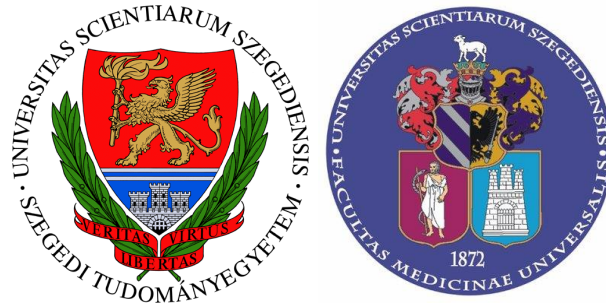


Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Biokémiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM



Ph.D. értekezés

A szindekán-4 összetett szerepe a mioblasztok migrációjában

Becsky Dániel

Témavezető: Dr. Keller-Pintér Anikó

2021

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények listája

- I. **Daniel Becsky***, Szuzina Gyulai-Nagy*, Arpad Balind, Peter Horvath, Laszlo Dux, Aniko Keller-Pinter (2020) Myoblast Migration and Directional Persistence Affected by Syndecan-4-Mediated Tiam-1 Expression and Distribution. Int J Mol Sci. 21: 823. [IF: 4.556] Q1

- II. **Daniel Becsky***, Kitti Szabo*, Szuzina Gyulai-Nagy, Tamas Gajdos, Zsuzsa Bartos, Arpad Balind, Laszlo Dux, Peter Horvath, Miklos Erdelyi, Laszlo Homolya, and Aniko Keller-Pinter (2020) Syndecan-4 Modulates Cell Polarity and Migration by Influencing Centrosome Positioning and Intracellular Calcium Distribution. Front Cell Dev Biol. 8: 575227. [IF: 5.201] Q1

*: társszerző

A tézishez kapcsolódó publikációk kumulatív impakt faktora: 9,757

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

Ca²⁺: kalcium

Cdc42: sejt osztódást szabályozó fehérje 42-es homológ

dSTORM: közvetlen sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia

FGF: fibroblaszt növekedési faktor

GAG: glükózaminoglikán

GEF: guanin nukleotid kicserélő faktor

GM130: Golgi mátrix protein - 130 kDa

Par: partitioning-defective (polaritás protein)

PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor

PKC: protein-kináz C

Rac1: Ras-függő C3 botulinum toxin szubsztrát-1

RhoA: Ras homológ család A

SDC: szindekán

SDC1: szindekán-1

SDC2: szindekán-2

SDC3: szindekán-3

SDC4: szindekán-4

Ser: szerin

shRNS: short hairpin (rövid hajtű) RNS

Tiam1: T-lymphoma invázió és metasztázis-1

TRPC: tranziens receptor potenciál kation csatorna

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

WASP: Wiskott-Aldrich szindróma protein

1. BEVEZETÉS

A vázizomzat egyedi, nagyfokú dinamikával alkalmazkodik a különféle hatásokhoz és sérülését követően regenerációra képes. Az öregedés, testmozgás vagy különböző betegségek (pl.: tumoros cachexia, immobilizáció, izomdisztrófia) hatására mérete megváltozik. A vázizomzat őssejtjei, az úgynevezett szatellita sejtek, felelősek a vázizom plaszticitásáért, fenntartásáért és regenerációjáért. Ezek a sejtek az izomrost és a bazális lamina között helyezkednek el. Mitotikusan és fiziológiailag is nyugalomban vannak, amíg helyi sérülés nem aktiválja őket. Aktivációjukat követően mioblasztokká alakulnak, amelyek osztódnak és a sérülés helyére vándorolnak. Ezután differenciálódnak és fúziót követően több sejtmagból álló szinciciumot, ún. miotubulusokat alkotnak.

1.1. Sejtmigráció

A sejtmigráció elengedhetetlen a többsejtű szervezetek megfelelő kialakításához és fenntartásához. A migráció folyamata a citoskeleton és sejt-mátrix adhéziók átrendezésével valósul meg. Az aktin citoskeleton – a sejt citoskeletonális rendszerének egyik alkotóeleme – egy komplex struktúra, mely aktívan részt vesz a sejtek mozgásában. Migráció során a sejt feji része meghatározza a mozgás irányát, miközben egy farki, követő rész képződik. Eközben az aktin-citoskeleton és a sejt-mátrix kapcsolatok átrendeződésének következtében a sejtek megnyúlnak. A sejt-mátrix kontaktpontok, az ún. fokális adhéziók dinamikus struktúrák, amelyeket több mint 150 protein épít fel. A sejtmigrációhoz szükséges a fokális adhéziók folyamatos képződése és szétesése. A sejt feji végén új fokális adhéziók keletkeznek, míg a farki végen szétbomlanak, így előidézve a sejt elmozdulását.

A sejtvándorlás korai szakaszában a sejtek polarizálódnak (sejten belüli aszimmetria), és membránkitüremkedések (lemezszerű lamellipódiumok és kesztyűujjszerű filopódiumok) alakulnak a sejt feji végén. Az aktin felhalmozódik a migráció irányába növekvő lamellipódiumban, ami az intracelluláris térben aszimmetriát eredményez, a képződött aktin struktúrák előre nyomják a plazmamembránt. A migráló sejtekben továbbá aktin stresszrostok képződnek, melyek közreműködnek a sejtek tapadásában, migrációjában, kontraktilitásában és mechanikai szilárdságában, összehúzódásukat követően a sejt farki része előre mozdul.

1.2. Citoskeletonális dinamika és sejtmigráció

A sejtvándorláshoz aktin polimerizáció, az aktin retrográd áramlása és az aktinhálózat átépülése, valamint miozin II-alapú kontraktilitás szükséges. Több aktin filamentum képződése a sejt vezető oldalában fizikai erőhatást gyakorol a sejt vezető oldala felőli

plazmamembránra, ezzel kialakítva a lamellipódiális kitüremkedéseket, protrúziókat. Ez az erő egyúttal visszahúzza a sejtek farki végét. Az aktin stressz rostok kialakulása mind a sejt-sejt, mind a sejt-extracelluláris mátrix adhéziót elősegítik. Döntő fontosságúak a sejt alakjának megőrzése és megváltoztatása, valamint a sejtfelület mechanikai tulajdonságainak meghatározása szempontjából. A kadherin-komplexek főként az α -katenin révén szabályozzák az aktin dinamikáját. Az α -katenin gátolja az Arp2/3 által közvetített elágazódások létrejöttét, és egy aktinkötő fehérjét (formin) gyűjt a kapcsolódási pontokhoz. A β -katenin és a p120-katenin a csatlakozási stabilitást biztosító szerepük mellett transzkripciós szabályozóként is működhetnek. Az aktin citoskeleton dinamikájának legfontosabb szervezői a Rho GTPázok, a kis molekulatömegű GTP-kötő Ras fehérje szupercsalád tagjai.

