

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Szabó László

A citoszkéletális szeptin7 fehérje szerepe a vázizmok működésében és regenerációjában

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A citoszkeletális szeptin7 fehérje szerepe a vázizmok működésében és regenerációjában

Szabó László

Témavezető: Dr. Dienes Beatrix



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	5
2	Bevezetés	8
3	Irodalmi áttekintés	9
3.1	A citoszkeletális rendszer	9
3.1.1	Aktin	10
3.1.2	Tubulin	11
3.1.3	Intermedier filamentumok	11
3.2	Szeptinek.....	12
3.2.1	A szeptin fehérjecsalád	12
3.2.2	A szeptinek szerkezete és működése	13
3.3	A szeptin7 fehérje	16
3.3.1	A szeptin7 fehérje szerepe élettani folyamatokban	17
3.4	A vázizomrostok jellemzése	19
3.4.1	A vázizomrostok felépítése	19
3.4.2	A kontraktilis fehérjék	20
3.4.3	T-tubulus rendszer és szarkoplazmatikus retikulum	21
3.4.4	Az emlős vázizomrostok típusai.....	22
3.5	Az izom <i>in vivo</i> fejlődése (miogenesis) és regenerációja	23
4	Problémafelvetés és célkitűzés	28
5	Metodikák	29
5.1	Humán eredetű minták vizsgálata.....	29
5.2	Állatkísérletek és a kísérleti állatok tartása	29
5.3	Tamoxifen etetés.....	29
5.4	A HSA-MCM transzgenikus egértörzs létrehozása.....	29
5.5	A Szeptin7 deléciónak ellenőrzése genotipizálással.....	30
5.6	<i>In vivo</i> kísérletek	31
5.6.1	<i>In vivo</i> CT vizsgálat.....	31
5.6.2	Önkéntes futás futómalomban.....	31
5.6.3	Mellső láb erejének mérése	31
5.7	<i>In vitro</i> kísérletek	32
5.7.1	Izomerő mérése	32
5.7.2	Egyedi izomrostok elkülönítése	32
5.8	Az egyedi izomrostok és kriosztátos illetve paraffinos metszetek immunkémiai festése	33
5.9	Izomregeneráció vizsgálata	34

5.10	Elektronmikroszkópos mintaelőkészítés és feldolgozás	34
5.11	RNS-izolálás, Real-time PCR és kvantitatív PCR vizsgálat.....	35
5.12	Western blot vizsgálat	38
5.13	Statistikai módszerek	39
6	Eredmények	40
6.1	A harántcsíktolt vázizomrostok különböző szeptin izoformákat expresszálnak	40
6.2	A szeptin7 az egyedfejlődés során változó expressziót mutat	41
6.3	A szeptin7 elhelyezkedése a vázizomrostokban.....	42
6.4	A szeptin7 vázizom-specifikus csökkenése módosult fenotípushoz vezet.....	44
6.5	Az <i>in vivo</i> erőgenerálás sérül a szeptin7 knockdown egerekben.....	47
6.6	Az <i>in vitro</i> erőgenerálás csökken a szeptin7 knockdown egerek izmaiban.....	47
6.7	A szeptin7 csökkent expressziója módosult miofibrilláris és mitokondriális szerkezethez vezet	49
6.8	A szeptin7 megváltozott expressziót mutat izomregeneráció során.....	54
6.8.1	A vázizomregeneráció során morfológiai változások mennek végbe	56
6.9	A vázizomsérülés a szeptin7 expressziójának emelkedését váltja ki	58
6.10	A regenerációt a Pax7 transzkripció faktor megemelkedése kíséri.....	61
6.11	A regenerációs szakaszban a miogenin transzkripció faktor emelkedett expresszió mutat	63
6.12	A laminin expressziós változása a regeneráció során	65
6.13	A szeptin7 leütése késlelteti a regenerációt, ami morfológiai változásokat okoz..	67
7	Megbeszélés	69
7.1	Szeptin izoformák expressziója a vázizomban	69
7.2	A szeptinek szerepe a mitokondriális dinamikában.....	70
7.3	A szeptin7 szerepe a vázizomzat regenerációjában.....	70
8	Összefoglalás	76
9	Summary.....	77
10	Új eredmények.....	78
11	Irodalomjegyzék	79
12	Saját közlemények jegyzéke.....	91
13	Tárgyszavak-Key Words	94
14	Köszönetnyilvánítás	95
15	Függelék	96

1 Rövidítések jegyzéke

ACTA1	humán vázizomspecifikus aktin
AR	Aspect ratio (oldaltengelyarány)
ATP	Adenozin-trifoszfát
ATPáz	Adenozin-trifoszfát hidroláz
CC	Coiled Coil
c-MET	tirozin-protein kináz Met
CT	komputertomográf
CTR	kalcitonin receptor
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAMP	Damage associated molecular pattern (sérülés kapcsolt molekuláris mintázat)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHPR	Dihidropiridin receptor
EC-coupling	Excitation-contraction coupling (elektro-mechanikai kapcsolás)
ECM	Extracelluláris mátrix
EDL	M. extensor digitorum longus
EGTA	Etilén-glikol--bis(β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
EM	Elektronmikroszkóp
ERK3	Extracellular signal-regulated kinase 3
ERT2	módosított ösztrogén kötő domén
FDB	M. flexor digitorum brevis
FF	Form factor (alakítványzó)
GTP	Guanozin-trifoszfát
GTPáz	Guanozin-trifoszfát hidroláz
HCC	Hepatocelluláris karcinóma
HE	Hematoxin-Eozin
HRP	Horse radish peroxidase (torma peroxidáz)

IFN- γ	Interferon- γ
IL	interleukin
KD	Knock-down (leült expresszióval rendelkező)
L-tubulus	Longitudiális tubulus rendszer
Mcad	M-kadherin
Myf-5	myogenic factor 5
MYH4	4-es típusú miozin nehéz lánc
MyoD	Myoblast determination protein 1 (izomsejt előteleződési fehérje)
nAChR	nikotinos acetilkolin receptor
NB	Újszülött egerek
NCAM	Neural cell adhesion molecule (idegi sejtadhéziós molekula)
NMJ	Neuro-muszkuláris junctió
ntc	Nem templát kontroll
ORAI	Calcium release-activated calcium channel protein 1
Pax	Paired box transzkripció faktor
PB1-2	Polibázikus régió 1-2
PBS	Phosphate-buffered saline (foszfát puffer oldat)
PCR	Polimeráz láncreakció
PFA	Paraformaldehid
PTC	Papilláris pajzsmirigyrák
qPCR	Kvantitatív PCR
RT	Reverz transzkriptáz
RyR1	1-es típusú rianodin receptor
SC	szatellita sejt
SEM	Standard hiba
SOCE	Store-operated calcium entry (Raktár által vezérelt kalcium-ion belépés)
Sol	M. soleus

SR	Szarkoplazmatikus retikulum
STIM1	Stromal Interaction molecule 1
SUE	Septin Unique Element
TA	M. tibialis anterior
TC	Terminális ciszterna
TnC	Troponin C
TNF- α	tumor nekrosis faktor alfa
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometán
TRITC	Tetrametilrodamin-izotiocianát
T-tubulus	Transzverzális tubulus rendszer
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule (ér eredetű adhéziós fehérje 1)

2 Bevezetés

Az élet mozgás; a mozgás élet. Mozgásunkat két szervrendszer, a vázizomzat és a csontrendszer szoros együttműködése biztosítja. Ezen rendszerek molekuláris szintű megfelelője a kontraktilis fehérjék és a citoskeletális rendszer. Kölcsönhatásainak pontosabb megértése számos, a vázizomműködéssel kapcsolatos nyitott kérdésre adhat választ.

Az orvostudomány fejlődése során a különböző szervrendszerek működésének egyre mélyebb és pontosabb megértésére törekedett az ember életminőségének javítása, illetve megőrzése céljából. A jelentős ismeretanyag ellenére, a vázizomrendszerünk élettana és az izomzatot érintő kórfolyamatok lefolyása az eddig egyik kevésbé feltárt terület. A harántcsíkolt vázizomzat megfelelő működése rendkívül fontos mind egyéni, mind társadalmi szinten egészségügyi és gazdasági szempontból is. Az izomsorvadásos betegségek, az időskori izomvesztés és a mikrogravitáció okozta izomleépülés jelen korunkban általánosan előforduló, mindennapos nehézségeket okozó tényezők. Ezen folyamatok teljesebb megértése olyan kezelési lehetőségek megalapozásához vezethetnek, melyek számos egészségügyi problémára jelenthetnek megoldást.

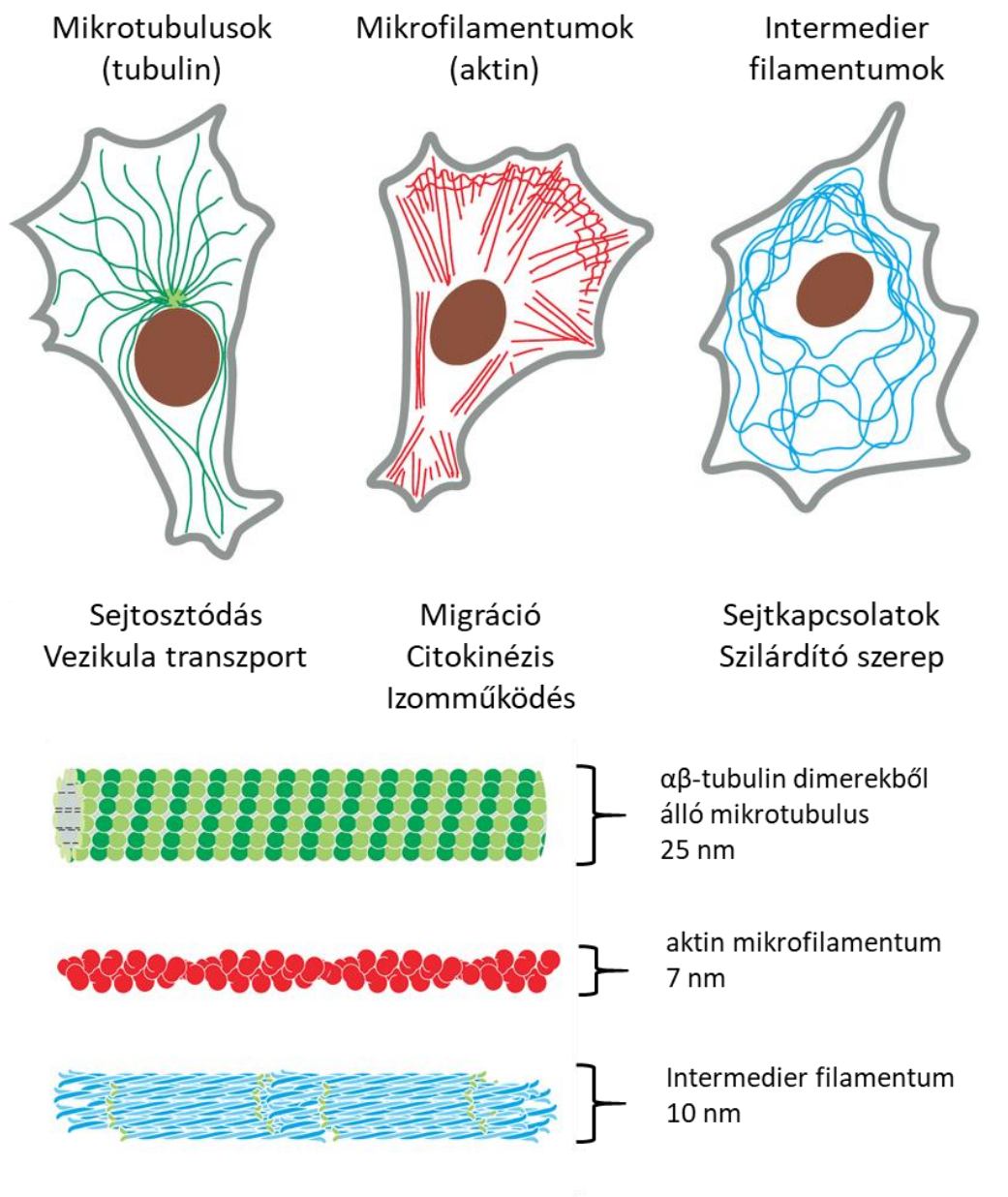
A harántcsíkolt vázizomsejtek molekuláris szintű működését már részben leírták, de komplex szabályozásukat még nem sikerült teljesen feltárni. Rendkívül magas szintű szerkezeti összetettsége miatt a vázizomrostok többmagvú rostjaiban található citoskeletális rendszer működésének megértése hozzásegíthet e szabályozás lépéseinek feltárásához. Az eddig ismert citoskeletális alkotóelemeket - az aktint, az intermedier filamentumokat és a mikrotubulusokat - már vizsgálták, és szerepüket részben felderítették, azonban az utóbbi évtizedek során újabb vázfehérje-családot azonosítottak, a szeptineket. Ezen szeptin fehérjék egymással igazoltan képesek oligomereket és magasabb szintű szerkezeteket képezni. A szeptin fehérjéket számos sejttípusban vizsgálták már, és több fontos szerepüket is tisztázták. Makromolekuláris komplexeket alkotva részt vesznek a sejtosztódás, differenciálódás, migráció, immunválaszok, áttétképződések folyamataiban. A szeptinek vázizomműködésben betöltött szerepe azonban még nem tisztázott. Szerkezeti összetételük alapján négy nagy csoportba sorolhatjuk a szeptineket. A szeptin7 egyedüli a csoportjában, és eddigi ismereteink szerint a magasabb szintű komplexek felépítésében rendkívüli fontossággal bír.

In vitro és *in vivo* szerepüket munkacsoportunk írta le először és ezen ismeretanyag új lehetőséget nyújthat a harántcsíkolt vázizomrostok molekuláris szabályozásának megértésében. Jelen dolgozatban az egereken elvégzett kísérletek *in vivo* és *in vitro* eredményei kerülnek bemutatásra.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A citoszkeletális rendszer

A citoszkeleton vagy más néven sejtváz egy egymással kölcsönható és egymáshoz kapcsolódó fehérjeszálak összetett és dinamikus hálózata, amely minden sejt citoplazmájában jelen van [1]. Három fő komponensből áll: mikrofilamentumokból, intermedier (köztes) filamentumokból és mikrotubulusokból [2]. Ezek között a fehérjék között megtalálhatóak olyanok, melyek a sejt igényeitől függően gyors összeépülésre vagy szétszerelésre képesek, ami dinamikus változásokhoz vezet [3]. A citoszkeleton dinamikájából adódóan számos funkciót lát el (1. ábra). Elsődleges feladata, hogy szabályozza a sejt alakját és ellenálljon a deformációval szemben, valamint biztosítja a kapcsolatot az extracelluláris térrel és az ott jelenlévő kötőszövevel és más sejtekkel [4]. A citoszkeleton a korábban említett tulajdonságai miatt részt vesz a sejtek migrációjában is. Ezen túlmenően számos jelátviteli útvonalban, az extracelluláris anyagfelvételében, vagyis az endocitózisban, a sejtosztódás során a kromoszómák szegregációjában, a sejtosztódás citokinézis szakaszában és a sejtosztódás megszervezésében is szerepe van [5]. Az említett sejt folyamatokon kívül különleges struktúrákat is felépíthet, például flagellákat, csillókat, valamint lamellipodiákat és podoszómákat is képezhet. Sejtípustól függően a citoszkeleton összetétele, struktúrája, működése és dinamikája jelentősen különbözhet.



1. ábra: A „klasszikus” citoszkeletális rendszer. A sejtváz főbb ismert tagjai és funkciójuk a szeptinek felfedezése előtt [6].

3.1.1 Aktin

Az aktin fehérje szerkezete globuláris, mérete megközelítőleg 42 kDa, átmérője 4-7 nm. Mikrofilamentumokat képeznek a citoszkeletonban. Aktin esetén három fő izoformát azonosítottak: az alfa, a béta és a gamma csoportot [7]. Az izomszövetekben található alfa-aktinok a kontraktilis apparátus fő alkotóelemei. A béta- és gamma-aktinok a legtöbb sejtípusban együtt jelennek meg a citoszkeleton alkotóelemeiként és a belső sejtmozgás közvetítőiként. A sejtekben megjelenhet szabad monomerként, G-aktinként, vagy egy lineáris

polimerként, azaz mikrofilamentumként, az F-aktin formában [8]. Mindkettő forma nélkülözhetetlen számos létfontosságú sejtfunkció kialakításához. Ilyen folyamat például a migráció, sejtosztódás, a sejthalak meghatározása, az izomösszehúzódás, a vezikulák és organellek transzportja, különböző jelátviteli folyamatok és a sejt-sejt, valamint a sejt-környezet kapcsolatok kialakítása. Ezen folyamatokban az aktin fehérjék és a sejtmembrán kölcsönhatásai kiemelt szerepet játszanak. Részt vesznek a dezmoszómák és a hemidezmoszómák felépítésében [9].

3.1.2 Tubulin

A tubulinok evolúciósan erősen konzervált fehérjék, amelyek minden eukariótában megtalálhatók [10]. Az eukariótákban hat tubulin izoformát különböztetünk meg, bár nem mindegyik van jelen minden fajban. Rendelkezik GTPáz aktivitással, összeszerelő és szétszerelő képességgel, valamint polimer szerkezetet alakíthatnak ki. Mind az α , mind a β tubulinok tömege körülbelül 50 kDa [11]. Az $\alpha\beta$ -tubulin dimerek mikrotubulusokká állnak össze, ami egy dinamikus polimer, amely számos funkcióban vesz részt, de elsődleges a mitózisban betöltött szerepük. A kromoszómák szétválásánál elengedhetetlenek a kinetokor régióhoz kapcsolódó mikrotubulusok és az osztódási orsó létrejöttéhez [12]. A sejtosztódás mellett a mikrotubulusrendszer nélkülözhetetlen a sejtben belüli vezikulatranszport megszervezéséhez is. A mikrotubulusok polarizáltságuk miatt a dinein és kinein motorfehérjék számára szolgálnak vázszerkezetként [13].

3.1.3 Intermedier filamentumok

Az intermedier (köztes) filamentumok nevüket arról kapták, hogy az átmérőjük körülbelül 10 nm, ami a citoszkeleton két másik fő elemének, az aktin filamentumoknak (körülbelül 7 nm) és a mikrotubulusoknak (körülbelül 25 nm) az átmérője között van. Ellentétben az aktin filamentumokkal és mikrotubulusokkal az intermedier filamentumok nem vesznek részt közvetlenül a sejtmozgáshoz kapcsolódó folyamatokban. Az eddigi megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy alapvetően szerkezeti szerepet játszanak azáltal, hogy mechanikai szilárdságot biztosítanak a sejteknek és szöveteknek [14]. A nem polarizált fehérjeegységek közötti szoros kapcsolatok nagy szakítószilárdságú filamentumokat biztosítanak. Ez teszi őket a citoszkeleton legstabilabb összetevőjévé. Ezen ellenállóságuknak köszönhető előfordulásuk a különösen tartós szerkezetekben, mint például a haj, a bőr és a körmök [15]. Az intermedier filamentumok elsődleges funkciója a sejt-kapcsolatok létrehozása és a feszülés alatt lévő hámsejt rétegek

szakadásának megakadályozása. Az intermedier filamentumok közötti komplex kölcsönhatásokból adódik, hogy együttesen kialakított szerkezetük növeli a sejtek és szövetek torziós, nyomó-, nyújtó- és hajlítóerőkkel szembeni ellenállását. Részt vesznek továbbá a magmembrán kialakításában is, ahol segítik a sejt DNS-tartalmának védelmét és szerveződését [16].

3.2 Szeptinek

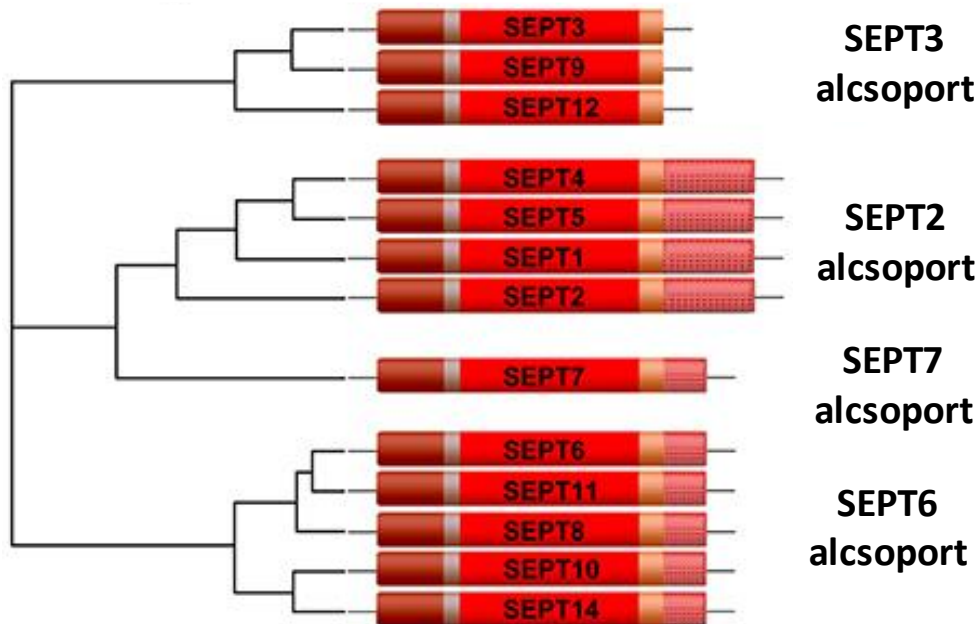
3.2.1 A szeptin fehérjecsalád

A szeptinek felfedezése 5 évtizeddel ezelőtt történt, jelentőségük feltérképezése azóta is tart. A szeptin név eredete a szeparáció kifejezésből származik, és a *Saccharomyces cerevisiae* bimbózó élesztőben írták le először, ahol a sejtosztódásban, az utódsejtek elválasztásában játszik fontos szerepet [17]. Az azóta eltelt évtizedekben más eukariótákban is kimutatták őket és számos funkciót kötöttek a szeptin fehérjecsalád tagjaihoz [18]. A szeptinek evolúciósan erősen konzervált guanozin-trifoszfátot (GTP) kötő fehérjék, valamint GTPáz funkcióval is rendelkeznek [19]. A szeptinek legkorábban felismert, sejtosztódásban betöltött szerepén kívül egyéb sejtspecifikus funkciókat is elláthatnak. Ebből adódóan fontos szerepük van számos fiziológiai és patológiás sejtfolyamatban, például a karcinogenezisben, exocitózisban, endocitózisban és a membránszerveződésben [20–27]. Eddig 13 humán szeptin izoformát azonosítottak, amelyeket szerkezet- és a szekvenciahomológia alapján négy funkcionális csoportba soroltak (SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7) [19,28]. A 2. ábrán ezen szerkezeti csoportok és az azokba besorolt izoformák láthatóak, főbb doménszerkezetükkel.

A Doménszerkezet



B Homológia csoportbesztás



2. ábra: **A szeptinek csoportosítása és a főbb doménrégiók.** (A) Egy szeptin fehérje doménszerkezete és annak funkciója [29]. (B) A szerkezethomológia alapján beosztott 13 emberben kimutatott szeptin izoforma.

3.2.2 A szeptinek szerkezete és működése

A szeptinek funkcióját és a hozzá szükséges aminosavszerkezetet vizsgálva megfigyelhetjük, hogy a szeptinekben jelen van egy AKAD szekvencia, valamint egy Walker A (GxxxxGKS/T) és B (DxxG) motívum, melyek a GTP specifikus kötődésért és a GTP guanin alegységével, valamint a GTP foszfátcsoportjával kialakított kölcsönhatásért felelősek (polibázis régió). A GTP hidrolízise egy Mg^{2+} részvételét is igényli a bontási folyamatban. A szeptinek meglepő módon a GTP-kötő doménjeiken keresztül képesek oligomerizálódni és ezzel filamentózus, különböző szeptin izoformákat tartalmazó komplexeket hoznak létre [30]. Ezen komplexek kialakításához a szomszédos GTP-kötő domének, vagyis G felszín, valamint az N- és C-terminális nyúlványok által kialakított NC felszín közötti kölcsönhatások szükségesek. A

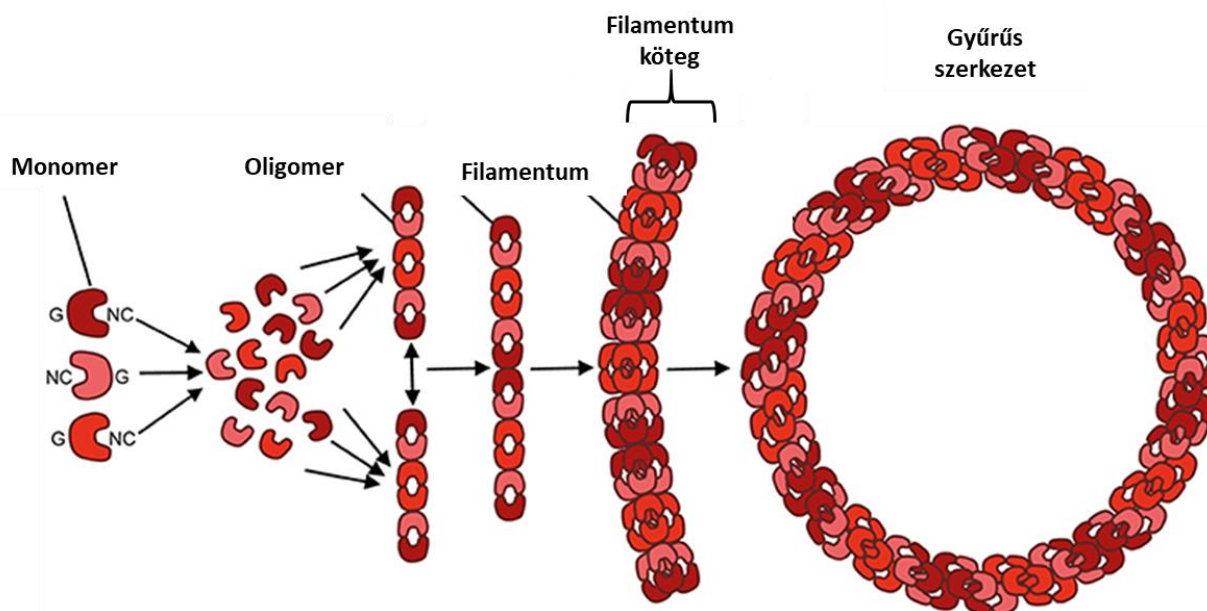
mélyebb szerkezeti vizsgálatok kimutatták, hogy a GTP bekötődése konformációváltozást hoz létre a fehérjében, amely destabilizálja az NC felszínt, míg a GTP hidrolízis stabilizálja a G felszínt [30–32]. A szeptin monomerek nagyobb sebességgel hidrolizálják a GTP-t, mint a dimerek és oligomerek, mert a GTP-kötő domén a komplexben elhelyezkedő szeptinek esetén nem mindig hozzáférhető. Azonban nem minden szeptin képes a GTP hidrolízisére. A SEPT6 csoporton belül az izoformáknak hiányzik egy kulcsfontosságú pozícióban lévő treonin aminosava, aminek hiányában akadályozott a GTP guanozin-difoszfáttá (GDP-vé) alakítása [30]. Ezen szeptinek alapállapotukban a GTP-hez kötött formában vannak jelen, így az NC- és G-felzíneken való kölcsönhatásuk nem szabályozható a GTP hidrolízisen keresztül [17].

A szeptinek szerkezetében fontos szerkezeti sajátosság a Septin Unique Element (SUE) elnevezésű szekvencia, amely a G-től az NC-felzínig terjed, és lehetővé teszi a filamentózus szerkezetek kialakítását [33]. A SUE strukturális elem 60 aminosavból épül fel és két egységre osztható. Az első részt három kis β -szál építi fel, melyek egy nagymértékben megcsavarodott β -meander szerkezeti motívumot ($\beta\alpha$ - $\beta\epsilon$) alkotnak. A SUE második fele két egymást követő, evolúciósan konzervált aminosavszekvenciákból álló kanyarral kezdődik, és két hélix szerkezeten keresztül, az $\alpha 5$ és $\alpha 6$ hélixeken keresztül folytatódik. Az $\alpha 6$ hélix a G-domén második leghosszabb hélice, amely az NC-felzín részét képezi [33].

A szeptin izoformák jelentős részének C-terminális doménjében Coiled Coil (CC) szekvenciák találhatók, kivételt képeznek például a humán SEPT3 csoport tagjai és az élesztő szeptin Cdc10. Emberi sejtekben a CC szekvencia hossza a különböző szerkezeti csoportok tagjai között különbözik. A SEPT2 csoportba tartozó tagokban körülbelül 30 aminosavat tartalmaz, míg a SEPT6 és SEPT7 csoportokban körülbelül 60 aminosav építi fel. A CC domén mellett a C-doménen belül két további szerkezeti rész is megtalálható: C_N , valamint a CC-t követő régió. A C_N -régió nagyfokú szerkezeti és szekvencia variabilitással rendelkezik, és ennek köszönhetően rendkívüli rugalmasságot mutató szerkezeti elem [34,35]. A vizsgálatok alapján a Coiled Coil domént kísérő régió rendezetlen szerkezetű. A SEPT6 és SEPT7 csoportokban a C-terminális szakasz egy polibázisú szekvencia (K/RK/RDKxK/RKN/K, illetve EKNKKKGK). Ez a motívum a más szeptinekben található különböző polibázisos doménekkal (PB1 és PB2) együtt segíthet kialakítani számos membrán-szeptin kölcsönhatást [36–39]. A szeptinek szerkezete különböző mértékben feltárt területekkel rendelkezik. Az összes szeptinen belül az N-terminális domén a legkevésbé vizsgált és a legváltozatosabb domén. A G-felzín előtt található α -hélix régió ($\alpha 0$) gyakran tartalmaz egy már fent említett polibázisos régiót (PB1), amely eddigi ismereteink alapján kiemelt fontossággal bír a membráninterakciók létrehozásában [29]. A

szeptinek szerkezeti vizsgálatainak nehézségét adja, hogy az N-domén nagyobb része azonban rendezetlen szerkezetű [40].

Jól látható, hogy a szeptinek rendkívül változatos és összetett szerkezettel bíró fehérjék, melyek egymással kölcsönhatva még bonyolultabb struktúrák felépítésére is képesek (3. ábra). Az összetettebb, magasabb szintű szerveződést és funkciót mutató szeptin struktúrákhoz elengedhetetlen a heterogén összetétel, vagyis egy komplexben rendszerint többféle csoportból (SEPT2,3,6,7) származó izoformák is részt vehetnek a polimer felépítésében (3. ábra). A monomerek jelenlegi ismereteink alapján hexamer vagy oktamer komplexeket alkothatnak [41]. Ezek az oligomerek filamentumokká állhatnak össze és ezek a filamentum szálak kötegekbe rendeződhetnek. Az egyedi szálak és kötegek is felvehetnek ketrec vagy gyűrű struktúrát [34].

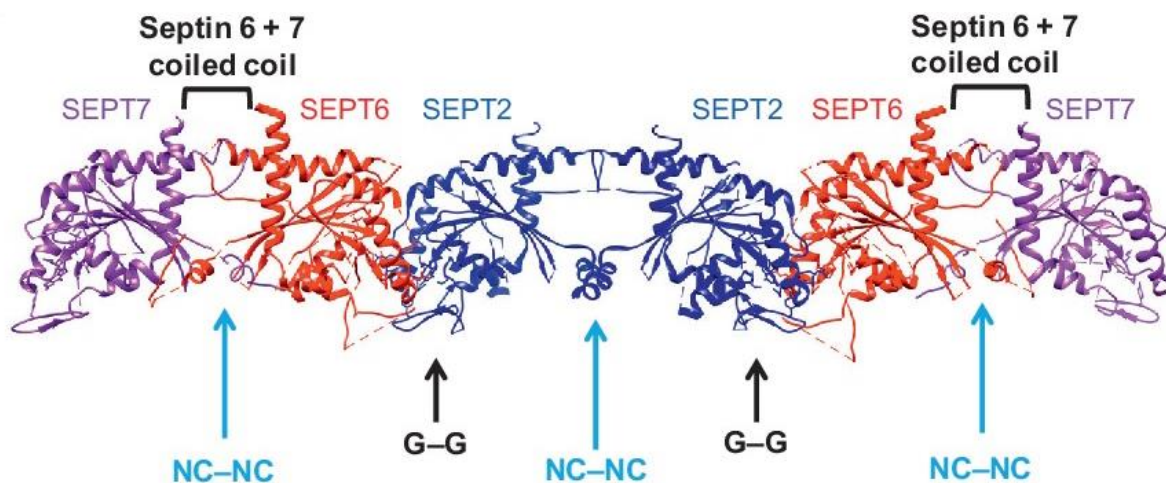


3. ábra: A szeptinek szerveződése. A nagyobb szerkezeteket a monomerek közötti kölcsönhatások stabilizálják [42].

