

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A citoszkéletális szeptin7 fehérje szerepe a
vázizmok működésében és regenerációjában**

Szabó László

Témavezető: Dr. Dienes Beatrix



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

A citoszeletális szeptin7 fehérje szerepe a vázizmok működésében és regenerációjában

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

Írta: Szabó László
okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Dienes Beatrix

Az értekezés bírálói:

Dr. Szikora Szilárd, PhD
Dr. Matta Csaba, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Panyi György, MTA doktora
tagok: Dr. Szikora Szilárd, PhD
Dr. Matta Csaba, PhD
Dr. Mádi András, PhD
Dr. Puskár Zita, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2024. április 22, 13 óra

1. Bevezetés

Az orvostudomány fejlődése során a különböző szervrendszerek működésének megértésére törekszünk az életminőség megőrzése céljából. A harántcsíkolt vázizomzat megfelelő működése rendkívül fontos mind egyéni, mind társadalmi szinten egészségügyi és gazdasági szempontból is. Az izomsorvadásos betegségek, az időskori izomvesztés és a mikrogravitáció okozta izomleépülés mind jelen korunk egyik limitáló tényezője.

Az eddig ismert citoskeletális alkotóelemeket - az aktint, az intermedier filamentumokat és a mikrotubulusokat - már vizsgálták, és szerepüket részben felderítették, azonban az utóbbi évtizedek során újabb vázfehérje-családot azonosítottak, a szeptineket. Ezen szeptin fehérjék egymással igazoltan képesek oligomereket és magasabb szintű szerkezeteket képezni. Makromolekuláris komplexeket alkotva részt vesznek a sejtosztódás, differenciálódás, migráció, immunválaszok, áttétképződések folyamataiban. A szeptinek vázizomműködésben betöltött szerepük azonban még nem tisztázott. Szerkezeti összetételük alapján négy nagy csoportba sorolhatjuk a szeptineket. A Szeptin7 egyedüli a csoportjában, és eddigi ismereteink szerint a magasabb szintű komplexek felépítésében rendkívüli fontossággal bír.

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

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A citoskeletális rendszer

A citoskeleton vagy más néven sejtváza egy egymással kölcsönható és egymáshoz kapcsolódó fehérjeszálak összetett és dinamikus hálózata, amely az összes sejt citoplazmájában jelen van. Három fő komponensből áll: mikrofilamentumokból, köztes filamentumokból és mikrotubulusokból. A citoskeleton elsődleges feladata, hogy szabályozza a sejt alakját és ellenálljon a deformációval szemben, valamint biztosítja a kapcsolatot az extracelluláris térrel és az ott jelenlévő kötőszövetrel és más sejtekkel. A citoskeleton a korábban említett tulajdonságai miatt részt vesz a sejtek migrációjában is. Ezen túlmenően számos jelátviteli útvonalban, az extracelluláris anyagfelvételében, vagyis az endocitózisban, a sejtosztódás során a kromoszómák

szegregációjában, a sejtsztódás citokinézis szakaszában és a sejtsztódás megszervezésében is szerepe van. Az említett sejt-folyamatokon kívül különleges struktúrákat is felépíthet, például flagellákat, csillókat, valamint lamellipodiákat és podoszómákat is képezhet.

2.1.2 Aktin

Az aktin fehérje szerkezete globuláris, mérete megközelítőleg 42 kDa, átmérője 4-7 nm. Mikrofilamentumokat képeznek a citoskeletonban. Aktin esetén három fő izoformát azonosítottak: az alfa, a béta és a gamma csoportot. A sejtekben megjelenhet szabad monomerként, G-aktinként, vagy egy lineáris polimerként, azaz mikrofilamentumként, az F-aktin formában. Nélkülözhetetlenek számos létfontosságú sejt-funkcióban például a migráció, sejtsztódás, a sejtalak meghatározása, az izomösszehúzóds, a vezikulák és organelumok transzportja, különböző jelátviteli folyamatok és a sejt-sejt, valamint a sejt-környezet kapcsolatok kialakítása. Ezen folyamatokban az aktin fehérjék és a sejtmembrán kölcsönhatásai kiemelt szerepet játszanak. Részt vesznek a dezmoszómák és a hemidezmoszómák felépítésében.

2.1.3 Tubulin

A tubulinok evolúciósan erősen konzervált fehérjék, amelyek minden eukariótában megtalálhatók. Rendelkeznek GTPáz aktivitással, összeszerelési és szétszerelési képességgel, valamint polimer szerkezetet alakíthatnak ki. Mind az α , mind a β tubulinok tömege körülbelül 50 kDa. Az $\alpha\beta$ -tubulin dimerek mikrotubulusokká állnak össze, ami egy dinamikus polimer, amely számos funkcióban vesz részt, de elsődlegesen a mitózisban betöltött szerepük. A kromoszómák szétválásánál elengedhetetlenek a kinetokor régióhoz kapcsolódó mikrotubulusok és az osztódási orsó létrejöttéhez. Nélkülözhetetlen a sejtben belüli vezikulatranszport megszervezéséhez is.

2.1.4 Intermediér filamentumok

Az intermediér (köztes) filamentumok nevüket arról kapták, hogy az átmérőjük körülbelül 10 nm, ami az aktin filamentumoknak (körülbelül 7 nm) és a mikrotubulusoknak (körülbelül 25 nm) az átmérője között van. Az eddigi megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy alapvetően szerkezeti szerepet játszanak azáltal, hogy mechanikai szilárdságot biztosítanak a sejteknek és szöveteknek. A nem polarizált

fehérjeegységek közötti szoros kapcsolatok nagy szakítószilárdságú filamentumokat biztosítanak. Ez teszi őket a citoskeleton legstabilabb összetevőjévé. Ezen ellenállóságuknak köszönhető előfordulásuk a különösen tartós szerkezetekben, mint például a haj, a bőr és a körmök. Az intermedier filamentumok elsődleges funkciója a sejtkapcsolatok létrehozása és a feszülés alatt lévő hámsejt rétegek szakadásának megakadályozása. Az intermedier filamentumok növelik a sejtek és szövetek torziós, nyomó-, nyújtó- és hajlítóerőkkel szembeni ellenállását. Részt vesznek továbbá a magmembrán kialakításában is, ahol segítik a sejt DNS-tartalmának védelmét és szerveződését.