1.3. A Rho GTPázok

A Rho GTPázok közé tartoznak a Rac1 (Ras-rokon C3 botulinum-toxin-szubsztrát 1), a Cdc42 (sejtosztódás-szabályozó fehérje 42 homológ) és a RhoA (Ras homológ családtag A), amelyek részt vesznek a sejt-polaritás kialakításában és az aktin citoskeleton evolúciósan konzervált szabályozói. Az Rho GTPázok molekuláris kapcsolóként működnek – váltakozva az inaktív GDP-hez kötött és az aktív GTP-hez kötött formák között – és képesek megkötni, aktiválni a downstream effektor fehérjéket, ezáltal szabályozva a különböző jelátviteli utakat.

A migráló sejtekben a Rho GTPázok kritikus jelentőségűek a polaritás megteremtése- és fenntartása szempontjából. Ezen felül szerepet játszanak a sejtosztódásban, a morfogenezisben, a differenciálódásban, valamint a migráció kialakításában és fenntartásában is. Az aktivált Rac1 a vezető él mentén dúsul fel, aktivitása fokozza az aktin polimerizációját. Ez a folyamat a lamellipódiális membrán protrúziók kialakulásához vezet, míg a Rac1 aktivitás csökken a sejt farki régiójában. Ezzel ellentétes a RhoA aktivitása, amely a farki régióban a legmagasabb. A RhoA aktivitás kontraktilis aktin kötegek (stressz rostok) megjelenéséhez vezet, de befolyásolja az érett fokális adhéziók kialakulását is. A Cdc42 aktiválása a filopodium kialakulását eredményezi. A Rac1 és a Cdc42 egyaránt képes aktiválni az Arp2/3 komplexet, ami aktin polimerizációhoz és aktin elágazódások létrejöttéhez vezet a lamellipódiumban. A sejtek mozgása során a fokális adhéziók képződnek a sejtek elülső, feji részében. Ezáltal biztosítottak az aktin stressz szálak rögzítési helyei, és biztosított a sejtmozgás folytatásához szükséges összehúzó erő is. A Cdc42 és a Rac1 a kortikális aktin polimerizációját a Wiskott-Aldrich-szindróma fehérje (WASP)/Scar1 szupercsalád tagjaival való kölcsönhatásuk révén szabályozzák. A Rho GTPázok mind az aktin polimerizációjának

szabályozásában, mind az aktin depolimerizációjában részt vesznek. Az aktin depolimerizációját a kofilin foszforilációjának szabályozásával befolyásolják.

A Tiam1 (T-lymphoma invázió és metasztázis-1) egy guanin nukleotid kicserélő faktor (GEF), amely a Rac1 specifikus aktivátoraként működik, és kulcsszerepet játszik a sejtek migrációjában és a sejtek polarizációjában. A Tiam1 az Arp2/3 komplexszel való kölcsönhatása révén szabályozza az aktin polimerizációját és az aktin citoskeleton átrendeződését. Az SDC4 befolyásolja a Rac1 aktiválódását a PKC α -n keresztül, és az aktív Rac1-et felhalmozza a migráló sejt feji végén, biztosítva ezzel a membránnyúlványok kialakulását. A Par polaritási komplex, amely a Par3-at, a Par6-ot és az atipikus PKC-t (protein kináz C) tartalmazza, kulcsszerepet játszik a sejt polaritás kialakulásában és fenntartásában. Ezenkívül a Tiam1 és a Par polaritási komplex együttesen stimulálja a migráció iránytartását azáltal, hogy stabilizálja a vándorló sejtek polarizációját. A Par3 kölcsönhatásba lép a Tiam1-gyel, ami lokalizált Rac1-aktivációhoz vezet. Ez a migráló sejtekben az aktív Rac1 és RhoA GTPázok gradiensét hozza létre: az előbbi a feji végén koncentrálódik, az utóbbi pedig a sejt farki végében. Mivel a sejt polaritásának megteremtéséhez és fenntartásához Tiam1 által közvetített Rac1 szignál szükséges, a károsodott Tiam1 jelátvitel gátolja az mozgó sejtek fej-farok polarizációjának kialakulását, ezáltal gátolja migrációs iránytartását.

1.4. A Ca²⁺ szerepe a sejt migrációban

A citoszolos Ca²⁺ koncentrációhoz mind az extracelluláris térből beáramló Ca²⁺, mind az intracelluláris raktárakból (elsősorban az endoplazmatikus retikulum) felszabaduló Ca²⁺ hozzájárul. A migráló sejtek Ca²⁺ gradienst generálnak a feji végtől (vezető oldaltól) a farki végig, amely koordinátorként működik különféle molekulák polarizált eloszlásában. Ez a növekvő Ca²⁺ gradiens részt vesz a sejt farki részében levő fokális adhéziók szétszerelésében, és ennek eredményeként a sejt hátsó végének visszahúzásában, így a sejt előremozdulásában. A Ca²⁺ gradiens szükséges a fej-farok polaritás fenntartásához azáltal, hogy gátolja a lamellipódiumok spontán kialakulását a migráló sejtek farki végénél. Az aktomiozin kontraktilitás befolyásolása mellett az intracelluláris Ca²⁺ változásai befolyásolják a kalmodulin-függő enzimek és az aktin-keresztköti fehérjék aktivitását, így kulcsszerepet játszanak az adhéziók dinamikájában. A magas RhoA-aktivitás és a következményes aktomiozin-kontraktilitás meghatározza a vándorló sejt farki végét, valamint a fokális adhéziós fehérjék hasításához szükséges megnövekedett Ca²⁺ koncentrációt és következményesen a Ca²⁺-függő proteázok aktiválódását eredményezi.

