

A DNMT2 gén intracelluláris funkciójának vizsgálata siRNA modell segítségével

37. OTDK Biológia szekció

biológia alapszak

készítette:

Kómár Vince

Biológus MSc 1. félév

témavezetők:

Dr. Gál Anikó

adjunktus

Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézete

Dr. Vellainé Dr. Takács Krisztina

egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Embertani Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIA INTÉZET



SEMMELWEIS EGYETEM GENOMIKAI MEDICINA ÉS RITKA
BETEGSÉGEK INTÉZETE

Budapest, 2025

Tartalom

1. Rövidítésjegyzék	2
2. Bevezetés	4
2.1. A DNMT2 fehérje funkciója, szerkezete.....	4
2.2. A DNMT2 sejtbioológiai szerepe	5
2.3. DNMT2 eltérések klinikai asszociációja.....	7
2.4. Előzetes eredményeink	8
3. Célkitűzés	12
4. Anyagok és módszerek	13
4.1. HeLa sejtek tenyésztése	13
4.2. siRNA géncsendesítés.....	13
4.3. RNA izolálás és RT-PCR.....	13
4.4. Western blot	14
4.5. Transzkriptomanalízis és bioinformatikai analízis.....	14
5. Eredmények	15
6. Diskusszió	20
7. Köszönetnyilvánítás	24
8. Irodalomjegyzék	25

1. Rövidítésjegyzék

BSE – bundle sygnaling element

Ca²⁺ - kalcium ion

COX - ciklooxygenáz

CYP4F3 – cytochrome P450 family 4 subfamily F member 3 (citokróm P450 4. család F alcsalád 3. tagja)

DNM2 – Dynamin 2

DRP1 – Dynamin-related protein 1 (Dynamin kapcsolt fehérje 1)

EMT – epithél-mesenchimális átalakulás

ER – endoplazmatikus retikulum

FBLIM1 – filamin kötő LIM fehérje 1

GED – GTP-áz effektor domén

IF – intermediér filamentum

KO – knock out (kiütés)

KRT13 – keratin 13

KRT19 – keratin 19

lncRNS – hosszú nem kódoló RNS

LOXL1-AS1 – lysil oxidase-like 1-antisense 1 (lizil oxidáz-szerű 1 antiszensz 1)

MD – middle domain (középső domén)

NGS – új generációs szekvenálás

PCR – polimeráz láncreakció

PH – pleckstrin homológ

PIP2 – foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát

PKA – protein kináz A

PRD – prolin felismerő domain

PTC – szemölcsös pajzsmirigyrák

RIN – RNS integritási szám

RT-PCR – valós idejű PCR

SARG – specifikus androgén-szabályozott gén

SDS-PAGE – natrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis

SERM – szelektív ösztrogénreceptor modulátor

SH3 – Src homológ 3

siRNS – kis interferáló RNS

TMEM139 – transzmembrán fehérje 139

TMEM45A – transzmembrán fehérje 45A

TNNC1- troponin C 1

VEGF-C – vaszkuláris endothél növekedési faktor C

VEGFR-3 – VEGF receptor

2. Bevezetés

2.1. A DNM2 fehérje funkciója, szerkezete

A Dynamin 2 (DNM2) a nagy GTP-ázok családjába tartozó 100 kDa tömegű, relatív alacsony GTP affinitású fehérje, mely a fehérjecsalád többi tagjára is jellemzően membrán fissionban és fusionban, a citoskeletális dinamikában, valamint a klatrin mediálta endocitózisban vesz részt (Trochet & Bitoun, 2021). A Dynamin szupercsalád fehérjék (DSP) közül a Dynamin 1 (DNM1) az idegsejtekben, a DNM2 minden sejtípusban, nagyobb mennyiségben a szív- illetve a vázizomzatban (Diatloff-Zito et al., 1995), míg a Dynamin 3 (DNM3) az agyban, szívben, herékben és a tüdőben található (Cao et al., 1998).

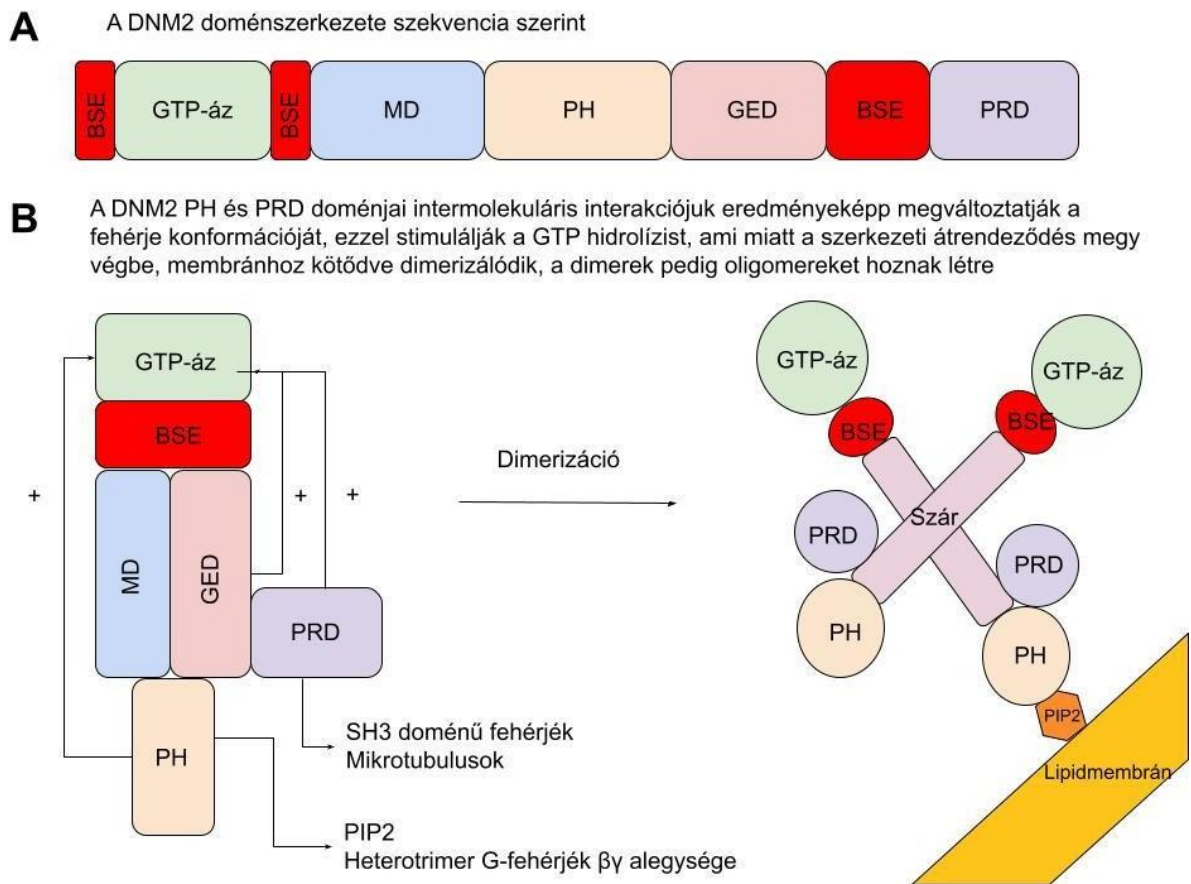
A DNM2 fehérje szerkezetileg öt doménből épül fel, amelyek az N-terminálistól C-terminálisig: (1) GTP-áz domén, (2) a középső domén (MD), (3) a pleckstrin homológ (PH), (4) a GTP-áz effektor domén (GED) és (5) a prolinban gazdag prolin-felismerő domén (PRD). A GTP-áz aktivitású domén az N- és a C-terminális végén, valamint a GED C-terminális hélice együttesen a bundle signaling element-et (BSE) alkotja, ami a GTP-áz és a GED, valamint a MD alkotta Dynamin-szár (stalk) közötti flexibilis intramolekuláris kapcsolatot hozza létre (Zhao et al., 2018) (1. ábra).

A MD feltételezhetően képes aktin megkötésére, a Dynamin-szár részeként szerepe van a fehérje-fehérje interakciókban, elsősorban a DNM2 fehérje oligomerizációjában, ami egy több fehérjéből álló Dynamin-gyűrűt hoz létre (Ramachandran et al., 2007). A GED az MD-hez hasonlóan része a Dynamin-szárnak, emiatt a fehérje dimerizációja során ezen a struktúrán keresztül a lépnek egymással interakcióba a többi DNM2-vel. A GED a DNM2 fehérjén belüli GTP-áz aktivátorként pozitívan szabályozza GTP-áz domén működését dimerizáció során (Chakraborty et al., 2012).

A PH domén kötődik a heterotrimer G-fehérjék $\beta\gamma$ alegységéhez, valamint a DNM2 és a foszfolipid membránok foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP_2) molekulájához. E fehérje-ligandum interakció megléte növeli a GTP-áz aktivitást, aminek következtében a DNM2 oligomerizálódik (Achiriloaie et al., 1999).

