

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Hajdú Tibor**

**N-metil-D-aszpartát típusú glutamát receptorok  
*in vitro* vizsgálata nem excitábilis sejteken**

**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**N-metil-D-aszpartát típusú glutamát receptorok  
*in vitro* vizsgálata nem excitábilis sejteken**

**Dr. Hajdú Tibor**

**Témavezető: Dr. Zákány Róza, PhD**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022**

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezetés és célkitűzés .....	7
2. Irodalmi áttekintés .....	10
2.1. Az N-metil-D-aszpartát receptor.....	10
2.1.1. A glutamát receptorokról általában.....	10
2.1.2. Az N-metil-D-aszpartát receptor jellemzői .....	11
2.1.2.1. Az NMDAR-ok klasszikus kompozíciója.....	11
2.1.2.2. A GluN3 alegység és érdekes heterotetramer alternatívák .....	14
2.2. A kalcium és a sejtek jelátviteli folyamatai.....	15
2.3. Az idegrendszeren kívül I.: az ízületi porc .....	17
2.3.1. A porcszövetről röviden.....	17
2.3.2. A porcdifferenciáció.....	20
2.3.2.1. A porcszövet fejlődésének <i>in vitro</i> megközelítése.....	20
2.3.2.2. A porcfejlődés molekuláris gépezetének fogaskerekei.....	21
2.3.3. Amit vázrendszeri sejtekben az NMDAR-okról és a Ca <sup>2+</sup> -okról eddig tudunk.....	24
2.4. Az idegrendszeren kívül II.: egészséges és patológiás pigmentsejtek .....	25
2.4.1. Melanocyták a bőr epidermisében .....	25
2.4.2. Melanoma malignum cutis.....	27
2.4.2.1. A pigmentes bőrgyógyászati jelenségek problémája .....	27
2.4.2.2. A melanoma epidemiológiája és rizikófaktorai .....	28
2.4.2.3. A melanoma manifesztációja .....	30
2.4.3. Amit humán pigmentsejtekben az NMDAR-okról és a Ca <sup>2+</sup> -okról eddig tudunk. ....	31
3. Anyagok és módszerek.....	34
3.1. Porcosodó, mesenchymalis, nagy sejtsűrűségű (HD) kultúrák.....	34
3.2. Melanocyták és melanoma sejt kultúrák .....	35
3.3. Az mRNA expresszió vizsgálata .....	35
3.3.1. RNS izolálás .....	35
3.3.2. Reverz transzkripció.....	36
3.3.3. Polimeráz láncreakció.....	36
3.4. Fehérjeexpressziós vizsgálatok.....	39
3.4.1. A minták preparálása.....	39

3.4.2. Szubcelluláris frakcionálás .....	40
3.4.3. SDS gélelektroforézis.....	40
3.5. Immuncitokémiai reakciók.....	43
3.6. Konfokális mikroszkópia .....	45
3.7. Szekretált glutamát koncentráció meghatározása.....	45
3.8. Farmakológiai kezelések és funkcionális vizsgálatok porcosodó sejteken.....	46
3.8.1. Alkalmazott farmakonok .....	46
3.8.2. A metabolikus aktivitás (életképesség) vizsgálata .....	47
3.8.3. A sejtsztódás vizsgálata .....	47
3.8.4. A porc mátrix termelés analízise .....	48
3.8.5. A citoszolikus Ca <sup>2+</sup> -koncentráció és Ca <sup>2+</sup> -tranziensek vizsgálata.....	49
3.9. Statisztikai analízis .....	50
4. Eredmények.....	51
4.1. NMDAR-ok vizsgálata chondrogenicus sejtekben.....	51
4.1.1. A differenciálódó porcsejtek NMDAR alegységeket expresszálnak .....	51
4.1.2. A porcfejlődés kritikus napján az alegységek lokalizációi csatornaformálást sejtetnek.....	54
4.1.3. A chondrogenicus sejtek glutamátot termelnek .....	55
4.1.4. Az NMDAR-ok farmakológiai modulálása változatos hatásokat okoz .....	55
4.1.5. A lokálisan adagolt NMDA Ca <sup>2+</sup> -tranzienseket eredményez.....	57
4.2. NMDAR-ok vizsgálata humán melanocytákban és melanoma sejtekben .....	60
4.2.1. A pigmentsejteket teljes NMDAR alegység mRNS készlet jellemzi .....	60
4.2.2. Az alegységek fehérjeexpressziója eltér melanocytákban és melanoma sejtekben .....	61
4.2.3. Az alegységek sejtmagi kolokalizációt mutatnak melanoma sejtekben.....	62
5. Megbeszélés .....	68
5.1. Az NMDAR-ok szerepe chondrogenicus sejtek differenciációjában.....	68
5.1.1. Az NMDAR alegységei expresszálódnak a porcosodó kultúrákban .....	68
5.1.2. Az NMDAR-ok farmakológiai modulálása befolyásolja a chondrogenesist.....	70
5.1.3. A chondrogenicus sejtek NMDAR-mediált Ca <sup>2+</sup> -jelei.....	71
5.2. Az NMDAR-ok összefüggései a daganatos sejtfenotípussal humán pigmentsejtekben.....	73
5.2.1. Az egészséges és patológiás pigmentsejtek NMDAR alegység expressziója eltérő .....	74
5.2.2. Szokatlan összetételű NMDAR-ok a melanoma sejtek magjában.....	74
5.3. Idegrendszeren kívüli, nem excitábilis sejtek az NMDAR-ok és Ca <sup>2+</sup> -ok keresztmetszetében.....	76
5.3.1. Az NMDAR-ok a differenciálódó porcsejtek Ca <sup>2+</sup> -jelátviteli eszköztárának tagjai.....	76

5.3.2. Újszerű alternatívák a melanoma sejtek $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisában.....	79
5.4. Záró gondolatok .....	82
6. Új eredmények.....	84
7. Összefoglalás.....	85
8. Summary .....	86
9. Hivatkozások .....	87
10. Közlemények listája .....	96
11. Tárgyszavak.....	99
12. Keywords .....	100
13. Köszönetnyilvánítás .....	101
14. Függelék.....	102

## Rövidítések jegyzéke

<b>[Ca<sup>2+</sup>]</b> : Ca <sup>2+</sup> -koncentráció	<b>NCX</b> : Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -exchanger
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub></b> : citoszolikus Ca <sup>2+</sup> -koncentráció	<b>NFAT</b> : nuclear factor for activated T-lymphocytes
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> : intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -koncentráció	<b>NHEM</b> : normál humán epidermális melanocyt
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>n</sub></b> : sejtmagi Ca <sup>2+</sup> -koncentráció	<b>NLS</b> : nukleáris lokalizációs szignál
<b><sup>3</sup>H-</b> : trícium	<b>NMDA</b> : N-metil-D-aszpartát
<b>AMPA</b> : α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolopionsav	<b>NMDAR</b> : N-metil-D-aszpartát receptor
<b>ATP</b> : adenzin-trifoszfát	<b>NR</b> : nukleoplazmatikus retikulum
<b>BRAF</b> : rágszóó sarcoma virális (v-ra f) onkogén homológ B1	<b>NRAS</b> : neuroblastoma RAS virális (v-ras) onkogén homológ
<b>CaMKII</b> : Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-függő kináz II	<b>OA</b> : osteoarthritis
<b>cAMP</b> : ciklikus adenzin-monofoszfát	<b>OD</b> : optikai denzitás
<b>CDK4</b> : ciklin-dependens kináz 4	<b>OK</b> : oldószeres kontroll
<b>CDKN2A</b> : ciklin-dependens kináz inhibitor 2A	<b>P2X</b> : purinerg 2X receptor
<b>cDNS</b> : komplementer dezoxiribonukleinsav	<b>P2Y</b> : purinerg 2Y receptor
<b>CREB</b> : ciklikus AMP reszponzív elem kötő (cyclic AMP response element binding)	<b>PARP</b> : poli(ADP)ribóz-polimeráz
<b>DAPI</b> : diamidino-2-fenilindol (diamidino-2-phenylindole)	<b>PBST</b> : 0,1% Tween20-szal kiegészített foszfátpufferelt sóoldat (phosphate buffered saline with 0,1% Tween20)
<b>DCKA</b> : 5,7-diklorokinurén-sav	<b>PG</b> : proteoglikán
<b>DMMK</b> : dimetilmetilénkék	<b>PKA</b> : proteínkináz A
<b>dNTP</b> : dezinukleotid trifoszfát	<b>PKC</b> : proteínkináz C
<b>EC</b> : extracelluláris	<b>PLC</b> : foszfolipáz C
<b>ECM</b> : extracelluláris mátrix	<b>RB</b> : retinoblastoma
<b>ER</b> : endoplazmatikus retikulum	<b>RT-PCR</b> : reverz transzkripciót követő polimerázláncreakció (reverse transcription followed by polymerase chain reaction)
<b>ERK1/2</b> : extracelluláris szignál regulált kináz 1/2	<b>SDS</b> : nátrium-dodecilszulfát (sodium-dodecylsulphate)
<b>FBS</b> : főtális marha szérummal (FBS, foetal bovine serum)	<b>SERCA</b> : szarko/endoplazmatikus retikulum Ca <sup>2+</sup> ATPáz
<b>GAG</b> : glükózaminoglikán	<b>SLC17A7 és 6</b> : a VGLUT1 és 2 génjei
<b>GAPDH</b> : gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz	<b>SOCE</b> : raktár által vezérelt Ca <sup>2+</sup> -belépés (store operated Ca <sup>2+</sup> -entry)
<b>GluN1</b> : NMDAR egyes alegység	<b>STIM</b> : stromalis interakciós molekula (stromal interaction molecule)
<b>GluN2</b> : NMDAR kettes alegység	<b>TATABP</b> : TATA box kötő fehérje (TATA box binding protein)
<b>GluN3</b> : NMDAR hármas alegység	<b>TK</b> : toluidin kék
<b>GlyR</b> : glicin receptor	<b>TRP</b> : tranziens receptor potenciál
<b>HD</b> : nagy sejtsűrűségű (high density)	<b>TRPM1/2/7/8</b> : tranziens receptor potenciál melastatin 1/2/7/8
<b>IC</b> : intracelluláris	<b>UV</b> : ultraibolya (ultra violet)
<b>iGluR</b> : ionotróp glutamát receptor	<b>VGLUT1/2</b> : vezikuláris glutamát transzporter 1/2
<b>InsP<sub>3</sub></b> : inozitol-1,4,5-triszfoszfát	<b>wb</b> : western blot
<b>InsP<sub>3</sub>R</b> : inozitol-1,4,5-triszfoszfát receptor	
<b>MAPK</b> : mitogén aktivált proteinkináz	
<b>MC1R</b> : melanocortin-1 receptor	
<b>mGluR</b> : metabotróp glutamát receptorok	
<b>mRNS</b> : messenger ribonukleinsav	
<b>MTT</b> : 3-[4,5-dimetiltiazolil-2]-2,5-difeniltetrazólium bromid	

## 1. Bevezetés és célkitűzés

Ismert, hogy a glutamát a központi idegrendszer legelterjedtebb serkentő neurotranszmittere, mely különféle receptorokon, többek között az ionotróp receptorok közé tartozó N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptorokon (NMDAR) [1] képes kifejteni hatásait. Az NMDAR-okkal 40 éve foglalkozik kiemelten a nemzetközi irodalom, melynek keretében többek között neurobiokémiai, biofizikai és elektrofiziológiai paramétereiket is feltérképezték. A például a tanulásban és a hosszú távú memóriában is fontos szerepet betöltő A receptorioncsatornán kationok, elsősorban  $\text{Ca}^{2+}$ -ok áramlanak át, melyek az NMDAR-okhoz köthető jelátviteli folyamatokban döntő fontosságúak.

Főként kötőszövet-biológiával foglalkozó kutatócsoportunk, a Debreceni Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének Jelátviteli Laboratóriuma, a 2000-es évek közepén fordította érdeklődését az NMDAR-ok felé. Ekkor ugyanis intézetünk egyik neurobiológiai munkacsoportja olyan kontroll szövetet keresett kísérleteikhez, melyben NMDAR-ok egészen biztosan nem voltak jelen. Így esett a választás a porc szövetre, mint kontrollra, azonban a vizsgálatok hamar kimutatták, hogy a porc szövetben az NMDAR alegységei kifejeződnek. Merőben újszerű volt a tapasztalat, hogy egy klasszikus idegrendszeri receptor megjelenjen nem ingerelhető, ún. nem excitábilis sejteken. Mivel azonban az ezredfordulót követően több tudományos közlemény is elkezdett foglalkozni bizonyos neuronális receptorok idegrendszeren kívüli jelenlétével és szerepével, ezért az ízületi porc, az előkísérleteink eredményeire támaszkodva, joggal vált ígéretes vizsgálatok tárgyává.

A váz- és izomrendszer eredetű betegségek prevalenciája fokozatosan növekszik, melyek közül az idős populáció mozgáskorlátozottságának fő okait az életkorhoz köthető és a krónikus gyulladással járó ízületi betegségek képezik [2]. A krónikus vázrendszeri betegségek leggyakoribb formája az osteoarthritis (OA), a szinoviális ízületek degeneratív elváltozása, melyet alacsony fokú gyulladt állapot, progresszív degradáció, a subchondralis csontszövet átépülése és az ízületi porc elvesztése jellemez [3]. Az ízületi porcot érintő betegségek kialakulásának hátterében számos olyan gén állhat, melyek a porcfejlődéshez köthetők [4]. A degeneratív folyamatok az ereket nem tartalmazó ízületi porc gyér öngyógyító képességeiből kifolyólag komoly gyógyászati kihívásokat jelentenek [5]. A chondrogenesis tanulmányozása azonban a porc szövet regeneratív folyamatainak hatékonyabbá tételében is segítségünkre lehet.

Mindemellett a porcfejlődés során végbemenő jelátviteli mechanizmusok jelentős része érzékeny az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) változásaira [6, 7].

Az NMDAR-okat már előttünk, tőlünk függetlenül is vizsgálták vázrendszeri elemekben. Az NMDAR-okon keresztül megvalósuló glutamáterg jelátvitel komplex funkciókért felel a csont átépülése során [8] és többek között rész vesz az osteoblastok és osteoclastok differenciálódásában [9]. A chondrocytákra fókuszáló közlemények közt találunk olyanokat, melyek NMDAR alegységek expressziójáról számolnak be patkány eredetű *in vitro* porcsejt kultúrákban [10-12], illetve olyanokat, melyek érett, humán ízületi porcsejteken dokumentáltak NMDAR-okat [13]. Utóbbi esetben az NMDAR-ok feltételezhetően mechanotranszdukciós útvonalak működésében vesznek részt, illetve szerepük lehet a chondrocyták megváltozott viselkedésében OA során [13]. A fejlődő porcsejtekben azonban még nem vizsgálták az NMDAR-ok szerepét, így a porcdifferenciációban betöltött lehetséges szerepükről korábban még nem jelentek meg publikációk.

Ennek megfelelően munkám céljai voltak, hogy:

- 1) csirke eredetű chondrogenicus modellünkben vizsgáljuk a differenciálódó mesenchymalis sejtek NMDAR alegységeinek kifejeződését,
- 2) meghatározzuk az azonosított NMDAR alegységek celluláris lokalizációját és potenciális kolokalizációját,
- 3) felmérjük, hogy a chondrogenicus sejtek képesek lehetnek-e L-glutamát termelésre és glutamáterg jelátvitel vezérelt sejtfunkció-változásokra,
- 4) különböző farmakonok segítségével megvizsgáljuk az NMDAR-ok által érintett celluláris funkciókat, különös tekintettel a chondrogenesisben létfontosságú porcspecifikus extracelluláris mátrix (ECM) termelését,
- 5) megfigyeljük, hogy az NMDAR-okon keresztül megvalósulnak-e  $Ca^{2+}$ -tranziensek, illetve, hogy a receptorokhoz köthető spontán  $Ca^{2+}$ -események befolyásolják-e a chondrogenesis történéseit.

Munkacsoportunk a 2010-es évek fordulóján pigmentsejtekkel, egészen pontosan humán melanoma sejtekkel, majd bőr eredetű melanocyttákkal is elkezdett foglalkozni. A melanoma malignum cutis a bőr normál pigmentsejtjeiből, a melanocyttákból kiinduló rosszindulatú daganatos folyamat. Agresszivitása és gyors áttétképző képessége okán rossz prognózissal és rendkívül magas halálozási rátával jellemezhető [14]. Éppen ezért képezi intenzív kutatások tárgyát számos munkacsoportnál. A neoplasticus sejteken végezett kísérletek természetesen

megkövetelik az egészséges pigmentsejtek vizsgálatát is. A normál és patológiás pigmentsejteken kapott *in vitro* kísérleti eredmények összevetése gyakorlati jelentőségű tapasztalatokat jelenthetnek a bőrgyógyászat és a patológiai diagnosztika számára.

Az NMDAR-ok pigmentsejteken való *in vitro* vizsgálata az első, ígéretes projektjeink közé tartozott, különös tekintettel a téma gyér irodalmára. Legelső melanoma sejteken végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy bizonyos NMDAR-okat befolyásoló farmakonok hatására a  $Ca^{2+}$ -koncentráció változások vizsgálatára alkalmas fluoreszcens festék (Fura-2), különösen a sejt központi (a sejtmagnak megfelelő) területén, emelkedett  $Ca^{2+}$ -szintet jelzett. Ez a megfigyelés vezetett az NMDAR-ok feltételezett sejtmagi jelenlétének hipotéziséhez, ami figyelembe véve, hogy melanoma sejteken szerzett tapasztalat, akár a daganatos fenotípussal is összefüggésbe hozható. Így kezdtem, 2013-ban, tudományos doktori projektem fő témáját, a daganatos sejtek NMDAR profiljának részletes feltérképezését. Munkám előrehaladtával a projekt kiegészült a kontrollként alkalmazott melanocyták NMDAR-ainak vizsgálatával is.

A 2000-es években folyamatosan bővültek ismereteink a központi idegrendszeren kívüli szervekben, szövetekben azonosított glutamát receptorokról [15]. Ezzel együtt számos publikáció számolt be funkcionálisan aktív receptorok szerepéről patológiás elváltozásokban, elsősorban daganatokban [16]. Tumoros szövetmintákon szerzett tapasztalatok szerint a melanoma sejtek glutamátot képesek felszabadítani [17]. Számos publikáció foglalkozott a melanoma sejtek és melanocyták metabotróp glutamát receptoraival [18], azonban az ionotróp receptorokkal, és azon belül is az NMDAR-okkal kapcsolatban erősen hiányosak az ismereteink.

Mindezek tükrében értekezésem célkitűzéseit azzal folytatnám, hogy:

- 6) meg akarjuk határozni a bőr melanocytáinak NMDAR alegység expressziós profilját,
- 7) kiindulási kísérleteink tapasztalataira támaszkodva több, eltérő stádiumból izolált melanoma sejtvonal szubcelluláris frakcionálása révén kívánjuk pontosan feltérképezni az NMDAR alegységek különböző sejtkompartmentekben való expresszióját,
- 8) immuncitokémiai reakciókkal és konfokális mikroszkóppal megvizsgáljuk a feltételezett NMDAR alegységek subcellularis lokalizációit, illetve potenciális kolokalizációt.

Doktori értekezésem végső célja pedig, hogy a porc- és pigmentsejteken szerzett *in vitro* tapasztalatok függvényében következtetéseket vonjak le az NMDAR-ok ezen nem excitábilis sejtek  $Ca^{2+}$ -függő folyamataiban betöltött szerepét illetően.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. Az N-metil-D-aszpartát receptor**

#### **2.1.1. A glutamát receptorokról általában**

Bizonyos aminosavak – köztük az L-glutamát – idegi stimulusok továbbításában betöltött szerepéről az ötvenes években jelentek meg az első tudományos beszámolók. Elsőként Hayashi és munkacsoportja regisztrálta, hogy egyes, a kísérleti majmok agyfelszínére jutatott aminosavak (glutaminsav, aszparaginsav, homocisztein) konvulziókat képesek kiváltani [19]. Pár évvel később már Curtis és Watkins is dokumentálta a gerincevelői idegsejtek fokozott ingerlékenységét az említett aminosavak alkalmazását követően [20]. Ezeket az aminosavakat a későbbiekben serkentő jellegű, ún. excitatórikus aminosavaknak nevezték el. Mindkét kísérletsorozatban kiemelkedőek voltak a glutaminsavval kapott eredmények, így hamar felmerült annak a gondolata, hogy a korábbiakban csak fehérje alkotóként ismert glutamátnak idegi ingerületátvivő szerepe is lehet. Néhány évtizeddel később az L-glutamátot már az emlősök központi idegrendszerében fellelhető egyik leggyakoribb neurotranszmitterként ismerjük. Az L-glutamát az elsődleges mediátor a szenzoros és motoros információk közvetítésében, illetve a memóriával és tanulással kapcsolatos folyamatokban. Összességében az agykéreg idegsejtjeinek 70–80%-át, míg a szinapszisok 80–90%-át tekinthetjük glutamátergnek [21, 22].

