

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A citoszkeletális Szeptin7 fehérje szerepének vizsgálata C2C12 sejt kultúrákon

Dr. Ráduly Zsolt

Témavezető: Dr. Szentandrásyné Gönczi Mónika



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	4
2	Bevezetés	7
3	Irodalmi áttekintés	8
3.1	A vázizom	8
3.1.1	A vázizom általános bemutatása	8
3.1.2	A vázizom felépítése	8
3.1.3	Miogenezis	10
3.1.4	A vázizomsérülésekről és regenerációs folyamatokról általában	15
3.1.5	A vázizom citoskeletális rendszerének felépítése és szerepe a migrációban .	17
3.2	A szeptinek	20
3.2.1	A szeptinekről általában	20
3.2.2	A szeptinek szerkezete és strukturális szerveződésük.....	21
3.2.3	A Szeptin7 fehérje jellemzése	25
3.2.4	A Szeptin7 fehérje szerepe fiziológiás és patológias folyamatokban	26
3.2.5	A Szeptin7 szerepe a sejtmigrációs folyamatokban	27
3.2.6	A szeptin rendszer szerveződésének módosítási lehetőségei	29
4	Problémafelvetés és célkitűzés.....	31
5	Anyagok és Módszerek	32
5.1	C2C12 sejtek tenyésztése és differenciáltatása	32
5.2	Proliferációs vizsgálatok	32
5.3	A fúziós index meghatározása.....	33
5.4	RNS izolálás és RT-PCR elemzés.....	33
5.5	Génkiütés a CRISPR-Cas9 módszerrel	35
5.6	Géncsendesítés	36
5.7	A fúziós fehérje előállítása és sejtekbe történő transzfektálása	37
5.8	A fúziós fehérje kifejeződésének nyomonkövetése élő sejtekben	37
5.9	Immuncitokémia.....	38
5.10	Mitokondriumok kimutatása C2C12 sejtekben.....	39
5.11	Kolokalizációs vizsgálat.....	39
5.12	A Szeptin7 filamentum vastagságának meghatározása.....	39
5.13	Fehérjekimutatás	40

5.14	A sejtmigráció vizsgálata	40
5.15	Intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mérése	41
5.16	Statisztikai analízis és adatelemzés	42
6	Eredmények	43
6.1	Különböző szeptinek kifejeződése C2C12 mioblasztokon és differenciált miotubulusokon	43
6.2	A Szeptin7 elengedhetetlen a C2C12 sejtek osztódásához	45
6.3	A Szeptin7 fehérje expresszió csökkentésének hatása C2C12 sejteken	46
6.4	A Szeptin7 csendesítése hatással van a C2C12 sejtek morfológiájára.....	48
6.5	A Szeptin7 fehérje létfontosságú a C2C12 sejtek differenciálódásához.....	52
6.6	A Szeptin7 hatása a C2C12 sejtek mitokondriális hálózatra.....	54
6.7	A Szeptin7 eltérő elrendeződést mutat migráló és nem migráló sejtekben.....	55
6.8	A Szeptin7 szerepet játszik a migráció alatti intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásokban..	59
6.9	A Szeptin7 szintje hatással van a migrációra	61
6.10	Az FCF stabilizálja a Szeptin7 filamentumokat C2C12 mioblasztokban	64
6.11	Az FCF kezelés megváltoztatta a C2C12 mioblasztok migrációját, viszont a C2C12 S7-KD tenyészetek ellenállóbbak voltak a kezeléssel szemben	66
7	Megbeszélés	69
7.1	A szeptin filamentumok a vázizom citoskeletális rendszerének szerves részei	69
7.2	A szeptinek szerepe a mioblasztok sejtelettani folyamatainak szabályozásában.....	69
7.3	A Szeptin7 filamentumok átrendeződése a migráló mioblasztokban kiemelt jelentőségű.....	71
7.4	A Szeptin7 fehérje expressziójának megváltozása jelentős hatással van a mioblasztok migrációjára	72
7.5	A szeptin rendszer dinamikus átrendeződésének farmakológiai gátlása jelentősen befolyásolja a mioblasztok migrációját.....	74
8	Összefoglalás	76
9	Summary	77
10	Új eredmények	78
11	Irodalomjegyzék	79
12	Saját közlemények jegyzéke	92
13	Tárgyszavak-Key Words	94
14	Köszönetnyilvánítás	95
15	Függelék	96

1 Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	
ADP	Adenozin-difoszfát
Arp2/3	Actin Related Protein 2/3 complex (Aktin kapcsolt fehérje 2/3 komplex)
ATCC	American Type Culture Collection - (Amerikai típusú Sejtkultúra Kollekción)
ATP	Adenozin-trifoszfát
BAI 1/3	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1/3 (Agy-specifikus angiogenezis inhibitor)
bHLH	basic-Helix-loop-Helix
Borg5	Binder of Rho GTPases 5 (5-ös Rho GTPáz kötő fehérje)
CAM	Cell Adhesion Molecule (Sejtdhéziós molekula)
Cas9	CRISPR-associated protein 9 (CRISPR-asszociált fehérje 9)
CC	Coiled Coil
cDNS	komplementer DNS
CK	Kreatin-kináz
CKIP-1	Casein kinase 2-interacting protein-1 (Kazein kináz-2 kölcsönható fehérje-1)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések)
Ctrl	Kontroll C2C12 sejtvonal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
Diff	Differenciált minta
d1, d3, d5	A differenciálódási kísérlet adott napja (1,3,5)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DOCK1	Dedicator of cytokinesis protein 1
Dock180	Dedicator of cytokinesis protein 1 (Dock1)
Drp1	Dynamin-related protein 1 (Dynamin kapcsolt fehérje 1)
EC	Endothélsejt
ECFP	Enhanced cyan fluorescent protein (Fokozott cián fluoreszcens fehérje)
ECM	Extracelluláris Mátix
EGTA	etilén-glikol-bis(β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav)
ELMO	Engulfment and Cell Motility fehérje
ER	Endoplazmatikus Retikulum
ERBB2	errb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERK3	Extracellular signal-regulated kinase 3
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás)
FBS	Fetal Bovine Serum (szarvasmarha magzati szérum)
FCF	Forklórfenuron
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
GDP	Guanozin-difoszfát
GFP	Green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)

GRAF1	GTPase-activating protein for Rho family proteins (GTPáz-aktiváló fehérje a Rho család fehérjéi számára)
GTP	Guanozin-trifoszfát
HCC	Hepatocelluláris carcinoma
HDR	Homology-directed repair (Homológia irányított javítás)
HER2	Human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa
HRP	Horseradish peroxidase (tormaperoxidáz)
HS	Horse Serum (Lószérum)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Humán köldökvénás endothélsejtek)
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor-1
Jamb	Junctional adhesion molecule B (Junkciós adhéziós molekula B)
Jamc	Junctional adhesion molecule C (Junkciós adhéziós molekula C)
JNK	c-Jun N-terminális kináz
KO	Knock Out (génkiütött)
LDH	Laktát-dehidrogenáz
LSD1	Lizin-specifikus demetiláz 1A
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MCEC	Egér szív endotheliális sejtek
MMP	Mátrix metalloproteináz
MRF	Myogenic regulatory factor (miogén szabályozó faktor)
Mrf4	Myogenic regulatory factor 4 (miogén szabályozó faktor 4)
mRNS	messenger RNS (hírvivő RNS)
MSC	Mezenchimális őssejtek
MYF5	Myogenic Factor 5 (Miogén Faktor 5)
MYH	Miozin izoformák
MYH3	Miozin nehézlánc 3
MYH7	Miozin nehézlánc 7
MyoD	mioblaszt determinációs fehérje 1
ND	nem differenciált minta
N-WASP	Neurális Wiskott-Aldrich szindróma fehérje
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ)
NIH	National Institutes of Health (Nemzeti Egészségügyi Intézet)
NSCLC	Non-small-cell lung cancer (Nem kissejtes tüdőrák)
ORAI	Calcium release-activated calcium channel protein 1 (Kalcium-felszabadulás-aktivált kalciumcsatorna fehérje 1)
p1	proliferáló állapotú C2C12
Pax3	Paired box gén 3
Pax7	Paired box gén 7
PB1	Polibázisos régió
PBS	Foszfát-pufferelt sóoldat
PBST	PBS+1V/V% Tween-20
PDB kód	Protein Data Bank kód (Fehérje Szerkezeti Adatbázis)

PCR	Polimeráz-láncreakció
PFA	Paraformaldehid
PS	Foszfatidil-szerin
PTC	Papilláris thyroid carcinoma
RFP	Red fluorescent Protein (Piros fluoreszcens fehérje)
RNS	Ribonukleinsav
RT	Reverz transzkriptáz
S7-KD	<i>Szeptin7</i> géncsendesített C2C12 sejtvonal
SC	Szatellita sejt
shRNS	short hairpin RNS (rövid hajtű RNS)
Scr	Kevert <i>Szeptin7</i> szekvenciával csendesített C2C12 sejtvonal
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis
SEM	Standard Error of the Mean (Az átlag standard hibája)
SOCE	Store-operated calcium entry (Raktár által vezérelt Ca^{2+} belépés)
SR	Szarkoplazmatikus Retikulum
SRF	Serum Response Factor (Szérum válasz faktor)
STIM1	Stromal Interaction molecule 1 (Strómális Interakciós Molekula 1)
SUE	Septin Unique element (Szeptin egyedi egység)
TCGA	The Cancer Genome Atlas (A daganatos sejtek genom atlasza)
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometán
TRITC	Tetrametilrodamin-izotiocianát

2 Bevezetés

A XXI. század egyik legnagyobb kihívása az egészség megőrzése, az egészségben eltöltött évek számának növelése. A vázizom fejlődésével kapcsolatosan számos génnek és az általuk kódolt fehérjének a szerepét sikerült már kimutatni, de még a mai napig vannak feltárandó területek a témakörben. A vázizomsérülések során a gyors regenerációnak kiemelt egészségügyi, szociális és gazdasági szerepe van. A legtöbb új gyógyszer engedélyezésekor a mellékhatásprofilban mindig fel kell tüntetni a vázizmot érintő mellékhatásokat, mivel komoly farmakovigilanciái kockázattal bírnak. Bármilyen új információ a vázizommal kapcsolatban egy lehetséges terápiás irány lehet az emberek életének jobbra tételében. A citoskeletonális rendszert a XX. század végére már leírták és jellemezték, így az aktin, intermedier filamentumok vagy a mikrotubulusok szerepe viszonylag jól ismert. Az elmúlt 50 év kutatásai ugyanakkor rávilágítottak a tényre, hogy egy másik nagy fehérjeszerveződés, a szeptinek csoportja is kiemelkedő szereppel bír a citoskeleton felépítésében és szabályozásában. Szerepüket már számos fiziológiás és patológias folyamatban leírták, ugyanakkor több sejttypusban, többek között a vázizmokban sem vizsgálták még őket. A szeptinek egymással változatos módon képesek kölcsönhatásokat létrehozni, ezzel olyan hetero-oligomereket és makromolekuláris komplexeket képezve, melyek a sejtosztódás, differenciálódás, migráció, immunválaszok és áttétképződések folyamataiban szerepet játszhatnak. Szerkezeti hasonlóságuk alapján négy csoportba sorolták a szeptineket, melyek közül a Szeptin7 egyedüli a csoportjában és eddigi kutatási eredmények alapján a hetero-oligomerek felépítésében kiemelt szereppel bír. Mivel a különböző szeptinek expressziójának megváltozását már számos betegségben igazolták, így jogosan tartják őket potenciális gyógyszer-célpontnak, legyen szó daganatok vagy idegrendszeri betegségek terápiájáról. Kutatásaink során egy olyan, ezidáig ismeretlen területet vizsgáltunk, ahol a szeptinek, részletesebben pedig a Szeptin7 szerepét térképeztük fel vázizomban. Munkacsoportunk először írta le szerepüket *in vitro* és *in vivo*, mely a vázizomfejlődés és regeneráció folyamatainak megértésében új irányt ad a tudomány számára. Jelen dolgozatban az *in vitro* eredmények kerülnek bemutatásra, melyek C2C12 sejteken végzett kísérletek adataiból származnak.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A vázizom

3.1.1 A vázizom általános bemutatása

A vázizom az emberi szervezet legnagyobb szerve, mely testünk tömegének közel 40%-át teszi ki. A központi idegrendszer által beidegzett, részben akaratlagosan, részben reflexesen működtetett, harántcsíkolattal rendelkező izmokat nevezzük vázizomnak [1]. A vázizmok nagy része a csontvázhoz rögzül és egy vagy több ízületet hidal át, melyek elsődleges funkciója a csontváz elemeinek megfelelő helyzetben történő rögzítése, illetve a hely- és helyzetváltoztató mozgások kivitelezése. A harántcsíkolt rekeszizom kiemelt jelentőségű továbbá a légzés folyamatában is. Ugyanakkor az emberi testben számos helyen található olyan vázizomcsoport, ami nem rögzül csontvázhoz. Ilyen például a tápcsatorna és a vizeletelválasztó rendszer nyílásainál található különböző záróizmok vagy az arc mimikai izmai [1,2].

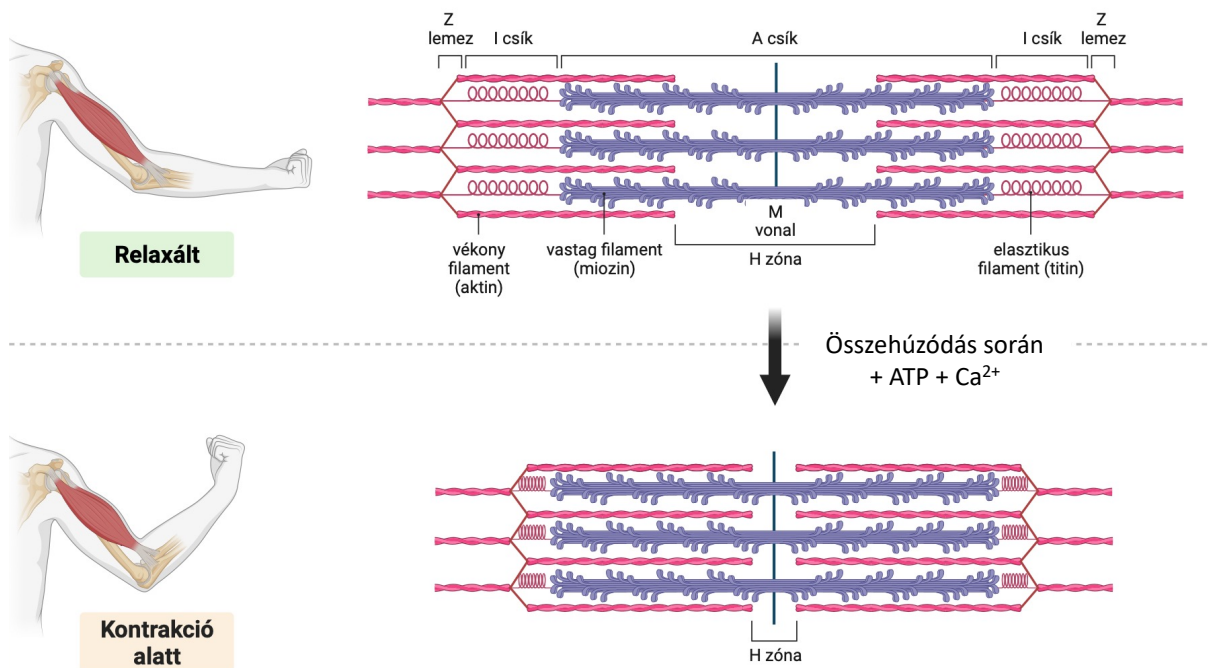
A vázizom tömege fizikai munkával növekedhet, idős korban, mozgásszegény életmódban és betegségek során viszont jelentős mértékben csökkenhet. Az élettani funkciók ellátásához szükséges energiát biokémiai úton nyeri, amit a vázizom precíz szabályozással mechanikai munkává alakít át [3]. Az izomösszehúzódás közvetlen energiaforrása az ATP bomlása, mely folyamat során keletkező ADP molekulát a kreatin-foszfát folyamatosan refoszforilálja, így tudja viszonylag állandó értéken tartani az ATP szintet a vázizomban. Az előbb említett reakció meg is fordulhat, az oxidációs és glikolitikus folyamatok során az ATP és kreatin reakciójában ADP és kreatin-foszfát képződik. Egy aktív, működő vázizom hőt termel, így nagyban hozzájárul a meleg vérű szervezetek hőháztartásához is. Az emlősök vázizomrostjai különböző típusúak, az adott izomban való előfordulási arányuk alapján fehér (glikolitikus) és vörös (oxidatív) izomtípusokról beszélhetünk [2].

3.1.2 A vázizom felépítése

A vázizom kötegekbe rendezett izomrostokból épül fel, melyet kötőszöveti réteg vesz körül. A vázizomrostok mérete különböző, átmérőjük 10 és 80 μm között változhat, hosszuk viszont néhány mm-től akár 25 cm-ig is terjedhet. A harántcsíkolt többmagvú izomrostok alkotják a vázizom celluláris és funkcionális egységeit [3]. Ezek az ellapult, el nem ágazó, hosszú óriássejtek az izomrost hosszától függően akár több száz magot is tartalmazhatnak a

sejtmembránjuk alatt [4]. Az izomsejtek plazmamembránját szarkolemmának nevezzük, mely felépítése részben hasonlít más ingerlékeny sejtek membránjához [3]. Így tartalmaznak ligand- és feszültség-vezérelt ioncsatornákat, mint például a gyors Na^+ -csatornákat vagy a késői K^+ -csatornákat. A szarkolemmán belül helyezkedik el a szarkoplazma és a miofibrillumok. Ez utóbbiak az izom hossz tengelyével párhuzamosan futó kontraktilis elemek, melyeket a szarkoplazmatikus retikulum (SR) vesz körül, ami a vázizom Ca^{2+} raktáraként funkcionál. A miofibrillumok szerkezetét a párhuzamosan elhelyezkedő vékony és vastag miofilamentumok (aktin- és miozinmolekulák), továbbá az ezekre merőlegesen és velük párhuzamosan húzódó tartóelemek és a hozzájuk csatlakozó fehérjék adják [3].

A szarkomerek a miofibrillumokon belüli alapegységek, melyek az izomrost hosszában sorban helyezkednek el. A harántcsíkolatot a szarkomerben belül található vastag és vékony filamentumok strukturális rendezettsége alakítja ki. A szarkomereket egymástól a Z-lemez választja el, ami α -aktinint tartalmaz. Ez segíti a vékony miofilamentumok lehorgonyzását, melynek fő eleme az aktin. Ezekkel részben átfedve helyezkednek el a vastag filamentumok, melyeket a miozin láncok alkotnak. Izom-kontrakció esetén a szarkomer megrövidül, így a Z-lemezek egymáshoz közelebb kerülnek [3]. A fenti leírást az 1. ábra szemlélteti.



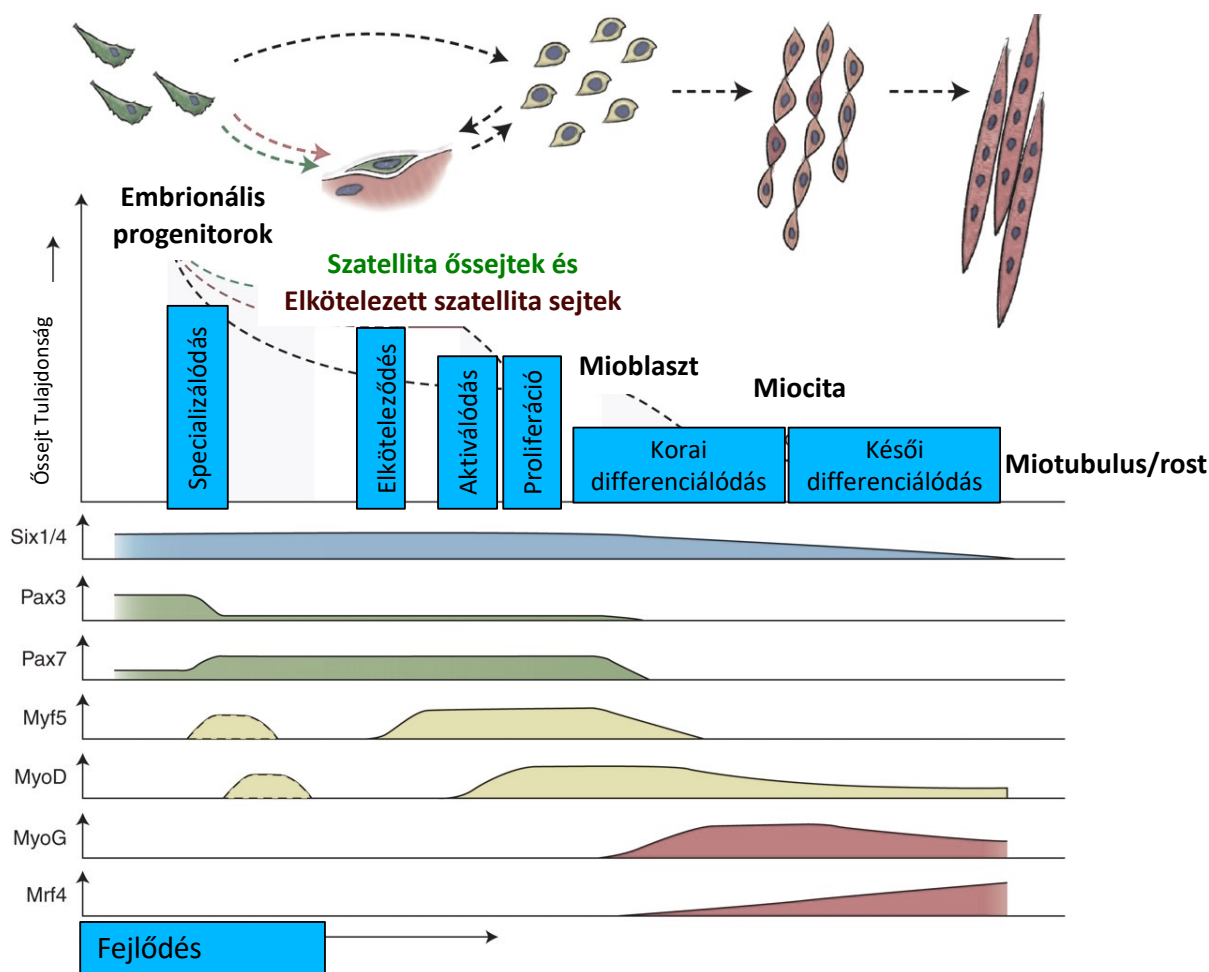
1. ábra: A humán vázizom sematikus felépítése. A szarkomereket, melyek a miofibrillumokon belüli alapegységek, a Z-lemezek választják el egymástól. Kontrakció során a szarkomer megrövidül, így a Z-lemezek közelebb kerülnek egymáshoz. A vastag filamentumokban a középső ponttól kiindulva (M-vonal) tükrösszimmetrikusan rendezett miozinkötegek foglalják el a szarkomer közepét. Az egyes megnyúlt miozinmolekulák farki részeikkel egymás felé rendeződnek kötegekbe, feji végeik pedig a Z-lemez felé néznek. Az egyes kötegeket elastikus titin-óriásmolekulák kötik a Z-lemezhez. A Z-lemezhez egyik végükkel rögzülő vékony filamentumok polimerizált aktin molekulákból állnak. A vékony filamentumok másik vége szabad. Az a szakasz, amely csak a vékony filamentumokat tartalmazza, az I-csík, ahol pedig a vastag és a vékony filamentumok fedésben vannak, az A-csík. A szarkomer középső szakaszán csak vastag filamentumok találhatók (ez a rész a H-zóna). Összehúzódás során a miozinféjek csapásai középre húzzák a vékony filamentumokat, amelyek így a vastag filamentumok közé csúsznak be, ezzel pedig a Z-vonalakat is közelebb húzzák (tehát a szarkomer rövidebb lesz, viszont sem a vékony, sem a vastag filamentumok hossza nem változik). Az összehúzódás jeladója a mioplazma Ca^{2+} -szintjének emelkedése, mely további, ezen az ábrán nem ismertetett folyamatokat foglal magába. Az ábra a BioRender.com segítségével készült [1].

3.1.3 Miogenezis

Az izomrostok kialakulása a prenatális ontogenezis során egy szigorúan programozott, jelátviteli folyamatok sokaságával szabályozott eseménysorozat eredménye [5], mely folyamatot miogenezisnek nevezzük [6]. Az izomrostok fejlődése számos stádiumra különíthető el, melyek részben átfednek egymással (2. ábra). A vázizom fejlődése embrionális szinten a mezoderma laterális régiójából, az úgynevezett szomitákból indul. A mezenchimális

őssejtek (MSC-k) megfelelő biokémiai jel hatására számos sejtípussá képesek differenciálódni. A korai differenciálódási szakasz alatt transzkripciós faktorok által precízen regulált molekuláris események sorozata zajlik [6]. A transzkripciós faktorok közül kiemelendő a Pax3, mely expressziója először a pre-szomita paraxiális mezodermban figyelhető meg, majd végül a szomiták dorzális régiójából kialakuló dermomiótómára korlátozódik. A központi testszegmensek vázizomzatának kialakulásához a Pax3-expresszáló sejtek leválnak a dermomiótómáról, majd az újonnan formált szomiták dorzomediális részén kifejeződik a Myf5 transzkripciós faktor [7]. A Myf5 és MyoD expresszió aktiválódásával a Pax3 expresszió kikapcsol. A dermomiótóma központi része később szétválík és kialakul az elsődleges (primer) miótóma. A primer miótóma a dermomiótóma dorzálisan és a szklerotóma ventrálsan elhelyezkedő sejtjeinek összehúzódásával kialakuló réteg. Ez a progenitor populáció a születés után a vázizomzatban található szatellita sejtek (SC-k) egy részét eredményezi. Az emberi test különböző izomcsoportjainak a fejlődése már ebben a korai szakaszban meghatározott, mely szintén pontosan és precízen szabályozott jelátviteli folyamatok eredménye az adott sejtpopulációkban. Így például a hátizmok a dermomiótóma és a miótóma epaxiális részéből, míg a törzs oldalsó izmai és a végtagizmok a hipaxiális szakaszokból származnak [8]. Ugyanakkor a testfal hipaxiális izmait a dermomiótóma és a miótóma ventráls irányú megnyúlása generálja [9]. A végtag izmai, a rekeszizom és a hypoglossalis húr izomzata kiterjedt vándorlóképeségű miogén sejtekből származnak, amelyek a dermomiótóma ventrolateralis ajkából a végtagok szintjén delaminálódnak [10]. A fejszomákat a prechordális és a garatfej mezodermból származó sejtek alkotják. Összegezve tehát, az egymást követő miótómák létrehozhatnak egymással összeolvadva egy izmot (pl. *m. erector spinae*), vagy a miótómák feltagozódhatnak és úgy alkotnak több izmot (pl. *m. deltoideus*). Ezen felül a mioblasztok a keletkezési helyükről távolabbra is elvándorolhatnak, így képezve pl. a *m. latissimus dorsi* izmot [11].

A mioblasztok a miociták (más néven izomsejtek) embrionális prekursorai. A miogenezis során a mioblasztok többmagvú miotubulusokká egyesülnek (fúzionálódnak), amelyek később izomrostokká alakulnak megfelelő beidegzést követően [6]. A miogenezis folyamatát és a főbb transzkripciós faktorokat a 2. ábra foglalja össze röviden.

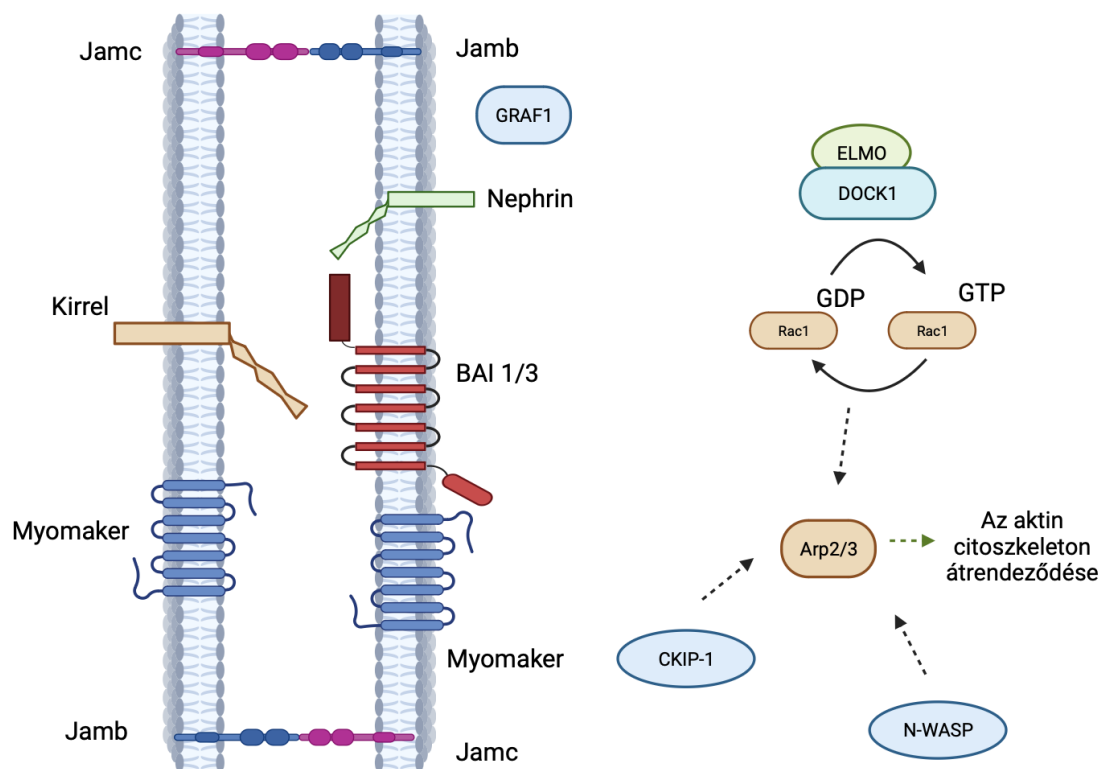


2. ábra: A miogenezis folyamata és a különböző szakaszait szabályozó legfontosabb transzkripciós faktorok időbeli megjelenése. Az embrionális izomdifferenciálódásban résztvevő progenitorok kihagyják a nyugalmi szatellita sejt (SC) stádiumot, és közvetlenül mioblasztokká válnak. Egyes progenitorok SC állapotban maradnak születés után a vázizomban, így a szatellita őssejtek és az elkötelezett szatellita sejtek heterogén populációját alkotják. A *Six1/4* és a *Pax3/7* a korai specifikáció fő szabályozói, míg a *Myf5* és a *MyoD* megjelenése a sejteket már a miogenezis programjában viszi előrébb. A terminális differenciálódási gének expressziójában, amelyek a miociták fúziójához és a miotubulusok kialakulásához szükségesek, a myogeninnek (*MyoG*) és az *MRF4*-nek van kiemelt szerepe. Az ábra a [6] alapján módosítva készült.

Az izomfejlődés során az első posztmitotikus sejtek a miociták. Ezek a sejtek már specifikus fehérjéket fejeznek ki, melyek az izmok fejlődési irányát vezetik. A miozin az egyik fő kontraktilis fehérje, amely a kémiai energiát az ATP hidrolízise révén mechanikai energiává alakítja át, így bármilyen genetikai módosulás ezen a ponton súlyos izomfejlődési zavarokhoz vezethet, ami számos esetben letális [12]. A miozin egy hexamer fehérje, amely egy pár miozin nehézláncból (MYH-ból) és két pár variábilis könnyűláncból áll. A MYH-eket egy több génből álló család kódolja. Emlőseinkben legalább 10 különböző MYH izoformát írtak le, melyek

harántcsíkolt, sima és nem izomsejtekben is előfordulnak. Ezek az izoformák a fejlődés során térben és időben szabályozott expressziót mutatnak. A *Myosin Heavy Chain 7 (MYH7)* gén például a béta (β)-miozin nehézlánc néven ismert fehérje expressziójához járul hozzá. Ez a fehérje a szívizomban és az I. típusú vázizomrostokban található [13]. A *Myosin Heavy Chain 3 (MYH3)* szintén a miozin kialakulásában játszik szerepet [14]. A fejlődés ezen szakaszában megjelennek a struktúrfehérjéket, például az alfa-aktint és dezmin kódotoló gének is [1].

A differenciálódási folyamat során a mioblasztok, miociták összeolvadásából alakulnak ki a miotubulusok [6]. Ez a folyamat időben és térben meghatározott lépésekre bontható. Először az izomsejtek sejtadhéziós molekulák (CAM-ok) által közvetített adhéziója valósul meg. Több adhéziós molekula közül számos vizsgálat történt például a Nephrin fehérjével kapcsolatosan, melynek hiányában izomfejlődési zavar következett be (3. ábra) [15]. A Nephrin mellett számos más, különböző immunológiai tulajdonsággal bíró molekula is szerepet játszik, mely fehérjék membránba történő kihelyeződése a sejten belüli szignalizációs folyamatok és génexpressziós változások eredménye [16]. Az első lépésben kifejeződő sejt felszíni molekulák jelenléte viszont önmagában nem elég az összeolvadáshoz, ehhez szorosabb sejtmembrán-kontaktus kialakulása szükséges. Ezt a két fúziós partner egy pár toló és ellenálló erő közvetítésével éri el. Ahhoz, hogy a membránok közelsége optimális legyen, a két fúziós partnernek át kell rendeznie az aktin rendszerét és az aktomiozin hálózatát, ami a citoskeletális rendszer átszervezésével is jár (3. ábra). Több modellrendszerben is vizsgálták már a folyamatban szereplő molekulákat és nagyobb fehérje szerveződéseket. A citoskeletális átrendeződéseket kiváltó jelek az Arp 2/3 komplexhez konvergálnak, amely az elágazó aktin nukleációját végzi. Az Arp 2/3 komplex az emlősökben a Dock1, a Rac és az N-Wasp fehérjéken keresztül regulálódik [17]. A folyamat időben és térben szabályozott módon zajlik, ezen molekuláris komponensek egy része sejttípus-specifikus módon működik. A 3. ábrán az összeolvadásban szerepet játszó molekulák sematikus illusztrációja látható.



