

# Univerzita Karlova

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Patrik Hrbáč**

Savčí septiny v buněčných procesech  
Mammalian septins in cellular processes

Bakalářská práce

Školitelka: **RNDr. Lenka Libusová, Ph.D.**

Praha, 2023

**Poděkování:**

Děkuji paní doktorce Libusové za vedení práce, trpělivost, bleskurychlou zpětnou vazbu a užitečné rady během psaní bakalářské práce. Rovněž bych rád poděkoval paní doktorce Lánské za zpětnou vazbu, ochotu a trpělivost s mými verzemi bakalářské práce. V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům za neutuchající podporu.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 12. 2023

Podpis

## **Abstrakt**

Septiny jsou cytoskeletární GTP vazebné proteiny s unikátními vlastnostmi. Vyskytují se od jednobuněčných eukaryot až po savce s výjimkou vyšších rostlin. Napříč organismy mají septiny dobře konzervovanou strukturu i funkci. V buňkách jsou septiny lokalizovány v cytoplazmě, kde jsou schopné tvořit filamenta a struktury vyššího řádu. Mimoto interagují s buněčnými membránami, aktinovými filamenti, mikrotubuly a množstvím různorodých proteinů. Změny v expresi septinů se často projeví poruchami rozličných buněčných procesů a jsou tak spjaty s různými nemocemi. Kvůli tomu se nabízí pro savčí septiny možnost klinického využití. Se stále rostoucím počtem rolí v buňce se septinům dostává nemalé pozornosti a poznatky o nich rostou závratným tempem. V této rešerši se pokusím shrnout co největší množství informací o struktuře, skladbě, funkci a praktickém využití savčích septinů.

## **Klíčová slova**

savčí septiny, cytoskelet, membrána, filamenta

## **Abstract**

Septins are cytoskeletal GTP-binding proteins with unique properties that can be found in species ranging from single-cell eukaryotes to mammals with the exclusion of vascular plants. Septins are well conserved across species in both their structure and function. They are located in the cytoplasm, where they can assemble into filaments and higher order structures. Moreover, septins can interact with membranes, actin filaments, microtubules, and various proteins. Changes in septin expression often result in numerous defects in cellular processes and are, therefore, linked to a multitude of diseases. For that reason, mammalian septins appear to be of clinical importance. With the ever-increasing number of discovered cellular roles, septins are becoming a point of interest for many and the amount of information known about them grows rapidly. In this review, I attempt to summarise knowledge about the structure, assembly and function of mammalian septins, as well as their possible practical use.

## **Keywords**

mammalian septins, cytoskeleton, membrane, filaments

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Nomenklatura septinů.....	2
3. Doménová struktura septinů.....	4
3.1. N-koncová doména .....	5
3.2. G-doména.....	5
3.3. C-koncová doména.....	8
4. Septinová filamenta.....	9
4.1. Štěpení GTP .....	10
4.2. Vazebná rozhraní.....	11
4.3. Struktury vyššího řádu.....	11
5. Vliv septinů na buněčné procesy.....	13
5.1. Cytoplazmatická membrána.....	13
5.2. Golgiho aparát.....	15
5.3. Lipidové kapénky.....	16
5.4. Mitochondrie.....	16
5.5. Endoplazmatické retikulum.....	18
5.6. Cytoskelet .....	18
6. Septiny a nemoci .....	25
6.1. Samčí sterilita .....	25
6.2. Nádorová onemocnění.....	27
6.3. Parkinsonova choroba .....	30
6.4. Buněčná imunita.....	31
7. Závěr: .....	31
Použitá literatura.....	34

## Seznam zkratk

ARTS – septinový protein spojený s apoptózou přes signalizaci transformujícího růstového faktoru beta

Bcl-2 – lymfom B-buněk 2 (protein)

CENP-E – centrosomální protein E

CHO-K1 – buněčná linie z buněk vaječníku čínského křečka

CLIP-170 – cytoplazmatický linker protein 170

CRC – kolorektální karcinom

C-konec – C-koncová doména

DAG – diacylglycerol

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Drp1 – s dynaminem příbuzný protein 1

ERK – kináza regulovaná extracelulárním signálem

ESCRT – endocytární třídící komplex potřebný pro transport

FCF – forchlorfenuron

F-aktin – fibrilární aktin

GA – Golgiho aparát

GDP – guanosindifosfát

GFP – zelený fluorescenční protein

GMPPNP – guanylylimidodifosfát

GM130 – protein z matrixu *cis*-Golgi o hmotnosti 130 kDa

GTP – guanosintrifosfát

G-doména – guanosintrifosfát vazebná doména

G-rozhraní – vazebné rozhraní tvořené interakcí dvou guanosintrifosfát vazebných domén

HDMVEC – lidské dermální mikrovaskulární endoteliální buňky

HeLa – Henrietta Lacks (buňky)

HGF – růstový faktor hepatocytů

Huh7R – buněčná linie pocházející z lidského hepatomu

IMCD3 – myší buněčná linie vnitřního medulárního kanálku

KIF – člen rodiny kinesinů

K562 – lidská buněčná linie myeloidní leukémie

MAP – s mikrotubuly asociovaný protein

MCAK – mitotický s centromerou asociovaný kinesin

MCF – buněčné linie nalezené Michigan Cancer Foundation

MDA-MB-231 – buněčná linie metastazující rakoviny prsou od M. D. Anderson

MDCK – Madin-Darby psi ledvinné buňky

MEK – mitogenem aktivovaná proteinkináza kinázy

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

MT – mikrotubuly

NC-rozhraní – vazebné rozhraní tvořené interakcí dvou N- a C-koncových domén

N-konec – N-koncová doména

ORAI1 – protein vápníkového kanálu aktivovaného uvolněním vápníku 1

polyGlu MT – mikrotubuly s polyglutamátovým řetězcem na tubulinu

P-loop – fosfát vazebná klička

RPE-1 – buněčná linie pigmentových epiteliálních buněk lidské sítnice

STIM1 – stromální interakční molekula 1

SUE – pro septiny unikátní element

TAG – triacylglycerol

TGF- $\beta$  – transformující růstový faktor beta

Ts – Taxol senzitivní buňky

Tr – Taxol rezistentní buňky

UV – ultrafialové

U2OS – lidská buněčná linie z osteosarkomu

VE-kadherin – vaskulární endoteliální kadherin

XIAP – s X chromosomem spojený inhibitor apoptózy

6-OHDA – 6-hydroxydopamin

786-O – lidská buněčná linie karcinomu ledviny

+TIP – proteiny asociované s plus konci mikrotubulů

# 1. Úvod

Septiny byly poprvé popsány v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell, 1971). Postupem času byly objeveny u dalších zcela nepříbuzných organismů. Dnes již víme, že se septiny vyskytují od jednobuněčných eukaryot až po savce s výjimkou vyšších rostlin. Třebaže septiny pocházejí z různých druhů, sdílejí podobné vlastnosti. Septiny jsou totiž ortology. Některé poznatky získané studií septinů u jednoho druhu tak mohou být užitečné při zkoumání septinů u druhu jiného a zcela nepříbuzného (Shuman and Momany, 2022). U mnohobuněčných organismů se některé septiny nacházejí ve všech buňkách těla, zatímco jiné mají specializované funkce a jsou tkáňově specifické (Cao et al., 2007; Hall et al., 2005; Ihara et al., 2005; Kim et al., 2004; Lin et al., 2009).

Podstatnější než rozšíření septinů je však jejich stavba a funkce. Postupem času bylo odhaleno, že jsou to GTP vazebné proteiny, které se dají rozdělit na N-koncovou doménu (N-konec), GTP vazebnou doménu (G-doménu) a C-koncovou doménu (C-konec). Netrvalo dlouho a septiny si získaly pozornost díky nezvyklé organizaci do filament a struktur vyššího řádu i díky přítomnosti unikátního elementu ve své G-doméně (Mendonça et al., 2019; Pan et al., 2007; Valadares et al., 2017). Rozsah a množství jejich funkcí v různých tkáních dodnes není znám, ovšem účast septinů byla prokázána v reorganizaci a modifikaci mikrotubulů, váčkovém transportu, buněčném dělení, určování tvaru buňky, degradaci extracelulární matrix, stabilizaci a lokalizaci organel a dalších buněčných procesech (Bowen et al., 2011; Collins et al., 2019; Desterke and Gassama-Diagne, 2019; Song et al., 2019; Spiliotis et al., 2008, 2005). Z medicínského hlediska je významné, že septiny hrají svoji roli také v samčí sterilitě, neurodegenerativních i nádorových onemocnění (Cai et al., 2018; Hall et al., 2005; Ihara et al., 2005; Kemeny et al., 2012; Lin et al., 2011, 2009; Vickram et al., 2021; Zhang et al., 2016).

Přestože jsou septiny v posledních letech cílem intenzivního výzkumu, zůstávají nadále málo prozkoumány s prostorem pro další bádání. Třebaže výzkum není zdaleka u konce, septiny se ukázaly býti natolik významnými, že jsou nyní považovány za čtvrtou část cytoskeletu, hned vedle mikrotubulů, mikrofilament a intermediálních filament (Mostowy and Cossart, 2012).

V této práci se zaměřím na dosud popsaných 13 savčích septinů, jejich doménové složení, skládání do filament a struktur vyššího řádu. Shrnu popsané funkce v rámci savčí buňky a popíšu některé změny, které provází utlumení, vyřazení, nebo naopak nadměrná exprese septinů.



## 2. Nomenklatura septinů

Savčí septiny lze rozdělit jednak na základě sekvenční podobnosti (Kartmann and Roth, 2001; Kinoshita, 2003), ale též dle vzájemné zaměnitelnosti některých septinů. Na základě těchto parametrů byly septiny rozřazeny do čtyř skupin někdy také nazývaných po svém tvůrci Kinsoshitovi skupiny, viz Tab. 1 (Kinoshita, 2003). Toto rozdělení se používá dodnes. Septiny ze stejné skupiny lze mezi sebou uměle vyměnit, mění se tím ovšem vlastnosti septinových filament (Sellin et al., 2014).

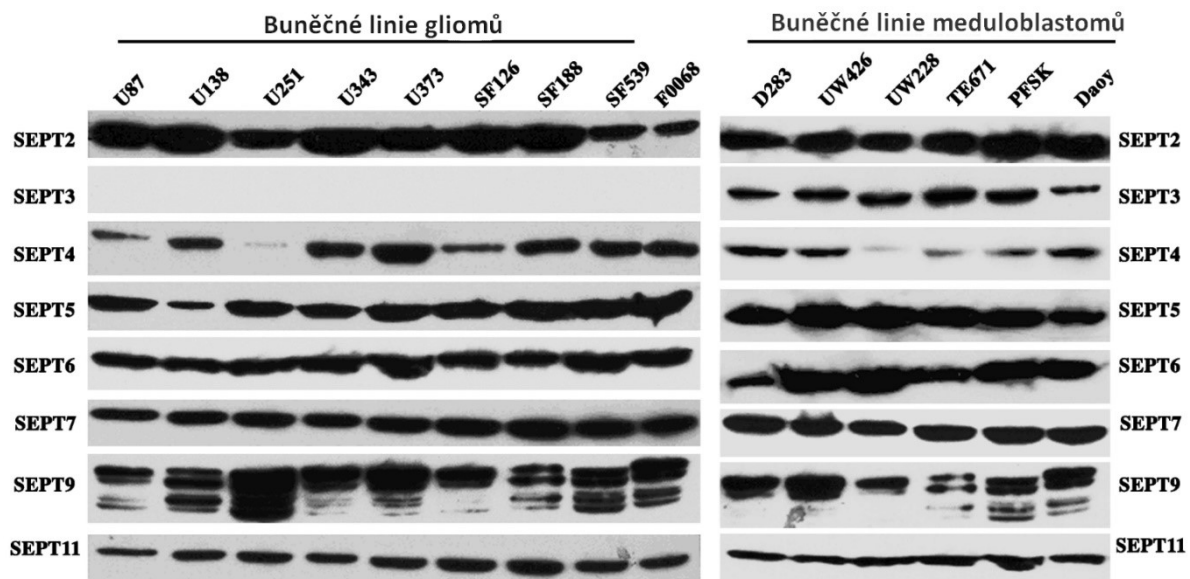
Septinové skupiny se navzájem liší délkou C- a N-konců, schopností štěpit GTP a tím i mírou konzervovanosti G-domény a rychlostí štěpení GTP (Macedo et al., 2013; Spiliotis and Nakos, 2021). Skupina SEPT7 obsahuje pouze septin 7. Do skupiny SEPT6 patří septiny 6, 8, 11, nově také 10 a 14. Skupina SEPT3 zahrnuje septiny 3, 9 a 12. V poslední skupině SEPT2 se nacházejí septiny 1, 2, 4 a 5, viz Tab. 1 (Kinoshita, 2003). Zatímco septinové skupiny SEPT2, SEPT3 a SEPT7 se liší ve svých C-koncích (Leonardo et al., 2021; Pan et al., 2007). Členové skupiny SEPT6 se od ostatních septinů odlišují neschopností štěpit GTP (Leonardo et al., 2021; Sirajuddin et al., 2009). Strukturou septinu se blíže zabývá kapitola 3.

Kinoshitova skupina	zařazené septiny				
skupina SEPT7	SEPT7	-	-	-	-
skupina SEPT6	SEPT6	SEPT8	SEPT10	SEPT11	SEPT14
skupina SEPT3	SEPT3	SEPT9	SEPT12	-	-
skupina SEPT2	SEPT1	SEPT2	SEPT4	SEPT5	-

**Tab. 1:** Savčí septiny rozděleny nerovnoměrně do čtyř skupin dle (Kinoshita, 2003). Septiny jsou v rámci skupiny zaměnitelné (Kinoshita, 2003). Doplněno o nově objevené septiny z (Spiliotis and Nakos, 2021).

V savčích septinech hraje velkou roli alternativní sestřih. Transkripce konkrétního septinového genu můžeme získat četné sestřihové varianty mRNA, které vedou ke vzniku nejrůznějších septinových izoform (Sellin et al., 2014, 2012). Alternativní sestřih nejčastěji ovlivňuje C- a N-konce, zatímco G-doména je vždy přítomna (Bläser et al., 2003; Hall et al., 2005; Møller et al., 2018). Navíc se počet septinových izoform mezi savci liší. Například u myši byly pozorovány tři, u potkanů jedna a u člověka dvě izoformy SEPT12 (Lin et al., 2009).

Některé septiny a jejich izoformy jsou tkáňově specifické, zatímco jiné septiny se vyskytují hojně. Jejich množství a zastoupení se však mění jak v průběhu maturace buněk, tak i během diferenciaci buněk. Ke změnám v expresi septinů dochází i v nádorových tkáních (Bläser et al., 2003; Hall et al., 2005; Lin et al., 2009; Møller et al., 2018; Tada et al., 2007). Například exprese SEPT3 je velmi dobře patrná u buněk lidských nádorových linií původem z meduloblastomů, ale chybí u buněk lidských nádorových linií pocházejících z gliomů, viz Obr. 1 (Kim et al., 2004). Dalším příkladem může být SEPT12, který byl ze zkoumaných myších tkání přítomen pouze ve varlatech (Lin et al., 2009).



**Obr. 1:** Expresé septinů v různých nádorových liniích mozku a primárních lidských fibroblastů (F0068). Podstatný je zde rozdíl v expresi SEPT3, který dokládá, že se exprese septinů v různých buňkách může lišit (Kim et al., 2004). Z obrázku jsou také dobře patrné izoformy SEPT9. Takový výsledek je vzhledem k velkým rozdílům v hmotnosti jednotlivých izoform SEPT9 očekávaný (Sellin et al., 2014). Převzato z (Kim et al., 2004).

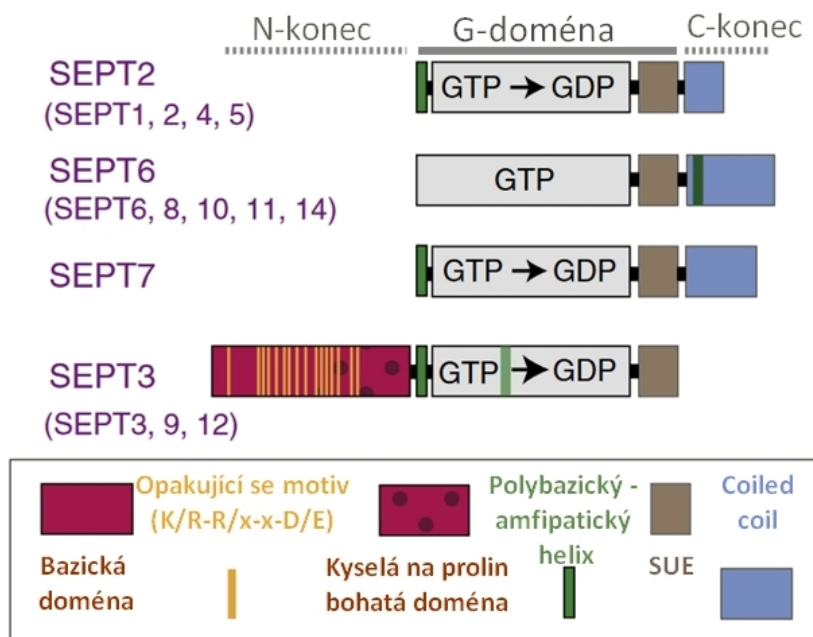
Ačkoli vznik izoform je u savčích septinů častý, SEPT9 rozmanitostí hmotností svých izoform vystupuje z řady. To je dobře viditelné na Obr. 1. Nejtěžší nalezená izoforma SEPT9 má 65 kDa s délkou N-konce 295 aminokyselin, zatímco nejlehčí izoforma SEPT9 pouhých 39 kDa a délkou N-konce 44 aminokyselin. Hmotnost izoform SEPT9 se tak může lišit téměř dvojnásobně. (Sellin et al., 2014, 2012). Dalším příkladem může být izoforma SEPT4 známá jako ARTS. Ta obsahuje

unikátní C-konec čítající 27 aminokyselin, který se nenachází v žádném jiném produktu genu H5/PNUTL2/CDCrel2b, ze kterého ARTS pochází (Larisch et al., 2000).

Třebaže se u septinů dodržují všeobecná pravidla pro pojmenovávání genů i proteinů, lze se v člancích setkat s několika zajímavostmi. Proteinové izoformy se běžně značí názvem septinu následovaným podtržítkem, „i“ a číslem izoformy, například SEPT9\_i1 (Macara et al., 2002). Dále se kvůli obtížím se získáváním purifikovaných septinů v plné délce začaly místy používat zkrácené proteiny (Castro et al., 2020; Leonardo et al., 2021; Macedo et al., 2013; Sirajuddin et al., 2009), které se nazývají dle přítomných, nebo naopak chybějících domén. Například SEPT3, který obsahuje G-doménu a C-konec, ale postrádá N-konec, se může značit: SEPT3-GC, SEPT3GC, ΔNSEPT3, nebo SEPT3ΔN.

### 3. Doménová struktura septinů

Jak již bylo zmíněno, septiny jsou proteiny s molekulovou hmotností mezi 35 až 65 kDa (Kim et al., 2004). Obsahují několik typických domén, díky kterým se mohou účastnit celé řady buněčných pochodů. V následujících odstavcích bude popsána stavba a funkce všech hlavních domén septinů: N-konec, G-doména a C-konec. Doménová stavba je také znázorněna na Obr. 2.