2.2 Szeptinek

2.2.1 A szeptin fehérjecsald

A szeptin név eredete a szeparáció kifejezésből származik, és a *Saccharomyces cerevisiae* bimbózó élesztőben írták le először, ahol a sejtosztódásban, az utódsejtek elválasztásában játszik fontos szerepet. A szeptinek evolúciósan erősen konzervált guanozin-trifoszfátot (GTP) kötő fehérjék, valamint GTPáz funkcióval is rendelkeznek. A szeptinek legkorábban felismert, sejtosztódásban betöltött szerepén kívül egyéb sejtspecifikus funkciókat is elláthatnak. Ebből adódóan fontos szerepük van számos fiziológiai és patológiás sejt folyamatban, például a karcinogenezisben, excitózisban, endocitózisban és a membránszerveződésben. Eddig 13 humán szeptin izoformát azonosítottak, amelyeket szerkezet- és a szekvenciahomológia alapján négy funkcionális csoportba soroltak (SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7).

2.2.2 A szeptinek szerkezete és működése

A szeptinek funkcióját és a hozzá szükséges aminosavszerkezetet vizsgálva megfigyelhetjük, hogy a szeptinekben jelen van egy AKAD szekvencia, valamint egy Walker A (GxxxxGKS/T) és B (DxxG) motívum, melyek a GTP specifikus kötődésért felelősek (polibázis régió). A szeptinek meglepő módon a GTP-kötő doménjeiken keresztül képesek oligomerizálódni. Ezen komplexek kialakításához a szomszédos GTP-kötő domének, vagyis G felszín, valamint az N- és C-terminális nyúlványok által kialakított NC felszín közötti kölcsönhatások szükségesek.

A szeptinek szerkezetében fontos szerkezeti sajátosság a Septin Unique Element (SUE) elnevezésű szekvencia, amely a G-től az NC-felszínig terjed, és lehetővé teszi a filamentózus szerkezetek kialakítását.

A szeptin izoformák jelentős részének C-terminális doménjében Coiled Coil (CC) szekvenciák találhatóak. A CC domén mellett a C-doménen belül két további szerkezeti rész is megtalálható: C_N, valamint a CC-t követő régió. A C_N-régió nagyfokú szerkezeti és szekvencia variabilitással rendelkezik, és ennek köszönhetően rendkívüli rugalmasságot mutat. A vizsgálatok alapján a Coiled Coil domént kísérő régió rendezetlen szerkezetű. A C-terminális szakasz egy polibázisú szekvencia. Ez a motívum a más szeptinekben található különböző polibázisos doménekkal (PB1 és PB2) együtt segíthet kialakítani számos membrán-szeptin kölcsönhatást.

Az élesztővel és *Drosophila*-val végzett korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy több szeptin izoforma is részt vehet egy molekulakomplex felépítésében. Ahogy a strukturális csoportok meghatározásából és eddigi szerkezeti ismereteinkből tudjuk, a Szeptin7 csoportjának egyedüli képviselője. Esszenciális szerepet játszik a hetero-oligomer komplexek kialakításában, és a magasabb rendű citoskeletális struktúrák összeszerelésében.

2.3 A szeptin7 fehérje

A szeptin7 fehérjét kódoló génszakasz (SEPTIN7) emberben a 7p14.2 kromoszóma területen található és 1254-1311 nukleotidot tartalmaz, 19 exon régióval rendelkezik, ami 418-437 aminosavat kódol. A szeptin7 egy G-felszínen keresztül képes önmagával dimert képezni.

2.3.1 A szeptin7 fehérje szerepe élettani folyamatokban

A szeptin7 jelentőségét már többféle sejtélettani folyamatban is leírták. A *Drosophila* modellrendszerrel végzett kísérletek során a szeptin7 hiánya és emelkedett kifejeződése is repülési rendellenességet eredményezett, ami a kalciumraktárak és a kalciumhomeosztázis érintettségére utalt. Ezen eredmények alapján a szeptin7 az intracelluláris Ca²⁺ szint szabályozásában közvetlenül vagy közvetett módon is részt vehet. A szeptin rendszer és szeptin7 szerepe a migrációban és a fagocitózisban fontos tényező a különböző immunsejtek funkciója szempontjából. A szeptin7 szerepét eddig vizsgálták már neuronokban és az idegrendszerben, ahol több sejtípusban is kimutatták már. A sejtosztódásban betöltött szerepe miatt befolyásolhatja bizonyos gliómák, papilláris pajzsmirigyák és májkarcinómák kialakítását. A szeptin7 túlzott mennyisége, amit okozhat fokozott expresszió vagy csökkent degradáció, gátolhatja a sejtproliferációt és leállítja a sejtciklust, és a tumorsejtek apoptózisát indukálhatja.

A szeptin7 ilyen ellentmondásosnak tűnő hatása arra vezethető vissza, hogy a sejtosztódás folyamatában két jól elkülönülő, kinetikai és elhelyezkedési szempontból különböző folyamatban is részt vesz.

Az alábbi példákat szemlélve, kijelenthető hogy a szeptin7 szerepe eltérő lehet különböző sejtekben. Ez a diverzitás többek között a sejt-specifikus környezettől, és az adott sejt-típusokban kifejeződő partnerfehérjéktől is függhet.

