

# **A szindekán-4 komplex szerepe a vázizomzatban: miogenezis és onkogenezis**

Ph.D. értekezés összefoglalója

Szabó Kitti

Témavezető: *Keller-Pintér Anikó, MD, Ph.D.*

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Izomadaptációs kutatócsoport

Biokémiai Intézet

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM



Szeged

2022

## PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

### 1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- I. **Szabo K**, Varga D, Vegh AG, Liu N, Xiao X, Xu L, Dux L, Erdelyi M, Rovo L, Keller-Pinter A. Syndecan-4 affects miogenesis via Rac1-mediated actin remodeling and exhibits copy-number amplification and increased expression in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Mol Life Sci.* 2022 Feb 7;79(2):122. [IF: 9.216] D1
- II. Keller-Pinter A, **Szabo K**, Kocsis T, Deak F, Ocsosvzki I, Zvara A, Puskas L, Szilak L, Dux L. Syndecan-4 influences mammalian mioblast proliferation by modulating miostatin signalling and G1/S transition. *FEBS Lett.* 2018 Sep;592(18):3139-3151. [IF: 2.675] D1

A tézishez kapcsolódó publikációk kumulatív impakt faktora: 11.891

### 2. Az értekezéshez nem kapcsolódó cikkek:

- I. Dezső P, Virok, Ferenc Tömösi, Anikó Keller-Pintér, **Kitti Szabó**, Anita Bogdanov, Szilárd Poliska, Zsolt Rázga, Bella Bruszel, Zsuzsanna Cseh, Dávid Kókai, Dóra Paróczai, Valéria Endrész, Tamás Janáky, Katalin Burián. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Cannot Inhibit Chlamydia trachomatis Growth in HL-60 Human Neutrophil Granulocytes. *Frontiers in Immunology (1664-3224): 12 Paper 717311.* 14 p. (2021) [IF: 7.561] Q1
- II. Becsky D\*, **Szabo K\***, Gyulai-Nagy S, Gajdos T, Bartos Z, Balind A, Dux L, Horvath P, Erdelyi M, Homolya L, Keller-Pinter A. Syndecan-4 Modulates Cell Polarity and Migration by Influencing Centrosome Positioning and Intracellular Calcium Distribution. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Oct 15;8:575227. [IF: 5.87] Q1  
\*társszerző
- III. Kocsis T, Trencsenyi G, **Szabo K**, Baan JA, Muller G, Mendler L, Garai I, Reinauer H, Deak F, Dux L, Keller-Pinter A. Miostatin propeptide mutation of the hypermuscular Compact mice decreases the formation of miostatin and improves insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2017 Mar 1;312(3):E150-E160. [IF: 4.161] D1

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. Izomfejlődés és regeneráció

Az izomrostok kialakulásának folyamatát miogenezisnek nevezzük. Az embrionális fejlődés során pontos molekuláris jelek, transzkripciós és növekedési faktorok irányítják, amelyek egy heterogén izomzat kialakulását eredményezik. Az őssejtek a megfelelő kémiai jelre reagálva bármely szövetre jellemző sejtekké alakulhatnak át. A mononukleáris mioblasztok a harántcsíkolt izomképződés helye körül halmozódnak fel. Ezek egy része alkotja az embrionális izmot, míg egy különálló sejtvonalból szatellita sejtek keletkeznek, amelyekből a sérült izom regenerációja elindítható. A vázizomzat regenerációs folyamatának megértésével lehetőségünk nyílna annak javítására sportsérülések, izombetegségek után vagy az öregedés során.

## 1.2. A vázizomszövet kialakulásának molekuláris mechanizmusa

A miogenezist és az izomdifferenciálódást szabályozó transzkripciós faktorok közé tartoznak a MyoD (mioblaszt determinációs protein 1) család tagjai [MyoD, Myf5, MRF4 és MyoG (miogenin)], amelyeket miogenikus szabályozó faktoroknak (MRF) is neveznek. Az MRF-ek megkülönböztetett térbeli és időbeli mintázatban jelennek meg az embrionális fejlődés és a harántcsíkolt izomzat regenerációja során.

A számos faktor közül a miosztatin (GDF8, növekedési differenciálódási faktor 8) fontos szerepet játszik az izomfejlődés és regeneráció szabályozásában azáltal, hogy gátolja a mioblasztok proliferációját és differenciálódását. Megakadályozza továbbá a vázizomszövet hipertrofiáját és hiperpláziáját. Kétféle aktivinreceptorhoz, az ActI-hez és az ActIIa/b-hez kapcsolódik. Ezek a receptorok heteromereket alkotnak, és a miosztatin, mint ligandum megkötésekor foszforilálódnak, ami a Smad2 és Smad3 molekulák foszforilációjához vezet, mivel a miosztatin a Smad-mediált jelátviteli útvonalon keresztül hat. Ily módon gátolja a MyoD és a MyoG hatását, így gátolja az izomsejtek elköteleződését és differenciálódását. A Smad-útvonalon kívül azonban az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF1) jelátviteli útvonal egyes tagjaira is gátló hatást gyakorolhat. Ezenkívül aktiválja a p21 fehérjét, ami a Cdk2 (ciklinfüggő kináz) gátlásához vezet, és következésképpen a foszforilálatlan retinoblasztóma fehérje (Rb) gátolja a sejtciklus G1/S fázisainak átmenetét. Ezért az izomregeneráció és a differenciálódás nem következik be.