**Obr. 2:** Typická struktura všech čtyř skupin savčích septinů. U septinů se vyskytuje G-doména a variabilní N- a C-konce. G-doména septinů obsahuje pro septiny unikátní element (SUE), který, jak název napovídá, se vyskytuje pouze u septinů (Valadares et al., 2017). Dlouhý N-konec vyobrazený u skupiny SEPT3 je ve skutečnosti charakteristický pouze pro SEPT9 (Sellin et al., 2014). Převzato a upraveno z (Spiliotis and Nakos, 2021).

Pochopení struktury septinů je důležité pro objasnění jejich schopnosti skládat se do filament. Septiny spolu mohou interagovat přes G-domény s navázaným nukleotidem a tvořit G-rozhraní, nebo přes

okrajové části G-domény, N-konce a C-konce za vzniku NC-rozhraní (Sirajuddin et al., 2007; Valadares et al., 2017). Obě rozhraní jsou znázorněna na Obr. 3.

### 3.1. N-koncová doména

N-konce septinů jsou obvykle krátké a až na polybazický alfa helix v blízkosti G-domény s označením  $\alpha 0$  nestrukturované (Sirajuddin et al., 2007). Septiny skupiny SEPT6 v porovnání s ostatními septiny mají  $\alpha 0$  helix s výrazně zkrácenou polybazickou oblastí (Mendonça et al., 2021). Zdaleka nejdelší a nejvariabilnější N-konec mezi septiny patří SEPT9 ze skupiny SEPT3. Ostatní členové této skupiny: SEPT3 a SEPT12, mají N-konec krátký a nevariabilní (Sellin et al., 2014), proto se informace o N-konci budou týkat převážně SEPT9.

Zhruba polovina N-konce SEPT9 blíže k G-doméně je kyselá, zatímco druhá polovina je bazická, viz Obr. 2 (Bai et al., 2013; Smith et al., 2015).

SEPT9 ve svém N-konci obsahuje repetitivní motiv K/R-R/x-x-D/E, kritický pro vazbu septinu na mikrotubuly. Schopnost SEPT9 vázat se na mikrotubuly koreluje s délkou N-konce a tím i s množstvím repetitivních motivů, jak ukazují výsledky popsané Bai et al. (2013). Izoforma SEPT9 s nejdelším N-koncem SEPT9\_i1 velmi ochotně kolokalizovala s mikrotubuly v blízkosti jádra. Naopak izoformě SEPT9\_i4 chybí podstatná část N-konce s většinou repetitivního motivu. Tato izoforma s mikrotubuly téměř nekolokalizovala (Bai et al., 2013; Valadares et al., 2017).

Bazická část N-konce SEPT9 se rovněž váže na F-aktin (Smith et al., 2015). Ačkoli Smith et al. (2015) nezkoušeli vazbu různých izoform na F-aktin, je pravděpodobné, že i v tomto případě izoformy SEPT9 s výrazně zkrácenou bazickou částí N-konce se na F-aktin vázat nebudou.

N-koncový polybazický  $\alpha 0$  helix je struktura zodpovědná za možnost septinů vázat se na negativně nabitě fosfolipidy, které se vyskytují na membránách (Nakazawa et al., 2023; Zhang et al., 1999). Výskyt této interakce *in vivo* se předpokládá pouze u skupiny SEPT3. Polybazický  $\alpha 0$  helix je při vazbě GTP do G-domény SEPT9 orientován do prostoru, čímž může interagovat s membránou. Při vazbě GDP po hydrolýze GTP je vnořený do NC-rozhraní a stabilizovaný polykyselou oblastí G-domény (Castro et al., 2020; Valadares et al., 2017).

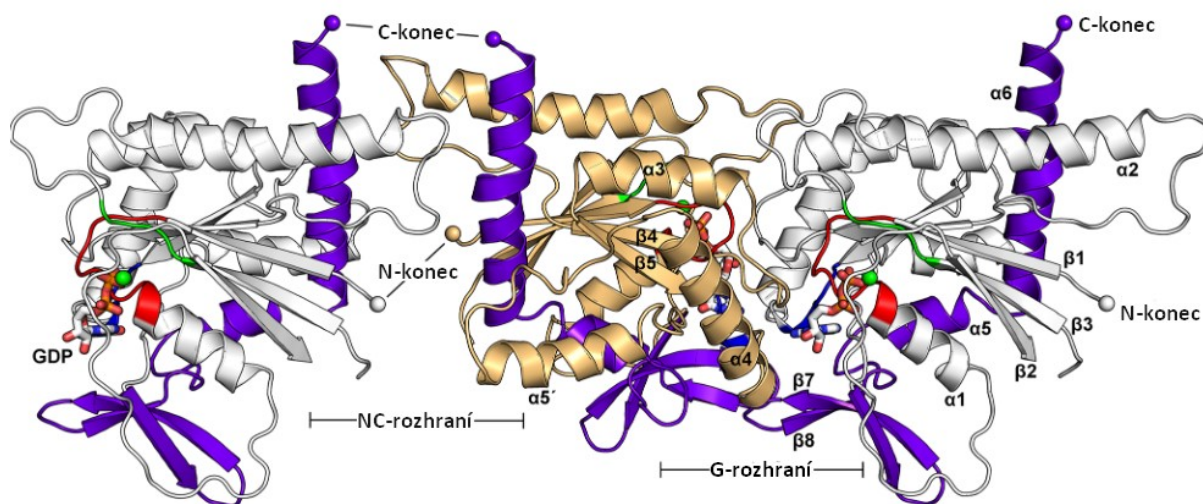
### 3.2. G-doména

Septiny patří do skupiny P-loop GTPáz, obsáhlé a různorodé skupiny proteinů schopných štěpit GTP (Bourne et al., 1991; Leipe et al., 2002). Ačkoli existuje mnoho variant G-domény, všechny obsahují centrální  $\beta$ -list složený z šesti antiparalelních vláken obklopený pěti  $\alpha$ -helixy (Valadares et al., 2017). GTPázy ve své G-doméně obsahují konzervované motivy G1-G5. Tyto motivy hrají roli při vazbě GTP a jeho hydrolýze na GDP, ale i při výměně GDP za GTP. Tyto motivy se však v GTPázách často nevyskytují všechny současně (Bourne et al., 1991). Jinak tomu není ani u septinů, které obsaují G-doménu pouze s G-motivy G1, G3 a G4. Mimo G-motivy se u G-domény septinů setkáme také

s dalšími oblastmi. Za zmínku stojí oblasti switch I, pro septiny unikátní element (SUE), motivy Sep1-4, polybazická a polykyselá doména (Auxier et al., 2019; Pan et al., 2007; Saraste et al., 1990). Jejich vlastnosti a funkce shrnuje Tab. 2. G-motivy a SUE septinů jsou znázorněny na Obr. 3.

oblast	alternativní název	funkce a vlastnosti
G1 motiv	P-loop, Walker A box	motiv: GxxxxGK(S/T) variabilní sekvence u mnoha GTP vazebných proteinů váže $\alpha$ - a $\beta$ -fosfát GTP stejná konformace při vazbě GTP i GDP.
G3 motiv	switch II	motiv: DxxG koordinuje hořčnatý kation koordinuje molekulu vody konzervován ve všech GTP vazebných proteinech mění konformaci při vazbě GTP
G4 motiv	Walker B motiv	motiv: AKAD stabilizuje vazebné místo pro GTP
switch I	-	nefunkční u skupiny SEPT6 koordinuje molekulu vody do pozice vhodné ke štěpení GTP
Sep1	S1 motiv	motiv: ExxxxR
Sep2	S2 motiv	motiv: DxR[VI]Hxxx[YF]F[IL]xP
Sep3	S3 motiv	motiv: GxxLxxxD
Sep4	S4 motiv	motiv: WG
SUE	septin unique element	důležitý pro tvorbu unikátní vazby přes NC-rozhraní umožňuje polymeraci septinů
polybazická	PB2	u skupiny SEPT3: interaguje s polykyselou oblastí G-domény druhého septinu během uzavřené konformace NC-rozhraní
polykyselá	-	u skupiny SEPT3: stabilizuje polybazický $\alpha$ -helix ( $\alpha 0$ ) během otevřené konformace NC-rozhraní interaguje s polybazickou oblastí G-domény druhého septinu během uzavřené konformace NC-rozhraní

**Tab. 2:** Přehled důležitých oblastí G-domény septinů (Bourne et al., 1991; Castro et al., 2020; Leipe et al., 2002; Pan et al., 2007; Sirajuddin et al., 2009; Valadares et al., 2017).



**Obr. 3:** Ukázka tří GTP vazebných domén a jejich vzájemného uspořádání. N- a C-konce zde pro přehlednost nejsou vyobrazeny. Znázorněna jsou pouze místa, kde by začínaly. Fialově je vyznačen SUE (septin unique element), který svým umístěním významně přispívá ke vzniku NC-rozhraní, méně pak k tvorbě G-rozhraní. Červeně, zeleně a modře jsou v tomto pořadí zvýrazněny G1, G3 a G4 motivy G-domény zodpovědné za selektivní rozpoznání GTP. Převzato a upraveno z (Valadares et al., 2017).

G-doména sama o sobě není schopna vázat GTP. K tomu potřebuje hořčnatý kation. Jeho role během vazby a hydrolýzy GTP však není dobře prozkoumána (Cavini et al., 2021; Huang et al., 2006; Macedo et al., 2013). Efektivita štěpení GTP je u různých septinů rozdílná. U zástupců všech čtyř skupin lidských septinů SEPT2, SEPT6, SEPT7 a SEPT9, byla zkoumána rychlost, s jakou hydrolyzují GTP na GDP. Zatímco SEPT6 a SEPT9 bylo možné získat jako monomery, SEPT2 a SEPT7 byly získány ve formě dimerů. Z toho důvodu byly navíc v testování použity mutované verze těchto septinů, které zůstávají v roztoku ve formě monomerů. Monomerní SEPT7(E184A) štěpil GTP nejrychleji. Dále následovaly SEPT9 a monomerní SEPT2(F156D). SEPT6 neprokázal žádnou GTPázovou aktivitu (Zent and Wittinghofer, 2014). S výjimkou SEPT6 štěpily septinové monomery GTP relativně podobnou rychlostí. Nemutované septiny SEPT2 a SEPT7, které se nacházely v roztoku v podobě dimerů, vykazovaly nejpomalejší štěpení GTP (Zent and Wittinghofer, 2014). Autoři na základě těchto měření a pozorování navrhuji, že k výměně GDP za GTP musí nejdřív dojít k rozpadu dimerů, nebo komplikovanějších struktur, což významně zpomaluje rychlost štěpení (Zent and Wittinghofer, 2014).

G-doména obsahuje mimo jiné oblast nazývanou switch I, která je jednou z nejvíce variabilních oblastí v G-doméně septinů (Rosa et al., 2020). V této oblasti chybí septinům ze skupiny SEPT6 konzervovaný threonin, který se jednak spoluúčastní s dalšími oblastmi na koordinaci hořčnatého kationtu, ale hlavně drží molekulu vody ve vhodné pozici pro štěpení GTP. Nepřítomnost GTPázové aktivity u skupiny SEPT6 by tak mohla být způsobena právě absencí tohoto threoninu (Sirajuddin et al., 2009; Valadares et al., 2017). Při bližším pohledu na switch I v samostatném septinu SEPT2

zjistíme, že je tato oblast nestrukturovaná, zatímco v SEPT6-SEPT2 heterodimeru je oblast switch I u SEPT2 zcela a u SEPT6 téměř zcela strukturovaná. Téměř identicky vypadala oblast switch I i při interakci SEPT2 s dalšími členy skupiny SEPT6, a to SEPT8 a SEPT11. Vzhledem k tomu, že bez správného vazebného partnera se switch I vyskytuje u SEPT2 a SEPT6 v nestrukturovaném stavu, mohla by oblast switch I hrát kritickou roli v hledání správného vazebného partnera. Naproti tomu interakce septinů SEPT7-SEPT3 je složitější. V SEPT7 je oblast switch I strukturovaná jak v heterodimeru s SEPT3(T282Y), tak i v samostatném SEPT7. Opačně je tomu u SEPT3(T282Y), kde je více možností, jak se může switch I uspořádat (Rosa et al., 2020).

Oblast switch II, nebo také G3, zatím nemá v septinech jasnou funkci (Rosa et al., 2020). Byla však pozorována konformační změna oblasti switch II při vazbě nehydrolyzovatelného analogu GTP, GMPPNP. Oblast switch II je při vazbě GTP strukturovaná a tvoří vodíkový můstek na  $\gamma$ -fosfát GTP. Při absenci tohoto fosfátu je konformace switch II volnější, i když stále strukturovaná. Ačkoli funkce oblasti switch II není známa, autoři předpokládají, že by mohla mít klíčovou roli v přenosu strukturní informace přes  $\alpha$ 2-helix. Hydrolyza GTP na G-rozhraní by se tak přes tento helix mohla projevit na NC-rozhraní (Castro et al., 2020).

G-doména septinů se od ostatních GTP vazebných proteinů odlišuje přítomností SUE, který je důležitý pro schopnost septinů tvořit filamenta. SUE díky svému umístění přispívá k tvorbě obou rozhraní, viz Obr. 3 (Valadares et al., 2017).

### 3.3. C-koncová doména

Septinové skupiny s výjimkou skupiny SEPT3 obsahují na C-konci coiled coil doménu (Pan et al., 2007). Tato doména je mezi septinovými skupinami značně proměnlivá. U septinů ze skupiny SEPT2 je krátká a tvoří ji zhruba 30 aminokyselin. Mnohem delší coiled coil doménu pak mají skupiny SEPT6 a SEPT7, u kterých dosahuje délky okolo 57 aminokyselin (Leonardo et al., 2021). Mezi coiled coil a G-doménou se s velkou pravděpodobností nachází ohebná oblast C-konce, o čemž svědčí obtíže, které se objevují při pokusech získat strukturu C-konců pomocí rentgenové krystalografie (Sirajuddin et al., 2007).

C-konec septinů může sloužit k vazbě dalších proteinů, jak ukázala interakce C-konce SEPT7 s molekulárním motorem CENP-E (Zhu et al., 2008). Toto pozorování se však zdá být ojedinělé a hlavní role C-konce septinů bude s nejvyšší pravděpodobností jiná.

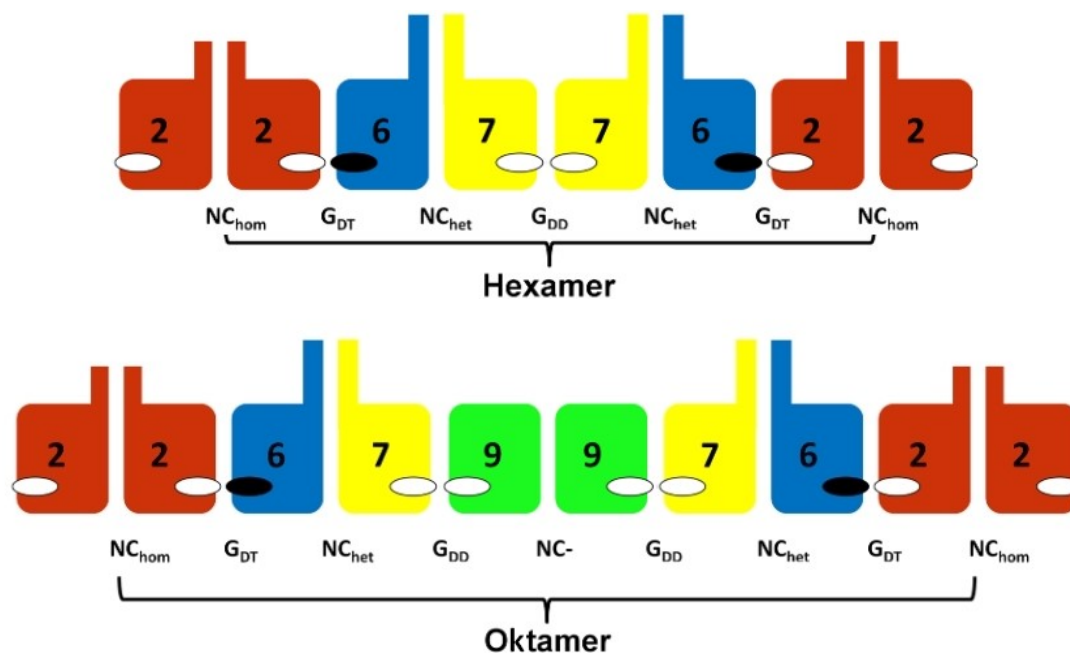
Zdá se, že coiled coil struktury septinů stabilizují NC-rozhraní při tvorbě filament a umožňují vznik struktur vyššího řádu (Leonardo et al., 2021). Sirajuddin et al. (2007), izolovali komplex skládající se ze septinů SEPT2, SEPT6 a SEPT7, které byly připraveny o svoji coiled coil doménu. Porovnáním takto izolovaných hexamerů a hexamerů izolovaných z nepozměněných septinů autoři nenalezli žádné významné rozdíly (Sirajuddin et al., 2007). Septiny jsou tak schopné tvořit heteromery i bez C-konců.

Naproti tomu Leonardo et al. (2021) pozorovali, že septiny SEPT6, SEPT7 a SEPT2 tvořily filamenta, ale při nahrazení SEPT2 jeho upravenou verzí bez C-konce k tvorbě filament nedošlo a septiny se poskládaly pouze do krátkých heteromerů. Autoři se domnívají, že C-konce a coiled coil struktury jsou důležité pro vznik a prodlužování septinových filament a jejich vzájemné interakce v strukturách vyššího řádu (Leonardo et al., 2021).

#### 4. Septinová filamenta

Septiny jsou jedny z mála GTP vazebných proteinů schopných tvořit filamenta. Ta lze pozorovat pod elektronovým mikroskopem, který odhalí 5 nm široké septinové struktury s délkou kolem 25 nm pro jeden hexamer (Mendonça et al., 2019) a 32 nm pro oktamer (Sirajuddin et al., 2007). Na rozdíl od mikrotubulů a mikrofilament se septinová filamenta obvykle skládají ze symetrických hexamerů nebo oktamerů a netvoří tedy odlišný plus a minus konec (Valadares et al., 2017). Všechny přirozeně se vyskytující heteromery se skládají ze sudého počtu podjednotek (Sellin et al., 2014). *In vitro* byla pozorována i filamenta tvořena náhodnou kombinací hexamerů a oktamerů (Soroor et al., 2021). Předchozí pozorování naznačují, že taková filamenta vznikají i *in vivo* a dále se mohou skládat do struktur vyššího řádu (Sellin et al., 2014). Při tvorbě hexameru jsou septiny uspořádány tak, že se dvojice SEPT7 nachází uprostřed, SEPT6 více ke kraji a SEPT2 zcela na kraji hexameru (Mendonça et al., 2019). Oktamery, obsahují navíc ještě dvojici septinů ze skupiny SEPT3 mezi SEPT7 původního hexameru, viz Obr. 4, Tab. 1 (Soroor et al., 2021). Existují však i výjimky z těchto uspořádání. Například SEPT1 na membráně Golgiho aparátu funguje nezávisle na ostatních septinech a tvoří v živých buňkách homooligomerní multimery sám se sebou (Song et al., 2019). Septiny spolu mohou interagovat přes G-domény s navázaným nukleotidem a tvořit G-rozhraní, nebo přes okrajové části G-domény, N-konce a C-konce za vzniku NC-rozhraní (Sirajuddin et al., 2007; Valadares et al., 2017). Dimerizace GTP vazebných proteinů přes G-domény není vzácná, ale sama o sobě neumožní polymeraci. Tvorba NC-rozhraní je pro septiny unikátní. Přítomnost obou rozhraní vede ke schopnosti septinů polymerovat (Valadares et al., 2017).