Az L-glutamát hatásai receptorok széles palettáján érvényesülhetnek, amelyeket tulajdonságaik alapján két nagyobb csoportba rendszerezhetjük. Ez alapján beszélhetünk egyrészt a hatvanas-hetvenes években felfedezett ionotróp glutamát receptorok (iGluR) csoportjáról, melyek az agonista bekötődését követően ioncsatornaként viselkednek, másrészt pedig a nyolcvanas években azonosított, G-proteinek – és ezeken keresztül változatos jelátviteli útvonalakat – aktiváló, plazmamembrán fehérjékről, az ún. metabotróp glutamát receptorokról (mGluR).

Az iGluR-ok szerepe leginkább a kémiai szinapszisok erősségének változtathatóságához, azaz a szinaptikus plaszticitáshoz köthető. Ennek manifesztációi a hosszú távú potenciáció, illetve depresszió, melyek elengedhetetlen tényezők a tanulási folyamatok és a memória szempontjából.

Az iGluR-ok családját a hetvenes-nyolcvanas években radioligandumokkal végzett kísérletek alapján két alcsoportra oszthatjuk, melyet a legszélesebb körben elfogadott, szintetikus iGluR

agonista, az N-metil-D-aszpartát (NMDA) nagyfokú specificitása tett lehetővé [1]. Ennek megfelelően beszélhetünk NMDA és nem-NMDA típusú glutamát receptorokról. Utóbbiak közé tartoznak az  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA, vagy régebbi nevén kviszkalát), a kainát és a  $\delta$  típusú glutamát receptorok [23]. E három receptor farmakológiai tulajdonságai és szekvencia homológiái alapján számos átfedést mutat egymással. Igaz rájuk továbbá, hogy nem feszültségfüggők és kinyílásukkor befelé irányuló  $\text{Na}^+$ , illetve kifelé tartó  $\text{K}^+$ -áramot biztosítanak, de emellett bizonyos alegység kombinációik fennállása esetén  $\text{Ca}^{2+}$ -ok számára is átjárhatók. A posztszinaptikus idegvégződésen a nem-NMDA típusú glutamát receptorok által okozott előzetes membránpolarizáció feltétlenül szükséges a feszültségfüggő NMDAR-ok működéséhez.

Mielőtt azonban részletesebben rátérnék az NMDAR-ok áttekintésére, feltétlenül említést kell tennem a mGluR-okról is. A mGluR-ok idegrendszeri funkcióit, molekuláris sajátágaikból adódóan, lényegesen nehezebb konkretizálni, mint az iGluR-okét. Az mGluR-ok 7 transzmembrán doménnel rendelkező, G-proteinhez kapcsolt fehérjék ( $G_q$  vagy  $G_i$ ), melyek a pre- és a posztszinaptikus sejten is megtalálhatók [24]. A receptorok, aktivációjukat követően, változatos jelátviteli útvonalakat elindítva képesek befolyásolni a neuronális excitabilitást (a posztszinaptikus sejten) és a szinaptikus transzmissziót (a preszinaptikus sejten) [25, 26]. Az mGluR-okat három nagy családba sorolhatjuk (I-III). Ezeken belül, a kódoló gének alapján, számos típust megkülönböztethetünk ( $\text{mGluR}_{1-8}$ ), amelyek nagyfokú molekuláris heterogenitásuk következtében még további altípusokra is feloszthatók [27]. Mint látjuk, a mGluR-ok altípusainak széles választéka biztosít bőséges variációt az idegszövetet felépítő szinte valamennyi sejt működésének finomhangolásában.

A mGluR-ok élettani és patológiás folyamatokban betöltött szerepét a központi és környéki idegrendszeren túl számos szervben, szövetben megvizsgálták már [28, 29], az iGluR-okkal kapcsolatban azonban lényegesen kevesebb az idegrendszeren kívüli tapasztalat.

## **2.1.2. Az N-metil-D-aszpartát receptor jellemzői**

### **2.1.2.1. Az NMDAR-ok klasszikus kompozíciója**

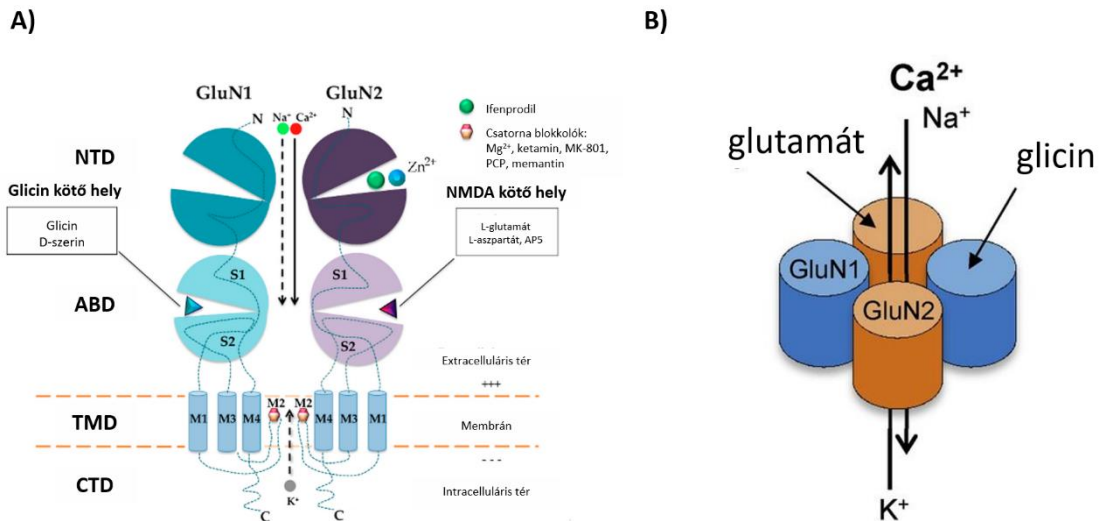
Az NMDAR-ok a legelterjedtebb és legtöbbet dokumentált glutamát receptorok. Bár a többi iGluR-hoz hasonlóan nem szelektív kationcsatornaként funkcionálnak, a nem-NMDA típusú receptorokkal szemben mégis leginkább  $\text{Ca}^{2+}$ -ra permeábilisak [30, 31]. (Ezért a nemzetközi

szakirodalomhoz hasonlóan, az egyszerűség kedvéért a továbbiakban a csatornán keresztül megvalósuló kationáramra, mint  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienstre fogok hivatkozni.)

Az NMDAR-ok három alegység típus kombinációjából (GluN1, GluN2 és GluN3) szerveződhetnek di- vagy triheterotetramer komplexekké. Az alegységek számos splice variánssal rendelkeznek, továbbá a GluN2 és GluN3 alegységeknek több izoformája is ismert (GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, illetve GluN3A és GluN3B) [32]. Az ioncsatoma létrejöttéhez elengedhetetlen két GluN1 alegység részvétele, ugyanis ezek képezik a csatoma pórusát. Emellett a GluN1 alegységek a koaktivációhoz szükséges glicin kötőhelyét is biztosítják. Fontos megemlíteni, hogy a NMDAR-ok tetramer receptorkomplex formájában helyeződnek ki a plazmamembránba és hogy a receptor a GluN1 alegység jelenléte nélkül nem kerül ki a citoplazmából a sejtmembránba. A receptor glutamát (és NMDA) kötőhelyét már a GluN2 alegységeken találjuk [33]. A GluN1-GluN2 diheterotetramer konstelláció a központi idegrendszerben fellelhető leggyakoribb NMDAR alegység kombináció (2.1. ábra). Ez a szerkezet megköveteli a glutamát és a glicin együttes bekötődését a receptor optimális működéséhez, de mint később látni fogjuk, ez nem mindegyik alegység-összetétel esetében lesz elmondható.

A csatornaformálás kétféle módon is megvalósulhat: az ún. „nem alternáló” esetben két-két GluN1 és GluN2 alegység egymás mellett helyezkedik el (GluN1/GluN1/GluN2/GluN2), az „alternáló” esetben pedig egymást váltva szerveződnek (GluN1/GluN2/GluN1/GluN2), azonban a receptor működőképességéhez minden esetben az alternáló modellnek kell érvényesülnie [34, 35].

A ligandumokon kívül a GluN1-GluN2 diheterotetramer szerkezetű receptor aktivációjához szükséges egy előzetes, AMPA receptorok révén megvalósuló, posztzinaptikus membrán depolarizáció is. Ez azért szükséges, mert a ligandumok kötődését követő konformációváltozás még nem nyitja meg szükségszerűen a csatornát, ugyanis a receptort  $\text{Mg}^{2+}$ -ok gátolják, ami feszültségfüggő jelleget kölcsönöz a GluN1-GluN2 diheterotetramernek. Az előzetes membránde polarizáció azonban felszabadítja az NMDAR-t a nyugalmi helyzetben fennálló  $\text{Mg}^{2+}$ -blokádtól, ez pedig nagy amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$ -áram létrejöttét teszi lehetővé [32]. Természetesen a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek elektrofiziológiai paraméterei az GluN2 alegység izoformáinak függvényében tovább árnyalhatók.



**2.1. ábra: Egy GluN1-GluN2 összetételű N-metil-D-aszpartát receptor (NMDAR) szerkezete funkcionális doménekkal és ligandumkötő helyekkel. (A)** Az NMDAR-ok GluN1 alegységei elengedhetetlenek a pórus kialakításában, illetve az a legységek összeszerelésében és a heteromer komplex membránba kerülésében [36]. A GluN2 (és GluN3) alegységek az NMDAR-ok aktivációs és inaktivációs kinetikáinak meghatározásában játszanak szerepet [37, 38]. Mindegyik a legység egy nagy extracelluláris N-terminális doménből (NTD), egy agonista-kötő doménből (ABD), egy transzmembrán doménből (TMD) és egy C-terminális doménből (CTD) áll. A transzmembrán domén három hélixet (M1, M3, M4) és egy hurkot (M2) tartalmaz. A GluN1 alegység a gonista-kötő doménje glicint és D-szerint, a GluN2 alegysége L-glutamátot és L-aszpartátot, valamint a kompetitív antagonistának számító AP5-öt képes kötni. A  $Zn^{2+}$  a GluN2 alegységeket gátolja, míg az ifenprodil konkrétan a GluN2B alegységek antagonistája. Az NMDAR-okon számos természetes és mesterséges csatorna blokkoló ( $Mg^{2+}$ , ketamin, MK-801, fenciklidin /angyalpor/, memantin) hatása érvényesülhet. A kép forrása: [39] (módosítva). **(B)** A működőképes NMDAR sémás ábrája a heterotetramer alternáló formájáról, a glutamát és glicin kötőhelyek feltüntetésével. A kép forrása: [https://www.researchgate.net/figure/Subunit-stoichiometry-and-subunit-arrangement-of-GluN1-2-NMDA-receptors-The-crystal\\_fig2\\_326607568](https://www.researchgate.net/figure/Subunit-stoichiometry-and-subunit-arrangement-of-GluN1-2-NMDA-receptors-The-crystal_fig2_326607568) (módosítva).

Mindemellett a GluN1 alegység szerkezete egy további érdekes molekuláris tulajdonsággal rendelkezik. A fehérje GluN1-1a splice variánsának intracelluláris (IC) doménje egy funkcionális szempontból releváns nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) rendelkezik. Az NLS egy bázikus aminosavakból álló szekvencia, mely tulajdonképpen bármelyik fehérjén jelen lehet. Az NLS leggyakrabban a fehérjék felszínén helyezkedik el, lehetővé téve az importin fehérjék kapcsolódását és ezáltal biztosítva a sejtmagba való bejutást [40]. A szekvencia az alegység C-terminusához közeli régiókban, az ún. C1 kazettában található, és két részből tevődik össze [41]. A szokatlan szubcelluláris lokalizáció lehetősége újszerű funkciók értelmezéséhez vezethet, amely akár egy patofiziológiai kontextust is előrevetíthet. Egyelőre azonban még nem világos, hogy a GluN1 alegység intramembrán proteolízist követően jut a sejtmagba, vagy szintézisét követően, teljes méretében kerül be. A GluN1-en kívül a többi NMDAR alegységben eddig még nem azonosítottak NLS-t.

### 2.1.2.2. A GluN3 alegység és érdekes heterotetramer alternatívák

A harmadik alegység típust (GluN3) eddig leginkább az agy fejlődésében betöltött szerepe kapcsán vizsgálták [42, 43]. A GluN3 alegység nem köt L-glutamátot, de a GluN1-hez hasonlóan rendelkezik glicin kötőhellyel. *In vivo* funkcionális vizsgálatok szerint a GluN3 alegység a GluN1 és GluN2 alegységekkel közösen alkot csatornát. Az ilyen triheterotetramer komplexek *bona fide* NMDAR-oknak tekinthetők, azonban a konvencionális NMDAR-okhoz képest árnyaltabb funkciókkal jellemezhetők. Idegsejtekben a GluN2A és GluN2B alegységek, oligodendrocytákban a GluN2C alegység képezhet triheterotetramer komplexet a GluN3A-val, míg a GluN3B alegység hippocampus eredetű idegsejt tenyészetekben alkot receptort a GluN2A-val [44].

A GluN3 alegység (és főként a GluN3A) tartalmú NMDAR-ok a magzati és korai csecsemőkorban feltételezhetően egyfajta fékként működnek az idegi hálózatokat érő stimulusok feldolgozásának időzítésében és mértékének szabályozásában. Ez a késleltetés vagy kondicionálás a serkentő szinapszisok érésében játszik szerepet egészen addig, amíg az idegrendszer nem találkozik egy-egy definitív stimulussal (pl. bőrérzékelés kapcsán az első tapintás élmények megszerzése) [44]. Jelenlegi tudásunk szerint felnőttkorra a GluN3 alegységek lényegében eltűnnek, azonban több neuropszichiátriai betegségben (pl. Huntington-kórban, addikcióban, fehérállományi károsodások esetén) beszámoltak már a GluN3A „reaktíválódásáról” [44].

Azok az NMDAR-ok, melyek GluN1-GluN3 diheterotetramerek teljesen szokatlan funkciókat tölthetnek be, hiszen kötőhely hiányában nem reagálnak L-glutamátra vagy NMDA-ra, és mivel nem állnak  $Mg^{2+}$ -blokádnak alatt, ezért a sejtmembrán depolarizációjával szemben is érzéketlenek. Az ilyen NMDAR-ok tehát tulajdonképpen glicin kapuzott, excitatórikus ioncsatornák [38]. Figyelemre méltó, hogy a GluN1-GluN3 összetételű csatornákon áthaladó  $Ca^{2+}$ -influxra lényegesen kisebb amplitúdó jellemző, mint a konvencionális felépítésű NMDAR-okra. Az alacsony amplitúdójú  $Ca^{2+}$ -áram pedig valószínűsíthetően más jellegű IC jeleket generál a GluN1-GluN2 összetételű csatornák aktivációjához képest [45].

Az alternatív glicin receptorként felfogható, serkentő jellegű GluN1-GluN3 NMDAR-ok *in vivo* létezése ellentmondásos. A glicin saját receptorain hatva hiperpolarizáló hatású, így gátló szinapszisokban játszik szerepet. Leírták azonban, hogy nagyagykérgi idegsejteken kisüléseket is eredményezett [38]. Mindemellett GluN3B overexpresszázó hippocampus eredetű neuron sejttenyészetekben már nem sikerült serkentő hatású ionáramokat mérni glicin adagolását

követően [46]. Az excitatórikus GluN1-GluN3 NMDAR-ok *in vivo* hatásai tehát jobbra még ismeretlenek, azonban farmakológiai megközelítésű vizsgálatok egyre precízebb lehetőségeket biztosítanak a pontosabb meghatározáshoz [47].

## 2.2. A kalcium és a sejtek jelátviteli folyamatai

Mivel az NMDAR-ok elsősorban  $\text{Ca}^{2+}$ -okra permeábilisak, ezért feltétlenül szükséges néhány szót külön szólnom a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok sejtélettani folyamatokban betöltött szerepeiről. Az oxigén, a szén, a hidrogén és a nitrogén után a kalcium az emberi szervezet ötödik leggyakrabban előforduló kémiai eleme. Egy átlagos felnőtt teste kb. 1 kg kalciumot tartalmaz és míg ezen mennyiség szinte teljes egésze a csontokhoz és fogakhoz köthető, addig csupán kb. 1% az a rész, amely a citoplazmában található és részt vesz a celluláris folyamatok finomhangolásában [48].

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok evolúciós szempontból a legősibb másodlagos jelátviteli hírvivők (ún. szekunder messenger-ek), melyek nem igényelnek enzimeket a szintézisükhöz, gyorsan mobilizálhatók, illetve eliminálhatók, mindemellett koncentrációváltozásaik, az igények függvényében, generalizáltak vagy lokálisak is lehetnek, azaz térben jól szabályozhatók. Utóbbi például idegsejtekben vagy szívizomrostokban kiemelten fontos tényező. Az IC tér  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változásai időben is szabályozhatók, ugyanis hosszantartó ingerlés és a csatornák gyors, egymás utáni megnyílásai következtében a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek oly gyakran követhetik egymást, hogy oszcillációkat hoznak létre, melyek néhány milimásodperctől akár percekig is eltarthatnak attól függően, hogy milyen hatás elérése a cél. Az oszcillációk gyorsan, 2–6  $\mu\text{m/s}$  sebességgel terjednek, 50–600 nM-os IC  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedéseket okozva. Az oszcillációk következtében az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változások az amplitúdó mellett frekvenciával is jellemezhetővé válnak [49].

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ok legfőbb előnye, amellyel egyedülállóvá váltak a jelátvitel számára, hogy a lehetőségek számtalan, egyedi kombinációit biztosítják. Mivel a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok bekötődése nagyszámú citoszolikus fehérje működését módosítja, ezért ezt a sejt-kompartmentet alapvetően igen alacsony a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció jellemzi. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ok az extracelluláris (EC) térből, illetve az IC  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárakból felszabadulva femtomásodpercek alatt képesek megnövelni a relatíve alacsony  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t (ennek értéke kb. 100 nM az EC tér 1,4–1,5 mM-os koncentrációjával szemben). A belső  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak kapcsán legtöbbször az endoplazmatikus retikulum (ER), illetve ennek izombéli megfelelője, a szarkoplazmatikus retikulum kerül említésre. Emellett azonban más sejt-szervecskék is raktárként szolgálhatnak, mint például a mitokondriumok [50],

a Golgi apparátus [51], illetve endoszómák és lizoszómák [52, 53]. A koncentráció változása térben és időben precízen szabályozott és gyors elimináló (pumpa)mechanizmusok részvételével valósul meg. Az elhúzódó magas  $[Ca^{2+}]_i$ -fokozódás sejthalálhoz vezethet.

Bizonyos jelátviteli útvonalak tehát érinthetik a plazmamembránban és a belső membránokban elhelyezkedő  $Ca^{2+}$ -csatornákat, ezáltal bevonva a  $Ca^{2+}$ -kat a szignalizációs folyamatokba. Ennek tükrében a plazmamembránban elhelyezkedő  $Ca^{2+}$ -csatornákat négy csoportra oszthatjuk: beszélhetünk feszültségfüggő (L-, P/Q-, N-, R-, T-típusú csatornák), ligandum vezérelt (pl. NMDAR, ionotróp purinerg /P2X/  $Ca^{2+}$ -csatornákról, tranziens receptor potenciál /TRP/ ioncsatornák), másodlagos messenger vezérelt csatornákról (pl. arachidonsav vezérelt  $Ca^{2+}$ -csatorna), és  $Ca^{2+}$ -felszabadulás által aktivált  $Ca^{2+}$ -csatornákról [54]. Az egyik leggyakoribb, belső raktárakból történő  $Ca^{2+}$ -felszabadulást kiváltó jelátviteli lépés a foszfolipáz C (PLC) enzim aktivitásának fokozódása, melynek eredményeként a felszabaduló inozitol-1,4,5-triszfoszfát ( $InsP_3$ ) molekulák bekötődnek az ER membránjában elhelyezkedő receptoraikhoz ( $InsP_3R$ ). Az  $InsP_3R$ -ok  $Ca^{2+}$ -csatornákként funkcionálnak, melyek a ligandum-receptor interakciót követően kiengedik a raktárakból a  $Ca^{2+}$ -kat a citoszolba [55]. A belső raktárak hasonló ürítését valósítják meg a rianodin receptorok is [56].

A felszabaduló  $Ca^{2+}$ -ok szinte valamennyi sejtélettani funkcióban szerepet játszanak. A teljesség igénye nélkül megemlítve ide sorolhatjuk a vázizmok elektromechanikai kapcsolásában betöltött szerepüket, az idegsejtek neurotranszmittereket tartalmazó vezikulumainak felszabadítását, az enzimreakciók regulációját, a sejtciklus szabályozását, programozott sejthalálhoz köthető folyamatok elindítását, illetve a génexpresszió irányítását és befolyásolását. Utóbbi esetében kiemelendők azok a transzkripciós faktorok (pl.: NFAT /nuclear factor for activated T-lymphocytes/, NF $\kappa$ B /nuclear factor  $\kappa$  B/), melyek közvetlenül a  $Ca^{2+}$ -ok hatására kerülnek a sejtmagba és befolyásolják bizonyos gének átírását [57].