2.4 A vázizomrostok jellemzése

2.4.1 A vázizomrostok felépítése

Az egyedi vázizomrostokat egy sajátos sejtmembrán, a szarkolemma, veszi körül. A sejt citoplazmájában helyezkednek el a kontraktilis fehérjék, melyek jelentős tömegét alkotja a sejt fehérjetartalmának. A kontraktilis rendszert két fő alkotóelem építi fel: a vastag filamentumot a miozin képezi, míg a vékony filamentum aktin molekulákból áll. A rostban megtalálhatók még az energiatermeléshez nélkülözhetetlen nagyszámú mitokondriumok és a szarkolemma alatt elhelyezkedő sejtmagok. A myofilamentumok myofibrillumokba rendeződnek, melyeket egy fejlett membránrendszer, a szarkoplazmatikus retikulum (SR) vesz körül. Egy izomrostot néhány száz myofibrillum épít fel, amelyek mindegyike a Z-lemezek által több megközelítőleg 1,9-2,1 μm hosszú szarkomerre bontható.

2.4.2 A kontraktilis fehérjék

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

A miozin egy a vázizomban fellelhető motorfehérje, ami az izomösszehúzódásért felelős energiaigényes konformációváltozás kialakításában játszik szerepet. A miozin molekulának van egy kétfelé ágazó fejrésze, ami ATP-áz aktivitással bír, ami egy nyaki szakaszhoz kapcsolódik. Több száz miozin molekula épül össze egyetlen komplexszé, ami kialakítja a vastag filamentumot.

A vázizom vékony filamentumának fő alkotóeleme az aktin. Az aktinnal számos, a kontrakció szabályozásában résztvevő fehérje áll kapcsolatban. Az ugyancsak filamentózus tropomiozin az aktin filamentum köré csavarodva helyezkedik el, olyan konformációban, amelyben a tropomiozin molekula lefedi az aktin monomer miozin-kötőhelyét. A tropomiozin szerepe az aktin és miozin közötti kapcsolat

kialakulásának gátlása és ezáltal a kontrakció szabályozása. Az aktinhoz kapcsolódik továbbá egy troponin komplex, ami három alegységből áll. A troponin-C (TnC, MW=18 kDa) a Ca^{2+} ion megkötésében játszik szerepet; a troponin-T (Tn-T, MW=37 kDa) egy kapcsolófehérje, ami a troponin komplexet a tropomiozinhez rögzíti; a troponin-I (Tn-I, MW=24 kDa) közvetlenül felelős a gátló hatásért mert megakadályozza az aktin és miozin közötti kereszthídképződést. A komplex működése folyamán az elektromechanikai-kapcsolás során a megemelkedett Ca^{2+} -szint miatt a komplex Ca^{2+} -ot köt és konformációt változtat, aminek a következtében megszűnik a TnI gátló szerkezete és létrejöhetnek az aktin-miozin kapcsolatok.

2.4.3 T-tubulus rendszer és szarkoplazmatikus retikulum

A megfelelő anyagmozgásért a szarkolemmában transzverzális irányban a rostok belseje felé irányuló betüremkedések vannak, amelyek egy speciális csatornarendszert vagyis a T-tubulus rendszert alkotják. A T-tubulus rendszerrel szoros kapcsolatban áll a szarkoplazmatikus retikulummal (SR), ami a vázizomrostokban jelenlévő módosult endoplazmatikus retikulum. A T-tubulusokhoz mindkét kétoldról csatlakozik az SR egy-egy kiöblösödő térrésze, a terminális ciszterna, és a három cső együttesen alkotja a triád struktúrát. A szarkolemmában megtalálható dihidropiridin receptor (DHPR) a membránon tovaterjedő akcióspotenciát érzékelve megváltoztatja a konformációját és a DHPR-rel közvetlen kapcsolatban lévő 1-es típusú rianodin receptor (RyR1) konformáció változását idézi elő. A nyitott RyR1-en keresztül az SR intracelluláris Ca^{2+} -raktárból felszabaduló Ca^{2+} teszi lehetővé az aktin-miozin közötti kapcsolat kialakulását és a kontrakció megkezdését. Ezt a folyamatot, amikor az elektromos impulzus (akciós potenciál) kontrakciónv alakul elektromechanikai kapcsolásnak, vagy más néven EC-kuplungnak nevezzük.

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

Az izomrostok kialakulásához három fő lépésnek kell megtörténnie. Az izomsejtek képződésének a kezdeti lépése az izomösszejtek vagyis a szatellita sejtek (SC) aktiválódása és osztódása. Az így képződő izomsejtek előzetes differenciációt követően a második fejlődési fázisban összeolvadnak egymással, amellyel létrehozzák a jellegzetes sokmagvú izomrostokat. Az utolsó szakaszban a még éretlennek tekinthető izomrostok a megfelelő vázizomrosttípussá differenciálódnak.

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

Az első fázis maga a vázizomsérülés és az azt követő nekrozis. A szövetkárosító hatás mértékétől és a behatási időtől függően beszélhetünk mikrosérülésekről, rostsérülésektől és az izomszövet teljes pusztulásától.

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

A korábban már említett vázizomspecifikus őssejtek a szatellita sejtek felelősek a regeneratív miogenezis fázisáért. Az izomrostok között nem véletlenszerűen jelenlévő szatellita sejtek a körülöttük lévő térrész, más néven niche fenntartásáért felelősek. A legfontosabb aktivációs markerek a Pax7, az Mcad, a VCAM1, és számos miogén marker is, mint a dezmin, a myogenic factor 5 (Myf-5) és a izomsejt elköteleződési fehérje (MyoD).

A szatellita sejtekből kialakuló és az újonnan képződő rostokba beépülő izomsejteknek differenciáción és érésen kell keresztülmenniük. Ezen fázisban a fokozott fehérjeszintézis miatt az alap esetben perifériásan elhelyezkedő sejtmagok centrális pozíciót foglalnak el a rostban, ami a fehérjeszintézis és anyagtranszport megkönnyítése miatt történik. A rost körüli extracelluláris mátrix (ECM) szintézise is ebben a fázisban zajlik, amit éppen ezért szöveti újjáépítésnek, más néven remodellingnek neveznek. Az ECM változatos összetételben tartalmaz fehérjéket, proteoglikánokat és glikoproteineket, amelyek fontos szerepet játszanak strukturális támasztóelemként, az erőátvitelben valamint a sejtosztódás és differenciáció szabályozásában.