**Obr. 4:** Současná představa savčího septinového hexameru a oktameru. Bílé ovály představují navázanou molekulu GDP, černé GTP. SEPT2-SEPT2 interakce a SEPT6-SEPT7 interakce je zprostředkována NC-rozhraním, zatímco SEPT2-SEPT6 a SEPT7-SEPT7 interakce jsou tvořeny G-rozhraním. SEPT2 a SEPT7 ve filamentu váží GDP, SEPT6 GTP. G-rozhraní lze dále rozdělit na  $G_{DD}$ -a  $G_{DT}$ -rozhraní, kdy DD značí GDP-GDP a DT značí GDP-GTP nukleotidy v G-rozhraních. Podobně lze dále rozvést NC-rozhraní. Dle interakce C-konců rozlišujeme NC- (bez helixu),  $NC_{het}$  (s helixy mezi rozdílnými septiny) a  $NC_{hom}$  (s helixy mezi stejnými septiny). Převzato z (Valadares et al., 2017) a upraveno dle (Mendonça et al., 2019).

#### 4.1. Štěpení GTP

Ačkoli za fyziologických podmínek váží septiny GTP, zdá se, že pro tvorbu filament *in vitro* není nezbytný a septinová filamenta mohou vzniknout i s navázaným GDP. Experiment s cílem vytvořit filamenta čistě ze SEPT2 prokázal, že homooligomerní filamenta se tvoří nejen při vazbě SEPT2 s GTP, ale i s GDP. Taková filamenta se ovšem tvoří mnohonásobně delší dobu. U septinů s navázaným GTP se vytvořila filamenta do 30 minut, zatímco u septinů s navázaným GDP trvalo nahromadění detekovatelného množství filament 6 hodin (Huang et al., 2006). Funkce hydrolyzy GTP tak není zcela objasněna.

Castro et al. (2020) se podívali na strukturu septinů ze skupiny SEPT3 a zjistili, že se jejich NC-rozhraní vyskytuje ve více konformacích. Konkrétně se NC-rozhraní u septinů této skupiny mění z otevřené konformace, když septin váže GTP na uzavřenou při vazbě GDP. Autoři navrhli model, ve kterém představují možný vliv hydrolyzy GTP na interakci s cytoplazmatickou membránou prostřednictvím N-koncového polybazického  $\alpha 0$  helixu. Při navázaném GTP by tak měl být N-konec s  $\alpha 0$  helixem vytlačen do prostoru s možností interakce s cytoplazmatickou membránou. Po hydrolyze na GDP a změnou konformace z uzavřené na otevřenou, by se do otevřeného NC-rozhraní poskládal  $\alpha 0$  helix k polykyselé oblasti, čímž by se septin odpoutal od membrány. Mimo skupinu SEPT3 nebyla uzavřená konformace NC-rozhraní pozorována. Autoři se však domnívají, že se tímto modelem řídí

všechny septiny skupiny SEPT3, a že všechny zbylé skupiny septinů tvoří pouze otevřené konformace s  $\alpha 0$  helixem skrytým v NC-rozhraní (Castro et al., 2020).

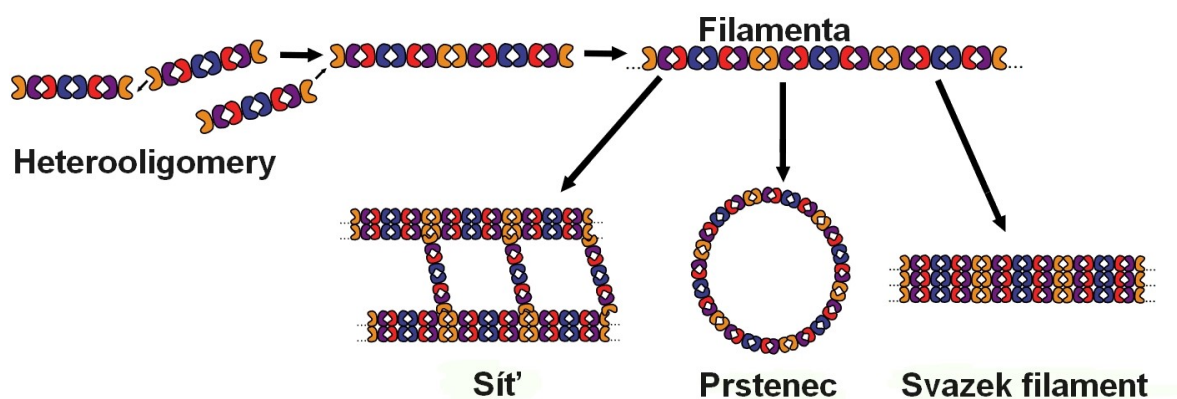
Nukleotid je v krystalických strukturách zcela pohřben v G-rozhraní vzniklém mezi septiny (Sirajuddin et al., 2009), zdá se, že aby mohlo dojít k výměně GDP za GTP, musí se septinové struktury nejdříve rozpadnout (Zent and Wittinghofer, 2014).

#### 4.2. Vazebná rozhraní

Mendonça et al. (2019) zjistili, že NC-rozhraní jsou v porovnání s G-rozhraním náchylnější k destabilizaci při zvýšení koncentrace solí v roztoku. Depolymerizace septinových filament na hexamery nebo oktamery je proto pravděpodobnější, když bude na jejich konci právě slabší NC-rozhraní, viz Obr. 4 (Mendonça et al., 2019). Bez obvyklých vazebných partnerů se septiny mohou vázat *in vitro* nekanonicky jeden s druhým, například může vzniknout SEPT2-SEPT2 homodimer přes G-rozhraní, který se v obvyklém hexameru nebo oktameru nevyskytuje (Valadares et al., 2017). Dochází k tomu nejspíše právě z důvodu větší stability G-rozhraní oproti NC-rozhraní (Mendonça et al., 2019).

#### 4.3. Struktury vyššího řádu

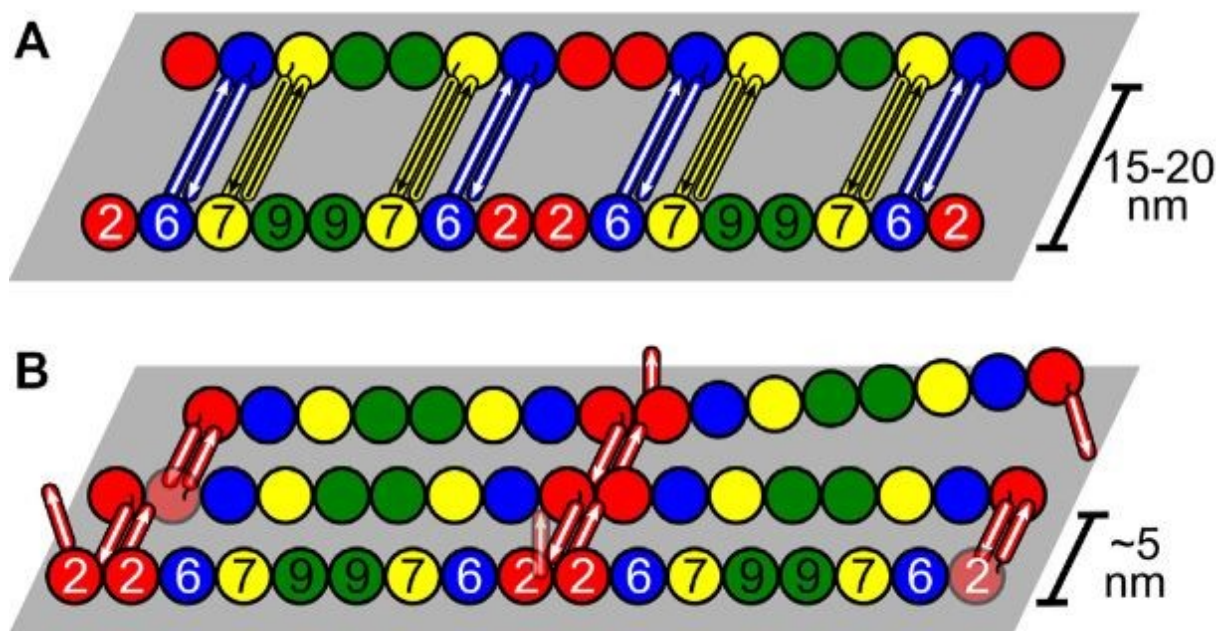
Septinová filamenta se dále mohou skládat do struktur vyššího řádu a tvořit různé svazky, sítě, nebo prstence, viz Obr. 5 (Hu et al., 2010; Huang et al., 2006; Nakazawa et al., 2023; Sellin et al., 2014; Sirianni et al., 2016; Spiliotis et al., 2005; Zhu et al., 2008).



**Obr. 5:** Znárodnění skladby septinových heterooligomerů do filament a struktur vyššího řádu. Jednoduché vyobrazení tří struktur vyššího řádu, mezi které lze zařadit septinové síť, prstence nebo svazky filament. Převzato a upraveno z (Fung et al., 2014).

Třebaže existuje množství pozorování septinů poskládaných do struktur vyššího řádu, není jisté jak spolu septiny v těchto strukturách interagují. Leonardo et al. (2021) navrhuji na základě *in vitro* pozorování roli C-koncových coiled coil domén v tvorbě struktur vyššího řádu. Dále představují model, kterým se snaží vysvětlit pozorování dvou odlišně velkých rozstupů mezi filamenti v strukturách vyššího řádu. V tomto modelu by coiled coil domény septinů z jednoho filamenta

interagovaly s coiled coil doménami septinů z druhého filamenta. Krátké rozestupy, odhadované na 5 nm, by tak byly tvořeny interakcemi mezi kratšími coiled coil doménami septinů ze skupiny SEPT2. Delší rozestupy, jejichž délku autoři odhadují mezi 15-20 nm, by byly utvářeny delšími coiled coil doménami septinů ze skupin SEPT6 a SEPT7, viz Obr. 6 (Leonardo et al., 2021).



**Obr. 6:** Navržený model antiparalelních interakcí coiled coil domén septinů mezi dvěma filameny. **(A)** Dlouhý rozestup tvořený interakcemi delších coiled coil domén SEPT6 a SEPT7. **(B)** Krátký rozestup tvořený interakcemi kratších coiled coil domén SEPT2 (Leonardo et al., 2021). Převzato z (Cavini et al., 2021).

Septinové složení ovlivňuje vlastnosti struktur vyššího řádu. Větší zastoupení oktamerů způsobené nadměrnou expresí krátké izoformy SEPT9, zvětší průměrnou velikost septinového prstence v buňce, zatímco nadměrná exprese SEPT3 nebo SEPT12 způsobí přeměnu hexamerů na tetramery, což má na velikost septinového prstence opačný efekt. Navíc přítomnost atypických heteromerů může snížit stabilitu struktur vyššího řádu (Sellin et al., 2014).

Septinové struktury vyššího řádu se vyskytují specificky u různých buněk a obecně i na různých místech v rámci jedné buňky. Následující příklady budou podrobně popsány v kapitolách 5. a 6. V savčích spermích se septiny nachází v prstencovité struktuře zvané anulus. Bez septinů tato struktura nevznikne a spermie jsou nepohyblivé (Ihara et al., 2005). Prstence a oblouky ze septinů byly často pozorovány v interakci s cytoplazmatickou membránou. Ať už se vyskytovaly u neuronů, kde ovlivňovaly strukturu dendritů a jejich výběžků (Tada et al., 2007; Xie et al., 2007), na bázi primární cilie u buněčné linie IMCD3 (Hu et al., 2010), u nepřilnutých T-lymfocytů a buněčné linii K562 (Sellin et al., 2011), nebo v lidských dermálních mikrovaskulárních endoteliálních buňkách (Kim and Cooper, 2018). Dále byly struktury vyššího řádu pozorovány mimo cytoplazmatickou membránu.

Například během buněčného dělení. Zde se septiny vyskytovaly v podobě sítě a tvořily proteinové lešení, které napomáhalo správnému seřazení chromosomů a následnému rozchodu chromosomů k pólům buňky (Spiliotis et al., 2005). V HeLa buňkách nakažených bakterií *Shigella flexneri* tvoří septiny klece z prstencovitých struktur, které bakterie obsatvějí a uvězní. Tyto prstencovité struktury interagují s vnější membránou mitochondrií (Sirianni et al., 2016).

Ztráta těchto struktur byla téměř vždy doprovázena změnou morfologie buněk. Dochází ke vzniku kratší primární cilie, k poškození buněčných spojů v epitelu, nebo k méně komplexnímu větvení dendritů a změnou morfologie dendritických trnů u neuronů (Hu et al., 2010; Kim and Cooper, 2018; Tada et al., 2007; Xie et al., 2007). Při dělení buněk vyústí ztráta struktur vyššího řádu v poruchy buněčného dělení (Spiliotis et al., 2005).

## 5. Vliv septinů na buněčné procesy

Uvnitř buněk probíhá nespočet komplexních procesů. Po narušení exprese septinů je možné pozorovat množství změn na buněčných strukturách. Navíc jsou často tyto změny takového rozsahu, že se projeví na vlastnostech i celkovém vzhledu buněk.

### 5.1. Cytoplazmatická membrána

Na cytoplazmatické membráně vzniká množství zakřivení a vypouklin obzvláště u specializovaných buněk jako jsou například neurony (Tada et al., 2007). U septinů byla zjištěna schopnost rozpoznávat a vázat se na tato zakřivení cytoplazmatické membrány. Septiny preferovaná délka zakřivené membrány je okolo jednoho mikrometru. Schopnost tvořit filamenta navíc septinům umožňuje pokrýt plochu o libovolném rozměru (Bridges et al., 2016). Na membráně dochází vlivem septinů k funkční kompartmentalizaci tvorbou difúzních bariér. Septiny tvoří difúzní bariéry pro membránové nebo k membráně vázané proteiny na specifických místech cytoplazmatické membrány, jako jsou báze cilií a dendritů (Ewers et al., 2014; Hu et al., 2010).

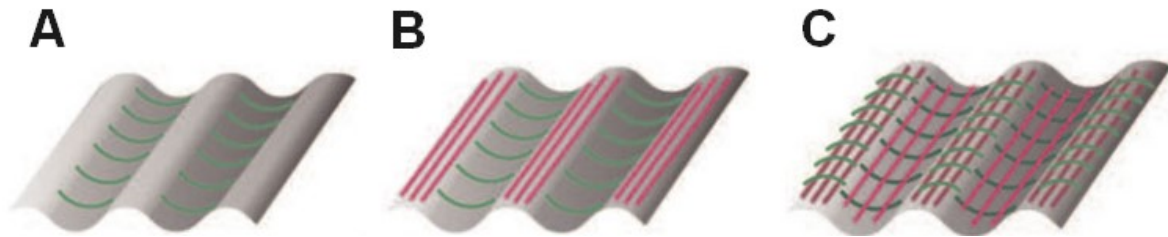
Při výzkumu vlivu septinů na vznik primární cilie a pohyblivost pro ni typických membránových proteinů. Bylo zjištěno, že se na vnitřní cytoplazmatické membráně cilie tyto proteiny volně pohybují až k bázi primární cilie, kde jim je zabráněno pokračovat dále do buňky. Báze primární cilie je zároveň místo, kde byl lokalizován SEPT2, který byl při některých pozorování součástí prstencovité struktury o průměru ~500 nm. Depletování SEPT2 v buňce způsobilo kompletní ztrátu primární cilie, zatímco pouze částečné depletování se projevilo vytvořením mnohem kratší primární cilie než v kontrolních buňkách. Zároveň u buněk s částečně depletovaným SEPT2 byla naměřena větší pohyblivost ciliárních membránových proteinů, což poukazuje na funkci septinů v tvorbě difúzních bariér na membráně (Hu et al., 2010).

Tvorba podobné septinové difúzní bariéry je předpokládána v potkaních hypokampálních neuronech. Pozorováním SEPT7 v těchto buňkách bylo odhaleno, že nemá rovnoměrné rozmístění. Často se nachází ve shlucích na bázích výběžků a v bodech větvení dendritů. Nadměrná exprese SEPT7, SEPT6 a SEPT2 zvýšila komplexitu dendritů a množství výběžků na nich. Nadměrně exprimovaný SEPT7 byl rovněž součástí dlouhých filament, která se vázala podél mikrotubulů. V neuronech s cílenou mutací SEPT7 vznikl SEPT7m, který přišel o svou GTPázovou aktivitu. Tento septin nejenže se neshlukoval na dříve zmíněných místech, ale ani nebyl součástí filament, což se projevilo menší komplexitou dendritického větvení. Deplecí septinů SEPT2, SEPT5, SEPT6 nebo SEPT7 došlo k silné redukci komplexity dendritů. Změny výběžků na dendritech se však lišily v závislosti na depletovaném septinu. Deplece SEPT2 nebo SEPT5 snížila množství dendritických trnů. Deplece SEPT6 se kromě sníženého množství dendritických trnů navíc projevila změnou jejich morfologie, kdy dendritické trny byly širší a protáhlejší. Naproti tomu neurony se sníženou hladinou SEPT7 měly normální množství dendritických trnů, ale na jejich dendritech se navíc vyskytovalo množství dlouhých výběžků (Tada et al., 2007; Xie et al., 2007).

Septiny připojují aktomyosinový cytoskelet k cytoplazmatické membráně buňky (Mostowy et al., 2011). Hagiwara et al. (2011) zjistili, že septinové heteromery jsou v kortexu myši buněčné linie N-18 stabilnější než běžná aktinová filamenta (Hagiwara et al., 2011). Navíc jsou septiny rekrutovány na dynamické nestabilní oblasti cytoplazmatické membrány, kde díky spolupráci s aktomyosinovým cytoskeletem pomáhají udržovat membránovou stabilitu zatahováním neplánovaně vzniklých výčnělků (Gilden et al., 2012). To dále potvrzuje pozorování pohybujících se T-lymfocytů s vyřazeným SEPT7, u kterých se často objevoval blebbing a jiné nadbytečné výčnělky na cytoplazmatické membráně. Kromě toho byla pohyblivost u těchto T-lymfocytů snížena (Tooley et al., 2009).

Velmi recentní článek zaměřený na *in vitro* vazbu lidských septinových oktamerů (SEPT2\_GFP-SEPT6-SEPT7-SEPT9\_i1-SEPT9\_i1-SEPT7-SEPT6-SEPT2\_GFP) na uměle vytvořenou lipidovou membránu přinesl nové informace ohledně skládání septinů na membránách a jejich preferencí. Septiny interagovaly pouze s membránami, v nichž se nacházely lipidy s negativním nábojem: fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát a dioleoylfosfatidylserin (Nakazawa et al., 2023). To souhlasilo s předchozím pozorováním (Castro et al., 2020; Zhang et al., 1999). Nakazawa et al. (2023) odhalili uspořádání septinů připomínající dvouvrstvou síť, kdy jedna vrstva septinových filament pravouhle křížovala druhou vrstvu. Tyto vrstvy byly od sebe vzdálené zhruba 12 nm a autoři se domnívají, že by spolu mohly interagovat flexibilními coiled coil strukturami septinů. Dále bylo pozorováno chování septinových oktamerů v koncentracích od 8 nM až po 87 nM na vyztužené vlnité membráně, viz Obr. 7. Autoři nikdy nepozorovali náznak vzniku třetí vrstvy septinových filament. Na rovné membráně měla septinová filamenta poměrně náhodnou orientaci. Jiný experiment, při kterém se s rostoucí koncentrací septinů objevovalo stále větší množství deformovaných liposomů, potvrdil,

že septiny mají schopnost deformovat jednovrstvené liposomy. Při vysokých koncentracích NaCl dochází k inhibici polymerace septinů do filament. Ve většině případů nebyly za těchto podmínek pozorovány žádné deformace liposomů, třebaže byly jejich membrány plně pokryté septiny. K deformaci liposomů je tak třeba určité množství septinů a jejich polymerace do filament (Nakazawa et al., 2023).