1.5. A szindekánok általános jellemzése

A szindekán (SDC) család tagjai I. típusú transzmembrán proteoglikánok, melyeknek a gerincesekben négy típusa ismert. Az SDC-k expressziója sejt-, szövet- és fejlődésspecifikus. A szindekán-1 (SDC1) az endothel-, az epithelium-, a simaizom- és a plazma sejtekben fordul elő. A szindekán-2 (SDC2) főleg fibroblasztokban, mezenchimális szövetekben, míg a szindekán-3 (SDC3) főleg neuronokban expresszálódik. A szindekán-4 (SDC4, ryudocan) a család többi tagjától eltérően minden sejtípusban kifejeződik; továbbá a nyugvó és aktivált szatellita sejtek sejt felszíni markere. Az SDC-k felépítésüket tekintve három részből állnak. N-terminális, amely egy változó extracelluláris domén (ektodomén), a rendkívül konzervált transzmembrán domén és a C-terminális intracelluláris domén. A glükózaminoglikán (GAG) oldalláncok extracellulárisan kapcsolódnak a gerincfehérjéhez. Transzmembrán szerkezetük miatt az SDC család tagjainak legfontosabb feladata az extracelluláris mátrix és a sejtek közötti kommunikáció fenntartása.

1.6. A SDC4 jellemzése

A SDC4 a család többi tagjával együtt részt vesz a sejtmembránon keresztül történő jelátviteli folyamatokban. Szerepet játszik a sejtproliferációban, a migrációban, a sejtadhézióban, emellett részt vesz az endocitózisban és a mechanotranszdukcióban. A SDC4 GAG-láncjaihoz kapcsolódó molekulák mindegyike heparin-kötő doménnel rendelkezik hasonlóan, mint az FGF2 (fibroblaszt növekedési faktor-2), a VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) vagy a PDGF (vérlemezké eredetű növekedési faktor). Ezenkívül az extracelluláris mátrixkomponensek, proteázok, proteázgátlók és tirozin-kináz aktivitású molekulák interakcióban lehetnek a SDC4-gyel. A fibronektin közvetlen megkötésével részt vesz a sejtadhézióban, ezáltal befolyásolja a sejtek migrációját is.

Az integrinokkal való közvetett kapcsolata miatt az SDC4 fontos szerepet játszik a fokális adhéziókban. A fokális adhéziók kialakulásakor a fibronektin heparint kötő doménje az SDC4 heparán-szulfát oldalláncjaihoz kötődik, a fibronektin hidat képez az SDC4 és az integrin között. Az SDC4 számos jelátviteli úthoz csatlakozik, és strukturális fehérjeként funkcionál. Az SDC4 citoplazmás domén vaiábilis régiója megköti a PKC α -t és szabályozza annak aktivitását. Az SDC4 kapcsolatot létesít az aktin citoskeletonnal is, mivel a SDC4 citoplazmatikus doménje az alfa-aktininhez kötődik, amely egy keresztkötő fehérje az aktinszálak között.

A Tiam1 kölcsönhatásba lép az SDC4-gyel, az aktin citoskeleton átrendeződésével befolyásolja a sejtek migrációját, a sejtmatrixot és a sejt-sejt adhéziókat. A Tiam1 az Arp2/3 komplexszel való kölcsönhatása révén szabályozza az aktin polimerizációját, az aktin citoskeleton átrendeződését. A SDC4 befolyásolja a Rac1 aktivációját a PKC α -n keresztül, és koncentrálna az aktivált Rac1-et, valamint a vándorló sejt vezető oldalán lévő membránnyúlványok kialakulását is elősegíti. A Tiam1 és az SDC4 közvetlen interakcióját korábban tanulmányozták és bizonyították. A különböző SDC-ok Tiam1-molekulával való kölcsönhatásának affinitása és erőssége eltérő. A Tiam1-el való közvetlen kölcsönhatása révén a SDC4 a Rac1 aktivitását a SDC4 Ser179 foszforilációjától függő módon szabályozza.

A SDC4 fontos szerepet játszhat az intracelluláris Ca²⁺ szint koordinálásában. A SDC4 hatást gyakorol a tranziens receptor potenciális kanonikus (TRPC) csatornáira, ezáltal szabályozza a citoszolós Ca²⁺ egyensúlyt és a sejtek viselkedését. A SDC4 fibroblasztokban képes az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt megemelni. A SDC4 és a TRPC7 között közvetlen interakcióról egyelőre nem számoltak be. Ezzel szemben podocitákban a SDC4 csendesítése csökkentette a TRPC6-csatorna sejtfelszíni expresszióját és redukálta az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt. Továbbá a SDC4 csendesítése a HaCaT keratinocitákban nem befolyásolta a Ca²⁺ mennyiséget, míg a SDC1 és a SDC4 csendesítése csökkentette az intracelluláris Ca²⁺ szintet a TRPC4-csatornák modulálásával.