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

3. Problémafelvetés és célkitűzés

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

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

Kísérleteinkben a következő kérdéseket terveztük megválaszolni:

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

4. Metodikák

4.1 Humán eredetű minták vizsgálata

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

4.2 Állatkísérletek és a kísérleti állatok tartása

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

4.3 Tamoxifen etetés

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

4.4 A HSA-MCM transzgenikus egértörzs létrehozása

B6.Cg-Tg(ACTA1-cre)79Jme/J transzgenikus egértörzs került beszerzésre a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) kutatólaboratóriumtól. A HSA-Cre transzgenikus egerekben jelen van egy humán vázizomspecifikus aktin (ACTA1) promoterral kombinált Cre rekombinááz gént kódoló szakasz, ezért a Cre enzim kifejeződése csak felnőtt és differenciált harántcsíkolt vázizomrostokban történik meg. A HSA-MerCreMer (HSA-MCM) génszekvencia egy Cre rekombinááz (Cre) enzimet és egy módosított ösztrogén kötő domént (ERT2) is tartalmaz, ezáltal a Cre enzim expressziója Tamoxifen jelenlétében indukálható, vagyis a Cre enzim kifejeződéséhez a Tamoxifen jelenléte szükséges. Abban az esetben, ha a HAS-MCM törzset keresztezzük egy a módosítani kívánt, loxP-szekvenciákkal határolt gént tartalmazó törzssel, egy vázizomspecifikus, indukálható delécio létrehozására nyílik lehetőségünk. Az általunk keresztezett B6.Cg-Tg(ACTA1-cre)79Jme/J egértörzset a állatok ujjperceiből izolált genomális DNS alapján PCR vizsgálat során ellenőriztük a HSA-MCM transzgen megléte szempontjából.

4.5 A Szeptin7 deléciójának ellenőrzése genotipizálással

C57BL/6J Szeptin7flox/flox (SS00) egértörzs került beszerzésre Prof. Dr. Matthias Gaestel laboratóriumából, a Hannoveri Orvostudományi Egyetemről, a Fiziológiai kémiai intézettől. Az említett egereket kereszteztük B6.Cg-Tg(ACTA1-cre)79Jme/J (ssC0) egerekkel. A megszületett utódokat (SsC0) visszakeresztettük SS00 genotípusú egyedekkel. Ezen pároztatásokból származó almokat a Tamoxifen etetésre használtuk fel a kísérletek során. Az utódok között jelen volt olyan egyed, melynek genomja tartalmazta a flox szekvenciákat a szeptin7 gén 4-es exonja határain és a Cre enzimet kódoló génszekvenciát is. A szeptin7 módosítás mértékének ellenőrzésére vázizom mintákat (*m. quadriceps femoris*, *m. biceps femoris* és *m. pectoralis*) gyűjtöttünk a Cre+szeptin7flox/flox egerekből (a továbbiakban Cre+) és genomi DNS-t izoláltunk. Kontroll mintának azon alomtárs egyedeket tekintettük, melyek nem tartalmazták a MerCreMer konstruktot. A deléciós helyre tervezett PCR primereket használtuk a flox szekvenciát tartalmazó és a vad típusú, vagyis kontroll minták elkülönítésére.

4.6 *In vivo* kísérletek

4.6.1 *In vivo* CT vizsgálat

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

4.6.2 Önkéntes futás futómalomban

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

4.6.3 Mellső láb erejének mérése

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

4.7 *In vitro* kísérletek

4.7.1 Izomerő mérése

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

A rángások és a tetanusz időtartamának meghatározásához a teljes összehúzóadás és a 10 százalékos elernyedési állapot közötti időtartamot vettük alapul.

4.7.2 Egyedi izomrostok elkülönítése

M. flexor digitorum brevis (FDB) izomból enzimatisus emésztés során egyedi izomrostokat nyertünk. Az FDB izmokat 0,2 százalékos 1-es típusú kollagenáz (Sigma) tartalmú kalcium mentes médiumban 37°C-on az egér tömegének megfelelő időtartamig emésztve az FDB izmokat a kötőszövet felbomlott. Az izmokat Tyrode oldatban enyhén titurálva az izmokat egyedi, ép rostokat kaptunk. Ezek az egyedi rostok egy üveg fedőlemezre kitapadva, tápfolyadékban 4°C-on 2 napig tárolhatóak.

4.8 Az egyedi izomrostok és kriosztátos illetve paraffinos metszetek immunkémiai festése

Az immunkémiai vizsgálatok kivitelezéséhez a mintákat először 4% paraformaldehidben (PFA) fixáltuk 20 percig. Az immunhisztokémiához használt kriosztátos meszetek kezelése az immuncitológiával kezelt rostokkal teljesen megegyezik, az egyetlen eltérés hogy a fixálás előtt 15 percig hagytuk kiolvadni a fagyasztott metszeteket. A 20 perces fixálás során és utána is a minta megőrzi eredeti szerkezetét. A fixálás után következett a nem keresztkötött PFA semlegesítése 100 mM glicin-PBS oldat segítségével. Az antitestek sejtbe való jutásához a sejtmembrán permeabilizálása szükséges 0,5 százalékos Triton-X (Sigma) PBS oldatával 10 percig. A mintákat ezek után háromszor mostuk 10 percig PBS oldattal. A nem specifikus kötőhelyek lefedéséhez Serum-free Protein Blocking Solution (Dako, Los Altos, CA) oldatot használtunk 30 percig. Az elsődleges antitestet (anti-RyR1, anti-Szeptin7, anti-CD45 és vázizom specifikus anti- α -aktinin) egy éjszakán keresztül 4°C-on nedves kamrában inkubáltuk a mintákon. A nem bekötődött antitesteket PBS oldatos mosással távolítottuk el. Az elsődleges antitest nehéz láncá ellenes és egy fluoroforral konjugált másodlagos antitestet adtunk a mintákhoz. A nem bekötődött antitestek újabb mosással történő eltávolítása után a metszeteket lefedtük. Az Alexa Fluor 488, TRITC és DAPI fluorofórok tartalmazó mintákról AiryScan 880 lézerpásztazó konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) készítettünk képeket 20-szoros levegős valamint 40-szeres és 63-szoros olaj immerziós objektív használatával. A fent említett fluorofórok 488, 543 és 405 nm hullámhosszon gerjesztettük és 520-550 nm, 560-580 nm, illetve 420-490 nm hullámhossz tartományban detektáltuk az emissziót (a felsorolás sorrendjében).