**Obr. 7:** Schéma znázorňující postupné obsazování vlnité membrány septinovými filenty *in vitro* v závislosti na koncentraci septinů. (A) septinová filamenta se při 9nM koncentraci septinů objevila v údolích membrány, kde byla orientována kolmo ke zvlnění membrány. (B) Při 26nM koncentraci septinů přibyla rovná filamenta na vrcholu membrány, která se vyskytovala podél zvlnění membrány. (C) Následně se septinová filamenta z údolí membrány prodloužila a kolmo překřížila filamenta z vrcholu membrány, čímž začala tvořit dříve zmíněnou dvouvrstvou síť pozorovanou při 87nM koncentraci septinů. Nakonec došlo k pokrytí celé plochy membrány dvouvrstvou sítí. Převzato a upraveno z (Nakazawa et al., 2023).

## 5.2. Golgiho aparát

Septiny lze rovněž najít na membránových organelách. Jedním takovým je SEPT1 vyskytující se na Golgiho aparátu (GA), konkrétně *cis*-Golgi cisterně. Song et al. (2019) pozorovali fragmentaci GA při depleci SEPT1, ale ne při depleci jiných septinů. Znovu-vnesením SEPT1 do buňky s depletovaným SEPT1 byli schopni fragmentaci GA zvrátit. Při dalším experimentu do buňky s depletovaným SEPT1 vnesli mutantní SEPT1 bez C- a N-konců, který fenotyp rozpadlého GA zvrátit nedokázal. Z toho autoři usoudili, že schopnost SEPT1 skládat se do filament je nutná k jeho správnému fungování na GA. Vzhledem k tomu, že Song et al. (2019) nepozorovali interakci SEPT1 s jinými septiny a deplece jiných septinů nezpůsobila fragmentaci GA, autoři věří, že SEPT1 tvoří v buňce homodimery a homomultimery sám o sobě, čímž se zcela vymyká běžnému uspořádání septinů do heterooligomerů, viz kapitola 4. Dále byla nalezena interakce SEPT1 s proteinem charakteristickým pro GA, golginem, GM130. GM130 zprostředkoval vazbu mezi SEPT1 a membránou GA. Nepřítomnost GM130 v buňce se projevila fragmentací GA, stejně jako když chyběl samotný SEPT1. SEPT1 také tvořil na GA proteinové lešení pro mikrotubuly organizující faktory, jako je  $\gamma$ -tubulin nebo CEP170. Ačkoli SEPT1 napomáhal nukleaci mikrotubulů, sám s nimi přímo neinteragoval. Právě kvůli funkci SEPT1 při nukleaci mikrotubulů na GA, vyústila jeho ztráta nebo ztráta jeho schopnosti tvořit filamenta v narušení množství anterográdně i retrográdně putujících váčků z GA a zapříčinila změnu tvaru v podobě fragmentace GA a roztáhnutí jednotlivých cisteren. Dopad těchto změn bylo možné pozorovat i na jednotlivých buňkách, kdy ty se sníženou hladinou SEPT1 měly pomalejší přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu a celkově se pomaleji dělily. To dle autorů nebylo

způsobeno defektem během mitózy nebo kontrolních bodů mezi fázemi buněčného cyklu, ale spíš zpomalením růstu buněk vlivem narušeného fungování GA (Song et al., 2019).

### 5.3. Lipidové kapénky

Lipidové kapénky jsou organely s jednou vrstvou fosfolipidů a slouží k ukládání tuků. Lipidové kapénky jsou také ovlivňovány septiny, což dokazuje vyřazení genu *SEPT2*, při kterém se sníží počet a rychlost formování vznikajících lipidových kapének (Chen et al., 2021). V jiné práci bylo prokázáno, že SEPT9 velmi ochotně a silně interaguje s fosfatidylinositol-5-fosfátem, který se ve stěně lipidových kapének nachází. Utlumení produkce fosfatidylinositol-5-fosfátu v buňce naruší běžné uspořádání SEPT9 a má dopad na lipidové kapénky, které se zmenší a zvýší svůj obsah diacylglycerolu (DAG) na úkor triacylglycerolu (TAG). Akil et al. (2016) zjistili, že vnesení SEPT9\_i1 do buněk Huh7R naopak změní poměr TAG a DAG v lipidových kapénkách ve prospěch TAG až trojnásobně. Tato pozorování autoři vysvětlují kolokalizací SEPT9\_i1 s diacylglycerol acyltransferázou 1, enzymem účastnícím se biosyntézy TAG. SEPT9 navíc podporuje hromadění i dalších enzymů pro syntézu lipidů k jádru buňky. Na základě těchto pozorování autoři navrhují roli SEPT9 v regulaci růstu lipidových kapének a biosyntézy lipidů (Akil et al., 2016).

### 5.4. Mitochondrie

Septiny mají vliv na morfologii mitochondrií. Deplece SEPT2 a SEPT7 v lidských buňkách HeLa a U2OS vyústila v protáhlejší mitochondrie. V případě SEPT2 depletovaných buněk byly mitochondrie delší až 1,8 násobně. Naopak nadměrná exprese SEPT2 neměla na délku mitochondrií žádný pozorovatelný vliv. Zajímavé je, že u SEPT2 depletovaných buněk, nadměrná exprese SEPT7 částečně zvrátila protažení mitochondrií způsobené deplecí SEPT2. Naproti tomu deplece SEPT9 neměla v této práci na protažení mitochondrií žádný významný vliv (Pagliuso et al., 2016). K odlišným výsledkům došli Sirianni et al. (2016) v jiné práci, kde deplece SEPT9 způsobila nezanedbatelné protažení mitochondrií (Sirianni et al., 2016). Obě práce přitom probíhaly na HeLa buňkách, které byly pozorovány 72 hodin po transfekování septinové siRNA.

Pagliuso et al. (2016) se rozhodli pokračovat v experimentu se SEPT2, jehož deplece vykazovala největší změny na mitochondriích. SEPT2 byl detekován až na 36 % zúžených míst na mitochondriích. Zatímco nebyl zjištěn žádný vliv SEPT2 na fúzi mitochondrií, jinak tomu bylo u mitochondriálního štěpení. Ukázalo se, že SEPT2 přímo interaguje s Drp1, proteinem podobným dynaminu, jehož funkcí je právě štěpení mitochondrií. Tato interakce byla nalezena jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Deplecí SEPT2, se snížilo množství Drp1 na mitochondriích i o více než 70 % v porovnání s kontrolními buňkami. Tato interakce překvapivě fungovala stejně i se SEPT2 mutovaným tak, aby nemohl štěpit GTP. Zároveň fungovala nezávisle na aktinu. Z toho vyplývá, že SEPT2 pomáhá lokalizovat Drp1 na mitochondrie, i když zatím neznámým způsobem (Pagliuso et al., 2016). Rovněž není známo, zda absence SEPT2 a prodloužení mitochondrií nějak ovlivňuje jejich funkci.

Ve spermích, vysoce specializovaných pohyblivých buňkách, byla pozorována důležitost septinů pro správnou organizaci mitochondrií. Za snížené hladiny SEPT12 měly mitochondrie v myších spermích menší plochu membrán a tím méně komplexní strukturu (Lin et al., 2009). Totéž bylo možné pozorovat u spermií s vyřazeným *Sept4*, ale v tomto případě se navíc lišila i velikost mitochondrií. To je nezvyklé, neboť běžně jsou mitochondrie ve spermích podobné velikosti. I takto pozměněné mitochondrie zůstaly metabolicky aktivní (Kissel et al., 2005). Ačkoliv se autoři touto otázkou nezabývali, dá se předpokládat, že kvůli zmenšené ploše mitochondriálních membrán bude snížena i funkčnost mitochondrií. Zajímavé je, že Kissel et al. (2005) nepozorovali tyto mitochondriální abnormality v srdečních a jaterních buňkách s vyřazeným *Sept4*. Autoři na základě těchto pozorování usuzují, že vliv SEPT4 na organizaci mitochondrií je tkáňově specifický (Kissel et al., 2005).

#### 5.4.1. Apoptóza

Mitochondriální izoforma SEPT4 nazvaná ARTS je protein související s apoptózou v signální dráze transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ), který se vyskytuje na vnějším mitochondriální membráně (Edison et al., 2012; Larisch et al., 2000). ARTS je během obvyklého fungování buňky na vnější mitochondriální membráně alespoň do jisté míry držen interakcí s apoptózou inhibujícím proteinem vnější mitochondriální membrány Bcl-2 (Edison et al., 2017, 2012). ARTS posiluje apoptotický vliv TGF- $\beta$  na buňky, jak je patrné ze zvýšení citlivosti buněk na TGF- $\beta$  při jeho nadměrné expresi. Naopak snížení hladiny ARTS v buňce vyústí ve snížení citlivosti buněk na TGF- $\beta$  (Larisch et al., 2000). Edison et al. (2017, 2012) popsali mechanismus působení ARTS v permeabilizaci vnější mitochondriální membrány během apoptózy. V tomto mechanismu navíc hrají roli: protein s ubiquitin ligázovou aktivitou XIAP a apoptózu inhibující protein Bcl-2. Po vystavení buněk staurosporinu, proapoptotickému stimulu, se ARTS a Bcl-2 spolu přesouvají z vnější mitochondriální membrány do cytoplazmy, kde ARTS slouží jako adaptor, díky kterému může nasednout protein XIAP s ubiquitin ligázovou aktivitou do těsné blízkosti proteinu Bcl-2 a ubiquitinovat ho. Protein Bcl-2 je tak odsouzen k degradaci v proteasomu. Předpokládá se, že následkem degradace Bcl-2 je snazší permeabilizovat vnější mitochondriální membránu a uvolnit proapoptotické faktory z mezimembránového prostoru mitochondrie, v důsledku čehož apoptóza touto drahou pokračuje (Edison et al., 2017, 2012).

ARTS není jediný septin působící během apoptózy. To dokládá porovnání množství apoptotizujících lidských buněk HeLa s depletovaným septinem SEPT7 a buněk s depletovaným septinem SEPT2 proti buňkám kontrolním. U všech buněk byla navozena mitochondriální apoptóza vystavením staurosporinu. Zatímco kontrolních buněk přežilo kolem 10 %, buňky s depletovaným SEPT7 i buňky s depletovaným SEPT2 na tom byly podstatně lépe a přežilo jich mírně nad 20 %. Van Ngo et al. (2022) zjistili, že tyto septiny hrají jinou roli během apoptózy než ARTS. Po spuštění apoptózy v buňkách s depletovaným SEPT7 bylo pozorováno snížené množství uvolňovaného cytochromu c z mitochondrie. Tyto septiny by tak mohly zatím neznámým mechanismem přispívat ke spuštění



apoptózy podporou uvolňování cytochromu c. Dále autoři na základě podobnosti výsledků získaných při depleci SEPT2 a SEPT7 usoudili, že tyto septiny na rozdíl od monomerního ARTS působí společně v heterooligomerech (Van Ngo et al., 2022).

### **5.5. Endoplazmatické retikulum**

Nezdá se, že by septiny měly vliv na morfologii endoplazmatického retikula, nepřímo však podporují interakci senzorického proteinu STIM1 lokalizovaného v membráně endoplazmatického retikula s  $\text{Ca}^{2+}$  kanály cytoplazmatické membrány, ORAI1, čímž hrají roli v  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci (Katz et al., 2019; Pagliuso et al., 2016; Subedi et al., 2017). Po výlevu  $\text{Ca}^{2+}$  z endoplazmatického retikula STIM1 rozpozná úbytek těchto iontů a přesouvá se do periferní oblasti endoplazmatického retikula. Zde se nachází v blízkosti cytoplazmatické membrány, ve které jsou  $\text{Ca}^{2+}$  kanály ORAI1. Senzorický protein STIM1 vytváří komplex s kanály ORAI1 a aktivuje je, čímž se spustí vtok vápníku z vnějšího prostředí do buňky (Subedi et al., 2017). Katz et al. (2019) sledovali vliv depletování SEPT4 a SEPT5 na interakci STIM1 a ORAI1 v HeLa buňkách a zjistili, že přítomnost septinů podporuje efektivní spojení STIM1 a ORAI1. Autoři došli k závěru, že se septiny podílí na tvorbě lokálních bariér na cytoplazmatické membráně. U těchto bariér autoři předpokládají, že by mohly znemožňovat  $\text{Ca}^{2+}$  kanálům ORAI1 odcestovat pryč z oblasti interakce. Navíc v buňkách s depletovanými septiny byla menší oblast interakce endoplazmatického retikula a cytoplazmatické membrány, na které mohly STIM1 a ORAI1 interagovat. Molekulární mechanismus tohoto působení septinů zatím nebyl objeven. Přesto lze s jistotou prohlásit, že přítomnost septinů ovlivňuje množství interakcí STIM1 a ORAI1, přičemž napomáhá i udržování interakcí endoplazmatického retikula s cytoplazmatickou membránou (Katz et al., 2019).

### **5.6. Cytoskelet**

Buněčný cytoskelet tvoří komplexní a dynamický systém různých filament s mnoha funkcemi v buňce. Cytoskelet udržuje velikost a tvar buněk. Dále spolu s molekulárními motory zprostředkovává vnitrobuněčný transport a umožňuje i buněčný pohyb.

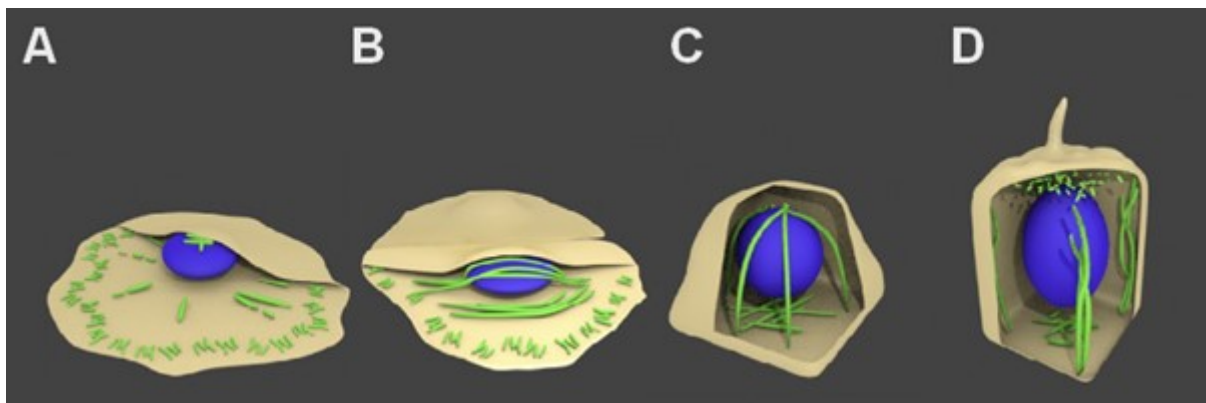
Cytoskelet se tradičně dělí na tři části: mikrotubuly, intermediální filamenta a mikrofilamenta. Na septiny začalo být díky jejich výskytu a vlastnostem nedávno nahlíženo jako na čtvrtou část cytoskeletu (Mostowy and Cossart, 2012). Septiny byly pozorovány v různých interakcích s mikrotubuly a mikrofilamenty, ale ne s intermediálními filamenty.

#### **5.6.1. Mikrotubuly**

Mikrotubuly (MT) patří mezi hlavní složky cytoskeletu. Jsou to dynamické struktury z tubulinových dimerů, které udržují tvar a velikost buňky. Dále slouží jako cesty pro molekulární motory ve váčkovém transportu a jsou nepostradatelné v buněčném dělení.

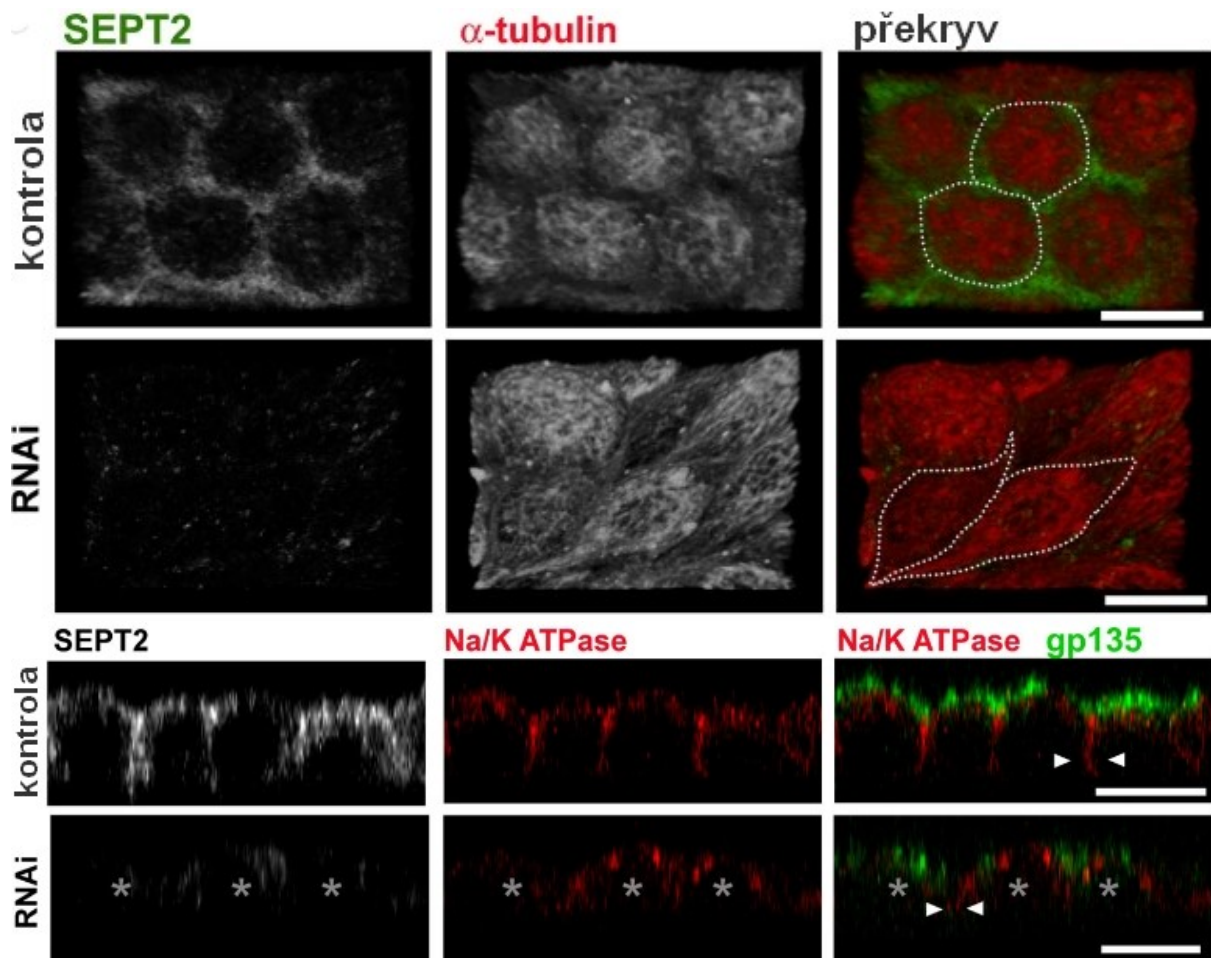
Septiny ovlivňují dynamiku MT. V jejich nepřítomnosti byly ve velmi zvýšené míře pozorovány rozpady MT (tzv. katastrofy) a zkrácená doba růstu MT (Bowen et al., 2011). V souladu s tímto pozorováním, jiná práce popisuje *in vitro* experiment, ve kterém měly fyziologické koncentrace SEPT9 mírný vliv na růst plus konce mikrotubulů. Se zvyšující se koncentrací SEPT9 se pauzy mezi růstem MT zkracovaly a množství katastrof snižovalo, dokud MT nedosáhly stálého a stabilního růstu. Na mínus konci MT nebyly pozorovány žádné signifikantní změny. Překvapivým zjištěním bylo, že přímým vlivem SEPT9 došlo k rekrutování volného tubulinu na povrch MT. Autoři předpokládají, že by rekrutování volného tubulinu na povrch MT mohlo zabraňovat katastrofám, a tím usnadňovat jeho růst (Nakos et al., 2019). Vzhledem k dříve popsáným případům, při kterých stejné septiny *in vitro* dimerizovaly (Valadares et al., 2017), se Nakos et al. (2019) rozhodli vytvořit mutovanou verzi SEPT9 neschopnou dimerizovat přes své G-domény. Vazba mutovaného SEPT9 na MT měla v porovnání s normálním SEPT9 malý vliv na dynamiku MT. Navíc rekrutování volného tubulinu na povrch MT bylo v tomto případě výrazně sníženo. Autoři se tak domnívají, že dimerizace SEPT9 přes G-domény by mohla být pro schopnost N-konce SEPT9 vázat se na MT a ovlivňovat jejich dynamiku nebo vázat a rekrutovat volný tubulin stěžejní (Nakos et al., 2019). Bohužel, mechanismus, který by tato pozorování vysvětlil, zatím nebyl nalezen.