A PRD domén több Src homológ 3 (SH3) kötő fehérjemotívumot tartalmaz, ami a DNM2 és az SH3 doménnel rendelkező fehérjék közötti interakcióban jelentős szerepe van. Mivel a DNM2 az SH3 doménű fehérjék közvetítésével tud a klatrinburokhoz bekötni, ez elengedhetetlen a klatrin burokkal borított vezikulák célbavételére (Okamoto et al., 1997). A PRD domén segítségével a DNM2 mikrotubulusokhoz is képes kötődni. Mindkét említett esetben, a PRD

bekötődése GTP-áz domén aktivitását stimulálja (Morita et al., 2010).



1. ábra: A DNM2 doménszerkezete és funkciója (Zhao et al., 2018)

2.2. A DNM2 sejtszervezési szerepe

A DNM2 központi szerepet tölt be elsősorban olyan, membrán újraszervező folyamatokban, mint a klatrin mediálta endocitózis, a klatrin független endocitózis, caveolin független endocitózis (John R. Henley et al., 1998), intracelluláris vezikula transzport a transz-Golgi hálózat részeként, exocitózis, makrofágokban fagocitózis (Gold et al., 1999) és a makropinocitózis. Szerepet játszhat az aktinszerveződés szabályozásában és az aktin újraszerveződésében számos aktin kötő fehérjével való interakciók segítségével, ezáltal a citoszkeletális dinamikában is részt vehet (Changkyu Gu et al., 2010). Mivel a sejtváz dinamikában a DNM2 feltételesen szerepet vállal, aktin és mikrotubulusok működésének szabályozásával, így közvetett szerepe lehet a mitózisban és a sejtciklus lebonyolításában (Chircop et al., 2011). Funkcionálhat továbbá GTP-áz szignál molekulaként a p53 függő

apoptotikus útvonalban (Liu et al., 2008).

Klatrin mediálta endocitózis kezdeti lépéseinél a plazmamembránnál az invagináció hatására megemelkedik az állvány- és klatrin adaptor burokfehérjék koncentrációja és a leendő vezikulákon fehérjeburkot képeznek a membránon lévő PIP₂-höz és az integráns membránfehérjékhez való bekötéssel. Ezen interakciók kialakulásának eredményeképp, a membrán bemélyedésével párhuzamosan megkezdődik az aktin polimerizációja. Az invagináció felszínén megnövekszik a klatrinborítottság, amit pozitív visszacsatolással stimulálják endocitotikus faktorok és cargo adaptorok. A DNM2 a folyamatosan növekvő klatrinburkos struktúra szűkületénél rendeződik, majd aktin nukleáció kíséretében, melyben a Bin, Amfifizin, Ryn (BAR) fehérjék upstream kötődnek a DNM2 PRD-hez. Ez a downstream helyzetben lévő DNM2 gyors felhalmozódását teszi lehetővé a klatrinnal borított struktúra körül és Dynamin-gyűrűt alkotva lehasítja a képződő vezikulát (Ferguson et al., 2009).

Caveolin függő endocitózis során a DNM2 és az aktin vesznek részt a caveolae lipid raftok plazmamembránról való GTP-függő lehasításában, amely során a klatrin mediálta endocitózissal analóg mechanizmus megy végbe. DNM2 funkciója ebben a mechanizmusban még nem ismert, ugyanakkor hiánya esetén sem caveolae, sem caveolin1 nem volt detektálható (J. R. Henley et al., 1998).

Citoszkeletális dinamikában, ahogyan az endocitotikus folyamatokban is, a DNM2 direkt és indirekt is interakcióba lép az aktin filamentumokkal. A DNM2 PRD doménjén keresztül aktin szabályozó fehérjekomplexekkel lép kölcsönhatásba, közvetetten szerepet játszik a lamellipodia, membránfodrozódás, invadopodia, podosomia és aktinfarkak kialakulásában (Ferguson & De Camilli, 2012). A DNM2 közvetetten és közvetlenül is képes kötődni az F-aktinhoz, elsősorban membránremodelláció miatt. Ugyanakkor a kötődés mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, viszont a DNM2 aktinnal és annak regulátoraival való kapcsolatai segítik a fehérje pozicionálását az endocitotikus helyeken (C. Gu et al., 2010). In vitro a DNM2 képes erős kolokalizációra mikrotubulusokkal CMT mutáns PH domén, valamint DNM2 hiány esetén megemelkedik az acetilált tubulin szintje, ami a fehérje, mikrotubulusokkal való interakcióképességét ugyancsak bizonyítja (Tanabe & Takei, 2009).

A DNM2 a fentiekén kívül, a Dynamin-kapcsolt fehérje 1-gyel (DRP1) együtt részt vesz mitokondriális és peroxisomális fúziós és fissziós mechanizmusban is, mely során a DRP1 központi szerepet játszik annak kezdeti és végső lépéseiben. A DRP1 a mitokondrium külső membránjához köt be, majd a DNM2-höz hasonlóan helikális oligomer gyűrűs szerkezetet hoz

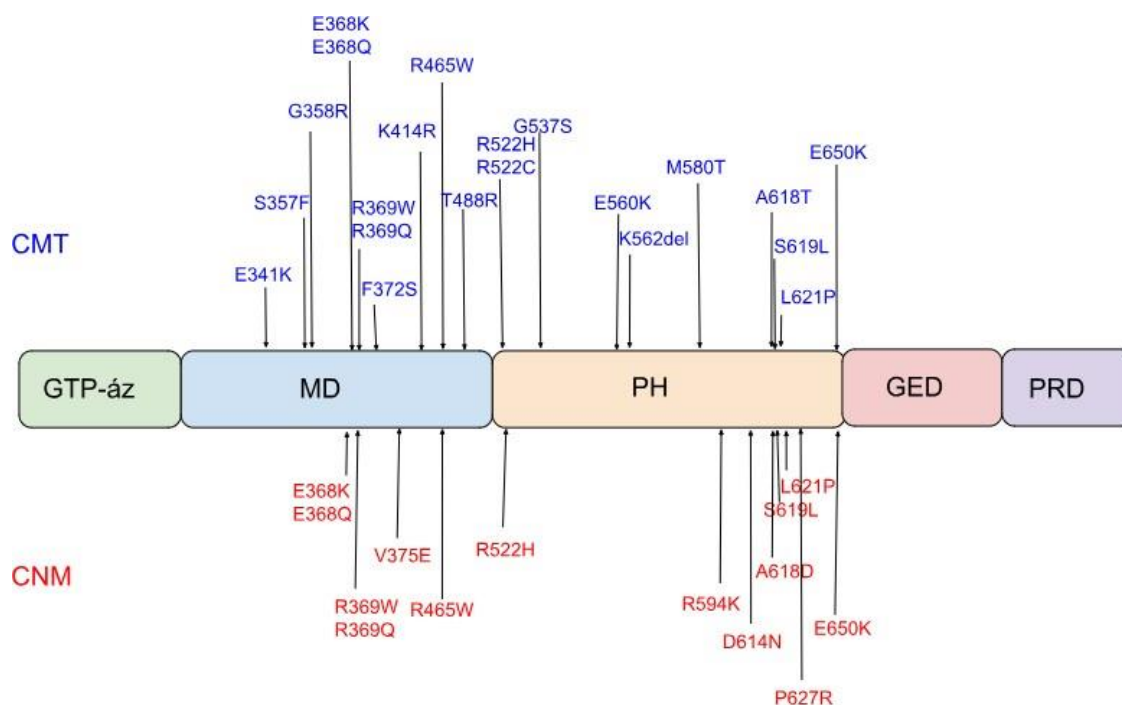
létre. A gyűrűs oligomer több, X-alakú helikális dimerből épül fel, melyek együttesen a mitokondriális membrán összeszűkülését és elvágását indukálják. A DNM2 a mitokondriális fúzióban és fisszióban szabályozza a DRP1 működését, ami 200-300 nm-re csökkent mitokondrium átmérő esetében képes az organellumot elvágni, míg a DNM2 40 nm átmérő alatt képes a hasításra, emiatt a végső hasítást ez utóbbi fehérje végzi membrán fisszió esetén (Kraus et al., 2021).

2.3. DNM2 eltérések klinikai asszociációja

A DNM2 gén ritka patogén variánsai a sejt organizációs zavarát okozzák, melyek főként az autoszómális dominánsan öröklődő centronukleáris miopátia (CNM) és axonális neuropátia (CMT2M) hátterében állnak (Zhao et al., 2018). A DNM2 gén patogén variánsai által meghatározott CNM klinikai megjelenése széles spektrumot mutat a súlyos gyermekkori formáktól a kevésbé súlyos felnőttkori manifesztációt mutató esetekig.