3. ábra: A mioblasztok fúziójában szereplő fehérjék sematikus ábrázolása. A Jamb és a Jamc egy esszenciális sejtfelszíni receptorpár, amely a két sejt megfelelő közelsége esetén kölcsönhatásba lépnek egymással. A Kirrel fehérje a többmagvú gyors izomrostok kialakulásában játszik szerepet. A Myomaker egy izomspecifikus membránfehérje, amely szükséges az embrionális mioblasztok fúziójához. A GRAF1-hiányos egereknél a születés utáni izmok keresztmetszeti területe jelentősen és tartósan csökken, ami a mioblaszt fúzió hibájára utalhat. Több, különböző jelátviteli útvonalban szereplő fehérje különböző erősségű kölcsönhatásba léphet az Arp 2/3 fehérjével, mely végső soron az aktin citoszkeleton átrendeződéséhez járul hozzá. Az ábra a Biorender.com segítségével készült, a [16] alapján.

Harmadik lépésként a lipid kettősrétegek destabilizálása történik, ami hajlamossá teszi a sejteket az összeolvadásra [16]. C2C12 sejtekben *in vitro* kimutatták, hogy a foszfatidil-szerin (PS) átmeneti expozíciója segíti a membránok összeolvadását [18], míg egér kísérletek alapján a Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) fehérje szerepét vizsgálták [19]. Az endogén BAI1 expresszió megnövekedett a mioblasztok fúziója során, és a BAI1 overexpresszió az ELMO/Dock180/Rac1 fehérjéken keresztül jelátvitel révén fokozta a fúziót. A fenti folyamat eredménye többmagvú miotubulusok keletkezése. Az összehangolt jelátviteli rendszer a citoszkeletális szerkezet dinamikus átszerveződéséhez vezet, melyben számos, még nem ismert vagy nem kimutatott fehérje játszhat szerepet.

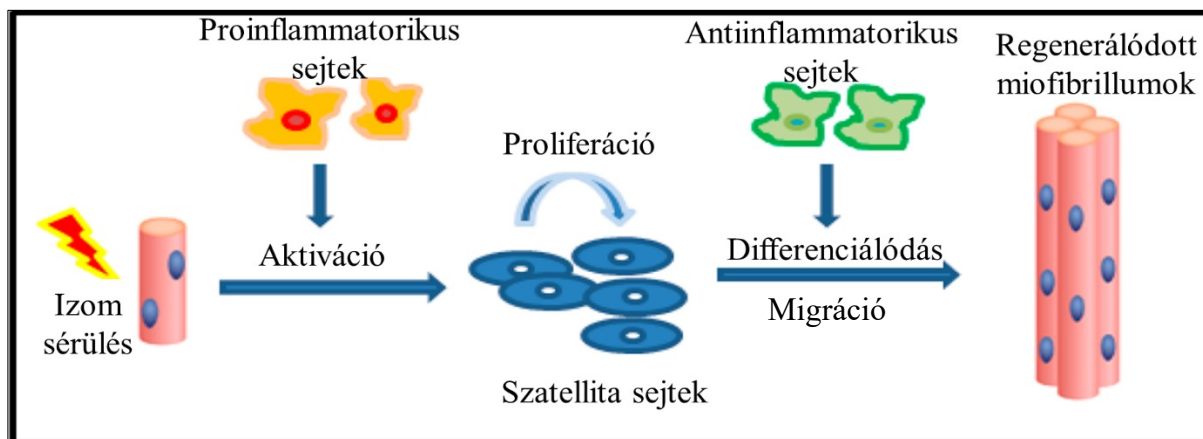
A miotubulusokból képződnek később a többmagvú, harántcsíkolattal rendelkező izomrostok, melyekben már megtalálhatók a kontraktilis miofibrillumok. Fontos kiemelni, hogy funkcionális izomrost képződéséhez többek között a megfelelő beidegzés, a neuromuszkuláris-junctio kialakulása és a felszíni nikotinos acetil-kolin receptorok megjelenése is szükséges, ami a dolgozatban nem említett, további sejtleletani és fejlődéstani folyamatokat foglal magába [1].

3.1.4 A vázizomsérülésekről és regenerációs folyamatokról általában

A vázizom fejlődése nemcsak a prenatális időszakra korlátozódik. Életünk során a vázizomzat folyamatosan változik, számos külső behatás éri. Kiemelendő, hogy a vázizom nagyfokú regenerációs képességgel rendelkezik, mely folyamat hasonlít a fejlődési szakaszban leírtakra, de fontos különbség, hogy itt a meglévő rendszer javítása történik a már említett nyugvó SC populáció segítségével [13]. A vázizomsérülések során lezajló folyamatokat két nagy csoportra oszthatjuk: a szöveti pusztulás szakaszára és a rekonstrukciós fázisra [20]. Sérülést követően a vázizomban különböző nekrotikus folyamatok indulnak el, amit lokálisan a szövetek nem képesek kompenzálni. Ennek során olyan faktorok szabadulnak fel, mint a kreatin-kináz (CK), laktát dehidrogenáz (LDH) vagy troponin, melyek vérvizsgálat során könnyen azonosíthatók, bár emelkedett szintjük nemcsak vázizomsérülésre utalhat [21]. A különböző mikroRNS-ek szintén diagnosztikai jelentőségűek lehetnek különböző mértékű vázizomsérüléseknél [22]. A folyamat következő lépése az intracelluláris sejttörmelék megjelenése az extracelluláris térben, mely egy steril gyulladásos folyamatot indít el. Az így kialakuló immunológiai válasz számos neutrofil granulocitát és makrofágot vonz a sérülés helyére, melyek a sejttörmelék eltávolításához proinflammatorikus faktorokat, proteázokat és szabadgyököket szabadítanak fel [20,23]. A steril gyulladásos folyamat lezajlását követően indul a regenerációs fázis, melyben nagy szerepe van a vázizomban található nyugvó SC-knek [2], melyek mitotikusan inaktívak. Az SC-k szerepe közül kiemelendő az izomszövet regenerálása és a nyugvó SC populáció fenntartása. Ennek eléréséhez az SC-k szimmetrikusan és aszimmetrikusan is képesek osztódni [24]. A szimmetrikus osztódásból azonos, összejt-tulajdonságokkal rendelkező utódsejtek jönnek létre. A folyamat szabályozásában két transzkripciós faktor bír kiemelt szereppel, a Pax7 és a MyoD. A Pax7 egy transzkripciós faktor, amely részt vesz a SC specifikációjában és a populáció fenntartásában. Sérülés esetén a SC-k elhagyják nyugalmi állapotukat, csökkentik a Pax7 szintet és differenciálódnak, hozzájárulva a vázizomzat regenerációjához [24]. A MyoD,

más néven myoblast determinációs protein 1, egy olyan fehérje, amely fontos szerepet játszik az izomdifferenciálódás szabályozásában [25,26]. A MyoD a miogenikus szabályozó faktorok (MRF) néven ismert fehérjecsaládba tartozik. Ezek az ún. basic helix loop helix (bHLH) transzkripciós faktorok egymás után jelennek meg a miogenikus differenciációban. A gerincesek MRF család tagjai közé tartozik a MyoD, a Myf5, a myogenin és az MRF4 (Myf6) is. A MyoD rendkívül alacsony és lényegében kimutathatatlan szinten fejeződik ki a nyugalmi SC sejtekben, viszont expressziója már akár fizikai edzés hatására is aktiválódik. Izomszöveti károsodás esetén ugyanakkor drasztikusan megemelkedik a MyoD kifejeződése. Összegezve, egy aszimmetrikus folyamat során egyetlen SC létrehozhat egy önmegújuló leánysejtet, megtartva annak Pax7 expresszióját, és elnyomva a MyoD-t ($\text{Pax7}^{\text{magas}}/\text{MyoD}^{\text{alacsony}}$), továbbá egy elkötelezett sejtet, amelyben elnyomja a Pax7-et és kifejezi a MyoD-t ($\text{Pax7}^{\text{alacsony}}/\text{MyoD}^{\text{magas}}$). Az önmegújulás és az elkötelezettség közötti finom egyensúly felborulása a regenerációs folyamat kudarcához és/vagy az összejtkészlet kimerüléséhez vezethet [27].

Az elkötelezett SC-knek a fúzió és a differenciálódás mellett nagyon fontos, hogy a megfelelő helyre eljussanak, amit a sejtmigrációs folyamatok segítségével érnek el. Ezekben a sejtekben a transzkripciós faktor myogenin szintje megemelkedik és számos olyan jelátviteli útvonal aktiválódik, mely a migrációt segíti [28]. A Wnt az egyik legfontosabb jelátviteli útvonal, amely részt vesz a vázizomzat regenerációjában [29]. A felnőtt vázizomzatban a kanonikus Wnt jelátvitel - főként a Wnt3a ligandumon keresztül - az SC-k differenciálódását irányítja, míg a nem kanonikus Wnt jelátvitel a Wnt7a ligandumon keresztül a szimmetrikus sejtosztódást, az SC-k migrációját és a rostok növekedését segíti elő [30]. Bár nagyrészt a sérülés helyén történik az intenzív sejtosztódás, a sejthalak bizonyos fokú megváltozása, továbbá a sejtek mobilitása mindenképp szükséges. A sejt alakjának és szerkezetének változásait nagyrészt a Rho GTPázok családja (Rho, Rac és Cdc42) irányítja. Ezek membránhoz kötött kis GTP-kötő fehérjék, amelyek extracelluláris jelzésekre válaszul közvetítik a citoskeletális átrendeződéseket, a downstream jelátvitelt és a transzkripciós változásokat [31]. Miután az SC-k a céljukat elérték, elkezdődik a regenerációs fázis következő lépése, amikor létrejön az új izomszövet. Ezt a sejtek többféle úton képesek megvalósítani: vagy önmagukkal összeolvadva alakítanak ki egy új rostot, vagy pedig illeszkednek, illetve bekötődnek már meglévő izomrostokhoz [20,31]. A regenerációs folyamatok összességében kb. két-három hétig tartanak, mely még számos, a dolgozatban nem részletezett molekuláris folyamat eredményeként jön létre. A regenerációt a 4. ábra szemlélteti sematikus.

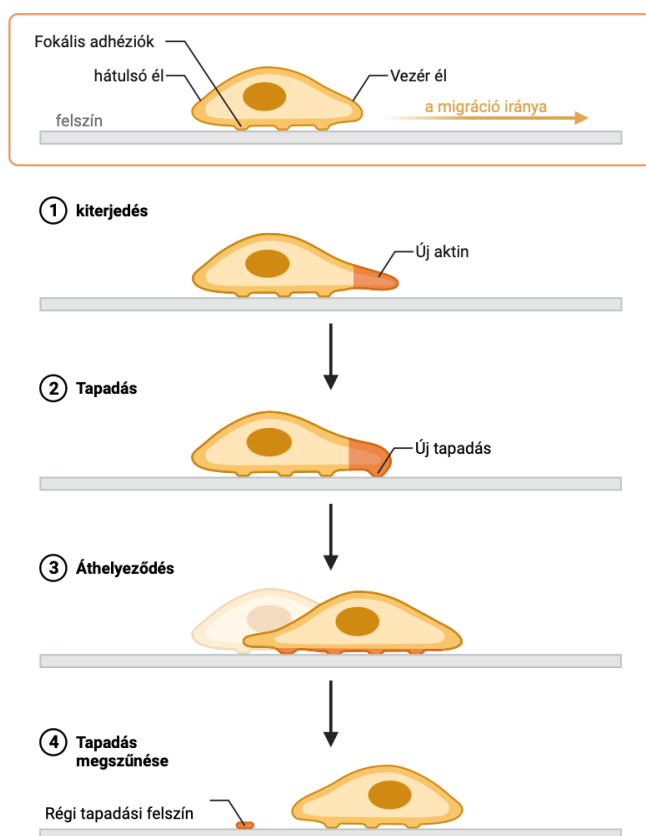


4. ábra: A Vázizom regenerációjának sematikus folyamata. Izomsérülés következtében egy steril gyulladásos folyamatot indít el az intracelluláris termékek megjelenése az extracelluláris térben, mely hatására számos, jelen dolgozatban nem részletezett immunológiai folyamat aktiválódik. A regenerációs folyamat során a nyugvó SC sejtek aktiválódnak és intenzív sejtosztódásuk indul meg transzkripciós szabályozás következtében. Így összességében a proliferációs, migrációs és differenciációs lépések segítségével eléri azt, hogy a miofibrillumok minél gyorsabban regenerálódjanak.

3.1.5 A vázizom citoskeletális rendszerének felépítése és szerepe a migrációban

A sejtmigráció a multicelluláris szervezet olyan folyamata, mely képessé teszi azt feladatainak ellátására, a megújulásra és nagyfokú szerveződésre. A migráció folyamatát már számos fiziológiás és patológiás körülmény között vizsgálták. Kitétetett szerepe van a sejtek mozgásának az embrionális fejlődésben, sérülések során, regenerációs folyamatokban, különböző típusú immunválaszokban, de patológiás esetben például tumorok áttétképződésében is [32]. A migráció folyamata során a sejt az egyik pontból a másikba mozdul, a folyamatot sematikusan az 5. ábra szemlélteti.

A migráció lépései



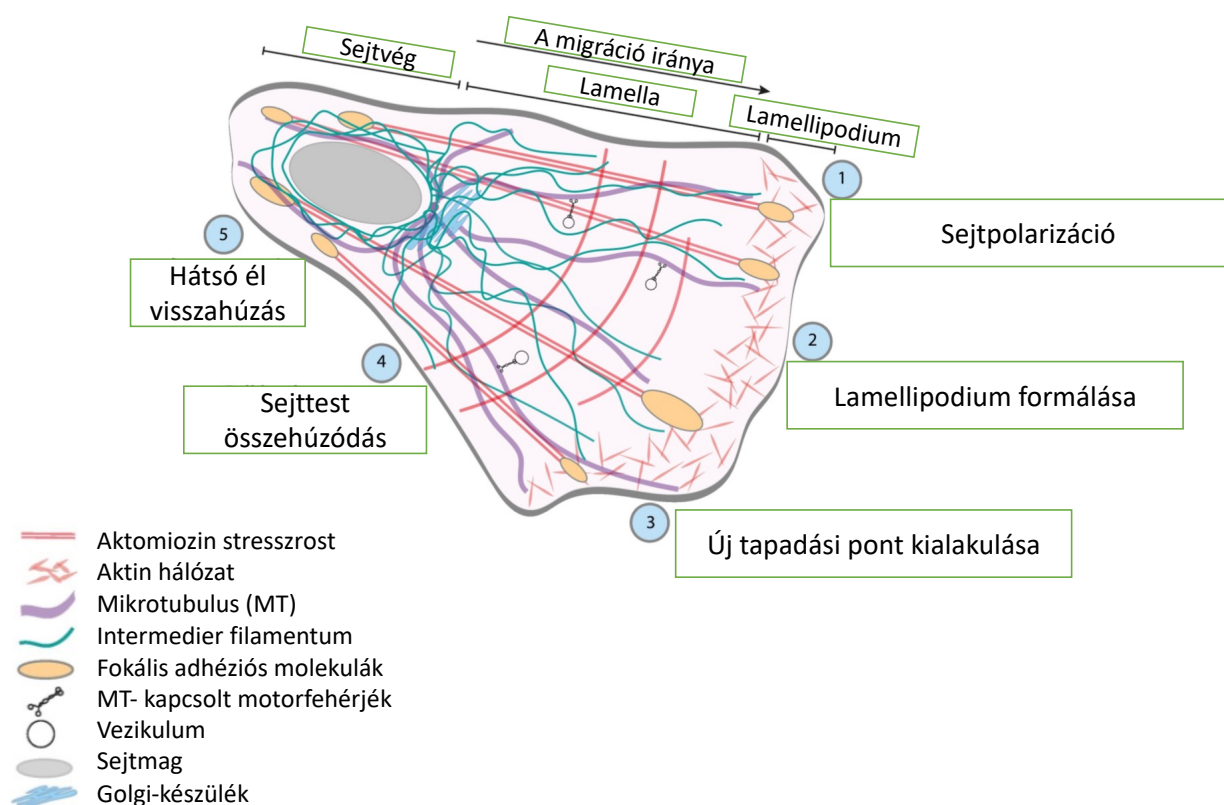
5. ábra: A migrációs folyamat sematikus ábrázolása. Egy migráló sejt kétpólusává válik, ahol a vezér élt és a hátsó élt lehet elkülöníteni egymástól. A vezér élen (1) gyors aktin polimerizáció zajlik, mely képessé teszi a sejtet az új tapadási felszín kialakítására (2). Az áthelyeződés folyamatában (3) fontos szerepe van a mikrotubuláris rendszer dinamikus átrendeződésének is, mely többek között a tapadási felszín megszűnéséhez járul hozzá (4). Az ábra a BioRender.com segítségével készült.

A vázizom fejlődése és regenerációja során a citoskeletális elemek átrendeződése és a sejtadhéziós folyamatok szignalizációs szabályozása a migrációs folyamatok fő hajtóereje [33,34]. A citoskeleton egy komplex rendszer, melynek építőelemei a mikrotubulusok, az intermedier filamentumok és a mikrofilamentumok. Az elmúlt 50 év kutatási eredményei arra utalnak, hogy az előbbieken kívül egy másik nagy fehérjeszerveződés, a szeptinek a citoskeletális rendszer negyedik elemét alkotják [35].

Az α - és β -tubulin alegységek között létrejövő dinamikus kölcsönhatások eredménye a mikrotubulusok képződése [36]. A mikrotubulusok 13 párhuzamos protofilamentumból épülnek fel, amelyek α -tubulint és β -tubulin heterodimereket tartalmaznak. A tubulin dimerek összeszerelődése fejtől farokig történik, és ennek a biokémiai folyamatnak az eredménye egy 25 nm átmérőjű makromolekula [37]. A mikrotubuláris rendszer számos sejtbiológiai szerepe közül kiemelendő a sejthalak meghatározása és a sejtmozgás irányítása [36]. Az aktin

filamentumok vagy mikrofilamentumok átmérője 7 nm. A 40 kDa molekulatömegű aktin alapját egy globuláris fehérje, a G-aktin képezi. Az ATP-t ADP-vé hidrolizálva az aktin monomerek F-aktinná polimerizálódnak, így képződnek az aktin filamentumok [38]. Az aktin filamentumok polárisak, pozitív és negatív végekkel rendelkeznek, ezzel segítve a szálak dinamikus össze- és szétszerelését. Az intermediér filamentumok mérete a fent említett fehérjék között van, körülbelül 10 nm-es átmérővel, és növeli a sejtek mechanikai stabilitását [35]. Nem polárisak és tetramer komplexekből épülnek fel (6. ábra).

A mioblasztok migrációjában számos szabályozó tényező vesz részt, azonban ezek többsége nem izomspecifikus (6. ábra). A folyamatot a citoskeleton átrendeződésének dinamikája jelentősen befolyásolja. Ebben a főszerepet játszó fehérje az aktin, amely bonyolult struktúrákba (filopodia, lamellipodia, stresszrostok vagy podoszómák) szerveződik [39]. A stresszrostokon belül az aktomiozin komplex kontraktilis tulajdonságait azok a fehérjék szabályozzák, amelyek a plazmamembrán adhéziós komplexeiben helyezkednek el [40]. Ilyenek például a már említett Rho családba tartozó kis GTPázok (Rho1, Cdc42 és Rac1), melyek a szubcelluláris aktin-összeszerelődés szabályozásában más komplexeket céloznak meg, beleértve az Arp2/3-at, aminek szerepe van a filamentumok elágazódásának szabályozásában is [39]. Ezen túlmenően több tanulmányban bebizonyosodott, hogy a fent említett fehérjék nem csak aktin filamentumokkal, hanem más citoskeletális fehérjékkel, például a jelen dolgozatban részletesebben bemutatott szeptinekkal is kölcsönhatásba lépnek [41,42].



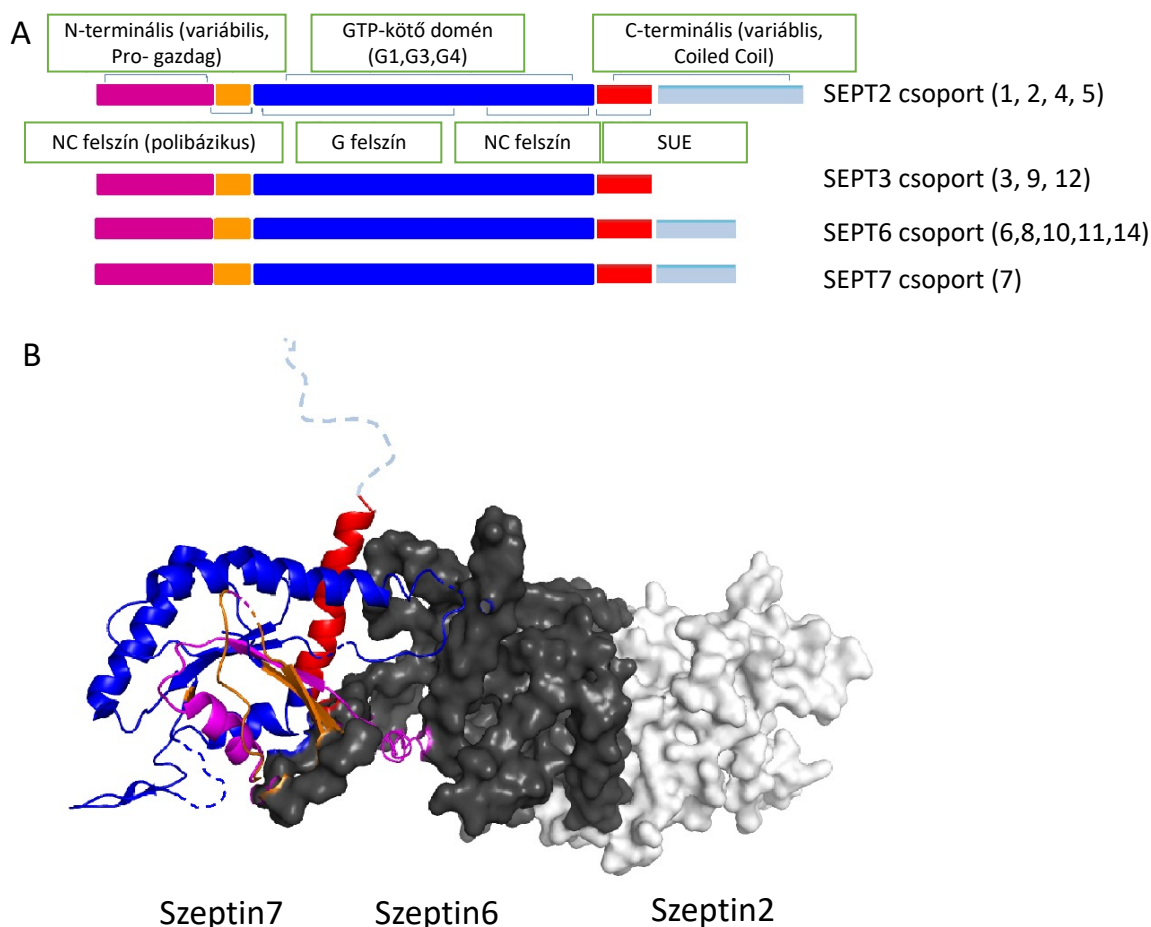
6. ábra: A sejt citoskeletális elemei egy migráló sejtben. Sejtpolarizációt (1) követően a vezér élen az ún. lamellipodium formálódik (2), ami egy aktin gazdag hálózatnak felel meg és az új tapadási pont kialakulásában játszik szerepet (3). A fokális adhézións egy olyan nagyobb fehérjekomplex összefoglaló elnevezése, mely az extracelluláris elemekkel való kapcsolatot segíti. A sejttest összehúzódásában (4) az energetikai folyamatok fő végrehajtói a mikrotubulusok és intermedier filamentumok, mely fehérjék dinamikus átszerveződése során a hátsó él visszahúzódik (5). Az ábra a [43] alapján szerkesztve.

3.2 A szeptinek

3.2.1 A szeptinekről általában

A szeptinek felfedezése 50 éves múltra tekint vissza, és egyre több kutatási eredmény arra utal, hogy a citoskeleton szerves része és egyik fő meghatározói. A szeptineket először *Saccharomyces cerevisiae* bimbózó élesztőben írták le, azóta számos prokarióta és eukarióta szervezetben mutatták ki expressziójukat és szerepüket. A szeptinek guanozin-trifoszfátot (GTP-t) kötő fehérjék, eukariótákban egy erősen konzervált fehérjecsaládba tartoznak [35]. A szeptinek fontos szerepét számos fiziológiai és patológiás sejt folyamatban igazolták, beleértve a karcinogenezist, exocitózist, endocitózist és a sejtosztódást [44,45]. Eddig 13 humán szeptin fehérjét azonosítottak, amelyeket a szekvencia hasonlóság alapján négy csoportba soroltak

(SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7), a 7. ábrán ezen csoportok bemutatása látható, főbb doménszerkezetükkel együtt [35].



7. ábra: A szeptinek csoportosítása és főbb doménjeik. A szeptin csoportok után zárójelben találhatóak a csoportba tartozó szeptin fehérjék (A). A kanonikus Szeptin7-6-2 komplex kristályszerkezetének ábrázolása (PDB: 2QAG), ahol a Szeptin7 szerkezetében látható domének az (A) ábrán bemutatott színek szerint mutatja a domének térbeli elrendeződését (B). Az ábra a [46] alapján módosítva. A (B) ábra a PyMOL szoftverrel készült.

3.2.2 A szeptinek szerkezete és strukturális szerveződésük

A szeptinek szerkezetében megtalálható egy GTP-specifikus motívum (AKAD) valamint a Walker A (GxxxxGKS/T) és B (DxxG) motívumok, amelyek egyrészt a GTP guanin alegységével lépnek kölcsönhatásba, másrészt a GTP foszfátcsoportjaihoz kötődve, egy Mg^{2+} bevonásával segítik a GTP hidrolízist. A Ras szupercsalád monomer kis GTPázaival ellentétben a szeptinek oligomerizálódnak GTP-kötő doménjeiken (G felszín) keresztül, ezzel fonalas hetero-polimereket képezve (7. és 8. ábra) [47]. Az NC felszín az N-terminális és a C-terminális részét jelenti a fehérjének (7. és 8. ábra). Ez utóbbi régió GDP-t kötött állapotban stabilabb,

mint a GTP-hez kapcsolódó [47–49]. A strukturális vizsgálatok azt mutatják, hogy a GTP-kötés olyan konformációs változásokat vált ki, amelyek destabilizálják az NC felszínt, míg a GTP hidrolízis ellentétes hatást gyakorol a G felszínre. A szeptin monomerek gyorsabban bontják a GTP-t, mint a dimerek vagy oligomerek, mivel az utóbb említett komplexek GTP kötő doménje nem mindig hozzáférhető. Ugyanakkor nem minden szeptin képes a GTP hidrolízisére, mivel a folyamathoz mindenképp szükség van egy treonin aminosavra a megfelelő pozícióban [47]. Így például a SEPT6 csoporton belül hiányzik a már említett kulcsfontosságú treonin, ami megakadályozza, hogy a GTP-t GDP-vé hidrolizálják. Ezek a szeptinek konformációsán a GTP-hez kötött állapotban vannak, így az NC és G felszíneken való kölcsönhatási képességük nem szabályozható GTP-hidrolízissel [50].

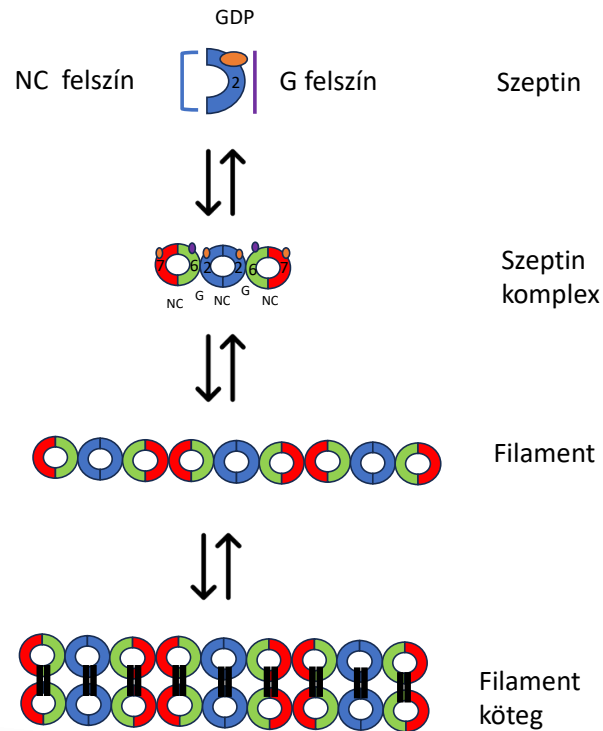
A szeptinek szerkezetében fontos megkülönböztető jegy a Septin Unique Element (SUE) [51], amely a G-től az NC felszínig terjed, és lehetővé teszi a filamentum képződést. A SUE nagyjából 60 aminosavat tartalmaz, és két részre osztható. Az első fele három kis β -szálat tartalmaz, amelyek egy nagyon csavart β -meandert ($\beta\alpha\beta\alpha$) alkotnak. A SUE második része két egymást követő, többnyire konzervált aminosavakból álló fordulattal kezdődik, és az $\alpha 5$ és $\alpha 6$ hélixeken keresztül folytatódik, ez utóbbi a G-domén második leghosszabb hélice, amely az NC felszín részét képezi [51].

A legtöbb szeptin C-terminális doménjében Coiled Coil (CC) szekvenciák találhatók, néhány kivételtől eltekintve (pl. a humán SEPT3 csoport tagjai és az élesztő szeptin Cdc10). Emberben a CC hossza a különböző csoportok között változik: a SEPT2 csoportban körülbelül 30 aminosavat tartalmaz, míg a SEPT6 és SEPT7 csoportokban körülbelül kétszer olyan hosszú. Magán a CC-n kívül a C-doménben potenciálisan két kísérő régió található: C_N , a G-domén utolsó hélice ($\alpha 6$) és a CC-ben részt vevő hélix közötti régió, valamint CC-t követő régió. A C_N -régió igen változatos és meglehetősen rugalmasnak tekinthető. Úgy tűnik, hogy zsanéerként működik, lehetővé téve a CC mozgását a G-doménhez képest [52,53]. A Coiled Coil C-terminusát kísérő régiót többnyire rendezetlen szerkezetűnek tartják. A SEPT6 és SEPT7 csoportokban a C-terminális domén legvégén egy polibázisos szekvencia van jelen (K/RK/RDKxK/RKN/K, illetve EKNKKKGK). Ez a motívum a szeptinekben található más polibázisos doménekkel (PB1 és PB2) együtt segítheti a membráninterakciót [54–57].

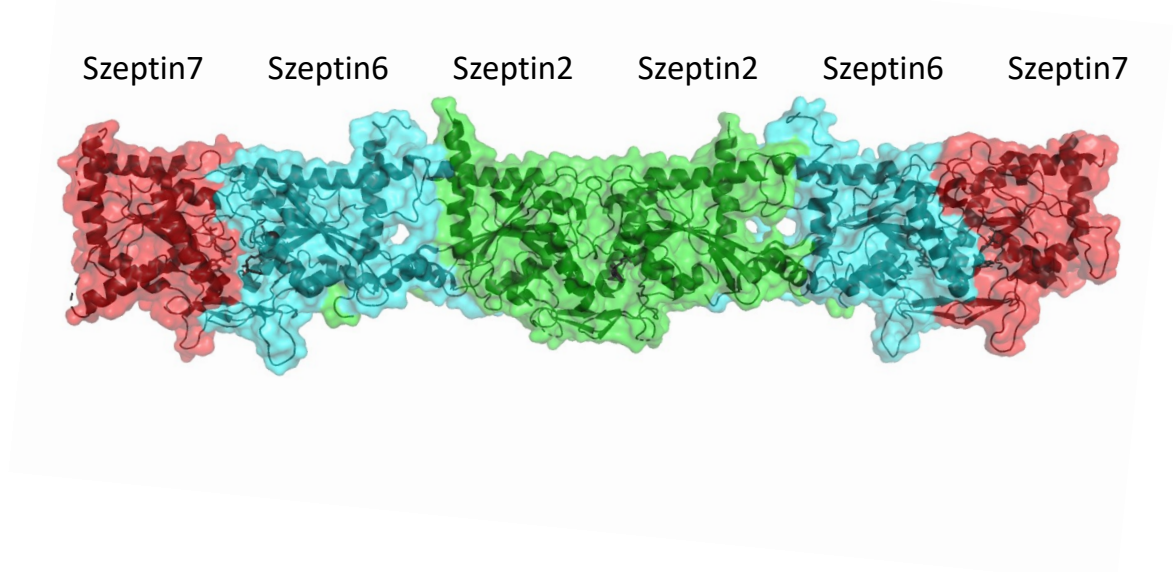
A szeptinek N-terminális doménje a legkevésbé vizsgált szerkezetű és a legváltozatosabb régió az összes szeptinben. Az itt található α -hélix régió ($\alpha 0$, a G-domén előtt) gyakran tartalmaz egy polibázisos régiót (PB1), amelyről úgy gondolják, hogy szintén döntő fontosságú a membráninterakció szempontjából [58]. A szeptinek N-doménjének nagyobb része azonban szintén rendezetlen szerkezetű [59].