A  $Ca^{2+}$ -ok jelátviteli folyamatokban betöltött evolúciós sikerének kulcsai a gyorsaság és az irányíthatóság voltak. Az IC tér EC térrel, illetve  $Ca^{2+}$ -raktárakkal szemben fenntartott elektrokémiai grádiense döntő tényező egy-egy  $Ca^{2+}$ -tranziens gyors létrejöttében és aktív pumpamechanizmusok útján történő kioltásában. Ennek megfelelően tehát a jelátviteli folyamat részeként megemelkedő  $[Ca^{2+}]_i$ -t a plazmamembránban és a belső membránokban elhelyezkedő  $Ca^{2+}$ -pumpák és exchanger-ek (szarko/endoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  ATPáz (SERCA); plazmamembrán  $Ca^{2+}$  ATPáz;  $Na^+$ / $Ca^{2+}$ -exchanger (NCX); mitokondriális uniporter) gyorsan helyreállítják [58]. A  $Ca^{2+}$ -jelek megszűnését követően a csekély mértékben szabadon maradó  $Ca^{2+}$ -ionokat kalciumpufferek (a citoszolban: kalbindin, kalretinin, parvalbumin; az ER/SR-

ben: kalnexin, kalretikulin, kalszekvesztrin) illetve kalciumeffektorok (kalmodulin) kötik meg, azaz lényegében nem marad szabad  $\text{Ca}^{2+}$  a cytosolban a következő  $\text{Ca}^{2+}$ -eseményig [54]. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ok eliminálása persze nemcsak az állandó jelgenerálásra kényszerített jelátviteli apparátus kikapcsolása szempontjából létfontosságú, hanem a sejt életben maradása kapcsán is, ugyanis a magas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , egyebek mellett, az oldhatatlan foszfátsók kicsapódása révén toxikus hatással van a sejtre.

Összességében tehát beláthatjuk, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok a sejtek univerzálisan jelen lévő jelátviteli komponensei, melyek lényegében valamennyi celluláris életfolyamatra hatást gyakorolhatnak. Nem véletlen, hogy ezt a  $\text{Ca}^{2+}$ -okkal kapcsolatban álló, komplex rendszert a nemzetközi szakirodalom, mint 'Ca<sup>2+</sup>-signalling tool kit' nevezi, amit magyarra a legmegfelelőbbben Ca<sup>2+</sup>-jelátviteli eszköztárként fordíthatunk le.

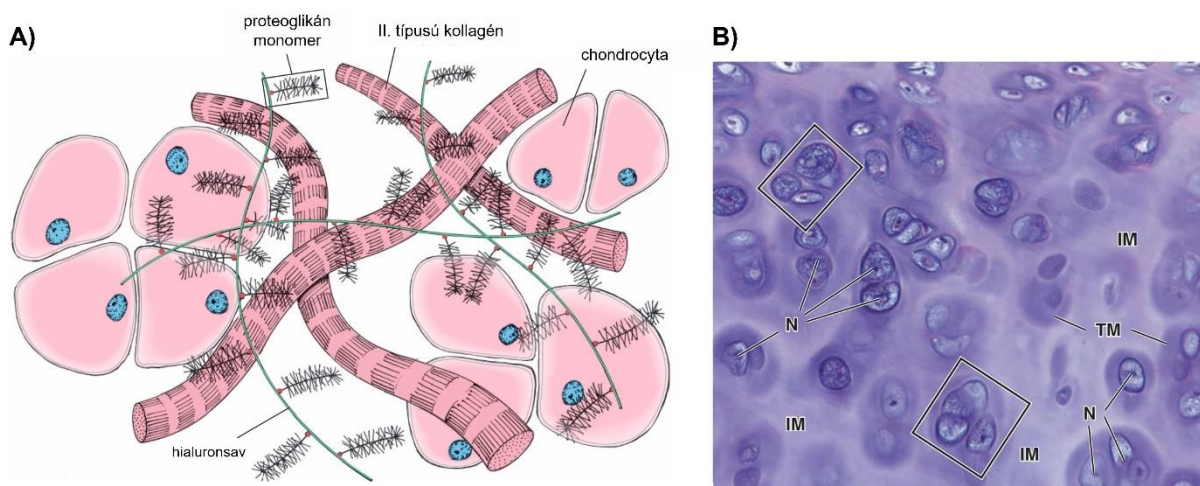
## **2.3. Az idegrendszeren kívül I.: az ízületi porc**

### **2.3.1. A porcszövetről röviden**

A porcszövet a gerincesek – és így az ember – egyik alapvető kötő- és támasztószöveve. Jól jelzi fontosságát az a tény, hogy már az egyedfejlődés korai fázisában megjelenik és támaszt nyújt a többi fejlődő szövet számára. Ennek megfelelően a korai embriók vázrendszere szinte teljes egészében porcszövetből áll, ami modellként szolgál a később chondralis csontosodással kialakuló csontoknak. A csontosodás során a porcszövet nem alakul át teljes egészében csontszövevé, ugyanis pl. az epiphysisek állományában fennmarad, mint epiphysisporckorong, ami a gyermek- és serdülőkori gyors hossznövekedésért felelős. Ezzel ellentétben a csontok ízületben érintkező, szabad végeit védő és permanensen porcszövetként megmaradó ízületi porc nem a csont porcos vázának maradványa. Embriónális korban ugyanis a jövőbeni ízületek helyén egy jól elkülöníthető sejtszaporulat jelenik meg; ez az interzóna [59]. Az ízületi porc fejlődése során az egymással gap junction-ökön keresztül szoros kapcsolatban álló interzóna sejtek kerekded morfológiája lapossá és nyúlánkká válik, mely alakváltozást az ECM összetételének változása kíséri [60]. A porcszövet ezen kívül fontos strukturális elemként számos egyéb helyen is megtalálható a szervezetben, többek között a koponyaalapon, a fülkagylóban, az orrban, a gégegében és az alsó légutakban is [4]. Ezek az ún. állandósult porcok a testben.

A definitív porcszövetet az alkotó sejtek morfológiai és funkcionális sajátosságai, illetve a körülöttük lévő ECM összetétele, valamint a mindezekből következő biomechanikai tulajdonságok alapján három nagyobb csoportra oszthatjuk: hyalin- vagy üvegporcra, elasztikus porcra és rostos porcra. Mivel értekezésem kísérletes munkája során a hyalinporcot tanulmányoztam közelebbről, ezért a továbbiakban elsősorban erre a porc fajtára fókuszálok (habár a porcszövet szerkezetére vonatkozó megállapításaim többsége mindhárom fajtára igaz). A kifejlett állati szervezetben a hyalinporc ízületi porcként vagy ún. állandósult porcként (zsigerek falában) fordulhat elő. Az ontogenesis során a csontok modelljeként szolgáló porcszövet szintén hyalinporcnak számít.

A porcszövet mindhárom megjelenési formájára igaz, hogy a kerekded porcsejtek (chondrocyták) az összetett és jellegzetes makromolekulákból álló, arányaiban nagy mennyiségű sejtközötti állományba ágyazottan helyezkednek el (2.2. ábra).



**2.2. ábra. A differenciált porcszövetben a chondrocyták kerekded alakúak és izogén sejtcsoportokba rendeződnek. (A)** A porcsejtek és az extracelluláris mátrix (ECM) viszonyának sematikus ábrázolása. **(B)** A hyalinporcot hematoxilinnal és eozinnal festve, majd fénymikroszkóppal tanulmányozva megfigyelhetjük, hogy az izogén csoportokba rendeződött sejtek egyedi lacunákban helyezkednek el (egy-egy lacunában a sejtek magja N betűvel van jelölve). Jól látható, hogy a sejtek közötti mátrix nem mutat egységes festődési mintázatot. A sejtcsoportok egyes sejtjei körüli pericelluláris mátrix (vagy régies nevén porctok) nagy mennyiségben tartalmaz negatív töltésű makromolekulákat, mint például proteoglikánok (PG), glükózaminoglikánok (GAG), melyek erős bazofil (sötétlila színű) festődést eredményeznek. A pericelluláris mátrixot a kevésbé bazofil territoriális mátrix (TM) veszi körül. Az adott territoriális mátrixszal körülvevett izogén sejtcsoport a porcszövet alapegységét, a chondronot adja (bekeretezett részek). A chondronok közötti térség kevésbé bazofil festődést mutat, mivel itt a lacsonyabb a PG koncentráció és így nagyobb arányban található kollagénrostok az ECM-ben. Ez a terület az interterritoriális mátrixnak (IM) felel meg [61]. A kép forrása: [61] (módosítva).

A porcmátrix kötőszöveti rostokból és alapállományból áll. A rostok alkotói nagyjából kollagén molekulák, melyek jelentős többségét a II. típusú kollagén alkotja. Emellett fontos szereppel bír a IX. típusú kollagén, ami az egyéb, nem-kollagén mátrixkomponensek és a

kollagénhálózat közötti kapcsolatok kialakításáért felel, a X. típusú kollagén, ami a kollagénkötegek hálózatos elrendeződését teszi lehetővé, a XI. típusú kollagén, ami a rostok hosszúságát szabályozza, valamint a VI. típusú kollagén, ami a porcsejtek és az alapállomány interakcióinak fenntartását biztosítja [61].

A porc mátrix rostok közötti alapállományát proteoglikánok (PG) és multiadhezív, nem kollagén glikoproteinek alkotják. A hyalinporc PG-jei közé tartozik az aggrekán, a dekorin, a biglikán és a fibromodulin. Ezek közül kitűnik az aggrekán, ami a porc mátrixra leginkább specifikus molekulának tekinthető. Az aggrekán monomer a nagyszámú kondroitin-szulfát és keratán-szulfát glükózaminoglikánok (GAG) oldalláncnak egy központi tengelyfehérje mentén való, kémsősómosókefe-szerű rendeződése révén jön létre. Az ECM alkotói közül külön kiemelendő a PG-t nem képző, szabad GAG-nak tekintendő hialuronsav, mely hosszú láncként fűzi össze az aggrekán monomereket. A porc mátrixban nagy mennyiségben aggregáló PG-k végeredményben jelentős vízmegkötő képességgel ruházzák fel a porcszövetet [61]. Ennek hátterében a GAG oldalláncok erősen polianionos természete áll.

Az alapállomány multiadhezív glikoproteinjei a porcsejtek, a kollagénrostok és a PG-k közötti kapcsolatok kialakításáért felelnek. Többek között ide tartozik a tenascin, a fibronectin, a kondronektin, a matrilin-1, a porc oligomerekus mátrix protein és a thrombospondin is [62]. Ezek a mátrixalkotók alapvető szerepet töltenek be a porcsejtek és az ECM kapcsolatában, biztosítják a rostok és az egyéb ECM komponensek hálózatos kapcsolatrendszerét. A multiadhezív fehérjék integrinek révén a sejtmembránhoz kötődnek, így képesek a mátrixot érő mechanikai ingerek deformáló hatásait a sejtek felé közvetíteni.

A porcszövet az egyik legcsekélyebb regenerációs képességgel jellemezhető alapszövet és ez döntő faktor a porc patológiás elváltozásainak kialakulásában. Számos tényezőt megemlíthetünk, mint megújulási képességet minimalizáló körülményt. Egyrészt, a porcszövet nem tartalmaz ereket. Tápanyagellátását a környező kötőszövet (perichondrium) vagy az ízületi (synovialis) folyadék teszi lehetővé diffúzió útján. Többek között ezért is töltenek be fontos szerepet az ECM GAG-jai, mert nagy vízmegkötő képességük révén biztosítják a diffúzió közegét. Másrészt, a test növekedésének lezárultával a porcszövet sejtjei, a chondrocyták, gyakorlatilag már nem osztódnak.

Az OA a leggyakoribb, felnőttkori mozgáskorlátozottsághoz vezető vázrendszeri megbetegedés, ami az ízületi porc mennyiségi és minőségi károsodásával és az ún.

subchondralis csontszövet kóros átalakulásával járó, igen fájdalmas degeneratív ízületi betegség. A kórkép előrehaladásával az ízületi lágyrészek gyulladása is megjelenik [3].

Egyre nyilvánvalóbb, hogy az ízületi porcot érintő betegségek kialakulásáért sok esetben a porcfejlődéshez köthető gének, illetve celluláris mechanizmusok patológiás változásai tehetők felelőssé [4]. Mindezek pedig komoly kihívásokat jelentenek az ortopédia és a regeneratív medicina számára, illetve indokoltá teszik azt az elképzelést, hogy a porcdifferenciációt szabályozó molekuláris mechanizmusok pontosabb megismerése elősegítheti e betegségek oki kezelésére szolgáló gyógyszerek, módszerek fejlesztését [5].

## **2.3.2. A porcdifferenciáció**

### **2.3.2.1. A porcszövet fejlődésének *in vitro* megközelítése**

A porcszövet biológiai funkcióinak széles repertoárja szemben áll némelyest puritán, ámde egyedi strukturális adottságaival. A porcszövet működésének pontosabb megértéséhez a porcsejtek közelebbi vizsgálatával juthatunk el. Mivel az érett porcszövet sejtjei terminálisan differenciálódtak, így *in vitro* körülmények között nehezen szaporíthatók, valamint rendkívül érzékenyek a környező mátrix elvesztésére, kitapadó monolayer sejt kultúrákban gyorsan dedifferenciálódnak. A porcszövet kialakulása az embrionális élet korai szakaszában kezdődik, ez pedig megnehezíti a fiatal porcszövettel történő *in vivo* kísérletek kivitelezhetőségét. Ezeknek a problémáknak az áthidalására különböző *in vitro* porcdifferenciációs modelleket állítottak elő. Ezek egy része primer sejt kultúra, amelyekhez minden alkalommal embrionális sejteket kell izolálni, de ismert néhány sejt vonal alapú megközelítés is.

Az egyik leginkább elterjedt *in vitro* megközelítés a Hamburger és Hamilton szerinti 22–24-es fejlődési stádiumban [63] lévő csirkeembriók mellső és hátsó végtagtelepeiből izolált primer, nagy sejtsűrűségű, ún. high density (HD) sejt kultúrák [64, 65], melyek döntően chondroprogenitor mesenchymalis sejtekből állnak. Az iniciális sejtenyészetben a mesenchymalis sejtek mellett a kultúrák kitapadásában segítséget nyújtó fibroblastok, illetve hámsejtek és myoblastok is jelen vannak, azonban ezek a sejtek a nagy sejtsűrűségű kultúrákban visszaszorulnak, illetve a hám- és porcsejtek el is tűnnek. A porcfejlődés *in vitro* vizsgálatára alkalmas lehet még egy, a csirke modellhez hasonló, rágcsálókra adaptált protokoll is [66], valamint az egér (C3H10T1/2), patkány (RCJ 3.1) és humán eredetű multipotens, mesenchymalis sejt vonalak is [67-69].

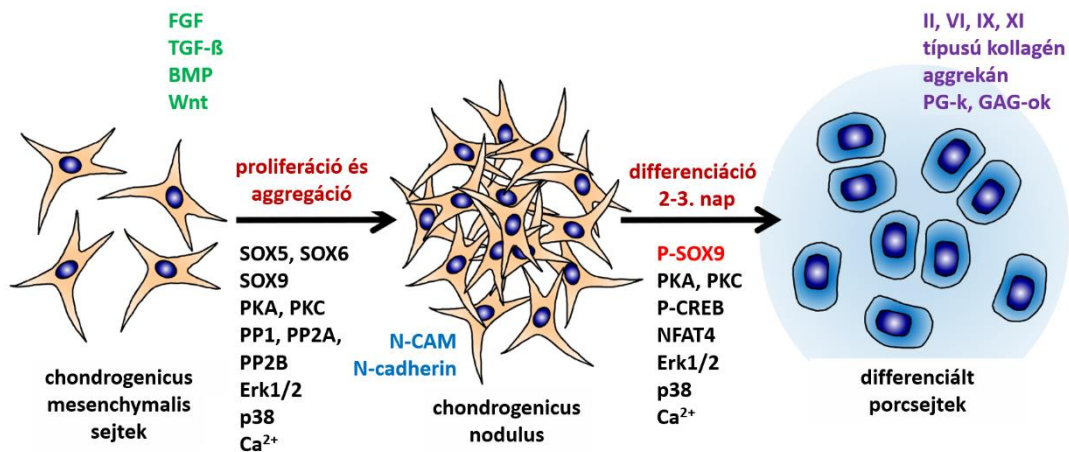
A primer HD kultúrákat különböző differenciálódási szakaszban lévő sejtek elegyeként foghatjuk fel, melyeket valamilyen mesterséges (műanyag vagy üveg) felületen szaporítunk. A módszer előnye, hogy a kezdeti mesenchymalis sejtek úgy válnak spontán módon érett porcsejteké a sejttenyésztés végét jelentő 6. napra, hogy közben nem igénylik a főtális szérumon kívül egyéb növekedési faktorok, citokinek stb. alkalmazását. Differenciációs programjuk spontán, a nagy kezdeti sejtsűrűség és a fokozatosan elért differenciáltsági állapotok következtében, automatikusan végbemegy.

Persze nem mehetünk el szó nélkül amellett sem, hogy egy *in vitro* modell mennyire képes megfelelni a valóságnak. Ugyan az *in vivo* és *in vitro* porcdifferenciáció alapvető mechanizmusai megegyeznek, ám nem hagyhatjuk figyelmen kívül a tényt, hogy az embrió testében térben és időben meghatározott sorrendben, eltérő alakú és elhelyezkedésű porcszigetek képződnek, míg egy *in vitro* sejttenyésztésben lényegében homogén eloszlású és amorf szerkezetű porcszövet jön létre. Ezért az eredmények interpretációjakor ezt a megállapítást feltétlenül szem előtt kell tartanunk. Mindezek tükrében a chondroprogenitor mesenchymalis sejtekből létrehozott primer HD kultúrák sokrétű felhasználhatóságát és széles körű elfogadottságát számos publikáció megerősíti [65, 70-74].

### **2.3.2.2. A porcfejlődés molekuláris gépezetének fogaskerekei**

A porcfejlődés kezdetekor a többi mesenchymalis sejttől még megkülönböztethetetlen chondroprogenitor sejtek csomókat, ún. nodulusokat formálnak, majd a differenciálódás kritikus, 2–3. napján porcsejteké alakulnak [64]. A nodulusok létrejöttében kulcsfontosságúak a sejt-sejt kapcsolatokért felelős molekulák (pl. neuronális sejtadhéziós molekula, N-cadherin) [75, 76], illetve a szomszédos sejtek közötti gap junction-ök [77]. A nodulusképződés kezdete olyannyira kritikus a porcfejlődés során, hogy ezt a lépést már eleve tekinthetjük a mesenchymalis sejtek chondrogenicus irányba történő elköteleződésének. A nodulusképződés során az ECM is drasztikusan változik. Kezdetben a sejtek jelentős mennyiségű fibronektint termelnek, ami elősegíti az aggregációt, azonban a csomók kialakulását követően szintje erőteljesen lecsökken [78]. Hasonló expressziós mintázatot követ az I. típusú kollagén is, melynek expressziója a nodulusképződés kezdetén magas, majd a folyamat végére lecsökken [79]. Mindeközben az aggregációt gátló hialuronsav gyorsan eltávolításra kerül a differenciálódó sejteket körülvevő mesenchymalis ECM-ből [71].

A sejt-sejt kapcsolatok kialakulása következtében a citoskeletális organizáció megváltozik, a nyúlványos, fibroblast-szerű sejtek lekerekednek [80] és a porcképződést serkentő citokineket, illetve növekedési faktorokat (pl. csont morfogénikus proteint, transzformáló növekedési faktor- $\beta$ -t és fibroblast növekedési faktort) kezdenek termelni [81, 82]. Az előzetes aggregáció többek között biztosítja a parakrin jelátvitel hatósugarának csökkenését is. A növekedési faktorok a porcfejlődésben kulcsfontosságú SOX9 transzkripciós faktor expresszióját fokozzák [83, 84], ami néhány egyedi kivételt leszámítva porcspecifikusnak tekinthető [85]. A SOX-fehérjecsaldába tartozik még a SOX5 és a SOX6 is, melyek a SOX9-cel az ún. SOX-triót alkotják és a porcspecifikus ECM-komponens gének promóter régiójához bekötődve fokozzák azok expresszióját [86]. Ilyen ECM komponens géneknek számítanak a II., VI., IX. és XI. típusú kollagén, illetve az aggregán tengelyfehérje, a link protein és néhány egyéb multiadhezív fehérje génjei [87]. Mindemellett a sejtek felszínén a porcra jellemző ECM makromolekulák megkötéséhez szükséges receptorok is fokozatosan megjelennek. Ebből is látható tehát, hogy a dinamikus változó ECM milyen nagy hatással van az éretlen porcsejtek labilis fenotípusára [88] (2.3. ábra).