A már említett fehérjemotívumok a változatos összetétel miatt különböző fehérje és membrán kölcsönhatások alapjait képezhetik. Az ilyen interakciók vizsgálata számos nehézséget hordoz magában, azonban elengedhetetlen a citoskeletális szeptin rendszer teljesebb megértéséhez. A GTP megkötése és hidrolízise monomer szeptin izoformák esetén már vizsgált kérdéskör, ellenben a filamentumokban és a komplexekben ez a mechanizmus még mindig nem teljesen tisztázott [43]. Ezen információ jelentősen befolyásolhatja a szeptinek dinamikáját

kapcsolatos ismereteinket. A jelenleg meglévő röntgen krisztallográfiás komplex szerkezeti adatok ellentmondásosak, és az ezekből származtatott kérdéses eredmények téves következtetésekhez vezethetnek. Az élesztővel és *Drosophila*-val végzett korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy több szeptin izoforma is részt vehet egy molekulakomplex felépítésében. A kísérletekben megvizsgált hetero-oligomerek kristályszerkezete szerint az N- és C- terminális részek (NC) az alegységek közötti kölcsönhatásért felelősek, ezenkívül a G-domain felszínek (G) is szerepet játszhatnak a fehérjekapcsolatok kialakításában (4. ábra) [43].

Ahogy a strukturális csoportok meghatározásából és eddigi szerkezeti ismereteinkből tudjuk, a Szeptin7 csoportjának egyedüli képviselője. Esszenciális szerepet játszik a hetero-oligomer komplexek kialakításában, és a magasabb rendű citoskeletális struktúrák összeszerelésében.



4. ábra: A szeptin monomerek között kialakuló kölcsönhatások térbeli helyzete. A röntgen krisztallográfiával kimutatott 7-6-2-2-6-7 szeptinekből felépülő hexamer szerkezete [44].

3.3 A szeptin7 fehérje

A szeptin7 fehérjét kódoló génszakasz (SEPTIN7) emberben a 7p14.2 kromoszóma területen található és 1254-1311 nukleotidot tartalmaz, 19 exon régióval rendelkezik, ami 418-437 aminosavat kódol. A méretbeli eltérés a feltételezett alternatív hasítási verziók miatt került ilyen módon megadásra. A szeptin7 cDNS-szekvenciája emberben homológ a *cdc10*-el élesztőbeli fehérjét kódoló szekvenciával. Az egyes szeptinek háromdimenziós röntgen krisztallográfiás szerkezete alapján meghatározták, hogy a szeptin7 a többi szeptin izoformához hasonlóan egy kanonikus Ras-szerű G-domént tartalmaz, amely 6 β -szálból álló meander motívumból és 5 α -hélixből áll. A szeptin7 egy G-felületén keresztül képes önmagával dimert képezni [33,45].

3.3.1 A szeptin7 fehérje szerepe élettani folyamatokban

A szeptin7 jelentőségét már többféle sejtélettani folyamatban is leírták. A citoskeletális fehérjék szinte minden molekuláris folyamatban érintettek közvetlen vagy közvetett formában, hiszen a reakciókhoz szükséges fizikai közelséget, elhelyezkedést biztosítják. A biokémiai folyamatok rendszerint valamilyen szintű membránszerveződést igényelnek, beleértve a receptorok klaszterizációját, a jelátviteli fehérjék komplexbe szerveződését.

A *Drosophila* modellrendszerrel végzett kísérletek során a szeptin7 hiánya és emelkedett kifejeződése is repülési rendellenességet eredményezett, ami a kalciumraktárak és a kalciumhomeosztázis érintettségére utalt. A STIM1-Orai fehérjék összeszerelődésén keresztül, a SOCE (Store Operated Calcium Entry, raktár-vezérelt kalciumbelépés) folyamatában történő elégtelen szabályozás okozta a repülési idő csökkenését. Ezen eredmények alapján a szeptin7 az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozásában közvetlenül vagy közvetett módon is részt vehet [27,46,47].

A szeptin rendszer és szeptin7 szerepe a migrációban és a fagocitózisban fontos tényező a különböző immunsejtek funkciója szempontjából. Az immunsejtek érpályából történő kilépésében, a kórokozók bekebelezésében, az ehhez szükséges membránmódosulások kialakításában, az immunrendszer tagjai között kialakuló sejt-sejt kapcsolatok kialakításában vagy a szignáltranszdukcióban is szerepet játszhat [48].

A szeptin7 szerepét eddig neuronokban és az idegrendszerben vizsgálták, ahol több sejttypusban is kimutatták. Részt vesz a dendritok kialakításában, pontosabban a sejttest és a dendrittövek közötti szerkezet létrehozásában, valamint tenyésztett neuronoknál a dendritikus elágazásokban is kimutatták. A dendritokban a szeptin7 a specifikus funkcióhoz szükséges jellegzetes sejthalak kialakításához járul hozzá azáltal, hogy összetett struktúrákat, többek között körkörös filamentumokat vagy térhálós szerkezetet alkot [49].

Különböző daganatok vizsgálata kimutatta a szeptin7 szerepét ezekben a folyamatokban. A sejtosztódásban betöltött szerepe miatt befolyásolhatja bizonyos gliómák, papillaris pajzsmirigyák (PTC) és májkarcinómák kialakítását. A szeptin7 túlzott mennyisége, amit okozhat fokozott expresszió vagy csökkent degradáció, gátolhatja a sejtproliferációt és leállítja a sejtciklust, és a tumorsejtek apoptózisát indukálhatja. A különböző sejttypusokban a szeptin7 megváltozott mennyiségének eltérő következményei lehetnek. A fiziológias szinttől való eltérés kedvezhet a malignus átalakulásnak, de gátolhatja is azt. A daganatos folyamat lefolyása közben a szeptin7 expresszió drasztikusan változhat. A szeptin7 downstream hatással bír a rákos sejtek ERK3 (Extracellular signal-regulated kinase 3) útvonalára, ezáltal befolyásolva a

migrációt, a tüdőrák esetén az áttétképződést [50]. A szeptin7 hatásának kettősségét az is jól mutatja, hogy tumorszupresszorként írták le a PTC esetén. A szeptin7 expressziója és szubcelluláris elhelyezkedése bizonyítottan összefügg a PTC specifikus altípusaival [51]. A krónikus alkoholizmus vagy vírusfertőzés okozta májgyulladás következtében kialakuló hepatocelluláris karcinóma (HCC) kórlefolyásában is szerepet játszik a szeptin7. A MiR-127 mikroRNS szintje csökken HCC-ben, ami a szeptin7 fehérjeexpressziójának a csökkenéséhez vezet és megállítja a sejtciklust [52].

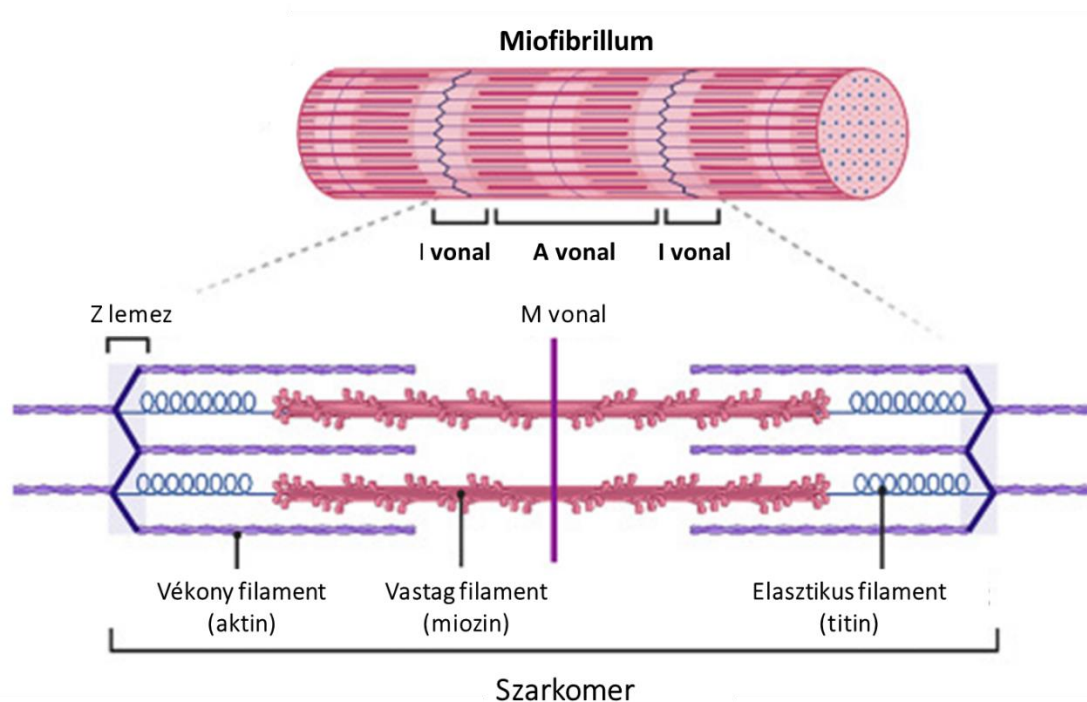
A szeptin7 ilyen ellentmondásosnak tűnő hatása arra vezethető vissza, hogy a sejtosztódás folyamatában két jól elkülönülő, kinetikai és elhelyezkedési szempontból különböző folyamatban is részt vesz. Mind a kontraktilis gyűrű szerveződéséhez, mind az azt követően kialakuló utódsejtek szeparációjához elengedhetetlen. További vizsgálatok kimutatták, hogy a szeptinek a sejttípustól függően eltérő módon befolyásolhatják az emlős sejtek citokinézisét [53]. A tipikusan adherens sejtek, melyek más sejtekkel és a kötőszöveti rostokkal állnak közvetlen kapcsolatban, a szeptin7 hiányában többmagvú, funkcióvesztett óriássejteké válnak. Egyik ilyen adherens sejttípus a fibroblaszt. A genetikailag módosított, szeptin7 hiányt mutató egérembriók egyedfejlődése során a középső csiralemez (mezoderma) nem megfelelő fejlődése súlyosan befolyásolja a kötőszövet kialakulását és letális következményekkel jár [54]. Az adherens sejtekkel ellentétben a nem kitapadó sejtek, mint a vérsejtek osztódásukat követően szétválnak egymástól. A szeptin7 hiányának következtében a mikrotubulus-hasító gépezet szerveződési hibája túlzottan stabil mikrotubulusokat eredményez, azonban a stathmin fehérje jelenléte molekuláris általános mikrotubulus destabilizátorként funkcionálva helyreállítja a citokinézis folyamatát, vagyis ezekben a nem adherens sejtekben az osztódás szeptin-független módon is végbemehet [54].

Az alábbi példákat szemlélve kijelenthető, hogy a szeptin7 szerepe eltérő lehet különböző sejtekben. Ez a diverzitás többek között a sejtspecifikus környezettől és az adott sejttípusokban kifejeződő partnerfehérjéktől is függhet. A szeptin7 szeptin rendszerben betöltött szerepe miatt a többi szerkezeti alcsoport tagjaival is kölcsönhat, és esetenként egymás hiányát is kompenzálni képesek. Ez rávilágít a fehérje sejtspecifikus vizsgálatainak szükségességére, különösen igaz ez egy olyan specifikus és meglehetősen összetett rendszerben, mint a vázizomrostokban.

3.4 A vázizomrostok jellemzése

3.4.1 A vázizomrostok felépítése

Az egyedi vázizomrostokat egy sajátos sejtmembrán, a szarkolemma, veszi körül. A sejt citoplazmájában helyezkednek el a kontraktilis fehérjék, melyek jelentős tömegét alkotja a sejt fehérjetartalmának. A kontraktilis rendszert két fő alkotóelem építi fel: a vastag filamentumot a miozin képezi, míg a vékony filamentum nagyrészt aktin molekulákból áll [55]. A rostban megtalálhatók még az energiatermeléshez nélkülözhetetlen nagyszámú mitokondriumok és a szarkolemma alatt elhelyezkedő sejtmagok. A miofilamentumok miofibrillumokba rendeződnek, melyeket egy fejlett membránrendszer, a szarkoplazmatikus retikulum (SR) vesz körül. Egy izomrostot néhány száz miofibrillum épít fel, amelyek mindegyike a Z-lemezek által több, megközelítőleg 1,9-2,1 μm hosszú szarkomerre bontható [56]. A vázizomrostok fénymikroszkópos vizsgálata során váltakozó világos és sötét csíkok láthatóak, innen ered a harántcsíkolt elnevezés (5. ábra). A szarkomer azon része, ahol az aktin és a miozin fehérjék átfednek egymással egy sötét, anizotróp (A) vonalat képez, a csak aktint tartalmazó részek pedig egy világos, izotróp (I) vonalat. A csak miozinból álló terület a H-zóna, amely középvonalában M-vonallá vastagodik [57].



5. ábra: **A vázizom felépítése.** Az izomrostokat felépítő miofibrillum-kötegek szerkezete a szövettani területekkel. A vázizom és a kontrakciós apparátus szerkezeti egysége a szarkomer [58].

3.4.2 A kontraktilis fehérjék

A kontrakciók kialakításáért a már említett kontraktilis rendszer két eleme, az aktin és a miozin a felelős. Az összehúzódások során a két fehérje közötti molekuláris szintű interakciók hozzák létre az élethez elengedhetetlen mozgás alapját.

A miozin egy, a vázizomban fellelhető motorfehérje, ami az izomösszehúzódásért felelős energiaigényes konformációváltozás kialakításában játszik szerepet [59]. A miozin molekulának van egy kétfelé ágazó fejrésze, ami ATPáz aktivitással bír és egy nyaki szakaszhoz kapcsolódik. A fej és a nyaki rész együtt alkotja a miozin nehéz lánc doménjét (Heavy Myosin Chain), ami mintegy 200 kDa tömegű. A nehéz lánchoz csatlakozik a könnyű lánc (Light Myosin Chain), ami az egész szerkezet farki részének tekinthető és egy 15-30 kDa tömegű fehérjedomén [60]. Több száz miozin molekula épül össze egyetlen komplexszé, ami kialakítja a vastag filamentumot [61].

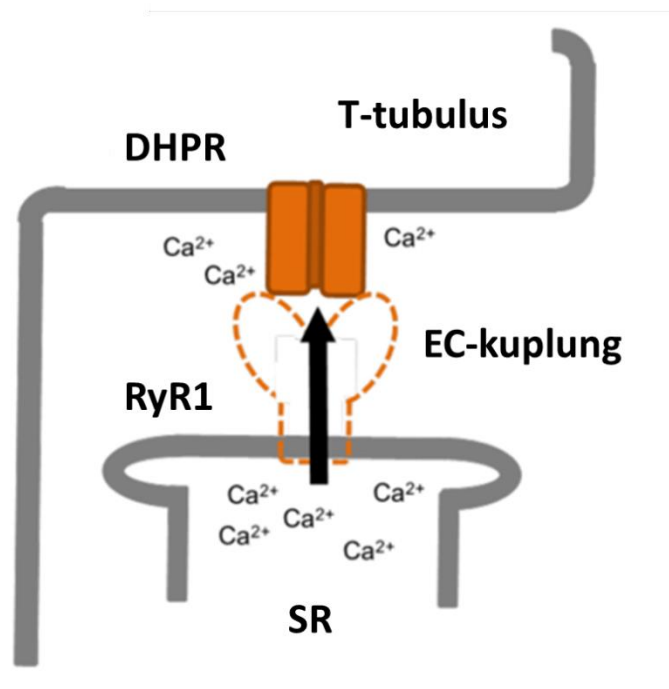
A vázizom vékony filamentumának fő alkotóeleme az aktin. Ahogy már korábban kifejtettük, a fehérje két ismert formát vehet fel: globuláris monomerként (G-aktin, 42 kDa-os molekulatömeg), vagy fibrilláris polimer (F-aktin) alakjában [62].

Az aktinnal számos, a kontrakció szabályozásában résztvevő fehérje áll kapcsolatban. Az ugyancsak filamentózus tropomiozin az aktin filamentum köré csavarodva helyezkedik el, olyan konformációban, amelyben a tropomiozin molekula lefedti az aktin monomer miozin-kötőhelyét (G-aktint). A tropomiozin szerepe az aktin és miozin közötti kapcsolat kialakulásának gátlása és ezáltal a kontrakció szabályozása. Az aktinhoz kapcsolódik továbbá egy troponin komplex, ami három alegységből áll. A troponin-C (TnC, MW=18 kDa) a Ca^{2+} ion megkötésében játszik szerepet; a troponin-T (Tn-T, MW=37 kDa) egy kapcsolófehérje, ami a troponin komplexet a tropomiozinhez rögzíti; a troponin-I (Tn-I, MW=24 kDa) közvetlenül felelős a gátló hatásért, mert megakadályozza az aktin és miozin közötti kereszthíd képződést [63]. A komplex működése folyamán az elektromechanikai kapcsolás során a megemelkedett Ca^{2+} -szint miatt a komplex Ca^{2+} -ot köt és konformációt változtat, aminek a következtében megszűnik a TnI gátló szerkezete és létrejöhetnek az aktin-miozin kapcsolatok.

3.4.3 T-tubulus rendszer és szarkoplazmatikus retikulum

A vázizomrostok kontraktilis funkciójának elvégzéséhez a már korábban említett kontraktilis fehérjék nagy mennyiségben szükségesek. Ez a mennyiség akkora, hogy a rostban belül egyéb sejtalkotók számára korlátozott térfogat áll rendelkezésre. A nyugvó rostokban a sejtmagok a perifériára szorulnak ki és a szarkolemma alatt lesznek megtalálhatóak. Az ilyen sűrűn strukturált szerkezetekben a más sejteknél megszokott anyagtranszportok is módosulnak. A megfelelő anyagtranszportokért és az akciós potenciál vezetéséért a szarkolemmában transzverzális irányban a rostok belseje felé irányuló betüremkedések formálódnak, amelyek egy speciális csatornarendszert, a T-tubulus rendszert alkotják. A vázizomzatban a T-tubulusok elhelyezkedése szigorúan meghatározott, az A és I vonalak között helyezkednek el [64]. A T-tubulus rendszer szoros kapcsolatban áll a szarkoplazmatikus retikulummal (SR), ami a vázizomrostokban jelenlévő módosult endoplazmatikus retikulum. A szarkomerekkel párhuzamosan elhelyezkedő longitudinális (L) tubulusok a T-tubulus közelében, a Z-lemezek fölött terminális ciszternákká (TC) tágulnak és szoros fizikai közelségbe kerülnek a T-tubulus membránjával. A T-tubulusokhoz mindkét oldalról csatlakozik az SR egy-egy kiöblösödő térrésze, a terminális ciszterna, és a három cső együttesen alkotja a triád struktúrát [65]. A szarkolemma és az SR közötti fizikai közelség a vázizomműködés egyik elengedhetetlen

feltétele. A szarkolemmában megtalálható dihidropiridin receptor (DHPR) a membránon tovaterjedő akcióspotenciát érzékelve, feszültség-szenzorként működve megváltoztatja a konformációját és a DHPR-rel közvetlen kapcsolatban lévő 1-es típusú rianodin receptor (RyR1) konformáció változását idézi elő (6. ábra). A nyitott RyR1-en keresztül az SR intracelluláris Ca^{2+} -raktárból felszabaduló Ca^{2+} teszi lehetővé az aktin-miozin közötti kapcsolat kialakulását és a kontrakció megkezdését. Ezt a folyamatot, amikor az elektromos impulzus (akciós potenciál) kontrakcióvá alakul, elektromechanikai kapcsolásnak, vagy más néven EC-kuplungnak nevezzük.



6. ábra: Az izomrost elektromechanikai kapcsolata a T-tubulus és a szarkoplazmatikus retikulum membránrendszere révén. A belső kalciumraktárból felszabaduló kalcium biztosítja a kontrakcióhoz szükséges teljes mennyiséget [66].

3.4.4 Az emlős vázizomrostok típusai

A makroszkóposan csak fehér és vörös izomnak nevezett képleteket molekuláris biológiai módszerekkel megvizsgálva bennük különféle fehérjéket találhatunk. Az izmokat alkotó izomrostok sokmagvú természetükből adódóan egy heterogén rendszert képeznek. Újabb megfigyelések szerint az ugyanazon rostban belüli egyes magok eltérő funkcióval rendelkezhetnek, ezért rost és rost között a tulajdonságok különbözhetnek [67]. A rostok között

a színnek megfelelően különbséget tehetünk a mioglobin oxigénraktározó fehérje mennyisége alapján is.

A tudomány fejlődésével a miozin ATPáz aktivitása szempontjából osztották fel a rosttípusokat az I. (lassú) és a II. (gyors) aktivitású rosttípusokra [68]. A miozin ATPáz aktivitás mértéke jól korrelál a vázizomrostok kontrakciós sebességével [68]. A rostokat az energiatermelésük kinetikája alapján, vagyis aerob-anaerob reakciók alapján is két csoportra lehetett felosztani. A kétféle paraméter, vagyis a miozin ATPáz aktivitás és a metabolikus kapacitás összefügg és ezek kombinációjával háromféle rosttípust megkülönböztetése került bevezetésre. Ezen rosttípusok a gyors glikolitikus, a gyors oxidatív-glikolitikus és a lassú oxidatív, melyek a jelenleg is elfogadott általános besorolási csoportok [69].

3.5 Az izom *in vivo* fejlődése (miogenesis) és regenerációja

Az izomsejtek osztódása, fejlődése és differenciációja nem csak az intrauterin élet során fontos. Az életünk során a mindennapokban elszenvedett izomsérülések esetén szükséges izomregeneráció is hasonló folyamatokat igényel. Az izomrostok kialakulásához három fő lépésnek kell megtörténnie. Az izomsejtek képződésének a kezdeti lépése az izomössejtek vagyis a szatellita sejtek (SC) aktiválódása és osztódása. Az így képződő izomsejtek előzetes differenciációt követően a második fejlődési fázisban összeolvadnak egymással, amellyel létrehozzák a jellegzetes sokmagvú izomrostokat. Az utolsó szakaszban a még éretlennek tekinthető izomrostok a megfelelő vázizomrosttípussá differenciálódnak.

A miogenezis kezdeti fázisát a prekursor sejtek (szatellita sejtek) proliferációja jellemzi, amelyet az izomspecifikus gének kifejeződése követ, és végül a differenciálódó mioblasztok érett miotubulusokká történő fúziója zárja le a folyamatot [70–72]. A miotubulusok innervációt követően válnak érett izomrostokká. A szatellita sejtek miogén növekedési faktorok vagy a vázizom sérülésekor megjelenő szignálmolekulák hatására kilépnek az össejtekre jellemző nyugalmi állapotból, és aktivációs fázisba jutnak. Az így keletkező progenitor sejteknek vagy mioblastoknak az izom irányú differenciálódását a MyoD, a Myf-5 és a miogenin transzkripció faktorok expressziója indukálja [73]. Amíg bizonyos növekedési faktorok (különösen a fibroblaszt eredetű növekedési faktorok) jelen vannak, a mioblastok differenciálódás nélkül osztódnak. Amikor ezek a hatások megszűnnek, a mioblasztok osztódása leáll, fibronektint választanak ki az extracelluláris mátrixba, és az $\alpha 5 \beta 1$ integrin, a fő fibronektinreceptoruk segítségével kötődnek egymáshoz [74,75]. Ha ezt az adhéziót kísérletileg blokkoljuk, nem következik be további izomfejlődés, így úgy tűnik, hogy az integrin-fibronektin kötődésből

származó kapcsolat elengedhetetlen a mioblasztok izomsejteké váló differenciálódásának irányításában. A második lépés a mioblasztok láncba történő összeolvadása. Ezt a lépést a sejtmembrán glikoproteinek, köztük számos kadherin és egyéb sejt adhéziós molekula közvetíti. A sejtek közötti fúzió csak akkor történik meg, ha a két sejt mioblaszt-eredetű. Az összeolvadás akár különböző fajok mioblaszt tenyésztete között is megtörténhet; a fajok azonossága nem kritikus [76]. A harmadik lépés maga a sejtfúziós esemény [77–79]. Az izomsejtek fúziója akkor kezdődik, amikor a mioblasztok kilépnek a sejtciklusból. A differenciálódó sejtek egymáshoz rendeződnek és összeolvadnak, hogy az izomszövetre jellemző többmagvú myotubusokat alkossanak. Mint a legtöbb membránfúzióban, a kalciumionok itt is kritikus szerepet játszanak. Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a fúziót a meltrineknek nevezett metalloproteinázok közvetítik [80]. A terminális differenciálódás a késői miogén gének, például a MYH kifejeződése révén azonosítható [60].

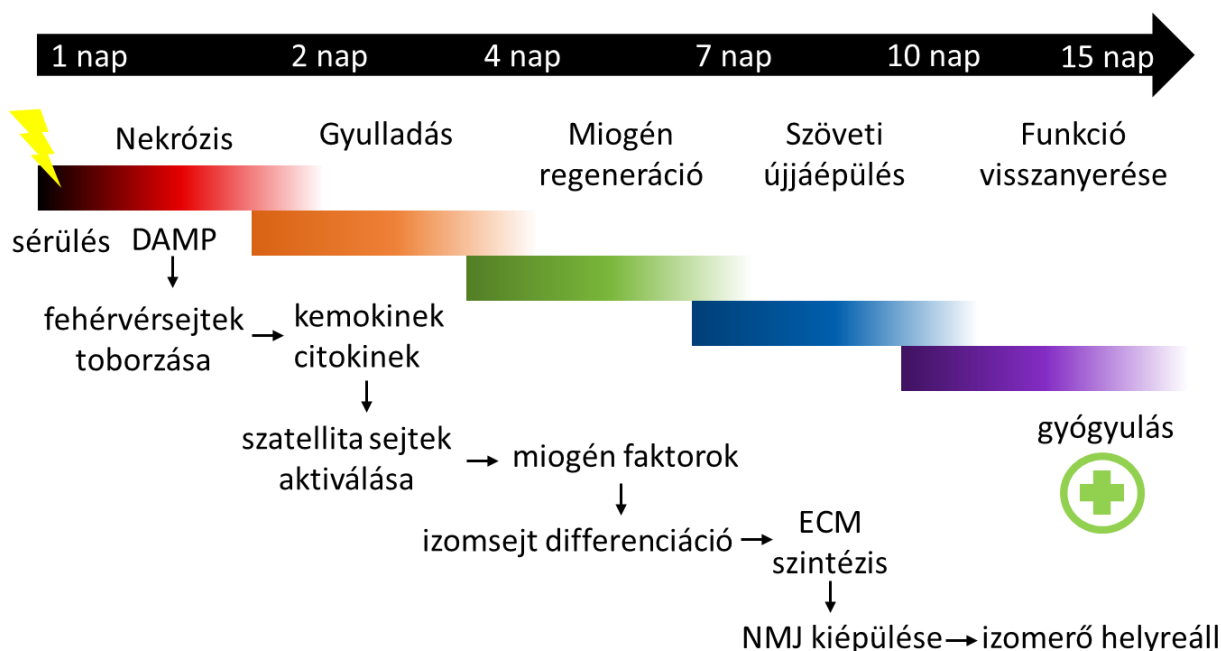
A miogenesis folyamata ennél sokkal összetettebb, hiszen a folyamatot befolyásoló, de az izomrostok kialakulásának konkrét folyamatában nem közvetlenül résztvevő lépéseket is tartalmaz. Természetesen ezek a molekuláris folyamatok is elengedhetetlenek a funkcióképes izomrostok és izomszövet kialakulásához. Az egyik ilyen említett folyamat a szatellita sejtek aktivációja és migrációja, ami citokinek és miokinek együttes szabályozó hatására történik. Továbbá a sejteket és a kialakuló rostot körülvevő kötőszövet szintézise is alapvető a fiziológias funkció biztosításához. Ehhez hozzátartozik a kifejlett izomrostok beidegzése és a neuromuszkuláris junkció (NMJ) kialakítása.

A miogenezis folyamata komplex fehérjeszintézisszerű szabályozással és a vázizomra jellemző transzkripciós faktorok által közvetített regulációval is rendelkezik [81–84]. A vázizomrostok vizsgálata szempontjából pontosan ezen jelenségek okozzák a kutatás nehézségét. A többi sejtípushoz képest a vázizomrostok többmagvú tulajdonsága újabb variabilitást eredményez. Friss kutatások alapján az izomrostban elhelyezkedő egyes magok funkciója a transzkripciós markerek szűrése alapján bizonyos mértékben különbözhet, vagyis az egy rostban belül elhelyezkedő magok az egész rostra ható feladatok csak egy adott részét végzik [67]. Ez a jelenség azt eredményezi, hogy az elvégzett feladatokat figyelembe véve az egy rostban belüli magok alcsoportokba sorolhatóak.

A szeptin7 a fentebb említett fejlődési folyamatok szinte mindegyikében részt vehet, a vázizom működésében azonban ezt a kérdést még nem vizsgálták átfogóan.

Az egyedfejlődés alatt történő miogenezis mellett szükség van az izomrostok sérüléseinek során elvesztett/károsodott rostok pótlására/javítására is. Ez az összetett folyamat a regeneráció. Öt egymással átfedő szakaszra osztható, ahol a fázisok szigorú sorrendben követik egymást (7.

ábra). A sérülés fajtájától és mértékétől függően a regenerációs lépések változó időtartamokat vehetnek igénybe, azonban az egész folyamat jellemzően 2 hét alatt befejeződhet [85].



7. ábra: **A regeneráció 5 fázisa.** Az egymással átfedő fázisok sorrendben: nekrózis, gyulladás, regeneratív miogenezis, szöveti remodelling és a funkció visszanyerése.

Az első fázis maga a vázizomsérülés és az azt követő nekrózis. A szövetkárosító hatás mértékétől és a behatási időtől függően beszélhetünk mikrosérülésekről, rostsérülésekről és az izomszövet teljes pusztulásáról. A regeneráció vizsgálata szempontjából a szövetkárosító hatás megválasztása kiemelt fontosságú [86–89]. Kísérletes szempontból megkülönböztetünk fizikai és kémiai ágenseket, azonban megjegyzendő, hogy *in vivo* fertőzések is okozhatnak izomsérülést. A fizikai behatások a hősokktól a fagyasztásig terjedhetnek, de alkalmaznak káros erősségű elektromos stimulust és tompa traumát is. A szélsőséges hőmérsékleti hatások és a nagy erejű áram hatására a sejtmembránok destabilizálódnak és elvesztik integritásukat [90]. Ez a fajta szövetkárosodás jellemzően a vázizomrostok tápanyaghiányos sérülését modellezi. Ilyen körülmények a szervezetben a vérellátás megszűnésekor jelennek meg. A tompa trauma esetén is hasonló folyamatok játszódnak le, csak ott a szövetekben keletkező ödéma fogja elzárni a vérellátást és vezet az izomszövet tápanyaghiányához [85]. A mikrosérülések szimulálására alkalmazható módszer a vizsgálni kívánt izomcsoport túledzése. A kémiai izomroncsolás kiváltásához citotoxikus vegyületek (pl.: BaCl_2) vagy állati toxinok (pl.: kígyóméreg) is rendelkezésre állnak. A sérülés hatására jellemzően membránsérülés alakul ki

és a szarkolemma permeabilitása fokozódik. Ebben az esetben makroszkóposan megduzzadt és eosinnal csak halványan festődő rostokat láthatunk. Amennyiben a sérülés túlzott mértékű, akkor apoptózissal, de jellemzően nekrozissal elpusztul a rost. Ha a nekrosis az adott izomterületen teljes, akkor a nekrotizáló rostok mellett a kötőszövet, az erek és a szatellita sejtek is elpusztulnak. Ilyen esetben egy halott zóna (dead zone) keletkezik. Ennek regenerációjához a szomszédos, éppen maradt izomterületről vándorolhatnak ide őssejtek [71,91,92].

