz részt, azonban ezek többsége nem izomspecifikus. A folyamatot a citoskeleton átrendeződésének dinamikája jelentősen befolyásolja. Ebben a főszerepet játszó fehérje az aktin, amely bonyolult struktúrákba (filopodia, lamellipodia, stresszrostok vagy podoszómák) szerveződik. A stresszrostokon belül az aktomiozin komplex kontraktilis tulajdonságait azok a fehérjék szabályozzák, amelyek a plazmamembrán adhéziós komplexeiben helyezkednek el. Ilyenek például a Rho családba tartozó kis GTPázok (Rho1, Cdc42 és Rac1), melyek a szubcelluláris aktin-összeszerelődés szabályozásában más komplexeket céloznak meg, beleértve az Arp2/3-at, mely utóbbinak szerepe van a filamentumok elágazódásának szabályozásában is. Ezen túlmenően több tanulmányban bebizonyosodott, hogy a fent említett fehérjék nem csak aktin filamentumokkal, hanem más citoskeletális fehérjékkel, például a jelen dolgozatban részletesebben bemutatott szeptinekkel is kölcsönhatásba lépnek.

2.3 Szeptinek

2.3.1 A szeptinekről általában

A szeptinek guanozin-trifoszfátot (GTP) kötő fehérjék, eukariótákban egy erősen konzervált fehérjecsaládba tartoznak. A szeptinek szerepét számos fiziológiai és patológiás

sejtfolyamatban igazolták, beleértve a karcinogenezist, exocitózist, endocitózist, és a sejtosztódást. Eddig 13 humán szeptin fehérjét azonosítottak, amelyeket a szekvencia hasonlóság alapján négy csoportba soroltak (SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7). A szeptinek rendkívül változatos szerkezettel bíró fehérjék, melyek egymással reagálva még bonyolultabb struktúrákat alkothatnak. Ahhoz, hogy magasabb rendű fehérjeszerveződésként tudjanak működni, nagyon fontos az adott szeptin csoportok képviselőinek (SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7) jelenléte a komplexekben. Az így kialakult komplex akár több ponton is képes lehet egyszerre más fehérjékkel reagálni. A szeptin filamentumok szerveződése magában foglalja a nukleotidok megkötését és hidrolízisét.

A szeptinek szerkezetében megtalálható egy GTP-specifikus motívum (AKAD) valamint a Walker A (GxxxxGKS/T) és B (DxxG) motívumok, amelyek egyrészt a GTP guanin alegységével lépnek kölcsönhatásba, másrészt a GTP foszfátcsoportjaihoz kötődve, egy Mg^{2+} bevonásával segítik a GTP hidrolízist. A Ras szupercsalád monomer kis GTPázaival ellentétben a szeptinek oligomerizálódnak GTP-kötő doménjeiken (G felszín) keresztül, ezzel fonalas hetero-polimereket képezve. Az NC felszín az N-terminális és C-terminális részét jelenti a fehérjének. A szeptinek szerkezetében több domén is kiemelt szereppel bír. Így a Septin Unique Element (SUE), amely a G-től az NC felszínig terjed, és lehetővé teszi a filamentum képződést, a Coiled Coil motívum a szeptinekben található más polibázisos doménekkal (PB1 és PB2) együtt segítheti a membráninterakciót, valamint az általában rendezetlen szerkezetű N-terminális domén, mely szintén a membráninterakciót segíti.

A vizsgált oligomerek kristályszerkezete szerint az NC felszín az alegységek közötti kölcsönhatási pontok, ezenkívül a G felszín felhasználásával is létrejöhet kötődés. A szeptin komplexek és a velük kölcsönhatásban lévő fehérjepartnerek feltérképezése korunk tudományos kutatásainak egy rendkívül intenzíven vizsgált területe. Ahogy a csoportok beosztásából és eddigi szerkezeti ismeretekből tudjuk, a Szeptin7 csoportjának egyedüli képviselőjeként elengedhetetlen szerepet játszik a hetero-oligomer szeptin komplexek, ezáltal pedig a magasabb rendű citoskeletális struktúrák kialakításában.

2.3.2 A Szeptin7 fehérje bemutatása

A Szeptin7-et kódoló génszakasz (*SEPTIN7*) 1254 nukleotidot tartalmaz a 7P14.4-14.1 kromoszómán, ez 418 aminosavat kódol, beleértve a GTP-kötő motívumot is. A Szeptin7 cDNS-szekvenciája emberben homológ a *cdc10*-el élesztőben, kezdetben a *Szeptin7*-et emberben *hCdc10*-nek nevezték. Az egyes szeptinek háromdimenziós röntgenszerkezete

alapján kimutatták, hogy a Szeptin7 a többi szeptinhez hasonlóan egy kanonikus Ras-szerű G-domént tartalmaz, amely 6 β -szálból és 5 α -hélixből áll. A Szeptin7 egy G-felületen keresztül dimert képez.

A Szeptin7 szerepét már számos sejtelettani folyamatban leírták. Számos kutatás igazolta a szerepét különböző daganatos elváltozásokban, például bizonyos gliómákban, papilláris pajzsmirigykarcinómában (PTC) és hepatocelluláris karcinómában (HCC-ban), de az intracelluláris kalciumhomeosztázisban betöltött szerepével kapcsolatosan is állnak rendelkezésre adatok.

Fontos megemlíteni, hogy a különböző szeptinek szerepe különböző kísérleti rendszerekben sokszor ellentmondásosnak tűnik, amivel kapcsolatban szintén számos irodalmi adat áll rendelkezésre. Így például a Szeptin7 expressziója különböző glióma sejtvonalakban alacsonyabb volt, mint a normál agysejtekben, ami ahhoz vezetett, hogy a Szeptin7 emelkedett expressziója jelentősen gátolta az LN18 sejtek migrációját és az IGF-1 indukált kemotaxist. Az is bebizonyosodott, hogy a megnövekedett Szeptin7 kifejeződés depolimerizálhatja az aktin filamentumokat, így gátolva a glióma sejtek migrációját. A fentiekkel ellentétben, a Szeptin2 és Szeptin7 expressziójának csökkentése gátolt proliferációt, migrációt és inváziót eredményezett mellrák sejtvonalakban. Humán osteosarcoma U2-OS sejtekben a Szeptin7 a mikrotubulusok nukleációjának modulálásával képes volt fenntartani a sejtmigrációt, míg alacsonyabb Szeptin7 expressziónál csökkent ezen sejtek migrációja.

2.3.3 A szeptin rendszer szerveződésének módosítási lehetőségei

A migrációs folyamatok vizsgálata több módon is történhet, ugyanakkor elengedhetetlen olyan vegyületek fejlesztése és ismerete, amelyek a szeptinek szabályozásán keresztül hatnak.

A forklórfenuron (FCF; N-(2-klór-4-piridil)-N9-fenil-karbamid; CPPU) egy kis molekulájú vegyület, amelyről ismert, hogy reverzibilisen befolyásolja a szeptin filamentumok összeszerelődését. Angelis és mtsai mérései szerint, az FCF dokkolása a szeptinek összes ismert kristályszerkezetével azt jelzi, hogy az FCF előnyben részesíti a GTP-kötő zsebet. Azt találták, hogy az FCF kötési szabad energiái és affinitása a szeptin csoportoktól függően változhat *in silico*, ami arra utal, hogy az FCF egyes szeptinek nukleotid zsebeihez jobban hozzáférhet vagy illeszkedhet, mint másokéhoz, ezáltal a hidrolízist is befolyásolja.

3 Problémafelvetés és Célkitűzés

A szeptinek vázizomban betöltött szerepéről az elmúlt 50 évben még nem történt átfogó vizsgálat, ami arra ösztönzött minket, hogy a jelenleg hiányos ismereteket megfelelő szinten feltárjuk. Munkacsoportunk a szeptinek szerepének vizsgálatát *in vitro* és *in vivo* modellek segítségével tervezte megvalósítani.

Jelen dolgozat keretében az *in vitro*, C2C12 sejteken kapott eredményeket ismertetem. A C2C12 egy immortalizált egér eredetű mioblaszt sejtvonal, ami elfogadott modellrendszer az emlős vázizomzat fejlődésének vizsgálatára.

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

- A szeptinek kifejeződésének vizsgálata mioblasztokban és a miotubulusok differenciálódási folyamatának különböző stádiumaiban.
- A Szeptin7 szerepének tanulmányozása C2C12 sejtekben; a fehérje kifejeződésének módosítása CRISPR/Cas9-indukált génkiütéssel és shRNS-alapú géncsendesítéssel, az így létrehozott sejtenyészetek sejtleletani tulajdonságainak meghatározása.
- A Szeptin7 fehérje C2C12 sejtek migrációjában betöltött szerepének a tisztázása.
- A Szeptin7 szerepének feltárása a C2C12 sejtek migrációja során megfigyelhető intracelluláris Ca^{2+} -változásban.
- A szeptinek farmakológiai gátlásának C2C12 sejtek migrációjára kifejtett hatásának a leírása.

4 Metodikák

4.1 C2C12 sejtek tenyésztése és differenciáltatása

Az egér eredetű C2C12 mioblasztok (ATCC, Cat# CRL-1772; RRID:CVCL_0188) tenyésztése magas glükóz tartalmú tápoldatban (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Biosera, Nuaille, Franciaország) történt, mely 10 térfogatszázalékban (V/V%) magzati szarvasmarha szérumot (FBS, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), Penicillin (100 U/mL) és Streptomycin (100 µg/mL) antibiotikumokat (Biosera), és 2mM koncentrációban L-glutamint (Biosera) tartalmazott. Az így elkészített és alkalmazott tápoldat (proliferáló tápoldat) cseréje kétnaponta történt, a sejtek passzálása pedig 80-90%-os konfluencia elérését követően lett végrehajtva.