**2.3. ábra.** A high density (HD) kultúrákban a mesenchymalis sejtek egy többlépcsős folyamat során érett porcsejteké válnak miközben szövetspecifikus összetételű extracelluláris mátrixot (ECM) termelnek. Kezdetben a chondroprogenitor sejtek laza kapcsolatban állnak egymással és elnyújtott, gracilis sejtalakúak jellemezhetők. Az aggregáció során a sejtek osztódnak és migrálnak, melynek eredményeként chondrogenic nodulusokat alakítanak ki, amik a porcdifferenciáció melegágyának tekinthetők. Az *in vitro* chondrogenesis végeredményeként lekerekedett, érett chondrocyták jelennek meg, melyek porc-specifikus ECM-et termelnek maguk körül. A folyamat molekuláris háttere jól dokumentált, számos jelátviteli molekula és útvonal kvázi porcspecifikusnak tekinthető. A kép forrása: Dr. Zákány Róza és Dr. Matta Csaba illusztrációja (módosítva).

A SOX9 aktivitását a molekula foszforilációja felerősíti, ezért – direkt vagy indirekt módon – különféle kinázok és foszfatázok alapvetően befolyásolják azt. A ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) jól ismert downstream célpontja a protein kináz A (PKA), mely a SOX9 foszforilálása révén a transzkripciós faktor hatásainak fokozott érvényesülését eredményezi

[85, 89]. A PKA másik gyakori célpontja a cAMP reszponzív elem kötő (CREB) fehérje, egy transzkripciós faktor, amely foszforilációját követően CRE régiót tartalmazó gének átírását – többek között magát a SOX9-ét is – serkenti [90]. A kinázokkal érzékeny egyensúlyban együttműködő foszfatázok közül a foszfoprotein foszfatáz 2A a CREB defoszforilálása révén szólhat bele a SOX9 expressziójába és hatásainak érvényesülésébe [91]. Jól demonstrálja ezt, hogy a foszfoprotein foszfatáz 2A szelektív gátlószere, az okadánsav, laboratóriumunk által igazoltan serkenti a porcdifferenciációt [92]. Azonban nem minden foszfatáz fogja feltétlenül gátolni a SOX9-et. A foszfoprotein foszfatáz 2B, vagy más néven kalcineurin, például indirekt módon – az extracelluláris szignál regulált kináz 1/2 (ERK1/2) defoszforilációján keresztül – a SOX9 foszforilált állapotát és a porcképződést segíti [72]. A foszfoprotein foszfatáz 2B közvetlenül érinti az NFAT működését is. E transzkripciós faktor esetében a foszfát csoport elvesztése sejtmagi transzlokációt eredményez, ami többek között a csont morfogénikus protein-2 átírását fokozza a sejtmagban, ez pedig hozzájárul a porcdifferenciáció öngerjesztő köreihez [93].

Az emberben 15 ismert taggal rendelkező protein kináz C (PKC) izoenzimcsalád is részt vesz a chondrogenicus folyamatokban [94, 95]. Az enzimcsaládon belül megkülönböztetünk egy konvencionális alcsoportot ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), melynek tagjai diacil-glicerolt,  $\text{Ca}^{2+}$ -okat és foszfolipideket igényelnek aktivációjukhoz, egy új (novel) csoportot ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), melyhez tartozó enzimeknek  $\text{Ca}^{2+}$ -okra nincs, diacil-glicerolra és foszfolipidekre azonban szüksége van az aktivációhoz, illetve egy atípusos csoportot ( $\zeta$ ,  $\nu/\lambda$ ), melynek tagjai főként foszforilációs mechanizmusokkal aktiválódnak [96].

Jelenleg még nem állnak rendelkezésünkre olyan adatok, melyek megerősítenék a SOX9 és a PKC közötti direkt interakciót. A PKC-nek azonban az aktin citoskeletonra hatva ismert szerepe van a chondrocyta fenotípus változtatásában, mely során az ERK1/2 meghatározó tényező. Kutatócsoportunk például az ERK1/2 és a SOX9 PKC $\delta$  általi foszforilációját dokumentálta a porcfejlődés során [97]. Fontos továbbá megemlíteni, hogy az ERK1/2-n keresztül az N-cadherin expresszió is fontos célpontja a PKC által regulált korai chondrogenicus folyamatoknak [98].

### 2.3.3. Amit vázrendszeri sejtekben az NMDAR-okról és a $\text{Ca}^{2+}$ -okról eddig tudunk

Az elmúlt években több közlemény foglalkozott glutamát receptorok vázrendszeri sejtekben való megjelenésével. Az NMDAR-ok főként az osteoblastok és osteoclastok differenciálódására [9] kifejtett összetett hatásaik révén vehetnek részt a csontszövet átépülésében [8]. NMDAR alegységek expresszióját azonosították emellett patkányeredetű *in vitro* porcsejt kultúrákon is [10-12]. Az érett, humán ízületi porcsejteken detektált NMDAR-ok feltehetően mechanotranszdukciós útvonalakat szabályoznak és fontos szerepük lehet a porcsejtek OA-ban megváltozott viselkedésében [13]. Az NMDAR-ok chondrogenicus folyamatokban betöltött szerepe azonban idáig felderítetlen terület maradt.

Függetlenül attól, hogy milyen alegység-összetételű NMDAR-okról beszélünk, receptor-aktiváció hatására végeredményben  $\text{Ca}^{2+}$ -ok áramlanak az IC térbe. Mivel a sejtsztódás és a sejtdifferenciáció azon esszenciális funkciók közé tartoznak, melyeket a  $\text{Ca}^{2+}$ -okhoz köthető jelátviteli folyamatok befolyásolnak [58], nem meglepő, hogy a differenciálódó mesenchymalis sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisa számos kutatócsoport, köztük a miénk, célkeresztjébe került. Habár a mesenchymalis őssejtek eredendően nem excitábilis sejtek, de differenciációjuk eredményezhet excitábilis (pl. izomsejt) sejtfenotípust [99]. Annak ellenére, hogy az elmúlt években több publikáció is foglalkozott a chondrocyták és chondrogenicus sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisával, illetve  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna készletével, mégis számos kérdés maradt megválaszolatlan ezek differenciációban betöltött szerepét illetően. Jelenlegi ismereteink szerint a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli útvonalak fontos szerepet tölthetnek be a mesenchymalis sejtek fejlődésében [6, 7]. Többek között ezen útvonalak közé tartoznak a klasszikus PKC aktivitást igénylő jelátviteli útvonalak [96]. A  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-függő kináz II (CaMKII) a PKA mellett szintén képes a CREB foszforilációjára [100]. Az NFAT magi transzlokációját kiváltó celluláris folyamatok ugyancsak  $\text{Ca}^{2+}$ -dependenciát mutatnak [93].

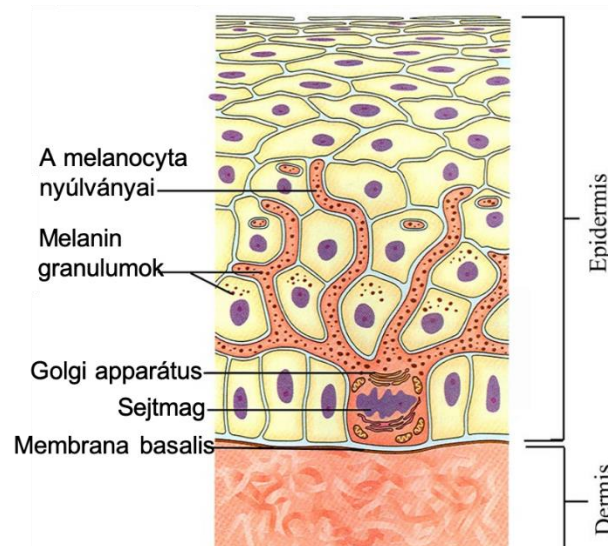
Laboratóriumunk korábbi eredményei szerint a HD kultúrákban differenciálódó porcsejtek citoszoljában mérhető  $\text{Ca}^{2+}$ -szintjek a hosszabb távon (napi léptékben) változó bazális [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> mellett gyors változásokat is mutattak, melyek érzékenyek voltak a feszültségfüggő  $\text{K}^{+}$ -csatornák gátlására [101]. Szintén laboratóriumunk dokumentálta a raktár által vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -belépés (SOCE) szerepét is a chondrogenicus folyamatokban [102]. Az érett chondrocyták plazmamembránjában jelen lévő, igazoltan működőképés  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák pedig az ún. 'chondrocyta channellome' részét képezik [103].

## 2.4. Az idegrendszeren kívül II.: egészséges és patológiás pigmentsejtek

### 2.4.1. Melanocyták a bőr epidermisében

A melanocyták pigmentek termeléséért felelős nyúlványos sejtek, melyek elsősorban a bőr epidermisének bazális sejtrétegében fordulnak elő, de emellett a szőr/hajszálak tüszőiben, a szemgolyó érhártyájában, a központi idegrendszer kötőszövetes burkaiban és a szájüregi nyálkahártyában is megtalálhatók. A melanocyták ectodermális, egészen pontosan crista neuralis eredetű sejtek, mely magyarázatul szolgál különleges celluláris tulajdonságaikra és viselkedésükre a bőr vagy az érhártya többi sejtjéhez képest.

Az epidermális melanocyták sajátos viszonyban állnak az őket körülvevő keratinocyttal. Egy bazális elhelyezkedésű melanocyta ugyanis átlagosan harminchat keratinocyttal képes kapcsolatot kialakítani. Ennek eredményeként a melanocyta citokrin szekrécióval transzportál pigmenteket a környező sejteknek [104]. Ezt, a közel negyven sejtből álló funkcionális csoportosulást epidermális melanin egységnek nevezzük (2.4. ábra). Az egyes testtájak eltérő denzitásban tartalmaznak epidermális melanin egységeket (legsűrűbben a háton és a vállak területén, leggyéribben a tenyereken és a talpakon fordulnak elő), ettől függetlenül igaz azonban, hogy az egységek mindenütt azonos számú sejtet foglalnak magukba [105].



**2.4. ábra: Egy jellegzetes melanocyta morfológiája az epidermisben.** Az epidermális melanocyták sejtteste a bazális keratinocytták szomszédságában helyezkedik el és nyúlványai, polipcsápokhoz hasonlóan, a felszínesebb rétegek hámsejtjei közé furakodnak. A nyúlványok elhelyezkedése a pigmenttermelés ütemétől függően dinamikusan változhat, de ez az epidermális melanin egység integritásán nem változtat. A kép forrása: <https://www.quora.com/Why-how-do-we-get-moles> (módosítva).

A pigmentsejtek legfőbb feladata a melanin nevű pigment szintézise, ami citoplazmatikus, membránnal körülvett sejtorganellumokban, az ún. melanoszómákban történik. A pigmenttermelés során a melanoszómák egy érési folyamaton mennek keresztül, melynek négy fázisát különítjük el a pigmentek szerkezete, mennyisége és minősége alapján. Kezdetben a melanoszómák egyszerű endoszómális képletek, amik nem tartalmaznak pigmentet. Az érés második szakaszában egy glikoproteinekből felépülő, fibrilláris mátrix alakul ki az organellumban. A harmadik fázisban a tirozináz és a DOPAkróm tautomeráz enzim, valamint a tirozinázszerű protein 1 megjelenésével megkezdődik a melanin termelése. Végül az érett melanoszómák teljesen megtelnek pigmentekkel és sötét színű, elliptikus struktúrákká válnak [106].

Az emlősökben két eltérő kémiai tulajdonságokkal bíró, de egyaránt tirozin alapú festékanyagot különíthetünk el: a sötét, barnásfekete színű eumelanint, illetve a világos, sárgás-vöröses árnyalatú pheomelanint [107]. A melanocyták mindkét pigmentet képesek termelni, a bőr színét pedig elsősorban a két pigment aránya szabja meg. Mivel a különböző bőrszínű emberek melanocytáinak száma megegyezik, ezért a fő különbségek a melanoszómák méretében, számában, összetételében, illetve eloszlásában rejlenek [108]. Természetesen a melanogenesis, azaz a pigmentek termelése során a tirozináz enzim aktivitása és a szubsztrátok koncentrációja szintén meghatározó tényező [109].

Mivel a melanin (elsősorban az eumelanin) képes elnyelni az ultraibolya (UV) sugárzás 50–75%-át, és mindemellett antioxidáns hatásokkal is rendelkezik, ezért a pigmentek legfontosabb szerepének az UV-sugárzással szembeni védelmet tekintjük. A keratinocytákba transzportált pigment tartalmú melanoszómák a citoplazmában a sejtek magjai fölé rendeződnek így egyfajta „sapkát” képeznek és védik a sejtmag DNS-tartalmát az UV-sugárzás mutagén hatásaitól. Természetesen az epidermisben ily módon képződő „pigment ernyő” a dermis sejtjei számára is védelmet nyújt. Ezek alapján belátható, hogy a több pigmentet tartalmazó bőrtípus ellenállóbb az UV-sugárzás általi károsodással szemben. Sötét bőrű emberekben a melanoszómák az epidermis felszínesebb sejtrétegeiben is megtalálhatók, míg világos bőrűek hasonló rétegeiben jóval kevesebb melanoszómát figyelhetünk meg. A világos bőrtípus ezért rizikófaktornak számít az UV-expozíció által indukált melanomagenesis szempontjából [110].

## 2.4.2. Melanoma malignum cutis

### 2.4.2.1. A pigmentsejtes bőrgyógyászati jelenségek problémája

A melanoma malignum cutis a bőr melanocytáinak rosszindulatú daganata. Mielőtt azonban közelebbről is megvizsgálom a pigmentsejtek neoplasiáját, szükséges néhány szót szólnom az anyajegyek és a melanoma között feszülő diagnosztikai problémákról. Gyakorlatilag minden felnőtt ember rendelkezik anyajegyekkel, azaz naevusokkal. E jóindulatú pigmentált elváltozások fajtája, mérete és mennyisége nagyfokú variabilitást mutat. Elkülöníthetjük az egészséges pigmentsejtek számbeli növekedésével járó állapotokat, amelyeket melanocytá hyperplasiával járó kórképeknek nevezünk. Ebben az esetben a morfológiailag normális melanocyták számbeli növekedése, vagy fokozott pigmenttermelése eredményez körülírt, szabályos foltokat, ún. maculákat a bőrön, melyek színe a világosbarnától egészen a feketéig terjedhet.

A jóindulatú pigmentsejtes elváltozások másik csoportjába a melanocytáer naevusok (naevus pigmentosus) tartoznak, melyek esetében a crista neuralis eredetű melanocyták differenciálódása vagy migrációja szenved zavart. Ez kóros küllemű/lokalizációjú melanocytákat eredményez, melyek fészkeket képeznek az epidermisben vagy a dermisben [111]. Patogenezisük során ezek a rendellenes morfológiájú melanocyták (naevussejtek) a dermoepidermalis határról indulnak ki, és progresszív érési folyamatokon mennek keresztül.

Az anyajegyek közt külön kiemelendők a malignus hajlam szempontjából jelentős atípusos vagy dysplasticus naevusok. Szöveti és klinikai tulajdonságaik is eltérnek a közönséges melanocytáer naevusoktól és morfológiailag hasonlóságokat mutatnak a melanoma malignummal. Méretük meghaladja az 5 mm-t, szabálytalan alakúak és irreguláris szélűek, azonban a melanomától eltérően hosszabb időn keresztül megfigyelve sem mutatnak változást, sőt regresszálhatnak is.

Azoknál az egyéneknél, akiknek 100, vagy több szerzett, közönséges naevus található a bőrén 3,4-szeres az esélye a melanoma malignum kialakulására, míg azok számára, akik 10 vagy több dysplasticus naevussal rendelkeznek, ez 12-szeres kockázatot jelent [112]. Noha a melanocytáer naevusok többnyire jóindulatú elváltozások, potenciálisan a legnagyobb rizikófaktort jelentik a melanoma malignum kialakulására, ugyanis a melanomák körülbelül 33 %-a közvetlenül naevusokból alakul ki [113].

#### 2.4.2.2. A melanoma epidemiológiája és rizikófaktorai

Ugyan a melanoma malignum cutis csak 4%-át adja a bőr eredetű daganatos eseteknek, mégis jelentős részét képezik az ezekből kifolyó halálozásoknak [114]. A betegséget növekvő incidenciája és mortalitása miatt a legveszélyesebb proliferatív elváltozások közé szokták sorolni. A melanoma incidenciája a világos bőrű, kaukázusi populációkban világszerte növekvő (3–7%-os) tendenciát mutatott az elmúlt fél évszázadban. Ennek legnyilvánvalóbb magyarázata a világos bőr alacsonyabb melanin tartalmából fakadó csökkent fotoprotektív képesség [115]. Magyarországon 2001 és 2012 között a melanoma malignum 100 000 lakosra vetített incidenciája 12-ről 23-ra emelkedett és a nemek között nem tapasztalható érdemi eltérés [116]. A kimutatások szerint a betegség leggyakrabban az 50–60 éves korosztályban jelentkezik; a férfiak esetében főként a törzsön, míg a nőknél a végtagokon jellemzőbb a daganat kialakulása [117]. Nem elhanyagolható azonban a 15–39 éves korosztály sem, ahol feltételezhetően a megváltozott napozási szokások következtében a melanoma veszélye jóval nagyobb mértékben érinti a fiatal nőket [118].

A melanoma kialakulásáért felelős rizikófaktorok közt megkülönböztetünk környezeti és genetikai hatásokat. Az egyik legnyilvánvalóbb környezeti ágens a napsugárzás részét képező UV-irradiáció, ami az esetek kétharmadában meghatározó tényező a melanomagenesisben [119]. Az UV-sugárzás és a daganatképződés közti kapcsolat szinte nyilvánvaló, hiszen minél többször következik be súlyos napégés az élet során, annál nagyobb az esély a melanoma kialakulására [120]. A különböző bőrszínű egyének nem egyformán reagálnak az UV-sugárzásra. Ennek osztályozásához alkotta meg Thomas B. Fitzpatrick a róla elnevezett bőrtípus skálát, ami hat csoportra osztja a populációt a napégéssel szembeni tolerancia, illetve a leburnulási-leégési hajlam alapján [121]. Melanoma kialakulása szempontjából az I-es bőrtípushoz tartozó (fehér bőrű, világos – általában szőke vagy vörös – hajú, könnyen leégő, de szinte sosem barnuló) egyének a legveszélyeztetettebbek. Ezzel szemben az V-VI. bőrtípussal rendelkező (pigmentált bőrű, fekete hajú) emberek bőrének magasabb melanin tartalma fokozott védelmet biztosít a káros UV-sugárzással szemben [121, 122].

A melanoma rizikófaktorai közt említést érdemelnek bizonyos mutációk, melyek daganatképződést eredményeznek. A familiáris eredetű melanomák aránya csupán 2% az összes melanomás esethez viszonyítva, de a mutációk hordozóinál a daganat 50–90%-os valószínűséggel alakul ki a 80. életévre [123]. Azon családok 25–40%-a esetében, ahol több generáción keresztül fordult elő melanoma malignum, a ciklin-dependens kináz inhibitor 2A (CDKN2A) gén mutációja is jelen volt. Ez a familiáris halmozódást mutató melanomák

leggyakoribb okozója. Kiseb arányban, de a protoonkogén ciklin-dependens kináz 4 (CDK4) mutációja is előfordul a melanomás családokban [114]. A CDKN2A gén által kódolt p16 fehérje tumorszuppresszor hatású és a sejtciklus G1 és S fázisai közti átmenetet szabályozza azáltal, hogy gátolja a CDK4-et a retinoblastoma fehérje (RB) foszforilálásában. Így a nem foszforilált, azaz aktív RB az E2F fehérjéhez kötődve gátolja annak transzkripciós aktivitását. A mutációk végeredményben az RB fehérje inaktivációját okozzák, amely hatására a sejtciklus az S fázisba lép és a sejtek kontrollálatlan osztódásba kezdenek. A CDK4 esetében ráadásul, onkogén mutáció révén, egyetlen allél mutációja is elegendő a daganatképződéshez [124].

Hasonló genetikai rizikótényező a melanocortin-1 receptor (MC1R) gén mutációja is. A gén által kódolt fehérje egy transzmembrán G protein, amely a melanocyták membránjában helyezkedik el, és receptorként szolgál az  $\alpha$ -melanocytastimuláló hormon számára. Az agonista bekötődését követően adenilát cikláz aktiváción keresztül fokozódik a melanocyták eumelanin termelése. Fiziológias esetben az UV-sugárzás hatására fokozódik az  $\alpha$ -melanocytastimuláló hormon képződése, ami az MC1R upregulációja révén intenzív pigmenttermelést eredményez. Az MC1R mutációi gátolják a cAMP által aktivált jelátviteli útvonalakat és ennek következtében csökken az eumelanin termelése. A Fitzpatrick-skálán az I-es bőrtípushoz tartozó egyének esetében például kimutatták az MC1R különböző, gátló hatású genetikai variánsait, ami összefüggésben állhat a melanoma magas rizikójával [125].