Mint ahogy a fenti jellemzésből is kitűnik, a szeptinek rendkívül változatos szerkezettel bíró fehérjék, melyek egymással reagálva még bonyolultabb struktúrákat alkothatnak (8. ábra). Ahhoz, hogy magasabb rendű fehérjeszerveződés-ként tudjanak működni, nagyon fontos az adott szeptin csoportok képviselőinek (SEPT2,3,6,7) jelenléte a komplexekben (lásd például a 8. ábra, B panel). Az így kialakult komplex akár több ponton is képes lehet egyszerre más fehérjékkel reagálni. Az ilyen fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata rendkívül nehéz és összetett. A szeptin filamentumok szerveződése magában foglalja a nukleotidok megkötését és hidrolízisét, a pontos mechanizmus azonban még mindig nem teljesen tisztázott [47,60]. Eddig számos elméletet publikáltak kölcsönhatásairól, a szerkezeti adatok azonban ellentmondásosak. Először is, a bimbózó élesztővel és a *Drosophila*-val végzett vizsgálatok kimutatták, hogy több szeptin fehérje is részt vehet egy hetero-oligomer molekulakomplex felépítésében. A vizsgált oligomerek kristályszerkezete szerint az N- és C-terminális részek az alegységek közötti kölcsönhatási pontok, ezenkívül a G-domén felszínének (G) felhasználásával is létrejöhet kötődés [60]. A szeptin komplexek és a velük kölcsönhatásban lévő fehérjepartnerek feltérképezése korunk tudományos kutatásainak egy rendkívül intenzíven vizsgált területe. Ahogy a csoportok beosztásából és eddigi szerkezeti ismereteinkből tudjuk, a Szeptin7, mint a SEPT7 csoport egyedüli képviselője elengedhetetlen szerepet játszik a hetero-oligomer szeptin komplexek, ezáltal pedig a magasabb rendű citoskeletális struktúrák kialakításában.

A



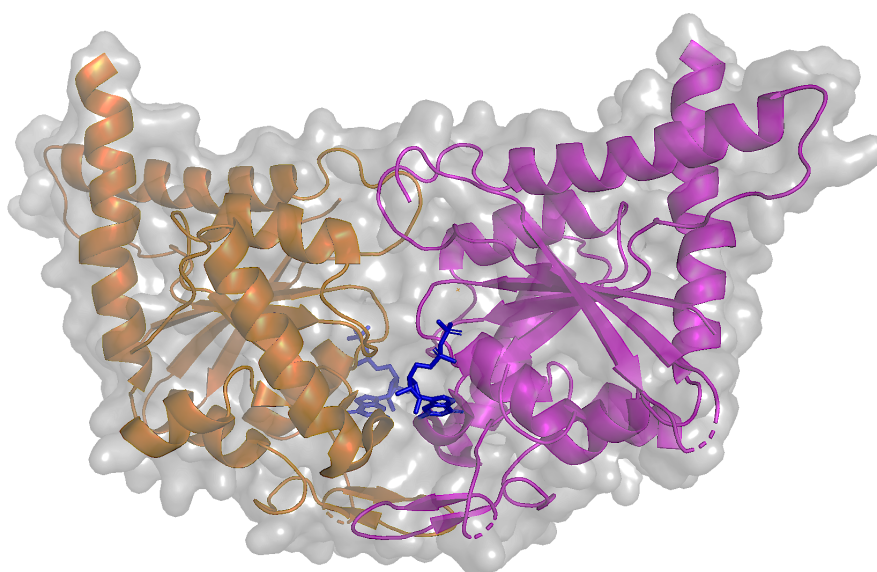
B



8. ábra: A szeptinek szerveződésének lehetőségei. (A) Egy szeptin molekula egyik oldalán a GTP-kötő doménnel (G felszín), a másik oldalon a fehérjelánc N- és C-terminális felszínével (NC felszín) más szeptinekkel együtt komplexet képezhetnek. Így például a szeptinek GTP kötött állapotban képeznek heterohexamer komplexet, mely aztán filamentumokba és még nagyobb kötegekbe rendeződhet. Nagyon fontos a folyamat reverzibilitása, mely alapján az átépülés rendkívül dinamikus, ezáltal a szeptinek alkalmazkodnak a sejt adott feladataihoz. (B) a klasszikus Szeptin7-6-2-2-6-7 hexamer röntgen szerkezete (PDB kód: 2QAG). Az ábra a PyMOL szoftver segítségével készült.

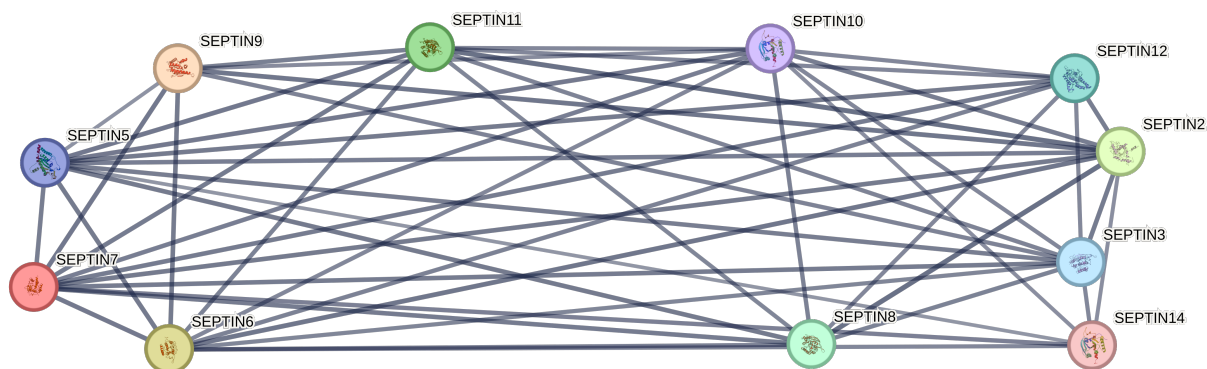
3.2.3 A Szeptin7 fehérje jellemzése

A Szeptin7-et kódoló génszakasz (*SEPTIN7*) 1254 nukleotidot tartalmaz a 7P14.4-14.1 kromoszómán, ez 418 aminosavat kódol, beleértve a GTP-kötő motívumot is. A humán Szeptin7 cDNS-szekvenciája homológ a *cdc10*-el élesztőben, ezért kezdetben a Szeptin7-et emberben *hCdc10*-nek nevezték. Az egyes szeptinek háromdimenziós röntgenszerkezete alapján kimutatták, hogy a Szeptin7 a többi szeptinhez hasonlóan egy kanonikus Ras-szerű G-domént tartalmaz, amely 6 β -szálból és 5 α -hélixből áll (9. ábra). A Szeptin7 egy G-felületen keresztül dimert képez [45,52,56].



9. ábra: A Szeptin7 dimer GDP kötéssel. Narancs és a magenta színek az individuális Szeptin7 fehérjéket, míg a kék az általuk kötött GDP molekulát szemlélteti (PDB kód: 3T5D). Az ábra a PyMOL szoftver segítségével készült.

A Szeptin7-nek számos interakciós partnerét már feltérképezték különböző rendszerekben, melyben néhány partnert a 10. ábra szemléltet.



10. ábra: A Szeptin7 interakciós partnerei, kifejezetten a szeptin interakciós hálózatra fókuszálva. (Humán Szeptin7 fehérje, STRING adatbázis alapján, kísérletesen igazolt partnerek, ahol a minimálisan szükséges interakciós pontszám:0.7). (Elérve: <https://string-db.org>, 2023.09.23.).

3.2.4 A Szeptin7 fehérje szerepe fiziológias és patológias folyamatokban

A Szeptin7 szerepét már számos sejtélettani folyamatban leírták. A *Drosophila* modellrendszerben a *dseptin7* hiánya és emelkedett kifejeződése egyaránt repülési rendellenességet okozott, ami a STIM1- ORAI fehérjék szabályozásán keresztül, a raktár által vezérelt Ca^{2+} belépés (SOCE) folyamatában történt hibára utalhatnak. Az így kapott eredmények a Szeptin7 intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozásában betöltött szerepére utalnak [61–63].

A Szeptin7 szerepét az idegrendszer több pontján is kimutatták. A fehérje a dendritikus nyúlványok tövében és a dendritikus elágazási pontokon lokalizálódik tenyésztett hippocampalis neuronokban. A dendritekben a Szeptin7 összetett struktúrákat, például körívet vagy géz-szerű szerkezetet alkot, amelyek hasonlóak az élesztőben a citokinézis során szeptinek által kialakított gyűrű- és homokóra-struktúrákhoz [64].

Számos kutatás igazolta a Szeptin7 szerepét különböző daganatos elváltozásokban, például bizonyos gliómákban, papilláris pajzsmirigykarcinómában (PTC-ben) és hepatocelluláris karcinómában (HCC-ban). A Szeptin7 túlzott jelenléte gátolja a sejtproliférációt és leállítja a sejtciklus progresszióját a G0/G1 fázisban glióma sejtekben, ezáltal a tumorsejtek apoptózist indukálhatja. A Szeptin7 downstream hatást fejt ki a rákos sejtek Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) által indukált migrációjában, deléciója megszünteti az ERK3 azon képességét, ami elősegíti a tüdőráksejtek migrációját és invázióját [65]. A Szeptin7-et tumorsuppresszorként írták le a pajzsmirigyrák leggyakoribb formájában, a PTC-ben. A Szeptin7 expressziója és szubcelluláris elhelyezkedése bizonyítottan összefügg a PTC specifikus altípusaival [66].

A HCC a máj elsődleges daganata, mely krónikus alkoholizmus és vírusos hepatitis fertőzés következtében alakulhat ki. A MiR-127 szintje csökken HCC-ben, és csökkenti a HCC sejtek (Huh7) növekedését, valamint a Szeptin7 szuppresszióján keresztül megállítja a sejtciklust G2/M fázisban a fent említett sejtekben [67]. A sejtosztódás két, térben és időben elkülönülő folyamat során igényli a szeptineket, először a kontraktilis gyűrű szerveződéséhez, majd a középtest abszeissziójához. Az előbbi a nagy prominencia és evolúciós konzerváltsága miatt már korán ismertté vált, míg az utóbbi a sejtípus-függősége miatt ismeretlen maradt [68].

Kimutatták, hogy az emlős sejtek citokinézisének szeptinektől való függése nagymértékben különbözik az egyes sejtípusok között. A fibroblasztok, tipikusan adherens sejtek, *in vivo* más sejtekkel és/vagy kötőszövettel, *in vitro* pedig extracelluláris mátrixszal és mesterséges szubsztrátummal érintkezve osztódnak. A Szeptin7 kifejeződésének génszinten történő *in vivo* kiütése azt mutatja, hogy a szeptinek nélkülözhetetlenek a citokinézishez fibroblasztokban. A *Szeptin7* hiányos egérembriók nem gasztrulálódnak, és a szeptinhiányos fibroblasztok pleiotróp hibákat mutatnak a fő citokinetikus gépezetben, beleértve a mikrotubulusok hiperacetilációját/stabilizációját és a középső test abszeissziójának megrekedését, ami konstitutív többmagvúsághoz vezet [69]. Ezzel szemben az amőboid vérképző sejtek *in vivo* planktonikusan növekednek és szuszpenzióban egyedileg osztódnak. Menon és munkatársai megerősítették a szeptinek szerepét a mikrotubulus-hasító gépezet szerveződésében [69]. Úgy tűnik, hogy ez a rendszer a Szeptin7 hiányában inaktív a fibroblasztokban, ami a középtest stabilizációjához vezet. A vérképző rendszerben a stathmin fehérje magas szintje és kifejeződése viszont passzív mentéshez vezet az általános mikrotubulus destabilizáció miatt, így a citokinézis ebben az esetben például szeptin független módon zajlik [69].

Ahogy a fenti példák is mutatják, a szeptinek - többek között a Szeptin7 - szerepe eltérő funkciókkal is bírhat különböző sejtekben, ez egyrészt a sejt-specifikus környezettől, másrészt az adott sejtípusokban kifejeződő partnerfehérjétől is függ.

3.2.5 A Szeptin7 szerepe a sejt migrációs folyamatokban

A szeptinek szerepét a migrációban számos sejtípusban igazolták, beleértve a hámsejteket, a fibroblasztokat, a limfocitákat és a neuronokat [37]. A szeptinek expressziójában bekövetkező rendellenességek fokozhatják a rákos sejtek migrációs és invazív tulajdonságait [37,70–72], ráadásul az alternatív hasítással létrejött variánsoknak ellentétes hatásai is lehetnek, amit a Szeptin9 esetében már bebizonyítottak [73]. Emlőrákos sejt vonalakban a Sept9_i1 támogatja a sejt migrációt, míg a Sept9_i2 esetében ez a hatás nem volt kimutatható, ami azt bizonyítja, hogy

az alternatív fehérje izoformák expressziója eltérően szabályozhatja a különböző sejttípusok migrációját [73]. Egy másik, a Szeptin9-en végzett tanulmányban kimutatták, hogy a szövetspecifikus kölcsönható partnerek is képesek szabályozni és koordinálni a szeptin-aktin hálózatok kialakulását [42]. A CDC42EP5/BORG3 fehérje aktin struktúrákhoz kapcsolódik, és a Szeptin9 fehérjén keresztül szabályozza az aktomiozin kontraktilitását. Ez a biológiai folyamat segíti a melanoma sejtek amöboid jellegű mozgását [42]. Ezenkívül ismert, hogy a Szeptin6 overexpressziója elősegítette a HCC sejtek proliferációját, migrációját és invázióját [74]. Egy másik rendszerben, humán nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) sejtvonalakon végzett vizsgálat igazolta, hogy a szabályozó fehérjék, pl. a lizin-specifikus hiszton-demetiláz 1 (LSD1) szabályozza a tumor metasztázisát a demetiláló SEPT6 promóteren keresztül, a Szeptin6 overexpressziója bekapcsolhatja a TGF- β 1 útvonalat, mely hozzájárul a tumoros állapot kiterjedéséhez [75].

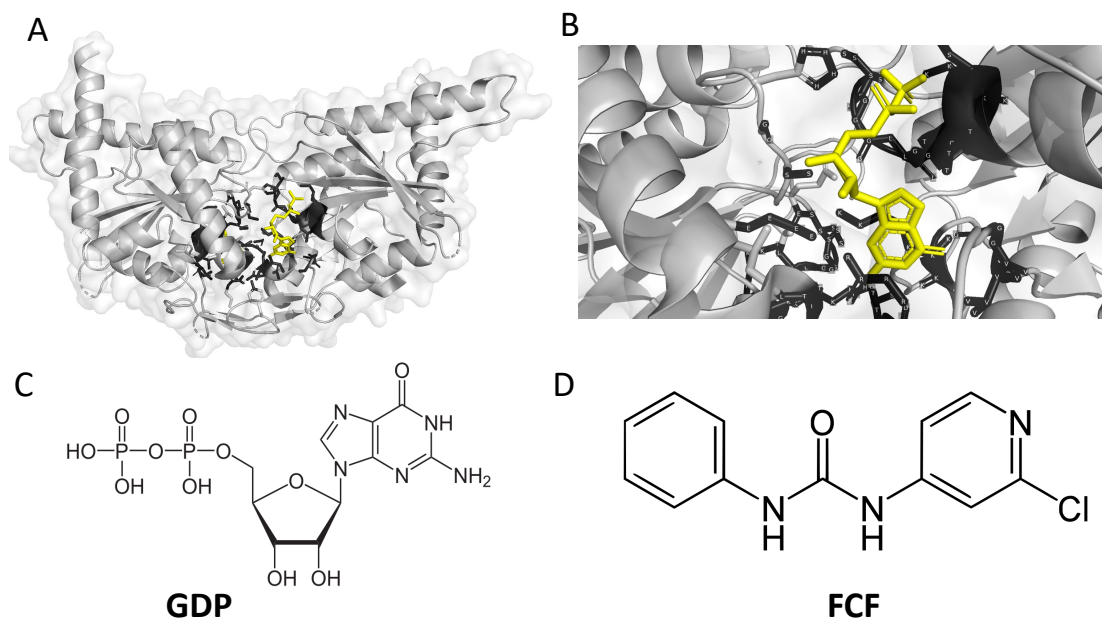
A különböző szeptinek hatása tehát sokszor tűnik ellentmondásosnak, amivel kapcsolatban szintén számos irodalmi adat áll rendelkezésre. A Szeptin7 expressziója különböző glióma sejtvonalakban alacsonyabb volt, mint a normál agysejtekben, ami ahhoz vezetett, hogy a Szeptin7 emelkedett expressziója jelentősen gátolta az LN18 sejtek migrációját és az IGF-1 indukált kemotaxist [76]. Az is bebizonyosodott, hogy a megnövekedett Szeptin7 kifejeződés depolimerizálhatja az aktin filamentumokat, így gátolva a glióma sejtek migrációját [76]. A fentiekkel ellentétben, a Szeptin2 és Szeptin7 expressziójának csökkentése gátolt proliferációt, migrációt és inváziót eredményezett mellrák sejtvonalakban [72]. Humán osteosarcoma U2-OS sejtekben a Szeptin7 a mikrotubulusok nukleációjának modulálásával képes volt fenntartani a sejtmigrációt, míg csökkent Szeptin7 expressziónál csökkent ezen sejtek migrációja [77]. Az ereket bélelő endothelsejtek (EC-k) az angiogenezis legfontosabb szereplői. Liu és munkatársai vizsgálták a szeptinek szerepét egér szívben található EC-ben (MCEC) [41]. A Binder of the Rho GTPase 5 (Borg5) és a szeptin citoszkeleton szabályozza az aktomiozin rostok pozícionálását és szerveződését az MCEC-kben, ami fontos ezen sejtek *in vitro* megvalósuló, tartós irányított migrációjához. Mivel a Szeptin9 knockout (KO) embriókból származó immortalizált egér embrionális fibroblasztok szintén gátolt irányított migrációt mutatnak a kontrollokhoz képest, a szeptinek ezen folyamatokban betöltött kiemelt szerepe egyértelműnek tűnik [70].

3.2.6 A szeptin rendszer szerveződésének módosítási lehetőségei

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

A forklórfenuron (FCF; N-(2-klór-4-piridil)-N9-fenil-karbamid; CPPU, 11. ábra) egy kis molekulájú vegyület, amelyről ismert, hogy befolyásolja a szeptin filamentumok összeszerelődését [47,78]. Az FCF egy szintetikus növényi citokinin, egy klórozott piridinből és egy karbamidcsoporttal összekapcsolt fenolgyűrűből áll. Az FCF hatásait a *S. cerevisiae* bimbózó élesztőben mutatták ki először, ahol a szer reverzibilisen befolyásolta a szeptin komplexek lokalizációját és megjelenését. Napjainkban ez az egyetlen elérhető szer a szeptin rendszer dinamikájának vizsgálatára, számos *in silico* adattal is rendelkezünk a szerrel kapcsolatosan. Bizonyos gyógyszerkutatások a szeptinek dinamikus átrendeződésének gátlására irányulnak, különböző FCF analógokat már vizsgáltak daganatos sejteken is [79–81]. Kimutatták, hogy az FCF és az új analógok citotoxikus hatást okoznak mind kezeletlen, mind ciszplatín-rezisztens rosszindulatú mesothelioma-eredetű sejtekben [79]. ECC-1 és a HCH-1 endometrium- és petefészekrák sejtvonalakban az FCF csökkenti a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2, humán génszimbólum: ERBB2) expresszióját, amely fehérje bizonyos daganattípusokban túlzottan expresszálódik [81].

Angelis és mtsai mérései szerint, az FCF dokkolása a szeptinek összes ismert kristályszerkezetével azt jelzi, hogy az FCF előnyben részesíti a GTP-kötő zsebet (11. ábra). Azt találták, hogy az FCF kötési szabad energiái és affinitása a szeptin csoportoktól függően változhat *in silico*, ami arra utal, hogy az FCF egyes szeptinek nukleotid zsebeihez jobban hozzáférhet vagy illeszkedhet, mint másokéhoz. Az FCF a predikció szerint kölcsönhatásba lép a szeptinek jellegzetes motívumaival, mint például a G1 Walker A motívummal (GxxxxGKS/T), a G4 GTP-kötési specificitású AKAD motívummal is, valamint egy erősen konzervált treonin-aminosavval, amely katalizálja a GTP hidrolízisét. Ezek a kölcsönhatások összességében azt sugallják, hogy az FCF utánozza a nukleotid kötését, zavarja a GTP-kötést és valószínűleg ezáltal a hidrolízist is befolyásolja [47].



11. ábra: A forklórfenuron (FCF) és a Szeptin7 kapcsolódási lehetőségei. Az (A) panelen szürkével van jelölve a Szeptin7 dimer, melyben sárga színnel jelenik meg a GDP molekula. A Szeptin7 dimeren belül fekete színnel vannak kiemelve azon aminosavak, melyek 5 Angström távolságra vannak térben a GDP molekulától. A (B) panel a GDP környezetét mutatja kinagyítva. (C) panel a GDP szerkezeti képlete, míg a (D) panelen az FCF szerkezeti képlete látható. Angelis és mtsai *in silico* dokkolási vizsgálatai alapján az FCF előnyben részesíti a GTP-kötő zsebet. Az (A) és (B) panelen bemutatott ábra PDB kódja 3T5D és a PyMOL szoftver felhasználásával készült.

4 Problémafelvetés és célkitűzés

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

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

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

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

5 Anyagok és Módszerek

5.1 C2C12 sejtek tenyésztése és differenciáltatása

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

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

5.2 Proliferációs vizsgálatok

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

5.3 A fúziós index meghatározása

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

5.4 RNS izolálás és RT-PCR elemzés

A sejtenyészetek mintáit 4°C-os PBS-sel történő mosást követően Trizolban (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) vettük fel és általános RNS izolálási protokollnak vetettük alá. Először 20%-os kloroform hozzáadása után a mintákat 4°C-on $16\,000 \times g$ -n, 15 percig centrifugáltuk. A minták felső vizes fázisát 500 µl RNáz-mentes izopropanol segítségével precipitáltuk szobahőmérsékleten 10 percig. Centrifugálást ($12\,000 \times g$) követően a kicsapódott RNS-t 75 V/V%-os etanol segítségével mostuk, majd ismét centrifugáltuk. A teljes RNS-t nukleáz mentes vízben oldottuk, majd a koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 Spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével határoztuk meg. Sikeres izolálást követően a nukleáz mentes vízben beoldott mintákat -80 °C-on tároltuk. A reverz transzkriptáz (RT) reakció elegye (20 µl) (Omniscript, QIAGEN, Germantown, MD, USA) 1 µg RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibitor, 0,25 µl oligot (dT)-t, 2 µl dNTP-t (200 µM) tartalmazott RT pufferben. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációját olyan specifikus primerpárok segítségével végeztük, amelyeket a Primer Premier 5.0 szoftverrel (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA) terveztünk a GenBankban közzétett egér nukleotid szekvenciák alapján, és a tervezés alapján a Bio Basic-tól (Toronto, Kanada) vásároltunk. Az egyedi tervezésű primerpárok specificitását *in silico* igazoltuk az NCBI Primer-BLAST szolgáltatás felhasználásával (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A primerpárok szekvenciája, az alkalmazott annealációs hőmérsékletek és az egyes polimeráz láncreakciók várható amplimer mérete az 1. táblázatban látható. Az amplifikációkat

programozható PCR készülékben (Labnet MultiGene 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) végeztük a következő beállításokkal: kezdeti denaturálás 94°C-on 1 percig, majd 30 ciklus denaturálás 94°C-on (30 s); annealáció optimalizált hőmérsékleten minden primerpárra 30 másodpercig – lásd 1. táblázatot; extenzió 72 °C-on, 60 másodpercig, majd végső elongáció 72°C-on 5 percig. A PCR-termékeket EZ-Vision Dye 6x (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) pufferrel kevertük össze, és a DNS-sávokat 1,2-2,5%-os agaróz gélen végzett elektroforézis után tettük láthatóvá (Fujifilm Labs-3000 készülék, Fuji, Tokió, Japán).

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

Gén	Primer	Nukleotid szekvencia (5'→3')	GenBank Accession No.	Annealációs hőmérséklet	Amplimer méret (bp)
Septin1	sense	CACGGCACAACTCTGACC (222-240)	NM_017461	56 °C	500
Mus musculus	antisense	CAACGACTGCGAAAGGGA (704-721)			
Septin2	sense	GAACAGGCGTCACATCA (550-566)	NM_001159719	50 °C	352
Mus musculus	antisense	AACCTTCTTGCCTTTGG (885-901)			
Septin3	sense	CCACTGCTGCCTCTACT (776-792)	NM_001358836	52 °C	231
Mus musculus	antisense	TTGTCCTCCAAATCCTC (990-1006)			
Septin4	sense	GCAAACCGTGGAGATTA (654-670)	NM_011129	52 °C	325
Mus musculus	antisense	CGCCTTAGCCAAGATAG (962-978)			
Septin5	sense	CGCAAGTCCGTCAAGAAA (194-211)	NM_213614	55 °C	268
Mus musculus	antisense	TGGGCTTCCAACATTCAG (444-461)			
Septin6	sense	ACATCATTCCTCGTTATTGC (820-838)	NM_001177324	52 °C	221
Mus musculus	antisense	CATCATCTTGTTGCCTATCTT (1020-1040)			
Septin7	sense	CCTTGAGGGCTATGTGGG (278-295)	NM_009859	56 °C	250
Mus musculus	antisense	CAGCAGCAACTGAACACCAC (508-527)			
Septin8	sense	CACAGAGGAGGTGAAGGT (1000-1017)	NM_033144	54 °C	471
Mus musculus	antisense	TTGAAGGCGTTGGTCTC (1454-1470)			
Septin9	sense	AACATTGTCCCAGTCATCG (1400-1418)	NM_001113486	54 °C	381
Mus musculus	antisense	GCGTTTCACTCGGTAGG (1764-1780)			

<i>Septin10</i>	sense	GACACGACCTCCAAGAT (1088-1104)	NM_001024910	52 °C	349
<i>Mus musculus</i>	antisense	GACGCTCACCATAGAAC (1420-1436)			
<i>Septin11</i>	sense	CCTGTGCGTGGGTGAGA (287-303)	NM_001310669	55 °C	433
<i>Mus musculus</i>	antisense	GATGGTGTCTGGCTTTTCG (703-719)			
<i>Septin12</i>	sense	AGTCCAAAGTATGGCAGTC (344-362)	NM_027669	52 °C	105
<i>Mus musculus</i>	antisense	GCTTCAATCCCTTCTCC (432-448)			
<i>Septin14</i>	sense	TCCACTCTTGGGCATTT (160-176)	NM_028826	50 °C	290
<i>Mus musculus</i>	antisense	CTGGCTTCCTTGTTTATCT (431-449)			
<i>HSA-MCM</i>	sense	GCATGGTGGAGATCTTTGA		58 °C	717
<i>Mus musculus</i>	antisense	CGACCGGCAAACGGACAGAAGC			
<i>Septin7</i>	sense1	CTTTGCACATATGACTAAGC		58 °C	151 WT
<i>WT-loxP-KD</i>	sense2	GCTTCTTTTATGTAATCCAGG			197 Flox
<i>Mus musculus</i>	antisense	GGTATAGGGGACTTTGGGG			256 KD
<i>Gapdh</i>	sense	AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG (99-121)	NM_001289726.1	58 °C	322
<i>Mus musculus</i>	antisense	AATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT (399-420)			

5.5 Génkiütés a CRISPR-Cas9 módszerrel

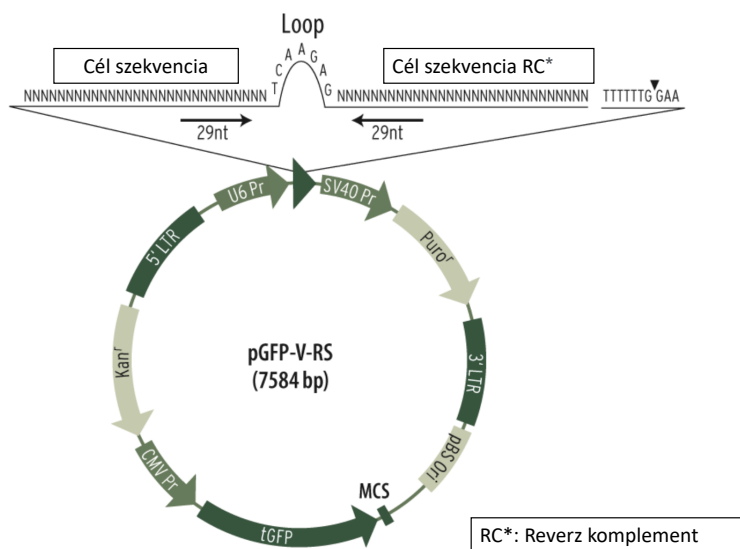
A CRISPR/Cas9 KO és HDR (Homology-directed repair) plazmid konstruktok, mely specifikusan az egér *Szeptin7* gént célozták 3 különböző kódoló régióban (exon #3, #4, és #5), a Santa Cruz Biotechnológiai cégtől lettek beszerezve (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA). A *Szeptin7* CRISPR-Cas9 KO plazmid 3 különböző guideRNS-plazmidből és HDR-plazmidből álló készlet volt. Sense A: TCAGCAACCGAAGAACCTTG (exon3), Sense B: CTGACAATAGTTGATACTCC (exon4), Sense C: CTGGAGAATACAAATCTGTG (exon5).

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

szelektáltuk. A sejtek proliferáló tápoldatba kerültek, a sejtosztódást transzmissziós mikroszkóp (EVOS XL Core Imaging System, Thermo Fisher Scientific) segítségével követtük nyomon.

5.6 Géncsendesítés

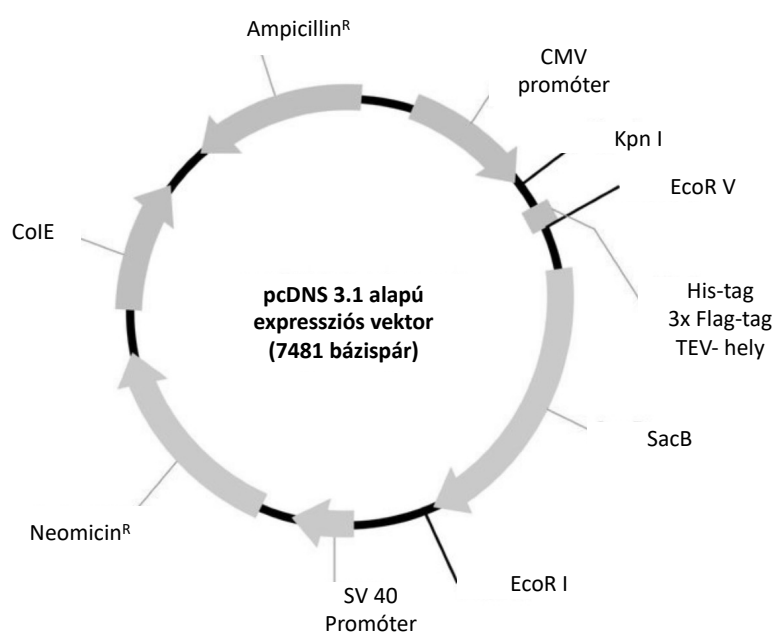
A C2C12 sejtek tenyésztése 6-lyukú edényben történt. 50-60%-os konfluencia elérését követően a sejtekre szérummentes Opti-MEM oldat (Thermo Fisher Scientific) került és Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transzfekciós reagens segítségével egy retrovírus alapú, *Szeptin7*-specifikus shRNS konstruktot tartalmazó pGFP-V-RS vektorral történt a transzfekció (12. ábra). Kontrollként egy kevert szekvenciájú shRNS (short hairpin RNS) vektort kaptak a sejtek (Scr sejtek). A transzfekciót követően 3 órával a sejtekre újra proliferáló oldat került, majd 48 órán át regenerálódtak és szintetizálták a kódolt shRNS-t. Az inkubációs idő után a sejtek puromycin (2 µg/ml)-tartalmú tápoldatban szelektálódtak addig, míg jól körülhatárolható sejtklónok jelentek meg a tenyésztőedényben. Az egyedi klónok külön tenyésztőedénybe kerültek, megfelelő sejtszám elérését követően a géncsendesítés eredményességét fehérjeszinten, western blot módszer segítségével igazoltuk. Azokat a klónokat, melyek a *Szeptin7* kifejeződésben szignifikáns csökkenést mutattak, több passzálást követően is teszteltük és csak azokat használtuk fel későbbi kísérletekhez, melyekben a csökkent *Szeptin7* fehérje expresszió folyamatosan kimutatható volt (S7-KD sejtek).



12. ábra: A *Szeptin7*-specifikus shRNS konstruktot tartalmazó pGFP-V-RS vektor sematikus ábrázolása.