A nekrozist követő folyamat a sérülés kiváltotta gyulladás. Ezen folyamat résztvevői az immunrendszer sejtjei, pontosabban annak természetes immunitás oldala. A neutrofil granulociták és a makrofágok az elpusztuló izomrostokból felszabaduló sérülésre utaló jeleket (damage associated molecular patterns, DAMP) és gyulladásos mediátorokat felismerve aktiválódnak [93,94]. Az immunválasz lefolyása alatt megtörténik a sérült szöveti elemek eltávolítása, valamint a felszabaduló citokinek, kemokinek és miokinek (pl.: TNF- α (tumor nekrosis faktor alfa), IFN- γ (interferon- γ), IL-1 β (interleukin-1 β), IL-1, IL-8, IL-6) aktiválják a regenerációhoz szükséges őssejteket [77,95–97].

A korábban már említett vázizomspecifikus őssejtek, a szatellita sejtek felelősek a regeneratív miogenezis fázisáért. A szatellita sejtek könnyen felismerhetők és azonosíthatóak az egészséges vázizomszövetben, ugyanis nyugvó állapotban szubsarkolemmálisan helyezkednek el [98].

Az izomrostok között nem véletlenszerűen jelenlévő szatellita sejtek a körülöttük lévő térrész, más néven niche fenntartásáért felelősek [99–101]. A nyugalmi állapotban lévő szatellita sejteket a Paired box transzkripció faktorok (Pax3 és Pax7), az idegsejt adhéziós molekula (NCAM), az M-cadherin (Mcad), a tirozin-protein kináz Met (c-Met), az ér eredetű adhéziós fehérje 1 (VCAM-1), a CD34, a 3-as és 4-es típusú szindekán transzkripció faktorok és szöveti markerek jellemzik [81–83]. A szatellita sejtek aktiválódása és differenciálódása során a megváltozó funkció érdekében genetikai és epigenetikai változások is történnek, amik dinamikus hatnak a fehérjeexpresszióra. A legfontosabb aktivációs markerek a Pax7, az Mcad, a VCAM1, és számos miogén marker is, mint a dezmin, a myogenic factor 5 (Myf-5) és a izomsejt elköteleződési fehérje (MyoD) [81,82].

A szatellita sejtekből kialakuló és az újonnan képződő rostokba beépülő izomsejteknek differenciáción és érésen kell keresztülmenniük. Ezen fázisban a fokozott fehérjeszintézis miatt az alapesetben perifériásan elhelyezkedő sejtmagok centrális pozíciót foglalnak el a rostban, ami a fehérjeszintézis és anyagtranszport megkönnyítése miatt történik [102–104]. A már beépült sejtek növekedése és az ismételt fúziók miatt a rostok érése a rost növekedésével jár. A rost körüli extracelluláris mátrix (ECM) szintézise is ebben a fázisban zajlik, amit éppen ezért szöveti újjáépítésnek, más néven remodellingnek neveznek [105]. Az ECM változatos

összetételben tartalmaz fehérjéket, proteoglikánokat és glikoproteineket, amelyek fontos szerepet játszanak strukturális támasztóelemként, az erőátvitelben, valamint a sejtosztódás és differenciáció szabályozásában [106]. A membrana basalis (alaphártya) főleg lamininból és IV-es típusú kollagénből áll, míg az I-es, III-as és VI-os típusú kollagének a fibronectinnel együtt egy proteoglikánban gazdag hálózatot alkotnak a membrana basalis körül [107–110].

A regeneráció utolsó fázisa az érett izomrostok beidegzése a motoneuronok által. Ennek létrejöttéhez újra ki kell alakulnia a neuromuszkuláris kapcsolatnak (NMJ). A specializálódott kémiai szinapszisban a megfelelő jelátvitelhez az izom típusú nikotinos acetilkolin receptorok (nAChR) klaszterizációja szükséges. A klaszterizáció folyamata jelenleg nem teljesen ismert, de a citoszkeleton és a szarkolemma interakciói fontos szerepet játszhatnak benne. Az újonnan kialakult NMJ-k kimutatása az izomerő visszatérésével igazolható.

Mind az egyedfejlődés, mind pedig a sérülések miatt szükséges a miogenezis komplex folyamatának ismerete. A sejtek közötti kapcsolatok és az izomrostok citoskeletális rendszerének fiziológias működése elengedhetetlen a folyamat eredményes lefolytatásához. Ezen ismereteket alapul véve belátható, hogy a citoskeletális rendszer vázizomzatban betöltött funkciójának pontos megismerése nagy jelentőséggel bír.

4 Problémafelvetés és célkitűzés

Eddigi ismereteink alapján a szeptin fehérjék fontos szerepet tölthetnek be a vázizomrostok számos molekuláris folyamatában, ugyanakkor jelentőségük feltárása még messze nem teljes. A szeptinek, és kiemelten a szeptin7 feladatainak feltérképezése hozzásegíthet számos, a vázizom működését érintő, és jelenleg még nyitott kérdés megválaszolásához. Munkacsoportunk célul tűzte ki a szeptin7 vázizomműködésben játszott szerepének részletes vizsgálatát, amihez egy *in vivo* egérmodell létrehozását is elvégezte.

Jelen dolgozatban az *in vivo*, génmódosított, indukált szeptin7 knock down egértörzsön nyert eredményeket mutatom be, amelyek az izomműködést és a regenerációs képességet érintik. Továbbá tárgyalásra kerülnek az ugyanezen egértörzsekből származó mintákon *in vitro* elvégzett kísérletsorozatok, amelyek a molekuláris biológiai és morfológiai méréseket, valamint az izomerő változását foglalják magukban.

Kísérleteinkben a következő kérdéseket terveztük megválaszolni:

- Milyen mértékben mutathatók ki a szeptinek egerekben és humán izommintákban? Változik-e az expresszió mértéke az egerek egyedfejlődése során?
- Milyen szereppel bír a szeptin7 a vázizomban a kontroll és egy Cre-lox rendszerrel vázizomspecifikusan létrehozott szeptin7 knock down egértörzs összehasonlítása alapján?
- Milyen szerepe lehet a szeptin7-nek az izomerő generálásában?
- Milyen hatása van a szeptin7-nek a regeneráció folyamatára?

5 Metodikák

5.1 Humán eredetű minták vizsgálata

Az emberi eredetű vázizomminták felhasználása a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság 7917-1/2013/EKU 113/2013 számú rendeletében leírtaknak megfelelően történt. A vizsgálatok során amputáción átesett páciensek *quadriceps femoris* izommintáit használtuk fel. A végtageltávolító műtéteket és az izomszövetből történő mintavételt a Debreceni Egyetemen, a Kenézy Gyula Oktatókórházban végezték.

5.2 Állatkísérletek és a kísérleti állatok tartása

Az állatkísérletek kivitelezése az Európai Unió 86/609/EEC számú rendelete és a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának 2/2019/DEMAB számú rendelete alapján történt. Az egereket rácsos tetővel ellátott műanyag ketrecekben tartottuk és szabad hozzáféréssel rendelkeztek az egértáphoz és az ivóvízhez. A lakóhelyük megvilágítása automatizált volt 12 órás sötét és világos ciklusokkal, a szoba hőmérséklete 22-25°C között volt beállítva.

5.3 Tamoxifen etetés

A szájon keresztül történő Tamoxifen etetés 4 hetes korban kezdődött, közvetlenül az anyáról való leválasztás után, mindegyik kísérleti állatsoport esetén. A kísérletekhez felhasznált egyedek 3 hónapig folyamatosan kapták a Tamoxifent tartalmazó tápot (Envigo, Indianapolis, IN, TD, USA 130857). Az alkalmazott tápszer dózis 500 mg Tamoxifent tartalmazott kilogrammonként a tápban, így 3-4 grammos napi fogyasztás mellett az egerek átlagos testtömegére (20–25 g) vetítve a napi Tamoxifen bevitel 80 mg/testtömeg (kg) volt [111,112].

5.4 A HSA-MCM transzgenikus egértörzs létrehozása

B6.Cg-Tg(ACTA1-cre)79Jme/J transzgenikus egértörzs került beszerzésre a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) kutatólaboratóriumtól. A HSA-Cre génre nézve hemizigóta egyedek nem mutatnak eltérést életképességben, fertilitásban, testméretben és viselkedésben a kontroll egyedekhez képest. A HSA-Cre transzgenikus egerekben jelen van egy humán vázizomspecifikus aktin (ACTA1) promoterrel kombinált Cre rekombinááz gént kódoló szakasz,

ezért a Cre enzim kifejeződése csak kifejlett és differenciált harántcsíkolt vázizomrostokban történik meg. A HSA-MerCreMer (HSA-MCM) génszekvencia egy Cre rekombináza (Cre) enzimet és egy módosított ösztrogén kötő domént (ERT2) is tartalmaz, ezáltal a Cre enzim expressziója Tamoxifen jelenlétében indukálható, vagyis a Cre enzim kifejeződéséhez a Tamoxifen jelenléte szükséges [113]. Abban az esetben, ha a HSA-MCM törzset keresztezzük egy a módosítani kívánt, loxP-szekvenciákkal határolt gént tartalmazó törzzsel, egy vázizomspecifikus, indukálható deléciónak létrehozására nyílik lehetőségünk [114]. Az általunk keresztezett B6.Cg-Tg(ACTA1-cre)79Jme/J egértörzset a állatok ujjperceiből izolált genomiális DNS alapján PCR vizsgálat során ellenőriztük a HSA-MCM transzgén megléte szempontjából.

5.5 A Szeptin7 deléciójának ellenőrzése genotipizálással

C57BL/6J Szeptin7^{flox/flox} (SS00) egértörzs került beszerzésre Prof. Dr. Matthias Gaestel laboratóriumából, a Hannoveri Orvostudományi Egyetemről, az Orvosi Kémiai Intézetből. Az említett egereket kereszteztük B6.Cg-Tg(ACTA1-cre)79Jme/J (ssC0) egerekkel. A megszületett utódokat (SsC0) visszakereszteltük SS00 genotípusú egyedekkel. Az így létrejött utódokat Tamoxifennel etettük. Az utódok között jelen volt olyan egyed, melynek genomja tartalmazta a flox szekvenciákat a szeptin7 gén 4-es exonja határain és a Cre enzimet kódoló génszekvenciát is. A szeptin7 módosítás mértékének ellenőrzésére vázizom mintákat (*m. quadriceps femoris*, *m. biceps femoris* és *m. pectoralis*) gyűjtöttünk a Cre+szeptin7^{flox/flox} egerekből (a továbbiakban Cre+) és genomi DNS-t izoláltunk. A 4 hónapos felnőtt egyedek specifikus izmainak kipreparálása mellett újszülött (4 napos) egerekből is történt mintavétel, melynek során dekapitációt követően az állatok végtagjait kitűzve a végtagokon található valamennyi izmot együttesen távolítottuk el. Kontroll mintának azon alomtárs egyedeket tekintettük, melyek nem tartalmazták a MerCreMer konstruktot. A deléciós helyre tervezett PCR primereket (lásd 1. táblázat) használtuk a flox szekvenciát tartalmazó és a vad típusú, vagyis kontroll minták elkülönítésére.

5.6 *In vivo* kísérletek

5.6.1 *In vivo* CT vizsgálat

Az *in vivo* képalkotáshoz az egereket 3% izofuránnal altatták egy kisállatok altatására szánt készülékkel. Egy nanoScan SPECT/ CT (Mediso Kft, Magyarország) készülékkel teljes test CT szkennelés készült, az alábbi beállításokat követve: a röntgenső feszültsége 60 kVp, áramerőssége 86 mA; az expozíciós idő képenként 170 ms; voxel mérete: 1×1 mm. A CT képek előállítása és elemzése a Nucline and InterView FUSION program (Mediso Kft, Magyarország) segítségével történt [115,116].

5.6.2 Önkéntes futás futómalomban

A különböző csoportokba tartozó egereket futómalommal (Campden Instruments Ltd., Loughborough, Egyesült Királyság) ellátott ketrecekben tartottuk az önkéntes futás vizsgálata céljából [117]. A számítógéphez kapcsolt futómalomok 20 perces időközönként mérik a készülék fordulatszámát és ezzel az egerek önkéntes aktivitását 14 napon keresztül. Egyedenként meghatározásra került a naponkénti átlagos és legnagyobb futási sebesség és távolság, valamint a futás ideje. Ezeket az eredményeket a vizsgálati csoportokra vonatkoztatva átlagoltuk.

5.6.3 Mellső láb erejének mérése

Az első végtag fogási erejének mérését egy erre a célra kialakított mérőrendszerrel végeztük. Az állatot a farka tövének fájdalommentesen megfogva egy, az egerek számára kényelmesen megmarkolható fémdróthoz tartjuk. Az állat megragadja a drótot, és ekkor a húzóerőt folyamatosan mérve elkezdjük a kísérleti alanyt hátrafelé mozgatni a maximális erő kifejtéséig, azaz amikor a drótot a kísérleti állat már elereszti. A drót elmozdulását pedig egy számítógéphez kapcsolt erőmérő észleli. Állatonként a vizsgálatot 10-15 alkalommal elvégezve és ezen mérésekkel átlagolva kaptunk egy mérési pontot. A fogási erő mérése mindig az állatok feláldozása előtt egy nappal történt [118].

5.7 *In vitro* kísérletek

5.7.1 Izomerő mérése

Gyors és lassú izomtípusok, vagyis *m. extensor digitorum longus* (EDL) és *m. soleus* (Sol), kipreparálása után az izmokat a végeiknél található inaknál felkötve egy különleges mérőtárályba helyeztük [118]. A Sol izmok I típusú lassú oxidatív valamint IIa típusú gyors oxidatív rostokat tartalmaznak, az EDL pedig szinte kizárólag IIb típusú gyors glikolitikus rostokból épül fel [119]. A mérőtartályban az izmokat egyik végükön rögzítettük, míg a másik végük az erőmérő karjához volt kötve. A vizsgálat folyamatos oldatáramoltatás során (10 ml/perc) Krebs oldatban (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 10 mM glükóz, 10 mM NaHCO₃; pH 7.2; 95% O₂ és 5% CO₂ tenzió mellett, szobahőmérsékleten) történt. Az izom mozgását egy kapacitív mechano-elektromos erőmérő (Experimetria, Budapest, Magyarország) érzékelte. Az egyedi rángások kiváltásához az izmok köré helyezett két platina elektród között kiváltott 2 ms hosszúságú supermaximális impulzust használtunk. Az ingerlés hatására regisztrált erőgenerálás mérése egy TL-1 DMA mérőműszeren történt 2 kHz frekvenciával, az adatokat Axotape szoftver (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) segítségével értékeltük ki. A megfelelő izomhossz beállításánál a legnagyobb erő generálása volt a cél, ezek után az izmokat 6 percig a megfelelő szarkomerhosszúság mellett hagytuk az új egyensúlyi állapot beállításának érdekében. Az egyedi rángásokat 0,5 Hz ingerlésfrekvencia mellett vizsgáltuk, ahol legalább 10 egyedi rángást elemeztünk minden izom esetén. A rángás-sorozatokon belül az egyedi ciklusok amplitúdója kevesebb, mint 3 % eltérést mutatott, így az egyes izmok jellemzésére az egyedi rángások amplitúdójának az átlagát választottuk. A tetanusz vizsgálata során EDL esetén egy 200 ms hosszú, 200 Hz-es, míg a Sol esetén egy 500 ms hosszú, 100 Hz-es impulzussal ingereltük az izmokat. A rángások és a tetanusz időtartamának meghatározásához a teljes összehúzódás és a 10 %-os elernyedési állapot közötti időtartamot vettük alapul.

5.7.2 Egyedi izomrostok elkülönítése

M. flexor digitorum brevis (FDB) izomból enzimatisz emésztés során egyedi izomrostokat nyertünk. Az FDB izmokat 0,2 %-os 1-es típusú kollagenáz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmú kalcium mentes Tyrode oldatban 37°C-on az egér tömegének megfelelő időtartamig (testtömeg (g) + 10 perc) emésztve az FDB izmokat a kötőszövet felbomlott

[120,121]. Az izmokat Tyrode oldatban (1,8 mM CaCl_2 , 0 mM EGTA) enyhén titrálva egyedi, ép rostokat kaptunk. Ezek az egyedi rostok egy üveg fedőlemezre kitapadva, tápfolyadékban 4°C-on 2 napig tárolhatóak.

5.8 Az egyedi izomrostok és kriosztátos, illetve paraffinos metszetek immunkémiai festése

Az immunkémiai vizsgálatok kivitelezéséhez a mintákat először 4% paraformaldehidben (PFA) fixáltuk 20 percig. Az immunhisztokémiához használt kriosztátos metszetek kezelése az immuncitológiával kezelt rostokkal teljesen megegyezik, az egyetlen eltérés, hogy a fixálás előtt 15 percig hagytuk kiolvadni a fagyasztott metszeteket. A 20 perces fixálás eredményeképpen a minta megőrzi eredeti szerkezetét. A fixálás után következett a nem keresztkötött PFA semlegesítése 100 mM glicin-PBS oldat segítségével. Az antitestek sejtbe való jutásához a sejtmembrán permeabilizálása szükséges 0,5 %-os Triton-X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) PBS oldatával 10 percig. A mintákat ezek után háromszor mostuk 10 percig PBS oldattal. A nem specifikus kötőhelyek lefedéséhez Serum-free Protein Blocking Solution (Dako, Los Altos, CA, USA) oldatot használtunk 30 percig. Az elsődleges antitestet (anti-RyR1 (1:500; monoklonális egérben termeltetett, Thermo, Waltham, MA, USA, MA3-925), anti-szeptin7 (1:250; monoklonális nyúlban termeltetett, IBL, Hamburg, Németország JP18991), anti-CD45 (1:500; poliklonális nyúlban termeltetett, Thermo, Waltham, MA, USA, AP5-96061) és vázizom specifikus anti- α -aktinin (1:1000; monoklonális egérben termeltetett, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, A7811)) egy éjszakán keresztül 4°C-on nedves kamrában inkubáltuk a mintákon. A nem bekötődött antitesteket PBS oldatos mosással távolítottuk el. Az elsődleges antitest nehéz lánc ellenes és egy fluorofórral konjugált másodlagos antitestet (Alexa 488-konjugált anti-nyúl nehézlánc, 1:1000; monoklonális kecskében termeltetett, Thermo, Waltham, MA, USA, A32731; Cy3-konjugált anti-egér nehézlánc, 1:1000; monoklonális kecskében termeltetett, Thermo, Waltham, MA, USA, A10521; Cy3-konjugált anti-nyúl nehézlánc, 1:1000; monoklonális kecskében termeltetett, Thermo, Waltham, MA, USA, A10520) adtunk a mintákhoz. A nem bekötődött antitestek újabb mosással történő eltávolítása után a metszeteket lefedtük. Az Alexa Fluor 488, TRITC és DAPI fluorofórokat tartalmazó mintákról AiryScan 880 lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) készítettünk képeket 20× levegős, valamint 40× és 63× olaj immerziós objektív használatával. A fent említett fluorofórokat 488, 543 és 405 nm

hullámhosszon gerjesztettük és 520-550 nm, 560-580 nm, illetve 420-490 nm hullámhossz tartományban detektáltuk az emissziót (a felsorolás sorrendjében).

A paraffinos metszeteket kezelés előtt deparaffinálni kellett. Ezen metszetek, bár már fixálva voltak, de utófixálás történt rajtuk a már ismertetett módon. Az endogén peroxidáz enzimeket 0,5 %-os hidrogén-peroxid oldattal (H_2O_2) gátoltuk. A paraffinos metszetekhez nem fluoreszcens jelöléssel ellátott másodlagos antitesteket, hanem peroxidáz enzimmal kötött antitesteket (HRP-konjugált anti-nyúl nehézlánc, 1:1000; monoklonális kecskében termeltetett, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, 170-6515; HRP-konjugált anti-egér nehézlánc, 1:1000; monoklonális kecskében termeltetett, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, 170-6516) adtunk. Ezek után a DAB reagenssel kezelve, az antitest komplexek helyén barna csapadék vált ki. A metszeteket víztelenítés után lefedtük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk 20x nagyítás mellett.

5.9 Izomregeneráció vizsgálata

A vázizomsérülés kiváltása $BaCl_2$ izomba való injektálásával történt. 20 μ l fiziológiás sóoldatban oldott 1,2 %-os $BaCl_2$ *m. tibialis anterior* (TA) izomba történő beoltása steril gyulladást okozott [89]. Az egyes egerek egyik lába kontrollként szolgált, amit fiziológiás sóoldattal oltottunk be. A vizsgálati csoportok egyedei az oltást követően a 4. és a 14. napon kerültek feláldozásra. Mind az oltott, mind a nem oltott, vagyis kontroll lábakból származó TA mintákból a későbbiekben western blot vizsgálat, illetve kriosztátos és paraffinos metszetek készültek. A szövettani vizsgálatok során Hematoxilin-Eozin (HE) és DAB festés történt. A hematoxilin a sejtmagokat kékes-lilásan jelölte, míg az eozin a sejtplazmát rózsaszínűre festette.

5.10 Elektronmikroszkópos mintaelőkészítés és feldolgozás

Frissen izolált TA izmokat *in situ* fixáltunk 3 %-os glutáraldehidos Millonig pufferban. A leválasztott kisebb izomkötegeket utófixáltuk 1 %-os OsO_4 vizes oldatában. Gyors etanolgradiensén keresztüli víztelenítés követően propilén-oxidos kezelés majd Durcupan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) epoxigyantás beágyazás történt. Ultravékony hossz-, illetve keresztirányú metszeteket készítettünk egy Leica Ultracut UCT (Leica Microsystems, Bécs, Ausztria) ultramikrotómmal. Az elkészült metszeteket uranil-acetáttal és ólom-citráttal festettük. A metszetekről egy JEM1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL, Tokió,

Japán) készítettünk felvételeket. Az EM képeket ImageJ szoftver (NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével elemeztük, és meghatároztuk az egyedi miofibrillumok és a mitokondriumok területét, kerületét, tengelyarányait, a kör alakhoz viszonyított arányait a Cre⁻ és Cre⁺ egértörzsek mintáiból készített hossz- és keresztmetszeti képeken.

5.11 RNS-izolálás, Real-time PCR és kvantitatív PCR vizsgálat

A humán eredetű izombiopszia mintákat és az egerekből származó (újszülött (4 napos) és felnőtt (6 hónapos)) izommintákat Trizolban (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) homogenizáltuk és szerves oldószeres RNS izolálási módszerrel vontuk ki az mRNS-t. 20%-os kloroform hozzáadása után a lizátumokat 4°C-on 16 000 g értéken, 15 percig centrifugáltuk. A minták felülúszóját 500 µl RNáz-mentes izopropanollal szobahőmérsékleten 10 percig precipitáltuk. 12 000 g értéken történő centrifugálás után a kicsapódott RNS-t 75 térfogatszázalékos etanol segítségével mostuk, majd ismét lecentrifugáltuk. A kicsapódott RNS-t RNáz-mentes vízben újra beoldottuk, majd az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo, Waltham, MA, USA) segítségével lemértük, és a beoldott, ismert koncentrációjú mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk. A reverz transzkriptáz (RT) reakció kivitelezéséhez a reakcióelegy (20 µl össztérfogatra megadva) 1 µg RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibitor, 0,25 µl oligo(dT)-t, 2 µl dNTP-t (200 µM) tartalmazott RT pufferben. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációját Primer Premier 5.0 szoftverrel (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA) előre megtervezett specifikus primerpárok segítségével végeztük, amiket a Bio Basic-tól (Toronto, Kanada) szereztünk be. Az egyedi tervezésű primerpárok specificitását és alkalmazhatóságát *in silico* módon igazoltuk az NCBI Primer-BLAST internetes adatbázis felhasználásával (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A primerpárok szekvenciáját, valamint az alkalmazott annealációs hőmérsékleteket és az egyes polimeráz láncreakciók várható termékeinek méretét az 1. táblázatban tüntettük fel. A vizsgálni kívánt szekvenciák felsokszorozását programozható PCR készülék (Labnet MultiGene 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) segítségével végeztük. A kezdeti denaturálás 94°C-on 1 percig történt, majd 30 ciklus következett egy denaturálási lépéssel 94°C-on (30 s); majd annealáció optimalizált hőmérsékleten minden primer párra 30 másodpercig; végül pedig extenzió 72 °C-on, 60 másodpercig történt, majd a folyamat zárásaként a végső elongáció 72°C-on 5 percig. A PCR-termékeket EZ-Vision Dye 6X (VWR, Radnor, PA, USA) pufferrel inkubáltuk. A DNS-sávokat 1,2-2,5%-os agaróz gélen futatott elektroforézis után UV fény megvilágítással tettük láthatóvá.

Kvantitatív PCR (qPCR) során a különböző vázizommintákból (*m. tibialis anterior*, *m. pectoralis*, and *m. quadriceps*) az izolált RNS mintákat DNáz kezelésnek vetettük alá és a megmaradt RNS-eket egy reverz transzkripció után cDNS-é alakítottuk. Az amplifikációs program során a qPCR mérés a következő lépésekből állt: az első denaturáció 10 percig tartott 95 °C-on, majd 50 ciklus következett, melyben az egyes ciklusok során 15 másodpercig 95 °C-on és 1 percig 60 °C-on tartotta a készülék a hőmérsékletet. A qPCR vizsgálat során egy LightCycler 480 (Roche, Basel, Svájc) készülékben két különböző módszerrel vizsgáltuk a mintákat a meglévő primereinknek megfelelően. Az egyik lehetőség a SYBRGreen (PCR Biosystems, Oxford, Egyesült Királyság) keverék alkalmazása volt, a másik módszer a magas specificitású TaqMan esszé (szeptin7, Mm00550197_m1; GAPDH, Mm99999915_g1; 18S riboszóma alegység, Mm03928990_g1; AP3D1, Mm00475961_m1) volt. Light Cyclyer 480 SW 1.5.0 szoftver (Roche) segítségével a triplikátumban vizsgált minták ciklusidejéből meghatároztuk az átlagos Cp értéket. Ezekből a Cp értékekből a ΔC_p módszer segítségével meghatároztuk a vizsgálni kívánt mRNS-ek relatív expresszióját a belső kontroll gének eredményeihez viszonyítva.

Gén	Primer	Nucleotid szekvencia (5'→3')	GenBank Accession No.	Annelációs hőmérséklet	Amplimer méret (bp)
SZEPTIN1 <i>Homo sapiens</i>	sense	GGGTTTGACTTCACGCTAATG(101-121)	NM_001365977	58 °C	443
	antisense	CCAATGACTGGGATGATGTTG(523-543)			
SZEPTIN2 <i>Homo sapiens</i>	sense	GCGAAGATTCTCATTACC(367-384)	NM_001008491	52 °C	476
	antisense	TACCACTGTCAGGCGTAG(825-842)			
SZEPTIN3 <i>Homo sapiens</i>	sense	TGAATGTTTGCGAATGTTG(4315-4333)	NM_019106	55 °C	220
	antisense	GATTGGCTGGGACTGGTA(4517-4534)			
SZEPTIN4 <i>Homo sapiens</i>	sense	CCGAAAGTCCGTGAAGAA(698-715)	NM_004574	55 °C	221
	antisense	TGTCCACAATGGTGAGCC(901-918)			
SZEPTIN5 <i>Homo sapiens</i>	sense	CTCAACCGAAAGAACATCCAA(513-533)	NM_002688	55 °C	319
	antisense	TGCCTATAACGGCGAAGG(814-831)			
SZEPTIN6 <i>Homo sapiens</i>	sense	TTCACGCTTAAACAACCA(3403-3420)	NM_145799	52 °C	407
	antisense	CCTCGTATCCAGGAATGTA(3791-3809)			
SZEPTIN7 <i>Homo sapiens</i>	sense	CTTATTGCCAAAGCAGAC(798-815)	NM_001788	50 °C	434
	antisense	AGAGGGCTCTTAGTCAGC(1214-1231)			
SZEPTIN8 <i>Homo sapiens</i>	sense	TGCCTCTACTTCATCACGC(559-577)	NM_001098811	56 °C	493
	antisense	TGTCAACATCGTGTCTT(1034-1051)			
SZEPTIN9 <i>Homo sapiens</i>	sense	AGGGCACAGATGACCAAAG(3043-3061)	NM_001113495.1	56 °C	287
	antisense	GGCAAGTCGGCAAAGTAAA(3311-3329)			
SZEPTIN10 <i>Homo sapiens</i>	sense	CTGGCAACAGGCAGCAAC(1449-1466)	NM_001321509.2	56 °C	366
	antisense	AGCAAAGGTGTCGGGTGG(1797-1814)			

SZEPTIN11	sense	AGGATGATGGGCTTTCTA (2449-2466)	NM_001306147	50 °C	279
	antisense	CTTACGGGT CATGTTGTG (2710-2727)			
Homo sapiens					
SZEPTIN12	sense	ATGTGGTGCCCGTGATTG (513-530)	NM_001154458	56 °C	324
	antisense	GGAGGTGGGAGCGGATAA (819-836)			
Homo sapiens					
SZEPTIN14	sense	GAAGAAACTGCTGCTCAA (786-803)	XM_011515373	50 °C	488
	antisense	TTCTTATCTCCTCCTGT (1256-1273)			
Homo sapiens					
Szeptin1	sense	CACGGCACAAACTCTGACC (222-240)	NM_017461	56°C	500
	antisense	CAACGACTGCGAAAGGGA (704-721)			
Mus musculus					
Szeptin2	sense	GAACAGGCGTCACATCA (550-566)	NM_001159719	50 °C	352
	antisense	AACCTTCTTGCCCTTGG (885-901)			
Mus musculus					
Szeptin3	sense	CCACTGCTGCCTCTACT (776-792)	NM_001358836	52 °C	231
	antisense	TTGTCCTCCAAATCCTC (990-1006)			
Mus musculus					
Szeptin4	sense	GCAAACCGTGGAGATTA (654-670)	NM_011129	52 °C	325
	antisense	CGCCTTAGCCAAGATAG (962-978)			
Mus musculus					
Szeptin5	sense	CGCAAGTCCGTCAAGAAA (194-211)	NM_213614	55 °C	268
	antisense	TGGGCTTCCAACATTCAG (444-461)			
Mus musculus					
Szeptin6	sense	ACATCATTCCTCGTTATTGC (820-838)	NM_001177324	52°C	221
	antisense	CATCATCTTGTTGCCTATCTT (1020-1040)			
Mus musculus					
Szeptin7	sense	CCTTGAGGGCTATGTGGG (278-295)	NM_009859	56°C	250
	antisense	CAGCAGCAACTGAACACCAC (508-527)			
Mus musculus					
Szeptin8	sense	CACAGAGGAGGTGAAGGT (1000-1017)	NM_033144	54°C	471
	antisense	TTGAAGGCGTTGGTCTC (1454-1470)			
Mus musculus					
Szeptin9	sense	AACATTGTCCCAGTCATCG (1400-1418)	NM_001113486	54°C	381
	antisense	GCGTTTCACTCGGTAGG (1764-1780)			
Mus musculus					
Szeptin10	sense	GACACGACCTCCAAGAT (1088-1104)	NM_001024910	52°C	349
	antisense	GACGCTCACCATAGAAC (1420-1436)			
Mus musculus					
Szeptin11	sense	CCTTGTCGTGGGTGAGA (287-303)	NM_001310669	55 °C	433
	antisense	GATGGTGTGGCTTTCG (703-719)			
Mus musculus					
Szeptin12	sense	AGTCCAAAGTATGGCAGTC (344-362)	NM_027669	52°C	105
	antisense	GCTTCAATCCCTTCTCC (432-448)			
Mus musculus					
Szeptin14	sense	TCCACTCTTGGGCATTT (160-176)	NM_028826	50 °C	290
	antisense	CTGGCTTCTTGTTTATCT (431-449)			
Mus musculus					
HSA-MCM	sense	GCATGGTGGAGATCTTTGA		58 °C	717
	antisense	CGACCGGCAAACGGACAGAAGC			
Mus musculus					
Szeptin7	sense1	CTTTGCACATATGACTAAGC		58 °C	151 WT
	sense2	GCTTCTTTTATGT AATCCAGG			
	antisense	GGTATAGGGGACTTTGGGG			
WT-loxP-KD					
Mus musculus					
Gapdh	sense	AAGGTGGAGTCAACGGATTTGG (99-121)	NM_001289726.1	58 °C	322
	antisense	AATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT (399-420)			
Mus musculus					
16S alegység	sence	CGGCTACCACATCCAAGGAA			
	antisense	CCTGTATTGTTATTTTCGTCACTACCT			

1. táblázat: A primerpárok szekvenciája, az alkalmazott annealációs hőmérsékletek és az egyes polimeráz láncreakciók várható amplimer mérete.

