

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A sejtfelszíni fehérjék és a clusterin vizsgálata  
porcsejtekben**

**Dr. Kovács Patrik**

**Témavezető: Dr. Matta Csaba**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2026**

# TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
<b>1. BEVEZETÉS.....</b>	<b>7</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>10</b>
2.1. A porcszövet biológiájának bemutatása .....	10
2.1.1. <i>A porc általános jellemzői</i> .....	10
2.1.2. <i>A hyalinporc felépítése és tulajdonságai</i> .....	12
2.1.3. <i>A porcdifferenciáció folyamatának áttekintése</i> .....	17
2.1.4. <i>Csirke embryonalis végtagtelep-progenitorok: egy in vitro porcdifferenciációs modell</i> .....	20
2.2. A sejtfelszíni fehérjék összessége, avagy a „surfaceome” .....	23
2.2.1. <i>A sejt plazmamembránjának bemutatása</i> .....	23
2.2.2. <i>A sejtfelszíni fehérjék általános és a porcszövetben betöltött szerepének ismertetése</i> .....	24
2.2.2.1. <i>A plazmamembrán transzporter fehérjei és a porcsejtek életében betöltött szerepük</i> .....	26
2.2.2.2. <i>A plazmamembrán receptor fehérjei és a porcsejtek életében betöltött szerepük</i> .....	30
2.2.2.3. <i>A plazmamembrán adhéziós fehérjei és a porcsejtek életében betöltött szerepük</i> .....	33
2.2.2.4. <i>A plazmamembrán enzimjei és a porcsejtek életében betöltött szerepük</i> .....	36
2.2.3. <i>A surfaceome kimutatására szolgáló technikák</i> .....	40
2.2.3.1. <i>Centrifugálással történő membránfehérje izolálás</i> .....	41
2.2.3.2. <i>Elektrosztatikus kölcsönhatáson alapuló membránfehérje izolálás</i> .....	41
2.2.3.3. <i>Fehérjeszerkezet felismerésen alapuló membránfehérje izolálás</i> .....	42
2.2.3.4. <i>Biotin-jelölésen alapuló membránfehérje izolálás</i> .....	42
2.3. Clusterin: élet és halál között egy extracellularis chaperonnal.....	45
2.3.1. <i>A clusterin szintézisének, izoformáinak és azok funkcióinak bemutatása</i> .....	45
2.3.2. <i>A clusterin a porcszövet és porcfejlődés kontextusában</i> .....	49
2.4. A surfaceome és a clusterin kapcsolata .....	50
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>52</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>53</b>
4.1. Kísérleti modell: csirkeembryo végtagtelep-eredetű porcosodó micromass primer sejt kultúra .....	53

4.2. Szövetteni festés alkalmazása.....	54
4.3. Sejtfelszíni fehérjék izolálása és dúsítása aminooxi-biotin technikával.....	55
4.4. A porcsejtek total proteomjának izolálása.....	59
4.5. A surfaceome és a total proteom peptid minták tömegspektrometriai analízise LC-MS/MS módszerrel és a nyers adatok elemzése.....	60
4.6. A kvantitatív tömegspektrometriából származó expressziós adatok bioinformatikai analízise .....	61
4.6.1. A mintákban lévő fehérjék kifejeződési mintázatának feltérképezése expressziós klaszterek és heatmap segítségével .....	61
4.6.2. A fehérjék surfaceome alapú szűrése és funkcióik szerinti csoportosítása GO kifejezések segítségével, kvalitatív összehasonlítása Venn-diagrammal .....	62
4.7. Az újonnan felfedezett fehérjék expressziójának validálása western blot technikával .	65
4.8. Az újonnan felfedezett fehérjék cellularis lokalizációjának validálása immuncitokémiai technikával és konfokális mikroszkópiával .....	70
4.9. Statisztikai analízis .....	72
4.10. A clusterin interakciós partnereinek feltárása <i>in silico</i> hálózatbiológiai módszerekkel .....	73
4.10.1. A CLU interakciós partnereinek feltérképezése STRING adatbázis és Cytoscape szoftver segítségével.....	73
4.10.2. A CLU interakciós partnereinek és az OA-ban betöltött szerepének vizsgálata Qiagen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) elemzéssel .....	74
<b>5. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>76</b>
5.1. A porcdifferenciáció fiziológias progressziójának ellenőrzése sDMMK szövetteni festés segítségével.....	76
5.2. A különböző stádiumú porcsejtekből származó total proteom és izolált surfaceome minták tömegspektrometriai eredményeinek összehasonlítása .....	77
5.2.1. A total proteom és az AOB dúsított surfaceome fehérjelistáinak vizsgálata PCA elemzéssel.....	77
5.2.2. A total proteom és az AOB dúsított surfaceome fehérjelista közötti átfedés ellenőrzése.....	78
5.2.3. A total proteom és az AOB dúsított surfaceome fehérjelisták GO kifejezésekkel történő <i>in silico</i> szűrése .....	79
5.3. A különböző porcsejtek surfaceome dúsításából származó kvantitatív tömegspektrometriai eredmények DEP és PPI elemzése .....	80
5.4. Az AOB dúsított surfaceome fehérjék funkcionális csoportosítása .....	86
5.5. A különböző tenyésztési napokból származó AOB dúsított surfaceome listák kvalitatív összehasonlítása Venn-diagram segítségével .....	87
5.6. A CNTFR és a PODXL expressziójának és cellularis lokalizációjának validálása .....	88

5.7. A clusterin interakciós partnereinek és az OA-ban megváltozott expressziójának bemutatása .....	91
5.7.1. A STRING adatbázisból származó, CytoScape programmal létrehozott CLU interakciós hálózatának ismertetése .....	91
5.7.2. Az IPA tudásbázis segítségével létrehozott CLU interakciós hálózat ismertetése..	94
5.7.3. CLU hálózatképzés molekuláris aktivitáson alapuló predikció segítségével az OA kontextusában .....	96
<b>6. MEGBESZÉLÉS.....</b>	<b>98</b>
6.1. Az <i>in vitro</i> chondrogenesis sejtfelszíni fehérjeinek vizsgálata.....	98
6.1.1. A csirkeembryo végtagtelepből származó modell megbízhatósága és validálása ..	98
6.1.2. A total proteom és a surfaceome változásainak összehasonlítása a porcdifferenciáció előrehaladtával.....	98
6.1.3. A surfaceome fehérjék expressziójának temporális változásai a chondrogenesis folyamatában.....	99
6.1.4. Az újonnan felfedezett korai chondrogenikus biomarkerek (CNTFR, PODXL) azonosítása, validálása és lehetséges szerepük felderítése.....	104
6.1.5. A porcsejtek sejtfelszíni fehérje vizsgálatának limitációi és jövőbeli felhasználása .....	106
6.2. A clusterin feltételezett szerepe az osteoarthritis pathomechanizmusában .....	107
6.2.1. A CLU interakciós partnerei a STRING-Cytoscape által létrehozott hálózatban	108
6.2.2. A CLU által szabályozott molekulák az IPA tudásbázisból létrehozott hálózatban .....	111
6.2.3. A CLU molekuláris aktivitáson alapuló predikcióval létrehozott IPA hálózat az OA kontextusában .....	113
6.2.4. A CLU OA diagnosztikában, prognosztikában és terápiában történő felhasználásának limitációi és jövőbeli lehetőségei.....	116
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>118</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>119</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>120</b>
<b>10. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA .....</b>	<b>145</b>
<b>11. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS .....</b>	<b>148</b>
<b>12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>149</b>
<b>13. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE .....</b>	<b>150</b>
<b>14. FÜGGELÉKEK .....</b>	<b>152</b>

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>ACAN:</b> aggregán	<b>DLL:</b> delta-like fehérje
<b>ACM3:</b> M3 muscarin típusú acetilkolin receptor	<b>DMD:</b> disztrofin
<b>ACTN:</b> aktinin	<b>DTT:</b> ditriotreitol
<b>ADAM:</b> egy disintegrin és metalloproteináz enzim (a disintegrin and metalloproteinase)	<b>EC:</b> extracellularis
<b>ADAMTS:</b> egy disintegrin és metalloproteináz thrombospondin motívumokkal rendelkező enzim (a disintegrin and metalloproteinase with thrombosponding motifs)	<b>ECM:</b> extracellularis matrix
<b>AFM:</b> alpha-albumin	<b>EDTA:</b> etilén-diamin-tetraacetát
<b>AGA:</b> antiglikán antitest	<b>EFNA2:</b> ephrin receptor A2
<b>AMPER:</b> ammónium-perszulfát	<b>EGF:</b> epidermalis növekedési faktor (epidermal growth factor)
<b>ANXA:</b> annexin A	<b>EGFR:</b> epidermalis növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
<b>AOB:</b> aminosoy-biotin	<b>ELFO:</b> elektroforézis
<b>AP2M1:</b> AP-2 complex alegység mű	<b>ELISA:</b> enzim-kapcsolt immunoszorbens esszé (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>APO:</b> apolipoprotein	<b>ENaC:</b> epithelialis nátriumcsatorna
<b>APP:</b> amyloid- $\beta$ A4 protein	<b>EPH:</b> ephrin receptor
<b>ARF6:</b> ADP-ribosziláció faktor 6	<b>ER:</b> endoplazmatikus retikulum
<b>ATP:</b> adenzin-trifoszfát	<b>FAM169A:</b> 169-es családú homológia szekvenciával rendelkező A tag
<b>ATP7B:</b> ATPáz, réztranszportáló béta alegység	<b>FAS:</b> zsírsav szintáz
<b>BAX:</b> BCL2-asszociált X apoptózis szabályozó	<b>FBS:</b> foetalis borjú szérum
<b>BCA:</b> bicinkoninsav	<b>FC:</b> fold change
<b>BCL2L1:</b> BCL2-szerű 1	<b>FGF:</b> fibroblast növekedési faktor (fibroblast growth factor)
<b>BK:</b> nagy konduktanciájú kalcium aktiválta kálium csatorna (big conductance calcium activated potassium channel)	<b>FGFR:</b> fibroblast növekedési faktor receptor
<b>BMP:</b> csont morfogénikus fehérje (bone morphogenic protein)	<b>FN1:</b> fibronektin-1
<b>BP:</b> biológiai folyamat (biological process)	<b>FZD:</b> frizzled
<b>BSA:</b> borjú szérum albumin	<b>GAG:</b> glükózaminoglikán
<b>C7:</b> komplement fehérje C7	<b>GFRA2:</b> GDNF család receptor alpha-2
<b>C9:</b> komplement fehérje C9	<b>GO:</b> gén ontológia (gene ontology)
<b>CAC1C:</b> feszültség kapuzott L-típusú kalciumcsatorna	<b>GP:</b> glikoprotein
<b>CALM3:</b> kalmodulin-3	<b>GPCR:</b> G-fehérje kapcsolt receptor (G-protein coupled receptor)
<b>CAM:</b> sejtheadhéziós molekula (cell adhesion molecule)	<b>GPI:</b> glikozil-foszfatidilinozitol
<b>CC:</b> sejtes komponens (cellular component)	<b>HA:</b> hyaluronsav
<b>CDK1:</b> ciklin dependens kináz 1	<b>HD:</b> nagy sejtsűrűségű (high-density)
<b>CLU:</b> clusterin	<b>HH:</b> Hamburger-Hamilton felosztás
<b>CMF-PBS:</b> calcium és magnézium mentes foszfát-pufferelt sóoldat	<b>HMGB1:</b> nagy mobilitású csoport protein B1
<b>CNTFR:</b> ciliaris neurotrophikus faktor receptor	<b>HPLC:</b> nagy hatékonyságú folyadékromatográfia (high-performance liquid chromatography)
<b>COMMD1:</b> rézanyagsere Murr1 domén tartalmú fehérje	<b>HPX:</b> hemopexin
<b>CRTAP:</b> porc-asszociált protein	<b>HRP:</b> tormá-peroxidáz (horseradish peroxidase)
<b>CS:</b> chondroitin-szulfát	<b>HS:</b> heparán-szulfát
<b>CSC:</b> sejtfelszíni befogás (cell surface capture)	<b>HSP:</b> hősokk fehérje (heat-shock protein)
<b>DAPI:</b> 4,6-diamidino-2-fenilindol	<b>HSP90B1:</b> hősokk fehérje B család [Hsp90] 1. tagja
<b>DCN:</b> dekorin	<b>HSPA5:</b> hősokk fehérje A család [Hsp70] 5. tagja
<b>DDA:</b> adat dependens adatgyűjtés (data-dependent acquisition)	<b>HTRA1:</b> magas hőmérsékletű szükség A1 enzim (high-temperature requirement A1)
<b>DDR:</b> discoidin domén receptor	<b>HYAL:</b> hyaluronidáz
<b>DEP:</b> eltérő expressziójú protein (differentially expressed protein)	<b>HYOU1:</b> hypoxia által upregulált fehérje 1
<b>DIA:</b> adat independens adatgyűjtés (data independent acquisition)	<b>IC:</b> intracellularis
	<b>IDA:</b> információ dependens adatgyűjtés (information-dependent acquisition)
	<b>IGFALS:</b> insulin-szerű növekedési faktor-kötő fehérje savérzékeny alegység

**IGLL5:** immunoglobulin lambda-szerű polypeptid 5  
**IHH:** indian hedgehog  
**IPA:** ingenuity pathway analysis  
**iPSC:** indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell)  
**KC1G1:** kazein kináz-1 izoforma gamm-1  
**KO:** génkiütés (knock-out)  
**KS:** keratán-szulfát  
**LALBA:**  $\alpha$ -laktalbumin  
**LAMP:** lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein  
**LC-MS/MS:** folyadékkromatográfiával kombinált tandem tömegspektrometriai analízis  
**LMNA:** prelamin-A/C  
**LRP:** alacsony denzitású lipoprotein receptor-rokon protein  
**LYZ:** lysosim  
**LYZL4:** lysosim-szerű fehérje 4  
**MAP:** molekuláris aktivitás predikció  
**MF:** molekuláris funkció  
**MMP:** matrix metalloproteináz  
**MOCOS:** molibdén-kofaktor szulfuráz  
**mRNS:** hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleid acid)  
**MSC:** mesenchymalis őssejt (mesenchymal stem cell)  
**MSRB1:** metionin-szulfoxid-reduktáz B1  
**MYH9:** miozin-9  
**NCAM1:** neuronális sejt adhéziós molekula 1  
**NHS:** N-hidroxiszukcinimid  
**NMDAR:** N-metil-D-aszpartát receptor  
**OA:** osteoarthritis  
**ORM2:** oromucosid 2  
**OSTP:** osteopontin  
**P3H1:** prolil 3-hidroxiláz 1  
**P3H2:** prolil 3-hidroxiláz 2  
**P4HA1:** prolil 4-hidroxiláz alegység  $\alpha$ -1  
**P4HA2:** prolil 4-hidroxiláz alegység  $\alpha$ -2  
**P4HB:** protein diszulfid-izomeráz A1  
**PAGE:** poliakrilamid gélelektroforézis  
**PAX6:** páros dobozo protein pax-6  
**PBS:** foszfát-pufferelt sóoldat  
**PCA:** elsődleges komponens analízis (principal component analysis)  
**PCM:** pericellularis matrix  
**PDIA3:** protein diszulfid-izomeráz A3  
**PG:** proteoglikán  
**PLOD1:** prokollagén-lizin,2-oxoglutarát 5-dioxigenáz 1  
**PLXNA4:** plexin A4  
**PM:** plazmamembrán  
**PODXL:** podocalyxin  
**PPI:** protein-protein interakció  
**PPP2R1A:** szerin-threonin protein foszfatáz 2A regulatórikus alegység A alpha izoforma  
**PRDX6:** peroxidoxin-6  
**PRG4:** proteoglikán 4  
**PRNP:** prion protein  
**PROC:** protein C

**PTHR:** PTHrP receptora  
**PTHrP:** parathormon-rokon protein (parathormon-related protein)  
**PTM:** poszttranszlációs módosítás  
**RA:** rheumatoid arthritis  
**RAB10:** ras-rokon protein rab-10  
**RAB14:** ras-rokon protein rab-14  
**RAB5C:** ras-rokon protein rab-5c  
**RAP1B:** ras-rokon fehérje rap-1B  
**RIPA:** radio immunoprecipitációs esszé  
**RPM:** percenkénti fordulatszám (round per minute)  
**RT-qPCR:** valós idejű – kvantitatív polimeráz-lánreakció (real-time quantitative polymerase chain reaction)  
**RUNX2:** Runt-rokon transzkripció faktor 2 (Runt-related transcription factor 2)  
**S100A6:** protein S100-A6  
**SD:** standard deviáció  
**SDC4:** syndecan-4  
**sDMMK:** savas dimetil-metilénkék  
**SDS:** nátrium-dodecil-szulfát  
**SEM:** standard hiba (standard error of the mean)  
**SERPINA4:** serpin peptidáz inhibitor A család 4  
**siRNS:** rövid interferáló ribonukleinsav (short interfering ribonucleid acid)  
**SK:** kis konduktanciájú kalcium aktiválta kálium csatorna (small conductance calcium activated potassium channel)  
**SMO:** smoothened  
**SNCA:** alpha-synuclein  
**SOX9:** SRY-gént tartalmazó box 9 (SRY-box transcription factor 9)  
**SPACA:** spermium acrosoma-asszociált fehérje  
**SPRR3:** kis prolin-gazdag fehérje 3  
**SRC:** proto-onkogén tirozin-protein kináz src  
**SUPT5H:** transzkripció elongáció faktor SPT5  
**TACE:** tumor nekrosis faktor-alpha konvertáló enzim (tumor necrosis factor-alpha converting enzyme)  
**TEA:** tetraetil-ammónium  
**TEMED:** tetrametil-etilén-diamin  
**TF:** transzkripció faktor  
**TG:** transzglutamináz enzim  
**TGF:** transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)  
**TGFB2:** transzformáló növekedési faktor-beta 2  
**THBS2:** thrombospondin-2  
**TIMP3:** metalloproteináz inhibitor 3  
**TLR:** toll-like receptor  
**TRPV:** transiens receptor potenciál aktiválta vanilloid típusú ioncsatorna  
**TSP:** thrombospondin  
**TTR:** transthyretin  
**UC puffer:** urea-Tris-hidrogén-klorid puffer  
**VCAN:** vezikán mag fehérje  
**VDCC:** feszültségfüggő kalciumcsatorna (voltage-dependent calcium channel)  
**VLDLR:** nagyon kis denzitású lipoprotein receptor (very low density lipoprotein receptor)

**WNT:** Wingless-type MMTV integration site family member  
**XRCC6:** X-sugár által indukált javító fehérje 6

**YES1:** tirozin protein kináz yes-1

# 1. BEVEZETÉS

A mozgásszervrendszeri struktúrákat és a támasztószöveteket érintő degeneratív megbetegedések korunk társadalmának és egészségügyi ellátórendszerének egyik legjelentősebb, ugyanakkor egyik leginkább elhanyagolt problémája. Az idővel progrediáló elváltozások olyan krónikus, életminőséget rontó állapotok kialakulásához vezethetnek, mint például az ízületi porckopás, másnéven osteoarthritis (OA). Fontos kiemelni egy nevezéktani eltérést a magyar és az angol nomenklatúrában. Magyarul az ízületi porckopást osteoarthrosisnak nevezik, mely az ízületi felszínen bekövetkezett kopásra, mechanikai károsodásra utal. Ezzel ellentétben az angol szakirodalom az osteoarthritis kifejezést használja, mely nevet a betegség progressziója során másodlagosan megjelenő gyulladással járó folyamatok miatt kapta [1]. Az OA egy multifaktoriális etiológiával rendelkező, heterogén, nemcsak a porcszövetet, hanem az egész ízületet érintő, sokszor fájdalommal járó megbetegedés, amely a csökkent fizikai teljesítmény és a korai munkaképtelenség vezető oka. Becslések szerint 1990-ben a globális népesség 4,8%-a, azaz 256 millió ember szenvedett a betegségben. Ez az érték jelentős növekedést mutat, mivel 2020-ban a világ népességének már 7,6%-a, vagyis körülbelül 595 millió ember élt ízületi porckopással [2]. A térd a leggyakrabban érintett ízület, mivel teherhordó funkciója miatt jelentős mechanikai erőhatásoknak van kitéve. Becslések szerint az emberek körülbelül 45%-nál alakulhat ki tüneteket okozó térdízületi OA életük folyamán [3]. Magyarországon a 2019-es Európai Lakossági Egészségfelmérés (ELEF) jelentése alapján a férfiak 27%-a és a nők 37%-a szenvedett az ízületeket érintő betegségekben. Az életkor előrehaladtával az érintettség aránya növekszik: míg a fiatalok (15–34 év) körében közel 10%, a középkorúaknál (35–64 év) ~30%, az időseknél (65+ év) pedig ~60% a mozgásszervi betegségek előfordulása [4]. A Nemzetközi Osteoarthritis Kutató Társaság (OARSI) által jóváhagyott, jelenleg elfogadott definíció az OA-t a mozgatható ízületek olyan rendellenességeként határozza meg, amelyet cellularis stressz és extracellularis matrix degradáció jellemez [5]. A betegség etiopathológiájában egyrészt ízületet érintő, másrészt szisztémás kockázati tényezők is egyaránt szerepet játszhatnak. Az OA incidenciája a túlsúly és az elhízás hatására növekszik, mivel ezen állapotok fokozzák a teherhordó ízületekre nehezedő terhelést, valamint szisztémás gyulladást idézhetnek elő, amely az összes ízületet érintheti [6,7]. A beteg neme is kulcsszerepet játszik, ugyanis a nők hajlamosabbak a betegség kialakulására, valamint nonspecifikus különbségek mutatkoznak nemcsak az előfordulásban, hanem több kockázati tényező – például az elhízás – relatív kockázatában is [8]. A foglalkozási

és életmódbeli tényezők tovább növelik a betegség összetettségét; az ismétlődő és megterhelő fizikai tevékenységek fokozzák a kockázatot, emiatt az OA gyakoribb a fizikailag megterhelő munkát végzők körében [9]. Az ízületi porckopás kialakulása és előrehaladása során események láncolata indul el az ízületi struktúrákban, amelyek szisztémás gyulladás, fibrosis, ECM lebomlása, neovascularisatio és idegi sensitisatio formájában nyilvánulnak meg. Ezek a változások nem követnek szigorú időbeli sorrendet, továbbá hatást gyakorolnak a szomszédos szövetekre is, létrehozva egy összetett pathológiai állapotot, amely végső soron elősegíti a progressziót [10]. A kóros események bonyolult kölcsönhatása és a háttérben álló mechanizmusok sokfélesége is rámutat arra, hogy az OA egy rendkívül komplex betegség.

Az OA jelenleg is gyógyíthatatlan megbetegedés. A jelenlegi kezelési megközelítések (gyógyszeres és műtéti) elsősorban a tünetek csökkentésére összpontosítanak, céljuk a fájdalom enyhítése és az ízületi funkció javítása a mindennapi tevékenységek megkönnyítésének érdekében [11]. Izgalmas új irányt jelenthet az őssejt alapú terápiák kifejlesztése és a 3D bionyomtatott szövetek sebészi beültetése. Jelenleg azonban a porc-progenitorsejtek pontos karakterizálása, azok költséghatékony kinyerése a páciensből, majd autológ vagy allogén módon történő beültetése még nem kellően hatékony [12]. A különböző kezelési stratégiák előtt gátat szab továbbá a túl későn felállított diagnózis, amikor az ízületet alkotó szövetek destrukciója már visszafordíthatatlan. A diagnózis-alkotás a mai napig elsősorban a tüneteken és a fizikális vizsgálaton alapszik: a térd esetén a fájdalom megjelenése járás közben, valamint az ízületi merevség az első tünetek közé sorolhatóak. Érdeemes megjegyezni, hogy ezek a tünetek nemcsak évekkel a betegség objektív radiológiai jelei után, de azok előtt is jelentkezhetnek [13]. A röntgen a szokásos és jelenleg ajánlott képalkotó eljárás, amely segíti az OA hagyományos szerkezeti deformitásának értékelését. Ennél azonban pontosabb képet ad az ízületek korai elváltozásairól az MRI és a CT, melyek hozzáférhetősége bizonyos területeken viszont erősen korlátozott [14].

Az OA korai diagnosztikájához, valamint az őssejtterápiában alkalmazott jó minőségű porcsejtek kinyeréséhez és szortírozásához elengedhetetlen a porcszövet, valamint a porcdifferenciáció átfogó, rendszerszintű ismerete. Ezen túlmenően szükség van olyan megbízható, könnyen kimutatható biomarkerekre, melyek a későbbiekben felhasználhatóak a pontos diagnózisalkotáshoz vagy a sejt alapú terápiákhoz.

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán, az Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetben működő Chondro-omikai Laboratórium fő kutatási területe a porcsejtek biológiájának tanulmányozása. Kísérleteink célja, hogy tanulmányozzuk a porcfejlődés

különböző stádiumaira jellemző genom, transzkriptom és proteom eltéréseket, valamint feltárjuk a chondrogenesis folyamatában részt vevő szabályozó molekulákat és meghatározzuk azok pontos szerepét. Távlati célunk, hogy eredményeinkkel hozzájárulhassunk az ízületi porcbetegségek pontos, korai diagnosztikájához, hatékony terápiájának kifejlesztéséhez, valamint megbízható prognosztikájához egyaránt.

Az elmúlt esztendőben a laboratóriumunk rendszerszintű, „omikai” megközelítést és biológiai hálózatelemzést alkalmazva több olyan jelátviteli útvonalat azonosított, melyek kiemelkedő jelentőséggel bírnak a porcfejlődés szempontjából [15,16]. Az értekezésem alapjául szolgáló kísérleteket két olyan kutatási irányvonal határozta meg, amelyek szorosan illeszkednek a jelenlegi nemzetközi trendekhez. Vizsgálataink során a chondrogenesis dinamikusán változó sejtfelszíni fehérje-mintázatában bekövetkezett változások, illetve az ebből felfedezhető értékes diagnosztikai/prognosztikai biomarkerek tanulmányozása volt a célunk. Emellett az extracellularis (EC) fehérjék fiziológiás térszerkezetét biztosító, valamint a sejt-túlélést szabályozó chaperon fehérje, a clusterin *connectome*-ját is feltérképeztük bioinformatikai adatbázisok segítségével.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A porcszövet biológiájának bemutatása

#### 2.1.1. A porc általános jellemzői

A porcszövet a kötő- és támasztószövetek egy különleges képviselője, amely alapvető vázépítési és mechanikai funkciókat lát el az emberi és állati szervezetben. Kulcsszerepet játszik az embryonalis és magzati fejlődés során, mivel a korai stádiumban a legtöbb csont előalakjaként a vázrendszer kialakításában vesz részt. A növekedési (epiphysis) porckorongok segítségével az enchondralis csontosodási folyamat révén biztosítja a végtagokban található hosszú, csöves csontok postnatalis növekedését is. Mindezekon felül a porcszövet hozzájárul az ízületi felszínek borításához és az ízületi üregben található járulékos ízületi struktúrák (discusok, meniscusok) felépítéséhez, ezzel elősegítve a különböző, ízületeket érintő mechanikai terhelések elosztatását, így csökkentve az azokat ért erőhatások mértékét. Emellett szerepet játszik még az orr, a fül, a gége és a légcső vázának a felépítésében is. [17,18].

A porcszövet felépítésében két alkotóelem vesz részt: az érett porcsejtek (chondrocyták) és az általuk termelt sejtközötti állomány, másnéven extracellularis matrix (ECM), melyet a porcspecifikus tulajdonságai miatt porcmatrixnak is hívnak. Az érett sejteken kívül azonban kis mennyiségben jelen vannak a chondroprogenitor sejtek is, amelyek őssejtekre jellemző tulajdonságaik révén hozzájárulnak a porcszövet sejt-ECM egyensúlyának fiziológias fenntartásához, valamint korlátozott regenerációs képességéhez [19]. A szervezet különböző porcok területei anatómiai elhelyezkedésük és a rájuk ható mechanikai terhelések függvényében jelentős szövettani eltéréseket mutatnak. A porcszövet biomechanikai tulajdonságai, mint rugalmassága, hajlékonysága és szakítószilárdsága változó mértékben alkalmazkodik a nyomó- és nyíróerőkhöz, amelyet döntően az ECM molekuláris összetétele határoz meg. A porcszöveten belül három fő típust különböztetünk meg: hyalinporc, elasticus porc és rostos porc. A hyalin-, vagy másnéven üvegporc általában homogén megjelenésű ECM-mel rendelkezik, és rendkívüli mértékben ellenáll a nyomóerőknek. Ez a típus különösen fontos szerepet játszik a már említett enchondralis csontosodási folyamatokban. A hyalinporcon belül megkülönböztetünk egy alkategóriát, az ízületi porcot (articularis porc), melynek matrix összetétele specializálódott a változó erőhatásoknak köszönhetően. Ez a porcszövet-típus a mozgás során keletkező kompressziós erők elosztásában, valamint a súrlódás csökkentésében játszik kitüntetett szerepet az ízületi felszíneken [20]. Az elasticus porc nagyfokú

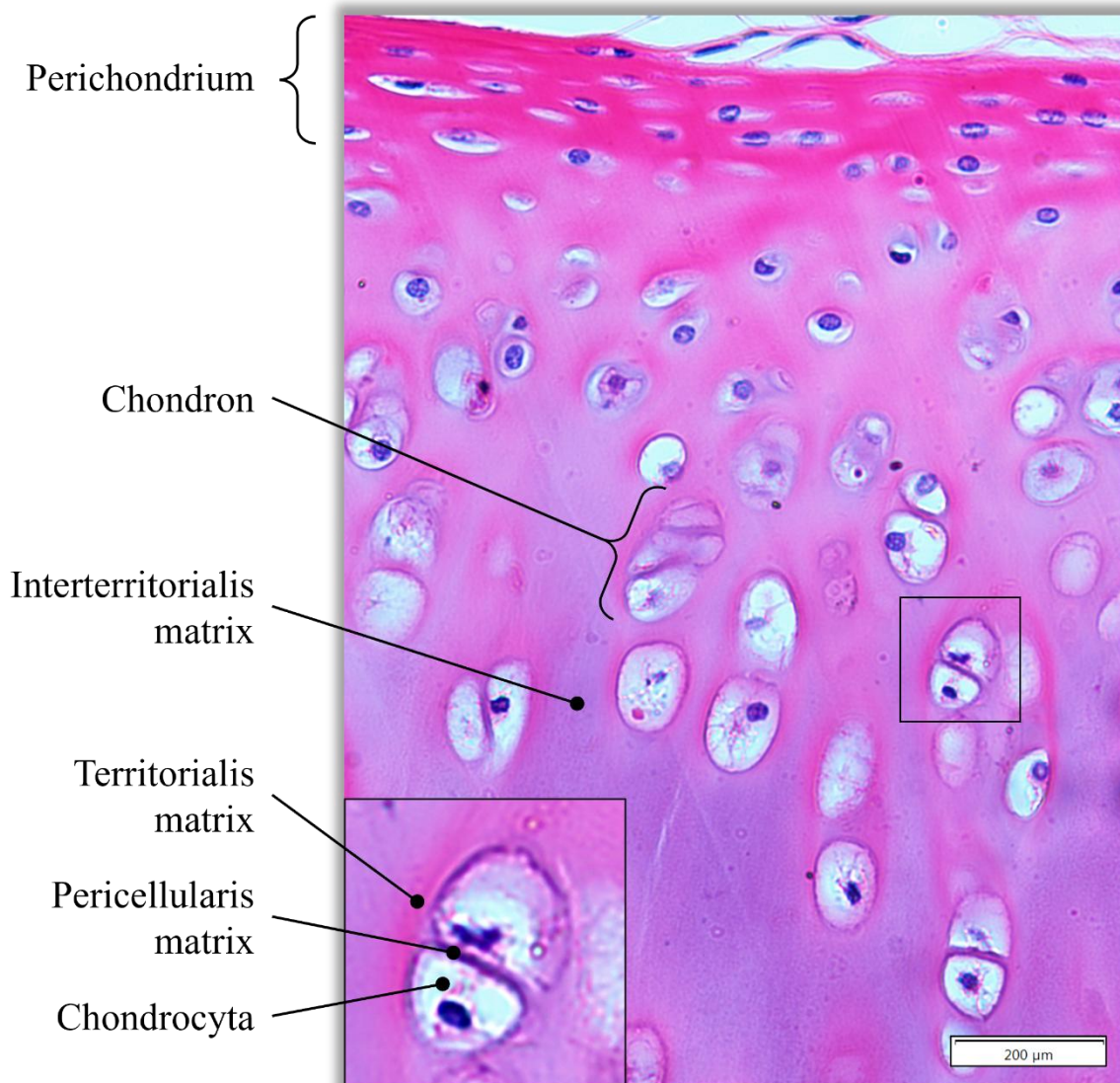
hajlékonysággal és alacsony szakítószilárdsággal rendelkeznek. Fő alkotóeleme az elasztikus rost, amely rugalmasságot biztosít. Jellemző előfordulási helye például a fülkagyló, ahol a fülporc ebből a típusból épül fel. A rostos porc elsősorban a nyíróerőkkel szembeni ellenállásáról ismert, mivel ECM-je nagyrészt kollagénrostokból áll. Ez a típus olyan területeken található meg, ahol nagyfokú nyíróerő éri a szövetet, például a csigolyák közötti porckorongokban vagy a térdízület meniscusaiban. A porcszövet típusai és biomechanikai tulajdonságai kulcsfontosságú szerepet játszanak az emberi mozgásszervrendszer stabilitásának, valamint rugalmasságának fenntartásában egyaránt [21].

Az egészséges porcszövet egyik legjellegzetesebb tulajdonsága, hogy mentes a vérér-, nyirokér- és ideghálózattól, amely alapvetően meghatározza metabolikus és regenerációs képességét. Mivel a porcsejtek nem kapnak közvetlen vérellátást, a szükséges tápanyagok és oxigén molekulák kizárólag diffúzió útján tudnak eljutni hozzájuk, legtöbb esetben a környező szövetekből. Az ízületi porcsejtek esetén ez némileg eltér, mivel az egyik fő tápanyag- és oxigénforrást egy kettős diffúziós rendszer biztosítja, amely során az említett anyagok először áthaladnak az erekből az ízületi tokon keresztül a synovialis térben lévő folyadékba, majd onnan a porcszövet ECM-en keresztül tovább diffundálnak, hogy elérjék a különböző mélységben levő chondrocytákat [22]. Ennek okán az ízületi porc teljes vastagságában oxigénkoncentrációs gradiens figyelhető meg, ahol az oxigénszint a felszíni rétegben 6%, míg a mélyebb rétegekben kevesebb mint 1%. Az artériás vér 13%-os oxigénszintjéhez képest a porchoz eljutó oxigén mennyisége tehát alacsonyabb, összehasonlítva más vázrendszeri szövetekkel, például az izomszövettel és a csontszövettel [23]. Ennek eredményeként a chondrocyták főként anaerob glikolízissel állítanak elő ATP-t, ami azonban kevésbé hatékony energiatermelési mechanizmus [24]. Ezzel szemben kimutatták, hogy aerob glikolízis (Warburg-effektus) egészséges chondrocytáiban is előfordul az anaerob glikolízis mellett, különösen fiziológiás oxigénkoncentráció megléte esetén [25,26].

A chondrocyták felelősek az őket körülvevő ECM komponenseinek szintéziséért, beleértve a kollagéneket (főként II-es típusú kollagént), proteoglikánokat (pl. aggregán) és glükózaminoglikánokat (pl. hyaluronsav), amelyek együttesen biztosítják a porc biomechanikai tulajdonságait, mint a rugalmasságot és a kompressziós ellenállást [27]. Ugyanakkor a porcsejtekre is visszahat az ECM minőségi és mennyiségi összetétele, mely befolyásolni képes a chondrocyták fenotípusát, kialakítva egy oda-vissza ható sejt–ECM hatásmechanizmust [28]. Mivel kutatásaink tárgyát elsősorban a hyalinporc képezte, emiatt a következőkben ezt a porctípust ismertetem részletesebben.

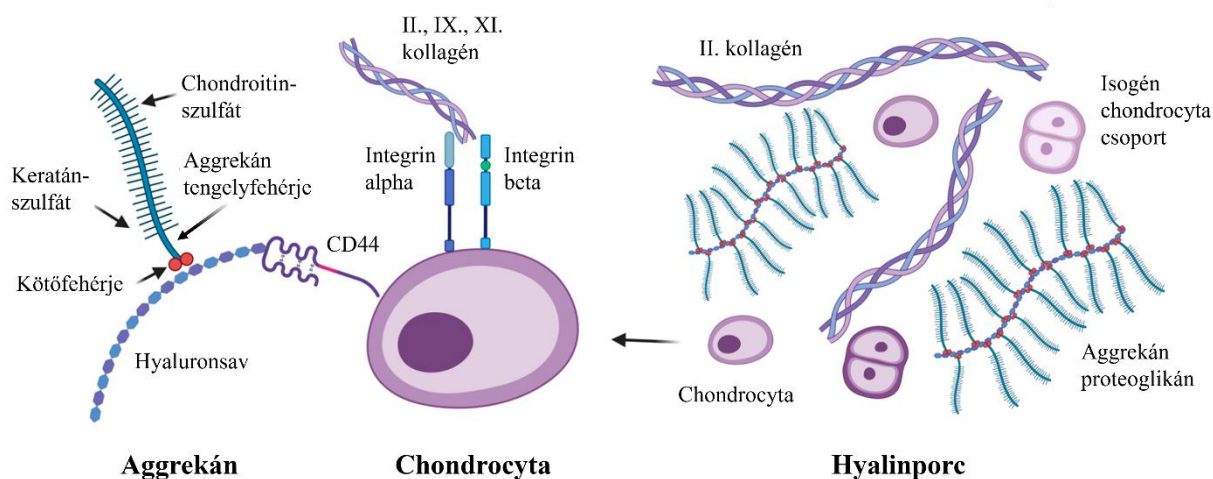
### 2.1.2. A hyalinporc felépítése és tulajdonságai

Az érett chondrocyták és az általuk dinamikusan fenntartott ECM egyedi egésszet alkot. A porc szövettani alapegysége a chondron, amely a hyalinporc esetében általában 2–4, de ritkán 8 gömbszerű porcsejt szoros kapcsolódásából, az őket egyenként körülvevő vékony pericellularis matrixból (PCM), valamint az egy chondronhoz tartozó sejtesoport körül elhelyezkedő territorialis matrixból áll (2.1. ábra). A chondronok közötti terület interterritorialis matrixnak nevezzük, amely az ECM legnagyobb részét alkotja [29]. Maguk a porcsejtek lacunákban, azaz apró üregekben helyezkednek el, amelyeket az ECM ölel körbe. A légutak állandósult hyalinporcát, valamint az enchondralis csontosodás során átmeneti templátként szolgáló porcot egy külső réteg, a porchártya (perichondrium) borítja. A porchártya külső rétege rostós kötőszövetből épül fel, míg a belső réteg differenciálatlan sejtekben gazdag. Ezek az éretlen, chondroprogenitor sejtek osztódásra képesek, ezáltal hozzájárulnak mind a porcszövet növekedéséhez, mind annak korlátozott regenerációjához. A chondroprogenitor sejtekből chondroblastok differenciálódnak, amelyek a porc belsejébe vándorolva jelentős mértékben képesek szintetizálni az ECM komponenseit, így elősegítve a porc növekedését és vastagodását. A porcszövettel ellentétben a porchártya ereket és idegvégződéseket is tartalmaz, amelyek fontos szerepet játszanak a porc táplálásában és a környező szövetekkel való kapcsolattartásban. Érdekesség, hogy sérülés esetén a porchártya csak korlátozott mértékben képes támogatni a porc regenerációját. Ahelyett, hogy kizárólag új porcszövet képződne, a megújulási folyamatok során inkább csontszövetre jellemző makromolekulák termelődése válik dominánssá, ami jelentősen limitálja a sérült porc funkcionális helyreállíthatóságát [30].



**2.1. ábra: A hyalinporc szövettani felépítésének ábrázolása humán hematoxylin-eosin festett trachea metszeten (objektív: 20X).** A porcot kívülről porchártya borítja, mely főként I-es típusú kollagénrostokból és differenciálatlan sejtekből épül fel. A porc mélyebb rétegeiben több porcsejt együttese alkotja a szövet alapvető szerkezeti egységét, a chondront. A chondrocyták körül elhelyezkedő ECM három rétegre osztható: közvetlenül a sejtek körül helyezkedik el a pericellularis matrix, amely védelmet nyújt és szabályozza a sejtek mikrokörnyezetét; a teljes chondront kívülről határolja a territorialis matrix, amely főként kollagénrostokból áll és szerkezeti stabilitást biztosít; míg a chondronok közötti teret az interterritorialis matrix tölti ki, amely a porc fő térkitöltő és mechanikai erőhatásokat elosztó komponenseként működik. (Forrás: DE-ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstan Intézet oktatási segédanyagának metszetkészlete.)

A hyalinporc ECM-jének főbb alkotóelemei a különböző típusú kollagének, a negatív töltéssel rendelkező glükózaminoglikánok (GAG) és proteoglikánok (PG) (2.2. ábra). Ezenfelül nagy mennyiségben tartalmaz ionokat és vizet: a hyalinporc teljes térfogatának 70–80%-át víz teszi ki. Ezzel szemben az ECM száraz tömegének 50–70%-át elsősorban a kollagének és proteoglikánok adják [31].



**2.2. ábra: A hyalinporc ECM-et alkotó komponensek szerkezeti viszonyát bemutató sematikus ábra.** A matrix jellegzetes szerkezeti egységei a nagyméretű proteoglikán aggregátumok, amelyek aggregátum tengelyfehérjékből, az ezekhez kapcsolódó chondroitin-szulfát és keratán-szulfát glükózaminoglikán (GAG) oldalláncokból, valamint egy központi hyaluronsav láncból épülnek fel. Egy ilyen aggregátum körülbelül 20–30 aggregátum molekulát tartalmaz, amelyek kötőfehérjéken keresztül kapcsolódnak a hyaluronsav gerincéhez, ezáltal létrehozva egy összetett és stabil szerkezetet. A hyaluronsav a CD44 transzmembrán receptorhoz, ezzel szemben a II-es, IX-es és XI-es kollagén fehérjék pedig a dimerizálódott integrinokhoz kapcsolódva képesek kommunikálni a porcsejtekkel. (Forrás: [31], módosítva)

Az egészséges hyalinporc kollagéntartalmának 90–95%-át a II-es típusú kollagén alkotja [32]. A II-es típusú kollagén molekulái nagyobb távolságra helyezkednek el egymástól, mint az I-es típusú kollagéneké, ami a glikozilált hidroxilizin oldalláncok jelenlétének köszönhető. Ez lehetővé teszi, hogy a II-es típusú kollagén 50–100%-kal több vizet raktározzon, mint az I-es típusú kollagén [33]. A II-es típusú kollagén vízmegkötő képessége fontos lehet az ozmotikus tágulás korlátozásában és a kompressziós erők elosztatásában, ami megmagyarázza, hogy miért van ez a kollagéntípus legnagyobb mértékben jelen az egészséges hyalinporcban [33]. Bár ezen szövettípusban a legnagyobb mennyiségben a II-es típusú, részben I-es típusú kollagénrostok találhatók, emellett kisebb koncentrációban jelen van számos, úgynevezett minor kollagéntípus is, amelyek szerepe a rostok kölcsönös megerősítése [34]. A minor kollagéneket a porcban betöltött szerepük alapján több csoportba lehet osztani. A „fibrillum-asszociált kollagének” közé sorolhatóak a III-as, V-ös, IX-es, XI-es, XII-es, XIV-es, és XVI-os típusúak, melyek enzimatis módon kovalens keresztkötéseket hoznak létre, ezáltal erősebb és érettebb kollagénhálózatot alakítanak ki [35]. Másik ilyen csoport a „chondrocyta homeostasiszt fenntartó kollagének”, a IV-es és VI-os típusú kollagén. A IV-es típusú kollagén tetramer hálózatot alkot az ízületi porc PCM-ben, ahol szerepet játszik az ízületi chondrocyták

életképességének és fenotípusának fenntartásában [36]. A VI-os típusú kollagénről jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk, azonban jelenlétét szintén leírták a PCM régióban [37] és feltételezik, hogy kiemelkedő szereppel bír a sejt–sejt és a molekulák közötti interakciókban. Knock-out (KO) állatmodellben a VI-os típusú kollagén kiütése megduzzadt sejteket és a PCM csökkent integritását eredményezte, ami feltételezi ezen kollagénmolekula porcsejt homeostasist szabályozó szerepét [38]. Végezetül a harmadik csoportja a minor kollagéneknek az „interfaciális kollagének”, melybe a X-es, XIII-as, XXII-es és XXVII-es típus tartozik. Bár a legtöbb fajta chondrocyta nem termeli, a hypertrophiás chondrocyták kollagéntermelésének körülbelül 45%-át a X-es típusú kollagén teszi ki [39]. Térben és időben szoros összefüggést mutat az enchondralis csontosodással, ezért a porc hypertrophia biomarkereként tekintenek rá [40]. A XIII-as típusú kollagén az egyetlen olyan kollagén a porcban, amely áthalad a sejtmembránon. Megfigyelhető a perichondriumban, a hypertrophiás és proliferatív porcban egyaránt [41]. A XXII-es típusú kollagén a különböző szövettípusok találkozásánál fejeződik ki, például az ízületi porc és a synovialis folyadék határán, ahol fibrillinhez vagy a VI-os típusú kollagénhez kötődik [42]. A XXVII-es típusú kollagén, hasonlóan a X-es típusú kollagénhez, az osteochondralis junkció közelében található, és az enchondralis csontosodásban tölt be szerepet [43], továbbá kimutatták a növekedési porckorong PCM-jében is [44]. Látható, hogy a hyalinporc megfelelő működéséhez elengedhetetlen a kollagén molekulák különböző típusainak térben és időben összehangolt megjelenése. Azonban ezen harmónia megbomlásával a porcszövet elveszíti a funkcióját betöltéséhez szükséges biomechanikai tulajdonságait.

A kollagének mellett a porcszövetben a méret és összetétel szempontjából a GAG-ok és az aggregánok (ACAN) szintén nagy mennyiségben vannak jelen. Utóbbiak több mint 100 chondroitin-szulfát (CS) és keratán-szulfát (KS) GAG láncot tartalmaznak, amelyek egy központi tengelyfehérjéhez kötődnek. Az ACAN-okat a hyalinporc fő proteoglikánjaiként tartják számon, amelyek hyaluronsavval (HA) kölcsönhatásba lépve komplex aggregátumokat alkotnak [45]. Az így létrejövő aggregátumok elsősorban a porcszövet szilárdságának biztosításáért és a jelentős mechanikai terhelések elviseléséért felelősek [46]. Léteznek az ACAN-nál rövidebb és kevésbé strukturált láncokkal rendelkező PG-k is, melyek képesek kölcsönhatásba lépni a kollagénmolekulákkal. A decorin, a biglycan és a fibromodulin a fehérjékhez hasonló szerkezeti sajátosságokkal rendelkeznek, azonban funkciójuk eltér a GAG-okétól. Mind a decorin, mind a fibromodulin képes kölcsönhatásba lépni a II-es típusú kollagén rostokkal a matrixban, és szerepet játszhatnak a fibrillogenezisben (rostképződésben), valamint a fibrillumok közötti kapcsolatok szabályozásában [47]. A HA az ACAN-okkal együtt

aggregátumokat képez, amelyeket egy kötőfehérje stabilizál. Az így létrejövő térbeli hálózat az ízületi porc kollagén fibrilláris szerkezetébe ágyazódik, biztosítva annak szerkezeti stabilitását és biomechanikai funkcionalitását [48]. A HA–ACAN aggregátumok negatív töltésűeknek és ezáltal a pozitív ionok megkötésének köszönhetően befolyásolják a porc víztartalmát és hozzájárulnak a fiziológiás hidrosztatikus nyomás fenntartásához. A szerkezeti és ozmotikus funkciójukon túl az ACAN molekulák elősegítik az oldott anyagok és létfontosságú tápanyagok mozgását is a hyalinporcban [49,50].

Az egészséges ECM fenntartásához elengedhetetlen a sérült komponensek lebontása, majd újak termelése a helyükre. Az ECM *remodelling*-ben vagy másnéven ECM átalakításban különböző típusú enzimek vesznek részt [51]. A matrix metalloproteinázok (MMP-k) egy kalciumfüggő, cinket tartalmazó endopeptidáz család, amely számos molekulát képes lebontani, beleértve az ECM bizonyos komponenseit, növekedési faktorokat, citokineket, adhézions és jelátviteli molekulákat [52]. Más cink-függő proteázcsalád tagjai közé sorolhatók az ADAM és ADAMTS enzimek [53]. Az ADAM proteázok transzmembrán fehérjék, amelyek diszintegrin-, cisztein-gazdag és epidermalis növekedési faktor (EGF) doméneket tartalmaznak. Ezzel szemben az ADAMTS proteázok az ECM-be szekretálódnak, és EGF-motívumok helyett I-es típusú TSP (trombospondin) motívumokat hordoznak. Mindkét proteázcsoport számos célpontot bont le, és egyaránt részt vesz az ECM normál, valamint kóros átalakulási folyamataiban is [53]. A cisztein-katepszinek, bár főként az intracelluláris (IC) endolysosomal kompartmentekben találhatóak meg, az EC térben is leírták már szerepüket, melynek során számos ECM és adhézions molekulát bontanak le. Egyes katepszinek kiválasztódnak az ECM-be, és az enyhén savas környezetben – amilyen jellemző például az OA esetén is – továbbra is aktívak maradnak [54]. A proteázokon kívül a GAG-bontó enzimek is szerepet játszanak az ECM átalakításában. Az emberi szervezetben eddig hat hyaluronsav-bontó enzimet (hyaluronidázokat) írtak le: HYAL-1, -2, -3, -4, HYALP és PH20. Egy másik fontos GAG-bontó enzim, amely jelentős szerepet játszik az ECM szerkezetének módosításában, a heparanáz. A heparanáz egy endoglükuronidáz, amely lerövidíti a PG-khoz kötött heparán-szulfát (HS) láncokat, miközben bioaktív, 4–7 kDa méretű HS-fragmenseket szabadít fel [55]. A szolubilis formája a HS-nek aktiválja az MMP3 és MMP13 enzimeket, csökkenti a II-es típusú kollagén mRNS expresszióját, valamint olyan katabolikus fenotípusú chondrocyták megjelenését segíti elő, amelyek az OA-ra jellemzőek [56].

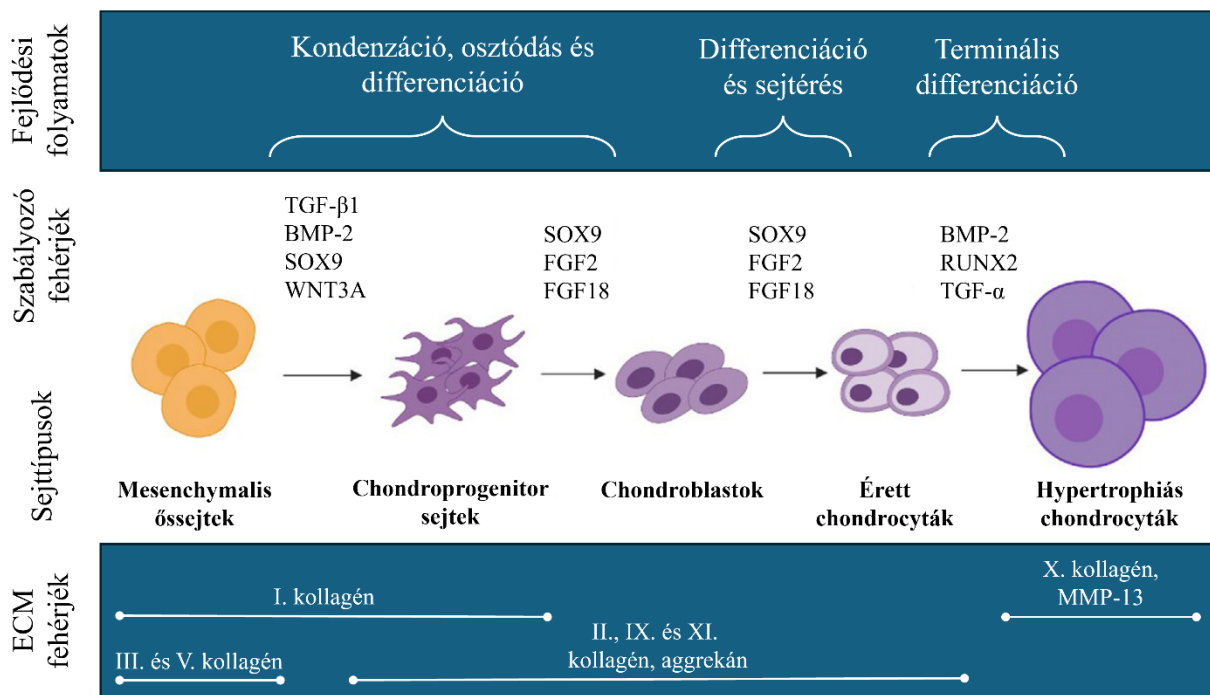
Az előzőekből látható, hogy az ECM nemcsak passzív strukturális szereppel rendelkezik, hanem aktív biológiai vázanyag is egyben. Az ECM-et az adott porcszövetben

található sejtek maguk állítják elő és tartalmazza azokat a bioaktív jeleket, amelyek irányítják a sejtek tapadását, proliferációját és differenciálódását [57]. Ezáltal a sejtek képesek az ECM komponensek segítségével a saját fejlődésüket autokrin módon irányítani. Az általuk termelt növekedési faktorok megkötődnek a PCM-ben, és elősegítik az *in vitro* chondrogenesist, anélkül, hogy további növekedési faktorok bevonására lenne szükség [58]. A PCM molekuláris összetétele eltér az ECM többi részétől, és változatos biomechanikai tulajdonságokat biztosít számára, valamint lehetővé teszi, hogy a fizikai ingereket molekuláris jelátviteli útvonalakká alakítsa, mely folyamatot mechanotranszdukciónak nevezünk [59]. A mechanikai ingerek alapvető szerepet játszanak a chondrocyták differenciálódásában és az ízületek kialakulásában, ami kiemeli a biomechanikai mikrokörnyezet fontosságát a fejlődés során [60]. Egyik példa a mechanojelátvitelre a különböző típusú kollagének integrinhez történő kötődése, mely után többek között a MAPK–ERK jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolják a porcfejlődést [61]. A porcdifferenciáció egy másik fontos szabályozó útvonala a hyaluronsav kapcsolódása a receptorához, a CD44-hez [62].

### 2.1.3. A porcdifferenciáció folyamatának áttekintése

A vázrendszer fejlődése során a chondrocyták elsősorban mesodermális (de a fej-nyak terület esetén crista neuralis) eredetű mesenchymalis őssejtekből (MSC-kből) alakulnak ki, és olyan porc előalakokat hoznak létre, amelyek később a fejlődő csont alapját képezhetik [63]. A porcfejlődés, vagy chondrogenesis az MSC-k kondenzációjának eredményeként megy végbe, mely sejtek kezdetben I-es, III-as és V-ös típusú kollagéneket fejeznek ki. Ezt követően a chondroprogenitor sejtek differenciálódása során megjelennek a porc-specifikus kollagének, köztük a II-es, IX-es és XI-es típusú, amelyek meghatározó szerepet játszanak a porcszövet kialakulásában [64]. Ebben a stádiumban a sejtek egymáshoz közel kerülnek, és nagy sejtsűrűségű nodulusokat képeznek. A fejlődés ezen szakaszában a sejtek egyre nagyobb mennyiségben kezdik expresszálni a sejt–sejt közötti adhéziónak molekulákat, például az N-kadherint és az idegi sejtadhéziónak molekulát (N-CAM) [65,66]. Ezzel párhuzamosan fokozódik a sejt–matrix adhéziónak molekulák, mint például a tenascin, szindekán és fibronectin szintézise is [67]. Ennek eredményeként a sejtek morfológiája jelentős változáson megy keresztül: a nagyszámú sejt–sejt és sejt–matrix adhéziónak kialakulását követően nyúlványaik fokozatosan visszahúzódnak, és alakjuk egyre jobban kerekdeddév válik [68]. A chondroprogenitor sejtekből először gömbölyű chondroblastok fejlődnek (2.3. ábra), melyek a fejlődő porcmatrix legnagyobb részét termelik. Ezt követően a chondroblastok tovább differenciálódnak érett

chondrocytákká, melyek az ECM komponenseit egyszerre termelik és lebontják, ezáltal egy dinamikus változó közeget képezve maguk körül. Végezetül az érett porcsejtek az átmeneti porcok (pl. epiphysis porckorong) esetén hypertrophiás chondrocytákká alakulnak, melyek az enchondralis csontosodás irányába változtatják a képződő szövet tulajdonságait. Ez az átalakulás a permanens ízületi porc esetén nem játszódik le. A chondrogenesis egy több lépcsős folyamat, melyet számos külső és belső faktor összehangolt működése szabályoz. Ezen mechanizmusok közé tartozik az eltérő növekedési faktorok által befolyásolt jelátvitel, a különböző biomechanikai erők által aktivált mechanotranszdukciós útvonalak, valamint a sejtmembránban található ioncsatornák áteresztőképessége, mely folyamatok összjátéka egy többszinten kontrollált, összetett, egymásra kölcsönható jelátviteli rendszert alkot.



**2.3. ábra: A chondrogenesis sematikus folyamatábrája.** Rajta találhatóak a fejlődési folyamatok, a főbb szabályozó fehérjék (a teljesség igénye nélkül), a különböző stádiumokra jellemző sejtípusok és az általuk termelt karakterisztikus ECM komponensek. (Forrás: [69], módosítva)

Elsőként a növekedési faktorok porcfejlődésben betöltött szerepét fogom áttekinteni. A chondrogenesis szabályozásában a fibroblast növekedési faktor (FGF18) [70], a transzformáló növekedési faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), a csont morfogénikus fehérjék (BMP) [71,72] és a Wnt [73] jelátviteli útvonalak kölcsönhatása játszik szerepet [74]. A SOX9 és a RUNX2 két kulcsfontosságú transzkripciós faktor, amelyek elengedhetetlenek az ízületi porc

kialakulásához, a hypertrophiás porcsejtek éréséhez és az enchondralis csontosodáshoz [75,76]. A SOX9 a DNS azon enhanszer régióhoz kötődik, melyek a porcmatrix alkotóit kifejező gének közelében találhatóak, melyekről többek között a II-es és XI-es típusú kollagén, valamint az aggregán tengelyfehérje fejeződik ki. A COL10A1 és MMP13 a hypertrophiás chondrocyták markerei, amelyek közvetlen célgénjei a RUNX2 transzkripciós faktornak [69]. A SOX9 közvetlenül gátolja a RUNX2-t [77], miközben a TGF- $\beta$  és a BMP eltérő módon szabályozzák a Wnt/ $\beta$ -katenin jelátviteli útvonalat, mely végül a RUNX2 aktiválásához, ezáltal a csontfejlődés irányához vezet [78]. A SOX9 és  $\beta$ -katenin közötti egyensúly tehát meghatározza, hogy a fejlődő sejtek a chondrogenesis vagy az osteogenesis irányába differenciálódnak [76]. Újabb kutatások azt is jelzik, hogy az epidermalis növekedési faktor receptor (EGFR) jelátviteli útvonala szerepet játszik az enchondralis csontosodás szabályozásában a fejlődő növekedési porckorongban [79]. Az EGFR egyik ligandja, a TGF $\alpha$  pedig elnyomja az ízületi chondrocyták fenotípusát, amelyet a Rho/ROCK és a MEK/ERK jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül ér el [80].

Az egészséges porcfejlődéshez nem csak a szolubilis ligandok megfelelő receptorhoz való kapcsolódása szükséges, hanem számos biomechanikai hatás is szerepet játszik benne. A dinamikus mechanikai terhelés fokozza a porcspecifikus transzkripciós faktorok és az ECM-komponensek génexpresszióját csirke és egér-eredetű primer chondroprogenitor sejt kultúrákban, valamint elősegíti a chondrogén irányú differenciációt [81-83]. A mechanikai jelek többféle módon befolyásolhatják a chondrocyták működését. Ezek egyike az integrin jelátvitel, amely kulcsszerepet játszik a sejtek mechanikai érzékelésében [61]. Az ízületi porc mechanikai terhelése az ioncsatornák több képviselőjének is az aktiválásához vezet, beleértve a feszültség- és mechanoszenzitív csatornákat: BK, SK [84], TRPV4 [38] és a PIEZO1/2 [85]. A primer cilium számos, különféle plazmamembrán fehérjét hordoz, melyek funkciója és specifikus lokalizációja fontos szerepet játszik a chondrocyták mechanotranszdukciójában [86]. Ezenkívül a sejtmag deformációja [87] és az aktin cytoskeleton átrendeződése [88] szintén fizikai ingerek hatására következhet be, melyek befolyásolni képesek a chondrogenesist. A biomechanikai tényezők sokféle jelátvitelt aktiválnak, többek között a YAP/TAZ, Rho/ROCK, FAK, PKA, MAPK, PP2A és NF- $\kappa$ B útvonalakat [83,89]. Ezen szignáltranszdukciók következtében erősödik azoknak a géneknek az expressziója (pl. ACAN, COL2A1, SOX9, valamint TGF- $\beta$ 1 és FGF-2), melyek elősegítik a chondrogenikus differenciációt [90]. Az FGF-2 segít fenntartani a chondrocyták porc irányú elköteleződését [91], és indukálja a GAG komponensek akkumulációját az ECM-ben, elősegítve a porcmatrix

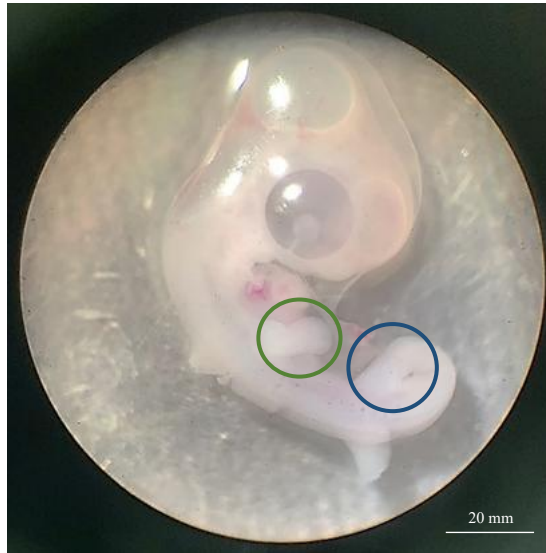
optimális minőségét [92]. Ezen információk ismeretében belátható, hogy az ideális mértékű mechanikai erőhatások, valamint az azokat felfogó sejtstruktúrák és ECM komponensek megléte esszenciális a porcfejlődés folyamatában.

#### 2.1.4. Csirke embryonalis végtagtelep-progenitorok: egy *in vitro* porcdifferenciációs modell

A porcképződés a gerincesek embryonalis fejlődésének korai szakaszában megy végbe, ami megnehezíti a chondrogenesis szabályozó mechanizmusainak *in vivo*, azaz élő szervezetben történő tanulmányozását. Azonban a XX. század második felében a kutatók olyan *in vitro* modelleket fejlesztettek ki, amelyek lehetővé tették a porcdifferenciáció laboratóriumi körülmények közötti vizsgálatát [93]. Ezek a modellek számos előnnyel rendelkeznek: egyszerűen elkészíthetőek, könnyen reprodukálhatók, valamint létrehozásuk és fenntartásuk is költséghatékony [94], ennek köszönhetően még napjainkban is széles körben alkalmazzák a tudományos közösségben.