Dále mají septiny vliv na směr růstu MT a jejich organizaci. Bowen et al. (2011) pozorovali u psi ledvinné buněčné linie MDCK, že septiny pomáhaly rostoucímu MT udržet směřování k periferii buňky. Autoři pozorovali septinová filamenta, podél kterých směřovaly MT. V blízkosti jádra se podél septinových filament tvořily trvale rostoucí svazky MT, do kterých často narážely individuální MT. Tyto individuální MT následně zatočily a začaly růst ve směru septinových filament. Na periferiích se vyskytovala pouze krátká septinová filamenta. Z trajektorií plus konců periferních MT se zdá, že i zde MT během svého růstu kolokalizovaly s těmito periferními septinovými filamenty. Autoři dále zjistili, že v MDCK buňkách dochází k zastavení, nebo zatočení MT po nárazu do jiného MT zhruba v 30 % případů nezávisle na přítomnosti septinů. V nepřítomnosti septinů však pozorovali větší tendenci septinů po nárazu zastavovat, než v kontrolních buňkách. Septiny v buněčné linii MDCK tak mají vliv na tvorbu svazků MT poblíž jádra. Dále ovlivňují organizaci periferních MT, kdy v MDCK buňkách bez SEPT2 se MT táhnou podél cytoplazmatické membrány, namísto toho, aby směřovaly kolmo na ni. Během polarizace MDCK buněk mění septiny své umístění, viz schéma na Obr. 8. Bowen et al. (2011) předpokládají, že septiny mohou navádět MT k apikální straně polarizujících buněk a pomáhat tak vytvoření MT sítě pozorované na apikální straně polarizovaných buněk. To dále podporuje skutečnost, že buňky bez SEPT2 měly snížený výskyt MT na apikální a zvýšený výskyt MT v bazální oblasti polarizovaných buněk (Bowen et al., 2011).



**Obr. 8:** Schéma organizace septinových filament v různých fázích polarizace buňky MDCK. Zeleně jsou znázorněna septinová filamenta a modře je vyobrazeno jádro. **(A)** Naivní nepolarizované buňky mají ve velké míře rozmístěné septiny kolem celé buněčné periferie. **(B)** V časně polarizujících buňkách septiny kolokalizují s MT svazky probíhajícími v blízkosti jádra. **(C)** Následně v pozdní fázi polarizace se septinová vlákna stahují k laterální membráně. **(D)** Nakonec v plně polarizovaných buňkách septiny kolokalizují s MT svazky směřujícími od bazální k apikální straně buňky podél laterální membrány. Převzato a upraveno z (Bowen et al., 2011).

Dále byl objeven vliv septinů na udržování některých post-translačních modifikací tubulinu (Froidevaux-Klipfel et al., 2015; Spiliotis et al., 2008). Konkrétně byla odhalena jejich role v udržování a prodlužování poly glutamátových (polyGlu) řetězců na C-konci tubulinu v MT. Septiny ovlivňují délku polyGlu řetězců rekrutováním enzymů prodlužujících a zkracujících polyGlu řetězce. Na jejich vznik *de novo* se ovšem nezdají mít vliv (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). Spiliotis et al. (2008) navrhuje, že by vazba SEPT2 na polyGlu MT mohla vytvářet podmínky pro rychlejší přepravu váčků tím, že zabrání navázání s mikrotubuly asociovaného proteinu (MAP) 4, který váčkový transport naopak brzdí. Navíc rovnováha mezi MAP4 a SEPT2 vázanými na polyGlu MT by mohla kontrolovat množství váčků transportovaných na cytoplazmatickou membránu. Snížením hladiny SEPT2 došlo v buňkách MDCK ke snížení a kompletní reorganizaci umístění apikálního komplexu gp135/podocalyxin a bazolaterální Na/K-ATPázy, viz Obr. 9. Tyto struktury se začaly častěji nacházet v cytoplasmě, což poukazuje na důležitost SEPT2 pro transport váčků s membránovými proteiny z Golgiho aparátu na cytoplazmatickou membránu (Spiliotis et al., 2008). V neposlední řadě bylo prokázáno, že septiny ovlivňují morfologii buňky. Od kontrolních buněk MDCK s morfologií typickou pro polarizované cylindrické buňky se buňky MDCK se sníženou hladinou SEPT2 zcela odlišují svým tvarem, viz Obr. 9. Změna tvaru je doprovázena ztrátou polyGlu mikrotubulů, které se běžně nacházejí spolu s SEPT2 vlákny souběžně s laterální membránou buňky (Spiliotis et al., 2008).



**Obr. 9:** Změny pozorované na buňkách MDCK po depleci SEPT2. Horní snímky ukazují dorzální pohled na rozdílnou morfologii normálně cylindrických polarizovaných kontrolních buněk a deformovaných buněk se sníženou hladinou SEPT2. Spodní snímky ukazují boční pohled na kontrolní buňky a jejich porovnání s buňkami se sníženou hladinou SEPT2. Zaměření je zde na rozdíly v umístění membránových markerů. Na/K ATPáza se za normálních okolností vyskytuje na bazolaterální části membrány, zatímco komplex gp135/podocalyxin se vyskytuje na apikální části membrány. U SEPT2 depletovaných buněk můžeme pozorovat změnu v umístění obou markerů. Hvězdičkami jsou označeny buňky s depletovaným SEPT2. Šipky míří na boční kontakty buněk. Převzato z (Spiliotis et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že váčkový transport je úzce spjatý s MT, nabízí se otázka, zdali je váčkový transport ovlivňován septiny přímo a pokud ano, tak do jaké míry. Karasmanis et al. (2018) se zaměřili na vliv SEPT9 na váčkový transport v potkaních hipokampálních neuronech. SEPT9 byl v těchto buňkách lokalizován především na dendritických MT. Překvapivě se zdá, že zde SEPT9 nemá klasické uspořádání, vzhledem k tomu, že vyřazení SEPT7, jeho běžného vazebného partnera, nemělo na expresi SEPT9 žádný vliv a naopak. Dále autoři provedli *in vitro* experiment, ve kterém pozorovali nasedání kinesinu-1/KIF5 na samotné stabilní MT a stabilní MT s pevně navázaným SEPT9. KIF5 nasedal na MT se SEPT9 méně často a po nasednutí se v porovnání s tím na samotných MT pohyboval pomaleji a častěji zastavoval. Pozorováním KIF5 v dendritech živých neuronů autoři došli k podobným výsledkům. Navíc nadměrná exprese SEPT9 v dendritech dále snížila pohyblivost KIF5, zatímco jeho deplece naopak pohyblivost KIF5 zvýšila. V kontrolních neuronech náklad tažený KIF5 doputoval do dendritu, kde se postupně zastavil a začal putovat zpět. V neuronech s depletovaným

SEPT9 lokalizoval KIF5 více do dendritů než v kontrolních neuronech. Také bylo v dendritech pozorováno větší množství nákladu taženého KIF5 oproti kontrolním buňkám (Karasmanis et al., 2018).

Dalším motor proteinem, na který se Karasmanis et al. (2018) zaměřili, byl kinesin-3/KIF1A. *In vitro* KIF1A reagoval na přítomnost SEPT9 na MT zcela opačně než KIF5. KIF1A nasedal na MT se SEPT9 častěji a putoval po nich rychleji. V neuronech s depletovaným SEPT9 se KIF1A shromažďoval v dendritech poblíž těla neuronu, nebo přímo v těle neuronu. V souladu s tímto pozorováním bylo možné sledovat úbytek fluorescenčně značeného nákladu KIF1A z krajních oblastí dendritů a nárůst fluorescenčního signálu v těle neuronu v porovnání s kontrolními buňkami. Dramatický rozdíl v chování obou kinesinů na přítomnost SEPT9 na MT autoři přisuzují krátké, na lysin bohaté sekvenci, která se nachází na KIF1A. Karasmanis et al. (2018) proto vytvořili chimérický KIF5, který obsahoval na lysin bohatou sekvenci z KIF1A. Tento chimérický KIF5 se v *in vitro* experimentech, které byly zmíněny výše, choval velmi podobně jako KIF1A, což poukazuje na důležitost této sekvence. Nakonec autoři otestovali vliv SEPT9 na pohyb dyneinů. Bylo zjištěno, že ačkoli pohyblivost dyneinů *in vitro* byla na MT se SEPT9 snížena, v živých buňkách měla přítomnost SEPT9 na pohyblivost dyneinů pouze malý vliv. Na základě těchto pozorování autoři představují přímý vliv SEPT9 na organizaci váčkového transportu v neuronech. SEPT9 tak podle přítomnosti na lysin bohaté domény usnadňuje vstup kinesinu-3/KIF1A a naopak zamezuje vstup kinesinu-1/KIF5 do dendritů neuronu (Karasmanis et al., 2018).

Jiné, ale neméně zajímavé výsledky přinesla práce Bai et al. (2016). Autoři rovněž pozorovali vliv septinů v potkaních hipokampálních neuronech, tentokrát ale v souvislosti s kinesinem-2/KIF17. Motorová doména KIF17 se nachází na N-konci a místo pro vazbu nákladu na C-konci. Bai et al. (2016) testovali možnost interakce septinů SEPT2, 6, 7 a 9 s KIF17. Ze zmíněných septinů interagoval KIF17 jedině se SEPT9, a to přímo přes svůj C-konec. Vazba SEPT9 neovlivnila pohyb ani rychlost pohybu KIF17. Autoři však pozorovali vliv SEPT9 na transport dvou různých proteinů zprostředkovaný KIF17. Zatímco transport jednoho proteinu probíhal normálně, transport druhého proteinu byl snížen v porovnání s kontrolními buňkami. To je pravděpodobně způsobeno tím, že váčky s druhým proteinem jsou ke KIF17 navázané přes komplex, který kompetuje o vazbu na KIF17 se SEPT9. Na základě těchto pozorování autoři předpokládají, že SEPT9 může ovlivňovat vazbu nákladu, nebo jeho selekci. Alternativně může vazba SEPT9 spouštět uvolňování nákladu z KIF17 (Bai et al., 2016).

### **5.6.2. Mikrofilamenta**

Mikrofilamenta jsou vysoce dynamická vlákna složená z aktinu. Jsou klíčová pro pohyb, dělení a přichycení buněk k podkladům. U přisedlých i migrujících buněk tvoří svazky mikrofilament stresová vlákna.

Narušení exprese kteréhokoli septinu z kanonického hexameru má za následek rozpad stresových vláken a dobře pozorovatelnou změnu v uspořádání aktinového cytoskeletu i celkového vzhledu buněk. Zatímco kontrolní buňky jsou protáhlé a polarizované s dobře viditelnými stresovými vlákny, buňky s depletovanými septiny mají mnohem kulatější tvar s drobnými neuspořádanými aktinovými vlákny. Zajímavé je, že buňky opůsobené siRNA pro libovolný septin kanonického hexameru se mnohem rychleji rozprostřely po ploše imitující extracelulární matrix v porovnání s buňkami kontrolními (Kremer et al., 2007).

Dosud jediný savčí septin, u kterého je známo, že může interagovat s aktinovými filamenty přímo je SEPT9. Ten se váže přes svou polybazickou část N-konce na F-aktin, a to třemi různými způsoby. V prvním typu vazby nasedá SEPT9 na aminokyselinové zbytky F-aktinu 80-101, 125-130 a 357-360, ve druhém na 1-7, 21-30, 56-60 a 92-103 a ve třetím na 223-238 a 248-251. Všechny tři typy vazeb se vyskytují zhruba se stejnou frekvencí. Zároveň se zdá, že SEPT9 nasedá na aktin vždy jen na jedno vazebné místo. To by mohlo být vysvětleno pozorováním, kdy 1. a 2. typ vazby sdílí některé aminokyselinové zbytky a pro současný 2. a 3. typ vazby není dostatek prostoru. Autoři předpokládají, že se první nasedající SEPT9 naváže na F-aktin kterýmkoli ze tří typů, čímž určí tento typ nasedání pro sousední SEPT9, které nasedají na vedlejší aktinové podjednotky. SEPT9 za přítomnosti ATP soupeří s myosiny o stejná vazebná místa na F-aktinu během 1. a 2. typu vazby, čímž inhibuje aktomyosinovou aktivitu. Obdobně, přítomnost SEPT9 na F-aktinu brání nasednutí kofilinu, proteinu destabilizujícího aktinová filamenta. SEPT9 tak chrání aktinová filamenta proti depolymerizaci kofilinem. Na základě těchto pozorování autoři předpokládají roli SEPT9 v regulaci organizace a funkce F-aktinu (Smith et al., 2015).

Aktinová stresová vlákna jsou spojena s maturací fokálních adhezí, se kterými jsou v kontaktu (Oakes et al., 2012). Rozsáhlá septinová síť tvořena filamenty složených ze septinů SEPT2, 6, 7 a 9 byla pozorována na radiálních i příčných stresových vláknech u MDCK buněk vystavených růstovému faktoru hepatocytů (HGF). Takto ovlivněné buňky vykazovaly částečnou epitelo-mezenchymální tranzici. Autoři zjistili, že se SEPT9 v MDCK buňkách aktivovaných HGF vyskytoval ve větším množství a měl schopnost přímo propojovat aktinová vlákna. Navíc, po vyřazení SEPT2, nebo SEPT9 obsahovala aktinová síť snížené množství F-aktinu. Příčná stresová vlákna chyběla a radiální stresová vlákna byla kratší, řidší a nestabilnější. Vyřazení výše uvedených septinů následně negativně ovlivnilo velikost a dobu života fokálních adhezí buněk. Třebaže rychlost skládání nebo rozebírání fokálních adhezí zůstala stejná, jejich velikost byla snížena a doba života zkrácena. Zároveň došlo k jejich posunu směrem k okraji buněk. Na základě těchto pozorování přisuzují Dolat et al. (2014) roli septinů v organizaci sítě aktinových stresových vláken a tím i nepřímo roli v stabilizaci a maturaci fokálních adhezí (Dolat et al., 2014).

Vaskulární endoteliální kadherin (VE-kadherin) se v lidských dermálních mikrovaskulárních endoteliálních buňkách (HDMVEC) vyskytuje po celé ploše cytoplazmatické membrány s největší koncentrací v místech adhezivních spojů (Kim and Cooper, 2021, 2018). Tyto buňky tvoří jednovrstevný epitel a jsou vhodné na pozorování buněčných interakcí. Septiny SEPT2/7/9 byly nalezeny poblíž buněčných spojů obsahujících velké množství VE-kadherinu. Kim and Cooper (2018) nenalezli v těchto místech žádného zástupce skupiny SEPT6. Zatím není jisté, zda jde o technickou chybu, nebo nekanonické uspořádání septinů v těchto buňkách. Navíc, pozorovaný SEPT2 nebyl v přesném překryvu s VE-kadherinem. SEPT2 se koncentroval na pozitivně zakřivenou cytoplazmatickou membránu v oblastech buněčných spojů, kde byl součástí polokruhovitých struktur. To je přesně opačné chování septinů, než jaké pozorovali Nakazawa et al. (2023) v *in vitro* studii zaměřené na vazebné preference septinů, viz 5.1. Je možné, že je zde důležitější faktor, než preference zakřivení membrány, který určuje, kam se septiny navážou. Mimo membránových výstupků a zakřivení nebyl SEPT2 na cytoplazmatické membráně koncentrovaný a objevoval se v lineárním uspořádání. Autoři depletovali SEPT2 v HDMVEC, což vedlo ke ztrátě soudružnosti buněčných spojů a ke vzniku mezer mezi buňkami. Zatímco v kontrolních buňkách aktinové svazky interagovaly s VE-kadherinem, v buňkách s depletovaným SEPT2 došlo k úbytku aktinových svazků z buněčných spojů a k přemístění vláken F-aktinu do cytoplazmy. Dále se deplece SEPT2 projevila zvýšením exprese VE-kadherinu a změnou jeho uspořádání na membráně. SEPT2 je tak důležitým účastníkem regulace organizace a množství VE-kadherinu na endoteliálních buněčných spojích (Kim and Cooper, 2018).

### 5.6.3. Jaderné a buněčné dělení

Dělení je jeden z nejsložitějších a nejdůležitějších buněčných procesů a je k němu potřebná dlouhá příprava s přísnou regulací. Cytoskelet je pro dělení buněk zcela nepostradatelný, jelikož zajišťuje vnitřní pohyby v buňce. Vliv septinů byl pozorován jak na průběh jaderného, tak i buněčného dělení.

Během metafáze mají buňky HeLa a MDCK lokalizovány septiny SEPT2, SEPT6 a SEPT7 u dělicího vřeténka. Během metafáze jsou septiny přítomny v krátkých vzájemně protkaných filamentech blízko kinetochorů a kinetochorových mikrotubulů (Spiliotis et al., 2005; Zhu et al., 2008). Zhu et al. (2008) zjistili, že se SEPT7 přímo váže na CENP-E, molekulární motor zodpovědný za stabilní vazbu mikrotubulů dělicího vřeténka ke kinetochorům (Zhu et al., 2008). Bylo prokázáno, že deplece těchto septinů způsobí chybné seřazení chromosomů v ekvatoriální rovině. Rozchod chromosomů tak neproběhne správně, následkem čehož neproběhne správně ani buněčné dělení. To má za následek častý vznik dvoujaderných buněk (Spiliotis et al., 2005; Zhu et al., 2008).