5.7 A fúziós fehérje előállítása és sejtekbe történő transzfektálása

Szeptin7-N-mCherry és Szeptin7-N-ECFP (Enhanced cyan fluorescent protein) kódoló szekvenciákat pcDNA 3.1 (+) expressziós vektorba klónoztattuk (Thermo Fisher Scientific) (13. ábra). A sejtekre 50-70%-os konfluencia elérését követően szérummentes Opti-MEM tápoldat került és a fúziós fehérjéket kódoló vektorok transzfektálása (mCherry vagy ECFP) Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagens segítségével történt. Három órával a transzfektálást követően a sejtekre a proliferációs tápoldat került és 24 vagy 48 óra elteltével történt a minták további vizsgálata. Élősejtes mikroszkópos vizsgálatok előtt Hoechst 33342 festékkel jelöltük meg a sejtmagokat. A képeket AiryScan 880 laser scanning konfokális mikroszkóp segítségével készítettük (Zeiss).



13. ábra: A Szeptin7-N-mCherry és Szeptin7-N-ECFP kódoló szekvenciákat tartalmazó pcDNA 3.1 (+) expressziós vektor ábrázolása.

5.8 A fúziós fehérje kifejeződésének nyomonkövetése élő sejtekben

A C2C12 sejteket 96 lyukú Cell Carrier Ultra lemezekben (6055302, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) növesztettük 10 V/V% FBS-t tartalmazó DMEM-ben. 70%-os konfluencia elérését követően a tápközeget szérummentes Opti-MEM-re cseréltük (Thermo Fisher Scientific), és a sejteket Szeptin7-N-mCherry kódoló plazmiddal transzfektáltuk. A sejteket 24 órán keresztül hagytuk a kódolt fehérjét kifejezni. A közel 95-100% konfluens tenyészetek esetén sejtmentes zónát hoztunk létre egy Tecan Freedom EVO folyadékkezelő robot segítségével, a

folyadékkezelő kart használva, 10 µl-es pipettavéggel. A képeket az Opera Phenix High Content Confocal System-en készítettük (Perkin Elmer). Lyukanként összesen 24 mezőt vettünk fel 200–250 sejttel, és mindegyik képalkotó pozícióhoz lézer alapú autofókuszot használtunk. Az áteső és az Alexa-647 csatornák képeit az optikai lemez aljához képest a Z képsík 5 µm-es pozíciójában gyűjtöttük 63×-os objektív segítségével (Numerikus Apertúra: 1,15).

5.9 Immuncitokémia

A sejteket PBS-sel történő mosást követően 4 V/V%-os PFA oldattal fixáltuk 15 percen keresztül. A felesleges paraformaldehid inaktiválása 0,1M Glicin tartalmú PBS segítségével történt. A sejtek permeabilizálásához 0,25 V/V% Triton-X (TritonX-100, Sigma, St. Louis, USA) tartalmú PBS oldatot használtunk 10 percig, melyet három PBS-es mosás követett (3 x 15 perc). Ezután szérummentes fehérjeblokkolást alkalmaztunk (DAKO, Los Altos, CA, USA) 30 percig. A blokkolást követően a blokkoló oldatban hígított elsődleges Szeptin7 antitest (IBL, 1:250) került a mintákra és 16-18 órán át, nedves kamrában, 4°C hőmérsékleten inkubálódott. Az inkubációs időt követően PBS-el mostuk a mintákat (3 x 15 percig), majd a másodlagos, fluorofór-konjugált antitest (1:1000), valamint FITC-phalloidin (1:1000) vagy TRITC-phalloidin (1:1000) került a mintákra 1 óra időtartamra, szobahőmérsékleten. A phalloidin-nel konjugált fluorofór specifikusan az F-aktinhoz kötődik. Három PBS-es mosást (3 x 15 perc) követően fedőmédium segítségével fejeződött be a minták előkészítése. Az Alexa Fluor 488, TRITC, FITC, Hoechst33342 és DAPI jelölt mintákról a felvételek az AiryScan 880 laser scanning konfokális mikroszkóp segítségével készültek (Zeiss), 20x levegős, valamint 40x és 63x olajimmerziós objektívvel. A másodlagos antitestek és/vagy fúziós fehérjékről (Szeptin7-N-mCherry és Szeptin7-N-ECFP) a felvételek fluoreszcenciás detektálhatóság függvényében 488 nm, 543 nm és 405 nm excitációs hullámhosszokon, míg az emisszió hosszú hullámhosszokon áteresztő szűrővel, 550 nm felett történt.

5.10 Mitokondriumok kimutatása C2C12 sejtekben

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

5.11 Kolokalizációs vizsgálat

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

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

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

5.12 A Szeptin7 filamentum vastagságának meghatározása

A Szeptin7 filamentum szerkezetében bekövetkezett változások számszerűsítését a Szeptin7 filamentumok vastagságának meghatározásával értékeltük a Ctrl C2C12 tenyészetek fluoreszcens képein. A C2C12 sejteket 24 órás FCF kezelés (Sigma, 100 μ M) után, az immuncitokémia fejezeten belül leírt módszer segítségével kezeltük, majd felvételeket készítettünk a mintákról az AiryScan 880 laser scanning konfokális mikroszkóp (Zeiss)

segítségével. Az így készült képeket elemeztük tovább. A Zen 3.5 Blue (Zeiss) szoftvert használtuk a képfeldolgozáshoz, ahol az egyes sejteken belül öt régiót választottunk ki véletlenszerűen, ezeken a jelölt Szeptin7 filamentumok fluoreszcencia intenzitásából határoztuk meg azok vastagságát.

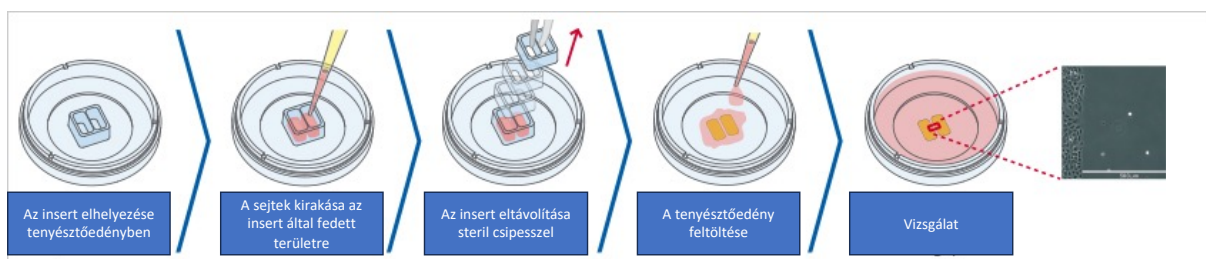
5.13 Fehérjekimutatás

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

5.14 A sejtmigráció vizsgálata

A sejteket (2×10^4) speciális inzerben (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) szélesztettük, és 24 órán át hagytuk a felülethez tapadni (14. ábra). Az inzer eltávolítása előtt Mitomycin C (Sigma) kezelést alkalmaztunk (10 μ g/uL, 2 óra), ezzel blokkolva a sejtek osztódását. Az inkubációt követően a Mitomycin C tartalmú oldatot eltávolítottuk, a sejteket PBS-el mostuk,

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



14. ábra: A migrációs esszé kivitelezésének sematikus ábrája. A sejteket a mérés előtti napon az ábrán látható inzerten belül szélesztettük, majd 20 óra elteltével a sejtekre Mitomycin tartalmú oldat került 2 órára. Az insert eltávolítása a felvétel előtt történt steril csipesz segítségével történt. Az eltávolítása után PBS-es mosás következett, mely folyamat után feltöltöttük a tenyésztőedényt a kísérleti célnak megfelelő tápoldattal.

Az egyes sejtek migrációjának elemzésére MathLab (MathWorks) alapú Cell Tracker képfeldolgozó szoftvert használtunk [42]. Kiszámoltuk a teljes megtett utat, a kiindulási ponttól maximálisan elért távolságot, az átlagos sebességet, valamint megjelenítettük az egyes sejtek migrációs útvonalait is. A 12 órás mérés során kiszámítottuk azon alkalmak számát, amikor a sejtek nem mozdultak el. Az egyes sejtek bármely irányú mozgását az eredeti felvételek 20 perces időablakaiban határoztuk meg. A sejteket akkor tekintettük mozgónak, ha elmozdulásuk bármely irányban meghaladta a sejt átmérőjét, ellenkező esetben nem mozgónak nyilvánítottuk az adott időtartamban.

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

A sejteket 20 percen keresztül töltöttük 37°C-on Fura-2-AM (Sigma) festék segítségével szérummentes tápoldatban (DMEM; 2,5 μM Fura-2-AM). Feltöltés után a sejteket Tyrode oldatban tartottuk (mM-ban: 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl_2 , 1,8 CaCl_2 , 11,8 Hepes és 1 g L^{-1} glükóz; pH 7,4). A Fura-2-t egy CoolLED pE-340fura fényforrással (CoolLED LTD, Andover, Anglia) gerjesztettük, ami ZEISS Axiovert 200m-es mikroszkóppal volt összekapcsolva. A

gerjesztési hullámhossz 340 és 380 nm között váltakozott, az emissziót 505-570 nm-es sáváteresztő szűrővel detektáltuk, a méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A képfelvétel és utófeldolgozás az AxioVision (rel. 4.8) szoftverrel (Zeiss) történt. A $[Ca^{2+}]_i$ -t reprezentáló fluoreszcencia hányadost a háttérkorrekciót követően a 340 és 380 nm-en készített képekből számítottuk ki. Ezekben a kísérletekben két objektívet használtunk, 10×-es (levegő) az adatgyűjtéshez és 40×-es (olajimmerziós) a reprezentatív képekhez.

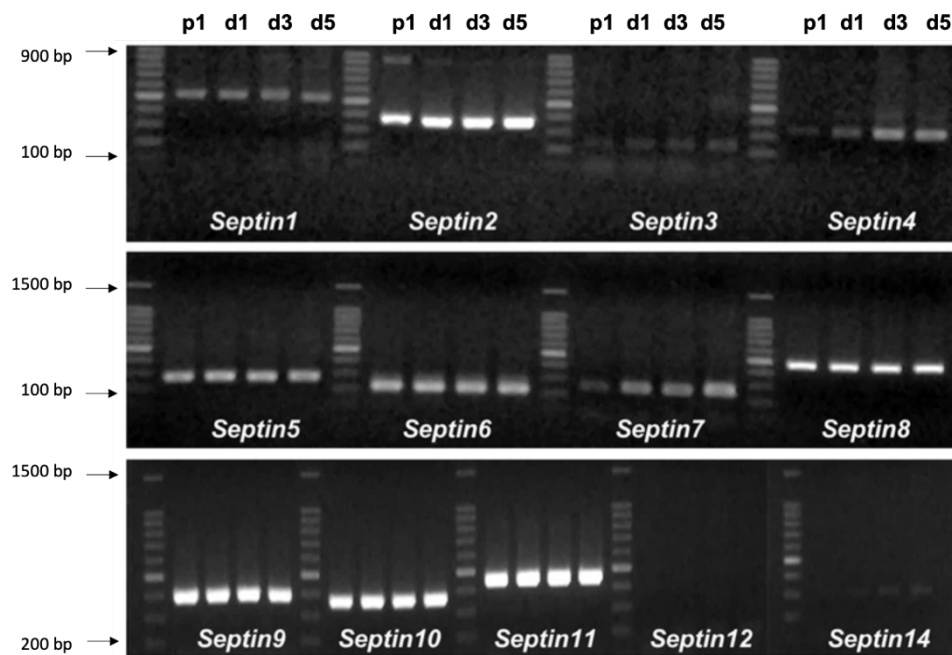
5.16 Statisztikai analízis és adatelemzés

Az összevont adatokat az átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formában fejeztük ki. Az adatcsoportok közötti különbségeket közönséges egytényezős ANOVA, Bonferroni post hoc többszörös összehasonlító teszt (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) és Student-féle t-teszt (kétmintás, kétoldali t-próba) segítségével értékeltük ki, ahol a 0,05-nél kisebb p-értékeket statisztikailag szignifikáns különbségnek tekintettük.

6 Eredmények

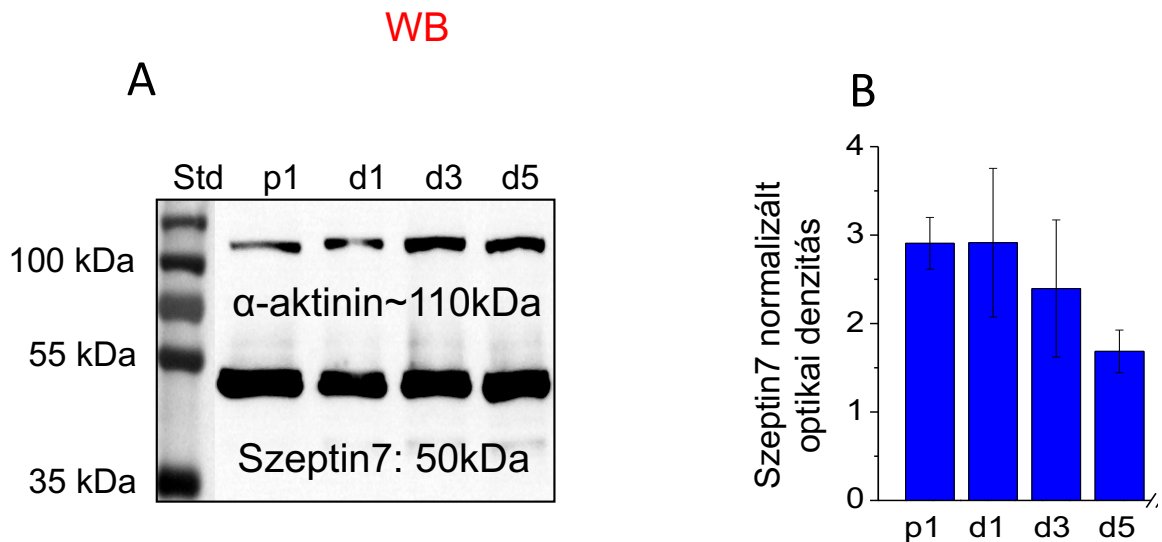
6.1 Különböző szeptinek kifejeződése C2C12 mioblasztokon és differenciált miotubulusokon

A szeptineket, mint a citoszkeletális rendszer meghatározó komponenseit eddig vázizom eredetű sejtekben nem vizsgálták [82,83]. A miogén eredetű C2C12 sejtekben a szeptinek adott csoportjaiba tartozó fehérjék mRNS-eit proliferáció és differenciálódás során egyaránt kimutattuk (15. ábra). A SEPT2 csoport (1,2,4,5) képviselőinek mRNS szintje esetén a *Szeptin1* alig fejeződött ki, a *Szeptin2* proliferáló és differenciáló mintákon egyaránt kimutatható volt, a *Szeptin4* differenciálódás függő expressziót mutatott és a *Szeptin5* is jelen volt. A SEPT3 (3,9,12) csoportból a *Szeptin3* alig fejeződött ki és a *Szeptin12* sem volt kimutatható, a *Szeptin9* viszont proliferáló és differenciáló mintákban egyaránt erős jeleket mutatott. A SEPT6 csoport tagjaiból (6,8,10,11,14) a *Szeptin14* nem amplifikálódott az általunk vizsgált mintákon, míg a többi fehérje mRNS-eit mind proliferáló és differenciáló mintákból ki tudtuk mutatni. Kiemelt jelentőségű a SEPT7 csoport egyetlen képviselőjének, a *Szeptin7*-nek a jelenléte, mivel ez a fehérje szükséges a szeptin komplexek képződéséhez. A *Szeptin7* mRNS-e proliferáló és differenciáló mintákban egyaránt detektálható volt. Mivel a szeptinek egymással különböző típusú makromolekuláris komplexeket és hetero-oligomereket képeznek, így az adott csoportba tartozó szeptin fehérjék jelenléte kritikus a megfelelő fehérjekomplex szerveződéséhez [35,56,84].



15. ábra: Különböző szeptinek expressziója mRNS szinten C2C12 sejtenyészetben. A C2C12 sejteket szélesztettük, majd adott időpontokban a tenyészeteket learattuk a módszerekben leírt protokoll szerint Trizol segítségével. A különböző állapotok az alábbiak voltak: p1: proliferáló mioblasztok, d1, d3, d5: a képződő miotubulus a differenciálódás 1, 3 és 5 napján. RNS izolálást követően az 1. táblázatban meghatározott primerek segítségével a mintákkal RT-PCR reakciót végeztünk, mely kvalitatív elemzés eredményei az ábrán láthatók.

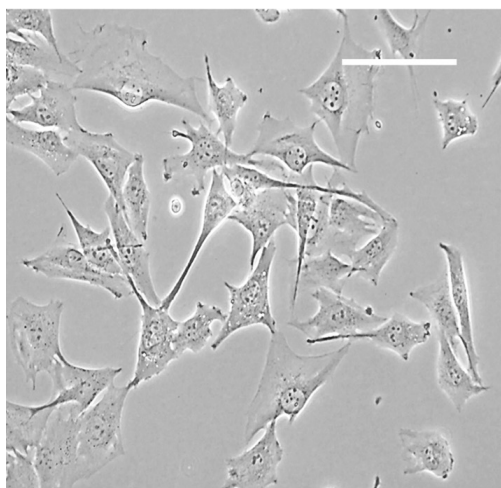
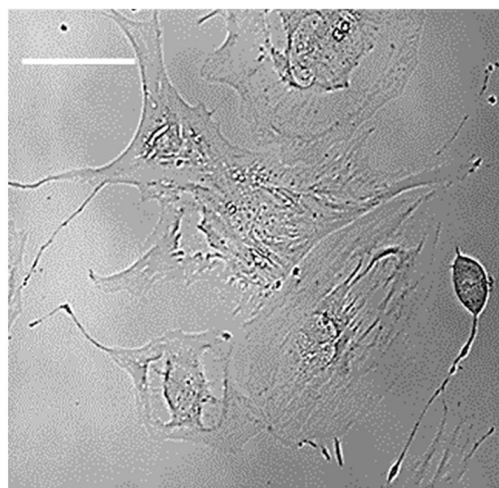
Részletesebben a Szeptin7 kifejeződését vizsgáltuk fehérje szinten is a C2C12 tenyészetek különböző fejlettségi állapotaiban. Eredményeink alapján kimutattuk a Szeptin7 fehérje jelenlétét mind a proliferációs, mind a különböző differenciálódási napokon (16. ábra). A szemi-kvantitatív adatok alapján, α -aktininre történő normalizálás után a Szeptin7 fehérje expressziós szintje a differenciálódás előrehaladtával csökkenő tendenciát mutat C2C12 miotubulusokban, mely a 16. ábra (B) paneljén látható.



16. ábra: Ontogenezis-függő Szeptin7 fehérje expresszió proliferáló és differenciált C2C12 sejtekben. Reprezentatív Western Blot eredmény (A). A C2C12 sejteket szélesztettük és adott napokon a mintákat fehérjekimutatás céljából arattuk le. A mintákat a Fehérjekimutatás fejezetben leírtak alapján kezeltük, majd WB során, Szeptin7 (1:250) és α -aktinin (1:250) specifikus primer, valamint megfelelő szekunder antitestekkel történő inkubáció után a lumineszcens jeleket detektáltuk. A Szeptin7 denzitometriás (A) értékek normalizálása az α -aktininre és ennek ábrázolása (N=3) (B).

6.2 A Szeptin7 elengedhetetlen a C2C12 sejtek osztódásához

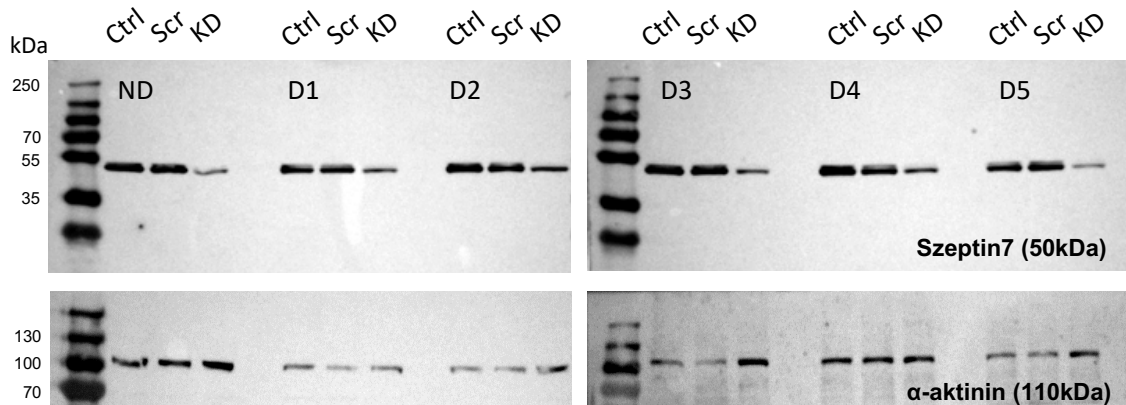
A Szeptin7 szerepének feltérképezéséhez első lépésként genetikai módosítással kívántuk megváltoztatni az általunk használt sejtekben a fehérje kifejeződését. A Szeptin7 expressziót C2C12 sejtekben először CRISPR/Cas9 technikával terveztük gátolni (17. ábra, illetve a metodika génkiütéses szakasza). Ez a kísérleti megközelítés abnormális sejtmérethez vezetett, ráadásul a sejtek osztódása leállt, amit a nagyméretű, több sejtmagot tartalmazó, egymástól nem elváló sejtek szemléltetnek (17. ábra, B). Egy kultúra esetében sem sikerült 8-10 sejtmagot tartalmazó állapotot követően további sejtosztódást elérnünk. Ez egyrészt arra utal, hogy a Szeptin7 jelenléte elengedhetetlen a C2C12 sejtek osztódásához, másrészt viszont más génmódosítási módszer alkalmazását tette szükségessé további kísérleteinkben, hogy fenntartható sejtvonalat generáljunk a Szeptin7 szerepének vizsgálatára.

A**B**

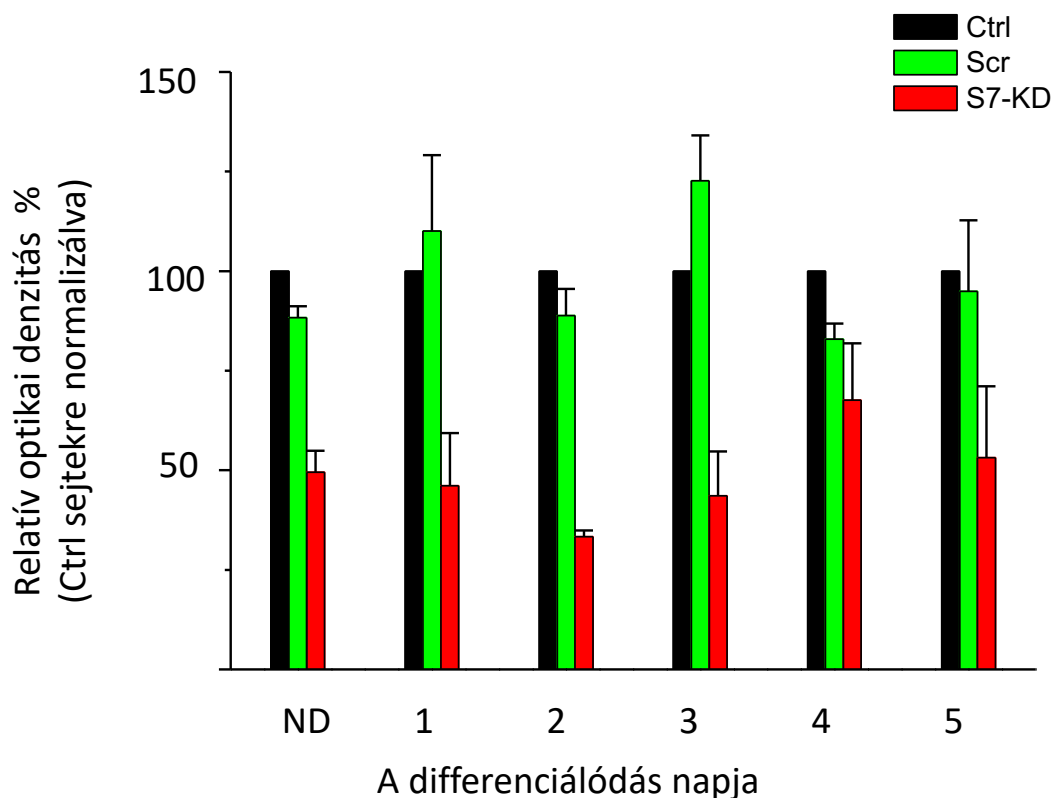
17. ábra: Kontroll (Ctrl, A), kezelés nélküli, illetve Crispr KO és HDR plazmidokkal transzfektált, majd FACS Aria áramlási citométerrel szortolt C2C12 sejtek (B) transzmissziós mikroszkópos képei azt mutatják, hogy a Szeptin7 expresszió feltételezett teljes gátlása C2C12 sejtekben megakadályozza a megfelelő proliferációt. A skála 50 μm mind a két panel esetében.

6.3 A Szeptin7 fehérje expresszió csökkentésének hatása C2C12 sejteken

A Szeptin7 csökkent expresszióját C2C12 mioblasztokban shRNS-közvetített géncsendesítéssel értük el. A knockdown (S7-KD) sejtek csökkent Szeptin7 fehérjeszintje kimutatható volt (18-19. ábra) az abszolút kontrollhoz (Ctrl), illetve a kevert *Szeptin7* szekvenciájú (Scr) shRNS-transzfektált sejtekhez képest, ráadásul ez a változás megmaradt a differenciálódási folyamat során is. A Szeptin7 fehérje kifejeződésében kb. 50%-os csökkenést sikerült elérni géncsendesítés során.



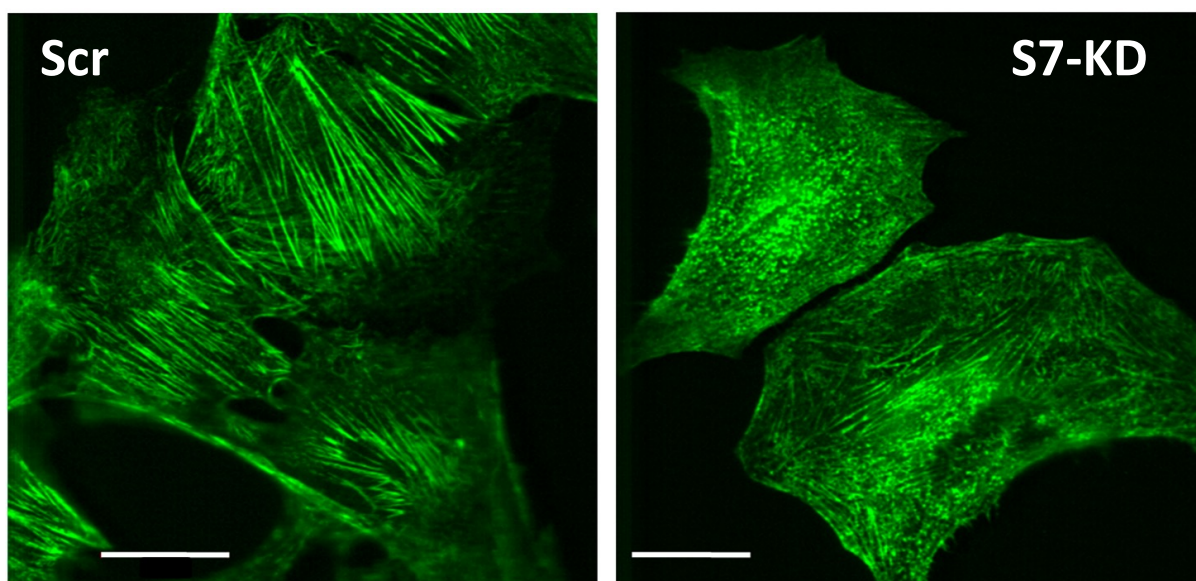
18. ábra: A Szeptin7 fehérje (50 kDa) módosított expresszióját követtük a Ctrl, Scr és S7-KD sejtek (ábrán KD jelöléssel) differenciálódási folyamata során. Az ND a nem differenciált, a D1–D5 a megfelelő napokat (1–5) jelenti a differenciálódás kezdetét követően. A létrán megadott méretek kDa mértékegységben vannak megadva. A Ctrl, Scr és az S7-KD sejtekből minden esetben 8 μ g fehérjemintát vittünk fel az SDS-PAGE gélre, majd elektroforézist és nitrocellulóz membránra történő blottolást követően, a Szeptin7-t (50 kDa) és az α -aktint (110 kDa) a megfelelő primer antitestekkel történő jelöléssel vizsgáltuk.



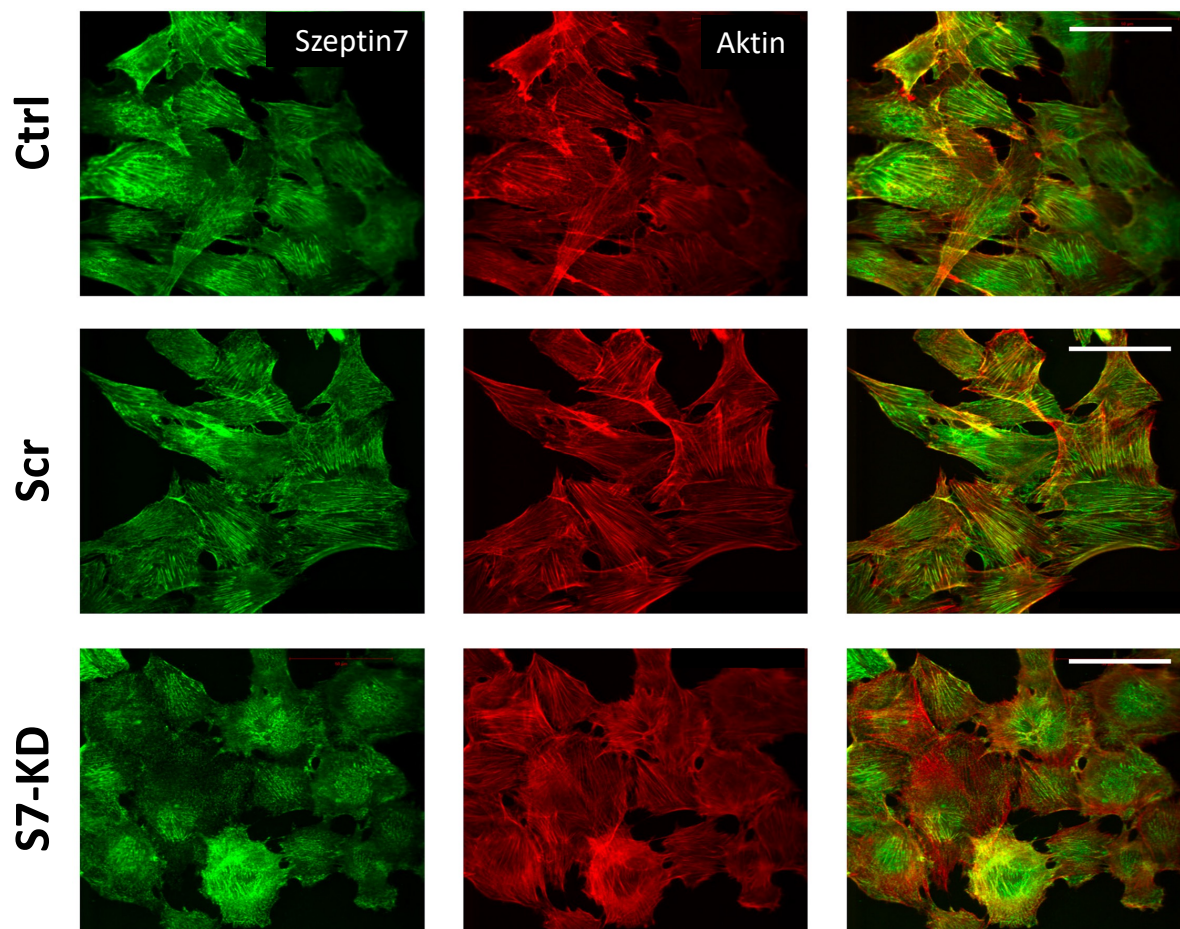
19. ábra: A Szeptin7 fehérje (50 kDa) expressziójának változását nyomon követtük a Ctrl, Scr és S7-KD sejtek differenciálódási folyamata során. Az ND a nem differenciált, a D1–D5 a megfelelő napokat (1–5) jelenti a differenciálódás kiváltását követően. Az ábrán a 18. ábrán bemutatott kísérlet adataiból származó, relatív optikai denzitás értékei láthatók, mely szerint a Ctrl sejtekhez képest kb. 50%-os Szeptin7 expresszió csökkenést sikerült elérnünk ($N=3$, Western Blot adatok).

6.4 A Szeptin7 csendesítése hatással van a C2C12 sejtek morfológiájára

Már a géncsendesített sejtek fénymikroszkópos nyomonkövetésénél is megfigyelhető volt, hogy a Szeptin7 fehérje kifejeződésének csökkentése jelentős változásokat eredményezett a sejtek megjelenésében és alakjában egyaránt. Ennek további vizsgálatára a Scr és S7-KD sejteken specifikus immunjelölést végeztünk Szeptin7-re és a sejtalakot alapvetően befolyásoló aktinra (F-aktin) (20-21. ábra). A Ctrl és Scr sejtekben megfigyelhető jellegzetes Szeptin7 filamentum szerkezet a legtöbb S7-KD sejtben eltűnt, helyette a fehérje fragmentált, pontszerű megjelenését figyeltük meg (20. ábra). A Ctrl és a Scr tenyészetekben a Szeptin7 és az aktin filamentumok erősen kolokalizáltak voltak, míg a S7-KD sejtekben (21. ábra) ez a térbeli átfedés nem jellemző, bár a sejteken belüli aktin szerkezete többnyire változatlanak tűnt.