A kísérletek egy részében a C2C12 sejtek 80-90%-os konfluencia elérését követően, egy foszfát-pufferes (PBS, Biosera) mosás után differenciáló oldatot kaptak. A differenciáló oldat DMEM alapú volt, mely 2 V/V%-ban lószérumot (Horse Serum, HS, Gibco, Billings, Montana, USA), továbbá Penicillin (100 U/mL) és Streptomycin (100 µg/mL) antibiotikumokat (Biosera), és 2mM koncentrációban L-glutamint (Biosera) tartalmazott. Az így elkészült tápoldatot alkalmaztuk a differenciálódási folyamat során (miotubulus képződés).

4.2 Proliferációs vizsgálatok

A sejtproliferáció vizsgálatát CyQUANT NF Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) segítségével végeztük. A C2C12 sejtek (2500 sejt/lyuk) tenyésztése 96-lyukú fekete sejtenyésző edényben történt (Greiner Bi-One, Mosonmagyaróvár, Magyarország) 72 órán keresztül. A mérés napján a gyártó leírása alapján jártunk el. Röviden, 1x HBSS (Hank's balanced salt solution, Hank-féle sóoldat) puffert készítettünk ionmentesített vízzel a gyári 5x HBSS felhasználásával, majd hozzá adtuk a CyQUANT NF festékreagenst (1x festékmegkötő oldat elkészítése). A mérés előtt a tápoldatot 100 µl 1x-es festékmegkötő oldatra cseréltük, majd a 96-lyukú edényt lefedtük és 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A fluoreszcenciát 485 nm-es gerjesztés és 530 nm-es emissziós hullámhosszon mértük FlexStation 3 Microplate Reader leolvasóval (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). A relatív fluoreszcencia értékeket a 100%-nak tekintett, Ctrl sejteken kapott értékek százalékában fejeztük ki.

4.3 A fúziós index meghatározása

A miotubulus differenciálódás előrehaladását immuncitokémia segítségével számszerűsítettük. A sejteket üveg fedőlemezekre szélesztettük, és a differenciálódási folyamat minden napján a mintákat 4%-os paraformaldehid oldatban (PFA) fixáltuk, majd ezt követően a mintákat dezmin-specifikus immunjelölésnek és DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festésnek vetettük alá (a protokoll részletes leírása az Immuncitokémia pontban található). A megfelelő mintákból konfokális képeket készítettünk. Az Alexa Fluor 488 és DAPI-jelölésű minták képeit AiryScan 880 lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) készítettük, ahol 20x levegős és 40x olajimmerziós objektíveket használtunk. A fúziós indexet a két vagy több maggal rendelkező miotubulusok sejtmagjai számának és a látómezőkben lévő magok teljes számának arányaként számítottuk ki.

4.4 RNS izolálás és RT-PCR elemzés

A sejtenyészetek mintáit 4°C-os PBS-sel történő mosást követően Trizolban (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) vettük fel és általános RNS izolálási protokollnak vetettük alá. Először 20%-os kloroform hozzáadása után a mintákat 4°C-on $16\,000 \times g$ -n, 15 percig centrifugáltuk. A minták felső vizes fázisát 500 µl RNáz-mentes izopropanol segítségével precipitáltuk szobahőmérsékleten 10 percig. Centrifugálást ($12\,000 \times g$) követően a kicsapódott RNS-t 75 V/V%-os etanol segítségével mostuk, majd ismét centrifugáltuk. A teljes RNS-t nukleáz mentes vízben oldottuk, majd a koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 Spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével határoztuk meg. Sikeres izolálást követően a nukleáz mentes vízben beoldott mintákat –80°C-on tároltuk. A reverz transzkriptáz (RT) reakció elegye (20 µl) (Omniscript, QIAGEN, Germantown, MD, USA) 1 µg RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibitor, 0,25 µl oligot (dT)-t, 2 µl dNTP-t (200 µM) tartalmazott RT pufferben. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációját olyan specifikus primerpárok segítségével végeztük, amelyeket a Primer Premier 5.0 szoftverrel (Premier Biosoft, Palo Alto, CA) terveztünk a GenBankban közzétett egér nukleotid szekvenciák alapján, és a tervezés alapján a Bio Basic-től (Toronto, Kanada) vásároltunk. Az egyedi tervezésű primerpárok specificitását *in silico* igazoltuk az NCBI Primer-BLAST szolgáltatás felhasználásával (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Az amplifikációkat programozható PCR készülékben (Labnet MultiGene 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ) végeztük a következő beállításokkal: kezdeti denaturálás 94°C-on 1 percig, majd 30 ciklus denaturálás 94°C-on (30 s); annealáció optimalizált hőmérsékleten minden primerpárra 30 másodpercig, extenzió 72 °C-on, 60 másodpercig, majd végső elongáció 72°C-on 5 percig. A PCR-termékeket EZ-Vision Dye 6X (VWR) vegyítettük, és a DNS-sávokat 1,2-2,5%-os agaróz gélen végzett elektroforézis után tettük láthatóvá (Fujifilm Labs-3000 készülék, Fuji, Tokió, Japán).

4.5 Génkiütés a CRISPR-Cas9 módszerrel

A CRISPR/Cas9 knockout (KO) és HDR (Homology-directed repair) plazmid konstruktok, mely specifikusan az egér *Szeptin7* gént célozták 3 különböző kódoló régióban (exon #3, #4, és #5) a Santa Cruz Biotechnológiai cégtől lettek beszerezve (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA). A *Szeptin7* CRISPR-Cas9 KO plazmid 3 különböző guideRNS-plazmidből és HDR-plazmidből álló készlet volt. Sense A: TCAGCAACCGAAGAACCTTG (exon3), Sense B:

CTGACAATAGTTGATACTCC (exon4), Sense C: CTGGAGAATACAAATCTGTG (exon5).

A C2C12 sejtek transzfektálása a KO és HDR plazmidokkal szérummentes Opti-MEM oldatban (Thermo Fisher Scientific) történt, melyhez Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenst használtunk (Invitrogen). 48 óra elteltével a sejteket puromycin-tartalmú szelekciós tápoldatban (2 µg/ml) tartottuk 5 napon keresztül, majd a vektorok GFP (Green Fluorescent Protein, zöld fluoreszcens fehérje) és RFP (Red Fluorescent Protein, piros fluoreszcens fehérje) fehérjéket kódoló tulajdonságai alapján a megfelelő egyedi sejteket FACS Aria (Fluorescence Activated Cell Sorting) áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA) szelektáltuk. A sejtek proliferáló tápoldatba kerültek, a sejtosztódást transzmissziós mikroszkóp (EVOS XL Core Imaging System, Thermo Fisher Scientific) segítségével követtük nyomon.

4.6 Géncsendesítés

A C2C12 sejtek tenyésztése 6-lyukú edényben történt. 50-60%-os konfluencia elérését követően a sejtekre szérummentes Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) oldat került és Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transzfekciós reagens segítségével, egy retrovírus alapú, *Szeptin7*-specifikus shRNS konstruktot tartalmazó pGFP-V-RS vektorral történt a transzfekció. Kontrollként egy kevert szekvenciájú shRNS (short hairpin RNS) vektort kaptak a sejtek (Scr sejtek). A transzfekciót követően 3 órával a sejtekre újra proliferáló oldat került, majd 48 órán át regenerálódtak és szintetizálták a kódolt shRNS-t. Az inkubációs idő után a sejtek puromycin-tartalmú (2 µg/ml) tápoldatban szelektálódtak addig, míg jól körülhatárolható sejtklónok jelentek meg a tenyésztőedényben. Az egyedi klónok külön tenyésztőedénybe kerültek, megfelelő sejtszám elérését követően a géncsendesítés eredményességét fehérjeszinten, Western blot módszer segítségével igazoltuk. Azokat a klónokat, melyek a *Szeptin7* kifejeződésben szignifikáns csökkenést mutattak, több passzálást követően is teszteltük és csak azokat használtuk fel későbbi kísérletekhez, melyekben a csökkent *Szeptin7* fehérje-expresszió folyamatosan kimutatható volt (S7-KD sejtek).

4.7 Fúziós fehérje előállítása és sejtekbe történő transzfektálása

Szeptin7-N-mCherry és *Szeptin7*-N-ECFP (Enhanced cyan fluorescent protein) kódoló szekvenciákat pcDNA 3.1 (+) expressziós vektorba klónoztattuk (Thermo Fisher Scientific). A sejtekre 50-70%-os konfluencia elérését követően szérummentes Opti-MEM tápoldat került és a fúziós fehérjéket kódoló vektorok transzfektálása (mCherry vagy ECFP) Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagens segítségével történt. Három órával a transzfektálást követően a sejtekre a

proliferációs tápoldat került és 24 vagy 48 óra elteltével történt a minták további vizsgálata. Élősejtes mikroszkópos vizsgálatok előtt Hoechst 33342 festékkel lettek megjelölve a sejtmagok. A képeket AiryScan 880 laser scanning konfokális mikroszkóp segítségével készítettük (Zeiss).