A paraffinos metszeteket kezelés előtt deparaffinálni kellett. Ezen metszetek bár már fixálva voltak, de utófixálás történt rajtuk a már ismertetett módon. Az endogén peroxidáz enzimeket 0,5 százalékos hidrogén-peroxid oldattal (H_2O_2) gátoltuk. A paraffinos metszetekhez nem fluoreszcens jelöléssel ellátott másodlagos antitesteket, hanem peroxidáz enzimmel kötött antitesteket adtunk. Ezek után a DAB reagenssel kezelve, az antitest komplexek helyén barna csapadék vált ki. A metszeteket víztelenítés után lefedtük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

4.9 Izomregeneráció vizsgálata

A vázizomsérülés kiváltása $BaCl_2$ izomba való injektálásával történt. 20 μ l fiziológias só oldatban oldott 1,2 százalékos $BaCl_2$ *m. tibialis anterior* (TA) izomba történő beoltása steril gyulladást okozott. Az egyes egerek egyik lába kontrollként szolgált, amit fiziológias só oldattal oltottunk be. A vizsgálati csoportok egyedei az oltást követően a 4. és a 14. napon kerültek feláldozásra. Mind az oltott mind a nem oltott, vagyis kontroll lábakból származó TA mintákból a későbbiekben Western blot vizsgálat, illetve kriosztátos és paraffinos metszetek készültek. A szövettani vizsgálatok során Hematoxinil-Eozin (HE) és DAB festés történt.

4.10 Elektronmikroszkópos mintaelőkészítés és feldolgozás

Frissen izolált TA izmokat *in situ* fixáltunk 3 százalékos glutáraldehidos Millonig pufferban. A leválasztott kisebb izomkötegeket utófixáltuk 1 százalékos OsO_4 vizes oldatában. Gyors etanolgradiensben keresztüli víztelenítés követően propilén-oxidos kezelés majd Durcupan (Sigma) epoxigyantás beágyazás történt. Ultravékony hossz-, illetve keresztirányú metszeteket készítettünk egy Leica Ultracut UCT (Leica Microsystems, Bécs, Ausztria) ultramikrotómmal. Az elkészült metszeteket uranil-acétáttal és ólom-citráttal festettük. A metszetekről egy JEM1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL, Tokió, Japán) készítettünk felvételeket. Az EM képeket ImageJ szoftver (NIH, Bethesda, MD) segítségével elemeztük, és meghatároztuk az egyedi miofibrillumok és a mitokondriumok területét, kerületét, tengelyarányait, a kör alakhoz viszonyított arányukat a Cre- és Cre+ egértörzsek mintáiból készített hossz- és keresztmetszeti képeken.

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

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

Kvantitatív PCR (qPCR) során a különböző vázizommintákból (*m. tibialis anterior*, *m. pectoralis*, and *m. quadriceps*) az izolált RNS mintákat DNáz kezelésnek vetettük alá és a megmaradt mRNS-eket egy reverz transzkripció után cDNS-é alakítottuk. A qPCR vizsgálat során egy LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) készülékben kettő különböző módszerrel vizsgáltuk a mintákat a meglévő primereinknek megfelelően. Az egyik lehetőség a SYBRGreen (PCR Biosystems, Oxford, Egyesül Királyság) keverék alkalmazása volt a másik módszer a magas

specificitású TaqMan esszé (Mm00550197_m1) volt. Light Cycler 480 SW 1.5.0 szoftver (Roche) segítségével a triplikátumban vizsgált minták ciklusidejéből meghatároztuk az átlagos C_p értéket. Ezekből a C_p értékekből a ΔC_p módszer segítségével meghatároztuk a vizsgálni kívánt mRNS-ek relatív expressziót a belső kontroll gének eredményeihez viszonyítva.

4.12 Western blot vizsgálat

A fehérje expresszió méréséhez az izommintákat mechanikai feltárás során lízis-pufferben (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, Protease Inhibitor Cocktail [Sigma, St. Louis, USA]) homogenizáltuk egy HT Mini homogenizer (OPS Diagnostics) készülék segítségével. A mintákat 4°C-on 2000 g értéken lecentrifugáltuk és a felülúszókból BCA protein esszé segítségével meghatároztuk a fehérjekoncentrációt, és azonos koncentrációkat állítottunk be az elektroforézis mintapuffer oldat (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10% SDS-ben oldott brómfenol kék (0,01%), 100 mM β -merkaptóetanol) használatával. Az elkészült ismert koncentrációjú mintákat 5 percig, 95°C-on főztünk, így denaturálva a fehérjéket. 10 százalékos SDS-poliakrilamid gél segítségével 10 μ g teljes fehérjeminta került elektroforetikus elválasztásra. Az elektroforézis után a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk és PBS-ben oldott 5%-os sovány tejpor segítségével blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket. A membránokat a megfelelő elsődleges antitestekkel egy éjszakán keresztül, 4°C-os hőmérsékleten inkubáltuk. A bekötődést követően háromszor 15 perces PBS+1% Tween-20 (PBST) mosással a nem kötődött antitesteket eltávolítottuk, majd egy órán keresztül szobahőmérsékleten HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk a membránokat. A kialakult jelölő immunkomplexek láthatóvá tétele felerősített kemilumineszcencia segítségével történt (Thermo Fisher Scientific). A jelek denzitometriás vizsgálatát ImageJ szoftver segítségével végeztük, úgy hogy a detektált szeptin7 jelet ugyanazon minta belső kontroll fehérjére, az α -aktinin jel erőségére normalizáltuk. A vizsgálatokat legalább három független mintából végeztük el, technikai ismétlések száma pedig szintén három volt.