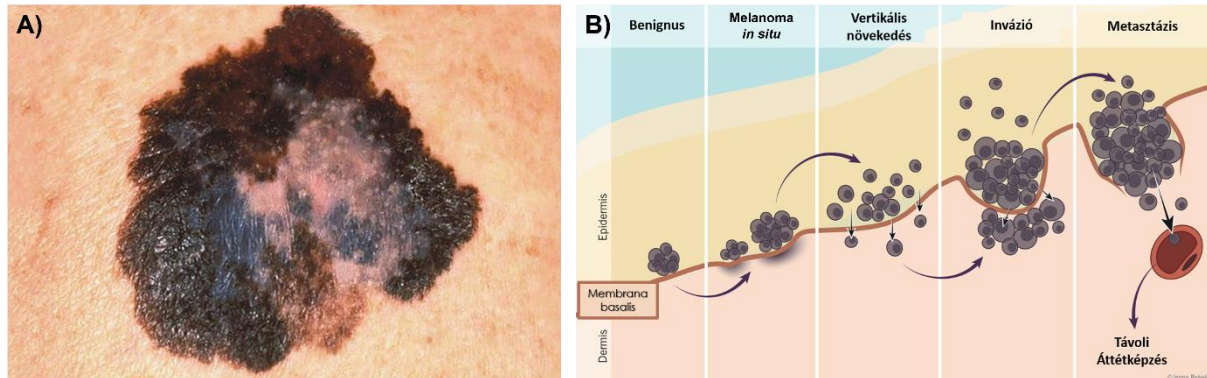
A sporadikus melanomák kialakulásáért is számos genetikai mutáció tehető felelőssé, azonban a CDKN2A funkcióvesztése kevésbé gyakori, mint családi halmozódást mutató melanomák esetében [126]. Nagyobb szerepe van viszont a BRAF és NRAS onkogén mutációknak, melyek a mitogén aktivált proteinkináz (MAPK) útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat a RAF fehérje foszforilálása, és ezáltal aktivációja révén. A RAF így képes lesz foszfátcsoport-transzferrel aktiválni a citoszolikus MAPK fehérjét, mely az ERK1/2-t foszforilálja. A folyamat végeredményeként a sejt osztódását elősegítő gének expressziója fokozódik [127], ezáltal befolyásolva a sejtosztódást, sejt differenciálódást, sejtöregedést, illetve a sejthalált. Az NRAS mutáció, amely a melanomák mintegy 20%-ban jelen van, képes függetleníteni a MAPK útvonalat az EC szignáloktól, így önálló, külső koordináló hatástól mentes, folyamatos aktivációt tesz lehetővé [128]. Gyakrabban következik be mutáció a BRAF onkogén kináz doménjében (körülbelül a melanomák felében [114]), egészen pontosan a 600-as kodonban, ahol egy báziscsere következtében valin helyett glutaminsav épül be a polipeptidláncba (BRAF<sup>V600E</sup>). Így a gén által kódolt fehérje tartós foszforilált állapotba kerül és a sejtnövekedést és proliferációt befolyásoló jelátviteli útvonalak konstitutív aktivációja következik be [129].

Érdeemes megjegyezni, hogy a naevusok körülbelül 80%-a is hordozza ezen mutációkat, mely magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért alakulhat ki egy anyajegyből közvetlenül melanoma [130].

### 2.4.2.3. A melanoma manifesztációja

A rizikófaktorok hatására kialakuló daganat többlépcsős folyamatban juthat el a legkedvezőtlenebb kimenetelű klinikai stádiumig (2.5. ábra), mely során jól definiálható hisztológiai progressziót írhatunk le.

A kezdeti stádiumban a daganat *in situ*, azaz a hám bazális sejtrétegét nem lépi át (I. stádium). Egy ponton túl azonban az elváltozás mikroinvazív válik: a daganatos sejtek áttörik a membrana basalis és elkezdnek behatolni a papilláris dermisbe (II. stádium). A progresszió ezen szakaszaiban a melanoma sugárirányú növekedést mutat, maximális vastagsága meghaladhatja a 4 mm-t, azonban közeli nyirokcsomóba és távoli szervbe sem adott még áttétet [131, 132]. Ezt követően a daganatos sejtek főként a bőr felszínére merőlegesen terjednek előbb a reticularis dermisbe (III. stádium), majd a subcutisba (IV. stádium) (2.5. ábra).



**2.5. ábra: A melanoma malignum cutis klinikai megjelenése.** (A) A melanoma korai diagnózisa kulcsfontosságú a túlélés szempontjából, ugyanis a mortalitás drámaian növekszik a daganat progressziójával. A klinikai diagnózis meghatározásában a zABCDE szabály nyújthat segítséget a lézió morfológiai jellemzése révén. A naevusokkal és más benignus folyamatokkal szemben a melanoma alakja szabálytalan (Asymmetry), széle irreguláris (Border), színe változatos, főként a barna és a fekete árnyalataiban keveredik (Color), átmérője általában az 5 mm-t meghaladja (Diameter), mérete pedig a z idő előrehaladtával növekszik (Evolution) [133]. A paraméterek tükrében, akár önvizsgálattal, a kár bőrgyógyászati szűréssel megítélhető, hogy szükséges-e komolyan venni és radikálisan fellépni az elváltozással szemben [134]. A kép forrása: <https://stamfordskin.com/en/dermatology/skin-cancer-melanoma-topic-overview/> (B) A melanoma malignum cutis áttétképzésének folyamata. A jóindulatú daganatokból, illetve naevusokból nem alakul ki szükségszerűen melanoma. A melanoma *in situ* az I. stádiumnak, míg a vertikális növekedés időszaka a III. stádiumnak felel meg (a II. stádium jellemzői nincsenek külön ábrázolva). A subcutis elérése, majd az áttétek megjelenése a IV. stádium eseményei közé tartozik. A kép forrása: <http://www.pathophys.org/melanoma/melanoma-progression/> (módosítva)

A progresszió következő szakaszát az áttétek képzése jelenti, melyet lokoregionális, regionális és távoli formákra oszthatunk fel. A lokoregionális metasztázisok magukba foglalják a szatellita vagy in-transit bőráttéteket, attól függően, hogy a primer tumortól 5 cm-en belül vagy kívül találhatóak. A regionális áttétek érinthetik az ún. sentinel nyirokcsomókat, vagy a távolabbi nyirokcsomókat. A melanomával kapcsolatos halálozásért leginkább a távoli áttétek tehetők felelőssé, amikor az áttétek különböző szerveket (elsősorban az agyat, a májat és a tüdőt) érintenek [135].

A szövettani grádust a hám daganat általi érintettsége, illetve a fő tumortömeg és a hám viszonya határozza meg. A besorolás meghatározásában a Breslow- és a Clark-index segíthet. A Breslow-index a tumorvastagság milliméterben kifejezett legnagyobb vertikális kiterjedését demonstrálja, a stratum granulosumtól egészen a tumor legmélyebb pontjáig. A Clark-index az invázió mértékét méri fel a bőr mélyebb szöveteiben [111].

### **2.4.3. Amit humán pigmentsejtekben az NMDAR-okról és a Ca<sup>2+</sup>-okról eddig tudunk**

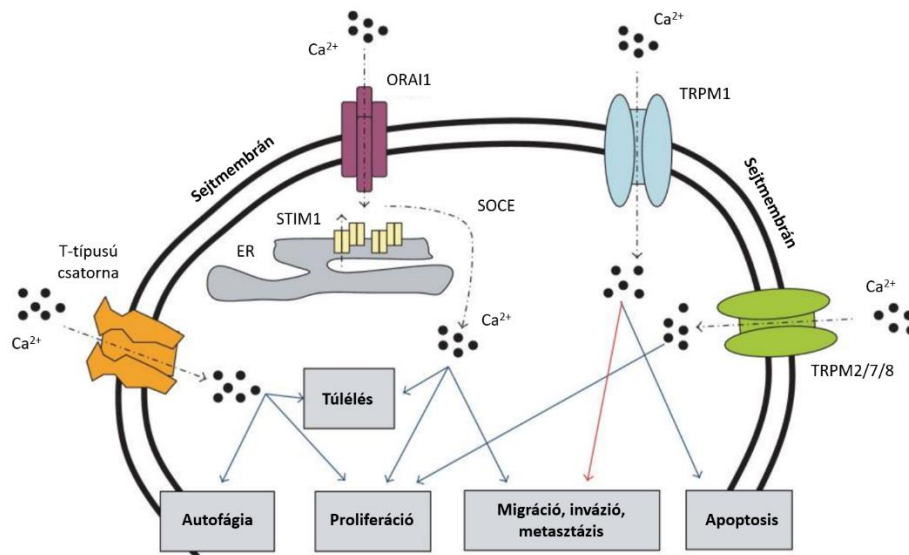
Mivel a pigmentsejtek Ca<sup>2+</sup>-homeosztázisának boncolgatása, a differenciálódó porcsejtekéhez hasonlóan, egy külön dolgozatot is megérdemelve, ezért igyekeztem lényegre törően összefoglalni az eddigi leglényegesebb ismereteket. Az első közlemények, melyek funkcionálisan aktív NMDAR-okról számoltak be daganatos elváltozásokban, az ezredfordulót követően jelentek meg [16]. Melanoma eredetű szövetmintákon végzett kísérletek igazolták, hogy a melanoma sejtek jelentősebb mennyiségű glutamátot képesek felszabadítani egy feltételezett autokrin hurok révén [17]. Nemcsak daganatos, de egészséges pigmentsejtek esetében is több publikáció demonstrálta a mGluR-ok jelenlétét és szerepét [18], azonban az iGluR-ok, és ezáltal az NMDAR-ok, feltérképezetlenek maradtak. Egy friss tanulmány *in vitro* és *in vivo* is megerősítette, hogy a nyitott NMDAR-okat gátló MK-801 a migráció és a tumorméret csökkenését eredményezte [136]. Az NMDAR-okat illetően azt találták, hogy a GluN2A génjében (*GRIN2A*) gyakran fordulnak elő mutációk [137], melyek jelenléte a melanomás betegek túlélésének csökkenésével korrelált [138]. Megállapításra került továbbá, hogy a *GRIN2A* tumorszuppresszor génnek tekinthető melanomában, mivel aktivitásának csökkenése kontrollálatlan sejtosztódáshoz vezet [139]. Melanocytákon a GluN2A és GluN2C (illetve AMPA receptor) alegységek expressziójáról számoltak be [140], azonban a pontos alegységösszetételt illetően még nincsenek információk. Farmakológiai megközelítésű

vizsgálatok szerint a melanocyták iGluR receptorai a sejt morfológia és a melanoszóma transzfer szabályozásában játszhatnak szerepet [141]. A GluN2(A) tehát a melanocytákkal és melanoma sejtekkel leggyakrabban összefüggésbe hozott NMDAR alegység, míg e tekintetben a GluN1 és GluN3 alegységek funkciói homályosak.

Az  $[Ca^{2+}]_i$  változásai fontos szabályozó tényezők a melanocyták sejtélettani folyamataiban. Érintik a melanocyták fejlődését, a mitogén stimulusokra adott válaszaikat, a melanintermelést és a fotoprotektív funkcióikat, valamint bizonyos betegségek (pl. vitiligo) kialakulásában is szerepet játszhat [142]. A  $Ca^{2+}$ -ok sejtbe való bejutását elősegítő mechanizmusok közül kiemelendő a TRP családba tartozó tranziens receptor potenciál melastatin 1 (TRPM1), mely által biztosított  $Ca^{2+}$ -koncentráció változások a melanogenezist regulálhatják. Alátámasztja ezt az a megfigyelés is, miszerint a TRPM1 expressziója UV(-B) sugárzás hatására p53-mediált útvonalon keresztül fokozódik [142]. Belote és Simon egészen friss közleményben számolt be keratinocytá ko-kultúrában tenyésztett melanocyták dendritjeinek lokális és kompartmentalizált  $Ca^{2+}$ -tranzienzeiről [143]. A  $Ca^{2+}$ -koncentráció fluktuációi a környező keratinocyták által felszabadított acetil-kolin és endotelin következtében jelentkeztek. A keratinocyták emellett glutamát spontán felszabadítására is képesek, amint azt humán epidermális keratinocytákon végzett kísérletek bizonyították [144]. A melanocyták nem képesek glutamátot termelni, így elképzelhető, hogy a melanocyták glutamáthozköthető jelátviteli folyamatai a keratinocytákkal alkotott szoros funkcionális kapcsolataira vezethetők vissza. Az epidermalis melanocyták ráadásul glutamát transzportereket expresszálnak, ami a lokálisan cirkuláló glutamát koncepcióját tovább erősíti [140].

A jelenleg rendelkezésre álló ismereteink szerint a  $Ca^{2+}$ -ok fontos szerepet töltenek be a malignus pigmentsejtek celluláris folyamataiban is (2.6. ábra). A  $Ca^{2+}$ -ok belépésére szolgáló apparátusból külön kiemelendők a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ -csatornák közé tartozó T-típusú csatornák, melyek expressziójának fokozódása szoros összefüggést mutat a melanoma progressziójával [145]. Megjegyzendő, hogy melanocyták és melanoma sejtek is expresszálják a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ -csatornák széles palettáját, azonban a T-típusú csatornák azok, amelyek szembetűnő eltéréseket mutatnak az egészséges és patológiás pigmentsejtek között. Mindemelllett a BRAF<sup>V600E</sup> mutációkat hordozó melanoma sejtekben a T-típusú csatornák génjei PCR reakciókkal bizonyítottan fokozott expressziós szinteket mutattak [146]. Szintén megemlítendő a melanocytákból már ismert TRPM1, mely tumorsuppresszornak tekinthető, hiszen expressziójának elvesztése agresszív sejt fenotípus megjelenéséhez vezet [147]. A

TRPM2, 7 és 8 ezzel szemben kifejezetten a metasztatikus formákra jellemző és a sejtsztódás fokozásában van szerepük [147].



**2.6. ábra: A  $\text{Ca}^{2+}$ -influx lehetőségei és annak hatásai melanoma sejtekben.**  $\text{Ca}^{2+}$  az extracelluláris térből különféle ioncsatornákon keresztül juthat be a daganatos pigmentsejtekbe. Ezek közé sorolhatjuk a tranziens receptor potenciál melastatin (TRPM) és a T-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat, valamint a raktár által vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -belépéssel (SOCE) összefüggésben lévő Orai csatornákat. A beáramló  $\text{Ca}^{2+}$ -ok eltérő funkciókért felelnek. Különösen szembetűnő eza TRPM1 és a TRPM2/7/8 esetében, ugyanis míg a TRPM1  $\text{Ca}^{2+}$ -szignáljai apoptotikus folyamatokat serkentenek, illetve migrációt, inváziót és metasztázisképző képességet gátolnak (a z az a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelek antitumor hatásokkal jellemezhetők), addig a TRPM2/7/8 éppen, hogy proliferációt fokozó  $\text{Ca}^{2+}$ -jeleket generálnak. A kép forrása [147] (módosítva).

A melanocyták és melanoma sejtek esetében is fontos celluláris jelenség a porcsejtek kapcsán már említett SOCE. Míg a melanocyták esetében a SOCE a melaninszintézishez járul hozzá [148], addig melanoma sejteken a SOCE farmakológiai gátlása erősen lecsökkentette a migrációt *in vitro* és a tumoros kolóniák létrejöttét *in vivo* [149]. Sun és munkatársai megfigyelései szerint a SOCE mediált  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk összefüggésben állnak a melanoma sejtek inváziós képességeivel, ugyanis a SOCE nélkülözhetetlen fehérjéinek (STIM, Orai) hiányában az invazivitásért felelős sejtnyúlványok, az ún. invadopodiumok képződése több mint felére esett vissza a kontrollhoz képest [150].

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -oknak fontos szerepük van a melanocyták és melanoma sejtek életében. Az irodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy a feltételezett NMDAR-ok, bár eltérő következményekkel, de komolyan kivehetik a részüket az egészséges és patológiás pigmentsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának szabályozásában.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Porcosodó, mesenchymalis, nagy sejtsűrűségű (HD) kultúrák

A porcosodó, ún. chondrogenicus sejtek nagy sejtsűrűségű kultúrákban tenyésztve képesek 2-3 nap alatt spontán módon ECM-et termelő chondroblastokká differenciálódni. E folyamat eredményeként a kultúrában jelentős mennyiségű hyalinporc-specifikus ECM szaporodik fel a tenyésztés hatodik napjára.

A porcosodásra képes, nagy sejtsűrűségű, mesenchymalis kultúrák, vagy high density (HD) kultúrák, a porcdifferenciáció tanulmányozásának egyik legismertebb *in vitro* modelljét képviselik. Kísérleteinkhez ezt, az elsőként Ahrens és mtsai által publikált, széles körben alkalmazott és könnyen reprodukálható kísérleti rendszert használtuk [64], mely lehetővé teszi a hyalinporc képződésének megfigyelését. A HD kultúrák létrehozásához szükséges chondroprogenitor mesenchymalis sejteket Ross-fajtájú, fehér, húshibrid csirkeembriók végtagtelepeinek distalis részéből nyertük ki. A kísérleteinkhez használt csirkeembriók fejlettsége a Hamburger és Hamilton szerinti 22–24. stádiumnak [63], azaz körülbelül 4,5 naposnak felelt meg. A tojásokból steril körülmények között eltávolítottuk az embriókat, majd sztereomikroszkóp alatt csipeszekkel leválasztottuk a végtagtelepek distalis részletét. Ezután az izolált végtagbimbó darabokat kalcium- és magnéziummentes foszfátpufferelt sóoldatba (pH 7,4) helyeztük. Az összegyűjtött szöveteket 0,25% tripszinben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 órán keresztül, 37°C-on emésztettük. Ezt a folyamatot 1:1 térfogat mennyiségű főtális marha szérummal (FBS; Gibco, Gaithersburg, MD, USA) állítottuk le, és a sejteket 10 percig tartó centrifugálással (800 × g) szeparáltuk a felülúszótól.

Kísérleteinkhez  $1,5 \times 10^7$  sejt/ml sűrűségű sejtszuszpenziókat használtunk és a kísérlet céljától függően egyetlen 15, 30 vagy 100 µl-es cseppet pipettáztunk üveg fedőlemezekre (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Németország), műanyag Petri-csészékbe vagy sejtenyésző edények lyukaiba (Eppendorf, Hamburg, Németország). A sejtek 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 80% relatív páratartalom mellett 2 óra alatt kitapadtak. Ezt követően a kultúrák 10% FBS-sel kiegészített, antibiotikumokat és antimikotikumot (50 egység/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1,25 µg/ml Fungizone; TEVA, Debrecen, Magyarország) is tartalmazó Ham F12 (N6760, Sigma-Aldrich) tápoldatot kaptak. A sejtenyésző médiumot kétnaponta cseréltük. A kicseppentés napját a tenyésztés 0. napjának tekintettük. A fejlődő kultúrákat 6 vagy 10 napig tartottuk fenn. A csirkeembriókon végzett kísérletekhez nem volt szükség a Debreceni Egyetem

Etikai Bizottságának engedélyére. *A kísérletekhez szükséges HD kultúrákat Dr. Matta Csaba, Dr. Juhász Tamás, Dr. Takács Roland, Somogyi Csilla, Katona Éva és Bíróné Barna Krisztina hozta létre és tartotta fenn.*

### **3.2. Melanocytá és melanoma sejt kultúrák**

A kísérleteinkhez használt normál humán epidermális melanocytá (NHEM) sejt kultúrákat (PromoCell GmbH, Heidelberg, Németország) juvenilis bőr minták epidermiséből állították elő. A melanocytákat a gyártó előírásainak megfelelően tenyésztettük Melanocyte Medium-ban (PromoCell GmbH).

Vizsgálatainkat emellett öt különböző melanoma sejt vonalon végeztük (A2058, HT168M1, HT199, M35/01 és WM35). Az A2058 sejt kultúrát amelanotikus melanoma nyirokcsomó metasztázisából hozták létre; a HT168M1 sejt vonalat HT168 sejtekkel injektált, immunszuppresszált egerek lépéből izolálták; a HT199 sejteket áttétképző nodularis melanoma primer daganatából nyerték ki; az M35/01 sejt kultúrát vertikális növekedési fázisban lévő superficial spreading melanomából állították elő; a WM35 sejt vonalat pedig áttétet nem képző, *in situ* melanomából származtatták. Az A2058 és WM35 kultúrákat az ATCC-től szereztük be (ATCC® CRL-1661™, Manassas, VA, USA). A HT168M1, a HT199 és az M35/01 sejt vonalakra Ladányi Andrea (Országos Onkológiai Intézet, Budapest) szíves segítségével tettünk szert. A melanoma sejteket RPMI-1640 sejt tenyésztő médiumban (Sigma-Aldrich) szaporítottuk. A tápfolyadékot 10% FBS-sel, 4,1 g/L glükózzal, 2 mmol/L L-glutaminnal (Gibco), penicillinnel (100 egység/ml) és streptomycinnel (100 µg/ml) egészítettük ki.