1.7. SDC4 KO egerekkel végzett kísérletek eredményei

Habár a heparán-szulfát elengedhetetlen glükózaminoglikán a sejtek életében, a SDC1- és SDC4-KO egerek fertilisek és életképesek. SDC1 és SDC4 proteoglikánok hiányában az egerek kedvezőtlenül reagálnak a postnatalis- és sérülés okozta stresszhelyzetekre, valamint sebgyógyulásuk, szöveti regenerációjuk elhúzódik. SDC1 hiányában az epitheliális regeneráció lelassul, és a fehérvérsejtek endotheliumhoz való tapadása megváltozik. Táplálkozási és tanulási rendellenességeket egyaránt kimutattak SDC3 KO egerekben. A SDC4 alapvető szerepet játszik a vázizomzat fejlődésében és regenerálásában. A SDC4 csendesített egerekben a granulációs szövet angiogenezise károsodik, és a vázizom regenerációja nem következik be, miközben a MyoD expressziója csökken, a szatellita sejtek aktiválódnak és proliferálnak, de ezen jelenségek pontos mechanizmusai nem ismertek.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- (i) A SDC4 KO egerek vázizom regenerációja sérült. Bár a SDC4 alapvető szerepét a vázizomzat fejlődésében és regenerációjában már leírták, a jelenség pontos mechanizmusa nem ismert. A dolgozat első célja a SDC4 működésének vizsgálata mioblasztok migrációja során.
- (ii) A sejtmigráció molekuláris szintű vizsgálata az utóbbi években nagy népszerűségnek örvend. Korábban már leírták a legfontosabb szabályozó molekulákat, valamint háttérmechanizmusokat, ennek ellenére továbbra is számos kérdés merül fel. Mivel a SDC4 aktin nanoléptékű szerkezetére gyakorolt hatását még nem tanulmányozták, így a dolgozat következő célja dSTORM technikával vizsgálni az aktinszálak struktúrájában bekövetkező nanoléptékű változásokat a SDC4 csendesítést követően. Továbbá vizsgálni kívánom a SDC4 csendesítés hatásait a mioblasztok fokális adhézióira.
- (iii) A sejtek alakjukat tekintve, sejten belüli molekuláris eloszlásukban és az organellek pozícióját tekintve polarizálódnak, mely fontos folyamat a sejtmigráció során. A sejtorganellek intracelluláris elhelyezkedése az elülső-hátsó tengely mentén a sejt polarizációjának egyik indikátora. A centroszóma pozíció jelölése a vezető él-sejtmag-hátsó él tengelyén jól számszerűsíthető és régóta alkalmazott módszer a sejtpolarizáció meghatározására. Következő céltom a centroszómák helyzetének meghatározása a SDC4 csendesítés okozta sejtpolarizáció változások hatására. Vizsgálni kívánom továbbá a SDC4 intracelluláris eloszlását is.
- (iv) Az intracelluláris Ca^{2+} elengedhetetlen a sejtek migrációjához. Az extracelluláris térből beáramló Ca^{2+} , valamint az intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca^{2+} egyaránt hozzájárul a citoszolus Ca^{2+} koncentrációhoz. A vándorló sejtek intracelluláris Ca^{2+} gradienst generálnak hosszanti tengelyük mentén, amelynek koordinátor szerepe van a polarizált jelátviteli események tekintetében. Dolgozatom célja az intracelluláris Ca^{2+} eloszlásának vizsgálata a vándorló mioblasztokban, SDC4 csendesítést követően.
- (v) Ismert, hogy SDC4 KO sejtekben a delokalizált, aktivált Rac1 mennyisége megnő. Továbbá a Tiam1-et GEF-ként azonosították, amely specifikus Rac1 aktivátorként működik és részt vesz olyan biológiai folyamatokban, mint a sejtek vándorlása és a polarizációja. További céltom, hogy megvizsgáljam, a Rac1 gátlása enyhíti-e a SDC4 csendesítés migrációra gyakorolt hatását, és hogy a SDC4 befolyásolja-e a Tiam1 expresszióját és intracelluláris lokalizációját.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Sejtkultúra és plazmidok*

Kísérleteinket nem transzfektált, valamint shRNS-mediált SDC4 csendesített (két különböző targetszekvenciát hordozó plazmidot használtunk: shSDC4#1 és shSDC4#2) és negatív kontrollként kevert szekvenciájú (scrambled) shRNS-sel stabilan transzfektált C2C12 egér mioblaszt sejteken végeztük. A plazmidokkal történő transzfekcióhoz X-tremeGENE reagenst alkalmaztunk. A nem transzfektált sejteket standard proliferációs médiumban tenyésztettük, amely 80% DMEM-ből, 20% FBS-ből, illetve gentamycinből állt. A transzfektált sejtvonalakhoz (negatív kontroll, csendesített csendesített shSDC4#1 és csendesített shSDC4#2) szelektív antibiotikumként puromycint adtunk a standard tápoldathoz kiegészítésként.

3.2. *Western blot*

A sejteket RIPA pufferrel lizáltuk, a lízis puffert kiegészítettük 1 mM Na-fluoriddal, 1 mM Na-ortovanadáttal és proteáz inhibitor koktéllal. A mintákat lecentrifugáltuk, (5 perc, 13000 rpm 97 mm-es rotor, 4 °C-on) és a felülúszóval dolgoztunk a továbbiakban. A felülúszót SDS/PAGE-el elválasztottuk és nitrocellulóz membránon blottoltuk. Blokkolás után a membránokat primer antitestekkel inkubáltuk, nyúl anti-SDC4-el és egér anti-GAPDH-val. Kemilumineszcencián alapuló reagenssel és röntgen film segítségével detektáltuk az immunreakciót. A filmeket Quantity One szoftverrel értékeltük ki.

3.3. *Sejtmigrációs esszék*

Két féle elrendezést alkalmaztunk a kísérletek elvégzésére és a sejtmigráció során bekövetkező intracelluláris folyamatok vizsgálatára: véletlenszerű (random) és irányított migrációs vizsgálatokat. Mindkét esetben kétdimenziós migrációs elrendezést választottunk.

A random migrációs esszé esetén a sejteket szélesztettük (6, 12 vagy 24 lyukú sejttenyésztő edényre), majd 1 óra inkubációt követően a proliferációs médiumot szérumsökkentett médiumra cseréltük a sejtosztódás elkerülése végett.

Sejtmentes zónát, mely a sérülést, vagy sebet (sebzést) hivatott prezentálni létre tudunk hozni ún. karcolásos módszerrel, vagy szilikon inszertek segítségével is. Karcolásos módszer esetén a konfluens sejttenyésztetet pipettahegygel megkarcoljuk, ezt követően a sejtek a "seb" két széléről egymás irányába fognak migrálni, mely migrációt vizsgálni tudjuk. Szilikon inszertekkel is létrehozható a sejtmentes zóna. Ezen inszertek előnye, hogy segítségükkel standard méretű "seb"-et tudunk létrehozni. A sejtmentes zóna szélén elhelyezkedő sejtek

intenzívebb migrációra képesek, míg a konfluens tenyészetben belül (hátrébb) elhelyezkedő sejtek az előtük elhelyezkedő sejtek fizikai akadályai miatt képtelenek az aktív helyváltásra.