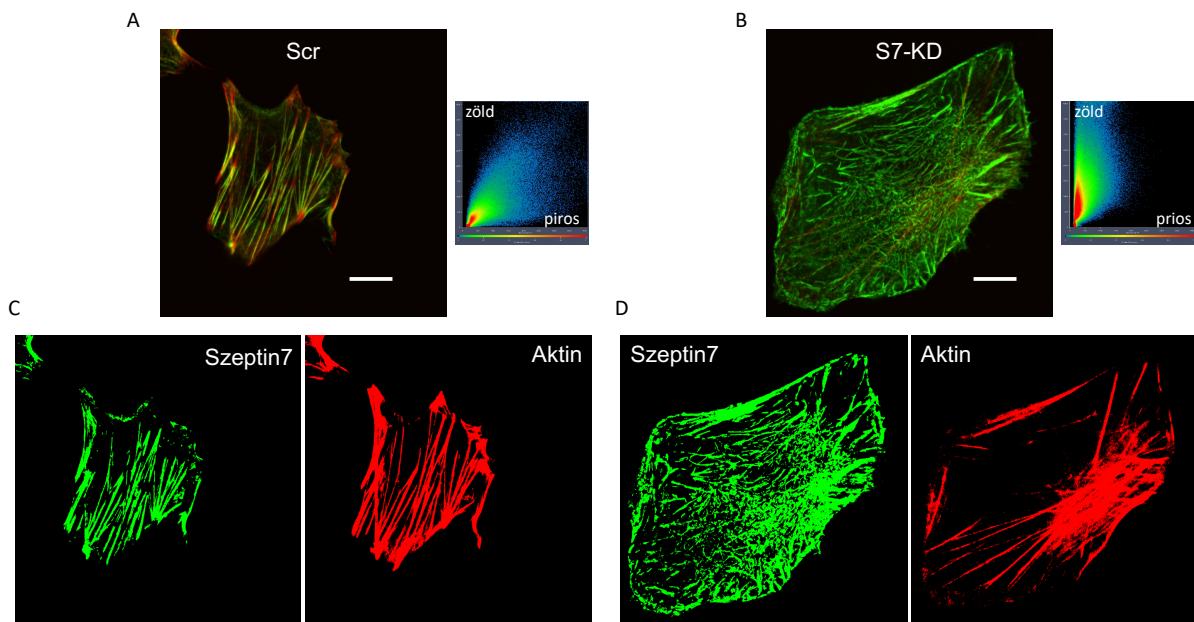


20. ábra: A Szeptin7 filamentumok immunjelölése proliferáló Scr (bal) és S7-KD sejtekben (jobb), amely a filamentum szerkezetének, méretének és alakjának megváltozását mutatja. A skála hossza 20 μm .



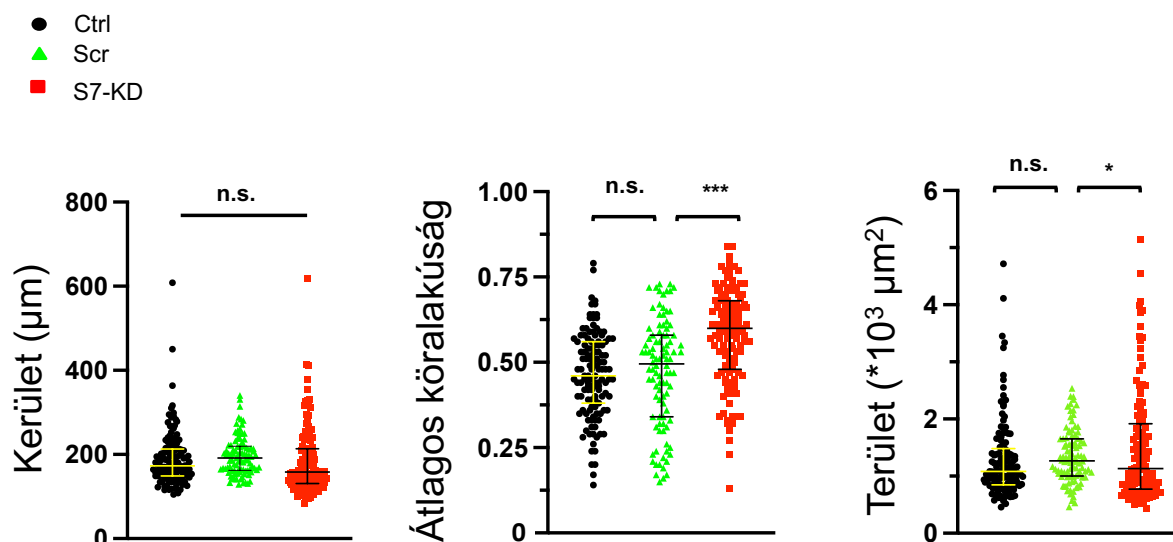
21. ábra: A Szeptin7 (zöld) és az aktin (piros) filamentumok intracelluláris lokalizációja külön-külön, és együtt (harmadik oszlop) proliferáló Ctrl, Scr és S7-KD C2C12 sejtekben. A skála hossza 50 μ m.

Ahhoz, hogy a Scr és S7-KD sejtekben a Szeptin7 filamentumok elrendeződését még szemléletesebben mutassuk, egy maszkolási eljárást alkalmaztunk, melynek részletei a 22. ábrán láthatók. A két sejtípus (Scr és S7-KD) között nemcsak a sejt morfológia változásai mutatkoznak meg, hanem a Szeptin7 filamentózus szerkezetének jelentős különbsége is jól körül határolható. A Scr (A) és S7-KD sejteken (B) jelölt Szeptin7 (zöld) és aktin filamentumok (piros) jól szemléltetik az adott fehérjét reprezentáló intenzitások aszimmetrikus eloszlását az S7-KD sejtek esetében, ellentétben a Scr sejteken megfigyelhető, egyenletes citoplazmatikus megjelenéssel. Az egyedi színekkel készült képek (C, D) a különálló csatornák küszöbértékével készültek. A két tenyészet esetében, a maszkolást követően kolokalizációs elemzést is végeztünk, ennek alapján a Pearson-féle együttható kisebb volt a S7-KD sejtekben (0,648), mint az Scr C2C12 sejtek esetében (0,833).



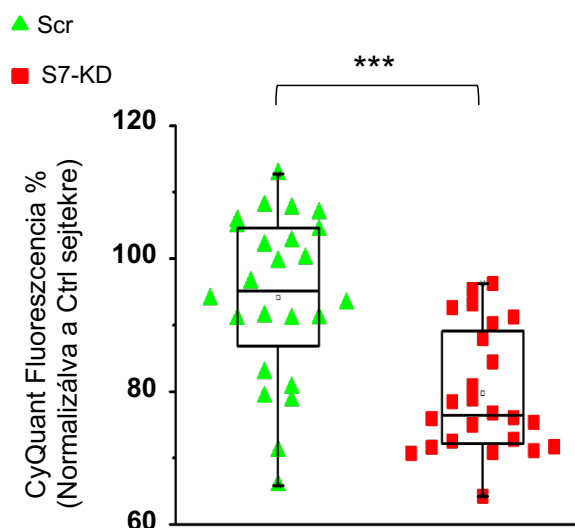
22. ábra: Reprezentatív konfokális képek a Szeptin7 (zöld) és az aktin (piros) filamentumokról egy proliferáló Scr (A) és egy S7-KD (B) C2C12 mioblaszt sejtben, ahol kolokalizációs elemzést végeztünk. A Pearson-féle kolokalizációs együttható kisebb volt az S7-KD (B, 0,648), mint a Scr (A, 0,833) sejt esetében. A sejtek eredeti egyesített képeiből a Szeptin7 (zöld színnel) és az aktin filamentumok (piros színnel) külön-külön vannak ábrázolva a Scr (C) és az S7-KD (D) sejtek esetében. Az intenzitások aszimmetrikus eloszlása az S7-KD sejtek esetében egyértelműen azonosítható. A filamentumképek (C, D) a különálló csatornák küszöbértékének meghatározásával készültek. Az (A) és (B) panelekben a méretarányos sáv 10 μm -nek felel meg.

A sejt morfológiában bekövetkezett változások kvantitatív jellemzéséhez az ImageJ program segítségével meghatároztuk a fent említett sejt kultúrákban az egyedi sejtek területét, kerületét, és az ezekből számolt kör alakúságot (cirkularitást) is. A cirkularitás egy mértékegység nélküli szám 0 és 1 között, amelyet a $(4\pi \times \text{terület} / \text{kerület}^2)$ képlettel számol ki a program. A S7-KD sejtek átlagos területe szignifikánsan magasabb volt a Scr tenyészet megfelelő paraméteréhez viszonyítva (23. ábra). A meghatározott cirkularitás adatok azt mutatják, a S7-KD sejtek inkább hasonlítanak a kör alakhoz, mint a Scr sejtek. Ez az eredmény jól korrelál korábbi megfigyeléseinkkel, miszerint a S7-KD sejtek kevesebb nyúlvánnyal rendelkeztek (lásd 20. és 21. ábra). A fentiekkel ellentétben a S7-KD sejtek kerülete szignifikánsan nem különbözik a Scr és Ctrl sejtektől (23. ábra). Az itt bemutatott sejt morfológiai paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget a Ctrl és Scr sejtek között, így a S7-KD sejtekben való eltérések kialakításában a csökkent Szeptin7 kifejeződés jelentős szereppel bír. A Szeptin7 expresszió csökkenése feltehetőleg a szeptinek magasabb rendű szerkezeteit is károsan érinthette.



23. ábra: A sejtmorfológia változásainak számszerűsítése, mely során a tenyészetek kerületét, átlagos köralakúságát és területét vizsgáltuk. A vizsgált sejtek száma Ctrl sejtek esetén 127, Scr-ben 96, S7-KD tenyészetekben 121 volt; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; a kísérletet kétszer ismételtük meg ($N=2$). A kísérleti eredmények alapján a kerületben nem találtunk szignifikáns eltérést a tenyészetek között. Fontos megfigyelés, hogy az S7-KD sejtek kevesebb nyúlvánnyal rendelkeztek, amit az átlagos köralakúságban tapasztalt különbség is jól mutat. A sejtek átlagos területe esetén az S7-KD sejtek nagyobb területtel rendelkeztek. A képek feldolgozása az ImageJ szoftver segítségével történt. Az ábrákon a vonalak a mediánt az interkvartilis intervallummal ($Q1$ és $Q3$) jelölik.

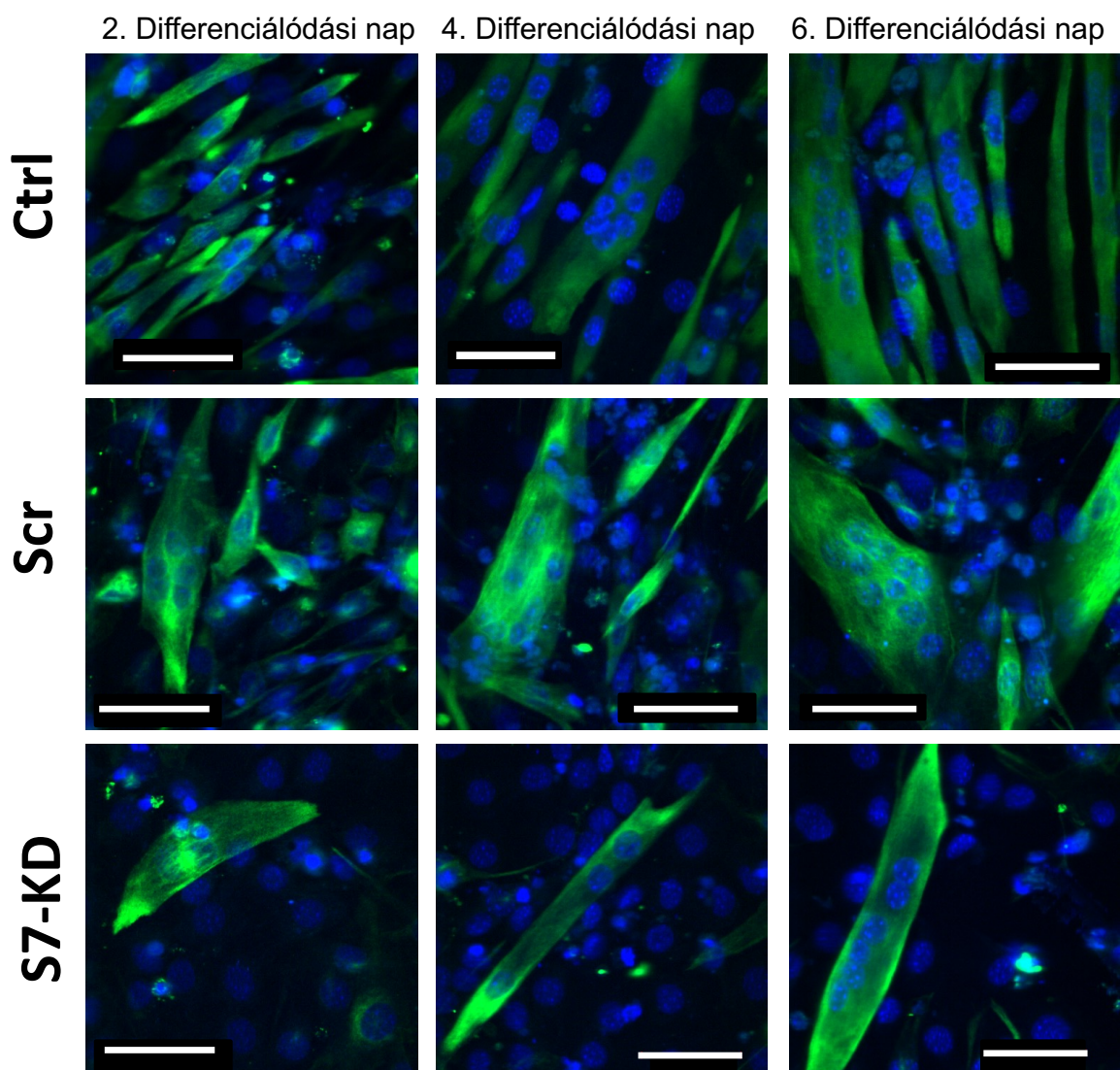
A Szeptin7 sejtosztódásban betöltött szerepét már számos más sejttypusban leírták, nemcsak emlős, hanem élesztő sejtekben is. A mioblasztok proliferációs kapacitását több napon keresztül teszteltük, eredményeink szerint szignifikánsan csökkent a sejtosztódás a Szeptin7 módosított sejtekben (24. ábra). Ez jól korrelál a sejtek tenyésztésénél tett megfigyeléssel, miszerint azonos sejtszámból kiindulva a S7-KD sejtek minden esetben később érték el a konfluens állapotot, mint a Scr vagy Ctrl tenyészetek.



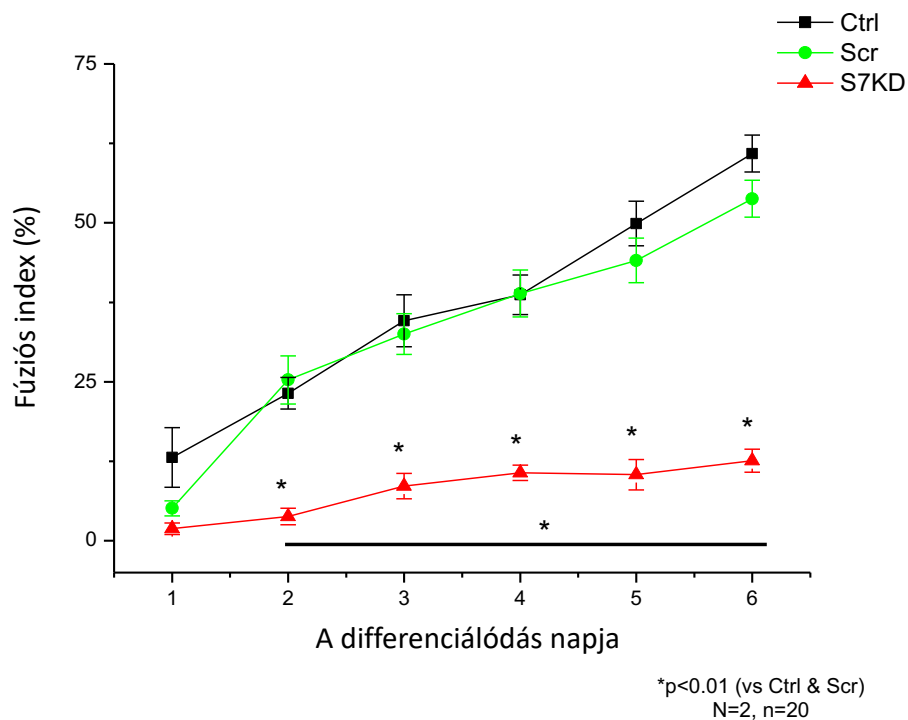
24. ábra: A sejtproliferációs vizsgálatok eredményei. Csökkent proliferáció tapasztalható 3 nappal a szélesztés után, CyQUANT fluoreszcenciaként értékelve (3 kísérlet eredményeiből, $n=24$ /tenyészet, ahol egy szimbólum egy 96-well lyuk mérési eredményét mutatja (** $p<0,001$)).

6.5 A Szeptin7 fehérje létfontosságú a C2C12 sejtek differenciálódásához

A különböző tenyészetek fáziskontraszt mikroszkópban történő nyomonkövetése során a másik fontos megfigyelésünk az volt, hogy a tenyészetek differenciálódása során a miotubulusok képzése is jelentősen módosult a Szeptin7 géncsendesítést követően. Ennek pontos meghatározására a differenciálódás különböző napjain fixáltuk a tenyészeteket és ezeken immunfestéssel jelöltük a dezmin fehérjét, ami csak a mioblasztok fúzióját követően figyelhető meg C2C12 tenyészetekben, ott is kizárólag a többmagvú miotubulusokban [85]. A miotubulusok képződését a fúziós index kiszámításával jellemeztük, ami azt jelenti, hogy milyen arányban találtunk sejtmagokat a többmagvú, terminálisan differenciált miotubulusokban a teljes tenyészetben. A differenciálódás második napjától kezdődően növekvő miotubulus képződés volt megfigyelhető a Ctrl és a Scr tenyészetekben, míg a S7-KD tenyészetekben csak elhanyagolható sejtfúzió volt kimutatható, még a kísérlet 6. napján is (25. ábra). A folyamat kvantitatív jellemzése végett meghatároztuk az egyes tenyészetekben az adott differenciálódási napokon a fúziós indexet és ezt az idő függvényében ábráztuk. Mint azt a 26. ábra szemlélteti, a Ctrl és Scr tenyészetek esetében folyamatosan emelkedő értékeket kaptunk, ami az egyre előrehaladottabb differenciáltsági fokot (nagyobb számú miotubulusban lévő magszámot) prezentál. Ezzel ellentétben a S7-KD tenyészetekben már a második differenciálódási naptól szignifikánsan alacsonyabb fúziós indexet kaptunk, ami a miotubulus-képzés visszamaradott volta utal.



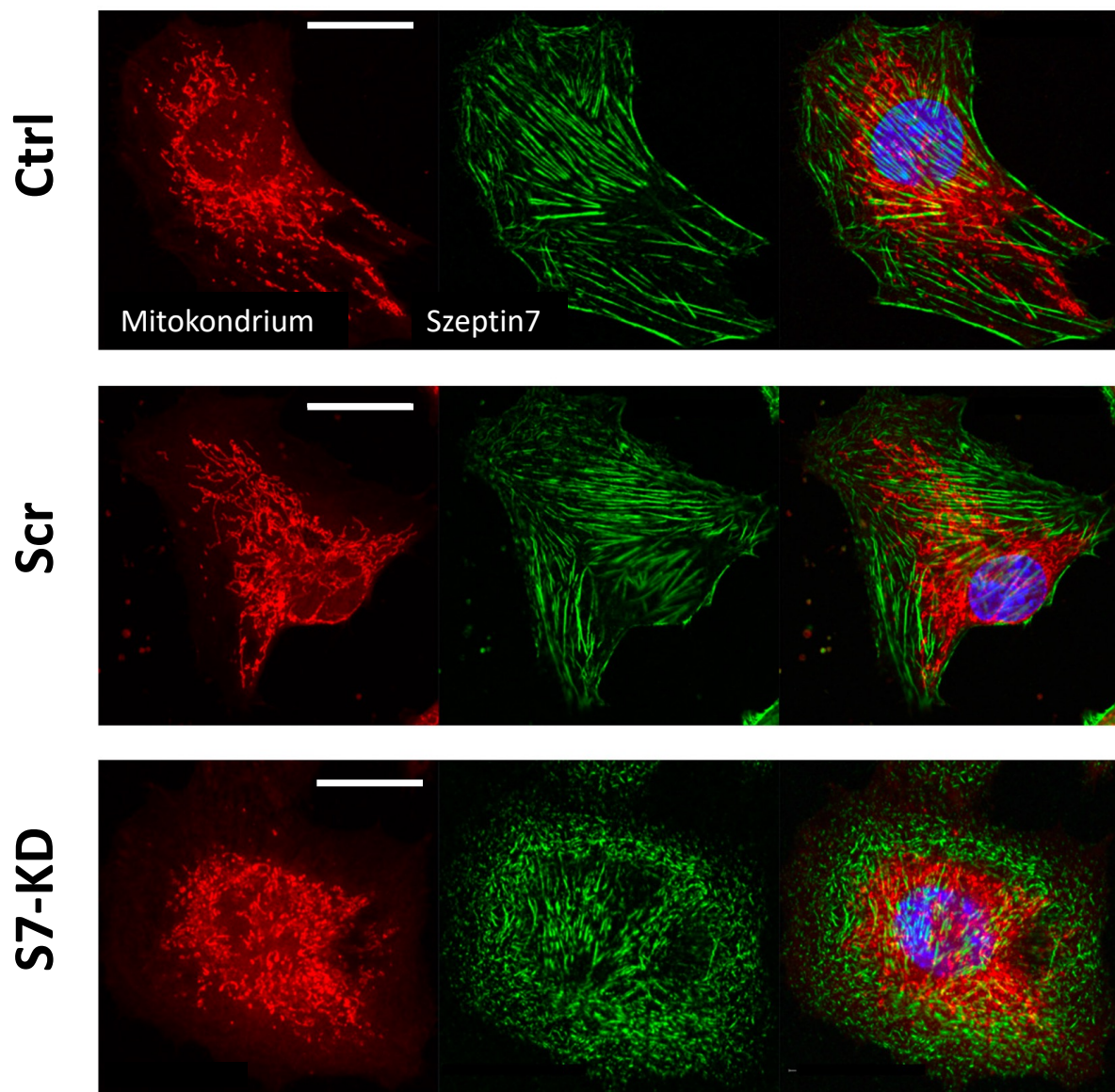
25. ábra: Reprezentatív konfokális képek differenciált Ctrl, Scr és S7-KD tenyészetekről. A kísérlet során a differenciálódási folyamat során naponta immuncitokémiai jelölést végeztünk, így sejtvonalanként 6 különböző állapotot vizsgáltunk. A miotubulusokban expresszálandó dezmin fluoreszcensen jelöltük specifikus antitesttel (dezmin, 1:250, másodlagos antitest: Alexa Fluor 488 (zöld), 1:1000), a sejtmagokat pedig DAPI-val (kék) festettük. A skála hossza 50 μm .



26. ábra: A 6 napos tenyésztés alatt a differenciálódást a fúziós index kiszámításával értékeltük a Ctrl (fekete), Scr (zöld) és S7-KD kultúrákban (2 párhuzamos kísérletből, minden differenciálódási napon 20 véletlenszerű látótér vizsgálatával). Az ábrán lévő vízszintes vonal azt mutatja, hogy hol volt statisztikailag szignifikáns a különbség a Scr és az S7-KD sejtek között (* $p < 0,05$ a t-tesztből). A Ctrl és Scr minták esetében hasonló, szignifikánsan nem különböző fúziós index értékeket kaptunk.

6.6 A Szeptin7 hatása a C2C12 sejtek mitokondriális hálózatára

A szeptinek szerepét a különböző sejtek mitokondriális hálózatának kialakításában már több alkalommal is elemezték [86,87]. Az eddigi tudományos eredményeket alapul véve feltételeztük, hogy a Szeptin7 expressziójának változása hatással lehet a mitokondriális morfológiára géncsendesített C2C12 sejtekben [88]. Élő sejteken kivitelezett MitoTracker Red CMXR-al történő festést követően azt tapasztaltuk, hogy a S7-KD sejtekben nemcsak a Szeptin7 filamentózus szerkezete különbözött a Ctrl és Scr tenyészetektől, hanem a mitokondriális hálózatot is jelentősen érintette a *Szeptin7* gén csendesítése (27. ábra). A Ctrl és Scr tenyészeteken megfigyelhető, kiterjedt mitokondriális "hálózat" jelentősen beszűkült és módosult összetettséget mutatott a S7-KD sejtekben. Ez arra utalhat, hogy a citoskeletális szeptin rendszer a mitokondriális rendszer felépítésében és struktúráltságának megtartásában is jelentős szerepet vállalhat a mioblasztokban.

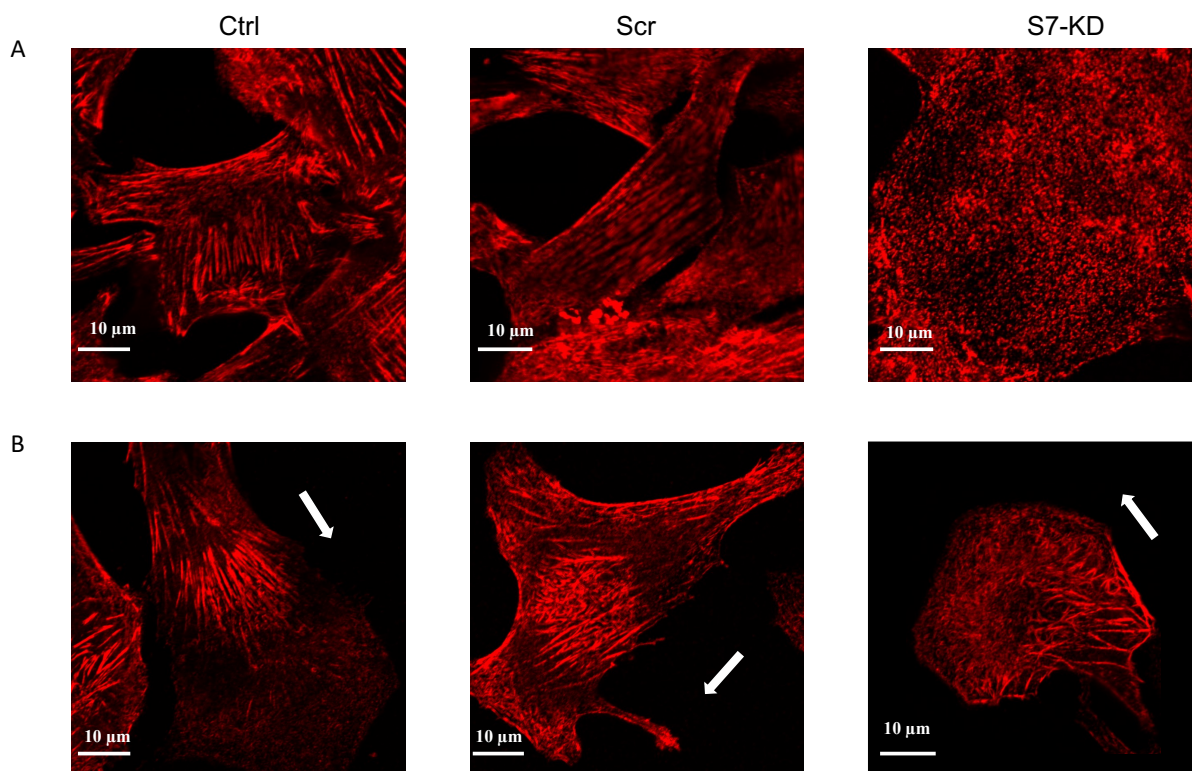


27. ábra: A mitokondriális hálózat és a szeptin filamentumok megváltozása Szeptin7 géncsendesítést követően C2C12 tenyészetekben. A reprezentatív képek a fluoreszcensen jelölt mitokondriumokat (piros) és a Szeptin7 fehérjét (zöld) mutatják a Ctrl, a Scr és a S7-KD proliferáló mioblasztokban. A magok DAPI-vel vannak jelölve (kék). A skála 20 μm -t jelent.

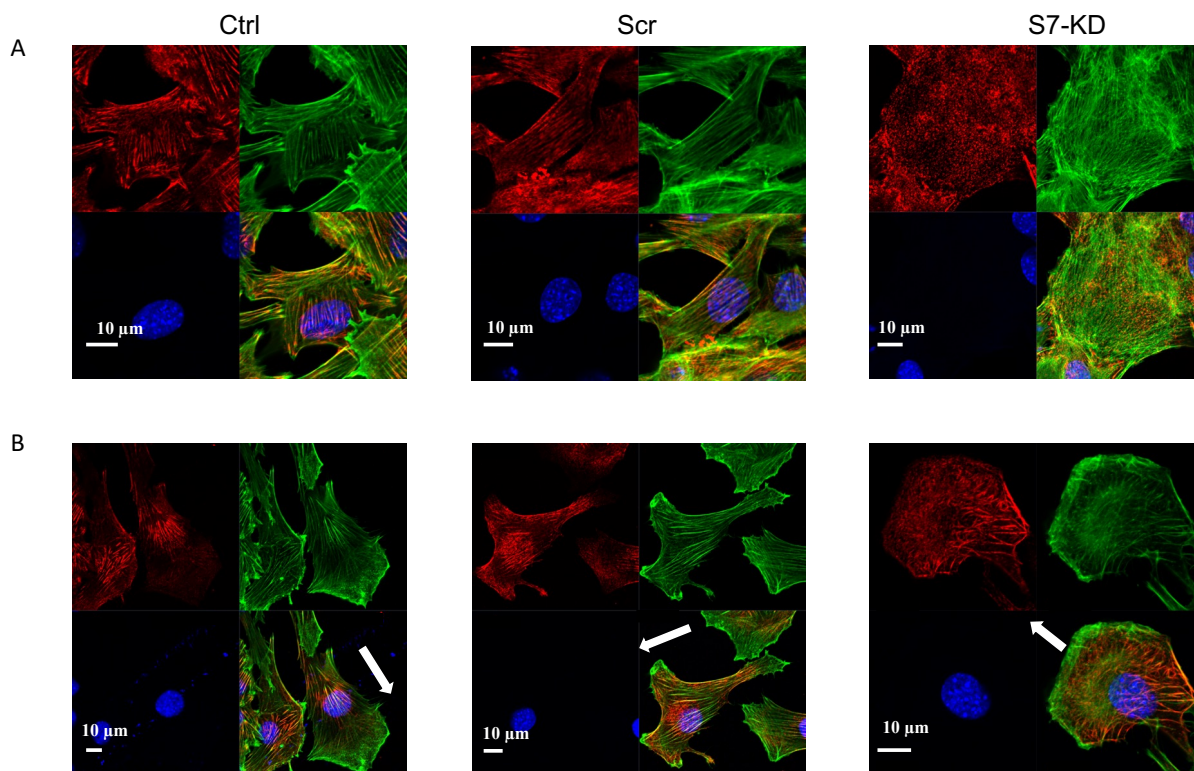
6.7 A Szeptin7 eltérő elrendeződést mutat migráló és nem migráló sejtekben

A vázizom fejlődése és az izomsérülés utáni regeneráció során a miogén sejteknek és előalakjainak az adott helyre való jutása kiemelt jelentőségű, hiszen így tud később funkcionális izomrost képződni [17]. A sejtek migrációja a citoszkéletális rendszerük átszerveződésével jár együtt. Kísérleteink során a Szeptin7 fehérje migráció alatti változásait vizsgáltuk.

Bebizonyítottuk, hogy a Szeptin7 és az aktin filamentumok, mely utóbbi szabályozó szerepe jól ismert a sejtmozgásban, kolokalizálódnak C2C12 sejteken (21. és 22. ábra). A Szeptin7 fehérje szerkezeti átrendeződéséről a mioblasztok mozgása során azonban még nem állt rendelkezésre információ. Nem migráló sejtekben a Szeptin7 filamentszerű megjelenését mutattuk ki (28. ábra, A), a migráció során viszont ez a kifejeződési forma megváltozott, és jól szervezett szerkezeti egységek alakultak ki (28. ábra, B), melyek elsősorban a sejtprojekciókban, és a hátulso éleken voltak megfigyelhetők. Mivel a géncsökkentés során megközelítően 50%-os csökkenést sikerült elérni, így alapvetően az S7-KD sejtek is képesek Szeptin7-et termelni, és az ezen fehérjét tartalmazó filamentumok megjelenése még a migráló S7-KD sejtek esetében is kimutatható a sejtnyúlványokban (28. ábra, B). Migráció során a Szeptin7 megváltozott megjelenésével párhuzamosan az aktin rendszer is átszerveződött mindegyik vizsgált sejt típusban (29. ábra).