### 1.3. Szindekán család

A szindekánok (SDC-k) I. típusú transzmembrán proteoglikánok, amelyek szerkezeti funkciójuk mellett jelentős szerepet játszanak a jelátvitelben is. A család négy tagja ismert a gerincesekben. Szerkezetüket tekintve egy N-terminális, variábilis extracelluláris doménből (ektodomén), egy erősen konzervált transzmembránból és egy C-terminális intracelluláris doménből állnak. Az N-terminális doménhez ismétlődő diszacharid molekulákból álló glükózaminoglikán (GAG) oldalláncok kapcsolódnak. Ezek a GAG-láncok az SDC2 és SDC4 esetében heparán-szulfátok, de a heparán-szulfátokon túl kondroitin-szulfát oldalláncok is megtalálhatók az SDC1 és SDC3 esetében. Az SDC1 elsősorban epitél- és plazmasejtekben, az SDC2 mesenchymális szövetekben, fibroblasztokban, az SDC3 neuronális szövetekben, vázizomzatban fejeződik ki, míg az SDC4, a család többi tagjától eltérően univerzálisan, gyakorlatilag minden sejt típusban kifejeződik.

### 1.4. SDC4

Transzmembrán szerkezetének köszönhetően az SDC4 fontos szerepet játszik a sejt és a környező mátrix közötti kétirányú kommunikációban. Többek között szerepet játszik a fokális adhéziók kialakulásában, a sejt migrációban, a sebgyógyulásban, valamint az angiogenezis, a gyulladás és a tumor terjedés folyamatában. Az SDC4 receptorként és koreceptorként is működhet. Az SDC4 a heparán-szulfát láncokon keresztül növekedési faktorokat, kemokineket, enzimeket köt, és részt vesz a sejt-sejt adhéziók kialakításában, illetve közvetve aktin filamentumokhoz is kötődik, így részt vesz a citoskeletális váz megváltoztatásában.

Az extracelluláris domén heparán-szulfát láncjai képesek az FGF2-t megkötni, így az FGF-receptor koreceptoraként funkcionál. Az intracelluláris domén szabályozza a Rac1-et, és az  $\alpha$ -aktininen keresztül kötődik az aktin citoskeletonhoz. Befolyásolja a citokinézist, részt vesz a vezikuláris transzportfolyamatokban, és a TRPC csatornákon keresztül szabályozza az intracelluláris kalciumszintet.

Az SDC4 az aktivált és nyugalmi szatellita sejtek markere, a fejlődő vázizomzat jelentős SDC4 expressziót mutat. Továbbá a soleus-izom regenerációja során az SDC4 mRNS expressziója megnövekedett.

Számos tumortípusban az SDC4 expressziója szabályozatlan, és a legtöbb esetben az SDC4 felszabályozott. Az SDC4 expressziós szintjének változása számos tumortípusban megfigyelhető, és prognosztikai markerként szolgál, például emlőrákban, gliómában, melanómában, májrákban és oszteosarkómában.

Az SDC4 transzmembrán proteoglikán hiányos egerek kevésbé reagálnak a posztnatális és sérülés utáni stresszhelyzetekre, valamint a sebgyógyulásuk elhúzódik. Ismert, hogy az SDC4 knockout (KO) egerek fibroblasztjaiban a Rac1 szintje emelkedett, az angiogenezis, a szatellita sejtek aktivációja és proliferációja, a MyoD expressziója és az izomregeneráció károsodott.

Az SDC4 befolyásolja a Rac1 aktiválódását és felhalmozza az aktív Rac1-et a migráló sejtek vezető széleinél, lehetővé téve ezzel a fúziós folyamathoz nélkülözhetetlen membrán protrúziók kialakulását.

### **1.5. Mioblaszt fúzió és az aktin citoskeleton átrendeződése**

A sejt-fúzió olyan jelenség, amely számos folyamat során előfordul, nemcsak a miogenezis során, hanem az oszteoklasztok, a szinciciotrofoblasztok és a tumorsejtek kialakulása során is. Ahhoz, hogy a fúzió bekövetkezhesen, először a sejtek morfológiájának meg kell változnia, a fibroblasztszerű, csillag alakú megjelenésnek orsószerű, megnyúlt alakra kell változnia. A fúzió során, a plazmamembránon lamellipodiáknak vagy filopodiáknak nevezett nyúlványok alakulnak ki.

A fúzió folyamán az aktin citoskeleton folyamatos átrendeződése figyelhető meg, amelynek szabályozásában több molekula is részt vesz. A sejtadhéziós molekulák után ható, az aktin citoskeleton folyamatos és dinamikus átrendeződését szabályozó kulcsfontosságú intracelluláris komponensek a kis GTPázok Rho családjának tagjai, amelyek legjobban jellemzett tagjai a RhoA, a Rac1 (Ras-hoz kapcsolódó C3 botulinum toxin szubsztrát 1) és a Cdc42. A kis GTPázok molekuláris kapcsolóként működnek. Számos tanulmány arra utal, hogy a Rac1 kis GTPáz a *Drosophilában* a mioblasztfúzió központi szabályozója, és arról is beszámoltak, hogy a Rac1 és a Cdc42 a gerincesekben a mioblasztfúzióhoz nélkülözhetetlen. A Rac1-GTP szintje megemelkedik a fúzió helyén, és a konstitutívan aktív Rac1 indukálja a mioblasztfúziót. Ezzel szemben, mivel az aktív RhoA antagonizálja a Rac1-GTP-t, a konstitutívan aktív RhoA expressziója csökkenti a mioblasztfúziót.