3.4. *Élősejtes mikroszkópia*

PerkinElmer Operetta készülékkel végeztük az élősejtes mikroszkópiát, mely biztosítja a sejtek számára a megfelelő körülményeket, azaz a 37 °C-os állandó hőmérsékletet, illetve az 5% szén-dioxid tenziót. A készülék gyors és automatikus képalkotást tesz lehetővé.

A 24 órás szérumban csökkentett médiummal történő inkubáció után magfestést végeztünk a sejteken Hoechst 33342 oldattal, 1 órát inkubáltuk, majd 1× PBS-sel történő mosást követően a sejtek mozgását követtük, random migrációs esszé esetén 18 órán keresztül, míg irányított migrációnál 8 órán át. Az Operetta készülék segítségével 20 percenként készítettünk felvételt a sejtek helyzetéről.

3.5. *Mioblasztok mozgásának nyomon követése*

Az individuális sejtek mozgásának kiértékeléséhez a CellTracker képfeldolgozó szoftvert használtunk, mellyel a sejtmagokat képkockáról képkockára az időben (8, illetve 18 órán keresztül) követni tudtuk. A pusztuló, sérült és esetleg osztódó sejteket kizártuk az értékelési folyamatból. Mind az irányított, mind a random migrációs vizsgálatokban meghatároztuk a teljes út hosszát, az origótól mért maximális távolságot, valamint az átlagos és a maximális sejtsebességet. A sejtek által megtett vektoriális távolságot (azaz tényleges elmozdulást) is kiszámítottuk. Az egyes mioblasztok által megtett útról reprezentatív háromdimenziós, valamint ún. szélrózsa diagramokat készítettünk az Excel DiPer Plot_At-Origin makróval.

A sejtmozgás iránytartását a perzisztencia index fejezi ki, mely kiszámítható a vektoriális elmozdulás és a sejtek által megtett teljes út hosszának hányadosából.

3.6. *Karcolásos migrációs esszé*

Karcolásos (sebzéses) esszéhez a mioblasztokat 6-lyukú sejttenyésztő edényben tenyésztettük proliferációs médiumban, míg a tenyészet konfluenciája el nem érte a 100%-ot. Ezt követően 24 órán át inkubáltuk a sejteket szérumban csökkentett médiumban, majd P200 pipetta hegyével karcolást ejtettünk a tenyészetben. A sejttenyészetről közvetlenül a karcolást követően (0. óra), valamint 4, illetve 8 órát követően Leica DMI1 fázis-kontraszt mikroszkóppal felvételt készítettünk. A sejtmentes zóna területét a Digimizer képelemző szoftverrel mértük le. A sejtmentes terület bezáródását a következőképpen számoltuk: (sejtmentes zóna területe $t_{0\text{óra}}$ - sejtmentes zóna területe $t_{x\text{óra}}$) / sejtmentes zóna területe $t_{0\text{óra}}$.

3.7. *Fluoreszcens jelölés*

A fluoreszcens jelöléshez egy óra inkubálást követően a sejteket 24 órán át FBS-sel bevont üveg fedőlemezekre szélesztettük.

A Tiam1 immunfestéshez a sejteket 4% paraformaldehiddel 10 percig fixáltuk, 0,3% Tween 20-szal permeabilizáltuk és szobahőmérsékleten 1% marha szérum albuminnal (BSA) blokkoltuk PBS-ben. Nyúl poliklonális anti-Tiam1 elsődleges antitestjét a megfelelő Alexa488-konjugált szekunder antitesttel tettük láthatóvá. Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóppal, 40 × objektívekkel készítettünk felvételeket.

A centroszómák megjelenítéséhez a sejteket metanollal, a karcólást követő 2, 4 és 6 órával fixáltuk. 0,5% Tween-20-szal végzett permeabilizálás után a mintákat 4% -os BSA-val blokkoltuk, egér monoklonális anti- γ -tubulin antitesttel jelöltük, majd Alexa Fluor 488-konjugált anti-egér szekunder antitesttel inkubáltuk.

Az aktin rostok vizualizálása érdekében a mioblasztokat metanolmentes 4%-os formaldehid-oldattal fixáltuk, 2 órával a karcólást követően. 0,3% Triton X-100-al történő permeabilizálás és 4% BSA-ban történő blokkolás után az aktin szálakat Alexa Fluor 647-el konjugált falloidinnal jelöltük.

A fokális adhéziókat egér monoklonális anti-FAK primer antitesttel és Alexa Fluor 488 konjugált szekunder antitesttel jelöltük. A cisz-Golgi hálózatot egér monoklonális anti-GM130 antitesttel festettük, majd CF568-konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk.

A sejtmagokat Hoechst 33258-cal jelöltük.

3.8. *A Tiam1 eloszlás értékelése*

Az ImageJ képelemző program segítségével (Image>Lookup Tables) hőtérképeket készítettünk a fluoreszcens mikroszkópiával készült felvételekből. Az egyes pixelek intenzitásának értékét meghatároztuk, majd az adott sejten belüli összes jelintenzitást elosztottuk a sejt területével, ezzel megkapva az átlagos Tiam1 jelintenzitás mértékét egy-egy különálló sejtre vonatkoztatva.

3.9. *A centroszómák helyzetének meghatározása és számszerűsítése*

A sejtek polarizációjának számszerűsítéséhez a centroszómák helyzetét elemeztük. Az anti- γ -tubulinnal festett mintákat Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket ImageJ szoftver segítségével analizáltuk.

3.10. A SDC4 immunfluoreszcencia értékelése

A SDC4 immunfluoreszcens jelölését követően a mioblasztokról $40 \times$ és $100 \times$ nagyításban készültek felvételek Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóppal. Az egyes pixelek jelintenzitásának értékét a kiválasztott területen belül mértük, és a jelintenzitások összegét elosztottuk a sejt területével, hogy megkapjuk az egyes sejtek átlagos SDC4 intenzitási értékét.

3.11. A fokális adhéziók mennyiségi meghatározása

A fokális adhéziók immunfluoreszcens jelölését követően a mioblasztokról $100 \times$ nagyításban készültek felvételek Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóppal. A képeket bináris képekké konvertáltuk, 0 és $100 \mu\text{m}^2$ közötti parcellákat választottunk ki. E kiválasztott parcellákat maszkoltuk és megmértük az egyes parcellák területét.