Az autoszómális domináns centronukleáris miopátiák 50%-ában a DNM2 gén érintettsége felelős (Romero, 2010). Az érintett betegek nagy részénél jellemző az arcizmok gyengesége, a kétoldali ptosis (szemhéjcsüngés) és az ophthalmoparesis. A DNM2-vel összefüggő CNM-ben az izombiopszia hipotrófiát és az 1-es típusú rostok túlsúlyát a szarkoplazma kötegek sugárirányú elrendeződését és a centrálisan elhelyezkedő sejtmagokat mutat (Catteruccia et al., 2013).

Jelenleg az irodalomban és az adatbázisokban 33 ismert, az American College of Medical Genetics (ACMG) besorolása alapján patogén vagy valószínűleg patogén variáns szerepel (2. ábra) amelyek főként a MD és PH doménben helyezkednek el (Catteruccia et al., 2013).



2. ábra: A DNM2 CNM és CMT mutációinak elhelyezkedése a doménszerkezetben (Zhao és mtsai., 2018)

2.4. Előzetes eredményeink

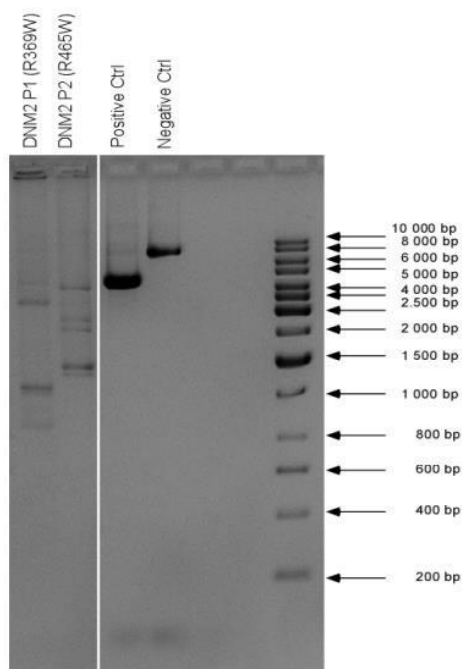
A Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetének páciensei közül korábban a DNM2 gén ritka, patogén variánsát két CNM-ben szenvedő beteg esetében azonosítottak. Egy 59 éves nő esetében a kór 23 éves korában manifesztálódott, aminek háttérében a DNM2 gén heterozigóta R369W ritka mutánsa igazolódott. A családi szegregációs vizsgálat során újabb esetet nem találtunk, édesanyja korábban elhunyt, nővérének hasonló klinikai tünetei vannak, de Ő nem járult hozzá a vizsgálathoz (Gal et al., 2015).

A másik női betegnél heterozigóta R465W patogén DNM2 variáns igazolódott. Mindkét páciensnél jelen volt axonális neuropátia, valamint a külső szemizmok bénulása is. Az R369W mutáció esetén kardiomiopátiát, az R465W hordozó páciensnél halláscsökkenést is, valamint mindkettejükönél endokrinológiai rendellenességeket is észleltünk (Gal et al., 2015).

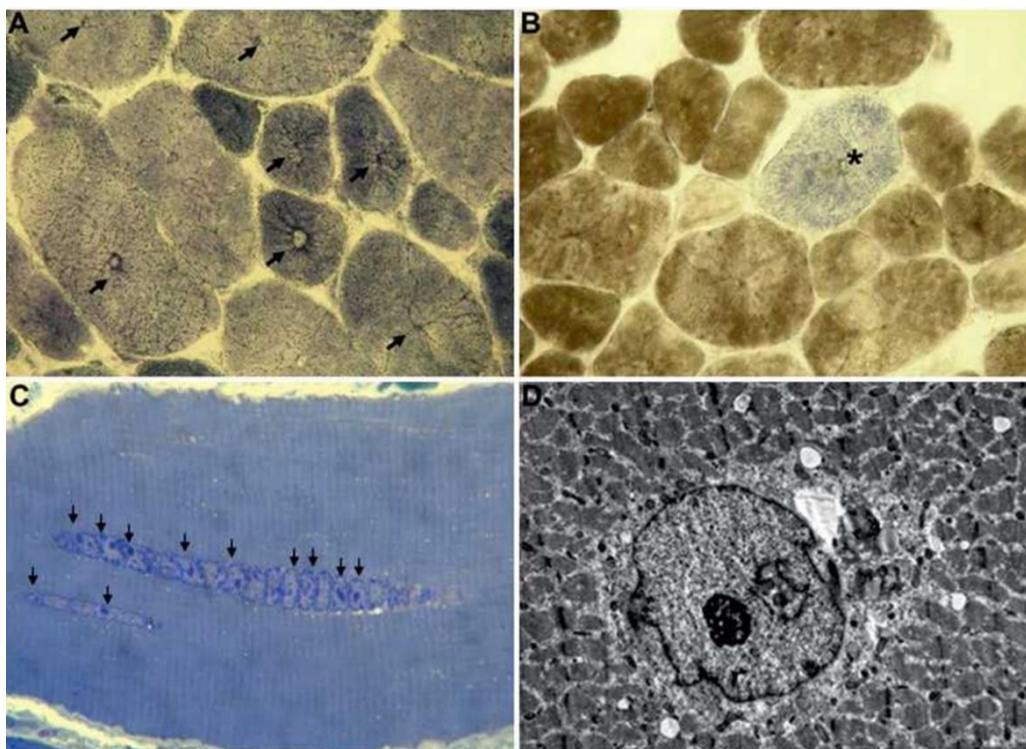
Izombiopsziából végzett miopatológiai vizsgálat során centrális magokat és COX negatív rostokat, elektronmikroszkóposvizsgálat során glikogén akkumulációt, lipidcseppecskéket és lekerekített mitokondriumokat találtunk (Gal et al., 2015; 5. ábra). Mindkét betegnél long-range PCR segítségével az mtDNS multiplex deléciója igazolódott (4. ábra). Az általunk talált mutációk mindegyike a DNM2 gén középső doménjében lokalizálódik. A két páciens klinikai tünetei a 3. táblázatban került összegzésre (3. táblázat).

	P1	P2
Mutáció	c.1105C>T (p.R369W) mtDNS multiplex deléción	c.1393C>T (R465W) mtDNS multiplex deléción
Betegség kezdete	23	42
Neurológiai tünetek	jellegzetes, hosszú, miopátias arc kétoldali ptózis izom atrofia oftalmoparézis relaxációs nehezítettség	jellegzetes miopátias arc micrognátia, kis szemek izom atrofia disartria parézis
Pszichiai tünetek	enyhe depresszió memória és alvás zavarok	enyhe depresszió
Neurofiziológiai vizsgálat	enyhe kognitív diszfunkció	n/a
EMG	miopátia	miopátia
ENG	axonális neuropátia	axonális neuropátia
Kardiológiai tünetek	kardiomiopátia	-
Fülészeti eltérések	-	halláscsökkenés
Fénymikroszkópia	az izomokban ismértékű rostkaliber változás, valamint centrális és perinukleáris festési mintázat COX negatív izomrostok	az izomokban ismértékű rostkaliber változás, valamint centrális és perinukleáris festési mintázat
Elektronmikroszkópia	lipid droplet megnövekedett mennyisége csökkent számú és megváltozott alakú intermiofibrilláris mitokondriumok	lipid droplet megnövekedett mennyisége glikogén felhalmozódás intramitokondriális parakristallin inklúziók

3. táblázat: A DNM2 mutációval rendelkező két beteg klinikai fenotípusának leírása



4. ábra: A DNM2 betegek mtDNS deléción vizsgálata long-range PCR-rel



5. ábra: neuropatológiai eltérések a DNM2 R369W mutációval rendelkező betegnél.
 A (NADH): számos izomrostban megfigyelhető, centrálisan elhelyezkedő sejtmag (nyíl);
 B (COX-SDH): COX negatív és ragged blue rostok (csillag);
 C (félvékony metszet): izomrostokban elhelyezkedő centrális magvak (nyíl);
 D: csökkent számú, lekerekített mitokondriumok, valamint lipidcseppek figyelhetők meg (elektronmikroszkópos metszet). (Gal és mtsai., 2015)

Kutatócsoportunknak a későbbiekben lehetősége volt a DNM2 betegeken további mitokondriális dinamikai útvonalat célzó funkcionális mérésre a Thomas Jefferson Egyetem MitoCare Centrumával, Philadelphia, PA, USA (Prof. Hajnóczky György) és az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Embertani Tanszékével (Vellainé Takács Krisztina) közösen. A MitoCare Centrumban végzett vizsgálatok alapján elmondható, hogy a DNM2 patogén variánsokat hordozó betegekből nyert primer fibroblaszt sejtekben a mitokondriális dinamika és hálózat zavarát találtuk. A betegből származó sejteken a mitokondriumok a kontrollhoz képest lényegesen nagyobb fragmentációt mutattak és a mitokondriális fúziós aktivitásuk is csökkent, ami vad típusú DNM2 túlexpresszió hatására rendeződik. Továbbá a DNM2 mutáns fibroblasztokon bioenergetikai változásokat, mint a mitokondriális dinamika változása és intracelluláris Ca^{2+} -felvételt nem találtunk, ezen eltérések

további vizsgálata során a fő GTP-ázok (MFN1, MFN2 és OPA1) expressziója nem változott, a kolokalizációs vizsgálatok során az ER-mitokondrium és a tubulin-mitokondrium kolokalizációja a kontrolltól nem tért el (Gal et al., 2018).