A gerinces élőlényekben a csontvázrendszer fejlődésének első lépéseként az ektoderma és a mesoderma csíralemezeiből származó multipotens mesenchymalis sejtek a test meghatározott területeire vándorolnak, ahol fejlődő végtagbimbókat kezdenek létrehozni, miközben kondenzálódnak és elköteleződnek a támasztószövetek differenciálódásának irányába, ezáltal megjelennek az első chondrocyták [95]. A primer sejt kultúrákat gyakran csirkeembryok végtagtelepeinek felhasználásával hozzák létre (2.4. ábra). A Hamburger–Hamilton-féle rendszer szerint ezek az embryok a 22–24-es stádiumot érték el, ami körülbelül 4,5 napos fejlődési kort jelent [96]. Ez a fejlődési szakasz kritikus, mivel ekkor kezdődik a mesenchymalis sejtek kondenzációja és porcprogenitor sejtekké való alakulása. A végtagbimbókból izolált chondroprogenitor sejtek szuszpenziójának cseppentésével úgynevezett nagy sejtsűrűségű (high-density, HD) vagy másnéven micromass sejt kultúrák hozhatók létre, ahol a sejtsűrűség eléri a 10–15 millió sejt/ml értéket [97]. Ezekben a kultúrákban a sejtek kitapadása után a porcsejt-differenciáció lépései következnek be, hasonlóan az *in vivo* folyamathoz. A modell egyik előnye, hogy a sejt kultúrákban már a 3. tenyésztési napra a sejtek véglegesen elköteleződnek a porcfejlődés irányába, és ezt követően a 6. napig egyre több porcmatrixot termelnek [15]. Ez lehetővé teszi, hogy viszonylag rövid idő alatt jelentős mennyiségű információt nyerjünk a porcképződés folyamatáról. A porcsejt-differenciáció jól meghatározott időbeli lefutása lehetővé teszi a chondrogenesis különböző stádiumainak vizsgálatát, ezáltal alkalmas biomarkerek felfedezésére, valamint géncsendesítést igénylő,

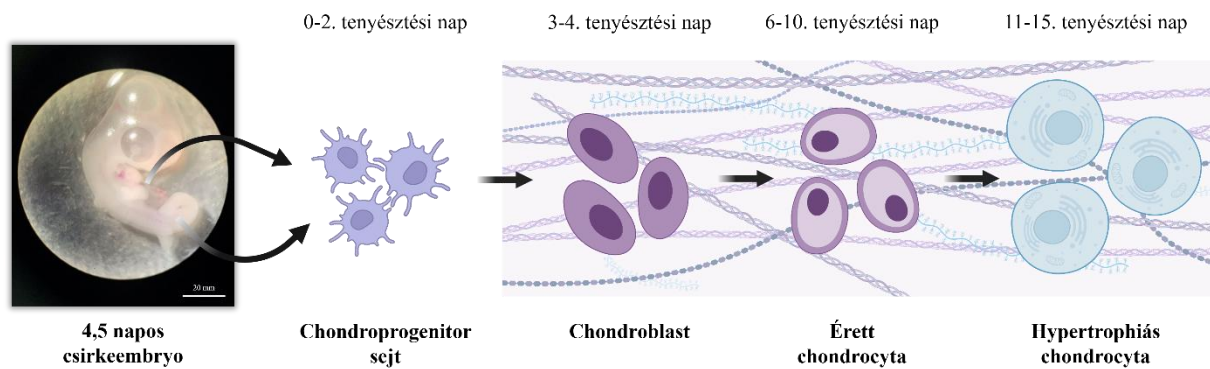
különböféle funkcionális kísérletekre egyaránt. A micromass kultúrák azért is előnyösek, mert egyszerűen szabályozhatók és reprodukálhatók, így széles körben alkalmazzák őket a porcképződés mechanizmusainak tanulmányozásában.



**2.4. ábra:** A képen egy 4,5 napos csirkeembryo fénymikroszkópos felvétele látható. Az embryoról a tojásból való eltávolítást, illetve a különböző embryonalis burkok és hártályak leválasztását követően készült a felvétel. A végtagtelepek még intaktak és az embryo törzséhez csatlakoznak. A mellső végtagtelepet zöld, a hátsó végtagtelepet kék kör jelöli.

A sejtek izolálásának és a tenyésztőfelületen történő megtapadásának napját tekintjük a sejttenyészet kezdő napjának (0. nap) (2.5. ábra). Az első két nap során a chondroprogenitor sejtek intenzív osztódáson mennek keresztül, miközben aktív sejtmigrációval elkezdnek összekapcsolódni egymással, ami elősegíti a kezdetleges porc-nodusok létrejöttét. A sejtek szoros közelsége szükséges a porcirányú differenciáció létrejöttéhez. A 3. tenyésztési napra a sejtek morfológiája jelentős átalakuláson megy keresztül, alakjuk egyre gömbölydedebbé válik, elveszítik sejtnyúlványaikat. Ebben a szakaszban a sejt kultúrát már elsősorban chondroblastok alkotják. Bár az osztódási aktivitásuk fokozatosan lassul, ebben az időszakban kezdődik meg az ECM porc-specifikus alkotóelemeinek nagymértékű szintézise, amely elengedhetetlen a fiziológias porc szövet létrehozásához és az autokrin módon történő differenciáció folytatásához. A 4. és 6. nap között a sejtek fokozatos érési folyamaton mennek keresztül, amelynek eredményeként a hatodik tenyésztési napra a sejttenyészet döntően érett chondrocytából áll. Ekkorra a porcsejtek már jelentős mennyiségű ECM-et termeltek maguk köré, amely hozzájárul a sejttenyészet szerkezeti stabilitásához. Külön érdekesség, hogy a 10.

napot követően a primer porcosodó micromass kultúrákban megfigyelhetők az enchondralis csontosodás jellegzetes folyamatai. A 10. és 15. tenyésztési nap között az ECM-ben mineralizációs jelek már kimutathatóak, miközben a porcsejtek génexpressziós profilja egyértelműen hypertrophia irányú differenciálódásra utal.



**2.5. ábra: Az *in vitro* porcdifferenciáció lépéseinek sematikus ábrázolása.** A végtagtelepekből származó sejtek kikapadnak a tenyésztőedény aljára a tenyésztés 0. napján. A chondroprogenitor sejtek a 0. és 2. tenyésztési napok között nagymértékű osztódást mutatnak, megindul a kondenzáció, amely hozzájárul a porc-nodusok kialakulásához. A 3. tenyésztési napra a sejtek elveszítik nyúlványos megjelenésüket és kerekdeddéválnak, és elkezdik termelni a porcszövetre jellemző ECM alkotókat. Ekkorra a sejt kultúrákat döntően chondroblastok alkotják. A sejtek ezután tovább differenciálódnak, a micromass sejtenyészetet a 6. tenyésztési napra elsősorban érett chondrocytákat tartalmaz, amelyek fenntartják környezetükben a porc-specifikus ECM-et. A 10. tenyésztési napot követően a sejtek tovább haladnak az enchondralis csontosodás irányába és hypertrophiás chondrocytékká alakulnak (Forrás: saját ábra, Biorender felhasználásával)

Az embryokból izolált, primer, HD kultúrák egyik legjelentősebb előnye, hogy a porcdifferenciáció spontán módon bekövetkezik, anélkül, hogy szükség lenne a sejttenyésztő médium kiegészítésére különféle növekedési faktorokkal vagy stimuláló ágensekkel. Ez részben a sejtek egymáshoz közeli elhelyezkedésének köszönhető, mivel az így létrejövő sejt-sejt kommunikáció elindítja azokat a jelátviteli folyamatokat, melyek a chondroprogenitor sejtek porc-irányú differenciációjához szükségesek. Ugyanakkor fontos figyelembe venni bizonyos limitáló tényezőket is, amelyek korlátozhatják a primer micromass kultúrák alkalmazhatóságát. A sejtek izolációja során előfordulhat, hogy a mesenchymalis őssejtek mellett fibroblastok, izom- vagy hámsejtek is bekerülnek a tenyésztetbe. Bár ezek a sejt-típusok a sejttenyésztet fejlődése során jellemzően fokozatosan eltűnnek, kezdetben mégis inhomogenitást okozhatnak. Továbbá, a fiziológiai *in vivo* fejlődési környezetet egy *in vitro* rendszerben nem lehet tökéletesen reprodukálni, így a primer micromass kultúrákban kialakuló porcszerkezet kevésbé komplex, mint az élő szervezetben létrejövő porcszöveté. Egy további

kihívást jelent, hogy a leggyakrabban alkalmazott csirkeembryo modellek evolúciós szempontból távolabb állnak az emberi szervezettől az emlősállatok modelljeihez képest. Ennek ellenére számos kutatás rámutatott arra, hogy a porcfejlődés molekuláris mechanizmusai nagyfokú hasonlóságot mutatnak az emlősök és a madarak törzsfjlődéstani osztályai között, így a csirkeembryo-alapú vizsgálatoknak van tudományos relevanciája.

Más megközelítésben a HD kultúrák nemcsak primer sejtekből, hanem immortalizált mesenchymalis eredetű sejtvonalak felhasználásával is létrehozhatók. Ugyanakkor ezek a sejtvonalak jellemzően csak speciális növekedési faktorok és egyéb mitogének hozzáadásával tarthatók fenn, amelyek befolyásolják a sejtmiótot. További nehézséget jelent a fenotípusos heterogenitás, amely az ismételt passzálásokkal fokozatosan növekszik, ezáltal torzíthatja a kísérleti eredményeket. Mivel az MSC-k multipotensek, ezért differenciációs lehetőségei szélesebb spektrumot fednek le, így nem megfelelő környezeti tényezők esetén könnyen eltérő fejlődési irányt vehetnek (pl. csont-, zsír- vagy izomsejtek), ami heterogénebb sejt kultúrákhoz vezethet a primer kultúrákhoz képest.

Az *in vitro* porcképződés során a végtagbimbókból izolált porcprogenitor sejtek differenciálódása során a hyalinporcra jellemző fenotípus válik dominánssá, emiatt az így létrejövő sejt kultúrák az üvegporc vizsgálatára alkalmasak. Mivel az ízületi porc hasonló mechanizmusok révén alakul ki, a modell alkalmazása indokolt lehet az ízületi porcfejlődés vizsgálatában is. Azonban a porcdifferenciáció molekuláris útvonalainak feltérképezése nemcsak a porcdefektusok kialakulásának megértésében segíthet, hanem hozzájárulhat új terápiás lehetőségek kidolgozásához is. Fontos megjegyezni, hogy a primer kultúrákban a chondrocyták végső sorsa a terminális differenciáció, amelynek során hypertrophiás átalakuláson mennek keresztül. E folyamat során a porcmatrix összetétele megváltozik, miközben a sejtek specifikus citokinek termelésével elősegítik az enchondralis csontosodás megindulását.

## 2.2. A sejt felszíni fehérjék összessége, avagy a „surfaceome”

### 2.2.1. A sejt plazmamembránjának bemutatása

Minden sejtnak rendelkeznie kell azokkal a sejtalkotókkal, melyek esszenciálisak az életben maradáshoz és az osztódáshoz. Ezek egyike a plazmamembrán (PM), amely elhatárolja a sejt citoplazmáját a sejten kívüli, EC környezettől, ezáltal definiálva a sejtek határát. Bár a

PM-et gyakran egy szilárd, homogén lipid-kettősréteggént ábrázolják, valójában egy rendkívül dinamikus sejtalkotóról van szó. Ezen túlmenően a PM-et nagymértékben aszimmetrikus molekuláris eloszlás jellemzi, amely nemcsak oldalirányban nyilvánul meg, hanem a belső és a külső felszín között is nagyfokú eltérést mutat [98]. A különböző fehérjék és lipidek laterális és vertikális diffúziója révén a sejt folyamatosan alkalmazkodik a változó környezeti feltételekhez. A PM legpontosabb leírását a jelenleg elfogadott nézetek szerint a Singer és Nicholson féle módosított folyékony-mozaik modell írja le, melyben úgynevezett lipidraftok „úsznak” [99]. Úgy vélik, hogy a lipid tutajokban található szfingolipid molekulák befolyásolják számos membránfehérje strukturális, ezáltal funkcionális tulajdonságait [100]. A membrán különböző foszfolipid molekulákat (pl.: szfingomielin, foszfatidil-kolin, foszfatidil-etanolamin és foszfatidil-szerin), koleszterint és fehérjéket tartalmaz. A foszfolipidek amfipatikus molekulák, melyeknek hidrofób oldalláncaik a lipid-kettősrétegben egymás felé néznek, míg a hidrofíl oldaluk az IC és EC felszín felé tekint [101]. A foszfolipidek egyenlőtlen eloszlása a membrán két oldalán biztosítja a sejt felszín görbületét [102]. A sejtmembrán teljes vastagsága transzmissziós elektronmikroszkóp alapján körülbelül 8–10 nm. Az EC oldalon a fehérjékhez és lipidekhez szénhidrátok kapcsolódhatnak, ezáltal glycoproteineket és glycolipideket hozva létre, melyek együttesen a sejt köpenyt, vagyis a glyocalixot alkotják [17]. A legtöbb sejt esetében a PM-ek teljes tömegének nagyjából felét a fehérjemolekulák adják, melyek számos jelátviteli és transzport folyamatot biztosítanak az IC és EC tér között. A molekuláris diverzitás elsősorban nem a lipidek, hanem a sejtmembrán subproteom változatosságából ered, vagyis azoknak a fehérjéknek az összességéből, amelyek a membránba ágyazva találhatóak. A sejt felszín dinamikus jellegét tovább fokozza, hogy az ott megjelenő fehérjék nemcsak mennyiségben változhatnak, hanem az mRNS alternatív splicing-ja és a különféle poszttranszlációs modifikációk révén azok szerkezete, vagyis minősége is módosulhat [103].

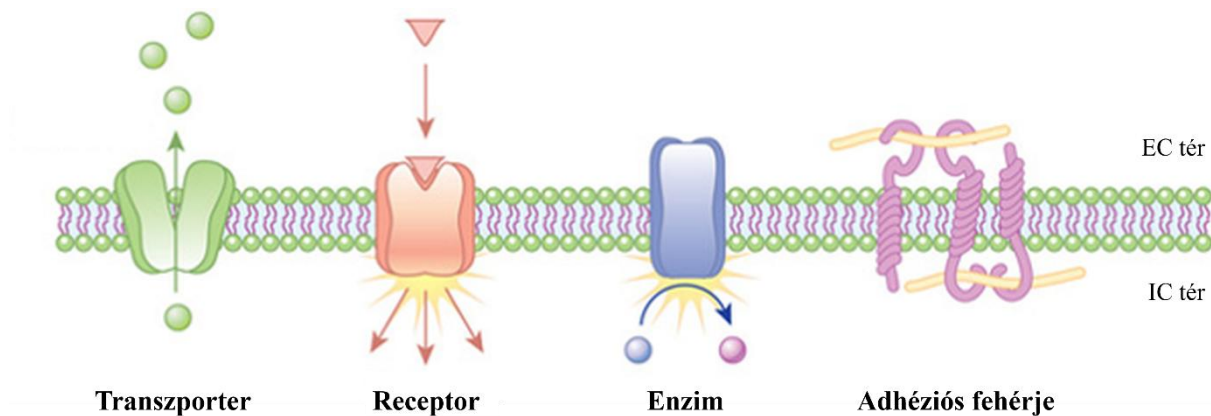
### *2.2.2. A sejt felszíni fehérjék általános és a porcszövetben betöltött szerepének ismertetése*

A PM-ben számos fehérje található, amelyek különféle élettani funkciókért felelősek, például jelátvitelért, iontranszportért, sejt motilitásért és sejtek adhéziójáért. A PM-fehérjék sokféle csoportba sorolhatók, például a membránhoz való kötődésük jellege alapján. Az integráns, másnéven transzmembrán fehérjék teljes egészében áthaladnak a foszfolipid kettősrétegen, legalább egy hidrofób doménjük révén [104]. Ezzel ellentétben a perifériás membránfehérjék vízdékonyabbak, és reverzibilisen kapcsolódnak kizárólag a membrán egyik felszínéhez, melyben különböző kölcsönhatások segítenek: hidrofób hurkok, lipid

oldalláncok vagy elektrosztatikus interakciók [105]. Ezen túlmenően a felsoroltakon kívül is kapcsolódhatnak fehérjék a PM-hez. A glikozil-foszfatidilinozitol (GPI) horgonyzott fehérjék egy olyan oldható fehérjecsoportot alkotnak, amelyek a PM-hez egy GPI-horgonynak nevezett poszttranszlációs módosításon (PTM) keresztül kötődnek. Ezek a fehérjék szinte kizárólag a PM külső rétegében található meg [106]. A sejtfelszíni fehérjéken becslések szerint több mint 90%-ban előforduló PTM a glikoziláció, szemben a citoplazmával, ahol a fehérjéknek ez a fajta módosítása nem jellemző [107]. A glikánláncok leggyakrabban kétféle módon kapcsolódhatnak a fehérjékhez: az aszparagin oldalláncokhoz (N-glikoziláció) [108], illetve a szerin és treonin oldalláncokhoz (O-glikoziláció) [109]. Emellett kisebb arányban a triptofán C-glikozilációja [110] és a cisztein S-glikozilációja [111] is ismert jelenségek. A kifejeződő sejtfelszíni fehérjék PTM-ek során szénhidrát molekulával díszítődnek, amely a fehérje érésének a részét képezi. Ez a folyamat az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-apparátusban zajlik, ahol jól szabályozott glikozidázok és glikoziltranszferázok végzik a módosításokat [112]. Végül az érett fehérje a PM-be transzportálódik vagy kiválasztódik az exocytotikus vesiculumok által. A glikán láncok kulcsfontosságú szerepet töltenek be számos biológiai folyamatban, többek között a sejt differenciációban, a sejtek közötti kommunikációban és a sejtadhézióban [113].

Azok a PM fehérjék, amelyeknek legalább egy része az EC térbe nyúlik, ezáltal a sejtek felszínét alkotó subproteom-nak tekinthető, összefoglalóan *surfaceome* néven ismertek. Bár szükséges megjegyezni, hogy létezik számos olyan EC fehérje is, melyek nem a PM-hez, hanem a membránfehérjékhez tapadnak, ezáltal azok indirekt módon köthetőek a sejtfelszínhez. Az ilyen típusú proteinek tágabb értelmezésben szintén bekerülhetnek a „surfaceome” definíciójába, azonban a különböző kutatócsoportok között mai napig nincs teljes egyetértés a pontos meghatározással kapcsolatban. Mindazonáltal a sejtfelszíni fehérjék kulcsszerepet játszanak a sejt és környezete közötti sejt folyamatokban [114]. Bár a különböző sejt típusok surfaceome-ja eltérő funkcióval rendelkezik, meglepő módon ezen fehérjék expressziós mintázata csak részben tér el. További különbségek inkább a surfaceome lokális szerveződésében jelennek meg, mivel a különböző sejt típusok helyi fehérjetömörüléseket, úgynevezett nanoklasztereket alakítanak ki a PM-ben [107]. Általánosságban elmondható, hogy egyetlen receptor aktiválása is elegendő lehet egy sejt válasz kiváltásához, azonban a nanoklaszterek kialakulása az érzékelhető jelek specificitását növeli [115]. Bár a PM klaszterképző mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, feltételezhetően lipid tutajok, valamint a protein–protein interakciók (PPI-k) is szerepet játszanak benne [116]. A membránfehérjék fontos szerepet töltenek be a porc szövet biológiájában és a chondrocyták

működésében is. Ezek a fehérjék víz-, ion- és molekula-transzporterekként, receptorokként, enzimekként, valamint a cytoskeletalis és ECM fehérjék, illetve sejt–sejt kapcsolatok adhéziós elemeiként szolgálnak [117] (2.6. ábra).



**2.6. ábra: A transzmembrán fehérjék leggyakoribb 4 funkciójának bemutatása.** A transzporterek ionokat vagy molekulákat szállítanak a plazmamembrán egyik oldaláról a másikra. A receptorok képesek kötődni egy EC molekulához (például egy szolubilis ligandhoz), ami egy IC jelátviteli kaszkádot aktivál. Az enzimek a membránban ugyanazt a funkciót látják el, mint a sejtek citoplazmájában: egy vagy több szubsztrátot egy vagy több terméké képesek alakítani. Az adhéziós fehérjék fizikai kapcsolatot biztosítanak a sejt és egy másik sejt vagy a sejt és az ECM között. (Forrás: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-membranes-14052567/>, módosítva)

#### 2.2.2.1. A plazmamembrán transzporter fehérjéi és a porcsejtek életében betöltött szerepük

A transzporter fehérjék a PM szelektív permeabilitását biztosítják, amely lehetővé teszi az ionok, metabolitok és egyéb kis molekulák szabályozott áthaladását, így fenntartva a sejten belüli homeostasiszt. Mivel a membrán belseje hidrofób jellegű, a hidrofil molekulák nem képesek hatékonyan passzív diffúzióval átjutni a membránon, ezenfelül sok esetben koncentrációgradienssel szemben kell mozogniuk. Ennek okán a szelektív transzport folyamatok fenntartásához különböző kapcsolt transzporterekre, ionpumpákra és ioncsatornákra van szükség [118]. Ezek a fehérjék kiemelten fontosak az orvostudományban, mivel egyrészt lehetővé teszik a gyógyszermolekulák sejtekbe jutását, másrészt képesek a sejtekből kifelé irányuló transzportot (effluxot) is biztosítani (pl. ABC transzporterek révén), amely gyakran a gyógyszerrezisztencia kialakulásának az alapja [119]. A következőkben a porcsejtekre jellemző transzportereket fogom részletesebben ismertetni.

A porcszövet kationtartalma rendkívül magas, mivel az ECM-ben található PG-k és GAG-ok jelentős negatív töltésekkel rendelkeznek. Ennek következtében a chondrocyták egy

szokatlanul magas ionkoncentrációjú (250–350 mmol Na<sup>+</sup>) és ozmotikus nyomású (350–450 mOsm) mikrokörnyezetben élnek [120]. Ebből kifolyólag, bár a chondrocyták nem excitábilis sejtek, membránfehérje-készletük számos különböző transzportert tartalmaz [121]. A Na–K-ATPáz egy PM-be ágyazott fehérje, amely fenntartja az eltérő Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup> koncentrációk által kialakított erős elektrokémiai grádienseket az EC és IC tér között. A folyamat során az ATP biztosítja az energiát a foszforilációs-defoszforilációs ciklushoz, amelyet Albers–Post ciklusnak neveznek [122]. A chondrocyták többféle  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységét is expresszálják a Na–K-ATPáznak, köztük az  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  és  $\beta 3$  izoformákat, amelyek eltérő módon fejeződnek ki a porcfejlődés különböző szakaszaiban és patológiás állapotokban [123], valamint sejtvonalakban és primer sejttenyészetekben [124]. Az epithelialis nátriumcsatorna (ENaC) jelenlétét is igazolták humán chondrocytákban, mely sejtek egyaránt expresszálják az ENaC  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységeit, Na<sup>+</sup> beáramlást biztosítva a sejtekbe [123].

A káliumcsatornák által közvetített káliumáramokat széles körben dokumentálták érett chondrocytákban [121]. Ezek közé tartoznak a heteromultimer feszültségfüggő káliumcsatornák csoportjába tartozó K<sub>V</sub>1.4 [125] és K<sub>V</sub>1.6 [126], a befelé egyenirányító, ATP-függő káliumcsatornák (K<sub>ATP</sub>) [127], továbbá a nagy (BK) [128] és kis (SK) [129] konduktanciájú kalcium-aktivált káliumcsatornák. Primer porcinosodó micromass sejttenyészetekben kimutatták, hogy a K<sub>V</sub>1.1, K<sub>V</sub>1.3 és K<sub>V</sub>4.1 káliumcsatorna-alegységek fehérjeszinten expresszálódnak. A K<sup>+</sup>-csatorna blokkoló tetraetil-ammónium (TEA) alkalmazása csökkentette a K<sub>V</sub> áramokat, a sejtek proliferációját, a porc-specifikus gének expresszióját, valamint gátolta a porc kialakulását [130]. A befelé egyenirányító K<sup>+</sup>-csatorna (Kir2.1) funkcióvesztése károsítja az indukált pluripotens őssejtek (iPSC-k) chondrogén irányú differenciációját azáltal, hogy csökkenti a kulcsfontosságú transzkripciós faktorok expresszióját, valamint megzavarja a BMP jelátviteli útvonalakat [131].

A chondrocytákban és chondroprogenitor sejtekben található kloridcsatornák expressziójára és funkciójára vonatkozó irodalom viszonylag szűkös [121]. A feszültségfüggő kloridcsatornák nemcsak az IC pH és a sejttérfogat homeostasisának szabályozásában játszanak szerepet, hanem feltételezhetően a chondrocyták proliferációját és differenciációját is befolyásolják [132].

A csirke micromass tenyészetekben végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az  $\alpha 1$  alegység expressziós profilja alapján többféle feszültségfüggő kalciumcsatorna (VDCC) altípus is jelen van, köztük az L-típusú (Cav1.2 és Cav1.3), R-típusú (Cav2.3) és T-típusú (Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3) VDCC-k [133]. A chondrogenesis során a VDCC-k funkcionális csoportot alkotnak a

$\beta 1$  integrinnel, a Na–K-ATPázsal és az ENaC-csatornával, létrehozva egy mechanoszensor komplexet az eger végtagbimbójából származó differenciálódó chondrocyták felszínén [134]. A Cav1.2 és Cav3.2 csatornaalegységek ugyancsak kimutathatók voltak egérembryok chondrocytaiban, valamint ugyanezek az L- és T-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák azonosításra kerültek az ATDC5 chondrogén sejtvonalban is [135]. A VDCC-ken keresztül érkező  $Ca^{2+}$ -beáramlás szükséges az ECM szintézisét szabályozó jelátviteli útvonalak aktiválásához ízületi chondrocytákban [136]. Azokban az egerekben, amelyekben hiányzott a Cav3.2 csatorna, a SOX9 expressziója csökkent, ami rendellenes trachea porcképződéssel járt együtt [136]. Továbbá a VDCC működésének gátlása nifedipinnel jelentősen akadályozza a chondrogenesist, és szinte teljesen megakadályozza a sejtek proliferációját [133].

A VDCC ioncsatornákon kívül más transzporterek is szerepet játszanak a chondrocyták  $Ca^{2+}$  jelátviteli útvonalaiban. Az ízületi chondrocyták széles skáláját expresszálják mind az adenzin-kötő P1, mind az ATP-kötő P2 purinerg receptoroknak, beleértve az A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> és A<sub>2B</sub> altípusokat, a különböző ionotróp P2X receptorokat (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>), valamint a metabotróp, G-fehérje kapcsolt P2Y receptorokat (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>) [137,138]. A purinerg receptorok széles körű jelenlétét (köztük P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> és P2X<sub>7</sub>, valamint P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>3</sub>, P2Y<sub>4</sub> és P2Y<sub>5</sub> receptorokat) western blot vizsgálatokkal igazolták differenciálódó micromass porcsejt kultúrákban. Ezen kultúrákban az EC ATP által kiváltott  $Ca^{2+}$ -szint emelkedésért a P2X<sub>4</sub> receptor volt a felelős [139]. Az IC ATP-oszcillációk, amelyekben a P2X<sub>4</sub> receptorokon keresztül zajló ionáram is részt vesz, fontos szerepet játszanak a chondrogenesist megelőző MSC sejtek kondenzációjában [140], valamint közvetítik az FGF és a Sonic Hedgehog (SHH) jelátvitel hatásait [141]. A P2 purinerg receptorok, amelyeket az EC ATP aktivál, mechanikai ingerek által kiváltott jelátvitelt közvetítenek a chondrocytákban a primer ciliumon keresztül [142].

A purinerg receptorok mellett  $Ca^{2+}$  beáramlást biztosíthat még az L-glutamát aminosav is, mely aktiválja mind az ionotrop (iGluR), mind a metabotrop (mGluR) glutamát receptorokat. Az ionotrop glutamát receptorok ligand függő nem-szelektív kationcsatornák, és három fő csoportra oszthatók:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA) receptorokra, kainát receptorokra és N-metil-D-aszpartát receptorokra (NMDAR), mely utóbbiak elsődlegesen  $Ca^{2+}$ -áteresztők [143]. A heterotetramer NMDAR-ok két kötelező NR1 alegységből, valamint két NR2 és/vagy NR3 alegységből épülnek fel [144]. A NR1, NR2D és NR3A alegységek konstitutív módon expresszálódnak fejlődő chondrocytákban [145], valamint érett ízületi chondrocytákban [146], mely esetben aktív komponensei a mechanotranszdukciós

jelátvitelnek [147]. Ezen túlmenően a NR2D-t tartalmazó NMDAR-ok jelentős szerepet töltenek be a chondrocyták proliferációjában is [148].

További sejtfelszíni, nem-szelektív ioncsatornák a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák, melyek kiemelt szerepet töltenek be a  $Ca^{2+}$  IC koncentrációjának szabályozásában nem ingerelhető sejtekben. Az emlősök TRP-csatornái hagyományosan hat alcsoportra oszthatók: kanonikus (TRPC), vanilloid (TRPV), melastatin (TRPM), ankirin (TRPA), mucolipin (TRPML), policisztin (TRPP), valamint egy speciális, úgynevezett „nem mechanoreceptor potenciál C” típusúra (TRPN) [144]. A differenciálódó micromass sejt kultúrák a TRPV-ioncsatornák széles skáláját expresszálják [149]. A TRP-csatornák közül a TRPV4 szerepe kiemelkedő a chondrocyták fiziológiájában, mely egy ozmotikusan szenzitív ioncsatorna és a kulcsfontosságú mechanotranszdukciós útvonalak egyik komponense [150-152]. A TRPV4 pozitív szabályozója a chondrogenikus SOX9 transzkripciós faktornak, és farmakológiai aktiválása SOX9-függő génexpressziókat indukál [153]. A chondrocyták nyugalmi membránpotenciálját legalább részben a TRPV5 szabályozza [154], amely  $Ca^{2+}$ -beáramlást biztosít, ezenfelül képes gátolni a chondrocyta autofágiát egy kísérletes OA-modellben [155]. A TRPV6 chondroprotektív funkciót tölthet be, mivel a TRPV6 KO egerekben súlyos OA-ra emlékeztető elváltozásokat figyeltek meg, beleértve az ízületi porc felszakadozását, mély erózióját, továbbá az ECM PG-vesztését [156].

2010-ben felfedeztek egy új ioncsatorna családot, a Piezo fehérjéket, melyek mechanikai stimulusokra, membránfeszülésre nyílnak és biztosítják a kationok számára az átjárást a sejtmembránon keresztül. A Piezo fehérjék jelentős expressziót mutatnak a chondrocytákban, és kulcsszerepet töltenek be a mechanotranszdukciós folyamatokban [157]. Lee és mtsai. RT-qPCR analízissel és immunfluoreszcens festéssel vizsgálták a Piezo ioncsatornák expresszióját humán, sertés és egér ízületi porcban, miszerint a Piezo1 és Piezo2 ioncsatorna mind a primer chondrocyta kultúrákban, mind a különböző eredetű porcszövetekben magas szinten expresszálódnak [158]. Du és mtsai. szintén kimutatták a Piezo1 és Piezo2 fehérjék jelentős expresszióját egér primer chondrocytákban western blot segítségével. Kísérleteik során megfigyelték, hogy a ciklikus húzóerő alkalmazása fokozza a Piezo1 és Piezo2 expresszióját a chondrocytákban [159]. Továbbá, atomerő mikroszkóppal végzett nagyfokú mechanikai kompresszió (legalább 45% deformáció) izolált sertés chondrocytákban jelentősen megnövelte az IC  $Ca^{2+}$  szintet, mely kalcium-beáramlás elnyomható volt Piezo1 vagy Piezo2 siRNS-alapú géncsendesítéssel, illetve a Piezo1 inhibitor GsMTx4 farmakológiai gátlásával [158]. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk,

hogy a Piezo-csatornák elsősorban a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás szabályozásán keresztül közvetítik a mechanikai stimulusokat az ECM felől a chondrocytáknak. A hyalin porcban uralkodó magas ionkoncentráció és ozmolaritás magával vonja a nagy mennyiségű víztartalmat is az ECM-ben. Az aquaporin vízcsatornák a chondrocyta PM-ben is expresszálódnak, és kulcsszerepet töltenek be a sejttérfogat szabályozása során a víz be- és kiáramlásában [121]. Az MSC-k chondrogén differenciációja során megfigyelték az AQP1 és AQP3 vízcsatornák expressziójának fokozódását, ami arra utal, hogy ezek a fehérjék biztosítják a fiziológiás alkalmazkodást a változó EC ozmolaritáshoz az érett chondrocyták számára [160].

A porcsejtekben kifejeződő sokféle ioncsatorna rávilágít arra a tényre, hogy a megfelelő ionáramok jelenléte nemcsak az excitábilis sejtek privilégiuma. A chondrocyták számára a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , de leginkább a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációk részletes szabályozása szintén kiemelt fontosságú a homeostasis szempontjából.

#### *2.2.2.2. A plazmamembrán receptor fehérjéi és a porcsejtek életében betöltött szerepük*

Másik jelentős, surfaceome fehérje-funkció a külső szignálok, változások érzékelése, melyet a receptorok biztosítanak, és alapvető feltétele a sejtek környezethez való alkalmazkodásában. Ennek megfelelően a PM számos receptort tartalmaz, amelyek képesek EC jeleket érzékelni és továbbítani a membránon keresztül. Ezek a jelek lehetnek szolubilis ligandok, az ECM komponensei, vagy akár szomszédos sejtek felszínén található molekulák is. A sejt felszíni receptorok típusa alapján megkülönböztetünk saját enzimaktivitással nem rendelkező receptorokat (G-fehérje kapcsolt receptorok, tirozin kinázhoz kapcsolt receptorok és proteolitikus receptorok), saját enzimaktivitással rendelkező receptorokat (tirozin kináz receptorok, tirozin foszfatáz receptorok, guanilat cikláz receptorok és szerin-treonin kináz receptorok), valamint ioncsatorna funkcióval rendelkező receptorokat, másnéven ligand kapuzott ioncsatornákat [161]. Amikor egy jelátviteli ligand kötődik a receptorához, az egy konformációs változást idéz elő a fehérjében, amelyet gyakran összetett fehérjeklaszterek képződése kísér a membránban vagy annak felszínén. Ennek hatására az addig rejtett citoplazmatikus fehérjedomének hozzáférhetővé válnak más, IC jelátviteli molekulák számára. A jelátviteli útvonal további effektor molekulákon keresztül végül sejtszintű válaszokat eredményez [162].

A receptorok csoportosítása alapján is látható, hogy egy fehérje nem csak egyfajta funkciót hordozhat. Ennek következtében a már korábbi bekezdésekben bemutatott, kevert

funkciójú PM fehérjéket nem fogom ismét részletesen tárgyalni, csak felsorolás szintjén említtem meg őket a továbbiakban. Ide tartoznak például a ligand kapuzott ioncsatornák, melyeket másnéven ionotróp receptoroknak nevezhetünk. A porcsejtekben kimutatták a P1, valamint a különböző típusú ionotróp P2X és metabotróp P2Y purinerg receptorokat is. Ugyancsak igazolták chondrocytáknak expressziójukat és szerepüket az L-glutamát által aktivált, ionotróp NMDA receptoroknak. A következőkben az általam eddig nem tárgyalt, porcsejtek szempontjából jelentős receptorokat fogom ismertetni.

A BMP és TGF- $\beta$  jelátviteli útvonalakban a dimer ligandok ugyanahhoz a szupercsaládhoz tartoznak és egy heterotetramer receptorhoz kötődnek, amelyek két I-es és két II-es típusú receptorból állnak, valamint intrinsic szerin/treonin kináz aktivitással rendelkeznek [163]. A BMP-jelátvitel kritikus szerepet játszik a korai végtagbimbó fejlődésében, melyek közül a BMP-2, BMP-4 és BMP-7 expresszálódik a végtagbimbó mesenchymájában [164]. A TGF- $\beta$  szerepe a chondrogenesisben a differenciáció stádiumától függ. A korai differenciációs szakaszban a TGF- $\beta$  jelátvitel korlátozza a porcfejlődés megindítását, és inkább az osteoblast irányba történő elköteleződést segíti. Ezzel ellentétben az érett chondrocyták esetén a TGF- $\beta$  útvonal egyrészt chondroprotektív hatással rendelkezik azáltal, hogy gátolja a porcsejtek hypertrophiáját és apoptózisát [165,166], továbbá elősegítik a porcmatrix szintézisét [167,168]. Másrészt viszont a TGF- $\beta$  útvonal szerepet játszhat az OA progressziójában is. A TGF- $\beta$  expressziója fokozódik OA-s porcban, ami hozzájárulhat a betegség pathogenesiséhez [169,170].

További kináz típusú sejtfelszíni receptorok, melyek a porcsejtek fejlődésében jelentős szerepet töltenek be, a fibroblast-szerű növekedési faktor receptorok (FGFR). A kanonikus és endokrin FGF jelátviteli útvonalak összesen 18 szekretált szignálfehérjét foglalnak magukba, amelyek négyféle tirozin-kináz aktivitású receptorhoz kötődhetnek és azokat aktiválják [171]. Létezik egy ötödik, nem tirozin-kináz aktivitású FGFR is, az FGFR5 (vagy FGFR1), amely homológ az FGFR1–4 receptorokkal az EC ligandkötő doménben, de nem rendelkezik IC tirozin-kináz funkcióval. Az FGFR5-öt eredetileg egyébként humán porcszövetben azonosították [172]. Érdekesség, hogy a sejtfelszíni és ECM-ben található HS proteoglikánok (melyek nagy mennyiségben alkotják a porcmatrixot) befolyásolják az FGF-ek diffúzióját a porcszövetben, valamint növelik az FGF-ek és receptoraik közötti kötődési affinitást, ezáltal fokozva a receptor aktivációját [173,174]. Az FGFR3 kulcsfontosságú szabályozó receptor, amely a chondrogenesis minden szakaszában szerepet játszik. Az éretlen chondrocyták osztódása és differenciációja fokozódik az FGFR3 jelátvitel hatására [175,176]. Ez a válasz az

FGF9 és FGF18 ligandok általi FGFR3 receptor aktiválásnak köszönhető, amelyek a szomszédos mesenchymában expresszálódnak [177,178].

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR-ok) a hét transzmembrán doménnel rendelkező receptorok családját alkotják, és jelátvitelüket heterotrimer G-fehérje komplexeken keresztül közvetítik, melyek három alegységből állnak: alfa ( $\alpha$ ), béta ( $\beta$ ) és gamma ( $\gamma$ ). A porcsejtek életében a legjelentősebb GPCR-ok a *parathormon-related protein* (PTHrP) receptora (PTHR1) [179], a Smoothened (SMO) receptora, a Hedgehog családba tartozó Indian Hedgehog (IHH) receptor [180], illetve a WNT fehérjék fő receptora, a Frizzled (FZD) receptor. A PTHR1 alacsony szinten expresszálódik a proliferáló chondrocytákban, azonban magas szinten jelenik meg az érett chondrocytákban, még mielőtt hypertrophikus állapotba lépnének [181]. A fejlődő porcszövetben az IHH elsősorban a prehypertrophikus chondrocytákban expresszálódik, de még a korai hypertrophikus chondrocytákban is jelen van. Az IHH szignáljai egyaránt hatnak a proliferáló porcsejtekre és a felettük elhelyezkedő perichondralis sejtekre, befolyásolva ezzel a porc fejlődését és a növekedésének irányát [181,182]. A Wnt-jelátviteli útvonalak két fő típusba sorolhatók attól függően, hogy  $\beta$ -katenin-dependens-e vagy sem. A  $\beta$ -katenin által közvetített kanonikus Wnt-jelátvitel két fő hatást fejt ki a porcsejtekre: egyrészt gátolja a chondrogenesis folyamatát, másrészt serkenti a chondrocyta hypertrophiaát [183]. A nem-kanonikus útvonalak részletes szerepe a porcszövetben jelenleg kevésbé ismert, azonban felfedezték, hogy a nem-kanonikus Wnt-útvonalat aktiválni képes WNT5A és WNT11 ligandok expresszálódnak a fejlődő porcszövetben, valamint a WNT5A az egyik legdominánsabban jelenlévő Wnt-fehérje a porcban [184]. Egy korábbi kutatás eredményei arra utalnak, hogy a WNT5A expressziója és receptorához történő kötődése kulcsszerepet játszhat a porc és a növekedési porckorong fejlődésében [185]. A Notch-jelátvitel a szomszédos sejtek közötti kommunikációt közvetíti, mivel különleges módon nem csak a receptor, de a ligandja is transzmembrán fehérje, amelyek minden többsejtű élőlényben szabályozzák a sejtorsdöntéseket [186]. Watanabe és mtsai. kimutatták, hogy differenciálódó ATDC5 sejtekben (egy egér chondrocyta sejtvonalonban) a NOTCH1 receptor már korán kifejeződik, melyet a delta-like fehérje-1 (DLL1) ligand expressziója követ [187]. A Notch-jelátvitel kritikus szerepet játszik a chondrocyták érésében. Csirke végtagbimbókban a DLL1 hibás expressziója blokkolta a chondrogenesist és csökkentette a csontosodás mértékét. A  $\gamma$ -szekretáz (Presenilin1 és Presenilin2) eltávolítása, valamint a NOTCH1 és NOTCH2 gének kiütése egerekben a hypertrophias chondrocyták felhalmozódásához vezetett a növekedési porckorongban az embryonalis fejlődés során [188]. A porcsejtek érése során, a NOTCH1 és DLL1 expressziója

folyamatosan csökken [189]. Humán MSC-kben is megfigyelték ezt a csökkenést a NOTCH1 expressziójában a chondrogén irányú differenciáció előrehaladtával [190]. Azonban később a NOTCH1 szintje újra fokozódni kezd, mely változást az egér végtagbimbók prehypertrophikus és hypertrophikus zónájában igazolták [191]. Crowe és mtsai. már 1999-ben leírták tapasztalataikat a Notch-útvonal chondrocyták hypertrophijában betöltött szerepét illetően [192]. Ezek alapján elmondható, hogy a chondrogenesis és a chondrocyta differenciáció során a Notch-jelátvitel kontextusfüggő módon működik. Bár a NOTCH receptorok elősegítik a mesenchymalis sejtek proliferációját, általánosságban gátolják a chondrogenesist. A Notch-jelátvitel általában magas expressziót mutat a korai porcfejlődés során, majd lecsökken, végül újra emelkedni kezd, amikor a chondrocyták hypertrophias állapotba lépnek.

Összefoglalva az alfejezetet: a chondrogenesis számos sejt felszíni receptor – TGF $\beta$ R, BMPR/ALK, FGFR, PTHR, IHH, FZD, NOTCH – és jelátviteli útvonaluk szigorú szabályozása révén valósul meg. Többek között ezeknek az útvonalaknak az időbeli és térbeli finomhangolása határozza meg a chondrocyták fiziológiás érését.

#### *2.2.2.3. A plazmamembrán adhéziós fehérjéi és a porcsejtek életében betöltött szerepük*

A harmadik funkcionális csoportba a kihorgonyzó, vagy adhéziós fehérjék tartoznak. Ahogy korábban említettem, a sejt felszíni fehérjék a környező sejtekhez, valamint az ECM komponenseihez is kapcsolódhatnak, melyeket emiatt adhéziós fehérjéknek hívhatunk. Ez a sejt–sejt és sejt–ECM kommunikáció kulcsszerepet játszik a szövetek fejlődésében és a sejtek differenciációjában is [193], ugyanakkor számos betegség kialakulásával is összefüggésbe hozható [194]. A sejt–sejt kölcsönhatásokat egy nagyszámú, verzatilis sejt adhéziós transzmembrán molekulacsoport közvetíti, amelyek a szomszédos sejtekhez kötődnek, és mechanikai választ váltanak ki, gyakran a cytoskeleton átrendeződésével együtt [195,196]. Ide tartoznak például az integrinek [197], az immunoglobulin szupercsalád tagjai (pl. N-CAM) [198], a kadherineket (pl. E-, N-, P-kadherin) [199], valamint a szelektinek, melyek Ca<sup>2+</sup> jelenléte mellett képesek a kapcsolatot biztosítani [200]. A sejt–ECM kommunikációt többek között az ún. klasszikus ECM receptorok tartják fenn. Ide tartoznak ismételtelen a különböző integrinek, melyekhez sokszor szükséges egy köztes, multiadhéziós adapter fehérje: egy glikoprotein (GP, pl.: laminin, nidogén, fibronectin és vitronectin) [201]. Ezenfelül klasszikus ECM receptorok még a kollagénnel kapcsolódni képes diszoidin domén receptorok (DDR-ek) [202], valamint a hialuronsav receptorai, mint például CD44, RHAMM, LYVE-1 és HARE [203]. Ezen

túlmenően az ECM molekulák képesek kölcsönhatásba lépni és jelátviteli folyamatokat szabályozni más, nem klasszikus ECM receptorokon keresztül, ideértve a különböző növekedési faktor receptorokat és a Toll-like receptorokat (TLR-eket) [193,204].

A chondrocyták életciklusának korai szakaszában (mesenchymalis kondenzáció) a sejt–sejt adhézió elsősorban kadherineken és CAM-okon keresztül valósul meg. A növekedési porckorong chondrocyták fejlődésének későbbi szakaszában az adhéziós jelátvitel elsősorban az ECM komponensektől származik, amelyek az integrineken és más ECM-receptorokon keresztül közvetítik a jeleket. Ezek alapján a chondrogenesis során ugyancsak kiemelt jelentőségűek a sejt–sejt és sejt–matrix kölcsönhatások [205]. A sejtek közötti adhéziós molekulák, mint például az N-kadherin és az N-CAM, fontos szerepet játszanak a chondrogenesis elindításában azáltal, hogy MSC-ket toboroznak a környező szövetekből [206]. Az N-kadherin a klasszikus kadherin család tagja [207], amely kalciumfüggő, homofil módon (vagyis egy másik ugyanolyan N-kadherinhez) kapcsolja össze a sejteket [208]. A kadherineket intracellularisan kateninekkal lépnek kölcsönhatásba, amelyek adapterekként működve összekötik a kadherineket az aktin cytoskeletonnal [209]. Ez az összekapcsolódás elengedhetetlen a működőképes adherens junkciók kialakulásához. Az N-kadherin magas szinten fejeződik ki a végtagok fejlődése során, különösen az MSC-k kondenzációjának szakaszában [210]. Az N-CAM egy glikoprotein, amely homofil vagy heterofil módon is képes kötődni más sejt felszíni adhéziós molekulához, vagy akár a porcmatrixhoz [211]. A pre-chondrogenikus kondenzáció során a sejtek fokozzák az N-CAM expresszióját [212]. Az N-CAM szerepe feltételezhetően a magas sejtsűrűség kialakításában és stabilizálásában van [213]. Az N-CAM expressziójának csökkenését a szindekán fibronectinhez való kötődése és a homeobox gének aktivációja váltja ki a BMP-2 és BMP-4 jelenlétében, amely megállítja a további kondenzációt és elindítja a pre-chondrocyta differenciációt [214]. A kondenzáció fázisában kialakuló sejt–sejt kölcsönhatásokat ezután a porcsejtek és az ECM közötti kölcsönhatások váltják fel [215].

Az integrinek olyan transzmembrán receptorok, amelyek a porcsejteket képesek szomszédos sejtekhez vagy az ECM molekulákhoz kapcsolni. Eddigi ismereteink szerint összesen 24 féle egyedi integrin dimer alakulhat ki a 18  $\alpha$ - és 8  $\beta$ -alegység kombinációiból. Az integrin heterodimer ligand-specifitása az  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységek összetételétől függ [216]. A fiziológias chondrocyták által elsődlegesen expresszált II-es típusú kollagénkötő integrin az  $\alpha 10\beta 1$  [217], míg az  $\alpha 1\beta 1$  képes ugyan II-es típusú kollagénhez kötődni, de valószínűleg inkább a VI-os típusú kollagént részesíti előnyben [218]. Az összetett kölcsönhatások a kollagénnel –

és valószínűleg más ECM-fehérjékkel – elősegítik a chondrocyták lamininhez való kötődését is az  $\alpha 6\beta 1$  integrinen keresztül [219]. A  $\beta 1$ -integrin KO egerekből származó chondrocyták: abnormális sejtmorfológiát, csökkent proliferációt, és a sejtciklus szabályozásának felborulását mutatták. Egyéb *in vitro* kísérletek azt is feltárták, hogy a  $\beta 1$ - és  $\alpha V\beta 5$ -integrin elvesztése elősegíti az apoptózist a növekedési porckorong chondrocytaiban [220]. Az anti- $\beta 1$ , anti- $\alpha 2$  és anti- $\alpha 3$  integrin antitestek gátolják a hypertrophikus differenciációt, továbbá csökkentik a chondrocyták túlélését is [221]. Az integrinek az ECM-et az IC aktin cytoskeletonhoz kapcsolják, ezáltal EC kémiai és mechanikai jeleket közvetítenek a sejt belsejébe. A ligandhoz való kötődés után számos molekula toborzása indul meg az integrinek rövid citoplazmatikus doménjéhez, hogy fokális adhézios helyeket, vagyis heterogén összetételű molekuláris platformokat hozzanak létre, amelyek különböző sejtfunkciók szabályozásában vesznek részt, mint például: sejttúlélés, sejtosztódás, differenciáció, migráció és adhézió [222].

A HA elsődleges receptora a CD44, egy széles körben tanulmányozott transzmembrán fehérje, amely számos sejt típusban – és a chondrocytákban is – megtalálható. A végtagbimbó kialakulásának korai szakaszában a sejteket nagy mennyiségű ECM választja el egymástól [223], amelynek fő összetevője a HA, amely feltételezhetően elősegíti a sejtek vándorlását és osztódását [224]. A kondenzáció megindulásával azonban a porcmatrix HA tartalma csökken, amit a CD44 közvetít, mivel ez részt vesz a GAG endocytosisában és lebontásában [225]. Egy *in vitro* vizsgálat során Ishida és mtsai. kimutatták, hogy a chondrocyták HA-hoz történő kötődése a CD44-en keresztül elősegíti a sejtek proliferációját, valamint a TGF- $\beta$  expresszióját, amely nemcsak a sejtosztódásban, hanem a chondrocyták érésében is szerepet játszik [226].

A szindekánok a kis méretű, I-es típusú transzmembrán PG-k családjába tartoznak, amelyek növekedési faktorok, citokinek és ECM komponensek ko-receptoraiként működnek. A szindekánok HS oldalláncokat tartalmaznak, és a citoplazmatikus végükön keresztül jelátviteli folyamatokat indítanak el [227]. A szindekán családnak négy tagja van, de csak a szindekán-1, -3 és -4 kifejeződését mutatták ki patkány chondrocytákban, valamint progenitor sejtekben a condylus mandibulae fejlődése során [228]. A szindekán-3 expressziója emelkedett szintet mutatott a chondrogenesis kezdetén a kondenzált csirke végtagbimbó mesenchymájában [229]. Egy másik tanulmány arra utal, hogy a szindekán-3 befolyásolja, vagy akár közvetíti is az IHH aktivitását a csirke végtag fejlődése során, megerősítve azt az elképzelést, hogy szoros kapcsolat van a szindekánok és a növekedési faktorok által közvetített proliferáció között [230]. A szindekán-4-et főként az OA-val hozták összefüggésbe [231].

A DDR-ek további, nem-integrin típusú receptorok, amelyek közvetlenül kötődnek az ECM molekuláihoz. A DDR1 és a DDR2 tirozin-kináz aktivitással rendelkező receptorok, amelyeket a kollagén bekötődése aktivál [232]. Más receptor tirozin-kinázokkal összehasonlítva – amelyeket általában kis, szolubilis növekedési faktorok aktiválnak – a DDR-ek aktivációja lassabb, de hosszantartóbb a kollagénnel történő interakció révén [233]. A DDR2 aktivációja *in vitro* serkenti az MMP-1 expresszióját, amely ismert szerepet játszik az ECM *remodelling*-ben a morphogenesis során [232]. Érdekes módon a DDR2 mutációit egy ritka növekedési retardáció kialakulásával hozták összefüggésbe emberekben [234]. Ez összhangban van egy korábbi állatkísérlettel, amelyben a DDR2 gén kiütése egerekben csökkentette a posztnatális chondrocyta proliferációt és a hosszú csöves csontok növekedését [235].

A porcsejtek viselkedésének szabályozása a chondrogenesis során összetett folyamat, amely különböző serkentő és gátló eseményeket foglal magába. Az alfejezetet összefoglalva, az egészséges porcfejlődéshez nem csak eltérő szolubilis növekedési faktorokra és azok receptoraira van szükség, de kiemelt fontosságú az N-kadherin, N-CAM általi sejt–sejt, valamint az integrinek, a CD44, szindekán-3 és a DDR-ek által kialakított sejt–ECM közötti interakciók biztosítása is.

#### 2.2.2.4. A plazmamembrán enzimjei és a porcsejtek életében betöltött szerepük

Végezetül az utolsó funkcionális csoportot mutatom be, mely az enzimaktivitással rendelkező sejtfelszíni fehérjéket foglalja magában. Az enzimek biokémiai reakciókat katalizáló fehérjék, melyek egy vagy több szubsztrátból egy vagy több terméket képesek létrehozni eltérő mechanizmusokkal. A Biokémiai és Molekuláris Biológiai Nemzetközi Szövetség (IUBMB) alapján jelenleg 7 enzimcsoportot lehet megkülönböztetni: 1. oxidoreduktázok (dehidrogenázok, oxidázok, oxigenázok, peroxidázok, katalázok), 2. transzferázok (aminotranszferázok, kinázok, mutázok), 3. hidrolázok (peptidázok, foszfatázok, foszfolipázok), 4. liázok (dekarboxilázok, aldolázok), 5. izomerázok (racemázok, mutázok, epimerázok), 6. ligázok (szintetázok, karboxilázok) és a legújabb 7. transzlokázok (ionok, molekulák áthelyezése a membrán két oldala között, melyhez katalitikus reakció szükséges) [236]. Az enzimek elsődlegesen a szénhidrát, lipid, aminosav, és nukleotid anyagcserében játszanak szerepet, de megtalálhatóak a különböző jelátviteli útvonalak szabályozó fehérjéiként is. Mindazonáltal a legtöbb, sejt által expresszált enzim vagy IC-n (citoplazmában, mitokondriumban, ER-ben, lizoszómában) vagy szekréció útján az ECM-ben található. Csekély

azon enzimek száma, melyek a PM-be ágyazottan találhatóak és van az EC tér felé néző doménjük, tehát sejtfelszíni fehérjének tekinthetők lennének.

Ennek az enigmatikus sejtfelszíni csoportnak a tagjai kevés esetben tekinthetők kizárólag enzimeknek, mivel általában több szereppel is rendelkeznek. A korábbi fejezetekben említettem a porcsejtekre is jellemző, enzimátikus és transzporter funkcióval egyaránt rendelkező Na–K ATPázt. Ezenfelül számos enzimmel találkozunk a receptor fehérjék között is: szerin-treonin kináz receptorok (TGF $\beta$ R és BMPR), tirozin kináz receptorok (FGFR), vagy a NOTCH receptort proteolitikusan hasító tumor nekrosis faktor- $\alpha$  konvertáló enzim (TACE), melyek szintén képesek szubsztrátból terméket létrehozni. Mivel a sejt–ECM kommunikáció kifejezetten fontos a porcsejtek differenciációja során, emiatt érdemes itt megemlíteni azokat az EC enzimeket, melyek különböző ECM komponensek lebontásáért és az egész porcmatrix fejlődése során a dinamikus átformálásáért, *remodelling*-ért felelősek. A normál felnőtt porcsovétben a chondrocyták egy állandó egyensúlyi állapotot tartanak fenn, amelyben a matrix szintézisének üteme megegyezik a lebomlás ütemével. Bármilyen változás ebben az egyensúlyi állapotban hatással lesz a porc funkcionális integritására [237]. A lebomlás és regeneráció közötti egyensúlyt annyira kritikusnak tekintik, hogy ha az egyensúly a lebomlás irányába billen, az később OA-hoz vezethet [238].

Néhány ECM bontó enzim sejtmembránhoz kötött, mások pedig szekretált formában vannak jelen. Két nagy enzimes család, a szerin proteázok és a metalloproteinázok semleges pH-nál aktívak, és extracellularisan fejtik ki hatásukat. A szerin proteázok közül korábbi proteomikai vizsgálatok kiemelik a HTRA1-et, mint a chondrocyták által az egyik legnagyobb mennyiségben szekretált fehérjét. Ez az enzim az aggregátumot hasítja az interglobuláris doménen belül az emberi porcsovétben [239]. A HTRA1 főként a porc mély rétegében lokalizálódik [240], és megnövekedett expressziót mutat az MSC-k porcsejt irányú differenciációja során [241].

A másik nagy, porcban is fellelhető enzimes család a metalloproteinázok, melyek további öt csoportra oszthatók fel: a szerralizin, az asztacin, az MMP, az ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), illetve az ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs*) [242]. A felsoroltak közül csak az utóbbi hármat mutatták ki porcsovétben is, ezért ezt a három csoportot fogom részletesebben tárgyalni. Az MMP-k több mint 23 szekretált és/vagy sejtfelszíni cinkfüggő endopeptidázból álló családot alkotnak, amelyek számos szubsztrátot képesek lebontani semleges pH mellett [243]. A proteolízis gyakran a sejt közvetlen közelében megy végbe, ahol bizonyos MMP-k meghatározott

területekre lokalizálódnak a sejtfelszínen és transzmembrán doménnel rendelkeznek, mint az MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25 [244]. Más MMP-k pedig sejtfelszíni receptorokhoz, sejtfelszíni enzimekhez vagy PCM fehérjékhez kötődnek. A sejtfelszíni HS például képes megkötni az MMP-7-et [245], míg az MMP-1 a sejtfelszíni EMMPRIN fehérjéhez kötődik (extracellularis matrix metalloproteináz induktor) [246]. Három MMP, azaz az MMP-1, MMP-8 és MMP-13 (másnéven kollagenáz-1, -2 és -3), képesek hasítani a fibrilláris kollagéneket [247]. Az MMP-1 és az MMP-13 szintézisét a fibroblastok és a chondrocyták is végzik, amikor a sejtek környezetében gyulladásos mediátorok vannak jelen. Az MMP-8 szintén termelődhet chondrocyták által [248]. Az MMP-13 elsősorban a II-es típusú kollagént bontja le, míg az MMP-1 és az MMP-8 inkább a III-as és I-es típusú kollagént részesíti előnyben [249]. Az MMP-3 és az MMP-10 (másnéven stromelysin-1 és -2), bár széles, de hasonló szubsztrát specificitással rendelkeznek, lebontják többek között a PG-ket, a fibronectint és a laminint [250]. Ezenfelül mindkét enzim képes aktiválni az inaktív prokollagenázokat is [251,252]. Az MMP családot leginkább az ECM komponenseinek hasítási képességéről ismerjük, de ezen kívül képesek lebontani más proteínázokat, proteínáz inhibitorokat, latens növekedési faktorokat, kemotaktikus molekulákat, növekedési faktor kötőfehérjéket, vagy akár sejtfelszíni receptorokat és sejt–sejt adhéziós molekulákat is, ezáltal a szignálfolyamatok aktív résztvevőinek is tekinthetők [253].

Két további metalloproteináz csoport az ADAM és ADAMTS enzimek. Az emberi szervezetben eddig 21 ADAM [253] és 19 ADAMTS [254] fehérjét azonosítottak. Az ADAMTS enzimek 5 doménban hasonlítanak az ADAM proteázokhoz, azonban nem tartalmazzak három ADAM domént (epidermalis növekedési factorszerű domén, transzmembrán domén, citoplazmatikus farok domén), ellenben rendelkeznek egy thrombospondin-1 (TSP-1) doménnel [254]. Utóbbi főként a C-terminális végükön helyezkedik el, és úgy vélik, hogy az enzim ezen része az ECM-mel való kölcsönhatásokat közvetíti [255]. Míg az ADAM proteázok általában a plazmamembránhoz kötődnek, addig az ADAMTS fehérjék a transzmembrán domén hiánya miatt szekretálódnak. Ugyanakkor néhány ADAM enzim is (például az ADAM28) mutat szekretált izoformát, amelyek szintén nem tartalmazzak transzmembrán domént [256]. Az ADAM-17, másnéven a korábban említett TACE fehérje is egyben [257], nemcsak a Notch jelátvitelről ismert, de képes felszabadítani a gyulladásos mediátorként működő TNF $\alpha$ -t is a sejtfelszínről [258]. Az ADAM-17 mellett, az ADAM-10, -12 és -15 proteázokat is kimutatták már az ezredforduló előtt a porcszövetben [259]. Az ADAM8 nem csak a fejlődő csontvázban fejeződik ki [260], de az ADAM23-mal együtt igazolták jelenlétét

az MSC-k chondrocytákká történő differenciálódása során [261]. Az ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16 és -18 képesek a proteoglikánok hasítására a porc szövetben, bár *in vitro* körülmények között drámaian eltérő hatékonysággal működnek [262-264]. Egér KO vizsgálatok során nyert adatok arra utalnak, hogy az ADAMTS-5 az egyik legjelentősebb pathofiziológiai mediátora az aggregán katabolizmusának [265,266]. Marha [267] és sertés [268] modelleken végzett kísérletek alapján megerősítették az ADAMTS5 szerepét, valamint kimutatták, hogy az ADAMTS-4 is felelős az aggregán hasításáért a porcban. Ezen eredményeket még inkább alátámasztja az a megfigyelés, hogy emberi porcsejtben az ADAMTS-4 vagy ADAMTS-5 kiiktatása védelmet biztosított a porcban található aggregán lebomlásával szemben [269].

A szerin- és metalloproteinázokon kívül egy további ígéretes sejtfelszíni enzimmel is foglalkoznak a porckutatók. A transzglutamináz-2 (TG2) a szöveti transzglutaminázok családjába tartozik, mely enzimek  $Ca^{2+}$ -függő acil-transzferáz reakciót katalizálnak [270]. A sejttípustól függően a TG2 jelentős hányada (1–20%) található extracellularisan, mind a plazmamembránon, mind az ECM-ben [271]. A pre-hypertrophiás chondrocyták citoplazmájában a TG2 felhalmozódását annak kiválasztódása, majd katalitikus aktivitása követi, amely később az ECM-ben kimutatható [272]. A TG2 expressziója csökken, amikor a chondrocyták elérik a hypertrophiás állapotot [273]. A TG2 autokrin faktorként is működhet, és szabályozhatja a GAG-ok szintézisét a porcfejlődés során [274]. A TG2 nemcsak enzimátikus, hanem más funkciókkal is rendelkezik, mivel modulálja a sejtek kölcsönhatásait az ECM komponensekkel és a szolubilis növekedési faktorokkal nem-kovalens kölcsönhatások révén, valamint szabályozó szereppel bír az integrinek [275], a szindekán-4 [276] és a növekedési faktor receptorok [277] kapcsán.

A chondrocyták enzimeit elsősorban az ECM molekulák lebontásában játszanak szerepet. Ez alapvetően szükséges, mivel kizárólag termeléssel nem tartható fenn a porc szövet megfelelő összetételű és dinamikusan változó struktúrája. A porcbiológiában nagy jelentőségű EC enzimek közé sorolhatjuk a HTRA1, az MMP, az ADAM, az ADAMTS és a TG2 enzimeket, melyek produktumai sok esetben jelátviteli útvonalakat is képesek befolyásolni.

A 2.2.2. alfejezet alapján tehát a surfaceome egyfajta molekuláris ujjlenyomatként is működik, amely a sejt belső állapotát és igényeit tükrözi. Ez jelentős potenciállal bír az olyan felszínen expresszált biomarkerek és neo-antigének azonosításában, amelyek terápiás célpontokként szolgálhatnak [278]. Például egy egészséges sejt malignus transzformációja a transzlációs mechanizmusok megváltozásával járhat, ami a surfaceome összetételét is módosíthatja [279]. Ez a változás befolyásolja az egyes fehérjék mennyiségi eloszlását, és új

protein mintázat megjelenéséhez vezethet a sejtfelszínen. Az ilyen mintázatok, mint például az alternatív N-terminális aminosav-szekvenciák vagy PTM-ek révén létrejött variánsok, kiváló biomarker-jelöltek lehetnek [280]. A surfaceome jelentős lehetőségeket kínál a terápiás célpontok felfedezésére más betegségekben is, mivel könnyen hozzáférhető a gyógyszer-molekulák számára. Ezt támasztja alá, hogy a DrugBank adatbázis szerint a jelenleg forgalomban lévő gyógyszerek több mint 60%-a surfaceome molekulákra hat [281,282], annak ellenére, hogy a transzmembrán fehérjék az emberi fehérjekódoló gének mindössze 30%-át képviselik [283]. A surfaceome feltérképezésének további célja olyan specifikus sejtfelszíni fehérjék azonosítása, amelyek konkrét betegségekhez vagy azok különböző stádiumaihoz kapcsolódnak, ezáltal lehetővé téve a korai diagnózis- és prognózisalkotást [284].

### *2.2.3. A surfaceome kimutatására szolgáló technikák*

A sejtek viszonylag alacsony felszín/térfogat aránya miatt a plazmamembrán fehérjék eleve kisebb arányban fordulnak elő a teljes fehérjekészletben, így nehezebben azonosíthatók. Továbbá az integráns membránfehérjék hidrofób membránszakaszon helyezkednek el, amely átlagosan 5 nm vastag, és egy körülbelül 20–25 aminosav hosszúságú  $\alpha$ -hélixszel rögzülnek [285]. A membránba ágyazott, rejtett doménjeik miatt a membránfehérjék és a proteomika sokáig összeegyeztethetetlennek számítottak, mivel ezeknek a fehérjéknek az izolálása, dúsítása és azonosítása tömegspektrometriai (mass spectrometry) módszerekkel számos kihívást jelentett [286]. Az úgynevezett bottom-up (shotgun) proteomikai módszer során a kivont fehérjéket emésztéssel peptidekké alakítják, hogy azok alkalmasak legyenek a tömegspektrometriai analízisre. A tripszin az egyik legszélesebb körben alkalmazott proteáz erre a célra, mivel specifikus helyeken, hatékonyan hasít. Emellett a tripszines emésztés olyan peptideket eredményez, amelyek kedvező tulajdonságokkal rendelkeznek a folyadékkromatográfiával kombinált tandem tömegspektrometriai (LC-MS/MS) analízishez. Ilyen előny például a megfelelően rövid peptidszakasz és az effektív ionizációs képesség. Azonban a membránfehérjék hosszú hidrofób szakaszai általában nem, vagy nagyon kis arányban tartalmaznak poláris aminosavakat, így az emésztés során olyan peptidek keletkeznek, amelyek hajlamosak a kicsapódásra, ezáltal kevésbé alkalmasak az LC-MS/MS analízisre. Bár az EC domének (globularis régiók és EC hurkok) poláris aminosavakat tartalmaznak, az elemzésük további kihívásokat jelent, mivel ezek a domének gyakran jelentős PTM-n esnek át, ezen belül különösen a glikozilációs módosítások képezhetnek térbeli akadályokat a proteázok számára. Ennek következtében azok a PM fehérjékből származó

emésztett peptidek, amelyek alkalmasak lennének az LC-MS/MS analízisre, gyakran csak kis mennyiségben fordulnak elő, így megnehezíti a pontos fehérjeazonosítást és kvantifikálást, amelyhez megfelelő szekvenciafedettségre lenne szükség [287]. Mivel a surfaceome fehérjék általában alacsonyabb mennyiségben fordulnak elő a citoplazmatikus fehérjékhez képest, ajánlott – és igazából szükséges – részleges dúsításuk, hogy a kísérletek érzékenysége megfelelő mértékű legyen. Például egy HeLa sejtekben végzett elemzés szerint a sejtek fehérjéinek mindössze 4%-a tartozik az integráns membránfehérjék közé, és átlagosan 4–5 példány található belőlük egy 100 nm<sup>2</sup> területű sejt felszínen [288,289]. A következőkben néhány, gyakrabban alkalmazott sejt felszíni fehérje dúsításra szolgáló technikát szeretnék bemutatni.