4.13 Statisztikai módszerek

Az adatokat átlag \pm standard hiba (SEM) formában ábráztuk. Az eltéréseket a kontroll és a Tamoxifen diétán lévő állatok között egyutas ANOVA és Bonferroni post hoc többszörös összehasonlító teszt módszerrel vizsgáltuk a GraphPad Prism5 szoftver használatával (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Student-féle t-

próbát alkalmaztunk a szignifikancia szintek meghatározásához és a $p < 0,05$ értéket tekintetük szignifikáns eltérésnek.

5 Eredmények

5.1 A harántcsíkolt vázizomrostok különböző szeptin izoformákat expresszálnak

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

5.2 A szeptin7 az egyedfejlődés során változó expressziót mutat

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

5.3 A szeptin7 elhelyezkedése a vázizomrostokban

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

5.4 A szeptin7 vázizom-specifikus csökkenése módosult fenotípushoz vezet

A vázizomzatban a szeptin7 által betöltött feladatok vizsgálatára a szeptin7 gén vázizom-specifikus leütéséhez a Cre/Lox rendszer segítségével egy egérmodellt állítottunk elő. A HSA-Cre transzgenikus egerekben a Cre rekombinááz gént a vázizom-specifikus humán alfa-aktin (ACTA1) promoter hajtja. Ezeket az egerekkel párosítjuk egy olyan egértörzssel, amelyekben a szeptin7 GTP-kötő P-hurkát kódoló 4-es exon loxP szekvenciával határolt. A Cre-közvetített rekombináció katalizálja a 4-es exon kivágását, ami egy további kereteltolódási mutációt eredményez az exontól lefelé. Az így keletkező szeptin7 mRNSEk csonkoltak lesznek és nem fog róluk funkcióképes fehérje átíródni. Az *in vivo* és *in vitro* kísérleteinkhez a Cre+ hemizigóta egereket használtuk fel, melyeket a vizsgálatok előtt 1 hónapos koruktól kezdve 3 hónapos Tamoxifen etetésnek vettünk alá. Ezekben az egerekben a Tamoxifen indukálta a Cre enzimet, ami elvégezte a szeptin7 4-es exonjának kivágását, ezáltal megakadályozta a funkcióképes szeptin7 fehérje translációját. A szeptin7 fehérje expressziója izom-specifikus downregulációjának méréséhez *m. quadriceps femoris* és *m. pectoralis* mintákból készített teljes sejtlizátumot használtunk. A delécio a rostok többmagvúsága miatt részleges volt, de így is a szeptin7 fehérje expressziójának szignifikáns csökkenését eredményezte, ami mindegyik izomtípusnál megfigyelhető volt: 59 ± 8 és 63 ± 8 százalékos csökkenés a Cre- egerekhez képest, *m. quadricepsben* és *m. pectoralisban*. Ezen eredmények jól korreláltak a gDNS PCR-módszerrel történő vizsgálatából meghatározott körülbelül 50 százalékos delécióval. A Cre+ egerekben

kialakult egy látványos fenotípus ami egy kifejezett gerincdeformitás formájában mutatkozott meg, ahol a gerinc túlzottan kifelé görbült, így púpos, görbe hátú megjelenéssel rendelkező egyedeket eredményezett.

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

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

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

A szeptin7 csökkenés szignifikáns hatása az *in vitro* módszerekkel mért izomerő paramétereiben is megmutatkozott. Mind az egyedi rángás, mind a tetanusz során mért erő szignifikánsan csökkent a Cre⁺ egerek EDL és Sol mintáiban a Cre⁻ alomtársak megfelelő izmaihoz képest. A maximális erő csökkenése a csökkent szeptin7 expresszió eredménye, mivel a Tamoxifen kezelés önmagában nem volt hatással a kontraktilis paraméterekre. Érdekes módon a rángások és a tetanusz kinetikája, valamint a fáradékonyság csak a Cre⁺ egerek Sol-ban változott. Az *in vivo* és *in vitro* erőmérések tehát arra utalnak, hogy a szeptin7 alapvetően hozzájárul a normál vázizomzat teljesítményéhez. Továbbá az izomerő meghatározásában fontos két kontraktilis fehérje, az aktin és a miozin (MYH4) expresszióját és térbeli eloszlását is megvizsgálták a Cre⁻ és Cre⁺ állatok FDB-jéből izolált egyedi izomroston. A kontraktilis fehérjékben jelentős változását nem észleltünk; emellett az L-típusú kalciumcsatorna expressziós mintázata szintén hasonló volt a Cre⁻ és Cre⁺ minták összehasonlításakor.

5.7 A szeptin7 csökkent expressziója módosult miofibrilláris és mitokondriális szerkezethez vezet

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

A fent említett paramétereket a mitokondriumokra vonatkoztatva is meghatároztuk a különböző állatsoportokból származó TA izmok kereszt- és hosszszelvényi felvételein is. A mitokondriumokra nézve is elvégeztük a morfológiai változások leírását. Minden egyes azonosított mitokondrium esetében kiszámítottuk a területet, a kerületet, az tengelyarányt (AR) és az alaktényezőt (FF). A számított átlagos kerület és terület szignifikánsan megnőtt a Cre⁺ mintákban a Cre⁻ állatokból származó izmok adataihoz, illetve a kontroll BL6 egerek mintáihoz képest. Kismértékben a mitokondriális terület relatív eloszlása is megváltozott a Cre⁺ mintákban, ami a nagyobb mitokondriumok megjelenésével magyarázható. Az AR szignifikánsan csökkent a Cre⁺ mintákban a Cre⁻ mintákhoz képest, míg a számított FF paraméterekben nem volt szignifikáns különbség. Az egységnyi területre jutó mitokondriumok száma a kiválasztott látómezőkben belül szintén szignifikánsan megnőtt a Cre⁺ egerekből származó mintákban a Cre⁻ vagy BL6 egerek izmaihoz