Ezen előzetes eredmények után egy közös NKFIH pályázat keretében vizsgáltuk a DNM2 gén pontos intracelluláris szerepét, jelen dolgozatban az siRNS géncsendesített HeLa sejtvonalon végzett modellkísérleteinket mutatjuk be, melyek Intézetünkben készültek és az eredmények analízisében, valamint validációjában ténylegesen is részt vettem.

3. Célkitűzés

Jelen vizsgálatban arra kerestük a választ, hogy HeLa sejteken a DNM2 géncsendesítés hatására milyen génexpressziós változások következnek be, amellyel magyarázatot szeretnénk találni a fentebb kifejtett, mitokondriális dinamikában látott sejtbiológiai jelenségre.

4. Anyagok és módszerek

4.1. HeLa sejtek tenyésztése

A kísérletek során HeLa sejteket használtunk, melyeket az ATCC Sejtbankból (CCL-2, www.atcc.org) származik. A sejteket 10% FBS (fetal bovine serum) (GIBCO, Life Technology), 2 mM glutamin (GIBCO, Life Technology) és 100 NE/ml penicillin/streptomycin, 4.5 g/L glukóz tartalmú DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) sejttenyésztő médiumban 5%-os CO₂ inkubátorban 37°C-on tenyésztettük.

4.2. Géncsendesítés siRNS-sel

A DNM2 fehérjék géncsendesítése során a HeLa sejteket DNM2-specifikus siRNS-ekkel transzfektáltuk. Kísérleteinkben 3-3 különböző siRNS-t használtunk (s223432, s4212, s4214 (Life Technologies)), a transzfekció kontrolljaként scrambled (kontroll) siRNS-ekkel (Silencer® Negative Control #1 siRNS, Life Technologies), valamint liposzóma alapú transzfekciós reagenst (Lipofectamine RNAMax-ot (Life Technologies)) alkalmaztunk. Az siRNS kezelést követően a sejteket 72 órán át inkubáltuk, majd a mintákból RNS-t és azzal párhuzamosan fehérjét izoláltunk.

4.3. RNS izolálás és RT-PCR

Az siRNS kezelést követően 72 órával a mintákból RNS-t és azzal párhuzamosan proteint izoláltunk. Az RNS izolálást QIAGEN RNA Mini kit segítségével a gyártó által megadott protokoll szerint végeztük. Az RNS-t a transzfektált és kezeletlen HeLa sejtekből izoláltuk, QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az egyes RNS-ek mennyiségét és RIN-értékét (RNS integritási számát) QBIT RNS (Thermo Fisher Scientific) és Bioanalyzer RNA 6000 Nano (Agilent) tesztek segítségével határoztuk meg.

A cDNS-könyvtár írásához szükséges reverz transzkripciót high Sensitive cDNA reverse transcriptase kittel (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A kvantitatív real-time PCR vizsgálatokat TaqMan génexpressziós esszék segítségével végeztük (Thermo Fisher Scientific) ((DNM2 (Hs00974698_m1), TNNC1 (Hs00268524_m1), KRT13 (Hs01002802_m1), KRT19 (Hs00761767_s1), CYP4F3 (Hs01064978_m1), TMEM45A (Hs01046616_m1), TMEM139 (Hs00542095_m1), FBLIM1 (Hs05003573_m1) és endogén kontrollként GAPDH

(Hs02758991_g1)). A génexpressziós változást ddCT módszer segítségével határoztuk meg.

4.4. Western blot

Western blot vizsgálat során a vizsgálandó mintákból 40 µg proteint vittünk fel a 12%-os SDS-PAGE gélre, majd a szeparációt követően ezt nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránokat blokkoló oldattal blokkoltuk (LI-COR Biosciences), majd az elsődleges antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk (a kísérletek során használt antitesteket a 4. supplementben részletezzük). Az antitesteket IRDye 800 másodlagos antitestekkel (LI-COR Biosciences) vizualizáltuk. A proteinek kvantifikációjára ImageJ szoftvert használtuk és a releváns bandákat HSP70 endogén kontrollhoz normalizáltuk. DNM2 - H00001785-M01, GAPDH MA515738-.

4.5. Transzkriptomanalízis és bioinformatikai analízis

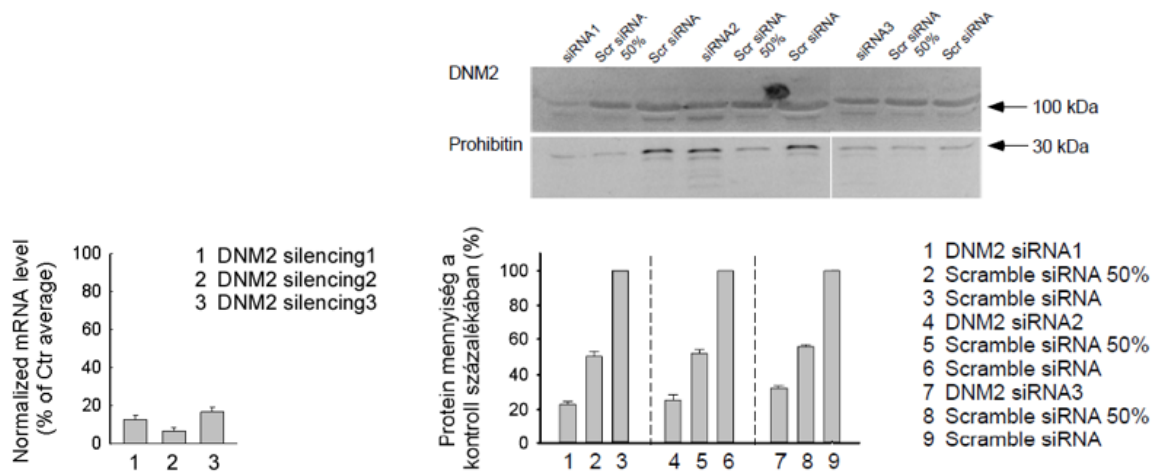
Az RNS szekvenálás során a könyvtár készítés Perkin Elmer reagenssel történt NEXTFLEX® Rapid Directional RNA-Seq Kit 2.0. reagens segítségével a gyártó által megadott protokoll szerint. Az RNS szekvenálás Illumina NextSeq platformon történt. Az RNASeq NGS futást követően a bioinformatikai analízis során az adaptor trimmelt, minőségi szűrt (Q>30) read-ek térképezése és kvantitációja a BaseSpace RMA Express programjával történt. A differenciál expressziós analízis a R limma-voom módszerrel, (prior szűrés min. count=3, min. sample=3, TMM normalizáció) történt.

Első lépésként a 3 párhuzamos, nem transzfektált minta összehasonlításával létrehoztuk egy génexpressziós alapvonalat. Ezután minden egyes DNM2-specifikus siRNS-sel kezelt mintát összehasonlítottunk mind a scramble kontroll, mind a kezeletlen mintákkal, majd későbbiekben ezeket az értékeket átlagoltuk és erre számoltuk a varianciát. Az elemzések során csak azon gének génexpresszió változásait vettük figyelembe, amelyek minden vizsgált mintánál szignifikánsan tértek el az általunk meghatározott -1 és +1 log fold change értéktől.