#### *2.2.3.1. Centrifugálással történő membránfehérje izolálás*

A frakcionált (ultra)centrifugálás egy egyszerű módszer, amely lehetővé teszi a sejt törmelékek és sejt szervecskék szétválasztását méretük, alakjuk és tömegük alapján. Bár ez az eljárás különböző sejtorganelleum fázisokat eredményez, nem biztosít teljes tisztaságú frakciókat, mivel a hasonló méretű, de különböző eredetű membrán partikulumok gyakran nem különíthetők el megfelelően. További hátrány, hogy a technika nem képes eltávolítani azokat a nem PM-hoz tartozó fehérjéket, amelyek PM fehérjékhez kapcsolódnak, így szennyeződésként jelenhetnek meg a mintában. Ezek a szennyező fehérjék származhatnak az IC vagy EC környezetből, például az ECM-ből vagy a szérumból [290].

#### *2.2.3.2. Elektrosztatikus kölcsönhatáson alapuló membránfehérje izolálás*

A természetben a foszfolipidek kizárólag nettó negatív töltéssel rendelkeznek, vagy zwitterionos formában fordulnak elő, de soha nem hordoznak pozitív töltést [291]. Ennek következtében a PM felszínének nettó töltése mindig negatív, amely tulajdonság kihasználható a membránok dúsítására kationos bevonatú felületek alkalmazásával. Például a polilizinnel bevont üveglemezek gyakran szolgálnak pozitív töltésű felületként, amelyhez a sejtek hozzátapadhatnak. Sejt feltárás után [292] a PM darabkák a pozitív töltésű felszínen maradnak, míg a citoplazmatikus fehérjék és sejt szervecskék eltávolíthatók mosással [293]. Azonban ennek a módszernek egyik jelentős hátránya a membrán részletek alacsony visszanyerési aránya, amely körülbelül 15%. Ez a veszteség elsősorban a kiterjedt mosási és a szonikálási lépéseknek tulajdonítható, amely szükséges a sejtek feltárásához [294].

### 2.2.3.3. Fehérjeszerkezet felismerésen alapuló membránfehérje izolálás

Az affinitás-alapú dúsítás lehetővé teszi a membránfehérjék izolálását akár teljes sejtlizátumból, mégpedig két molekula közötti specifikus biológiai kölcsönhatás révén. Ilyen kölcsönhatás lehet például a receptor-ligand vagy az antitest-antigén kötődés. Az antitestek képesek specifikusan felismerni bizonyos fehérjéket, valamint PTM-eket, például a glikozilációt. Az ilyen típusú antitesteket anti-glikán antitesteknek (AGA) nevezik [295]. Az AGA-t széles körben alkalmazzák különféle diagnosztikai és prognosztikai biomarkerek azonosítására, és számos specifikus antitest megtalálható az anti-glikán reagenseket tartalmazó adatbázisban [296]. Ugyanakkor az anti-glikán antitest affinitása általában alacsonyabb, mint a fehérje epitópokat felismerő antitesteké, ami bizonyos korlátokat jelent a PM fehérjék dúsításában. Az antitest-alapú módszereknek azonban ezen kívül is vannak hátrányai. Először is előzetes ismeretek szükségesek egy specifikus, de a sejtfelszín minden részén jelenlévő antigénről, amely könnyen felismerhető. Másodsor az antitestek magas költséggel járnak, és csak korlátozott számban használhatóak fel újra. Harmadszor a szénhidrátok (glikánok) gyenge immunogenitása megnehezíti az ellenük irányuló hatékony antitestek jövőbeli előállítását [297]. Végül a glikánstruktúrák nagyfokú hasonlósága miatt az ER-ből és a Golgi-apparátusból származó glikoproteinek beszennyezhetik a mintát. Ezek a hátrányok jelentősen korlátozzák az antitestek alkalmazását a komplex surfaceome analízisekben, ezért ezt a megközelítést főként célzott vizsgálatokban használják [298,299].

### 2.2.3.4. Biotin-jelölésen alapuló membránfehérje izolálás

A sejtfelszíni fehérjék izolálását úgy is el lehet érni, hogy egy korai lépésben kémiai kötés segítségével specifikusan megjelöljük őket, és csak ezt követően történik meg a sejtek lizálása. A surfaceome azonosítására – valamint a szekretált fehérjék és az EC komponensek vizsgálatára – elsőként egy kémiai biotinizációs stratégiát fejlesztettek ki, amely a szabad aminocsoportokat célozza meg [300]. A módszer kezdeti lépésében N-hidroxiszukcinimid (NHS) észter kötésű biotint adtak a sejtenyészetekhez, amely az összes hozzáférhető célhelyet biotinizálta. A sejtlizist követően a biotinizált membránfehérjéket streptavidin segítségével választották külön, ugyanis a biotin rendkívül erős affinitással kötődik az avidinhez. A biotin-(strept)avidin kölcsönhatás a természetben ismert legerősebb nem kovalens kötések egyike, amelynek disszociációs állandója ( $K_d$ )  $10^{-15}$  M [301]. Különösen előnyös, hogy a

(strept)avidinnel való kötődése rendkívül ellenálló olyan hatásokkal szemben, mint az organikus oldószerek, magas sókoncentrációk és detergensok, így lehetőséget biztosít többszörös mosási lépések alkalmazására. Bár a korai kísérletekben a membránfehérjék kezdeti dúsítása megtörtént, a citoplazmatikus fehérjékkel való szennyeződés így is számottevő volt. A magas szennyeződési szint elsősorban annak tulajdonítható, hogy a korai időszakban alkalmazott biotinizáló reagens lapos alakja és apoláris jellege miatt könnyen átjutott a lipid kettősrétegen, így nemcsak a felszíni, hanem IC fehérjéket is megjelölt.

Bár a legtöbb kémiai biotinizációs módszer a szabad aminocsoportokat célozza meg, léteznek alternatív stratégiák is. Vannak olyan surfaceome dúsítási technikák, amelyek a fehérjék glikolizáltságára épülnek, és ezek kémiai, metabolikus vagy enzimátikus módosításával érhető el a célzott elkülönítés. 2003-ban Aebersold kutatócsoportja egy újabb módszert fejlesztett ki a plazma glikoproteinek és felszíni glikoproteinek specifikus izolálására egy nyers PM frakcióból [302]. A módszer alapja, hogy a szacharidokban jelen lévő cisz-diol csoportokat (például szíálsavban és galaktózban) nátrium-metaperjodáttal ( $\text{NaIO}_4$ ) oxidálják, így aldehiddé alakulnak. Ezeket az aldehidcsoportokat ezután hidrazid kémiai reakció révén egy szilárd hordozóhoz kötik, amely során kovalens hidrazon kötés jön létre. A fehérjék emésztése után a megkötött glikopeptidek továbbra is a szilárd hordozón maradnak, míg a nem glikozilált peptidek könnyen eltávolíthatók mosással. Végül a PNGase F enzim segítségével a glikopeptidek felszabadulnak, így alkalmasakká válnak LC-MS/MS analízisre. Az eredeti tanulmányban 64 fehérjét azonosítottak, amelyek közül 45 (70%) membránfehérje volt. Wollscheid és mtsai. továbbfejlesztették ezt a módszert, hogy kifejezetten a sejt felszínen expresszált fehérjéket dúsítsák, amely eljárást sejt felszín-befogásnak (cell surface capture, CSC) nevezték el. A módszer során először mérsékelt oxidációt alkalmaznak ép sejteken perjodát segítségével, majd a sejt felszínre korlátozó biocitin-hidrazinnal jelölik az oxidált glikánokat, még a sejt lizis előtt. Mivel a jelölőanyag nem képes áthatolni a membránon, kizárólag a sejt felszínen lévő módosult glikánokhoz tud kapcsolódni. Ezt követően a sejteket lizálják, a fehérjéket emésztik, így egy heterogén peptidkeverék jön létre. A biotinizált glikopeptideket streptavidin segítségével szeparálják, a szennyező fehérjéket lemosják, végezetül az N-glikozilált peptideket – hasonlóan az előző munkacsoportéhoz – PNGase F enzim segítségével szabadítják fel [303]. Ez a stratégia lehetővé tette a Cell Surface Protein Atlas (CSPA) nevű adatbázis létrehozását, amely több mint 1500 humán és 1300 egér sejt felszíni fehérjét tartalmazza 78 különböző humán és egér sejt típusból [304]. Ducret és csoportja kisebb módosításokkal alkalmazta a CSC stratégiát hepatocytákon, és 217 sejt felszíni fehérjét

azonosítottak, amelyek közül több specifikusan a májsejtek jelölésére alkalmasnak bizonyult [305]. A hidrazid konjugáció alternatívájaként a gliko-jelölés (glycocapture) elvégezhető aminoszintetizációs reagens alkalmazásával is, mely technikát a mi munkacsoportunk évek óta sikeresen alkalmazza és amelyet felhasználtam a disszertációm alapjául szolgáló kísérletek kivitelezéséhez is. Hasonlóan a CSC stratégiához, ebben a módszerben a glikán oldalláncokat először nátrium-metaperjodáttal oxidáljuk, hogy aldehidcsoportokat képezzünk. Ezután a biotinon található aminoszintetizációs csoport reakcióba lép az aldehidekkel, amelynek eredményeként a sejtfelszíni fehérjék biotinilálása egy oximkötésen keresztül valósul meg. Ezt a módszert témavezetőm, Dr. Matta Csaba már sikeresen alkalmazta chondroprogenitor sejtek és MSC-k surfaceome-jának azonosítására, hogy kollégáival feltárja a két sejtípus közötti proteomikai különbségeket [306].

Bár a sejtfelszíni fehérjék biotinilálása széles körben alkalmazott és könnyen kivitelezhető módszer, hátrányai is léteznek. A biotinilált fehérjék dúsítása továbbra is érzékeny lehet szennyeződésekre, például kapcsolódó fehérjékre (pl. fehérjekomplexek alegységeire) és nem specifikus fehérje–fehérje kölcsönhatásokra, különösen nagy mennyiségben jelen lévő fehérjék esetén [307]. Emiatt a módszer különböző reagensekkel történő többször ismételt mosási lépéseket igényel a nem kívánt fehérjék eltávolítására, amely limitálhatja az alacsony kópiaszámú sejtfelszíni fehérjék kimutatását. Ezen kívül érdemes figyelembe venni, hogy a különböző ingerekre adott válaszuk során a sejtek nemcsak a felszíni fehérjék mennyiségét, hanem azok N-glikozilációjának mértékét is megváltoztathatják, ezáltal a mintába kerülő peptid aránya is részben eltérhet [308].

A porcfejlődés különböző stádiumainak kvalitatív és kvantitatív surfaceome mintázatáról jelenleg erősen korlátozottak az ismereteink, ami akadályozza a porcbetegségek (pl. OA, RA) korai diagnosztikáját és az őssejt-alapú kezelési stratégiák kifejlesztését. Az általunk alkalmazott csirkeembryo modellben összehasonlíthatjuk a chondroprogenitor sejtek, a chondroblastok, az érett chondrocyták, valamint a hypertrophiás chondrocyták sejtfelszíni fehérjemintázatát. Ennek segítségével az adott porcfejlődési stádiumra jellemző surfaceome profilokat hozhatunk létre. Általánosságban elmondható, hogy az egyes sejtfelszíni fehérjék megváltozott expressziója segítségével szolgálhat a porc-progenitorsejtek és eltérő pathológiás markerek felfedezésére. Arról is információt szolgáltat, hogy milyen célpontot érdemes biológiai terápiával célba venni az egyes porcbetegségek esetén. Ezenfelül az ún. kettős- és multitargeting kezelési stratégiák egyre nagyobb figyelmet kapnak, mivel növelhetik a terápiás

hatékonyságot és csökkenthetik a gyógyszerrezisztencia kialakulását. Ennek okán a sejtfelszíni fehérjék alapos feltérképezése jelentős segítséget nyújthat az orvostudománynak.

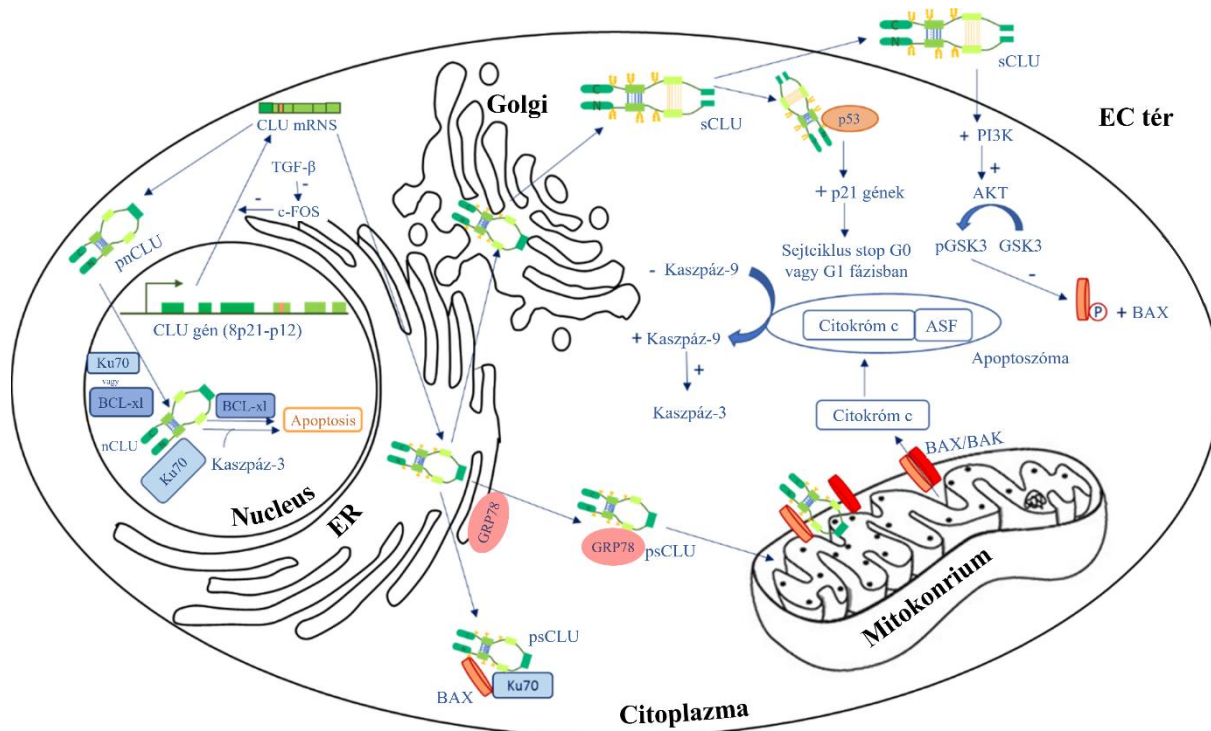
## 2.3. Clusterin: élet és halál között egy extracellularis chaperonnal

### 2.3.1. A clusterin szintézisének, izoformáinak és azok funkcióinak bemutatása

A clusterint 1979-ben fedezték fel, és elsőként patkány hereszövetéből izolálták [309]. Nevét („clusterin”) amiatt a képessége miatt kapta, hogy *in vitro* körülmények között vörösvértesteket képes aggregálni [310]. Ezen fehérjét különböző kutatócsoportok más-más névvel illették: apolipoprotein J (ApoJ), citolízis inhibitor (CLI), SP-40, gp80, NA1, NA2, SGP-2, tesztoszteron represszált prosztata hírvivő-2 (TRPM-2), azonban jelenleg elsősorban clusterinként (CLU) ismert [311]. A CLU egy általánosan jelenlévő, multifunkcionális glikoprotein, amely szinte az összes testfolyadékban megtalálható, valamint több IC kompartmentben is jelen van. Az eredeti fehérje prekuzorból különböző izoformák keletkezhetnek, amelyek eltérő funkciókat töltenek be. Egy kisebb, körülbelül 49 kDa tömegű izoforma a sejtmagban lokalizálódik, míg egy közepes méretű, 53 kDa-os változat a citoplazmában és mitokondriumban marad. Emellett léteznek nagyobb, glikozilált módosulatai, amelyek az ER-ben és a Golgi-apparátusban hasadnak, végül  $\alpha$ - $\beta$  heterodimer formában kiválasztódnak a sejtől, melyek mérete 75–80 kDa között mozog [312].

A CLU a sejtben belül elsősorban az apoptózis szabályozásban játszik fontos szerepet. Érdekessége, hogy egyszerre képes pro- és anti-apoptotikus folyamatokat aktiválni, függően attól, hogy mely izoformájának a szintje emelkedik meg (2.7. ábra). Bizonyos cellularis stressz esetén a pre-nukleáris izoforma (pnCLU) érési folyamatokon esik át [313], és az így létrejövő nukleáris clusterin (nCLU) a sejtmagba transzlokálódik, ahol Ku-70-hez kötődve elősegíti az apoptózis folyamatát egy kaszpáz-3 függő mechanizmuson keresztül [314,315]. Az nCLU-nek ezt a pro-apoptotikus hatását megerősítették Tunel-festéssel, a BCL-XL anti-apoptotikus fehérje gátlásával [316], valamint az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalban betöltött szerepével is [317]. A nukleáris izoforma feltételezett pro-apoptotikus funkciójával ellentétben a kanonikus útvonal által közvetített folyamatok sokkal összetettebbek. A glikoziláció során egy úgynevezett pre-szekretált, majdnem érett izoforma (presecreted clusterin, psCLU) keletkezik, amely 53 kDa molekulatömegű. Eltérő fiziológiás állapotokban, amikor megnövekedett a szekréciós terhelés, vagy patológias állapotokban, például mutálódott fehérjék jelenlétében [318], továbbá farmakológiai kezelések, például paclitaxel alkalmazása esetén [319], illetve korai életkorban

fellépő alultápláltság hatására [320], a psCLU képes megkötni az ER-ben a retikuláris chaperon GRP87-et (másnéven BiP vagy HSPA5, egy HSP70 fehérje), amely stabilizálja és segíti a psCLU mitokondriumba történő transzlokációját [319]. A mitokondriumba jutva a psCLU megköti az aktivált BAX fehérjét, ezzel gátolja annak oligomerizációját [321], melynek eredményeként akadályozza a BAX–BAK komplex kialakulását. A komplex normál esetben az apoptotikus kaszkád elindításához vezetne a mitokondrium külső membránjának permeabilizációja (MOMP) és a Citokróm C felszabadulása révén [322]. Ebből adódóan a psCLU anti-apoptotikus fehérjeként működik. Más esetben, ha a psCLU a citoplazmában marad, akkor stabilizálja a Ku70-BAX komplexet, így megakadályozza, hogy a BAX elérje a mitokondriumot [323]. Szintén a citoplazmában a psCLU képes megkötni bizonyos citotoxikus anyagokat, és proteasomalis lebontásukhoz hozzájárulni [324], ezzel tovább növelve anti-apoptotikus tulajdonságait. Ezt a szerepét tovább erősítette Pereira és mtsai., mivel 2018-ban kimutatták, hogy a szekretált izoforma (sCLU) képes aktiválni a PI3K-AKT jelátviteli útvonalat. Ez az aktiváció a GSK3 foszforilációját eredményezi, amely így megakadályozza a BAX fehérje aktiválásához szükséges foszforilációt, ezáltal hozzájárulva a sejtek apoptózis elleni védelméhez [325]. Ezzel teljesen szembe megy az a megfigyelés, hogy miután egy másik sejt felveszi, a teljesen érett sCLU izoforma pro-apoptotikus szerepet is betölthet. Ez annak köszönhető, hogy képes stabilizálni a p53 fehérjét, amely olyan géneket aktivál, amelyek megállíthatják a sejtciklust a G1 [323] vagy akár G0 fázisban [326], így gátolva a sejtek további proliferációját. Összefoglalásképpen elmondható, hogy míg a nukleáris izoforma pro-apoptotikus tulajdonságokkal rendelkezik, addig a CLU mitokondriumban és citoplazmában található pre-szekretált formája inkább az anti-apoptotikus folyamatokat segíti. Azonban az EC térbe jutó szekretált formája ennél bonyolultabb működésű és kontextus függő módon képes anti-apoptotikus (PI3K-AKT útvonal) vagy pro-apoptotikus (p53 aktiváció) hatást is elérni, így biztosítva a sejttúlélés-sejthalál bonyolult szabályozását.



**2.7. ábra: A clusterin szintézise és izoformáinak funkciója a sejten belül.** A pre-nukleáris clusterin (pnCLU) érési folyamat révén bejut a sejtmagba, ahol nukleáris clusterinné (nCLU) alakul és elősegíti a tervezett sejthalál (apoptosis) folyamatát. A CLU mRNS-ről egy másik splice variáns az ER-be jut, ahonnan pre-szekretált formában (psCLU) a citoplazmában és a mitokondriumban elsősorban anti-apoptotikus folyamatokat indukál. Az ER-ből a Golgi irányába a psCLU poszttranszlációs módosulás során érett, szekretált CLU (sCLU) keletkezik. A sCLU képes megállítani a sejtciklust a p53 fehérje stabilizálása révén, másfelől a PI3K-AKT jelátvitelen keresztül a pre-szekretált izoformához hasonlóan gátolja a sejthalált folyamatát. (Forrás: [327], módosítva)

A CLU volt az első olyan molekula, amelyről kimutatták, hogy szekretált izoformája chaperonként működik az EC térben, segítve a rosszul feltekeredett fehérjék eltávolítását [328]. A CLU egy ATP-független chaperon, amelynek funkcionális tulajdonságai hasonlítanak a „holdáz” típusú dajkafehérjékre, mint amilyenek a kis hőszokk fehérjék is (sHSP-k) [329]. A holdáz chaperonok megkötik és stabilizálják a fehérjehajtogatás köztes termékeit és a hibásan feltekeredett fehérjéket, megakadályozva azok aggregációját, azonban nem segítik elő aktívan a helyes újrashajtogatást. Feltételezések szerint a CLU egyelőre nem meghatározott, úgynevezett „olvadt gombolyag” -szerű (molten globule-like) doménon keresztül lép kölcsönhatásba a célfehérjékkel [330]. A CLU extracellulárisan aggregátumokhoz kötődik, és elősegíti azok eltávolítását receptor-mediált endocytosis útján [328,331]. A CLU internalizációjának pontos mechanizmusa azonban még nem teljesen tisztázott. Számos lehetséges receptort azonosítottak, amelyek szerepet játszhatnak a CLU sejtek által történő felvételében. Ezek közé tartoznak többek között a scavenger receptorok [328], a HS PG-k [332], az apolipoprotein E receptor 2

(ApoER2), a nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein receptor (VLDLR) [333], a myeloid sejtek által expresszált 2-es trigger receptor (TREM2) [334], a Plexin A4 [335], valamint az LRP1 és LRP2 [336,337]. Miután a CLU specifikus sejt felszíni receptorokon keresztül elősegíti a hibásan feltekeredett fehérjék internalizációját, a bejutott fehérjék lebomlanak az ubiquitin-proteasoma rendszeren [324] és/vagy autophagián/lysosomákon keresztül [338]. Emellett azt is feltételezik, hogy a CLU együttműködik a plazminogén aktivációs rendszerrel a patológiás fehérjeaggregátumok EC térből történő eltávolításának elősegítése érdekében [339].

A CLU-t először az Alzheimer-kórral hozták összefüggésbe, miszerint fontos szerepet játszik a rosszul feltekeredett fehérjék, valamint más sejtörmelékek eltávolításában a sejt közötti térben, melynek következtében hagyományosan neuroprotektív szerepet tulajdonítanak neki [340]. Ezt a feladatát tovább erősíti, hogy a CLU képes megelőzni vagy legalábbis lassítani az amorf aggregátumok és amyloid fibrillumok képződését több eltérő neurodegeneratív betegségben, mely hatást többek között az amyloid- $\beta$  [341],  $\alpha$ -synuclein [342], Tau [331], transthyretin [343] és a TDP-43 fehérje esetében is igazoltak [344]. A CLU chaperon funkciójának élettani jelentőségét jól mutatja az a megfigyelés is, hogy ha emberi vérplazmából immunológiai módszerekkel eltávolítják a CLU-t, a plazmafehérjék stressz-indukálta kicsapódása nagy mértékben megemelkedik [345]. Az idős CLU KO egerekben a vesében fehérje-lerakódások alakulnak ki, – ami glomerularis nephropathiához vezet – mely közvetlenül rámutat arra, hogy a CLU szerepet játszik a hibásan feltekeredett fehérjék eltávolításában [346]. A CLU nemcsak chaperon aktivitása révén rendelkezik proteinvédő hatással, hanem azáltal is, hogy képes gátolni az MMP család bizonyos tagjainak aktivitását. Ezt először a sejt felszíni MMP25 esetében igazolták [347]. Egy későbbi tanulmányban Fini és mtsai. azonosították a CLU-t mint egy MMP9-cel kölcsönhatásba lépő fehérjét egy élesztő kettős hibrid szűrés során [348]. Ebben a kutatásban a CLU továbbá gátolta az MMP2 és MMP3 enzimatis aktivitását, valamint kisebb mértékben az MMP7 aktivitását is.

Az elmúlt években a CLU-t nemcsak idegvédő fehérjeként, hanem fájdalomcsillapító szerepkörben is vizsgálták a klinikumban. Felmerült, hogy mérsékelheti a daganatos betegségek kezeléséből fakadó onkológiai fájdalmat, valamint potenciális terápiás célpontként javasolták egyéb fájdalomtípusok, például a neuropathiás és gyulladásból fakadó fájdalom kezelésére is [349,350]. Továbbá friss kutatások szerint a CLU gyulladással kapcsolatos állapotokban, például elhízás esetén, adjuváns szerepet játszhat, ahol az étvágy szabályozásával is összefüggésbe hozták [337]. Érdekes módon egyes eredmények arra utalnak, hogy a függőségi folyamatok és a CLU expressziós szintek között kapcsolat állhat fenn [351]. Ezen túlmenően az utóbbi években

több tanulmány is foglalkozott a CLU szerepével cardiovascularis betegségekben, mely esetben a nukleáris izoforma káros, a szekretált izoforma pedig előnyös tulajdonságokat mutatott, ami tovább erősíti a CLU széles körű orvostudományi jelentőségét [352].

### 2.3.2. *A clusterin a porcszövet és porcfejlődés kontextusában*

Ahogy azt korábban említettem, a CLU fehérje többek között egy egyedi chaperonként is működik, amely kritikus és szinergikus szerepet játszik mind az IC, mind az EC fehérjék élettani konformációjának fenntartásában [353], és ahogy azt az előző alfejezetben bemutattam, már számos kórfolyamatban is bizonyították érintettségét. Ennek ellenére jelenleg sem teljesen tisztázott a CLU szerepe a porcszövetet érintő arthritises és rheumás megbetegedésekben.

Az utóbbi években a CLU egyre nagyobb figyelmet kap az OA kialakulásának és progressziójának összefüggésében. Az eddigi publikációk szerint a CLU szerepet játszhat az OA pathogenesisében, ezen belül is a porcanyagcserében, a gyulladós folyamatok szabályozásában és az oxidatív stresszben [354,355]. Mivel a CLU egy szabályozó molekula, amely nem csak az apoptosist, de a gyulladást, az oxidatív környezetet és az energia-homeosztasist is befolyásolni képes, ezért potenciális biomarker-jelölt az OA kialakulásának tanulmányozásában, valamint a klinikai beavatkozásokra adott válaszok követésében [355]. Az *in vitro* tenyésztett humán OA-s ízületi chondrocyták teljes sejtlizátumában azt tapasztalták, hogy a sejtek magasabb CLU mRNS- és fehérjeszintet expresszálnak az egészséges kontrollcsoportéhoz képest [356]. Egy másik vizsgálat eredményei, amelyben a CLU lokalizációját elemezték az autológ chondrocyta-implantációt követően regenerálódott porcban, szintén alátámasztják a CLU védő szerepét, mely következtetés a CLU eloszlásának különbségein alapul az egészséges és a regenerált porc között [357]. Több proteomikai vizsgálat is kimutatta, hogy klinikai szempontból a CLU az OA egyik ígéretes glikoprotein biomarkere lehet [358]. Ezen túlmenően a sCLU kulcsszerepet játszhat EC chaperonként az ízületi porc ECM-ben, ahol védelmet nyújthat a proteotoxicitás ellen, hasonlóan ahhoz, ahogyan neurodegeneratív betegségek esetén is működik [359].

Mindezek ellenére kevés információval rendelkezünk arról, hogy a CLU expressziója és aktivitásának szabályozása milyen útvonalak mentén valósul meg a porcsejtekben és mik lehetnek azok a target fehérjék a porcmatrixban, melyek hibás konformációját a sCLU javítani képes.

## 2.4. A surfaceome és a clusterin kapcsolata

A proteostasis kifejezés arra utal, hogy a teljes proteom megfelelő konformációban, koncentrációban és lokalizációban van jelen annak érdekében, hogy a fehérjék megfelelően elláthassák funkcióikat, ami kritikus fontosságú az élő szervezet életképességének fenntartásában [360]. A proteostasis biztosító folyamatok mind az IC, mind az EC környezetben működnek, bár az IC térben működő rendszerekről több ismerettel rendelkezünk. Annak ellenére, hogy a fehérjék akkor kezdenek el aggregálódni (összetapadni), amikor koncentrációjuk meghaladja az oldhatósági határt [361], számos fehérje fiziológiai körülmények között is az oldhatósági küszöb felső határán működik [362]. Ennek következtében a fehérjekoncentráció vagy oldhatóság kis mértékű változása (például mutációk vagy környezeti változások miatt) könnyen felboríthatja ezt a kényes egyensúlyt, ami aggregációhoz és fehérje-depositumokhoz vezethet. Ismert tény, hogy az emberi szérumalbumin módosításai – például oxidáció révén vagy bizonyos mutációk következtében –, amelyek növelik a felszíni hidrofóbicitását, felgyorsítják annak eltávolítását a vérkeringésből [363]. Ezenkívül kimutatták, hogy *in vivo* a denaturált plazmafehérjék gyorsabban bomlanak le, mint natív megfelelőik [364]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy valószínűleg léteznek olyan EC mechanizmusok, amelyek hozzájárulnak a proteostasis fenntartásához, és kiegészítik az IC chaperonok már ismert szerepét. A CLU volt az elsőként felfedezett képviselője [365] annak a bőségesen előforduló EC chaperon családnak, amelynek tagja még az  $\alpha 2$ -makroglobulin [366], a haptoglobin [367], valamint az  $\alpha_{S1}$ - [368] és  $\beta$ -kazein [369] is.

Ahogy a surfaceome bemutatása során említettem, a sejt felszíni és ECM fehérjék számos különféle élettani funkcióért felelősek, például a külső szignálok felismeréséért, a sejt differenciáció és sejtosztódás szabályozásáért, a sejt motilitásért és a sejt volumen fenntartásért. Egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy nemcsak a fehérjék expressziója, elhelyezkedése, de azok többféle konformációs állapotának szabályozása, és végső soron a proteostasis fenntartása a sejtek és az egész szervezet szempontjából ugyancsak létfontosságú folyamata. Ugyanakkor a mechanizmus részletei, amely révén ez a szabályozás az EC térben megvalósul, jelenleg sem teljesen tisztázott.

Összefoglalásképpen elmondhatom, hogy a surfaceome átfogó ismerete és a sejt felszíni fehérjék védelmének biztosítása elsőrendű fontosságú nem csak a testünket felépítő mikro- és makrostruktúrák alapos ismerete szempontjából, hanem számos betegség pathogenesisének,

pathomechanizmusának megértése miatt is, mely tudás birtokában pontosabbá tehető a diagnózisalkotás és eredményesebbé a gyógyítás folyamata.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk az volt, hogy az *in vitro* porcdifferenciáció során és különböző bioinformatikai adatbázisok segítségével az alábbiakat vizsgáljuk meg:

- **Milyen kvalitatív és kvantitatív összetétellel rendelkezik a surfaceome az *in vitro* porcfejlődés során?** A porcfejlődés eltérő szakaszaiban milyen fehérjék és mekkora mértékben fejeződnek ki a sejtfelszínen? A sejtfelszíni proteinek milyen fő funkciókkal rendelkeznek és történik-e változás a funkciók arányában?
- **Találhatóak-e olyan fehérjék a sejtek felszínén, melyek specifikusak lehetnek egy adott porcfejlődési stádiumra?** Kimutathatunk-e egy vagy több surfaceome fehérjét melyek csak a korai, vagy csak a kései chondrogenesis során expresszálódnak? Vagy léteznek-e olyan sejtfelszíni fehérjék, melyek végig jelen vannak, de kifejeződésük mértéke szignifikánsan változik a porcdifferenciáció előrehaladtával?
- **Az esetlegesen kimutatott sejtfelszíni biomarker milyen szereppel rendelkezhet a porcsejtek életében?**
- **Végezetül milyen specifikus feladattal rendelkezhet a CLU a porcszövet élettanában, valamint az OA pathomechanizmusában?** A CLU-nek mik lehetnek a target fehérjéi porcszövetben? Ezenfelül bioinformatikai hálózatelemzések alapján milyen feltételezett kölcsönhatások lehetnek közöttük?

Egyetemi doktori értekezésem fő célja az volt, hogy az *in vitro* chondrogenesis során megvizsgáljam a surfaceome expressziós mintázatában bekövetkezett változásokat és a porcfejlődés meghatározott stádiumaira jellemző új sejtfelszíni biomarkereket azonosítsak. Ezenfelül, hogy felfedezzem a sejtfelszíni és EC fehérjék chaperonjának, a CLU-nek az interakciós partnereit hálózatbiológiai módszerek segítségével. Ezen ismeretek birtokában részletesebb képet kaphatunk a különböző stádiumú porcsejtek surfaceome ujjlenyomatáról, továbbá az így felfedezett biomarkerek potenciális célpontként szolgálhatnak a degeneratív porcbetegségek korai diagnózisában és terápiájának kifejlesztésében.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Kísérleti modell: csirkeembryo végtagtelep-eredetű porcosodó micromass primer sejt kultúra

Az *in vitro* chondrogenesis folyamatát csirkeembryok végtagtelepeiből izolált chondroprogenitor sejtek segítségével vizsgáltuk, melyeket high-density micromass kultúrákban differenciáltattunk [370]. A csirkeembryok kutatásban történő felhasználásához nincs szükség külön etikai engedélyre a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságától. Kísérleteinkhez a tojásokat (általában 100–150 db tojás biológiai replikátumonként) egy közeli telephelyről szereztük be, majd 4,5 napig inkubáltuk azokat a keltetőgépben. Az inkubációs periódus végén a csirkeembryok a Hamburger-Hamilton (HH) felosztás szerint 23–24-es stádiumúvá fejlődtek (az iris pigmentáltsága már látható, de a végtagokba még nem törtek be az erek, valamint az ujjak szeparációja még nem indult meg). Az embryokat steril körülmények között a feltört tojásokból kiemeltük, azokat kalcium- és magnézium-mentes foszfátpufferelt sóoldatba (CMF-PBS) helyeztük. Ezután mikroszkóp és steril csipeszek segítségével lamináris fülkében a mellső és hátsó végtagtelepek distalis 1/3-át lemetsztük és egy CMF-PBS-t tartalmazó üvegpetribe gyűjtöttük, mivel a végtagbimbók ezen része a 23-24 HH stádiumban elsősorban chondroprogenitor sejteket tartalmaz. Ezt követően, hogy kinyerjük a sejteket a lemetszett végtagokból, a szövet 0,25% tripszin-EDTA oldatban való emésztése következett egy órán keresztül, 37 °C-os, 5% CO<sub>2</sub> és 90% relatív páratartalmú sejtenyészítő inkubátorban. Az emésztést a tripszin oldattal azonos térfogatú foetalis borjúszérummal (FBS) állítottuk le. 10 perces centrifugálást (800 × g) követően a sejtüledéket előzetesen komplett Ham's F12 médiumban (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) reszuszpendáltuk (az összetevők listáját lásd alább). Az így kapott sejtsuszpenziót egy 20 µm pórusátmérőjű szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) át szűrtük, és ismét 10 percen át centrifugáltuk (800 × g). Ennek köszönhetően a szuszpenziónk egy közel egységes méretű, chondrogenikus mesenchymális sejt populációt tartalmazott. A sejtsűrűséget Luna automata sejtszámoló készülék (Logos Biosystems, Gyeonggi-do, Dél-Korea) segítségével számoltuk ki, mely után  $1,5 \times 10^7$  sejt/ml sűrűsége hígítottuk a szuszpenziót. A savas dimetil-metilénkék (sDMMK) szövettani festéshez a 12 mm átmérőjű üvegfedőlemezzel (Avantor) ellátott 24 lyukú plate-ben (Eppendorf, Hamburg, Németország), wellenként 30–30 µl csepp sejtsuszpenziót alkalmaztunk. A sejt felszíni fehérje izolálásához 30-25-20-15-15 db 100 µl-es cseppet használtunk nagy (150 mm

átmérőjű) petrikben (Avantor, Radnor Township, Pennsylvania, USA) attól függően, hogy milyen hosszú ideig tenyésztettük a kultúrákat: 1, 3, 6, 10 vagy 15 napig. A western blot esetén szintén 30-25-20-15-15 db 100 µl-es cseppet használtunk nagy petrikben (Avantor), azonban az immuncitokémiához elegendő volt a  $2 \times 100$  µl-es csepp is közepes méretű (60 mm átmérőjű) petrikben (Eppendorf). A sejteket végül két órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on, 5%  $\text{CO}_2$  és 90% relatív páratartalmú inkubátorban (BINDER GmbH, Tuttlingen, Germany) engedték kitapadni a tenyésztő edények alsó felszínére, majd a 2 óra letelte után megfelelő mennyiségű, komplett Ham's F12 médiummal etették meg a kultúrákat, amelyet 2 naponta cseréltünk. A kísérletekhez a sejt kultúrákat a chondrogenesis meghatározott stádiumainak megfelelő tenyésztési napokon használtuk fel: 1. napon chondroprogenitor sejtek, 3. napon chondroblastok, 6. napon érett chondrocyták, 10. napon hypertrophia előtt álló chondrocyták, 15. napon pedig már hypertrophiás chondrocyták alkották a kultúrákat (2.5. ábra).

A tenyésztéshez és a sejtek fenntartásához alkalmazott Ham's F12 médium általunk hozzáadott komponensei a következők voltak: 0,1% penicillin-streptomycin mix (Sigma-Aldrich) és 0,2% gentamycin (Laboratorios Normon, Madrid, Spanyolország) antibiotikum, 0,05% amphotericin-B Fungison (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) antifungális készítmény, 100 mg/l L-aszcorbinsav (C-vitamin) (Sigma-Aldrich), melyet használat előtt kiegészítettünk még 10% FBS-sel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), valamint 0,5 mM stabil L-glutaminnal (Euroclone, Pero, Olaszország).

*A csirkeembryo végtagtelep eredetű HD kultúrák létrehozásában a szerző mellett Vágó Judit és Katona Éva vett részt.*

## 4.2. Szövettani festés alkalmazása

Az általánosan alkalmazott szövettani festési eljárások leírásakor beszélhetünk orthochromasiáról, amikor a felhasznált festék az eredeti színével fest meg bizonyos makromolekulákat, sejt- és szövetkomponenseket. Ezzel szemben a metachromasia esetében az alkalmazott festék a saját színétől eltérő színnel jelöl bizonyos struktúrákat. Kísérleteink során az sDMMK szövettani festés alkalmazásával figyeltük meg a fejlődő porcban termelődő porcspecifikus ECM változásait. A festék orthochromasiás színe a kék, míg a porcosodás megjelenésével metachromasiás elszíneződéssel püspöklila árnyalatot figyelhetünk meg az általunk vizsgált micromass kultúrákban. A metachromasiát a termelődő porcmatrixban található nagy mennyiségű PG és GAG makromolekulák okozzák, ugyanis ezen komponensek

erősen negatív töltéssel bírnak a hozzájuk kapcsolódó szulfát csoportok miatt. A negatív töltéssel rendelkező struktúrákhoz a festékben lévő pigmentek nagyobb mennyiségben aggregálódnak, polimerizált formában kötődnek, ezáltal a fénymikroszkópban a területen áteső fény hatására a festék az eredeti színétől eltérő árnyalatban fog megjelenni [371]. A savas pH-n történő festés amiatt szükséges, mert ennek során kizárólag a szulfátcsoportokat tartalmazó GAG-ok festődnek (pl.: chondroitin-szulfát), de az egyéb polianionok (pl. nukleinsavak, hyaluronsav) nem kötik meg a festéket, így nem interferálnak a felvételek kiértékelésekor [372].

A szövettani festéshez a csirkeembryo végtagtelep eredetű sejtszuszpenzióból 30 µl-es cseppeket pipettáztunk 12 mm átmérőjű üvegfedőlemezzel ellátott 24-lyukú tenyésztő edénybe. A porcsejtek matrix-termelő képességét a már említett tenyésztési napokon vizsgáltuk (1., 3., 6., 10. és 15. napon). sDMMK festés esetében első lépésként a kultúrákat az adott tenyésztési napon kétszer átmostuk PBS-sel, majd 30 perces fixálás következett etil-alkohol (Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország) és formalin (Molar Chemicals Kft.) 4:1 arányú keverékével. Hogy eltávolítsuk a formalint a kultúrákról és a festéknek szükséges környezetet megteremtjük, a fixálást leszálló alkoholsor követte (96%, 80%, 70%), minden esetben 5-5 percig inkubáltuk a kultúrákat, majd desztillált vízzel rehidratáltuk a fixált sejteket. Ezt követően a festék oldószerével, vagyis 3%-os ecetsav oldattal (Molar Chemicals Kft.) mostuk át a kultúrákat. Ezután következett a festés, mely 3%-os ecetsavban (pH 1,8) oldott 0,1%-os DMMK (Sigma-Aldrich) oldattal 5 percen keresztül történt, miután a nem kötődött festéket 3%-os ecetsav oldattal, valamint desztillált vízzel mostuk le. Végezetül az üvegfedőkön levő mintákat Aquatex (Sigma-Aldrich) vizes alapú ragasztó segítségével tárgylemezre fedtük. Az sDMMK-festett kultúrákról egy Olympus BX53 mikroszkóppal (Olympus Corporation) készítettünk felvételeket 4x nagyítású objektív alkalmazásával. 3 független biológiai kísérletsorozat történt, sorozatonként 3–3 különálló sejtenyészet megfestésével. A digitális felvételeken látható metachromatikus pixelekből a MatLab program (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) segítségével metachromasiás index kalkulálható (alkalmazott RGB kód: R190, G10, B174), melynek segítségével következtethetünk a porcmatrix mennyiségi és minőségi összetételére.

#### 4.3. Sejtfelszíni fehérjék izolálása és dúsítása aminosav-biotin technikával

A 2.2.3. *alfejezetben* több, sejtfelszíni fehérje izolálásra alkalmas technikát ismertettem. Ezen módszerek szükségességét az adja, hogy a PM-ben relatíve alacsony arányban fejeződnek

ki fehérjék a teljes proteomhoz viszonyítva, emiatt a teljes sejtlizátumon végzett tömegspektrometriai vizsgálat során a nagy mennyiségben jelenlévő citoplazmatikus és egyéb fehérjék elfedhetik az alacsonyabb expresszióval jellemezhető társaikat [373]. A sejtfelszíni fehérjék izolálása során számos mosási lépésnek köszönhetően megszabadulhatunk ezektől a szennyező, nem surfaceome-asszociált fehérjéktől. A sejtfelszíni glikoproteinek specifikus dúsításához mi az aminooxi-biotin jelölést alkalmaztunk. A jelölési folyamat két lépésből áll: először enyhe perjodátos oxidációval aldehidcsoportokat képzünk a sejtfelszíni glikoproteineken, majd az oxidálódott csoportokhoz aminooxi-biotin kötődik oxim-kötés segítségével. A reakció relatíve lassan zajlik (12–16 óra), azonban ez lerövidíthető 60 percre egy katalizátor, például anilin használatával [374]. A biotinnal jelölt sejtfelszíni fehérjéket (neutr)avidin tartalmú agaróz gyöngyökhöz adjuk, melynek következtében egy erőteljes biotin-avidin kötés alakul ki. Ez a kötés elég stabil ahhoz, hogy számottevő veszteség nélkül tisztíthassuk a fehérjemintáinkat a szennyeződésektől többszörös mosási lépésen keresztül. Ezt a módszert már hatékonyan alkalmazták sejtfelszíni fehérjék jelölésére chondroprogenitor és mesenchymális őssejtekben [306], valamint érett chondrocytáknak [375], de még nem alkalmazták a chondrogenesis teljes folyamatában.

A surfaceome jelöléshez a chondrogenesis különböző tenyésztési napjain (1., 3., 6., 10., 15. nap) használtuk fel a nagy petriben fejlődő HD sejt kultúrákat. Első lépésként a sejt kultúrákat átmostuk kétszer 15 ml steril PBS-sel (pH 7,4) (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK), majd 15 ml szérummentes Ham's F12 médiumban 1 órán át inkubáltuk őket 37 °C-on a sejtenyésztő inkubátorban, hogy az FBS-ben található szérumfehérjéket eltávolítsuk. Az 1 órás inkubáció után ismét kétszer mostuk a kultúrákat 15 ml PBS-sel, majd hozzáadtunk 5 ml 0,25%-os I-es típusú kollagenáz oldatot (Sigma-Aldrich) és visszahelyeztük a tenyésztőedényeket az inkubátorba 5–20 percre (függően az ECM mennyiségétől), hogy az emésztő enzim ideális körülmények között a kollagénben gazdag porc matrixot lebontsa, anélkül, hogy a sejt felszíni fehérjéket károsítaná.

Az inkubáció letelte után a felszabadult sejteket egy centrifugacsőbe pipettáztuk át, továbbá két alkalommal 5–5 ml PBS segítségével gyűjtöttük össze a nagy petriben visszamaradt sejteket ugyanabba a centrifuga csőbe a kellően magas sejtszám eléréséhez. A mintákat 300 × g-n 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. Ezt követően valamennyi lépést hidegben vagy jégen végeztük a mintákban esetlegesen jelenlévő proteázok aktivitásának minimalizálása érdekében. Frissen elkészítettük az oxidációs/biotinilációs keveréket, amely 1 mM nátrium-metaperjodátot (Thermo Fisher Scientific), 100 mM aminooxi-biotint (Biotium,

Fremont, CA, USA) és 10 mM anilint (Sigma-Aldrich) tartalmaz PBS-ben (pH 6,7). A centrifuga csőben lévő sejttöledéket 4 ml oxidációs/biotinilációs mixben vettük fel, majd közepes méretű (60 mm átmérőjű) petribe (Eppendorf) pipettáztuk a sejtuszpenziót. A közepes petriket 4 °C-ra, sötétbe helyeztük és 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket egy körkörös (orbitális) mozgású rázóberendezésen.

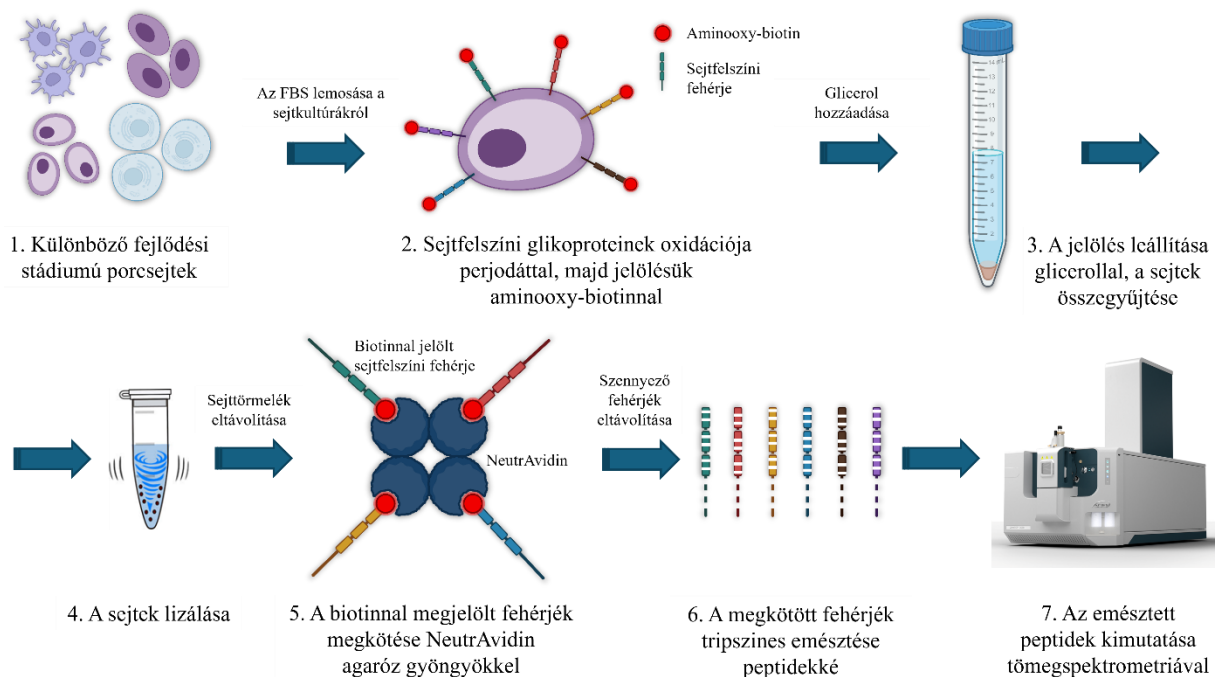
Az 1 óra elteltével 400 µl 1 mM végkoncentrációjú glicerol (Sigma-Aldrich) hozzáadásával 10 perc inkubáció során állítottuk le a jelölést az előzőekkel megegyező körülmények között (sötétben, 4 °C-on). Ezután átpipettáztuk a közepes petriben lévő, sejteket tartalmazó oldatot egy 50 ml-es centrifugacsőbe (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Svájc). A petriben visszamaradt sejteket egyszer 10 ml PBS-sel (pH 7,4) gyűjtöttük össze, majd hozzáadtuk az 50 ml-es centrifugacsőhöz, végezetül  $300 \times g$ -n 5 percig centrifugáltuk a sejtuszpenziót. A felülúszó eltávolítása után 10 ml 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -t (Sigma-Aldrich) és 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ -t (Avantor) tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk a sejteket, majd újra  $300 \times g$ -n 5 percig centrifugáltuk őket. Az így kapott sejttöledéket 500 µl lízispufferben újraszuszpendáltuk (mely tartalmazott: 1% Triton X-100-at [Thermo Fisher Scientific], 150 mM NaCl-ot [Avantor], 5 mM jódiacetamidot [Sigma-Aldrich], 0,1 mg/ml PMSF-et [AppliChem GmbH, Darmstadt, Németország], 10 mM Tris-HCl-t [pH 7,6] [Amresco, Solon, OH, USA], továbbá frissen hozzáadott 10 µl proteáz inhibitor koktélt [Sigma-Aldrich]), majd áthelyeztük a még sejteket tartalmazó szuszpenziót egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe, és jégen 30 percig inkubáltuk őket, miközben minden 5. percben vortexeltünk, hogy minél alaposabban szétszedjük a sejteket alkotóelemeikre. Az így kapott sejtízátumot 4 °C-on  $2800 \times g$ -n 5 percig centrifugáltuk, majd eltávolítottuk a leülepedett sejtörmeléket (amely tartalmazta a sejtservecskéket, sejtmembrán darabokat és sejtmagokat) úgy, hogy a felülúszót egy új 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe pipettáztuk. Ezután kétszer ismételtük a centrifugálást 4 °C-on, de már  $16000 \times g$ -n 15–15 percig. Mindig áthelyeztük a fehérjéket tartalmazó felülúszót egy új Eppendorf-csőbe. Annak érdekében, hogy előkészítsük a biotinnal jelölt sejt felszíni fehérjék tisztítását és dúsítását, 150 µl NeutrAvidin agaróz gyöngyöket tartalmazó oldatot (Thermo Fisher Scientific) helyeztünk filterrel ellátott Pierce Spin Columns Snap Cap típusú centrifugacsővekbe (Thermo Fisher Scientific), majd  $500 \times g$ -n 30 másodperces centrifugálással eltávolítottuk a gyöngyöket szuszpenzióban tartó fixáló oldatot. Ezután még háromszor leöblítettük a gyöngyöket 500–500 µl PBS-sel, és minden mosás után centrifugáltuk azokat ( $500 \times g$ , 30 másodperc).

Előzetesen a Snap Cap csövek aljára gumisapkát helyeztünk, hogy megelőzzük a mintaoldat szivárgását. Ezután a korábban nyert, fehérjét tartalmazó felülúszót az előkészített, gumisapkával lezárt Snap Cap centrifugacsövekbe pipettáztuk, amely már az átmosott NeutrAvidin agaróz gyöngyöket is tartalmazta. Ezt követően folyamatos rázatás mellett inkubáltuk a mintákat 4 °C-on 2 órán keresztül. Ebben a lépésben a biotinnal jelölt sejtfelszíni fehérjék az ismert legerősebb nem-kovalens kötéssel kapcsolódtak a NeutrAvidin agaróz gyöngyökhöz [376], míg a biotinnal nem jelölt szennyező fehérjék szabadon az oldatban maradtak. A nem specifikus, szennyező fehérjék eltávolításához számos mosási lépést végeztünk el különböző reagensek felhasználásával, mely előtt eltávolítottuk a gumisapkát. Az első három oldat esetén 15–15 alkalommal 500–500 µl oldattal mostunk, majd minden mosás után a mosóoldatokat 500 × g-n 30 másodperc centrifugálással távolítottuk el a Snap Cap centrifugacsövekből.

Elsőként a gyöngyöket 15 × lízis pufferrel, másodjára pedig 15 × 0,5% (w/v) nátrium-dodecil-szulfátot (SDS-t) (Amresco) tartalmazó PBS-sel (pH 7,4) végeztük a mosást, mely utóbbi segít eliminálni az oldatban maradt foszfolipideket [377]. Ezt követően a mintákat 20 percig szobahőmérsékleten 0,5% (w/v) SDS-t és 100 mM DTT-t (Avantor) tartalmazó PBS-ben (pH 7,4; frissen készítve) inkubáltuk, majd a végén újra centrifugáltuk 500 × g-n 30 másodpercig. A harmadik oldat az UC puffer volt (6 M urea [Invitrogen, Waltham, MA, USA], 100 mM Tris–HCl [pH 8.5]), mellyel szintén 15 × mostuk a mintáinkat, centrifugálásokkal alternálva. Ezután a mintáinkat 50 mM jódecetamidot tartalmazó UC pufferrel alkiláltuk 20 percig szobahőmérsékleten.

A következőkben felsorolt oldatokkal a gyöngyöket már csak 10–10 alkalommal mostuk, hasonlóan 500–500 µl térfogattal, majd minden lépés után ugyanúgy centrifugáltuk a centrifugacsöveket 500 × g-n 30 másodpercig: UC puffer, 5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich), PBS, végül HPLC minőségű víz (Molar Chemicals Kft.). A mosási lépések befejeztével egy új gumisapkát helyeztünk a Snap Cap oszlopok aljára, továbbá egy új 1,5 ml-es Eppendorf csövet is alátettünk az esetleges szivárgás esetén. Az agaróz gyöngyöket 400 µL 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-t (Sigma-Aldrich) és 5 µg Pierce Trypsin Protease-t (tömegspektrometriai minőségű tripszint, Thermo Fisher Scientific) tartalmazó HPLC vízben szuszpendáltuk fel. A tripszines oldatban lévő, NeutrAvidin gyöngyökhöz kötött biotinilált sejtfelszíni fehérjéket egy éjszakán át, 37 °C-on inkubáltuk. Másnap eltávolítottuk a gumisapkát a Snap Cap oszlop aljáról, és centrifugálással (500 × g, 1 perc) összegyűjtöttük a tripszin által feldarabolt, sejtfelszíni fehérjékből származó peptideket. A Snap Cap oszlop alá egy új, 1,5 ml-es

Eppendorf-csövet helyeztünk, majd 200  $\mu\text{L}$  50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -t tartalmazó HPLC vízzel öblítettük le a gyöngyöket, végül centrifugálással ( $500 \times g$ , 1 perc) összegyűjtöttük a maradék peptid frakciókat, melyet összepipettáztunk az első, peptid mintát tartalmazó Eppendorf-csővel. Utolsó lépésként a peptid mintáinkból vákuumcentrifuga segítségével elpárologtattuk az oldószert, majd a liofilizátumot  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk a tömegspektrometriai elemzésre történő szállításig.



**4.1. ábra: A sejtfelszíni fehérjék izolálása és dúsitása aminoxy-biotin technikával.** Az eltérő fejlődési stádiumban lévő porcsejtekről lemostuk a szérumfehérjéket tartalmazó FBS-t. Ezután a sejtek felszínén lévő glikoproteineket oxidáltuk, majd aminoxy-biotinnal jelöltük. A jelölés leállítása után a sejteket lízispufferrel lizáltuk. A keletkező sejtörmeléket centrifugálási lépésekkel eltávolítottuk, majd a fehérjéket tartalmazó felülúszót NeutrAvidin agaróz gyöngyöket tartalmazó Snap Cap oszlopokba pipettáztuk. A szennyező fehérjék lemosása után a NeutrAvidin gyöngyökhöz kötött sejtfelszíni fehérjéket nagy tisztaságú tripszinnel peptidekké hasítottuk, melyeket összegyűjtöttünk. Végül az emésztett peptideket liofilizáltuk és elküldtük tömegspektrometriai elemzésre. (Forrás: [378], módosítva.)

#### 4.4. A porcsejtek total proteomjának izolálása

A surfaceome izolálással párhuzamosan ugyanazon tenyésztési napokon (1., 3., 6., 10. és 15. napon) a micromass sejt kultúrákból total proteom (teljes fehérjékészlet) mintákat is gyűjtöttünk. A porcsejteket 100  $\mu\text{L}$  RIPA pufferbe helyeztük (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország, melynek tartalma: 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-

40 lizáló ágens, 1% nátrium-deoxikolát, 0,1% SDS), majd ultraszonikátorral ( $3 \times 10$  másodperces impulzusokkal) lizáltuk, hogy ezzel biztosítsuk a különböző membránfehérjék szolubilizálását is. Ezt követően a mintákat  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk a tömegspektrometriai vizsgálatig. Ez a kettős megközelítés lehetőséget biztosított a sejtfelszíni dúsított és a teljes celluláris fehérjekészlet minőségi és mennyiségi összehasonlítására a chondrogenesis folyamata során.

#### 4.5. A surfaceome és a total proteom peptid minták tömegspektrometriai analízise LC-MS/MS módszerrel és a nyers adatok elemzése

A liofilizált peptid mintákat hűtött csomagolásban elküldtük kollaborációs partnerünknek, David J. Boocock-nak a Nottinghami Egyetemre az Egyesült Királyságba. A munkacsoportjával ők végezték el a minták tömegspektrometriai elemzését és a nyers adatok kiértékelését.

A szárított peptideket tartalmazó Eppendorf-csőbe  $150\text{ }\mu\text{L}$  10%-os acetonitrillel kevert 0,1%-os hangyasavat adtak, majd egy termosztátos keverőn  $5\text{ }^\circ\text{C}$ -on 20 percen keresztül rázatták a mintákat. Ezután hozzáadtak újabb  $150\text{ }\mu\text{L}$  0,1%-os hangyasavat, majd alaposan elkeverték őket egy vortex gép segítségével. Az így kapott végső koncentráció 5%-os acetonitril és 0,1%-os hangyasav lett. Eltávolították a maradék törmeléket vagy a fel nem szuszpendált részecskéket úgy, hogy  $13400\text{ RPM}$ -en centrifugálták a mintákat 2 percen keresztül (Eppendorf MiniSpin készülékben). Az így kapott felülúszót egy folyadékkromatográfiával (LC-vel) kompatibilis fiolába helyezték, ügyelve arra, hogy ne kavarják fel az esetlegesen keletkezett üledéket. Ezt követően betöltötték az LC fiolát az automatikus mintavevőbe, majd megfelelő mennyiségű peptidet fecskendeztek az oszlopra a tömegspektrometriai analízishez. Mindegyik felvett mintából  $3\text{--}3\text{ }\mu\text{L}$ -t injektáltak egy Waters M-Class LC rendszerből a hozzacsatlakoztatott Sciex 7600 Zeno-TOF készülékbe, egy Phenomenex Kinetex XB- $\text{C}_{18}$   $2,6\text{ }\mu\text{m}$ -es, és  $15 \times 0,3\text{ mm}$ -es analitikai oszlopon keresztül, Direkt Injektálás módban,  $30\text{ }^\circ\text{C}$ -os hőmérséklet beállítással. A mintákat egy olyan LC-módszer szerint futtatták, amely a következő gradiensekkel működött: 3–35% B mobil fázis 12 perc alatt,  $10\text{ }\mu\text{L}/\text{perc}$  áramlási sebességgel, majd az áramlási sebességet  $12\text{ }\mu\text{L}/\text{perc}$ -re növelték a 13. és 15. perc között, hogy 80% B fázison mossák az oszlopot. Ezután a 16,5. percnél visszaállították 3%-ra az egyensúlyi állapot kialakítása érdekében. A tömegspektrometriát pozitív ion módban futtatták, adatfüggetlen (data independent acquisition, DIA) adatgyűjtési módban (zenoSWATH [379]), egy  $25\text{ ms}$ -os TOF-

MS letapogatással, amelyet 65-féle eltérő SWATH ablak követett, mindegyik 12 ms időtartammal, m/z 400 és 750 közötti tartományban, mely így 1146 ms totál ciklusidővel rendelkezett. Alternatív megoldásként, egy kvalitatívabb analízishez a műszert IDA/DDA (Information/Data-Dependent Acquisition) módban is lehetett volna futtatni.

A ZenoTOF 7600 készülék minden egyes mérési ciklushoz háromféle fájltypust generált, ugyanazzal a fájl előtaggal: *wiff*, *wiff2* és *wiff.scan* típusokat. Ezután letöltötték a legújabb (vagy legmegfelelőbb) proteom FASTA fájlt a UniProt adatbázisból (<https://www.uniprot.org>) *Gallus gallus* (UniProt taxonómia ID: 9031) számára tömörítetlen formátumban, a kanonikus fehérjékkel és izoformáikkal együtt. A DIA-NN szoftverrel [380] dolgozták fel az adatfájlokat a jelölés-mentes kvantifikációhoz (label-free quantitation, LFQ). A legelső elemzéshez a *pg\_matrix.tsv* fájlt használták, amely a detektált fehérjéket és a hozzájuk tartozó normalizált LFQ értéket tartalmazta minden minta esetén. Az analízis után a kimutatott fehérjék és a hozzájuk tartozó relatív expressziós értékek listáját Microsoft Excel fájlként exportálták és továbbították számunkra részletesebb vizsgálat céljából.

*Az LC-MS/MS analízist és a nyers adatok elemzését teljes mértékben David J. Boocock és munkatársai végezték el a Nottinghami Egyetemen.*

## 4.6. A kvantitatív tömegspektrometriából származó expressziós adatok bioinformatikai analízise

### 4.6.1. A mintákban lévő fehérjék kifejeződési mintázatának feltérképezése expressziós klaszterek és heatmap segítségével

A proteomikai adatokat kollaborációs partnerünk  $\log_2$  transzformációnak vetette alá. A hiányzó értékek kiegészítése balra tolt normáloszlás alapján történt a minProb módszerrel ( $q = 0,001$ ), az R szoftver *promor* csomagjának felhasználásával [381], ezáltal szimulálva az alacsony megjelenésű, a detektálási küszöb alá eső jeleket. Azokat a találatokat, amelyek fehérjecsaládokat reprezentáltak (és amelyek esetében az egyes fehérjék nem voltak megbízhatóan szétválaszthatók), kizárta a további bioinformatikai elemzésekből, különös tekintettel arra, hogy ezek némelyike egyedi találatként is jelen volt az adatmatrixban. A mintavariabilitás és az esetleges batch-hatások feltérképezéséhez PCA-elemzést (Principal Component Analysis) alkalmazott.

Ezután DEP-analízist (Differential Expression of Proteins, eltérő expresszióval rendelkező fehérjék) végzett az R szoftver *DEqMS* csomagját felhasználva lineáris modellezéssel és a peptidszámokon alapuló variancia-moderáció alkalmazásával. Azoknak a fehérjéknek az expresszióját tekintette szignifikánsan eltérőnek, amelyeknél a  $\log_2$  fold change értéke  $>1$  és Benjamini–Hochberg-féle korrigált  $p$ -érték  $<0,05$  volt. Az orthológ fehérjék hozzárendelését csirkéről (*Gallus gallus*) emberre (*Homo sapiens*) a *gorth* csomaggal végezte. Az így kapott DEP-készletet  $z$ -score normalizálással egységesítette, majd hierarchikus klaszterezéssel csoportosította az időben különböző expressziós mintázatok azonosításához.