5.12 Western blot vizsgálat

A fehérje expresszió méréséhez az izommintákat mechanikai feltárás során lízis-pufferben (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) homogenizáltuk egy HT Mini homogenizer (OPS Diagnostics, Lebanon, NJ, USA) készülék segítségével. A mintákat 4°C-on 2000 g értéken lecentrifugáltuk és a felülészókból BCA protein esszé segítségével meghatároztuk a fehérjekoncentrációt, és azonos koncentrációkat állítottunk be az elektroforézis mintapuffer oldat (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10% SDS-ben oldott brómfenol kék (0,01%), 100 mM β -merkaptoetanol) használatával. Az elkészült ismert koncentrációjú mintákat 5 percig, 95°C-on főztünk, így denaturálva a fehérjéket. 10 %-os SDS-poliakrilamid gél segítségével 10 μ g teljes fehérjeminta került elektroforetikus elválasztásra. Az elektroforézis után a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk és PBS-ben oldott 5%-os sovány tejpor segítségével blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket. A membránokat a megfelelő elsődleges antitestekkel (anti-szeptin7 (1:250; monoklonális nyúlban termeltetett, IBL, Hamburg, Németország, JP18991), anti-Pax7 (1:500; monoklonális egerben termeltetett, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, SAB1404168), anti-miogenin (1:500; monoklonális egerben termeltetett, Santa Cruz, Dallas, TX, USA sc-12732), anti-laminin, 1:500; poliklonális nyúlban termeltetett, Novus Biologicals, Minneapolis, MN, USA, NB300-144) és vázizom specifikus anti- α -aktinin (1:1000; monoklonális egerben termeltetett, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, A7811)) egy éjszakán keresztül, 4°C-os hőmérsékleten inkubáltuk. A bekötődést követően háromszor 15 perces PBS+1% Tween-20 (PBST) mosással a nem kötődött antitesteket eltávolítottuk, majd egy órán keresztül szobahőmérsékleten HRP-konjugált másodlagos antitestekkel (HRP-konjugált anti-nyúl nehézlánc, 1:1000; monoklonális kecskében termeltetett, Bio-Rad Laboratories, 170-6515; HRP-konjugált anti-egér nehézlánc, 1:1000; monoklonális kecskében termeltetett, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, 170-6516) inkubáltuk a membránokat. A kialakult jelölő immunkomplexek láthatóvá tétele felerősített kemilumineszcencia segítségével történt (Thermo, Waltham, MA, USA). A jelek denzitometriás vizsgálatát ImageJ szoftver segítségével végeztük, úgy, hogy a detektált szeptin7 jelet ugyanazon minta belső kontroll fehérjére, az α -aktinin jel erősségére normalizáltuk. A vizsgálatokat legalább három független mintából végeztük el, technikai ismétlések száma pedig szintén három volt.

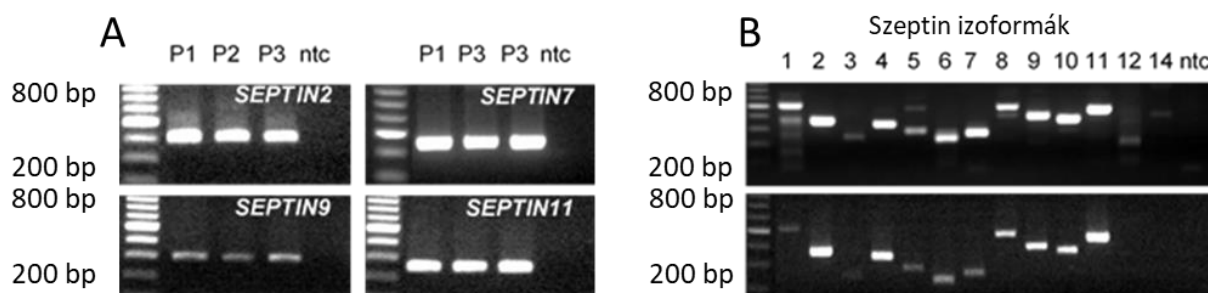
5.13 Statisztikai módszerek

Az adatokat átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formában ábráztuk. Az eltéréseket a kontroll és a Tamoxifen diétán lévő állatok között egyutas ANOVA és Bonferroni post hoc többszörös összehasonlító teszt módszerrel vizsgáltuk a GraphPad Prism5 szoftver használatával (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Student-féle t-próbát alkalmaztunk a szignifikancia szintek meghatározásához és a $p < 0,05$ értéket tekintetük szignifikáns eltérésnek.

6 Eredmények

6.1 A harántcsíkolt vázizomrostok különböző szeptin izoformákat expresszálnak

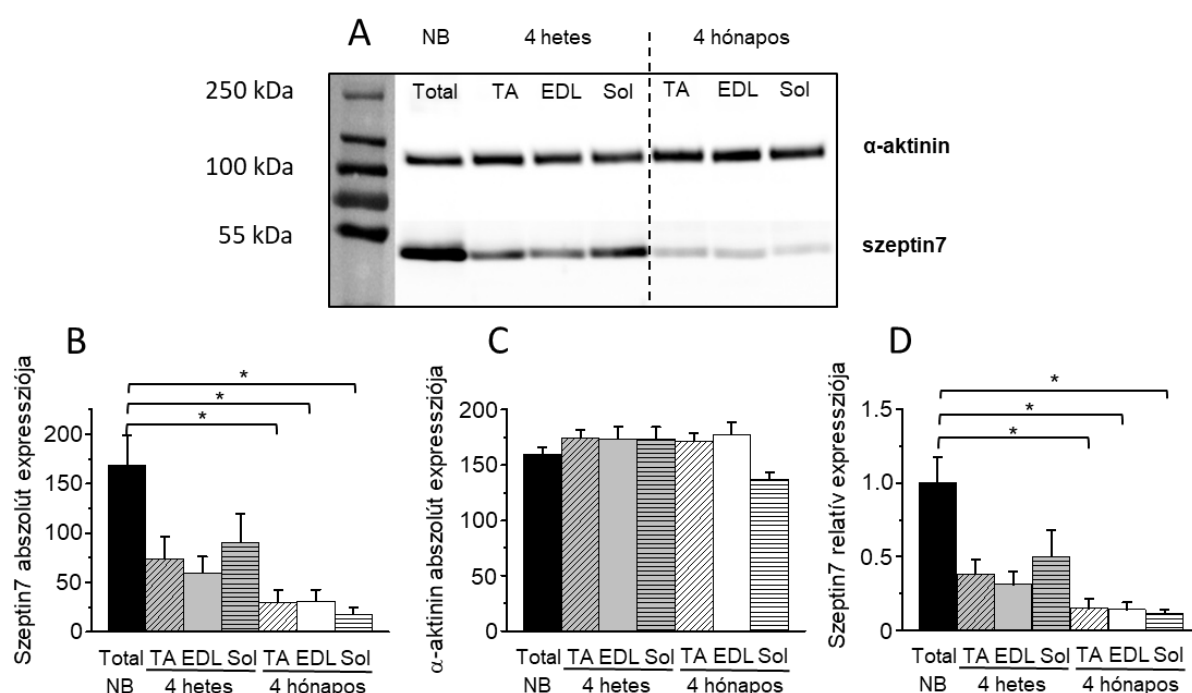
Humán vázizom minták (amputáció során nyert *m. quadriceps femoris* biopszia) teljes lizátumában mRNA szinten a különböző szerkezeti csoportokba tartozó szinte valamennyi szeptin kimutatható volt RT-PCR reakciókkal (8. ábra). Kivételt képeznek a szeptin 12 és 14, amelyeket nem tudtunk detektálni. Hasonló eredményre jutottunk újszülött (4 napos) C57BL/6J egerekből származó vázizmok analízise során: mRNA szinten a 12-es és 14-es izoformán kívül az összes szeptin izoforma jelenlétét igazoltuk. Az expressziós mintázat hasonló volt felnőtt (4 hónapos) egerek izomzatában is, habár egyes szeptin izoformák mRNA-expressziója (szeptin5 - szeptin10) életkorfüggést mutatott.



8. ábra. **A szeptinek a vázizom citoskeletális rendszerének szerves részét képezik.** (A) Agaróz gél-elektroforézis eredményének képei, amelyek a szeptin izoformák mRNA szintű expresszióját mutatják emberi vázizomban (*m. quadriceps femoris* amputált végtagokból). Az egyes szerkezeti alcsoportok egy-egy képviselője látható. Három betegtől származó független minták eredményeit ábrázoltuk. A létrák első és utolsó sora 200, illetve 800 bp-nek felel meg. (B) Az összes szeptin izoforma expressziója mRNA-szinten újszülött egerekben (felső panel) és egerek felnőttkori vázizomzatában. A nem templát kontroll (ntc) minták cDNS helyett nukleázmentes vizet tartalmaznak.

6.2 A szeptin7 az egyedfejlődés során változó expressziót mutat

Mivel a szeptin mRNA expressziós szintek változást mutattak a C2C12 immortalizált izomeredetű proliferáció során, ezért felmerült lehetséges szerepük a vázizomzat fejlődésében is [122]. Elsősorban a szeptin7-re fókuszáltunk. A szeptin7 változó mértékű expresszióját az izomfejlődés során fehérjeszinten is megfigyeltük. A szeptin7 fehérje átírásának üteme fokozatosan csökkent az életkorral, amint azt az újszülöttekből, a 4 hetes és a 4 hónapos egerekből származó izommintáinak összehasonlítása mutatta (9. ábra). Megfigyeltük, hogy a szeptin7 expressziója az adott életkorban független az izomtípustól, mivel azonos mennyiségeket detektáltunk a különböző izomtípusokban (*m. tibialis anterior* – TA, *m. extensor digitorum longus* – EDL és *m. soleus* – Sol). A szeptin7 fehérje expressziójának ez az egyedfejlődéssel bekövetkező csökkenése összhangban van az mRNA-szinten mért eredményeinkkel. A szeptin7 relatív expressziója figyelemreméltóan magas az újszülött egerekben (NB) a későbbi időpontokból származó izommintákhoz képest.

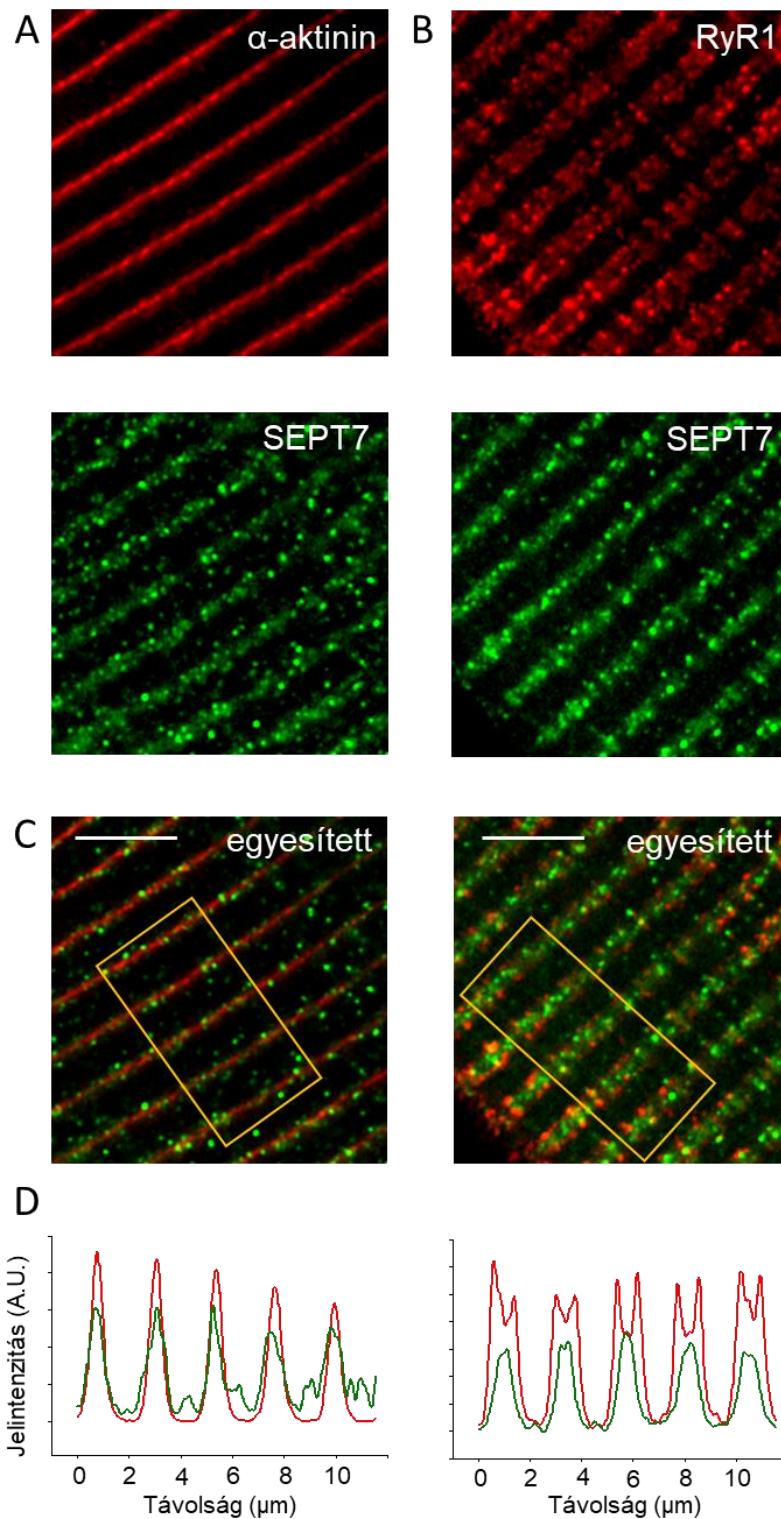


9. ábra. **A szeptinek expressziója az egerek vázizomzatában.** A szeptin7 (50 kDa) fehérje szintű expressziója (A) Western blot eredménye egerekben a fejlődés különböző stádiumaiban különböző vázizomokban. Normalizáló, belső kontrollként α -aktinint (szarkomer specifikus) (110 kDa) használtuk. A létra első és utolsó sora 55, illetve 250 kDa-nak felel meg. Az oszlopdiagramok a szeptin7 (B) és α -aktinin (C) abszolút, valamint a szeptin7 α -aktininre

normált (D) relatív expresszióját mutatják a különböző mintákban: újszülött egerek teljes vázizom lizátuma (NB), TA: *m. tibialis anterior*; EDL: *m. extensor digitorum longus*; és Sol: *m. soleus*. A bemutatott adatok három egér/korcsoport adatai. Az adatok az átlag $\pm$ standard hibáját jelentik (SEM), * $p < 0,05$ ANOVA analízis alapján.

6.3 A szeptin7 elhelyezkedése a vázizomrostokban

A szeptin7 vázizomzaton belüli pontos lokalizációjának vizsgálatához BL6 egerekből származó enzimatikusan izolált egyedi *m. flexor digitorum brevis* (FDB) rostokat immunfluoreszcens jelölésnek vetettünk alá. Mivel a vázizomra specifikus α -aktinin és a RyR1 helyzete jól meghatározott az izomrostokon belül, ezeket referenciapontként használtuk fel ezekben a kísérletekben. A szeptin7-et immuncitokémiával tettük láthatóvá, és egyesített képeket állítottunk elő (szarkomerben található) α -aktininnel és RyR1-gyel, hogy meghatározzuk a szeptin7 viszonylagos lokalizációját a már említett referencia fehérjékhez képest (10. ábra). A konfokális képekből nyert adatok azt mutatták, hogy a szeptin7 az α -aktininhez hasonlóan a Z-vonal mellett helyezkedik el, és szeptin7 jelölést figyeltünk meg a RyR1 által jellemzett terminális ciszternák között is.

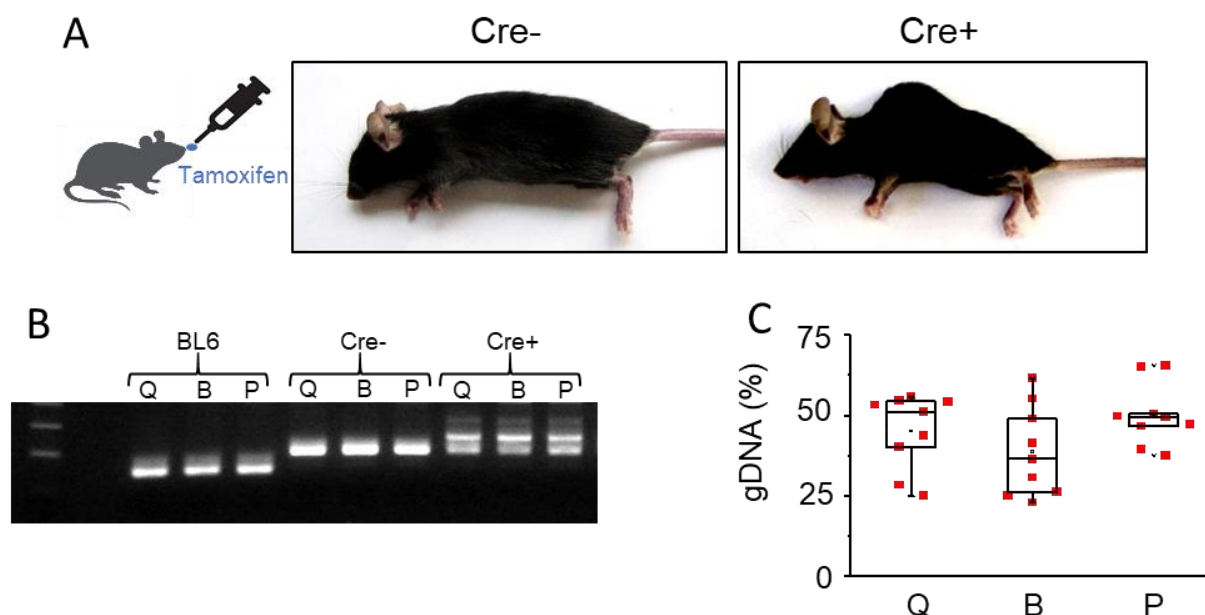


10. ábra. **A** szeptin7 elhelyezkedése egerek FDB izmából származó vázizomrostokban. (A) α -aktininhez (Z-vonalhoz) viszonyított szeptin7 intracelluláris lokalizáció FDB vázizomrostban. (B) RyR1-hez (szarkoplazmatikus retikulumhoz) viszonyított szeptin7

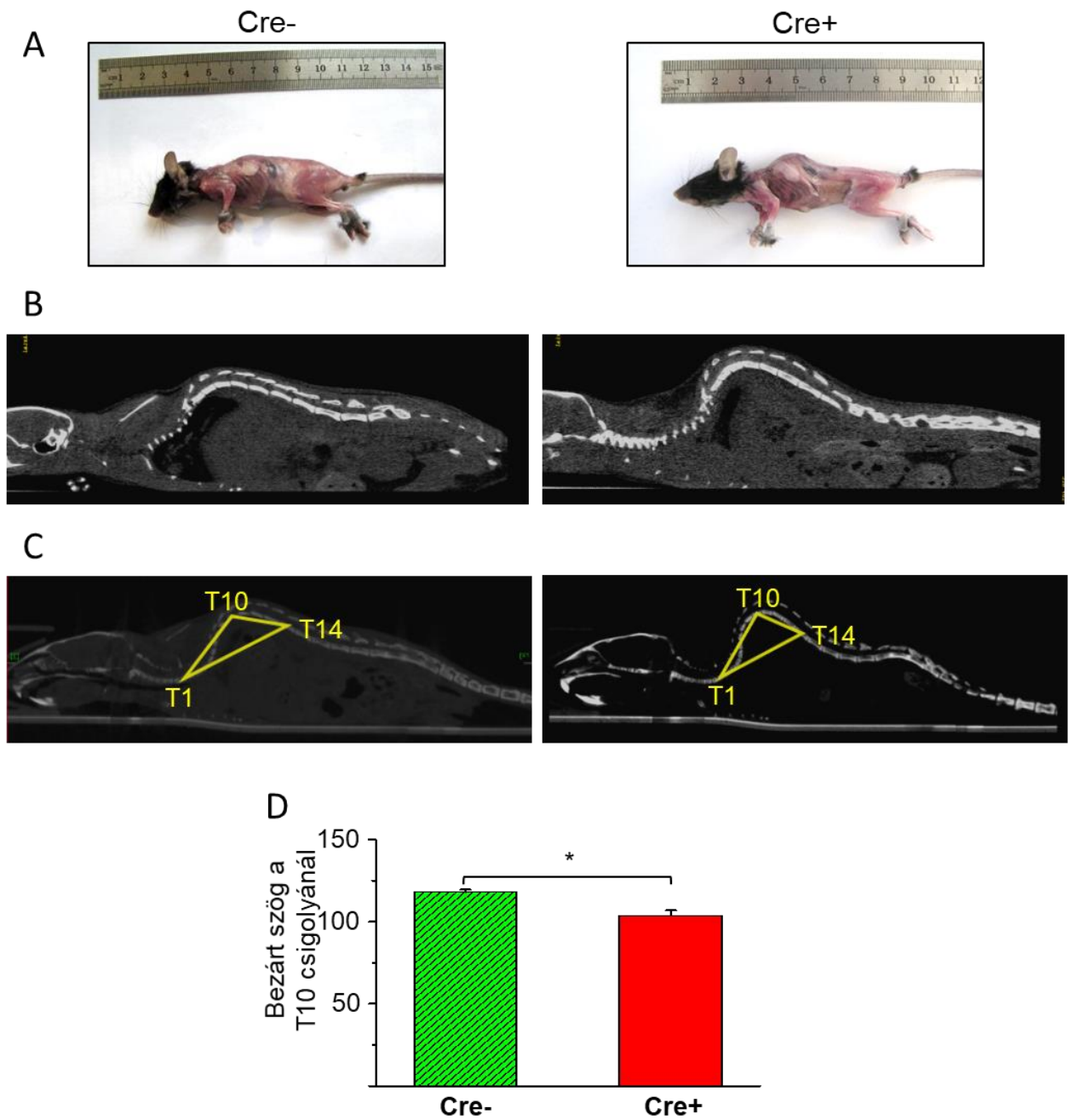
immunfluoreszcens festődés FDB mintákon. A skála 5 μm , 63x olajimmerziós objektív mellett. Az egyesített felvételen (C) feltüntetett téglalap alakú területekből számítva a diagramok (D) a szeptin7 (zöld, Alexa 488) és az α -aktinin (piros, Cy3), illetve (E) a szeptin7 (zöld, Alexa 488) és a RyR1 (piros, Cy3) fehérjéket jelölő fluorofórok fluoreszcencia intenzitásváltozásait ábrázolják a rost mentén.

6.4 A szeptin7 vázizom-specifikus csökkenése módosult fenotípushoz vezet

A vázizomzatban a szeptin7 által betöltött feladatok vizsgálatára a szeptin7 gén vázizom-specifikus leütéséhez a Cre/Lox rendszer segítségével egy egérmodellt állítottunk elő. A HSA-Cre transzgenikus egerekben a Cre rekombinááz gént a vázizom-specifikus humán alfa-aktin (ACTA1) promotor hajtja. Ezeket az egerekkel pároztatjuk egy olyan egértörzsszel, amelyekben a szeptin7 GTP-kötő P-hurkát kódoló 4-es exon loxP szekvenciával határolt. A Cre-közvetített rekombináció katalizálja a 4-es exon kivágását, ami egy további kereteltolódási mutációt eredményez az exontól lefelé. Az így keletkező szeptin7 mRNsek csontoktól lesznek és nem fog róluk funkcióképes fehérje átíródni. Az *in vivo* és *in vitro* kísérleteinkhez a Cre⁺ hemizigóta egereket használtuk fel, melyeket a vizsgálatok előtt 1 hónapos koruktól kezdve 3 hónapos Tamoxifen etetésnek vettünk alá. Ezekben az egerekben a Tamoxifen indukálta a Cre enzimet, ami elvégezte a szeptin7 4-es exonjának kivágását, ezáltal megakadályozta a funkcióképes szeptin7 fehérje transzlációját. A szeptin7 fehérje expressziója izom-specifikus downregulációjának méréséhez *m. quadriceps femoris* és *m. pectoralis* mintákból készített teljes sejtizátumot használtunk. A delécio a rostok többmagvúsága miatt részleges volt, de így is a szeptin7 fehérje expressziójának szignifikáns csökkenését eredményezte, ami mindegyik izomtípusnál megfigyelhető volt: 59 ± 8 és 63 ± 8 %-os csökkenés a Cre⁻ egerekhez képest, *m. quadricepsben* és *m. pectoralisban* (11. ábra). Ezen eredmények jól korreláltak a gDNS PCR-módszerrel történő vizsgálatából meghatározott körülbelül 50 %-os delécióval. A Cre⁺ egerekben kialakult egy látványos fenotípus, ami egy kifejezett gerincdeformitás formájában mutatkozott meg, ahol a gerinc túlzottan kifelé görbült, így púpos, görbe hátú megjelenéssel rendelkező egyedeket eredményezett (12. ábra).



11. ábra: **A szeptin7 vázizom-specifikus leütése látványos fenotípust eredményezett.** (A) Tamoxifennel etetett Cre⁻ és Cre⁺ egerekről 4 hónapos korukban készített felvételek. (B) Három specifikus primer párral végzett PCR eredménye a szeptin7 gén részleges deléciójának kimutatására a Cre⁺ egerek különböző vázizomtípusaiban (Q: *m. quadriceps femoris*; B: *m. biceps femoris*; P: *m. pectoralis*). Igazoltuk a deléció hiányát BL6 kontrollból és Cre⁻ állatokból készített mintákban. A Cre⁻ egyedekből származó mintákban a floxolt 4-es exont, míg a vad típusú Tamoxifennel táplált egerekben a normális 4-es exont mutattuk ki. A létra első és utolsó sora 200, illetve 300 bp-nek felel meg. (C) A diagramon az összevont adatok láthatóak a 4-es exon deléció %-os kifejezéséről Cre⁺ egerek különböző izomtípusaiban. Három alomból 14 alomtársat (kilenc Cre⁺ és öt Cre⁻) vizsgáltunk. Itt és minden további ábrán a négyzetes diagramok téglalapjai a mediánt, valamint a 25 és 75 %-os értékeket mutatják, míg a hibásávok 1 és 99%-ot jelentenek.



12. ábra: **A szeptin7 vázizom-specifikus leütése gerincdeformitást okozott.** (A) Az egerekről készült teljes test fényképeken és (B) CT fevéteken jól látható a gerincdeformitás. (C) Meghatároztuk a háti gerincszakaszon az egyes csigolyák által bezárt szöget. (D) A T1, T10, T14 szögek átlagos értékét a diagramon tüntettük fel. *p<0,05

6.5 Az *in vivo* erőgenerálás sérül a szeptin7 knockdown egerekben

Az *in vivo* kísérletek során egyértelműen megfigyelhető volt, hogy a szeptin7 csökkent mennyisége kisebb testsúlyt eredményez és rontja az izomteljesítményt. A testtömegre normalizált átlagos fogási erő hasonló volt a kontroll BL6 állatokban és a Cre⁻ egerekben, míg a Cre⁺ állatokban szignifikánsan kisebb értékeket mértünk (13. ábra). Az önkéntes futási tesztek hasonló eredményekre vezettek. A futás összes paramétere (távolság, időtartam, átlagsebesség, maximális sebesség) szignifikánsan kisebb volt a Cre⁺ állatokban a BL6 állatokhoz vagy a Cre⁻ egerekhez képest, míg a kontroll és a Cre⁻ egyedek között nem volt különbség a futás paramétereiben (2. táblázat).