3.12. Szuper-rezolúciós dSTORM képalkotás

A falloidinnal jelölt minták szuper felbontású direkt sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópos (dSTORM) mérései egyedi gyártmányú, invertált mikroszkóppal lettek elvégezve, amely Nikon Eclipse Ti-E-n alapult. Az összes dSTORM képet epi-megvilágításban rögzítettük 634 nm gerjesztési hullámhosszon. A reaktiváláshoz további lézert használtunk. A képeket digitális fényképezőgéppel készítettük ($512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$; képpontméret: $16 \mu\text{m}$). A képeket rainSTORM lokalizációs szoftverrel elemeztük és rekonstruáltuk a beépített Simple Histogram módszerrel.

3.13. A dSTORM felvételek értékelése

A falloidin-jelölt mintákról készült dSTORM felvételeket elemeztük a továbbiakban. A lamellipódiális aktin szerkezetekről készült dSTORM képeket ImageJ szoftverrel dolgoztuk fel. A szuperfelbontású képeket szürkeárnyalatossá alakítottuk és maszkoltuk. Az ImageJ *skeletonize* funkcióját használva bináris képeket készítettünk a felvételekből, majd az aktin elágazások számát és hosszát kvantitáltuk.

3.14. Az intracelluláris Ca^{2+} eloszlás értékelése

Kontrollként a kevert szekvenciát tartalmazó (scrambled), illetve a két SDC4 csendesített sejt vonalat 8-lyukú, üveg aljú sejttenyésztő kamrára szélesztettük. A konfluens tenyészeteket pipettahegygel karcoltuk, majd inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 30 percig, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 5% CO_2 tenzióan olyan DMEM-mel kezeltük, mely $2 \mu\text{M}$ Fluo-4 AM és $3 \mu\text{M}$ Fura Red AM-et

és 50 μ M verapamil tartalmazott. Több alapos mosási lépés után a zöld (493–572 nm) és a távoli vörös (609–797 nm) fluoreszcens felvételeket egyidejűleg 488, illetve 458 nm gerjesztésen készítettük Zeiss 710 LSM lézer scanning fluoreszcens konfokális mikroszkóppal. A képeket ImageJ 1,49g szoftverrel elemeztük.

3.15. Statisztikai analízis

A csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVA alkalmazásával, Dunett és Scheffé-féle post hoc teszttel, illetve Student-féle t-próbával elemeztük. A GraphPad Prism 7.0-t, illetve JMP 13.0 (SAS) használtuk grafikonok készítéséhez és statisztikai értékelések során. Az adatokat átlag + az átlaghoz tartozó standard hiba formájában tüntettük fel. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értéket szabtuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A SDC4 csendesítése csökkenti a mioblasztok migrációját

Az shRNS-sel stabilan transzfektált C2C12 sejtek SDC4 expressziójának Western blottal történő ellenőrzése alapján mindkét csendesített sejtvonalban csökkent a SDC4 szintje, mind a kevert szekvenciával transzfektált vonalhoz, mind a nem transzfektált C2C12 sejtekhez képest. SDC4 csendesítés hatására a mioblasztok migrációjának minden vizsgált paramétere (teljes megtett út, kiindulási ponttól mért maximális távolság, vektoriális távolság, átlagsebesség, maximális sebesség) erősen redukálódik, míg kontroll sejtvonalak között nem találtunk szignifikáns eltérést.

4.2. A SDC4 hatással van az aktin citoskeleton nanoléptékű szerkezetbeli változásaira a szuperrezolúciós dSTORM alapján

Minden sejtvonal esetén a dSTORM méréseket megelőzően nagy felbontású panorámaképeket készítettünk a sejtenyészetről, melyek lefedik a teljes sejtmentes zónát és a konfluens területeket egyaránt.

dSTORM felvételek készítése során a "sebzés", azaz sejtmentes zóna határvonalában elhelyezkedő mioblasztokat vizsgáltuk. Minden sejt esetén a lamellipódiális területről készítettünk dSTORM felvételt. A SDC4 csendesítése hatással van a mioblasztok aktinhálózatának nanoléptékű struktúrájára. Míg a nem transzfektált és kevert szekvenciát tartalmazó kontroll sejtvonalak esetén a mioblasztok lamellipódiális aktin szerkezete egy jól struktúrált, fejlett aktinhálózatot mutatott, addig a SDC4 csendesített sejtek

lamellipódiumainak aktin szerkezete kevésbé rendezett struktúrájú. A lamellipódiális aktin filamentumokról készült bináris képek alapján a SDC4 csendesített sejtek lamellipódiális aktinszerkezetében az elágazások száma és hossza is csökkent.

4.3. *A SDC4 csendesítés hatása a fokális adhézciókra*

A sejtmentes terület határán elhelyezkedő mioblasztok aktin stressz szálainak végein vizsgáltuk az anti-FAK jelölt fokális adhézciók számát és méretét. Érdekes módon mind a fokális adhézciók mérete, mind a száma szignifikánsan csökkent a SDC4 csendesítés hatására.

4.4. *A SDC4 hatással van a centroszómák sejten belüli helyzetére, valamint a sejtpolarizációra*

A sejtek polarizációjának megfigyeléséhez először a sejtmentes zóna határán elhelyezkedő első sorban lévő sejteket vizsgáltuk. A karcolást követő második órában a mintákat fixáltuk és a centroszómákat immuncitokémiai módszerrel jelöltük. A sejtmagot referenciapontnak tekintve a sejtmag körüli területet 30°-os szektorokra osztottuk. Abban az esetben, ha a centroszóma a sejtmentes zóna irányába mutató szektorba esett, a centroszómákat polarizáltság szempontjából megfelelő orientációjúnak tekintettük. SDC4 csendesítés hatására a sejten belül a centroszómák szignifikánsabb kevesebb alkalommal voltak megtalálhatók a helyes orientációjú szektorban, mint kontroll sejtek esetén, mely a mioblasztok helytelen polarizációját mutatja SDC4 csendesítés hatására. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, nem csak egy késett polarizációról van szó, hanem valóban a sejtpolarizáció zavaráról, a karcolást követő 2, 4 és 6 órával is vizsgáltuk a centroszómák pozícióját SDC4 csendesítés hatására. Az igen nagy mennyiségű adat feldolgozása érdekében egy új nevezéktant vezettünk be. A sejtmagot origónak tekintve meghatároztuk, hogy a front irányába (sejtmentes zóna irányába) ("toward"), a sejtmag vonalában ("middle"), vagy a mozgás irányával ellentétes irányba ("away") lokalizálnak a centroszómák. Vizsgáltuk továbbá nem csak a sebzés határán elhelyezkedő első, de a második sorban lévő sejteket is. Eredményeink alapján a mioblasztok polarizációja SDC4 csendesítés hatására nem csak késik, de egy erős zavart is szenved.