4.8 A Fúziós fehérje kifejeződésének nyomonkövetése élő sejtekben

A C2C12 sejteket 96 lyukú Cell Carrier Ultra lemezekben (6055302, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) növesztettük 10 V/V% FBS-t tartalmazó DMEM-ben. 70%-os konfluencia szintnél a tápközeget szérummentes Opti-MEM-re cseréltük, és a sejteket Szeptin7-N-mCherry kódoló plazmiddal transzfektáltuk. A sejteket 24 órán keresztül hagytuk a kódolt fehérjét kifejezni. A közel 95-100% konfluens tenyészetek esetén sejtmentes zónát hoztunk létre egy Tecan Freedom EVO folyadékkezelő robot segítségével, a folyadékkezelő kart használva, 10 µl-es pipettavéggel. A képeket az Opera Phenix High Content Confocal System-en készítettük (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Lyukanként összesen 24 mezőt vettünk fel 200–250 sejttel, és mindegyik képalkotó pozícióhoz lézer alapú autofókuszot használtunk. Az áteső és az Alexa-647 csatornák képeit az optikai lemez aljához képest a Z képsík 5 µm-es pozíciójában gyűjtöttük 63×-os objektív segítségével (Numerikus Apertúra értéke: 1,15).

4.9 Immuncitokémia

A sejteket PBS-sel történő mosást követően 4 V/V%-os PFA oldattal fixáltuk 15 percen keresztül. A felesleges paraformaldehid inaktiválása 0,1M Glicin tartalmú PBS segítségével történt. A sejtek permeabilizálásához 0,25 V/V% Triton-X (TritonX-100, Sigma) tartalmú PBS oldatot használtunk 10 percig, melyet három PBS-es mosás követett (3x15 perc). Ezután szérummentes fehérjeblokkolást alkalmaztunk (DAKO, Los Altos, CA, USA) 30 percig. A blokkolást követően a blokkoló oldatban hígított elsődleges Szeptin7 antitest (IBL, 1:250) került a mintákra, az inkubáció 16-18 órán át, nedves kamrában, 4°C hőmérsékleten történt. Az inkubációs időt követően PBS-el mostuk a mintákat (3 x 15 percig), majd a másodlagos, fluorofór-konjugált antitest (1:1000), valamint FITC-phalloidin (1:1000) vagy TRITC-phalloidin (1:1000) került a mintákra 1 óra időtartamra, szobahőmérsékleten. A phalloidin-nel konjugált fluorofór specifikusan az F-aktinhez kötődik. Három PBS-es mosást (3x 15 perc) követően fedőmédium segítségével fejeződött be a minták előkészítése. Az Alexa Fluor 488, TRITC, FITC, Hoechst33342 és DAPI jelölt mintákról a felvételek az AiryScan 880 laser scanning konfokális mikroszkóp segítségével készültek (Zeiss), 20x levegős, valamint 40x és

63x olajimmerziós objektívvel. A másodlagos antitestek és/vagy fúziós fehérjékről (Szeptin7-N-mCherry és Szeptin7-N-ECFP) a felvételek fluoreszcenciás detektálhatóság függvényében 488 nm, 543 nm és 405 nm excitációs hullámhosszokon, míg az emisszió hosszú hullámhosszokon áteresztő szűrővel, 550 nm felett történt.

4.10 Mitokondriumok kimutatása C2C12 sejtekben

A C2C12 sejteket üveg fedőlemezekre szélesztettük, majd 24 óra elteltével, a gyártó protokollja szerint, a mitokondriumokat MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific) festék segítségével jelöltük, majd az immuncitokémiai protokoll szerint fixáltuk a mintákat további vizsgálatokhoz.

4.11 Kolokalizációs vizsgálat

Az aktin és Szeptin7 filamentumok kolokalizációját immunjelölést követően az AiryScan 880 laser scanning (Zeiss) konfokális mikroszkóppal és Zeiss 3.5 Blue program segítségével végeztük. A fluoreszcencia-kolokalizációs vizsgálatok eredményeit grafikusán is ábrázoltuk szórásdiagramokban, ahol az egyik szín intenzitását minden egyes pixel esetében a második szín intenzitásával szemben ábrázoltuk. A szórásdiagramokon a Pearson-féle korrelációs együtthatót (PCC) használtuk a kolokalizáció számszerűsítésére. A PCC képlete az alábbiakban egy tipikus, vörös és zöld csatornából álló képre van megadva,

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

ahol R_i és G_i a vörös és a zöld csatorna intenzitásértékére utal, illetve az i képpont intenzitásértékére, $\bar{R}$ és $\bar{G}$ pedig a vörös és zöld csatornák átlagos intenzitására utalnak a teljes képen. A PCC értékek 1-től terjednek két olyan kép esetében, amelyek fluoreszcencia-intenzitása tökéletesen, lineárisan kapcsolódik egymáshoz, és -1-ig két olyan kép esetében, amelyek fluoreszcencia-intenzitása tökéletesen, de fordítottan kapcsolódik egymáshoz. A nullához közeli értékek olyan próbák eloszlását tükrözik, amelyek nem korrelálnak egymással.

4.12 Szeptin7 filamentum vastagságának meghatározása

A Szeptin7 filamentum szerkezetében bekövetkezett változások számszerűsítését a Szeptin7 filamentumok vastagságának meghatározásával értékeltük a kontroll (Ctrl) C2C12 tenyészetek fluoreszcens képein. A sejteket 24 órás FCF kezelést (100 μ M, Sigma) követően az

Immuncitokémia fejezetén belül leírt módszer segítségével jelöltük, majd felvételeket készítettünk a mintákról az AiryScan 880 laser scanning konfokális mikroszkóp (Zeiss) segítségével. Az így készült képek feldolgozásához a Zen 3.5 Blue (Zeiss) szoftvert használtuk, ahol az egyes sejteken belül öt régiót választottunk ki véletlenszerűen, ezeken a jelölt Szeptin7 filamentumok fluoreszcencia intenzitásából határoztuk meg azok vastagságát.

4.13 Fehérjekimutatás

A fehérje kifejeződés vizsgálatához a sejteket lízis-pufferben gyűjtöttük össze (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). A mintákból BCA protein esszé segítségével meghatároztuk a fehérjekoncentrációt, majd azonos koncentrációk beállítását követően 5x elektroforézis mintapuffert (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10% SDS-ben oldott brómfenol kék (0,01%), 100 mM β -merkaptoetanol) adtunk a teljes sejtlizátumhoz, amit 5 percig, 95°C-on főztünk, így denaturálva a fehérjéket. 7,5%-os SDS-poliakrilamid gél segítségével 8-10 μ g teljes fehérjeminta került elektroforetikus elválasztásra. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk és PBS-ben oldott 5%-os nem-zsíros tejpor segítségével blokkoltuk a nem specifikus kötődéseket. A membránok a megfelelő elsődleges antitestekkel 16-18 órán keresztül, 4°C hőmérsékleten inkubálódtak (Szeptin7, IBL, 1:250; α -aktinin, Sigma, 1:250). A bekötődést követően 30 perces PBS+1V/V% Tween-20 (PBST) mosás következett, majd HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten. A specifikus kötődések detektálása felerősített kemilumineszcencia segítségével történt (Thermo Fisher Scientific). A jelek denzitometriai analízise ImageJ szoftver (NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével történt. A jelek szemi-kvantitatív összehasonlítását ImageJ szoftver segítségével végeztük, a detektált Szeptin7 jelet ugyanazon minta α -aktinin jelére normalizáltuk. Ahhoz, hogy a Scr és a S7-KD mintákban detektált Szeptin7 jeleket össze tudjuk hasonlítani, a Ctrl sejtekben kapott Szeptin7 értékre normalizáltuk, így az értékeket %-ban is kifejeztük. A vizsgálatokat legalább három független mintából végeztük el, technikai ismétlés száma pedig szintén három volt.

4.14 A Sejtmigráció vizsgálata

A sejteket (2×10^4) speciális inzerben (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) szélesztettük, és 24 órán át hagytuk a felülethez tapadni. Az inzer eltávolítása előtt Mitomycin C (Sigma) kezelést alkalmaztunk (10 μ g/ μ L, 2 óra), ezzel blokkolva a sejtek osztódását. Az inkubációt követően a Mitomycin C tartalmú oldatot eltávolítottuk, a sejteket PBS-el mostuk, majd az

inzert eltávolítását követően a sejtekre oldószeres kontroll (etanol, Sigma) vagy FCF-et (100 μM) tartalmazó tápoldatot tettünk. A sejtek migrációját 37°C-on, 5% CO_2 -dal termosztált környezetben, CytoSMART™ rendszer (CytoSMART Technologies, Eindhoven, Hollandia; Lonza Bioscience, Basel, Svájc) segítségével követtük nyomon. A rendszer 5 percenként készített képeket a beállított látótérrel, melyből a kísérlet végén egy 24 órás videó állt a rendelkezésünkre. A rendszer 20× nagyítású objektívvel dolgozott. A CytoSMART™ rendszerrel rögzített képeket egyenként mentettük, és az ImageJ szoftver segítségével tovább elemeztük (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

Az egyes sejtek migrációjának elemzésére MathLab (MathWorks) alapú Cell Tracker képfeldolgozó szoftvert használtunk. Kiszámoltuk a teljes megtett utat, a kiindulási ponttól maximálisan elért távolságot, az átlagos sebességet, valamint megjelenítettük az egyes sejtek migrációs útvonalait is. A 12 órás mérés során kiszámítottuk azon alkalmak számát, amikor a sejtek nem mozdultak el. Az egyes sejtek bármely irányú mozgását az eredeti felvételek 20 perces időablakaiban határoztuk meg. A sejteket akkor tekintettük mozgónak, ha elmozdulásuk bármely irányban meghaladta a sejt átmérőjét, ellenkező esetben nem mozgónak nyilvánítottuk az adott időtartamban.