A melanocytá és melanoma kultúrákat 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> és 80%-os páratartalom mellett tenyésztettük, megközelítőleg 80%-os konfluencia eléréséig. *A kísérletekhez szükséges pigmentsejt kultúrákat Dr. Hajdú Tibor tartotta fenn.*

### **3.3. Az mRNS expresszió vizsgálata**

#### **3.3.1. RNS izolálás**

A polimeráz láncreakció specifikus génszakaszok sokszorosítását teszi lehetővé megfelelő primerekkel és egy hőstabil DNS-polimeráz enzim segítségével. Ha a módszert reverz transzkripcióval kapcsoljuk össze, azaz a sejtekben található messenger ribonukleinsavakat (mRNS) komplementer DNS-sé (cDNS) írjuk át, akkor az adott pillanatban éppen kifejeződő

géneken végezhetünk el specifikus amplifikációt (reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció /RT-PCR/).

A Petri-csészékben tenyésztett kultúrákat 4°C-os fiziológias NaCl-oldattal mostuk és TRIzol-ban (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) oldottuk fel. Ezután 20%-os kloroform (Sigma-Aldrich) hozzáadását követően a mintákat 15 percig, 4°C-on centrifugáltuk  $10000 \times g$ -n, majd a felülúszót 500  $\mu$ l RNáz-mentes izopropanollal (Molar Chemicals, Halásztelek, Hungary) inkubáltuk 1 órán keresztül, -20°C-on. Az izolált totál RNS-t nukleázmentes vízben (Promega, Madison, WI, USA) feloldottuk és tisztaságát NanoDrop 1000 spektrofotométerünkkel (NanoDrop Technologies, Bio-Science, Magyarország) határoztuk meg. Az RNS izolálást *Bíróné Barna Krisztina* végezte.

### 3.3.2. Reverz transzkripció

A kinyert RNS-mintákból High Capacity RT kit (Applied Biosystems) felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-eket írtunk. A reakcióhoz mintánként 2  $\mu$ g RNS mintát használtunk. Az alkalmazott reakcióelegy a porcosodó kultúrák esetében  $1 \times$  RT-pufferben 0,112  $\mu$ M RT random (oligo(dT)) primert, 0,5 mM dezoxinukleotid trifoszfát (dNTP) mixet és 200 egység MultiScribe™ reverz transzkriptáz enzimet tartalmazott. A pigmentsejtek mintái kapcsán 2  $\mu$ l  $10 \times$  RT-pufferhez 2  $\mu$ l  $10 \times$  RT random primert, 0,8  $\mu$ l  $25 \times$  dNTP-t (100mM) és 50 egység MultiScribe™ reverz transzkriptázt adtunk a mixtúrához. A cDNS írása 2 órán keresztül történt 37°C-on egy programozható termosztátban (Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA).

### 3.3.3. Polimeráz láncreakció

A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációja olyan primer párok segítségével történt, amelyeket az interneten hozzáférhető humán, illetve csirke nukleotid-szekvenciák alapján állítottunk elő (GenBank, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, online elérhetőség: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A humán primerek tervezése a Primer Premier 5.0 szoftverrel (Premier Biosoft, Palo, Alto, CA, USA), míg a csirke primereké a Primer BLAST web service-szel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) történt. A Primer Premier 5.0-val tervezett primerek specificitását *in silico* ellenőriztük a Primer BLAST segítségével. A primereket ezt követően mindkét esetben az Integrated DNA Technologies

cégtől (Coralville, IA, USA) rendeltük meg. A PCR-reakciókhoz használt forward és reverse primerek szekvenciáit, a specifikus anellációs hőmérsékleti paramétereket és a várható amplimer méreteket a 3.1 (csirke) és a 3.2 (humán) táblázatok foglalják össze.

Gén neve	Primer	Nukleotid szekvencia (5'→3')	GenBank ID	Anellációs hőmérséklet	Amplimer mérete (bp)
<b>GluN1</b> ( <i>GRIN1</i> )	sense	AGG AGA GAG AGT CCA AGG CT (560-579)	<b>NM_206979.1</b>	56°C	307
	antisense	ACC GCC ACT GCA TCA CTT AT (866-847)			
<b>GluN2A</b> ( <i>GRIN2A</i> )	sense	GCC ACA TGA TTA TTC ACC TC (2817-2836)	<b>XM_025155260.1</b>	49°C	373
	antisense	CAG CCA CAG GGT TTC TAA CT (3189-3170)			
<b>GluN2B</b> ( <i>GRIN2B</i> )	sense	AAA AGT TCC AGA AAC CCA A (2791-2809)	<b>NM_015289359.2</b>	50°C	402
	antisense	TGT GAC AAA TGC CAG TGA G (3192-3174)			
<b>GluN2C</b> ( <i>GRIN2C</i> )	sense	ACC CTG ACC CAT TTT TCC CG (5068-5087)	<b>XM_025141838.1</b>	50°C	303
	antisense	GAT TCC GGT CTC CAC GAA GG (5370-5351)			
<b>GluN2D</b> ( <i>GRIN2D</i> )	sense	GCA GCA ATT ACC CGG CCA (2090-2107)	<b>XM_014262098</b>	52°C	393
	antisense	CCA GCA GCA TGT AGA ACA CCC (2482-2462)			
<b>GluN3A</b> ( <i>GRIN3A</i> )	sense	AGC CTG AAC TTG CTC TTA TT (1271-1290)	<b>XM_001232181</b>	52,5°C	484
	antisense	ACG GTG TCA TTT CCT CCT (1754-1737)			
<b>GluN3B</b> ( <i>GRIN3B</i> )	sense	GGT GGA GCA TCC CTT CGT (1309-1326)	<b>XM_015299990.2</b>	57°C	177
	antisense	TAC CCA TAG CAG CAC TTC TTG T (1485-1464)			
<b>SLC17A7</b>	sense	TGG AAT GTG CTG CAA ACA ACC (1692-1712)	<b>XM_015616358.1</b>	54°C	169
	antisense	CGG CCG CTC CTT GTA TTT AT (1859-1840)			
<b>SLC17A6</b>	sense	TCG GGA TCC GAT GTA ACT TGG (459-479)	<b>XM_001168383.1</b>	50°C	106
	antisense	TTC GCT TTA AGG GTT CCC ACC (564-544)			
<b>GAPDH</b>	sense	GAG AAC GGG AAA CTT GTC AT (238-257)	<b>NM_204305</b>	54°C	556
	antisense	GGC AGG TCA GGT CAA CAA (793-776)			

**3.1. táblázat: A csirkeeredetű porckultúrák mintáin végzett PCR-reakciókban alkalmazott forward és reverse primerek szekvenciái, a reakciók specifikus anellációs hőmérsékleti paraméterei és a várható amplimer méretei.**

Gén neve	Primer	Nukleotid szekvencia (5'→3')	GenBank ID	Anellációs hőmérséklet	Amplimer mérete (bp)
<b>GluN1</b> ( <i>GRIN1</i> )	sense	CCA CGC TGA GTG ATG GGA CA (1568-1587)	NM_007327.3	56,5°C	369
	antisense	GGT ACT TGA AGG GCT TGG AAA A (1936-1915)			
<b>GluN2A</b> ( <i>GRIN2A</i> )	sense	TGC CAC AAC GAG AAG AAC (2946-2963)	NM_001134407.2	57°C	192
	antisense	GAT GGA GAA GAG CAA CCC (3137-3120)			
<b>GluN2B</b> ( <i>GRIN2B</i> )	sense	CAA GAG GCG TAA GCA GC (3413-3429)	NM_000834.3	55°C	170
	antisense	CCA GGT AGA AGT CCC GTA G (3582-3564)			
<b>GluN2C</b> ( <i>GRIN2C</i> )	sense	ACG TCC ACG GCA TTG TCT (676-693)	NM_000835.4	61°C	296
	antisense	GGA TGT CAT TCC CAT AAC CA (971-952)			
<b>GluN2D</b> ( <i>GRIN2D</i> )	sense	TGG CAA GCA CGG AAA GAA GAT C (1618-1639)	NM_000836.2	62,5°C	144
	antisense	TCC ACG AAG GGG ACG GAG AAG T (1761-1740)			
<b>GluN3A</b> ( <i>GRIN3A</i> )	sense	ACA CAA AAC CCA CTT CCA ACA TCC (2107-2130)	NM_133445.2	58°C	316
	antisense	TGC TCC ATA CTT TCC ATC CCC TAC (2422-2399)			
<b>GluN3B</b> ( <i>GRIN3B</i> )	sense	CGC AAG TGC TGC TAC GGC TAC (1436-1456)	NM_138690.2	61°C	479
	antisense	ACG GTG CGT CTG AAG AGG ATG (1914-1894)			
<b>GAPDH</b>	sense	CCA GAA GAC TGT GGA TGG CC (740-759)	NM_002046.5	54°C	411
	antisense	CTG TAG CCA AAT TCG TTG TC (1150-1131)			

**3.2. táblázat: A humán melanocyták és melanoma sejtek mintáin végzett PCR-reakciókban alkalmazott forward és reverse primerek szekvenciái, a reakciók specifikus anellációs hőmérsékleti paraméterei és a várható amplimer méretei.**

Az egyenként 21 µl össztérfogatú PCR-reakcióelegyek az alábbi összetevőket tartalmazták: 1-1 µl sense és antisense primer (10 µM), 0,5 µl cDNS, 0,5 µl dNTP (200 µM), és 0,625 egység (0,125 µl) Promega GoTaq® DNS-polimeráz enzim 1 × Green GoTaq® pufferben (Promega).

A DNS-szakaszok amplifikációjához egy programozható termosztátot (Labnet International) használtunk. A csirke eredetű cDNS-ek amplifikációja a következők szerint ment végbe: kezdeti denaturáció 90°C-on 1 percig, majd 30 ciklusban denaturáció, anelláció és extenzió (denaturáció 90°C-on, 30 másodpercig, anelláció minden egyes primerre nézve specifikus hőmérsékleti értéken, 30 másodpercig, illetve extenzió 72°C-on, 30 másodpercig), végül elongáció történik 72°C-on, 5 percig. A humán minták reakciói az alábbi paraméterek mellett történtek: kezdeti denaturáció 95°C-on 2 percig, majd 35 ciklusban denaturáció, anelláció és

extenzió (denaturáció 94°C-on, 1 percig, anelláció minden egyes primerre nézve specifikus hőmérsékleti értéken, 1 percig, illetve extenzió 72°C-on, 1,5 percig), majd ezek után elongáció 72°C-on, 10 percig.

A kapott PCR-termékeket etídium-bromidot és 1,5% agarózt tartalmazó gélben horizontálisan elektroforetizáltuk (120 V feszültség mellett). A reakció eredményeit gél dokumentációs rendszerünkben (Fluorchem E, Protein Simple, San Jose, CA, USA) hívtuk elő. A kapott jelek optikai denzitásainak (OD) számszerűsítését az ImageJ 1.8.0\_112 verziószámú (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) számítógépes program segítségével végeztük. *A primerek tervezését, a reverz transzkripciót, a PCR reakciókat és a géldokumentációt Dr. Hajdú Tibor, Dr. Matta Csaba és Dr. Juhász Tamás végezte.*

### **3.4. Fehérjeexpressziós vizsgálatok**

#### **3.4.1. A minták preparálása**

A fehérjeexpresszió vizsgálatát célzó western blot (wb) analízisünkhöz teljes sejtlizátumokra és szubcelluláris frakciókra volt szükségünk. Első lépésként a különböző tenyésztési napokról származó porcosodó kultúrákat, illetve a kellő konfluencia elérését követően a melanocytákat és a melanoma sejteket mostuk fiziológias sóoldattal. A sejteket sejtkaparó kanál segítségével lekapartuk, Eppendorf csövekbe gyűjtöttük és 2000 × g-n lecentrifugáltuk, majd ezt követően 100 µl Radio Immuno Precipitation Assay puffert adtunk a szuszpenziókhöz. Ez a homogenizáló puffer 150 mM NaCl-ot, 1,0% NP40-et, 0,5% nátrium dezoxikolátot, 50 mM Trist, 0,1% nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) (pH 8,0) tartalmazott, melyet proteáz inhibitorokkal (aprotinin /10 µg/ml/, 5 mM benzamidin, leupeptin /10 µg/ml/, tripszin inhibitor /10 µg/ml/, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, 5 mM etilén-diamin-tetraecetsav, 1 mM etilén-glikol-tetraecetsav, 8 mM Na-fluorid és 1 mM Na-ortovanadát) egészítettünk ki. Mindegyik komponenst a Sigma Aldrich-tól szereztük be.

A mintapreparálási lépések ennél a pontnál annak függvényében váltak el, hogy teljes sejtlizátumokkal vagy frakcionált mintákkal kívántunk tovább dolgozni. A teljes lizátumok előállításához a fehérjéket ultrahangos szonikálással tártuk fel jégen történő hűtés közben. A mintákat 3 alkalommal, egyenként 30 másodpercig szonikáltuk (50-es ciklusszámot alkalmazva) ultraszonikus homogenizátorral (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). A frakcionálási lépések, komplexitásukat tekintve, külön alfejezetben kerülnek bemutatásra. *A fehérjemintákat Dr. Hajdú Tibor és Dr. Juhász Tamás preparálta.*

### 3.4.2. Szubcelluláris frakcionálás

A frakcionálás célja, hogy a sejtek különböző kompartmentjeit (pl. citoszol, membránok, sejtmag) egymástól elválasszuk és ezáltal lehetővé váljon az egyes frakciók egyedi vizsgálata. A melanoma sejtek frakcionálása során a citoszol és a membrán, illetve a sejtmag kompartmenteket elválasztásához különböző protokollokat alkalmaztunk.

A citoszol és membrán frakciók izolálásához a mintákat először szonikáltuk, majd  $50000 \times g$  értéken centrifugáltuk  $4^{\circ}\text{C}$ -on, 90 percig. A citoszol frakciókat tartalmazó felülúszókat különválasztottuk, míg az üledékeket reszuszpendáltuk  $60 \mu\text{l}$  1%-os TritonX-100 (Reanal, Budapest, Hungary) detergens-tartalmú Radio Immuno Precipitation Assay pufferben (proteáz inhibitorokat is tartalmazott a fentiekben leírtak szerint) és ezután a mintákat egy órán keresztül jégen trituráltuk. Ezt újabb centrifugálási lépés követte  $50000 \times g$ -n,  $4^{\circ}\text{C}$ -on, 55 percig, majd a végeredményben kapott felülúszókat óvatosan szeparáltuk, ugyanis ezek tartalmazták a porcsejtek és melanoma sejtek membrán frakcióit [151].

A sejtmag frakciók izolálása az előbbiektől eltérően, egy ún. cukorgrádiens alapján történt. A kiindulási sejtüledékeket 1 ml puffer-A-ban oldottuk be. A puffer-A 10 mM hidroexietil-piperazin etánszulfonsavat, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot, 10 mM KCl-ot, 0,1 mM etilén-diamin-tetraecetsavat, 0,1 mM etilén-glikol-tetraecetsavat és 1 mM ditiotreitolt, illetve a fentebb leírtaknak megfelelő összetételben proteáz inhibitorokat tartalmazott. Ezután a mintákat  $50 \mu\text{l}$  Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) hozzáadását követően Dounce homogenizátorral szuszpendáltuk. A homogenizálást követően a mintákat  $770 \times g$ -n centrifugáltunk  $4^{\circ}\text{C}$ -on, 10 percig, majd az üledékeket 1 ml 2,2 mM szacharóz-puffer-A oldatban reszuszpendáltuk. Ezt egy második centrifugálási lépés követte  $40000 \times g$  értéken,  $4^{\circ}\text{C}$ -on, 90 percig. A végeredményben kapott üledékeket további kétszer mostuk 0,25 mM szacharóz-puffer-A oldattal, majd ugyanezen oldat  $200 \mu\text{l}$ -es térfogataiba beoldottuk. *A szubcelluláris frakciókat Dr. Hajdú Tibor és Dr. Juhász Tamás izolálta.*

### 3.4.3. SDS gélelektroforézis

A fentiekben leírt módon előállított sejt-lizátumokat és szeparált szubcelluláris frakciókat immunoblot technikával elemeztük. A minták fehérjetartalmát módosított BCA próbával (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A teljes és frakcionált lizátumokhoz az SDS-gélelektroforézis előtt Laemmli elektroforézis puffert

adtunk, hogy az egységes koncentrációik összevethetőséget biztosítsanak. A puffer összetétele a HD kultúrákból származó minták vizsgálatához: 10% SDS, 100 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,01% brómfenolkék, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4). Ezután 95°C-on, 5 percig forraltuk a mintákat. A puffer összetétele a pigmentsejtek vizsgálatához: 4% SDS, 10%  $\beta$ -merkaptoetanol, 20% glicerol, 0,004% brómfenolkék, 0,125 mM Tris-HCl (pH 6,8). Ezután 95°C-on, 10 percig forraltuk a mintákat.

Az NMDAR alegységek detektálásához a mintáinkat 7,5%-os akrilamid gélben elektroforetizáltuk. A chondrogenicus sejtek, a melanocyták, illetve a melanoma sejtek esetében 50, 40 illetve 10  $\mu$ g fehérjét tartalmazott egy-egy elektroforetizált minta. A szeparálást követően a mintákat a Bio-Rad Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) elektromos erőterének segítségével transzferáltuk nitrocellulóz membránokra (Bio-Rad Trans Blot Turbo Midi Nitrocellulose Transfer Packs), melyeket sovány tejpör 5%-os PBS-oldatával blokkoltuk 1 órán keresztül és a 3.3. ill. 3.4. táblázatban felsorolt primer antitestek megfelelő, blokkoló oldatban történt hígításainak jelenlétében inkubáltuk egy éjszakán át, 4 °C-on.

Ezt követően a membránokat háromszor 10 percig PBST-ben (0,1% Tween-20-szal /Amresco LLC, Solon, OH, USA/ kiegészített PBS) mostuk, majd a torma peroxidáz konjugált szekunder antitestek (anti-nyúl vagy anti-egér IgG /Bio-Rad Laboratories/) 1:1500-as hígításával inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Az antitesteket minden esetben 1% sovány tejpört tartalmazó PBS-ben oldottuk. Ezután ismét háromszor 10 percig mostuk a membránokat, majd az immunreaktív sávokat erősített kemilumineszcenciával hívtuk elő a gyártó utasításai szerint (HD kultúrák kapcsán: Millipore, Billerica, MA, USA; pigmentsejtek esetében: Advansta Inc., Menlo Park, CA, USA). A porcsejtek mintáin kapott kemilumineszcens jeleket röntgenfilmeken rögzítettük, melyekről 8-bites szürke skálán kódolt digitális felvételeket készítettünk géldokumentációs rendszerbe integrált CCD kamerával (DNR Bio-Imaging Systems Ltd. Jeruzsálem, Izrael). A pigmentsejtekhez tartozó jeleket géldokumentációs rendszerünkben (Fluorchem E, Protein Simple, San Jose, CA, USA) rögzítettük. A jelek OD értékeinek kvantifikálását ImageJ 1.8.0\_112 freeware segítségével végeztük. *A fehérjeminták wb analizisét Dr. Hajdú Tibor és Dr. Juhász Tamás végezte.*

Antitest	Forrás, klonalitás	Hígítási arány western blothoz	Hígítási arány immuncitokémia reakcióhoz	Forgalmazó, katalógus szám
Anti-GluN1	nyúl, poliklonális	1:600	-	Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA #4204
Anti-GluN1	nyúl, monoklonális	-	1:50	Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA #5704S lot:2
Anti-GluN2A	nyúl, poliklonális	1:600	-	Abcam, Cambridge, UK ab14596
Anti-GluN2B	nyúl, poliklonális	1:600	1:50	Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA #4207S lot:2
Anti-GluN3A	nyúl, poliklonális	1:200	-	Merck-Millipore, Billerica, MA, USA 07-356
Anti-GluN3B	nyúl, poliklonális	1:200	-	Abcam, Cambridge, UK ab35677-100
Anti-GluN3B	nyúl, poliklonális	-	1:50	Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael AGC-031
Anti-VGLUT1/2	nyúl, poliklonális	1:500	-	Synaptic Systems, Göttingen, Németország 135 503 lot:3
Anti-GAPDH	nyúl, poliklonális	1:1.500	-	Abcam, Cambridge, UK ab9485
Anti-β-actin	egér, monoklonális	1:10.000	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA A5441

**3.3. táblázat: A HD porckultúrákból származó mintákon alkalmazott primer antitestek specifikációi és hígítási paraméterei fehérjeexpressziós analízishez, illetve immuncitokémiai reakciókhoz.**

Antitest	Forrás, klonalitás	Hígítási arány western blothoz	Hígítási arány immuncitokémia reakcióhoz	Forgalmazó, katalógus szám
Anti-GluN1	nyúl, monoklonális	1:250	1:50	Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA #5704S lot:2
Anti-GluN1-1a	nyúl, poliklonális	1:200	1:50	Merck-Millipore, Billerica, MA, USA AB5046P
Anti-GluN2A	nyúl, poliklonális	1:200	1:50	Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA #4205S lot:1
Anti-GluN2B	nyúl, poliklonális	1:200	-	Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA #4207S lot:2
Anti-GluN3A	nyúl, poliklonális	1:500	1:50	Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael AGC-030
Anti-GluN3B	nyúl, poliklonális	1:250	1:50	Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael AGC-031
Anti-TATABP	egér, poliklonális	1:500	-	Abcam, Cambridge, UK ab51841
Anti-GAPDH	nyúl, poliklonális	1:500	-	Abcam, Cambridge, UK ab9485
Anti-β-actin	egér, monoklonális	1:10.000	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA A5441

**3.4. táblázat: A humán melanocytákból és melanoma sejtekből származó mintákon alkalmazott primer antitestek specifikációi és hígítási paraméterei fehérjeexpressziós analízishez, illetve immuncitokémiai reakciókhoz.**

### 3.5. Immuncitokémiai reakciók

Az NMDAR alegységek pontos szubcelluláris lokalizációjának feltérképezéséhez immuncitokémiai reakciókat végeztünk. A reakciókhoz a porc- és pigmentsejteket üveg fedőlemezekre tenyésztettük. A HD kultúrákat a porcdifferenciáció 3. napján Sainte-Marie fixálószerrel (99% etanol és 1% ecetsav elegye) fixáltuk 1 órán keresztül. Az optimális konfluencia elérését követően a melanocytá és melanoma kultúrákat 4%-os paraformaldehidben (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) fixáltuk 1 órán keresztül. Ezután a fixálószer maradványait kimostuk, majd PBS-sel történő öblítést követően blokkoltuk a reakciók szempontjából nem specifikus kötőhelyeket BSA (Amresco) 1%-os PBS-oldatával 30 percig, 37°C-on.