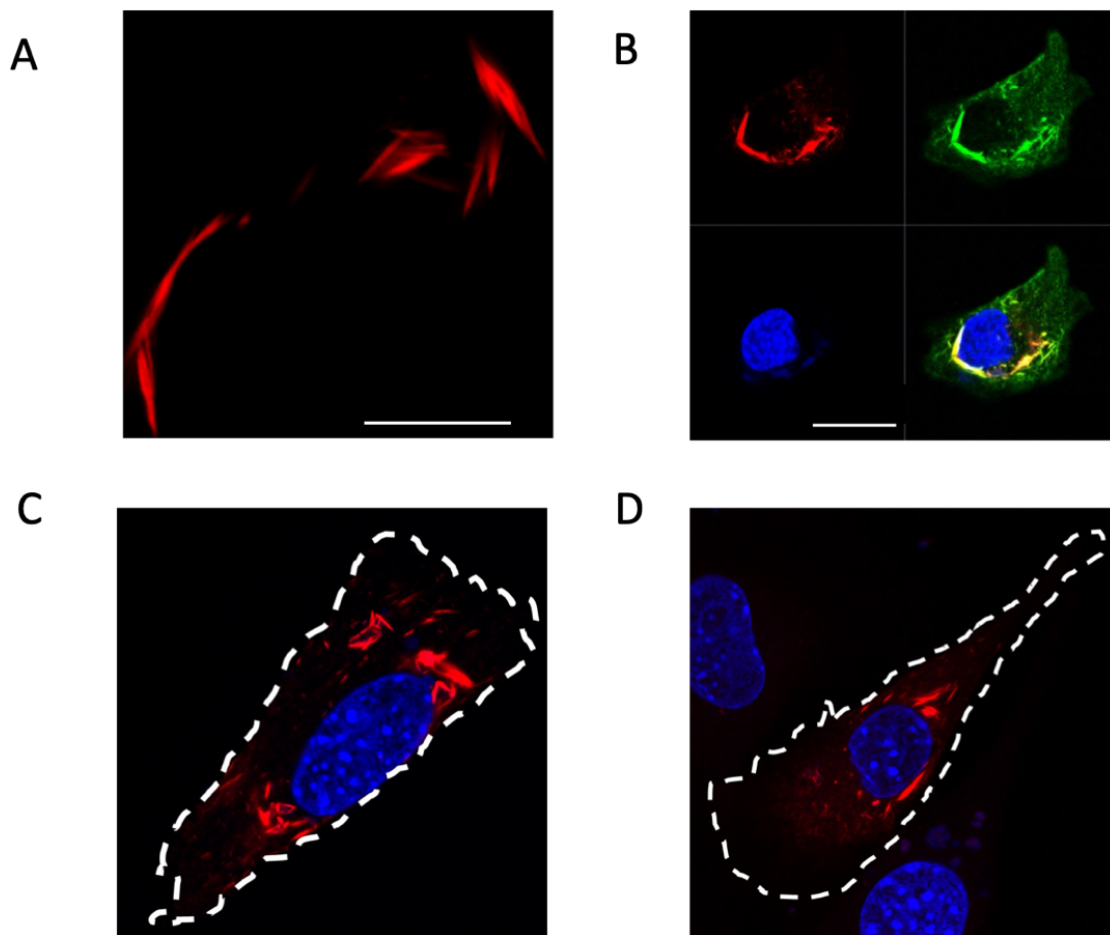


28. ábra: A Szeptin7 kimutatása immunjelöléssel nem migráló (A) és migráló (B) mioblasztokban. A Szeptin7-et tartalmazó citoszketalális filamentumokat anti-Szeptin7 antitesttel és a megfelelő Cy3-mal jelölt másodlagos antitesttel (piros) vizsgáltuk kontroll (Ctrl), Scrambled shRNS-transzfektált (Scr) és a Szeptin7-knockdown (S7-KD) C2C12 mioblasztokban. Az egyes tenyészetek nem migráló (A) és migráló (B) régiójában lévő sejtekből származó immunfluoreszcens jeleket nagy felbontásban detektáltuk a Zeiss Airyscan konfokális mikroszkóp segítségével, 40x olajimnerziós objektívvel és 535 nm-es gerjesztési hullámhosszal. A skála hossza 10 μm. A B panel ábráin a nyilak a migráció irányát jelölik.

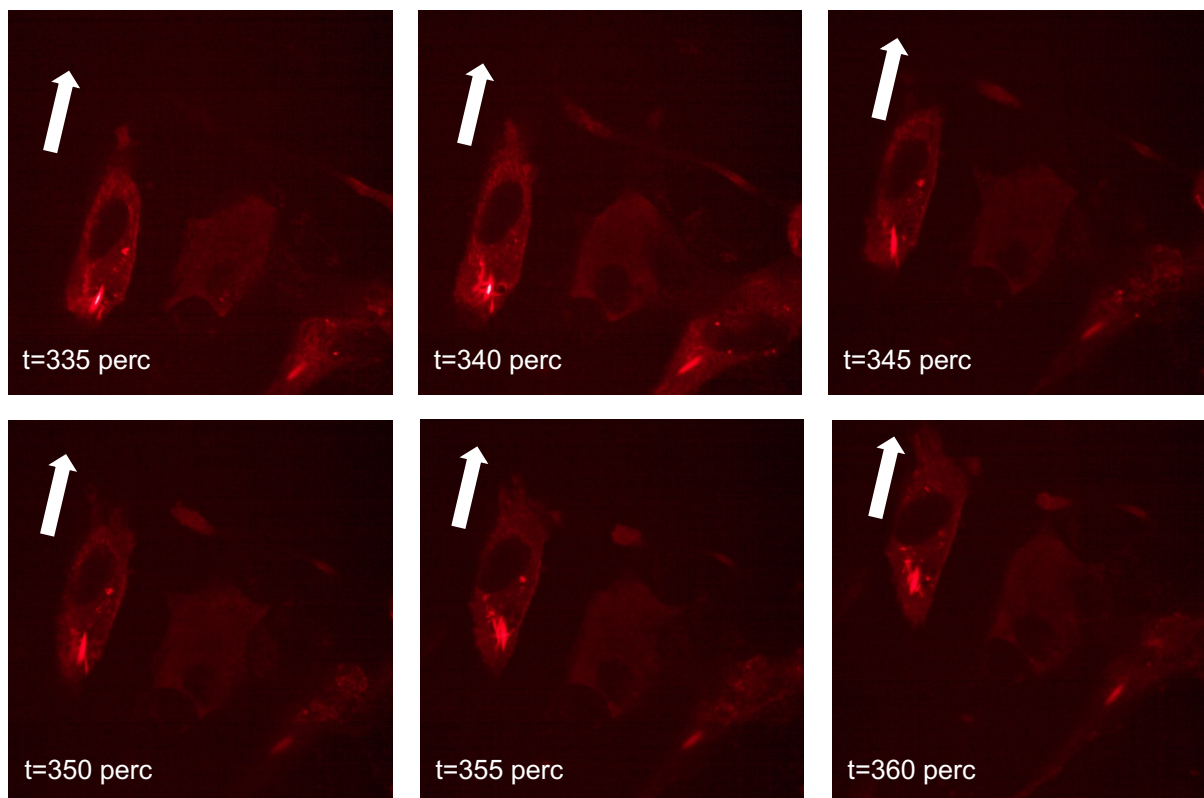


29. ábra: A 28. ábra aktinnal kiegészített része. A Szeptin7-et tartalmazó citoskeletális filamentumokat anti-Szeptin7 antitesttel és a megfelelő Cy3-jelölt másodlagos antitesttel vizsgáltuk kontroll (Ctrl), shRNS-transzfektált (Scr) és S7-KD C2C12 mioblasztokban. Az aktin filamentumokat FITC-jelölt phalloidinnal, míg a sejtmagokat DAPI-val festettük. Az egyes kultúrák nem migráló (A) és migráló (B) régiójában lévő sejtek immunfluoreszcens jeleit konfokális mikroszkóppal detektáltuk 40x olajimmerziós objektívvel. A Szeptin7 (piros), az aktin (zöld), illetve a sejtmagok (kék) láthatóvá tételéhez 535, 488 és 405 nm gerjesztési hullámhosszakot használtunk. A B panel ábráin a nyilak a migráció irányát mutatják. A méretarányos sávok 10 μm -t jelentenek.

Ahhoz, hogy a Szeptin7 fehérje megjelenését időben is nyomon tudjuk követni, a következő kísérletet élő sejteken végeztük. Fluoreszcensen tag-elt Szeptin7-N-mCherry fehérje exogén plazmidról történő expresszióját, valamint ennek sejtben történő megjelenését Opera Phenix képalkotó rendszer segítségével követtük nyomon. Az újonnan képződött Szeptin7 filamentózus megjelenést mutatott (30. ábra) normál tenyésztési körülmények között, immunjelölést követően pedig meg tudtuk különböztetni a plazmidról expresszálandó fluoreszcens filamentumokat az endogén módon képződőktől (30. ábra, B). Ezenkívül a fúziós fehérje kifejeződését vándorló C2C12 mioblasztokban is nyomon követtük (31. ábra). Az 5 percenként készített felvételek alapján a Szeptin7 filamentumok folyamatosan változó mintázatát észleltük, ami egyértelmű bizonyítéka volt a Szeptin7 filamentumok migráció során bekövetkező változásainak (31. ábra).



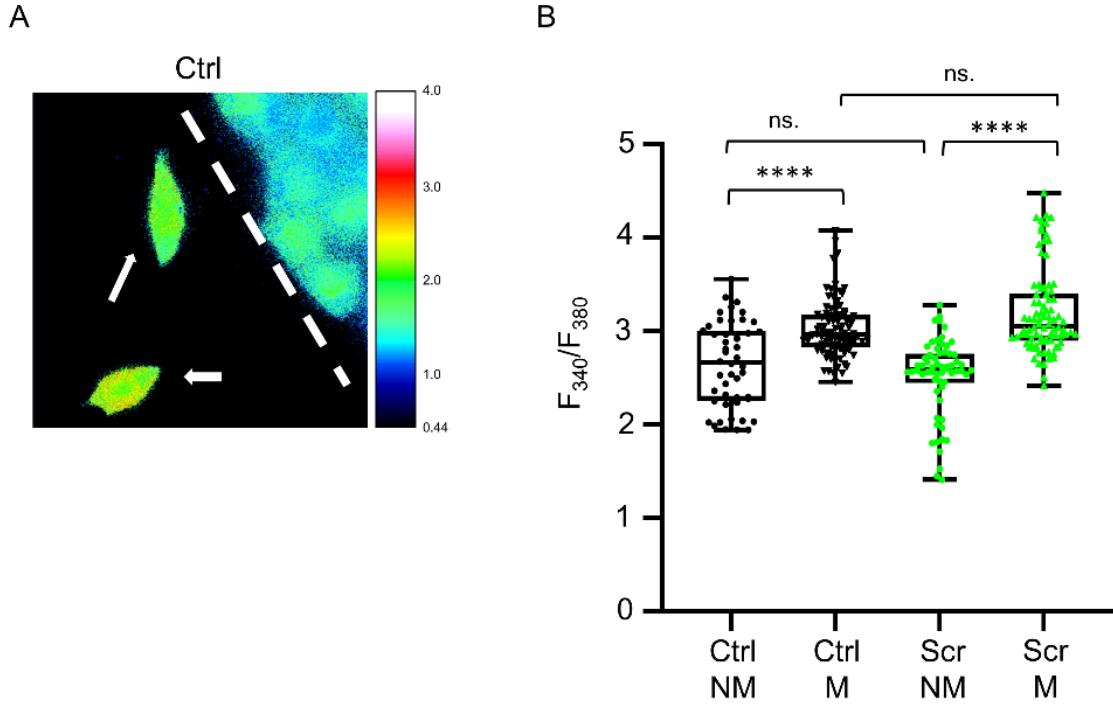
30. ábra: Fluorofór-jelölt Szeptin7 fehérje expressziója és filamentózus megjelenése C2C12 mioblasztokban. Az mCherry-taggal ellátott Szeptin7 fehérjét eukarióta expressziós vektorról indukáltuk proliferáló C2C12 mioblasztokban. A fluoreszcens Szeptin7 filamentumok (piros) intracelluláris eloszlását konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. (A) Az mCherry-N-Szeptin7 fúziós fehérje fluoreszcens képe C2C12 mioblasztokban. A skála 10 μ m. (B) Az mCherry-N-Szeptin7 fúziós fehérje (piros) és az endogén módon szintetizált Szeptin7 (zöld) lokalizációja és eloszlása immunjelölést követően. Szeptin7 antitestet (Septin7, IBL, 1:250, másodlagos antitest: Alexa Fluor 488, zöld) használtuk a sejtekben lévő összes Szeptin7 fehérje jelölésére. Az egyesített kép az exogén és endogén Szeptin7 fehérjék intracelluláris lokalizációját mutatja. A sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük. A skála 20 μ m. (C-D) A szintetizált mCherry-N-Szeptin7 fehérje (piros) elhelyezkedése a sejten belül. A sejt körvonalát fehér szaggatott vonal jelöli, míg kék színnel a sejtmagot jelöltük (DAPI).



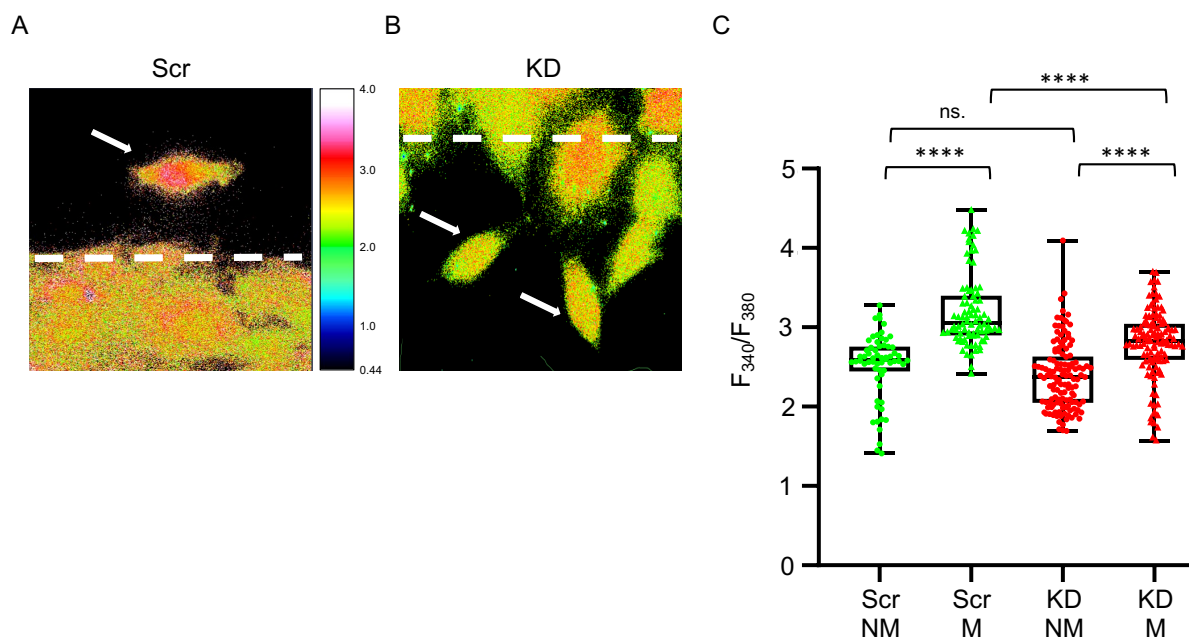
31. ábra: Képsorozat a migráló C2C12 mioblasztokról. Az mCherry-N-Szeptin7 filamentumokat (piros) Opera Phenix rendszerrel követtük nyomon a mioblasztok migrációja során. 5 percenként felvételek készültek, amelyek a sejtek helyzetét és a Szeptin7 filamentumok tényleges elhelyezkedését mutatják be migráló C2C12 sejten belül. A fehér nyíl az adott sejt mozgásának irányát jelzi, míg az idő a kísérlet kezdetétől eltelt időt mutatja.

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

Szérummentes DMEM tápoldatban tartott tenyészetekben 5 órás inkubációt követően a nem migráló és migráló sejtek egyértelműen elkülöníthetőek voltak (32.A ábra). Mivel a C2C12 mioblasztok ebben a környezetben nem képesek osztódni, az $[Ca^{2+}]_i$ változása a sejtek migrációjával hozható összefüggésbe. A Ctrl és a Scr sejtek között nem volt szignifikáns különbség a nem migráló sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ban, míg ezen tenyészetek migráló sejtjein az $[Ca^{2+}]_i$ szignifikáns növekedését mutattunk ki a nem migráló társaikhoz képest (32. ábra). A S7-KD sejtek esetében a nem migráló sejtek alacsonyabb, de szignifikánsan nem különböző $[Ca^{2+}]_i$ szintet mutattak a Scr sejtekhez képest (33. ábra). Bár a migráló S7-KD sejteken a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés ugyanúgy megfigyelhető volt, mint a Ctrl és Scr mioblasztoknál, a kialakult emelkedés arányaiban jóval kisebb volt (33. ábra).



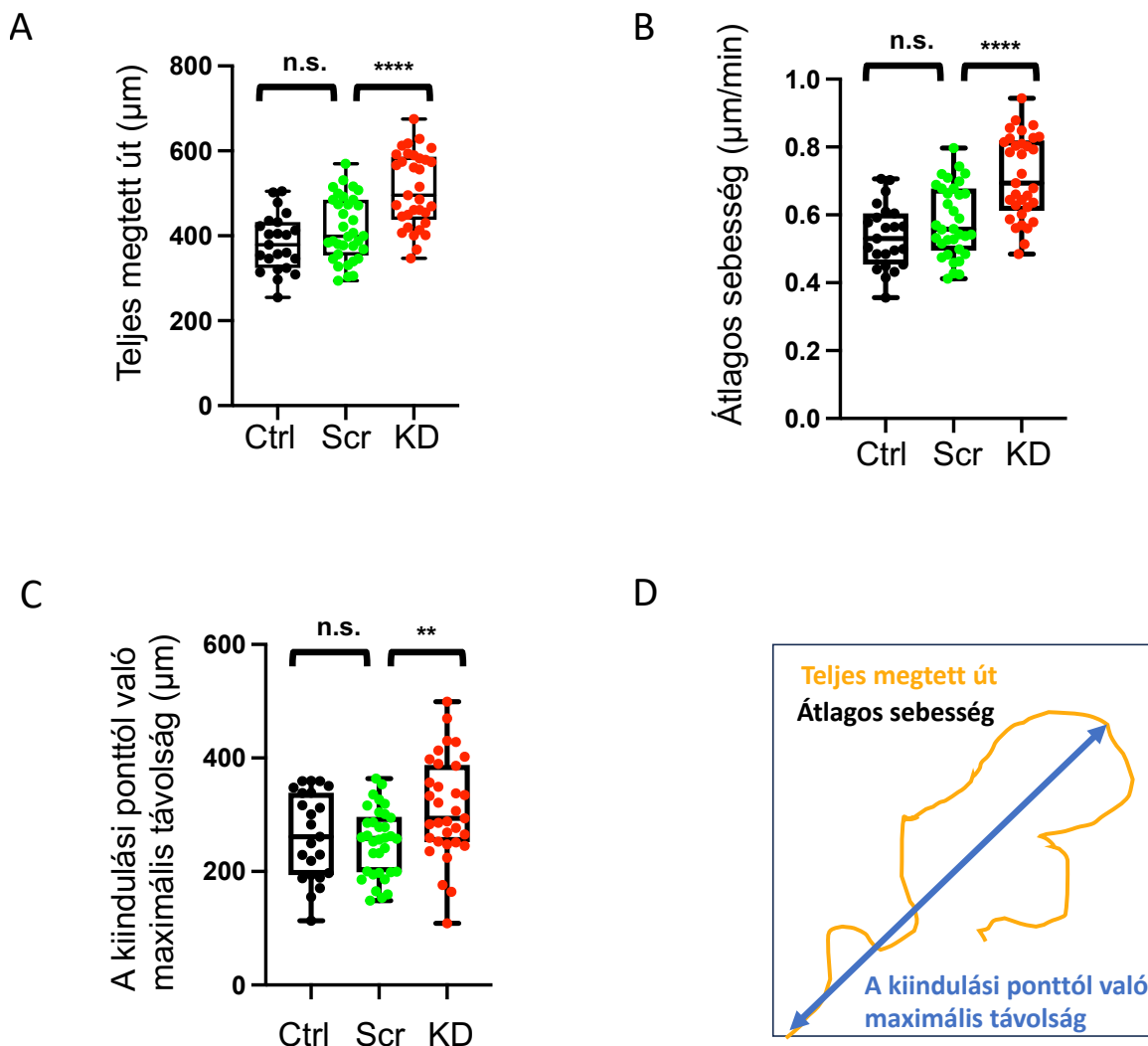
32. ábra: Az $[Ca^{2+}]_i$ Fura-2-AM-mel töltött Ctrl és Scr C2C12 mioblasztokban határoztuk meg. (A) Reprezentatív ratiometrikus kép Fura-2-AM töltött Ctrl kultúrákról. A szaggatott vonal a manuálisan meghatározott határvonalat jelentik a sejtenyészet nem migráló és migráló régiói között. A fehér nyilak a migráló sejteket jelölik. A színskála 340 és 380 nm-en mért eltérő arányt jelez; a melegebb szín magasabb $[Ca^{2+}]_i$ -jelent. (B) A nem migráló (NM) és migráló (M) Ctrl (fekete) és Scr (zöld) sejtekben mért fluoreszcencia arány. A statisztikákat egytényezős ANOVA és Bonferroni-féle többszörös összehasonlító teszt segítségével számoltuk (**** $p < 0,001$; $n = 48$ és 89 sejt a nem migráló és migráló Ctrl mintákban; $n = 62$ és 86 sejt a nem migráló és migráló Scr mintákban, 3 független kísérletből). A négyszögek a négyzetdiagramokban a mediánt, valamint a 25 és 75 százalékos értékeket mutatják, míg a hibasávok 1 és 99%-ot mutatnak. A kísérleteket 10-szeres objektívvel végeztük, továbbá az ábra A paneljén a migráló sejteket reprezentáló képeket 40-szeres objektívvel készítettük.



33. ábra: Az $[Ca^{2+}]_i$ változásai migráló C2C12 tenyészetekben. Az $[Ca^{2+}]_i$ -t Fura-2 AM-festékkel töltött Scr és S7-KD mioblasztokban határoztuk meg. (A) Reprezentatív ratiometrikus képek Fura-2-AM festékkel töltött Scr (A) és S7-KD (B) tenyészetekből. A szaggatott vonalak a manuálisan meghatározott határvonalat jelentik a sejtenyészetek nem migráló és migráló régiói között. A fehér nyilak a migráló sejteket jelölik. A színskála 340 és 380 nm-en mért eltérő arányt jelez; a melegebb szín magasabb $[Ca^{2+}]_i$ -jelent. (C) Nem migráló (NM) és migráló (M) Scr (zöld) és KD (piros) sejtekben mért fluoreszcencia arány. A statisztikát az egytényezős ANOVA és Bonferroni-féle többszörös összehasonlító teszttel számítottuk ki (**** $p < 0,001$; $n = 62$ és 86 sejt a nem migráló és migráló Scr-mintákban; valamint $n = 130$ és 125 sejt a nem migráló és migráló KD mintákban, 3 független kísérletből). A négyzetdiagramokban a mediánt, valamint a 25 és 75 százalékos értékeket mutatják, míg a hibásávok 1 és 99%-ot mutatnak. A kísérleteket 10-szeres objektívvel végeztük, továbbá az ábra A- B paneljén a migráló sejteket reprezentáló képeket 40-szeres objektívvel készítettük.

6.9 A Szeptin7 szintje hatással van a migrációra

Mivel a Szeptin7 filamentumok elrendeződése különbözik a migráló és nem migráló sejtekben, kíváncsiak voltunk arra, hogyan változnak az alapvető migrációs paraméterek (teljes megtett út, átlagos sebesség, kiindulási ponttól való maximális távolság, 34. Ábra, D panel) a géncsendesített C2C12 sejtvonalon. Kísérleteink során a Mitomycin C-t, egy erős DNS-kereszt kötőt használtunk a sejtosztódás blokkolására. A mérések 24 óráig tartottak, melyből az első 12 órát használtuk fel az adatok elemzésére. Fontos kiemelni, hogy a Ctrl és Scr sejtek között a vizsgált paraméterekben nem tapasztalunk szignifikáns változást 12 óra migráció alatt (34. ábra, A-C panelek). Eredményeink azt mutatják, hogy a S7-KD sejtek átlagos sebessége nagyobb volt, mint az Scr sejteké, és ezek a sejtek távolabb kerültek a kiindulási ponttól (34. ábra A, B, C panelek). Mivel a teljes útvonal is hosszabb volt, a S7-KD sejtek többet migráltak, mint a Scr sejtek.

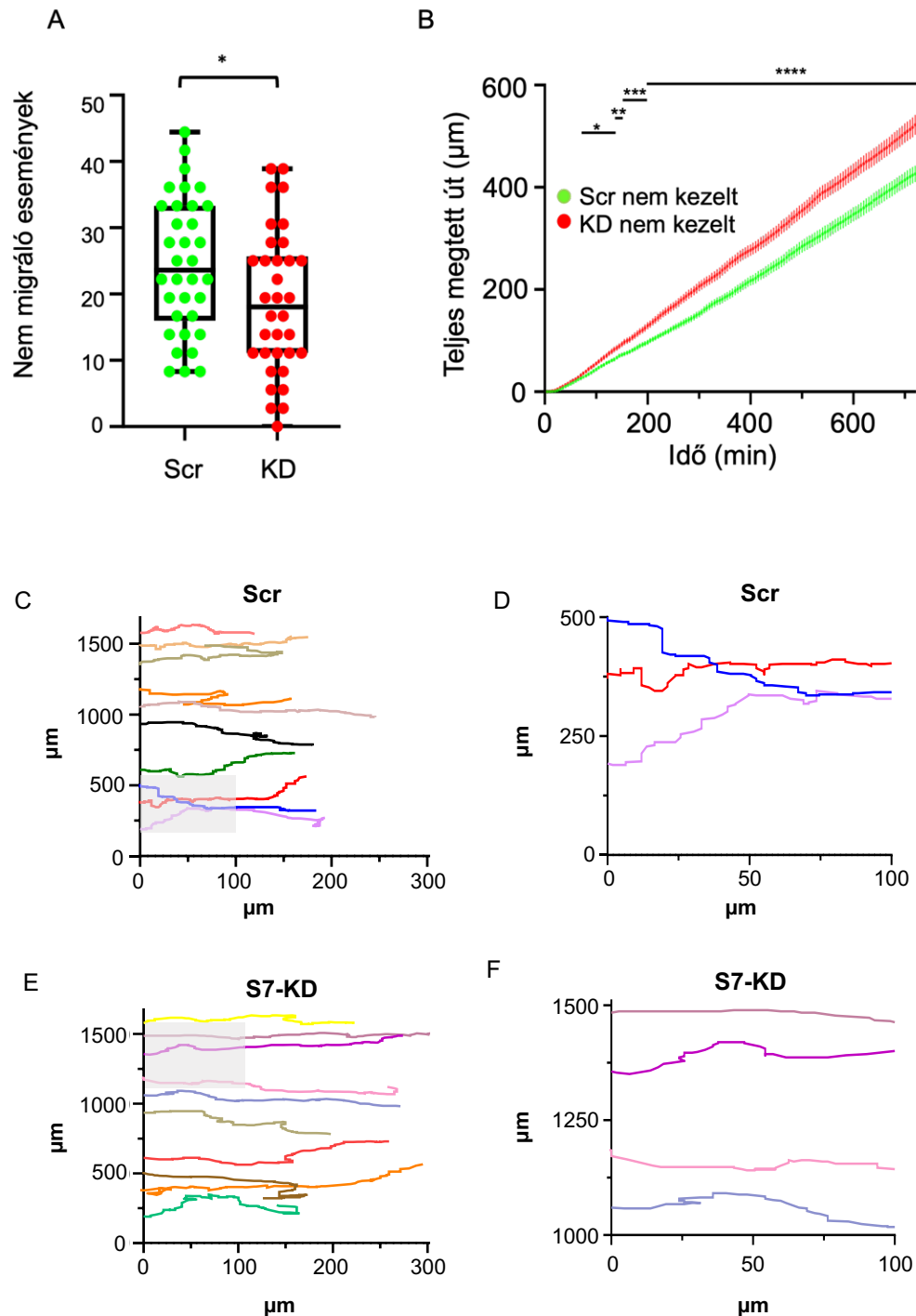


34. ábra: A migrációt leíró paraméterek változása a vizsgált tenyészetekben. 12 órás migrációt elemeztünk, és kiszámítottuk a teljes út hosszát (A), az átlagos sebességet (B) és az egyes sejtek eredeti helyzetétől való maximális távolságot (C). A statisztikákat egytényezős ANOVA és Bonferroni-féle többszörös összehasonlító tesztjével számítottuk ki (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$; $n = 23$ sejt Ctrl esetén, $n = 34$ sejt Scr esetén és $n = 33$ sejt S7-KD-ben, 3 független kísérletből). A (D) panel a vizsgált paramétereket mutatja be sematikus ábrázolásban.

A Scr és S7-KD sejtek közti különbséget szemlélteti a 35. ábra A paneljén található, nem migráló események száma is, mely a Scr sejtekben szignifikánsan magasabb volt. Ahhoz, hogy a sejtek migrációját még jobban szemléltessük, az egyedi sejtek x-y koordinátáit ábrázoltuk (35. ábra, C-F panelek). Ezeken az ábrákon látható, hogy az S7-KD sejtek a 12 órás migráció elején kevesebb alkalommal tesznek fordulatot, bár a megfigyelést statisztikailag nem vizsgáltuk.

Ezt követően a teljes útvonalat az idő függvényében ábrázoltuk, amely a 35. ábra B paneljén látható. Az ilyen módon reprezentált időbeli eltérés a S7-KD sejtek gyorsabb mozgását

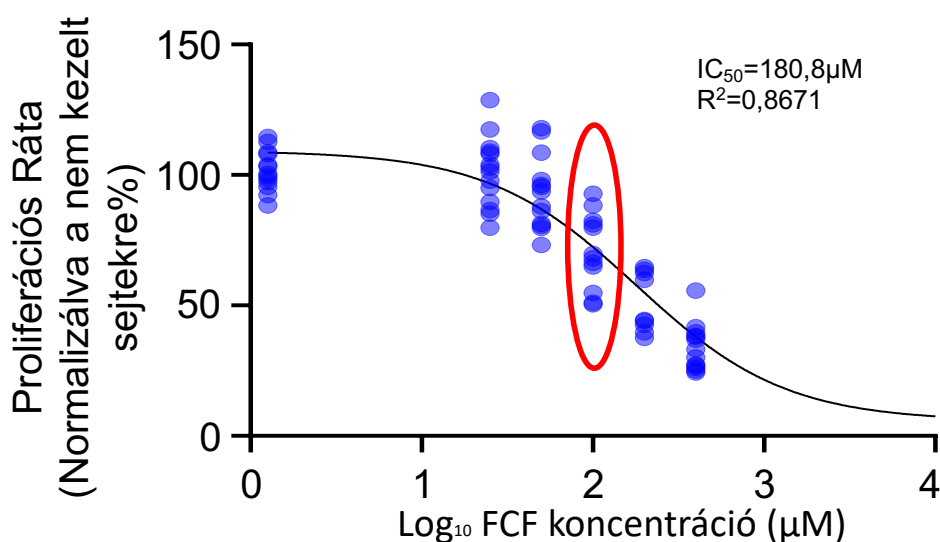
szemlélteti. A kapott adatok alapján a migráció feltehetőleg a Szeptin7 fehérje csökkent kifejeződése miatt változik meg.



35. ábra: Az S7-KD és Scr sejtek migrációban bekövetkezett változások bemutatása. (A) Az eredeti felvételek 20 perces periódusából határoztuk meg azon események számát, ahol a sejtek nem migráltak vagy migráltak. Nem migráló eseménynek vettük, ha a sejtek mozgása semmilyen irányban nem érte el a sejtek méretét. (B) Ahhoz, hogy a Scr és S7-KD sejtek közötti időbeli különbséget is szemléltessük, a panelen az 5 perces intervallumok esetén mért teljes megtett út időbeli változása látható. A migráló Scr (C) és S7-KD (E) C2C12 mioblasztok reprezentatív pályáit mutatjuk be, ahol különböző színek az egyes sejteket jelölik a migráció első 12 órájában. A pályák részletesebb megjelenítése érdekében az D és F panelek az C és E panelek kinagyított területeit mutatják be, amint azt a szürke téglalapok is jelzik.

6.10 Az FCF stabilizálja a Szeptin7 filamentumokat C2C12 mioblasztokban

Mint ahogy a bevezetőben is említettük, az FCF egy olyan szer, amelyet az eukarióta sejtekben a szeptinek stabilizálására használnak különböző kísérletekben [47]. Munkánk során először azt vizsgáltuk, hogy az FCF kezelés befolyásolja-e és ha igen, milyen módon a C2C12 mioblasztok proliferációját. 24 órás FCF kezelést követően értékeltük a sejtosztódás változását CyQuant NF esszé segítségével, eredményeink szerint a szer dóziszfüggő módon csökkentette a sejtproliferációt (36. ábra). A további vizsgálatokhoz a félhatásos dózis alatti, 100 μM -os koncentrációt választottuk.



36. ábra: A forklorfenuron (FCF) kezelés módosítja a sejtproliferációt. A különböző koncentrációjú FCF hatását a C2C12 mioblasztok proliferációjára 24 órás kezelés után határoztuk meg. Az adatpontokat a nem kezelt tenyészetekre normalizálva mutatjuk be, és a Hill-egyenlettel illesztettük őket, ami körülbelül 181 μM IC_{50} -értéket eredményezett.