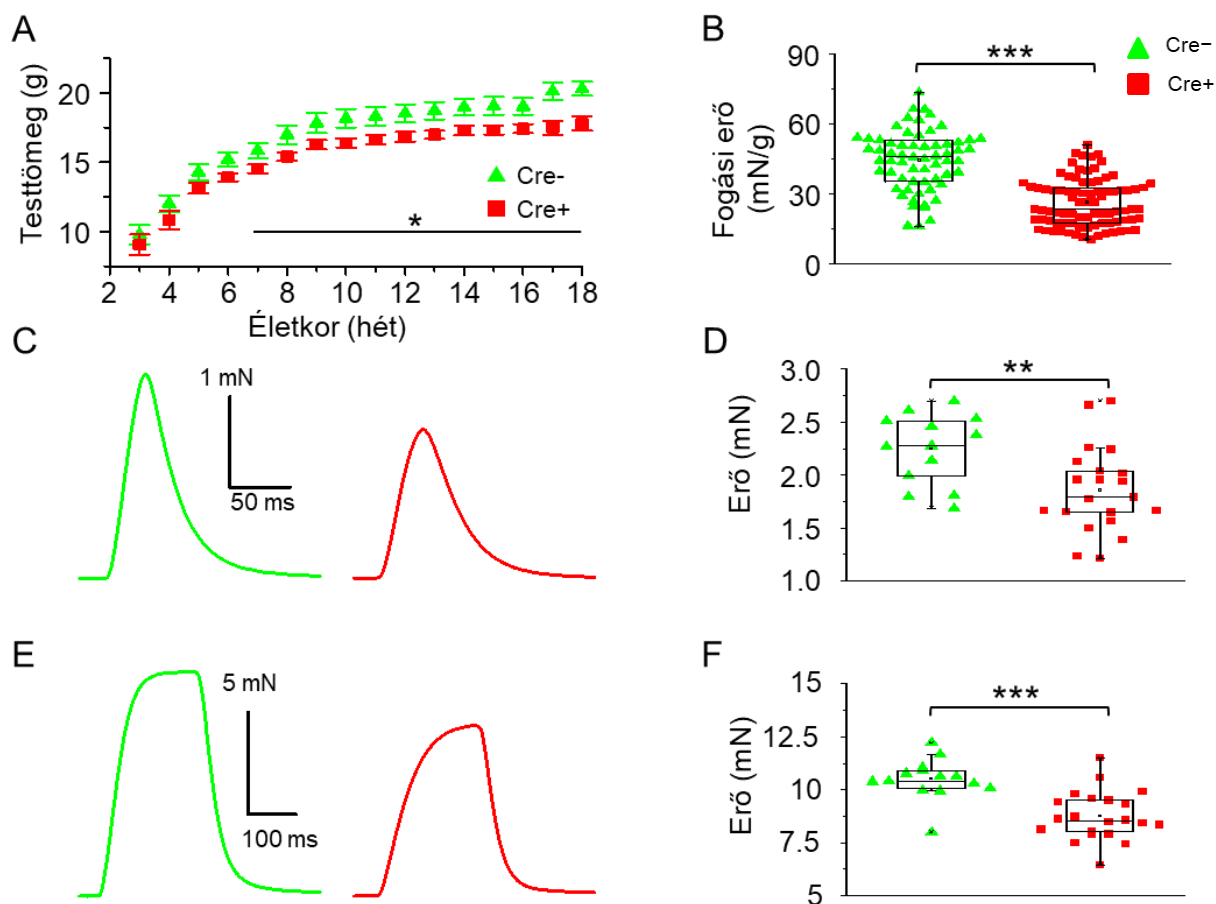
Futási paraméterek	BL6 n=3	Cre- n=2	Cre+ n=4
Távolság (km/nap)	2.46±0.19	2.34±0.06	0.83±0.02***
Időtartam (perc/nap)	343.3±15.2	317.1±11.1	264.4±4.2***
Átlagsebesség (m/perc)	7.27±0.44	7.30±0.32	4.01±0.13***
Maximális sebesség (m/perc)	14.04±0.56	15.71±0.62	10.31±0.20***

2. táblázat: A BL6, Cre⁻ és Cre⁺ egércsoportok futási paramétereinek összehasonlítása. A statisztikai összehasonlítás a Cre⁻ és Cre⁺ között történt. ***p<0,001

6.6 Az *in vitro* erőgenerálás csökken a szeptin7 knockdown egerek izmaiban

A szeptin7 csökkenés szignifikáns hatása az *in vitro* módszerekkel mért izomerő paramétereiben is megmutatkozott. Mind az egyedi rángás, mind a tetanusz során mért erő szignifikánsan csökkent a Cre⁺ egerek EDL és Sol mintáiban a Cre⁻ alomtársak megfelelő izmaihoz képest (13. ábra). A maximális erő csökkenése a csökkent szeptin7 expresszió eredménye, mivel a Tamoxifen kezelés önmagában nem volt hatással a kontraktilis paraméterekre. Érdekes módon a rángások és a tetanusz kinetikája, valamint a fáradékonyság csak a Cre⁺ egerek Sol-ban változott. Az *in vivo* és *in vitro* erőmérések tehát arra utalnak, hogy a szeptin7 alapvetően hozzájárul a normál vázizomzat teljesítményéhez. Továbbá az izomerő meghatározásában fontos két kontraktilis fehérje, az aktin és a miozin (MYH4) expresszióját és térbeli eloszlását

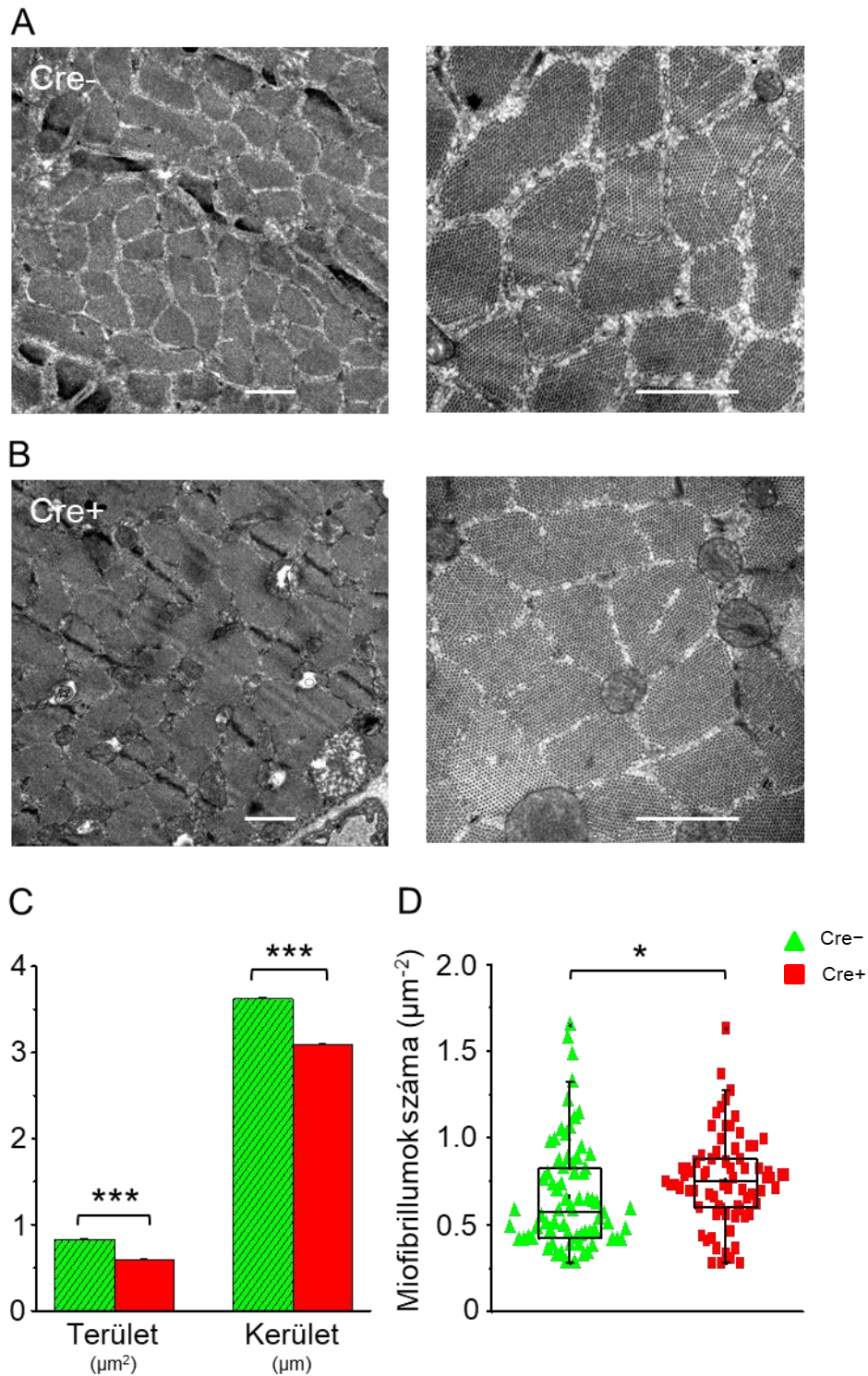
is megvizsgáltuk a Cre- és Cre+ állatok FDB-jéből izolált egyedi izomroston. A kontraktilis fehérjékben jelentős változást nem észleltünk; emellett az L-típusú kalciumcsatorna expressziós mintázata szintén hasonló volt a Cre- és Cre+ minták összehasonlításakor.



13. ábra: A szeptin7 vázizom-specifikus leütése csökkentette az izomtömeget és az izomerőt (A) A diagramon az állatok testtömeg-változása látható Cre- (zöld háromszög, n=11) és a Cre+ (piros négyzet, n=14) egerekben. Fekete folytonos vonal mutatja, hogy hol jelentkezett statisztikai különbség (p<0,05). A hibasávok SEM-et mutatnak. (B) A fogási erő testsúlyra normalizálva Cre- (n=4) és Cre+ egerekben (n=7). Egyedi rágás (C) és tetanusz (E) során mérhető reprezentatív tranziensek EDL esetén. Maximálás erő rágás (D) és tetanusz (F) esetén Cre- (n=7) és Cre+ (n=11) egerekből származó EDL izmokon mért adatokból. **p<0,01; ***p<0,005

6.7 A szeptin7 csökkent expressziója módosult miofibrilláris és mitokondriális szerkezethez vezet

A szeptin7 csökkent expressziója által a vázizomrostok miofibrilláris rendszerében kiváltott szerkezeti változásokat elektronmikroszkóppal (EM) tanulmányoztuk TA izmokban. A Cre⁻ állatok keresztmetszeti EM felvételein az egyedi vázizomrostban elhelyezkedő szarkoplazmatikus retikulum (SR) által jól körülhatárolható miofibrillumok jelenléte figyelhető meg. A Cre⁺ egerek mintáiban azonban a miofibrillumok elkülönítése kevésbé volt nyilvánvaló. A tényleges látómező egy területén belüli összes miofibrillum azonosítása után megbecsültük a miofibrillumok átlagos összterületét adott területegységen (1 μm^2) belül, az egyes miofibrillumok területét, kerületét és a miofibrillumok átlagos számát a látómezőben (14. ábra). A Cre⁺ állatokból származó miofibrillumok átlagos területe és kerülete is szignifikánsan kisebb volt, mint a Cre⁻ egerekből származó miofibrillumok megfelelő paraméterei. A fenti észrevételeinkkel összhangban a miofibrillumok száma egy adott látómezőben szignifikánsan megnőtt a Cre⁺ egerekből származó mintákban a Cre⁻ állatok metszeteihez képest. A Cre⁺ egerek miofibrillumáiban az összes fent említett paraméter szignifikánsan különbözött a kontroll BL6 mintáktól (a BL6 egértörzsön végzett megfigyelések eredményeit jelen dolgozatban csak hivatkozzuk, de itt nem mutatjuk be). A BL6 állatokból és a Cre⁻ állatokból izolált miofibrillumok megfelelő paraméterei között nem volt szignifikáns különbség. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a csökkent szeptin7 expresszió az egységnyi területre jutó egyedi miofibrillumok méretében csökkenést, számában viszont jelentős emelkedést okozott a Cre⁺ egerek vázizomzatában.

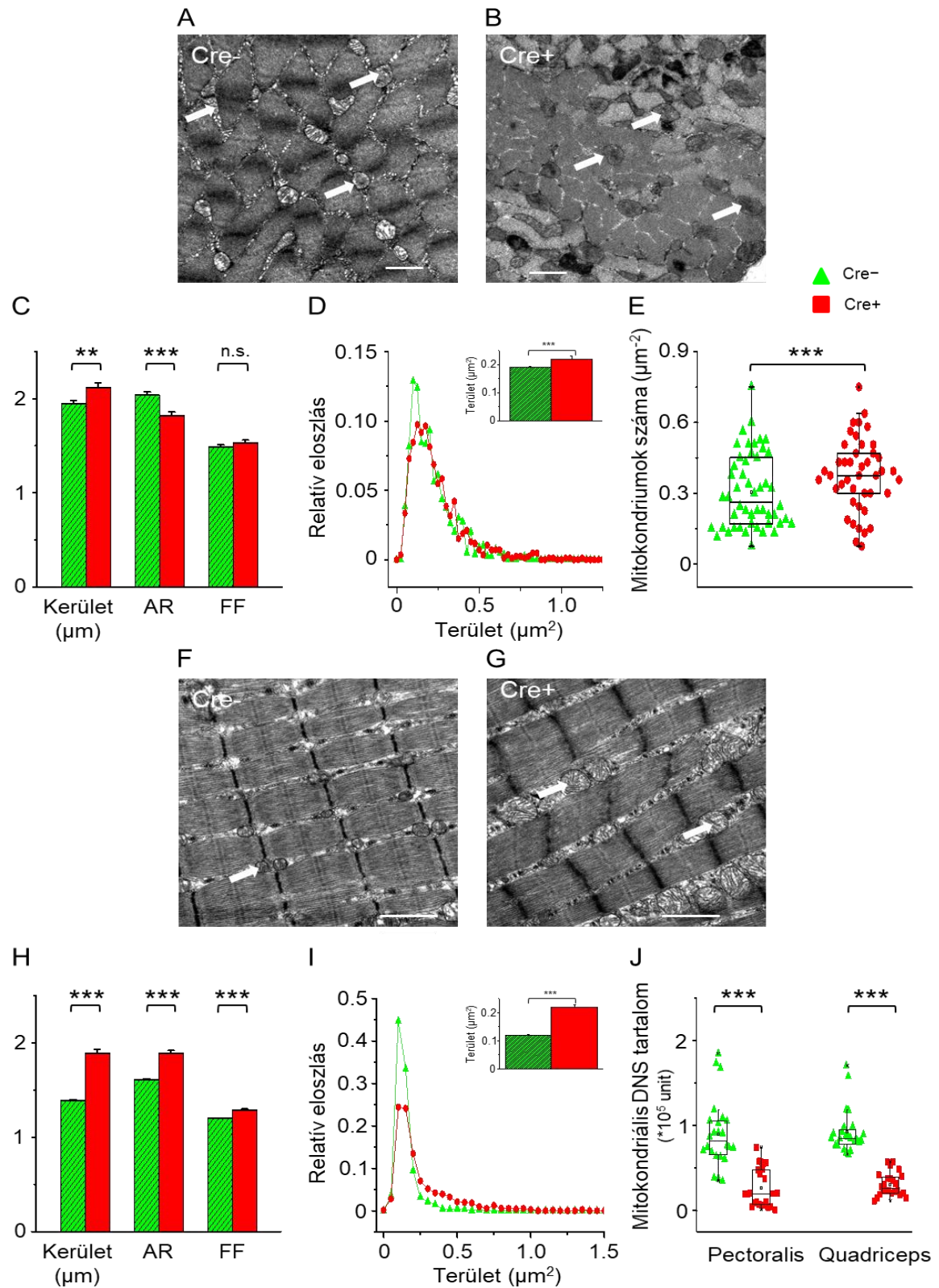


14. ábra: **A szeptin7 vázizom-specifikus leütése módosította az izomrost szerkezetét**
 Reprezentatív elektronmikroszkópos (EM) felvételek az izomrostok keresztmetszetéről Cre- (A) és Cre+ (B) egerek TA izmaiból. A skála 1 μm -nek felel meg, a nagyítás 10000x illetve 20000x. EM felvételekből meghatároztuk az egyes miofibrillumok területét és kerületét (C), valamint az adott látómező 1 μm^2 -ére eső miofibrillumok számát (D). Itt és minden további

ábrán a zöld oszlopok a Cre⁻, míg a piros oszlopok a Cre⁺ állatok adatait jelentik (átlag ± SEM). A miofibrillumok számának, területének és kerületének számításához a vizsgált miofibrillumok összes darabszáma Cre⁻ és Cre⁺ egerekben 3012, illetve 3174, míg a vizsgált látómezők száma 72, illetve 74 volt, (*p<0,05; ***p<0,001)

A fent említett paramétereket a mitokondriumokra vonatkoztatva is meghatároztuk a különböző állatcsoportokból származó TA izmok kereszt- és hosszszetszeti felvételein is. A mitokondriumokra nézve is elvégeztük a morfológiai változások leírását. Minden egyes azonosított mitokondrium esetében kiszámítottuk a területet, a kerületet, a tengelyarányt (AR) és az alak tényezőt (FF) (15. ábra). Az alak tényezőt az alábbi képlet szerint határoztuk meg: $FF = 4\pi \cdot \text{terület} / \text{kerület}^2$. A számított átlagos kerület és terület szignifikánsan megnőtt a Cre⁺ mintákban a Cre⁻ állatokból származó izmok adataihoz, illetve a kontroll BL6 egerek mintáihoz képest. Kismértékben a mitokondriális terület relatív eloszlása is megváltozott a Cre⁺ mintákban, ami a nagyobb mitokondriumok megjelenésével magyarázható. Az AR szignifikánsan csökkent a Cre⁺ mintákban a Cre⁻ mintákhoz képest, míg a számított FF paraméterekben nem volt szignifikáns különbség. Az egységnyi területre jutó mitokondriumok száma a kiválasztott látómezőkben belül szintén szignifikánsan megnőtt a Cre⁺ egerekből származó mintákban a Cre⁻ vagy BL6 egerek izmaihoz képest (a BL6 egértörzsön végzett megfigyelések eredményeit jelen dolgozatban csak hivatkozzuk, de itt nem mutatjuk be). A mitokondriumokkal kapcsolatos paraméterek nem különböztek a BL6 kontroll és a Cre⁻ csoport között. A Cre⁻ és BL6 kontroll mintákban a miofibrillumok/mitokondriumok területe és kerülete változásának jobb szemléltetésére az adathalmazok statisztikai eloszlását kiszámítottuk és hisztogramok formájában ábrázoltuk. Sem a miofibrillumok, sem a mitokondriumok területe és kerülete nem, vagy csak nagyon csekély eltolódást mutat a kontroll és a Cre⁻ minták között. A különböző állatcsoportok hosszszetszeteinek transzmissziós elektronmikroszkópos analízise normális miofibrilláris szerkezetet (szarkomer hosszát, triád összetételt) tárt fel a Cre⁻ mintákban, míg a legtöbb Cre⁺ izmokról készült felvételen nagy mitokondriális hálózatok előfordulását azonosítottuk. A hosszanti metszetekben a morfológiai paraméterek értékelése egyértelmű változásokat mutatott az átlagos területben, a kerületben, az AR-ben és az FF-ben egyaránt. Ezek a paraméterek szignifikánsan magasabbak voltak a Cre⁺ mintákban, mint a Cre⁻ társaik képein. A mitokondriális terület relatív megoszlásának eltolódása arra utal, hogy nagy területű mitokondriumok jelennek meg a Cre⁺ állatok izmaiban. A mitokondriumok összterületét az adott látómező teljes területének %-ában a BL6 és Cre⁻ állatokban is megvizsgáltuk, de ebben a paraméterben nem volt szignifikáns különbség ezen

egerek között. Meghatároztuk a mitokondriális DNS-tartalmat is a különböző izomtípusokban (*m. pectoralis* és *m. quadriceps*) [123,124]. Mindkét vizsgált izomban a mitokondriális (16S) RNS-tartalom erősen csökkent a Cre⁺ egerek izmaiban, a Cre[−] egerek adataihoz viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szeptin7 expressziójának csökkenése a vázizmokban nemcsak a mitokondriális morfológiát, hanem feltehetően a mitokondriális működést is súlyosan befolyásolja.



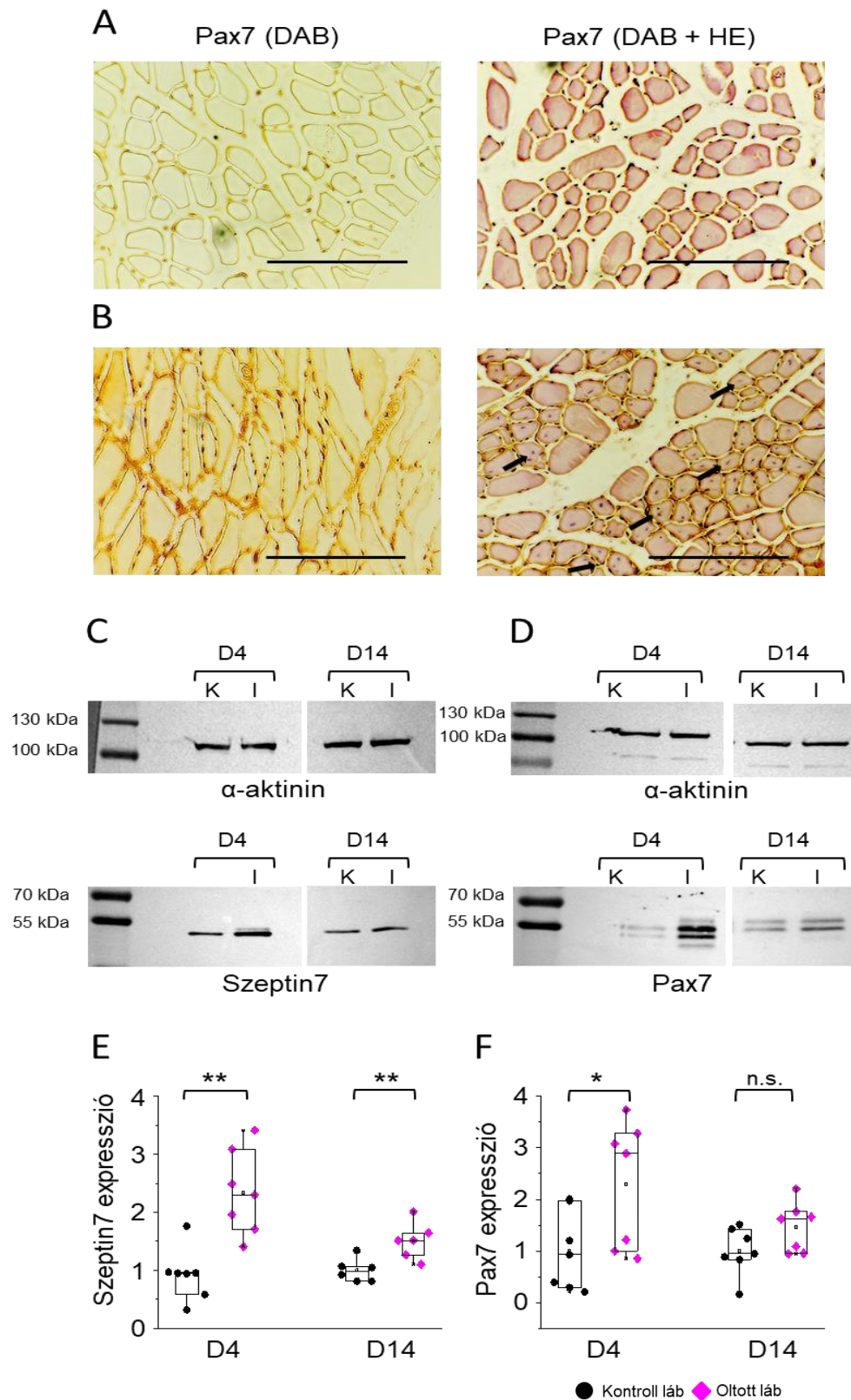
15. ábra: A *septin7* *in vivo* leütése megváltoztatja a mitokondriális paramétereket. Reprezentatív elektronmikroszkópos (EM) felvételek mitokondriumokkal rendelkező izomrostok keresztmetszeti mintáiból Cre⁻ (A) és Cre⁺ (B) egerek TA izmaiban. (C) Az egyes

mitokondriumok kerülete, AR és FF értéke (átlag $\pm$ SEM; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (D) A mitokondriumok területének statisztikai eloszlása a Cre⁻ (zöld) és a Cre⁺ (piros) minták EM-felvételein. Az átlag $\pm$ SEM van feltüntetve. (E) Az adott látómezőben az 1 μm^2 -re eső mitokondriumok száma. Az összes mitokondrium száma 811, illetve 866, míg a vizsgált látómezők száma 50 és 43 volt Cre⁻ és Cre⁺ állatokban (*** $p < 0,001$). Reprezentatív EM felvételek a miofibrillumokról és mitokondriumokról Cre⁻ (F) és Cre⁺ (G) egerekből származó TA izomminták hosszmetaszetein. (H) A kerületet, az AR-t és az FF-t a hosszanti metszetekből meghatároztuk mind a Cre⁻ (n=1635), mind a Cre⁺ (n=713) minták esetében (átlag $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$). A Cre⁻ és Cre⁺ vázizomrostokban a mitokondriális terület relatív megoszlását az I, a mitokondriumok átlagos területét a kis diagram mutatja. A vizsgált látómezők száma 42, illetve 41 volt (átlag $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$). A skála minden képen 1 μm -nek felel meg, a nagyítás 10000x. (J) A mitokondriális DNS-tartalmat specifikus qPCR primerek alkalmazásával a *m. pectoralis* és *m. quadriceps femoris* izmokban vizsgáltuk a Cre⁻ és Cre⁺ egerek esetében. A minták száma mindkét esetben 8 volt, kísérleti triplikátumok alkalmazásával (*** $p < 0,001$).

6.8 A szeptin7 megváltozott expressziót mutat izomregeneráció során

Korábbi adatok arra utaltak, hogy a szeptin7 kiemelkedő szerepet játszik az újszülött állatok izomfejlődésében és az izomrostok szerkezeti felépítésében, ezért megvizsgáltuk a szeptin7 expressziójának feltételezhető változásait az izomregeneráció során. A BL6 egerek TA izmaiban kismértékű steril gyulladást és ezzel enyhe izomkárosodást indukáltunk BaCl₂ injekcióval. Két különböző időpontban kriosztátos metszeteket készítettünk a BaCl₂-dal injektált és az ellenoldali, BaCl₂-dal nem, de fiziológiás sóoldattal injektált kontrollként kezelt izmokból. A metszeteket hematoxin-eozin (HE) festésnek vetettük alá. A regeneráció során szatellita sejtek aktivációjának következtében megemelkedett Pax7 expressziót, valamint az izomrostokban központi elhelyezkedésű sejtmagokat figyeltünk meg az injektált izmokban, összehasonlítva a kontroll mintákkal (16. ábra). A gyulladást követően kialakuló regeneráció során megemelkedett Pax7 expressziót a fokozott barna festődés mutatja. A szeptin7 fehérje mennyiségét a regeneráció során 2 hétig figyeltük, és az elvégzett western blot mérések minden vizsgált időpontban emelkedett értéket mutatottak. A szeptin7 megemelkedett expressziója, amelyet a BaCl₂ által kiváltott izomkárosodást követően észleltünk, felveti annak lehetőségét,

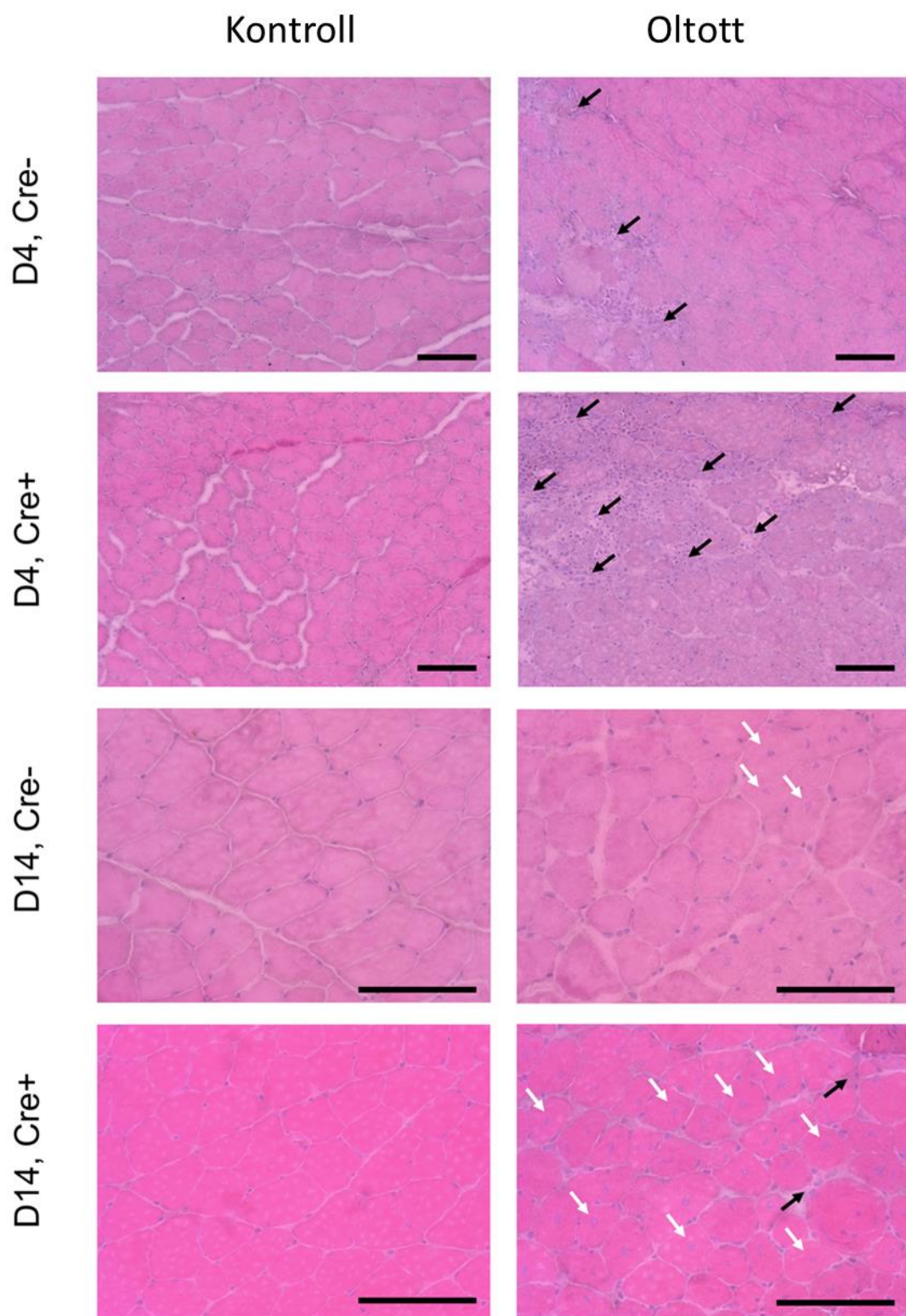
hogy a citoplazmatikus szeptinek potenciálisan hozzájárulnak a regenerációhoz az újonnan képződött izomsejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásán keresztül.



16. ábra: **A szeptin7 szerepe az izomregeneráció során.** Reprezentatív szövettani képek BL6 egerek kontroll (A) és BaCl₂-injektált (B) TA izommintáiból 14 nappal az izomsérülést követően. A 6 µm-es kriosztatos metszeteket Pax7-specifikus DAB jelöléssel végzett immunfestésnek vetettük alá (bal), és HE-festéssel egészítettük ki (jobb). A HE festés a BaCl₂-dal injektált mintákban centrális magokkal rendelkező regenerálódó izomrostok kimutatására is szolgált, ezeket nyilakkal jeleztük. A skála 100 µm-nek felel meg, a nagyítás 40x. Fehérjemintákat készítettünk a kontroll (K) és az injektált (I) izmokból az adott időpontokban (4. nap [D4] és 14. nap [D14]). A szeptin7 (C) és a Pax7 (D) fehérje expresszióját minden mintapárban meghatároztuk, normalizáló kontrollként α-aktint használtunk. A normalizált szeptin7 (E) és Pax7 (F) expressziós szintet meghatároztuk a kontroll (fekete körök) és az injektált izmokban (lila gyémántok), és külön-külön ábráztuk a vizsgálat minden időpontjában. Minden pont egyedi adatot jelent (*p<0,05,**p<0,01).

6.8.1 A vázizomregeneráció során morfológiai változások mennek végbe

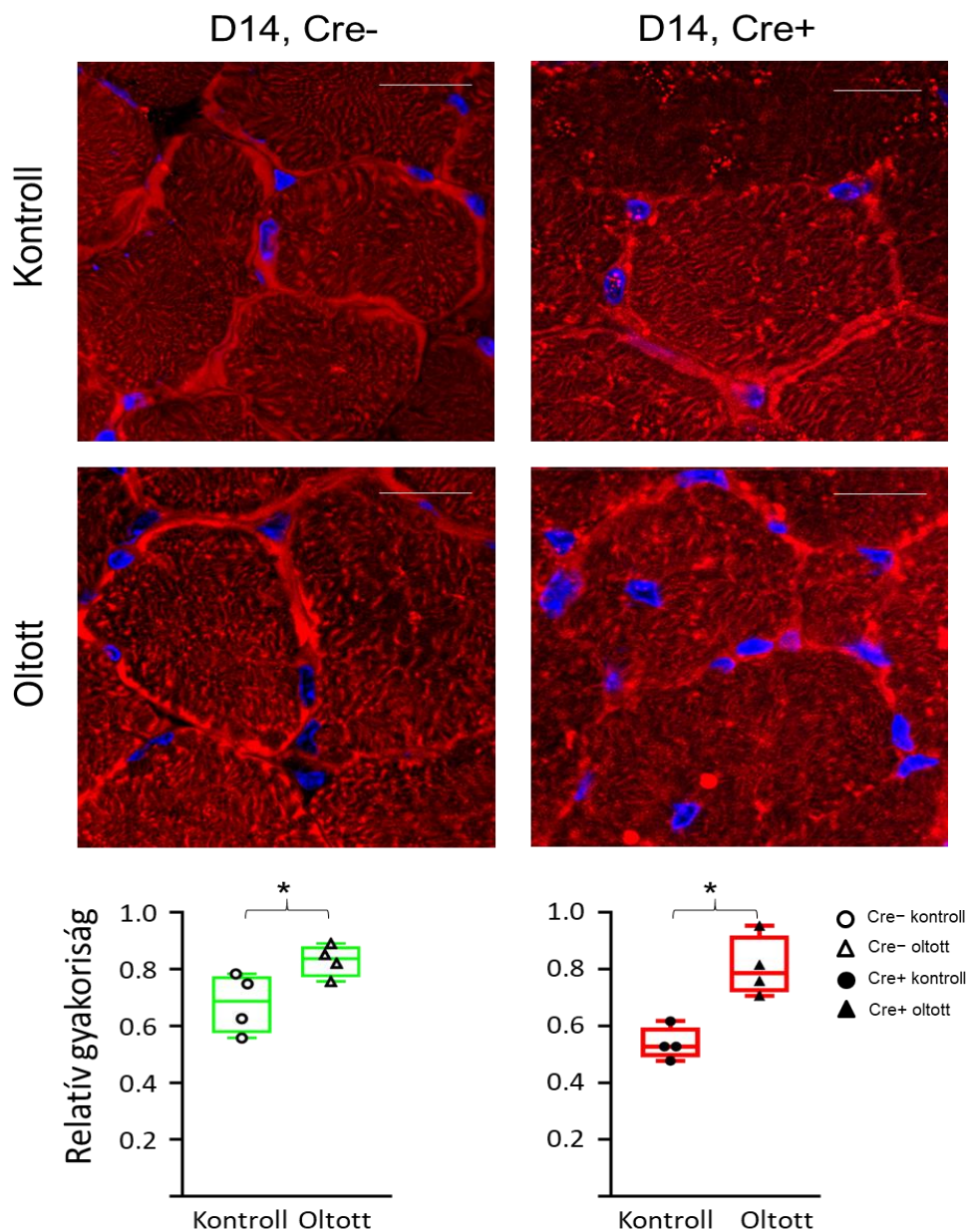
Mivel az izomsérülés károsítja az izomrost szerkezetét, feltételezhető, hogy a regeneráció során a helyreállítás a citoskeletális összetevőket érinti, azok részvételét igényli. A szeptinekről szerzett eddigi eredményeink alapján feltételeztük, hogy a szeptinek részt vesznek az izomregenerációban. A szeptin7 vázizom-regenerációban betöltött szerepének vizsgálatához a már említett Cre–Lox rekombinációs technológiával generált indukálható szeptin7 knockdown állatmodellt használtunk. A szeptin7 regenerációban betöltött szerepének pontosabb feltárásához steril vázizomgyulladást és ezáltal károsodást váltottunk ki a fent leírt BaCl₂ injektálási módszerrel. A fiatal Cre– és Cre+ egerek bal oldali lábában steril gyulladást indukáltunk, míg a jobb oldali TA fiziológiás sóoldattal injektált kontrollként szolgált. Ezt a fajta sérülést a megerőltető izommunka során fellépő izomkárosodás, vagyis mikrosérülések szimulációjaként használják. A gyulladás morfológiai jelei az injekció beadása után 4 nappal mind a Cre+, mind a Cre– egerekben láthatók voltak, és csökkent mértékben még 14 nappal a sérülés után is jelen voltak, amint azt a HE-festés is mutatja (17. ábra). A gyulladásos sejtek (neutrofil granulociták, makrofágok) inváziója a BaCl₂ injektált területen jól megfigyelhető volt, míg a kontroll lábakon gyulladásra utaló jelek nem mutatkoztak.