Az aktin citoskeleton dinamikus rendszer, a polimerizáció és depolimerizáció során folyamatosan átrendeződik. Az Arp2/3 komplex és a forminok közé tartozó Dia felelős az aktin polimerizáció nukleációjáért. Az Arp2/3 komplex Rac1- és Cdc42-függő módon új filamentumképzést kezdeményez azáltal, hogy a már létező aktin filamentum oldalához kapcsolódva, az eredeti filamentummal 70°-os szöget bezárva, oldalirányban, míg a Rho effektor Dia lineárisan nyújtja meg az aktin filamentumokat.

## 1.6. Rbdomioszarkóma

A rbdomioszarkóma a leggyakoribb gyermekkori vázizom eredetű lágyrészsarkóma. Előfordulása a fiatal, 20 év alatti felnőttek körében az USA-ban 4,4/1 millió évente. Hagyományos osztályozási rendszere szövettani megfigyeléseken alapul, amelyek alapján négy csoportot különböztetnek meg: embrionális rbdomioszarkóma és annak botrioid változata, pleomorf és alveoláris rbdomioszarkóma. Majd 2013-ban a molekuláris biológiai eredmények fényében új osztályozási rendszert tettek közzé, amely már csak két fő csoportot különít el: a fúzió pozitív (FPRMS) és a fúzió negatív (FNRMS) rbdomioszarkómákat. Egy daganat akkor fúzió pozitív, ha a sejtekben vagy a t(2;13)(q35;q14) kromoszómatranszlokációból eredő PAX3-FOXO1 fúziós fehérje, vagy a t(1;13)(p36;q14) transzlokációból eredő PAX7-FOXO1 fehérje mutatható ki. Minden más esetben a fúzió negatívnak tekinthető.

Bár a rbdomioszarkómás betegek túlélése az elmúlt 40 évben javult, az áttétes vagy recidiváló esetek prognózisa továbbra is kedvezőtlen. Ezért további kutatásokra van szükség a betegség molekuláris hátterének tisztázása érdekében.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Irodalomból ismert, hogy a SDC4 géniütött egerek zavart szenvednek a vázizomzat regenerációjában, illetve emelkedett Rac1 GTPáz aktivitással rendelkeznek. Valamint a Rac1-ről az is ismert, hogy fontos szerepet játszik az emlős mioblasztok fúziójában, illetve a PAK1-en keresztül az aktin citoskeleton átrendeződésében, amely a sejtek rugalmasságát alapvetően meghatározza. Eredmények vannak arra vonatkozóan is, hogy a mioblasztok proliferációjához magas SDC4 expresszió szükséges. Viszont a SDC4 KO egerekben lezajló vázizom regeneráció folyamatát pontosan nem ismerjük. Illetve a fúzió negatív rbdomioszarkómák molekuláris háttere is kevésbé tanulmányozott. Így a következő kérdések fogalmazhatók meg:

1. Változik a miosztatin és az SDC4 expressziója a M. soleus regenerációja során?
2. Milyen hatással van az SDC4 csendesítése a heparán-szulfát proteoglikánok és a miosztatin szintjére?

3. Milyen hatással van az SDC4 csendesítése és az SDC4/Rac1 útvonal a mioblasztok differenciálódására és fúziójára?
4. Az SDC4 által közvetített Rac1 aktivitás befolyásolja-e a MyoD expressziót, beleértve a PAK1 és a cofilin aktivitást az izomdifferenciáció során?
5. Milyen hatása van az SDC4 csendesítésének az aktin nanostruktúrára és a kortikális aktinra a differenciálódás során? Van-e hatása a C2C12 mioblasztok rugalmasságára?
6. Van-e változás az SDC4 kópiaszámában vagy RNS-expressziós szintjében humán rabdomioszarkómában?

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Sejtkultúra és plazmidok**

C2C12 egér mioblasztokat stabilan transzfektáltunk SDC4-specifikus shRNS-t (rövid hajtú RNS) expresszáló plazmidokkal. A nem transzfektált sejteket 80% DMEM, 20% FBS-ben és 50 µg/ml gentamicinben tenyésztettük. A transzfektált sejteket 4 µg/ml puomicint tartalmazó médiumban szelektáltuk. A differenciáltatáshoz 2% lószérumot tartalmazó médiumot használtunk. Az RD humán rabdomioszarkóma sejteket 90% DMEM-ben, 10% FBS-ben és 50 µg/ml gentamicinben növesztettük.

#### **3.2. Kísérleti állatok**

A 300-320 g tömegű hím Wistar patkányok soleus izom regenerációjának indukálása érdekében a kígyómérget, notexin (*Notechis scutatus scutatus*ból) tartalmú injekciót adtunk be az izom teljes hosszában (20 µg notexin 200 µl 0,9%-os NaCl-ban). Az izmokat a sérülést követő 0., 1., 3., 4., 5., 7., 10. és 14. napon altatásban eltávolítottuk (n = 4 minden csoportban). Minden állatkísérletet a Csongrád Megyei Állategészségügyi és Állategészségügyi Ellenőrző Intézet engedélyével végeztünk.