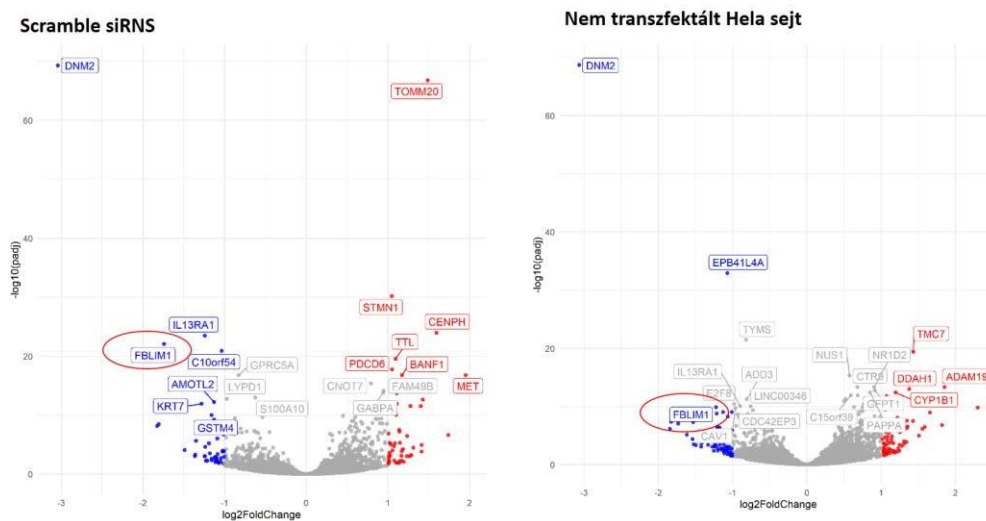
5. Eredmények

A DNMT2 fehérjék elnémításának hatásának vizsgálatához a HeLa sejteket DNMT2 specifikus siRNA-ekkel transzfektáltuk. Mindkét gén esetében 3-3 különböző siRNA-t használtunk (DNMT2-re specifikusan s223432, s4212, s4214, Life Technologies)). A vizsgálatok kontrolljaként az üres, kontroll (scrambled) siRNA-ekkel (Silencer® Negative Control #1 siRNA, Life Technologies) transzfektált mintákat és az intakt, nem transzfektált HeLa sejteket külön – külön szeretnénk volna vizsgálni. Az siRNA kezelést követően a sejteket 72 órán keresztül inkubáltuk. Az siRNA hatékonyságát mRNA és protein expresszió szinten real-time PCR-rel és Western blottal ellenőriztük. Az siRNA kezelést követően 72 órával a mintákból RNA-t és azzal párhuzamosan proteint izoláltunk. A transzkriptom analízishez azon mintákat válogattuk ki, ahol a gén és protein expressziós adatok alapján a géntörés hatékony volt, valamint az RNA minták RIN értéke (RNA integrity number) 7 felett volt. A transzfektált mintáink ellenőrzését minden párhuzamos kísérlet után RT PCR-rel és Western blottal végeztük. Az RNA szekvenálásra kiválasztott mintáink esetében az siRNA géncsendesített mintákon a génexpressziós érték a kontroll 10-15%-a volt, míg a protein expresszió szintje 20-30%-nak bizonyult (6. ábra).

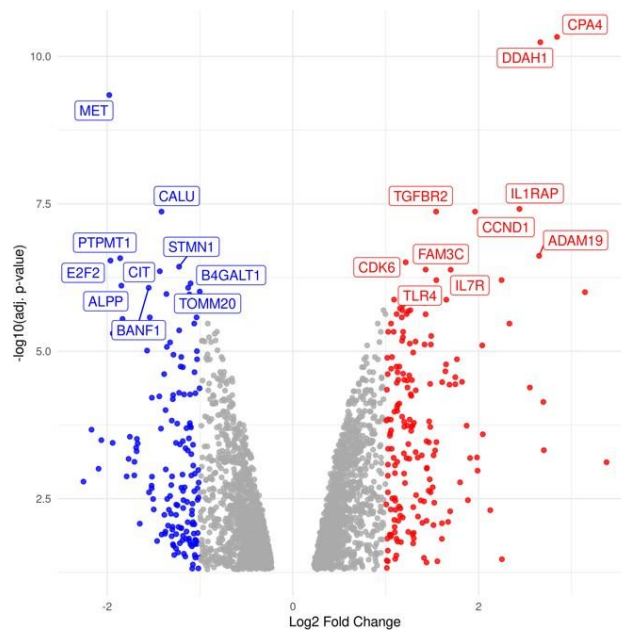
Az RNA szekvenálást követően a bioinformatikai elemzés során első lépésként a 3 párhuzamos, nem transzfektált minta összehasonlításával létrehoztunk egy génexpressziós alapvonalat. Ezután minden egyes DNMT2-specifikus siRNA-sel kezelt mintát összehasonlítottunk mind a scramble kontroll, mind a kezeltlen mintákkal. Az elemzések során csak azon gének génexpressziós változásait vettük figyelembe, amelyek minden vizsgált mintánál szignifikáns eltérést mutattak. Az elemzések során csak azon gének expressziós változásait vettük figyelembe, amelyek minden vizsgált mintánál szignifikánsan tértek el (8. ábra). Ezzel az elemzési módszerrel a DNMT2 minták esetében csak az FBLIM1 gén expressziójának downregulációja volt a közös variancia (7. ábra).



6. ábra: HeLa sejtek siRNS csendesítésének hatékonyságát Western blot és RT PCR segítségével ellenőriztük



7. ábra: DNM2 siRNS silencing hatására bekövetkező génexpressziós változások



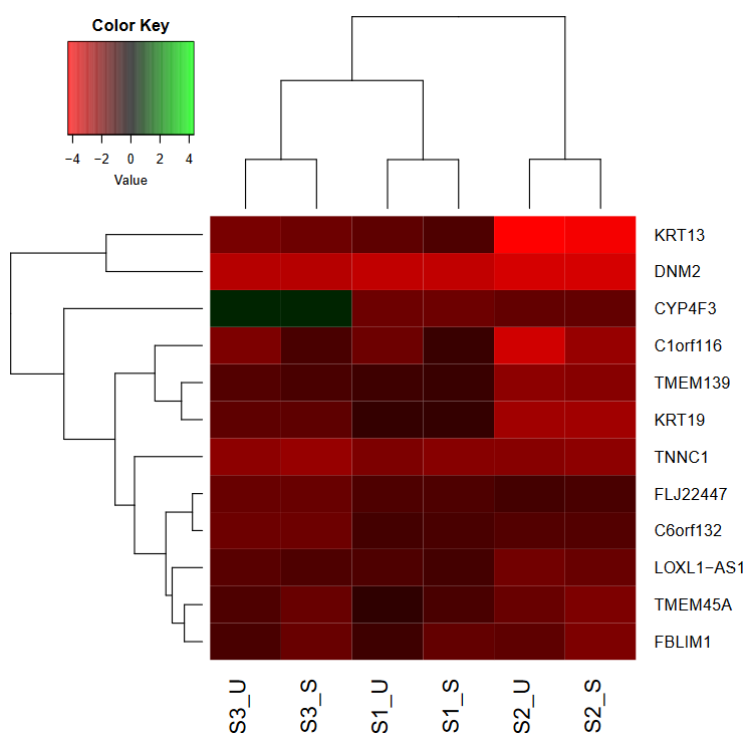
8. ábra: Scrambled vs untransfected HeLa sejtek expressziós változása

Ezt követően a Lipofectamine RNAMax transzfekciós reagens hatásának vizsgálatára megvizsgáltuk a szignifikáns változásokat a scramble kontrollok és a nem transzfektált minták között. Az elemzés eredményeként azt találtuk, hogy a Lipofectamine RNAMax 332 gén expresszióját változtatta meg szignifikánsan. Ezeket a géneket kizártuk a további elemzésből (8. ábra).

A DNM2 minták esetében a DNM2 log2 (fold change) -3 alatt volt minden transzkriptom futtatásban. A DNM2 csendesített minták esetében ezen analízisek után összesen 203 génváltozást figyeltünk meg, amelyek közül 12 gén esetében találtunk nagyon erős szignifikanciát (9. ábra). Az FBLIM1, KRT13, KRT19, TMEM139, TMEM45A gének részt vesznek a citoskeletális működésben és a traffickingben, így közvetett módon módosíthatják a mitokondriális dinamikát. A DNM2 depléciós mintákban 3 nem karakterizált fehérje és egy antiszensz RNS gén expressziója is szignifikánsan csökkent. A TNNC1 gén szintén downregulációt mutatott. A TNNC1 nagy szerepet játszik az izomműködés szabályozásában, így a talált expressziós csökkenés összefüggésben állhat a centronuclearis magok kialakulásával. A CYP4F3 gén expressziója szintén szignifikánsan csökkent. Ez egy monooxidáz, amely részt vesz a koleszterin és szteroid bioszintézisben. A DNM2-vel való kapcsolata jelenleg kérdéses. A szteroid bioszintézis szerepe a mitokondriumokban tehát összefügg a DNM2-vel és a CYP4F3-mal. Megjegyzendő, hogy a DNM2-pozitív betegekben gyakori a társuló endokrin rendellenesség, ami talán a szteroid biogenezis diszfunkciójával magyarázható (10. táblázat). A fenti gének közül a 3 nem karakterizált fehérje és az egy antiszensz RNS gén kivételével minden

esetben ismételt siRNS silencinget követően, a transzkriptom NGS futástól független a génexpressziós változásokat real-time PCR-rel TaqMan génexpressziós assay-k segítségével validáltuk. A validálás során az RNASeq által downregulációt mutató gének expressziója szintén csökkent (11. ábra).