4.15 Intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ mérése

A sejteket 20 percen keresztül töltöttük 37°C-on Fura-2-AM festék segítségével szérummentes tápoldatban (DMEM, 2,5 μM Fura-2-AM, Sigma). Feltöltés után a sejteket Tyrode oldatban tartottuk (mM-ban: 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl_2 , 1,8 CaCl_2 , 11,8 Hepes és 1 g L^{-1} glükóz; pH 7,4). A Fura-2-t egy CoolLED pE-340fura fényforrással (CoolLED LTD, Andover, Anglia) gerjesztettük, ami ZEISS Axiovert 200 m-es mikroszkóppal volt összekapcsolva. A gerjesztési hullámhossz 340 és 380 nm között váltakozott, az emissziót 505-570 nm-es sáváteresztő szűrővel detektáltuk, a méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A képfelvétel és utófeldolgozás az AxioVision (rel. 4.8) szoftverrel (Zeiss) történt. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t reprezentáló fluoreszcencia hányadost a háttérkorrekciót követően a 340 és 380 nm-en készített képekből számítottuk ki. Ezekben a kísérletekben két objektívet használtunk, 10×-es (levegő) az adatgyűjtéshez és 40×-es (olajimmerziós) a reprezentatív képekhez.

4.16 Statisztikai analízis és adatelemzés

Az összevont adatokat az átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formában fejeztük ki. Az adatcsoportok közötti különbségeket közönséges egytényezős ANOVA, Bonferroni post hoc többszörös összehasonlító teszt (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) és Student-féle t-teszt

(kétmintás, kétoldali t-próba) segítségével értékeltük ki, ahol a 0,05-nél kisebb p-értékeket statisztikailag szignifikáns különbségnek tekintettük.

5 Eredmények

5.1 Különböző Szeptinek kifejeződése C2C12 mioblasztokon és differenciált miotubulusokon

A miogén eredetű C2C12 sejtekben a szeptinek adott csoportjaiba tartozó fehérjék mRNS-eit proliferáció és differenciálódás során egyaránt kimutattuk. A SEPT2 csoport (1,2,4,5) képviselőinek mRNS szintje esetén a *Szeptin1* alig fejeződött ki, a *Szeptin2* proliferáló és differenciáló mintákon egyaránt kimutatható volt, a *Szeptin4* differenciálódás-függő expressziót mutatott és a *Szeptin5* is jelen volt. A SEPT3 (3,9,12) csoportból a *Szeptin3* alig fejeződött ki és a *Szeptin12* sem volt kimutatható, a *Szeptin9* viszont proliferáló és differenciáló mintákban egyaránt erős jeleket mutatott. A SEPT6 csoport tagjaiból (6,8,10,11,14) a *Szeptin14* nem amplifikálódott az általunk vizsgált mintákon, míg a többi fehérje mRNS-eit mind proliferáló és differenciáló mintákból ki tudtuk mutatni. Kiemelt jelentőségű a SEPT7 csoport egyetlen képviselőjének, a *Szeptin7*-nek a jelenléte, mivel ez a fehérje szükséges a szeptin komplexek képződéséhez. A *Szeptin7* mRNS-e proliferáló és differenciáló mintákban egyaránt detektálható volt. Mivel a szeptinek egymással különböző típusú makromolekuláris komplexeket és hetero-oligomereket képeznek, így az adott csoportba tartozó szeptin fehérjék jelenléte kritikus a megfelelő fehérjekomplex szerveződéséhez.

Részletesebben a *Szeptin7* kifejeződését vizsgáltuk fehérje szinten is a C2C12 tenyészetek különböző fejlettségi állapotaiban. Eredményeink alapján kimutattuk a *Szeptin7* fehérje jelenlétét mind a proliferációs, mind a különböző differenciálódási napokon. A szemi-kvantitatív adatok alapján, α -aktininre történő normalizálás után a *Szeptin7* expressziós szintje a differenciálódás előrehaladtával csökkenő tendenciát mutatott C2C12 miotubulusokban.

5.2 A *Szeptin7* elengedhetetlen a C2C12 sejtek osztódásához

A *Szeptin7* szerepének feltérképezéséhez első lépésként genetikai módosítással kívántuk megváltoztatni az általunk használt sejtekben a fehérje kifejeződését. A *Szeptin7* expressziót C2C12 sejtekben először CRISPR/Cas9 technikával terveztük gátolni. Ez a kísérleti megközelítés abnormális sejtmérethez vezetett, ráadásul a sejtek osztódása leállt, amit a

nagyméretű, több sejtmagot tartalmazó, egymástól nem elváló sejtek szemléltettek. Egy kultúra esetében sem sikerült 8-10 sejtmagot tartalmazó állapotot követően további sejtosztódást elérnünk. Ez egyrészt arra utal, hogy a Szeptin7 jelenléte elengedhetetlen a C2C12 sejtek osztódásához, másrészt viszont más génmódosítási módszer alkalmazását tette szükségessé további kísérleteinkben, hogy fenntartható sejtvonalat generáljunk a Szeptin7 szerepének vizsgálatára.

5.3 A Szeptin7 fehérje expresszió csökkentésének hatása C2C12 sejteken

A Szeptin7 csökkent expresszióját C2C12 mioblasztokban shRNS-közvetített géncsendesítéssel érték el. A S7-KD sejtek csökkent Szeptin7 fehérjeszintje kimutatható volt a Ctrl, illetve a Scr sejtekhez képest, ráadásul ez a változás megmaradt a differenciálódási folyamat során is. A Szeptin7 fehérje kifejeződésében kb. 50%-os csökkenést sikerült elérni géncsendesítés során, mely tulajdonságot folyamatosan nyomon követtük a sejt kultúráinkban.

A géncsendesített sejtek fénymikroszkópos nyomonkövetésénél már megfigyelhető volt, hogy a Szeptin7 fehérje kifejeződésének csökkentése jelentős változásokat eredményezett a sejtek megjelenésében és alakjában egyaránt. Ennek további vizsgálatára a Scr és S7-KD sejteken specifikus immunjelölést végeztünk Szeptin7-re és a sejthalakot alapvetően befolyásoló aktinra (F-aktin). A Ctrl és Scr sejtekben megfigyelhető jellegzetes Szeptin7 filament-szerkezet a legtöbb S7-KD sejtben eltűnt, helyette a fehérje fragmentált, pontszerű megjelenését figyeltük meg. A Ctrl és a Scr tenyészetekben a Szeptin7 és az aktin filamentumok erősen kolokalizáltak voltak, míg a S7-KD sejtekben ez a térbeli átfedés nem volt jellemző, bár a sejteken belüli aktin szerkezete többnyire változatlanak tűnt. A Scr és S7-KD tenyészetek esetén kolokalizációs elemzést is végeztünk, mely alapján a Pearson-féle együttható kisebb volt a S7-KD sejtekben (0,648), mint az Scr C2C12 sejtek esetében (0,833).

A sejtmorfológiában bekövetkezett változások kvantitatív jellemzéséhez az ImageJ program segítségével meghatároztuk a fent említett sejt kultúrákban az egyedi sejtek területét (T), kerületét (K), és az ezekből számolt köralakúságot (C, cirkularitást) is. A cirkularitás egy mértékegység nélküli szám 0 és 1 között, amelyet a $(4\pi \times T / K^2)$ képlettel számol ki a program. A S7-KD sejtek átlagos területe és köralakúsága szignifikánsan magasabb volt a Scr tenyészet megfelelő paraméteréhez viszonyítva (S7-KD: $T=1564 \pm 142 \mu m^2$; $p < 0,05$; $n=121$, $C=0,58 \pm 0,05$; $p < 0,001$, Scr: $T=1348 \pm 138 \mu m^2$ és $C=0,47 \pm 0,05$; $n=96$). Az eredmény jól korrelál korábbi megfigyeléseinkkel, miszerint a S7-KD sejtek kevesebb nyúlvánnyal

rendelkeztek. Az egyes sejttípusok területét is kiszámítottuk, és nem találtunk különbséget a Ctrl ($190,1 \pm 16,9 \mu\text{m}$), a Scr ($196,5 \pm 19,9 \mu\text{m}$), valamint a S7-KD kultúrák ($185,0 \pm 16,7 \mu\text{m}$) között. Az általunk vizsgált paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget a Ctrl és Scr sejtek között (Ctrl: $T=1298 \pm 115 \mu\text{m}^2$ és $C=0,46 \pm 0,04$; $n=127$), így a S7-KD sejtekben való eltérések kialakításában a csökkent Szeptin7 kifejeződés jelentős szereppel bír. A Szeptin7 expresszió csökkenése feltehetőleg a szeptinek magasabb rendű szerkezeteit is károsan érinthette.

A mioblasztok proliferációs kapacitását több napon keresztül teszteltük, eredményeink szerint szignifikánsan csökkent sejtosztódást tapasztaltunk a Szeptin7 módosított sejtekben 72 órával a szélesztést követően (adatok a Ctrl sejtekre normalizálva, Scr: $94,1 \pm 7\%$, S7-KD: $79,7 \pm 5,2\%$, $N=3$, $n=24$; $p < 0,001$). Ez jól korrelál a sejtek tenyésztésénél tett megfigyeléssel, miszerint azonos sejtszámból kiindulva a S7-KD sejtek minden esetben később érték el a konfluens állapotot, mint a Scr vagy Ctrl tenyészetek.