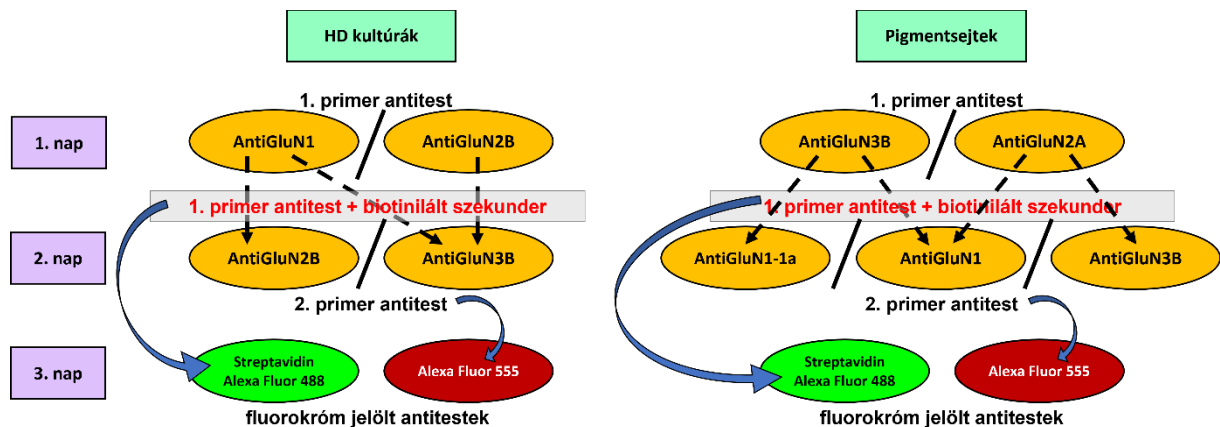
Ezután a kultúrákat egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk az első primer antitesttel. Ez a háromnapos HD kultúrák esetében az anti-GluN1 (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael)

monoklonális vagy az anti-GluN2B (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) poliklonális antitestek voltak, míg a pigmentsejtek esetében az anti-GluN2A (Cell Signaling) vagy az anti-GluN3B (Alomone Labs) poliklonális antitestek voltak. Mindegyik antitestet nyúlban termeltették és 1:50 arányában hígítottuk PBST-ben.

A kísérlet második napján háromszori PBS mosást követően, kecskében termelt, biotinilált, anti-nyúl szekunder antitesteket (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pipettáztunk a mintákra. A biotinilált antitesteket 1:1000 arányában oldottuk PBST-ben, mellyel 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltunk. Ezután a mintákat ismét PBS-sel mostuk, majd újabb 4°C-os inkubáció következett a második primer antitesttel egy éjszakán keresztül. Ezek a HD kultúrák esetében vagy az anti-GluN2B, vagy az anti-GluN3B antitestek voltak. A pigmentsejtek reakcióinak második primer antitestjei az egyik kísérleti felállásban (amikor az első primer antitest az anti-GluN3B antitest volt) vagy az anti-GluN1 antitest, vagy az anti-GluN1-1a antitest volt, míg a másik kísérleti konstellációban (amikor az első primer antitest az anti-GluN2A antitest volt) vagy az anti-GluN1 antitest, vagy az anti-GluN3B antitest volt. Mindegyik antitestet nyúlban állították elő. A második primer antitesteket a korábbiakhoz hasonlóan PBST-ben oldottuk 1:50 hígítási arányban.

Végül, a kísérletek harmadik napján a PBS mosásokat követően a kecskében termelt biotinilált szekunder antitesteket Streptavidin Alexa Fluor 488 fluorokróm jelölt antitestekkel (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), míg a második primer antitesteket Alexa Fluor 555 fluorokróm jelölt antitestekkel (Life Technologies) tettük láthatóvá. Ezen antitesteket 1:1000 arányában oldottuk PBST-ben. A kultúrákat Vectashield mounting mediummal (Vector Laboratories, Peterborough, UK) fedtük, mely a sejtmagi DNS jelölésére alkalmas DAPI-t is tartalmazta. Az immuncitokémiai reakciókat három független kísérletben végeztük el és mindegyik során 5-5 látótérről készítettünk fluoreszcens felvételeket.

Az immuncitokémiai reakciók során alkalmazott antitestek paramétereit a 3.3. és 3.4. táblázatok foglalják össze. A reakciók sematikus áttekintését a 3.1. ábra szolgálja. *A HD kultúrák és a pigmentsejtek immuncitokémiai reakcióit Dr. Hajdú Tibor végezte.*



**3.1. ábra: Az immuncitokémiai reakciók sémás áttekintése.** A high density (HD) kultúrák és a pigmentsejtek immuncitokémiai reakciói esetében a kísérlet első napján az első primer antitesttel inkubálunk (az antitesteket reprezentáló buborékok közti perjel vagy gyalagosságot jelent). Tekintettel arra, hogy az anti-GluN1, az anti-GluN2A, az anti-GluN2B és az anti-GluN3B is nyúlban előállított antitest, ezért a második napon biotinnal jelölt anti-nyúl antitesteket adtunk a mintáinkhoz, majd ezt követően inkubáltunk a második primer antitestekkel. A reakció harmadik napján a biotinnal jelölt szekunder antitesteket Streptavidin Alexa Fluor 488, míg a második primer antitesteket Alexa Fluor 555 fluorokróm jelölt antitestekkel vizualizáltuk.

### 3.6. Konfokális mikroszkópia

Az NMDAR alegységek pontos lokalizációinak és esetleges kolokalizációinak vizsgálatához fluoreszcens képeket rögzítettünk az Olympus FV3000 konfokális mikroszkóp (Olympus Corporation, Tokió, Japán) segítségével. A felvételek elkészítéséhez 60 × nagyítású PlanApo N olaj-immersiós objektívet (NA: 1,42) alkalmaztunk. A fluoreszcens képekhez használt gerjesztési lézerek 488 és 555 nm hullámhosszúak voltak. A z-tengely mentén készített sorozatfelvételek optikai szeletvastagsága 1 µm-es volt. A felvételek rögzítésekor kerültük annak a lehetőségét, hogy az immunpozitív foltokat jelölő pixelek túltelítettek legyenek. Eredményeink digitális rögzítéséhez az FV31S-SW szoftvert (Olympus Corporation) használtuk. A fluoreszcens képek összevetítése a program segítségével készült. A felvételeken képszerkesztő programok általi módosítás nem történt. *A konfokális mikroszkópiai analízist Dr. Juhász Tamás végezte.*

### 3.7. Szekretált glutamát koncentráció meghatározása

A chondrogenicus sejtek által a sejtenyésző médiumba felszabadított glutamát koncentrációját a Glutamine/Glutamate Determination Kit (Sigma-Aldrich) segítségével határoztuk meg. A

méréseket a gyártó útmutatásainak megfelelően végeztük. A kiindulási sejtszuszpenzióból  $5 \times 100 \mu\text{l}$ -t cseppentettünk Petri csészékbe, majd a porcfejlődés különböző napjain  $4 \times 200 \mu\text{l}$  tápoldatot távolítottunk el a kultúrákról, amiben megvizsgáltuk a szekretált glutamát mennyiségét. A háttér emissziót vak minták (steril víz és Ham's F12 médium) segítségével határoztuk meg. Az abszorbanciát 340 nm-en detektáltuk microplate olvasónkkal (Chameleon, Hidex, Turku, Finnország). A méréseket 3 független kísérletben végeztük 4 párhuzamos mintán a porcfejlődés minden egyes napján. *A HD kultúrák szekretált glutamát koncentrációinak meghatározását Dr. Juhász Tamás végezte.*

### **3.8. Farmakológiai kezelések és funkcionális vizsgálatok porcosodó sejteken**

#### **3.8.1. Alkalmazott farmakonok**

Az NMDAR-okhoz köthető lehetséges funkciókat különféle kezelőanyagok igénybevételével az alegységek aktivitásának befolyásolásán keresztül vizsgáltuk. Ezen kezelőanyagok közé tartozott az NMDAR-ok mesterséges agonistája, az NMDA, a GluN1 és GluN3 alegységekhez koagonistaként kötődni képes glicin, a GluN1 alegységek glicin-kötőhelyének kompetitív antagonistája, a DCKA, a GluN2B alegységek gátlószere, az ifenprodil, illetve a glicin receptorok (GlyR) specifikus antagonistája, a sztrichnin. A farmakonokat az alábbi koncentrációkban alkalmaztuk:  $20 \mu\text{M}$  NMDA (Sigma-Aldrich; törzsoldat  $20 \text{ mM}$  steril vízben oldva);  $10 \mu\text{M}$  glicin (Amresco; törzsoldat  $10 \text{ mM}$  steril vízben oldva);  $10 \mu\text{M}$  DCKA (5,7-diklorokinurénsav; Tocris Bioscience, Ellisville, MI, USA; törzsoldat  $10 \text{ mM}$  dimetil-szulfoxidban oldva);  $20 \mu\text{M}$  ifenprodil (Sigma-Aldrich; törzsoldat  $20 \text{ mM}$  steril vízben oldva);  $5 \mu\text{M}$  sztrichnin (Sigma-Aldrich; törzsoldat  $5 \text{ mM}$  etanolban oldva).

Az NMDA-t, a DCKA-t, az ifenprodilt és a sztrichnint folyamatosan alkalmaztuk porcosodó kultúráinkon az izolálás napjától (0. nap) kezdve. A glicint egyrészt az első naptól kezdve, másrészt a porcfejlődés 2. és 3. napján  $2 \times 4$  órán keresztül kapták a kultúrák. A funkcionális vizsgálatokhoz a porcsejteket 96-lyukú plate-ekben és kis méretű Petri-csészékben tenyésztettük (Eppendorf). Az oldószeres kontroll (OK) kultúrákat megfelelő mennyiségű oldószerrel (víz, etanol, dimetil-szulfoxid) kezeltük. *A HD kultúrák NMDAR-ainak farmakológiai kezelését Dr. Hajdú Tibor és Dr. Juhász Tamás végezte.*

### 3.8.2. A metabolikus aktivitás (életképesség) vizsgálata

A sejtek metabolikus aktivitásának (vagy életképességének) vizsgálatához MTT-assay-t használtunk. Az assay lényege, hogy az élő sejtek mitokondriális reduktázainak aktivitását kolorimetriásan meghatározzuk és ebből következtetünk a metabolikus aktivitásra (vagy az ún. életképességre) [152]. Bizonyos megközelítések a módszert a sejtosztódás követésére is alkalmasnak ítélik, lévén az osztódás fokozódásával keletkező több sejt nagyobb metabolikus aktivitást produkál, és vice versa. Saját laboratóriumi tapasztalataink azonban más sejtosztódást vizsgáló módszerek és az MTT-assay között nem minden esetben találtak arányos összefüggést, ezért mi a proliferáció követésére külön módszert alkalmaztunk és az MTT-assay-vel csak a metabolikus aktivitást (életképességet) vizsgáltuk.

Az MTT-assay során egy sárga színű tetrazólium só, az MTT oldatát (3-[4,5-dimetiltiazolil-2]-2,5-difeniltetrazólium bromid; VWR International, Debrecen, Hungary) adtuk a kultúráinkhoz (MTT-oldat: 5 mg MTT/1 ml PBS). Ezután 2 órán keresztül inkubáltuk a sejteket 37°C-on, ami alatt a mitokondriális enzimek az MTT-t lila színű, oldhatatlan formazán kristályokká alakítják. A csapadékot 500 µl MTT szolubilizáló oldat segítségével oldhatóvá tesszük, ami a teljesen lila színűvé váló oldat OD-jának vizsgálatát teszi lehetővé (az MTT szolubilizáló oldat 90%-ban izopropanolból (Molar Chemicals) és 10%-ban Triton X-100-ból (Reanal) áll). Az abszorbancia meghatározását 570 nm-en végeztük microplate olvasó spektrofotométerünkön (Chameleon). A kísérleti csoportok OD értékeit az oldószeres kontrollra normalizáltuk és százalékos változás formájában tüntettük fel. *Az életképesség vizsgálatát Dr. Hajdú Tibor és Dr. Juhász Tamás végezte.*

### 3.8.3. A sejtosztódás vizsgálata

A sejtek osztódási rátáját a radioaktív trícíált timidinnek (<sup>3</sup>H-timidin) az osztódó sejtek DNS-ébe történő beépülését (inkorporációját) követően határoztuk meg. Az assay során 1 µCi/ml <sup>3</sup>H-timidint tartalmazó médiumot adtunk a sejt kultúráinkhoz (185 GBq/mM metil-<sup>3</sup>H-timidin oldatból kihígítva; Amersham Biosciences, Budapest, Magyarország).

Az inkorporációs assay-hez a porcsejteket szcintillációs plate-ekben (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) tenyésztettük. A sejtek a <sup>3</sup>H-timidint tartalmazó médiumot a differenciáció 3. (vagy 10.) napján kapták meg az NMDAR agonistákkal és antagonistákkal való kezeléseket követően. A <sup>3</sup>H-timidinnel való 16 órás inkubáció után a

kultúrákat PBS-sel mostuk és a fehérjéket 5%-os triklórecetsav (Acros Organics, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) jéghideg oldatával precipitáltuk. Ezután a plate-eket két hétig szárítottuk, majd a minták radioaktivitását folyadékszintillációs üzemmódban használt microplate olvasónk (Chameleon, Hidex) segítségével határoztuk meg. Minden kísérleti csoport 10 mintából állt és a kísérletet háromszor ismételtük. A kísérleti csoportok szcintillációs értékeit az oldószeres kontrollra normalizáltuk és százalékos változás formájában tüntettük fel. *A sejtosztódás vizsgálatát Dr. Hajdú Tibor és Dr. Juhász Tamás végezte.*

### **3.8.4. A porcmátrix termelés analízise**

Az érett porcra jellemző ECM a tenyésztés harmadik napjától kezd megjelenni, így a termelt mátrix minőségi és mennyiségi analízisét 6 vagy 10 napos HD kultúrákban végeztük. A vizsgálathoz metakromáziás festékeket, mint például a dimetil-metilénkék (DMMK; Aldrich, Németország) és a toluidinkék (TK; Reanal) alkalmaztuk.

Az ECM kvalitatív analíziséhez 24-lyukú plate-ekbe helyezett kerek, üveg fedőlemezeken (Menzel-Gläser) tenyésztettük a HD kultúrákat, a különböző kezelési csoportok kísérleti elrendezésének megfelelően. A porcfejlődés hatodik és tizedik napján a tenyészeteket alkohol:formalin 4:1 arányú elegyével fixáltuk és 3%-os ecetsavban (pH 1,8) oldott 1%-os DMMK-val festettük [102]. Az alacsony pH-n történő festés során kizárólag a szulfátcsoportok disszociálnak, így az egyéb polianionok (pl. nukleinsavak) nem kötik meg a festéket. A festett kultúrák metakromatikusan festődött porcnodulusairól a Nikon Eclipse E800 mikroszkóphoz (Nikon, Tokió, Japán) csatlakoztatott Spot Advanced kamera segítségével készítettünk felvételeket.

A porcmátrix szulfatált komponenseinek mennyiségi meghatározása szemikvantitatív megközelítéssel, TK metakromáziás festék alkalmazását követően történt. A 6-napos kultúrákat Kahle-féle fixálóval (28% etanol, 4% formalin és 2% jégecet) fixáltuk, majd glicin-HCl pufferben (pH 1,8) oldott 0,1%-os TK-oldattal festettük 5 percig. A nem kötődött festékmolekulákat glicin-HCl pufferben történő félórás mosás révén távolítottuk el. Az erősen szulfatált PG-khez és GAG-okhoz kötődött festékmolekulákat 8% HCl abszolút etanos oldatával távolítottuk el, majd a minták festéktartalmát fotometriás módszerrel, 625 nm-en történő leolvasással határoztuk meg microplate reader (Chameleon, Hidex, Turku, Finland) segítségével. A módszer eredményeként a fő ECM komponensek mennyisége az OD értékekkel arányosnak mutatkozik [102]. Az OD-kat 3 különböző kísérlet mindegyik kísérleti csoportjának

3-3 különböző biológiai mintájában megvizsgáltuk. *A metakromatikus festéseket és azok értékelését Biróné Barna Krisztina, Dr. Matta Csaba és Dr. Juhász Tamás végezte.*

### **3.8.5. A citoszolikus $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció és $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek vizsgálata**

Méréseinket a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens fluoreszcens festék, a Fura-2 használatával végeztük 30 mm-es, kerek, üveg fedőlemezeken (Menzel-Gläser) tenyésztett HD kultúrákon a porcfejlődés első, második és harmadik napján [70]. A Fura-2-vel töltött sejteket invertált fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Kowasaki, Japán) alatt vizsgáltuk  $40 \times$  olajimmerziós objektívvel. A méréseket kettős hullámhosszúságú monokromátor berendezéssel (Delta Scan, Photon Technologies International, Lawrenceville, KY, USA) perfúziós kamrában szobahőmérsékleten  $1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$ -koncentrációjú Tyrode standard sóoldatban (összetétele:  $137 \text{ mM NaCl}$ ,  $5,4 \text{ mM KCl}$ ,  $0,5 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $1,8 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $11,8 \text{ mM}$  hidroexietil-piperazin etánszulfonsav,  $1 \text{ g/L}$  glükóz; pH: 7,4) végeztük. A gerjesztő hullámhosszúságot  $340$  és  $380 \text{ nm}$  között,  $50 \text{ Hz}$  frekvenciával változtattuk és az emittált fényt  $510 \text{ nm}$ -en detektáltuk. Az adatok kinyerési frekvenciája  $10 \text{ Hz}$  volt. Az emittált fluoreszcencia-intenzitások hányadosait váltakozó hullámhosszokon történő gerjesztést követően (F340/F380) mértük. Vizsgálataink során a teszt oldatot ( $20 \mu\text{M}$  NMDA Tyrode-oldatban oldva), illetve a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Tyrode-oldatot ( $5 \text{ mM}$  etilén-glikol-tetraecetsavat tartalmaz  $\text{CaCl}_2$  nélkül) közvetlenül a sejteken alkalmaztuk egy  $250 \mu\text{m}$  belső átmérőjű perfúziós kapillárison keresztül (Perfusion Pencil™; AutoMate Scientific, San Francisco, CA, USA)  $1,5 \mu\text{l/s}$  áramlási ráta mellett és lokális perfúziós rendszert használva (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific). A  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket 3 különböző kísérletben mértük.

A spontán  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket az LSM 510 META lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) vizsgáltuk. Mindegyik mérés szobahőmérsékleten történt. Röviden a kísérlet lényege az alábbi. A kétnapos kultúrákat  $30$  percig  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk  $10 \mu\text{M}$  Fluo-4-AM koncentrációjú F12 médiumban. A felvételeket standard Tyrode-oldatban rögzítettük. A  $20 \mu\text{M}$ -os NMDA és a  $20 \mu\text{M}$ -os ifenprodil teszt oldatát Tyrode-oldatból állítottuk elő. A line-scan képek rögzítését a kultúrákon történő oldatcserét követően azonnal megkezdtük. A mérések során csupán azokat a sejteket vizsgáltuk, melyek  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációkat mutattak, a többi sejttel nem foglalkoztunk. A line-scan felvételeket  $0,8 \text{ ms/vonal}$  és  $512 \text{ pixel/vonal}$  paraméterekkel rögzítettük  $7 \text{ ms}$ -os intervallumokban, összességében  $8192$  vonalat rögzítve  $63 \times$  vízimmerziós objektívvel. A méréseket  $3$  független kísérletben ismételtük meg.