#### **3.3. QRT-PCR vizsgálat**

A qRT-PCR-hez teljes RNS-t izoláltunk a C2C12 sejtvonalakból és reverz transzkripciót végeztünk (3 minta minden sejtvonalból). A TaqMan próbák [SDC1: Mm01275869\_m1, SDC2: Mm04207492\_m1, SDC3: Mm01179833\_m1, SDC4:

Mm00488527\_m1, glipikán-1 (Gpc1): Mm01290371\_m1, perlekán (Hspg2): Mm01181173\_g1, miosztatin (Mstn): Mm00440328\_m1, HPRT: Mm03024075\_m1; mind a ThermoFisher Scientific-től] és a TaqMan Master Mix (Roche). Az egyéni küszöbciklus (Ct) értékeket a HPRT Ct-értékeire normalizáltuk. A relatív génexpressziós szinteket log<sub>2</sub>-arányként mutattuk be.

### **3.4. Gélelektroforézis és immunblot**

A sejteket 1 mM NaF-fel és proteáz inhibitor koktéllal kiegészített RIPA pufferben lizáltuk. A soleus-izmot 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> és proteáz inhibitor koktélt tartalmazó pufferben homogenizáltuk, majd a pellet eltávolításához 13 000 fordulat/perc fordulatszámon 5 percig 4°C-on centrifugáltuk.

A minták fehérjekoncentrációját BCA protein assay kit segítségével határoztuk meg, majd azonos mennyiségű fehérjét poliakrilamid gélen futtatunk, majd ezt követően Protran membránokra blottoltuk. A membránokat primer egér/nyúl antitestekkel inkubáltuk, majd a megfelelő torna-peroxidázzal konjugált anti-IgG másodlagos antitestekkel inkubáltuk, a peroxidáz aktivitást kemilumineszcencia eljárással vizualizáltuk. A jelintenzitást a QuantityOne szoftverprogram segítségével számszerűsítettük.

### **3.5. Rac1 aktivációs vizsgálat**

A 70-80%-ban konfluens sejt kultúrákat Mg<sup>2+</sup> tartalmú lízispufferrel és proteáz inhibitor koktéllal lizáltuk. Ezután a lizátumokat centrifugáltuk (14 000 × g 5 percig 4°C-on), a felülúszót leszívtuk, majd eltávolítottuk a pelletet. Az aktív Rac1-GTP kimutatásához a Rac1 Activation Magnetic Beads Pull-down Assay-t alkalmaztuk a gyártó ajánlásai szerint.

### **3.6. Rac1 GTPáz gátlás**

A Rac1 aktivitást NSC23766 trihidrokloriddal gátoltuk a mioblaszt differenciálódás során. A sejteket 6 lyukú lemezekbe (1,8 × 10<sup>5</sup> sejt/lyuk) proliferáló tápfolyadékba tettük, majd 50 μM NSC23766-ot tartalmazó differenciáló tápfolyadékba helyeztük át, és a tápfolyadékot 2 naponta cseréltük.

### **3.7. A sejtek fluoreszcens jelölése és a szövetminták hematoxin és eozin festése**

A desmin immunfestéshez a differenciálódás 5. napján 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk a miotubulusokat, majd 5 perces permeabilizálás után 0,1%-os Triton X-100-mal PBS-ben, a mintákat 0,1%-os szarvasmarha szérumalbuminban (BSA) PBS-ben blokkoltuk. A differenciált miotubusok festéséhez a mintákat egy éjszakán át egér anti-desmin primer antitesttel inkubáltuk 4°C-on, majd 20 percig egér-ellenes Alexa Fluor 488 konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A sejtmagokat Hoechst 33258-mal festettük.



Az aktin filamentumok vizualizálásához a miotubokat 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd 0,9% Triton X-100-at és 4% BSA-t tartalmazó PBS-szel inkubáltuk 30 percig. Ezután a mintákat Alexa-647-konjugált falloidinnal jelöltük. A Hoechst 33258-mal történő nukleáris festést követően a mintákat azonnal feldolgoztuk dSTORM és konfokális képalkotás céljából. A kontroll és a regenerálódó soleus izmok fagyasztott metszeteit (10  $\mu\text{m}$ ) 5 percig acetonnal rögzítettük, majd hematoxilinnal (0,1%) és eozinnal (1%) festettük.

### **3.8. Miotubulus vizsgálat**

A desmin- és Hoechst 33258-mal festett mintákról fluoreszcencens felvételeket készítettünk Nikon Eclipse Ni-U fluoreszcens mikroszkóppal, 10 $\times$  objektívvel (Nikon FI Plan Fluor 10 $\times$ , DIC N2, NA = 0,30), és a Digimizer képelemző szoftverrel elemeztük. A differenciálódási indexet a desmin-pozitív sejtek számának és a sejtmagok teljes számának arányaként határoztuk meg. A fúziós index értékét úgy kaptuk meg, hogy a desmin-pozitív miotubulusokhoz tartozó sejtmagok számát elosztottuk az összes megszámlált sejtmaggal. Az egyes miotubulusok területét és hosszát is számszerűsítettük.

### **3.9. Konfokális mikroszkópia**

A konfokális képeket a Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóphoz csatlakoztatott Nikon C2+ konfokális pásztázófejjel készítettük. A konfokális és a szuperrezolúciós dSTORM-képeket a kísérletek során egymás után, ugyanazon mikroszkóp objektív (Nikon CFI Apochromat TIRF, NA=1,49, X100) használatával készítettük, hogy minimalizáljuk a térbeli sodródást és csökkentjük a képregisztrációs problémákat. A beállítás és az adatgyűjtés folyamatát a Nikon NIS-Elements 5.02 szoftverrel végeztük, a rögzített képeket pedig utólag ImageJ-Fiji (<https://fiji.sc/>) programban dolgoztuk fel. A 405 és 647 nm-en működő lézerek hullámhosszát és teljesítményét a Nikon Laser Unit segítségével állítottuk be.