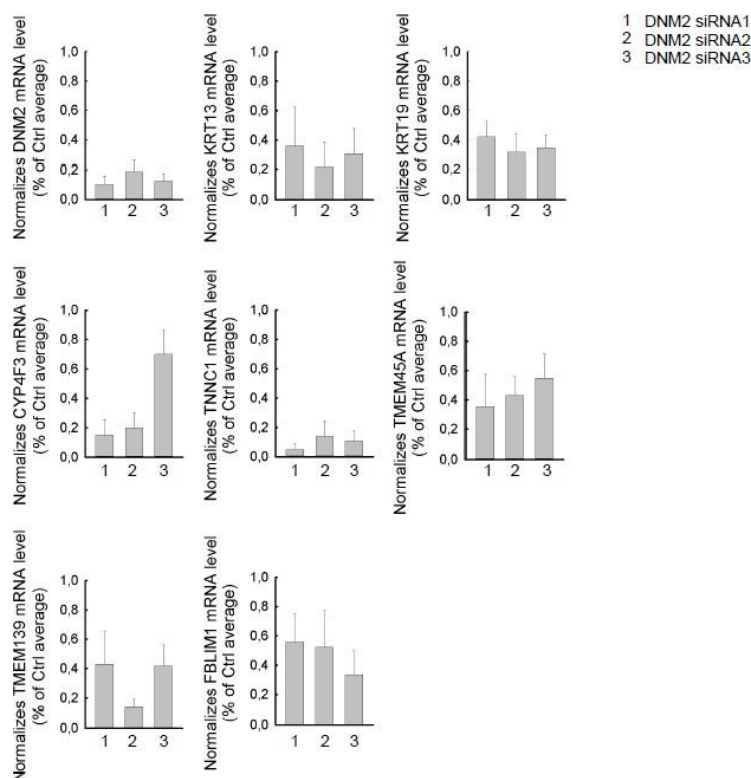
Továbbiakban ezen gének által kódolt proteinek expressziójának vizsgálatát Western blottal és immuncitokémiával szeretnénk vizsgálni. A későbbiekben a kolokalizációs vizsgálatok során szeretnénk tovább elemezni az immuncitokémiában talált DNM2 interakciós partnereket. A DNM2 fő interakciós partnereinek megtalálásával közelebb kerülhetünk a DNM2 mutációval rendelkező betegek célzott terápiájához.



9. ábra: a siRNS csendesített minták heatmap típusú expressziós összehasonlítása során a 12 magas szignifikanciát mutató génexpressziós változást ábrázoltuk

Gén	Megnevezés	Variancia	Átlag log2 fold
C1orf116	1. kromoszóma 116. nyílt olvasási keret	0,855	-2,039
C6orf132	6. kromoszóma 132. nyílt leolvasási keret	0,083	-1,487
CYP4F3	citokróm P450 4. család F alcsalád 3	1,541	-1,005
DNM2	Dynamin 2	0,053	-3,285
FBLIM1	filamin kötő LIM fehérje 1	0,147	-1,588
FLJ22447	nem karakterizált fehérje	0,066	-1,438
KRT13	keratin 13	1,738	-2,536
KRT19	keratin 19	0,64	-1,748
LOXL1-AS1	lizil-oxidáz-szerű 1 antiszensz RNS 1	0,089	-1,514
TMEM139	transzmembrán fehérje 139	0,379	-1,572
TMEM45A	transzmembrán fehérje 45A	0,199	-1,505
TNNC1	troponin C1, lassú oxidatív és szívizom típus	0,022	-2,311

10. táblázat: DNM2 siRNS silencing hatására magas szignifikanciát mutató gének



11. ábra: DNM2 siRNS silencing hatására magas szignifikanciát mutató gének validálása RT PCR-ral

6. Diszkusszió

A DNM2 csendesített mintákban az alkalmazott bioinformatikai algoritmust követve, amely során egy a scramble siRNS kezelt és a nem transzfektált HeLa sejtek expressziós mintázatának korreláltatásával egy olyan alapvonalat hoztunk létre, amellyel megpróbáltuk minimalizálni a transzfekciós reagens hatására bekövetkező génexpressziós változásokat. Ezen elemzéssel 12 gén esetében találtunk erősen szignifikáns génexpressziós csökkenést.

A magas szignifikanciát mutató gének közül 5 gén (*FBLIM1*, *KRT13*, *KRT19*, *TMEM139*, *TMEM45A*) a citoszkeletális működésben és forgalomban vesz részt, így ezek befolyásolhatják a mitokondriumok sejtvázs mentén történő mozgását, ezzel közvetett módon a mitokondriális dinamikát módosíthatják.

A KRT13 szerkezeti fehérje, mely a nyálkahártya bazális és intermedier laphám sejtjeiben, valamint nagy mennyiségben a prosztata tubulus iniciátor sejtjeiben expresszálódik, a KRT4-gyel az intracitoplazmás citoszkeleton IF alkotója, ami a nagy elektronsűrűségű dezmoszómákon keresztül kapcsolódnak más IF-hez, ezzel növelve a sejtek szakítószilárdságát. A KRT13 gén kifejeződését a Ca^{2+} , retinoidok, 1α , 25-dihidroxivitamin D3, ösztrogének és szelektív ösztrogén modulátorok szabályozzák (Yin et al., 2022).

A KRT119 a legkisebb, savas keratin fehérje, mely heterotipikus láncokban bázikus keratinokkal párosítva rendeződik el, eltérő expressziós mintázatot mutat fejlődő embrióban, érett harántcsikolt izomrostokban és az ektodermális epithél őssejtjekben (Sharma et al., 2019). Hiánya a sejtvázszerveződésben hibát eredményez, ugyanis KRT19 KO sejtekben az aktin feszült rost kifejeződése szignifikánsan csökkent, valamint a mikrotubuláris szerveződés is csökkent (Lam et al., 2020).

A TMEM139 egy újabban felfedezett transzmembránfehérje, aminek funkciója még nem tisztázott, feltételezhetően a plazmamembránban és a fokális adhézis helyeken lokalizálódik. Nem kis sejtes tüdőrákban (NSCLC) downregulációban van, csökkenti annak metasztatikus potenciálját, mivel direkt interakcióban van az E-kadherinnel és megakadályozza annak lizoszómális degradációját, gátolva az NSCLC-sejt epitél-mesenchimális tranzíciót (EMT), migrációját és invázióját in vitro és in vivo (Zhang et al., 2022).

TMEM45A egy transzmembrán fehérje, hipoxiás körülmények között a hipoxia faktor 1 (HIF1) upregulációjában, magas expresszáltága van az ektodermában, kapcsolatban áll a transz-Golgihálózattal és az ER-rel, mivel jelentős szerepe van a bőr keratinizációjában. Hiánya hipoxiás környezetben indukálhatja a zsírsav bioszintézis deregulációját, valamint a Warburg effektus miatt, a mitokondriális oxidatív foszforilációt aerob glikolízisre váltja (Schmit et al., 2019).

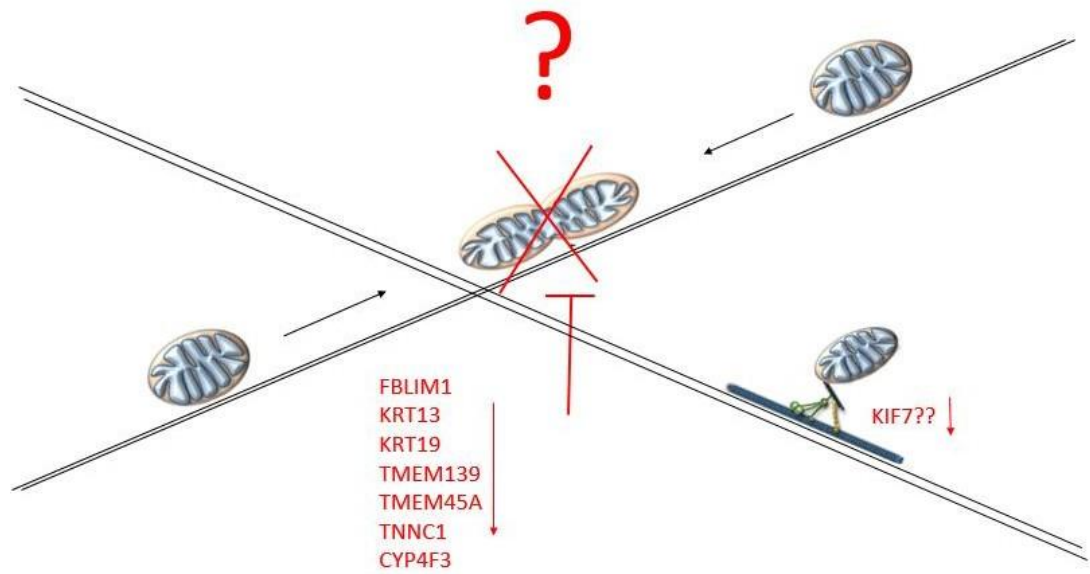
Az FBLIM1 vagy migfilin egy több LIM (Lin-11, Isl-1, Mec-3) és egy központi, prolinban gazdag domént tartalmazó fehérje, mely az extracelluláris mátrix-citoszkeleton közti kommunikáció során az aktinnal és integrinnel is kötődő filaminhoz kötődik a LIM doménnel. A migfilin fontos szabályozója az integrin mediálta citoszkeletális újrendeződésnek, a sejthalak változtatásnak és a sejtváándorlásnak (Tu et al., 2003), valamint szerepe van a kardiomiociták differenciációjában. Utóbbi magyarázattal bírhat a DNM2 ritka variánssal rendelkező eseteknél jelentkező szívizomérzékenység is (Reumers et al., 2021; Gal et al., 2015).