5.4 A Szeptin7 fehérje létfontosságú a C2C12 sejtek differenciálódásához

A különböző tenyészetek fáziskontraszt mikroszkópban történő nyomon követése során a másik fontos megfigyelésünk az volt, hogy a tenyészetek differenciálódása során a miotubulusok képzése is jelentősen módosult a Szeptin7 géncsendesítését követően. Ennek pontos meghatározására a differenciálódás különböző napjain fixáltuk a tenyészeteket és ezeken immunfestéssel jelöltük a dezmin fehérjét, ami csak a mioblasztok fúzióját követően figyelhető meg C2C12 tenyészetekben, ott is kizárólag a többmagvú miotubulusokban. A differenciálódás második napjától kezdődően növekvő miotubulus képződés volt megfigyelhető a Ctrl és a Scr tenyészetekben míg a S7-KD tenyészetekben csak elhanyagolható sejtfúzió volt kimutatható, még a kísérlet 6. napján is. A folyamat kvantitatív jellemzése végett meghatároztuk az egyes tenyészetekben az adott differenciálódási napokon a fúziós indexet. A Ctrl és Scr tenyészetek esetében folyamatosan emelkedő értékeket kaptunk, ami az egyre előrehaladottabb differenciáltsági fokot (nagyobb számú miotubulusban lévő magszámot) prezentál. Ezzel ellentétben a S7-KD tenyészetekben már a második differenciálódási naptól szignifikánsan alacsonyabb fúziós indexet kaptunk, ami a miotubulus-képzés visszamaradott voltára utal ($N=2$, $n=20$ sejttípusonként és az értékek %-ban megadva, Ctrl: D2: $23,2 \pm 2,5$; D3: $34,6 \pm 4,1$; D4: $38,7 \pm 3,1$; D5: $49,9 \pm 3,5$; D6: $60,9 \pm 2,95$; Scr: D2: $25,3 \pm 3,8$; D3: $32,5 \pm 3,2$; D4:

38,9±3,7; D5: 44,1±3,5; D6: 53,8±2,9; S7-KD D2: 3,8±1,3; D3: 8,6±2,0; D4: 10,7±1,2; D5: 10,4±2,4; D6: 12,6±1,8; $p<0,05$).

5.5 A Szeptin7 hatása a C2C12 sejtek mitokondriális hálózatra

Élő sejteken kivitelezett MitoTracker Red CMXR-al történő festést követően azt tapasztaltuk, hogy a S7-KD sejtekben nemcsak a Szeptin7 filamentózus szerkezete különbözött a Ctrl és Scr tenyészetektől, hanem a mitokondriális hálózatot is jelentősen érintette a *Szeptin7* gén csendesítése. A Ctrl és Scr tenyészeteken megfigyelhető, kiterjedt mitokondriális "hálózat" jelentősen beszűkült és módosult összetettséget mutatott a S7-KD sejtekben. Ez arra utalhat, hogy a citoskeletális szeptin rendszer a mitokondriális rendszer felépítésében és struktúráltságának megtartásában is jelentős szerepet vállalhat a mioblasztokban.

5.6 A Szeptin7 eltérő elrendeződést mutat migráló és nem migráló sejtekben

Bebizonyítottuk, hogy a Szeptin7 és az aktin filamentumok, mely utóbbi szabályozó szerepe jól ismert a sejtmozgásban, kolokalizálódnak C2C12 sejtekben. A Szeptin7 fehérje szerkezeti átrendeződéséről a mioblasztok mozgása során azonban még nem állt rendelkezésre információ. Nem migráló sejtekben a Szeptin7 filamentszerű megjelenését mutattuk ki, a migráció során viszont ez a kifejeződési forma megváltozott, és jól szervezett szerkezeti egységek alakultak ki, melyek elsősorban a sejtprojekciókban, és a hátulsó éleken voltak megfigyelhetők. Mivel a géncsendesítés során megközelítően 50%-os csökkenést sikerült elérni, így alapvetően az S7-KD sejtek is képesek Szeptin7-et termelni, és az ezen fehérjét tartalmazó filamentek megjelenése még a migráló S7-KD sejtek esetében is kimutatható a sejtnyúlványokban. Migráció során a Szeptin7 megváltozott megjelenésével párhuzamosan az aktin rendszer is átszerveződött mindegyik vizsgált sejttypusban.

A Szeptin7 fehérje megjelenését időben is nyomon tudtuk követni a fluoreszcensen tag-elt Szeptin7-N-mCherry fehérje exogén plazmidról történő expressziójával, az Opera Phenix képalkotó rendszer segítségével. Az újonnan képződött Szeptin7 filamentózus megjelenést mutatott, normál tenyésztési körülmények között, immunjelölést követően pedig meg tudtuk különböztetni a plazmidról expresszálandó fluoreszcens filamentumokat az endogén módon képződőktől. Ezenkívül a fúziós fehérje kifejeződését migráló C2C12 mioblasztokban is nyomon követtük. Az 5 percenként készített felvételek alapján a Szeptin7 filamentumok

folyamatosan változó mintázatát észleltük, ami egyértelmű bizonyítéka volt a Szeptin7 filamentumok migráció során bekövetkező változásainak.

5.7 A Szeptin7 szerepet játszik a migráció alatti intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ változásokban

Szérummentes DMEM tápoldatban tartott tenyészetekben 5 órás inkubációt követően a nem migráló (NM) és migráló (M) sejtek egyértelműen elkülöníthetők voltak. Mivel a C2C12 mioblasztok ebben a környezetben nem képesek osztódni, az $[Ca^{2+}]_i$ változása a sejtek migrációjával hozható összefüggésbe. A Ctrl és a Scr sejtek között nem volt szignifikáns különbség a nem migráló sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ban (F_{340}/F_{380} ratioértékek, Ctrl: $2,64 \pm 0,07$ ($n_{NM}=48$) és Scr: $2,52 \pm 0,05$ ($n_{NM}=62$), míg ezen tenyészetek migráló sejtjein az $[Ca^{2+}]_i$ szignifikáns növekedését mutattunk ki a nem migráló társaikhoz képest (F_{340}/F_{380} ratioértékek, Ctrl: $3,02 \pm 0,03$ ($n_M=89$) és Scr: $3,20 \pm 0,05$ ($n_M=86$); $p < 0,001$, mindkét esetben). A S7-KD sejtek esetében a nem migráló sejtek alacsonyabb, de nem szignifikánsan különböző $[Ca^{2+}]_i$ szintet mutattak a Scr sejtekhez képest (F_{340}/F_{380} ratioértékek, S7-KD: $2,39 \pm 0,04$ ($n_{NM}=130$). Bár a migráló S7-KD sejteken (S7-KD: $2,79 \pm 0,04$ ($n_M=125$), $p < 0,001$) a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés ugyanúgy megfigyelhető volt, mint a Ctrl és Scr mioblasztoknál, a kialakult emelkedés arányaiban jóval kisebb volt.

5.8 A Szeptin7 szintje hatással van a migrációra

Mivel a Szeptin7 filamentumok elrendeződése különbözik a migráló és nem migráló sejtekben, kíváncsiak voltunk arra, hogyan változnak az alapvető migrációs paraméterek (teljes megtett út, átlagos sebesség, kiindulási ponttól való maximális távolság) a géncsendesített C2C12 sejtvonalon. A mérések 24 óráig tartottak, melyből az első 12 órát használtuk fel az adatok elemzésére (3 független kísérlet volt sejtvonalanként). Eredményeink azt mutatják, hogy a S7-KD ($n=33$) sejtek átlagos sebessége ($0,71 \pm 0,02$ $\mu\text{m}/\text{min}$) nagyobb volt, mint az Scr ($n=34$) sejteké ($0,58 \pm 0,02$ $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0,001$), és ezek a sejtek távolabb kerültek a kiindulási ponttól (S7-KD: $311,64 \pm 15,43$ μm , Scr: $251,57 \pm 10,16$ μm ; $p < 0,01$). A teljes megtett út szintén hosszabb volt a S7-KD sejtek esetében, mint az Scr sejteknél (S7-KD: $509,32 \pm 15,18$ μm és Scr: $416,18 \pm 12,76$ μm ; ($p < 0,001$). A Scr és S7-KD sejtek közti különbséget szemlélteti a nem migráló események száma is, mely a Scr sejtekben szignifikánsan magasabb volt.

Fontos kiemelni, hogy a Ctrl (n=23) és Scr sejtek között a vizsgált paraméterekben nem tapasztalunk szignifikáns változást 12 óra migráció alatt (sebesség: $0,54 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$, teljes megtett út: $383,43 \pm 13,93 \mu\text{m}$ és maximális távolság: $329,54 \pm 19,9 \mu\text{m}$) így a kapott adatok alapján a migráció feltehetőleg a Szeptin7 fehérje csökkent kifejeződése miatt változik meg.