Mindegyik DEP elemzéshez és időbeli klaszteralkotáshoz génontológiai (Gene Ontology, GO) dúsítás végzett az *enrichGO()* és *compareCluster()* függvények segítségével (org.Hs.eg.db,  $p$ -érték  $<0,05$ ;  $q$ -érték  $<0,2$ ), a Biológiai folyamat (*Biological Process*, BP), Molekuláris funkció (*Molecular Function*, MF) és Sejtes komponens (*Cellular Component*, CC) GO kategóriákra kiterjesztve. A statisztikai elemzések és az adatok vizualizációja szintén az R programnyelvben történt.

Az NGS adathalmazokat (BioProject azonosítók: PRJNA817177; PRJNA938813) R szoftverben dolgozta fel. A súlyozott génkorrelációs hálózatok elemzését (WGCNA) a *WGCNA* nevű R csomag segítségével végezte. A PPI hálózat felépítéséhez a STRING adatbázist használta, míg a kapcsolódó fehérjéket a Cytoscape szoftverrel szűrte. A dúsulási (enrichment) analízist a *clusterProfiler* nevű R csomag segítségével hajtotta végre.

*Az R programban a bioinformatikai elemzését teljes mértékben Brázda Péter végezte el az Utrechti Egyetemen.*

#### 4.6.2. A fehérjék *surfaceome* alapú szűrése és funkcióik szerinti csoportosítása GO kifejezések segítségével, kvalitatív összehasonlítása Venn-diagrammal

Az *in vitro* chondrogenesis 1., 3., 6., 10., és 15. napjából összegyűjtött peptidminták tömegspektrometriai elemzése után a kimutatott fehérjéket és a hozzájuk tartozó relatív expressziós értékeket Excel fájlban kaptuk meg a notthinghami munkacsoporttól. Elsőként a különböző napokhoz tartozó kimutatott fehérjék ID kódjait bemásoltuk a Uniprot webfelületére ([www.uniprot.org/id-mapping](http://www.uniprot.org/id-mapping)), hogy ezen proteinekről részletesebb képet kapjunk. Ehhez kiválasztottuk az általunk fontosnak vélt információk keresési kritériumait: „Protein names”, „Organism”, „GO (cellular component)”, „GO (biological process)”, „GO (molecular function)” és „Tissue specificity”. A kiválasztott keresési feltételekkel elemzést végeztünk a

weboldalon, majd az így kapott találatokat tömörítetlen Excel fájlként töltöttük le. Ezután a protein ID-k mellett név szerint is tudtunk keresni a különböző fehérjék között. Első feladatunk az volt, hogy ellenőrizzük a sejtfelszíni fehérje jelölésünk hatékonyságát. Ehhez a „GO (*cellular component*)” és a „GO (*biological process*)” oszlopokat vizsgáltuk meg és az általunk válogatott, sejtfelszínre jellemző GO kódok felhasználásával szűrést végeztünk (4.1. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy az általunk alkalmazott GO-kód-alapú szűrési módszer nem szűkíti le teljesen a PM-re a találatokat. Másszóval, ha egy fehérjét kimutattak egy membrán lokalizációban, az lehet a mitokondrium külső vagy belső membránjában, az ER-ben, a Golgi-ban, vagy akár a magmembránban is. Ennek ellenére azért használtunk ilyen tág keresési feltételeket, mert nem akartuk kizárni annak a lehetőségét, hogy egy korábban IC membránfehérjének hitt protein megjelenhet a sejtfelszínen is, ezáltal az adott sejttípusnál egy potenciális biomarker-jelölt lehet. Emiatt is választottuk inkább a két GO oszlop segítségével történő „manuális” surfaceome szűrést az egyéb *in silico* szűrési módszerekhez képest.

4.1. táblázat: A mintákban kimutatott fehérjék surfaceome szűrésére használt GO kódok

GO kód	Név
[GO:0016020]	membrane
[GO:0005576]	extracellular region
[GO:0005615]	extracellular space
[GO:0005886]	plasma membrane
[GO:0009897]	external side of plasma membrane
[GO:0031234]	extrinsic component of cytoplasmic side of plasma membrane
[GO:0045121]	membrane raft
[GO:0009986]	cell surface
[GO:0031012]	extracellular matrix
[GO:0005890]	sodium:potassium-exchanging ATPase complex
[GO:0016324]	apical plasma membrane
[GO:0016323]	basolateral plasma membrane
[GO:0016328]	lateral plasma membrane
[GO:0005905]	clathrin-coated pit
[GO:0060170]	ciliary membrane

A megszürt fehérjelistát ezután egy újabb keresésnek vetettük alá, melynek során kíváncsiak voltunk a kimutatott sejtfelszíni proteinek molekuláris funkcióira és azok megoszlására a különböző mintavételi napok között. Ehhez az Irodalmi áttekintés 2.2.2. fejezetében bemutatott négy fő funkcionális kategóriát vettük alapul. Szintén két oszlopot ellenőriztünk a keresés kiszélesítése érdekében: a „GO *biological process*” és a „GO *molecular function*” oszlopokat. Mivel az eltérő molekuláris funkciókhoz allokált GO kódok mennyisége kifejezetten nagy, emiatt ebben az esetben kulcsszavakat használtunk fel a kereséshez (4.2. táblázat). A különböző fehérjék funkcióit manuálisan adják hozzá az adatbázisban, emiatt előfordul, hogy nem a „GO *molecular function*” oszlopban található meg egy adott protein tényleges feladatköre. Ebből kiindulva szűrtünk két oszlopban, némileg eltérő kulcsszavakkal.

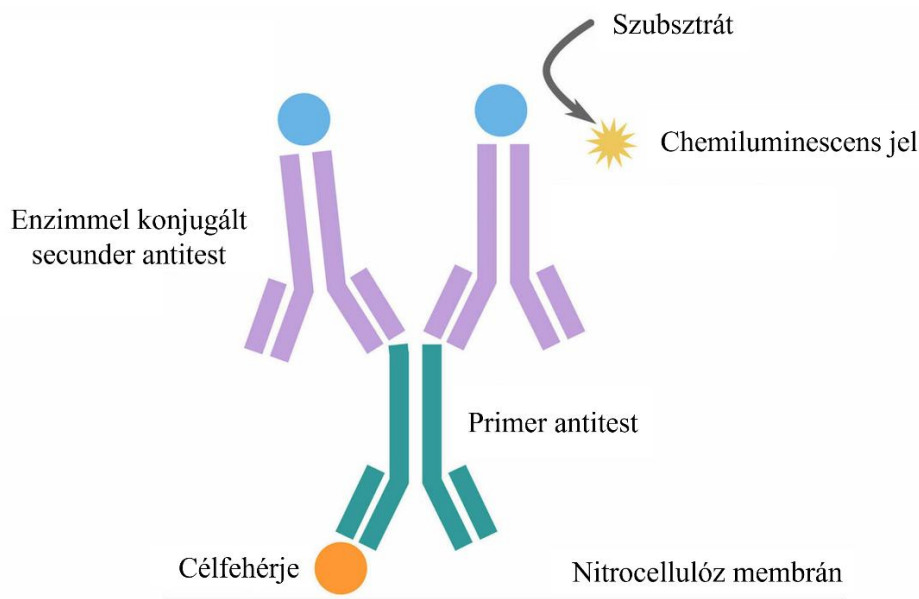
4.2. táblázat: A kiszűrt sejtfelszíni fehérjék kategorizálása funkcióik alapján különböző kulcsszavak segítségével

<b>Funkcionális csoport neve</b>	<b>GO „<i>biological process</i>” oszlopban használt keresőszó</b>	<b>GO „<i>molecular function</i>” oszlopban használt keresőszó</b>
Receptor	receptor	receptor
Transzporter	transport	transporter activity
	symport	symporter activity
	antiport	antiporter activity
	channel	channel activity
	porin	porin
	-	exchanging
Enzim	ase activity	ase activity
Adhéziós fehérje	cell-cell	cell-cell
	cell-matrix	cell-matrix
	cell adhesion	cell adhesion

Végezetül a különböző tenyésztési napokból származó sejtfelszínre szűrt fehérjelistákat Venn-diagram segítségével (<https://molbiotools.com/listcompare.php>) kvalitatívan hasonlítottuk össze. Azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy vannak-e olyan proteinek, amik csak az egyik porcdifferenciációs stádiumban vannak jelen, esetleg kizárólag a korai vagy kései chondrogenesisre jellemző az expressziójuk, ezáltal markerként felhasználhatók lehetnének.

#### 4.7. Az újonnan felfedezett fehérjék expressziójának validálása western blot technikával

A western blot fehérje-kimutatási módszerhez általában előre meghatározott koncentrációjú, teljes proteomot tartalmazó fehérjekeveréket használnak fel. A redukáló oldatnak köszönhetően a kiegyenesített fehérjék töltésük és molekulatömegük alapján szeparálódnak poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE), majd az így szétválasztott fehérjéket egy nitrocellulóz membránra viszik át. Ezután különféle módszerekkel lehet kimutatni a keresett fehérjét a membránon. Lehet direkt vagy indirekt ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) esszét is alkalmazni. A direkt esetben a célfehérjéhez közvetlenül kötődő primer antitest biztosítja a detektálható jelet. Ezzel ellentétben az indirekt ELISA módszernél a jel egy secunder antitestről érkezik, mely a primer antitest Fc régiójához kötődik, ezáltal egy fehérje–antitest–antitest–jelölő komplexet alkotnak. Nagy előnye az indirekt módszernek, hogy egy primer antitesthez több secunder antitest is be tud kötődni, ezáltal amplifikálni lehet az emittált jelet. Ez különösen hasznos az olyan fehérjék esetén, amelyek alacsony kópiaszámban vannak jelen a sejtben (pl. a PM fehérjék). A detektálni kívánt jel típusa is eltérhet. Lehet fluoreszcens festéket vagy valamilyen enzimet konjugálni akár a primer, akár a secunder antitesthez. A fluoreszcens festék a gerjesztés után fluoreszcens fényt emittál, amit a géldokumentációs rendszer detektora képes érzékelni. Az enzimmel konjugált antitest esetén azonban szükséges egy szubsztrátot adni a membránhoz, melyet az adott enzim (általában torna-peroxidáz) terméké alakít, ami fénykibocsátással jár, és szintén a géldokumentációs rendszer fogja detektálni. Mivel ez esetben egy kémiai módosulással jön létre az emittált fényt, ezért ezt a technikát kémiai fénykibocsátásnak, *chemiluminescenciának* nevezik. A képalkotó eszköz egy adott molekulatömegnél megjelenő sávként érzékeli a fehérje-antitest komplex jelenlétét. A membránon képződő sávokat létrához (molekulatömeg-jelzőhöz) viszonyítják annak meghatározására, hogy a vizsgált mintában jelen van-e az érdeklődés középpontjában álló fehérje vagy sem. Az általunk alkalmazott western blot technika indirekt ELISA módszeren alapul és chemiluminescens jelet ad a célfehérje jelenlétében (4.2. ábra).



**4.2. ábra:** A keresett fehérjék kimutatása chemiluminescens indirekt ELISA módszerrel. A célfehérjéhez a primer antitest kötődik közvetlenül, melyhez az enzimmel konjugált secunder antitest kapcsolódik. Szubsztrát jelenlétében az enzim által biztosított reakció fényt emittál, amit chemiluminescens jelnek hívunk. (Forrás: <https://www.integra-biosciences.com/global/en/blog/article/types-of-elisa-tests>, módosítva)

A korábban említésre került Venn-diagram segítségével felfedezett, porcsejtekben eddig még nem kimutatott fehérjék expresszióját western blot technika alkalmazásával, 3 biológiai replikátum segítségével validáltuk. A szükséges fehérjeminták előállításához a csirke chondroprogenitor sejtekből a korábban ismertetett módon (4.1. alfejezet) high-density micromass sejt kultúrákat tenyésztettünk nagy méretű petrikben. Az előzőekben is alkalmazott tenyésztési napokon (1., 3., 6., 10. és 15. napon) 100–100 µl RIPA puffert tartalmazó Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük a sejt kultúrákat. Ezt követően a sejtekből 15–15 másodperc ultrasonikálást alkalmazva tártuk fel a fehérjéket. Az így kapott teljes sejt lizátumban BCA assay segítségével mértük meg a protein-koncentrációt. Ehhez ismert koncentrációjú (2 mg/ml) BSA oldatot (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk a standard sor előállításához. A fehérjemintáinkat ezután PBS-sel ötszörösére hígítottuk. A frissen elkészített BCA munkaoldatból (Thermo Fisher Scientific) 100–100 µl-t pipettáztunk egy 96 lyukú plate szükséges számú welljébe. Ezt követően a csökkenő koncentrációjú BSA oldatból és a kihígított fehérjemintáinkból 10–10–10 µl-t pipettáztunk a BCA munkaoldatot tartalmazó wellékbe a 3 technikai replikátum elkészítéséhez. A létrehozott keverékeket 30 percig, 37 °C-on, 400 RPM-en orbitális rázó inkubátorban elegyítettük. A fél óra elteltével a lilás színreakció szabad szemmel is látható volt. A különböző wellék abszorbanciáját a Chameleon V plate reader

spektrofotométer (Hidex Ltd., Turku, Finland) segítségével 570 nm-es szűrővel mértük meg. Negatív kontrollként a BSA és a fehérjeminták hígítása során használt PBS-t alkalmaztuk.

A BSA standard sor abszorbancia értékeinek felhasználásával kiszámítottuk az egyenes egyenletét, mellyel kikalkulálhattuk a mintáink abszorbanciája alapján a bennük lévő fehérjekoncentrációt. Ezek után, hogy a fehérjék alkalmasak legyen a western blot során alkalmazott poliakrilamid gélben történő futtatásra, 4x töménységű Laemmli puffert (Thermo Fisher Scientific) adtunk a mintákhoz. A Laemmli puffer  $\beta$ -merkaptó-etanol, SDS-t, Trist, glicerolt és brómfenolkék festékmolekulát tartalmazott. A  $\beta$ -merkaptó-etanol SH-csoportok segítségével redukálja, ezáltal megszünteti a diszulfid-híd kötések a fehérjéken belül, míg az SDS a nem-kovalens kötések bontja szét, így mindkét vegyület a fehérjék másodlagos és harmadlagos térszerkezetét szünteti meg, hogy egyenes szálú proteinek jöjjenek létre. A Tris pufferként segít beállítani az oldat pH-ját 6,8-ra, valamint gátolja bizonyos proteázok aktivitását, védve ezzel a mintáink fehérjetartalmát. A glicerol segít sűrűbbé változtatni a mintaoldatot, ezért a western blot során a gélbe történő pipettázás során a minta leülepszik a well aljára és nem fog kidiffundálni a futtatás megindítása előtt. Végül a brómfenolkék festékmolekula abban segít, hogy láthatóvá teszi az egyébként áttetsző oldatot és ezáltal könnyebben bele tudjuk pipettázni a mintáinkat a poliakrilamid gél zsebeibe. A 4x Laemmli puffer, valamint PBS segítségével 1 mg/ml koncentrációra hígítottuk a mintáinkat. Az így kapott keveréket lezárt Eppendorf-csövekben előre felmelegített 95 °C-os inkubátorban (Bioer Technology, Hangzhou, Zhejiang, Kína) 10 perc alatt felfőztük, majd lehűlést követően -80 °C-os fagyasztótárolóba helyeztük.

A keresett fehérjék tömege (kDa) alapján kiválasztottuk a western blothoz alkalmazott szeparáló (alsó) poliakrilamid gél összetételét. A mi esetünkben ez egy 10%-os szeparáló gélt jelentett, mivel a vizsgált fehérjék tömege 100 kDa alatt volt. 4 párhuzamos 10%-os szeparáló gél összeállításához 10,56 ml 30%-os akrilamidot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA), 8 ml alsó gél puffert (1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8), 13 ml desztillált vizet, majd utolsóként a gél dermedésének elindításához 320  $\mu$ l 10%-os ammónium-perszulfátot (AMPER) (Amresco), valamint 32  $\mu$ l tetrametil-etilén-diamint (TEMED) (Amresco) adtunk a keverékhez. Az elkészült szeparáló gélt az előre összeállított állványban lévő, 1,5 mm-es rést kialakító üveglapok közé pipettáztuk. Ezután 70%-os izopropanolt (Molar Chemicals Kft.) pipettáztunk a gél tetejére, hogy a felületi feszültség csökkentésével kiegyenesítse a gélfelszínt, majd 20 percet vártunk a gél megdermedéséhez. Az idő elteltével tiszta szűrőpapírral óvatosan eltávolítottuk az izopropanolt a gélfelszínről.

Ezt követően összeállítottuk a 4 koncentráció (felső) gélt, mely 2,4 ml 30%-os akrilamidot, 3 ml felső gél puffert (0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8), 6,48 ml desztillált vizet, majd szintén utolsóként a dermedéshez szükséges 120 µl 10%-os AMPER-t és 12 µl TEMED-et tartalmazott. Az elkészült koncentráció gélt rápipettáztuk a már megdermedt szeparáló géltre, majd a még folyékony koncentráció gélbe behelyeztük a 15 foggal rendelkező fésűt. A gél dermedéséhez szükséges 15 perc várakozási idő leteltével eltávolítottuk az üveglap–gél szendvicseket az állványból és áthelyeztük azokat műanyag kazettákba, melyeket a futatókádba állítottuk. Az előkészített és lehűtött 1x-es elektroforézis (ELFO) pufferral (14,14 g glicin, 3,3 g Tris, 1 g SDS 1 liter desztillált vízben) feltöltöttük először a 2–2 üveglap közötti teret (ellenőrizve, hogy van-e szivárgás). Ezt követően a futatókádba is 1x-es ELFO puffert öntöttünk úgy, hogy a 2–2 üveglap közötti tér ne érintkezessen egymással. A fésű által kialakított wellket feltöltöttük létrával és a fehérjemintáinkkal. A 15-ös fésű esetén 20 µl (vagyis 20 µg) minta/well (a belső kontrollként alkalmazott β-aktin esetén viszont 5 µl [vagyis 5 µg] kontroll/well) mennyiséget használtunk. Ezután 2 µl „Precision Plus Protein Dual Color” létrát (Bio-Rad Laboratories) pipettáztunk az első wellbe. Ezt követően a futatókádát egy tálcára helyeztük, majd lezártuk a futatókádát és elindítottuk a futtatást: elsőként 20–30 percig 80 V, majd utána 120 V feszültséget alkalmazva a Bio-Rad PowerPac Basic gép segítségével (Bio-Rad Laboratories).

A gélelektroforézis során a denaturálódott, kiegyenesedett fehérjék méretük és töltésük alapján szétszlanak a szeparáló gélben: a felső részén a nagyobb, az alsó részén az egyre kisebb méretű fehérjék fognak megjelenni folytonos sávban. A futás ideje alatt bekevertük a nem specifikus kötőhelyek blokkolásához és a primer- és secunder antitestek hígításához használt tej–PBS-t: 10 g nem zsíros, szárított tejport (Panreac AppliChem ITW Reagents, Castellar del Vallès, Spanyolország) oldottunk 200 ml szobahőmérsékletű 1x PBS-ben. Ezt követően a tej–PBS-t 80 g/m<sup>2</sup> sűrűségű szűrőpapíron (Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein, Germany) szűrtük át, hogy eltávolítsuk a fel nem oldódott tejpor darabokat. Végül 6 db Eppendorf csőbe (3 primer, 3 secunder antitesthez) 1–1 ml tej–PBS-t adagoltunk.

A PAGE befejeztével a kazettákat szétszedtük, a szeparáló géleket pedig leválasztottuk a koncentráció gélről. A szeparáló gélben lévő fehérjéket nitrocellulóz membránba transzferáltuk a Trans Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad Laboratories) és a Trans-Blot Turbo Transfer System gép (Bio-Rad Laboratories) segítségével, mely folyamat 10 perc alatt lezajlott. A transzfert követően a membránokat áthelyeztük tej–PBS-t tartalmazó műanyag edényekbe,

melyekben 1 órán keresztül rázattuk őket szobahőmérsékleten, hogy blokkoljuk az aspecifikus kötőhelyeket.

Az inkubáció vége előtt összeállítottuk a primer antitesteket tartalmazó tej–PBS oldatokat. 1:500 hígítást alkalmaztunk az anti-PODXL poliklonális antitest (katalógusszám: 18150-1-AP; Proteintech, Rosemont, Illinois, USA) és az anti-CNTFR poliklonális antitest (katalógusszám: ab127425; Abcam, Cambridge, UK) esetén, valamint 1:5000 volt a hígítási arány az anti- $\beta$ -aktin monoklonális antitestnél (katalógusszám: A5441; Sigma-Aldrich). A blokkolás után a membránokat bezacsizóztuk és közben az elkészített 1–1 ml primer antitestet tartalmazó tej–PBS oldatot rájuk pipettáztuk. A lezárt zacskókat egy éjszakára 4 °C-ra, sötétben inkubáltuk.

Másnap összeállítottuk a PBST oldatot, melynek során 1 ml Tween 20-at (Amresco) adtunk 999 ml PBS-hez. A Tween 20 egy detergens, amely segít csökkenteni a háttérzaj megjelenését a géldokumentációs rendszerben történő jeldetektálás során azáltal, hogy lemossa a nem bekötődött primer és secunder antitesteket a membránról. A PBST összeállítását követően kivágtuk a zacskókat, kivettük a membránokat, majd  $3 \times 10$  perc rázatással mostuk őket minden alkalommal friss PBST-ben. Időközben összeállítottuk a chemiluminescens secunder antitesteket tartalmazó tej–PBS oldatot, melyet minden esetben 1:1000 hígításban alkalmaztunk. Mivel az anti-PODXL és az anti-CNTFR primer antitestet is nyúlban termeltették, ezért esetükben anti-nyúl HRP-konjugált secunder antitestet (katalógusszám: 170-6515; Bio-Rad Laboratories) alkalmaztunk. Az anti- $\beta$ -aktin primer antitestet egérben termeltették, ezért hozzá anti-egér HRP-konjugált secunder antitestet (katalógusszám: 170-6516; Bio-Rad Laboratories) kevertünk be. A PBST mosási lépést követően a membránokat ismételten bezacsizóztuk és a megfelelő membránhoz a hozzátartozó secunder antitestet pipettáztuk, majd lezártuk a zacskókat és 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten rázattuk azokat. Az inkubáció után eltávolítottuk a membránokat a zacskókból és ismételten  $3 \times 10$  percig PBST-vel mostuk őket. Az utolsó mosást követően az első membránt a géldokumentációs rendszer (ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories) hívófelületére helyeztük. A membránra a 2 komponensű hívófolyadékból (WesternBright ECL HRP substrate, Advansta Inc., San Jose, Kalifornia, USA) külön-külön 500–500  $\mu$ l-t pipettáztunk. A chemiluminescens jelölés során a secunder antitestek torna-peroxidáz enzimmel konjugáltak, melyekhez a szubsztrátot a hívófolyadékok tartalmazták. Az így létrejövő termék a szükséges gerjesztés után fényt emittált, amit detektálni tudtunk a géldokumentációs rendszerben. A hívás során elsőként a látható fény segítségével felvételt készítettünk a létráról. Ezt követően a chemiluminescens

módban detektáltuk a secunder antitest által létrehozott produktum emittált jelét. Az expozíciós időhöz a gép automata beállítását használtuk. A hívás végeztével a membránokat kékfestőbe (0,025g amidoblack festék [Amresco], 25 ml 100%-os ecetsav [Molar Chemicals Kft.], 112,5 ml metanol [Molar Chemicals Kft.], 112,5 ml desztillált víz) helyeztük, melyeket billegető gépen 15–20 percig hagyunk, hogy ellenőrizzük a membránok fehérjetartalmát, illetve a gélből membránba történő transzfer hatékonyságát.

#### 4.8. Az újonnan felfedezett fehérjék cellularis lokalizációjának validálása immuncitokémiai technikával és konfokális mikroszkópiával

Az immuncitokémia egy rendkívül hatékony módszer az orvostudományi kutatásokban, amelyet bizonyos fehérjék vagy más makromolekulák sejtekben és szövetekben történő azonosítására, lokalizálására vagy eloszlásának vizsgálatára alkalmaznak [382]. A western blotnál bemutatott módon itt is fehérje–antitest kötés adja a technika alapját. Ennél a módszernél is lehet alkalmazni direkt vagy indirekt megközelítést. Mi az immuncitokémiához is az indirekt típust alkalmaztuk, ellenben itt nem enzimmal, hanem fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antitestet alkalmaztunk. Vastagabb minták esetében, illetve, ha a mikroszkóp objektívlencséje nem rendelkezik elegendő mélységélességgel, a fókusz sík fölötti és alatti síkokból származó fény is észlelhető lesz, mely elmosódott felvételt eredményezhet, csökkentve ezzel a felbontást. Fluoreszcens mikroszkópia esetén bármely látómezőben található festékmolekula gerjesztődik, beleértve azokat is, amelyek a fókusz síktól eltérő síkokban helyezkednek el. A konfokális mikroszkópia lehetőséget biztosít arra, hogy a fókusz síktól eltérő síkból származó fény ne tudjon a detektorba jutni, így az nem fog elmosódást okozni a vizsgált képeken [383]. Ezáltal a konfokális mikroszkópiával az is elérhető, hogy egy sejtről ne szummált képet, hanem annak egyetlen szeletéről készíthessünk felvételt, melyen így elkülönül a csak sejtmagból, citoplazmából vagy sejtmembránból érkező jel. Ennek eredményeképpen meghatározhatóvá válik a keresett fehérje sejtben belüli elhelyezkedése.

Az immuncitokémiához a csirkeembryóból izolált chondroprogenitor sejteket, hasonlóan az előzőekhez, 15 millió sejt/ml denzitásban, de ebben az esetben  $2 \times 100 \mu\text{l}$  csepp mennyiségben, közepes méretű (60 mm átmérőjű) petriben tenyésztettük. Azonban ebben az alfejezetben szükséges megemlítenem a porcosodó, high-density micromass kultúráknak az egyik ambivalens tulajdonságát (amely jelen esetben hátrányt jelent), mégpedig az általuk termelt ECM nagy mennyiségét. A porcsejtek a 10. és 15. tenyésztési napra olyan erős

porcmatrixot termelnek, hogy az antitestek számára az korlátozottan átjárható, emiatt a keresett fehérjék immuncitokémiai jelölése nem megfelelő. Erre azt a megoldást alkalmaztuk, hogy amikor a sejt kultúrák elérték a szükséges tenyésztési napot (1., 3., 6., 10. és 15. nap), akkor a surfaceome izolálás során is használt 0,25%-os I-es típusú kollagenáz oldattal 5–20 perc alatt (az ECM mennyiségétől függően) felemésztettük a micromass kultúrákat a tenyésztő edény aljáról. Az emésztést ezt követően a kollagenáz oldattal megegyező volumenű FBS-sel állítottuk le. A keletkezett sejtszuszpenziót centrifugacsőbe összegyűjtöttük és 800 RPM-en, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és a sejttöledéket 3 ml komplett Ham's F12 médiumban reszuszpendáltuk, majd 12 mm üvegfedőlemezekkel ellátott 24 well plate-be pipettáztunk wellenként 500–500 µl sejtszuszpenziót, ezáltal *monolayer* kultúrákat létrehozva.

A sejteket 2 órára sejtenyésztő inkubátorba helyeztük, hogy kitapadhassanak az üvegfedők felszínére. A kitapadást követően a sejteket steril PBS-sel háromszor mostuk, majd 300 µl 10%-os formalin oldattal 30 percig fixáltuk őket. Ezután újra háromszor mostuk a sejteket steril PBS-sel, hogy a fixálószeret eltávolítsuk. Annak okán, hogy blokkoljuk a sejteken az antitestek nem specifikus kötőhelyeit, 300 µl blokkoló oldatot pipettáztunk minden kultúrára, mely 3% BSA-t (Amresco) és 10% szérumot tartalmazott a szekunder antitestek *host* állatából, a mi esetünkben kecskéből (Invitrogen), majd újra 30 percig inkubáltuk a sejteket. Az anti-CNTFR és anti-PODXL primer antitesteket 1%-os BSA-t és 3%-os kecskeszérumot tartalmazó PBS-ben hígítottuk, 1:500 arányban. A blokkoló oldat eltávolítását követően szigorúan mosás nélkül egyből ráhelyeztünk a megfelelő primer antitestet tartalmazó oldatból 300–300 µl-t a kultúrákra, majd egy éjszakán át, sötétben, 4 °C-on inkubáltuk őket.

Másnap a sejtekről eltávolítottuk a primer antitestet tartalmazó oldatot és 3x mostuk őket steril PBS-sel. Ezután Alexa Fluor 555 fluoreszcens festékkel konjugált anti-nyúl sekunder antitestet (Invitrogen) 1:1000 arányban hígítottuk steril PBS-ben és a keletkezett oldatból 300–300 µl-t pipettáztunk a kultúrákra, majd 2 órára sötétbe helyeztük őket. Az inkubáció után ismételtén 3x mostuk a sejteket steril PBS-sel. Végezetül 2 µl DAPI-t (4,6-diamidino-2-fenilindol) tartalmazó VECTASHIELD ragasztó médiumot (Vector Laboratories Inc, Burlingame, Ca, USA) cseppentettünk egy tárgylemezre (Thermo Fisher Scientific), a 24 well plate-ből kivettük a kis üvegfedőt, végül a sejtekkel borított felszínével ráborítottuk a ragasztó médiumra. A kiszáradás megelőzésére az üvegfedő szélét körömlakkal zártuk le. Ezt követően a sejteket, illetve a keresett fehérjéket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg.

A kutatásunkhoz az immuncitokémiai módszerrel megjelölt fehérjék celluláris lokalizációját Olympus FV3000 konfokális mikroszkóppal (Olympus Corporation, Shinjuku,

Tokió, Japán) ellenőriztük. A sejtekkel fedett tárgylemezt a mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük, fedőlemezrel lefelé. A felvételek elkészítéséhez 60x nagyítású PlanApo N immerzió olajos objektívet (NA: 1,42) alkalmaztunk. A DAPI egy fluoreszcens festék, amely erősen kötődik a DNS adenin–timinben gazdag régióihoz, ezáltal a sejtmag jelölésére alkalmas, és amelyet 405 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettünk. A sekunder antitesthez konjugált festék viszont az Alexa Fluor 555 volt, melyet 561 nm hullámhosszúságú lézerrel kellett gerjesztenünk. Eredményeink vizualizálásához és digitális rögzítéséhez az FV31S-SW szoftvert (Olympus Corporation) használtuk. A programon belül a két csatornán egyenként beállítottuk a megfelelő mértékű lézerintenzitást, vigyázva, hogy ne gerjesszük túl a fluoreszcens festékeket. Minden esetben a laser ND (neutral density) filter 4–7% közötti, a lézerfeszültség 400–700 V közötti, a Gain 1x és az Offset 0% volt. Ezután a megfelelő fókuszsíkot kiválasztva 3 kép lineáris átlagából készítettük el a felvételeket. Az elkészült képekre scale bar-t illesztettünk és *tiff* formátumban mentettük őket adathordozóra. A különböző fluoreszcens csatornák összevetítése a program segítségével készült. A felvételeken képszerkesztő programok általi módosítás nem történt.

#### 4.9. Statisztikai analízis

A disszertációban bemutatott kvantitatív kísérleti eredmények minden esetben 3, egymástól független biológiai replikátumból származnak. A bemutatott oszlopdiagramokon a különböző replikátumokból származó átlagolt eredmények láthatóak és a hibásávok az átlag szórását (standard deviáció, SD) jelzik. A western blot eredmények, az immucitokémiai jelölés, valamint az sDMMK szövettani festés leírásánál a biológiai triplikátumból egy kísérletsorozat reprezentatív felvételei kerültek megjelenítésre. A sejtfelszíni fehérjékből származó peptidminták tömegspektrometriai vizsgálatánál a normalizálás az összes kimutatott fehérje általános expressziós mintázatára történt. A kvantitatív proteomikai adatok kollaborációs partnerünk által végzett statisztikai elemzésének részleteit korábban a 4.6.1. alfejezetben ismerttettem. A numerikus adatok analíziséhez és vizualizálásához a Microsoft Excel (2507 verzió) programot használtuk. Az sDMMK szövettani festés során kapott adatok statisztikai kiértékelése és a statisztikai különbségek megállapítása a Student-féle kétmintás *t*-próba segítségével történt. A változásokat az *in vitro* csirke chondrogenesis meghatározott tenyésztési napjai között (1., 3., 6., 10., és 15. nap) hasonlítottuk össze. A változást  $p < 0,05$  esetén

tekintettük szignifikánsnak. A szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük az ábrán (\* =  $p < 0,05$ ).

*A statisztikai adatok elemzésében a szerző mellett David J. Boocock, Brázda Péter és Takács Roland vett részt.*

#### 4.10. A clusterin interakciós partnereinek feltárása *in silico* hálózatbiológiai módszerekkel

##### 4.10.1. A CLU interakciós partnereinek feltérképezése STRING adatbázis és Cytoscape szoftver segítségével

A modern, nagy átteresztőképességű technológiák, beleértve a laborunk által is gyakran alkalmazott RNS szekvenálást és proteomikát, egyre nagyobb mennyiségű adatot szolgáltatnak az egyes génekről és fehérjékről. A fehérjehálózati adatbázisok (pl. a STRING adatbázis) rendkívül hasznosnak bizonyultak a termelődött adathalmazok elemzésére [384]. A STRING adatbázis ismert és/vagy predikált PPI adatait biztosítja számos organizmusra vonatkozóan, mely interakciókhoz sorolja mind a fizikai kölcsönhatásokat, mind a funkcionális asszociációkat, és mindezeket pontszámokkal látja el, amelyek számszerűsítik a kimutatott kapcsolatok megbízhatóságát. A STRING az elérhető kísérleti adatokat és az összeállított adatbázisokból származó útvonalakat integrálja, és előre jelezheti a kölcsönhatásokat többek között koexpressziós szinten, evolúciósan (eltérő fajok között) konzervált szekvenciák alapján, valamint az orvostudományi irodalom automatikus szövegbányászása (text-mining) révén. A STRING webes felülete azonban nem alkalmas nagy méretű hálózatok kezelésére, és korlátozott rugalmasságot biztosít a hálózatok elemzése és megjelenítése terén. Ezzel szemben a Cytoscape szoftver kifejezetten a sok komponensű hálózatok analízisére és vizualizációjára lett tervezve, és sokkal nagyobb szabadságot kínál további adatok importálására és azok hálózatokban történő ábrázolására [385,386]. A Cytoscape azonban elsősorban hálózatelemző szoftver, nem pedig adatbázis, ezért a hálózatait máshonnan kell importálnia. Ezáltal a STRING és a Cytoscape tökéletes kooperációt alkot, különösen a proteomikai adatok elemzése terén [387].

Tekintettel arra, hogy a synoviális és szisztémás CLU egyaránt jelentős potenciállal rendelkezik az OA jövőbeli biomarkereként, részletesebb elemzésre van szükség a CLU interakciós hálózatának vizsgálatához gyulladáshoz vezető környezetben is, különösen az OA

kontextusában. Ennek érdekében az *in silico* kutatásunkban először a STRING adatbázist (11.5 verzió; [www.stringdb.org](http://www.stringdb.org)) és a Cytoscape szoftvert (3.0.0 verzió) használtuk fel a CLU hálózatának feltérképezésére és vizualizálására. A STRING adatbázisban megkerestük a CLU ismert PPI-eket és a hozzá kapcsolódó GO annotációkat. Ezután a Cytoscape szoftverben található PubMed-lekérdezési funkciót alkalmaztuk, hogy importáljuk a clusterin első 50 legvalószínűbb PPI targetjét (konfidencia küszöbérték: 0,4; hálózattípus: teljes STRING hálózat; lekérdezési keresőszó: *clusterin* vagy *clusterin osteoarthritis*) a PubMed-en lévő publikációk alapján.

*A STRING adatbázis és a Cytoscape szoftver kezelésében a szerző mellett Matta Csaba vett részt.*

#### *4.10.2. A CLU interakciós partnereinek és az OA-ban betöltött szerepének vizsgálata Qiagen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) elemzéssel*

A Qiagen által létrehozott IPA szintén lehetővé teszi a kiválasztott partnerek közötti hálózatok létrehozását. Az IPA azonban a STRING-től eltérően nem biztosít megbízhatósági pontszámokat a PPI-kről, hanem ehelyett három különböző evidencia szint között kínál választási lehetőséget a felhasználóknak: kísérletileg megfigyelt kölcsönhatások, predikált magas megbízhatóságú kölcsönhatások és predikált közepes megbízhatóságú kölcsönhatások. A hálózatépítés elindításához az IPA először lekérdezi az Ingenuity Knowledge Base (IKB) adatbázisból a keresett elemek közötti kölcsönhatásokat, majd pedig az összes egyéb molekulával fennálló kölcsönhatásokat is, amelyeket az IKB tárol. A STRING-hez hasonlóan az IPA tudásbázisa is egy biológiai interakciókat és funkcionális annotációkat tartalmazó tárhely, amely a fehérjék, gének, molekulakomplexek, sejtek, szövetek, gyógyszerek és betegségek közötti kapcsolatok modellezéséhez jött létre, és nyilvános, valamint privát orvostudományi adatbázisokból származó adatokból építkezik. Az IPA egyik fő előnye a STRING-hez képest a kis molekulákkal (pl. miRNS, gyógyszer-molekulák) kapcsolatos adatok integrációja, másik előnye a betegségeket és patológiás biomarkereket tartalmazó adatbázisokkal történő kommunikáció a hálózatépítés során [388].

Kollaborációs munkatársunk a CLU interakciós partnereit az IPA adatbázis segítségével hozta létre. A *core analysis* (alapelemzés) modult választotta ki annak érdekében, hogy azonosítsa a CLU kapcsolati hálójának a következő tényezőkre gyakorolt szignifikáns serkentő vagy gátló hatásait: különböző kanonikus útvonalak, betegségek, általános hálózatok, egyedi,

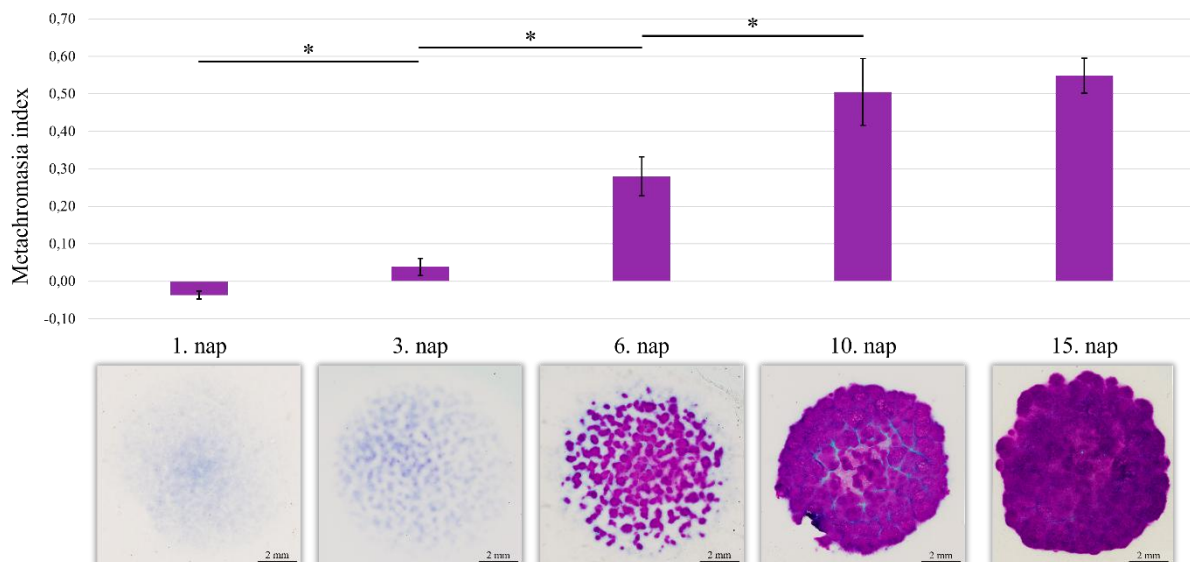
nem irányított hálózatok, toxikus és patológiás funkciók [389,390]. A statisztikai szignifikanciát Fisher-féle egzakt teszttel számolta ki,  $p \leq 0,05$  küszöbértékkel és Benjamini-Hochberg korrekcióval. A kanonikus jelátviteli útvonalak, betegségek és rendellenességek, molekuláris- és sejtfunkciók, valamint fiziológias embryonális fejlődési folyamatok aktivációját vagy gátlását az IPA *Z-score* algoritmusával számította ki, majd összevetette egy ideális aktivációs vagy gátlási mintával a jelátviteli útvonal, betegség/rendellenesség vagy biológiai funkció esetében. Az IPA-n belül a molekuláris aktivitást prediktáló (MAP) eszközt [390] használta fel annak feltérképezésére, hogy a CLU aktivációjának vagy gátlásának milyen hatása van az OA-hoz asszociált jelátviteli útvonalakra.

*A Qiagen IPA elemzést teljes mértékben kollaborációs partnerünk, Peter Pushparaj végezte.*

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. A porcdifferenciáció fiziológias progressziójának ellenőrzése sDMMK szövettani festés segítségével

A porcfejlődés folyamatának vizsgálatához savas DMMK szövettani festést alkalmaztunk, mely a chondrocyták által termelt ECM GAG-tartalmát mutatja ki metachromatikus festődés révén. Az általunk alkalmazott csirkeembryo végtagtelepből létrehozott micromass high-density sejtkultúra a tenyésztés 1. napján még chondroprogenitor sejteket tartalmaz, melyek csak kismértékben termelnek ECM-et. A chondrogenesis 3. napjára a sejtek chondroblastokká differenciálódnak, melyek aktívan elkezdik termelni a porcmatrix komponenseit, köztük a metachromasiát eredményező GAG-okat. Az érett chondrocyták megjelenésével együtt a 6. és 10. tenyésztési napra szignifikánsan megemelkedik az ECM mennyisége, mely a szövettani festés felvételei, valamint a belőlük kalkulált metachromasia index értékei alapján is jól nyomon követhető. A 10. és 15. nap között a porcsejtek hypertrophiás chondrocyttákká alakulnak és a porcmatrix méretében már csak kisfokú növekedés tapasztalható.



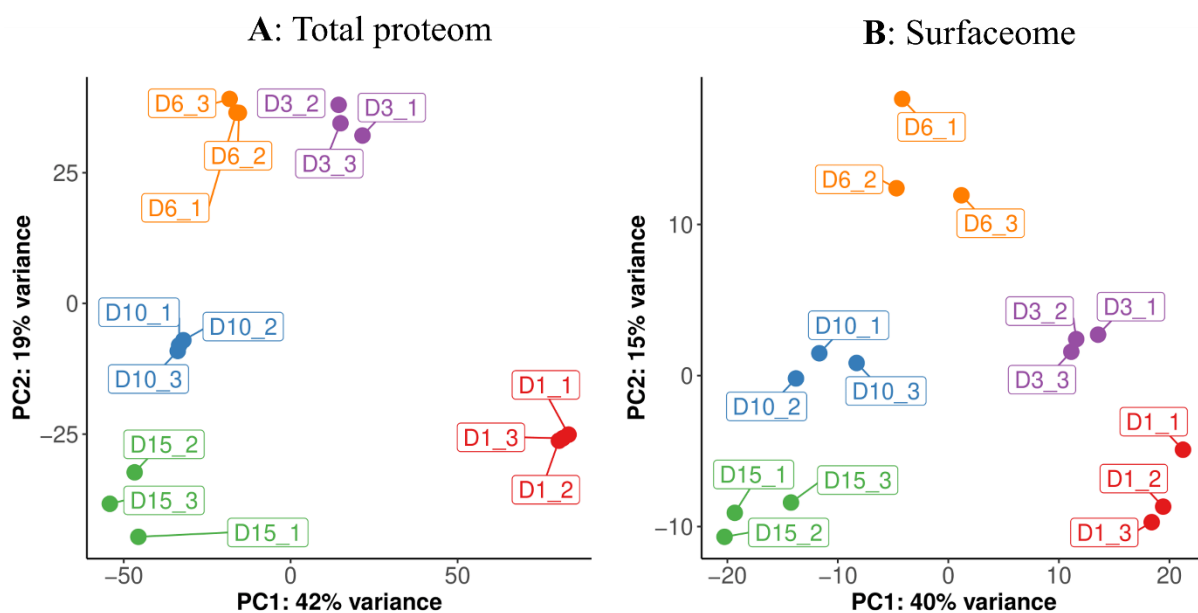
**5.1. ábra:** Az *in vitro* chondrogenesis meghatározott napjain (1., 3., 6., 10., 15. tenyésztési napok) megfestett sejtkultúrák felvételei és GAG tartalmának szemikvantitatív kiértékelése. Az 1. tenyésztési napon még csekély mértékben található ECM a sejtek körül. A 3. napra szignifikánsan megnő a porcmatrix GAG tartalma, mely növekedés mértéke a 6. és a 10. napra is szignifikáns marad. A 10–15. nap között azonban, ahogyan az érett porcsejtek hypertrophiás chondrocyttákká alakulnak, az ECM termelése mérséklődik. (N=3, \*  $p < 0,05$ )

## 5.2. A különböző stádiumú porcsejtekből származó total proteom és izolált surfaceome minták tömegspektrometriai eredményeinek összehasonlítása

Nagy áteresztőképességű (*high-throughput*) LC-MS/MS analízist végeztünk a chondrogenikus sejt kultúrákból származó teljes lizátumokon, valamint az aminosav-biotin (AOB) sejt felszíni fehérje izolálásból származó peptidmintákon, melyeket a 1., 3., 6., 10. és 15. tenyésztési napon gyűjtöttünk (N=3 biológiai replikátum), a porcdifferenciáció kulcsfontosságú szakaszainak megfelelően [15,370]. A teljes proteom vizsgálata során összesen 5207 fehérjét vagy fehérjecsoportot, míg a sejt felszíni fehérje dúsításból származó minták esetén összesen 522 fehérjét vagy fehérjecsoportot azonosítottunk ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.1. A total proteom és az AOB dúsított surfaceome fehérjelistáinak vizsgálata PCA elemzéssel

A PCA analízis jól elkülönülő proteomikai profilokat mutatott a total proteom mintákban, ezenfelül a biológiai replikátumok szorosan csoportosultak a különböző tenyésztési napok szerint (5.2. A ábra). Az első főkomponens (PC1), amely a variancia 42%-át magyarázza, az időbeli előrehaladást tükrözte, jól elkülönítve a differenciálatlan (1. nap) és az érett (10. és 15. nap) kultúrákat. A második főkomponens (PC2; 19%-os variancia) az intermedier porcfejlődési szakaszokat (3–6. nap) választotta el mind a korai, mind a késői időpontoktól. A surfaceome mintákban 522 kvantifikált fehérje/fehérjecsoport közül 18-at kizártunk a PCA elemzésből, mivel kizárólag egyetlen tenyésztési napon voltak detektálhatók, emiatt 504 fehérje maradt a vizsgálathoz. A PCA analízis alacsony mértékű variabilitást mutatott a biológiai replikátumok között, ugyanakkor tenyésztési nap szerint jól elkülönítette a mintákat az első főkomponens mentén (PC1; 40%-os variancia) (5.2. B ábra). Ez az elrendeződés tükrözte a teljes proteom elemzése során megfigyelt trendeket, valamint betekintést engedett a sejtek surfaceome összetételének változásába a porc-progenitorsejt (1. nap) állapottól a hypertrophiás (15. nap) állapot felé.



**5.2. ábra:** Kvantitatív proteomikai analízis a chondrogenikus micromass sejtkultúrák meghatározott tenyésztési napjaiból származó teljes sejt-lizátumok (A) és AOB dúsított minták (B) esetében. A. A chondrogenesisen áteső chondroprogenitorokból, chondroblastokból, érett chondrocytákból és hypertrophiás chondrocytákból származó teljes sejt-lizátumok PCA analízise (a teljes adatbázisban 5207 fehérje szerepelt). A PCA-diagram a tenyésztési napok szerint a lektorálás nélküli klasztereződést mutatja be az első (PC1) és második (PC2) főkomponens mentén, amelyek a teljes variancia 42%-át, illetve 19%-át jelentik. B. A chondrogenesis meghatározott stádiumaiból származó AOB-dúsított fehérjeminták PCA analízise (504 fehérje szerepelt az adatbázisban). A minták ebben az esetben is a tenyésztési napok szerint klasztereződtek az első és második főkomponens mentén, amelyek a variancia 40%-át, illetve 15%-át mutatták. Minden pont egy-egy biológiai replikátumot (N=3) jelöl. ( $p < 0,05$ )

### 5.2.2. A total proteom és az AOB dúsított surfaceome fehérjelista közötti átfedés ellenőrzése

Az összehasonlító elemzés átlagosan mindössze 23%-os átfedést mutatott a teljes sejt-lizátum és a sejt-felszíni fehérje-dúsított minták fehérjéi között (5.1. táblázat). Ezen számadatból kikövetkeztethető, hogy az AOB-izolált fehérjék 77%-a, vagyis 205–238 protein nem volt kimutatható a teljes sejt-lizátumban, melyet „rejtett surfaceome”-nak nevezünk el. Ez az összefüggés alátámasztja a módszer fokozott érzékenységét az alacsony kópiaszámban megjelenő, plazmamembránhoz kötött fehérjék azonosításában. Korábbi tapasztalatok alapján a hagyományos, teljes sejt proteomikai megközelítéseket mai napig korlátozza a nagy mennyiségben jelen lévő citoplazmatikus és sejtorganelleum fehérjék dominanciája, amelyek a tömegspektrometriai analízis során gyakran elfedik az alacsony expresszióval rendelkező, sejtmembránon vagy annak közelében elhelyezkedő célfehérjék jelenlétét. A sejt-felszíni fehérjék szelektív dúsításával csökkenthetjük az elfedésből eredő korlátozást, lehetővé téve a membránhoz kötött és EC fehérjék megbízható azonosítását, amelyek máskülönben a

kimutathatósági küszöb alatt maradnának a teljes lizátumokban. Ez a módszertani előrelépés hangsúlyozza a technika hatékonyságát a biológiailag releváns sejtfelszíni fehérjekomponensek feltárásában, amelyek gyakran alul reprezentáltak a globális proteomikai vizsgálatokban, és kiemeli alkalmazhatóságát receptorok, biomarkerek és terápiás célpontok felfedezésében.

5.1. táblázat: A sejtfelszíni fehérje (AOB) dúsított és a teljes sejtizátum (total proteom) minták összehasonlító táblázata kismértékű átfedést mutat. Megközelítőleg mindössze a fehérjék 23%-át sikerült mindkét frakcióban azonosítani.

Minta ID	AOB surfaceome	Total proteom	Átfedés (db)	Átfedés (%)	Rejtett surfaceome
1. nap A	289	5016	84	22,52	205
1. nap B	305	5010	87	22,19	218
1. nap C	312	5013	86	21,61	226
3. nap A	317	4944	93	22,68	224
3. nap B	335	4995	100	22,99	235
3. nap C	328	4998	98	23,00	230
6. nap A	305	5004	94	23,56	211
6. nap B	326	5000	100	23,47	226
6. nap C	303	4980	89	22,70	214
10. nap A	338	4900	100	22,83	238
10. nap B	309	4986	95	23,51	214
10. nap C	336	4997	101	23,11	235
15. nap A	326	5001	99	23,29	227
15. nap B	306	5008	92	23,12	214
15. nap C	329	4950	98	22,95	231

5.2.3. A total proteom és az AOB dúsított surfaceome fehérjelisták GO kifejezésekkel történő *in silico* szűrése

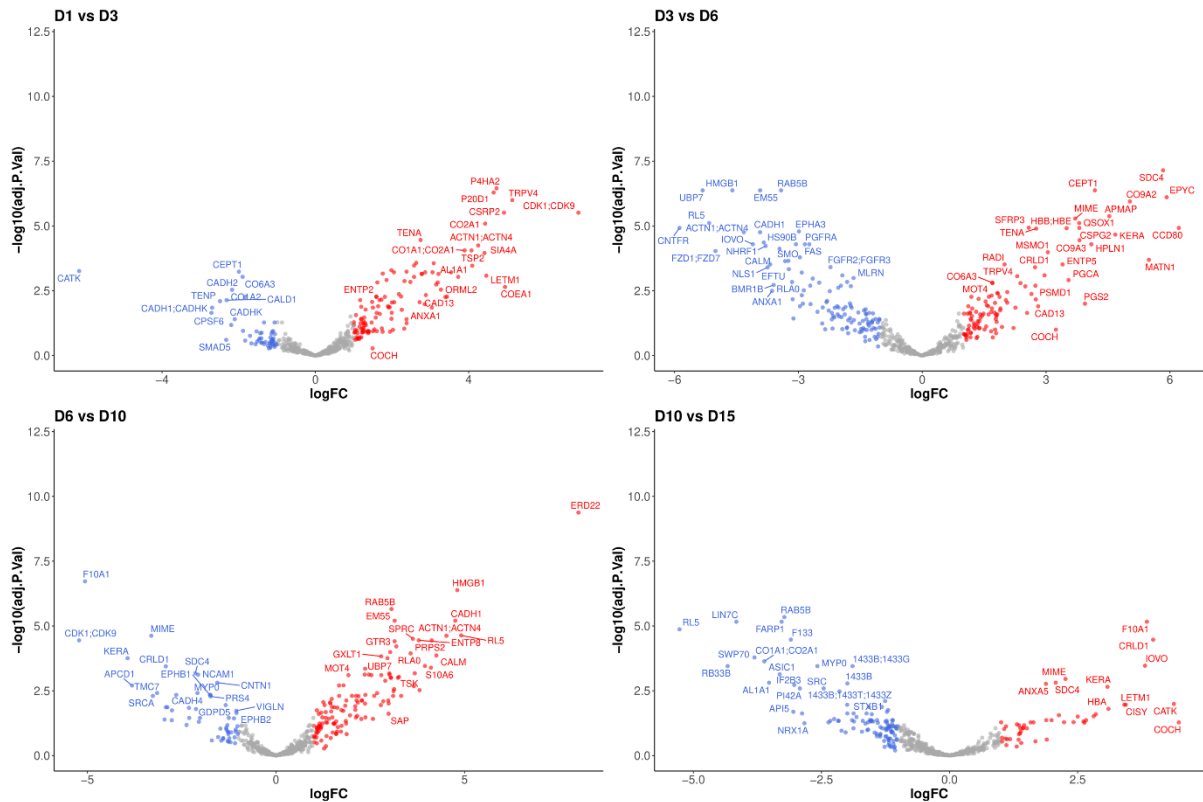
A sejtfelszíni fehérjék azonosításának maximalizálása érdekében minden detektált fehérje esetében *in silico* megközelítéssel következtettünk a sejtfelszíni lokalizációra jól megalapozott Gene Ontology (GO) annotációk alapján (4.1. táblázat). Elsőként ezt a predikciós módszert a teljes sejtizátum adatállományára alkalmaztuk, így definiálva a porcsejt kultúrák

GO-alapú sejt felszíni subproteomját. Az ebben az adatbázisban szereplő 5207 fehérje közül 885 (17%) esetében valószínűsítettünk sejt felszíni lokalizációt.

Ezt követően ugyanazon GO annotációkkal a surfaceome mintákon is elvégeztük a szűrést. Az AOB-alapú dúsítási eljárás szignifikánsan megnövelte az azonosított sejt felszíni fehérjék arányát: minden vizsgált időpontban és biológiai replikátumban a fehérjék 55–60%-a sejt felszíni lokalizációval volt annotálva. Ezáltal az AOB jelölési technika a GO annotációs szűréssel egybekötve jelentős előrelépést jelenthet a sejtek surfaceome profiljának teljesebb körű leírásában.

### 5.3. A különböző porcsejtek surfaceome dúsításából származó kvantitatív tömegspektrometriai eredmények DEP és PPI elemzése

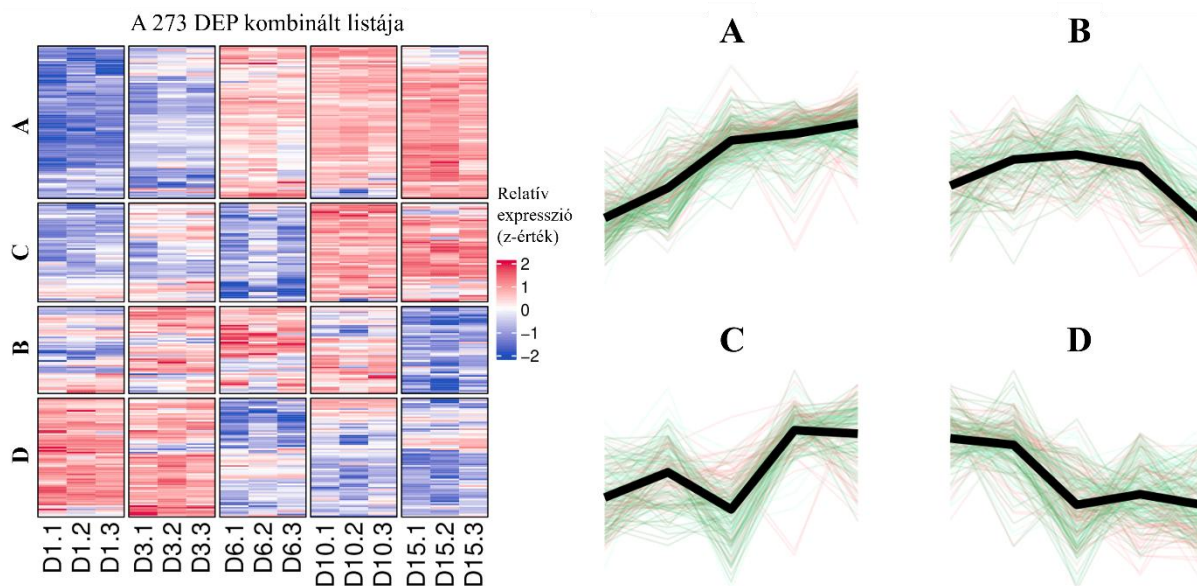
Az eltérő stádiumú porcsejtekből izolált surfaceome mintákon végzett LC-MS/MS vizsgálat kvantitatív eredményeit, a total proteom-hoz hasonlóan, bioinformatikai elemzésnek vetettük alá. Az egymást követő mintavételi napok között összehasonlítottuk a változó kifejeződésű fehérjék expressziós értékeit, melyeket vulkán diagramokon ábrázoltunk (5.3. ábra). Az összesen 504 vizsgált fehérjéből azokat tekintettük szignifikánsan eltérő expresszióval rendelkezőknek, amelyeknek a  $\log_2$  fold change ( $\log_2FC$ ) értéke nagyobb volt, mint 1,0 és a Benjamini–Hochberg korrekcióval módosított  $p$ -értéke 0,05 alatti eredménnyel rendelkezett. Ezek alapján összesen 254 fehérje mutatott szignifikáns mértékű növekvő expressziót, valamint 170 fehérje esetében figyeltünk meg szignifikáns downregulációt. A porcfejlődés folyamatában összehasonlítottuk az egymást követő napok fehérje expresszióbeli különbségeit. Időpont-összehasonlításonként az up- és downregulálódott DEP-ek száma a következőképpen alakult: 1–3. nap között 72 nőtt, 10 csökkent, 3–6. nap között 74 nőtt, 82 csökkent, 6–10. nap között 89 nőtt, 31 csökkent, valamint 10–15. nap között 19 nőtt, 47 csökkent.



**5.3. ábra:** A chondrogenikus sejt-kultúrákból AOB-dúsítást követően kvantitatív tömegspektrometriával meghatározott DEP-ek összehasonlítása az egymást követő mintavételi napok között (1–3, 3–6, 6–10, 10–15. nap). A vízszintes tengely a fehérje expresszió pozitív vagy negatív irányú változásának mértékét jelöli, ahol a határértékek:  $\log_2$  fold change (logFC) >1,0. A függőleges tengely a változás szignifikanciafokát mutatja, melynél küszöbértéknek a korrigált  $p$ -érték (adj. P.Val) <0,05-öt tekintettük. A piros pontok a későbbi időpontban upregulált, míg a kék pontok a későbbi időpontban downregulált fehérjéket jelölik. (N=3)

A mintavételi napok közötti összes DEP részletesebb jellemzésére GO analízist végeztünk a *g:Profiler* segítségével. Az upregulált fehérjék esetében a kollagén bioszintézissel (pl. peptidil-prolil hidroxiláció [GO:0019511], L-aszorbinsav-kötés [GO:0031418]), az ECM érésével (GAG-bioszintézis [GO:0006024]), valamint a sejt–matrix és sejt–sejt adhézióval kapcsolatos GO kifejezések mutattak eltérést [GO:0005925, GO:0005911, GO:0098641], melyek összhangban vannak a chondrocyta-specifikus funkciókkal. Ezzel szemben a downregulált fehérjékre jellemző GO kifejezések a proliferációs jelátviteli utakhoz (transzmembrán ephrin receptor aktivitás [GO:0005005], Wnt-aktivált receptoraktivitás [GO:0042813], az ERK1 és ERK2 kaskád pozitív szabályozása [GO:0070374], fibroblast növekedési faktor kötés [GO:0017134]), valamint az idegrendszeri folyamatokhoz (pre- és post-synaptic membrán [GO:0098888, GO:0099634], axonális irányítás [GO:0007411]) köthetőek, ami olyan sejt felszíni fehérjék jelenlétére utalhat, amelyek az idegsejtek szinaptikus membránján szintén megtalálhatóak.

Az aminooxi-biotinnal dúsított sub-proteom fehérjéit a porcfejlődés teljes időszakában mutatott expressziós mintázatuk alapján rendszereztük, majd négy klaszterbe soroltuk (5.4. ábra). Ezután az egyes klasztereken ismét elvégeztük a GO elemzést. Az „A” klaszterbe tartozó 96 fehérje progresszív upregulációt mutatott az *in vitro* chondrogenesis előrehaladtával. Ebben a csoportban az ECM szerveződéséhez (GO:0030198), L-aszorbinsav-kötéshez (GO:0031418), a kollagén alfa-lánc szintéziséhez szükséges peptidil-prolil hidroxilációhoz (GO:0019511) és csontfejlődéshez (GO:0060348) kapcsolódó GO kifejezések dúsultak (5.4. A ábra). A „B” klaszterbe sorolt 60 protein expressziója a tenyésztés 6. napján érte el a legmagasabb kifejeződést, melyben többek között a transzmembrán ephrin receptor aktivitás (GO:0005005) és a fibroblast növekedési faktor kötés (GO:0017134) GO kifejezések voltak felülreprezentáltak (5.4. B ábra). A „C” klaszter 63 fehérjéje ezzel ellentétben átmeneti expressziócsökkenést mutatott a 6. napon, majd ezen proteinek a kései porcfejlődési fázisban ismételen upregulálódtak az érett sejt kultúrákban. Ebben a csoportban az RNS-polimeráz II foszforiláció (GO:0008353), és a sejtciklus szabályozáshoz kapcsolódó ciklin-dependens protein szerin-threonin kináz aktivitás (GO:0004693) GO kifejezések domináltak (5.4. C ábra). A „D” klaszterbe tartozó 88 fehérje expressziója a 3. naptól kezdve folyamatosan csökkent, ami azt sugallja, hogy ezen proteinek elsősorban a korai differenciációs szakaszban töltik be szerepüket (5.4. D ábra). A „B” klaszterhez hasonlóan itt is megjelentek az ephrin receptorhoz (GO:0005005) és fibroblast növekedési faktorhoz (GO:0017134) kapcsolódó GO kifejezések, továbbá kimutatható volt a WNT jelátvitel jelenléte is (GO:0042813). Ezeken felül az izom- és idegrendszeri fejlődéshez társítható GO találatok is megjelentek a „D” klaszterben (GO:0007517, GO:0007411, GO:0021953), mely jelezheti az őssejtekre jellemző plaszticitás fokozatos megszűnését. Az „A” és „C” klaszterben olyan sejt felszíni fehérjék expressziója volt jellemző, mely összefüggésbe hozható a porc irányú differenciációval. Ennek okán ezt a halmazt „chondrogenikus sejt felszíni fehérjehalmazként” neveztük el, amely olyan proteineket foglal magába, mint a kollagének (COL2A1, COL6A1, COL9A2), a növekedési faktor TGFB2 és a növekedési faktor receptor FGFR3.