A TNNC1 az izomműködés szabályozásában játszik fő szerepet, így a talált expressziós csökkenés a centronukleáris magok kialakulásával állhat összefüggésben. A TNNC1 citoszkeletális fehérje szívizomban jelenlévő izoformájának N-terminálisa közel 30 PKA által foszforilálható aminosavat tartalmaz, ami a lassú oxidatív és gyors oxidatív izmokban található izoformákban nincs jelen. A szívizom kontrakciójában a bot alakú szívi izoforma N-terminális szekvenciájának lehet szerepe, ugyanis annak foszforilációja elősegíti a myozin kereszthíd és Ca^{2+} -függő szarkomer aktivációját. Diasztolé során a fehérje inhibitor régiója és az aktin-kötő helye interaktál az aktin struktúraváltását, megelőzve az erős aktin-miozin interakciót, „Tung és munkatársai szerint az inhibitor régió β -hajlítókanyar konformációt vesz fel aktinhoz kötés során”. TNNC1 szabályozó helyéhez Ca^{2+} kötődik, ekkor az inhibitor régió és az aktin-kötő hely aktinnal való kötődése megszűnik, foszforiláció hiányában a Ca^{2+} -affinitása relatív magas az N-terminálison (Solaro et al., 2008).

CYP4F3 egy monooxygenáz, mely a koleszterin és a szteroid bioszintézisben vesz részt, DNM2-vel való kapcsolata jelenleg kérdéses, de nem zárható ki annak lehetősége, hogy a betegeknél tapasztalt endokrinológiai eltérések ezen összefüggéssel magyarázhatóak. A CYP4F családra jellemzően szubsztrátjaik hosszú szénláncú zsírsavak, CYP4F3B az arachidonsavat ω -hidroxilációval 20-hidroxi-eikozatetraénsavvá oxidálja. A 20-hidroxi-eikozatetraénsavvá vazokonstriktor és vérlemezke aggregációt aktivál, a CYP4F3B túlexpressziója kardiovaszkuláris megbetegedésekben játszik szerepet. A CYP4F3A katalizálja a leukotrién B4 ω -hidroxilációját 20-hidroxi-leukotrién B4-gyé, ami agyulladásra adott válasz egyik fontos szabályozó lépése (Jarrar & Lee, 2019).

A három nem karakterizált fehérje és egy antiszensz RNS génjeinek expressziójában látott különbség jelenleg erősen kérdéses, megállapítása további vizsgálatokat igényel, ugyanis ezen gének validációját jelenleg nem végeztük el. A lizil oxidáz-szerű 1 antiszensz RNS 1 (LOXL1-AS1) egy hosszú nem kódoló RNS (lncRNS), aminek komolyszerepe van a pseudoexfoliációs glaukóma (PEXG) kialakulásához, kórképére jellemző, hogy egy fehérjeszerű anyag lerakódását eredményezi a szem anterior szegmensében, különösképpen a szemlencsénél, mechanikai sérülést okoz a nem myelinizált retinális ganglionok axonjain a látóidegnél, ami azok apoptózisához és későbbi látásvesztéshez vezet (Aboobakar et al., 2017). Az FLJ22447 egy nem karakterizált fehérje, aminek génkifejeződése szignifikánsan csökkent, ez is egy lncRNS, ami a HIF1A gén közelében helyezkedik el, feltételezhetően annak expresszióját szabályozza (Bahramian et al., 2022). A C1orf116 a specifikus androgén szabályozta gén (SARG) citoplazmatikus fehérjét kódolja, ami elősegíti a szemölcsös pajzsmirigy rák (PTC) limfotikus metasztázisát a vaszkuláris endotél növekedési faktor C (VEGF-C), vaszkuláris endotél növekedési faktor receptor 3 (VEGFR-3) tengelyen, expressziója upregulációban van androgének által, ugyanakkor nem tartalmaz fehérjemotívumokat, amikkel a funkciót meg lehetne határozni. „Parsana és munkatársai felfedezték, hogy a SARG egy új EMT gén, aminek csökkentett expressziója összefügg a tüdő- és prosztatarák gyenge előrejelzésével, ugyanakkor a pajzsmirigy rákban való szerepe még mindig nem tisztázott.” (Xu et al., 2022). A C6orf132 (chromosome 6 open reading frame 132) egy méhnyakrák limfotikus metasztázissal kapcsolatos lncRNS-t kódol, ugyanakkor ennek a transzkriptomnak a funkciója nem ismert, nem karakterizált fehérje expresszálódik és a DNM2 csendesített mintákban kifejeződése szignifikánsan csökkent (Cheng & Huang, 2021).

A feltételezett citoskeletális modifikátorok proteomikai analízise folyamatban van, valamint az organelláris markerek és az egyes fehérjék kolokalizációs vizsgálatát tervezzük. Kísérleteink során a DNM2 fő interakciós partnereinek megtalálásával a DNM2 patogén mutánsal rendelkező betegek multiplex klinikai fenotípusa jobban megérthetővé válhat és ezzel a betegek célzott terápiájához közelebb juthatunk (12. ábra).



12. ábra: a DNM2 siRNS csendesítése következtében feltételezetten fellépő mitokondriális- és citoszeletális dinamikában történő változások

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a sok támogatást és segítséget témavezetőmnek, Dr. Gál Anikónak és Dr. Vellainé Takács Krisztinának. Nélkülük ez a munka nem jöhetett volna létre.

Köszönetet szeretnék nyilvánítani továbbá a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetének vezetőjének Prof. Dr. Molnár Mária Juditnak, hogy TDK munkám végzéséhez lehetőséget biztosított

Köszönöm a technikai segítséget Szosznyák Tündének, Markó Mariannának és Sály Mónikának, az RNS szekvenálásban Dr. Bihari Zoltánnak, Dr. Nagy Enikőnek, a bioinformatikai elemzésekben Dr. Gézsi Andrásnak és Dr. Bató Emesének.

Továbbá a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetének minden munkatársának.

A munka az NKFIH_132812, UNKP-22-5 (GA) támogatásokkal valósult meg.

8. Irodalomjegyzék

- Aboobakar, I. F., Johnson, W. M., Stamer, W. D., Hauser, M. A., & Allingham, R. R. (2017). Major review: Exfoliation syndrome; advances in disease genetics, molecular biology, and epidemiology. *Experimental Eye Research*, 154, 88-103.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.11.011>
- Achiriloaie, M., Barylko, B., & Albanesi, J. P. (1999). Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*, 19(2), 1410-1415.
<https://doi.org/10.1128/mcb.19.2.1410>
- Bahramian, S., Sahebi, R., Roohinejad, Z., Delshad, E., Javid, N., Amini, A., Razavi, A. E., Shafiee, M., & Shamsabadi, F. T. (2022). Low expression of LncRNA-CAF attributed to the high expression of HIF1A in esophageal squamous cell carcinoma and gastric cancer patients. *Molecular Biology Reports*, 49(2), 895-905. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06882-0>
- Cao, H., Garcia, F., & McNiven, M. A. (1998). Differential Distribution of Dynamin Isoforms in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9), 2595-2609.
<https://doi.org/10.1091/mbc.9.9.2595>
- Catteruccia, M., Fattori, F., Codemo, V., Ruggiero, L., Maggi, L., Tasca, G., Fiorillo, C., Pane, M., Berardinelli, A., Verardo, M., Bragato, C., Mora, M., Morandi, L., Bruno, C., Santoro, L., Pegoraro, E., Mercuri, E., Bertini, E., & D'Amico, A. (2013). Centronuclear myopathy related to dynamin 2 mutations: clinical, morphological, muscle imaging and genetic features of an Italian cohort. *Neuromuscul Disord*, 23(3), 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.12.009>
- Chakraborty, S., Pratihari, S., & Hosur, R. V. (2012). NMR Derived Model of GTPase Effector Domain (GED) Self Association: Relevance to Dynamin Assembly. *PLOS ONE*, 7(1), e30109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030109>
- Cheng, T., & Huang, S. (2021). Roles of Non-Coding RNAs in Cervical Cancer Metastasis. *Front Oncol*, 11, 646192. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.646192>
- Chircop, M., Sarcevic, B., Larsen, M. R., Malladi, C. S., Chau, N., Zavortink, M., Smith, C. M., Quan, A., Anggono, V., Hains, P. G., Graham, M. E., & Robinson, P. J. (2011). Phosphorylation of dynamin II at serine-764 is associated with cytokinesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(10), 1689-1699.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.018>
- Ferguson, S. M., & De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(2), 75-88. <https://doi.org/10.1038/nrm3266>
- Ferguson, S. M., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., E, O. T., & De Camilli, P. (2009). Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, 17(6), 811-822.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.005>
- Fish, K. N., Schmid, S. L., & Damke, H. (2000). Evidence That Dynamin-2 Functions as a Signal-Transducing Gtpase. *Journal of Cell Biology*, 150(1), 145-154.
<https://doi.org/10.1083/jcb.150.1.145>
- Gal, A., Inczedy-Farkas, G., Pal, E., Remenyi, V., Bereznai, B., Geller, L., Szelid, Z., Merkely, B., & Molnar, M. J. (2015). The coexistence of dynamin 2 mutation and multiple mitochondrial DNA (mtDNA) deletions in the background of severe cardiomyopathy and centronuclear myopathy. *Clin Neuropathol*, 34(2), 89-95. <https://doi.org/10.5414/np300789>
- Gal, A., Naghdi, S., Weaver, D., Gézsi, A., Molnar, M., & Hajnoczky, G. (2018). Altered mitochondrial dynamics due to DNM2 mutations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859, e88.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2018.09.261>
- Gold, E. S., Underhill, D. M., Morrisette, N. S., Guo, J., McNiven, M. A., & Aderem, A. (1999). Dynamin 2 Is Required for Phagocytosis in Macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12), 1849-1856. <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1849>
- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., & Sever, S. (2010). Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *Embo j*, 29(21), 3593-3606.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.249>

- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., & Sever, S. (2010). Direct dynamin–actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO Journal*, 29(21), 3593-3606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/emboj.2010.249>
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., & McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol*, 141(1), 85-99. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.85>
- Henley, J. R., Krueger, E. W. A., Oswald, B. J., & McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated Internalization of Caveolae. *Journal of Cell Biology*, 141(1), 85-99. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.85>
- Jarrar, Y. B., & Lee, S. J. (2019). Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *Int J Mol Sci*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174274>
- Kraus, F., Roy, K., Pucadyil, T. J., & Ryan, M. T. (2021). Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature*, 590(7844), 57-66. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03214-x>
- Lam, V. K., Sharma, P., Nguyen, T., Nehmetallah, G., Raub, C. B., & Chung, B. M. (2020). Morphology, Motility, and Cytoskeletal Architecture of Breast Cancer Cells Depend on Keratin 19 and Substrate. *Cytometry A*, 97(11), 1145-1155. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24011>
- Liu, Y.-W., Surka, M. C., Schroeter, T., Lukiyanchuk, V., & Schmid, S. L. (2008). Isoform and Splice-Variant Specific Functions of Dynamin-2 Revealed by Analysis of Conditional Knock-Out Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5347-5359. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0890>
- Morita, M., Hamao, K., Izumi, S., Okumura, E., Tanaka, K., Kishimoto, T., & Hosoya, H. (2010). Proline-rich domain in dynamin-2 has a low microtubule-binding activity: how is this activity controlled during mitosis in HeLa cells? *The Journal of Biochemistry*, 148(5), 533-538. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq116>
- Okamoto, P. M., Herskovits, J. S., & Vallee, R. B. (1997). Role of the Basic, Proline-rich Region of Dynamin in Src Homology 3 Domain Binding and Endocytosis *. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11629-11635. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11629>
- Ramachandran, R., Surka, M., Chappie, J. S., Fowler, D. M., Foss, T. R., Song, B. D., & Schmid, S. L. (2007). The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *The EMBO Journal*, 26(2), 559-566. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601491>
- Reumers, S. F. I., Erasmus, C. E., Bouman, K., Pennings, M., Schouten, M., Kusters, B., Duijkers, F. A. M., van der Kooi, A., Jaeger, B., Verschuuren-Bemelmans, C. C., Faber, C. G., van Engelen, B. G., Kamsteeg, E.-J., Jungbluth, H., & Voermans, N. C. (2021). Clinical, genetic, and histological features of centronuclear myopathy in the Netherlands. *Clinical Genetics*, 100(6), 692-702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cge.14054>
- Romero, N. B. (2010). Centronuclear myopathies: A widening concept. *Neuromuscular Disorders*, 20(4), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.01.014>
- Schmit, K., Chen, J.-W., Ayama-Canden, S., Fransolet, M., Finet, L., Demazy, C., D'Hondt, L., Graux, C., & Michiels, C. (2019). Characterization of the role of TMEM45A in cancer cell sensitivity to cisplatin. *Cell Death & Disease*, 10(12), 919. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2088-x>
- Sharma, P., Alsharif, S., Bursch, K., Parvathaneni, S., Anastasakis, D. G., Chahine, J., Fallatah, A., Nicolas, K., Sharma, S., Hafner, M., Kallakury, B., & Chung, B. M. (2019). Keratin 19 regulates cell cycle pathway and sensitivity of breast cancer cells to CDK inhibitors. *Scientific Reports*, 9(1), 14650. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51195-9>
- Solaro, R. J., Rosevear, P., & Kobayashi, T. (2008). The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(1), 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.114>
- Tanabe, K., & Takei, K. (2009). Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J Cell Biol*, 185(6), 939-948. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803153>

- Thompson, H. M., Cao, H., Chen, J., Euteneuer, U., & McNiven, M. A. (2004). Dynamin 2 binds γ -tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nature Cell Biology*, 6(4), 335-342. <https://doi.org/10.1038/ncb1112>
- Thompson, H. M., Skop, A. R., Euteneuer, U., Meyer, B. J., & McNiven, M. A. (2002). The Large GTPase Dynamin Associates with the Spindle Midzone and Is Required for Cytokinesis. *Current Biology*, 12(24), 2111-2117. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01390-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01390-8)
- Trochet, D., & Bitoun, M. (2021). A review of Dynamin 2 involvement in cancers highlights a promising therapeutic target. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 238. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02045-y>
- Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., & Wu, C. (2003). Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation. *Cell*, 113(1), 37-47. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00163-6)
- Xu, S. J., Jin, B., Zhao, W. J., Chen, X. X., Tong, Y. Y., Ding, X. F., Chen, Y. Y., Wang, D. H., Wang, Z. M., Dai, B. Q., Chen, S., Liang, Y., Chen, G., Pan, S. J., & Xu, L. L. (2022). The Specifically Androgen-Regulated Gene (SARG) Promotes Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) Lymphatic Metastasis Through Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) and VEGF Receptor 3 (VEGFR-3) Axis. *Front Oncol*, 12, 817660. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.817660>
- Yin, L., Li, Q., Mrdenovic, S., Chu, G. C.-Y., Wu, B. J., Bu, H., Duan, P., Kim, J., You, S., Lewis, M. S., Liang, G., Wang, R., Zhau, H. E., & Chung, L. W. K. (2022). KRT13 promotes stemness and drives metastasis in breast cancer through a plakoglobin/c-Myc signaling pathway. *Breast Cancer Research*, 24(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13058-022-01502-6>
- Zhang, S., He, Y., Xuan, Q., Ling, X., Men, K., Zhao, X., Xue, D., Li, L., & Zhang, Y. (2022). TMEM139 prevents NSCLC metastasis by inhibiting lysosomal degradation of E-cadherin. *Cancer Sci*, 113(6), 1999-2007. <https://doi.org/10.1111/cas.15341>
- Zhao, M., Maani, N., & Dowling, J. J. (2018). Dynamin 2 (DNM2) as Cause of, and Modifier for, Human Neuromuscular Disease. *Neurotherapeutics*, 15(4), 966-975. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00686-0>
- Cao, H., Garcia, F., & McNiven, M. A. (1998). Differential Distribution of Dynamin Isoforms in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9), 2595-2609. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.9.2595>
- Chakraborty, S., Pratihari, S., & Hosur, R. V. (2012). NMR Derived Model of GTPase Effector Domain (GED) Self Association: Relevance to Dynamin Assembly. *PLOS ONE*, 7(1), e30109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030109>
- Diatloff-Zito, C., Gordon, A. J., Duchaud, E., & Merlin, G. (1995). Isolation of an ubiquitously expressed cDNA encoding human dynamin II, a member of the large GTP-binding protein family. *Gene*, 163(2), 301-306. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00275-b](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00275-b)
- Gal, A., Naghdi, S., Weaver, D., Gézsi, A., Molnar, M., & Hajnoczky, G. (2018). Altered mitochondrial dynamics due to DNM2 mutations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859, e88. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.09.261>
- Morita, M., Hamano, K., Izumi, S., Okumura, E., Tanaka, K., Kishimoto, T., & Hosoya, H. (2010). Proline-rich domain in dynamin-2 has a low microtubule-binding activity: how is this activity controlled during mitosis in HeLa cells? *The Journal of Biochemistry*, 148(5), 533-538. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq116>
- Okamoto, P. M., Herskovits, J. S., & Vallee, R. B. (1997). Role of the Basic, Proline-rich Region of Dynamin in Src Homology 3 Domain Binding and Endocytosis *. *Journal*

- of *Biological Chemistry*, 272(17), 11629-11635.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11629>
- Trochet, D., & Bitoun, M. (2021). A review of Dynamin 2 involvement in cancers highlights a promising therapeutic target. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 238. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02045-y>
- Zhao, M., Maani, N., & Dowling, J. J. (2018). Dynamin 2 (DNM2) as Cause of, and Modifier for, Human Neuromuscular Disease. *Neurotherapeutics*, 15(4), 966-975.
<https://doi.org/10.1007/s13311-018-00686-0>