5.9 Az FCF stabilizálja a Szeptin7 filamentumokat C2C12 mioblasztokban

Munkánk során a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az FCF kezelés befolyásolja-e és ha igen, milyen módon a C2C12 mioblasztok proliferációját. 24 órás FCF kezelést követően értékeltük a sejtosztódás változását CyQuant esszé segítségével, eredményeink szerint a szer dózisfüggő módon csökkentette a sejtproliferációt ($\text{IC}_{50}=180,8 \mu\text{M}$, $R^2=0,8671$). A további vizsgálatokhoz a félhatásos dózis alatti, $100 \mu\text{M}$ -os koncentrációt választottuk. A mioblasztok FCF kezelését követően Szeptin7-specifikus immunjelölést végeztünk annak érdekében, hogy a filamentszerkezetben bekövetkező változásokat nyomon kövessük. Megállapítottuk, hogy a Szeptin7 filamentumok architektúrája jelentősen megváltozott FCF hatására, a sejtekben hosszabbnak és vastagabbnak tűnő filamentumok jelentek meg és azok intracelluláris elhelyezkedése is eltérő volt a nem kezelt sejtekhez képest. A filamentumok vastagságát számszerűsítettük is a megfelelő Ctrl sejteken belül (4 egyedi sejt esetén sejtenként 5 véletlenszerűen kiválasztott területéről mindkét esetben). Eredményeink szerint FCF kezelt sejtekben az immunjelölt Szeptin7 filamentumok vastagsága szignifikánsan nagyobb volt a nem kezelt sejtek megfelelő egységeihez képest ($670,5 \pm 20,1 \text{ nm}$; $n_{\text{filament}}=57$ a nem kezelt, illetve $973,3 \pm 34,3 \text{ nm}$; $n_{\text{filament}}=63$ az FCF-kezelt Ctrl sejtekben; $p<0,001$). Ezt követően a fent említett FCF kezelést és immunjelölést a fúziós fehérjével transzfektált sejteken is megismételtük, az endogén Szeptin7-hez hasonlóan jóval nagyobb méretű, fluoreszcensen tagelt filamentumok megjelenését tapasztaltuk a kezelt sejteken.

5.10 Az FCF kezelés megváltoztatta a C2C12 mioblasztok migrációját, viszont a C2C12 S7-KD tenyészetek ellenállóbbak voltak a kezeléssel szemben

Az FCF-kezelés minden tenyészet migrációs paramétereit megváltoztatta, de a nem kezelt tenyészetek paramétereire normalizált adatok változása nagymértékben eltérő volt. A Scr (n=37) és Ctrl (n=21) sejtek meghatározott paraméterei kezelés hatására szignifikánsan csökkentek (Scr és Ctrl kezelt és nem kezelt, $p<0,001$) nem kezelt társaikhoz viszonyítva (Scr FCF-kezelt: sebesség: $0,35 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$, teljes megtett út: $249,15 \pm 13,08 \mu\text{m}$ és maximális

távolság: $139,03 \pm 8,21 \mu\text{m}$, Ctrl FCF kezelt: sebesség: $0,39 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$, teljes megtett út: $279,30 \pm 11,09 \mu\text{m}$ és maximális távolság: $183,07 \pm 11,53 \mu\text{m}$, nem kezelt sejtek adatai az 5.8-es fejezetben). A kezelt Scr és Ctrl sejtek paramétereit egymással összehasonlítva azok szignifikánsan nem különböztek egymástól. Ezzel szemben a S7-KD ($n=32$) tenyészetek ellenállóbbnak tűntek az FCF-kezeléssel szemben (S7-KD FCF kezelt: sebesség: $0,63 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$, teljes megtett út: $452,39 \pm 16,57 \mu\text{m}$ és maximális távolság: $227,42 \pm 9,35 \mu\text{m}$, $p < 0,05$; a nem kezelt adatokat lásd az 5.8 fejezetben), mely utóbbi megfigyelés a Szeptin7 fehérje alacsonyabb kifejeződésének következménye lehet. A S7-KD sejteken meghatározott, migrációt leíró paraméterek közül a teljes megtett út esetében sok esetben a nem kezelt sejtekhez képest magasabb értékeket kaptunk, ami 100% feletti átlagot eredményezett. Az átlagos sebesség, valamint a kiindulási ponttól mért maximális elmozdulás értékeiben a S7-KD sejteken szignifikánsan kisebb csökkenést tapasztaltunk FCF kezelést követően, mint a Ctrl és Scr tenyészeteknél. Eddigi adatok azt mutatják, hogy az FCF reverzibilis módon, körülbelül 3-4 óra elteltével stabilizálja a szeptin filamentumokat. Ennek a hatásnak a bizonyítására a teljes út hosszadatait időben is megvizsgáltuk, mely alapján az FCF már a kezelés első órája során hatni kezdett, és ez a hatás jelentősebb volt az Scr tenyészetekben, mint a S7-KD sejtek esetében. Az FCF-nek több időre volt szüksége a S7-KD sejtekben a migrációt gátló hatás kialakításához, azonban egy bizonyos idő elteltével, körülbelül 8 óra kezelés után, a szer már itt is szignifikáns változást okozott a vizsgált paraméterben a nem kezelt sejtekhez képest. A Ctrl sejteken elvégzett kísérletek azt mutatják, hogy ezek a Scr sejtekhez hasonló módon reagáltak az FCF kezelésre.

6 Megbeszélés

6.1 A szeptin filamentumok a vázizom citoskeletális rendszerének szerves részei

A szeptinek a citoskeletális rendszer alapvető elemei, hiányuk különböző patológiás elváltozásokat eredményezhet. Élesztőben a térbeli kompartmentalizáció szabályozói és ezáltal kulcsszerepet játszanak a citokinézisben. A szeptinek GTP-kötő fehérjék, amelyek filamentumokat és magasabb rendű struktúrákat alkotnak az eukarióta sejtek plazmamembránja alatti rétegben, és társulnak az aktin és mikrotubulus citoskeletális hálózatokhoz. A szeptin komplexek koordinálják a sejtszétválást, hozzájárulnak a sejtpolaritás fenntartásához és a sejtmembrán szerkezetének dinamikus átalakításához. Bár a citoskeletális szeptinek

kifejeződését és szerepüket többféle sejt/szövet típusban tanulmányozták már, vázizomban, illetve azt modellező rendszerben erre vonatkozó információk hiányoznak a szakmai irodalomban. Ismereteink szerint eredményeink elsőként írják le a különböző szeptin fehérjék RNS-ének ontogenezis-függő expresszióját a C2C12 mioblaszt sejtekben és differenciálódásuk során, különböző fejlettségű miotubulusokban. A négy szeptin csoport (SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7) tagjai kifejeződnek a C2C12 sejtekben, melyek lehetőséget adnak változatos szeptin oligomerek és magasabb rendű struktúrák létrehozásához. Kísérleteink alapján igazoltuk, hogy a Szeptin7 fehérje, mint csoportjának egyedüli tagja, a differenciálódás előrehaladtával csökkenő expressziót mutat. Ez alapján feltételezhető, hogy szerepe a mioblaszt állapotú proliferáció és a differenciálódás kezdeti szakaszán fontosabb, amikor a legtöbb sejt fúziója történik.

6.2 A szeptinek szerepe a mioblasztok sejtelettani folyamatainak szabályozásában

A szeptinek és más citoskeletális fehérjék közötti kapcsolat kiemelkedő szerepet játszik a mechanikai jelek biokémiai válaszokká történő átalakításában. A szeptinek részt vesznek a mechano-transzdukcióban azáltal, hogy elősegítik a kontraktilis aktomiozin hálózatok kialakulását. Több próbálkozás is volt már génkiütött szeptin modellrendszerek létrehozására, viszont a jelenleg ismert 13 szeptin fehérjéből mindösszesen 7 féle szeptin KO egeret sikerült létrehozni. A mindenütt jelenlévő Szeptin7, Szeptin9 és Szeptin11 genetikai ablációja embrionális letalitáshoz vezetett. A *Szeptin7*^{-/-} egerek soha nem születtek meg, a fejlődés korai szakaszában megálltak, valószínűleg mitotikus hiba miatt, mezenchimális szöveti degenerációt és kiterjedt sejthalált mutatva.

A fentiekkel összhangban kimutattuk a Szeptin7 és az aktin filamentumok kolokalizációját Ctrl és Scr C2C12 sejtekben. Ezenfelül a CRISPR-Cas9 génkiütéses technológia alkalmazásával több sejtmaggal rendelkező, proliferációra képtelen óriás sejteket kaptunk eredményül, mely megfigyelés alapján kijelenthetjük, hogy Szeptin7 nélkül ezek a sejtek nem képesek osztódni. Eredményeink összhangban vannak a tudományos irodalommal, hiszen ahogy már említettük, a *Szeptin7*-hiányos egérembriókban nem történik meg a gasztruláció folyamata, ami a Szeptin7 kulcsfontosságú szerepére utal az egyedfejlődés során.

Géncsendesítés segítségével a C2C12 sejtekben kb. 50%-os Szeptin7 fehérjeszint csökkenést értünk el, mely a filamentumok szerkezetét, méretét és a sejtek alakját is megváltoztatta. Kísérleteink során a Szeptin7 fehérje hiánya nagyobb méretű és kevesebb nyúlvánnyal rendelkező, csaknem kerek C2C12 mioblaszt sejteket eredményezett, jelentősen módosult intracelluláris Szeptin7 filamentumokkal. Ez korrelál a megfigyeléssel, hogy a Szeptin7

meghatározó funkcióval bír a sejtmorfológia meghatározásában különböző sejtípusokban, például az idegrendszer hátsó gyökér ganglionok neuronjaiban vagy egér primer fibroblasztjaiban. Az általunk vizsgált modellrendszerben a Szeptin7 fehérje expressziójának csökkenése a C2C12 mioblaszt sejtek proliferációjának csökkenését okozta.