### **3.10. dSTORM mérések**

A szuperfelbontású közvetlen sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópiás (dSTORM) méréseket egy Nikon Eclipse Ti-E vázon alapuló, egyedi készítésű inverz mikroszkópon végeztük. Az EPI-fluoreszcens megvilágítást 647 nm-es gerjesztési hullámhosszon alkalmaztuk (2RU-VFL-P-300-647-B1,  $P_{\text{max}} = 300 \text{ mW}$ ). A lézer intenzitását a mintasíkon 2-4  $\text{kW/cm}^2$  -re állítottuk be, és egy akuszto-optikai hangolható szűrővel szabályoztuk. A dSTORM-kísérleteket GLOX pufferben végeztük, és a mintát mikroszkóplemezre helyeztük.

### **3.11. Kortikális aktin vizsgálata**

A kiválasztott struktúrák lokalizációs információit a rainSTORM program a "Export box section" eszközzel exportálta a MATLAB R2018b-ben írt IFM Analyzer kódba. Az IFM

Analyzer kódot eredetileg az indirect repülőizom szarkomer dSTORM képek mennyiségi értékelésére fejlesztették ki. Ugyanezt a kódot használtuk a jelen tanulmányban az epítóp eloszlási információk nyers lokalizációs adatokból való lekérésére és a kortikális aktin kötegek szélességének meghatározására.

### **3.12. Szkeletonizáció**

Egy további MATLAB-kódot írtunk a szuperfelbontású képek szkeletonizálására és az aktin filamentumok elágazásainak számának és hosszának meghatározására. Először a képeket binarizáltuk Otsu módszerének küszöbérték-erősítésével vagy az ImageJ-Fiji segítségével manuálisan beállított küszöbértékkel. A képeket egy 2D-s Gauss simító kernellel szűrtük 3-4 pixeles (60-80 nm) standard eltéréssel, hogy homogenizáljuk a pixeles képeket, majd ismét binarizáltuk őket Otsu módszerével. A bináris képek szkeletonizálására, valamint az ágszámok és az ág hosszok kiszámítására beépített MATLAB függvényeket (bwskel) használtunk (bwmorph és bwdistgeodesic). A rövid ágakat kihagytuk a számításból (a minimális ágméretet 120 nm-re állítottuk be).

### **3.13. Atomerő-mikroszkópia**

A sejteket (minden típust) üveg fedőlap felületén tenyésztettük. A fedőlemezeket a tápfolyadék cseréje után a mikroszkóp fűtőkamrába szereltük egy szabványos üvegfenekű műanyag Petri-csészébe, és a mérések alatt 37 °C-on tartottuk. A rugalmassági térképeket NTegra Spectra atomerő-mikroszkóppal rögzítettük, amelyen a Nova Px 3.4.1 meghajtó szoftver futott, és amelyet egy IX73-as fordított optikai mikroszkóp tetejére szereltünk a kezdeti pozicionálás megkönnyítése érdekében. A kísérletek előtt minden cantilevert kalibráltunk a Sader-módszer alapján. A rugalmas paramétereket a Hertz-modell segítségével számoltuk ki a meghajtó szoftver segítségével.

### **3.14. Rabdomioszarkómás esetek és genomikai adatkészletek**

A 199 betegről gyűjtött minta genomikai adatait a következő három adathalmazforrásból állítottuk össze: a Nemzeti Rákintézet, a Children's Oncology Group és a University of Texas Southwestern (UTSW). Az archivált betegminták genomikai elemzését az UTSW Orvosi Központban végezték az intézményi felülvizsgálati bizottság jóváhagyásával (STU 102011-034). Az eredeti genomikai adatokat a dbGAP adatbázisban helyezték letétbe phs000720 hozzáférési számmal.

### **3.15. Genom szekvenálás, kópiaszám és génexpressziós adatok elemzése**

A teljes genom és a teljes exon szekvenálási leolvasásokat a humán referencia genomhoz (hg19) igazítottuk, és a szomatikus fehérjéket megváltoztató mutációkat a Genome Analysis Tool Kit segítségével azonosítottuk. Az SNP-tömböket a Nexus BioDiscovery

szoftverben implementált SNP-FASST szegmentáló algoritmus segítségével dolgoztuk fel. A szignifikánsan megváltozott CNV-eket a GISTIC módszerrel vizsgáltuk, a statisztikai szignifikancia meghatározásához 0,25-ös alapértelmezett q-értéket használva. A génexpressziós adatokhoz az RNS-t a gyártó ajánlásainak megfelelően az Affymetrix Exon 1.0 ST array platformjával dolgozták fel. A CEL-fájlokat az R/BioConductor segítségével elemeztük robusztus multiarray átlag normalizálással és egyéni PERL szkriptekkel.

### **3.16. Statisztikai analízis**

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 6 szoftverrel, Student's t-próbával és egyutas ANOVA-val, valamint Sidak és Newman-Keuls poszthoc-teszttel végeztük el az egyenrangú párok összehasonlítására. Minden értékelt adatot átlag + SEM-ben fejeztünk ki.  $p < 0,05$  a statisztikai szignifikanciát jelölte.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. SDC4 és a miosztatin expressziója *in vivo* mioblaszt differenciálódás során**

Az izomregeneráció mesterségesen előidézhető a kígyóméreg notexin befecskendezésével. Gyorsan indukálja a mionekrózist, és mivel nem befolyásolja a szatellita sejteket, a szövet regenerációja következik be. A Western blot kísérletek az SDC4 expressziójának átmeneti felszabályozását mutatták ki a proliferációs fázis során, és egyidejűleg alacsony érett miosztatint és magas promiosztatint.