4.5. *SDC4 polarizált eloszlása migráció során*

A SDC4 mennyisége, figyelembe véve az összes fluoreszcencia jelintenzitást, szignifikánsan magasabb volt a kontroll sejtekben, mint a SDC4 csendesített sejtvonalakban. Eredményeink alapján a SDC4 eloszlása csendesítés hatására nem változik; csak a teljes SDC4 mennyisége alacsonyabb a csendesített sejtekben. Mivel korábbi munkáink során

bemutattuk a SDC4 kolokalizációját az anti-GM130 Golgi markerrel, és a SDC4 a fokális adhézió tagja, ezért a továbbiakban a SDC4 együttes eloszlását vizsgáltuk a GM130 és FAK markerekkel. A plazmamembrán eloszláson túl a SDC4 a cisz-Golgi hálózatban és a fokális adhéziókban is lokalizálódik.

4.6. *A SDC4 csendesítése megszünteti az intracelluláris Ca^{2+} gradienst migráló sejtekben*

Migráló sejtek Ca^{2+} tartalma fokozatos növekedését mutat a migrációs tengely mentén a farki irányba. A továbbiakban az intracelluláris Ca^{2+} eloszlását vizsgáltuk SDC4-csendesített C2C12 mioblasztokban, és összehasonlítottuk a kevert szekvenciát hordozó, (scrambled) kontroll sejtek intracelluláris Ca^{2+} eloszlásával. A várakozásoknak megfelelően az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a sejt feji végétől a farki részig nőtt a kontroll (scrambled) sejtekben. Ezzel szemben ez a Ca^{2+} gradiens teljesen megszűnt a SDC4 csendesített sejtekben. Összefoglalva, eredményeink igazolják a SDC4 alapvető szerepét a sejt polaritásában.

4.7. *A Rac1 gátlása nem állítja helyre a SDC4 csendesített sejtek hibás migrációs fenotípusát*

Korábbi vizsgálatok alapján a SDC4 KO a delokalizált, aktivált Rac1-GTPáz intracelluláris növekedését okozza. A Rac1 aktivitása specifikusan gátolható NSC23766 kezeléssel. A mioblaszt migrációt több mint 18 órán keresztül, random migrációs vizsgálattal követtük nyomon. Ezen elemzés során a Rac1 GTPáz specifikus gátlása nem enyhítette a SDC4 csendesítés miatt bekövetkező migrációs defektust. Érdekes módon a Rac1 gátlás további szignifikáns csökkenést okozott az összes vizsgált paraméterben, beleértve a sejtek teljes útvonalát, a vektoriális és a maximális elmozdulást, valamint az átlagos és maximális sebesség értékeket az összes sejtvonalban. Összességében tehát, a SDC4-csendesített sejtvonalak migrációs paraméterei tovább csökkentek az NSC23766 kezelést követően.

Az SDC4 csendesítése szignifikánsan csökkentette a mioblasztok 18 órányi vizsgált migráció során mért perzisztencia-indexet, és nem volt szignifikáns különbség a nem transzfektált és kevert szekvenciát hordozó, kontroll sejtek között. A sejtek NSC23766 kezelése tovább csökkentette a perzisztencia indexet mindkét SDC4 csendesített sejtvonalban. Érdekes módon a kezeletlen SDC4 csendesített sejtek perzisztencia indexe hasonló volt az NSC23766-tal kezelt kontroll vonalához; ami arra utal, hogy a Rac1 túl magas vagy túl alacsony aktivitása is kedvezőtlen a migráció iránytartására (perzisztenciájára) nézve.

4.8. *A SDC4 befolyásolja a Tiam1 expresszióját és lokalizációját*

A Tiam1-et GEF-ként azonosították, amely a Rac1 specifikus aktivátoraként működik. Mivel a Rac1 specifikus gátlása csökkentette az összes sejtvonal migrációs paramétereit, vizsgálni kívántuk, hogy azonosítható-e a Tiam1 eloszlásának vagy expressziójának változása.

A nem transzfektált és kevert szekvenciát hordozó kontroll sejtvonalakban aszimmetrikus Tiam1 eloszlást tapasztaltunk megnövekedett intenzitással a sejt feji vége felé, míg a Tiam1 ilyen mértékű intenzitása SDC4 csendesített sejtekben teljesen hiányzott.

5. KONKLÚZIÓ ÉS ÚJ EREDMÉNYEK

(i) SDC4 csendesítés hatására a mioblasztok migrációja csökken. SDC4 csendesítése következtében a sejtek által megtett teljes út, a kiindulási ponttól mért maximális távolság, a vektoriális elmozdulás, az átlag és maximális sebesség egyaránt redukálódik, továbbá a sejtek iránytartása, perzisztenciája zavart szenved.

(ii) Eredményeink alapján SDC4 csendesítés hatására az aktin nanoléptékű struktúrája megváltozik, a SDC4 csökkent expressziója következtében az aktin szálak szerkezete torzul. Mind az ágak hossza, mind az elágazások száma szignifikánsan csökken migráló sejtek lamellipódiumában SDC4 csendesítése következtében.

(iii) Vizsgálataink kiterjedtek a fokális adhéziók mennyiségi változásainak vizsgálatára is SDC4 csendesített mioblasztokban. Tapasztalataink alapján mind a fokális adhéziók mérete, mind számuk szignifikánsan csökkent SDC4 csendesítés hatására.