Ezen túlmenően, a géncsendesített S7-KD mioblasztoknak jelentősen gátolt és eltolódott a többmagvú miotubulusok létrehozásának képessége, illetve folyamata, azaz sérült a differenciálódási programjuk. Az izomdifferenciálódás során számos transzkripciós faktor adott időben való megjelenése rendkívül fontos, viszont a sejtek kapcsolódásán túl a citoszkeletális rendszer átrendeződésére is szükség van a miotubulusok létrehozásához. A C2C12 mioblasztokon végzett vizsgálatok a RhoA-t, a Rac1-et és a Cdc42-t a miogenezis fontos szabályozóiként azonosították. Ezek a GTPázok downstream kinázok és transzkripciós faktorok, például a p38 MAPK, a c-Jun N-terminális kinázok (JNK) és a szérum válasz faktor (SRF) aktivitásának modulálásán keresztül működnek. Az általuk szabályozott, bonyolult jelátviteli útvonalakat C2C12 sejtekben a szeptinekkel kapcsolatosan még nem vizsgálták, így jelenleg csak feltételezhető, hogy ezek az útvonalak akár a Szeptin7 fehérjén keresztül is befolyásolhatják a differenciálódást.

Összegezve a megfigyeléseinket, munkacsoportunk először írta le, hogy a Szeptin7 a citoszkeletális szeptin szerveződés kulcsfontosságú szereplője a sejtmorfológia, a proliferáció és a differenciálódás szabályozásában C2C12 mioblasztokban, mely paraméterek a miogenezist és a regenerációt alapvetően meghatározzák. Bár *Szeptin7* KO egérmodell nem létezik, vázizomspecifikus knockdown modellt munkacsoportunknak sikerült létrehozni, ami lehetőséget adott a vázizmot érintő folyamatok tanulmányozására.

A mitokondriumok kulcsfontosságú organellumok, amelyek a sejtek anyagcseréjét az oxidatív foszforiláción keresztül történő energiatermelés integrált mechanizmusán keresztül szabályozzák. A hálózat általános morfológiáját a mitokondriumok fúziója és hasadása határozza meg, amiben nagy szerepe van a Drp1 nevű mitokondriális hasítást szabályozó fehérjének, amit már összefüggésbe hoztak a Szeptin2 fehérjével is. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a Szeptin7-nek szerepe lehet a mitokondriumok fúziójában és hasadásában, ennek bizonyítására viszont további kísérletekre van szükség.

6.3 A Szeptin7 filamentumok átrendeződése a migráló mioblasztokban kiemelt jelentőségű

Egyes publikációk már tárgyalták, hogy a specifikus szeptin fehérjék (egyes esetekben a Szeptin7) expressziójának módosítása megváltoztatja a különböző eukarióta sejtípusok migrációját. Változásokat figyeltek meg többek között mikrovaszkuláris endotheliális sejtek,

humán hámsejtek, humán mellrák- és tüdőráksejtek vizsgálata során, viszont vázizomsejtek migrációját ebből a szempontból ezidáig még nem vizsgálták.

Jelen dolgozatban bemutattuk, hogy a Szeptin7 intracelluláris megjelenése eltérő a nem migráló és a migráló mioblasztokban. A nem migráló sejtekben a Szeptin7 filamentumok az egész citoplazmában jelen vannak, míg migráció során a filamentumok specifikusabb lokalizációja észlelhető, különösen a sejtprojekciókban és a hátsó élen. A migráló S7-KD tenyészetekben Szeptin7 filamentumok megjelenése ugyan megfigyelhető volt, de a hosszuk és méretük alulmaradt a Scr sejtekéhez képest. A Szeptin7 migrációban betöltött szerepéről már többen beszámoltak, de a pontos mechanizmus, hogy sejtspecifikus környezeti tényezők megváltoztathatják-e a fehérje viselkedését, még nem teljesen tisztázott. Jól ismert, hogy a sejtpolarizációhoz külön elülső és hátsó területek kialakítása szükséges a sejtben, ami fontos az irányított migráció és a sejtmozgás szempontjából. Az aktin által közvetített lamellipodialis membránkiemelkedés a migráló sejt élet képezi, a visszahúzódó farok kialakulása pedig döntő jelentőségű a mozgás kivitelezésében. Az aktin filamentumok sajátos megjelenése minden sejttypusunkban látható, intracelluláris eloszlásuk azonban megváltozik a S7-KD sejtekben, ami hozzájárul a gömb alakhoz közelítő, kevesebb sejtnyúlvánnyal jellemezhető sejt morfológiához. Amíg a Ctrl és Scr sejtekben a Szeptin7 és az aktin kolokalizálódik, és a határok nagyrészt láthatóak, addig a S7-KD sejtekben a Szeptin7 filamentumok véletlenszerű eloszlása és pontszerű megjelenése kevésbé kapcsolódik az aktin rendszerhez. A fent említett változások a S7-KD sejtekben jelentős mértékben hozzájárulnak a migráló sejtek eltérő sejtformájához és citoskeletális szerveződéséhez. Fontos ugyanakkor kiemelni, hogy a csökkent Szeptin7 expresszió nem gátolta a C2C12 sejtek migrációját.

6.4 A Szeptin7 fehérje expressziójának megváltozása jelentős hatással van a mioblasztok migrációjára

Az $[Ca^{2+}]_i$ -homeosztázis dinamikus adaptációja a migráció során minden sejttypusban elengedhetetlen. A migráló sejtekben növekvő elülső-hátsó $[Ca^{2+}]_i$ gradiens képződik, aminek szerepe van a fokális adhézciók feloldásában, a sejt hátsó visszahúzódásában és mozgékonyágában. Az elülső-hátsó polaritást meg kell őrizni a migráció során, mert ez a biokémiai folyamat szükséges a lamellipodia kialakulásának blokkolásához a sejt hátsó részein. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ nem különbözik szignifikánsan a Ctrl, Scr és S7-KD mioblasztok között, migráció során a migráló sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ja megnövekedett minden sejttypus esetében. Megfigyeléseink szerint az $[Ca^{2+}]_i$ szignifikánsan

kiseb a migráló S7-KD sejtekben, mint a Scr és Ctrl sejtekben, ami összefüggésben állhat a Szeptin7 fehérje csökkent szintjével. Számos tanulmány foglalkozott eddig is a szeptinek és a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]_i$ szabályozás kapcsolatával. Kimutatták, hogy a Szeptin7 szabályozza a Ca^{2+} bejutását az Orai-csatornákon keresztül humán idegi progenitor sejtekben és neuronokban. Ezenkívül igazolt kapcsolat van a *dseptin7* vad típusú *drosophila* neuronjaiban való túlzott expressziója és a módosított $[Ca^{2+}]_i$ homeosztázis között, amely jelentős repülési hibákhoz vezetett a vizsgált modellrendszerben. Eredményeink arra utalnak, hogy a Szeptin7 kifejeződésének csökkentése megváltoztathatja az $[Ca^{2+}]_i$ -t, ami szabályozhatja a mioblasztokban a migrációt és annak paramétereit. A változások hátterében álló pontos mechanizmus és a kapcsolódó jelátviteli útvonalak feltérképezése további vizsgálatokat igényel.

A migráció egy olyan kulcsfontosságú folyamat, ahol a sejtek mozgását összehangolt jelátviteli útvonalak is irányítják. A már említett Rho család kisméretű GTP-ázai szabályozhatják a migrációs folyamatokat is, amit eddig több tanulmány is igazolt. A Rho GTP-ázok közül a Cdc42-t és kölcsönható partnereit gyakran a szeptinekkel együtt elemzik. Így például hematopoietikus őssejteken végzett vizsgálatok alapján beszámoltak arról, hogy a Cdc42-Borg4-Szeptin7 tengely szabályozza a sejtek polaritását. A legújabb eredmények szerint a Szeptin7 expressziós szintje egyaránt növelheti vagy csökkentheti a migrációs paramétereket. A Szeptin7 túlzott expressziója a migráció gátlását okozta glióma sejtekben, míg az emlőrák sejtvonalakban ez a változás fokozta a migrációt. Jelen dolgozatban bemutatjuk, hogy a Szeptin7 csökkent kifejeződése esetén a S7-KD mioblasztok gyorsabban és nagyobb távolságokra migráltak, mint az Scr tenyészetek sejtjei. A Szeptin7 expressziós változásainak sejtmobilitásra gyakorolt hatásaival kapcsolatos ellentmondások feloldásához figyelembe kell venni a sejtmigráció elemzésére használt különböző kísérleti elrendezések korlátait is. A migrációs kísérletek során valamilyen rést hoznak létre, karcolás vagy inzert segítségével. Az assay-k során érdemes egy 24 órás időkorlátot betartani, mivel ezen túlmenően nehéz eldönteni, hogy a sejtprolifерáció és/vagy -migráció következtében zárul-e be a rés. Jelen kísérleteink során tenyésztő inzertet használtunk, hogy a réssel határos sejteket sértetlenül tartsuk. A sejteket továbbá Mitomycin C-vel kezeltük a sejtprolifерáció blokkolására. Ezen túlmenően kísérleteinkben a mioblasztok minden irányba vándorolhattak, specifikus kemotaxist nem alkalmaztunk. A különböző sejtípusok vagy önmagukban (mioblasztok), lazán kapcsolódó populációkban (mezenchimális sejtek), vagy együttesen vándorolhatnak egy sejtréteggént (például hámsejtek esetén). Annak ellenére, hogy a S7-KD sejtek gyorsabban és nagyobb távolságokra vándoroltak a Scr sejtekhez képest, ezen sejtpopulációban a miotubulusok

képződése jelentősen gátolt. Eredményeinket a rendelkezésre álló irodalmi adatokkal összevetve megállapíthatjuk, hogy a Szeptin7 szerepet játszik a mioblasztok migrációjában, jelezve a fehérje fontosságát a miogenezisben és az izomregenerációban. Azt is meg kell ugyanakkor említeni, hogy *in vivo* a mioblasztoknak át kell vándorolniuk az alapmembránon és a kötőszöveti akadályokon is, így például a perimysiumon vagy az endomysiumon. Ezen folyamatok viszont számos más, a dolgozatban nem vizsgált regulátor fehérje szerepét is igénylik, hiszen a vázizomzat hatékony javításához és regenerációjához az extracelluláris mátrix (ECM) összehangolt átalakítása is szükséges. Egy példát említve, a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) kulcsszerepet játszanak az ECM átalakításában az izomregeneráció során. Eredményeink alapján viszont kijelenthetjük, hogy a vázizom fejlődése és regenerációja során a Szeptin7 fehérje fontos szabályozó szereppel bírhat.