### **4.2. Az SDC4 csendesítése befolyásolja a heparán-szulfát proteoglikánok és a miosztatin szintjét**

Az SDC4 csendesítése felszabályozta az SDC3 és SDC1 szintjét, és enyhén növelte az SDC2 transzkriptek mennyiségét. A heparán-szulfát proteoglikán glipikán-1 és perlekán gyenge felszabályozást mutatott az SDC4 csendesítését követően. A miosztatin mRNS szintje megnőtt az SDC4 csendesített sejtekben, ami a shSDC4#1 sejtvonalba jelentős volt.

### **4.3. SDC4 csendesítése fokozza a mioblasztok differenciációját és fúzióját *in vitro***

Kiváló *in vitro* modell áll rendelkezésre az izomdifferenciálódás tanulmányozására, mivel az egér C2C12 mioblasztok proliferáló médiumból alacsony szérumtartalmú fúziós

médiumra való áttelepítése többmagvú, miozint expresszáló miotubulusok kialakulását indukálja. Az SDC4 expressziója fokozatosan csökkent a C2C12 egér mioblasztok 5 napos differenciálódása során, és a proliferáló mioblasztok magasabb SDC4 szintet mutattak, míg a differenciált miotubulusok alacsonyabb SDC4 szintet mutattak. A Myf5 expressziója az 1. napon mutatott csúcsot, míg a MyoD és a desmin expressziója folyamatosan emelkedett, ami a minták megfelelő differenciálódását jelezte.

A reprezentatív immunoblotok azt mutatták, hogy mind a MyoD, mind a MyoG expressziója korábban megnőtt az SDC4 csendesített sejtekben a differenciálódás során. A dezminnel festett reprezentatív képek a miotubulusok számában és alakjában mutattak különbségeket az SDC4 expressziójának csendesítése után, ahol az SDC4 csendesített sejtek sokkal hosszabb és terjedelmesebb miotubulusokat képeztek, mint a kontroll sejtvonalak sejtjei. A differenciációs index és a fúziós index jelentős növekedését tapasztaltuk mindkét SDC4 csendesített sejtvonalba. A magszám-elemzés kimutatta, hogy a sejtmagok száma a miotubulusokban jelentősen megnőtt az SDC4 csendesítés után. Az SDC4 csendesített miotubulusok többsége 3-5 vagy >5 sejtmagot tartalmazott, míg a kontroll sejtvonalak elsősorban 2 sejtmagot tartalmaztak miotubulusonként, ami arra utal, hogy az SDC4 csendesítés részt vesz a mionukleáris akkumulációban a miotubulus kialakulásának elősegítése érdekében. Ezen túlmenően a miotubulusok területe és hossza is nagyobb volt az SDC4 csendesített sejtvonalakban.

#### **4.4. A Rac1 aktivitás szükséges az SDC4-csendesített sejtek fokozott fúziójához**

Eredményeink azt mutatták, hogy az SDC4 expressziójának csendesítése megnövelte a Rac1-GTP mennyiségét. Megfigyeltük, hogy mind a foszfo-PAK1(Thr423)/PAK1, mind a foszfo-kofilin(Ser3)/kofilin arányok emelkedtek az SDC4 csendesített sejtekben. Mivel az SDC4 csendesítés megnövelte a Rac1-GTP szintet, valamint a PAK1 és a cofilin foszforilációját, ezután megvizsgáltuk a Rac1 gátlás hatását a mioblaszt differenciálódásra az SDC4 expresszió csendesítése után. Reprezentatív, dezminnel festett fluoreszcens felvételek jól ábrázolják, hogy az NSC23766-kezelés gátolta a miotubulusok kialakulását mind a kontroll, mind a csendesített sejtekben, annak ellenére, hogy a dezmin kifejeződött. Továbbá, az NSC23766 adagolása megszüntette a MyoD expresszió növekedését, valamint a foszfo-PAK1(Thr423)/PAK1 és a foszfo-kofilin(Ser3)/kofilin arányok növekedését az SDC4 csendesített sejtekben.

#### **4.5. A Tiam1, a foszfo-PAK1 és a foszfo-kofilin szintje fokozatosan csökken az *in vitro* és *in vivo* miogenezis során.**

A C2C12 sejtek 8 napos differenciálódási időszakában a magas Tiam1 szint az 5. nap után folyamatosan csökkent. A Rac1-effektor foszfo-PAK1 és foszfo-kofilin mennyiségét is értékeltük, és megfigyeltük, hogy a differenciálódás korai szakaszában, a 2. naptól kezdve intenzív növekedést mutattak, amit az 5. naptól kezdve a foszfo-PAK1 (Thr423) szintjének csökkenése követett. A foszfo-PAK1 szintekkel összhangban a foszfo-kofilin (Ser3) szintjei is ugyanezt a mintázatot mutatták. Mind az *in vitro* differenciálódás, mind az *in vivo* vázizom regeneráció során a Rac1 aktivátor Tiam1 szintje, valamint a Rac1-effektor PAK1 és kofilin foszforilációja átmenetileg megemelkedett. Ezek a növekedések az aktinhálózat intenzív átalakulását eredményezhetik a miotubulusok kialakulása során.