Zdá se, že septiny tvoří lešení pro myosinové kinázy. Navíc interakce SEPT2 s myosinem IIA, nesvalovým molekulárním motorem, je nutná k dokončení buněčného dělení. Overexpresí samotné části coiled coil domény myosinu II byla v buňkách CHO-K1 narušena interakce

SEPT2 s myosinem IIA. U takových buněk vznikla normální dělicí rýha a následně i mezibuněčný most se strukturou zvanou midbody. K dokončení dělení však nedošlo. Namísto toho nastalo rozvolnění mezibuněčného mostu, regrese dělicí rýhy a vznik dvoujaderných buněk (Joo et al., 2007). K podobným výsledkům došli Zhang et al. (2016), kteří pozorovali SEPT2 a SEPT7 v aktomyosinovém prstenci v nádorových buňkách. Deplece septinů zde také způsobila problémy s dělením a vznik mnohjaderných buněk (Zhang et al., 2016).

Septiny mají během buněčného dělení i další úlohu. V buňkách MDCK se během uzavírání dělicí rýhy do vznikajícího midbody hromadí septiny a vytváří zde strukturu podobnou přesýpacím hodinám. Po uzavření dělicí rýhy se septiny v midbody reorganizují do dvou prstencovitých struktur asociovaných s cytoplazmatickou membránou. Karasmanis et al. (2019) odhalili, že septinové prstence obsahují septiny SEPT2, 6, 7 a 9 a jsou nutné pro správné fungování endocytárního třídícího komplexu potřebného pro transport (ESCRT), konkrétně jeho dílčí části ESCRT-III, která za normálních okolností pomáhá se zaškrcením membrány a oddělením dceřiných buněk. Septinové prstence jsou v kontrolních buňkách pomalu nahrazovány proteiny ESCRT-III. Jejich ztráta naruší organizaci ESCRT-III, a tím i buněčné dělení. Buňky MDCK s depletovaným SEPT9 tak potřebují na rozdělení mnohem více času, nebo se nejsou schopné rozdělit vůbec (Karasmanis et al., 2019). Septiny se tak zdají být podstatné pro oddělení dceřiných buněk ve finálních krocích buněčného dělení.

## 6. Septiny a nemoci

Vzhledem k rozmanitosti buněčných procesů ovlivňovaných septiny, není překvapivé, že změny v jejich expresi mohou vést k různým poruchám a nemocem.

### 6.1. Samčí sterilita

Bylo prokázáno, že přítomnost septinů je nutná pro správný vývoj a funkci savčích spermií.

Myši s mutací genu *Sept4* byly zdravé a až na samce, kteří se ukázali být sterilní, bez vývojových vad. Samčí spermie nesly nepoškozenou genetickou informaci, ale byly nepohyblivé. SEPT4 v normálních spermích kolokalizoval se SEPT1, SEPT6 a SEPT7 v prstencovité struktuře pod cytoplazmatickou membránou zvané anulus. Tato struktura odděluje střední oddíl a bičík spermie. Anulus nebyl u spermí s vyřazeným *Sept4* nalezen a septiny SEPT1, SEPT6 a SEPT7 byly delokalizovány. Tyto septiny tak tvoří důležitou část anulu a struktura bez nich nemůže vzniknout. Namísto anulu Ihara et al. (2005) pozorovali ve stejném místě zúženou oblast, po které následoval často ohnutý, nebo zlomený bičík. Překvapivě, nematurované spermie s vyřazeným *Sept4* neměly bičík ohnutý ani zlomený. Autoři tak předpokládají, že k poškození bičíku dochází až při pohybu spermí s vyřazeným *Sept4* po jejich maturaci vlivem absence anulu. Dalším zajímavým odhalením bylo, že se v defektních spermích nacházelo větší množství ATP oproti normálním spermím. Z toho autoři usoudili, že defektní spermie mohou generovat ATP, ale nedokáží ho plně využít, přestože mají funkční



molekulární motory. Zároveň na základě pozorování buněčného transportu uvnitř bičíku navrhuji vysvětlení, ve kterém je tento transport v nepřítomnosti SEPT4 narušený. V dříve zmíněné zúžené oblasti se ve spermích bez SEPT4 hromadily kinesiny, které nebyly schopné projít dále do bičíku. To dle autorů vedlo ke špatné organizaci mikrotubulů nebo snížené aktivitě dyneinů v bičíku a tím i k menší spotřebě ATP a následné nepohyblivosti. V neposlední řadě autoři pomocí protilátek úspěšně ověřili přítomnost septinů v anulu člověka. Zajímavé je, že z 22 vzorků lidských neplodných spermií, ke kterým měli autoři přístup, se ve třech nenacházel anulus (Ihara et al., 2005). V jiné práci, Vickram et al. (2021) rovněž pozorovali, že lidské spermie s nižší pohyblivostí mají méně, nebo žádný SEPT4 a poukázali na možné využití SEPT4 jako biomarkeru pro diagnostiku samčí neplodnosti.

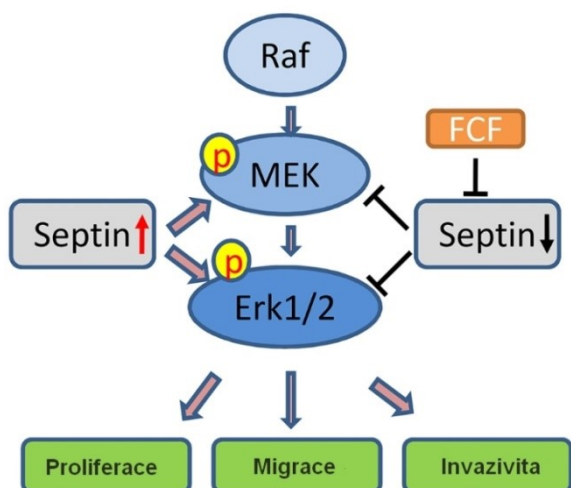
Existuje však mnohem zajímavější septin v souvislosti se samčí sterilitou, a to sice tkáňově specifický SEPT12. U myši i člověka byla exprese genu *Sept12* nalezena téměř výhradně ve varlatech. Jedinými dalšími strukturami, kde se exprese tohoto septinu v mnohem menší míře objevila, byly myší vaječníky. SEPT12 během diferenciaci mužských zárodečných buněk několikrát změnil lokalizaci a strukturu, na jejichž vzniku se podílí. Lin et al. (2009) předpokládají jeho roli ve formování hlavičky, krčku, spojovacího oddílu i bičíku. V lidských spermích se SEPT12 nachází v anulu, krčku spermie a na mitochondriích. Spermie se sníženou expresí SEPT12 jsou spojené s morfologickými defekty. Autoři za účelem studia funkce SEPT12 během spermiogeneze vytvořili *Sept12<sup>+/-</sup>* myší chiméry s různým poměrem zdravých a mutantních alel genu *Sept12*. Ačkoli všechny myši vypadaly normálně, z 28 samců bylo 21 neplodných. Váha varlat, počet a pohyblivost spermií byli v porovnání s kontrolními myšmi nižší. Navíc u nejvíce postižených myší byly spermie získané z kaudy nadvarlete nematurované a jejich počet velmi nízký. Žádné maturované spermie nebyly nalezeny ani ve vzorku z chámovodu. Akrosom se buď nevytvořil vůbec, nebo byl poničený. Podobně bylo možné pozorovat anomálie bičíku. Rovněž zcela chyběl, nebo byl deformovaný. Různé vývojové vady spermií se projevíly i na úrovni organel, kdy spermie myších chimér měly atypický tvar jádra a zvláštní organizaci mitochondrií. Lin et al. (2009) pozorovali, že ztráta jedné kopie *Sept12* je dostatečná pro vznik defektů myších spermií. Na základě těchto zjištění autoři zmiňují, že by tkáňově specifický SEPT12 mohl být ideálním cílem pro vývoj mužské antikoncepce (Lin et al., 2009).

U chimérických myší *Sept12<sup>+/-</sup>* Lin et al. (2011) detekovali větší množství poškozené DNA v porovnání s kontrolními myšmi. Z 51 myších vajíček uměle oplozených spermii chimérických myší se dostalo pouhých 7 do stádia blastocysty. Navíc, žádné z embryí neobsahovalo mutovanou alelu *Sept12*. Autoři předpokládají, že embrya s nedostatkem SEPT12 se nedokázala vyvinout dále než do stádia moruly. Pozorováním lokalizace SEPT12 během lidské spermiogeneze bylo odhaleno, že se v jednu chvíli SEPT12 vyskytuje na okraji jádra. Autoři předpokládají, že by zde mohl SEPT12 hrát roli během kondenzace DNA (Lin et al., 2011). Tento předpoklad je však pouhou spekulací a bude třeba se na něj zaměřit v dalším výzkumu.

## 6.2. Nádorová onemocnění

Byl prokázán vliv septinů na schopnost pohybu nádorových buněk. Septiny SEPT2 a SEPT7 byly v invazivní buněčné linii rakoviny prsu MDA-MB-231 v signifikantně vyšším zastoupení než ve zdravé prsní buněčné linii MCF10A. Během telofáze spolu tyto septiny kolokalizovaly na kontraktilním aktomyosinovém prstenci. Na druhou stranu, v průběhu interfáze SEPT2 kolokalizoval se SEPT7 ve filamentech v blízkosti jádra a také byl detekován v cytoplazmě (Zhang et al., 2016).

Po zjištění lokalizace septinů, Zhang et al. (2016) depletovali SEPT2 a SEPT7 v buněčných liniích MDA-MB-231 a MCF7. Alternativně autoři septiny pouze inhibovali pomocí forchlorfenuronu (FCF) (Zhang et al., 2016), specifického a reverzibilního inhibitoru septinů, který zvyšuje jejich stabilitu a podporuje vznik mohutných septinových svazků (Hu et al., 2008). Zhang et al. (2016) si pro pozorování a porovnávání schopnosti migrace vytvořili vlastní kultivační test v podobě 3D kolagenové matrix. Buňky s depletovaným SEPT7 i buňky s depletovaným SEPT2 měly větší povrch a vlivem problémů s cytokinezi nashromáždily velké množství jader, ačkoli v případě deplece SEPT2 byl tento fenotyp méně výrazný. Navíc deplece těchto septinů v obou případech významně snížila schopnost buněk migrovat. Naopak při nadměrné expresi kteréhokoli ze zmíněných septinů se podstatně zvýšila pohyblivost buněk a jejich schopnost invadovat do kolagenové matrix (Zhang et al., 2016). Podobný efekt septinů pozorovali Dolat et al. (2014), kteří se zaměřili na roli SEPT9 v pohyblivosti nádorových buněk 786-O. Zatímco nadměrná exprese SEPT9 pohyblivost těchto buněk zvýšila, jeho deplece naopak schopnost buněk migrovat snížila (Dolat et al., 2014). Zhang et al. (2016) na základě experimentů navrhli mechanismus, na kterém ukazují důležitost septinů v regulaci proliferace, migrace a invazivity buněčné linie rakoviny prsu MDA-MB-231, viz Obr. 10. V navrženém mechanismu septiny ovlivňují proliferaci, migraci a invazivitu nádorových buněk regulací aktivity kináz MEK a ERK1/2. Autoři zároveň poukazují na možné využití septinů při léčbě rakoviny (Zhang et al., 2016).



**Obr. 10:** Mechanismus funkce septinů v regulaci proliferace, migrace a invazivity buněčné linie rakoviny prsu MDA-MB-231. Inhibice septinů pomocí FCF, nebo deplece SEPT2 a SEPT7 utlumí aktivaci kináz MEK a ERK1/2. Naopak vysoká hladina septinů by posílila aktivitu kináz MEK a ERK1/2, čímž by podpořila proliferaci migraci a invazivitu těchto buněk. Převzato z (Zhang et al., 2016).

Paklitaxel, také známý jako taxol, je látka stabilizující mikrotubuly využívaná při chemoterapii k léčbě rakoviny (Cardoso et al., 2010; Hsiao et al., 2009; Jordan et al., 1996, 1993; Schiff et al., 1979). Velkým problémem je vznik rezistence proti taxolu u některých nádorových buněčných linií, a to i u pacientů, na které zprvu léčba působila (Orr et al., 2003). K získání této rezistence je nutná přítomnost mnoha proteinů, mezi nimiž jsou zahrnuty i septiny (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). Zároveň k navození rezistence došlo až po vystavení buněk účinkům taxolu (Froidevaux-Klipfel et al., 2011; Targa et al., 2019). V taxol rezistentních (Tr) lidských nádorových prsních buňkách MDA-MB-231 byla detekována zvýšená míra exprese SEPT2, 8, 9 a 11. Navíc byla pozorována i jiná lokalizace těchto septinů, než v taxol senzitivní linii stejných buněk (Ts). Zatímco v Ts buňkách byly septiny umístěny na kortikálním aktinu, v Tr buňkách byly ve zvýšené míře rekrutovány na mikrotubuly (Froidevaux-Klipfel et al., 2015, 2011). Další odlišností mezi Ts a Tr buňkami byl rozdílný poměr izoform SEPT9. Isoforma s nejdelším N-koncem, SEPT9\_i1, byla ve velkém množství pozorována v Tr buňkách, oproti tomu v Ts buňkách převládala menší SEPT9\_i3. Pro dosažení inhibiční koncentrace v Tr buňkách bylo třeba použít až třináctkrát více taxolu, než u kontrolních Ts buněk. Pod vlivem 25nM koncentrace taxolu měly navíc Tr buňky v porovnání s Ts buňkami dynamičtější změny v mikrotubulech (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). Mechanismu rezistence vůči taxolu se věnuje následující odstavec.

K navození rezistence je nutné vysoké množství tyrosinovaného tubulinu, o čemž svědčí pozorování Tr buněk, u kterých byla po inhibici enzymu zodpovědného za retyrosinaci tubulinu obnovena senzitivita k taxolu. Navíc, rekrutování septinů na mikrotubuly je závislé na množství této posttranslační modifikace. Deplece SEPT2, 9 nebo 11 v Tr buňkách rovněž snížilo jejich rezistenci k taxolu zpět na úroveň Ts buněk. Froidevaux-Klipfel et al. (2015) zjistili, že septiny přisedlé na

mikrotubulech tvoří lešení pro enzymy prodlužující a zkracující glutamátové řetězce, o čemž vypovídalo nízké množství těchto enzymů rekrutovaných na mikrotubuly během částečné deplece SEPT2 a naopak jejich rekrutování ve vyšší míře během nadměrné exprese SEPT2, jak již bylo zmíněno dříve v kapitole o mikrotubulech, viz 5.6.1. Ve stejné kapitole bylo také zmíněno, že septiny ovlivňují délku polyGlu řetězců, ale nemají vliv na jejich vznik. V Tr buňkách tak septiny udržují mikrotubuly s dlouhými polyGlu řetězci. Dále mikrotubuly s dlouhými polyGlu řetězci a septiny stimulovaly vazbu proteinů regulujících dynamiku mikrotubulů: faktor záchrany mikrotubulů CLIP-170 a faktor depolymerizující kinesin MCAK. Tyto faktory pak působily proti stabilizujícímu účinku taxolu. Rezistence vůči taxolu je tak ovlivňována množstvím různým faktorů a při narušení kteréhokoli z nich zaniká (Froidevaux-Klipfel et al., 2015).

Pro potvrzení, že takto vzniklá rezistence není specifická pouze pro MDA-MB-231, Targa et al. (2019) provedli sérii pokusů s nádorovými buňkami HeLa, CHO, HuH7 a nenádorovými RPE-1. Během těchto pokusů sledovali schopnost buněk s různě nadměrně exprimovanými proteiny přežít 72hodinovou expozici taxolu o koncentraci 1-10 nM a změny, které se v stále žijících buňkách objevily. Nadměrná exprese samotných enzymů prodlužujících glutamátové řetězce nezvýšila množství rekrutovaných CLIP-170 a MCAK na mikrotubuly. Totéž platí pro nadměrnou expresi septinů SEPT2, 6, 7, 9<sub>i3</sub>. Pokud byla však místo izoformy SEPT9<sub>i3</sub> přítomná izoforma SEPT9<sub>i1</sub>, k částečnému přemístění septinů na mikrotubuly a zvýšení množství rekrutovaných CLIP-170 a MCAK došlo. Nadměrnou expresí SEPT2, 6, 7, 9<sub>i1</sub> navíc v kombinaci s nadměrnou expresí enzymů prodlužujících glutamátové řetězce se dokončilo přemístění septinů na mikrotubuly a množství rekrutovaných CLIP-170 a MCAK se dále zvýšilo. K drobnému zvýšení rekrutovaných proteinů a částečnému přemístění septinů na mikrotubuly došlo i pokud v této kombinované nadměrné expresi byla přítomna izoforma SEPT9<sub>i3</sub>. Rezistenci vůči až 10nM koncentraci taxolu bylo možné pozorovat u buněk HeLa, CHO i RPE-1, ale buňky HuH7 mimo velice nízké koncentrace taxolu (<2 nM) rezistenci nevykazovaly. Na rozdíl od ostatních buněk u nich nebylo pozorováno ani přemístění septinů na mikrotubuly. Targa et al. (2019) na základě vlastních pozorování a dřívější práce (Froidevaux-Klipfel et al., 2015) navrhuje, že rozdílné schopnosti odolávat taxolu jsou dány rozdílnou výchozí hladinou SEPT9<sub>i1</sub> mezi buněčnými liniemi. To dokládají tím, že všechny buněčné linie, u kterých k přemístění septinů na mikrotubuly došlo, vykazovaly vysokou výchozí hladinu SEPT9<sub>i1</sub> (Targa et al., 2019).

Třebaže septiny působí jako proteiny, zajímavé informace lze získat i z jejich genů. Ze studie *de novo* methylace DNA v nádorových buňkách vyplývá, že ve většině případů obsahují nádorové buňky mnohem vyšší úroveň methylované DNA než zdravá tkáň. Zároveň bylo zjištěno, že se úroveň methylace ve většině tkání zvyšuje přirozeně s věkem (Nejman et al., 2014). Lofton-Day et al. (2008) identifikovali na základě specificky methylované DNA několik slibných markerů pro detekci nádorového onemocnění tlustého střeva – kolorektálního karcinomu (CRC) formou krevního

screeningu. Ze všech nalezených markerů se *SEPT9* ukázal být jako nejvhodnější kandidát pro vývoj metody schopné detekovat CRC z krve pacienta (Lofton-Day et al., 2008).