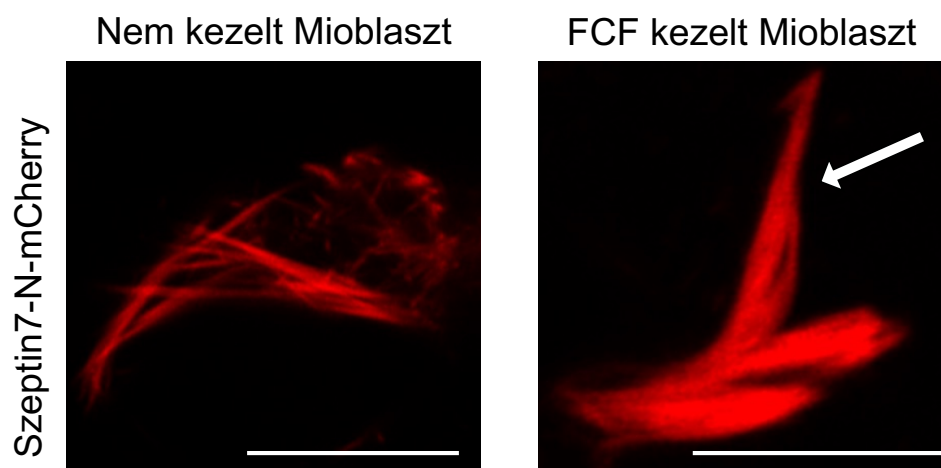
Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az FCF a Szeptin7 fehérje GDP-kötő helyéhez kötődhet [47] [89]. A mioblasztok FCF kezelését követően Szeptin7-specifikus immunjelölést végeztünk annak érdekében, hogy a filament szerkezetben bekövetkező változásokat nyomon kövessük. Megállapítottuk, hogy a Szeptin7 filamentumok architektúrája jelentősen megváltozott FCF hatására, a sejtekben hosszabbnak és vastagabbnak tűnő filamentumok jelentek meg (37. ábra) és azok intracelluláris elhelyezkedése is eltérő volt a nem kezelt sejtekhez képest. A filamentumok vastagságát számszerűsítettük is, FCF kezelt Ctrl sejtekben

az immunjelölt Szeptin7 filamentumok vastagsága szignifikánsan nagyobb volt a nem kezelt sejtek megfelelő paraméteréhez képest, ennek eredményét a 37. ábrán mutatjuk be.



37. ábra: Az egyes Szeptin7-filamentumok átlagos vastagságát véletlenszerűen kiválasztott mezőkben határoztuk meg a kezeletlen és FCF-kezelt Ctrl C2C12 sejtekben. A statisztikát Student-féle t-próbával számoltuk (**** $p < 0,001$; $n=57$ filament a nem kezelt (fekete), illetve $n=63$ filament az FCF-kezelt Ctrl sejtekben (magenta), a megfelelő kultúrákon belül 4 egyedi látómező 5 véletlenszerűen kiválasztott területéről). Az FCF kezelés valószínűleg stabilizálja a szeptin polimereket, kísérleti elrendezésünkben vastagabb és hosszabb Szeptin7 filamenteket generálva (fehér nyilakkal jelölve) az endogén Szeptin7-et kifejező C2C12 sejtekben. A skálák mérete 10 µm.

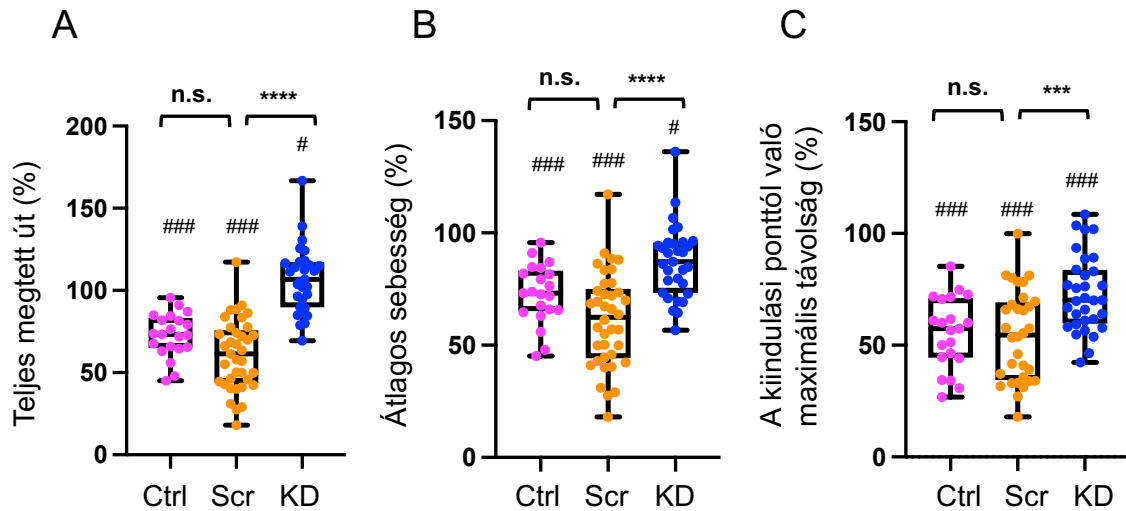
Ezt követően a fent említett FCF kezelést a fúziós fehérjével transzfektált sejteken is megismételtük, az endogén Szeptin7-hez hasonlóan jóval nagyobb méretű, fluoreszcensen tagelt filamentumok megjelenését tapasztaltuk a kezelt sejteken (38. ábra).



38. ábra: Az általunk előállított, Szeptin-7-mCherry fehérjét kódoló plazmiddal történő tranziens transzfektálás után 24 órával a sejteken 24 órás FCF kezelést alkalmaztunk (100 μ M), majd AiryScan 880 lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk a filamentumokat. A Szeptin7 filamentumok vastagabbak lettek FCF kezelés hatására az élő C2C12 sejtekben. A skálák mérete 10 μ m.

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

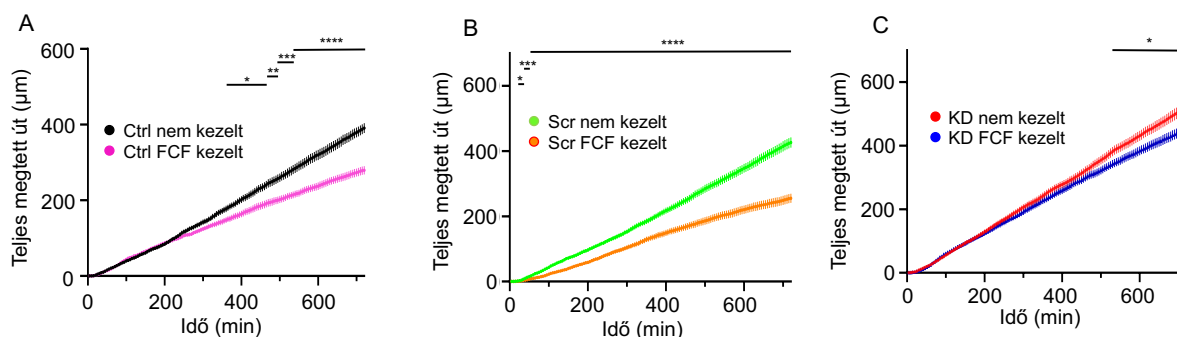
Mivel az FCF-et gyakran használják a szeptin filamentumok biológiai hatásainak nyomon követésére, célunk volt a szer tesztelése migráló mioblasztokon is. Az FCF-kezelés minden tenyészet migrációs paramétereit megváltoztatta, de a nem kezelt tenyészetek paramétereire normalizált adatok változása nagymértékben eltérő volt (39. ábra A-C panel). A Scr és Ctrl sejtek meghatározott paraméterei kezelés hatására szignifikánsan csökkentek nem kezelt társaikhoz viszonyítva. A kezelt Scr és Ctrl sejtek paramétereit egymással összehasonlítva azok szignifikánsan nem különböztek egymástól. Ezzel szemben a S7-KD tenyészetek ellenállóbbnak tűnnek az FCF-kezeléssel szemben, mely utóbbi megfigyelés a Szeptin7 fehérje alacsonyabb kifejeződésének következménye lehet (39. ábra A-C). A S7-KD sejteken meghatározott, migrációt leíró paraméterek közül a teljes megtett út esetében sok esetben a nem kezelt sejtekhez képest magasabb értékeket kaptunk, ami 100% feletti átlagot eredményezett. Az átlagos sebesség, valamint a kiindulási ponttól mért maximális elmozdulás értékeiben a S7-KD sejteken szignifikánsabb kisebb csökkenést tapasztaltunk FCF kezelést követően, mint a Ctrl és Scr tenyészeteknél.



39. ábra: Az FCF-kezelés megváltoztatja a migrációt leíró paramétereket, de a S7-KD sejtek ellenállóbbak a szerrel szemben. Az FCF-kezelt tenyészetek által megtett teljes utat (A), átlagos sebességet (B) és a kiindulási ponttól való maximális távolságot (C) meghatároztuk 12 órás migráció alatt, és az FCF-kezelt sejtek ezen paramétereit a nem kezelt sejtekre normalizált, százalékos értékeként mutatjuk be. A statisztikákat egytényezős ANOVA és Bonferroni-féle többszörös összehasonlító teszttel számítottuk ki (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$ (az FCF-kezelt Ctrl, Scr és S7-KD sejtek adatainak összehasonlítása) és # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ (a nem kezelt és az FCF-kezelt tenyészet összehasonlítása)); $n=37$ sejt Scr-ben, $n=32$ sejt KD-ben és $n=21$ sejt a Ctrl sejtek esetén, 3 független kísérletből.

Irodalmi adatok alapján az FCF reverzibilis módon, körülbelül 60-240 perc alatt stabilizálja a szeptin filamentumokat, ugyanakkor ez függ az alkalmazott dózistól és a vizsgált sejtípustól egyaránt [90]. Ennek a hatásnak a bizonyítására ábrázoltuk a teljes út adatait az idő függvényében (40. ábra). Jól látható, hogy az FCF már a kezelés első órája során hatni kezdett, és ez a hatás jelentősebb volt a Ctrl és Scr tenyészetekben (40. ábra, A-B), mint a S7-KD sejtek esetében. Az FCF-nek több időre volt szüksége a S7-KD sejtekben a migrációt gátló hatás kialakításához, azonban egy bizonyos idő elteltével, körülbelül 8 óra kezelés után, a szer már

itt is szignifikáns változást okozott a vizsgált paraméterben a nem kezelt sejtekhez képest (40. ábra, C).



40. ábra: Az FCF-kezelést követő változások jobb szemléltetése érdekében a teljes megtett út egyes pontjait az idő függvényében ábrázoltuk a Ctrl (A), Scr (B) és az S7-KD (C) tenyészetek esetében (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$). A kísérleti adatok alapján látható, hogy az FCF a kezelés kezdetétől rövid időn belül (1-4 óra) kezd hatni, mely hatás a kísérlet során végig fennmaradt. Figyeljük meg az S7-KD sejteken tapasztalt hatás későbbi kialakulását, mely a csökkent Szeptin7 kifejeződés miatt jöhetett létre.

7 Megbeszélés

7.1 A szeptin filamentumok a vázizom citoszeletális rendszerének szerves részei

A szeptinek szerepéről az elmúlt 50 év kutatásai igazolták, hogy a citoszeletális rendszer alapvető elemei, hiányuk különböző patológiás elváltozásokat eredményezhet. Szerepüket több szervezetben is igazolták már [35]. A szeptinek élesztőben a térbeli kompartmentalizáció szabályozói és kulcsszerepet játszanak a citokinézisben [91]. A szeptinek GTP-kötő fehérjék, amelyek filamentumokat és magasabb rendű struktúrákat alkotnak az eukarióta sejtek plazmamembránja alatti rétegben, és társulnak az aktin és mikrotubulus citoszeletális hálózatokhoz. A szeptin komplexek koordinálják a sejtosztódást, hozzájárulnak a sejt polaritás fenntartásához és a sejtmembrán szerkezetének dinamikus átalakításához [60,92]. Bár a citoszeletális szeptinek kifejeződését és szerepüket többféle sejt/szövet típusban tanulmányozták már, vázizomban, illetve azt modellező rendszerben erre vonatkozó információk hiányoznak a szakmai irodalomban. Ismereteink szerint eredményeink elsőként írják le a különböző szeptin fehérjék RNS-ének ontogenezis-függő expresszióját a C2C12 mioblaszt sejtekben és differenciálódásuk során, különböző fejlettségű mikrotubulusokban. A négy szeptin csoport (SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7) tagjai kifejeződnek a C2C12 sejtekben, melyek lehetőséget adnak változatos szeptin oligomerek és magasabb rendű struktúrák létrehozásához. Kísérleteink alapján igazoltuk, hogy a Szeptin7 fehérje, mint csoportjának egyedüli tagja a differenciálódás előrehaladtával csökkenő expressziót mutat. Ez alapján feltételezhető, hogy szerepe a mioblaszt állapotú proliferáció és a differenciálódás kezdeti szakaszán nagyobb, amikor a legtöbb sejt fúziója történik.

7.2 A szeptinek szerepe a mioblasztok sejtleletani folyamatainak szabályozásában

A szeptinek és más citoszeletális fehérjék közötti kapcsolat kiemelkedő szerepet játszik a mechanikai jelek biokémiai válaszokká történő átalakításában. A szeptinek részt vesznek a mechano-transzdukcióban azáltal, hogy elősegítik a kontraktilis aktomiozin hálózatok kialakulását. Ezeket a megfigyeléseket több sejt típusban is igazolták, például daganatos betegségekkel összefüggő fibroblaszt tenyészetekben, emlős epitheliális sejtekben és az egér szív endotheliális sejtekben (EC-kben) [93]. Több próbálkozás is volt már génkiütött szeptin modellrendszerek létrehozására, viszont a jelenleg ismert 13 szeptin fehérjéből mindösszesen 7 féle szeptin KO egeret sikerült létrehozni [94]. A mindenütt jelenlévő Szeptin7, Szeptin9 és

Szeptin11 genetikai ablációja embrionális letalitáshoz vezetett. A *Szeptin7*^{-/-} egerek soha nem születtek meg, a fejlődés korai szakaszában megálltak, valószínűleg mitotikus hiba miatt [95]. A *Szeptin11*^{-/-} egerek fejlődése a méhen belüli 11,5. napon leállt, és az egerek a 13,5. napon elpusztultak [96]. Az egészséges sárgatest, a szívverés és az erek fejlődése ellenére a *Szeptin9*^{-/-} embriók a vemhesség 10. napjára elpusztultak, mezenchimális szöveti degenerációt és kiterjedt sejthalált mutatva [70].

A fentiekkel összhangban kimutattuk a Szeptin7 és az aktin filamentumok kolokalizációját Ctrl és Scr C2C12 sejtekben. Ezenfelül a CRISPR-Cas9 génkiütéses technológia alkalmazásával több sejtmaggal rendelkező, proliferációra képtelen óriás sejteket kaptunk eredményül, mely megfigyelés alapján kijelenthetjük, hogy Szeptin7 nélkül ezek a sejtek nem képesek osztódni. Eredményeink összhangban vannak a tudományos irodalommal, hiszen ahogy már említettük, a *Szeptin7*-hiányos egérembriókban nem történik meg a gasztruláció folyamata [69], ami a Szeptin7 kulcsfontosságú szerepére utal az egyedfejlődés során [45].

Géncsendesítés segítségével a C2C12 sejtekben kb. 50%-os Szeptin7 fehérjeszint csökkenést értünk el, mely a filamentumok szerkezetét, méretét és a sejtek alakját is megváltoztatta. Kísérleteink során a Szeptin7 fehérje hiánya nagyobb méretű és kevesebb nyúlvánnyal rendelkező, csaknem kerek C2C12 mioblaszt sejteket eredményezett, deformált intracelluláris Szeptin7 filamentumokkal. Ez korrelál azzal a megfigyeléssel, hogy a Szeptin7 meghatározó funkcióval bír a sejtmorfológia meghatározásában különböző sejttypusokban, például az idegrendszer hátsó gyökér ganglionok neuronjaiban [45] vagy egér primer fibroblasztjaiban [97]. Korábban azt is kimutatták, hogy a *Szeptin7*, mint a miR-127-3p célgénje szerepet játszik a C2C12 proliferáció szabályozásában is [98]. Az általunk vizsgált modellrendszerben a Szeptin7 fehérje expressziójának csökkenése a C2C12 mioblaszt sejtek proliferációjának csökkenését okozta.

Ezen túlmenően, a géncsendesített S7-KD mioblasztokból jelentősen gátolt és eltolódott a többmagvú miotubulusok létrehozásának képessége, illetve folyamata, azaz sérült a differenciálódási programjuk. Az izomdifferenciálódás során számos transzkripciós faktor adott időben való megjelenése rendkívül fontos, viszont a sejtek kapcsolódásán túl a citoskeletonális rendszer átrendeződésére is szükség van a miotubulusok létrehozásához [34,39]. A C2C12 mioblasztokon végzett vizsgálatok a RhoA-t, a Rac1-et és a Cdc42-t a miogenezis fontos szabályozóiként azonosították. Ezek a GTPázok downstream kinázok és transzkripciós faktorok, például a p38 MAPK, a c-Jun N-terminális kinázok (JNK) és a szérum válasz faktor (SRF) aktivitásának modulálásán keresztül működnek. A RhoA által közvetített gátlással ellentétben a Rho GTPáz család más tagjai - a Rac1 és a Cdc42 - mind *in vitro*, mind *in vivo*

stimulálják a fúziós folyamatot [99]. Az előbb említett fehérjéket bizonyos sejttípusokban (Rac1 szerepe HUVEC sejtekben vagy a Cdc42 és kölcsönható partnerei: Caco-2 sejtek) a szeptinek szabályozó elemeiként írták le [100]. Az általuk szabályozott, bonyolult jelátviteli útvonalakat C2C12 sejtekben a szeptinokkal kapcsolatosan még nem vizsgálták, így jelenleg csak feltételezhető, hogy ezek az útvonalak akár a Szeptin7 fehérjén keresztül is befolyásolhatják a differenciálódást. Összegezve a megfigyeléseinket, munkacsoportunk először írta le C2C12 sejtek vizsgálatával, hogy a Szeptin7 a citoskeletális szeptin szerveződés kulcsfontosságú szereplője a sejtmorfológia, a proliferáció és a differenciálódás szabályozásában mioblasztokon, amely folyamatok a miogenezis és a regeneráció alapvető eseményei. Bár *Szeptin7* KO egérmodell nem létezik, vázizomspecifikus knockdown modellt munkacsoportunknak sikerült létrehozni [83], ami lehetőséget adott a vázizmot érintő folyamatok tanulmányozására [101,102].

A mitokondriumok kulcsfontosságú organellek, amelyek a sejtek anyagcseréjét az oxidatív foszforiláción keresztül történő energiatermelés integrált mechanizmusán keresztül szabályozzák. A hálózat általános morfológiáját a mitokondriumok fúziója és hasadása határozza meg [103]. A mitokondriális fúziót szabályozó számos mechanizmus közül kimutatták, hogy az endoplazmatikus retikulum (ER) és az aktin fontos szerepet játszik a mitokondriumok összehúzódásának közvetítésében és a kulcsfontosságú fúziós faktor, a Drp1 nevű dinamin-szerű fehérje működésének elősegítésében [104]. Emlős sejtekben kimutatták, hogy a Szeptin2 közvetlenül kölcsönhatásba lép a Drp1 mitokondriális hasítást szabályozó fehérjével, és szükséges a Drp1 hatékony lokalizációjához a mitokondriumokban [87,88]. Feltételezhető, hogy a szeptinek a mitokondriális rendszer felépítésében és dinamikájának fenntartásában is szerepet játszanak. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a Szeptin7-nek szerepe lehet a mitokondriumok fúziójában és hasadásában, ennek bizonyítására viszont további kísérletekre van szükség.

7.3 A Szeptin7 filamentumok átrendeződése a migráló mioblasztokban kiemelt jelentőségű

A Szeptin7 egyedülálló, és jelentős mértékben hozzájárul a szeptin oligomerek és magasabb rendű fehérjekomplexek kialakításához. Mivel a Szeptin7 döntő szerepet játszik a különböző fejlődési stádiumokban, a sejtmigrációra gyakorolt hatása alapvető lehet a különböző szövetek kialakulásának szabályozásában. Egyes publikációk már tárgyalták, hogy a specifikus szeptin fehérjék (egyes esetekben a Szeptin7) expressziójának módosítása megváltoztatja a különböző

eukarióta sejtípusok migrációját. Változásokat figyeltek meg többek között mikrovaszkuláris EC-k [41], humán hámsejtek [80], humán mellrák- és tüdőráksejtek [65,70–72] vizsgálata során, viszont vázizomsejtek migrációját ebből a szempontból ezidáig még nem vizsgálták.

Jelen dolgozatban bemutattuk, hogy a Szeptin7 intracelluláris megjelenése eltérő a nem migráló és a migráló mioblasztokban. A nem migráló sejtekben a Szeptin7 filamentumok az egész citoplazmában jelen vannak, míg migráció során a filamentumok specifikusabb lokalizációja észlelhető, különösen a sejtprojekciókban és a hátsó élen. A migráló S7-KD tenyészetekben Szeptin7 filamentumok megjelenése ugyan megfigyelhető, de a hosszuk és méretük alulmarad a Scr sejtekhez képest. A Szeptin7 migrációban betöltött szerepéről már többen beszámoltak, de a pontos mechanizmus, hogy sejt-specifikus környezeti tényezők megváltoztathatják-e a fehérje viselkedését, még nem teljesen tisztázott [45,72,98,105,106]. Jól ismert, hogy a sejt-polarizációhoz külön elülső és hátsó területek kialakítása szükséges a sejtben, ami fontos az irányított migráció és a sejtmozgás szempontjából [107]. Az aktin által közvetített lamellipodialis membránkiemelkedés a vándorló sejt élet képezi, és a visszahúzódó farok kialakulása döntő jelentőségű a mozgás kivitelezésében. Az aktin filamentumok sajátos megjelenése minden sejtípusunkban látható, intracelluláris eloszlásuk azonban megváltozik a S7-KD sejtekben, ami hozzájárul a kerekesebb, kevésbé nyúlványos sejt-morfológiához. Amíg a Ctrl és Scr sejtekben a Szeptin7 és az aktin kolokalizálódik, és a határok nagyrészt láthatóak, addig a S7-KD sejtekben a Szeptin7 filamentumok véletlenszerű eloszlása és pontszerű megjelenése kevésbé kapcsolódik az aktin rendszerhez. A fent említett változások a S7-KD sejtekben jelentős mértékben hozzájárulnak a migráló sejtek eltérő sejtformájához és citoskeletális szerveződéséhez. Fontos ugyanakkor kiemelni, hogy a csökkent Szeptin7 expresszió nem gátolta a C2C12 sejtek migrációját.

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

Az $[Ca^{2+}]_i$ -homeosztázis dinamikus adaptációja a migráció során minden sejtípusban elengedhetetlen. A migráló sejtekben növekvő elülső-hátsó $[Ca^{2+}]_i$ gradiens képződik, aminek szerepe van a fokális adhézciók feloldásában, a sejt hátsó visszahúzódásában és mozgékonyágában [107]. Az elülső-hátsó polaritást meg kell őrizni a migráció során, mert ez a biokémiai folyamat szükséges a lamellipodia kialakulásának blokkolásához a sejt hátsó részein [107–109]. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ nem különbözik

szignifikánsan a Ctrl, Scr és S7-KD mioblasztokban, a migráló sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ja megnövekedett minden sejttípus esetében. Megfigyeléseink szerint az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés szignifikánsan alacsonyabb a migráló S7-KD sejtekben, mint a Scr és Ctrl sejtekben, ami összefüggésben állhat a Szeptin7 fehérje csökkent szintjével. Számos tanulmány foglalkozott eddig is a szeptinek és a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]_i$ szabályozás kapcsolatával. Kimutatták, hogy a Szeptin7 szabályozza a Ca^{2+} bejutását az Orai-csatornákon keresztül humán idegi progenitor sejtekben és neuronokban [61]. Ezenkívül igazolt kapcsolat van a *dseptin7* vad típusú *drosophila* neuronjaiban való túlzott expressziója és a módosított $[Ca^{2+}]_i$ homeosztázis között, amely jelentős repülési hibákhoz vezetett [62,63]. Eredményeink arra utalnak, hogy a Szeptin7 kifejeződésének csökkentése megváltoztatja az $[Ca^{2+}]_i$ -t, ami szabályozhatja a mioblasztokban a migrációt és annak paramétereit. A változások hátterében álló pontos mechanizmus és a kapcsolódó jelátviteli útvonalak feltérképezése további vizsgálatokat igényel.

A migráció egy olyan kulcsfontosságú folyamat, ahol a sejtek mozgását összehangolt jelátviteli útvonalak is irányítják [32]. A már említett Rho család kisméretű GTP-ázai szabályozhatják a migrációs folyamatokat is, amit eddig több tanulmány is igazolt [41,42,107]. A Rho GTP-ázok közül a Cdc42-t és kölcsönható partnereit gyakran a szeptinekkel együtt elemzik. Így például hematopoietikus őssejteken végzett vizsgálatok alapján beszámoltak arról, hogy a Cdc42-Borg4-Szeptin7 tengely szabályozza a sejtek polaritását [110]. A legújabb eredmények szerint a Szeptin7 expressziós szintje egyaránt növelheti vagy csökkentheti a migrációs paramétereket. A Szeptin7 túlzott expressziója a migráció gátlását okozta glióma sejtekben [76], míg az emlőrák sejtvonalakban ez a változás fokozta a migrációt [72,76]. Jelen dolgozatban bemutatjuk, hogy a Szeptin7 csökkent kifejeződése esetén a S7-KD mioblasztok gyorsabban és nagyobb távolságokra migráltak, mint az Scr tenyészetek. A Szeptin7 expressziós változásainak sejtmobilitásra gyakorolt hatásaival kapcsolatos ellentmondások feloldásához figyelembe kell venni a sejtmigráció elemzésére használt különböző kísérleti elrendezések korlátait is [111]. A migrációs kísérletek során valamilyen rést hoznak létre, karcolás vagy inzert segítségével. Az assay-k során érdemes egy 24 órás időkorlátot betartani, mivel ezen túlmenően nehéz eldönteni, hogy a sejtproliferáció és/vagy -migráció következtében zárul-e be a rés. Jelen kísérleteink során tenyésztő inzertet használtunk, hogy a réssel határos sejteket sértetlenül tartsuk. A sejteket továbbá Mitomycin C-vel kezeltük a sejtproliferáció blokkolására. Ezen túlmenően kísérleteinkben a mioblasztok minden irányba vándorolhattak, specifikus kemotaxist nem alkalmaztunk. A különböző sejttípusok vagy önmagukban (mioblasztok), lazán kapcsolódó populációkban (mezenchimális sejtek), vagy együttesen vándorolhatnak egy sejtréteggént (például hámsejtek esetén) [111]. Annak ellenére, hogy a S7-KD sejtek gyorsabban és nagyobb

távolságokra vándoroltak a Scr sejtekhez képest, ez a sejtpopuláció nem volt képes ép miotubulusok kialakítására [83]. Eredményeinket a rendelkezésre álló irodalmi adatokkal összevetve megállapíthatjuk, hogy a Szeptin7 szerepet játszik a mioblasztok migrációjában, jelezve a fehérje fontosságát a miogenezisben és az izomregenerációban. Azt is meg kell ugyanakkor említeni, hogy *in vivo* a mioblasztoknak át kell vándorolniuk az alapmembránon és a kötőszöveti akadályokon is, így például a perimysiumon vagy az endomysiumon [39]. Ezen folyamatok viszont számos más, a dolgozatban nem vizsgált regulátor fehérje szerepét is igénylik, hiszen a vázizomzat hatékony javításához és regenerációjához az extracelluláris mátrix (ECM) összehangolt átalakítása is szükséges. Egy példát említve, a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) kulcsszerepet játszanak az ECM átalakításában az izomregeneráció során [112]. Eredményeink alapján viszont kijelenthetjük, hogy a vázizom fejlődése és regenerációja során a Szeptin7 fehérje fontos szabályozó szereppel bírhat.

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

A szeptinek hetero-oligomer komplexekbe való összeállási képessége és magasabb rendű szerkezetek kialakítása kritikus számos sejt működése szempontjából. A szeptineket *in vitro* nem poláros polimerekké lehet alakítani rekombináns vagy tisztított fehérjéből [52,113,114]. Azt azonban még nem tudjuk, hogy ezek a lineáris filamentumok tükrözik-e, hogy a szeptinek hogyan szerveződnek az *in vivo* megfigyelt nagyobb struktúrákban. Számos kérdés merül fel a szeptinek sejtekben való szerveződésével kapcsolatban is, például, hogy minden magasabb rendű szeptin alapú struktúra közös szerveződéssel rendelkezik-e molekuláris szinten? Szintén fontos lehet, hogy a nagyobb szeptin egységek (pl. gyűrű, géz-jellegű forma) átalakulása milyen gyorsan megy végbe? A szerveződés elemzése a magasabb rendű szeptin struktúrák esetén meghatározó jelentőségű, hogy megértsük a normál funkciót és betegségekben betöltött szerepüket [115]. Az irodalmi adatok alapján a heteromer és magasabb rendű szeptin komplexek működése mögött meghúzódó molekuláris mechanizmusok pontos leírása jelenleg még nem teljes [35,45,52,84]. A szeptin-hexamer (SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7) első kristályszerkezetének feltárása után ezt gyakran kanonikus komplexnek nevezték az eukarióta sejteken belül [35,52], ugyanakkor később egyre több lehetőség is felmerült a szeptin szerkezetbiológiában. Ebben az elrendezésben a G felszín mindkét végén szabad. Egyes kutatási eredmények azt is felvetették, hogy ugyanabból a szerkezeti csoportból bármely adott szeptin fehérje helyettesítheti egymást a komplexben [35]. Ez alapján 20 életképes hexamer és

60 oktamer létezhet, azonban ennek az elméletnek az általánossága még nem teljesen bizonyított, csupán *in silico* modellezésekre alapozták a feltételezéseket [116]. Ennek következtében egyre több adat utal arra, hogy a szeptinekkel kapcsolatos irodalmi adatokat és a strukturális predikciókat kritikusan kell értékelni [116]. A Szeptin2 és Szeptin7 komplexek elemzése során az kijelenthető, hogy egyfajta alapként, magként funkcionálnak a fehérjekomplexen belül. Mivel a magasabb rendű szeptin komplexek átépülése meglehetősen dinamikus és számos sejtleletani folyamatban játszanak szerepet, így minden olyan lehetőség, amely ezt a folyamatot befolyásolhatja, a szeptin kutatás fókuszában állhat.

Az FCF egy növényi citokinin és képes reverzibilisen megállítani a szeptinek dinamikus átrendeződését [47,80]. Az *in silico* dokkolási kísérletek feltárták, hogy a szeptinek nukleotidkötő zsebei az FCF feltételezett kötőhelye. Adataink összehasonlíthatók más vizsgálatokban nyert eredményekkel, mely alapján az FCF-kezelés negatívan befolyásolta a sejtosztódást, és csökkentette a migráló C2C12 mioblasztokban a teljes megtett utat és az átlagos sebességet. Ugyanakkor az FCF és a szeptinek esetében publikáltak bizonyos off-target hatásokat [78,117], ami a szer specificitását kérdőjelezi meg. Kísérleteinkben a Szeptin7 stabilizálására gyakorolt hatékonysága specifikusnak tűnik, mivel az mCherry-vel fúzionált Szeptin7 az endogénhez hasonlóan reagált a szer alkalmazására, nagyméretű filamenteket képezve. Az FCF kezelés hatására az S7-KD sejtek migrációja nem változott olyan mértékben, mint a Scr sejteké, így feltételezhetően ezek a sejtek ellenállóbbak a kezeléssel szemben, hiszen a Szeptin7 fehérje nem volt olyan mennyiségben jelen. Az FCF-et és analógjait már számos kutatási irányvonal potenciális daganatterápiás szerként említi [81,118–120]. A The Cancer Genome Atlas (TCGA) elemzései azt mutatják, hogy mind a Szeptin2, mind a Szeptin7 overexpressziója korrelál a megnövekedett mortalitással endometriumrákban. Az endometriumrákban a Szeptin2 relatív expressziója volt a legmagasabb, amelyet a Szeptin7 követett. A feltételezett szeptin-inhibitorok ígéretesek különböző daganatok terápiás kezelésében. Az általunk alkalmazott koncentráció (100 μ M) természetesen magas és nem elfogadható egy hatóanyagként, ugyanakkor a már előállított FCF analógok 4-5 μ M-os tartományban is gátolják bizonyos daganatsejttípusok proliferációját. A cél a nM-os koncentráció tartomány, ezzel redukálva a potenciális mellékhatásokat. Méréseink ugyanakkor fontos alapot is képezhetnek az FCF alapú szerek mellékhatásprofiljainak, például a vázizmot érintő negatív hatások feltérképezésében [81].