#### **4.6. Az SDC4 expressziójának csendesítése befolyásolja az aktinhálózat nanoszintű szerkezetét azáltal, hogy növeli a kortikális aktin vastagságát és az elágazások számát.**

Kimutattuk, hogy az SDC4 befolyásolja a Rac1 aktivitását a mioblasztokban, amely az aktin átrendeződés kulcsfontosságú szabályozója. Tekintettel az SDC4 ezen fontos szerepeire az aktin citoskeleton szerveződésében, az SDC4 expressziójának csendesítése után nyomon követtük az aktin nanoszerkezetének változásait a differenciálódás során. Az SDC4 csendesített sejtvonalak a differenciálódás során a kontroll sejtekhez képest szignifikánsan vastagabb kortikális aktint mutattak, és az értékelés a csendesített sejtvonalak körülbelül 50%-os kiszélesedését jelezte a nem transzfektált és a kevert szekvenciát tartalmazó sejtvonalakhoz képest.

Az aktinhálózat elágazó szerkezetének nanoméretű elemzéséhez a 3 napos, mononukleáris differenciált, de még nem fuzionált mioblasztok dSTORM-képeit pixelizáltuk és bináris képekké alakítottuk át. Az elemzés az elágazások számának és a normalizált elágazásszámnak a növekedését mutatta ki az SDC4 csendesített sejtekben. Az egyes ágak átlagos hossza azonban rövidebb volt a kontroll sejtekhez képest. Az aktin citoskeleton ezen változásai egy kompaktabb aktinhálózatot eredményezhetnek, amely elősegíti az SDC4 csendesített sejtek fúzióját.

Eredményeink szerint a sejttenyésztő médium szérumszámátartalma (20% FBS vs. 2% lószérum) befolyásolta a C2C12 sejtek aktin nanoszerkezetét. A szérumszámátalom csökkentésével az aktin citoskeleton egyes ágainak hossza minden sejtvonalban csökkent. Az SDC4 csendesítése szintén csökkentette az ágak hosszát a szérumszámátalomtól függetlenül. A magas szérumszámátalom hatására az SDC4 csendesített sejtekben az aktin nanoszerkezet

kevesebb elágazást eredményezett, míg a csendesített sejtek elágazásainak száma a kontrollokhoz képest nőtt a szérumsökkenett közegben.

#### **4.7. Az SDC4 expressziójának csendesítése csökkenti a miotubulusok rugalmasságát**

Tekintettel az SDC4 aktin citoskeleton átalakításában betöltött szerepére, feltételeztük, hogy az SDC4 befolyásolhatja a sejtek rugalmasságát. Ezért a következőkben azt vizsgáltuk, hogyan változik a sejtek rugalmassága a fúzió során az SDC4 expressziójának csendesítése után. Az SDC4 expressziójának csendesítése tehát csökkenti a sejtek rugalmasságát, azaz ezek a sejtek a citoskeletális szerkezetben megfigyelt változásokkal összhangban keményebbek, mint a kontroll sejtek.

#### **4.8. Az SDC4 génamplifikációja és fokozott expressziója humán rabdioszarkómában**

Az SDC4 mioblast differenciációban betöltött szerepéről szóló jelenlegi tanulmányunk alapján és figyelembe véve az SDC4 ismeretlen szerepét a rabdioszarkómában, megvizsgáltuk az SDC4 génamplifikációs és -vesztési események jelenlétét humán rabdioszarkóma mintákban. A kópiaszám-elemzés szerint az SDC4 nagymértékben amplifikálódott a rabdioszarkómában, különösen az FNRMS-ekben, mivel a genomikai elemzések a fúzió negatív tumorok 28%-ában mutattak ki kópiaszám-amplifikációs eseményeket. A 49 FPRMS-beteg közül 6 esetben mutatták ki az SDC4 erősödését, de egyik esetben sem mutatták ki az SDC4 elvesztését; ugyanakkor a 150 FNRMS-eset közül 42 esetben mutatták ki az SDC4 erősödését, 1 esetben pedig az SDC4 elvesztését. Az mRNS-szekvenálási adatok alapján az FNRMS-eseteket az FPRMS-esetekhez képest fokozott SDC4 mRNS-expresszió kísérte, ami arra utal, hogy az SDC4 az FNRMS-ben a tumorgenezist elősegítő potenciális tumor driver génje lehet.

Az RD-sejtekben megfigyelt magas SDC4-expresszió összhangban van az SDC4 FNRMS-tumorokban megfigyelhető kópiaszám-amplifikációjával és magas mRNS-expressziójával.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KONKLÚZIÓ

A vázizom sérülését követő regeneráció során a nyugalmi szatellita őssejtek aktiválódnak, proliferálódnak, mioblasztokká differenciálódnak, majd többmagvú miotubulusokká fuzionálnak. Az irodalomból ismert, hogy a vázizomzat morfológiája és regenerációja károsodott az SDC4 transzmembrán proteoglikán génkiütött egerekben, de nem tisztázott, hogy az SDC4 hiánya hogyan vezet az izomregeneráció zavarához. Továbbá a fúzió negatív rbdmioszarkómák molekuláris háttere is kevésbé ismert.