képest.. A különböző állatcsoportok hosszmetseteinek transzmissziós elektronmikroszkópos analízise normális myofibrilláris szerkezetet (szarkomer hosszát, triád összetételt) tárt fel a Cre⁻ mintákban, míg a legtöbb Cre⁺ izmokról készült felvételen nagy mitokondriális hálózatok előfordulását azonosítottuk. A hosszanti metsetekben a morfológiai paraméterek értékelése egyértelmű változásokat mutatott az átlagos területben, a kerületben, az AR-ben és az FF-ben egyaránt. Ezek a paraméterek szignifikánsan magasabbak voltak a Cre⁺ mintákban, mint a Cre⁻ társaik képein. A mitokondriális terület relatív megoszlásának eltolódása arra utal, hogy nagy területű mitokondriumok jelennek meg a Cre⁺ állatok izmaiban. A mitokondriumok összterületét az adott látómező teljes területének százalékában a BL6 és Cre⁻ állatokban is megvizsgáltuk, de ebben a paraméterben nem volt szignifikáns különbség ezen egerek között. Meghatároztuk a mitokondriális DNS-tartalmat is a különböző izomtípusokban (*m. pectoralis* és *m. quadriceps*). Mindkét vizsgált izomban a mitokondriális (16S) RNS-tartalom erősen csökkent a Cre⁺ egerek izmaiban, a Cre⁻ egerek adataihoz viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szeptin7 expressziójának csökkenése a vázizmokban nemcsak a mitokondriális morfológiát, hanem feltehetően a mitokondriális működést is súlyosan befolyásolja.

5.8 A szeptin7 megváltozott expressziót mutat izomregeneráció során

A BL6 egerek TA izmaiban kismértékű steril gyulladást és ezzel enyhe izomkárosodást indukáltunk BaCl₂ injekcióval. Két különböző időpontban kriosztátos metseteket készítettünk a BaCl₂-dal injektált és az ellenoldali, BaCl₂-dal nem, de fiziológiás sóoldattal injektált kontrollként kezelt izmokból. A metseteket hematoxinin-eozin (HE) festésnek vetettük alá. A regeneráció során szatellita sejtek aktivációjának következtében megemelkedett Pax7 expressziót, valamint az izomrostokban központi elhelyezkedésű sejtmagokat figyeltünk meg az injektált izmokban összehasonlítva a kontroll mintákkal. A szeptin7 fehérje mennyiségét a regeneráció során 2 hétig figyeltük, és az elvégzett Western blot mérések minden vizsgált időpontban emelkedett értéket mutatottak. A szeptin7 megemelkedett expressziója, amelyet a BaCl₂ által kiváltott izomkárosodást követően észleltünk, felveti annak lehetőségét, hogy a citoplazmatikus szeptinek potenciálisan hozzájárulnak a regenerációhoz az újonnan képződött izomsejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásán keresztül.

5.8.1 A vázizomregeneráció során morfológiai változások mennek végbe

A szeptin7 regenerációban betöltött szerepének pontosabb feltáráshoz steril vázizomgyulladását és ezáltal károsodást váltottunk ki a fent leírt BaCl₂ injektálási módszerrel. A fiatal Cre⁻ és Cre⁺ egerek TA izmába történt az oltás. A bal oldali lábban steril gyulladást indukáltunk, míg a jobb oldali TA fiziológiás sóoldattal injektált kontrollként szolgált. Ezt a fajta sérülést a megerőltető izommunka során fellépő izomkárosodás, vagyis mikrosérülések szimulációjaként használják. A gyulladás morfológiai jelei az injekció beadása után 4 nappal mind a Cre⁺, mind a Cre⁻ egerekben láthatók voltak, és csökkent mértékben még 14 nappal a sérülés után is jelen voltak, amint azt a HE-festés is mutatja. A gyulladással sejtek (neutrofil granulociták, makrofágok) inváziója a BaCl₂ injektált területen jól megfigyelhető volt, míg a kontroll lábakon gyulladásra utaló jelek nem mutatkoztak.

5.9 A vázizomsérülés a szeptin7 expressziójának emelkedését váltja ki

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

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

5.10 A regenerációt a Pax7 transzkripciós faktor megemelkedése kíséri

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

5.11 A regenerációs szakaszban a miogenin transzkripciós faktor emelkedett expresszió mutat

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

5.12 A laminin expressziós változása a regeneráció során

A regeneráció zárólépésének nyomon követése érdekében mRNA és fehérje szinten laminin kifejeződést vizsgáltunk mindegyik vizsgálati csoportban 4 és 14 nappal a sérülés után. Négy nappal a vázizom sérülése után kimutatható volt mind a laminin mRNA, mind a fehérje mennyiségének fokozódása a Cre⁻ egerekben. Azonban a Cre⁺ egerek sérült és nem sérült lábai között nem volt különbség sem az mRNA-

sztinben, sem a fehérje expressziójában. A regeneráció végére a laminin mRNS-növekedése lecsengett a Cre⁻ egerekben. A laminin fehérje Western-blot analízise megerősítette az mRNS-adatokat. Ellenben a Cre⁺ egerek sérült lábaiban a laminin mRNS-szintje ebben az időpontban emelkedést mutatott, de a laminin fehérje kifejeződése késést szenvedett, az mRNS-szintű változásokat még nem követte.