17. ábra A **szeptin7** leütés fokozott gyulladást okozott. 4 és 14 nappal a BaCl₂ injekció után a Cre⁻ és Cre⁺ egerek TA izmából HE metszetteket készítettünk. A kontroll mintákban is elvégeztük a festést. A fekete nyilak a gyulladásos sejteket jelölik, a fehér nyilak a központilag elhelyezkedő sejtmagokra mutatnak. A skála 100 µm-nek felel meg, a nagyítás 20x.

6.9 A vázizomsérülés a szeptin7 expressziójának emelkedését váltja ki

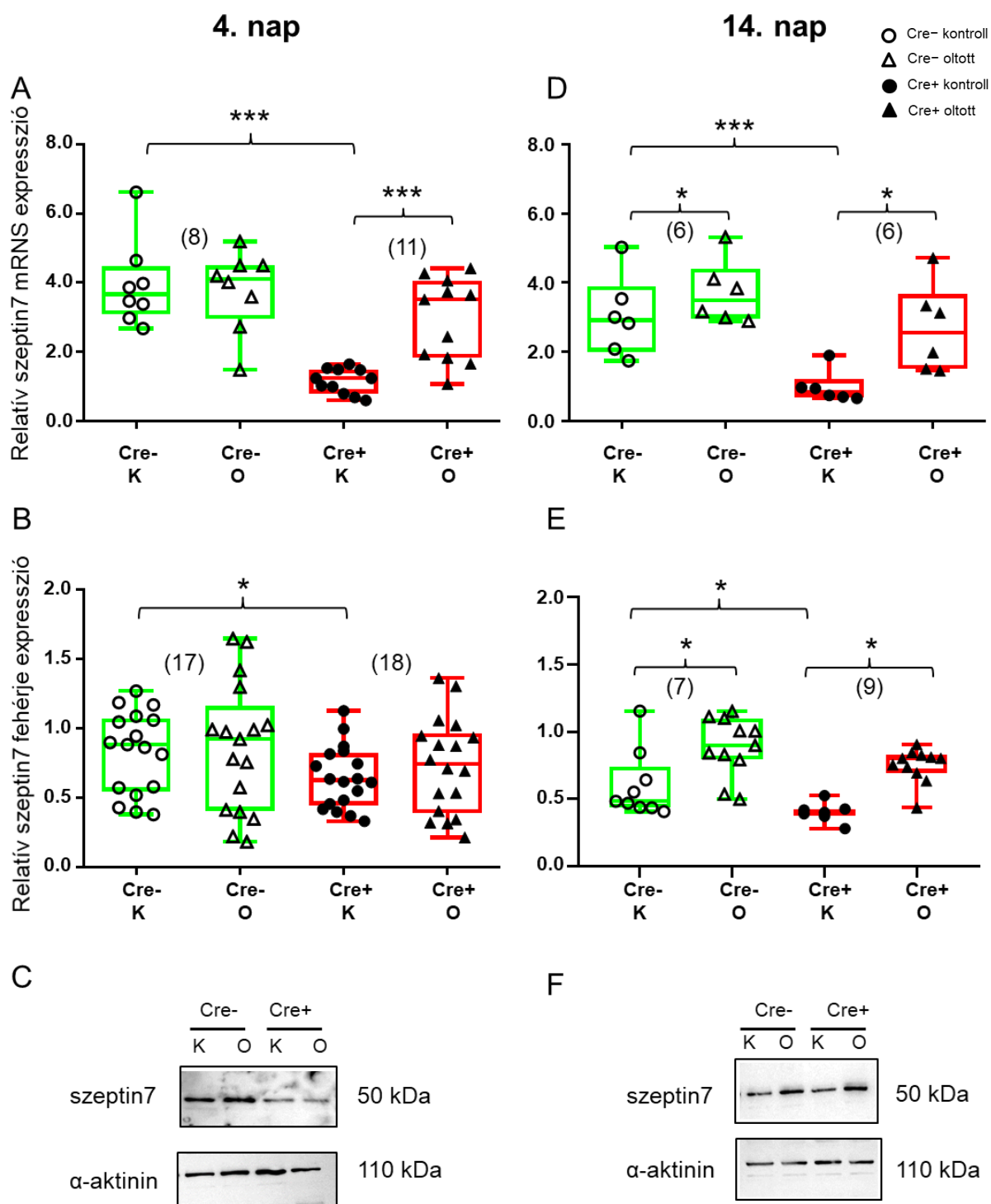
Az izomrostok károsodása a szeptin7 filamentumok szerkezeti változásához vezethet. Ennek vizsgálatára specifikus immunjelölést végeztünk. Konfokális mikroszkóppal készült felvételek alapján csak mérsékelt különbséget észleltünk a szeptin7 filamentumok expressziós mintázatában a Cre⁻ és a Cre⁺ egerek között (18. ábra). A képek statisztikai elemzése megerősítette, hogy a fehérjeexpresszió mind a Cre⁻, mind a Cre⁺ egerek izomzatában megemelkedett az injekció hatására ($67,9 \pm 5,2\%$ -ról $83,0 \pm 2,8\%$ -ra; és $53,7 \pm 2,9\%$ -ról $80,8 \pm 5,3\%$ -ra). A Cre⁺ állatok izommetszetében szignifikánsan alacsonyabb expressziót detektáltunk, mint a Cre⁻ állatokban ($p < 0,05$).



18. ábra: **A regenerálódó izomrostokban megváltozott a szeptinszerkezet.** Keresztmetszeti TA minták fluoreszcens festése 14 nappal a BaCl₂ beadása után Cre⁻ és Cre⁺ egerekben. A kontroll panelek a nem befecskendezett lábakat ábrázolják. A szeptin7 (Cy3) pirossal van jelölve, míg a magok kékek (DAPI). A skála 50 µm-nek felel meg, a nagyítás 63x. A relatív gyakoriság a szeptin7-jelként azonosított pixelek arányát jelenti az adott képen lévő összes pixelszámhoz viszonyítva. A relatív gyakoriságot a kontroll (K) és az injektált (I) lábakban is meghatároztuk. A zöld szín a Cre⁻ adatot jelöli, a piros szín pedig a Cre⁺ adatokat. A csillagok statisztikailag szignifikáns különbséget jeleznek (* p < 0,05).

Az immunfestések során észlelt szerkezeti különbségnek a további vizsgálatára kvantitatív analízist végeztünk mind mRNS, mind fehérje szinten (19. ábra). A szeptin7 mRNS szintjében a Cre⁻ egerekben a vázizom sérülése nem okozott változást a regeneráció korai szakaszában. Hasonlóképpen, nem volt kimutatható változás a szeptin7 mRNS-ben a BL6 vad típusú egerekben. Azonban a szeptin7 leütött (szeptin7-KD) egerekben a BaCl₂ kiváltotta sérülés a szeptin7 mRNS növekedését indukálta az injekció utáni 4. napon. A western blot analízis részben hasonló eredményeket mutatott. Csakúgy, mint mRNS szinten, a szeptin7 fehérje expressziójában nem volt megfigyelhető különbség a Cre⁻ egerekben a sérülés kiváltotta reakcióban. Bár a Cre⁺ egerek injektált izmában a szeptin7 mRNS szinten megemelkedett, ezt a jelenséget a fehérje expresszióban a vizsgált időpontban nem lehetett kimutatni.

Az oltás után 2 héttel mindkét egér reagált az izomsérülésre, és ez a szeptin7 expressziójában bekövetkezett változásokban is megmutatkozott. A BaCl₂ injekció eredményeként a szeptin7 mRNS megnövekedett mind a Cre⁻, mind a Cre⁺ egerekben. A szeptin7 fehérjeszintű változásai alátámasztották az mRNS adatainkat. Az izomsérülés a szeptin7 fehérje emelkedését okozta mind a Cre⁻, mind a Cre⁺ egerekben, bár a Cre⁺ állatban a fehérje mennyisége még a 14. napon sem érte el a Cre⁻ egerekben mért értékeket.

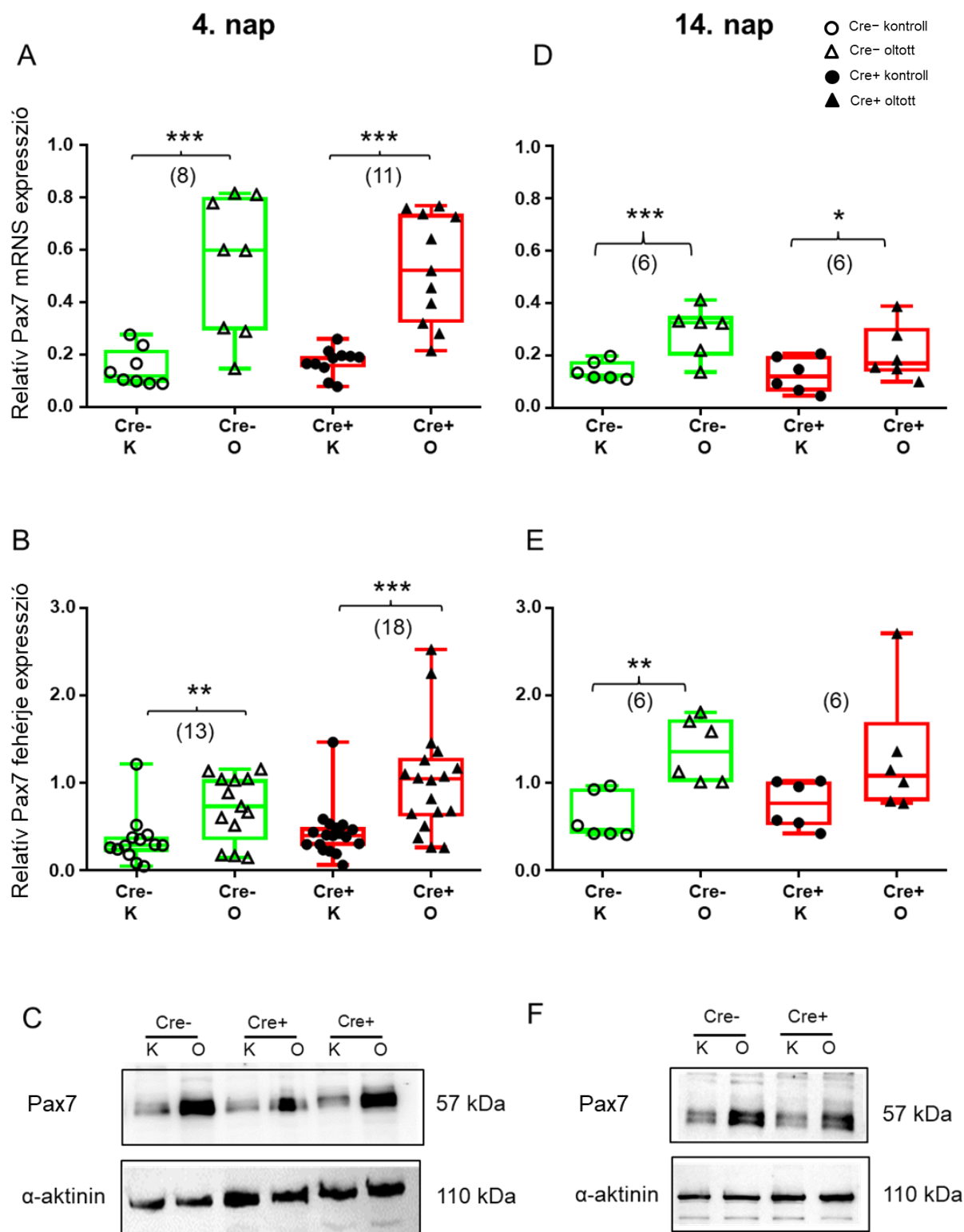


19. ábra: **A BaCl₂ injekció fokozott szeptin7 expressziót eredményezett.** A zöld szín a Cre- adatokat, míg a piros szín a Cre+ adatokat jelöli. A zárójelben lévő számok a vizsgálatban felhasznált TA izomminták számát jelzik. (A) Relatív szeptin7 mRNS expresszió (a belső kontrollként AP3D1-re normalizálva) a Cre- és Cre+ egerekben 4 nappal a BaCl₂ injekció után a kontroll (K) és az injektált (O) lábak esetében. (B) Relatív szeptin7 fehérje expresszió (α -aktininre normalizálva belső kontrollként) Cre- és Cre+ egerekben 4 nappal az injekció után.

(C) A western blot reprezentatív képei, amelyek a szeptin7 fehérje expressziós változásait mutatják a 4. napon. (D) Relatív szeptin7 mRNA expresszió Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (E) Relatív szeptin7 fehérje expresszió Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (F) A western blot reprezentatív képei, amelyek a szeptin7 fehérje expressziós változásait mutatják a 14. napon. A csillagok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelezik (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

6.10 A regenerációt a Pax7 transzkripciós faktor megemelkedése kíséri

Az izomregeneráció folyamatát izomspecifikus őssejtek, úgynevezett szatellita sejtek végzik. A nyugalomban lévő szatellitsejteket (SC) a Pax7 expressziója jellemzi, ami a nyugvó állapotból aktív sejtciklusba lépéskor növekvő expressziót mutat. Ezért az mRNA és a fehérje szintű expressziójának vizsgálata a BaCl₂ injekció utáni regenerációs folyamatok ellenőrzésére alkalmazható (20. ábra). Ahogy az várható volt, a Pax7 mRNA szintje szignifikánsan megemelkedett 4 nappal a vázizom sérülése után mind a Cre⁻, mind a Cre⁺ egerekben. Az mRNA változásait ebben az időpontban jól követte a Pax7 fehérje fokozott expressziója. A regeneráció végére (14. nap) a Pax7 mRNA szintje még mindig emelkedett volt a Cre⁻ és a Cre⁺ egerek injektált lábaiban. A Cre⁻ egerekben a Pax7 fehérje mennyiségének emelkedése továbbra is szignifikáns volt. Azonban a szeptin7 knockdown Cre⁺ egerekben a Pax7 fehérje már nem mutatott szignifikáns emelkedést.

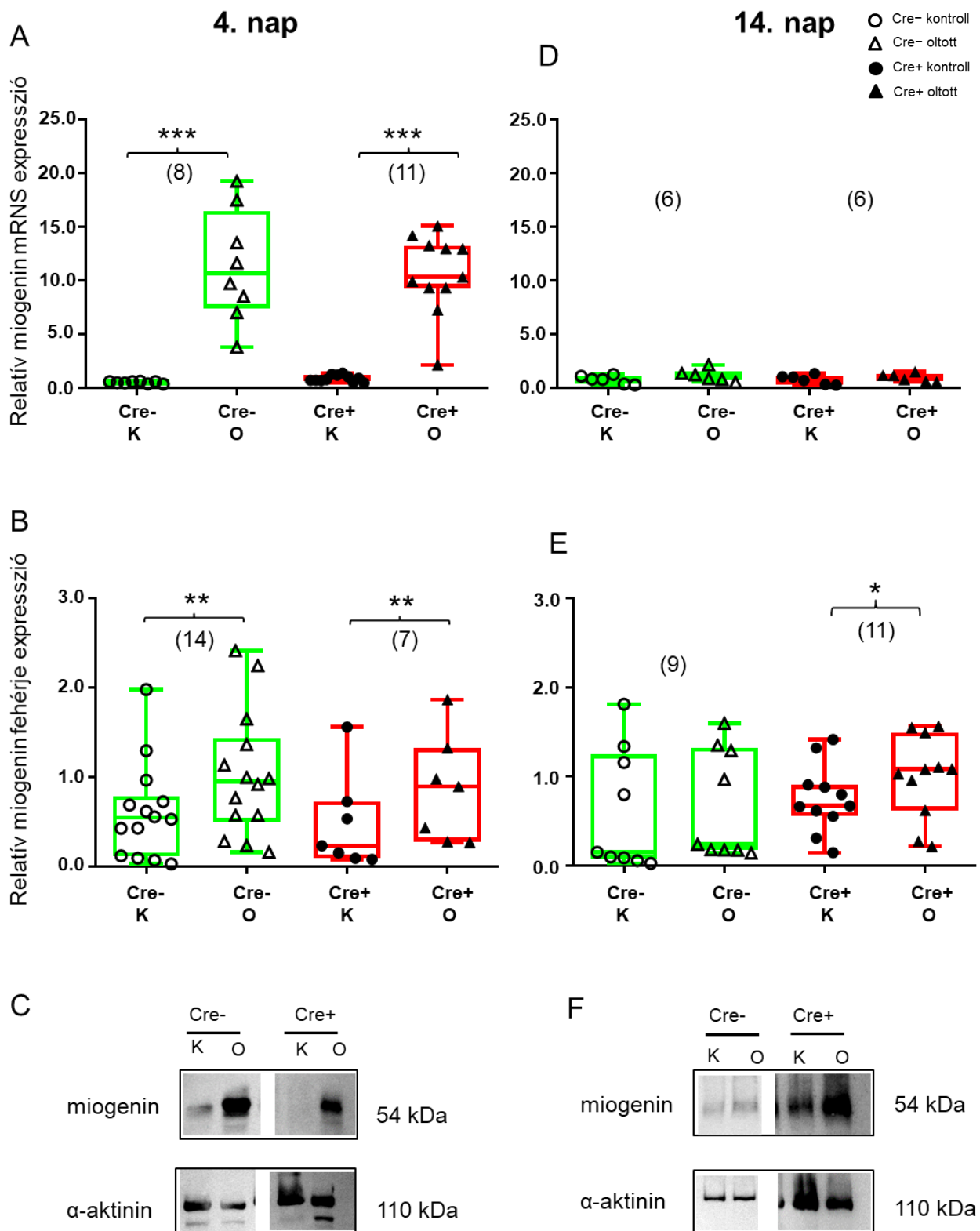


20. ábra. A vázizomsérülés a Pax7 szatellita sejtmarker upregulációjához vezet. A zöld szín a Cre⁻ egerekből, a piros szín pedig a Cre⁺ állatokból nyert adatokat jelöli. A zárójelben lévő számok a TA izomminták számát jelzik. (A) Relatív Pax7 mRNA expresszió (a belső kontrollként AP3D1-re normalizálva) Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 4 nappal a BaCl₂ injekció után a

kontroll (K) és az oltott (O) lábak esetében. (B) Relatív Pax7 fehérje expresszió (belső kontrollként α -aktininre normalizálva) Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 4 nappal az injekció után. (C) A western blot vizsgálatok reprezentatív képei, amelyek a Pax7 fehérje expressziós változásait mutatják a 4. napon. (D) Relatív Pax7 mRNS expresszió Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (E) Relatív Pax7 fehérje expresszió Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (F) A western blot reprezentatív képei, amelyek a Pax7 fehérje expressziós változásait mutatják a 14. napon. A csillagok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$).

6.11 A regenerációs szakaszban a miogenin transzkripciós faktor emelkedett expresszió mutat

A kezdeti regeneráció után a nyugvó szatellitasejtek differenciálódó mioblasztokká alakulnak. A miogén program egyik késői markere a miogenin transzkripciós faktor, amelynek aktiválódása a differenciálódáshoz nélkülözhetetlen fehérjék transzkripcióját koordinálja. A regeneráció folyamatának részletesebb analízise érdekében a miogenin változását is monitoroztuk (21. ábra). Négy nappal a vázizom sérülése után a miogenin mRNS szintje már emelkedett volt a Cre⁻ egerekben. Ezt a változást western blottal fehérjeszinten is megerősítettük. A szeptin7 részleges leütése nem befolyásolta a miogenin expressziós változásait, itt is emelkedést tapasztaltunk. A regeneráció végére (14. nap) a miogenin mRNS és fehérje szintje lecsökkent, és nem mutatott különbséget a kontroll és az injektált lábak között a Cre⁻ egerekben. Ellenben a Cre⁺ állatokban a miogenin fehérje szinten továbbra is fokozott expressziót mutatott, azonban a miogenin mRNS szintjében már nem volt megfigyelhető a fokozott kifejeződés.

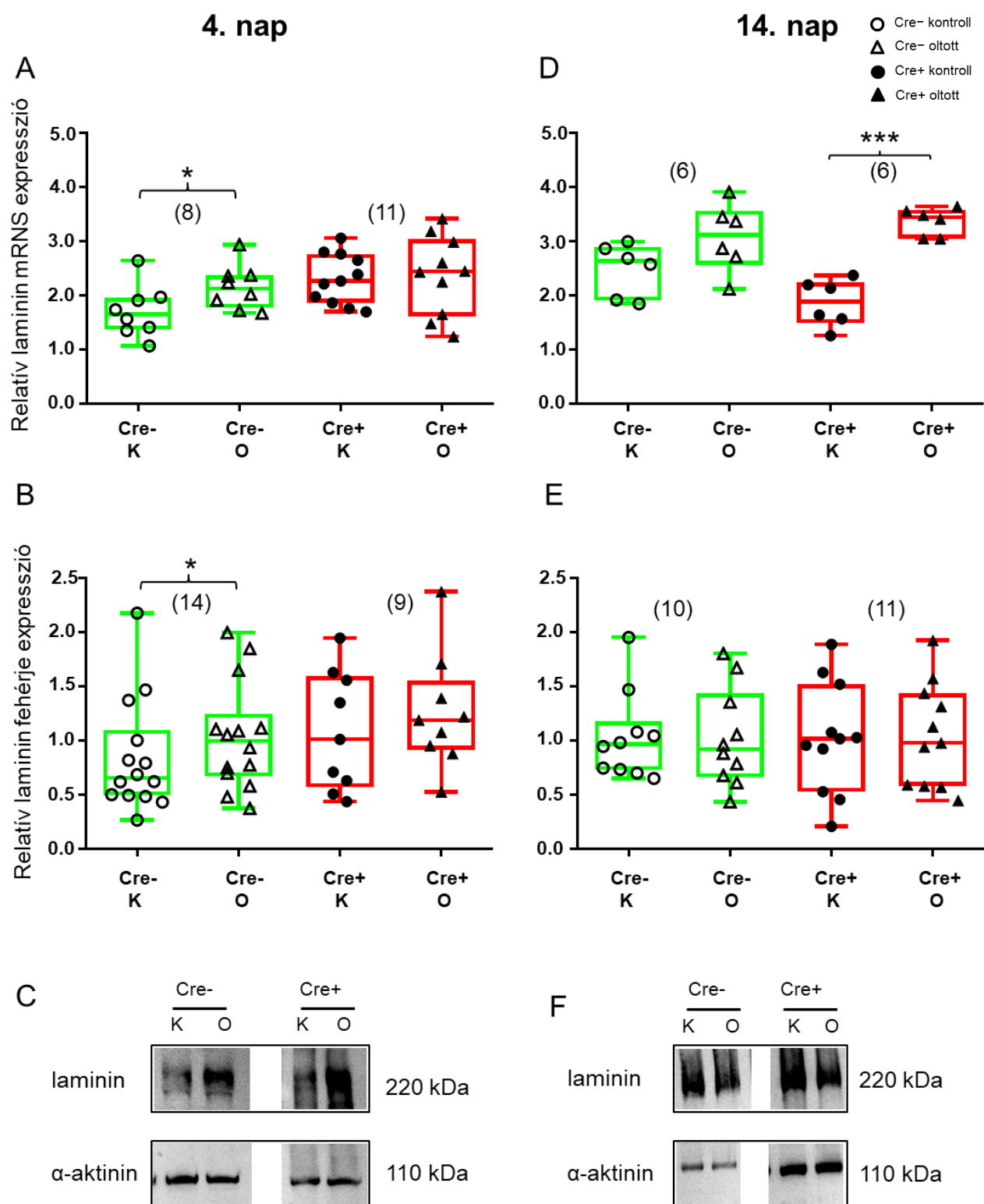


21. ábra: **A miogenin regenerációs marker szintje a regeneráció korai szakaszában megnövekedett.** A zöld szín a Cre⁻ adatot jelöli, a piros szín pedig a Cre⁺ adatokat. A zárójelben lévő számok a TA izomminták számát jelzik. (A) Relatív miogenin mRNA expresszió (a belső kontrollként AP3D1-re normalizálva) Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 4 nappal a

BaCl₂ injekció után a kontroll (K) és az oltott (O) lábak esetében. (B) Relatív miogenin fehérje expresszió (belső kontrollként α -aktininre normalizálva) Cre[−] és Cre⁺ egerekből 4 nappal az injekció után. (C) Western blot képek reprezentatív képei, amelyek a 4. napon a miogenin fehérje expressziós változásait mutatják. (D) Relatív miogenin mRNA expresszió Cre[−] és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (E) Relatív miogenin fehérje expresszió Cre[−] és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (F) A western blot reprezentatív képei, amelyek a 14. napon a miogenin fehérje expressziós változásait mutatják. A csillagok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelezik (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$).

6.12 A laminin expressziós változása a regeneráció során

Az izomregeneráció utolsó lépése az ECM újraképződése, melynek során számos fehérje, például a laminin, a proteoglikánok és a kollagén termelése zajlik. Ezen fehérjék elengedhetetlenek az újonnan képződött izomrostok megfelelő környezetének biztosításához és szerkezeti támogatásához. A laminin a membrana basalis aktív és nélkülözhetetlen alapeleme, mivel elősegíti a differenciálódást, részt vesz a migrációban és az adhízió folyamatában. A regeneráció zárólépésének nyomon követése érdekében mRNA és fehérje szinten laminin kifejeződést vizsgáltunk mindegyik vizsgálati csoportban 4 és 14 nappal a sérülés után (22. ábra). Négy nappal a vázizom sérülése után kimutatható volt mind a laminin mRNA, mind a fehérje mennyiségének fokozódása a Cre[−] egerekben. Azonban a Cre⁺ egerek sérült és nem sérült lábai között nem volt különbség sem az mRNA-szintben, sem a fehérje expressziójában. A regeneráció végére a laminin mRNA-növekedése lecsengett a Cre[−] egerekben. A laminin fehérje western blot analízise megerősítette az mRNA-adatokat. Ellenben a Cre⁺ egerek sérült lábaiban a laminin mRNA-szintje ebben az időpontban emelkedést mutatott, de a laminin fehérje kifejeződése késést szenvedett, az mRNA-szintű változásokat még nem követte.

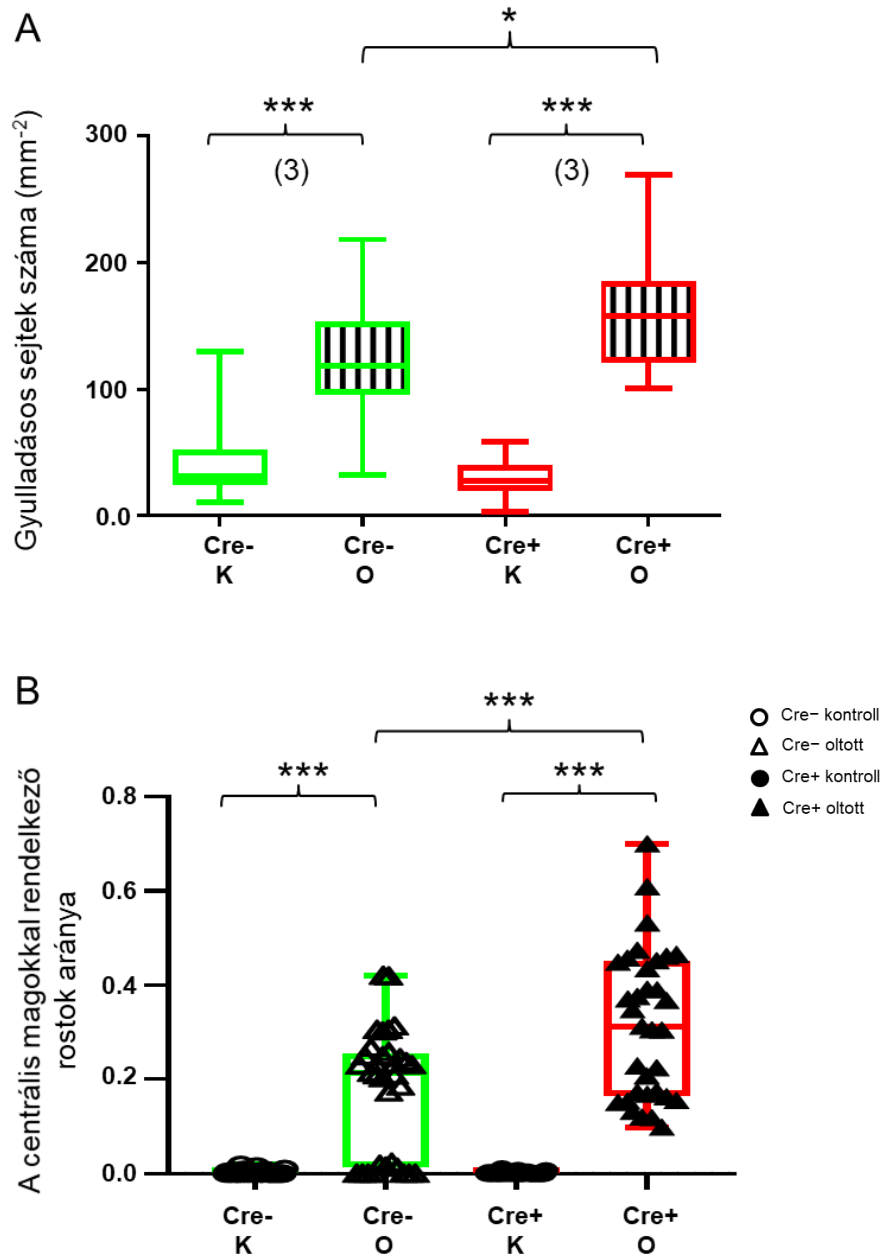


22. ábra. Az ECM-remodelling eltér Cre⁺ és Cre⁻ egerekben, ami megfigyelhető a laminin expresszió-változásában. A zöld szín a Cre⁻ adatot jelöli, a piros szín pedig a Cre⁺ adatokat. A zárójelben lévő számok a TA izomminták számát jelzik. (A) Relatív laminin mRNA expresszió (a belső kontrollként AP3D1-re normalizálva) Cre⁻ és Cre⁺ egerekből 4 nappal a

BaCl₂ injekció után a kontroll (K) és az oltott (O) lábak esetében. (B) Relatív laminin fehérje expresszió (belső kontrollként α -aktininre normalizálva) Cre[−] és Cre⁺ egerekből 4 nappal az injekció után. (C) A western blot reprezentatív képei, amelyek a 4. napon a laminin protein expressziós változásait mutatják. (D) Relatív laminin mRNA expresszió Cre[−] és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (E) Relatív laminin fehérje expresszió Cre[−] és Cre⁺ egerekből 14 nappal az injekció beadása után. (F) A western-blot reprezentatív képei, amelyek a 14. napon a laminin protein expressziós változásait mutatják. A csillagok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelezik (* p<0,05, *** p<0,001).