6.5 A szeptin rendszer dinamikus átrendeződésének farmakológiai gátlása jelentősen befolyásolja a mioblasztok migrációját

A szeptinek hetero-oligomer komplexekbe való összeállási képessége és magasabb rendű szerkezetek kialakítása kritikus számos sejt működése szempontjából. A szeptineket *in vitro* nem poláros polimerekké lehet alakítani rekombináns vagy tisztított fehérjéből. Azt azonban még nem tudjuk, hogy ezek a lineáris filamentumok tükrözik-e, hogy a szeptinek hogyan szerveződnek az *in vivo* megfigyelt nagyobb struktúrákban. Számos kérdés merül fel a szeptinek sejtekben való szerveződésével kapcsolatban is, például, hogy minden magasabb rendű szeptin alapú struktúra közös szerveződéssel rendelkezik molekuláris szinten? Szintén fontos lehet, hogy a nagyobb szeptin egységek (pl. gyűrű, géz-jellegű forma) átalakulása milyen gyorsan megy végbe? Az irodalmi adatok alapján a heteromer és magasabb rendű szeptin komplexek működése mögött meghúzódó molekuláris mechanizmusok pontos leírása jelenleg még nem teljes. Egyes kutatási eredmények azt is felvetették, hogy ugyanabból a szerkezeti csoportból bármely adott szeptin fehérje helyettesítheti egymást a komplexben. Ez alapján 20 életképes hexamer és 60 oktamer létezhet, azonban ennek az elméletnek az általánossága még nem teljesen bizonyított, csupán *in silico* modellezésekre alapozták a feltételezéseket. Ennek következtében egyre több adat utal arra, hogy a szeptinekkel kapcsolatos irodalmi adatokat és a strukturális predikciókat kritikusan kell értékelni. A Szeptin2 és Szeptin7 komplexek elemzése során az kijelenthető, hogy egyfajta alapként, magként funkcionálnak a fehérjekomplexen belül. Mivel a magasabb rendű szeptin komplexek átépülése meglehetősen

dinamikus és számos sejtélettani folyamatban játszanak szerepet, így minden olyan lehetőség, amely ezt a folyamatot befolyásolhatja, a szeptin kutatás fókuszában állhat.

Az FCF egy növényi citokinin és képes reverzibilisen megállítani a szeptinek dinamikus átrendeződését. Adataink egyezést mutatnak más vizsgálatokban nyert eredményekkel, mely alapján az FCF-kezelés negatívan befolyásolta a sejtosztódást, és csökkentette a migráló C2C12 mioblasztokban a migráció során a teljes megtett utat és az átlagos sebességet. Ugyanakkor az FCF és a szeptinek esetében publikáltak bizonyos off-target hatásokat, ami a szer specificitását kérdőjelezi meg. Kísérleteinkben a Szeptin7 stabilizálására gyakorolt hatékonysága specifikusnak tűnik, mivel az mCherry-vel fuzionált Szeptin7 az endogénhez hasonlóan reagált a szer alkalmazására, nagyméretű filamenteket képezve. Az FCF kezelés hatására az S7-KD sejtek migrációja nem változott olyan mértékben, mint a Scr sejteké, így feltételezhetően ezek a sejtek ellenállóbbak a kezeléssel szemben, hiszen a Szeptin7 fehérje nem volt olyan mennyiségben jelen. Az FCF-et és analógjait már számos kutatási irányvonal potenciális daganatterápiás szerként említi. Az általunk alkalmazott koncentráció (100 μ M) természetesen magas és nem elfogadható egy hatóanyagként, ugyanakkor a már előállított FCF analógok 4-5 μ M-os tartományban is gátolják bizonyos daganatsejttípusok proliferációját. A cél a nM-es koncentráció tartomány, ezzel redukálva a potenciális mellékhatásokat. Méréseink ugyanakkor fontos alapot képezhetnek az FCF alapú szerek mellékhatásprofiljainak, például a vázizmot érintő negatív hatások feltérképezésében.

7 Összefoglalás

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a különböző szeptin fehérjék a C2C12 sejtek különböző fejlődési állapotaiban eltérően fejeződnek ki. Bebizonyítottuk, hogy Szeptin7 nélkül a sejtek nem képesek osztódni és a Szeptin7 elengedhetetlen a miotubulusok képződéséhez. Kimutattuk, hogy a Szeptin7 a citoszkeleton szerves részeként hozzájárul a sejthalak meghatározásához a mioblasztokban. Méréseink alapján feltételezzük, hogy a Szeptin7 hatással van a sejtek mitokondriális rendszerére is, vélhetően a mitokondriális fúzió és hasadás folyamatainak befolyásolásán keresztül.

Bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a Szeptin7 filamentumok átrendeződnek a mioblasztok migrációja során. A Szeptin7 expressziójának downregulációja a migráció paramétereinek megváltozását eredményezte, a S7-KD mioblasztok gyorsabban mozognak és nagyobb utat tesznek meg a nem módosított kultúrákhoz képest. Ezen eredmények magyarázata nem csupán a szeptin filamentumok számának és rendezettségének csökkenése, hanem a migráló S7-KD

mioblasztok alacsonyabb $[Ca^{2+}]_i$ változása is lehet. Ezen túlmenően úgy tűnik, hogy a S7-KD sejtek kevesebb alkalommal változtatnak irányt a Scr sejtekhez képest, így „kijelölve” egy adott irányt, amerre a sejt tart. A Szeptin7 különleges szerepét a mioblasztok migrációjában az FCF kezelés is igazolja. Az FCF dózisfüggő módon gátolja a C2C12 sejtek proliferációját és vélhetően FCF kezelés hatására a szeptin filamentumok dinamikus átrendeződése is gátolt. Kísérleteink során FCF kezelés hatására a Scr sejtek migrációjában kifejezett csökkenést tapasztaltunk, míg a csökkent Szeptin7 expresszióval bíró S7-KD sejteken ez a változás az általunk vizsgált időtartamon belül szinte elhanyagolható volt. Összességében a Szeptin7 fehérje alapvető szerepet játszik a mioblasztok proliferációs, differenciációs és migrációs folyamataiban, melyek kulcsfontosságú események a funkcionális vázizomrostok fejlődési és regenerációs szakaszaiban.



Nyilvántartási szám: DEENK/424/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ráduly Zsolt
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10071483

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ráduly, Z.**, Szabó, L., Dienes, B., Szentesi, P., Bana, Á. V., Hajdú, T., Kókai, E., Hegedűs, C., Csernoch, L., Gönczi, M.: Migration of Myogenic Cells Is Highly Influenced by Cytoskeletal Septin7.
Cells. 12 (14), 1825, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12141825>
IF: 6 (2022)
2. Gönczi, M., **Ráduly, Z.**, Szabó, L., Fodor, J., Telek, A., Dobrosi, N., Balogh, N., Szentesi, P., Kis, G., Antal, M., Trencsényi, G., Dienes, B., Csernoch, L.: Septin7 is indispensable for proper skeletal muscle architecture and function.
eLife. 11, e75863, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.75863>
IF: 7.7

További közlemények

3. Gönczi, M., Teixeira, J. M. C., Barrera-Vilarmau, S., Mediani, L., Antoniani, F., Nagy, T. M., Fehér, K., **Ráduly, Z.**, Ambrus, V. A., Tózsér, J., Barta, E., Kövér, K. E., Csernoch, L., Carra, S., Fuxreiter, M.: Alternatively spliced exon regulates context-dependent MEF2D higher-order assembly during myogenesis.
Nat Comms. 14, 1329, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-37017-7>
IF: 16.6 (2022)
4. **Ráduly, Z.**, Szabó, A., Mézes, M., Balatoni, I., Price, R. G., Dockrell, M. E. C., Pócsi, J., Csernoch, L.: New perspectives in application of kidney biomarkers in mycotoxin induced nephrotoxicity, with a particular focus on domestic pigs.
Front. Microbiol. 14, 1085818, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2023.1085818>
IF: 5.2 (2022)





5. **Ráduly, Z.**, Price, R. G., Dockrell, M. E. C., Csernoch, L., Pócsi, I.: Urinary Biomarkers of Mycotoxin Induced Nephrotoxicity: Current Status and Expected Future Trends. *Toxins*. 13 (12), 848, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13120848>
IF: 5.075
6. **Ráduly, Z.**, Szabó, L., Madar, A., Pócsi, I., Csernoch, L.: Toxicological and Medical Aspects of Aspergillus-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Front. Microbiol.* 10, 2908, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02908>
IF: 5.64
7. Sharma, R., **Ráduly, Z.**, Miskei, M., Fuxreiter, M.: Fuzzy complexes: specific binding without complete folding. *FEBS Lett.* 589 (19), 2533-2542, 2015.
IF: 3.519

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 49,734

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,7**

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

Debrecen, 2023.09.14.