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

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

6. Megbeszélés

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

6.1 Szeptin izoformák expressziója a vázizomban

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

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

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

6.2 A szeptinek szerepe a mitokondriális dinamikában

Eredményeink arra utalnak, hogy a szeptinek szerepet játszanak az egerek vázizomzatának mitokondriális dinamikájában, mivel a mitokondriális vizsgálatok

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

6.3 A szeptin7 szerepe a vázizomzat regenerációjában

A kísérleteink során azt találtuk, hogy a szeptin7 expressziója megnövekszik a BaCl₂ injekció által kiváltott enyhe izomkárosodást követőekben. Az injekció indukálta gyulladást és az azt követő regeneráció megjelenését és mértékét a Pax7 pozitív szatellitsejtek jelenlétének kimutatásával követtük, és egyértelmű összefüggést találtunk a két molekula expressziós mintázatának időbeli lefolyásában. Ezen megfigyelésünk összhangban volt a Pax7-re vonatkozó korábbi eredményekkel. A sérülés után átlagosan 4 nappal a legintenzívebb a miogén regeneráció, így mind a Pax7, mind a szeptin7 expressziójának a növekedése ebben a fázisban volt a legnagyobb. 14 nappal a nekrosis kiváltását követően a regeneratív folyamatok lényegében teljesen befejeződtek, és a két molekula expressziója visszatért az alapszintre. Mivel a Pax7 transzkripció faktor megjelenése, valamint a rostban központilag elhelyezkedő magok az izomregeneráció elfogadott markerei, arra a következtetésre jutottunk, hogy a szeptin7 fokozott expressziója is összefüggésben lehet az izomregeneráció folyamatával. Bár ezek az eredmények bizonyították a szeptin filamentumok jelentőségét az

izomsérülést követő regenerációs lépésekben, pontos szerepük tisztázásához további kísérletekre volt szükség.

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

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

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

Egy másik transzkripció faktor, a miogenin szintjét is megvizsgáltuk a Cre⁻ és Cre⁺ állatokban. A miogenin az izom eredetű éretlen sejtek terminális differenciálódásában vesz részt, az ehhez szükséges fehérjék átírását irányítja. A nem

oltott mintákban nem láttunk különbséget a Cre⁺ és a Cre⁻ állatok között sem mRNS, sem fehérje szinten. Azonban a BaCl₂ injekció által kiváltott megnövekedett miogenin-fehérjeexpresszió a Cre⁺ állatokban még a 14. napon is fennállt, ami változást okozott a regeneráció dinamikájában és egy elhúzódó izomrostképződésre enged következtetni. Cre⁻ egerekben a korábbi magas mRNS expresszió a 14. napon már nem volt egyértelműen kimutatható. Ez arra utalhat, hogy a szeptin7 a folyamatok későbbi lépéseiben játszhat inkább szerepet. A jelátviteli folyamatok elindulnak, de a folyamat lassulása miatt nem kapcsolnak ki a fiziológiás esetben tapasztalt időtartam elteltével.

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

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

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

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

állatokban a laminin fehérje késleltetett expressziója szintén összhangban van ezzel a képpel, igazolva a szeptin7 jelentőségét és hatását a regeneráció későbbi lépéseire.

Az expressziós vizsgálatok mellett a regenerációt kísérő morfológiai változásokat is elemeztük. A gyulladással járó sejtek száma a sérülés következtében, a kialakuló steril gyulladás miatt mindegyik mintában megnövekedett. Kontroll körülmények között a gyulladás lezajlása után a fehérvérsejtek száma lecsökkent. Itt megjegyeznénk, hogy a kimutatott immunsejtek, főleg a makrofágok nem csak a sérült szövetek eltávolításában, de a regeneráció indukálásában is fontos szerepet játszanak. A Cre+ egyedekben a leukocitabeszűrődés mértéke szignifikánsan magasabb volt még a 14. napon is, ami azt jelzi, hogy a szeptin7 hiánya késleltette a gyógyulást.

Az immunsejt infiltráció mellett a rostban központilag elhelyezkedő magok száma is alátámasztotta elképzeléseinket. Az izomregeneráció jellemző indikátora a sejtmagok ilyen lokalizációja, mert ezek a gyógyuláshoz és differenciálódáshoz szükséges nagymennyiségű fehérjeszintézist jelzik. A központi magokat tartalmazó izomrostok száma szintén szignifikánsan magasabb a Cre+ egerekben, mint a Cre- egerekben, ami tovább hangsúlyozza a regeneráció kinetikájának elnyúlását és a szeptin7 szerepét az izomgyógyulásban.

7. Összefoglalás

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

izomgyógyulás markerei megváltozott expressziót mutattak, ami arra utalhat, hogy a regeneráció fázisai lelassultak és elhúzódott a gyógyulás.

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

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



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, L.**, Telek, A., Fodor, J., Dobrosi, N., Dócs, K., Hegyi, Z., Gönczi, M., Csernoch, L., Dienes, B.: Reduced Expression of Septin7 Hinders Skeletal Muscle Regeneration.
Int. J. Mol. Sci. 24 (17), 13536, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241713536>
IF: 5.6 (2022)
2. Gönczi, M., Ráduly, Z., **Szabó, L.**, Fodor, J., Telek, A., Dobrosi, N., Balogh, N., Szentesi, P., Kis, G., Antal, M., Trencsényi, G., Dienes, B., Csernoch, L.: Septin7 is indispensable for proper skeletal muscle architecture and function.
eLife. 11, e75863, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.75863>
IF: 7.7

További közlemények

3. Ráduly, Z., **Szabó, L.**, Dienes, B., Szentesi, P., Bana, Á. V., Hajdú, T., Kókai, E., Hegedűs, C., Csernoch, L., Gönczi, M.: Migration of Myogenic Cells Is Highly Influenced by Cytoskeletal Septin7.
Cells. 12 (14), 1825, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12141825>
IF: 6 (2022)
4. Dienes, B., Bazsó, T., **Szabó, L.**, Csernoch, L.: The Role of the Piezo1 Mechanosensitive Channel in the Musculoskeletal System.
Int. J. Mol. Sci. 24 (7), 6513, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076513>
IF: 5.6 (2022)





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





11. Ráduly, Z., Szabó, L., Madar, A., Pócsi, I., Csernoch, L.: Toxicological and Medical Aspects of Aspergillus-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain.
Front. Microbiol. 10, 2908, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02908>
IF: 5.64

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 64,184

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

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

Debrecen, 2024.02.26.