8 Összefoglalás

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

Bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a Szeptin7 filamentumok átrendeződnek a mioblasztok migrációja során. A Szeptin7 expressziójának downregulációja a migráció paramétereinek megváltozását eredményezte, a S7-KD mioblasztok gyorsabban mozognak és nagyobb utat tesznek meg a nem módosított kultúrákhoz képest. Ezen eredmények magyarázata nem csupán a szeptin filamentumok számának és rendezettségének csökkenése, hanem a migráló S7-KD mioblasztok alacsonyabb $[Ca^{2+}]_i$ változása is lehet. Ezen túlmenően úgy tűnik, hogy a S7-KD sejtek kevesebb alkalommal változtatnak irányt a Scr sejtekhez képest, így „kijelölve” egy adott irányt, amerre a sejt tart. A Szeptin7 különleges szerepét a mioblasztok migrációjában az FCF kezelés is igazolja. Az FCF dóziszfüggő módon gátolja a C2C12 sejtek proliferációját és vélhetően az FCF kezelés hatására a szeptin filamentumok dinamikus átrendeződése is gátolt. Kísérleteink során FCF kezelés hatására a Scr sejtek migrációjában kifejezett csökkenést tapasztaltunk, míg a csökkent Szeptin7 expresszióval bíró S7-KD sejteken ez a változás az általunk vizsgált időtartamon belül szinte elhanyagolható volt. Összességében a Szeptin7 fehérje alapvető szerepet játszik a mioblasztok proliferációs, differenciációs és migrációs folyamataiban, melyek kulcsfontosságú események a funkcionális vázizomrostok fejlődési és regenerációs szakaszaiban.

9 Summary

Based on our results, we can state that septin proteins appear differently in the developmental stages of C2C12 cultures. We proved that cells cannot divide without Septin7 and that Septin7 is essential for the formation of myotubes. We have shown that the level of Septin7 contributes to the determination of cell shape and is an integral part of the cytoskeleton. Our measurements suggest that the level of Septin7 also affects the mitochondrial system of cells, presumably by altering the mitochondrial fusion and fission.

We provide evidence that Septin7 filaments are rearranged during myoblast migration. Down-regulation of Septin7 expression resulted in altered migration parameters, with S7-KD myoblasts moving faster and longer as compared to unmodified cultures. These results may be explained not only by a reduction in the number and structural ordering of septin filaments, but also by the lower alteration of $[Ca^{2+}]_i$ in migrating S7-KD myoblasts. In addition, it appears that S7-KD cells change direction less often compared to Scr cells, thus "marking" a specific route in which the cell is heading toward. The specific role of Septin7 in the migration of myoblasts is also confirmed by FCF treatment. FCF inhibits C2C12 cell proliferation in a dose-dependent manner and presumably FCF treatment inhibits the dynamic rearrangement of septin filaments. Thus, in our experiments, we observed a marked decrease in parameters of migration in Scr cultures, whereas in S7-KD cultures with reduced Septin7 expression, this change was almost negligible over the time period we analyzed. Taken together, the Septin7 protein plays a fundamental role in the entirety of myoblast proliferation, differentiation, and migration processes, which are key events in the development and regeneration of functional skeletal muscle fibers.

10 Új eredmények

1. Kutatásaink során elsőként igazoltuk a Szeptin7 fehérje szerepét mioblasztokban.
2. Kimutattuk, hogy csökkent Szeptin7 expresszió esetén a C2C12 mioblaszt sejtek osztódása és differenciálódása is csökkent, mely az izomregeneráció és izomsérülés utáni felépülés folyamatában elengedhetetlen.
3. Kimutattuk, hogy a Szeptin7 fehérjének a C2C12 sejtek migrációs folyamataiban szerepe van, ezáltal hozzájárulhat az izomfejlődéshez.
4. Kimutattuk, hogy a Szeptin7 farmakológiai gátlása a C2C12 sejtek migrációs és proliferációs paramétereit megváltoztatja, ami egy potenciális mellékhatás lehet a szeptin rendszer befolyásolására alapuló terápiás alkalmazás során.

11 Irodalomjegyzék

1. Fonyó, A. *Az orvosi élettan tankönyve*; 2011; ISBN 9789632263441.
2. Mukund, K.; Subramaniam, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Systems Biology and Medicine* **2020**, *12*, e1462, doi:<https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>.
3. Frontera, W.R.; Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics* **2015**, *45*, 183–195, doi:10.1007/s00223-014-9915-y.
4. Bottinelli, R.; Reggiani, C. Human skeletal muscle fibres: Molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2000**, *73*, 195–262, doi:10.1016/S0079-6107(00)00006-7.
5. Gönczi, M.; Teixeira, J.M.C.; Barrera-Vilarmau, S.; Mediani, L.; Antoniani, F.; Nagy, T.M.; Fehér, K.; Ráduly, Z.; Ambrus, V.; Tózsér, J.; et al. Alternatively spliced exon regulates context-dependent MEF2D higher-order assembly during myogenesis. *Nature Communications* **2023**, *14*, doi:10.1038/s41467-023-37017-7.
6. Bentzinger, C.F.; Wang, Y.X.; Rudnicki, M.A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2012**, *4*, doi:10.1101/cshperspect.a008342.
7. Zammit, P.S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2017**, *72*, 19–32, doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.011.
8. Parker, M.H.; Seale, P.; Rudnicki, M.A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics* **2003**, *4*, 497–507, doi:10.1038/nrg1109.
9. Cinnamon, Y.; Kahane, N.; Bachelet, I.; Kalcheim, C. The sub-lip domain - A distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral-caudal migration. *Development* **2001**, *128*, 341–351, doi:10.1242/dev.128.3.341.
10. Vasyutina, E.; Birchmeier, C. The development of migrating muscle precursor cells. *Anatomy and Embryology* **2006**, *211*, 37–41, doi:10.1007/s00429-006-0118-9.
11. Masyuk, M.; Brand-Saberi, B. Recruitment of Skeletal Muscle Progenitors to Secondary Sites: A Role for CXCR4/SDF-1 Signalling in Skeletal Muscle Development. In *Vertebrate Myogenesis: Stem Cells and Precursors*; Brand-Saberi, B., Ed.; Springer

- Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015; pp. 1–23 ISBN 978-3-662-44608-9.
12. Marston, S. The Molecular Mechanisms of Mutations in Actin and Myosin that Cause Inherited Myopathy. *International journal of molecular sciences* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19072020.
 13. Park, J.-M.; Kim, Y.J.; Yoo, J.H.; Hong, Y. Bin; Park, J.H.; Koo, H.; Chung, K.W.; Choi, B.-O. A novel MYH7 mutation with prominent paraspinal and proximal muscle involvement. *Neuromuscular Disorders* **2013**, *23*, 580–586, doi:10.1016/j.nmd.2013.04.003.
 14. Agarwal, M.; Sharma, A.; Kumar, P.; Kumar, A.; Bharadwaj, A.; Saini, M.; Kardon, G.; Mathew, S.J. Myosin heavy chain-embryonic regulates skeletal muscle differentiation during mammalian development. *Development (Cambridge)* **2020**, *147*, 1–14, doi:10.1242/dev.184507.
 15. Sohn, R.L.; Huang, P.; Kawahara, G.; Mitchell, M.; Guyon, J.; Kalluri, R.; Kunkel, L.M.; Gussoni, E. A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 9274–9279, doi:10.1073/pnas.0904398106.
 16. Kim, J.H.; Jin, P.; Duan, R.; Chen, E.H. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Current Opinion in Genetics and Development* **2015**, *32*, 162–170, doi:10.1016/j.gde.2015.03.006.
 17. Millay, D.P. Regulation of the myoblast fusion reaction for muscle development, regeneration, and adaptations. *Experimental Cell Research* **2022**, *415*, 113134, doi:10.1016/j.yexcr.2022.113134.
 18. Van den Eijnde, S.M.; Van den Hoff, M.J.B.; Reutelingsperger, C.P.M.; Van Heerde, W.L.; Henfling, M.E.R.; Vermeij-Keers, C.; Schutte, B.; Borgers, M.; Ramaekers, F.C.S. Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *Journal of Cell Science* **2001**, *114*, 3631–3642, doi:10.1242/jcs.114.20.3631.
 19. Hochreiter-Hufford, A.E.; Lee, C.S.; Kinchen, J.M.; Sokolowski, J.D.; Arandjelovic, S.; Call, J.A.; Klibanov, A.L.; Yan, Z.; Mandell, J.W.; Ravichandran, K.S. Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. *Nature* **2013**, *497*, 263–267, doi:10.1038/nature12135.
 20. 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.
21. Brown, S.J.; Child, R.B.; Day, S.H.; Donnelly, A.E. Indices of skeletal muscle damage and connective tissue breakdown following eccentric muscle contractions. / Indices des lésions des muscles squelettiques et perturbations des tissus conjonctifs suite à des contractions musculaires excentriques. *European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology* **1997**, *75*, 369–374.
 22. Brzeszczyńska, J.; Brzeszczyński, F.; Hamilton, D.F.; McGregor, R.; Simpson, A.H.R.W. Role of microRNA in muscle regeneration and diseases related to muscle dysfunction in atrophy, cachexia, osteoporosis, and osteoarthritis. *Bone & Joint Research* **2020**, *9*, 798–807, doi:10.1302/2046-3758.911.bjr-2020-0178.r1.
 23. Juban, G.; Chazaud, B. Efferocytosis during Skeletal Muscle Regeneration. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10123267.
 24. Kuang, S.; Kuroda, K.; Le Grand, F.; Rudnicki, M.A. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* **2007**, *129*, 999–1010, doi:10.1016/j.cell.2007.03.044.
 25. Alway, S.E.; Morissette, M.R.; Siu, P.M. *Aging and apoptosis in muscle*; Seventh Ed.; Elsevier Inc., 2011; ISBN 9780123786388.
 26. Davis, R.L.; Weintraub, H.; Lassar, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **1987**, *51*, 987–1000, doi:10.1016/0092-8674(87)90585-X.
 27. Zammit, P.S.; Relaix, F.; Nagata, Y.; Ruiz, A.P.; Collins, C.A.; Partridge, T.A.; Beauchamp, J.R. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science* **2006**, *119*, 1824–1832, doi:10.1242/jcs.02908.
 28. Ganassi, M.; Badodi, S.; Wanders, K.; Zammit, P.S.; Hughes, S.M. Myogenin is an essential regulator of adult myofibre growth and muscle stem cell homeostasis. *eLife* **2020**, *9*, e60445, doi:10.7554/eLife.60445.
 29. von Maltzahn, J.; Chang, N.C.; Bentzinger, C.F.; Rudnicki, M.A. Wnt signaling in myogenesis. *Trends in Cell Biology* **2012**, *22*, 602–609, doi:10.1016/j.tcb.2012.07.008.
 30. Schmidt, M.; Schüller, S.C.; Hüttner, S.S.; von Eyss, B.; von Maltzahn, J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2019**, *76*, 2559–2570, doi:10.1007/s00018-019-03093-6.

31. Kann, A.P.; Hung, M.; Wang, W.; Nguyen, J.; Gilbert, P.M.; Wu, Z.; Krauss, R.S. An injury-responsive Rac-to-Rho GTPase switch drives activation of muscle stem cells through rapid cytoskeletal remodeling. *Cell Stem Cell* **2022**, *29*, 933–947.e6, doi:10.1016/j.stem.2022.04.016.
32. Choi, S.; Ferrari, G.; Tedesco, F.S. Cellular dynamics of myogenic cell migration: molecular mechanisms and implications for skeletal muscle cell therapies. *EMBO Molecular Medicine* **2020**, *12*, 1–18, doi:10.15252/emmm.202012357.
33. Mazzotti, A.L.; Coletti, D. The need for a consensus on the location “central nuclei” in striated muscle myopathies. *Frontiers in Physiology* **2016**, *7*, 1–4, doi:10.3389/fphys.2016.00577.
34. Wang, Y.X.; Rudnicki, M.A. Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2012**, *13*, 127–133, doi:10.1038/nrm3265.
35. Mostowy, S.; Cossart, P. Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2012**, *13*, 183–194, doi:10.1038/nrm3284.
36. Cleary, J.M.; Hancock, W.O. Molecular mechanisms underlying microtubule growth dynamics. *Current Biology* **2021**, *31*, R560–R573, doi:10.1016/j.cub.2021.02.035.
37. Spiliotis, E.T.; Nakos, K. Cellular functions of actin- and microtubule-associated septins. *Current Biology* **2021**, *31*, R651–R666, doi:10.1016/j.cub.2021.03.064.
38. Schaks, M.; Giannone, G.; Rottner, K. Actin dynamics in cell migration. *Essays in Biochemistry* **2019**, *63*, 483–495, doi:10.1042/EBC20190015.
39. Lehka, L.; Rędownicz, M.J. Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2020**, *104*, 81–92, doi:10.1016/j.semcdb.2020.02.004.
40. Blanchoin, L.; Boujemaa-Paterski, R.; Sykes, C.; Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews* **2014**, *94*, 235–263, doi:10.1152/physrev.00018.2013.
41. Liu, Z.; Vong, Q.P.; Liu, C.; Zheng, Y. Borg5 is required for angiogenesis by regulating persistent directional migration of the cardiac microvascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell* **2014**, *25*, 841–851, doi:10.1091/mbc.E13-09-0543.
42. Farrugia, A.J.; Rodríguez, J.; Orgaz, J.L.; Lucas, M.; Sanz-Moreno, V.; Calvo, F. CDC42EP5/BORG3 modulates SEPT9 to promote actomyosin function, migration, and invasion. *Journal of Cell Biology* **2020**, *219*, doi:10.1083/JCB.201912159.

43. Seetharaman, S.; Etienne-Manneville, S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology* **2020**, *30*, 720–735, doi:10.1016/j.tcb.2020.06.004.
44. Connolly, D.; Abdesselam, I.; Verdier-Pinard, P.; Montagna, C. Septin roles in tumorigenesis. *Biological Chemistry* **2011**, *392*, 725–738, doi:10.1515/BC.2011.073.
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. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2018**, *22*, 3298–3307, doi:10.1111/jcmm.13623.
46. Gönczi, M.; Dienes, B.; Dobrosi, N.; Fodor, J.; Balogh, N.; Oláh, T.; Csernoch, L. Septins, a cytoskeletal protein family, with emerging role in striated muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **2020**, doi:10.1007/s10974-020-09573-8.
47. 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.
48. Zent, E.; Wittinghofer, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biological Chemistry* **2014**, *395*, 169–180, doi:10.1515/hsz-2013-0268.
49. 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. *Biochemical Journal* **2013**, *450*, 95–105, doi:10.1042/BJ20120851.
50. Estey, M.P.; Kim, M.S.; Trimble, W.S. Septins. *Current Biology* **2011**, *21*, 384–387, doi:10.1016/j.cub.2011.03.067.
51. 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*. *Molecular Biology of the Cell* **2004**, *15*, 4568–4583, doi:10.1091/mbc.e04-04-0330.
52. 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.
53. Mendonça, D.C.; Guimarães, S.L.; Pereira, H.D.; 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. *Journal of molecular biology* **2021**, *433*, 167096,

doi:10.1016/j.jmb.2021.167096.

54. Zeraik, A.E.; Staykova, M.; Fontes, M.G.; Nemuraitè, 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.
55. Cannon, K.S.; Woods, B.L.; Crutchley, J.M.; Gladfelter, A.S. An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. *Journal of Cell Biology* **2019**, *218*, 1128–1137, doi:10.1083/jcb.201807211.
56. Jiao, F.; Cannon, K.S.; Lin, Y.C.; Gladfelter, A.S.; Scheuring, S. The hierarchical assembly of septins revealed by high-speed AFM. *Nature Communications* **2020**, *11*, 1–13, doi:10.1038/s41467-020-18778-x.
57. 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. *Molecular Biology of the Cell* **2021**, *32*, 1–9, doi:10.1091/mbc.E20-05-0303.
58. 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. *Current Biology* **1999**, *9*, 1458–1467, doi:10.1016/S0960-9822(00)80115-3.
59. Garcia, W.; de Araújo, A.P.U.; de Oliveira Neto, M.; Ballester, 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, doi:10.1021/bi061549z.
60. Woods, B.L.; Gladfelter, A.S. The state of the septin cytoskeleton from assembly to function. *Current Opinion in Cell Biology* **2021**, *68*, 105–112, doi:10.1016/j.ceb.2020.10.007.
61. 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.
62. Deb, B.K.; Pathak, T.; Hasan, G. Store-independent modulation of Ca²⁺ entry through Orai by Septin 7. *Nature Communications* **2016**, *7*, doi:10.1038/ncomms11751.
63. Deb, B.K.; Hasan, G. Regulation of store-operated Ca²⁺ entry by septins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2016**, *4*, 1–7, doi:10.3389/fcell.2016.00142.
64. Tada, T.; Simonetta, A.; Batterton, M.; Kinoshita, M.; Edbauer, D.; Sheng, M. Role of

- Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons. *Current Biology* **2007**, *17*, 1752–1758, doi:10.1016/j.cub.2007.09.039.
65. Elkhadragy, L.; Alsaran, H.; Long, W. The C-terminus tail regulates ERK3 kinase activity and its ability in promoting cancer cell migration and invasion. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 1–14, doi:10.3390/ijms21114044.
 66. 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. *Endocrine Pathology* **2011**, *22*, 86–96, doi:10.1007/s12022-011-9157-8.
 67. 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. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2014**, *33*, 1537–1546, doi:10.1159/000358717.
 68. Calin, G.A.; Croce, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 857–866, doi:10.1038/nrc1997.
 69. 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 Genetics* **2014**, *10*, 1–12, doi:10.1371/journal.pgen.1004558.
 70. 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. *Biological Chemistry* **2011**, *392*, 769–777, doi:10.1515/BC.2011.088.
 71. Zeng, Y.; Cao, Y.; Liu, L.; Zhao, J.; Zhang, T.; Xiao, L.; Jia, M.; Tian, Q.; Yu, H.; Chen, S.; et al. SEPT9_i1 regulates human breast cancer cell motility through cytoskeletal and RhoA/FAK signaling pathway regulation. *Cell Death and Disease* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41419-019-1947-9.
 72. Zhang, N.; Liu, L.; Fan, N.; Zhang, Q.; Wang, W.; Zheng, M.; Ma, L.; Li, Y.; Shi, L. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 61587–61600, doi:10.18632/oncotarget.11402.

73. Verdier-Pinard, P.; Salaun, D.; Bouguenina, H.; Shimada, S.; Pophillat, M.; Audebert, S.; Agavnian, E.; Coslet, S.; Charafe-Jauffret, E.; Tachibana, T.; et al. Septin 9-i2 is downregulated in tumors, impairs cancer cell migration and alters subnuclear actin filaments. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 1–18, doi:10.1038/srep44976.
74. Fan, Y.; Du, Z.; Ding, Q.; Zhang, J.; Op Den Winkel, M.; Gerbes, A.L.; Liu, M.; Steib, C.J. SEPT6 drives hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion via the Hippo/YAP signaling pathway. *International Journal of Oncology* **2021**, *58*, 1–13, doi:10.3892/IJO.2021.5205.
75. Hong, Y.; Li, X.; Zhu, J. LSD1-mediated stabilization of SEPT6 protein activates the TGF- β 1 pathway and regulates non-small-cell lung cancer metastasis. *Cancer Gene Therapy* **2022**, *29*, 189–201, doi:10.1038/s41417-021-00297-6.
76. Hou, M.; Liu, X.; Cao, J.; Chen, B. SEPT7 overexpression inhibits glioma cell migration by targeting the actin cytoskeleton pathway. *Oncology Reports* **2016**, *35*, 2003–2010, doi:10.3892/or.2016.4609.
77. Chen, T.Y.; Lin, T.C.; Kuo, P.L.; Chen, Z.R.; Cheng, H. ling; Chao, Y.Y.; Syu, J.S.; Lu, F.I.; Wang, C.Y. Septin 7 is a centrosomal protein that ensures S phase entry and microtubule nucleation by maintaining the abundance of p150glued. *Journal of Cellular Physiology* **2021**, *236*, 2706–2724, doi:10.1002/jcp.30037.
78. Heasley, L.R.; Garcia, G.; McMurray, M.A. Off-target effects of the septin drug forchlorfenuron on nonplant eukaryotes. *Eukaryotic Cell* **2014**, *13*, 1411–1420, doi:10.1128/EC.00191-14.
79. Henzi, T.; Diep, K.-L.; Oberson, A.; Salicio, V.; Bochet, C.G.; Schwaller, B. Forchlorfenuron and Novel Analogs Cause Cytotoxic Effects in Untreated and Cisplatin-Resistant Malignant Mesothelioma-Derived Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23073963.
80. Sun, L.; Cao, X.; Lechuga, S.; Feygin, A.; Naydenov, N.G.; Ivanov, A.I. A Septin Cytoskeleton-Targeting Small Molecule, Forchlorfenuron, Inhibits Epithelial Migration via Septin-Independent Perturbation of Cellular Signaling. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9010084.
81. Kim, K.K.; Singh, R.K.; Khazan, N.; Kodza, A.; Singh, N.A.; Jones, A.; Sivagnanalingam, U.; Towner, M.; Itamochi, H.; Turner, R.; et al. Development of Potent Forchlorfenuron Analogs and Their Cytotoxic Effect in Cancer Cell Lines. *Scientific Reports* **2020**, *10*, 1–

- 8, doi:10.1038/s41598-020-59824-4.
82. Gönczi, M.; Dienes, B.; Dobrosi, N.; Fodor, J.; Balogh, N.; Oláh, T.; Csernoch, L. Septins, a cytoskeletal protein family, with emerging role in striated muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **2021**, *42*, 251–265, doi:10.1007/s10974-020-09573-8.
 83. 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.
 84. Hall, P.A.; Russell, S.H. Mammalian septins: Dynamic heteromers with roles in cellular morphogenesis and compartmentalization. *Journal of Pathology* **2012**, *226*, 287–299, doi:10.1002/path.3024.
 85. Capetanaki, Y.; Milner, D.J.; Weitzer, G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell structure and function* **1997**, *22*, 103–116, doi:10.1247/csf.22.103.
 86. De Vos, K.J.; Allan, V.J.; Grierson, A.J.; Sheetz, M.P. Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Current Biology* **2005**, *15*, 678–683, doi:10.1016/j.cub.2005.02.064.
 87. 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 reports* **2016**, *17*, 858–873, doi:10.15252/embr.201541612.
 88. Pagliuso, A.; Cossart, P.; Stavru, F. The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2018**, *75*, 355–374, doi:10.1007/s00018-017-2603-0.
 89. Zent, E.; Vetter, I.; Wittinghofer, A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. *Biological Chemistry* **2011**, *392*, 791–797, doi:10.1515/BC.2011.082.
 90. Hu, Q.; Nelson, W.J.; Spiliotis, E.T. Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 29563–29571, doi:10.1074/jbc.M804962200.
 91. Oh, Y.; Bi, E. Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends in Cell Biology* **2011**, *21*, 141–148, doi:10.1016/j.tcb.2010.11.006.
 92. Bridges, A.A.; Gladfelter, A.S. Septin form and function at the cell cortex. *Journal of*

- Biological Chemistry* **2015**, 290, 17173–17180, doi:10.1074/jbc.R114.634444.
93. Lam, M.; Calvo, F. Regulation of mechanotransduction: Emerging roles for septins. *Cytoskeleton* **2019**, 76, 115–122, doi:10.1002/cm.21485.
 94. Dolat, L.; Hu, Q.; Spiliotis, E.T. Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biological Chemistry* **2014**, 395, 123–141, doi:10.1515/hsz-2013-0233.
 95. Kinoshita, M. Insight into Septin Functions from Mouse Models. In *The Septins*; John Wiley & Sons, Ltd, 2008; pp. 319–336 ISBN 9780470779705.
 96. Röseler, S.; Sandrock, K.; Bartsch, I.; Busse, A.; Omran, H.; Loges, N.T.; Zieger, B. Lethal phenotype of mice carrying a Sept11 null mutation: **2011**, 392, 779–781, doi:doi:10.1515/BC.2011.093.
 97. Abbey, M.; Hakim, C.; Anand, R.; Lafera, J.; Schambach, A.; Kispert, A.; Taft, M.H.; Kaefer, V.; Kotlyarov, A.; Gaestel, M.; et al. GTPase domain driven dimerization of SEPT7 is dispensable for the critical role of septins in fibroblast cytokinesis. *Scientific Reports* **2016**, 6, 1–15, doi:10.1038/srep20007.
 98. Jiang, H.; Hua, D.; Zhang, J.; Lan, Q.; Huang, Q.; Yoon, J.G.; Han, X.; Li, L.; Foltz, G.; Zheng, S.; et al. MicroRNA-127-3p promotes glioblastoma cell migration and invasion by targeting the tumor-suppressor gene SEPT7. *Oncology Reports* **2014**, 31, 2261–2269, doi:10.3892/or.2014.3055.
 99. Merenich, D.; Nakos, K.; Pompan, T.; Donovan, S.J.; Gill, A.; Patel, P.; Spiliotis, E.T.; Myers, K.A. Septins guide noncentrosomal microtubules to promote focal adhesion disassembly in migrating cells. *Molecular Biology of the Cell* **2022**, 33, 1–22, doi:10.1091/mbc.E21-06-0334.
 100. Nölke, T.; Schwan, C.; Lehmann, F.; Østevold, K.; Pertz, O.; Aktories, K. Septins guide microtubule protrusions induced by actin-depolymerizing toxins like Clostridium difficile transferase (CDT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, 113, 7870–7875, doi:10.1073/pnas.1522717113.
 101. 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. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24.
 102. De Gasperi, R.; Csernoch, L.; Dienes, B.; Gonczi, M.; Chakrabarty, J.K.; Goeta, S.; Aslan, A.; Toro, C.A.; Karasik, D.; Brown, L.M.; et al. Septin 7 Interacts With Numb To Preserve Sarcomere Structural Organization And Muscle Contractile Function **2023**.

103. Bhattacharya, D.; Scimè, A. Mitochondrial Function in Muscle Stem Cell Fates. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*, 1–15, doi:10.3389/fcell.2020.00480.
104. Pagliuso, A.; Tham, T.N.; Stevens, J.K.; Lagache, T.; Persson, R.; Salles, A.; Olivo-Marin, J.-C.; Oddos, S.; Spang, A.; Cossart, P.; et al. A role for septin 2 in Drp1-mediated mitochondrial fission. *EMBO reports* **2016**, *17*, 858–873, doi:https://doi.org/10.15252/embr.201541612.
105. Dash, S.N.; Narumanchi, S.; Paavola, J.; Perttunen, S.; Wang, H.; Lakkisto, P.; Tikkanen, I.; Lehtonen, S. Sept7b is required for the subcellular organization of cardiomyocytes and cardiac function in zebrafish. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **2017**, *312*, H1085–H1095, doi:10.1152/ajpheart.00394.2016.
106. Jia, Z.F.; Huang, Q.; Kang, C.S.; Yang, W.D.; Wang, G.X.; Yu, S.Z.; Jiang, H.; Pu, P.Y. Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth. *Journal of Neuro-Oncology* **2010**, *98*, 329–340, doi:10.1007/s11060-009-0092-1.
107. Becsky, D.; Szabo, K.; Gyulai-Nagy, S.; Gajdos, T.; Bartos, Z.; Balind, A.; Dux, L.; Horvath, P.; Erdelyi, M.; Homolya, L.; et al. Syndecan-4 Modulates Cell Polarity and Migration by Influencing Centrosome Positioning and Intracellular Calcium Distribution. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*, 1–17, doi:10.3389/fcell.2020.575227.
108. Kim, J.M.; Lee, M.; Kim, N.; Heo, W. Do Optogenetic toolkit reveals the role of Ca²⁺ sparklets in coordinated cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113*, 5952–5957, doi:10.1073/pnas.1518412113.
109. Tsai, F.C.; Kuo, G.H.; Chang, S.W.; Tsai, P.J. Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/409245.
110. Kandi, R.; Senger, K.; Grigoryan, A.; Soller, K.; Sakk, V.; Schuster, T.; Eiwen, K.; Menon, M.B.; Gaestel, M.; Zheng, Y.; et al. Cdc42-Borg4-Septin7 axis regulates HSC polarity and function. *EMBO reports* **2021**, *22*, 1–13, doi:10.15252/embr.202152931.
111. Kramer, N.; Walzl, A.; Unger, C.; Rosner, M.; Krupitza, G.; Hengstschläger, M.; Dolznig, H. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* **2013**, *752*, 10–24, doi:10.1016/j.mrrev.2012.08.001.

112. Lei, H.; Leong, D.; Smith, L.R.; Barton, E.R. Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2013**, *305*, C529–C538, doi:10.1152/ajpccell.00051.2013.
113. Frazier, J.A.; Wong, M.L.; Longtine, M.S.; Pringle, J.R.; Mann, M.; Mitchison, T.J.; Field, C. Polymerization of purified yeast septins: Evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *Journal of Cell Biology* **1998**, *143*, 737–749, doi:10.1083/jcb.143.3.737.
114. Bertin, A.; McMurray, M.A.; Grob, P.; Park, S.S.; Garcia, G.; Patanwala, I.; Ng, H.L.; Alber, T.; Thorner, J.; Nogales, E. *Saccharomyces cerevisiae* septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 8274–8279, doi:10.1073/pnas.0803330105.
115. DeMay, B.S.; Bai, X.; Howard, L.; Occhipinti, P.; Meseroll, R.A.; Spiliotis, E.T.; Oldenbourg, R.; Gladfelter, A.S. Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals. *Journal of Cell Biology* **2011**, *193*, 1065–1081, doi:10.1083/jcb.201012143.
116. Mendonça, D.C.; Macedo, J.N.; Guimarães, S.L.; Barroso da Silva, F.L.; Cassago, A.; Garratt, R.C.; Portugal, R. V.; Araujo, A.P.U. A revised order of subunits in mammalian septin complexes. *Cytoskeleton* **2019**, *76*, 457–466, doi:10.1002/cm.21569.
117. Sun, L.; Cao, X.; Lechuga, S.; Feygin, A.; Naydenov, N.G.; Ivanov, A.I. Septin-Independent Perturbation of Cellular Signaling. **2019**.
118. Marasco, D.; Scognamiglio, P. Identification of Inhibitors of Biological Interactions Involving Intrinsically Disordered Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 7394–7412, doi:10.3390/ijms16047394.
119. Vardi-Oknin, D.; Golan, M.; Mabjeesh, N.J. Forchlorfenuron disrupts SEPT9-i1 filaments and inhibits HIF-1. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0073179.
120. Blum, W.; Henzi, T.; Pecze, L.; Diep, K.L.; Bochet, C.G.; Schwaller, B. The phytohormone forchlorfenuron decreases viability and proliferation of malignant mesothelioma cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2019**, *10*, 6944–6956, doi:10.18632/oncotarget.27341.

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/424/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 49,734

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

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

Debrecen, 2023.09.14.



13 Tárgyszavak-Key Words

Magyarul:

Mioblaszt, C2C12, Szeptin, migráció, Szeptin7, vázizom, regeneráció, miogenezis, citoszkeleton, intracelluláris kalcium

Angolul:

Myoblast, C2C12, Septin, migration, Septin7, skeletal muscle, regeneration, myogenesis, cytoskeleton, intracellular calcium

14 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szentandrásyné Gönczi Mónikának, aki már egyetemista koromban is lelkesen támogatott, tudományos gondolkodásmódomat formálta, munkámat segítette és példát mutatott, mind szakmailag és emberileg egyaránt és mindig kiállt mellettem, még a legnehezebb időszakokban is.

Hálás vagyok Dr. Csernoch László Professzor Úrnak, aki megteremtette a lehetőséget, támogatást adott, hogy az Élettani Intézetben végezhessek kutatásokat, továbbá a kritikus tudományos gondolkodás és precizitás alapjait átadta számomra.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet Kalciumhomeosztázis Munkacsoport tagjainak, akik állandó gyakorlati tanácsaikkal, iránymutatásokkal nagyban hozzájárultak a gyakorlati és elméleti tudásom nagyfokú fejlődéséhez. Köszönöm az Élettani Intézet további munkatársainak, jelenlegi aktív és volt PhD hallgatóinak, hogy baráti támogató környezetet teremtettek és ezzel nagyban segítették a munkámat.

Szeretném megköszönni Édesanyámnak és Édesapámnak, hogy nem csak a PhD tanulmányaim alatt, de eddigi összes megpróbáltatás során mellettem voltak és hatalmas segítséget nyújtották számomra. Továbbra is számíthatok rájuk.

Hálás vagyok Arnoldnak és Marcellnek, akikkel a tudományos konzultációkat a családi találkozókra rendszeresen napirendre vesszük.

Végül, pedig köszönöm Feleségemnek, Nórának a kitartó támogatást és gyermekeimnek, Hannának és Sárának, akik a PhD képzés kezdete óta a tudományos tevékenységemmel együtt nőnek fel.

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, Inzulinrezisztencia, Űrkutatás (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) és az Debreceni Egyetem Tudományos Kiválóság támogatását szintén köszönöm.

PhD képzésem során a „Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj” című, NTP-NFTÖ-21-B-0173 számú pályázat támogatta a kutatásomat.

15 Függelék

A disszertációhoz felhasznált eLife cikk „Septin7 is indispensable for proper skeletal muscle architecture and function” során a hozzájárulásom az eLife cikkben szereplő C2C12 sejtekkel kapcsolatos kísérletek tervezése, módszertana, végrehajtása, adatelemzése és kiértékelése volt, továbbá a kézirat megírásában, a témámat érintő részekben részt vettem.

A disszertációhoz felhasznált Cells cikk „Migration of Myogenic Cells Is Highly Influenced by Cytoskeletal Septin7” esetében hozzájárulásom a kísérletek tervezése, módszertana, végrehajtása, adatelemzés és kiértékelés volt, továbbá részt vettem az eredeti kézirat megírásában és későbbi áttekintésében, ábrák tervezésében és szerkesztésében.