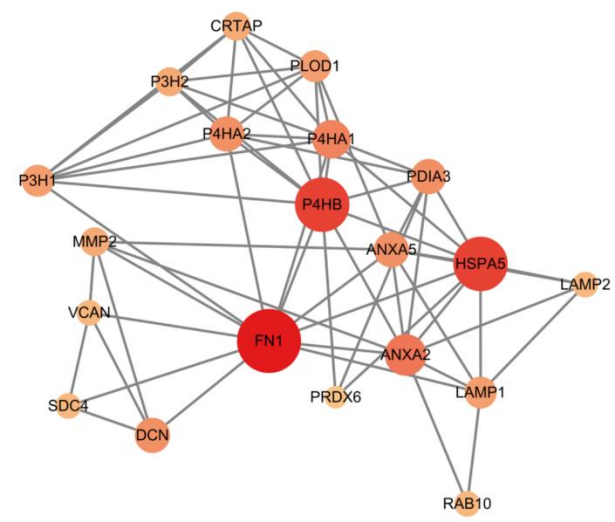


**5.4. ábra:** A chondrogenesis során az AOB-dúsított mintákban kimutatott DEP-ek expresszió szerinti csoportosítása a k-means algoritmus alkalmazásával. Az ábra baloldalán a 273 DEP kombinált listája látható heatmap formájában, melyen az X-tengely a különböző tenyésztési napokból származó biológiai replikátumokat jelöli, az Y-tengelyen pedig a fehérjék expressziós mintázata alapján készített klasztereket tüntettük fel. Az ábrán a piros szín árnyalatai a DEP-ek upregulációját, a kék szín árnyalatai pedig a downregulációját jelzi. Az ábra jobb oldalán az eltérő kifejeződésű fehérjéket 4 klaszterbe soroltuk expressziós dinamikájuk alapján. Az „A” klaszterben a progresszíven upregulálódó, a „B” klaszterben a 6. napon expressziós csúcsot mutató, a „C” klaszterben a 6. napon expressziós völgyet reprezentáló, végezetül a „D” klaszterben a progresszíven downregulálódó fehérjék expressziós görbéit láthatjuk. (N=3)

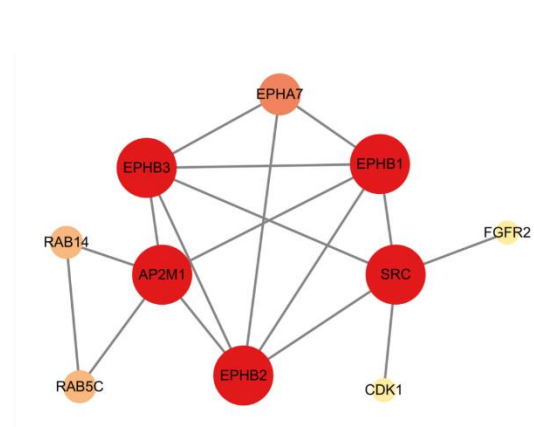
A sejtfelszíni fehérje klasztereken részletes PPI hálózatelemzést is végeztünk a STRING adatbázis segítségével (5.5. ábra). Az „A” klaszter PPI-hálózatában az ECM átalakuláshoz (MMP2, FN1, VCAN, DCN, PLOD1, CRTAP, P3H2, P4HA1/2), a kollagén bioszintézishez (PLOD1, CRTAP, P3H2, P4HA1/2, P4HB) és a fehérjehajtogatáshoz (HSPA5/PDIA3) kapcsolódó fehérjék voltak megtalálhatóak, emellett még a vezikula-transzportozáshoz és az oxidatív stresszválaszhoz (PRDX6) kötődő komponenseket is tartalmazott. A „B” klaszterben az ephrin jelátvitel dominált, benne négy ephrin recepttorral (EPHA7, EPHB1, EPHB2, EPHB3), mely felhívja a figyelmet a fejlődési mintázatok kialakításában betöltött szerepükre. Ugyancsak kimutathatóak voltak ebben a halmazban az endocytosisban szerepet játszó fehérjék (AP2M1, RAB5C) és a RAB GTPázok (RAB5C, RAB14), melyeket a dinamikus IC membrántranszport központi elemeiként azonosítanak. Az SRC és az FGFR2 kapcsolatot teremt a fokális adhéziók és az FGF jelátvitel között. A „C” klaszterben dúsultak a cytoskeletális szerveződéshez (ACTN1, ACTN4, MYH9, ARF6), a kalcium jelátvitelhez (CALM3, S100A6, ANXA1) és a sejtadhéziós útvonalakhoz (DMD, ARF6, RAP1B)

kapcsolódó fehérjék. A hálózatban a fokális adhézió és az aktin cytoskeleton útvonalai domináltak az aktinin (ACTN1, ACTN4), miozin (MYH9) és disztrofin (DMD) révén. A kalcium jelátvitel a metabolikus és gyulladásos válaszok integrálásában játszhat szerepet (CALM3, S100A6). A HMGB1 kapcsolatot teremt a sejtmagi DNS-javítás és az EC irányból érkező VEGF jelátvitel között. Ebben a klaszterben olyan fehérjék is megjelentek, melyek közreműködnek az enchondralis csontosodás folyamatában (TIMP3, TGFB2, THBS2, VLDLR). A „D” klaszterben szintén az ephrin jelátvitel dominált, több ephrin receptorral (EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA7, EPHB1, EPHB2, EPHB3), melyek a sejtmigráció szabályozásához járulhatnak hozzá a porcnodulus-képződés során. A Wnt (FZD1, FZD2, FZD7) és Hedgehog (SMO) jelátviteli útvonalak az egyedfejlődési folyamatok kulcsszereplői, míg az EGFR/FGFR receptorok (EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3) a hozzájuk kötődő növekedési faktorok segítségével a citoplazmatikus MAPK-aktivációt biztosítják.

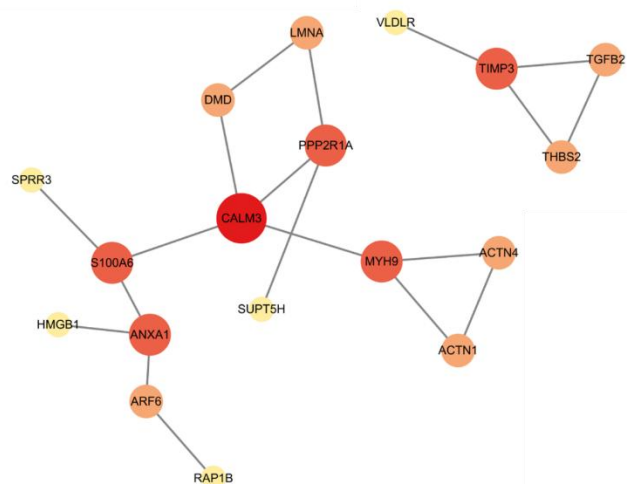
„A” Klaszter



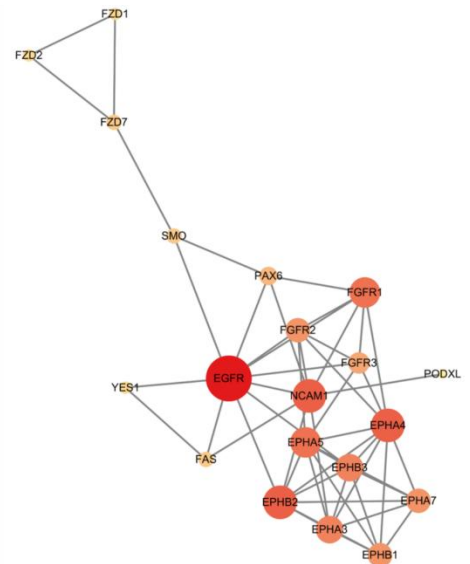
„B” Klaszter



„C” Klaszter



„D” Klaszter



**5.5. ábra:** A korábbi DEP klaszterekbe tartozó sejtfelszíni fehérjék közötti PPI hálózat elemzése a STRING adatbázis segítségével. Az egyes hálózatokban vagy alhálózatokban a körök mérete és színe a kapcsolatok (élek) számát jelöli: a nagyobb és vörösebb árnyalatú körök olyan fehérjéket jelentenek, amelyek nagyobb számú másik fehérjével lépnek kölcsönhatásba a hálózaton belül, míg a kisebb és fakóbb körök a kevesebb kapcsolattal rendelkező fehérjéket jelölik. Az „A” klaszter fehérjéi ABC sorrendben: ANXA2 (annexin A2), ANXA5 (annexin A5), CRTAP (porc-asszociált protein), DCN (dekorin), FN1 (fibronektin-1), HSPA5 (hőshock fehérjecsald A 5. tagja), LAMP1 (lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein 1), LAMP2 (lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein 2), MMP2 (matrix metalloproteináz 2), P3H1 (prolil 3-hidroxiáz 1), P3H2 (prolil 3-hidroxiáz 2), P4HA1 (prolil 4-hidroxiáz alegység  $\alpha$ -1), P4HA2 (prolil 4-hidroxiáz alegység  $\alpha$ -2), P4HB (protein diszulfid-izomeráz A1), PDIA3 (protein diszulfid-izomeráz A3), PLOD1 (prokollagén-lizin,2-oxoglutarát 5-dioxigenáz 1), PRDX6 (peroxidredoxin-6), RAB10 (ras-rokon protein rab-10), SDC4 (syndecan-4), VCAN (verzikán mag fehérje). A „B” klaszter fehérjéi ABC sorrendben: AP2M1 (AP-2 complex alegység mű), CDK1 (ciklin dependens kináz 1), EPHA7 (ephrin receptor A7), EPHB1 (ephrin receptor B1), EPHB2 (ephrin receptor B2), EPHB3 (ephrin receptor B3), FGFR2 (fibroblast növekedési faktor receptor 2), RAB14 (ras-rokon protein rab-14), RAB5C (ras-rokon protein rab-5c), SRC (proto-onkogén tirozin-protein kináz src). A „C” klaszter fehérjéi ABC sorrendben: ACTN1 (aktinin-1), ACTN4 (aktinin4), ANXA1 (annexin A1), ARF6 (ADP-ribosziláció faktor 6), CALM3

(kalmodulin-3), DMD (disztrófin), HMGB1 (nagy mobilitású csoport protein B1), LMNA (prelamin-A/C), MYH9 (miozin-9), PPP2R1A (szerin-threonin protein foszfatáz 2A regulatórikus alegység A alpha izoforma), RAP1B (ras-rokon fehérje rap-1B), S100A6 (protein S100-A6), SPRR3 (kis prolin-gazdag fehérje 3), SUPT5H (transzkripció elongáció faktor SPT5), TGFB2 (transzformáló növekedési faktor-beta 2), THBS2 (thrombospondin-2), TIMP3 (metalloproteináz inhibitor 3), VLDLR (nagyon kis denzitású lipoprotein receptor). A „D” klaszter fehérjéi ABC sorrendben: EGFR (epidermalis növekedési faktor receptor), EPHA3 (ephrin receptor A3), EPHA4 (ephrin receptor A4), EPHA5 (ephrin receptor A5), EPHA7 (ephrin receptor A7), EPHB1 (ephrin receptor B1), EPHB2 (ephrin receptor B2), EPHB3 (ephrin receptor B3), FAS (zsírsav szintáz), FGFR1 (fibroblast növekedési faktor receptor 1), FGFR2 (fibroblast növekedési faktor receptor 2), FGFR3 (fibroblast növekedési faktor receptor 3), FZD1 (frizzled-1), FZD2 (frizzled-2), FZD7 (frizzled-7), NCAM1 (neuronális sejt adhéziós molekula 1), PAX6 (páros dobozo protein pax-6), PODXL (podocalyxin), SMO (smoothened), YES1 (tirozin protein kináz yes).

#### 5.4. Az AOB dúsított surfaceome fehérjék funkcionális csoportosítása

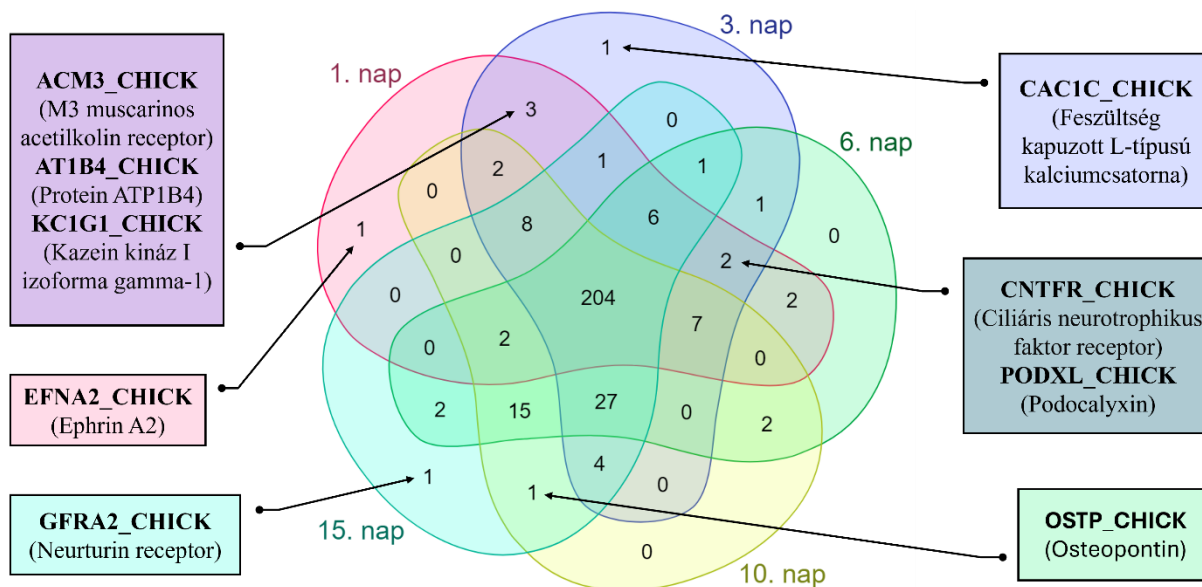
A surfaceome-ra jellemző GO kifejezések által (4.1. táblázat) kiszelektált sejtfelszíni fehérjéket 4 fő funkcionális kategóriába osztottuk a GO „*molecular function*” és „*biological process*” annotációk (4.2. táblázat) alapján: receptorok, enzimek, transzporterek, sejtadhéziós és sejtkapcsoló fehérjék, valamint az előző csoportokba nem besorolható proteineket egy ötödik, úgynevezett egyéb fehérjék halmazba gyűjtöttük (melyhez többek között a felszíni fehérjék ismert interakciós, szabályozó vagy kötőpartnerei tartoztak). A surfaceome fehérjék funkcionális megoszlása a chondrogenesis teljes időtartama alatt közel állandó maradt (5.2. táblázat).

5.2. táblázat: A kiszelektált sejtfelszíni fehérjék funkcionális besorolása GO annotációk alapján. A 4 fő funkcionális kategória, valamint az egyéb fehérjék relatív megoszlása a porcdifferenciáció különböző napjain.

	1. nap	3. nap	6. nap	10. nap	15. nap
Receptorok	28 %	29 %	27 %	28 %	28 %
Enzimek	33 %	31 %	32 %	32 %	31 %
Transzporterek	21 %	21 %	19 %	19 %	20 %
Adhéziós fehérjék	24 %	23 %	23 %	23 %	23 %
Egyéb fehérjék	20 %	24 %	25 %	25 %	26 %

## 5.5. A különböző tenyésztési napokból származó AOB dúsított surfaceome listák kvalitatív összehasonlítása Venn-diagram segítségével

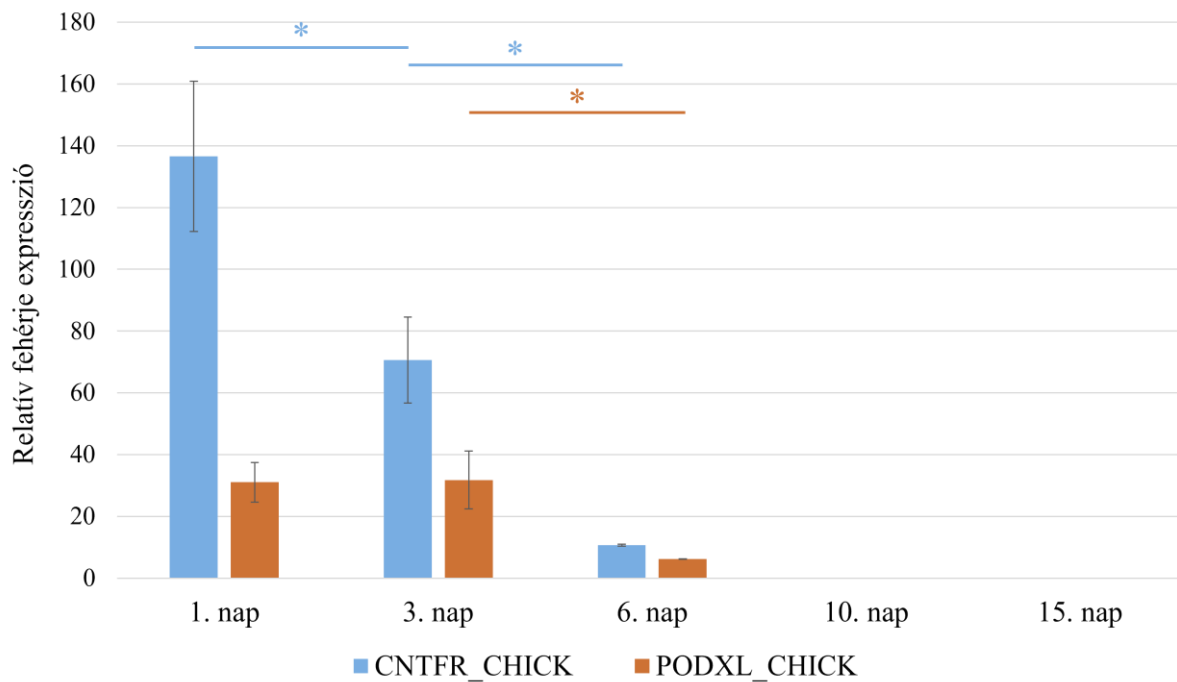
A sejtfelszíni fehérjék GO annotáció alapú szűrését követően a fehérjék kvalitatív jelenlétét hasonlítottuk össze az egyes tenyésztési napok között annak érdekében, hogy azonosíthassunk olyan sejtfelszíni, esetleges jövőbeli biomarker-jelölteket, amelyek a porcdifferenciáció meghatározott stádiumaira jellemzőek. A különböző tenyésztési napok közötti Venn-diagram alapú komparatív elemzés alapján 204 fehérje mind az 5 mintavételi napon jelen volt (5.6. ábra). A migrációban, sejt–sejt kommunikációban és sejtadhézióban szerepet játszó ephrin A2 receptor (EFNA2) csak a chondroprogenitor sejteken expresszáldott (1. tenyésztési nap). A feszültség-függő, L-típusú kalciumcsatorna alpha 1C alegysége (CAC1C), amely a  $Ca_v1.2$  csatorna komponense, kiemelkedő szereppel rendelkezik a porcsejtek kalcium homeostasisában és kalcium jelátvitelében. Ez a csatorna alegység csak a chondroblastokon volt kimutatható, vagyis a 3. tenyésztési napon. Három olyan proteint is sikerült detektálnunk, amelyek a tenyésztés 1–3. napján, másszóval a chondroprogenitor és a chondroblast stádiumban is expresszáldtak. Ide tartoznak a G-fehérje kapcsolt receptorcsaládba tartozó M3 típusú muscarinos acetilkolin receptor (ACM3), az ATP1B4 fehérje, amely transzkripciós ko-regulátorként működhet, valamint egy Wnt jelátvitelben szerepet játszó szerin-threonin kináz, a kazein kináz I izoforma gamma-1 (KC1G1). Bár kifejezetten a 6. napra a Venn-diagram nem mutatott jellemző fehérjét, a chondrogenesis korai fázisában (1–6. tenyésztési napok) két új fehérjét is sikerült detektálnunk: a ciliaris neurotrophikus faktor receptort (CNTFR) és a podocalyxin-t (PODXL). A porcfejlődés kései szakaszára (10–15. nap) az osteopontin (OSTP) volt specifikus, mely fehérje jellemzően az enchondralis csontosodás során jelentkezik. Az osteopontin a csontokban a hydroxyapatit-osteopontin-vitronectin-osteoclast híd alkotóelemeként szolgál és ezáltal a sejt–matrix interakcióban van szerepe. Egyedül a hypertrophiás chondrocytáakra volt jellemző a neurturin receptor alpha-2 alegység (GFRA2) kifejeződése, amely ligandkötődés után a RET tirozin kináz receptor autofoszforylációjához, és ezáltal aktivációjához vezet.



**5.6. ábra:** A chondrogenesis során az AOB-dúsított fehérjelisták kvalitatív összehasonlítása a különböző tenyésztési napok között Venn-diagram felhasználásával. Összesen 204 fehérje fejeződött ki a chondrogenesis teljes vizsgált időszakában. Az ephrin A2 receptor (EFNA2) csak az 1. napon, vagyis a chondroprogenitor sejteken volt jelen. A 3. tenyésztési napon, a chondroblastokon fejeződött ki egyedül az alfa 1C alegysége (CAC1C) a feszültség kapuzott L-típusú kalciumcsatornának. Mind az 1., mind a 3. napon detektálható volt azonban az M3 muscarinos acetilkolin receptor (ACM3), a protein ATP1B4, valamint a kazein kináz I izoforma gamma-1 alegysége (KC1G1). A chondrogenesis korai stádiumában, vagyis az 1–3–6. napon kimutatható volt két új fehérje, a ciliaris neurotrophikus faktor receptor (CNTFR), valamint a podocalyxin (PODXL). A 10. és 15. napon, vagyis a hypertrophiás stádiumban megjelenik a már ismert osteopontin (OSTP), ami a csontosodás megindulását jelzi. Egyedül a 15. napon, vagyis a hypertrophiás chondrocytákon volt jelen a neurturin receptor alpha 2 alegysége (GFRA2). (N=3)

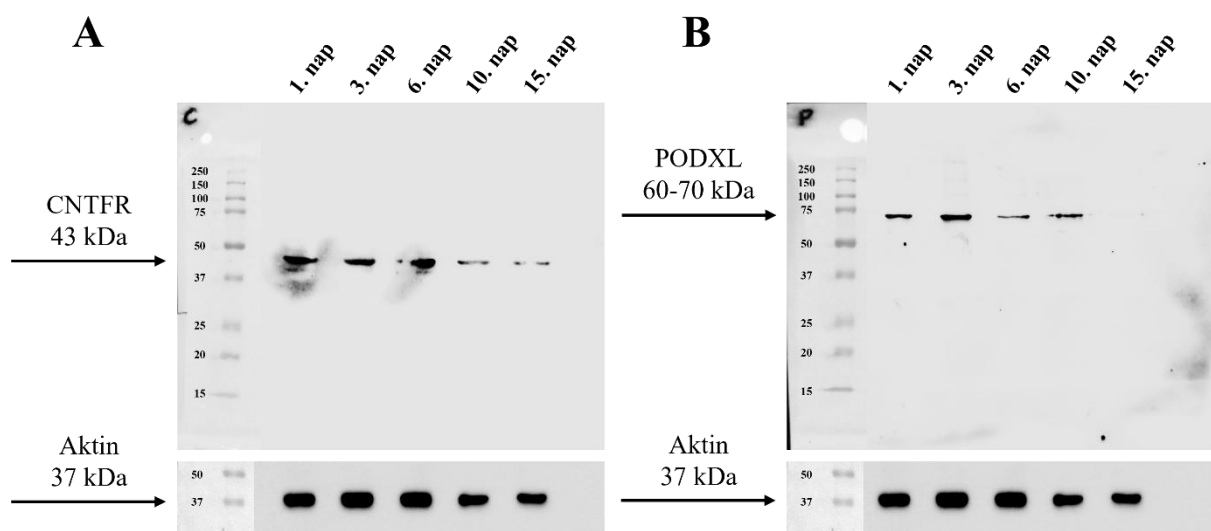
## 5.6. A CNTFR és a PODXL expressziójának és cellularis lokalizációjának validálása

A manuálisan, GO kifejezések alapján szűrt surfaceome fehérjelisták Venn-diagrammal történő összehasonlítása alapján mindössze két olyan fehérjét sikerült azonosítanunk, amelyek megfeleltek a korai chondrogenikus stádium (1–6. tenyésztési nap) kritériumainak: a CNTFR-t és a PODXL-t. Mindkét fehérje esetén a kvantitatív tömegspektrometriai vizsgálatból származó expressziós adatok progresszív csökkenést mutattak a differenciáció előrehaladtával, továbbá a 10. és 15. napon nem voltak kimutathatóak (5.7. ábra). A CNTFR esetén az 1. és 3., valamint a 3. és a 6. tenyésztési nap között is szignifikáns volt a csökkenés ( $p < 0,05$ ). A PODXL csak a 3. és 6. tenyésztési nap között mutatott szignifikánsan alacsonyabb expressziót ( $p < 0,05$ ).



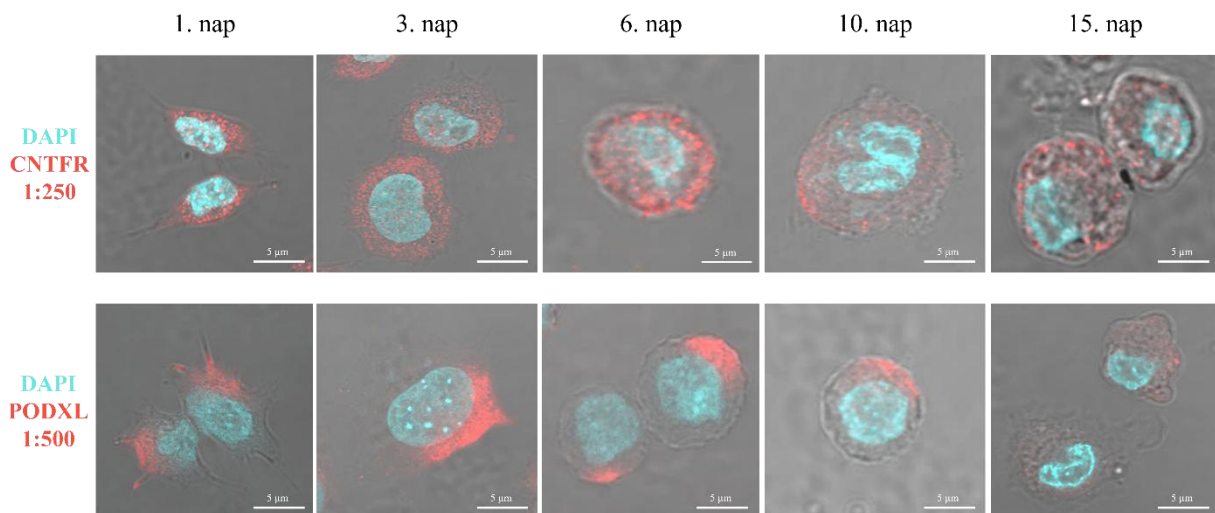
**5.7. ábra:** A CNTFR és a PODXL fehérjék kvantitatív tömegspektrometriai elemzésből származó expressziós adatai. Mindkét fehérje csak az első 3 mintavételi napon (1., 3. és 6. tenyésztési nap) volt detektálható, valamint relatív expressziós értékük progresszív csökkenést mutatott a porcfejlődés előrehaladtával: a CNTFR kifejeződése a 1–3. és a 3–6. nap között, míg a PODXL csak a 3–6. nap között mutatott szignifikáns downregulációt. A két fehérjét a 10. és 15. tenyésztési napon tömegspektrometriai módszerrel nem tudtuk kimutatni. (N=3, \*  $p < 0,05$ )

A CNTFR és a PODXL expressziójának igazolására western blot technikát alkalmaztunk a porcosodó micromass sejt kultúrákból származó teljes sejt lizátumokon, amelyeket az AOB-dúsított mintákkal megegyező tenyésztési napokon gyűjtöttünk. Mind a CNTFR, mind a PODXL kimutatható volt a nitrocellulóz membránokon a géldokumentációs rendszerben történő hívás során. A CNTFR esetében egy jól elkülönülő sáv volt megfigyelhető körülbelül 43 kDa-nál, amely megfelel a fehérje prediktált molekulatömegének. A CNTFR western blottal kimutatott expressziója hasonló mintázatot mutatott a differenciáció előrehaladtával (5.8. A ábra), mint az előzőekben ábrázolt kvantitatív proteomikai eredmények. Emellett a CNTFR jele alacsony mértékben detektálható volt a 10. és a 15. napon is. Hasonlóan a PODXL is specifikus sávként jelent meg ~60–70 kDa körüli magasságban, melynek expressziós dinamikája szintén követte a tömegspektrometriai vizsgálatból származó kvantitatív eredményeket (5.8. B ábra). Ezen kívül a PODXL bár kimutatható volt a 10. tenyésztési napon, de a 15. napon nem látszódott chemiluminescens jel.



**5.8. ábra:** A CNTFR és a PODXL expressziójának ellenőrzése meghatározott tenyésztési napokból származó chondrogenikus micromass sejtkultúrák teljes sejtlizátumain. A CNTFR a predikált ~43 kDa magasságban jelent meg a membránon. Az első 3 minta esetén erőteljesebb, míg a 10. és 15. tenyésztési napból származó mintáknál gyengébb jelölést mutatott. A PODXL jele szintén az előre meghatározott 60–70 kDa sávban jelent meg. A teljes sejtlizátumból származó mintákban az 1–10. nap között volt kimutatható a fehérje, a 15. napon azonban nem adott chemiluminescens jelet. Kontroll fehérjének aktint alkalmaztunk. Reprezentatív western blot felvételek.

A CNTFR és a PODXL cellularis lokalizációjának meghatározásához immuncitokémiai jelölést végeztünk, melyről konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk (5.9. ábra). A CNTFR fluoreszcens jele a differenciálódás kezdeti szakaszában homogén módon szemcsés eloszlást mutatott, és jelen van mind a citoplazmában, mind a sejtmagban. A 6. naptól kezdődően a jel fokozatosan a PM-hez közeli régiókban lokalizálódik, mely tendencia a 15. napon is megfigyelhető. A PODXL ezzel szemben már az 1. naptól kezdve lokális eloszlást mutat. A fluoreszcens jel intenzitása a chondrogenesis előrehaladtával folyamatosan csökken, a 15. napon pedig csak nagyon alacsony szinten detektálható. Érdekes megfigyelés, hogy a PODXL elsősorban a sejtnyúlványok vezető éléhez közel koncentrálnak, ami potenciális szerepére utalhat a sejtmorfológia és a migráció szabályozásában, különösen a porcfelődés korai szakaszában. Bár a képek elemzése kvalitatív jelleggel történt, mindkét marker esetében a porcdifferenciálódás későbbi szakaszaiban csökkenő jelintenzitást tapasztaltunk, hasonlóan a tömegspektrometriai és western blot eredményekhez.

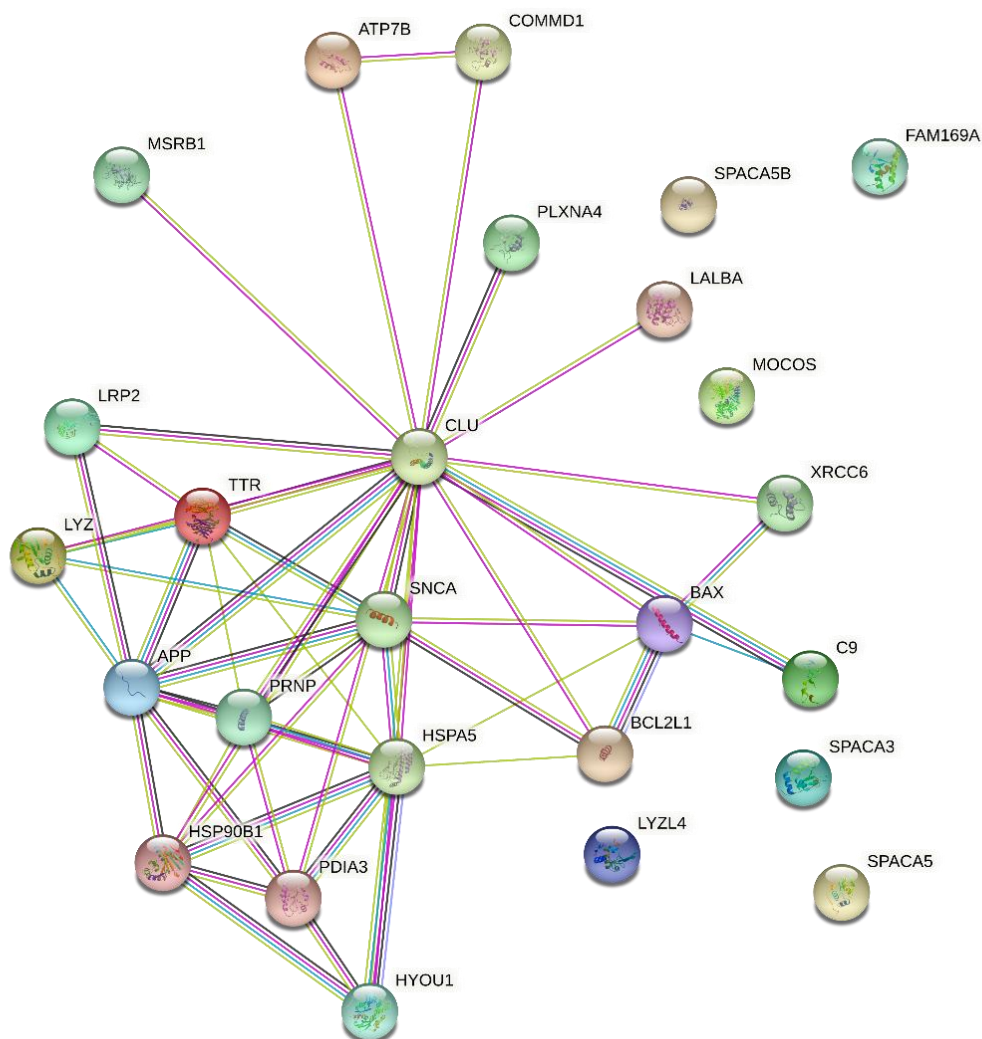


**5.9. ábra:** A CNTFR és a PODXL cellularis elhelyezkedésének ellenőrzése chondrogenikus sejt kultúrákon immuncitokémiai jelölést követően készült konfokális felvételek felhasználásával. A felvételek 3 féle réteg egyesítéséből származnak: fénymikroszkóp módban a sejtek kontúrja ábrázolódik, a világos kék szín a sejtek magját jelölő DAPI festék, a piros szín pedig a szekunder antitesthez konjugált Alexa 555 fluoreszcens festék mindkét target fehérje esetén. A CNTFR által adott jel kezdetben homogén, granuláris megjelenésű, megtalálható a citoplazmában és a sejtmagban is. A 6. naptól egészen a 15. napig a jel egyre inkább a sejtmembránhoz közel lokalizálódik. A PODXL egészen az 1. naptól kezdve fokális megjelenést mutat. A fluoreszcens jel intenzitása a chondrogenesis későbbi stádiumaiban egyre csökken, a 15. napon pedig alig detektálható. Reprezentatív konfokális felvételek.

## 5.7. A clusterin interakciós partnereinek és az OA-ban megváltozott expressziójának bemutatása

### 5.7.1. A STRING adatbázisból származó, CytoScape programmal létrehozott CLU interakciós hálózatának ismertetése

A STRING adatbázis alapján a CLU fehérjének jelenleg 25 interakciós partnerét ismerjük. A generált CLU „connectome” hálózat 53 élt (kapcsolatot, *edge*) tartalmazott, az egyes csomópontok (fehérjék, *node*) átlagos fokszáma 4,08 volt, továbbá a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tekintve a dúsulási  $p$ -érték  $< 1,0 \cdot 10^{-16}$  volt (5.10. ábra). A CLU hálózatának legfontosabb elemei között szerepeltek IC chaperonok (HSPA5, HSP90B1), valamint aggregátumképző fehérjék (APP, SNCA, PRNP), amely találatok a CLU és a neurodegeneratív betegségek közötti többszintű kapcsolatot figyelembe véve nem meglepő (5.3. táblázat). Az azonosított fehérjecsoportok porcsejtekben, porcfejlődésben és az OA-ban betöltött szerepét a Megbeszélés fejezetben tárgyalom részletesen.



**5.10. ábra: A clusterin STRING interakciós hálózata.** Az interakciós élek színekódolása a következőképpen történt: világoskék – ismert interakció lektorált adatbázisokból; magenta – kísérletesen bizonyított interakció; zöld – előre jelzett interakció génkörnyezet alapján; piros – génfüziókra utaló kapcsolat; sötétkék – gének együttes előfordulása; limezöld – szöveg-bányászatból származó interakció; fekete – ko-expresszió; lila – fehérje-homológia alapján definiált kapcsolat. A hálózatban szereplő fehérjék rövidítései ABC sorrendben a következők: APP (amyloid- $\beta$  A4 protein), ATP7B (ATPáz, réztranszportáló béta alegység), BAX (BCL2-asszociált X apoptózis szabályozó), BCL2L1 (BCL2-szerű 1), C9 (complement fehérje C9), CLU (clusterin), COMMD1 (rézanyagcsere Murr1 domén tartalmú fehérje), FAM169A (szolubilis lamin-asszociált fehérje), HSP90B1 (hősokk fehérje B család [Hsp90] 1. tagja), HSPA5 (hősokk fehérje A család [Hsp70] 5. tagja), HYOU1 (hypoxia által upregulált fehérje 1), LALBA ( $\alpha$ -laktalbumin), LRP2 (alacsony denzitású lipoprotein receptorhoz hasonló fehérje 2), LYZ (lysosim), LYZL4 (lysosim-szerű fehérje 4), MOCOS (molibdén kofaktor szulfuráz), MSRBI (metionin-szulfoxid reduktáz B1), PDIA3 (protein diszulfid-izomeráz A család 3. tagja), PLXNA4 (plexin A4), PRNP (prion protein), SNCA (alpha-synuclein), SPACA3 (spermium acrosoma-asszociált fehérje 3), SPACA5 (spermium acrosoma-asszociált fehérje 5), SPACA5B (spermium acrosoma-asszociált fehérje 5B), TTR (transthyretin), XRCC6 (röntgensugárzás-indukált javító fehérje 6).

5.3. táblázat: A clusterin STRING-hálózatában szereplő interakciós entitások a kapcsolatok számai alapján csökkenő sorrendben. A clusterinnel közvetett kapcsolatban álló fehérjék dőlt betűvel szerepelnek.

Entitás	Fehérje neve	Kapcsolatok száma
CLU	clusterin	19
HSPA5	hősokkfehérje A család (Hsp70) 5. tagja	10
APP	amyloid- $\beta$ A4 protein	9
SNCA	alpha-synuclein	9
HSP90B1	hősokkfehérje B család (Hsp90) 1. tagja	7
PRNP	prion protein	7
TTR	transthyretin	7
BAX	BCL2-asszociált X apoptózis szabályozó	6
PDIA3	protein diszulfid-izomeráz fehérje A család 3. tagja	6
BCL2L1	BCL2-szerű 1	4
HYOU1	hypoxia által upregulált fehérje 1	4
LYZ	lysosim	4
LRP2	alacsony denzitású lipoprotein receptorhoz hasonló fehérje 2	3
ATP7B	ATPáz, réztranszportáló béta alegység	2
C9	complement fehérje C9	2
COMMD1	rézanyagcsere Murr1 domén tartalmú fehérje	2
XRCC6	röntgensugárzás-indukált javító fehérje 6	2
LALBA	$\alpha$ -laktalbumin	1
MSRB1	metionin-szulfoxid reduktáz B1	1
PLXNA4	plexin A4	1
<i>FAM169A</i>	<i>Szolubilis lamin-asszociált fehérje</i>	0
<i>LYZL4</i>	<i>lysosim-szerű fehérje 4</i>	0
<i>MOCOS</i>	<i>molibdén kofaktor szulfuráz</i>	0
<i>SPACA3</i>	<i>spermium acrosoma-asszociált fehérje 3</i>	0
<i>SPACA5</i>	<i>spermium acrosoma-asszociált fehérje 5</i>	0
<i>SPACA5B</i>	<i>spermium acrosoma-asszociált fehérje 5B</i>	0

A CLU hálózatban kölcsönható komponensek bővebb azonosítása céljából a CytoScape beépített PubMed-alapú szövegelemző (*text-mining*) funkcióját alkalmaztuk a korábbi *connectome* kiterjesztésére. Ezt követően meghatároztuk a CLU OA-val összefüggő interakciós hálózatát is, melyhez szintén a CytoScape PubMed-alapú szövegelemző modulját használtuk fel a „clusterin” és „osteoarthritis” kulcsszavak segítségével. A hálózatban olyan kölcsönható partnerek jelentek meg, amelyeket a clusterin és osteoarthritis keresőszavakkal együtt említene a PubMed által indexált tudományos közleményekben. A keresés mindössze 13 kölcsönható entitást eredményezett, melyek közül öt molekula elsődleges, direkt kapcsolatnak

bizonyult (AFM, APOA4, HPX, CLU, C7), míg további hét fehérje másodlagos, indirekt kapcsolattal rendelkezik (PRG4, MMP3, ORM2, PROC, IGLL5, IGFALS, SERPINA4) (5.4. táblázat).

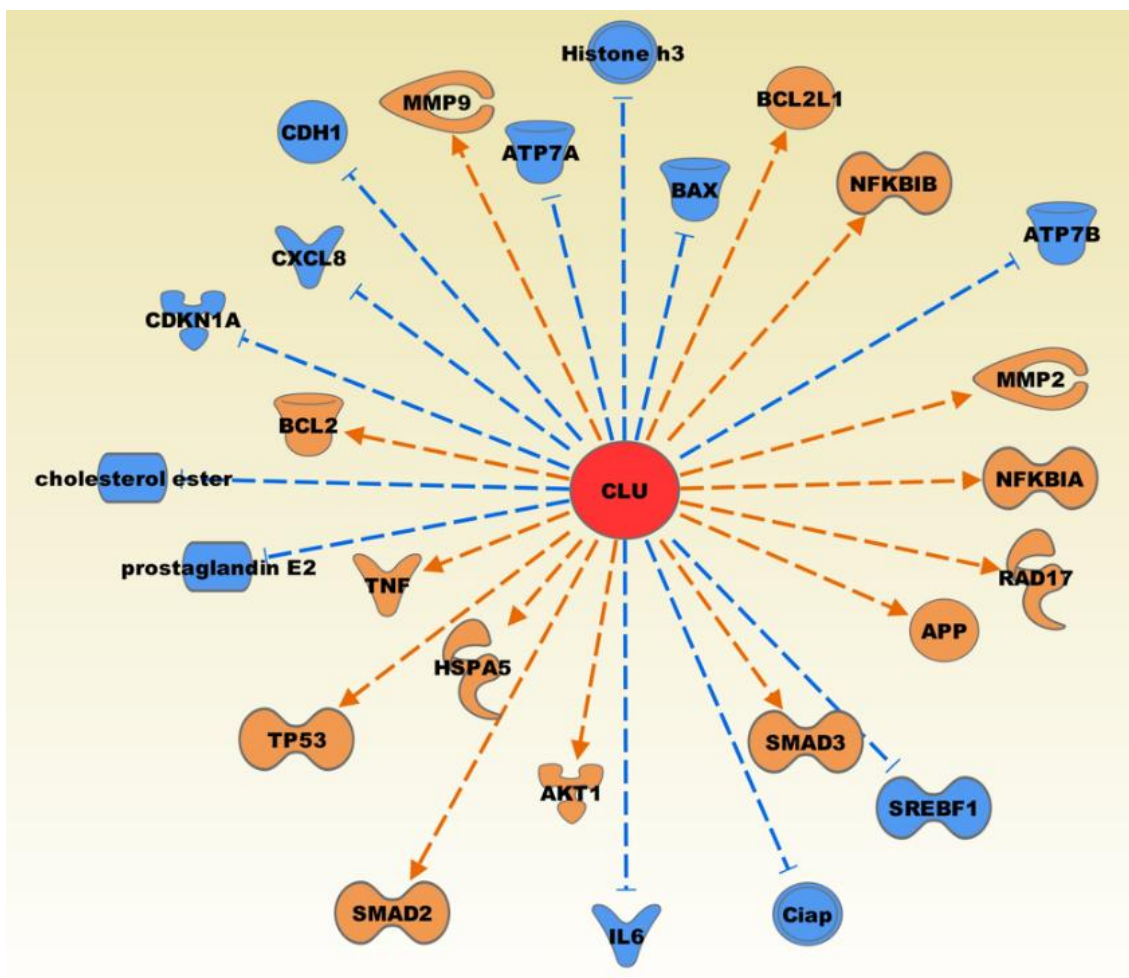
5.4. táblázat: A Cytoscape szoftver szövegelemző (text-mining) funkciója által a clusterin és osteoarthritis keresőszavak felhasználásával létrehozott interakciós hálózat elemei. Az entitásokat a kapcsolatok száma alapján csökkenő sorrendben tüntettük fel. Az első és második rétegben található interaktorokat külön soroltuk fel.

Entitás	Fehérje neve	Kapcsolatok száma
<b>Elsőrendű interakciós partnerek</b>		
AFM	alpha-albumin	6
APOA4	apolipoprotein A-4	6
HPX	beta-1B-glycoprotein/hemopexin	5
CLU	clusterin	4
C7	complement fehérje C7	2
<b>Másodrendű interakciós partnerek</b>		
PRG4	proteoglikán 4, lubricin	15
MMP3	matrix metalloproteináz 3	11
ORM2	alpha-1-savas glycoprotein 2/oromucosid 2	4
PROC	protein C	3
IGLL5	immunoglobulin lambda-szerű polypeptid 5	1
IGFALS	insulin-szerű növekedési faktor-kötő fehérjekomplex savérzékeny alegysége	1
SERPINA4	serpin peptidáz inhibitor A család 4. tagja	1

#### 5.7.2. Az IPA tudásbázis segítségével létrehozott CLU interakciós hálózat ismertetése

A CLU *interactome*-jének átfogó elemzését az IPA tudásbázisával is elvégeztük, és további jelátviteli útvonalakat, valamint kölcsönható partnereket azonosítottunk. Az IPA adatbázisból kiválogattuk azt a 26 molekulákat, amelyek expresszióját a hálózatelemzés során felhasznált szakirodalmi adatok alapján a CLU pozitívan vagy negatívan szabályozza (5.11. ábra). A CLU gátolja 12 fehérje, köztük a hiszton h3, BAX, ATP7B, SREBF1, Ciap, IL-6, prosztaglandin E2, koleszterin-észter, CDKN1A, CXCL8, CDH1, valamint a ATP7A expresszióját, azonban serkenti 14 protein, köztük a BCL2L1, NFKBIB, MMP2, NFKBIA, RAD17, APP, SMAD3, AKT1, SMAD2, HSPA5, TP53, TNF, BCL2, továbbá az MMP9 kifejeződését. Az előző alfejezetben tárgyalt STRING adatbázisból nyert interakciós

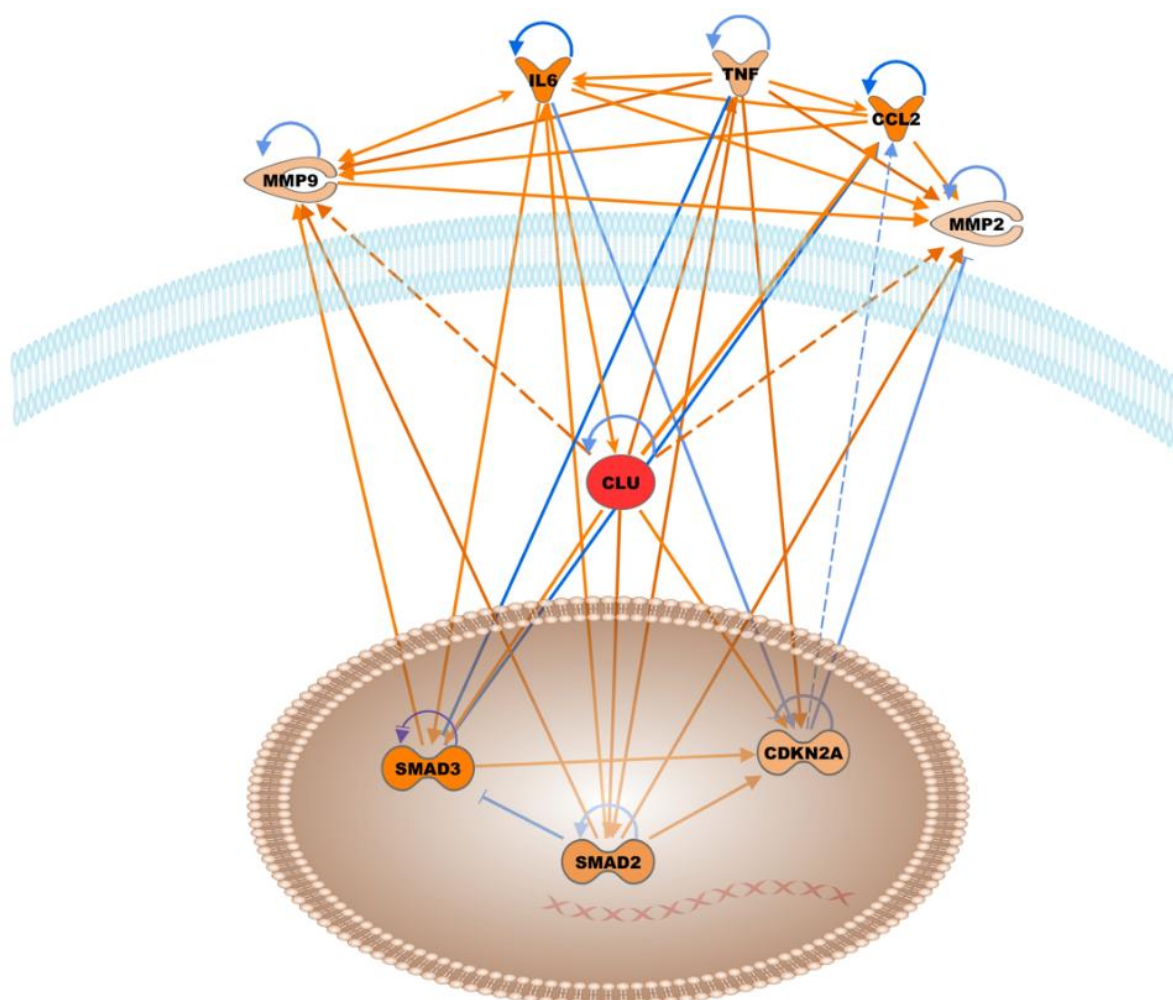
partnerekkel összehasonlítva, mindkét vizsgálat kimutatta a BAX, ATP7B, BCL2L1, APP, valamint a HSPA5 kapcsolatot a CLU-nel. A viszonylag kismértékű átfedés a két hálózatelemző módszer technikai különbségéből és beállítási paramétereiből származhat. Azonban ezek azok a fehérjék, amelyek nagy valószínűséggel kölcsönhatásban állnak a CLU-nel. Az OA kontextusában különösen jelentős a CLU-függő pozitív és negatív szabályozás több molekula esetében is, melyeket a Megbeszélés fejezetben fogok röviden ismertetni.



**5.11. ábra:** A clusterin által szabályozott molekulák hálózata az IPA tudásbázisa alapján. Az aktivációt narancssárga, a gátlást kék szaggatott vonal jelzi. A hálózat fehérjei az órajárásnak megfelelően a következők: CLU (clusterin), BAX (BCL-2 asszociált X), BCL2L1 (BCL2-szerű fehérje-1), NFKBIB (NF-kappa-B inhibitor beta), ATP7B (réz-transzporter ATPáz-2), MMP2 (matrix metalloproteináz-2), NFKBIA (NF-kappa-B inhibitor alpha), RAD17 (sejtciklus ellenőrző protein RAD17), APP (amyloid- $\beta$  A4), SREBF1 (szterol regulatórikus elemkötő fehérje 1), SMAD3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3), Ciap (cellularis inhibitora az apoptosishoz), IL-6 (interleukin-6), AKT1 (RAC-alpha szerin/treonin-protein kináz), SMAD2 (Mothers against decapentaplegic homolog 2), HSPA5 (hőshock fehérje A család [Hsp70] 5. tagja), TP53 (cellularis tumor antigén p53), TNF (tumor nekrosis faktor), prostaglandin E2, koleszterol-észter, BCL2 (apoptosis regulátor Bcl-2), CDKN1A (ciklin-dependens kináz inhibitor 1A), CXCL8 (interleukin-8), CDH1 (kadherin-1), MMP9 (matrix metalloproteináz-9), ATP7A (réz-transzporter ATPáz-1), hiszton H3.

### 5.7.3. CLU hálózatképzés molekuláris aktivitáson alapuló predikció segítségével az OA kontextusában

Az IPA tudásbázison alapuló, molekuláris aktivitást felhasználó predikciós elemzés öt kulcsfontosságú szabályozó jelátviteli útvonalat azonosított, amelyek a CLU szempontjából relevánsak lehetnek az OA patológiájában (5.12. ábra).



**5.12. ábra:** Az IPA tudásbázis felhasználásával molekuláris aktivitás predikción alapuló interakciók a clusterin és az OA-ban szerepet játszó partnerek között. A hálózatban a narancssárga vonalak az aktivációt, a kék vonalak a gátlást szimbolizálják. A folyamatos vonal a nagy konfidenciájú predikciót, a szaggatott vonal csak a valószínűsíthető interakciót jelzi. A kimutatott molekulák ABC sorrendbe rendezve a következők: CCL2 (C-C motívumú kemokin-2), CDKN2A (ciklin-dependens kináz inhibitor 2A), CLU (clusterin), IL6 (interleukin-6), MMP9 (matrix metalloproteináz-9), MMP2 (matrix metalloproteináz-2), SMAD2 (Mothers against decapentaplegic homolog 2), SMAD3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3), valamint TNF (tumor nekrozis faktor).

Az EC térben az MMP2, MMP9 matrix metalloproteinázokat, illetve az IL6, TNF és CCL2 ligandokat predikálta fontos jelátviteli komponensekként. A sejten belül a SMAD2 és SMAD3 transzkripciós faktorok, valamint a CDKN2A sejtciklust szabályozó fehérje mutatott nagyfokú kapcsolatot a CLU-nel. Az MMP9, TNF, CCL2, MMP2, SMAD3, SMAD2 és CDKN2A fehérjéket a CLU upregulálja, azonban az IL-6 irányában az elemzés nem talált meggyőző bizonyítékot. Ezen túlmenően mindegyik kimutatott molekula negatív feed-back mechanizmussal rendelkezik. Az említett folyamatok alapján a hálózatban szereplő interakciós partnerek egymással bonyolult szabályozási hálót alkotnak, mely mutatja a sejtek működésének nagyfokú komplexitását. Az elemzés 5 fő jelátviteli tengelyt azonosított a hálózatban: a proinflammatorikus IL-6 citokin, a stresszválaszokat szabályozó TNF- $\alpha$ , az ECM összetételét befolyásoló matrix metalloproteinázok, a sejtciklust gátló CDKN2A, valamint a TGF- $\beta$  jelátvitelben szereplő SMAD2/3 útvonalakat. Az 5 fő tengely porcsejtekben, porcfejlődésben és az OA-ban betöltött szerepét a Megbeszélés fejezetben tárgyalom.

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Az *in vitro* chondrogenesis sejtfelszíni fehérjéinek vizsgálata

#### 6.1.1. A csirkeembryo végtagtelepből származó modell megbízhatósága és validálása

A jelen disszertáció egyik alapvető célja volt a chondrogenesis időfüggő proteomikai változásainak feltérképezése egy csirkeembryo végtagtelepből származó micromass modellben. Az általunk alkalmazott sejtkultúra típus hosszú ideje az egyik legstabilabb és leginkább reprodukálható *in vitro* módszer a porcfejlődés vizsgálatára [370]. Ennek biológiai alapja, hogy a szoros sejt-sejt kapcsolatok a nagy sejtsűrűségű környezetnek köszönhetően önmagában képesek aktiválni a kondenzációs és differenciációs sejtprogramokat, amelyek a porcfejlődés korai szakaszait jellemzik *in vivo* is [391]. A savas DMMK alapú szövettani festés eredményei megerősítették, hogy a modellben jól nyomon követhető a porcfejlődés klasszikus időbeli lefutása: a korai, ECM-et alig termelő chondroprogenitor állapotot a 3. naptól megjelenő intenzív GAG-szintézis, majd a 6–10. nap között kialakuló, nagy ECM-tartalmú porcsejtkultúra követi. A 10–15. nap közötti enyhébb ECM-növekedés megfelel a hypertrophiás átmenetnek, amely a késői chondrogenesis, majd az enchondralis csontosodás jellegzetessége [392]. A hisztológiai felvételek, valamint a belőlük számított metachromasia index alakulása, továbbá a korábban a kutatócsoportunk által elvégzett részletes transzkriptomikai elemzések együttesen támasztják alá, hogy a micromass sejtkultúra hűen követi a porcdifferenciáció ismert fejlődési mintázatát [15].

Ezen eredmények alapján az alkalmazott micromass modell megbízható alapot biztosított a proteomikai változások időbeli követéséhez, valamint a sejtfelszíni fehérjekészlet (surfaceome) dinamikájának feltérképezéséhez.

#### 6.1.2. A total proteom és a surfaceome változásainak összehasonlítása a porcdifferenciáció előrehaladtával

A teljes proteom LC–MS/MS vizsgálatával 5207 fehérjét vagy fehérjecsoportot azonosítottunk, amely a chondrogenesis során aktiválódó, gátlódó vagy változatlanul jelenlévő molekuláris folyamatok széles spektrumát fedi le. A PCA analízis egyértelmű időbeli elrendeződést mutatott, ami arra utal, hogy a differenciáció folyamatában a teljes proteomra egyfajta stádiumspecifikusság jellemző. Az első főkomponens által magyarázott magas

variancia (42%) azt jelzi, hogy a porcsejtek érése markáns globális átrendeződést idéz elő, különösképpen az ECM fehérjék (fibronektin, II-es típusú kollagén, aggregán) kifejeződésében. Ezen megfigyelések jól illeszkednek a korábbi omikai vizsgálatok eredményeihez, amelyek a chondrogenesis során fokozatos és programszerű transzkripciós és translációs átállásokat mutattak ki [393,394].

A teljes proteom és az AOB dúsított fehérjelisták összehasonlításának egyik legfontosabb megállapítása az volt, hogy a teljes sejtlizátumban detektált fehérjék csupán 23%-a fedett át a sejtfelszíni dúsítással nyert proteinekkal. Ez azt jelzi, hogy a hagyományos proteomikai módszerekkel a membránhoz kötött és az EC felszínen megjelenő fehérjék jelentős része rejtve marad, ami más tanulmányokban is ismert metodikai kihívás [395-397]. Az AOB-alapú módszer azonban drámaian növelte a detektált sejtfelszíni fehérjék arányát: minden időpontban az azonosított fehérjék több mint fele (55–60%-a) surfaceome-hoz köthető GO annotációt kapott. Ezzel ellentétben ugyanez a GO annotációs szűrés a total proteom esetén a fehérjék csak 17%-ának valószínűsített sejtfelszíni elhelyezkedést. Ez a jelentős eltérés kiemeli a dúsítás hatékonyságát, különösen az alacsony kópiaszámú receptorok, adhéziós molekulák és transzporterek feltárásában, amelyek a jelátvitel, a sejtkecsolatok és a külső környezet érzékelésének elsődleges mediátorai. Mivel a legtöbb sejtfelszíni fehérje tipikusan alacsony expresszióval rendelkezik és térszerkezetük miatt kevésbé vízoldékonyak [398], az AOB-alapú izolálási technika lehetővé teszi olyan molekulák azonosítását, amelyeket hagyományos, teljes proteomikai vizsgálatokban a magas expressziójú, szolubilis fehérjék elfednének. Mindez azt is jelenti, hogy a surfaceome vizsgálata nélkül a chondrogenesis korai, részben a sejtfelszínhez köthető jelátviteli folyamatai rejtve maradnának.

Eredményeink tehát alátámasztják a surfaceome-analízis létjogosultságát olyan biológiai rendszerekben, ahol a sejtfelszíni kommunikáció kulcsfontosságú a fejlődési programok meghatározásában és irányításában.

### *6.1.3. A surfaceome fehérjék expressziójának temporalis változásai a chondrogenesis folyamatában*

A tömegspektrometriai vizsgálat összesen 504 eltérő fehérjét detektált az AOB dúsított mintákban. A különböző mintavételi napok eredményeinek összehasonlítása során a szignifikáns mértékben megváltozott expressziójú fehérjék (DEP-ek) közül 254 upregulációt, míg 170 downregulációt mutatott a porcfejlődés előrehaladtával. Az upregulált fehérjék között

olyan kulcsmolekulák jelentek meg, amelyek a GO analízis alapján a chondrocyták sejt–sejt-, illetve sejt–ECM kommunikációjához, a kollagén bioszintéziséhez, valamint a GAG-termeléséhez kapcsolódnak, mely biológiai folyamatok más chondrogenikus modellekben is megjelentek [399]. Ezzel szemben a csökkent expressziójú fehérjék között számos olyan receptor, jelátviteli komponens és neurogén markermolekula jelent meg, amelyek a mesenchymális plaszticitásra jellemzőek, de a differenciáció előrehaladtával fokozatosan elveszítik jelentőségüket. A szinapszisokhoz, illetve axon növekedéséhez tartozó fehérjék jelenléte alátámasztja a korai chondrogenikus stádiumban a chondroprogenitorok mesenchymalis őssejt eredetét, mely állapotban még jelentős a többirányú differenciációs potenciál, ellenben a chondrogenesis során fokozatosan háttérbe szorul [400]. A porcszövet és idegszövet kapcsolatát tovább erősíti az a megfigyelés is, melynek során Schwann-sejt prekursorok chondrocytákká differenciálódtak *in vivo* egérben és zebrahalban [401].

A biológiai interpretáció szempontjából különösen fontos volt megismerni, hogy a detektált surfaceome DEP-ek expressziós mintázata hogyan illeszkedik a chondrogenesis ismert stádiumaihoz. A további hierarchikus elemzés négy jól elkülöníthető fehérjecsoportot eredményezett, amelyek a chondrogenesis különböző szakaszaihoz köthetők. Azonban a klaszterezés célja nem csupán a fehérjék kvantitatív változásainak rendszerezése volt, hanem azok biológiai összefüggéseinek feltárása is, amely révén azonosíthatóvá váltak a differenciáció kulcsfontosságú molekuláris hajtóerői. Az expressziós dinamikák megjelenítése és funkcionális értelmezése alapján minden klaszter specifikus szerepet tölt be a chondrogenesis idővonalának valamely pontján, ami összhangban van a sejtfelszíni fehérjék funkcionális sokszínűségével, valamint azok eltérő temporális aktivációs/deaktivációs mechanizmusaival.

Az „A” klaszterre a fehérjék progresszív upregulációja volt jellemző a chondrogenesis teljes folyamatában, mely proteinek számos, az ECM-szerveződés alá tartozó sejt-folyamatot szabályoznak. A kapcsolódó GO-kifejezések, mint a kollagén bioszintéziséhez szükséges peptidil-prolil hidroxiláció vagy a csontfejlődési útvonalak jelenléte jelzi, hogy ezek a fehérjék a porcképződés előrehaladtával, majd az enchondralis csontosodás során válnak meghatározóvá [402]. A klaszterből képzett PPI-hálózat gazdag volt olyan ECM-érlelő és ECM-modifikáló fehérjékben, mint a 2-oxoglutarát-dependens oxigenáz enzimesaládba tartozó PLOD1, P3H2, P4HA1/2, vagy a P4HB, amelyek a kollagén keresztkötések stabilizálásához elengedhetetlenek [403]. Emellett erős kapcsolat mutatkozott a fehérjehajtogató chaperonok irányába (például HSPA5 [másnéven: BiP, GRP78] és PDIA3 [másnéven: ERp57]), amelyek döntő szerepet töltenek be a kollagének, illetve egyéb szekretált vagy membránhoz kötött fehérjék érési

folyamatában [404,405]. A PPI hálózat központi, legtöbb kapcsolatot kialakító eleme a fibronectin-1 volt, mely ECM fehérje kapcsolatot alakít ki a kollagén molekulák és a porcsejtek felszíne között, ezenfelül elősegíti a porcsejtek tömörülését, kondenzációját, amely esszenciális az egészséges chondrogenesis során [406]. A klaszterbe tartozó fehérjék jól mutatják a porcsejtek és a kollagének közötti szoros, és egyben bilaterális kapcsolatot, ami az expressziós mintázat alapján a porcfejlődés előrehaladtával egyre erősebbé válik. Ez a megfigyelés tovább erősíti a végtagtelep eredetű micromass sejt kultúrák alkalmazhatóságát a porcfejlődés tanulmányozásában.