Studie zaměřené na klinické využití *SEPT9* na sebe nenechaly dlouho čekat. Postupně tak vznikly testy založené na detekci methylované *SEPT9* DNA z krevní plazmy. Optimalizovaná verze (Warren et al., 2011) původního testu (deVos et al., 2009) dosáhla zajímavých výsledků, kdy se ukázala být schopna odhalit 87 % předložených vzorků krevní plazmy pacientů s CRC v raných fázích a všechny vzorky od pacientů s CRC v pozdních fázích. Navíc byl test schopný odhalit nádory z jakéhokoli místa tlustého střeva a konečníku se specifitou kolem 88 % u různých věkových kategorií. Autoři dále zkusili detekovat adenomy, ovšem test dokázal ověřit přítomnost adenomu pouze u 12 % případů. Autoři zmiňují, že lidé neradi podstupují kolonoskopii, spolehlivou avšak invazivní metodu k detekci CRC. *SEPT9* test založený na screeningu krve by mohl pomoci přesvědčit větší procento lidí k podstoupení preventivního vyšetření CRC (Warren et al., 2011). Od roku 2016 je americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv schválen jediný test tohoto typu – Epi proColon<sup>®</sup> (Cai et al., 2018). Septiny tak mají uplatnění v klinické praxi.

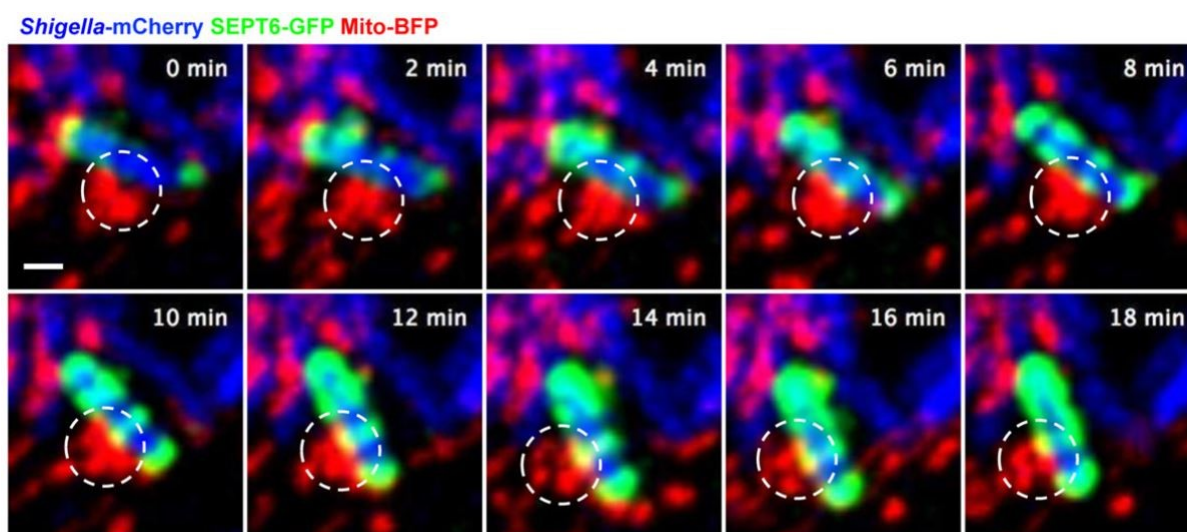
### 6.3. Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je vážné neurodegenerativní onemocnění (Kemeny et al., 2012). Septin ARTS byl popsán jako významný proapoptotický protein (Edison et al., 2017, 2012; Larisch et al., 2000). O apoptotickém významu ARTS svědčí, že i jeho samotná nadměrná exprese byla dostatečná pro spuštění apoptózy v různých buněčných liniích (Lotan et al., 2005). Kemeny et al. (2012), proto nejprve potvrdili proapoptotickou funkci ARTS v lidských nervových buňkách odvozených z neuroblastomu. Po vystavení těchto buněk různým proapoptotickým stimulům v nich výrazně vzrostla koncentrace ARTS a dalších proapoptotických markerů. Dále autoři vytvořili potkaní model Parkinsonovy choroby vystavením *substantia nigra* potkaního středního mozku neurotoxické látky, 6-OHDA. V buňkách této tkáně došlo opět k nárůstu ARTS, což vedlo autory ke spekulacím ohledně role ARTS v Parkinsonově chorobě. Parkin je cytoplazmatický protein, který ne zcela jasným mechanismem chrání neurony před degradací. Spekuluje se však, že by mohl inhibovat apoptózu. Kemeny et al. (2012) se proto zaměřili na možnou interakci Parkinu s ARTS. Ukázalo se, že Parkin může selektivně ubiquitinovat ARTS, a tak ho odsoudit k zániku v proteasomu. Překvapivě, Parkin byl pozorován při interakci i s druhou, neapoptotickou, izoformou SEPT4 – SEPT4\_i1, kterou ovšem neubiquitinoval. Na základě vlastních pozorování a dříve popsaném výskytu apoptózy v mozcích zesnulých pacientů s Parkinsonovou chorobou, Kemeny et al. (2012) navrhuje model neurodegenerace buněk během Parkinsonovy choroby. V tomto modelu je v buňkách množství ARTS za pomoci Parkinu regulováno. Dojde-li ke ztrátě funkce Parkinu, ARTS se začne hromadit a dojde k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a spuštění apoptózy mechanismem popsaným v 5.4.1. Dále autoři zmiňují nadměrnou expresi Parkinu jako možnost ochrany neuronů během Parkinsonovy choroby (Kemeny et al., 2012).

## 6.4. Buněčná imunita

Septiny také pomáhají buňkám bránit se proti bakteriím a hrají tak roli v buněčné imunitě.

V lidských buňkách HeLa nakažených bakterií *S. flexneri* byla kolem některých bakterií pozorována klecovitá septinová struktura, viz Obr. 11. Sirianni et al. (2016) zjistili, že velké množství proteinů, které interagují se septinovými klecemi, je čistě mitochondriálních. Navíc většina septinových klecí byla pozorována v asociaci s mitochondriemi. Autoři se proto rozhodli sledovat vliv mitochondrií na formování septinových klecí. V buňkách s depletovaným proteinem důležitým pro štěpení mitochondrií, Drp1, bylo možné pozorovat vznik protáhlejších mitochondrií, jak už bylo jednou uvedeno v kapitole 5.4. V těchto buňkách také vznikalo vyšší množství septinových klecí. Naproti tomu v buňkách s fragmentovanými mitochondriemi se septinové klece netvořily. Z těchto pozorování vyplynulo, že dlouhé mitochondrie podporují tvorbu septinových klecí. Dále byla odhalena preferenční tvorba septinových klecí okolo živých bakterií. Navíc bakterie uzavřené v septinových klecích byly většinou metabolicky neaktivní v porovnání s těmi, co se nacházely volně v buňce. Septinové klece tak zabraňují uvězněným bakteriím v proliferaci. Autoři se dále domnívají, že uvězněné bakterie jsou drženy na místě pro následnou antibakteriální autofagii (Sirianni et al., 2016).



**Obr. 11:** Tvorba septinové klece (zeleně) v blízkosti mitochondrií (červeně) okolo bakterie *S. flexneri* (modře). V kruhu je zvýrazněn mitochondrií podpořený vznik septinového prstence. Snímky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu v 2minutových intervalech. Měřítko na levém horním snímku je 1  $\mu\text{m}$ . Převzato z (Sirianni et al., 2016).

## 7. Závěr:

Septiny jsou GTP vazebné proteiny s definovanou N-koncovou doménou, G-doménou a C-koncovou doménou (Bourne et al., 1991; Leipe et al., 2002; Pan et al., 2007; Valadares et al., 2017). Je nám jasná jejich sekvence, ale stále ještě nemáme všechny informace o jejich struktuře. I přes velký pokrok vedoucí k objasnění přesné funkce septinových domén při skládání septinů do filamentů zůstává mnoho

otázek nezodpovězených (Rosa et al., 2020). N- a C-koncové domény rovněž skrývají několik tajemství. N-konce jsou kromě krátkého alfa helixu v blízkosti G-domény nestrukturované (Sirajuddin et al., 2007). N-konec SEPT9 je unikátní svou délkou a množstvím interakcí s jinými strukturami. Víme, že se váže na negativně nabitě fosfolipidy na membráně, mikrotubuly i aktinová filamenta (Bai et al., 2013; Nakazawa et al., 2023; Smith et al., 2015; Zhang et al., 1999). Kromě skupiny SEPT3 obsahují septiny coiled coil doménu na svém C-konci (Pan et al., 2007). Zatím se zdá, že coiled coil domény jsou potřebné při tvorbě filament a jejich vzájemných interakcích (Leonardo et al., 2021).

Víme, že se až na výjimky septiny skládají do symetrických heterooligomerů s jasně daným pořadí septinových podjednotek, které se dále propojují ve filamenta a mohou vytvořit struktury vyššího řádu (Ihara et al., 2005; Kim and Cooper, 2018; Mendonça et al., 2019; Sellin et al., 2014; Song et al., 2019; Valadares et al., 2017). Na druhou stranu není známo, jak spolu filamenta v strukturách vyššího řádu interagují. Bude nutné ověřit navržený model, jež v strukturách vyššího řádu počítá s dříve zmíněnými interakcemi coiled coil domény septinů (Leonardo et al., 2021).

V buňkách byly septiny nalezeny při interakcích s cytoplazmatickou membránou, na které tvoří difúzní bariéry (Ewers et al., 2014; Hu et al., 2010; Tada et al., 2007; Xie et al., 2007). Dále k ní připojují aktomyosinový cytoskelet (Mostowy et al., 2011). Pokus s uměle připravenou membránou *in vitro* dal vznik zajímavému modelu představujícímu preferenční skládání savčích septinů na membrány. V tomto modelu septinová filamenta v závislosti na koncentraci obsazují nejprve údolí membrán. Poté se objevují i na vrcholech membrány. Postupně membránu pokryjí celou. Nakonec vytváří druhou vrstvu filament přes tu první, čímž vznikne dvouvrstvá síť (Nakazawa et al., 2023). Zde je třeba ověřit platnost tohoto modelu *in vivo*.

Vliv septinů byl pozorován i na velkém množství organel. Bylo prokázáno, že septiny zabraňují fragmentaci GA (Song et al., 2019); napomáhají vzniku a regulaci obsahu u lipidových kapének (Akil et al., 2016; Chen et al., 2021) a hrají roli v mitochondriálním štěpení (Pagliuso et al., 2016; Sirianni et al., 2016). Mitochondriální septin ARTS se navíc ve vnější mitochondriální membráně účastní spouštění apoptózy (Kemeny et al., 2012; Larisch et al., 2000) a podílí se na vápníkové signalizaci (Katz et al., 2019). Třebaže víme, co se stane depletováním, či nadměrnou expresí septinů, molekulární mechanismy působení septinů nejsou vždy známy.

Četné interakce septinů s ostatními členy cytoskeletu jsou rovněž velmi podstatné. Jsou zodpovědné za údržbu polyGlu mikrotubulů a rekrutování proteinů regulujících dynamiku mikrotubulů (Froidevaux-Klipfel et al., 2015; Spiliotis et al., 2008). Navigují růst plus konce mikrotubulů (Bowen et al., 2011) a ovlivňují rychlost váčkového transportu (Spiliotis et al., 2008). Nyní se předpokládá i jejich role ve vazbě, nebo uvolňování nákladu z molekulárního motoru KIF17 (Bai et al., 2016).

Aktinová filamenta a jejich přímá interakce se septiny je možná hned třemi různými způsoby. Zde v závislosti na způsobu nasednutí ovlivňují možnost ostatních proteinů, jako je například kofilin, vázat se na F-aktin (Smith et al., 2015). Septiny se významně podílejí na organizaci stresových vláken, ať už přímým propojováním F-aktinu, nebo tvorbou lešení pro jiné vlivné proteiny. Svým vlivem na stresová vlákna nepřímo ovlivňují velikost a životnost fokálních adhezí (Dolat et al., 2014; Kremer et al., 2007). Překvapivě v porovnání s vlivem septinů na stresová vlákna, septiny příliš neovlivňují množství a organizaci aktomyosinového cytoskeletu v buněčném kortexu. Zde ovšem mají důležitou funkci v udržování membránové stability při zatahování různých nadbytečných výčnělků na cytoplazmatické membráně (Gilden et al., 2012; Hagiwara et al., 2011; Tooley et al., 2009). Dále se předpokládá účast septinů při tvorbě na aktinu závislých membránových výčnělků. Navíc jsou septiny důležité pro tvorbu pevných buněčných spojů v epitelech (Kim and Cooper, 2021, 2018). Ačkoliv se zdá, že tato pozorování platí obecně, bylo by dobré ověřit jejich platnost i v jiných buněčných liniích.

Septiny se tedy mohou vázat přímo na mikrotubuly i aktinová filamenta (Bai et al., 2016; Smith et al., 2015). Zatím však neexistuje studie zaměřená na možnou roli septinů v propojování mikrotubulů s aktinovými filamenty.

S cytoskeletem je úzce spjaté buněčné dělení. Zde jsou septiny nutné pro správné seřazení chromosomů během metafáze a jejich následnému rozchodu do budoucích dceřiných buněk (Spiliotis et al., 2008; Zhu et al., 2008). Septiny jsou rovněž nepostradatelné pro oddělení dceřiných buněk v závěrečném kroku buněčného dělení, a to jednak interakcí s myosinem IIA a jednak tvorbou lešení pro ESCRT komplex (Joo et al., 2007; Karasmanis et al., 2019).

Praktické využití septinů v medicíně už existuje ve formě preventivního vyšetření přítomnosti methylované *SEPT9* DNA v krvi. Jedná se o screening CRC s názvem Epi proColon<sup>®</sup> (Cai et al., 2018). Možností, které se zatím nedostaly do klinické praxe, se nabízí více. Vyřazení buňky jen jednoho septinového genu vede k samčí sterilitě. Septiny by tak mohly sloužit jako marker samčí neplodnosti (Ihara et al., 2005; Vickram et al., 2021). Navíc, díky tkáňové specifitě by mělo být možné využít septiny v mužské antikoncepci (Lin et al., 2009).

Nyní se zdá, že všechny savčí septiny již byly objeveny a rozčleněny do Kinoshitovo skupin. Menší pozornost byla ovšem věnována jejich izoformám, jejichž počet se navíc u různých druhů savců liší (Lin et al., 2009). Nalezení všech funkcí jednotlivých septinových izoform bude vyžadovat značné množství času i úsilí.



## Použitá literatura

(sekundární zdroje jsou označeny \*)

- Akil, A., Peng, J., Omrane, M., Gondeau, C., Desterke, C., Marin, M., Tronchère, H., Taveneau, C., Sar, S., Briolotti, P., Benjelloun, S., Benjouad, A., Maurel, P., Thiers, V., Bressanelli, S., Samuel, D., Bréchet, C., Gassama-Diagne, A., 2016. Septin 9 induces lipid droplets growth by a phosphatidylinositol-5-phosphate and microtubule-dependent mechanism hijacked by HCV. *Nat Commun* 7, 12203. <https://doi.org/10.1038/ncomms12203>
- Auxier, B., Dee, J., Berbee, M.L., Momany, M., 2019. Diversity of opisthokont septin proteins reveals structural constraints and conserved motifs. *BMC Evol Biol* 19, 4. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1297-8>
- Bai, X., Bowen, J.R., Knox, T.K., Zhou, K., Pendziwiat, M., Kuhlenbäumer, G., Sindelar, C.V., Spiliotis, E.T., 2013. Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *Journal of Cell Biology* 203, 895–905. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308068>
- Bai, X., Karasmanis, E.P., Spiliotis, E.T., 2016. Septin 9 interacts with kinesin KIF17 and interferes with the mechanism of NMDA receptor cargo binding and transport. *Mol Biol Cell* 27, 897–906. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0493>
- Bläser, S., Jersch, K., Hainmann, I., Zieger, W., Wunderle, D., Busse, A., Zieger, B., 2003. Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin SEPT8 (KIAA0202). *Gene* 312, 313–320. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00635-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00635-8)
- \* Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Bowen, J.R., Hwang, D., Bai, X., Roy, D., Spiliotis, E.T., 2011. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. *J Cell Biol* 194, 187–197. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102076>
- Bridges, A.A., Jentsch, M.S., Oakes, P.W., Occhipinti, P., Gladfelter, A.S., 2016. Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 213, 23–32. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512029>
- Cai, L., Hood, S., Kallam, E., Overman, D., Barker, K., Rutledge, D., Riojas, J., Best, C., Eisenberg, M., Kam-Morgan, L., 2018. Epi proColon®: Use of a Non-Invasive SEPT9 Gene Methylation Blood Test for Colorectal Cancer Screening: A National Laboratory Experience. *J Clin Epigenet* 4:7. <https://doi.org/10.21767/2472-1158.100092>
- Cao, L., Ding, X., Yu, W., Yang, X., Shen, S., Yu, L., 2007. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Letters* 581, 5526–5532. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.032>
- \* Cardoso, F., Senkus-Konefka, E., Fallowfield, L., Costa, A., Castiglione, M., 2010. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 21, v15–v19. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq160>
- Castro, D.K.S.V., da Silva, S.M.O., Pereira, H.M., Macedo, J.N.A., Leonardo, D.A., Valadares, N.F., Kumagai, P.S., Brandão-Neto, J., Araújo, A.P.U., Garratt, R.C., 2020. A complete compendium of crystal structures for the human SEPT3 subgroup reveals functional plasticity at a specific septin interface. *IUCrJ* 7, 462–479. <https://doi.org/10.1107/S2052252520002973>
- \* Cavini, I.A., Leonardo, D.A., Rosa, H.V.D., Castro, D.K.S.V., D’Muniz Pereira, H., Valadares, N.F., Araújo, A.P.U., Garratt, R.C., 2021. The Structural Biology of Septins and Their Filaments: An Update. *Front Cell Dev Biol* 9, 765085. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.765085>
- Chen, F., Yan, B., Ren, J., Lyu, R., Wu, Y., Guo, Y., Li, D., Zhang, H., Hu, J., 2021. FIT2 organizes lipid droplet biogenesis with ER tubule-forming proteins and septins. *J Cell Biol* 220, e201907183. <https://doi.org/10.1083/jcb.201907183>
- Collins, K.B., Kang, H., Matsche, J., Klomp, J.E., Rehman, J., Malik, A.B., Karginov, A.V., 2019. Septin2 mediates podosome maturation and endothelial cell invasion associated with