*A jelen dolgozat új eredményei a következőkben foglalhatók össze:*

1. Megfigyeltük, hogy az SDC4 expressziója a regeneráció korai szakaszában megnövekedett. A regeneráció során a domináns miosztatin forma az éretlen promiosztatin volt, amely a regeneráció 4. napján mutatta a legmagasabb expressziót.
2. Kimutattuk, hogy az SDC4 csendesítése felszabályozta az SDC3 és SDC1 szintjét, és enyhén növelte az SDC2 transzkriptek mennyiségét a C2C12 sejtekben. A heparán-szulfát proteoglikán glipikán-1 és perlekán gyenge upregulációt mutatott az SDC4 csendesítését követően. A miosztatin mRNS szintje megnőtt az SDC4 csendesített sejtekben.
3. Az SDC4 csendesítése fokozta a mioblasztok differenciálódását és fúzióját. Az SDC4 csendesített sejtek sokkal hosszabb és nagyobb területű miotubulusokat képeztek, mint a kontroll sejt vonalak sejtjei. A sejtmagok száma a miotubulusokban jelentősen megnőtt az SDC4 csendesítés után.
4. A Rac1 aktivitás szükséges az SDC4 csendesített sejtek fokozott fúziójához. Az izomdifferenciáció során az SDC4 fokozatosan csökkenő expressziója lehetővé teszi a Rac1 aktiválódását, ezáltal közvetítve a mioblasztok fúzióját.

A Rac1 gátlása (NSC23766-tal) mind a kontroll, mind a csendesített sejtekben megszüntette a miotubulus képződést. Ugyancsak megszűnt a MyoD expresszió növekedése, valamint a foszfo-PAK1(Thr423)/PAK1 és a foszfo-kofilin(Ser3)/kofilin arányok növekedése az SDC4 csendesített sejtekben.

5. Az SDC4 expressziójának csendesítése növelte a Rac1-GTP mennyiségét a mioblasztokban, és mind a foszfo-pAK1(Thr423)/PAK1, mind a foszfo-kofilin(Ser3)/kofilin arányok emelkedtek.
6. A Tiam1, a foszfo-PAK1 és a foszfo-kofilin szintje fokozatosan csökken az *in vitro* és *in vivo* miogenezis során.
7. Az SDC4 expressziójának csendesítése befolyásolja az aktinhálózat nanoszintű szerkezetét azáltal, hogy növeli a kortikális aktin vastagságát és az elágazások számát, valamint csökkenti a miotubulusok rugalmasságát. Ez magyarázhatja az SDC4 csendesített sejtek megnövekedett fúziós kapacitását, és így a fúzió mechanikai alapjának biztosításában betöltött szerepét.
8. Az SDC4 génamplifikáció a humán fúzió negatív rhabdomioszarkóma tumorok 28%-ában volt megfigyelhető, és az RNS-szekvenálási adatok alapján fokozott SDC4 expresszióval járt együtt. Vizsgálatunk arra utal, hogy az SDC4 tumor driver géneként szolgálhat a rhabdomioszarkóma tumor kialakulásának elősegítésében.

## TÁMOGATÓK

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatta [támogatási számok: NKFI FK 134684, FK 128654, NKFI K 132446, GINOP-2.3.2-15-2016-00040 (MIOTeam) és TKP2021-EGA-28]. A munkát továbbá támogatta a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (pályázati szám: BO/00734/19/5, A. K.-P. részére) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium UNKP-21-5-SZTE-571 Új Nemzeti Kiválósági Programja (A. K.-P. részére). A dSTORM méréseket a Magyar Agykutatási Program (támogatási szám: 2017-1.2.1-NKP-2017-00002); a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (támogatási szám: TKP2021-NVA-19), valamint egy uniós finanszírozású magyarországi ösztöndíj (támogatási szám: EFOP-3.6.1-16-2016-00008) támogatta.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek a doktori tanulmányaim rögzös útján, támogatásukért, hasznos tanácsaikért és szeretetükért.

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dux László Professzor Úrnak, a Multidiszciplináris Doktori Iskola vezetőjének és a Biokémiai Tanszék korábbi vezetőjének, valamint Csont Tamásnak, a Biokémiai Tanszék vezetőjének, akik az elmúlt években lehetőséget biztosítottak számomra, hogy az Intézetben dolgozhassak.

Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Keller-Pintér Anikónak bátorításáért, támogatásáért és szakmai útmutatásáért. Azért, hogy nem pusztán szakmai kérdésekben nyújtott segítséget a doktori éveim alatt.

Köszönöm továbbá társszerzőimnek, Varga Dánielnek, Erdélyi Miklósnak a dSTORM felvételeket, Végh Attila Gergelynek az AFM méréseket, valamint Ning Liunak, Xue Xiaonak és Lin Xunak a rbadomioszarkóma esetek genomikai adatelemzését.

Szeretnék köszönetet mondani Kocsis Tamásnak, Gáspár Renátának és Deák Ferencnek az első években nyújtott önzetlen segítségükért.

Őszintén köszönöm kis laboros családom jelenlegi és volt tagjainak, Rádi Erzsébetnek, Makráné Felhő Zitának, Engi Ildikónak, hogy mindig családias légkört biztosítottak számunkra. Köhler Zoltán Mártonnak, Becsky Dánielnek, Szalenko-Tőkés Ágnesnek, Petrilla Annamáriának, Szenci-Kaszás Balázsnak, Fazekas Szuzinának, Tóth Évanak, Sója Andreának, Demján Virágnak és Tóth Enikőnek.

Köszönöm továbbá a Biokémiai Tanszék minden munkatársának, Bodnár Tündének és Ocsosvzki Imrének az adminisztratív és technikai munkájukat.

Külön szeretném kifejezni szívből jövő örök hálámat családomnak és páromnak a kimeríthetetlen szeretetükért, támogatásukért és türelmükért, amely nélkül ez az értekezés nem jöhetett volna létre. Az értekezésem szeretném nekik és szeretett nagymamámnak, Farkas Piroskának ajánlani.