A „B” klaszterben egy átmeneti expressziós csúcs volt tapasztalható, melyben a proteinek nagy része elsősorban a sejtek fejlődési mintázatát szabályozza. A klaszter fehérjéi főként a chondrogenesis 6. napján mutatták a legmagasabb expressziót, ami egy ideiglenes jelátviteli fázis meglétére utal. A felülreprezentált GO-kifejezések – köztük a transzmembrán ephrin receptor aktivitás (GO:0005005) és az FGF-jelátvitelhez kapcsolódó funkciók (GO:0017134) – olyan szabályozási folyamatokat takarnak, amelyek a morphogenesis térbeli időbeli mintázatainak kialakításában játszanak szerepet. Az ephrin–Eph receptor tengely jól ismert modulátora a sejt migrációnak, a sejt sors eldöntésének és a sejt–sejt távolságok finomhangolásának [407]. Az általunk kimutatott ephrin receptorok (EPHA7, EPHB1, EPHB2, EPHB3) közül már leírták az EPHB1 [408], valamint az EPHB2 [409] jelenlétét és szerepét az enchondralis csontosodás során. Ezen megfigyelés alapján feltételezhető, hogy az ephrin jelátvitel nemcsak az embryonalis fejlődés korai fázisában aktív, hanem a chondrogenesis középső szakaszában is, ami funkcióját tekintve arra utal, hogy a chondroblast populációk pozicionálásában és a kondenzált porcmatrix stabilizálásában vehet részt. Hasonló expressziót mutatott az FGFR2 receptor, melynek végtagfejlődésben betöltött funkcióját már korábban is vizsgálták. Fejlődő csirkeembryok végtagbimbóiban az FGFR2 gátlása rövidebb, de vaskosabb, szélesebb és részben fuzionált porcelemek megjelenéséhez vezetett [410]. Mivel az említett kutatásban az FGFR2 főként a porcprekurzor-kondenzáció helyein fejeződött ki a végtagfejlődés során (mind *in vivo*, mind *in vitro*), ezért az eredmények arra utalnak, hogy az FGFR2-nek chondrogenesis-gátló hatása van, amely korlátozza a kialakuló csontvázelemek oldalirányú kiterjedését, megtartva a végtagok hosszanti fejlődését. A klaszterben szereplő RAB GTPázok (RAB5C, RAB14) és endocytosisban részt vevő fehérjék (AP2M1, RAB5C) PPI hálózata azt jelentheti, hogy az intenzív membrán- és anyagforgalom fontos sejtleletani funkciók lehetnek a chondroblast-állapot során. Egy japán kutatócsoport eredményei alapján az intracellularisan elhelyezkedő CCN2 interakcióba lép a RAB14 GTPázal a Golgi-apparátusból

a PM felé tartó, proteoglikánokat tartalmazó vezikulumokon, ezáltal feltehetően szerepet játszik a porcsejtek proteoglikán-szekréciónjában [411].

A „C” klaszter: átmeneti gátlás, majd késői újra aktiváció – mely fehérjék a sejtciklus és a metabolikus újraszerveződés szerepét hangsúlyozzák. Eme klaszter különösen érdekes mintázatot mutatott: a „B” klaszterrel ellentétesen ezen fehérjék expressziója átmenetileg visszaesett a 6. napon, majd a későbbi napokban fokozatosan újra aktiválódott. Az RNS-polimeráz II foszforiláció (GO:0008353), valamint a ciklin-dependens kináz aktivitás (GO:0004693) GO kifejezések jelenléte arra utal, hogy a chondroblastok ECM-termelő fázisát követően a sejtek részben újra aktiválják az általános fehérjeexpresszióhoz, sejtosztódáshoz, és sejt differenciációhoz kapcsolható útvonalakat. Ez a mechanizmus összhangban van más porcmodellekben megfigyelt jelenségekkel [412], ahol a hypertrophiás chondrocyták is fenntartanak egy alapszintű (transz)differenciációs potenciált és génextpressziós plaszticitást annak érdekében, hogy reagálni tudjanak az őket érő különböző mechanikai és hormonális ingerekre. A klaszterből képzett PPI hálózat egyik legfontosabb része a fokális adhézióhoz és az aktin cytoskeletonhoz köthető az aktininek (ACTN1, ACTN4), a miozin (MYH9), a disztrófin (DMD), az ADP-ribozilációs faktor 6 (ARF6), valamint a Ras-rokon 1B fehérje (RAP1B) révén. A fokális adhéziót kialakító fehérjekomplex nemcsak egy sejt–ECM kihorgonyzó struktúra, hanem egy olyan jelátviteli központ is, amelyen keresztül különféle sejtesemények – pl. sejtadhézió, migráció és proliferáció – indulnak el a porcsejtekben [413]. Az általunk is használt, mesenchymalis eredetű embryonális végtagbimbó modellben a fokális adhéziót a chondrogenesis pozitív regulátoraként írták le [414], míg egy másik tanulmányban az aktin cytoskeleton átrendeződés a hypertrophiás chondrocytáakra volt jellemző [415]. Ezen megfigyelések javarészt összhangban állnak a fehérjék expressziós dinamikájával, mivel kifejeződésük az érett chondrocyta stádium kezdetén mérséklődik, majd egyre fokozódik a terminálisan differenciált állapot irányában. Egy 2024-ben megjelent kutatásban kimutatták, hogy a kollagéntartalmú hidrogélben tenyésztett csontvelő eredetű MSC-k az ACTN1 és ACTN4 aktininek downregulációja révén chondrogenikus irányba tudtak differenciálódni [416], kiemelve a két fehérje negatív szabályozó szerepét a porcfejlődés során. A klaszter egy másik hálózatrésze tovább erősíti a kísérleteinkhez használt végtagtelep eredetű *in vitro* modell alkalmazhatóságát, mivel az enchondralis csontosodással összefüggésben lévő fehérjéket is sikerült kimutatnunk (TIMP3, TGFB2, THBS2, VLDLR). A TIMP3-nak (matrix metalloproteináz inhibitor 3), mely a klaszter hálózatának egyik központi eleme volt, korábban már bizonyították chondroprotektív hatását [417]. Ezen túlmenően a TIMP3 szignifikánsan

alacsonyabb mértékben fejeződött ki OA betegek porcsejtjeiben az egészséges chondrogenikus sejtekhez képest [418], amely megfigyelések lehetőséget teremtenek a fehérje jövőbeli diagnosztikus markerként való felhasználására.

A „D” klaszterben az össejtekre jellemző plaszticitást szabályozó molekulák fokozatos mérséklődése volt megfigyelhető. A klaszter fehérjéinek expressziója a 3. naptól folyamatosan csökkent, ami arra utal, hogy döntően a chondroprogenitor és chondroblast állapot sajátossága. A hálózatelemzésből kimutatott izom- és idegrendszeri fejlődéshez társított GO-kifejezések (GO:0007517, GO:0007411, GO:0021953) jól illusztrálják azt a pluripotens jellegű tulajdonságot, amelyet a mesenchymális eredetű sejtek a specializáció előtt hordoznak, mivel az MSC-k képesek myocytákká és neuronokká is differenciálódni [400]. A „B” klaszterhez is csoportosított ephrin receptorokon (EPHA7, EPHB1, EPHB2, EPHB3) kívül, 3 további fehérjét is a „D” klaszterhez sorolt az elemzés: EPHA3, EPHA4, EPHA5. Egy 2018-as tanulmányban az EPHA4 és EPHA5 gének expressziója jelentős eltérést mutatott a csonttörés gyógyulása során, ami arra utalhat, hogy szabályozó szerepet töltenek be a callus porc- és csontfejlődésében [419]. Ezen ephrin gének kifejeződése korrelált a callusban jelenlévő chondrocyta hypertrophiával és az osteoblastok működésével, ami tovább erősíti szabályozó szerepüket az enchondralis csontosodás folyamatában. Az ephrinek széles körben expresszálódnak az embryonális szövetekben, melynek során intracellularisan átrendezik a cytoskeletont és elősegítik az irányított sejt-vándorlást, a sejtadhéziót és a sejtleválást, amelyek hozzájárulnak a szöveti határok kialakításához az egyedfejlődés során [420]. Eredményeink ezzel tovább erősítik az ephrin-jelátvitel jelentőségét elsősorban a chondrogenesis korai, porcössejtek tartalmazó szakaszában. A „D” klaszter PPI hálózatának központi eleme az EGFR receptor volt, amely a legtöbb kapcsolattal rendelkezett. Az EGFR és a BMP2 jelátviteli útvonalak között keresztszabályozást írtak le a chondrocyták érése során. A rezerv és prehypertrophiás porcszövetzónákban a BMP2 jelátvitel egyoldalúan gátolja az EGFR aktivitását; azonban a hypertrophiás zónában az EGFR és a BMP2 útvonalak kölcsönösen elnyomják egymást [421], mely megfigyelés részben megmagyarázhatja az általunk kimutatott progresszíven csökkenő EGFR expresszió okát. További jelátviteli komponensek voltak a hálózatban az FGFR1/2/3 receptorok. A mesenchymalis kondenzáció perifériás részén elhelyezkedő sejtek, amelyekből később a perichondrium és a periosteum alakul ki, egyaránt expresszálják az FGFR1 és az FGFR2 receptorokat. A kondenzáció során a sejtek chondrocytákká kezdenek differenciálódni, és az FGFR3 expressziója fog aktiválódni – a Sox9 és a II-es típusú kollagén expressziójával együtt –, miközben az FGFR2 expressziója lecsökken. Amikor a centrális chondrocyták

hypertrophiássá válnak, az FGFR3 expressziója visszacsökken, ellenben az FGFR1 expressziója megnövekszik [422]. Az eredményeink azonban csak részben, az FGFR2 és FGFR3 esetén fednek át az előzőekben leírtakkal, mivel a tömegspektrometriai vizsgálat mindhárom receptor expressziója során progresszív csökkenést detektált. Itt azonban fontos megjegyezni, hogy az általunk felállított tenyésztési időskálában a hypertrophiás chondrocyta állapot viszonylag korai szakaszát vizsgáljuk, mely részben magyarázhatja az FGFR1 receptor expresszió növekedésének elmaradását. Az ephrin, EGFR és FGFR jelátvitelen kívül a Wnt (FZD1, FZD2, FZD7) és Hedgehog (SMO) útvonalak képviselőit is a „D” expressziós klaszterhez sorolta az elemzés. Ez arra utal, hogy a korai időszakban aktív morphogenetikai útvonalak szerepe fokozatosan háttérbe szorul, ahogy a sejtek egyre inkább elköteleződnek az MSC állapotból a porc irányú differenciáció felé [63]. Korábbi eredmények alapján az FZD2 kereteltolódásos mutációja a végtag mesenchyma sejtjeiben rövidebb csontrészek kialakulásához vezetett, melyben egyaránt a kanonikus Wnt/ $\beta$ -katenin, valamint a nem-kanonikus WNT5A/PCP jelátviteli útvonalak is közrejátszottak [423]. Egy másik munkacsoport eredményei alapján a nem-kanonikus Fzd jelátvitel feltehetően hozzájárul a proliferáló chondrocyták polaritásának és a leánysejtek identitásának fenntartásához azáltal, hogy szabályozza a sejtadhéziós komplexek expresszióját és/vagy lokalizációját [424]. A „D” klaszter fehérjéi alapján megállapítható, hogy a chondrogenesis korai szakaszában számos eltérő jelátviteli útvonal működik párhuzamosan annak érdekében, hogy a mesenchymalis kondenzációból a chondroprogenitor fázison keresztül matrix-termelő chondroblastok alakulhassanak ki, melyek végül érett chondrocytákká, és hypertrophiás porcsejteké differenciálódnak.

#### *6.1.4. Az újonnan felfedezett korai chondrogenikus biomarkerek (CNTFR, PODXL) azonosítása, validálása és lehetséges szerepük felderítése*

A surfaceome Venn-diagrammal történő kvalitatív összehasonlítása során mindössze két olyan proteint azonosítottunk, amelyek csak a chondrogenesis korai szakaszában (1–6. nap) voltak detektálhatóak a tömegspektrometriai vizsgálatunkban, és a későbbi, differenciált porcsejtekben eltűntek: a ciliaris neurotrophikus faktor receptort (CNTFR) és a podocalyxint (PODXL). A két fehérje esetén az expressziós mintázatot, illetve plazmamembrán közeli lokalizációjukat a western blot és az immuncitokémiai módszerek is megerősítették. Ez a szigorú időbeli mintázat azt sugallja, hogy mindkét fehérje potenciálisan alkalmas lehet korai porcdifferenciációs markernek.

A CNTFR differenciálódó chondrocytákban való azonosítása új perspektívát nyithat a neurotrophikus citokin jelátvitel szerepéről a porc szövet biológiájában. A ciliaris neurotrophikus faktor (CNTF), amely az interleukin-6 (IL-6) család tagja, egy háromkomponensű receptor komplexen keresztül hat: CNTFR $\alpha$ , gp130 és LIFR [425,426]. Bár eredetileg neuronális túlélést és differenciációt támogató faktorként írták le, a CNTF-et később a csont- és porc szövetre vonatkozó funkciókkal is összefüggésbe hozták [427,428]. A rokon ligandok, például a citokin receptorszerű faktor 1 (CRLF1) [429], vagy a cardiotrophin-szerű citokin (CLCF1) [430] szintén befolyásolják az MSC-k differenciációját és osteogenesisét, ami tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a CNTF/CNTFR jelátvitel fontos szereplője lehet a teljes vázrendszeri fejlődésnek [431]. A CNTFR expressziója ismert módon hozzájárul a porc homeostasisához és az OA progressziójához. A CRLF1/CLCF1 komplex upregulációja, amely kompetitíven gátolja a CNTF kötődését a receptorhoz, a porc matrix homeostasisának felborulásához és az OA súlyosbodásához vezet [432]. A jelen disszertációban megfigyelt, a chondrogenesis korai szakaszában tapasztalt erőteljes CNTFR-expresszió, valamint a fehérje PM közeli lokalizációja arra utal, hogy a CNTFR kettős szerepet tölthet be a porc szövet fenntartásában és a kóros átalakulási folyamatokban egyaránt. Mindez a CNTFR-t egyszerre helyezi el potenciális porcfejlődési regulátorként és terápiás célpontként az OA gyógyászatában. Proteomikai eredményeink összhangban állnak a chondrogenikus differenciáció jelátviteli szabályozásáról szóló korábbi megfigyelésekkel. A porc sejtekre jellemző sejtsors-specifikus elemzések [433], valamint a chondrocyta-alcsoportok újabb single-cell transzkriptomikai profiljai [434] egyaránt azt mutatták, hogy a növekedési faktorok – köztük az IL-6 család citokinjei, az FGFR-út vonal és a TGF- $\beta$ -jelátvitel – és az ECM átépülése közösen modulálják a progenitor-állapot megőrzését, valamint a hypertrophiás átmenetet is. Eredményeink arra utalnak, hogy a CNTFR e hálózat részeként működhet, kialakítva a sejttúlélési és rostosporc átépülési folyamatokat a differenciáció során.

A PODXL, amelyet klasszikusan a vese glomerulus podocytaival és a vascularis endotheliummal hoznak összefüggésbe, a CD34 transzmembrán sialomucin fehérjecsald tagja [435]. Szerepet játszik a sejtadhézió, a sejt migráció és a progenitor állapot fenntartásának szabályozásában [436,437]. A chondrogenikus sejtekben való jelenléte új megfigyelés, amely arra utal, hogy szerepe lehet a porc progenitor sejtek porcdifferenciációs jelzésekre – például a SOX9- vagy TGF- $\beta$ -függő út vonalakra – adott válaszaiban [438]. Ez összhangban áll azokkal az eredményekkel, amelyek rámutattak a sejt–matrix receptorok és cytoskeletalis regulátorok dinamikus változásaira a chondrocyták dedifferenciációs-redifferenciációs ciklusa során [433].

Továbbá, single-cell multiomikai megközelítéssel korábban azonosítottak olyan progenitor-szerű klasztereket, amelyek erős adhéziós és polaritási markereket expresszálnak [434], ami nagyfokú hasonlóságot mutat a jelen disszertáció PODXL-pozitív sejtjeivel. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a PODXL hozzájárulhat egy átmeneti, migrációs vagy matrix-adaptációs potenciállal bíró korai chondrogenikus fenotípus fenntartásához. Bár a PODXL közvetlen kapcsolatát a chondrogenesis alátámasztó bizonyítékok egyelőre korlátozottak, osteogenikus érés során tapasztalt downregulációja és progenitor-gazdag MSC populációkhoz való kötődése támogatja szerepét a korai porcfejlődés lehetséges regulátoraként.

Végezetül a CNTFR és PODXL jelenlétét humán ízületi chondrocyták különböző altípusaiban is ellenőriztük két, nyilvánosan elérhető single-cell transzkriptomikai adatbázis (GSE216578, GSE255460) segítségével, melyből az általunk létrehozott analízis mind a *CNTFR*, mind a *PODXL* transzkriptumokat detektálta. Az előbbit főként effektor és homeosztatis chondrocytákban, utóbbit alacsonyabb szinten VEGFA+ sejtekben, fibrochondrocytákban és pre-hypertrophiás chondrocytákban.

EC hozzáférhetőségük alapján a CNTFR és a PODXL fehérjék potenciálisan synovialis folyadékban vagy szérumban is detektálhatók lehetnek, ami korai OA diagnosztikai vagy prognosztikai lehetőségek felé egy költséghatékonyabb, könnyebben kivitelezhető irányt kínál.

A két fehérje porcélettanban betöltött szerepének pontosabb, jövőbeli megismerése érdekében azonban fontos megjegyezni, hogy a chondrogenikus jelátviteli hálózatok funkcionális redundanciája vagy más sejt felszíni receptorok kompenzációja elfedheti az egyes gének csendesítésének vagy kiütésének közvetlen fenotípusos hatásait, ennek ellenére a kombinált génmódosító vagy útvonal-fókuszú kísérletes megközelítések feltárhatják e két molekula teljes regulatív kapacitását. A diagnosztikai jelentőségen túlmenően a PODXL-mediált sejt–matrix kölcsönhatások vagy a CNTFR-függő jelátvitel célzott modulálása új irányokat nyithat a porc regenerációja és az OA kezelése felé [439].

#### 6.1.5. A porcsejtek sejt felszíni fehérje vizsgálatának limitációi és jövőbeli felhasználása

A csirkeembryo végtagtelepéből származó chondroprogenitor sejtek alkalmazása értékes fejlődésbiológiai modellt biztosít, ugyanakkor nem feltétlenül tükrözi teljes mértékben az emberi chondrogenesis vagy az OA pathofiziológiájának minden aspektusát. Bár az embryonális madár végtag-modellt széles körben validálták a porcdifferenciáció

mechanisztikus vizsgálatához [410,414,440,441], a fajspecifikus különbségek az ECM összetételében, a jelátviteli dinamikában és a progenitorsejt-populációkban korlátozhatják eredményeink közvetlen értelmezhetőségét az emberi ízületi porc kontextusában. Hasonlóképpen, bár a micromass sejttenyészet jól bevált modell a chondrogenikus elköteleződés tanulmányozására [370], továbbra is egy leegyszerűsített *in vitro* rendszer, amely nem képes teljesen visszaadni a natív ízületi környezet szöveti komplexitását, mechanikai ingereit vagy biokémiai heterogenitását.

A sejtfelszíni fehérjék dúsítására alkalmazott módszerünk elsősorban az N-glikozilált plazmamembrán-komponensekre fókuszált, ami nagyfokú specificitást biztosít a sejtfelszíni fehérjékhez, ugyanakkor alulreprezentálhat más biológiailag jelentős csoportokat, például a nem glikozilált vagy O-glikozilált membránfehérjéket, illetve a szekretált matrix komponenseket. Ennek következtében bizonyos jelátviteli vagy adhéziós receptorcsaládok, amelyek a chondrogenikus szabályozásban szerepet játszhatnak, kimaradhattak az azonosításból. Ezen felül, bár a surfaceome fehérjék szűréséhez alkalmazott GO annotációkat manuálisan adták hozzá a Uniprot adatbázishoz, bizonyos biológiai folyamatok madárspecifikusak lehetnek, vagy nem kellőképpen konzerváltak csirke és emberi porc között [442,443].

A jövőben humán chondroprogenitor sejteken, illetve betegből izolált OA chondrocytákon végzett több, alternatív surfaceome-izolálási (AOB technika, PNGase F technika) és további, megbízható validálási módszerek (SurfaceGenie *in silico* surfaceome szűrés, transzmissziós elektronmikroszkópia, fagyasztva-törés technika) elengedhetetlenek a translációs relevancia megerősítéséhez. Ezen felül a vizsgált sejtfelszíni fehérjék downstream jelátviteli hálózatainak részletes feltárásához szükséges lesz a stabil génmódosító módszerek (siRNS géncsendesítés, CRISPR-Cas9) alkalmazása. A chondrogenikus, egészséges és OA chondrocyták minél teljesebb körű surfaceome-profilozása alternatív utakat nyithat az ízületi porcot érintő megbetegedések diagnosztikájában, prognosztikájában, terápiájában, vagy egy minden szempontból optimális biomarker esetén ezek kombinációjában: teragnosztikájában.

## 6.2. A clusterin feltételezett szerepe az osteoarthritis pathomechanizmusában

A CLU egy multifunkcionális, mégis enigmatikus, holdáz típusú chaperon fehérje. A CLU számos funkcióval rendelkezik, mivel a proteostasis fenntartásában betöltött EC chaperon szerepén túl más folyamatokban is részt vesz, többek között a sejttúlélésben, a

komplementrendszer gátlásában és a sejtdifferenciáció szabályozásában is [353]. Ezen felül a CLU azért számít enigmatikus molekulának, mert citoplazmatikus formájának funkcióit még most sem értjük teljes egészében. Jelen disszertációban egy *in silico* megközelítést alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy mely interakciós partnerek és hálózatok társulnak a CLU-hez az OA betegségben, amelyek később hozzájárulhatnak új prognosztikus vagy diagnosztikus biomarker-panelek kialakításához.

#### 6.2.1. A CLU interakciós partnerei a STRING-Cytoscape által létrehozott hálózatban

A STRING adatbázisban (0,4 konfidencia cut-off érték mellett) 25 általános interakciós partnerét azonosítottuk a CLU-nek, melyek között összesen 53 kapcsolatot talált az elemzés. A hálózat elsődleges elemeinek funkciói és sejt folyamatokban betöltött szerepük alapján különféle csoportokba tudtuk őket besorolni: hősokkfehérjék és IC chaperonok (HSPA5, HSP90B1), aggregálódó fehérjék (APP, LRP2, SNCA, TTR, LYZ, LALBA, PDIA3, HYOU1), anti-apoptotikus fehérjék (BAX, BCL-XL), réz anyagcserében résztvevő fehérjék (ATP7B, COMMD1), complement rendszer komponens (C9), DNS-repair mechanizmus (XRCC6), szelén metabolizmusban résztvevő fehérje (MSRB1), valamint a semaphorin jelátvitel komponense (PLXNA4). A következőkben ezen csoportok és a bennük lévő CLU-partnerek porcsejtek, chondrogenesis és OA-ban betöltött lehetséges szerepét ismertetem röviden.

Chondrocyták ER-ben bekövetkező hibás feltekeredés esetén az ECM fehérjéi aggregálódnak, ami ER-stresszhez vezet, és aktiválódik a hibásan hajtogatott fehérjékre adott válasz folyamat, az úgynevezett „unfolded protein response” (UPR). A tartós ER-stressz az OA egyik kóros mechanizmusa [444]. Az interakciós partnerek közül a HSPA5 (hősokk fehérje család A [Hsp70] 5. tagja, más néven GRP78, vagy BiP) rendelkezett a legtöbb kapcsolattal a hálózatban, amely részt vesz a chondrogenesis során kialakuló ER stressz molekuláris mechanizmusában [445]. A HSP90B1 (másnéven Grp94) szintén nagyon magas kapcsolatszámú, és szerepet játszik a túlzott mechanikai terhelés és a hypoxia által kiváltott ER-stressz folyamatában porcsejtekben [446].

Az APP (amyloid- $\beta$  A4 protein) a CLU kapcsolati hálónak az egyik, már korábban is meghatározott fontos entitása [447]. A CLU–amyloid- $\beta$  komplex interakcióba lép az LRP2-vel (alacsony denzitású lipoprotein receptor-rokon protein 2; másnéven megalin, amely ismert CLU receptor), ami lehetőséget kínál a kóros fehérje aggregátumok eltakarítására [448]. Anti-LRP2 autoantitesteket mutattak ki rheumatoid arthritis (RA) betegek 87%-ának, valamint OA

betegek 15%-ának szérumban, mely felhívja a figyelmet a fehérje lehetséges szerepére az ízületeket érintő gyulladásos folyamatokban [449]. A CLU extracelluláris SNCA ( $\alpha$ -synuclein) fibrillumokkal is kölcsönhatásban áll, és korlátozza azok astrocyták általi felvételét [450], de eddig porcsejtekben nem mutatták ki jelentőségét. Ismert továbbá, hogy a CLU kapcsolatban áll az aggregálódott TTR (transthyretin) fehérjével is [451]. A TTR lerakódása az ízületi porcszövetben fokozott betegségfolyással jár OA egérmódelben [452]. Emellett a CLU és a TTR szintje egyaránt magasabb volt a synovialis folyadékban térdízületi OA esetén, ami arra utal, hogy kapcsolat állhat fenn közöttük az OA pathogenesis során [453]. A CLU kölcsönhatásba lép a LYZ (lysozyme) aggregálódó variánsaival [454]. A LYZ-ről régóta ismert, hogy jelen van a porcmatrixban [455], és annak lebomlása megnövekedett LYZ szintekhez vezet a szérumban és synovialis folyadékban OA betegekben [456]. A CLU részt vesz az extracellulárisan jelenlévő LALBA ( $\alpha$ -lactalbumin) fehérje hajtogatási/kihajtogatási folyamataiban is [457]. A PDIA3 (protein-diszulfid izomeráz A család 3-as tagja, másnéven ERp57) egy oxidoreduktáz enzim, amely a natív diszulfidhidak kialakításában játszik szerepet, és elengedhetetlen a CLU hatékony oxidatív hajtogatásához [458]. A HYOU1 (hypoxia upregulált 1) – amely a sejtes stressz hatására bekövetkező hibás fehérje feltekeredés egyik markere – részt vesz a chondrocyták IL-1 $\alpha$ -ra adott válaszában [459].

A CLU jól ismert anti-apoptotikus szereppel rendelkezik, részben azért, mert csökkenti a pro-apoptotikus BAX (BCL2-höz kapcsolt X apoptózis regulátor) aktivitását [325,460]. Ugyanakkor a BAX chondrocyta apoptózisban betöltött szabályozási mechanizmusai OA-ban nagyrészt ismeretlenek [461], és a CLU részvételét sem igazolták ebben az útvonalban OA-chondrocyták esetében. Ezzel szemben egy szöveg-bányászaton alapuló megközelítés nemrégiben az anti-apoptotikus BCL2L1-et (BCL-XL) azonosította olyan génként, amely potenciális gyógyszercélpontként hasznosítható OA-ban [462].

Az ATP7B (ATP-függő réztranszportáló  $\beta$ ) az IC réz-homeostasis egyik fontos szabályozója [463]. A COMMD1 (réz metabolizmus Murr 1 domén 1) a legtöbb szövetben expresszálódik, és szerepet játszik a fehérjék lebontásának és stabilitásának szabályozásában [464]. A CLU és a COMMD1 egymástól függetlenül lép kölcsönhatásba az ATP7B-vel. A réztranszporterek chondrocytákban betöltött funkciójáról kevés ismeret áll rendelkezésre [465], ugyanakkor a genetikai hajlam a fiziológiásan magasabb véráramban lévő réz- és cinkszintekre növelheti az OA kockázatát [466]. Szignifikánsan magasabb rézkoncentrációt mutattak ki OA-ban szenvedő betegek synovialis folyadékában, az egészséges egyénekhez képest [467]. Ezért a

részintek és a réztranszporter státusz CLU-nel kombinált vizsgálata további kutatást igényel az OA vonatkozásában.

A komplementrendszer C9 fehérjét leírták az epiphysis növekedési porc hypertrophiás zónájában [468]. Úgy tűnik, hogy a C9 elsősorban SC5b–9 komplexek formájában van jelen OA betegek synovialis membrán mintáiban [469]. Akut arthritis esetén, például OA fellángolásakor, jelentős C9-depozitumokat mutattak ki a synoviumban; ezzel szemben krónikus, degeneratív betegségekhez társuló állapotokban, így krónikus OA-ban sem találtak C9-lerakódásokat [470].

A CLU a DNS-javításban is szerepet kap. Tekintettel a DNS-törések gyakran fatális következményeire, több felismerő és javító útvonal is létezik ezeknek a károsodásoknak a helyreállítására. Az egyik ilyen mechanizmus a DNS-függő protein kináz (DNS-PK) heterotrimer komplexhez köthető, amely egy katalitikus alegységből, a Ku70 (a mi listánkban XRCC6-ként szerepel) és Ku80 fehérjékből áll [471]. A CLU-t a Ku70-interakciós partnereként azonosították, és feltehetően összetett jelátviteli folyamatokat indít el, amelyek végül sejthalálhoz vezethetnek [471]. Ugyanakkor jelenleg nem áll rendelkezésre kísérletes bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a CLU milyen szerepet tölthet be a Ku70-hez kapcsolódó DNS-javító útvonalak közvetítésében OA-ban.

Az MSRB1 (methionin szulfoxid reductáz B1, más néven szelenoprotein R, SelR) fontos szerepet játszik a sejten belüli redox-egyensúly fenntartásában. Mivel a szelén esszenciális nyomelem, a szelénanyagcserét közvetítő szelenoproteinek alapvető celluláris folyamatokban vesznek részt, köztük a redox-homeostasis fenntartásában [472]. A SelR kölcsönhatásba lép a CLU-nel [473]. A megfelelő szelénszint elengedhetetlen a porc szövet fejlődésének és homeostasisának fenntartásához [472], és kísérletes bizonyítékok támasztják alá, hogy szelenoproteinek *in vitro* is expresszálódnak chondrocyta sejtvonalakban [474]. Ezenfelül egy, a táplálkozási szelénbevitelre irányuló keresztmetszeti vizsgálat arra utalt, hogy a nagy mennyiségű szelénfogyasztás összefügghet az OA fokozott kockázatával [475]. Ugyanakkor a SelR-t eddig még nem vizsgálták közvetlenül az OA kialakulásának összefüggésében.

A plexinek a receptorfehérjék egyik családjához tartoznak, melyek ligandjai a semaphorinok [476]. A PLXNA4 (Plexin A4) a központi idegrendszerben a CLU receptoraként működik, és az Alzheimer-kór egyik újonnan felmerülő terápiás célpontja [335]. Noha a chondrocytákban található plexinek feltérképezése eddig csak részben történt meg, a PLXNA4 egyik ligandját, a semaphorin-3A-t (Sema3A) összefüggésbe hozták az OA-ban megfigyelhető chondrocyta-fiziológiával, mivel az interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) és a TNF- $\alpha$  által stimulált túlzott

Sema3A-jelátvitel apoptózist indukál [477]. A Sema4D-ről nem rég kimutatták, hogy szerepet játszik a lipopoliszacharid által kiváltott chondrocyta apoptózisban [478]. Ezért a semaphorin-jelátvitel zavarainak feltárása a plexinek és a CLU kontextusában új irányt biztosít az OA markerek azonosításához.

Az előzőek alapján összefoglalásképpen elmondható, hogy az alábbi interakciós partnerek további kísérletes megerősítést igényelnek az OA szempontjából. A CLU ismert kötődő partnere a Ku70, a DNS-PK komplex egyik alkotóeleme, amely sejthalált kiváltó folyamatokban vesz részt [314]. A CLU Ku70-mediált javító mechanizmusokban betöltött szerepét OA-ban azonban eddig nem vizsgálták. A selenoprotein R (SelR) az IC redox homeostasis fenntartója, és kölcsönhatásban áll a CLU-nel. A SelR és a CLU együttes túlzott expressziója szignifikánsan csökkentette az IC ROS-szintet. Bár a selenoproteinek kimutathatóak chondrocyta sejtvonalakban, magának a SelR-nek az OA kontextusában betöltött szerepe máig ismeretlen. További ígéretes molekulák a semaphorinok, amelyek sokrétű funkcióik révén részt vesznek például axonvezetési folyamatokban és a csontfejlődésben. A Sema3A-jelátvitel IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  hatására apoptózist indukál, míg a Sema4D-ről nemrég kimutatták, hogy közreműködik a chondrocyta-apoptózisban. A kóros semaphorin-jelátvitel tisztázása a CLU kontextusában új terápiás célpontok azonosításához vezethet OA-ban. Fontos továbbá megemlíteni, hogy a CLU–amyloid- $\beta$  komplex kölcsönhatásba lép az LRP2-vel, ami a kórosan felhalmozódott amyloid fehérjeaggregátumok eltávolításának egyik mechanizmusa [448]. Ennek a folyamatnak a szerepét azonban még szintén nem vizsgálták az ízületi porcszövet, valamint az OA kontextusában.

### *6.2.2. A CLU által szabályozott molekulák az IPA tudásbázisból létrehozott hálózatban*

Az IPA tudásbázist felhasználva megvizsgáltuk, hogy a CLU milyen irányban befolyásolja (serkentés vagy gátlás) az interakciós partnereinek expresszióját az összes sejt- illetve szövettípus tekintetében, hogy minél globálisabb képet kapjunk a vizsgált fehérje regulatórikus képességeiről. A STRING hálózat elemzéséhez hasonlóan az IPA által megtalált interakciós partnerek funkciói alapján is kisebb csoportokat tudunk képezni: ECM szerveződés (MMP2, MMP9, CDH1), gyulladásos folyamatok (TNF, IL-6, CXCL8, NFKBIA, NFKBIB, prostaglandin E2), sejtciklus és sejttúlélés szabályozás (CDKN1A, BAX, BCL2, BCL2L1, AKT1, TP53), réz metabolizmus (ATP7A, ATP7B), koleszterin bioszintézis (SREBF1), TGF-

$\beta$  jelátvitel (SMAD2, SMAD3), fehérje misfolding (APP, HSPA5), valamint sejtmagi hisztonok (hiszton H3).

A CLU fokozza az MMP-9 termelődését makrofágokban [479], ezen felül a fehérje kulcsszerepet játszik az OA pathofiziológiájában is [480]. Tumorsejtekben a CLU hozzájárul egy további matrix metalloproteináz, az MMP-2 expressziójának fokozásához, valamint a CDH1 (E-kadherin) szintjének csökkentéséhez [481].

A CLU direkt módon befolyásolta a TNF (TNF- $\alpha$ ) által közvetített gyulladáshoz vezető választ humán synovialis fibroblast sejtekben, mely megerősíti szerepét az RA pathológiájában [482]. Humán fibroblast-szerű synoviocyták kultúrákban a CLU siRNS-sel történő downregulációja megnövelte a proinflammatorikus citokinek, az IL-6 és a CXCL8 (másnéven IL8) termelését, ami arra utal, hogy a CLU negatív regulátorként működik az NF- $\kappa$ B által szabályozott citokin expresszióban [483]. Neuroblastoma sejtekben a CLU az NF- $\kappa$ B jelátvitelt az előzőhöz képest másik útvonalon gátolta: az NFKBIA és NFKBIB fehérjék (inhibitor  $\kappa$ B-alpha és -beta) stabilizálása révén [317]. Emellett a CLU csökkenteni képes a prostaglandin E2 termelődését is [484], amely a gyulladás egyik fő mediátora RA és OA betegségekben [485].

A CLU túltermelése blokkolja a TNF- $\alpha$  által indukált CDKN1A (p21) expresszióját, valamint gátolja az apoptózist végző BAX fehérje aktivációját [486]. Ezen felül a CLU szerepet játszik a mitokondriális apoptózis útvonal további fehérjéinek (BCL2, BCL2L1, AKT1) aktiválásában is, valamint a Ciap (másnéven BIRC2/3) gátlásában [321]. A TP53 (p53 tumor szuppresszor fehérje) csökkenti a CLU expresszióját és jól ismert szerepet tölt be az OA pathogenesisében [487], mely összefüggés jelentőséggel bírhat a betegség során tapasztalható p53-mediált chondrocyta-sejthalál szempontjából.

A CLU és a COMMD1 interakciója révén csökken az ATP7A és ATP7B réztranszportáló ATPázok expressziója [463], mely kapcsolatot az előzőekben tárgyalt STRING adatbázis is azonosított, ezáltal a CLU nagy eséllyel részt vesz a réz-homeostasis szabályozásában is.

A CLU gátolja a máj koleszterin bioszintézisét a SREBF1 (SRBP1) expressziójának csökkentése révén [488]. A koleszterinszint kulcsszerepet játszik a vázrendszer fejlődésében is, amelynek megzavarása hozzájárul a porcbetegségek, köztük az OA kialakulásához [489]. Ebből az okból kifolyólag a CLU indirekt módon a koleszterin-homeostasis szabályozója lehet mind fiziológiás, mind pathológiás (pl.: OA) körülmények között [490].

A CLU regulatórikus funkcióját a TGF- $\beta$  jelátvitelben a közelmúltban ismerték fel, ami a SMAD2/3 fehérjék aktivitását befolyásolja [491]. A CLU túltermelése fokozta a SMAD2/3 szintjét, feltehetően a TGF- $\beta$ -indukálta transzkripciós aktivitás erősítése révén. Emellett szerepe van ezen fehérjék stabilizálásában és megfelelő feltekeredésükben egyaránt [491]. Ezek a szabályozó fehérjék elengedhetetlenek az egészséges ízületi porc kialakulásához és fenntartásához [492], ezen felül a SMAD3 gén mutációi összefüggésbe hozhatók az OA kialakulásával [493].

A neurodegeneratív betegségekben is jelenlévő APP (amyloid- $\beta$  A4) fehérje, amely a STRING hálózatban is megjelent, valamint a CLU között pozitív kapcsolat áll fenn az IPA elemzés alapján. A CLU képes volt astrocyta sejtekből felgyorsítani a  $\beta$ -amyloid depozíciók eltakarítását [494], mely lerakódások akkumulálódását a térdízületi OA következményeként írták le egér modellben [495]. Eredményeink szerint a CLU serkenti a HSPA5 hősokkfehérje expresszióját, a két protein közötti interakciót a STRING adatbázis is megerősítette, sőt, kiemelte centralis pozícióját a hálózatban, mivel a HSPA5 rendelkezett a legtöbb kapcsolattal a partnerek közül. A HSPA5 expressziója emelkedett előrehaladott OA esetén, ami arra utalhat, hogy a chondrocytákban ER stressz jelenik meg a betegség progressziója során [496].

A hiszton H3 esetében vannak bizonyítékok arra, hogy epigenetikai módosításai – például a H3K9 metilációja – szerepet játszhatnak az OA pathogenesisében [497].

Bár az IPA elemzés CLU interakciós partnerként azonosította a RAD17 és a koleszterol-észter molekulákat is, ezen fehérjék (jelenlegi ismereteink és az irodalom alapján) nem állnak közvetlen kapcsolatban.

### *6.2.3. A CLU molekuláris aktivitáson alapuló predikcióval létrehozott IPA hálózat az OA kontextusában*

A molekuláris aktivitáson alapuló predikciós IPA hálózatelemzés a CLU fehérje 5 kulcsfontosságú jelátviteli tengelyét azonosította az OA pathomechanismusában betöltött szerepük alapján:

**1. Az IL-6 fokozza a CLU expresszióját.** Számos modellben kimutatták, hogy a CLU expresszióját a proinflammatorikus IL-6 citokin szabályozza [498-500]. A két fehérje közötti kapcsolatot humán fibroblast-szerű synoviocyta (FLS) kultúráiban is dokumentálták [483]. A CLU siRNS-alapú csendesítése FLS sejtekben szignifikáns és reprodukálható mértékben

növelte az IL-6 és IL-8 alapszintű termelődését, ami arra utal, hogy a CLU negatív regulátorként működik az NF- $\kappa$ B-függő citokin expresszió szabályozásában.

**2. A CLU elősegíti a TNF- $\alpha$  és egyéb citokinek expresszióját.** Az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor – amely EC ingerek, így például a TNF- $\alpha$  által is aktiválódik – kulcsszerepet játszik a stresszválaszokat irányító génexpressziós programok szabályozásában. Az IKK fehérjék az NF- $\kappa$ B aktivációjának felsőbb szintű (upstream) mediátorai [501]. Kimutatták, hogy a CLU azok közé a gének közé tartozik, amelyek expressziója TNF- $\alpha$  stimuláció utáni IKK-aktivációtól függ, ami arra utal, hogy ez az útvonal védelmet nyújthat immun-komplex mediált gyulladási reakciókkal szemben [502]. A TNF- $\alpha$  jelentős mértékben megváltoztatja a CLU bioszintézisét, és elősegíti a 50–53 kDa méretű, hasítatlan, nem glikozilált, diszulfid-kötésekkel összekapcsolt izoforma megjelenését, melyet nukleáris CLU-nek is hívunk, és a sejtmagban akkumulálódik [503]. Emellett a TNF- $\alpha$  fokozza a citoplazmatikus 36–38,5 kDa-s CLU izoforma szintjét is [504], mely egy atipikus IC forma, és valószínűleg az ER-stressz következtében a szekréciós rendszerből a citoszolba jutó, hibásan glikozilált CLU molekulának felel meg [353]. Ezek mellett az exogén CLU fokozta a TNF- $\alpha$  felszabadulását aktivált mikroglia sejtekben [505], mely eredmények felhívják a figyelmet a két fehérje bilaterális kapcsolatára. A BioPlex humán *interactome* hálózat szerint a CLU képes közvetlenül kötődni a TNF- $\alpha$ -hoz [506]. Mindemellett kimutatták, hogy a CLU fokozza több chemotaktikus citokin, például a monocyta chemotaktikus fehérje-1 (MCP-1), a makrofág gyulladási fehérje-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), a RANTES és maga a TNF- $\alpha$  expresszióját makrofágokban [479]. Ezzel szemben a CLU a TNF- $\alpha$  negatív szabályozója az OA chondrocytáiban, mivel a CLU-csendesített humán OA porcsejtekben emelkedett TNF- $\alpha$  szinteket mutattak ki [356]. A fentiek alapján a CLU citokin termelésre gyakorolt hatása függ a sejtípustól, a betegségállapottól, és az egyéb, közrejátszó IC jelátviteli útvonalak jelenlététől.

**3. A CLU modulálja az MMP enzimek aktivitását és expresszióját.** Mind RA-ban, mind OA-ban a gyulladási citokinek (pl. IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$ ) serkentik az ECM-t lebontó MMP enzimek termelődését [507]. Humán epithelialis sejtekben kimutatták, hogy a CLU közvetlenül kötődik az MMP-9-hez, amivel megakadályozta annak stressz indukálta aggregációját, és gátolta az enzim aktivitását [348]. Hasonló módon a CLU képes gátolni az MMP-2, MMP-3 és MMP-7 aktivitását is. Proinflammatorikus citokinekkal történő kezelés (mint IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$ ) csökkentette a CLU expresszióját [348]. Makrofágokban a CLU elősegíti az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációját az I $\kappa$ B- $\alpha$  lebomlásán és foszforilációján keresztül, ezáltal MMP-9 overexpressziót eredményezve. Fontos megjegyezni, hogy kizárólag a szekretált, glikozilált

izoforma (sCLU) volt képes az MMP-9 aktivációjára [508]; ellenben a glikoziláció nélküli, rekombináns CLU erre nem volt képes [479]. Emellett humán OA chondrocytáknban a CLU csendesítését követően megnövekedett MMP13-szinteket figyeltek meg [356]. Ezek az adatok azt is hangsúlyozzák, hogy az MMP-k CLU általi szabályozása – hasonlóan a citokin expresszió szabályozásához – sejttípus- és kontextusfüggő, és valószínűleg az egyidejűleg aktív jelátviteli útvonalak eredője határozza meg annak serkentő vagy gátló voltát.

**4. A CLU szükséges a CDKN2A (ciklin-dependens kináz inhibitor 2A, másnéven: p16) upregulálásához.** A FOXL2 transzkripció faktor serkenti a CLU expresszióját hypophysis tumorokban. A CLU viszont indukálja a CDKN2A-t, így gátolva a hypophysis sejtek proliferációját [509]. A FOXL2 számos fejlődési útvonal fő transzkripció faktora, beleértve a csont- és porcfejlődést is, és funkciói átfedést mutatnak a SOX9 által szabályozott génekkel [510]. Emellett a FOXL2 szabályozza az ECM összetevők expresszióját (pl. COL1A2, COL3A1, COL4A1, fibronectin, laminin) a petefészekben is [511]. Az időskori cellularis senescenciát elősegítő CDKN2A, amely synovialis szövetekben expresszálódik, OA biomarkerként is ismert; szomatikus deléciónja részleges védelmet nyújt a porcdegenerációval szemben [512]. Ezáltal a CLU gátlása a CDKN2A expressziójának csökkenése révén elméletben chondroprotektív hatással rendelkezhet, mely összefüggést kísérletesen még nem bizonyítottak.

**5. A CLU fokozza a SMAD2 és SMAD3 expresszióját.** A CLU a TGF $\beta$  II-es típusú receptorral való kölcsönhatása során szabályozza a porcfejlődés kulcsfontosságú modulátorainak számító SMAD2 és SMAD3 fehérjéket, ezen túlmenően a CLU képes stabilizálni a két fehérjét, feltehetően a proteasomális lebontásuk gátlásán keresztül [491].

Az általunk vizsgált 5 fő jelátviteli tengely alapján a CLU központi mediátorként működik az IL-6 és a TNF- $\alpha$  révén az OA-ban jelenlévő gyulladásos folyamatokban. Emellett részt vesz az ECM komponenseinek mennyiségi és minőségi szabályozásában, vagyis a porcmatrix dinamikus átépülésében a matrix metalloproteinázok (feltehetőleg MMP2, -3, -7, -9, és -13) segítségével. A FOXL2-CLU-CDKN2A, valamint a TGF- $\beta$ -CLU-SMAD2/3 jelátviteli útvonalak pedig a porcfejlődés és porc regeneráció regulációjában potenciális szereppel rendelkezhetnek. Az említett interakciók további, részletes feltérképezése új irányokat nyithat az OA pathomechanismusának megismerésében és porcszövet tervezési (tissue engineering) stratégiák finomhangolásában.

#### 6.2.4. A CLU OA diagnosztikában, prognosztikában és terápiában történő felhasználásának limitációi és jövőbeli lehetőségei

A disszertációban tárgyalt interakciók egy részét különböző *in vitro* modellekben vagy *in vivo* kísérletekben azonosították, és még nem (vagy nem teljeskörűen) vizsgálták az OA kontextusában. Ugyanakkor, mivel a CLU komplex biológiai szerepe mellett ezen interakciók partnerek is feltételezhetően fontos komponensek az OA pathogenesisében és/vagy pathomechanismusában, valószínűsíthető, hogy ezek a kölcsönhatások az arthritises ízületekben is jelen vannak.

Szükséges kihangsúlyozni, hogy az előző évtizedek biomarkerekről kialakított képét a tudománynak át kell formálnia, mivel valószínűtlen, hogy egyetlen biomarker kellő érzékenységet és specificitást biztosítson minden igény – így a betegség korai felismerése, a progresszió előrejelzése és a terápiás válasz monitorozása mint hatékony beavatkozási marker – maradéktalan kielégítésére. Nagy valószínűséggel több, különböző, akár azonos hálózatban szereplő marker kombinációját szükséges alkalmazni a betegellátás optimalizálásának érdekében. Ez feltehetően a CLU esetében is így lesz; önmagában egyetlen biomarkerként valószínűleg nem lesz elegendő az OA-ban szenvedő betegek diagnózisának vagy prognózisának megbízható támogatására. Mára egyértelművé vált, hogy különböző patológiás állapotokban a testnedvek CLU szintje megváltozik, ezért a jövőbeni biomarker-vizsgálatokban kapott eredményeket – különösen akkor, ha a CLU mennyiségét szérumban vagy vizeletben mérik – nem szabad kizárólag az OA-pathogenesis kontextusában értelmezni. Ellenben a synovialis folyadék valószínűleg alkalmasabb CLU forrás lehet az ízületi betegségeket érintő diagnosztikus vizsgálatokban.

Bár egyre több adat utal arra, hogy a CLU ígéretes biomarker lehet OA esetén [513], sokrétű biológiai funkcióit a jövőbeni transzlációs és klinikai ortopédiai kutatásokban fokozott óvatossággal kell értékelni, különösen mivel e fehérje más komorbid állapotokban is meghatározó szerepet játszhat. Az egyik ilyen komorbiditás az obesitas. A plazma CLU koncentrációja szorosan kapcsolódik különböző metabolikus zavarokhoz, így az elhízáshoz is, mivel magas zsírtartalmú, illetve magas cukortartalmú (nyugati típusú) diéta által kiváltott obesitas esetén egerekben megemelkedett szérum CLU szint figyelhető meg [514]. A kóros anyagcsere számos OA-fenotípussal hozható összefüggésbe, és az obesitas az OA egyik legjelentősebb kockázati tényezője [515]. A CLU-t egyre gyakrabban alkalmazzák az obesitashoz társuló Alzheimer-kór (AD) biomarkereként is [516], továbbá a liquorban mért eltérő CLU szintek az AD-pathológia különböző stádiumaival társulnak [517]. Noha az adipocytá-eredetű

adipokinek – köztük a CLU is – közvetlen szerepet játszhatnak az OA patológiájában, további vizsgálatok szükségesek annak meghatározásához, hogy a fehérje alkalmas biomarker-e legalább bizonyos OA-fenotípusok vagy molekuláris endotípusok definiálásában, illetve, hogy valóban összekötő kapocs lehet-e az elhízás, a metabolikus betegségek és az OA között.

A jövőben további kutatások szükségesek a CLU, mint szolubilis biomarker vizsgálatához annak megállapítása érdekében, hogy szolgáltat-e új ismereteket az OA-patogenesis előrehaladásáról. Továbbá alkalmazható-e molekuláris endotípusok meghatározására más biomarker-jelöltekkel együtt, ideértve a jelen munkában azonosított és tárgyalt fehérjehálózat elemeit, mint például a selenoprotein R, a semaphorinok és a HSPA5. Mindezeket figyelembe véve a CLU értékes eszköz lehet az OA pathogenesisének, progressziójának és esetleg a terápiákra adott válaszok értékelésében.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben részletezett kísérletek egyik célja az volt, hogy feltérképezzem a porcsejtek felszínén található fehérjék (*surfaceome*) dinamikusan változó minőségi és mennyiségi összetételét az *in vitro* chondrogenesis során. A másik cél pedig az volt, hogy megvizsgáljuk a CLU fehérje és annak interakciós partnereiből képzett hálózatot, hogy ezek a kölcsönhatások miként befolyásolják az ízületi betegségek pathomechanizmusát. A disszertációban bemutatott legfontosabb új eredményeket az alábbiakban foglalom össze:

### **A chondrogenikus surfaceome izolálással kapcsolatos új megállapítások:**

- Az általunk alkalmazott AOB alapú sejtfelszíni fehérje-dúsítási módszer alkalmazása lehetővé tette 205-238, alacsony mértékben kifejeződő fehérje azonosítását, amelyek teljes sejtlizátumból végzett proteomikai analízissel nem lettek volna detektálhatók.
- Az időben konstans csökkenő expressziót mutató surfaceome fehérjék közül az ephrin receptorcsalád több tagját is sikerült kimutatnunk (EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA7, EPHB1, EPHB2, EPHB3), ami arra utal, hogy az ephrin jelátvitel nemcsak a korai embryonális fejlődésben, hanem a porcfejlődés során is jelentős szabályozó szerepet tölthet be.
- A CNTFR és PODXL fehérjék csökkenő expresszióját és plazmamembrán közeli lokalizációját sikerült igazolni, mely proteineket eddig nem hoztak összefüggésbe a porcfejlődéssel. E két fehérje potenciális porcössejt markerként hasznosíthatóak lehetnek a porcszövet-tervezést alkalmazó terápiás stratégiák fejlesztésében.

### **A clusterin fehérjével kapcsolatos új megállapítások:**

- A STRING adatbázis elemzése alapján új összefüggések derültek ki a CLU szelén metabolizmusban betöltött szerepe, valamint a CLU-plexin-semaphorin jelátviteli tengely kapcsán, melyek új kutatási irányt kínálnak az OA pathomechanizmusának mélyebb megértéséhez.
- A molekuláris aktivitáson alapuló IPA hálózatelemzés 5 olyan, CLU által szabályozott útvonalat azonosított, melyeket már korábban is összefüggésbe hoztak az OA progressziójával. Ez a felismerés még tovább erősíti a CLU biomarkerként történő felhasználását az ízületi porcot érintő gyulladással járó kórállapotokban.

## 8. SUMMARY

One of the main objectives of my doctoral dissertation was to map the dynamically changing qualitative and quantitative composition of cell surface proteins (the *surfaceome*) of chondrocytes during *in vitro* chondrogenesis. A further aim was to investigate the network formed by the CLU protein and its interacting partners, in order to understand how these molecular pathways influence the pathomechanism of joint diseases. The most important novel findings presented in the dissertation are summarized below:

### Novel findings related to the characterization of the chondrogenic surfaceome:

- Application of the AOB-based cell surface protein enrichment method enabled the identification of 205–238 low-abundance proteins that would not have been detectable by proteomic analysis of total cell lysates.
- Among the surface proteins displaying a consistently decreasing expression pattern over time, several members of the ephrin receptor family were identified (EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA7, EPHB1, EPHB2, EPHB3), suggesting that ephrin signaling may play an important regulatory role not only during early embryonic development but also throughout cartilage development.
- Decreasing expression pattern and proximal plasma membrane localization of CNTFR and PODXL proteins were confirmed. These proteins have not previously been associated with cartilage development and may serve as potential chondroprogenitor cell markers with relevance for the development of cartilage tissue engineering-based therapeutic strategies.

### Novel findings related to the clusterin protein:

- Analysis using the STRING database revealed novel associations involving CLU-related selenium metabolism and the CLU-plexin-semaphorin signaling axis, offering new research directions for a deeper understanding of the pathomechanism of OA.
- Molecular activity-based IPA network analysis identified five CLU-regulated pathways that have previously been associated with OA progression. This observation further supports the potential utility of CLU as a biomarker in inflammatory conditions affecting articular cartilage.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Attur, M.G.; Dave, M.; Akamatsu, M.; Katoh, M.; Amin, A.R. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage* **2002**, *10*, 1-4, doi:10.1053/joca.2001.0488.
2. Collaborators, G.B.D.O. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol* **2023**, *5*, e508-e522, doi:10.1016/S2665-9913(23)00163-7.
3. Murphy, L.; Schwartz, T.A.; Helmick, C.G.; Renner, J.B.; Tudor, G.; Koch, G.; Dragomir, A.; Kalsbeek, W.D.; Luta, G.; Jordan, J.M. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **2008**, *59*, 1207-1213, doi:10.1002/art.24021.
4. Központi Statisztikai Hivatal, Európai lakossági egészségfelmérés – Egészségi állapot, 2019. [https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/idoszaki/elef/egeszsegi\\_allapot\\_2019/index.html](https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/idoszaki/elef/egeszsegi_allapot_2019/index.html). (2025. 02. 16.)
5. Kraus, V.B.; Blanco, F.J.; Englund, M.; Karsdal, M.A.; Lohmander, L.S. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**, *23*, 1233-1241, doi:10.1016/j.joca.2015.03.036.
6. Park, D.; Park, Y.M.; Ko, S.H.; Hyun, K.S.; Choi, Y.H.; Min, D.U.; Han, K.; Koh, H.S. Association of general and central obesity, and their changes with risk of knee osteoarthritis: a nationwide population-based cohort study. *Sci Rep* **2023**, *13*, 3796, doi:10.1038/s41598-023-30727-4.
7. Salis, Z.; Gallego, B.; Nguyen, T.V.; Sainsbury, A. Association of Decrease in Body Mass Index With Reduced Incidence and Progression of the Structural Defects of Knee Osteoarthritis: A Prospective Multi-Cohort Study. *Arthritis Rheumatol* **2023**, *75*, 533-543, doi:10.1002/art.42307.
8. Szilagyi, I.A.; Waarsing, J.H.; Schiphof, D.; van Meurs, J.B.J.; Bierma-Zeinstra, S.M.A. Towards sex-specific osteoarthritis risk models: evaluation of risk factors for knee osteoarthritis in males and females. *Rheumatology (Oxford)* **2022**, *61*, 648-657, doi:10.1093/rheumatology/keab378.
9. Wang, X.; Perry, T.A.; Arden, N.; Chen, L.; Parsons, C.M.; Cooper, C.; Gates, L.; Hunter, D.J. Occupational Risk in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **2020**, *72*, 1213-1223, doi:10.1002/acr.24333.
10. Hunter, D.J.; Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *Lancet* **2019**, *393*, 1745-1759, doi:10.1016/S0140-6736(19)30417-9.
11. Bannuru, R.R.; Osani, M.C.; Vaysbrot, E.E.; Arden, N.K.; Bennell, K.; Bierma-Zeinstra, S.M.A.; Kraus, V.B.; Lohmander, L.S.; Abbott, J.H.; Bhandari, M.; et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2019**, *27*, 1578-1589, doi:10.1016/j.joca.2019.06.011.
12. Valisena, S.; Azogui, B.; Nizard, R.S.; Tscholl, P.M.; Cavaignac, E.; Bouche, P.A.; Hannouche, D. Microfractures, autologous matrix-induced chondrogenesis, osteochondral autograft transplantation and autologous chondrocyte implantation for knee chondral defects: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *EFORT Open Rev* **2024**, *9*, 785-795, doi:10.1530/EOR-23-0089.
13. Case, R.; Thomas, E.; Clarke, E.; Peat, G. Prodromal symptoms in knee osteoarthritis: a nested case-control study using data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**, *23*, 1083-1089, doi:10.1016/j.joca.2014.12.026.
14. Sakellariou, G.; Conaghan, P.G.; Zhang, W.; Bijlsma, J.W.J.; Boyesen, P.; D'Agostino, M.A.; Doherty, M.; Fodor, D.; Kloppenburg, M.; Miese, F.; et al. EULAR recommendations for the use of imaging in the clinical management of peripheral joint osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **2017**, *76*, 1484-1494, doi:10.1136/annrheumdis-2016-210815.
15. Takacs, R.; Vago, J.; Poliska, S.; Pushparaj, P.N.; Ducza, L.; Kovacs, P.; Jin, E.J.; Barrett-Jolley, R.; Zakany, R.; Matta, C. The temporal transcriptomic signature of cartilage formation. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51*, 3590-3617, doi:10.1093/nar/gkad210.
16. Vago, J.; Katona, E.; Takacs, R.; Docs, K.; Hajdu, T.; Kovacs, P.; Zakany, R.; van der Veen, D.R.; Matta, C. Cyclic uniaxial mechanical load enhances chondrogenesis through entraining the molecular circadian clock. *J Pineal Res* **2022**, *73*, e12827, doi:10.1111/jpi.12827.
17. Ross, M.H.; Kaye I.G.; Pawlina, W. Szövettan – Kézikönyv és atlasz. Medicina Könyvkiadó, **2007**. ISBN:9789632260525
18. Berendsen, A.D.; Olsen, B.R. Bone development. *Bone* **2015**, *80*, 14-18, doi:10.1016/j.bone.2015.04.035.

19. Koelling, S.; Kruegel, J.; Irmer, M.; Path, J.R.; Sadowski, B.; Miro, X.; Miosge, N. Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 324-335, doi:10.1016/j.stem.2009.01.015.
20. Mow, V.C.; Huiskes, R. *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*. Lippincott Williams & Wilkins, **2005**. ISBN:0-7817-3933-0
21. Nakayama, N.; Pothiawala, A.; Lee, J.Y.; Matthias, N.; Umeda, K.; Ang, B.K.; Huard, J.; Huang, Y.; Sun, D. Human pluripotent stem cell-derived chondroprogenitors for cartilage tissue engineering. *Cell Mol Life Sci* **2020**, *77*, 2543-2563, doi:10.1007/s00018-019-03445-2.
22. Silver, I.A. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **1975**, *271*, 261-272, doi:10.1098/rstb.1975.0050.
23. Zhou, S.; Cui, Z.; Urban, J.P. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum* **2004**, *50*, 3915-3924, doi:10.1002/art.20675.
24. Blanco, F.J.; Rego, I.; Ruiz-Romero, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2011**, *7*, 161-169, doi:10.1038/nrrheum.2010.213.
25. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809.
26. Salinas, D.; Minor, C.A.; Carlson, R.P.; McCutchen, C.N.; Mumey, B.M.; June, R.K. Combining Targeted Metabolomic Data with a Model of Glucose Metabolism: Toward Progress in Chondrocyte Mechanotransduction. *PLoS One* **2017**, *12*, e0168326, doi:10.1371/journal.pone.0168326.
27. Bhosale, A.M.; Richardson, J.B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* **2008**, *87*, 77-95, doi:10.1093/bmb/ldn025.
28. Xu, W.; Zhu, J.; Hu, J.; Xiao, L. Engineering the biomechanical microenvironment of chondrocytes towards articular cartilage tissue engineering. *Life Sci* **2022**, *309*, 121043, doi:10.1016/j.lfs.2022.121043.
29. Korpershoek, J.V.; Rijkers, M.; Vonk, L.A. Isolation of Chondrons from Hyaline Cartilage. *Methods Mol Biol* **2023**, *2598*, 21-27, doi:10.1007/978-1-0716-2839-3\_3.
30. Gvaramia, D.; Kern, J.; Jakob, Y.; Zenobi-Wong, M.; Rotter, N. Regenerative Potential of Perichondrium: A Tissue Engineering Perspective. *Tissue Eng Part B Rev* **2022**, *28*, 531-541, doi:10.1089/ten.TEB.2021.0054.
31. Bacenkova, D.; Trebunova, M.; Demeterova, J.; Zivcak, J. Human Chondrocytes, Metabolism of Articular Cartilage, and Strategies for Application to Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms242317096.
32. Sophia Fox, A.J.; Bedi, A.; Rodeo, S.A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* **2009**, *1*, 461-468, doi:10.1177/1941738109350438.
33. Grynblas, M.D.; Eyre, D.R.; Kirschner, D.A. Collagen type II differs from type I in native molecular packing. *Biochim Biophys Acta* **1980**, *626*, 346-355, doi:10.1016/0005-2795(80)90129-4.
34. Zhang, L.; Hu, J.; Athanasiou, K.A. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng* **2009**, *37*, 1-57, doi:10.1615/critrevbiomedeng.v37.i1-2.10.
35. Eyre, D.R.; Weis, M.A.; Wu, J.J. Advances in collagen cross-link analysis. *Methods* **2008**, *45*, 65-74, doi:10.1016/j.ymeth.2008.01.002.
36. Kvist, A.J.; Nystrom, A.; Hulthenby, K.; Sasaki, T.; Talts, J.F.; Aspberg, A. The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent? *Matrix Biol* **2008**, *27*, 22-33, doi:10.1016/j.matbio.2007.07.007.
37. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **2002**, *4*, 30-35, doi:10.1186/ar380.
38. Zelenski, N.A.; Leddy, H.A.; Sanchez-Adams, J.; Zhang, J.; Bonaldo, P.; Liedtke, W.; Guilak, F. Type VI Collagen Regulates Pericellular Matrix Properties, Chondrocyte Swelling, and Mechanotransduction in Mouse Articular Cartilage. *Arthritis Rheumatol* **2015**, *67*, 1286-1294, doi:10.1002/art.39034.
39. Schmid, T.M.; Linsenmayer, T.F. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* **1985**, *100*, 598-605, doi:10.1083/jcb.100.2.598.
40. Shen, G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* **2005**, *8*, 11-17, doi:10.1111/j.1601-6343.2004.00308.x.
41. Sund, M.; Vaisanen, T.; Kaukinen, S.; Ilves, M.; Tu, H.; Autio-Harmanen, H.; Rauvala, H.; Pihlajaniemi, T. Distinct expression of type XIII collagen in neuronal structures and other tissues during mouse development. *Matrix Biol* **2001**, *20*, 215-231, doi:10.1016/s0945-053x(01)00134-2.
42. Koch, M.; Schulze, J.; Hansen, U.; Ashwodt, T.; Keene, D.R.; Brunken, W.J.; Burgeson, R.E.; Bruckner, P.; Bruckner-Tuderman, L. A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 22514-22521, doi:10.1074/jbc.M400536200.