- angiogenesis. *Journal of Cell Biology* 219, e201903023. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903023>
- Desterke, C., Gassama-Diagne, A., 2019. Protein-protein interaction analysis highlights the role of septins in membrane enclosed lumen and mRNA processing. *Advances in Biological Regulation* 73, 100635. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100635>
- deVos, T., Tetzner, R., Model, F., Weiss, G., Schuster, M., Distler, J., Steiger, K.V., Grützmann, R., Pilarsky, C., Habermann, J.K., Fleshner, P.R., Oubre, B.M., Day, R., Sledziewski, A.Z., Lofton-Day, C., 2009. Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer. *Clinical Chemistry* 55, 1337–1346. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.115808>
- Dolat, L., Hunyara, J.L., Bowen, J.R., Karasmanis, E.P., Elgawly, M., Galkin, V.E., Spiliotis, E.T., 2014. Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. *J Cell Biol* 207, 225–235. <https://doi.org/10.1083/jcb.201405050>
- Edison, N., Curtz, Y., Paland, N., Mamriev, D., Chorubczyk, N., Haviv-Reingewertz, T., Kfir, N., Morgenstern, D., Kupervaser, M., Kagan, J., Kim, H.T., Larisch, S., 2017. Degradation of Bcl-2 by XIAP and ARTS Promotes Apoptosis. *Cell Reports* 21, 442–454. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.052>
- Edison, N., Zuri, D., Maniv, I., Bornstein, B., Lev, T., Gottfried, Y., Kemeny, S., Garcia-Fernandez, M., Kagan, J., Larisch, S., 2012. The IAP-antagonist ARTS initiates caspase activation upstream of cytochrome C and SMAC/Diablo. *Cell Death Differ* 19, 356–368. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.112>
- Ewers, H., Tada, T., Petersen, J.D., Racz, B., Sheng, M., Choquet, D., 2014. A Septin-Dependent Diffusion Barrier at Dendritic Spine Necks. *PLOS ONE* 9, e113916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113916>
- Froidevaux-Klipfel, L., Poirier, F., Boursier, C., Crépin, R., Poüs, C., Baudin, B., Baillet, A., 2011. Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *PROTEOMICS* 11, 3877–3886. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000789>
- Froidevaux-Klipfel, L., Targa, B., Cantaloube, I., Ahmed-Zaïd, H., Poüs, C., Baillet, A., 2015. Septin cooperation with tubulin polyglutamylolation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget* 6, 36063–36080.
- \* Fung, K.Y.Y., Dai, L., Trimble, W.S., 2014. Chapter Seven - Cell and Molecular Biology of Septins, in: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 289–339. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00007-4>
- Gilden, J.K., Peck, S., M. Chen, Y.-C., Krummel, M.F., 2012. The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing. *J Cell Biol* 196, 103–114. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105127>
- Hagiwara, A., Tanaka, Y., Hikawa, R., Morone, N., Kusumi, A., Kimura, H., Kinoshita, M., 2011. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton* 68, 512–525. <https://doi.org/10.1002/cm.20528>
- Hall, P.A., Jung, K., Hillan, K.J., Russell, S.H., 2005. Expression profiling the human septin gene family. *The Journal of Pathology* 206, 269–278. <https://doi.org/10.1002/path.1789>
- Hartwell, L.H., 1971. Genetic control of the cell division cycle in yeast: IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research* 69, 265–276. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90223-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90223-0)
- Hsiao, J.-R., Leu, S.-F., Huang, B.-M., 2009. Apoptotic mechanism of paclitaxel-induced cell death in human head and neck tumor cell lines. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 38, 188–197. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00732.x>
- Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M.P., Nachury, M.V., Spiliotis, E.T., Nelson, W.J., 2010. A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science* 329, 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.1191054>
- Hu, Q., Nelson, W.J., Spiliotis, E.T., 2008. Forchlorfenuron Alters Mammalian Septin Assembly, Organization, and Dynamics. *J Biol Chem* 283, 29563–29571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804962200>

- Huang, Y.-W., Surka, M.C., Reynaud, D., Pace-Asciak, C., Trimble, W.S., 2006. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *The FEBS Journal* 273, 3248–3260. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05333.x>
- Ihara, M., Kinoshita, A., Yamada, S., Tanaka, H., Tanigaki, A., Kitano, A., Goto, M., Okubo, K., Nishiyama, H., Ogawa, O., Takahashi, C., Itohara, S., Nishimune, Y., Noda, M., Kinoshita, M., 2005. Cortical Organization by the Septin Cytoskeleton Is Essential for Structural and Mechanical Integrity of Mammalian Spermatozoa. *Developmental Cell* 8, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.005>
- Joo, E., Surka, M.C., Trimble, W.S., 2007. Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Nonmuscle Myosin II and Its Kinases. *Developmental Cell* 13, 677–690. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.09.001>
- Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., Wilson, L., 1993. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9552–9556.
- Jordan, M.A., Wendell, K., Gardiner, S., Brent Derry, W., Copp, H., Wilson, L., 1996. Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death. *Cancer Research* 56, 816–825.
- Karasmanis, E.P., Hwang, D., Nakos, K., Bowen, J.R., Angelis, D., Spiliotis, E.T., 2019. A Septin Double Ring Controls the Spatiotemporal Organization of the ESCRT Machinery in Cytokinetic Abscission. *Current Biology* 29, 2174–2182.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.050>
- Karasmanis, E.P., Phan, C.-T., Angelis, D., Kesisova, I.A., Hoogenraad, C.C., McKenney, R.J., Spiliotis, E.T., 2018. Polarity of Neuronal Membrane Traffic Requires Sorting of Kinesin Motor Cargo during Entry into Dendrites by a Microtubule-Associated Septin. *Developmental Cell* 46, 204–218.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.013>
- Kartmann, B., Roth, D., 2001. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science* 114, 839–844. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.5.839>
- Katz, Z.B., Zhang, C., Quintana, A., Lillemeier, B.F., Hogan, P.G., 2019. Septins organize endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions for STIM1-ORAI1 calcium signalling. *Sci Rep* 9, 10839. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46862-w>
- Kemeny, S., Dery, D., Loboda, Y., Rovner, M., Lev, T., Zuri, D., Finberg, J.P.M., Larisch, S., 2012. Parkin Promotes Degradation of the Mitochondrial Pro-Apoptotic ARTS Protein. *PLoS One* 7, e38837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038837>
- Kim, D.-S., Hubbard, S.-L., Peraud, A., Salhia, B., Sakai, K., Rutka, J.T., 2004. Analysis of Mammalian Septin Expression in Human Malignant Brain Tumors. *Neoplasia* 6, 168–178.
- Kim, J., Cooper, J.A., 2021. Junctional Localization of Septin 2 Is Required for Organization of Junctional Proteins in Static Endothelial Monolayers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 41, 346–359. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315472>
- Kim, J., Cooper, J.A., 2018. Septins regulate junctional integrity of endothelial monolayers. *MBoC* 29, 1693–1703. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-02-0136>
- \* Kinoshita, M., 2003. Assembly of Mammalian Septins. *The Journal of Biochemistry* 134, 491–496. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg182>
- Kissel, H., Georgescu, M.-M., Larisch, S., Manova, K., Hunnicutt, G.R., Steller, H., 2005. The Sept4 Septin Locus Is Required for Sperm Terminal Differentiation in Mice. *Developmental Cell* 8, 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.021>
- Kremer, B.E., Adang, L.A., Macara, I.G., 2007. Septins Regulate Actin Organization and Cell Cycle Arrest Through SOCS7-Mediated Nuclear Accumulation of NCK. *Cell* 130, 837–850. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.053>
- Larisch, S., Yi, Y., Lotan, R., Kerner, H., Eimerl, S., Tony Parks, W., Gottfried, Y., Birkey Reffey, S., de Caestecker, M.P., Danielpour, D., Book-Melamed, N., Timberg, R., Duckett, C.S., Lechleider, R.J., Steller, H., Orly, J., Kim, S.-J., Roberts, A.B., 2000. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol* 2, 915–921. <https://doi.org/10.1038/35046566>
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Aravind, L., 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology* 317, 41–72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378>

- Leonardo, D.A., Cavini, I.A., Sala, F.A., Mendonça, D.C., Rosa, H.V.D., Kumagai, P.S., Crusca Jr, E., Valadares, N.F., Marques, I.A., Brandão-Neto, J., Munte, C.E., Kalbitzer, H.R., Soler, N., Usón, I., André, I., Araujo, A.P.U., D’Muniz Pereira, H., Garratt, R.C., 2021. Orientational Ambiguity in Septin Coiled Coils and its Structural Basis. *Journal of Molecular Biology* 433, 166889. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166889>
- Lin, Y.-H., Chou, C.-K., Hung, Y.-C., Yu, I.-S., Pan, H.-A., Lin, S.-W., Kuo, P.-L., 2011. SEPT12 deficiency causes sperm nucleus damage and developmental arrest of preimplantation embryos. *Fertility and Sterility* 95, 363–365. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1064>
- Lin, Y.-H., Lin, Y.-M., Wang, Y.-Y., Yu, I.-S., Lin, Y.-W., Wang, Y.-H., Wu, C.-M., Pan, H.-A., Chao, S.-C., Yen, P.H., Lin, S.-W., Kuo, P.-L., 2009. The Expression Level of Septin12 Is Critical for Spermiogenesis. *Am J Pathol* 174, 1857–1868. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080955>
- Lofton-Day, C., Model, F., DeVos, T., Tetzner, R., Distler, J., Schuster, M., Song, X., Lesche, R., Liebenberg, V., Ebert, M., Molnar, B., Grützmann, R., Pilarsky, C., Sledziewski, A., 2008. DNA Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening. *Clinical Chemistry* 54, 414–423. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.095992>
- Lotan, R., Rotem, A., Gonen, H., Finberg, J.P.M., Kemeny, S., Steller, H., Ciechanover, A., Larisch, S., 2005. Regulation of the Proapoptotic ARTS Protein by Ubiquitin-mediated Degradation \*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25802–25810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501955200>
- Macara, I.G., Baldarelli, R., Field, C.M., Glotzer, M., Hayashi, Y., Hsu, S.-C., Kennedy, M.B., Kinoshita, M., Longtine, M., Low, C., Maltais, L.J., McKenzie, L., Mitchison, T.J., Nishikawa, T., Noda, M., Petty, E.M., Peifer, M., Pringle, J.R., Robinson, P.J., Roth, D., Russell, S.E.H., Stuhlmann, H., Tanaka, M., Tanaka, T., Trimble, W.S., Ware, J., Zeleznik-Le, N.J., Zieger, B., 2002. Mammalian Septins Nomenclature. *Mol Biol Cell* 13, 4111–4113. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0438>
- Macedo, J.N.A., Valadares, N.F., Marques, I.A., Ferreira, F.M., Damalio, J.C.P., Pereira, H.M., Garratt, R.C., Araujo, A.P.U., 2013. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. *Biochem J* 450, 95–105. <https://doi.org/10.1042/BJ20120851>
- Mendonça, D.C., Guimarães, S.L., Pereira, H.D., Pinto, A.A., de Farias, M.A., de Godoy, A.S., Araujo, A.P.U., van Heel, M., Portugal, R.V., Garratt, R.C., 2021. An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM. *Journal of Molecular Biology* 433, 167096. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167096>
- Mendonça, D.C., Macedo, J.N., Guimarães, S.L., Barroso da Silva, F.L., Cassago, A., Garratt, R.C., Portugal, R.V., Araujo, A.P.U., 2019. A revised order of subunits in mammalian septin complexes. *Cytoskeleton* 76, 457–466. <https://doi.org/10.1002/cm.21569>
- Møller, A.M.J., Füchtbauer, E.-M., Brüel, A., Andersen, T.L., Borggaard, X.G., Pavlos, N.J., Thomsen, J.S., Pedersen, F.S., Delaisse, J.-M., Søe, K., 2018. Septins are critical regulators of osteoclastic bone resorption. *Sci Rep* 8, 13016. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31159-1>
- \* Mostowy, S., Cossart, P., 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 183–194. <https://doi.org/10.1038/nrm3284>
- Mostowy, S., Janel, S., Forestier, C., Roduit, C., Kasas, S., Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., Lafont, F., 2011. A Role for Septins in the Interaction between the *Listeria monocytogenes* Invasion Protein InlB and the Met Receptor. *Biophys J* 100, 1949–1959. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.040>
- Nakazawa, K., Kumar, G., Chauvin, B., Di Cicco, A., Pellegrino, L., Trichet, M., Hajj, B., Cabral, J., Sain, A., Mangenot, S., Bertin, A., 2023. A human septin octamer complex sensitive to membrane curvature drives membrane deformation with a specific mesh-like organization. *Journal of Cell Science* 136, jcs260813. <https://doi.org/10.1242/jcs.260813>
- Nakos, K., Rosenberg, M., Spiliotis, E.T., 2019. Regulation of microtubule plus end dynamics by septin 9. *Cytoskeleton* 76, 83–91. <https://doi.org/10.1002/cm.21488>
- Nejman, D., Straussman, R., Steinfeld, I., Ruvolo, M., Roberts, D., Yakhini, Z., Cedar, H., 2014. Molecular Rules Governing De Novo Methylation in Cancer. *Cancer Research* 74, 1475–1483. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3042>

- Oakes, P.W., Beckham, Y., Stricker, J., Gardel, M.L., 2012. Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* 196, 363–374. <https://doi.org/10.1083/jcb.201107042>
- \* Orr, G.A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., Horwitz, S.B., 2003. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22, 7280–7295. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206934>
- Pagliuso, A., Tham, T.N., Stevens, J.K., Lagache, T., Persson, R., Salles, A., Olivo-Marin, J., Oddos, S., Spang, A., Cossart, P., Stavru, F., 2016. A role for septin 2 in Drp1-mediated mitochondrial fission. *EMBO Rep* 17, 858–873. <https://doi.org/10.15252/embr.201541612>
- Pan, F., Malmberg, R.L., Momany, M., 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol* 7, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-103>
- Rosa, H.V.D., Leonardo, D.A., Brognara, G., Brandão-Neto, J., D’Muniz Pereira, H., Araújo, A.P.U., Garratt, R.C., 2020. Molecular Recognition at Septin Interfaces: The Switches Hold the Key. *Journal of Molecular Biology* 432, 5784–5801. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.09.001>
- \* Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghofer, A., 1990. The P-loop — a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 430–434. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90281-F](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90281-F)
- Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B., 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 665–667. <https://doi.org/10.1038/277665a0>
- Sellin, M.E., Holmfeldt, P., Stenmark, S., Gullberg, M., 2011. Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. *Mol Biol Cell* 22, 4588–4601. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0754>
- Sellin, M.E., Stenmark, S., Gullberg, M., 2014. Cell type-specific expression of SEPT3-homology subgroup members controls the subunit number of heteromeric septin complexes. *Mol Biol Cell* 25, 1594–1607. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0553>
- Sellin, M.E., Stenmark, S., Gullberg, M., 2012. Mammalian SEPT9 isoforms direct microtubule-dependent arrangements of septin core heteromers. *Mol Biol Cell* 23, 4242–4255. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-06-0486>
- \* Shuman, B., Momany, M., 2022. Septins From Protists to People. *Front Cell Dev Biol* 9, 824850. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.824850>
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kühlmann, D., Macara, I.G., Weyand, M., Stark, H., Wittinghofer, A., 2007. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* 449, 311–315. <https://doi.org/10.1038/nature06052>
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Zent, E., Wittinghofer, A., 2009. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16592–16597. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902858106>
- Sirianni, A., Krokowski, S., Lobato-Márquez, D., Buranyi, S., Pfanzer, J., Galea, D., Willis, A., Culley, S., Henriques, R., Larrouy-Maumus, G., Hollinshead, M., Sancho-Shimizu, V., Way, M., Mostowy, S., 2016. Mitochondria mediate septin cage assembly to promote autophagy of *Shigella*. *EMBO reports* 17, 1029–1043. <https://doi.org/10.15252/embr.201541832>
- Smith, C., Dolat, L., Angelis, D., Forgacs, E., Spiliotis, E.T., Galkin, V.E., 2015. Septin 9 exhibits polymorphic binding to F-actin and inhibits myosin and cofilin activity. *J Mol Biol* 427, 3273–3284. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.07.026>
- Song, K., Gras, C., Capin, G., Gimber, N., Lehmann, M., Mohd, S., Puchkov, D., Rödiger, M., Wilhelmi, I., Daumke, O., Schmoranz, J., Schürmann, A., Krauss, M., 2019. A SEPT1-based scaffold is required for Golgi integrity and function. *J Cell Sci* 132, jcs225557. <https://doi.org/10.1242/jcs.225557>
- Soroosh, F., Kim, M.S., Palander, O., Balachandran, Y., Collins, R.F., Benlekbir, S., Rubinstein, J.L., Trimble, W.S., 2021. Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties. *Mol Biol Cell* 32, 289–300. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-06-0398>
- Spiliotis, E.T., Hunt, S.J., Hu, Q., Kinoshita, M., Nelson, W.J., 2008. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J Cell Biol* 180, 295–303. <https://doi.org/10.1083/jcb.200710039>

- Spiliotis, E.T., Kinoshita, M., Nelson, W.J., 2005. A Mitotic Septin Scaffold Required for Mammalian Chromosome Congression and Segregation. *Science* 307, 1781–1785. <https://doi.org/10.1126/science.1106823>
- \* Spiliotis, E.T., Nakos, K., 2021. Cellular functions of actin- and microtubule-associated septins. *Current Biology* 31, R651–R666. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.064>
- \* Subedi, K.P., Ong, H.L., Ambudkar, I.S., 2017. Assembly of ER-PM Junctions: A Critical Determinant in the Regulation of SOCE and TRPC1, in: Krebs, J. (Ed.), *Membrane Dynamics and Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 253–276. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5_11)
- Tada, T., Simonetta, A., Batterton, M., Kinoshita, M., Edbauer, D., Sheng, M., 2007. Role of Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons. *Current Biology* 17, 1752–1758. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.09.039>
- Targa, B., Klipfel, L., Cantaloube, I., Salameh, J., Benoit, B., Poüs, C., Baillet, A., 2019. Septin filament coalignment with microtubules depends on SEPT9\_i1 and tubulin polyglutamylation, and is an early feature of acquired cell resistance to paclitaxel. *Cell Death Dis* 10, 54. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1318-6>
- Tooley, A.J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W.S., Kinoshita, M., Krummel, M.F., 2009. Amoeboid T lymphocytes Require the Septin Cytoskeleton for Cortical Integrity and Persistent Motility. *Nat Cell Biol* 11, 17–26. <https://doi.org/10.1038/ncb1808>
- \* Valadares, N.F., d' Muniz Pereira, H., Ulian Araujo, A.P., Garratt, R.C., 2017. Septin structure and filament assembly. *Biophys Rev* 9, 481–500. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0320-4>
- Van Ngo, H., Robertin, S., Brokatzky, D., Bielecka, M.K., Lobato-Márquez, D., Torraca, V., Mostowy, S., 2022. Septins promote caspase activity and coordinate mitochondrial apoptosis. *Cytoskeleton (Hoboken)*. <https://doi.org/10.1002/cm.21696>
- Vickram, A.S., Anbarasu, K., Jeyanthi, P., Gulothungan, G., Nanmaran, R., Thanigaivel, S., Sridharan, T.B., Rohini, K., 2021. Identification and Structure Prediction of Human Septin-4 as a Biomarker for Diagnosis of Asthenozoospermic Infertile Patients—Critical Finding Toward Personalized Medicine. *Frontiers in Medicine* 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.723019>
- Warren, J.D., Xiong, W., Bunker, A.M., Vaughn, C.P., Furtado, L.V., Roberts, W.L., Fang, J.C., Samowitz, W.S., Heichman, K.A., 2011. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med* 9, 133. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-133>
- Xie, Y., Vessey, J.P., Konecna, A., Dahm, R., Macchi, P., Kiebler, M.A., 2007. The GTP-Binding Protein Septin 7 Is Critical for Dendrite Branching and Dendritic-Spine Morphology. *Current Biology* 17, 1746–1751. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.042>
- Zent, E., Wittinghofer, A., 2014. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biol Chem* 395, 169–180. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0268>
- Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P.S., Grinstein, S., Trimble, W.S., 1999. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology* 9, 1458–1467. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80115-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80115-3)
- Zhang, N., Liu, L., Fan, N., Zhang, Q., Wang, W., Zheng, M., Ma, L., Li, Y., Shi, L., 2016. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation. *Oncotarget* 7, 61587–61600. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11402>
- Zhu, M., Wang, F., Yan, F., Yao, P.Y., Du, J., Gao, X., Wang, X., Wu, Q., Ward, T., Li, J., Kioko, S., Hu, R., Xie, W., Ding, X., Yao, X., 2008. Septin 7 Interacts with Centromere-associated Protein E and Is Required for Its Kinetochores Localization. *J Biol Chem* 283, 18916–18925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710591200>