6.13 A szeptin7 leütése késlelteti a regenerációt, ami morfológiai változásokat okoz

Adataink azt mutatják, hogy a szeptin7 hozzájárul az izomregenerációhoz, mert a részleges leütése, így a szeptin7 hiánya expressziós és kinetikai eltéréseket eredményezett a regenerációt kísérő molekuláris folyamatokban. Az izomrostok esetén a központilag elhelyezkedő magok a szatellita sejt eredetű, újonnan differenciált mioblasztok sérült izomrostokhoz történő integrálódását jelzik. Az utolsó lépésben a magok visszanyerik eredeti szarkolemmális helyüket. A szeptin7 izomregenerációban betöltött szerepének további vizsgálatára morfológiai elemzést is végeztünk (23. ábra). A gyulladásos sejtek számát és a központi sejtmagokat tartalmazó rostok számát a sérülés után 14 nappal HE-festett metszeteken vizsgáltuk. A gyulladásos leukociták általi invázió igazolására fluoreszcens immunfestést végeztünk CD45, az általános leukocita antigén ellen. A BaCl₂ injekció a gyulladásos sejtek jelentős felszaporodása eredményezte mind a Cre⁺, mind a Cre[−] egerekben, melynek mértéke szignifikánsan magasabb volt a Cre⁺ egerekben, mint a Cre[−] egerekben. A központi sejtmagokat tartalmazó izomrostok száma is jelentősen magasabb volt a Cre⁺ egerekben, mint a Cre[−] egerekben. Központilag elhelyezkedő sejtmagokat alig lehetett azonosítani a nem injektált izmokban.



23. ábra: **Kvantitatív szövettani analízis a regeneráció kinetikájának vizsgálatára septin7-KD egerekben.** A zöld szín a Cre⁻ adatokat jelöli, a piros szín pedig a Cre⁺ adatokat. A zárójelben lévő számok a TA izomminták számát jelzik. (A) Gyulladásos sejtek száma mm²-re megadva Cre⁻ és Cre⁺ egerekből származó HE metszeteken 14 nappal a BaCl₂ injekció után. Vizsgálati csoportonként három állatról egyedenként tíz kép készült. (B) A központilag elhelyezkedő magokkal rendelkező regenerálódó izomrostok számát normalizáltuk az összes izomrostra a 14 nappal az injekció beadása után készített felvételeken. A csillagok a statisztikailag szignifikáns különbséget jeleznek (* p < 0,05, *** p < 0,001)

7 Megbeszélés

Az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a szeptin filamentumok a vázizomzat citoszkeletonjának szerves és nélkülözhetetlen részét képezik. Eddigi ismereteink alapján már tudjuk, hogy kölcsönhatásba léphetnek a sejtvázas más elemeivel, a sejtmembránnal és emellett számos jelátviteli útvonalban is részt vehetnek [29,125]. A kutatócsoportunk a vázizomzatot vizsgálva először mutatta ki a különböző szeptin izoformák jelenlétét és a szeptin7 fontosságát a vázizomzat megfelelő működésében, ezáltal tovább bővítve a szeptin rendszer elemeinek sejtspecifikus hatásspektrumát.

7.1 Szeptin izoformák expressziója a vázizomban

A szeptinek a citoszkeletális rendszer negyedik alkotóelemei. Részt vehetnek a vázizomzat felépítésében és a működésében is fontos szerepet játszhatnak. Egér és humán vázizom mintákban vizsgált szeptin mRNS expressziós mintázatok alapján kijelenthető, hogy az egyes homológcsoportok (SEPT2, SEPT3, SEPT6 és SEPT7) legalább egy tagja jelen van a harántcsíkolt vázizomban [34,35,38,126,127]. Ezek az eredmények az eddigi kutatások által igazolt hexamerek, magasabb rendű oligomer szerkezetek jelenlétét feltételezik, bár a pontos komplexképződés megértéséhez további szerkezeti vizsgálatok szükségesek.

A szeptin7 az életkor előrehaladtával csökkenő expressziót mutatott mind a gyors, mind a lassú kinetikával rendelkező vázizmokban. Ez arra utalhat, hogy az egyedfejlődés kezdeti szakaszában kifejezettebb a jelentősége. Ezen megfigyelés összhangban áll a szeptin7 korábban felismert, sejtosztódásban betöltött kiemelkedő szerepével. Az a tény, hogy a szeptin7, szeptin9 vagy szeptin11 gén mutációja és kiütése embrionálisan letális, szintén a korai fejlődésben betöltött alapvető szerepükre utal [128,129]. Tekintettel arra, hogy a szeptin7 az egyetlen tagja a SEPT7 homológiai csoportnak, hiánya feltételezhetően nem pótolható másik izoformával az oligomerekben, mert nincs másik hasonló szerkezetű szeptin izoforma. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a szeptin7 a vázizomzat korai fejlődésében nélkülözhetetlen és teljes hiánya halálos. Ebben a kísérletsorozatban arra világítottunk rá, hogy már a csökkent expresszió is súlyosan rontsolja a vázizomrendszer fejlődését. Az egyedfejlődés során bár lecsökkent a szeptin7 expressziója, de ez az alacsonyabb mennyiség kritikusnak bizonyul számos sejtélettani folyamat szempontjából. Vizsgálataink során a kondicionális szeptin7 KD (Cre+) egerek esetén megfigyelt megváltozott fenotípus és a csökkent izomerő is megerősítette a szeptin7 fontosságáról felállított teóriát.

A szeptinek és más citoskeletális fehérjék közötti kapcsolat kiemelkedő szerepet játszik a mechanikai ingerek érzékelésében és közvetítésében. Kimutatták, hogy a szeptinek együtt jelennek meg az aktin filamentumokkal a fokális adhézíós komplexekben és a stresszfilamentumokban. A szeptinek továbbá részt vesznek a mechano-transzdukcióban azáltal, hogy elősegítik a kontraktilis aktin-miozin kapcsolat kialakulását emlős hámsejtekben és egér szívizomsejtekben [130].

7.2 A szeptinek szerepe a mitokondriális dinamikában

Eredményeink arra utalnak, hogy a szeptinek szerepet játszanak az egerek vázizomzatának mitokondriális dinamikájában, mivel a mitokondriális vizsgálatok során az EM képeken az egyedi mitokondriumokból származtatott terület és kerület adatok eltértek a kontroll és az indukált szeptin7-KD állatok mintáiban. Továbbá a szeptin7 hiányos rostokban kiterjedt mitokondriális hálózatokat találtunk. Azonban a mitokondriális DNS-tartalom csökkent a nagyobb mitokondriumok ellenére is, ami a Cre⁺ egerek mitokondriális funkciójának károsodására utal [131]. A citoskeletonról kimutatták, hogy megváltoztatja a mitokondriumok mozgását és eloszlását az erősen poláros sejtekben, és szerepet játszik a mitokondriális dinamikában is [132]. A szeptin fehérjék hiányában a sejtekben megnyúlt mitokondriumok jelentek meg, ami a csökkent mitokondriális osztódás, vagyis a sérült mitokondriumhasadás folyamata miatt alakult ki, és nem a hibás mitokondriális fúzió miatt [133]. Kimutatták, hogy a szeptin2 hiánya befolyásolja a mitokondriális morfológiát HeLa sejtekben [133]. Ezt a képet tovább árnyalja a szeptin7 általunk kimutatott, a mitokondriumokra kifejtett vázizomspecifikus hatása. Már ismert, hogy a mitokondriumok működéséhez hozzájárulnak a körülöttük lévő strukturális funkcióval bíró szeptintekerc szerkezetek is [132]. Vizsgálatok során igazolták, hogy a szeptin expressziójának módosítása befolyásolja a *Tetrahymena thermophila* mitokondriális morfológiáját is [134]. Ez arra utal, hogy a szeptinek felelősek a mitokondriális stabilitás fenntartásáért csillós baktériumokban és protozoákban. Mindezek a szeptinek mitokondriális dinamikában betöltött evolúciósan konzervált szerepét körvonalazzák.

7.3 A szeptin7 szerepe a vázizomzat regenerációjában

Az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a szeptinek a szatellitsejtek aktivációjában is szerepet játszanak, így az izomregenerációban is fontos funkcióval rendelkezhetnek [72]. A kísérleteink során azt találtuk, hogy a szeptin7 expressziója megnövekszik a BaCl₂ injekció által kiváltott

enyhe izomkárosodást következtében. Az injekció indukálta gyulladást és az azt követő regeneráció megjelenését és mértékét a Pax7 pozitív szatellitsejtek jelenlétének kimutatásával követtük, és egyértelmű összefüggést találtunk a két molekula expressziós mintázatának időbeli lefolyásában. Ezen megfigyelésünk összhangban volt a Pax7-re vonatkozó korábbi eredményekkel [81,135]. A sérülés után átlagosan 4 nappal a legintenzívebb a miogén regeneráció, így mind a Pax7, mind a szeptin7 expressziójának a növekedése ebben a fázisban volt a legnagyobb. 14 nappal a nekrosis kiváltását követően a regeneratív folyamatok lényegében teljesen befejeződtek, és a két molekula expressziója visszatért az alapszintre. Mivel a Pax7 transzkripciós faktor megjelenése, valamint a rostban központiag elhelyezkedő magok az izomregeneráció elfogadott markerei, arra a következtetésre jutottunk, hogy a szeptin7 fokozott expressziója is összefüggésben lehet az izomregeneráció folyamatával [136,137]. Bár ezek az eredmények bizonyították a szeptin filamentumok jelentőségét az izomsérülést követő regenerációs lépésekben, pontos szerepük tisztázásához további kísérletekre volt szükség.

A szeptin7 izomregenerációban betöltött feladatának vizsgálatára az általunk létrehozott kondicionális KD egértörzset használtuk fel. A szeptin7 szintjének 40 %-os csökkenése a már említett gerincdeformitás és izomerő-csökkenés mellett rontotta a gyógyulás képességet is, ami jelentősen befolyásolta a regeneratív folyamatok dinamikáját.

A konfokális felvételeken látható eltérések, vagyis a gyulladást követően a szeptin7 expressziójában bekövetkező fokozódás megmutatkozott a fehérje és az mRNS szintek változásában is. Az injekció hatására mindkét állattörzsben (Cre⁻ és Cre⁺) nőtt a szeptin7 mRNS mennyisége, ezek a változások azonban kifejezettebbek voltak a Cre⁺ egerekben. Az mRNS szinten ez az emelkedés a Cre⁺ állatban már a 4. napon szignifikáns volt, míg fehérje szinten ez csak a 14. napon volt detektálható. Ahogy az várható volt, a Cre⁺ állat kontroll lábában az mRNS mennyisége abszolút értékben is szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Cre⁻ állatban. A regeneráció beindulása után a Cre⁺ egerekben gyorsan megemelkedett a szeptin7 mRNS szintje, ami a regenerációhoz szükséges megnövekedett szeptin7 mennyiségét kívánta biztosítani, azonban a fehérje mennyiségének növekedése csak néhány napos késéssel következett be. Ebben a folyamatban a gyulladás egy túlkompenzált szeptin7-termelést okozhatott, ami az addigi hiányt is megpróbálta kompenzálni. Feltételezhető, hogy a szeptin7 mRNS-ének ilyen nagymértékű megemelkedése szükséges, ami hangsúlyozza a folyamatban betöltött szerepét. Azt is valószínűsíthetjük, hogy egy adott szeptin7 mennyiség elengedhetetlen a regenerációs folyamat lefolyásához, és ha a rostok csak lassan képesek ezt megtermelni, akkor a folyamat dinamikája eltolódik.

A Pax7 mint fő szatellita aktivációs transzkripciós faktor nélkülözhetetlen a regenerációs fázis elindításában. Érdekes módon a Pax7 esetén a két csoport között nem volt szignifikáns különbség sem a fehérje, sem az mRNS szintben. Ez arra utalhat, hogy a Cre⁻ és a Cre⁺ egerek regenerációs képessége kezdetben hasonló, hiszen a szatellitsejtek által kifejezett és az izomregenerációhoz szükséges Pax7 szinte azonos szinteket ért el. Továbbá az is hozzájárulhat ehhez, hogy a Cre rekombinááz gént a vázizomspecifikus alfa-aktin promotor vezérelte, ami csak differenciált rostokban aktív. Ebből adódóan a szeptin7 expressziója csak a vázizomrostokban csökkent, a szatellita sejteket nem befolyásolta, mivel a Pax7-pozitív szatellitsejtek más típusú aktint expresszálnak. A sérülés minden esetben kiváltotta a Pax7 szintjének emelkedését, jelezve a regenerációs kaszkád kezdetét.

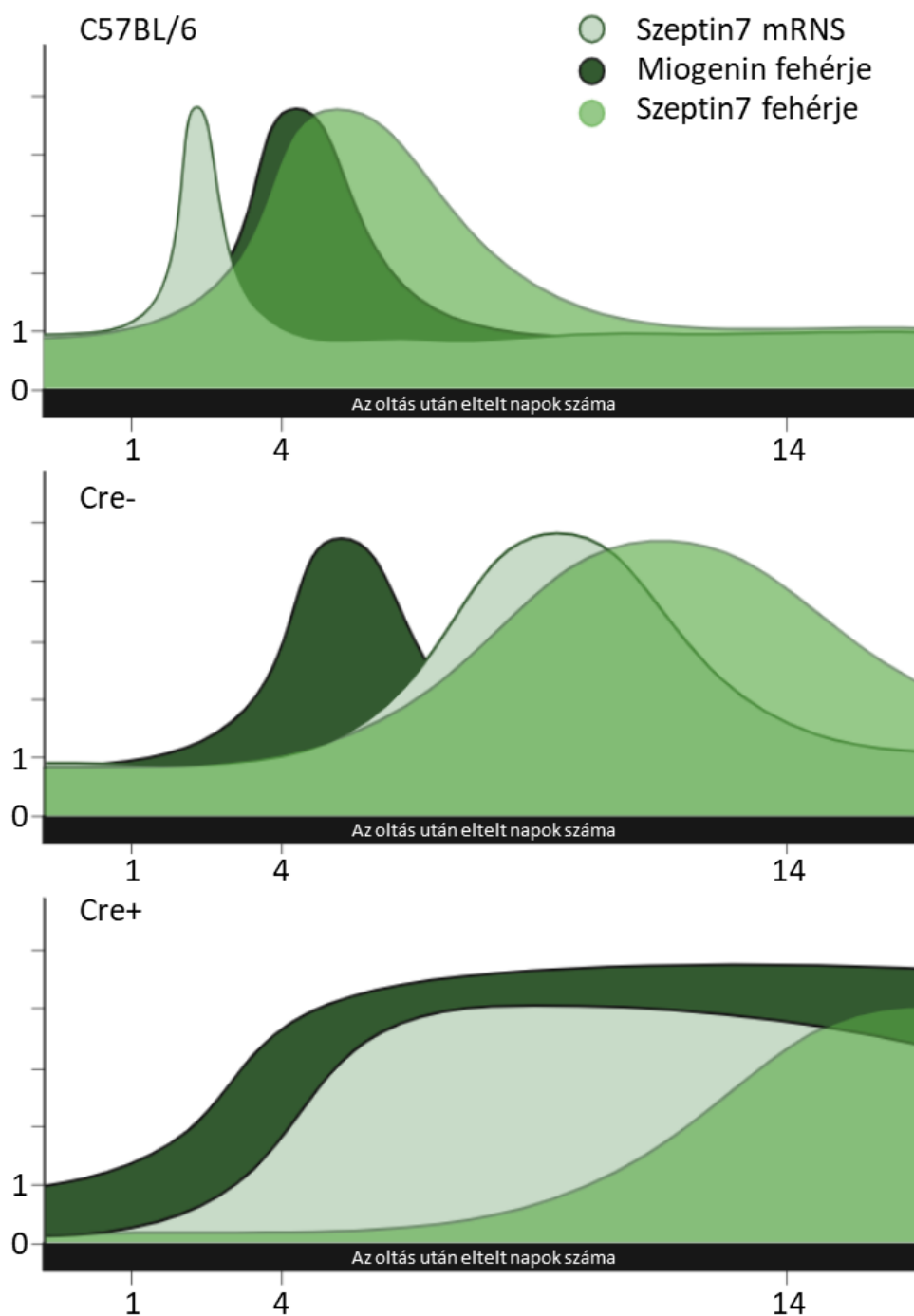
Egy másik transzkripciós faktor, a miogenin szintjét is megvizsgáltuk a Cre⁻ és Cre⁺ állatokban. A miogenin az izom eredetű éretlen sejtek terminális differenciálódásában vesz részt, az ehhez szükséges fehérjék átírását irányítja. A nem oltott mintákban nem láttunk különbséget a Cre⁺ és a Cre⁻ állatok között sem mRNS, sem fehérje szinten. Azonban a BaCl₂ injekció által kiváltott megnövekedett miogenin-fehérjeexpresszió a Cre⁺ állatokban még a 14. napon is fennállt, ami változást okozott a regeneráció dinamikájában és egy elhúzódó izomrostképződésre enged következtetni. Cre⁻ egerekben a korábbi magas mRNS expresszió a 14. napon már nem volt egyértelműen kimutatható. Ez arra utalhat, hogy a szeptin7 a folyamatok későbbi lépéseiben játszhat inkább szerepet. A jelátviteli folyamatok elindulnak, de a folyamat lassulása miatt nem kapcsolnak ki a fiziológias esetben tapasztalt időtartam elteltével.

Ez nem az egyetlen arra utaló jel, hogy a szeptin7 leütése az izomgyógyulás dinamikájában negatív hatást vált ki.

A laminin egy ECM molekula, amely a Cre⁻ egerek esetén jelentősen felszaporodott 4 nappal a sérülés után, míg a szeptin7 részleges leütése a Cre⁺ egyedekben akadályozta a laminin megfelelő időben történő kifejeződését. A Cre⁺ egerek esetén a laminin mRNS növekedése csak a 14 napos mintákban kezdődött el. A fehérje mennyiségének növekedése feltehetően a 14. után következett be, ami jelentős késés a Cre⁻ állatokhoz képest. A laminin expressziójának ez a mértékű eltolódása a szeptin7 hiányában kialakuló módosult citoszkeletonnak köszönhető. A stabil, érett sejtváz nélkül az ECM szintézise nem indokolt, hiszen a szeptin hiányában még ki nem épült vagy nem funkcióképes hemidezmoszómák nem tudnak az ECM elemeihez, például a lamininhez kapcsolódni [25,138].

A regenerációs folyamat dinamikai változásait a 24. ábra szemlélteti. Ez a kombinált hipotetikus összefoglaló ábra egyesíti a szakirodalomban fellelhető korábbi adatokat a

kísérleteinkben megfigyelt eredményeinken alapuló elképzelésünkkel. Kísérleteink alapján úgy gondoljuk, hogy a csökkent szeptin7 expresszió jelentősen meghosszabbítja a regeneráció fázisait. A kísérletes rendszerünkben a Cre-lox rendszer indukátoraként alkalmazott Tamoxifen önmagában kis mértékben lassította a regeneráció folyamatát, ösztrogénanalóg természete és hatása miatt. Kísérleteinkben ezért az összehasonlítás mindig a Cre⁻ és Cre⁺ egyedek között történt. Az egyedek között az indukált gyulladásra adott válaszreakció nagyfokú diverzitást mutatott, ezért a regenerációs szakaszok változó mértékben lassulhattak le.



24. ábra: A **szeptin7 hiányában megnyúlt regeneráció kinetikája**. A szeptin7 adott mennyiségének elérése feltétlen szükséges az egyes regeneratív fázisok lefolyásához és lezárásához. Szeptin7 hiányában akadályozott a szervezet az izomsérülés kijavításában. Az ábra a BioRender.com felhasználásával készült.

Összegezve tapasztalatainkat megállapítható, hogy a szeptin7 mennyiségének növekedése minden állattörzsben megfigyelhető volt, habár változó mértékben. Ez arra utal, hogy a fehérje elengedhetetlen a regenerációhoz. Ugyanakkor arra is következtethetünk, hogy a szeptin7 transzkripciója ugyan lassabb a Cre⁺ állatokban, de hosszabb idő alatt mégis elérte a Cre⁻ állatok expressziós mennyiségét, ezzel is azt a feltevést erősítve, hogy adott mennyiségű szeptin7 nélkülözhetetlen az izomgyógyulás lezajlásához. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy az izomrostok terminális differenciálódása nem megy végbe a szeptin7 hiányában. Ezt tükrözi a hosszan fennálló emelkedett miogenin szint is, ami annak tulajdonítható, hogy az alacsony szeptin7 szint mellett a kívánt differenciáltsági fok nem érhető el. A Cre⁺ állatokban a laminin fehérje késleltetett expressziója szintén összhangban van ezzel a képpel, igazolva a szeptin7 jelentőségét és hatását a regeneráció későbbi lépéseire.

Az expressziós vizsgálatok mellett a regenerációt kísérő morfológiai változásokat is elemeztük. A gyulladásos sejtek száma a sérülés következtében, a kialakuló steril gyulladás miatt mindegyik mintában megnövekedett. Kontroll körülmények között a gyulladás lezajlása után a fehérvérsejtek száma lecsökkent. Itt megjegyeznénk, hogy a kimutatott immunsejtek, főleg a makrofágok nemcsak a sérült szövetek eltávolításában, de a regeneráció indukálásában is fontos szerepet játszanak. A Cre⁺ egyedekben a leukocitabeszűrődés mértéke szignifikánsan magasabb volt még a 14. napon is, ami azt jelzi, hogy a szeptin7 hiánya késleltette a gyógyulást. Az immunsejt infiltráció mellett a rostban központilag elhelyezkedő magok száma is alátámasztotta elképzeléseinket. Az izomregeneráció jellemző indikátora a sejtmagok ilyen lokalizációja, mert ezek a gyógyuláshoz és differenciálódáshoz szükséges nagymennyiségű fehérjeszintézist jelzik. A központi magokat tartalmazó izomrostok száma szintén szignifikánsan magasabb a Cre⁺ egerekben, mint a Cre⁻ egerekben, ami tovább hangsúlyozza a regeneráció kinetikájának elnyúlását és a szeptin7 szerepét az izomgyógyulásban.

8 Összefoglalás

A szeptin7 citoszkeletális fehérjével végzett vizsgálatok során a genetikailag módosított egereken megfigyelt izomerő-csökkenés és gerincdeformitás a fehérje vázizomban betöltött jelentős szerepére utal. Ez a hatás kettős természetű. A szeptin rendszer strukturális feladatának elégtelensége mellett a mitokondriális funkció is sérült. Az egyes mitokondriumok szerkezeti módosulása és az összefüggő mitokondriális hálózatok kialakulása arra utalhatnak, hogy a szeptinrendszer és a mitokondriális osztódás, valamint hasítás folyamata szoros kapcsolatban áll. Ezek a morfológiai változások hozzájárulhattak a rostszerkezet további átrendeződéséhez és a mitokondriális funkció romlásához. A szeptin7 kifejeződése korfüggést mutatott, melyben a fiatal egyedekben a szeptin7 emelkedett expressziója a sejtosztódásban játszott fontos szerepének tulajdonítható. A kor előrehaladtával expressziója csökken, feladata inkább a membránszerveződésben, a differenciálódásban, a sejt-sejt közötti kapcsolatok létrehozásában és a belső struktúra kialakításában nyilvánul meg. Ezen folyamatok mindegyike jelentős szereppel bír a regeneráció folyamatában, ennek köszönhetően a szeptin7 hiánya több ponton is akadályozhatja az izomgyógyulást. A kísérleteink során igazoltuk, hogy a szeptin7 hiányának következtében az izomgyógyulás markerei megváltozott expressziót mutattak, ami arra utalhat, hogy a regeneráció fázisai lelassultak és elhúzódott a gyógyulás.

Megemlítendő, hogy a szeptin7 hatása nem feltétlenül közvetlen az említett folyamatokban. Számos tanulmány rámutatott az aktin váz szerepére is, valamint a mikrotubulusok dinamikájának jelentőségét is kiemelték az izomrostok képződésben. Továbbá azt is igazolták, hogy a citoszkeleton tagjainak kölcsönhatásai jelentősen befolyásolják egymást. Ezen túlmenően nem csak a citoszkeleton tagjai, hanem egyéb jelátviteli fehérjék is képezhetnek komplexet a szeptin7 fehérjével.

A szeptin7 szerepének pontosabb megértése és interakciós partnereinek feltárása elősegítheti az izomregeneráció és az izomerő generálás folyamatának teljesebb feltérképezését. Az így szerzett ismeretek hozzájárulhatnak az izomsorvadásos betegségek, illetve az időskori izomgyengeség elleni terápiák kidolgozásához, valamint a mikrogravitációban bekövetkező izomleépülés megelőzéséhez, így javítva az érintett páciensek életminőségét.

9 Summary

Studies with the cytoskeletal protein septin7 in genetically modified mice have shown a reduction in muscle strength and a spinal deformity, suggesting a significant role for this protein in skeletal muscle. This effect is dual in nature. Due to structural defect loss of function could be observed in the septin system, and mitochondrial function is impaired as well. The structural modification of individual mitochondria and the formation of interconnected mitochondrial networks may suggest that the septin system and the process of mitochondrial fission and division are closely related. These morphological changes may have contributed to further rearrangements of the fibre structure and to the impairment of mitochondrial function. The expression of septin7 showed an age-dependence, with elevated expression of septin7 in young individuals, which could be attributed to its important role in cell division. With age, its expression decreases and its function is more focused in membrane organization, differentiation, cell-cell contacts and internal structure formation. Each of these processes plays a major role in the regeneration process, and as a result, the lack of septin7 can interfere with muscle recovery at several points. In our experiments, we demonstrated that the lack of septin7 resulted in altered expression of markers of muscle healing, which may indicate that the phases of regeneration are slowed down and recovery is delayed.

It should be noted that the effect of septin7 is not necessarily direct in these processes. Several studies have also highlighted the role of the actin scaffold and the importance of microtubule dynamics in muscle fibre formation. Furthermore, it has been shown that the interactions of cytoskeleton members have a significant influence on each other. Moreover, not only cytoskeleton members but also other signalling proteins may form complexes with the septin7 protein.

A more precise understanding of the role of septin7 and the exploration of its interaction partners may help to more fully map the process of muscle regeneration and muscle force generation. This knowledge could contribute to the development of therapies for muscular atrophy and age-related muscle weakness, as well as to the prevention of muscle atrophy in microgravity, thus improving the quality of life of the patients concerned.

10 Új eredmények

1. Kutatásaink során elsőként igazoltuk a szeptin7 fehérje expresszióját vázizommintákban.
2. Kimutattuk, hogy a szeptin7 hiánya esetén a vázizomzat nem képes megfelelő kontrakciós erő kialakítására.
3. Igazoltuk, hogy szeptin7 hiányában módosul a mitokondriális hálózat az izomrostokban.
4. Kimutattuk, hogy a szeptin7 szerepet játszik a regeneráció folyamatában.
5. Igazoltuk, hogy szeptin7 hiányában a regeneráció lelassul, és a gyógyulás elhúzódik.

11 Irodalomjegyzék

1. Janmey, P.A. The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 763–781, doi:10.1152/physrev.1998.78.3.763.
2. Cohen, J.; Beisson, J. The Cytoskeleton. In *Paramecium*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1998; pp. 363–392 ISBN 978-3-642-73086-3.
3. Wen, Q.; Janmey, P.A. Polymer physics of the cytoskeleton. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2011**, *15*, 177–182, doi:10.1016/j.cossms.2011.05.002.
4. Carmignac, V.; Durbeej, M. Cell-matrix interactions in muscle disease. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 200–218, doi:10.1002/path.3020.
5. Fenteany, G.; Glogauer, M. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr. Opin. Hematol.* **2004**, *11*, 15–24, doi:10.1097/00062752-200401000-00004.
6. Shpilman, A.; Boikiy, D.; Polyakova, M.; Kudenko, D.; Burakov, A.; Nadezhdina, E. Deep learning of cell classification using microscope images of intracellular microtubule networks. *Proc. - 16th IEEE Int. Conf. Mach. Learn. Appl. ICMLA 2017* **2017**, *2017-Decem*, 1–6, doi:10.1109/ICMLA.2017.0-186.
7. Bray, D.; Clive, T. Unpolymerized actin in fibroblasts and brain. *J. Mol. Biol.* **1976**, *105*, 527–544.
8. Miller, L.; Phillips, M.; Reisler, E. Polymerization of G-actin by myosin subfragment 1. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1996–2002, doi:10.1016/s0021-9258(19)77976-9.
9. Hatzfeld, M.; Keil, R.; Magin, T.M. Desmosomes and intermediate filaments: Their consequences for tissue mechanics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, 1–20, doi:10.1101/cshperspect.a029157.
10. Yamauchi, W.; Antonio, S. *Tubulin Structure, Functions, and Roles in Disease*; Nova Science Publishers: Ne, 2011; ISBN 1621001415, 9781621001416.
11. Ludueña, R.F.; Banerjee, A. *The Tubulin Superfamily The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology. Cancer Drug Discovery and Development.*; Humana Press, 2008;
12. Howard, J.; Hyman, A.A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **2003**, *422*, 753–758, doi:10.1038/nature01600.
13. Lu, W.; Gelfand, V.I. Moonlighting Motors: Kinesin, Dynein, and Cell Polarity. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 505–514, doi:10.1016/j.tcb.2017.02.005.
14. Fuchs, E.; Cleveland, D.W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health

- and disease. *Science* (80-.). **1998**, 279, 514–519, doi:10.1126/science.279.5350.514.
15. Lane, E.B.; Mclean, W.H.I.; Lane, E.B. Keratins and skin disorders. *J. Pathol.* **2004**, 204, 355–366, doi:10.1002/path.1643.
 16. Kechagia, Z.; Sáez, P.; Gómez-González, M.; Canales, B.; Viswanadha, S.; Zamarbide, M.; Andreu, I.; Koorman, T.; Beedle, A.E.M.; Elosegui-Artola, A.; et al. The laminin–keratin link shields the nucleus from mechanical deformation and signalling. *Nat. Mater.* **2023**, 22, 1409–1420, doi:10.1038/s41563-023-01657-3.
 17. Estey, M.P.; Kim, M.S.; Trimble, W.S. Septins. *Curr. Biol.* **2011**, 21, 384–387, doi:10.1016/j.cub.2011.03.067.
 18. Fung, K.Y.Y.; Dai, L.; Trimble, W.S. Cell and Molecular Biology of Septins. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2014**, 310, 289–339.
 19. Mostowy, S.; Cossart, P. Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, 13, 183–194, doi:10.1038/nrm3284.
 20. Bridges, A.A.; Gladfelter, A.S. Septin form and function at the cell cortex. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 17173–17180, doi:10.1074/jbc.R114.634444.
 21. Kartmann, B.; Roth, D. Novel roles for mammalian septins: From vesicle trafficking to oncogenesis. *J. Cell Sci.* **2001**, 114, 839–844, doi:10.1242/jcs.114.5.839.
 22. Marquardt, J.; Chen, X.; Bi, E. Architecture, remodeling, and functions of the septin cytoskeleton. *Cytoskeleton* **2019**, 76, 7–14, doi:10.1002/cm.21475.
 23. Barve, G.; Sanyal, P.; Manjithaya, R. Septin localization and function during autophagy. *Curr. Genet.* **2018**, 64, 1037–1041, doi:10.1007/s00294-018-0834-8.
 24. Caudron, F.; Barral, Y. Septins and the Lateral Compartmentalization of Eukaryotic Membranes. *Dev. Cell* **2009**, 16, 493–506, doi:10.1016/j.devcel.2009.04.003.
 25. Spiliotis, E.T.; Nakos, K. Cellular functions of actin- and microtubule-associated septins. *Curr. Biol.* **2021**, 31, R651–R666, doi:10.1016/j.cub.2021.03.064.
 26. Nurullin, L.F.; Khuzakhmetova, V.F.; Khaziev, E.F.; Samigullin, D. V.; Tsentsevitsky, A.N.; Skorinkin, A.I.; Bukharaeva, E.A.; Vagin, O. Reorganization of Septins Modulates Synaptic Transmission at Neuromuscular Junctions. *Neuroscience* **2019**, 404, 91–101, doi:10.1016/j.neuroscience.2019.01.060.
 27. Deb, B.K.; Hasan, G. Regulation of store-operated Ca²⁺ entry by septins. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, 4, 1–7, doi:10.3389/fcell.2016.00142.
 28. Hilary Russell, S.E.; Hall, P.A. Septin genomics: A road less travelled. *Biol. Chem.* **2011**, 392, 763–767, doi:10.1515/BC.2011.079.
 29. Zhang, J.; Kong, C.; Xie, H.; McPherson, P.S.; Grinstein, S.; Trimble, W.S.

- Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol.* **1999**, 9, 1458–1467, doi:10.1016/S0960-9822(00)80115-3.
30. Angelis, D.; Karasmanis, E.P.; Bai, X.; Spiliotis, E.T. In silico docking of forchlorfenuron (FCF) to septins suggests that FCF interferes with GTP binding. *PLoS One* **2014**, 9, doi:10.1371/journal.pone.0096390.
 31. Zent, E.; Wittinghofer, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biol. Chem.* **2014**, 395, 169–180, doi:10.1515/hsz-2013-0268.
 32. MacEdo, J.N.A.; Valadares, N.F.; Marques, I.A.; Ferreira, F.M.; Damalio, J.C.P.; Pereira, H.M.; Garratt, R.C.; Araujo, A.P.U. The structure and properties of septin 3: A possible missing link in septin filament formation. *Biochem. J.* **2013**, 450, 95–105, doi:10.1042/BJ20120851.
 33. Versele, M.; Gullbrand, B.; Shulewitz, M.J.; Cid, V.J.; Bahmanyar, S.; Chen, R.E.; Barth, P.; Alber, T.; Thorner, J. Protein–Protein Interactions Governing Septin Heteropentamer Assembly and Septin Filament Organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **2004**, 15, 4568–4583, doi:10.1091/mbc.E04.
 34. Sirajuddin, M.; Farkasovsky, M.; Hauer, F.; Kühlmann, D.; Macara, I.G.; Weyand, M.; Stark, H.; Wittinghofer, A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* **2007**, 449, 311–315, doi:10.1038/nature06052.
 35. Mendonça, D.C.; Guimarães, S.L.; Pereira, H.D.M.; Pinto, A.A.; de Farias, M.A.; de Godoy, A.S.; Araujo, A.P.U.; van Heel, M.; Portugal, R. V.; Garratt, R.C. An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM. *J. Mol. Biol.* **2021**, 433, doi:10.1016/j.jmb.2021.167096.
 36. Zeraik, A.E.; Staykova, M.; Fontes, M.G.; Nemuraite, I.; Quinlan, R.; Araújo, A.P.U.; DeMarco, R. Biophysical dissection of schistosome septins: Insights into oligomerization and membrane binding. *Biochimie* **2016**, 131, 96–105, doi:10.1016/j.biochi.2016.09.014.
 37. Cannon, K.S.; Woods, B.L.; Crutchley, J.M.; Gladfelter, A.S. An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. *J. Cell Biol.* **2019**, 218, 1128–1137, doi:10.1083/jcb.201807211.
 38. Jiao, F.; Cannon, K.S.; Lin, Y.C.; Gladfelter, A.S.; Scheuring, S. The hierarchical assembly of septins revealed by high-speed AFM. *Nat. Commun.* **2020**, 11, 1–13, doi:10.1038/s41467-020-18778-x.
 39. Woods, B.L.; Cannon, K.S.; Vogt, E.J.D.; Crutchley, J.M.; Gladfelter, A.S. Interplay of septin amphipathic helices in sensing membrane-curvature and filament bundling. *Mol.*

Biol. Cell **2021**, 32, 1–9, doi:10.1091/mbc.E20-05-0303.

40. Garcia, W.; Ulian De Araújo, A.P.; De Oliveira Neto, M.; Ballesteros, M.R.M.; Polikarpov, I.; Tanaka, M.; Tanaka, T.; Garratt, R.C. Dissection of a human septin: Definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry* **2006**, 45, 13918–13931.
41. McMurray, M.A.; Thorner, J. Turning it inside out: The organization of human septin heterooligomers. *Cytoskeleton* **2019**, 76, 449–456, doi:10.1002/cm.21571.
42. Torraca, V.; Mostowy, S. Septins and bacterial infection. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, 4, 1–8, doi:10.3389/fcell.2016.00127.
43. Woods, B.L.; Gladfelter, A.S. The state of the septin cytoskeleton from assembly to function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2021**, 68, 105–112, doi:10.1016/j.ceb.2020.10.007.
44. Karen Y.Y. Fung; Lu Dai; William S. Trimble *Cell and Molecular Biology of Septins*; Jeon, K.W., Ed.; Academic Press, 2014; ISBN 9781425803780.
45. Wang, X.; Fei, F.; Qu, J.; Li, C.; Li, Y.; Zhang, S. The role of septin 7 in physiology and pathological disease: A systematic review of current status. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, 22, 3298–3307, doi:10.1111/jcmm.13623.
46. Deb, B.K.; Chakraborty, P.; Gopurappilly, R.; Hasan, G. SEPT7 regulates Ca²⁺ entry through Orai channels in human neural progenitor cells and neurons. *Cell Calcium* **2020**, 90, 102252, doi:10.1016/j.ceca.2020.102252.
47. Deb, B.K.; Pathak, T.; Hasan, G. Store-independent modulation of Ca²⁺ entry through Orai by Septin 7. *Nat. Commun.* **2016**, 7, doi:10.1038/ncomms11751.
48. Ivanov, A.I.; Le, H.T.; Naydenov, N.G.; Rieder, F. Novel Functions of the Septin Cytoskeleton: Shaping Up Tissue Inflammation and Fibrosis. *Am. J. Pathol.* **2021**, 191, 40–51, doi:10.1016/j.ajpath.2020.09.007.
49. Tada, T.; Simonetta, A.; Batterton, M.; Kinoshita, M.; Edbauer, D.; Sheng, M. Role of Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons. *Curr. Biol.* **2007**, 17, 1752–1758, doi:10.1016/j.cub.2007.09.039.
50. Elkhadragy, L.; Alsarani, H.; Long, W. The C-terminus tail regulates ERK3 kinase activity and its ability in promoting cancer cell migration and invasion. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1–14, doi:10.3390/ijms21114044.
51. Igci, Y.Z.; Arslan, A.; Akarsu, E.; Erkilic, S.; Igci, M.; Oztuzcu, S.; Cengiz, B.; Gogebakan, B.; Cakmak, E.A.; Demiryurek, A.T. Differential expression of a set of genes in follicular and classic variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocr. Pathol.* **2011**, 22, 86–96, doi:10.1007/s12022-011-9157-8.

52. Zhou, J.; Lu, S.; Yang, S.; Chen, H.; Shi, H.; Miao, M.; Jiao, B. MicroRNA-127 post-transcriptionally downregulates Sept7 and suppresses cell growth in hepatocellular carcinoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 1537–1546, doi:10.1159/000358717.
53. Calin, G.A.; Croce, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 857–866, doi:10.1038/nrc1997.
54. Menon, M.B.; Sawada, A.; Chaturvedi, A.; Mishra, P.; Schuster-Gossler, K.; Galla, M.; Schambach, A.; Gossler, A.; Förster, R.; Heuser, M.; et al. Genetic deletion of SEPT7 reveals a cell type-specific role of septins in microtubule destabilization for the completion of cytokinesis. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, 1–12, doi:10.1371/journal.pgen.1004558.
55. Jones, D.; Round, J.; de Haan, A. Skeletal Muscle from Molecules to Movement: A Textbook of Muscle Physiology for Sport, Exercise, Physiotherapy and Medicine. *Skelet. Muscle from Mol. to Mov. A Textb. Muscle Physiol. Sport. Exerc. Physiother. Med.* 2004, 1–202.
56. Gregorio, C.C.; Antin, P.B. To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 355–362, doi:10.1016/S0962-8924(00)01793-1.
57. Peachey, L.D.; Franzini-Armstrong, C. *Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells*; Peachey, L., Adrian, R.H., Geiger, S.R., Eds.; American Physiological Society: Baltimore, 1983;
58. Tajsharghi, H.; Oldfors, A. Myosinopathies: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* **2013**, *125*, 3–18, doi:10.1007/s00401-012-1024-2.
59. Lieber, R.L. *Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity: The Physiological Basis of Rehabilitation, 2nd Edition*; Lippincott Williams & Wilkins, 2003;
60. Ojima, K. Myosin: Formation and maintenance of thick filaments. *Anim. Sci. J.* **2019**, *90*, 801–807, doi:10.1111/asj.13226.
61. MacIntosh, B.R.; Gardiner, P.F.; McComas, A.J. *Skeletal Muscle: Form and Function*; Human Kinetics, 2006; ISBN 0736045171.
62. Estes, E.; Higgins, P.J. *Actin: Biophysics, Biochemistry, and Cell Biology*; Estes, E., Higgins, P.J., Eds.; 1st ed.; Springer New York, NY: New York, 1994;
63. Du Fay De Lavallaz, J.; Prepoudis, A.; Wendebourg, M.J.; Kesenheimer, E.; Kyburz, D.; Daikeler, T.; Haaf, P.; Wanschitz, J.; Löscher, W.N.; Schreiner, B.; et al. Skeletal Muscle Disorders: A Noncardiac Source of Cardiac Troponin T. *Circulation* **2022**, *145*, 1764–1779, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058489.

64. Franzini-Armstrong, C.; Protasi, F.; Ramesh, V. Comparative Ultrastructure of Ca²⁺ Release Units in Skeletal and Cardiac muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *16*, 20–30.
65. Franzini-Armstrong, C. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J.* **1999**, *13*, doi:10.1096/fasebj.13.9002.s266.
66. Al-Qusairi, L.; Laporte, J. T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet. Muscle* **2011**, *1*, 1–11, doi:10.1186/2044-5040-1-26.
67. Kim, M.; Franke, V.; Brandt, B.; Lowenstein, E.D.; Schöwel, V.; Spuler, S.; Akalin, A.; Birchmeier, C. Single-nucleus transcriptomics reveals functional compartmentalization in syncytial skeletal muscle cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–14, doi:10.1038/s41467-020-20064-9.
68. Bárány, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* **1967**, *50*, doi:10.1085/jgp.50.6.197.
69. Barnard, R.J.; Edgerton, V.R.; Furukawa, T.; Peter, J.B. Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* **1971**, *220*, 410–414, doi:10.1152/ajplegacy.1971.220.2.410.
70. Yablonka-Reuveni, Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: Still Young and Fascinating at 50. *J. Histochem. Cytochem.* **2011**, *59*, 1041–1059, doi:10.1369/0022155411426780.
71. Yin, H.; Price, F.; Rudnicki, M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 23–67, doi:10.1152/physrev.00043.2011.
72. Wang, Y.X.; Rudnicki, M.A. Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 127–133, doi:10.1038/nrm3265.
73. Zammit, P.S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *72*, 19–32, doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.011.
74. Mendelson, J.K.; Smoller, B.R.; Mendelson, B.; Horn, T.D. The microanatomy of the distal arrector pili: Possible role for $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins in mediating cell cell adhesion and anchorage to the extracellular matrix. *J. Cutan. Pathol.* **2000**, *27*, 61–66, doi:10.1034/j.1600-0560.2000.027002061.x.
75. Dalton, S.L.; Marcantonio, E.E.; Assoian, R.K. Cell attachment controls fibronectin and $\alpha 5\beta 1$ integrin levels in fibroblasts: Implications for anchorage-dependent and -independent growth. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8186–8191, doi:10.1016/s0021-9258(18)42425-8.
76. David YAFFE, M.; FELDMAN The Formation from of Hybrid of Multinucleated

- Different Muscle Origin ' Fibers Myoblasts. *Dev. Biol.* **1965**, *11*, 300–317.
77. Yang, W.; Hu, P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J. Orthop. Transl.* **2018**, *13*, 25–32, doi:10.1016/j.jot.2018.01.002.
 78. Tedesco, F.S.; Dellavalle, A.; Diaz-manera, J.; Messina, G.; Cossu, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential ... [J Clin Invest. 2010] - PubMed result. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 11–19, doi:10.1172/JCI40373.and.
 79. Alarcin, E.; Bal-öztürk, A.; Avci, H.; Ghorbanpoor, H.; Guzel, F.D.; Akpek, A.; Yesiltas, G.; Canak-ipek, T.; Avci-adali, M. Current strategies for the regeneration of skeletal muscle tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–28, doi:10.3390/ijms22115929.
 80. Borneman, A.; Kuschel, R.; Fujisawa-Sehara, A. Analysis for transcript expression of meltrin alpha in normal, regenerating, and denervated rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **2000**, *21*, 475–480, doi:10.1023/a:1005657607591.
 81. Seale, P.; Sabourin, L.A.; Girgis-Gabardo, A.; Mansouri, A.; Gruss, P.; Rudnicki, M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **2000**, *102*, 777–786, doi:10.1016/S0092-8674(00)00066-0.
 82. Von Maltzahn, J.; Jones, A.E.; Parks, R.J.; Rudnicki, M.A. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 16474–16479, doi:10.1073/pnas.1307680110.
 83. Addicks, G.C.; Brun, C.E.; Sincennes, M.C.; Saber, J.; Porter, C.J.; Francis Stewart, A.; Ernst, P.; Rudnicki, M.A. MLL1 is required for PAX7 expression and satellite cell self-renewal in mice. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41467-019-12086-9.
 84. Buckingham, M.; Relaix, F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *44*, 115–125, doi:10.1016/j.semcdb.2015.09.017.
 85. Laumonier, T.; Menetrey, J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J. Exp. Orthop.* **2016**, *3*, doi:10.1186/s40634-016-0051-7.
 86. Fernandes, T.L.; Pedrinelli, A.; Hernandez, A.J. Muscle Injury – Physiopathology, Diagnosis, Treatment and Clinical Presentation. *Rev. Bras. Ortop. (English Ed.* **2011**, *46*, 247–255, doi:10.1016/s2255-4971(15)30190-7.
 87. Gardner, T.; Kenter, K.; Li, Y. Fibrosis following Acute Skeletal Muscle Injury: Mitigation and Reversal Potential in the Clinic. *J. Sports Med.* **2020**, *2020*, 1–7, doi:10.1155/2020/7059057.
 88. Pichavant, C.; Pavlath, G.K. Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging. *Skelet. Muscle* **2014**, *4*, 1–11, doi:10.1186/2044-5040-4-9.
 89. Hardy, D.; Besnard, A.; Latil, M.; Jouvion, G.; Briand, D.; Thépenier, C.; Pascal, Q.;

- Guguin, A.; Gayraud-Morel, B.; Cavaillon, J.M.; et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–24, doi:10.1371/journal.pone.0147198.
90. Gengyun, L.; Lowe, D.A.; Kyba, M. Freeze Injury of the Tibialis Anterior Muscle Gengyun. *Methods Mol Biol.* **2016**, *1460*, 33–41, doi:10.1007/978-1-4939-3810-0.
 91. Carosio, S.; Berardinelli, M.G.; Aucello, M.; Musarò, A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res. Rev.* **2011**, *10*, 35–42, doi:10.1016/j.arr.2009.08.001.
 92. Dulak, J. Many roles for Pax7. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 21–22, doi:10.1080/15384101.2016.1248729.
 93. Forcina, L.; Cosentino, M.; Musarò, A. Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9051297.
 94. Juban, G.; Chazaud, B. Efferocytosis during skeletal muscle regeneration. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10123267.
 95. Ji, Y.; Li, M.; Chang, M.; Liu, R.; Qiu, J.; Wang, K.; Deng, C.; Shen, Y.; Zhu, J.; Wang, W.; et al. Inflammation: Roles in Skeletal Muscle Atrophy. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1–24, doi:10.3390/antiox11091686.
 96. Yang, Y.; Jiang, G.; Zhang, P.; Fan, J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.* **2015**, *2*, 1–12, doi:10.1186/s40779-015-0039-0.
 97. Roh, J.S.; Sohn, D.H. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Netw.* **2018**, *18*, 1–14, doi:10.4110/in.2018.18.e27.
 98. Snijders, T.; Nederveen, J.P.; McKay, B.R.; Joannis, S.; Verdijk, L.B.; van Loon, L.J.C.; Parise, G. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 1–21, doi:10.3389/fphys.2015.00283.
 99. Ahrens, H.E.; Henze, H.; Schüler, S.C.; Schmidt, M.; Hüttner, S.S.; von Maltzahn, J. Analyzing satellite cell function during skeletal muscle regeneration by cardiotoxin injury and injection of self-delivering siRNA in vivo. *J. Vis. Exp.* **2019**, *2019*, 1–10, doi:10.3791/60194.
 100. Mukund, K.; Subramaniam, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2020**, *12*, 1–46, doi:10.1002/wsbm.1462.
 101. Hicks, M.R.; Pyle, A.D. The emergence of the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* **2022**, *xx*, 1–12, doi:10.1016/j.tcb.2022.07.003.
 102. Cadot, B.; Gache, V.; Gomes, E.R. Moving and positioning the nucleus in skeletal

- muscle-one step at a time. *Nucleus* **2015**, 6, 373–381, doi:10.1080/19491034.2015.1090073.
103. Hastings, R.L.; Massopust, R.T.; Haddix, S.G.; Lee, Y. il; Thompson, W.J. Exclusive vital labeling of myonuclei for studying myonuclear arrangement in mouse skeletal muscle tissue. *Skelet. Muscle* **2020**, 10, 1–13, doi:10.1186/s13395-020-00233-6.
 104. Folker, E.S.; Baylies, M.K. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Front. Physiol.* **2013**, 4 DEC, 1–10, doi:10.3389/fphys.2013.00363.
 105. Rayagiri, S.S.; Ranaldi, D.; Raven, A.; Mohamad Azhar, N.I.F.; Lefebvre, O.; Zammit, P.S.; Borycki, A.G. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1–12, doi:10.1038/s41467-018-03425-3.
 106. Dunn, A.; Marcinczyk, M.; Talovic, M.; Patel, K.; Haas, G.; Garg, K. Role of Stem Cells and Extracellular Matrix in the Regeneration of Skeletal Muscle. *Muscle Cell Tissue - Curr. Status Res. F.* **2018**, doi:10.5772/intechopen.75828.
 107. Gillies, A.R.; Lieber, R.L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle and Nerve* **2011**, 44, 318–331, doi:10.1002/mus.22094.
 108. Kjær, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol. Rev.* **2004**, 84, 649–698, doi:10.1152/physrev.00031.2003.
 109. Garg, K.; Boppart, M.D. Influence of exercise and aging on extracellular matrix composition in the skeletal muscle stem cell niche. *J. Appl. Physiol.* **2016**, 121, 1053–1058, doi:10.1152/japplphysiol.00594.2016.
 110. Sanes, J.R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 12601–12604, doi:10.1074/jbc.R200027200.
 111. Koitabashi, N.; Djahida Bedja; Zaiman, A.L.; Pinto, Y.M.; Zhang, M.; Gabrielson, K.L.; Takimoto, E.; Kass, D.A. Avoidance of Transient Cardiomyopathy in Cardiomyocyte- Targeted Tamoxifen-Induced MerCreMer Gene Deletion Models. *Circ. Res.* **2009**, 105, 12–15, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.198416.Avoidance.
 112. Andersson, K.B.; Winer, L.H.; Mørk, H.K.; Molkentin, J.D.; Jaisser, F. Tamoxifen administration routes and dosage for inducible Cre-mediated gene disruption in mouse hearts. *Transgenic Res.* **2010**, 19, 715–725, doi:10.1007/s11248-009-9342-4.
 113. McCarthy, J.J.; Sriksuea, R.; Kirby, T.J.; Peterson, C.A.; Esser, K.A. Inducible Cre transgenic mouse strain for skeletal muscle-specific gene targeting. *Skelet. Muscle* **2012**, 2, 1, doi:10.1186/2044-5040-2-8.

114. Kim, H.; Kim, M.; Im, S.K.; Fang, S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab. Anim. Res.* **2018**, *34*, 147–159, doi:10.5625/lar.2018.34.4.147.
115. Gao, C.; Chen, B.P.; Sullivan, M.B.; Hui, J.; Ouellet, J.A.; Henderson, J.E.; Saran, N. Micro CT analysis of spine architecture in a mouse model of scoliosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2015**, *6*, 1–9, doi:10.3389/fendo.2015.00038.
116. Kertész, I.; Vida, A.; Nagy, G.; Emri, M.; Farkas, A.; Kis, A.; Angyal, J.; Dénes, N.; Szabó, J.P.; Kovács, T.; et al. In Vivo Imaging of Experimental Melanoma Tumors using the Novel Radiotracer 68Ga-NODAGA-Procaïnamide (PCA). *J. Cancer* **2017**, *8*, 774–785, doi:10.7150/jca.17550.
117. Walker, M.; Mason, G. A comparison of two types of running wheel in terms of mouse preference, health, and welfare. *Physiol. Behav.* **2018**, *191*, 82–90, doi:10.1016/j.physbeh.2018.04.006.
118. Singlár, Z.; Szentesi, P.; Fodor, J.; Angyal, Á.; Csernoch, L.; Sztretye, M. Assessing the potential of nutraceuticals as geroprotectors on muscle performance and cognition in aging mice. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–21, doi:10.3390/antiox10091415.
119. Augusto, V.; Padovani, C.R.; Eduardo, G.; Campos, R. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz. J. morphol. Sci.* **2004**, *21*, 89–94.
120. Szentesi, P.; Jacquemond, V.; Kovács, L.; Csernoch, L. Intramembrane charge movement and sarcoplasmic calcium release in enzymatically isolated mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **1997**, *505*, 371–384, doi:10.1111/j.1469-7793.1997.371bb.x.
121. Fodor, J.; Gönczi, M.; Sztretye, M.; Dienes, B.; Oláh, T.; Szabó, L.; Csoma, E.; Szentesi, P.; Szigeti, G.P.; Marty, I.; et al. Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca²⁺ release events and global Ca²⁺ signals in skeletal muscle cells in culture. *J. Physiol.* **2008**, *586*, 5803–5818, doi:10.1113/jphysiol.2008.160457.
122. Gönczi, M.; Ráduly, Z.; Szabó, L.; Fodor, J.; Telek, A.; Dobrosi, N.; Balogh, N.; Szentesi, P.; Kis, G.; Antal, M.; et al. Septin7 is indispensable for proper skeletal muscle architecture and function. *Elife* **2022**, *11*, 1–31, doi:10.7554/eLife.75863.
123. Bai, P.; Canto, C.; Oudart, H.; Brunyánszki, A.; Cen, Y.; Yamamoto, H.; Huber, A.; Kiss, B.; Houtkooper, R.H.; Schoonjans, K.; et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 461–468, doi:10.1016/j.cmet.2011.03.004.PARP-1.

124. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* **2006**, *127*, 1109–1122, doi:10.1016/j.cell.2006.11.013.
125. Joberty, G.; Perlungher, R.R.; Sheffield, P.J.; Kinoshita, M.; Noda, M.; Haystead, T.; Macara, I.G. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 861–866, doi:10.1038/ncb1001-861.
126. DeRose, B.T.; Kelley, R.S.; Ravi, R.; Kokona, B.; Beld, J.; Spiliotis, E.T.; Padrick, S.B. Production and analysis of a mammalian septin hetero-octamer complex. *Cytoskeleton* **2020**, *77*, 485–499, doi:10.1002/cm.21643.
127. Soroor, F.; Kim, M.S.; Palander, O.; Balachandran, Y.; Collins, R.F.; Benlekbir, S.; Rubinstein, J.L.; Trimble, W.S. Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties. *Mol. Biol. Cell* **2021**, *32*, 289–300, doi:10.1091/MBE.E20-06-0398.
128. Füchtbauer, A.; Lassen, L.B.; Jensen, A.B.; Howard, J.; De Salas Quiroga, A.; Warming, S.; Sørensen, A.B.; Pedersen, F.S.; Füchtbauer, E.M. Septin9 is involved in septin filament formation and cellular stability. *Biol. Chem.* **2011**, *392*, 769–777, doi:10.1515/BC.2011.088.
129. Röseler, S.; Sandrock, K.; Bartsch, I.; Busse, A.; Omran, H.; Loges, N.T.; Zieger, B. Lethal phenotype of mice carrying a Sept11 null mutation. *Biol. Chem.* **2011**, *392*, 779–781, doi:10.1515/BC.2011.093.
130. Lam, M.; Calvo, F. Regulation of mechanotransduction: Emerging roles for septins. *Cytoskeleton* **2019**, *76*, 115–122, doi:10.1002/cm.21485.
131. Malik, A.N.; Czajka, A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* **2013**, *13*, 481–492, doi:10.1016/j.mito.2012.10.011.
132. Pagliuso, A.; Cossart, P.; Stavru, F. The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 355–374, doi:10.1007/s00018-017-2603-0.
133. Pagliuso, A.; Tham, T.N.; Stevens, J.K.; Lagache, T.; Persson, R.; Salles, A.; Olivo-Marin, J.; Oddos, S.; Spang, A.; Cossart, P.; et al. A role for septin 2 in Drp1-mediated mitochondrial fission. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 858–873, doi:10.15252/embr.201541612.
134. Prins, K.W.; Lowe, D.A.; Ervasti, J.M. Skeletal muscle-specific ablation of γ cyto-actin does not exacerbate the mdx phenotype. *PLoS One* **2008**, *3*, 1–9,

doi:10.1371/journal.pone.0002419.

135. Sambasivan, R.; Yao, R.; Kissenpfennig, A.; Wittenberghe, L. Van; Paldi, A.; Gayraud-morel, B.; Guenou, H.; Malissen, B.; Tajbakhsh, S.; Galy, A.; et al. Erratum to Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* **2011**, *138*, 4333, doi:10.1242/dev.073601.
136. Lepper, C.; Partridge, T.A.; Fan, C.M. An absolute requirement for pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* **2011**, *138*, 3639–3646, doi:10.1242/dev.067595.
137. Mazzotti, A.L.; Coletti, D. The need for a consensus on the locution “central nuclei” in striated muscle myopathies. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 1–4, doi:10.3389/fphys.2016.00577.
138. Benoit, B.; Poüs, C.; Baillet, A. Septins as membrane influencers: direct play or in association with other cytoskeleton partners. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*, 1–10, doi:10.3389/fcell.2023.1112319.

12 Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/62/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó László
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10071480

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, L.**, Telek, A., Fodor, J., Dobrosi, N., Dócs, K., Hegyi, Z., Gönczi, M., Csernoch, L., Dienes, B.: Reduced Expression of Septin7 Hinders Skeletal Muscle Regeneration.
Int. J. Mol. Sci. 24 (17), 13536, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241713536>
IF: 5.6 (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. 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)
4. Dienes, B., Bazsó, T., **Szabó, L.**, Csernoch, L.: The Role of the Piezo1 Mechanosensitive Channel in the Musculoskeletal System.
Int. J. Mol. Sci. 24 (7), 6513, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076513>
IF: 5.6 (2022)





5. Gönczi, M., Csemer, A., **Szabó, L.**, Sztretye, M., Fodor, J., Pocsai, K., Szenthe, K., Keller-Pintér, A., Köhler, Z. M., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Pál, B., Csernoch, L.: Astaxanthin Exerts Anabolic Effects via Pleiotropic Modulation of the Excitable Tissue.
Int. J. Mol. Sci. 23 (2), 917, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23020917>
IF: 5.6
6. Singlár, Z., Ganbat, N., Szentesi, P., Osgonsandag, N., **Szabó, L.**, Telek, A., Fodor, J., Dienes, B., Gönczi, M., Csernoch, L., Sztretye, M.: Genetic Manipulation of CB1 Cannabinoid Receptors Reveals a Role in Maintaining Proper Skeletal Muscle Morphology and Function in Mice.
Int. J. Mol. Sci. 23 (24), 1-21, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232415653>
IF: 5.6
7. **Szabó, L.**, Balogh, N., Tóth, A., Angyal, Á., Gönczi, M., Csiki, D. M., Tóth, C., Balatoni, I., Jeney, V., Csernoch, L., Dienes, B.: The mechanosensitive Piezo1 channels contribute to the arterial medial calcification.
Front. Physiol. 13, 1037230, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.1037230>
IF: 4
8. Dienes, C., Hézső, T., Kiss, D. Z., Baranyai, D., Kovács, Z. M., **Szabó, L.**, Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Gönczi, M., Szentandrassy, N.: Electrophysiological Effects of the Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Inhibitor (4-Chloro-2-(2-chlorophenoxy)acetamido) Benzoic Acid (CBA) in Canine Left Ventricular Cardiomyocytes.
Int. J. Mol. Sci. 22 (17), 9499, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179499>
IF: 6.208
9. Sztretye, M., **Szabó, L.**, Dobrosi, N., Fodor, J., Szentesi, P., Almássy, J., Magyar, Z. É., Dienes, B., Csernoch, L.: From Mice to Humans: an Overview of the Potentials and Limitations of Current Transgenic Mouse Models of Major Muscular Dystrophies and Congenital Myopathies.
Int. J. Mol. Sci. 21 (23), 8935, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21238935>
IF: 5.924
10. Sztretye, M., Singlár, Z., **Szabó, L.**, Angyal, Á., Balogh, N., Vakilzadeh, F., Szentesi, P., Dienes, B., Csernoch, L.: Improved Tetanic Force and Mitochondrial Calcium Homeostasis by Astaxanthin Treatment in Mouse Skeletal Muscle.
Antioxidants. 9 (2), 98, 2020.
IF: 6.312





11. 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 64,184

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,3**

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

Debrecen, 2024.02.26.



13 Tárgyszavak-Key Words

Magyarul:

Vázizom, Szeptin, Szeptin7, regeneráció, citoskeleton, intracelluláris kalcium

Angolul:

Skeletal muscle, Septin, regeneration, Septin7, cytoskeleton, intracellular calcium

14 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Dienes Beatrixnek, aki PhD képzésem alatt megalapozta és formálta tudományos látásmódomat és gondolkodásomat. Segített munkám elvégzésében és mindenki számára követendő példát mutatott, mind szakmai mind emberi szempontból.

Továbbá hálával tartozom Dr. Csernoch László Professzor Úrnak, aki megteremtette a lehetőséget, hogy az Élettani Intézetben kutathassak. Valamint mindig segített abban, hogy a felmerülő tudományos kérdéseket kritikusan vizsgáljam.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet Intracelluláris Kalciumhomeosztázis Munkacsoport valamennyi tagjának, akik a képzésem alatt állandó gyakorlati tanácsaikkal, segítségükkel hozzájárultak a gyakorlati és elméleti tudásom folyamatos fejlesztéséhez. Köszönöm a jelenlegi és volt PhD hallgatónak, hogy baráti környezetet teremtettek és ezzel nagyban segítették a munkámat.

Szeretném megköszönni Édesanyámnak, Édesapámnak és Testvéremnek, hogy nem csak a PhD tanulmányaim alatt, de az ide vezető hosszú úton is mindig segítséget nyújtották a felmerülő akadályok megoldásában. Köszönöm, hogy számíthatok rátok.

A kutatás elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00044, „A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában” című projekt támogatta.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg és TKP2020-NKA-04 - Járműipar, Insulinrezisztencia, Úrkutatás (DE-SPACE) támogatta.

A kutatást az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 című projekt támogatta, amely az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFI OTKA K 137600 támogatta. A TKP2021-EGA-18 (a TKP2021-EGA támogatási program keretében) pályázat hozzájárult a kísérletek elvégzéséhez. Az Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat (ELKH, DE Sejtélettani Munkacsoport).

PhD képzésem során az „Új Nemzeti Kiválóság Program” című, ÚNKP-23-4-I-DE-333 számú, MECENATÚRA (MEC_21) című, MEC_R_21 számú és a „Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj” című, NTP-NFTÖ-21-B-0225 számú pályázat támogatta a kutatásomat.

15 Függelék

A disszertációmhoz felhasznált eLife cikk „Septin7 is indispensable for proper skeletal muscle architecture and function” elkészítése során a hozzájárultam a cikkben szereplő vázizmokon elvégzett kísérletek tervezéséhez, módszertanának beállításához, ezek végrehajtásához, valamint az adatelemzéshez és az eredmények kiértékeléséhez, továbbá részt vettem a kézirat megírásában, a témámat érintő részek kidolgozásában.

A disszertációmhoz felhasznált IJMS cikk „Reduced Expression of Septin7 Hinders Skeletal Muscle Regeneration” esetében a kísérletek tervezése, módszertana, azok végrehajtása, valamint az adatelemzés és kiértékelés volt a hozzájárulásom. Továbbá, részt vettem az ábrák tervezésében és szerkesztésében, az eredeti kézirat megírásában és későbbi áttekintésében.