43. Hjorten, R.; Hansen, U.; Underwood, R.A.; Telfer, H.E.; Fernandes, R.J.; Krakow, D.; Sebald, E.; Wachsmann-Hogiu, S.; Bruckner, P.; Jacquet, R.; et al. Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone* **2007**, *41*, 535-542, doi:10.1016/j.bone.2007.06.024.
44. Plumb, D.A.; Ferrara, L.; Torbica, T.; Knowles, L.; Mironov, A., Jr.; Kadler, K.E.; Briggs, M.D.; Boot-Handford, R.P. Collagen XXVII organises the pericellular matrix in the growth plate. *PLoS One* **2011**, *6*, e29422, doi:10.1371/journal.pone.0029422.
45. Dudhia, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci* **2005**, *62*, 2241-2256, doi:10.1007/s00018-005-5217-x.
46. Roughley, P.J.; Lee, E.R. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* **1994**, *28*, 385-397, doi:10.1002/jemt.1070280505.
47. Kheir, E.; Shaw, D. Hyaline cular cartilage. *Orthop Trauma*. **2009**, *23*(6):450–455, doi: 10.1016/j.mporth.2009.01.003
48. Hayes, A.J.; Melrose, J. Glycosaminoglycan and Proteoglycan Biotherapeutics in Articular Cartilage Protection and Repair Strategies: Novel Approaches to Visco-supplementation in Orthobiologics. *Adv Therap*. **2019**, *2*: 1900034, doi:10.1002/adtp.201900034
49. Pomin, V.H. Keratan sulfate: an up-to-date review. *Int J Biol Macromol* **2015**, *72*, 282-289, doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029.
50. Krishnan, Y.; Grodzinsky, A.J. Cartilage diseases. *Matrix Biol* **2018**, *71-72*, 51-69, doi:10.1016/j.matbio.2018.05.005.
51. Yuzhalin, A.E.; Lim, S.Y.; Kutikhin, A.G.; Gordon-Weeks, A.N. Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **2018**, *1870*, 207-228, doi:10.1016/j.bbcan.2018.09.002.
52. Piperigkou, Z.; Manou, D.; Karamanou, K.; Theocharis, A.D. Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer. *Methods Mol Biol* **2018**, *1731*, 325-348, doi:10.1007/978-1-4939-7595-2\_27.
53. Yang, C.Y.; Chanalaris, A.; Troeberg, L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'. *Osteoarthritis Cartilage* **2017**, *25*, 1000-1009, doi:10.1016/j.joca.2017.02.791.
54. Vizovisek, M.; Fonovic, M.; Turk, B. Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond. *Matrix Biol* **2019**, *75-76*, 141-159, doi:10.1016/j.matbio.2018.01.024.
55. Karamanos, N.K.; Piperigkou, Z.; Theocharis, A.D.; Watanabe, H.; Franchi, M.; Baud, S.; Brezillon, S.; Gotte, M.; Passi, A.; Vigetti, D.; et al. Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chem Rev* **2018**, *118*, 9152-9232, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00354.
56. Shamdani, S.; Chantepie, S.; Flageollet, C.; Henni-Chebra, N.; Jouan, Y.; Eymard, F.; Hay, E.; Cohen-Solal, M.; Papy-Garcia, D.; Chevalier, X.; et al. Heparan sulfate functions are altered in the osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther* **2020**, *22*, 283, doi:10.1186/s13075-020-02352-3.
57. Badylak, S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* **2007**, *28*, 3587-3593, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.043.
58. Fahy, N.; Alini, M.; Stoddart, M.J. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering. *J Orthop Res* **2018**, *36*, 52-63, doi:10.1002/jor.23670.
59. Guilak, F.; Alexopoulos, L.G.; Upton, M.L.; Youn, I.; Choi, J.B.; Cao, L.; Setton, L.A.; Haider, M.A. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci* **2006**, *1068*, 498-512, doi:10.1196/annals.1346.011.
60. Vining, K.H.; Mooney, D.J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, *18*, 728-742, doi:10.1038/nrm.2017.108.
61. Loeser, R.F. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol* **2014**, *39*, 11-16, doi:10.1016/j.matbio.2014.08.007.
62. Jordan, A.R.; Racine, R.R.; Hennig, M.J.; Lokeshwar, V.B. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol* **2015**, *6*, 182, doi:10.3389/fimmu.2015.00182.
63. Goldring, M.B.; Tsuchimochi, K.; Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **2006**, *97*, 33-44, doi:10.1002/jcb.20652.
64. Goldring, M.B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **2012**, *4*, 269-285, doi:10.1177/1759720X12448454.
65. Delise, A.M.; Tuan, R.S. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn* **2002**, *225*, 195-204, doi:10.1002/dvdy.10151.

66. Haas, A.R.; Tuan, R.S. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation* **1999**, *64*, 77-89, doi:10.1046/j.1432-0436.1999.6420077.x.
67. Chimal-Monroy, J.; Diaz de Leon, L. Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int J Dev Biol* **1999**, *43*, 59-67.
68. Daniels, K.; Solursh, M. Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J Cell Sci* **1991**, *100 (Pt 2)*, 249-254, doi:10.1242/jcs.100.2.249.
69. Szustak, M.; Gendaszewska-Darmach, E. Nanocellulose-Based Scaffolds for Chondrogenic Differentiation and Expansion. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, *9*, 736213, doi:10.3389/fbioe.2021.736213.
70. Haque, T.; Nakada, S.; Hamdy, R.C. A review of FGF18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. *Histol Histopathol* **2007**, *22*, 97-105, doi:10.14670/HH-22.97.
71. Kobayashi, T.; Lyons, K.M.; McMahon, A.P.; Kronenberg, H.M. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 18023-18027, doi:10.1073/pnas.0503617102.
72. Wu, X.; Shi, W.; Cao, X. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* **2007**, *1116*, 29-49, doi:10.1196/annals.1402.053.
73. Macsai, C.E.; Foster, B.K.; Xian, C.J. Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair. *J Cell Physiol* **2008**, *215*, 578-587, doi:10.1002/jcp.21342.
74. Yoon, B.S.; Pogue, R.; Ovchinnikov, D.A.; Yoshii, I.; Mishina, Y.; Behringer, R.R.; Lyons, K.M. BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development* **2006**, *133*, 4667-4678, doi:10.1242/dev.02680.
75. Lefebvre, V.; Smits, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* **2005**, *75*, 200-212, doi:10.1002/bdrc.20048.
76. Wuelling, M.; Vortkamp, A. Chondrocyte proliferation and differentiation. *Endocr Dev* **2011**, *21*, 1-11, doi:10.1159/000328081.
77. Zhou, G.; Zheng, Q.; Engin, F.; Munivez, E.; Chen, Y.; Sebald, E.; Krakow, D.; Lee, B. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 19004-19009, doi:10.1073/pnas.0605170103.
78. Dong, Y.F.; Song, Y.; Schwarz, E.M.; O'Keefe, R.J.; Drissi, H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* **2006**, *208*, 77-86, doi:10.1002/jcp.20656.
79. Zhang, X.; Siclari, V.A.; Lan, S.; Zhu, J.; Koyama, E.; Dupuis, H.L.; Enomoto-Iwamoto, M.; Beier, F.; Qin, L. The critical role of the epidermal growth factor receptor in endochondral ossification. *J Bone Miner Res* **2011**, *26*, 2622-2633, doi:10.1002/jbmr.502.
80. Appleton, C.T.; Usmani, S.E.; Mort, J.S.; Beier, F. Rho/ROCK and MEK/ERK activation by transforming growth factor-alpha induces articular cartilage degradation. *Lab Invest* **2010**, *90*, 20-30, doi:10.1038/labinvest.2009.111.
81. Takahashi, I.; Nuckolls, G.H.; Takahashi, K.; Tanaka, O.; Semba, I.; Dashner, R.; Shum, L.; Slavkin, H.C. Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* **1998**, *111 (Pt 14)*, 2067-2076, doi:10.1242/jcs.111.14.2067.
82. Elder, S.H.; Kimura, J.H.; Soslowsky, L.J.; Lavagnino, M.; Goldstein, S.A. Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells. *J Orthop Res* **2000**, *18*, 78-86, doi:10.1002/jor.1100180112.
83. Juhasz, T.; Matta, C.; Somogyi, C.; Katona, E.; Takacs, R.; Soha, R.F.; Szabo, I.A.; Cserhati, C.; Szody, R.; Karacsonyi, Z.; et al. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal* **2014**, *26*, 468-482, doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.001.
84. Zhang, K.; Wang, L.; Liu, Z.; Geng, B.; Teng, Y.; Liu, X.; Yi, Q.; Yu, D.; Chen, X.; Zhao, D.; et al. Mechanosensory and mechanotransductive processes mediated by ion channels in articular chondrocytes: Potential therapeutic targets for osteoarthritis. *Channels (Austin)* **2021**, *15*, 339-359, doi:10.1080/19336950.2021.1903184.
85. Lee, W.; Guilak, F.; Liedtke, W. Role of Piezo Channels in Joint Health and Injury. *Curr Top Membr* **2017**, *79*, 263-273, doi:10.1016/bs.ctm.2016.10.003.
86. Williantarra, I.; Leung, S.; Choi, Y.S.; Chhana, A.; McGlashan, S.R. Chondrocyte-specific response to stiffness-mediated primary cilia formation and centriole positioning. *Am J Physiol Cell Physiol* **2022**, *323*, C236-C247, doi:10.1152/ajpcell.00135.2022.

87. Swift, J.; Discher, D.E. The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. *J Cell Sci* **2014**, *127*, 3005-3015, doi:10.1242/jcs.149203.
88. Erickson, G.R.; Northrup, D.L.; Guilak, F. Hypo-osmotic stress induces calcium-dependent actin reorganization in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **2003**, *11*, 187-197, doi:10.1053/s1063-4584(02)00347-3.
89. Volz, M.; Wyse-Sookoo, K.R.; Travascio, F.; Huang, C.Y.; Best, T.M. Mechanobiological Approaches for Stimulating Chondrogenesis of Stem Cells. *Stem Cells Dev* **2022**, *31*, 460-487, doi:10.1089/scd.2022.0049.
90. Ouyang, X.; Xie, Y.; Wang, G. Mechanical stimulation promotes the proliferation and the cartilage phenotype of mesenchymal stem cells and chondrocytes co-cultured in vitro. *Biomed Pharmacother* **2019**, *117*, 109146, doi:10.1016/j.biopha.2019.109146.
91. Mandl, E.W.; Jahr, H.; Koevoet, J.L.; van Leeuwen, J.P.; Weinans, H.; Verhaar, J.A.; van Osch, G.J. Fibroblast growth factor-2 in serum-free medium is a potent mitogen and reduces dedifferentiation of human ear chondrocytes in monolayer culture. *Matrix Biol* **2004**, *23*, 231-241, doi:10.1016/j.matbio.2004.06.004.
92. Liu, G.; Kawaguchi, H.; Ogasawara, T.; Asawa, Y.; Kishimoto, J.; Takahashi, T.; Chung, U.I.; Yamaoka, H.; Asato, H.; Nakamura, K.; et al. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 20407-20415, doi:10.1074/jbc.M608383200.
93. Spieker, J.; Mudersbach, T.; Vogel-Hopker, A.; Layer, P.G. Endochondral Ossification Is Accelerated in Cholinesterase-Deficient Mice and in Avian Mesenchymal Micromass Cultures. *PLoS One* **2017**, *12*, e0170252, doi:10.1371/journal.pone.0170252.
94. Saha, A.; Rolfé, R.; Carroll, S.; Kelly, D.J.; Murphy, P. Chondrogenesis of embryonic limb bud cells in micromass culture progresses rapidly to hypertrophy and is modulated by hydrostatic pressure. *Cell Tissue Res* **2017**, *368*, 47-59, doi:10.1007/s00441-016-2512-9.
95. Sadler, T.W. Langman – Orvosi embriológia. Medicina Könyvkiadó, 2006. ISBN:2399958465602
96. Hamburger, V.; Hamilton, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **1951**, *88*, 49-92.
97. Mello, M.A.; Tuan, R.S. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **1999**, *35*, 262-269, doi:10.1007/s11626-999-0070-0.
98. Pauwels, J.; Fijalkowska, D.; Eyckerman, S.; Gevaert, K. Mass spectrometry and the cellular surfaceome. *Mass Spectrom Rev* **2022**, *41*, 804-841, doi:10.1002/mas.21690.
99. Sonnino, S.; Prinetti, A. Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem* **2013**, *20*, 4-21.
100. Prinetti, A.; Loberto, N.; Chigorno, V.; Sonnino, S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788*, 184-193, doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.001.
101. Devaux, P.F. Phospholipid flippases. *FEBS Lett* **1988**, *234*, 8-12, doi:10.1016/0014-5793(88)81291-2.
102. Op den Kamp, J.A. Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* **1979**, *48*, 47-71, doi:10.1146/annurev.bi.48.070179.000403.
103. Smith, L.M.; Kelleher, N.L.; Consortium for Top Down, P. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods* **2013**, *10*, 186-187, doi:10.1038/nmeth.2369.
104. Hedin, L.E.; Illergard, K.; Elofsson, A. An introduction to membrane proteins. *J Proteome Res* **2011**, *10*, 3324-3331, doi:10.1021/pr200145a.
105. Whited, A.M.; Johs, A. The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes. *Chem Phys Lipids* **2015**, *192*, 51-59, doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.07.015.
106. Zurzolo, C.; Simons, K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1858*, 632-639, doi:10.1016/j.bbamem.2015.12.018.
107. Bausch-Fluck, D.; Milani, E.S.; Wollscheid, B. Surfaceome nanoscale organization and extracellular interaction networks. *Curr Opin Chem Biol* **2019**, *48*, 26-33, doi:10.1016/j.cbpa.2018.09.020.
108. Bieberich, E. Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. *Adv Neurobiol* **2014**, *9*, 47-70, doi:10.1007/978-1-4939-1154-7\_3.
109. Gill, D.J.; Chia, J.; Senewiratne, J.; Bard, F. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *J Cell Biol* **2010**, *189*, 843-858, doi:10.1083/jcb.201003055.
110. Hofsteenge, J.; Muller, D.R.; de Beer, T.; Löffler, A.; Richter, W.J.; Vliegthart, J.F. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U. *Biochemistry* **1994**, *33*, 13524-13530, doi:10.1021/bi00250a003.
111. Qin, W.; Qin, K.; Zhang, Y.; Jia, W.; Chen, Y.; Cheng, B.; Peng, L.; Chen, N.; Liu, Y.; Zhou, W.; et al. S-glycosylation-based cysteine profiling reveals regulation of glycolysis by itaconate. *Nat Chem Biol* **2019**, *15*, 983-991, doi:10.1038/s41589-019-0323-5.

112. Lairson, L.L.; Henrissat, B.; Davies, G.J.; Withers, S.G. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* **2008**, *77*, 521-555, doi:10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.
113. Bagdonaite, I.; Pallesen, E.M.; Ye, Z.; Vakhrushev, S.Y.; Marinova, I.N.; Nielsen, M.I.; Kramer, S.H.; Pedersen, S.F.; Joshi, H.J.; Bennett, E.P.; et al. O-glycan initiation directs distinct biological pathways and controls epithelial differentiation. *EMBO Rep* **2020**, *21*, e48885, doi:10.15252/embr.201948885.
114. Sunshine, H.; Iruela-Arispe, M.L. Membrane lipids and cell signaling. *Curr Opin Lipidol* **2017**, *28*, 408-413, doi:10.1097/MOL.0000000000000443.
115. Nussinov, R.; Jang, H.; Tsai, C.J. Oligomerization and nanocluster organization render specificity. *Biol Rev Camb Philos Soc* **2015**, *90*, 587-598, doi:10.1111/brv.12124.
116. Goyette, J.; Gaus, K. Mechanisms of protein nanoscale clustering. *Curr Opin Cell Biol* **2017**, *44*, 86-92, doi:10.1016/j.ceb.2016.09.004.
117. Sheng, M.; Pak, D.T. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol* **2000**, *62*, 755-778, doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.755.
118. Saier, M.H., Jr.; Reddy, V.S.; Tsu, B.V.; Ahmed, M.S.; Li, C.; Moreno-Hagelsieb, G. The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, D372-379, doi:10.1093/nar/gkv1103.
119. Robinson, K.; Tiriveedhi, V. Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. *Front Oncol* **2020**, *10*, 265, doi:10.3389/fonc.2020.00265.
120. Urban, J.P.; Hall, A.C.; Gehl, K.A. Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J Cell Physiol* **1993**, *154*, 262-270, doi:10.1002/jcp.1041540208.
121. Barrett-Jolley, R.; Lewis, R.; Fallman, R.; Mobasher, A. The emerging chondrocyte channelome. *Front Physiol* **2010**, *1*, 135, doi:10.3389/fphys.2010.00135.
122. Martin, D.W. Structure-function relationships in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump. *Semin Nephrol* **2005**, *25*, 282-291, doi:10.1016/j.semnephrol.2005.03.003.
123. Trujillo, E.; Alvarez de la Rosa, D.; Mobasher, A.; Avila, J.; Gonzalez, T.; Martin-Vasallo, P. Sodium transport systems in human chondrocytes. I. Morphological and functional expression of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha and beta subunit isoforms in healthy and arthritic chondrocytes. *Histol Histopathol* **1999**, *14*, 1011-1022, doi:10.14670/HH-14.1011.
124. Mobasher, A.; Trujillo, E.; Arteaga, M.F.; Martin-Vasallo, P. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase subunit composition in a human chondrocyte cell line; evidence for the presence of alpha1, alpha3, beta1, beta2 and beta3 isoforms. *Int J Mol Sci* **2012**, *13*, 5019-5034, doi:10.3390/ijms13045019.
125. Mobasher, A.; Gent, T.C.; Womack, M.D.; Carter, S.D.; Clegg, P.D.; Barrett-Jolley, R. Quantitative analysis of voltage-gated potassium currents from primary equine (*Equus caballus*) and elephant (*Loxodonta africana*) articular chondrocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2005**, *289*, R172-180, doi:10.1152/ajpregu.00710.2004.
126. Clark, R.B.; Hatano, N.; Kondo, C.; Belke, D.D.; Brown, B.S.; Kumar, S.; Votta, B.J.; Giles, W.R. Voltage-gated K<sup>+</sup> currents in mouse articular chondrocytes regulate membrane potential. *Channels (Austin)* **2010**, *4*, 179-191, doi:10.4161/chan.4.3.11629.
127. Mobasher, A.; Gent, T.C.; Nash, A.I.; Womack, M.D.; Moskaluk, C.A.; Barrett-Jolley, R. Evidence for functional ATP-sensitive (K(ATP)) potassium channels in human and equine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **2007**, *15*, 1-8, doi:10.1016/j.joca.2006.06.017.
128. Mobasher, A.; Lewis, R.; Maxwell, J.E.; Hill, C.; Womack, M.; Barrett-Jolley, R. Characterization of a stretch-activated potassium channel in chondrocytes. *J Cell Physiol* **2010**, *223*, 511-518, doi:10.1002/jcp.22075.
129. Wright, M.; Jobanputra, P.; Bavington, C.; Salter, D.M.; Nuki, G. Effects of intermittent pressure-induced strain on the electrophysiology of cultured human chondrocytes: evidence for the presence of stretch-activated membrane ion channels. *Clin Sci (Lond)* **1996**, *90*, 61-71, doi:10.1042/cs0900061.
130. Varga, Z.; Juhasz, T.; Matta, C.; Fodor, J.; Katona, E.; Bartok, A.; Olah, T.; Sebe, A.; Csernoch, L.; Panyi, G.; et al. Switch of voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca<sup>2+</sup>-oscillations and cartilage formation. *PLoS One* **2011**, *6*, e27957, doi:10.1371/journal.pone.0027957.
131. Pini, J.; Giuliano, S.; Matonti, J.; Gannoun, L.; Simkin, D.; Rouleau, M.; Bendahhou, S. Osteogenic and Chondrogenic Master Genes Expression Is Dependent on the Kir2.1 Potassium Channel Through the Bone Morphogenetic Protein Pathway. *J Bone Miner Res* **2018**, *33*, 1826-1841, doi:10.1002/jbmr.3474.
132. Tian, M.; Duan, Y.; Duan, X. Chloride channels regulate chondrogenesis in chicken mandibular mesenchymal cells. *Arch Oral Biol* **2010**, *55*, 938-945, doi:10.1016/j.archoralbio.2010.08.005.
133. Fodor, J.; Matta, C.; Olah, T.; Juhasz, T.; Takacs, R.; Toth, A.; Dienes, B.; Csernoch, L.; Zakany, R. Store-operated calcium entry and calcium influx via voltage-operated calcium channels regulate

- intracellular calcium oscillations in chondrogenic cells. *Cell Calcium* **2013**, *54*, 1-16, doi:10.1016/j.ceca.2013.03.003.
134. Shakibaei, M.; Mobasheri, A. Beta1-integrins co-localize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes. *Histol Histopathol* **2003**, *18*, 343-351, doi:10.14670/HH-18.343.
  135. Shao, Y.; Alicknavitch, M.; Farach-Carson, M.C. Expression of voltage sensitive calcium channel (VSCC) L-type Cav1.2 (alpha1C) and T-type Cav3.2 (alpha1H) subunits during mouse bone development. *Dev Dyn* **2005**, *234*, 54-62, doi:10.1002/dvdy.20517.
  136. Xu, J.; Wang, W.; Clark, C.C.; Brighton, C.T. Signal transduction in electrically stimulated articular chondrocytes involves translocation of extracellular calcium through voltage-gated channels. *Osteoarthritis Cartilage* **2009**, *17*, 397-405, doi:10.1016/j.joca.2008.07.001.
  137. Knight, M.M.; McGlashan, S.R.; Garcia, M.; Jensen, C.G.; Poole, C.A. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors - a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* **2009**, *214*, 275-283, doi:10.1111/j.1469-7580.2008.01021.x.
  138. Koolpe, M.; Pearson, D.; Benton, H.P. Expression of both P1 and P2 purine receptor genes by human articular chondrocytes and profile of ligand-mediated prostaglandin E2 release. *Arthritis Rheum* **1999**, *42*, 258-267, doi:10.1002/1529-0131(199902)42:2<258::AID-ANR7>3.0.CO;2-O.
  139. Fodor, J.; Matta, C.; Juhasz, T.; Olah, T.; Goncezi, M.; Szijgyarto, Z.; Gergely, P.; Csernoch, L.; Zakany, R. Ionotropic purinergic receptor P2X4 is involved in the regulation of chondrogenesis in chicken micromass cell cultures. *Cell Calcium* **2009**, *45*, 421-430, doi:10.1016/j.ceca.2009.02.004.
  140. Kwon, H.J. Extracellular ATP signaling via P2X(4) receptor and cAMP/PKA signaling mediate ATP oscillations essential for prechondrogenic condensation. *J Endocrinol* **2012**, *214*, 337-348, doi:10.1530/JOE-12-0131.
  141. Kwon, H.J.; Ohmiya, Y.; Honma, K.I.; Honma, S.; Nagai, T.; Saito, K.; Yasuda, K. Synchronized ATP oscillations have a critical role in prechondrogenic condensation during chondrogenesis. *Cell Death Dis* **2012**, *3*, e278, doi:10.1038/cddis.2012.20.
  142. He, Z.; Leong, D.J.; Zhuo, Z.; Majeska, R.J.; Cardoso, L.; Spray, D.C.; Goldring, M.B.; Cobelli, N.J.; Sun, H.B. Strain-induced mechanotransduction through primary cilia, extracellular ATP, purinergic calcium signaling, and ERK1/2 transactivates CITED2 and downregulates MMP-1 and MMP-13 gene expression in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **2016**, *24*, 892-901, doi:10.1016/j.joca.2015.11.015.
  143. Carafoli, E. Calcium--a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J* **2005**, *272*, 1073-1089, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04546.x.
  144. Matta, C.; Zakany, R. Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair. *Front Biosci (Schol Ed)* **2013**, *5*, 305-324, doi:10.2741/s374.
  145. Takahata, Y.; Takarada, T.; Osawa, M.; Hinoi, E.; Nakamura, Y.; Yoneda, Y. Differential regulation of cellular maturation in chondrocytes and osteoblasts by glycine. *Cell Tissue Res* **2008**, *333*, 91-103, doi:10.1007/s00441-008-0607-7.
  146. Ramage, L.; Martel, M.A.; Hardingham, G.E.; Salter, D.M. NMDA receptor expression and activity in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **2008**, *16*, 1576-1584, doi:10.1016/j.joca.2008.04.023.
  147. Salter, D.M.; Wright, M.O.; Millward-Sadler, S.J. NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* **2004**, *41*, 273-281.
  148. Piepoli, T.; Mennuni, L.; Zerbi, S.; Lanza, M.; Rovati, L.C.; Caselli, G. Glutamate signaling in chondrocytes and the potential involvement of NMDA receptors in cell proliferation and inflammatory gene expression. *Osteoarthritis Cartilage* **2009**, *17*, 1076-1083, doi:10.1016/j.joca.2009.02.002.
  149. Somogyi, C.S.; Matta, C.; Foldvari, Z.; Juhasz, T.; Katona, E.; Takacs, A.R.; Hajdu, T.; Dobrosi, N.; Gergely, P.; Zakany, R. Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) Ion Channels in Chondrogenic Cells. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 18412-18438, doi:10.3390/ijms160818412.
  150. Hung, C.T. Transient receptor potential vanilloid 4 channel as an important modulator of chondrocyte mechanotransduction of osmotic loading. *Arthritis Rheum* **2010**, *62*, 2850-2851, doi:10.1002/art.27617.
  151. Phan, M.N.; Leddy, H.A.; Votta, B.J.; Kumar, S.; Levy, D.S.; Lipshutz, D.B.; Lee, S.H.; Liedtke, W.; Guilak, F. Functional characterization of TRPV4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **2009**, *60*, 3028-3037, doi:10.1002/art.24799.
  152. O'Connor, C.J.; Leddy, H.A.; Benefield, H.C.; Liedtke, W.B.; Guilak, F. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 1316-1321, doi:10.1073/pnas.1319569111.
  153. Muramatsu, S.; Wakabayashi, M.; Ohno, T.; Amano, K.; Ooishi, R.; Sugahara, T.; Shiojiri, S.; Tashiro, K.; Suzuki, Y.; Nishimura, R.; et al. Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 32158-32167, doi:10.1074/jbc.M706158200.

154. Lewis, R.; Asplin, K.E.; Bruce, G.; Dart, C.; Mobasher, A.; Barrett-Jolley, R. The role of the membrane potential in chondrocyte volume regulation. *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 2979-2986, doi:10.1002/jcp.22646.
155. Wei, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Bai, L. Transient Receptor Potential Vanilloid 5 Mediates Ca<sup>2+</sup> Influx and Inhibits Chondrocyte Autophagy in a Rat Osteoarthritis Model. *Cell Physiol Biochem* **2017**, *42*, 319-332, doi:10.1159/000477387.
156. Song, T.; Ma, J.; Guo, L.; Yang, P.; Zhou, X.; Ye, T. Regulation of chondrocyte functions by transient receptor potential cation channel V6 in osteoarthritis. *J Cell Physiol* **2017**, *232*, 3170-3181, doi:10.1002/jcp.25770.
157. Zhao, Z.; Li, Y.; Wang, M.; Zhao, S.; Zhao, Z.; Fang, J. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homeostasis. *J Cell Mol Med* **2020**, *24*, 5408-5419, doi:10.1111/jcmm.15204.
158. Lee, W.; Leddy, H.A.; Chen, Y.; Lee, S.H.; Zelenski, N.A.; McNulty, A.L.; Wu, J.; Beicker, K.N.; Coles, J.; Zauscher, S.; et al. Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, E5114-5122, doi:10.1073/pnas.1414298111.
159. Du, G.; Li, L.; Zhang, X.; Liu, J.; Hao, J.; Zhu, J.; Wu, H.; Chen, W.; Zhang, Q. Roles of TRPV4 and piezo channels in stretch-evoked Ca(2+) response in chondrocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* **2020**, *245*, 180-189, doi:10.1177/1535370219892601.
160. Graziano, A.C.E.; Avola, R.; Pannuzzo, G.; Cardile, V. Aquaporin1 and 3 modification as a result of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 2279-2291, doi:10.1002/jcp.26100.
161. Szabó, G. *Sejtbiológia. Medicina Könyvkiadó*, **2009**. ISBN:9789632261898
162. Eyster, K.M. New paradigms in signal transduction. *Biochem Pharmacol* **2007**, *73*, 1511-1519, doi:10.1016/j.bcp.2006.10.006.
163. Derynck, R.; Budi, E.H. Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling. *Sci Signal* **2019**, *12*, doi:10.1126/scisignal.aav5183.
164. Bandyopadhyay, A.; Tsuji, K.; Cox, K.; Harfe, B.D.; Rosen, V.; Tabin, C.J. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* **2006**, *2*, e216, doi:10.1371/journal.pgen.0020216.
165. Li, T.F.; Darowish, M.; Zuscik, M.J.; Chen, D.; Schwarz, E.M.; Rosier, R.N.; Drissi, H.; O'Keefe, R.J. Smad3-deficient chondrocytes have enhanced BMP signaling and accelerated differentiation. *J Bone Miner Res* **2006**, *21*, 4-16, doi:10.1359/JBMR.050911.
166. He, Y.; Fan, L.; Aaron, N.; Feng, Y.; Fang, Q.; Zhang, Y.; Zhang, D.; Wang, H.; Ma, T.; Sun, J.; et al. Reduction of Smad2 caused by oxidative stress leads to necrotic death of hypertrophic chondrocytes associated with an endemic osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* **2021**, *61*, 440-451, doi:10.1093/rheumatology/keab286.
167. Malemud, C.J.; Killeen, W.; Hering, T.M.; Purchio, A.F. Enhanced sulfated-proteoglycan core protein synthesis by incubation of rabbit chondrocytes with recombinant transforming growth factor-beta 1. *J Cell Physiol* **1991**, *149*, 152-159, doi:10.1002/jcp.1041490119.
168. Motaung, S.C.; Di Cesare, P.E.; Reddi, A.H. Differential response of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) to morphogens of bone morphogenetic protein/transforming growth factor-beta family in the surface, middle and deep zones of articular cartilage. *J Tissue Eng Regen Med* **2011**, *5*, e87-96, doi:10.1002/term.358.
169. Blaney Davidson, E.N.; Vitters, E.L.; van der Kraan, P.M.; van den Berg, W.B. Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* **2006**, *65*, 1414-1421, doi:10.1136/ard.2005.045971.
170. Pombo-Suarez, M.; Castano-Oreja, M.T.; Calaza, M.; Gomez-Reino, J.; Gonzalez, A. Differential upregulation of the three transforming growth factor beta isoforms in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis* **2009**, *68*, 568-571, doi:10.1136/ard.2008.090217.
171. Ornitz, D.M.; Itoh, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **2015**, *4*, 215-266, doi:10.1002/wdev.176.
172. Wiedemann, M.; Trueb, B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics* **2000**, *69*, 275-279, doi:10.1006/geno.2000.6332.
173. Wu, Z.L.; Zhang, L.; Yabe, T.; Kuberan, B.; Beeler, D.L.; Love, A.; Rosenberg, R.D. The involvement of heparan sulfate (HS) in FGF1/HS/FGFR1 signaling complex. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 17121-17129, doi:10.1074/jbc.M212590200.
174. Belov, A.A.; Mohammadi, M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a015958.

175. Iwata, T.; Chen, L.; Li, C.; Ovchinnikov, D.A.; Behringer, R.R.; Francomano, C.A.; Deng, C.X. A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet* **2000**, *9*, 1603-1613, doi:10.1093/hmg/9.11.1603.
176. Havens, B.A.; Velonis, D.; Kronenberg, M.S.; Lichtler, A.C.; Oliver, B.; Mina, M. Roles of FGFR3 during morphogenesis of Meckel's cartilage and mandibular bones. *Dev Biol* **2008**, *316*, 336-349, doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.035.
177. Hung, I.H.; Yu, K.; Lavine, K.J.; Ornitz, D.M. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev Biol* **2007**, *307*, 300-313, doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.048.
178. Ohbayashi, N.; Shibayama, M.; Kurotaki, Y.; Imanishi, M.; Fujimori, T.; Itoh, N.; Takada, S. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* **2002**, *16*, 870-879, doi:10.1101/gad.965702.
179. Lee, K.; Deeds, J.D.; Segre, G.V. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology* **1995**, *136*, 453-463, doi:10.1210/endo.136.2.7835276.
180. McMahon, A.P.; Ingham, P.W.; Tabin, C.J. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* **2003**, *53*, 1-114, doi:10.1016/s0070-2153(03)53002-2.
181. Vortkamp, A.; Lee, K.; Lanske, B.; Segre, G.V.; Kronenberg, H.M.; Tabin, C.J. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **1996**, *273*, 613-622, doi:10.1126/science.273.5275.613.
182. St-Jacques, B.; Hammerschmidt, M.; McMahon, A.P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* **1999**, *13*, 2072-2086, doi:10.1101/gad.13.16.2072.
183. Usami, Y.; Gunawardena, A.T.; Iwamoto, M.; Enomoto-Iwamoto, M. Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies. *Lab Invest* **2016**, *96*, 186-196, doi:10.1038/labinvest.2015.142.
184. Zhu, X.; Zhu, H.; Zhang, L.; Huang, S.; Cao, J.; Ma, G.; Feng, G.; He, L.; Yang, Y.; Guo, X. Wls-mediated Wnts differentially regulate distal limb patterning and tissue morphogenesis. *Dev Biol* **2012**, *365*, 328-338, doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.019.
185. Yang, Y.; Topol, L.; Lee, H.; Wu, J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **2003**, *130*, 1003-1015, doi:10.1242/dev.00324.
186. Chiba, S. Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* **2006**, *24*, 2437-2447, doi:10.1634/stemcells.2005-0661.
187. Watanabe, N.; Tezuka, Y.; Matsuno, K.; Miyatani, S.; Morimura, N.; Yasuda, M.; Fujimaki, R.; Kuroda, K.; Hiraki, Y.; Hozumi, N.; et al. Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. *J Bone Miner Metab* **2003**, *21*, 344-352, doi:10.1007/s00774-003-0428-4.
188. Hilton, M.J.; Tu, X.; Wu, X.; Bai, S.; Zhao, H.; Kobayashi, T.; Kronenberg, H.M.; Teitelbaum, S.L.; Ross, F.P.; Kopan, R.; et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med* **2008**, *14*, 306-314, doi:10.1038/nm1716.
189. Fujimaki, R.; Toyama, Y.; Hozumi, N.; Tezuka, K. Involvement of Notch signaling in initiation of prechondrogenic condensation and nodule formation in limb bud micromass cultures. *J Bone Miner Metab* **2006**, *24*, 191-198, doi:10.1007/s00774-005-0671-y.
190. Grogan, S.P.; Olee, T.; Hiraoka, K.; Lotz, M.K. Repression of chondrogenesis through binding of notch signaling proteins HES-1 and HEY-1 to N-box domains in the COL2A1 enhancer site. *Arthritis Rheum* **2008**, *58*, 2754-2763, doi:10.1002/art.23730.
191. Mead, T.J.; Yutzey, K.E. Notch pathway regulation of chondrocyte differentiation and proliferation during appendicular and axial skeleton development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 14420-14425, doi:10.1073/pnas.0902306106.
192. Crowe, R.; Zikherman, J.; Niswander, L. Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation. *Development* **1999**, *126*, 987-998, doi:10.1242/dev.126.5.987.
193. Theocharis, A.D.; Skandalis, S.S.; Gialeli, C.; Karamanos, N.K. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *97*, 4-27, doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
194. Bateman, J.F.; Boot-Handford, R.P.; Lamande, S.R. Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nat Rev Genet* **2009**, *10*, 173-183, doi:10.1038/nrg2520.
195. Cavallaro, U.; Dejana, E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, *12*, 189-197, doi:10.1038/nrm3068.
196. Tsai, T.Y.; Garner, R.M.; Megason, S.G. Adhesion-Based Self-Organization in Tissue Patterning. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2022**, *38*, 349-374, doi:10.1146/annurev-cellbio-120420-100215.

197. Geiger, B.; Salomon, D.; Takeichi, M.; Hynes, R.O. A chimeric N-cadherin/beta 1-integrin receptor which localizes to both cell-cell and cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **1992**, *103 ( Pt 4)*, 943-951, doi:10.1242/jcs.103.4.943.
198. Edelman, G.M. CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol Rev* **1987**, *100*, 11-45, doi:10.1111/j.1600-065x.1987.tb00526.x.
199. Arslan, F.N.; Eckert, J.; Schmidt, T.; Heisenberg, C.P. Holding it together: when cadherin meets cadherin. *Biophys J* **2021**, *120*, 4182-4192, doi:10.1016/j.bpj.2021.03.025.
200. McEver, R.P. Selectins. *Curr Opin Immunol* **1994**, *6*, 75-84, doi:10.1016/0952-7915(94)90037-x.
201. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **1992**, *69*, 11-25, doi:10.1016/0092-8674(92)90115-s.
202. Mehta, V.; Chander, H.; Munshi, A. Complex roles of discoidin domain receptor tyrosine kinases in cancer. *Clin Transl Oncol* **2021**, *23*, 1497-1510, doi:10.1007/s12094-021-02552-6.
203. Vigetti, D.; Karousou, E.; Viola, M.; Deleonibus, S.; De Luca, G.; Passi, A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1840*, 2452-2459, doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001.
204. Schaefer, L.; Tredup, C.; Gubbiotti, M.A.; Iozzo, R.V. Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology. *FEBS J* **2017**, *284*, 10-26, doi:10.1111/febs.13963.
205. Gao, Y.; Liu, S.; Huang, J.; Guo, W.; Chen, J.; Zhang, L.; Zhao, B.; Peng, J.; Wang, A.; Wang, Y.; et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 648459, doi:10.1155/2014/648459.
206. Mariani, F.V.; Martin, G.R. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* **2003**, *423*, 319-325, doi:10.1038/nature01655.
207. Takeichi, M.; Inuzuka, H.; Shimamura, K.; Fujimori, T.; Nagafuchi, A. Cadherin subclasses: differential expression and their roles in neural morphogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1990**, *55*, 319-325, doi:10.1101/sqb.1990.055.01.033.
208. Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **1991**, *251*, 1451-1455, doi:10.1126/science.2006419.
209. Aberle, H.; Schwartz, H.; Kemler, R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* **1996**, *61*, 514-523, doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4%3C514::AID-JCB4%3E3.0.CO;2-R.
210. Oberlender, S.A.; Tuan, R.S. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* **1994**, *120*, 177-187, doi:10.1242/dev.120.1.177.
211. Cunningham, B.A.; Hemperly, J.J.; Murray, B.A.; Prediger, E.A.; Brackenbury, R.; Edelman, G.M. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **1987**, *236*, 799-806, doi:10.1126/science.3576199.
212. Tavella, S.; Raffo, P.; Tacchetti, C.; Cancedda, R.; Castagnola, P. N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res* **1994**, *215*, 354-362, doi:10.1006/excr.1994.1352.
213. Fang, J.; Hall, B.K. N-CAM is not required for initiation of secondary chondrogenesis: the role of N-CAM in skeletal condensation and differentiation. *Int J Dev Biol* **1999**, *43*, 335-342.
214. DeLise, A.M.; Fischer, L.; Tuan, R.S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* **2000**, *8*, 309-334, doi:10.1053/joca.1999.0306.
215. Hacker, U.; Nybakken, K.; Perrimon, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, *6*, 530-541, doi:10.1038/nrm1681.
216. Barczyk, M.; Carracedo, S.; Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res* **2010**, *339*, 269-280, doi:10.1007/s00441-009-0834-6.
217. Camper, L.; Hellman, U.; Lundgren-Akerlund, E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 20383-20389, doi:10.1074/jbc.273.32.20383.
218. Loeser, R.F.; Sadiiev, S.; Tan, L.; Goldring, M.B. Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. *Osteoarthritis Cartilage* **2000**, *8*, 96-105, doi:10.1053/joca.1999.0277.
219. Durr, J.; Lammi, P.; Goodman, S.L.; Aigner, T.; von der Mark, K. Identification and immunolocalization of laminin in cartilage. *Exp Cell Res* **1996**, *222*, 225-233, doi:10.1006/excr.1996.0028.
220. Wang, W.; Kirsch, T. Annexin V/beta5 integrin interactions regulate apoptosis of growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 30848-30856, doi:10.1074/jbc.M605937200.
221. Hirsch, M.S.; Lunsford, L.E.; Trinkaus-Randall, V.; Svoboda, K.K. Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev Dyn* **1997**, *210*, 249-263, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3<249::AID-AJA6>3.0.CO;2-G.

222. Harburger, D.S.; Calderwood, D.A. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* **2009**, *122*, 159-163, doi:10.1242/jcs.018093.
223. Thorogood, P.V.; Hinchliffe, J.R. An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol* **1975**, *33*, 581-606.
224. Kosher, R.A.; Savage, M.P.; Walker, K.H. A gradation of hyaluronate accumulation along the proximodistal axis of the embryonic chick limb bud. *J Embryol Exp Morphol* **1981**, *63*, 85-98.
225. Culty, M.; Nguyen, H.A.; Underhill, C.B. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* **1992**, *116*, 1055-1062, doi:10.1083/jcb.116.4.1055.
226. Ishida, O.; Tanaka, Y.; Morimoto, I.; Takigawa, M.; Eto, S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J Bone Miner Res* **1997**, *12*, 1657-1663, doi:10.1359/jbmr.1997.12.10.1657.
227. Oh, E.S.; Couchman, J.R. Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol Cells* **2004**, *17*, 181-187.
228. Molteni, A.; Modrowski, D.; Hott, M.; Marie, P.J. Differential expression of fibroblast growth factor receptor-1, -2, and -3 and syndecan-1, -2, and -4 in neonatal rat mandibular condyle and calvaria during osteogenic differentiation in vitro. *Bone* **1999**, *24*, 337-347, doi:10.1016/s8756-3282(98)00191-4.
229. Gould, S.E.; Upholt, W.B.; Kosher, R.A. Syndecan 3: a member of the syndecan family of membrane-intercalated proteoglycans that is expressed in high amounts at the onset of chicken limb cartilage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 3271-3275, doi:10.1073/pnas.89.8.3271.
230. Shimo, T.; Gentili, C.; Iwamoto, M.; Wu, C.; Koyama, E.; Pacifici, M. Indian hedgehog and syndecans-3 coregulate chondrocyte proliferation and function during chick limb skeletogenesis. *Dev Dyn* **2004**, *229*, 607-617, doi:10.1002/dvdy.20009.
231. Echtermeyer, F.; Streit, M.; Wilcox-Adelman, S.; Saoncella, S.; Denhez, F.; Detmar, M.; Goetinck, P. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* **2001**, *107*, R9-R14, doi:10.1172/JCI10559.
232. Vogel, W.; Gish, G.D.; Alves, F.; Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* **1997**, *1*, 13-23, doi:10.1016/s1097-2765(00)80003-9.
233. Ichikawa, O.; Osawa, M.; Nishida, N.; Goshima, N.; Nomura, N.; Shimada, I. Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2. *EMBO J* **2007**, *26*, 4168-4176, doi:10.1038/sj.emboj.7601833.
234. Ali, B.R.; Xu, H.; Akawi, N.A.; John, A.; Karuvantevida, N.S.; Langer, R.; Al-Gazali, L.; Leitinger, B. Trafficking defects and loss of ligand binding are the underlying causes of all reported DDR2 missense mutations found in SMED-SL patients. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, 2239-2250, doi:10.1093/hmg/ddq103.
235. Labrador, J.P.; Azcoitia, V.; Tuckermann, J.; Lin, C.; Olaso, E.; Manes, S.; Bruckner, K.; Goergen, J.L.; Lemke, G.; Yancopoulos, G.; et al. The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Rep* **2001**, *2*, 446-452, doi:10.1093/embo-reports/kve094.
236. McDonald, A.G.; Tipton, K.F. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *FEBS J* **2023**, *290*, 2214-2231, doi:10.1111/febs.16274.
237. Mort, J.S.; Billington, C.J. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Res* **2001**, *3*, 337-341, doi:10.1186/ar325.
238. van den Berg, W.B. Pathophysiology of osteoarthritis. *Joint Bone Spine* **2000**, *67*, 555-556, doi:10.1016/s1297-319x(00)00216-5.
239. Chamberland, A.; Wang, E.; Jones, A.R.; Collins-Racie, L.A.; LaVallie, E.R.; Huang, Y.; Liu, L.; Morris, E.A.; Flannery, C.R.; Yang, Z. Identification of a novel HtrA1-susceptible cleavage site in human aggrecan: evidence for the involvement of HtrA1 in aggrecan proteolysis in vivo. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 27352-27359, doi:10.1074/jbc.M109.037051.
240. Muller, C.; Khabut, A.; Dudhia, J.; Reinholt, F.P.; Aspberg, A.; Heinegard, D.; Onnerfjord, P. Quantitative proteomics at different depths in human articular cartilage reveals unique patterns of protein distribution. *Matrix Biol* **2014**, *40*, 34-45, doi:10.1016/j.matbio.2014.08.013.
241. Rocha, B.; Calamia, V.; Casas, V.; Carrascal, M.; Blanco, F.J.; Ruiz-Romero, C. Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. *J Proteome Res* **2014**, *13*, 1045-1054, doi:10.1021/pr401030n.
242. Egeblad, M.; Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 161-174, doi:10.1038/nrc745.
243. Tallant, C.; Marrero, A.; Gomis-Ruth, F.X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1803*, 20-28, doi:10.1016/j.bbamcr.2009.04.003.
244. Zucker, S.; Pei, D.; Cao, J.; Lopez-Otin, C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol* **2003**, *54*, 1-74, doi:10.1016/s0070-2153(03)54004-2.

245. Yu, W.H.; Woessner, J.F., Jr. Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J Biol Chem* **2000**, *275*, 4183-4191, doi:10.1074/jbc.275.6.4183.
246. Guo, H.; Li, R.; Zucker, S.; Toole, B.P. EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res* **2000**, *60*, 888-891.
247. Aimes, R.T.; Quigley, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 5872-5876, doi:10.1074/jbc.270.11.5872.
248. Tetlow, L.C.; Adlam, D.J.; Woolley, D.E. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* **2001**, *44*, 585-594, doi:10.1002/1529-0131(200103)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C.
249. Knauper, V.; Lopez-Otin, C.; Smith, B.; Knight, G.; Murphy, G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 1544-1550, doi:10.1074/jbc.271.3.1544.
250. Nagase, H. Human stromelysins 1 and 2. *Methods Enzymol* **1995**, *248*, 449-470, doi:10.1016/0076-6879(95)48029-3.
251. Knauper, V.; Wilhelm, S.M.; Seperack, P.K.; DeClerck, Y.A.; Langley, K.E.; Osthues, A.; Tschesche, H. Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochem J* **1993**, *295 (Pt 2)*, 581-586, doi:10.1042/bj2950581.
252. Murphy, G.; Cockett, M.I.; Stephens, P.E.; Smith, B.J.; Docherty, A.J. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* **1987**, *248*, 265-268, doi:10.1042/bj2480265.
253. Sternlicht, M.D.; Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2001**, *17*, 463-516, doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.
254. Klein, T.; Bischoff, R. Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *J Proteome Res* **2011**, *10*, 17-33, doi:10.1021/pr100556z.
255. Porter, S.; Clark, I.M.; Kevorkian, L.; Edwards, D.R. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* **2005**, *386*, 15-27, doi:10.1042/BJ20040424.
256. Hubeau, C.; Rocks, N.; Cataldo, D. ADAM28: Another ambivalent protease in cancer. *Cancer Lett* **2020**, *494*, 18-26, doi:10.1016/j.canlet.2020.08.031.
257. Itai, T.; Tanaka, M.; Nagata, S. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF- $\alpha$ -converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur J Biochem* **2001**, *268*, 2074-2082, doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02085.x.
258. Black, R.A.; Rauch, C.T.; Kozlosky, C.J.; Slack, J.L.; Wolfson, M.F.; Castner, B.J.; Stocking, K.L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* **1997**, *385*, 729-733, doi:10.1038/385729a0.
259. McKie, N.; Edwards, T.; Dallas, D.J.; Houghton, A.; Stringer, B.; Graham, R.; Russell, G.; Croucher, P.I. Expression of members of a novel membrane linked metalloproteinase family (ADAM) in human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *230*, 335-339, doi:10.1006/bbrc.1996.5957.
260. Kelly, K.; Hutchinson, G.; Nebenius-Oosthuizen, D.; Smith, A.J.; Bartsch, J.W.; Horiuchi, K.; Rittger, A.; Manova, K.; Docherty, A.J.; Blobel, C.P. Metalloprotease-disintegrin ADAM8: expression analysis and targeted deletion in mice. *Dev Dyn* **2005**, *232*, 221-231, doi:10.1002/dvdy.20221.
261. Djouad, F.; Delorme, B.; Maurice, M.; Bony, C.; Apparailly, F.; Louis-Plence, P.; Canovas, F.; Charbord, P.; Noel, D.; Jorgensen, C. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther* **2007**, *9*, R33, doi:10.1186/ar2153.
262. Caterson, B.; Flannery, C.R.; Hughes, C.E.; Little, C.B. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* **2000**, *19*, 333-344, doi:10.1016/s0945-053x(00)00078-0.
263. Collins-Racie, L.A.; Flannery, C.R.; Zeng, W.; Corcoran, C.; Annis-Freeman, B.; Agostino, M.J.; Arai, M.; DiBlasio-Smith, E.; Dorner, A.J.; Georgiadis, K.E.; et al. ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix Biol* **2004**, *23*, 219-230, doi:10.1016/j.matbio.2004.05.004.
264. Zeng, W.; Corcoran, C.; Collins-Racie, L.A.; Lavallie, E.R.; Morris, E.A.; Flannery, C.R. Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760*, 517-524, doi:10.1016/j.bbagen.2006.01.013.
265. Glasson, S.S.; Askew, R.; Sheppard, B.; Carito, B.; Blanchet, T.; Ma, H.L.; Flannery, C.R.; Peluso, D.; Kanki, K.; Yang, Z.; et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **2005**, *434*, 644-648, doi:10.1038/nature03369.

266. Stanton, H.; Rogerson, F.M.; East, C.J.; Golub, S.B.; Lawlor, K.E.; Meeker, C.T.; Little, C.B.; Last, K.; Farmer, P.J.; Campbell, I.K.; et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* **2005**, *434*, 648-652, doi:10.1038/nature03417.
267. Tortorella, M.D.; Malfait, A.M.; Deccico, C.; Arner, E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* **2001**, *9*, 539-552, doi:10.1053/joca.2001.0427.
268. Powell, A.J.; Little, C.B.; Hughes, C.E. Low molecular weight isoforms of the aggrecanases are responsible for the cytokine-induced proteolysis of aggrecan in a porcine chondrocyte culture system. *Arthritis Rheum* **2007**, *56*, 3010-3019, doi:10.1002/art.22818.
269. Song, R.H.; Tortorella, M.D.; Malfait, A.M.; Alston, J.T.; Yang, Z.; Arner, E.C.; Griggs, D.W. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum* **2007**, *56*, 575-585, doi:10.1002/art.22334.
270. Eckert, R.L.; Kaartinen, M.T.; Nurminskaya, M.; Belkin, A.M.; Colak, G.; Johnson, G.V.; Mehta, K. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev* **2014**, *94*, 383-417, doi:10.1152/physrev.00019.2013.
271. Zemskov, E.A.; Janiak, A.; Hang, J.; Waghray, A.; Belkin, A.M. The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions. *Front Biosci* **2006**, *11*, 1057-1076, doi:10.2741/1863.
272. Aeschlimann, D.; Kaupp, O.; Paulsson, M. Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J Cell Biol* **1995**, *129*, 881-892, doi:10.1083/jcb.129.3.881.
273. Aeschlimann, D.; Wetterwald, A.; Fleisch, H.; Paulsson, M. Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes. *J Cell Biol* **1993**, *120*, 1461-1470, doi:10.1083/jcb.120.6.1461.
274. Nurminsky, D.; Shanmugasundaram, S.; Deasey, S.; Michaud, C.; Allen, S.; Hendig, D.; Dastjerdi, A.; Francis-West, P.; Nurminskaya, M. Transglutaminase 2 regulates early chondrogenesis and glycosaminoglycan synthesis. *Mech Dev* **2011**, *128*, 234-245, doi:10.1016/j.mod.2010.11.007.
275. Akimov, S.S.; Krylov, D.; Fleischman, L.F.; Belkin, A.M. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol* **2000**, *148*, 825-838, doi:10.1083/jcb.148.4.825.
276. Telci, D.; Wang, Z.; Li, X.; Verderio, E.A.; Humphries, M.J.; Baccarini, M.; Basaga, H.; Griffin, M. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and beta1 integrin co-signaling. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 20937-20947, doi:10.1074/jbc.M801763200.
277. Zemskov, E.A.; Loukinova, E.; Mikhailenko, I.; Coleman, R.A.; Strickland, D.K.; Belkin, A.M. Regulation of platelet-derived growth factor receptor function by integrin-associated cell surface transglutaminase. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 16693-16703, doi:10.1074/jbc.M109.010769.
278. Chen, R.; Fulton, K.M.; Twine, S.M.; Li, J. Identification of Mhc Peptides Using Mass Spectrometry for Neoantigen Discovery and Cancer Vaccine Development. *Mass Spectrom Rev* **2021**, *40*, 110-125, doi:10.1002/mas.21616.
279. Sendoel, A.; Dunn, J.G.; Rodriguez, E.H.; Naik, S.; Gomez, N.C.; Hurwitz, B.; Levorse, J.; Dill, B.D.; Schramek, D.; Molina, H.; et al. Translation from unconventional 5' start sites drives tumour initiation. *Nature* **2017**, *541*, 494-499, doi:10.1038/nature21036.
280. Vialaret, J.; Schmit, P.O.; Lehmann, S.; Gabelle, A.; Wood, J.; Bern, M.; Paape, R.; Suckau, D.; Kruppa, G.; Hirtz, C. Identification of multiple proteoforms biomarkers on clinical samples by routine Top-Down approaches. *Data Brief* **2018**, *18*, 1013-1021, doi:10.1016/j.dib.2018.03.114.
281. Hopkins, A.L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 727-730, doi:10.1038/nrd892.
282. Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Guo, A.C.; Lo, E.J.; Marcu, A.; Grant, J.R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, D1074-D1082, doi:10.1093/nar/gkx1037.
283. Wallin, E.; von Heijne, G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **1998**, *7*, 1029-1038, doi:10.1002/pro.5560070420.
284. Josic, D.; Clifton, J.G.; Kovac, S.; Hixson, D.C. Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies. *Curr Opin Mol Ther* **2008**, *10*, 116-123.
285. Ulmschneider, M.B.; Sansom, M.S.; Di Nola, A. Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins* **2005**, *59*, 252-265, doi:10.1002/prot.20334.
286. Santoni, V.; Molloy, M.; Rabilloud, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1054-1070, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1054::AID-ELPS1054>3.0.CO;2-8.
287. Helbig, A.O.; Heck, A.J.; Slijper, M. Exploring the membrane proteome--challenges and analytical strategies. *J Proteomics* **2010**, *73*, 868-878, doi:10.1016/j.jprot.2010.01.005.

288. Milo, R.; Jorgensen, P.; Moran, U.; Weber, G.; Springer, M. BioNumbers--the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*, D750-753, doi:10.1093/nar/gkp889.
289. Itzhak, D.N.; Tyanova, S.; Cox, J.; Borner, G.H. Global, quantitative and dynamic mapping of protein subcellular localization. *Elife* **2016**, *5*, doi:10.7554/eLife.16950.
290. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K.A.; Linse, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 2050-2055, doi:10.1073/pnas.0608582104.
291. Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19*, 281-296, doi:10.1038/nrm.2017.138.
292. Mun, J.Y.; Lee, K.J.; Seo, H.; Sung, M.S.; Cho, Y.S.; Lee, S.G.; Kwon, O.; Oh, D.B. Efficient adhesion-based plasma membrane isolation for cell surface N-glycan analysis. *Anal Chem* **2013**, *85*, 7462-7470, doi:10.1021/ac401431u.
293. Bezrukov, L.; Blank, P.S.; Polozov, I.V.; Zimmerberg, J. An adhesion-based method for plasma membrane isolation: evaluating cholesterol extraction from cells and their membranes. *Anal Biochem* **2009**, *394*, 171-176, doi:10.1016/j.ab.2009.07.027.
294. Cohen, C.M.; Kalish, D.I.; Jacobson, B.S.; Branton, D. Membrane isolation on polylysine-coated beads. Plasma membrane from HeLa cells. *J Cell Biol* **1977**, *75*, 119-134, doi:10.1083/jcb.75.1.119.
295. Tommasone, S.; Allabush, F.; Tagger, Y.K.; Norman, J.; Kopf, M.; Tucker, J.H.R.; Mendes, P.M. The challenges of glycan recognition with natural and artificial receptors. *Chem Soc Rev* **2019**, *48*, 5488-5505, doi:10.1039/c8cs00768c.
296. Sterner, E.; Flanagan, N.; Gildersleeve, J.C. Perspectives on Anti-Glycan Antibodies Gleaned from Development of a Community Resource Database. *ACS Chem Biol* **2016**, *11*, 1773-1783, doi:10.1021/acschembio.6b00244.
297. Nishat, S.; Andreana, P.R. Entirely Carbohydrate-Based Vaccines: An Emerging Field for Specific and Selective Immune Responses. *Vaccines (Basel)* **2016**, *4*, doi:10.3390/vaccines4020019.
298. Watarai, H.; Hinohara, A.; Nagafune, J.; Nakayama, T.; Taniguchi, M.; Yamaguchi, Y. Plasma membrane-focused proteomics: dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells. *Proteomics* **2005**, *5*, 4001-4011, doi:10.1002/pmic.200401258.
299. Lu, Z.; Kamat, K.; Johnson, B.P.; Yin, C.C.; Scholler, N.; Abbott, K.L. Generation of a Fully Human scFv that binds Tumor-Specific Glycoforms. *Sci Rep* **2019**, *9*, 5101, doi:10.1038/s41598-019-41567-6.
300. Busch, G.; Hoder, D.; Reutter, W.; Tauber, R. Selective isolation of individual cell surface proteins from tissue culture cells by a cleavable biotin label. *Eur J Cell Biol* **1989**, *50*, 257-262.
301. Bayer, E.A.; Wilchek, M. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal* **1980**, *26*, 1-45, doi:10.1002/9780470110461.ch1.
302. Zhang, H.; Li, X.J.; Martin, D.B.; Aebersold, R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **2003**, *21*, 660-666, doi:10.1038/nbt827.
303. Wollscheid, B.; Bausch-Fluck, D.; Henderson, C.; O'Brien, R.; Bibel, M.; Schiess, R.; Aebersold, R.; Watts, J.D. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol* **2009**, *27*, 378-386, doi:10.1038/nbt.1532.
304. Bausch-Fluck, D.; Hofmann, A.; Bock, T.; Frei, A.P.; Cerciello, F.; Jacobs, A.; Moest, H.; Omasits, U.; Gundry, R.L.; Yoon, C.; et al. A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas. *PLoS One* **2015**, *10*, e0121314, doi:10.1371/journal.pone.0121314.
305. Ducret, A.; Kux van Geijtenbeek, S.; Roder, D.; Simon, S.; Chin, D.; Berrera, M.; Gruenbaum, L.; Ji, C.; Cutler, P. Identification of six cell surface proteins for specific liver targeting. *Proteomics Clin Appl* **2015**, *9*, 651-661, doi:10.1002/prca.201400194.
306. Matta, C.; Boockook, D.J.; Fellows, C.R.; Miosge, N.; Dixon, J.E.; Liddell, S.; Smith, J.; Mobasher, A. Molecular phenotyping of the surfaceome of migratory chondroprogenitors and mesenchymal stem cells using biotinylation, glyco-capture and quantitative LC-MS/MS proteomic analysis. *Sci Rep* **2019**, *9*, 9018, doi:10.1038/s41598-019-44957-y.
307. Mellacheruvu, D.; Wright, Z.; Couzens, A.L.; Lambert, J.P.; St-Denis, N.A.; Li, T.; Miteva, Y.V.; Hauri, S.; Sardi, M.E.; Low, T.Y.; et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* **2013**, *10*, 730-736, doi:10.1038/nmeth.2557.
308. Xiao, H.; Wu, R. Quantitative investigation of human cell surface N-glycoprotein dynamics. *Chem Sci* **2017**, *8*, 268-277, doi:10.1039/c6sc01814a.
309. Hogg, S.D.; Embery, G. The isolation and partial characterization of a sulphated glycoprotein from human whole saliva which aggregates strains of *Streptococcus sanguis* but not *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* **1979**, *24*, 791-797, doi:10.1016/0003-9969(79)90040-2.

310. Blaschuk, O.; Burdzy, K.; Fritz, I.B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* **1983**, *258*, 7714-7720.
311. Wong, P.; Taillefer, D.; Lakins, J.; Pineault, J.; Chader, G.; Tenniswood, M. Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur J Biochem* **1994**, *221*, 917-925, doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18807.x.
312. Rohne, P.; Prochnow, H.; Koch-Brandt, C. The CLU-files: disentanglement of a mystery. *Biomol Concepts* **2016**, *7*, 1-15, doi:10.1515/bmc-2015-0026.
313. Pucci, S.; Bonanno, E.; Pichiorri, F.; Angeloni, C.; Spagnoli, L.G. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* **2004**, *23*, 2298-2304, doi:10.1038/sj.onc.1207404.
314. Caccamo, A.E.; Scaltriti, M.; Caporali, A.; D'Arca, D.; Corti, A.; Corvetta, D.; Sala, A.; Bettuzzi, S. Ca<sup>2+</sup> depletion induces nuclear clusterin, a novel effector of apoptosis in immortalized human prostate cells. *Cell Death Differ* **2005**, *12*, 101-104, doi:10.1038/sj.cdd.4401491.
315. Leskov, K.S.; Klokov, D.Y.; Li, J.; Kinsella, T.J.; Boothman, D.A. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 11590-11600, doi:10.1074/jbc.M209233200.
316. Kim, N.; Choi, W.S. Proapoptotic role of nuclear clusterin in brain. *Anat Cell Biol* **2011**, *44*, 169-175, doi:10.5115/acb.2011.44.3.169.
317. Santilli, G.; Aronow, B.J.; Sala, A. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IκappaB expression and regulation of NF-κappaB activity. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 38214-38219, doi:10.1074/jbc.C300252200.
318. Graves, T.K.; Patel, S.; Dannies, P.S.; Hinkle, P.M. Misfolded growth hormone causes fragmentation of the Golgi apparatus and disrupts endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic. *J Cell Sci* **2001**, *114*, 3685-3694, doi:10.1242/jcs.114.20.3685.
319. Li, N.; Zoubeidi, A.; Beraldi, E.; Gleave, M.E. GRP78 regulates clusterin stability, retrotranslocation and mitochondrial localization under ER stress in prostate cancer. *Oncogene* **2013**, *32*, 1933-1942, doi:10.1038/onc.2012.212.
320. Chan, K.A.; Bernal, A.B.; Vickers, M.H.; Gohir, W.; Petrik, J.J.; Sloboda, D.M. Early life exposure to undernutrition induces ER stress, apoptosis, and reduced vascularization in ovaries of adult rat offspring. *Biol Reprod* **2015**, *92*, 110, doi:10.1095/biolreprod.114.124149.
321. Zhang, H.; Kim, J.K.; Edwards, C.A.; Xu, Z.; Taichman, R.; Wang, C.Y. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol* **2005**, *7*, 909-915, doi:10.1038/ncb1291.
322. Mignard, V.; Lalier, L.; Paris, F.; Vallette, F.M. Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1266, doi:10.1038/cddis.2014.226.
323. Trougakos, I.P.; Gonos, E.S. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res* **2006**, *40*, 1324-1334, doi:10.1080/10715760600902310.
324. Nizard, P.; Tetley, S.; Le Drean, Y.; Watrin, T.; Le Goff, P.; Wilson, M.R.; Michel, D. Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic* **2007**, *8*, 554-565, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x.
325. Pereira, R.M.; Mekary, R.A.; da Cruz Rodrigues, K.C.; Anaruma, C.P.; Ropelle, E.R.; da Silva, A.S.R.; Cintra, D.E.; Pauli, J.R.; de Moura, L.P. Protective molecular mechanisms of clusterin against apoptosis in cardiomyocytes. *Heart Fail Rev* **2018**, *23*, 123-129, doi:10.1007/s10741-017-9654-z.
326. Bettuzzi, S.; Scorcioni, F.; Astancolle, S.; Davalli, P.; Scaltriti, M.; Corti, A. Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene* **2002**, *21*, 4328-4334, doi:10.1038/sj.onc.1205594.
327. Rodriguez-Rivera, C.; Garcia, M.M.; Molina-Alvarez, M.; Gonzalez-Martin, C.; Goicoechea, C. Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues. *Biomed Pharmacother* **2021**, *134*, 111174, doi:10.1016/j.biopha.2020.111174.
328. Wyatt, A.R.; Yerbury, J.J.; Berghofer, P.; Greguric, I.; Katsifis, A.; Dobson, C.M.; Wilson, M.R. Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68*, 3919-3931, doi:10.1007/s00018-011-0684-8.
329. Hoffmann, J.H.; Linke, K.; Graf, P.C.; Lilie, H.; Jakob, U. Identification of a redox-regulated chaperone network. *EMBO J* **2004**, *23*, 160-168, doi:10.1038/sj.emboj.7600016.
330. Bailey, R.W.; Dunker, A.K.; Brown, C.J.; Garner, E.C.; Griswold, M.D. Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry* **2001**, *40*, 11828-11840, doi:10.1021/bi010135x.
331. Yuste-Checa, P.; Trinkaus, V.A.; Riera-Tur, I.; Imamoglu, R.; Schaller, T.F.; Wang, H.; Dudanova, I.; Hipp, M.S.; Bracher, A.; Hartl, F.U. The extracellular chaperone Clusterin enhances Tau aggregate seeding in a cellular model. *Nat Commun* **2021**, *12*, 4863, doi:10.1038/s41467-021-25060-1.