(iv) A SDC4 csendesítésének hatását a sejt polarizációra a centroszómák sejten belüli lokalizációjának kvantitálásával határoztuk meg. A SDC4 csendesítése nem csak a sejtek késői polarizációját, hanem a centroszóma lokalizációjának teljes felborulását is okozta a sejtek migrációja során. A mioblasztok polarizációja zavart szenved SDC4 csendesítése következtében. Továbbá vizsgáltuk a SDC4 eloszlását sejten belül, melyre aszimmetria jellemző, mind SDC4 csendesített, mind kontroll sejtek esetén. Eredményeink alapján a SDC4 eloszlása csendesítés hatására nem változik; csak a teljes SDC4 mennyisége alacsonyabb a csendesített sejtekben.

(v) Migráló sejtek intracelluláris Ca^{2+} szintje stabilan emelkedik a migrációs tengely mentén a sejt vezető éle felől a követő vég felé. Vizsgálataink során a kontroll és SDC4 csendesített sejtek intracelluláris Ca^{2+} szintjét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a SDC4 befolyásolja az intracelluláris Ca^{2+} grádiens kialakulását és SDC4 csendesített mioblasztokban nem csak a sejtek polarizációja szenved zavart, de megszűnik az előbb említett grádiens is.

(vi) A Rac1 specifikus gátlása, mely NSC23766-tal történt, nem állította helyre a SDC4 csendesítés okozta migrációs defektust, sőt tovább rontotta azt. Továbbá a SDC4 befolyásolja a Tiam1 expresszióját és intracelluláris eloszlását. A SDC4 csendesítés a sejtek Tiam1 szintjének csökkenését és homogén Tiam1 eloszlását eredményezett, ami a Rac1 delokalizált aktivációját okozhatja.

FINANSZÍROZÁS

Ezt a kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Minisztérium támogatta [pályázatok száma: GINOP-2.3.2-15-2016-00040 (MYOTeam), EFOP-3.6.2-16-2017-00006, NKFI FK 134684, NKFI K 128123 és NKFI K 132446]. A munkát az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, az ÚNKP-19-4-SZTE-23 és az ÚNKP-20-5-SZTE-162 Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Programja (Keller-Pintér Anikónak). A dSTORM méréseket a Magyar Agykutatási Program finanszírozta (támogatás száma: 2017-1.2.1-NKP-2017-00002); a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Minisztérium (GINOP-2.3.2-15-2016-00036 sz. támogatás) és egy EU által finanszírozott magyar támogatás (EFOP-3.6.1-16-2016-00008 támogatás). Az élő sejt mikroszkópos képalkotáshoz a LENDULET-BIOMAG támogatás (2018-342 számú támogatás) és az Európai Regionális Fejlesztési Alap (GINOP-2.3.2-15-2016-00006, GINOP-2.3.2 támogatás) járult hozzá -15-2016-00026 és GINOP-2.3.2-15-2016-00037). A kutatást továbbá az EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (Becszy Dániel részére) is finanszírozta.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

“Vannak, akik inkább a szívükre hallgatnak, és nem arra, amit mások diktálnak. Ritkán találkozni ilyen emberekkel, de ők azok, akik emlékeztetnek arra, hogy ha elindultál az utadon, ne tántorítsanak el a kétségek és gyötrelmek, hogy jó abban hinni, hogy nincs "nem tudom", hogy nincs "úgyse sikerül" vagy "lehetetlen". Ők emlékeztetnek minket arra, hogy jó elhinni, a lehetetlen nem létezik.”

Szeretném kifejezni legmélyebb hálámat azoknak, akik támogattak tudományos munkám során. Köszönöm Professzor Dr. Dux Lászlónak és Dr. Csont Tamásnak, akik lehetővé tették, hogy a Biokémiai Intézetben dolgozzak, tanuljak és fejlődjek.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Keller-Pintér Anikónak, hogy kitartásával, szakértelmével és lelkesedésével végigkísérte doktorandusz éveimet.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Bálint Árpádnak, Horváth Péternek, Bartos Zsuzsának, Homolya Lászlónak és Gajdos Tamásnak, valamint Erdélyi Miklósnak, hogy lehetővé tették számomra élő sejtmikroszkópia-, a Ca^{2+} szinttel kapcsolatos-, valamint a dSTORM mérések és kiértékelések elvégzését.

Köszönetet mondok kollégáimnak, Rádi Erzsébetnek, Makráné Felhő Zitának, Szabó Kittinek, Gyulai-Nagy Szuzinának és Köhler Márton Zoltánnak kitartó támogatásukért és önzetlen munkájukért.

Köszönöm a tanáraimnak és mentoraimnak, akik tanulmányaim és képzésem során motiváltak és akikhez bármilyen jellegű kérdéssel, bármikor fordulhattam: Dr. Kiricsi Mónikának, Győri Istvánnak és Csigér Istvánnak.

Családomnak szeretném kifejezni szívből jövő hálámat. Édesanyámnak, Becsky Eszternek, édesapámnak, id. Becsky Balázsnak és bátyámnak, ifj. Becsky Balázsnak szüntelen szeretetükért és támogatásukért. Köszönetemet szeretném kifejezni unokatestvéremnek, Dr. Boros Krisztinának a bátorításáért és tanácsaiért tanulmányaim korai szakaszában.

Nagyon hálás vagyok páromnak, Dukić Monikának, kitartó támogatásáért és végtelen szeretetéért.

Végül szeretnék köszönetet mondani barátaimnak, akik elkísértek ezen az úton, motiváltak és akiknél tehetségesebb, intelligensebb embereket nem is választhattam volna magam mellé útitársnak: Dr. Szalenko-Tótkés Ágnes, Balla Benedikta, Barna Eszter, Dr. Sály Tekla, Talmácsi Ádám, Dr. Szabó Ákos, Bodzán Benedek, Dr. Sisák Benedek, Varga Dávid, Szabó Gábor, Dr. Horváth Gergely, Dr. Thury Géza, Dr. jur. Kreiniker Konrád, Dr. Bozó Kristóf, Dr. Kovács László, Rafajlović Marko, Dr. Tajti Máté, Vas Máté, Dr. Sala Nicolas, Dr. jur. Ménesi Rudolf, Schmidt Tamás, Dr. Sahin-Tóth Tibor.