332. Itakura, E.; Chiba, M.; Murata, T.; Matsuura, A. Heparan sulfate is a clearance receptor for aberrant extracellular proteins. *J Cell Biol* **2020**, *219*, doi:10.1083/jcb.201911126.
333. Leeb, C.; Eresheim, C.; Nimpf, J. Clusterin is a ligand for apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and very low density lipoprotein receptor (VLDLR) and signals via the Reelin-signaling pathway. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 4161-4172, doi:10.1074/jbc.M113.529271.
334. Yeh, F.L.; Wang, Y.; Tom, I.; Gonzalez, L.C.; Sheng, M. TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron* **2016**, *91*, 328-340, doi:10.1016/j.neuron.2016.06.015.
335. Kang, S.S.; Kurti, A.; Wojtas, A.; Baker, K.E.; Liu, C.C.; Kanekiyo, T.; Deming, Y.; Cruchaga, C.; Estus, S.; Bu, G.; et al. Identification of plexin A4 as a novel clusterin receptor links two Alzheimer's disease risk genes. *Hum Mol Genet* **2016**, *25*, 3467-3475, doi:10.1093/hmg/ddw188.
336. Bell, R.D.; Sagare, A.P.; Friedman, A.E.; Bedi, G.S.; Holtzman, D.M.; Deane, R.; Zlokovic, B.V. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* **2007**, *27*, 909-918, doi:10.1038/sj.jcbfm.9600419.
337. Gil, S.Y.; Youn, B.S.; Byun, K.; Huang, H.; Namkoong, C.; Jang, P.G.; Lee, J.Y.; Jo, Y.H.; Kang, G.M.; Kim, H.K.; et al. Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway. *Nat Commun* **2013**, *4*, 1862, doi:10.1038/ncomms2896.
338. Zhang, F.; Kumano, M.; Beraldi, E.; Fazli, L.; Du, C.; Moore, S.; Sorensen, P.; Zoubeidi, A.; Gleave, M.E. Clusterin facilitates stress-induced lipidation of LC3 and autophagosome biogenesis to enhance cancer cell survival. *Nat Commun* **2014**, *5*, 5775, doi:10.1038/ncomms6775.
339. Constantinescu, P.; Brown, R.A.; Wyatt, A.R.; Ranson, M.; Wilson, M.R. Amorphous protein aggregates stimulate plasminogen activation, leading to release of cytotoxic fragments that are clients for extracellular chaperones. *J Biol Chem* **2017**, *292*, 14425-14437, doi:10.1074/jbc.M117.786657.
340. Foster, E.M.; Dangla-Valls, A.; Lovestone, S.; Ribe, E.M.; Buckley, N.J. Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. *Front Neurosci* **2019**, *13*, 164, doi:10.3389/fnins.2019.00164.
341. Yerbury, J.J.; Poon, S.; Meehan, S.; Thompson, B.; Kumita, J.R.; Dobson, C.M.; Wilson, M.R. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J* **2007**, *21*, 2312-2322, doi:10.1096/fj.06-7986com.
342. Whiten, D.R.; Cox, D.; Horrocks, M.H.; Taylor, C.G.; De, S.; Flagmeier, P.; Tosatto, L.; Kumita, J.R.; Ecroyd, H.; Dobson, C.M.; et al. Single-Molecule Characterization of the Interactions between Extracellular Chaperones and Toxic alpha-Synuclein Oligomers. *Cell Rep* **2018**, *23*, 3492-3500, doi:10.1016/j.celrep.2018.05.074.
343. Greene, M.J.; Klimtchuk, E.S.; Seldin, D.C.; Berk, J.L.; Connors, L.H. Cooperative stabilization of transthyretin by clusterin and diflunisal. *Biochemistry* **2015**, *54*, 268-278, doi:10.1021/bi5011249.
344. Gregory, J.M.; Whiten, D.R.; Brown, R.A.; Barros, T.P.; Kumita, J.R.; Yerbury, J.J.; Satapathy, S.; McDade, K.; Smith, C.; Luheshi, L.M.; et al. Clusterin protects neurons against intracellular proteotoxicity. *Acta Neuropathol Commun* **2017**, *5*, 81, doi:10.1186/s40478-017-0481-1.
345. Poon, S.; Rybchyn, M.S.; Easterbrook-Smith, S.B.; Carver, J.A.; Pankhurst, G.J.; Wilson, M.R. Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 39532-39540, doi:10.1074/jbc.M204855200.
346. Rosenberg, M.E.; Girton, R.; Finkel, D.; Chmielewski, D.; Barrie, A., 3rd; Witte, D.P.; Zhu, G.; Bissler, J.J.; Harmony, J.A.; Aronow, B.J. Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 1893-1902, doi:10.1128/MCB.22.6.1893-1902.2002.
347. Matsuda, A.; Itoh, Y.; Koshikawa, N.; Akizawa, T.; Yana, I.; Seiki, M. Clusterin, an abundant serum factor, is a possible negative regulator of MT6-MMP/MMP-25 produced by neutrophils. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 36350-36357, doi:10.1074/jbc.M301509200.
348. Jeong, S.; Ledee, D.R.; Gordon, G.M.; Itakura, T.; Patel, N.; Martin, A.; Fini, M.E. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation. *Am J Pathol* **2012**, *180*, 2028-2039, doi:10.1016/j.ajpath.2012.01.025.
349. Lind, A.L.; Emami Khoonsari, P.; Sjodin, M.; Katila, L.; Wetterhall, M.; Gordh, T.; Kultima, K. Spinal Cord Stimulation Alters Protein Levels in the Cerebrospinal Fluid of Neuropathic Pain Patients: A Proteomic Mass Spectrometric Analysis. *Neuromodulation* **2016**, *19*, 549-562, doi:10.1111/ner.12473.
350. Oh, Y.M.; Ma, T.Z.; Kwak, Y.G.; Eun, J.P. Proteomic evaluation to identify biomarkers for carpal tunnel syndrome: a comparative serum analysis. *Connect Tissue Res* **2013**, *54*, 76-81, doi:10.3109/03008207.2012.746320.
351. Rodriguez-Rivera, C.; Perez-Garcia, C.; Munoz-Rodriguez, J.R.; Vicente-Rodriguez, M.; Polo, F.; Ford, R.M.; Segura, E.; Leon, A.; Salas, E.; Saenz-Mateos, L.; et al. Proteomic Identification of

- Biomarkers Associated with Eating Control and Bariatric Surgery Outcomes in Patients with Morbid Obesity. *World J Surg* **2019**, *43*, 744-750, doi:10.1007/s00268-018-4851-z.
352. Park, S.; Mathis, K.W.; Lee, I.K. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord* **2014**, *15*, 45-53, doi:10.1007/s11154-013-9275-3.
353. Satapathy, S.; Wilson, M.R. The Dual Roles of Clusterin in Extracellular and Intracellular Proteostasis. *Trends Biochem Sci* **2021**, *46*, 652-660, doi:10.1016/j.tibs.2021.01.005.
354. Gobeze, R.; Kho, A.; Krastins, B.; Sarracino, D.A.; Thornhill, T.S.; Chase, M.; Millett, P.J.; Lee, D.M. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **2007**, *9*, R36, doi:10.1186/ar2172.
355. Ungsudechachai, T.; Honsawek, S.; Jittikoon, J.; Udomsinprasert, W. Clusterin Is Associated with Systemic and Synovial Inflammation in Knee Osteoarthritis. *Cartilage* **2021**, *13*, 1557S-1565S, doi:10.1177/1947603520958149.
356. Tarquini, C.; Pucci, S.; Scioli, M.G.; Doldo, E.; Agostinelli, S.; D'Amico, F.; Bielli, A.; Ferlosio, A.; Caredda, E.; Tarantino, U.; et al. Clusterin exerts a cytoprotective and antioxidant effect in human osteoarthritic cartilage. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 10129-10146, doi:10.18632/aging.103310.
357. McCarthy, H.S.; Malda, J.; Richardson, J.B.; Roberts, S. Increased Production of Clusterin in Biopsies of Repair Tissue following Autologous Chondrocyte Implantation. *Cartilage* **2013**, *4*, 227-238, doi:10.1177/1947603513477652.
358. Fukuda, I.; Ishihara, T.; Ohmachi, S.; Sakikawa, I.; Morita, A.; Ikeda, M.; Yamane, S.; Toyosaki-Maeda, T.; Takinami, Y.; Okamoto, H.; et al. Potential plasma biomarkers for progression of knee osteoarthritis using glycoproteomic analysis coupled with a 2D-LC-MALDI system. *Proteome Sci* **2012**, *10*, 36, doi:10.1186/1477-5956-10-36.
359. Wilson, M.R.; Yerbury, J.J.; Poon, S. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol Biosyst* **2008**, *4*, 42-52, doi:10.1039/b712728f.
360. Balch, W.E.; Morimoto, R.I.; Dillin, A.; Kelly, J.W. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* **2008**, *319*, 916-919, doi:10.1126/science.1141448.
361. Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **2006**, *75*, 333-366, doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
362. Tartaglia, G.G.; Pechmann, S.; Dobson, C.M.; Vendruscolo, M. Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. *Trends Biochem Sci* **2007**, *32*, 204-206, doi:10.1016/j.tibs.2007.03.005.
363. Iwao, Y.; Anraku, M.; Yamasaki, K.; Kragh-Hansen, U.; Kawai, K.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1764*, 743-749, doi:10.1016/j.bbapap.2006.01.011.
364. Margineanu, I.; Ghetie, V. A selective model of plasma protein catabolism. *J Theor Biol* **1981**, *90*, 101-110, doi:10.1016/0022-5193(81)90124-7.
365. Humphreys, D.T.; Carver, J.A.; Easterbrook-Smith, S.B.; Wilson, M.R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 6875-6881, doi:10.1074/jbc.274.11.6875.
366. French, K.; Yerbury, J.J.; Wilson, M.R. Protease activation of alpha2-macroglobulin modulates a chaperone-like action with broad specificity. *Biochemistry* **2008**, *47*, 1176-1185, doi:10.1021/bi701976f.
367. Yerbury, J.J.; Rybchyn, M.S.; Easterbrook-Smith, S.B.; Henriques, C.; Wilson, M.R. The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin. *Biochemistry* **2005**, *44*, 10914-10925, doi:10.1021/bi050764x.
368. Matsudomi, N.; Kanda, Y.; Yoshika, Y.; Moriwaki, H. Ability of alphas-Casein to suppress the heat aggregation of ovotransferrin. *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, 4882-4886, doi:10.1021/jf030802o.
369. Zhang, X.; Fu, X.; Zhang, H.; Liu, C.; Jiao, W.; Chang, Z. Chaperone-like activity of beta-casein. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**, *37*, 1232-1240, doi:10.1016/j.biocel.2004.12.004.
370. Takacs, R.; Juhasz, T.; Katona, E.; Somogyi, C.; Vago, J.; Hajdu, T.; Barna, K.B.; Nagy, P.; Zakany, R.; Matta, C. Isolation and Micromass Culturing of Primary Chicken Chondroprogenitor Cells for Cartilage Regeneration. *Curr Protoc* **2023**, *3*, e835, doi:10.1002/cpz1.835.
371. Röhlich, P. Szövettan. Semmelweis Kiadó, **2014**. ISBN: 9789633313220
372. Zheng, C.H.; Levenston, M.E. Fact versus artifact: avoiding erroneous estimates of sulfated glycosaminoglycan content using the dimethylmethylene blue colorimetric assay for tissue-engineered constructs. *Eur Cell Mater* **2015**, *29*, 224-236; discussion 236, doi:10.22203/ecm.v029a17.
373. Jiang, L.; Wang, M.; Lin, S.; Jian, R.; Li, X.; Chan, J.; Dong, G.; Fang, H.; Robinson, A.E.; Consortium, G.T.; et al. A Quantitative Proteome Map of the Human Body. *Cell* **2020**, *183*, 269-283 e219, doi:10.1016/j.cell.2020.08.036.

374. Kolmel, D.K.; Kool, E.T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem Rev* **2017**, *117*, 10358-10376, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00090.
375. Jeremiase, B.; Matta, C.; Fellows, C.R.; Boocock, D.J.; Smith, J.R.; Liddell, S.; Lafeber, F.; van Spil, W.E.; Mobasher, A. Alterations in the chondrocyte surfaceome in response to pro-inflammatory cytokines. *BMC Mol Cell Biol* **2020**, *21*, 47, doi:10.1186/s12860-020-00288-9.
376. Haugland, R.P.; You, W.W. Coupling of antibodies with biotin. *Methods Mol Biol* **2008**, *418*, 13-24, doi:10.1007/978-1-59745-579-4\_2.
377. Barua, P.; Ahn, S.B.; Mohamedali, A.; Liu, F. Improved sensitivity in cell surface protein detection by combining chemical labeling with mechanical lysis in a colorectal cancer cell model. *Biotechnol Lett* **2020**, *42*, 683-695, doi:10.1007/s10529-020-02824-1.
378. Kovacs, P.; Boocock, D.J.; Coveney, C.; Mobasher, A.; Matta, C. Aminooxy Biotin-Based Characterization of the Surfaceome of Chondrogenic Cells. *Methods Mol Biol* **2025**, *2908*, 65-79, doi:10.1007/978-1-0716-4434-8\_5.
379. Wang, Z.; Mulleder, M.; Batruch, I.; Chelur, A.; Textoris-Taube, K.; Schwecke, T.; Hartl, J.; Causon, J.; Castro-Perez, J.; Demichev, V.; et al. High-throughput proteomics of nanogram-scale samples with Zeno SWATH MS. *Elife* **2022**, *11*, doi:10.7554/eLife.83947.
380. Demichev, V.; Messner, C.B.; Vernardis, S.I.; Lilley, K.S.; Ralser, M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat Methods* **2020**, *17*, 41-44, doi:10.1038/s41592-019-0638-x.
381. Ranathunge, C.; Patel, S.S.; Pinky, L.; Correll, V.L.; Chen, S.; Semmes, O.J.; Armstrong, R.K.; Combs, C.D.; Nyalwidhe, J.O. promor: a comprehensive R package for label-free proteomics data analysis and predictive modeling. *Bioinform Adv* **2023**, *3*, vbad025, doi:10.1093/bioadv/vbad025.
382. Burry, R.W. Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem* **2011**, *59*, 6-12, doi:10.1369/jhc.2010.956920.
383. Elliott, A.D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom* **2020**, *92*, e68, doi:10.1002/cpcy.68.
384. Szklarczyk, D.; Morris, J.H.; Cook, H.; Kuhn, M.; Wyder, S.; Simonovic, M.; Santos, A.; Doncheva, N.T.; Roth, A.; Bork, P.; et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, D362-D368, doi:10.1093/nar/gkw937.
385. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **2003**, *13*, 2498-2504, doi:10.1101/gr.1239303.
386. Cline, M.S.; Smoot, M.; Cerami, E.; Kuchinsky, A.; Landys, N.; Workman, C.; Christmas, R.; Avila-Campilo, I.; Creech, M.; Gross, B.; et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 2366-2382, doi:10.1038/nprot.2007.324.
387. Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Gorodkin, J.; Jensen, L.J. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J Proteome Res* **2019**, *18*, 623-632, doi:10.1021/acs.jproteome.8b00702.
388. Pietrosevoli, N.; Dobay, M.P. Optimized Protein-Protein Interaction Network Usage with Context Filtering. *Methods Mol Biol* **2018**, *1819*, 33-50, doi:10.1007/978-1-4939-8618-7\_2.
389. Jafri, M.A.; Kalamegam, G.; Abbas, M.; Al-Kaff, M.; Ahmed, F.; Bakhashab, S.; Rasool, M.; Naseer, M.I.; Sinnadurai, V.; Pushparaj, P.N. Deciphering the Association of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors in Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using an ex vivo Osteochondral Culture System. *Front Cell Dev Biol* **2019**, *7*, 380, doi:10.3389/fcell.2019.00380.
390. Kalamegam, G.; Alfakeeh, S.M.; Bahmaid, A.O.; AlHuwait, E.A.; Gari, M.A.; Abbas, M.M.; Ahmed, F.; Abu-Elmagd, M.; Pushparaj, P.N. In vitro Evaluation of the Anti-inflammatory Effects of Thymoquinone in Osteoarthritis and in silico Analysis of Inter-Related Pathways in Age-Related Degenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 646, doi:10.3389/fcell.2020.00646.
391. Lawrence, J.E.G.; Woods, S.; Roberts, K.; Sumanaweera, D.; Balogh, P.; Li, T.; Predeus, A.V.; He, P.; Polanski, K.; Prigmore, E.; et al. Single-cell transcriptomics identifies chondrocyte differentiation dynamics in vivo and in vitro. *Dev Cell* **2025**, *60*, 3066-3084 e3068, doi:10.1016/j.devcel.2025.06.031.
392. Mackie, E.J.; Ahmed, Y.A.; Tatarczuch, L.; Chen, K.S.; Mirams, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* **2008**, *40*, 46-62, doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009.
393. To, K.; Fei, L.; Pett, J.P.; Roberts, K.; Blain, R.; Polanski, K.; Li, T.; Yayon, N.; He, P.; Xu, C.; et al. A multi-omic atlas of human embryonic skeletal development. *Nature* **2024**, *635*, 657-667, doi:10.1038/s41586-024-08189-z.

394. Venkatasubramanian, D.; Senevirathne, G.; Capellini, T.D.; Craft, A.M. Leveraging single cell multiomic analyses to identify factors that drive human chondrocyte cell fate. *bioRxiv* **2024**, doi:10.1101/2024.06.12.598666.
395. Sarihan, M.; Bal Albayrak, M.G.; Kasap, M.; Akpınar, G.; Kocyigit, E. An experimental workflow for enrichment of low abundant proteins from human serum for the discovery of serum biomarkers. *J Biol Methods* **2023**, *10*, e99010001, doi:10.14440/jbm.2023.394.
396. Gundry, R.L.; Boheler, K.R.; Van Eyk, J.E.; Wollscheid, B. A novel role for proteomics in the discovery of cell-surface markers on stem cells: Scratching the surface. *Proteomics Clin Appl* **2008**, *2*, 892-903, doi:10.1002/prca.200780122.
397. Xu, X.; Yin, K.; Xu, S.; Wang, Z.; Wu, R. Mass spectrometry-based methods for investigating the dynamics and organization of the surfaceome: exploring potential clinical implications. *Expert Rev Proteomics* **2024**, *21*, 99-113, doi:10.1080/14789450.2024.2314148.
398. Elofsson, A.; von Heijne, G. Membrane protein structure: prediction versus reality. *Annu Rev Biochem* **2007**, *76*, 125-140, doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.163539.
399. Huynh, N.P.T.; Zhang, B.; Guilak, F. High-depth transcriptomic profiling reveals the temporal gene signature of human mesenchymal stem cells during chondrogenesis. *FASEB J* **2019**, *33*, 358-372, doi:10.1096/fj.201800534R.
400. Halim, A.; Ariyanti, A.D.; Luo, Q.; Song, G. Recent Progress in Engineering Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Rev Rep* **2020**, *16*, 661-674, doi:10.1007/s12015-020-09979-4.
401. Xie, M.; Kamenev, D.; Kaucka, M.; Kastriti, M.E.; Zhou, B.; Artemov, A.V.; Storer, M.; Fried, K.; Adameyko, I.; Dyachuk, V.; et al. Schwann cell precursors contribute to skeletal formation during embryonic development in mice and zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 15068-15073, doi:10.1073/pnas.1900038116.
402. Sugiki, T.; Uyama, T.; Toyoda, M.; Morioka, H.; Kume, S.; Miyado, K.; Matsumoto, K.; Saito, H.; Tsumaki, N.; Takahashi, Y.; et al. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem* **2007**, *100*, 1240-1254, doi:10.1002/jcb.21125.
403. Markolovic, S.; Wilkins, S.E.; Schofield, C.J. Protein Hydroxylation Catalyzed by 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases. *J Biol Chem* **2015**, *290*, 20712-20722, doi:10.1074/jbc.R115.662627.
404. Lamande, S.R.; Bateman, J.F. Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol* **1999**, *10*, 455-464, doi:10.1006/scdb.1999.0317.
405. Fae, K.C.; Diefenbach da Silva, D.; Bilate, A.M.; Tanaka, A.C.; Pomerantzeff, P.M.; Kiss, M.H.; Silva, C.A.; Cunha-Neto, E.; Kalil, J.; Guilherme, L. PDIA3, HSPA5 and vimentin, proteins identified by 2-DE in the valvular tissue, are the target antigens of peripheral and heart infiltrating T cells from chronic rheumatic heart disease patients. *J Autoimmun* **2008**, *31*, 136-141, doi:10.1016/j.jaut.2008.04.023.
406. Singh, P.; Schwarzbauer, J.E. Fibronectin matrix assembly is essential for cell condensation during chondrogenesis. *J Cell Sci* **2014**, *127*, 4420-4428, doi:10.1242/jcs.150276.
407. Niethamer, T.K.; Bush, J.O. Getting direction(s): The Eph/ephrin signaling system in cell positioning. *Dev Biol* **2019**, *447*, 42-57, doi:10.1016/j.ydbio.2018.01.012.
408. Nguyen, T.M.; Arthur, A.; Paton, S.; Hemming, S.; Panagopoulos, R.; Codrington, J.; Walkley, C.R.; Zannettino, A.C.; Gronthos, S. Loss of ephrinB1 in osteogenic progenitor cells impedes endochondral ossification and compromises bone strength integrity during skeletal development. *Bone* **2016**, *93*, 12-21, doi:10.1016/j.bone.2016.09.009.
409. Wang, Y.; Menendez, A.; Fong, C.; ElAlieh, H.Z.; Chang, W.; Bikle, D.D. Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* **2014**, *29*, 1900-1913, doi:10.1002/jbmr.2196.
410. Moftah, M.Z.; Downie, S.A.; Bronstein, N.B.; Mezentseva, N.; Pu, J.; Maher, P.A.; Newman, S.A. Ectodermal FGFs induce perinodular inhibition of limb chondrogenesis in vitro and in vivo via FGF receptor 2. *Dev Biol* **2002**, *249*, 270-282, doi:10.1006/dbio.2002.0766.
411. Hoshijima, M.; Hattori, T.; Aoyama, E.; Nishida, T.; Kubota, S.; Kamioka, H.; Takigawa, M. Roles of Interaction between CCN2 and Rab14 in Aggrecan Production by Chondrocytes. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21082769.
412. Haseeb, A.; Kc, R.; Angelozzi, M.; de Charleroy, C.; Rux, D.; Tower, R.J.; Yao, L.; Pellegrino da Silva, R.; Pacifici, M.; Qin, L.; et al. SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, doi:10.1073/pnas.2019152118.
413. Shin, H.; Lee, M.N.; Choung, J.S.; Kim, S.; Choi, B.H.; Noh, M.; Shin, J.H. Focal Adhesion Assembly Induces Phenotypic Changes and Dedifferentiation in Chondrocytes. *J Cell Physiol* **2016**, *231*, 1822-1831, doi:10.1002/jcp.25290.

414. Woods, A.; Wang, G.; Beier, F. Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* **2007**, *213*, 1-8, doi:10.1002/jcp.21110.
415. Nurminsky, D.; Magee, C.; Faverman, L.; Nurminskaya, M. Regulation of chondrocyte differentiation by actin-severing protein adseverin. *Dev Biol* **2007**, *302*, 427-437, doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.052.
416. Chen, C.; Xiong, K.; Li, K.; Zhou, B.; Cheng, J.; Zhu, B.; Zheng, L.; Zhao, J. Identification of key genes involved in collagen hydrogel-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells through transcriptome analysis: the role of m6A modification. *J Mater Sci Mater Med* **2024**, *35*, 43, doi:10.1007/s10856-024-06801-2.
417. Morris, K.J.; Cs-Szabo, G.; Cole, A.A. Characterization of TIMP-3 in human articular talar cartilage. *Connect Tissue Res* **2010**, *51*, 478-490, doi:10.3109/03008201003686958.
418. Lin, T.Y.; Mishra, V.K.; Dubey, R.; Chaturvedi, T.P.; Narayan, S.A.; Fang, H.W.; Tsai, L.W.; Kumar Dubey, N. Transcriptomic analysis reveals distinct molecular signatures and regulatory networks of osteoarthritic chondrocytes versus mesenchymal stem cells during chondrogenesis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2025**, *169*, 262-271, doi:10.5507/bp.2025.008.
419. Kaur, A.; Xing, W.; Mohan, S.; Rundle, C.H. Changes in ephrin gene expression during bone healing identify a restricted repertoire of ephrins mediating fracture repair. *Histochem Cell Biol* **2019**, *151*, 43-55, doi:10.1007/s00418-018-1712-7.
420. Cayuso, J.; Xu, Q.; Wilkinson, D.G. Mechanisms of boundary formation by Eph receptor and ephrin signaling. *Dev Biol* **2015**, *401*, 122-131, doi:10.1016/j.ydbio.2014.11.013.
421. Lees-Shepard, J.B.; Flint, K.; Fisher, M.; Omi, M.; Richard, K.; Antony, M.; Chen, P.J.; Yadav, S.; Threadgill, D.; Maihle, N.J.; et al. Cross-talk between EGFR and BMP signals regulates chondrocyte maturation during endochondral ossification. *Dev Dyn* **2022**, *251*, 75-94, doi:10.1002/dvdy.438.
422. Ornitz, D.M.; Marie, P.J. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev* **2015**, *29*, 1463-1486, doi:10.1101/gad.266551.115.
423. Zhu, X.; Xu, M.; Leu, N.A.; Morrisey, E.E.; Millar, S.E. FZD2 regulates limb development by mediating beta-catenin-dependent and -independent Wnt signaling pathways. *Dis Model Mech* **2023**, *16*, doi:10.1242/dmm.049876.
424. Li, Y.; Dudley, A.T. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development* **2009**, *136*, 1083-1092, doi:10.1242/dev.023820.
425. Pasquin, S.; Sharma, M.; Gauchat, J.F. Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine Growth Factor Rev* **2015**, *26*, 507-515, doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.007.
426. Sleeman, M.W.; Anderson, K.D.; Lambert, P.D.; Yancopoulos, G.D.; Wiegand, S.J. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* **2000**, *74*, 265-272, doi:10.1016/s0031-6865(99)00050-3.
427. Askmyr, M.; White, K.E.; Jovic, T.; King, H.A.; Quach, J.M.; Maluenda, A.C.; Baker, E.K.; Smeets, M.F.; Walkley, C.R.; Purton, L.E. Ciliary neurotrophic factor has intrinsic and extrinsic roles in regulating B cell differentiation and bone structure. *Sci Rep* **2015**, *5*, 15529, doi:10.1038/srep15529.
428. McGregor, N.E.; Poulton, I.J.; Walker, E.C.; Pompolo, S.; Quinn, J.M.; Martin, T.J.; Sims, N.A. Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcif Tissue Int* **2010**, *86*, 261-270, doi:10.1007/s00223-010-9337-4.
429. Huang, H.B.; Luo, H.T.; Wei, N.N.; Liu, M.L.; He, F.; Yang, W.; Dong, J.; Yang, X.F.; Li, F.R. Integrative analysis reveals a lineage-specific circular RNA landscape for adipo-osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* **2022**, *13*, 106, doi:10.1186/s13287-022-02792-5.
430. Nahle, S.; Pasquin, S.; Laplante, V.; Rousseau, F.; Sharma, M.; Gauchat, J.F. Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1) modulates mesenchymal stem cell osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* **2019**, *294*, 11952-11959, doi:10.1074/jbc.AC119.008361.
431. Tsuritani, K.; Takeda, J.; Sakagami, J.; Ishii, A.; Eriksson, T.; Hara, T.; Ishibashi, H.; Koshihara, Y.; Yamada, K.; Yoneda, Y. Cytokine receptor-like factor 1 is highly expressed in damaged human knee osteoarthritic cartilage and involved in osteoarthritis downstream of TGF-beta. *Calcif Tissue Int* **2010**, *86*, 47-57, doi:10.1007/s00223-009-9311-1.
432. Crisponi, L.; Buers, I.; Rutsch, F. CRLF1 and CLCF1 in Development, Health and Disease. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23020992.
433. Dehne, T.; Schenk, R.; Perka, C.; Morawietz, L.; Pruss, A.; Sittinger, M.; Kaps, C.; Ringe, J. Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene* **2010**, *462*, 8-17, doi:10.1016/j.gene.2010.04.006.
434. Matta, C.; Takacs, R.; Dvir-Ginzberg, M.; Richardson, S.M.; Pelttari, K.; Pattappa, G.; Risbud, M.V.; Mobasheri, A. Insights into chondrocyte populations in cartilaginous tissues at the single-cell level. *Nat Rev Rheumatol* **2025**, *21*, 465-477, doi:10.1038/s41584-025-01275-0.

435. Le Tran, N.; Wang, Y.; Nie, G. Podocalyxin in Normal Tissue and Epithelial Cancer. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13122863.
436. Larrucea, S.; Butta, N.; Rodriguez, R.B.; Alonso-Martin, S.; Arias-Salgado, E.G.; Ayuso, M.S.; Parrilla, R. Podocalyxin enhances the adherence of cells to platelets. *Cell Mol Life Sci* **2007**, *64*, 2965-2974, doi:10.1007/s00018-007-7374-6.
437. Lee, R.H.; Seo, M.J.; Pulin, A.A.; Gregory, C.A.; Ylostalo, J.; Prockop, D.J. The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood* **2009**, *113*, 816-826, doi:10.1182/blood-2007-12-128702.
438. Chen, H.; Tan, X.N.; Hu, S.; Liu, R.Q.; Peng, L.H.; Li, Y.M.; Wu, P. Molecular Mechanisms of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 664168, doi:10.3389/fcell.2021.664168.
439. Zhang, F.; Clair, A.J.; Dankert, J.F.; Lee, Y.J.; Campbell, K.A.; Kirsch, T. Cytokine Receptor-like Factor 1 (CRLF1) and Its Role in Osteochondral Repair. *Cells* **2024**, *13*, doi:10.3390/cells13090757.
440. Kumar, D.; Lassar, A.B. Fibroblast growth factor maintains chondrogenic potential of limb bud mesenchymal cells by modulating DNMT3A recruitment. *Cell Rep* **2014**, *8*, 1419-1431, doi:10.1016/j.celrep.2014.07.038.
441. El-Magd, M.A.; Abdelfattah-Hassan, A.; Elsisy, R.A.; Hawsawi, Y.M.; Oyouni, A.A.; Al-Amer, O.M.; El-Shetry, E.S. Expression and function of Ebfl gene during chondrogenesis in chick embryo limb buds. *Gene* **2021**, *803*, 145895, doi:10.1016/j.gene.2021.145895.
442. Primmer, C.R.; Papakostas, S.; Leder, E.H.; Davis, M.J.; Ragan, M.A. Annotated genes and nonannotated genomes: cross-species use of Gene Ontology in ecology and evolution research. *Mol Ecol* **2013**, *22*, 3216-3241, doi:10.1111/mec.12309.
443. Wallis, J.W.; Aerts, J.; Groenen, M.A.; Crooijmans, R.P.; Layman, D.; Graves, T.A.; Scheer, D.E.; Kremitzki, C.; Fedele, M.J.; Mudd, N.K.; et al. A physical map of the chicken genome. *Nature* **2004**, *432*, 761-764, doi:10.1038/nature03030.
444. Rellmann, Y.; Gronau, I.; Hansen, U.; Dreier, R. 4-Phenylbutyric Acid Reduces Endoplasmic Reticulum Stress in Chondrocytes That Is Caused by Loss of the Protein Disulfide Isomerase ERp57. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 6404035, doi:10.1155/2019/6404035.
445. Han, X.; Zhou, J.; Zhang, P.; Song, F.; Jiang, R.; Li, M.; Xia, F.; Guo, F.J. IRE1alpha dissociates with BiP and inhibits ER stress-mediated apoptosis in cartilage development. *Cell Signal* **2013**, *25*, 2136-2146, doi:10.1016/j.cellsig.2013.06.011.
446. Huang, Z.; Zhou, M.; Wang, Q.; Zhu, M.; Chen, S.; Li, H. Mechanical and hypoxia stress can cause chondrocytes apoptosis through over-activation of endoplasmic reticulum stress. *Arch Oral Biol* **2017**, *84*, 125-132, doi:10.1016/j.archoralbio.2017.09.021.
447. Wojtas, A.M.; Sens, J.P.; Kang, S.S.; Baker, K.E.; Berry, T.J.; Kurti, A.; Daugherty, L.; Jansen-West, K.R.; Dickson, D.W.; Petrucelli, L.; et al. Astrocyte-derived clusterin suppresses amyloid formation in vivo. *Mol Neurodegener* **2020**, *15*, 71, doi:10.1186/s13024-020-00416-1.
448. Hammad, S.M.; Ranganathan, S.; Loukinova, E.; Twal, W.O.; Argraves, W.S. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 18644-18649, doi:10.1074/jbc.272.30.18644.
449. Ooka, S.; Matsui, T.; Nishioka, K.; Kato, T. Autoantibodies to low-density-lipoprotein-receptor-related protein 2 (LRP2) in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* **2003**, *5*, R174-180, doi:10.1186/ar754.
450. Filippini, A.; Mutti, V.; Faustini, G.; Longhena, F.; Ramazzina, I.; Rizzi, F.; Kaganovich, A.; Roosen, D.A.; Landeck, N.; Duffy, M.; et al. Extracellular clusterin limits the uptake of alpha-synuclein fibrils by murine and human astrocytes. *Glia* **2021**, *69*, 681-696, doi:10.1002/glia.23920.
451. Greene, M.J.; Sam, F.; Soo Hoo, P.T.; Patel, R.S.; Seldin, D.C.; Connors, L.H. Evidence for a functional role of the molecular chaperone clusterin in amyloidotic cardiomyopathy. *Am J Pathol* **2011**, *178*, 61-68, doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.015.
452. Matsuzaki, T.; Akasaki, Y.; Olmer, M.; Alvarez-Garcia, O.; Reixach, N.; Buxbaum, J.N.; Lotz, M.K. Transthyretin deposition promotes progression of osteoarthritis. *Aging Cell* **2017**, *16*, 1313-1322, doi:10.1111/ace.12665.
453. Barreto, G.; Soliymani, R.; Baumann, M.; Waris, E.; Eklund, K.K.; Zenobi-Wong, M.; Lalowski, M. Functional analysis of synovial fluid from osteoarthritic knee and carpometacarpal joints unravels different molecular profiles. *Rheumatology (Oxford)* **2019**, *58*, 897-907, doi:10.1093/rheumatology/key232.
454. Kumita, J.R.; Poon, S.; Caddy, G.L.; Hagan, C.L.; Dumoulin, M.; Yerbury, J.J.; Stewart, E.M.; Robinson, C.V.; Wilson, M.R.; Dobson, C.M. The extracellular chaperone clusterin potently inhibits

- human lysozyme amyloid formation by interacting with prefibrillar species. *J Mol Biol* **2007**, *369*, 157-167, doi:10.1016/j.jmb.2007.02.095.
455. Greenwald, R.A.; Josephson, A.S.; Diamond, H.S.; Tsang, A. Human cartilage lysozyme. *J Clin Invest* **1972**, *51*, 2264-2270, doi:10.1172/JCI107035.
456. Bennett, R.M.; Skosey, J.L. Lactoferrin and lysozyme levels in synovial fluid: differential indices of articular inflammation and degradation. *Arthritis Rheum* **1977**, *20*, 84-90, doi:10.1002/art.1780200115.
457. Poon, S.; Treweek, T.M.; Wilson, M.R.; Easterbrook-Smith, S.B.; Carver, J.A. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett* **2002**, *513*, 259-266, doi:10.1016/s0014-5793(02)02326-8.
458. Jessop, C.E.; Chakravarthi, S.; Garbi, N.; Hammerling, G.J.; Lovell, S.; Bulleid, N.J. ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J* **2007**, *26*, 28-40, doi:10.1038/sj.emboj.7601505.
459. Wilson, R.; Golub, S.B.; Rowley, L.; Angelucci, C.; Karpievitch, Y.V.; Bateman, J.F.; Fosang, A.J. Novel Elements of the Chondrocyte Stress Response Identified Using an in Vitro Model of Mouse Cartilage Degradation. *J Proteome Res* **2016**, *15*, 1033-1050, doi:10.1021/acs.jproteome.5b01115.
460. Koltai, T. Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *Oncotargets Ther* **2014**, *7*, 447-456, doi:10.2147/OTT.S58622.
461. Miao, G.; Zang, X.; Hou, H.; Sun, H.; Wang, L.; Zhang, T.; Tan, Y.; Liu, W.; Ye, P.; Gao, L.; et al. Bax Targeted by miR-29a Regulates Chondrocyte Apoptosis in Osteoarthritis. *Biomed Res Int* **2019**, *2019*, 1434538, doi:10.1155/2019/1434538.
462. Yu, R.G.; Zhang, J.Y.; Liu, Z.T.; Zhuo, Y.G.; Wang, H.Y.; Ye, J.; Liu, N.; Zhang, Y.Y. Text Mining-Based Drug Discovery in Osteoarthritis. *J Healthc Eng* **2021**, *2021*, 6674744, doi:10.1155/2021/6674744.
463. Materia, S.; Cater, M.A.; Klomp, L.W.; Mercer, J.F.; La Fontaine, S. Clusterin and COMMD1 independently regulate degradation of the mammalian copper ATPases ATP7A and ATP7B. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 2485-2499, doi:10.1074/jbc.M111.302216.
464. Burkhead, J.L.; Morgan, C.T.; Shinde, U.; Haddock, G.; Lutsenko, S. COMMD1 forms oligomeric complexes targeted to the endocytic membranes via specific interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 696-707, doi:10.1074/jbc.M804766200.
465. Fife, R.S.; Moody, S.; Houser, D.; Proctor, C. Studies of copper transport in cultured bovine chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* **1994**, *1201*, 19-22, doi:10.1016/0304-4165(94)90145-7.
466. Zhou, J.; Liu, C.; Sun, Y.; Francis, M.; Ryu, M.S.; Grider, A.; Ye, K. Genetically predicted circulating levels of copper and zinc are associated with osteoarthritis but not with rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2021**, *29*, 1029-1035, doi:10.1016/j.joca.2021.02.564.
467. Yazar, M.; Sarban, S.; Kocyigit, A.; Isikan, U.E. Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Trace Elem Res* **2005**, *106*, 123-132, doi:10.1385/BTER:106:2:123.
468. Andrades, J.A.; Nimni, M.E.; Becerra, J.; Eisenstein, R.; Davis, M.; Sorgente, N. Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization. *Exp Cell Res* **1996**, *227*, 208-213, doi:10.1006/excr.1996.0269.
469. Kemp, P.A.; Spragg, J.H.; Brown, J.C.; Morgan, B.P.; Gunn, C.A.; Taylor, P.W. Immunohistochemical determination of complement activation in joint tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis using neoantigen-specific monoclonal antibodies. *J Clin Lab Immunol* **1992**, *37*, 147-162.
470. Kontinen, Y.T.; Ceponis, A.; Meri, S.; Vuorikoski, A.; Kortekangas, P.; Sorsa, T.; Sukura, A.; Santavirta, S. Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. *Ann Rheum Dis* **1996**, *55*, 888-894, doi:10.1136/ard.55.12.888.
471. Yang, C.R.; Yeh, S.; Leskov, K.; Odegaard, E.; Hsu, H.L.; Chang, C.; Kinsella, T.J.; Chen, D.J.; Boothman, D.A. Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Res* **1999**, *27*, 2165-2174, doi:10.1093/nar/27.10.2165.
472. Kang, D.; Lee, J.; Wu, C.; Guo, X.; Lee, B.J.; Chun, J.S.; Kim, J.H. The role of selenium metabolism and selenoproteins in cartilage homeostasis and arthropathies. *Exp Mol Med* **2020**, *52*, 1198-1208, doi:10.1038/s12276-020-0408-y.
473. Chen, P.; Wang, C.; Ma, X.; Zhang, Y.; Liu, Q.; Qiu, S.; Liu, Q.; Tian, J.; Ni, J. Direct Interaction of Selenoprotein R with Clusterin and Its Possible Role in Alzheimer's Disease. *PLoS One* **2013**, *8*, e66384, doi:10.1371/journal.pone.0066384.
474. Yan, J.; Zheng, Y.; Min, Z.; Ning, Q.; Lu, S. Selenium effect on selenoprotein transcriptome in chondrocytes. *Biometals* **2013**, *26*, 285-296, doi:10.1007/s10534-013-9610-x.
475. Deng, X.; Tan, Y. A national cross-sectional analysis of selenium intake and risk of osteoarthritis: NHANES 2003-2016. *Front Public Health* **2022**, *10*, 1047605, doi:10.3389/fpubh.2022.1047605.

476. Alto, L.T.; Terman, J.R. Semaphorins and their Signaling Mechanisms. *Methods Mol Biol* **2017**, *1493*, 1-25, doi:10.1007/978-1-4939-6448-2\_1.
477. Sun, J.; Wei, X.; Wang, Z.; Liu, Y.; Lu, J.; Lu, Y.; Cui, M.; Zhang, X.; Li, F. Inflammatory milieu cultivated Sema3A signaling promotes chondrocyte apoptosis in knee osteoarthritis. *J Cell Biochem* **2018**, *119*, 2891-2899, doi:10.1002/jcb.26470.
478. Lei, J.; Fu, Y.; Zhuang, Y.; Zhang, K. Sema4D Aggravated LPS-Induced Injury via Activation of the MAPK Signaling Pathway in ATDC5 Chondrocytes. *Biomed Res Int* **2020**, *2020*, 8691534, doi:10.1155/2020/8691534.
479. Shim, Y.J.; Kang, B.H.; Choi, B.K.; Park, I.S.; Min, B.H. Clusterin induces the secretion of TNF-alpha and the chemotactic migration of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **2012**, *422*, 200-205, doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.162.
480. Kapoor, M.; Martel-Pelletier, J.; Lajeunesse, D.; Pelletier, J.P.; Fahmi, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2011**, *7*, 33-42, doi:10.1038/nrrheum.2010.196.
481. Chen, D.; Wang, Y.; Zhang, K.; Jiao, X.; Yan, B.; Liang, J. Antisense oligonucleotide against clusterin regulates human hepatocellular carcinoma invasion through transcriptional regulation of matrix metalloproteinase-2 and E-cadherin. *Int J Mol Sci* **2012**, *13*, 10594-10607, doi:10.3390/ijms130810594.
482. Falgarone, G.; Essabbani, A.; Dumont, F.; Cagnard, N.; Mistou, S.; Chiocchia, G. Implication of clusterin in TNF-alpha response of rheumatoid synovitis: lesson from in vitro knock-down of clusterin in human synovial fibroblast cells. *Physiol Genomics* **2012**, *44*, 229-235, doi:10.1152/physiolgenomics.00095.2010.
483. Devauchelle, V.; Essabbani, A.; De Pinieux, G.; Germain, S.; Tourneur, L.; Mistou, S.; Margottin-Goguet, F.; Anract, P.; Migaud, H.; Le Nen, D.; et al. Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **2006**, *177*, 6471-6479, doi:10.4049/jimmunol.177.9.6471.
484. Zhang, F.; Sha, J.; Wood, T.G.; Galindo, C.L.; Garner, H.R.; Burkart, M.F.; Suarez, G.; Sierra, J.C.; Agar, S.L.; Peterson, J.W.; et al. Alteration in the activation state of new inflammation-associated targets by phospholipase A2-activating protein (PLAA). *Cell Signal* **2008**, *20*, 844-861, doi:10.1016/j.cellsig.2008.01.004.
485. Park, J.Y.; Pillinger, M.H.; Abramson, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* **2006**, *119*, 229-240, doi:10.1016/j.clim.2006.01.016.
486. Flanagan, L.; Whyte, L.; Chatterjee, N.; Tenniswood, M. Effects of clusterin over-expression on metastatic progression and therapy in breast cancer. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 107, doi:10.1186/1471-2407-10-107.
487. Criswell, T.; Klokov, D.; Beman, M.; Lavik, J.P.; Boothman, D.A. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther* **2003**, *2*, 372-380, doi:10.4161/cbt.2.4.430.
488. Seo, H.Y.; Kim, M.K.; Jung, Y.A.; Jang, B.K.; Yoo, E.K.; Park, K.G.; Lee, I.K. Clusterin decreases hepatic SREBP-1c expression and lipid accumulation. *Endocrinology* **2013**, *154*, 1722-1730, doi:10.1210/en.2012-2009.
489. Papathanasiou, I.; Anastasopoulou, L.; Tsezou, A. Cholesterol metabolism related genes in osteoarthritis. *Bone* **2021**, *152*, 116076, doi:10.1016/j.bone.2021.116076.
490. Gelissen, I.C.; Hochgrebe, T.; Wilson, M.R.; Easterbrook-Smith, S.B.; Jessup, W.; Dean, R.T.; Brown, A.J. Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J* **1998**, *331 (Pt 1)*, 231-237, doi:10.1042/bj3310231.
491. Lee, K.B.; Jeon, J.H.; Choi, I.; Kwon, O.Y.; Yu, K.; You, K.H. Clusterin, a novel modulator of TGF-beta signaling, is involved in Smad2/3 stability. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *366*, 905-909, doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.033.
492. Yang, X.; Chen, L.; Xu, X.; Li, C.; Huang, C.; Deng, C.X. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* **2001**, *153*, 35-46, doi:10.1083/jcb.153.1.35.
493. Thielen, N.G.M.; van der Kraan, P.M.; van Caam, A.P.M. TGFbeta/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8090969.
494. Zhou, J.; Singh, N.; Galske, J.; Hudobenko, J.; Hu, X.; Yan, R. BACE1 regulates expression of Clusterin in astrocytes for enhancing clearance of beta-amyloid peptides. *Mol Neurodegener* **2023**, *18*, 31, doi:10.1186/s13024-023-00611-w.
495. Gupta, D.P.; Lee, Y.S.; Choe, Y.; Kim, K.T.; Song, G.J.; Hwang, S.C. Knee osteoarthritis accelerates amyloid beta deposition and neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain* **2023**, *16*, 1, doi:10.1186/s13041-022-00986-9.

496. Nugent, A.E.; Speicher, D.M.; Gradisar, I.; McBurney, D.L.; Baraga, A.; Doane, K.J.; Horton, W.E., Jr. Advanced osteoarthritis in humans is associated with altered collagen VI expression and upregulation of ER-stress markers Grp78 and bag-1. *J Histochem Cytochem* **2009**, *57*, 923-931, doi:10.1369/jhc.2009.953893.
497. Ukita, M.; Matsushita, K.; Tamura, M.; Yamaguchi, T. Histone H3K9 methylation is involved in temporomandibular joint osteoarthritis. *Int J Mol Med* **2020**, *45*, 607-614, doi:10.3892/ijmm.2019.4446.
498. Pucci, S.; Mazzarelli, P.; Sesti, F.; Boothman, D.A.; Spagnoli, L.G. Interleukin-6 affects cell death escaping mechanisms acting on Bax-Ku70-Clusterin interactions in human colon cancer progression. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 473-481, doi:10.4161/cc.8.3.7652.
499. Van Lenten, B.J.; Wagner, A.C.; Navab, M.; Fogelman, A.M. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 1923-1929, doi:10.1074/jbc.M004074200.
500. Zhao, L.; Melenhorst, J.J.; Hennighausen, L. Loss of interleukin 6 results in delayed mammary gland involution: a possible role for mitogen-activated protein kinase and not signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* **2002**, *16*, 2902-2912, doi:10.1210/me.2001-0330.
501. Mercurio, F.; Manning, A.M. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* **1999**, *18*, 6163-6171, doi:10.1038/sj.onc.1203174.
502. Li, X.; Massa, P.E.; Hanidu, A.; Peet, G.W.; Aro, P.; Savitt, A.; Mische, S.; Li, J.; Marcu, K.B. IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 45129-45140, doi:10.1074/jbc.M205165200.
503. O'Sullivan, J.; Whyte, L.; Drake, J.; Tenniswood, M. Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. *Cell Death Differ* **2003**, *10*, 914-927, doi:10.1038/sj.cdd.4401254.
504. Humphreys, D.; Hochgrebe, T.T.; Easterbrook-Smith, S.B.; Tenniswood, M.P.; Wilson, M.R. Effects of clusterin overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-mediated death of L929 cells. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15233-15243, doi:10.1021/bi9703507.
505. Xie, Z.; Harris-White, M.E.; Wals, P.A.; Frautschy, S.A.; Finch, C.E.; Morgan, T.E. Apolipoprotein J (clusterin) activates rodent microglia in vivo and in vitro. *J Neurochem* **2005**, *93*, 1038-1046, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03065.x.
506. Huttlin, E.L.; Ting, L.; Bruckner, R.J.; Gebreab, F.; Gygi, M.P.; Szpyt, J.; Tam, S.; Zarraga, G.; Colby, G.; Baltier, K.; et al. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* **2015**, *162*, 425-440, doi:10.1016/j.cell.2015.06.043.
507. Burrage, P.S.; Mix, K.S.; Brinckerhoff, C.E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* **2006**, *11*, 529-543, doi:10.2741/1817.
508. Shim, Y.J.; Kang, B.H.; Jeon, H.S.; Park, I.S.; Lee, K.U.; Lee, I.K.; Park, G.H.; Lee, K.M.; Schedin, P.; Min, B.H. Clusterin induces matrix metalloproteinase-9 expression via ERK1/2 and PI3K/Akt/NF-kappaB pathways in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol* **2011**, *90*, 761-769, doi:10.1189/jlb.0311110.
509. Chesnokova, V.; Zonis, S.; Wawrowsky, K.; Tani, Y.; Ben-Shlomo, A.; Ljubimov, V.; Mamelak, A.; Bannykh, S.; Melmed, S. Clusterin and FOXL2 act concordantly to regulate pituitary gonadotroph adenoma growth. *Mol Endocrinol* **2012**, *26*, 2092-2103, doi:10.1210/me.2012-1158.
510. Marongiu, M.; Marcia, L.; Pelosi, E.; Lovicu, M.; Deiana, M.; Zhang, Y.; Puddu, A.; Loi, A.; Uda, M.; Forabosco, A.; et al. FOXL2 modulates cartilage, skeletal development and IGF1-dependent growth in mice. *BMC Dev Biol* **2015**, *15*, 27, doi:10.1186/s12861-015-0072-y.
511. Marongiu, M.; Deiana, M.; Marcia, L.; Sbardellati, A.; Asunis, I.; Meloni, A.; Angius, A.; Cusano, R.; Loi, A.; Crobu, F.; et al. Novel action of FOXL2 as mediator of Colla2 gene autoregulation. *Dev Biol* **2016**, *416*, 200-211, doi:10.1016/j.ydbio.2016.05.022.
512. Malaise, O.; Tachikart, Y.; Constantinides, M.; Mumme, M.; Ferreira-Lopez, R.; Noack, S.; Krettek, C.; Noel, D.; Wang, J.; Jorgensen, C.; et al. Mesenchymal stem cell senescence alleviates their intrinsic and seno-suppressive paracrine properties contributing to osteoarthritis development. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 9128-9146, doi:10.18632/aging.102379.
513. Kalvaityte, U.; Matta, C.; Bernotiene, E.; Pushparaj, P.N.; Kiapour, A.M.; Mobasheri, A. Exploring the translational potential of clusterin as a biomarker of early osteoarthritis. *J Orthop Translat* **2022**, *32*, 77-84, doi:10.1016/j.jot.2021.10.001.
514. Park, J.S.; Lee, W.K.; Kim, H.S.; Seo, J.A.; Kim, D.H.; Han, H.C.; Min, B.H. Clusterin overexpression protects against western diet-induced obesity and NAFLD. *Sci Rep* **2020**, *10*, 17484, doi:10.1038/s41598-020-73927-y.
515. Mobasheri, A.; Rayman, M.P.; Gualillo, O.; Sellam, J.; van der Kraan, P.; Fearon, U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2017**, *13*, 302-311, doi:10.1038/nrrheum.2017.50.

516. Bradley, D. Clusterin as a Potential Biomarker of Obesity-Related Alzheimer's Disease Risk. *Biomark Insights* **2020**, *15*, 1177271920964108, doi:10.1177/1177271920964108.
517. Tang, L.; Wang, Z.B.; Ma, L.Z.; Cao, X.P.; Tan, L.; Tan, M.S. Dynamic changes of CSF clusterin levels across the Alzheimer's disease continuum. *BMC Neurol* **2022**, *22*, 508, doi:10.1186/s12883-022-03038-w.

# 10. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/104/2026.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Patrik  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10080142

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, P.**, Brázda, P., Hajdú, T., Harsányi, B., Juhász, K. Z., Takács, R. Á., Vágó, J., Wang, Z., Coveney, C., Boocock, D. J., Matta, C.: Podocalyxin and ciliary neurotrophic factor receptor are novel components of the surfaceome of chondrogenic cells. *Cell Commun. Signal.* 24 (8), 1-20, 2026.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-025-02552-x>  
IF: 8.9 (2024)
2. **Kovács, P.**, Pushparaj, P. N., Takács, R. Á., Mobasheri, A., Matta, C.: The clusterin connectome: Emerging players in chondrocyte biology and putative exploratory biomarkers of osteoarthritis. *Front. Immunol.* 14, 1-21, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1103097>  
IF: 5.7

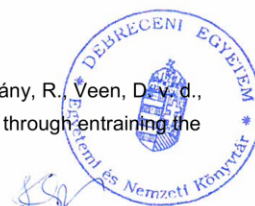
## További közlemények

3. **Kovács, P.**, Vágó, J., Mobasheri, A., Jenei-Lanzl, Z., Zaucke, F., Madry, H., Csernoch, L., Szekanecz, Z., Szondy, Z., Szőör, Á., Szatmári, I., Oláh, T., Matta, C.: Emerging Concepts in Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases: insights from the University of Debrecen Musculoskeletal Symposium 2025. *Osteoarthr. Cartil. Open.* 8 (1), 1-8, 2026.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ocarto.2025.100728>  
IF: 2.8 (2024)
4. **Kovács, P.**, Wang, Z., Hajdú, T., Juhász, K. Z., Katona, É., Takács, R. Á., Vágó, J., Zákány, R., Póliska, S., Szentesi, P., Csernoch, L., Matta, C.: Microgravity-induced transcriptional reprogramming in embryonic chicken limb bud-derived chondrogenic cultures. *Front. Cell. Dev. Biol.* 14, 1-16, 2026.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2026.1746313>  
IF: 4.3 (2024)





5. **Kovács, P.**, Boocock, D. J., Coveney, C., Mobasheri, A., Matta, C.: Aminooxy Biotin-Based Characterization of the Surfaceome of Chondrogenic Cells.  
In: *The Surfaceome: Methods and Protocols* / Csaba Matta, Ali Mobasheri, Roland Takács, Humana Press Inc, New York, 65-79, 2025, (Methods and Protocols)
6. Hajdú, T., **Kovács, P.**, Katona, É., Nguyen, M. N., Vágó, J., Fillér, C., Zákány, R., Emri, G., Tóth, G., Reglődi, D., Juhász, T.: Exploring the Link Between PACAP Signalling and Hyaluronic Acid Production in Melanoma Progression.  
*Int. J. Mol. Sci.* 26 (24), 1-25, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms262412049>  
IF: 4.9 (2024)
7. Juhász, K. Z., Hajdú, T., **Kovács, P.**, Vágó, J., Matta, C., Takács, R. Á.: Hypoxic Conditions Modulate Chondrogenesis through the Circadian Clock: the Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ .  
*Cells.* 13 (6), 1-17, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells13060512>  
IF: 5.2
8. Takács, R. Á., **Kovács, P.**, Ebeid, R. A., Almássy, J., Fodor, J., Ducza, L., Barrett-Jolley, R., Lewis, R., Matta, C.: Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Progenitor Cells of Musculoskeletal Tissues: A Narrative Review.  
*Int. J. Mol. Sci.* 24 (7), 6796, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076796>  
IF: 4.9
9. Vágó, J., Takács, R. Á., **Kovács, P.**, Hajdú, T., Veen, D. v. d., Matta, C.: Combining biomechanical stimulation and chronobiology: a novel approach for augmented chondrogenesis?  
*Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1-7, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2023.1232465>  
IF: 4.3
10. Takács, R. Á., Vágó, J., Póliska, S., Pushparaj, P. N., Ducza, L., **Kovács, P.**, Jin, E. J., Barrett-Jolley, R., Zákány, R., Matta, C.: The temporal transcriptomic signature of cartilage formation.  
*Nucleic Acids Res.* 51 (8), 3590-3617, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkad210>  
IF: 16.6
11. Vágó, J., Katona, É., Takács, R. Á., Dócs, K., Hajdú, T., **Kovács, P.**, Zákány, R., Veen, D. v. d., Matta, C.: Cyclic uniaxial mechanical load enhances chondrogenesis through entraining the molecular circadian clock.  
*J. Pineal Res.* 73 (4), e12827, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12827>  
IF: 10.3





12. Hajdú, T., **Kovács, P.**, Zsigrai, E., Takács, R. Á., Vágó, J., Cho, S., Sasi Szabó, L. A., Becsky, D., Keller-Pintér, A., Emri, G., Rác, K., Reglődi, D., Zákány, R., Juhász, T.: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Has Inhibitory Effects on Melanoma Cell Proliferation and Migration In Vitro.  
*Front Oncol.* 11, 681603, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.681603>  
IF: 5.738

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 73,638**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
14,6**

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

Debrecen, 2026.03.09.



## 11. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

Porcfejlődés, porcsejt, sejt differenciáció, in vitro, csirkeembryo, primer sejt kultúra, nagy sejtsűrűségű micromass sejttenyészet, tömegspektrometria, kvantitatív proteomika, AOB, surfaceome, DEP, heat-map, PPI, western blot, immuncitokémia, CNTFR, PODXL, clusterin, in silico, STRING, IPA, osteoarthritis

Chondrogenesis, chondrocyte, cell differentiation, in vitro, chicken embryo, primary cell culture, high density/micromass cell culture, mass spectrometry, quantitative proteomics, AOB, surfaceome, DEP, heat-map, PPI, western blot, immunocytochemistry, CNTRF, PODXL, clusterin, in silico, STRING, IPA, osteoarthritis

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretném kifejezni a hálámat témavezetőmnek, Dr. Matta Csabának, amiért 2020-ban lehetőséget biztosított számomra, hogy csatlakozzak a Chondro-omikai Laboratóriumhoz, majd 2021-ben támogatta doktori tanulmányaim megkezdését. TDK-hallgatói éveimtől kezdve folyamatosan segítette szakmai fejlődésemet széleskörű tudományos ismereteivel, következetes iránymutatásával és inspiráló szemléletével. Laborvezetőként számos pályázat elkészítésében is példát mutatott, miközben meghatározó szerepet játszott tudományos gondolkodásom és professzionális személyiségem formálásában.

Hasonló mértékű hálával tartozom Dr. Hajdú Tibornak, aki 2016-ban, másodéves orvostanhallgatóként hívott meg a Jelátviteli Kutatólaboratóriumba, és bevezetett a kísérletes munka metodikai alapjaiba, formálta a kutatói szemléletmódot, valamint felkészített az öt TDK-előadásomra és az egyetemi pályamunkám megírására. Azóta is mentorként támogat, és az évek során kapott útmutatásai fontos szerepet játszottak mind a szakmai, mind az egyéni fejlődésemben.

Köszönetemet fejezem ki a Chondro-omikai Laboratórium további munkatársainak, elsősorban jókedvű „padtársamnak”, Dr. Vágó Juditnak (Jucinak), továbbá Dr. Takács Rolandnak (Rolinak), Juhász Krisztiánnak (Krisznek), Dr. Ngoc Nguyen-nek (Pearl-nek) és Dr. Zhangzheng Wang-nak, akik nemcsak a kísérletek során nyújtottak jelentős segítséget, hanem a mindennapokhoz is támogató, barátságos és inspiráló légkört teremtettek.

Hálás vagyok továbbá Dr. Juhász Tamásnak, Dr. Szegeczki Vincének, Katona Évának, Dr. Zákány Rózának, Szücs Csillának és Fillér Csabának az évek során nyújtott szakmai segítségükért, türelmükért és támogatásukért. Különösen nagyra értékelem, hogy ebben az motiváló és kifejezetten családi közösségben dolgozhattam.

Megkülönböztetett köszönettel tartozom Biróné Barna Krisztinának, akinek precíz, megbízható asszisztensi munkája és rendkívüli elkötelezettsége nélkül a disszertációmban bemutatott eredmények nem jöhettek volna létre.

Szeretném megköszönni kollaborációs partnereinknek, Dr. David J. Boocock-nak és Dr. Clare Coveney-nek, hogy elvégezték mintáink tömegspektrometriai analízisét. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Brázda Péternek, aki magas szintű bioinformatikai szakértelmével hozzájárult a disszertációban bemutatott eredmények vizualizációjához.

Köszönöm az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet igazgatójának, Dr. Szücs Péternek, hogy lehetőséget biztosított számomra az Intézetben végzett kutatómunkára, valamint köszönöm az Anatómiai Intézet valamennyi munkatársának az elmúlt évek közös munkáját.

Végül, de nem utolsósorban, a legmélyebb hálával tartozom Szüleimnek, Öcsémnek, Keresztszüleimnek és a teljes Családomnak, akik mindvégig feltétlen támogatásukról biztosítottak. Türelemmel és szeretettel kísérték végig tanulmányaimat, majd munkámat, és minden élethelyzetben stabil háttérrel jelentettek számomra.

A disszertációban elvégzett kísérletes munkákhoz a következő pályázatok által biztosított források járultak hozzá: az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja, az NKFIH Fialat Kutatói Kiválósági Programja (FK-134304), a Kulturális és Innovációs Minisztérium Egyetemi Kutatói Ösztöndíj Programja (EKÖP-24-4-II-DE-58, EKÖP-24-3-I-DE-290, EKÖP-24-3-II-DE-1), valamint a Gróf Tisza István Debreceni Egyetemért Alapítvány Kiválósági PhD Ösztöndíja.

## 13. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

### ÁBRÁK

- **2.1. ábra** A hyalinporc szövettani felépítésének sematikus ábrázolása. 13. oldal
- **2.2. ábra** A hyalinporc ECM-et alkotó komponensek szerkezeti viszonyát bemutató sematikus ábra. 14. oldal
- **2.3. ábra** A chondrogenesis sematikus folyamatábrája. 18. oldal
- **2.4. ábra** A képen egy 4,5 napos csirkeembryo fénymikroszkópos felvétele látható. 21. oldal
- **2.5. ábra** Az *in vitro* porcdifferenciáció lépéseinek sematikus ábrázolása. 22. oldal
- **2.6. ábra** A transzmembrán fehérjék leggyakoribb 4 funkciójának bemutatása. 26. oldal
- **2.7. ábra** A clusterin szintézise és izoformáinak funkciója a sejten belül. 47. oldal
- **4.1. ábra** A sejt felszíni fehérjék izolálása és dúsítása aminoxy-biotin technikával. 59. oldal
- **4.2. ábra** A keresett fehérjék kimutatása chemiluminescens indirekt ELISA módszerrel. 66. oldal
- **5.1. ábra** Az *in vitro* chondrogenesis meghatározott napjain (1., 3., 6., 10., 15. tenyésztési napok) megfestett sejt kultúrák felvételei és GAG tartalmának szemikvantitatív kiértékelése. 76. oldal
- **5.2. ábra** Kvantitatív proteomikai analízis a chondrogenikus micromass sejt kultúrák meghatározott tenyésztési napjaiból származó teljes sejt lizátumok (A) és AOB dúsított minták (B) esetében. 78. oldal
- **5.3. ábra** A chondrogenikus sejt kultúrákból AOB-dúsítást követően kvantitatív tömegspektrometriával meghatározott DEP-ek összehasonlítása az egymást követő mintavételi napok között (1–3, 3–6, 6–10, 10–15. nap). 81. oldal
- **5.4. ábra** A chondrogenesis során az AOB-dúsított mintákban kimutatott DEP-ek expresszió szerinti csoportosítása a k-means algoritmus alkalmazásával. 83. oldal
- **5.5. ábra** Az egyes DEP klaszterekbe tartozó sejt felszíni fehérjék közötti PPI hálózat elemzése a STRING adatbázis segítségével. 85-86. oldal
- **5.6. ábra** A chondrogenesis során az AOB-dúsított fehérjelisták kvalitatív összehasonlítása a különböző tenyésztési napok között Venn-diagram felhasználásával. 88. oldal
- **5.7. ábra** A CNTFR és a PODXL fehérjék kvantitatív tömegspektrometriai elemzésből származó expressziós adatai. 89. oldal
- **5.8. ábra** A CNTFR és a PODXL expressziójának ellenőrzése meghatározott tenyésztési napokból származó chondrogenikus micromass sejt kultúrák teljes sejt lizátumain. 90. oldal
- **5.9. ábra** A CNTFR és a PODXL cellularis elhelyezkedésének ellenőrzése chondrogenikus micromass sejt kultúrákon immuncitokémiai jelölést követően készült konfokális felvételek felhasználásával. 91. oldal
- **5.10. ábra** A clusterin STRING adatbázisból létrehozott interakciós hálózata. 92. oldal
- **5.11. ábra** A clusterin által szabályozott molekulák hálózata az IPA tudásbázisa alapján. 95. oldal
- **5.12. ábra** Az IPA tudásbázis felhasználásával molekuláris aktivitás predikción alapuló interakciók a clusterin és az OA-ban szerepet játszó partnerek között. 96. oldal

## TÁBLÁZATOK

- **4.1. táblázat** A mintákban kimutatott fehérjék surfaceome szűrésére használt GO kódok 63. oldal
- **4.2. táblázat** A kiszűrt sejtfelszíni fehérjék kategorizálása funkcióik alapján különböző kulcsszavak segítségével 64. oldal
- **5.1. táblázat** A sejtfelszíni fehérje (AOB) dúsított és a teljes sejtizátum (total proteom) minták összehasonlító táblázata kismértékű átfedést mutat. Megközelítőleg mindössze a fehérjék 23%-át sikerült mindkét frakcióban azonosítani. 79. oldal
- **5.2. táblázat** A kiszelektált sejtfelszíni fehérjék funkcionális besorolása GO annotációk alapján. A 4 fő funkcionális kategória, valamint az egyéb fehérjék relatív megoszlása a porcdifferenciáció különböző napjain. 86. oldal
- **5.3. táblázat** A clusterin STRING-hálózatában szereplő interakciós entitások a kapcsolatok számai alapján csökkenő sorrendben. A clusterinnel közvetlen kapcsolatban álló fehérjék dőlt betűvel szerepelnek. 93. oldal
- **5.4. táblázat** A Cytoscape szoftver szövegelemző (text-mining) funkciója által a clusterin és osteoarthritis keresőszavak felhasználásával létrehozott interakciós hálózat elemei. Az entitásokat a kapcsolatok száma alapján csökkenő sorrendben tüntettünk fel. Az első és második rétegben található interaktorokat külön soroltuk fel. 94. oldal

## **14. FÜGGELÉKEK**

Az értekezést megalapozó közlemények különnyomatai.