A felvételek analizését a DE ÁOK Élettani Intézetében kifejlesztett automata esemény detektáló szoftver segítségével végeztük el. A detektált spontán tranziensek maximális amplitúdójának felénél mért időt a Prism (Graphpad Software, Inc.) 8.0.1. verziójának segítségével kalkulálva tudtuk meghatározni. A  $P < 0,05$  esetén tapasztalt különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. A box plot diagram az individuális adatokat (pöttyök), az átlagokat, a szórásokat, illetve a 25. és 75. percentiliseket tünteti fel. *A chondrogenicus sejtek szabad, citoszolikus  $Ca^{2+}$ -koncentrációjának, illetve spontán  $Ca^{2+}$ -oszcillációinak vizsgálatát Dr. Fodor János és Dr. Matta Csaba végezte.*

### **3.9. Statisztikai analízis**

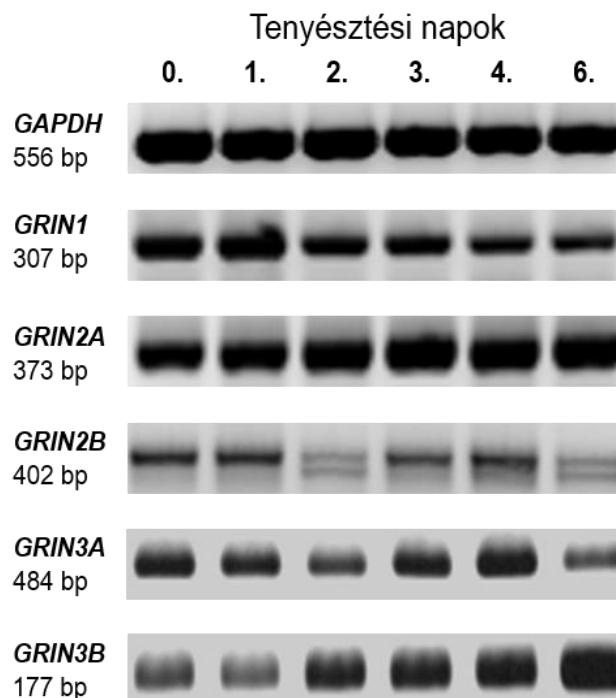
A bemutatott reprezentatív adatok minden esetben legalább három párhuzamos kísérlet közül mutatják a jellemző változásokat. A számadatok átlagértékek  $\pm$  standard hiba (SEM). A statisztikai elemzést a wb-ok, illetve az életképesség, az osztódóképesség és a metakromáziás porcterületek vizsgálata során Student-féle páratlan kétvégű  $t$ -teszttel, majd ezt követően Dunnett-féle próbával végeztük (\* $P < 0,05$ ). A spontán  $Ca^{2+}$ -események hosszának statisztikai eloszlását NMDA-val történő kezelést követően  $\chi^2$ , valamint Mann-Whitney teszttel végeztük. *A statisztikai analízist Prof. Dr. Panyi György és Dr. Juhász Tamás végezte.*

## 4. Eredmények

### 4.1. NMDAR-ok vizsgálata chondrogenicus sejtekben

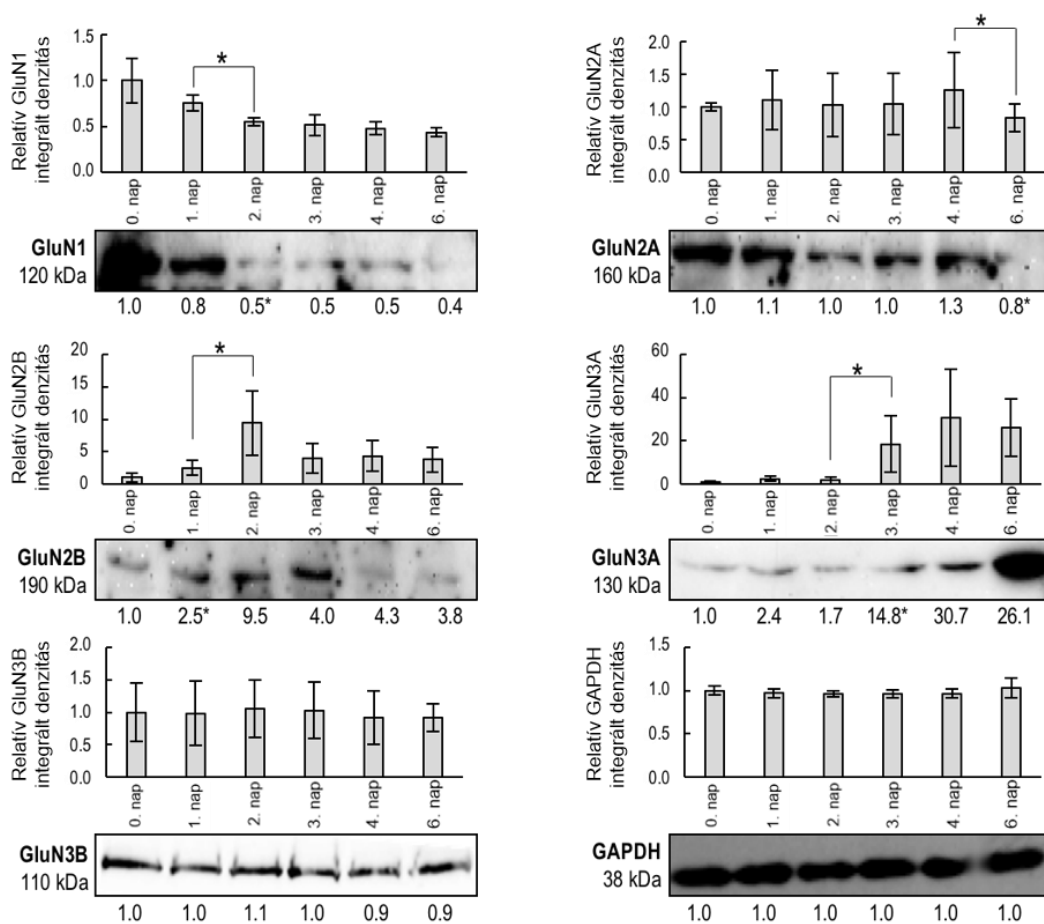
#### 4.1.1. A differenciálódó porcsejtek NMDAR alegységeket expresszálnak

A csirke GluN1 (*GRIN1*), GluN2A (*GRIN2A*), GluN2B (*GRIN2B*), GluN2C (*GRIN2C*), GluN2D (*GRIN2D*), GluN3A (*GRIN3A*) és GluN3B (*GRIN3B*) NMDAR alegységek mRNS-einek expresszióját RT-PCR-rel vizsgáltuk nagy sűrűségű, porcosodó kultúráinkban. Az RT-PCR-rel kapott eredmények a GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN3A és GluN3B NMDAR alegységek mRNS-einek meglétét igazolták a chondrogenicus mesenchymalis sejtek valamennyi fejlődési stádiumában (4.1. ábra). A kivételt a GluN2C és GluN2D alegységek képezték, melyek expresszióját nem tudtuk detektálni mintáinkban. A gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS-expressziója a reakciók belső kontrolljaként szolgált.



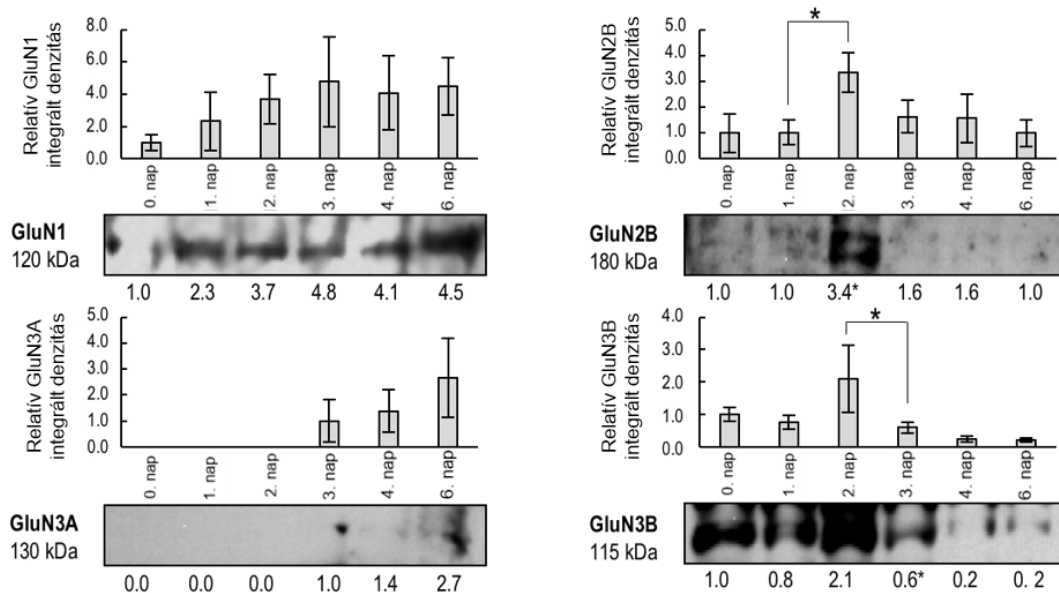
**4.1. ábra: N-metil-D-aszpartát receptor alegységek mRNS-expressziós profilja csirke eredetű, porcosodó HD kultúrákban.** Az mRNS-expressziók vizsgálata a teljes tenyésztési periódust (0-6. nap) felölelte (minden tenyésztési nap esetében n=3). A reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciók a GluN1 (*GRIN1*), a GluN2A (*GRIN2A*), a GluN2B (*GRIN2B*), a GluN3A (*GRIN3A*) és GluN3B (*GRIN3B*) alegységek kifejeződését bizonyították. A GluN2C (*GRIN2C*) és a GluN2D (*GRIN2D*) expresszióját nem detektáltuk. A reakció belső kontrollja a gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS-expressziója volt. Ez a reprezentatív felvétel az egyike annak a 3 független kísérletből származó gélképnek, melyek hasonló expressziós profilt mutattak.

Az RT-PCR-rel igazolt alegységek fehérje-szintű megjelenését wb-tal ellenőriztük. A vizsgálatot két lépésben közelítettük meg: egyrészt teljes sejtlizátumokon, másrészt membrán frakciókon vizsgáltuk meg az NMDAR alegységek jelenlétét (4.2. ábra). A teljes lizátumokban a GluN1 alegység szintje fokozatosan csökkent a chondrogenesis során, míg a GluN2A alegység kifejeződése a kultúrák érett stádiumában hirtelen csökkent le. A GluN2B expressziója ezzel szemben a második és harmadik fejlődési napokon ért el kiugró értékeket, amikor is a porcra jellemző ECM-termelésben részt vevő chondroblastok megjelennek. A GluN3A a harmadik differenciációs naptól mutatott erősödő kemilumineszcens jeleket, míg a GluN3B a teljes tenyésztési időszakban változatlan módon kifejeződött.



**4.2. ábra: N-metil-D-aszpartát receptor alegységek fehérjeexpressziója chondrogenicus sejtek teljes lizátumában.** A protein-expressziók vizsgálata a teljes tenyésztési periódust (0-6. nap) felölelte (n=3 minden tenyésztési nap esetében). A teljes lizátumokon végzett western blotok a GluN1, a GluN2A, a GluN2B, a GluN3A és GluN3B alegységek protein szintű jelenlétét igazolták. A vizsgálat belső kontrollja a gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) fehérjeexpressziója volt. Mindegyik vizsgált fehérje esetében összegyűjtöttük 3 párhuzamos kísérlet vonatkozó kemilumineszcens sávjainak optikai denzitás (OD) értékeit, amelyek átlagértékeit oszlopdiagramokon ábrázoltuk ( $\pm$  SEM) és mellékeljük hozzá az egyik kísérlet eredményeinek reprezentatív felvételét. Ez a reprezentatív felvétel az egyike annak a 3 független kísérletből származóknak, melyek hasonló expressziós profilt mutattak. Az OD értékeket az adott napi belső kontroll értékeire, majd a 0. napi kultúrák értékeire normalizálva ábrázoltuk. Az adott napi fehérjeexpressziós értékek OD-ét minden esetben az előző napi értékekhez viszonyítottuk és a szignifikáns változásokat csillaggal jelöltük (\* $P < 0,05$ ).

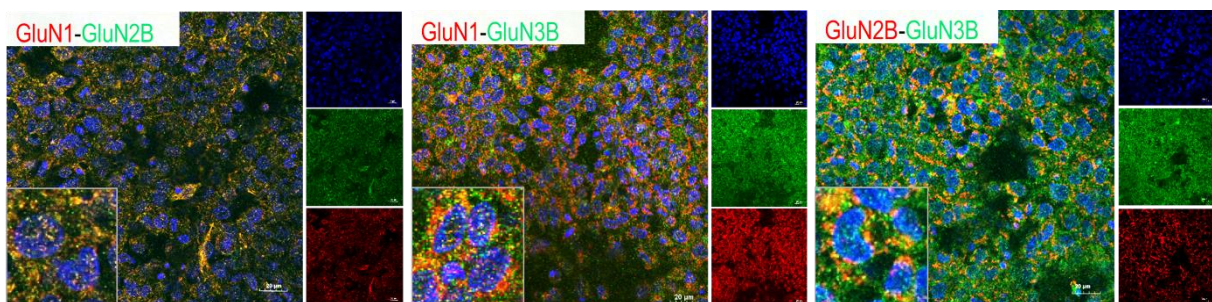
A HD kultúrákból izolált membrán frakciókon ugyanezen antitestekkel végeztünk wb-analízist. A blotokon látható sávok a membránokba transzlokálódó GluN alegységeket hivatottak reprezentálni (4.3. ábra). A porcsejtek membrán frakciójában a GluN1, a GluN2B, a GluN3A és a GluN3B alegységek kifejeződését detektáltuk. A GluN1 expressziója egy fokozatosan emelkedő trendet követett, míg a GluN2B és GluN3B alegységek a fejlődés második napján mutattak szignifikánsan intenzívebb jeleket. A GluN3A alegység membrán-jelenlétét csak a fejlődési periódus 6. napjának végén tudtuk detektálni. A GluN2A esetében egyik fejlődési napon sem észleltünk kemilumineszcens jeleket, a negatív eredményt nem tüntettük fel a 4.3. ábrán.



**4.3. ábra: N-metil-D-aszpartát receptor alegységek fehérjexpressziója chondrogenicus sejtek membrán frakciójában.** A protein expressziók vizsgálata a teljes tenyésztési periódust (0-6. nap) felölelte (n=3 minden tenyésztési nap esetében). Az izolált membrán frakciókon végzett western blotok a GluN1, a GluN2B, a GluN3A és GluN3B alegységek jelenlétét igazolták. A GluN2A expresszióját nem detektáltuk a membrán frakciókban. A vizsgálat belső kontrollja a gliceraldehid-foszfat dehidrogenáz (GAPDH) fehérjexpressziója volt. Mindegyik vizsgált fehérje esetében összegyűjtöttük 3 párhuzamos kísérlet vonatkozó kemilumineszcens sávjainak optikai denzitás (OD) értékeit, amelyek átlagértékeit oszlopdiagramokon ábrázoltunk ( $\pm$  SEM) és mellékeljük hozzá az egyik kísérlet eredményeinek reprezentatív felvételét. Ez a reprezentatív felvétel az egyike, annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló expressziós profilt mutattak. Az OD értékeket a 0. napi kultúrák értékeire normalizálva ábrázoltuk. Az a dott napi fehérjexpressziós értékek OD-it minden esetben az előző napi értékekhez viszonyítottuk és a szignifikáns változásokat csillaggal jelöltük (\* $P < 0,05$ ).

### 4.1.2. A porcfejlődés kritikus napján az alegységek lokalizációi csatornaformálást sejtetnek

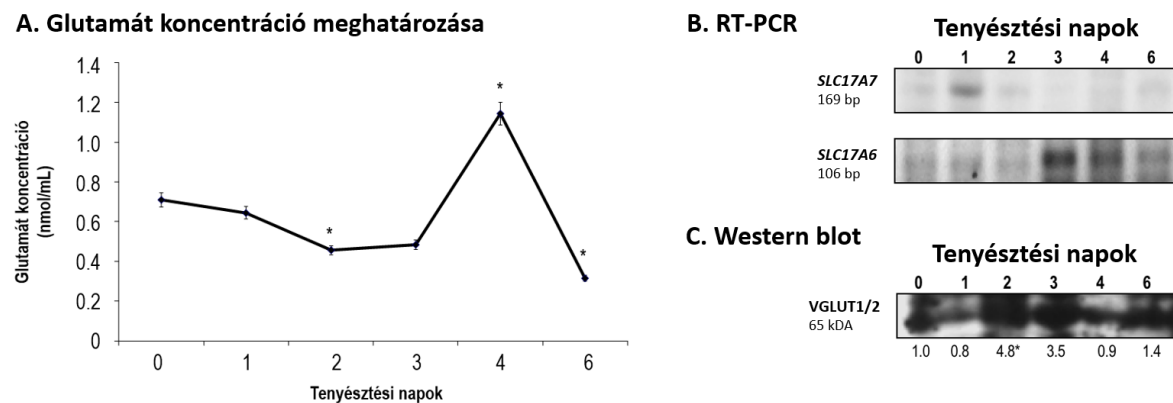
A HD kultúrák differenciálódó sejtjeiben azonosított GluN1, GluN2B és GluN3B alegységek pontos szubcelluláris elhelyezkedését és ioncsatorna-formálást sejtető potenciális kolokalizációját immuncitokémiai reakciókkal vizsgáltuk meg. Mivel a porcdifferenciáció 3. napján kulcsfontosságú változások következnek be a sejtenyészetekben, ezért kísérleteinkhez 3 napos kultúrákat használtunk. A konfokális mikroszkóppal készített felvételeken látható, hogy a GluN1 alegység a GluN2B és GluN3B alegységekkel is kolokalizál (4.4. ábra). Mivel hármas immuncitokémiai jelölést technikailag nem tudtunk kivitelezni az antitestekkel, ezért következő lépésként csak az anti-GluN2B és anti-GluN3B antitesteket alkalmaztuk közös reakcióban. A kísérlet eredményei szerint a GluN2B alegységek immunfluoreszcens jelei kolokalizációt mutatnak a GluN3B alegységgel. Mivel a membrán frakciókon végzett wb eredmények a GluN2A teljes hiányát és a GluN3A korai porcfejlődési időszakban mutatott elenyésző expresszióját jelezték, ezért ezeket az alegységeket a potenciális, membrán lokalizációjú NMDAR heteromerek kialakításában nem vettük számításba és elvetettük az immuncitokémiai reakciókkal való vizsgálatukat.



**4.4. ábra: A GluN1, GluN2B és GluN3B alegységek intracelluláris lokalizációja és eloszlása 3 napos porckultúrákban.** A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken a GluN1 alegység (pirossal jelölve) expresszióját, valamint GluN2B vagy GluN3B alegységgel (mindkettő zölddel jelölve) való kolokalizációját (sárga pöttyök) azonosítottuk a differenciálódó porcsejtekben. Egy másik kísérleti felállásban vizsgálva az a legységek szubcelluláris expressziós mintázatát látható, hogy a GluN2B (pirossal jelölve) és a GluN3B alegység (zölddel jelölve) sárga színű immunfluoreszcens jelei kolokalizálnak. A jelek szubcelluláris eloszlásának demonstrálásához azt az 1  $\mu\text{m}$ -es optikai szeletet választottuk ki, amely a látótérben lévő sejtek többségén keresztülhalad. A bemutatott mikrofotók a 3-3 független kísérlet eredményeit jól reprezentáló felvételek. A 3 független vizsgálatban egybecsengő immunpozitivitást és kolokalizációs mintázatot láttunk. Mindegyik panelen inzerben kiemeltünk néhány reprezentatív sejtet. A lépték 20  $\mu\text{m}$ -es.

### 4.1.3. A chondrogenicus sejtek glutamátot termelnek

Miután megbizonyosodtunk az NMDAR alegységek expressziójáról és lokalizációjáról, arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a porcosodó mesenchymalis sejtek képesek-e glutamátot szekretálni a sejttenyésztő médiumba. A HD kultúrák felülűszójában minden tenyésztési napon nagyobb glutamát koncentrációt figyeltünk meg a sejtmentes tápoldathoz viszonyítva, ami a sejtek spontán endogén glutamát felszabadítására utal. A kolorimetriás glutamin/glutamát szint meghatározó assay 0,2–1,1 nmol/ml szekretált glutamát koncentrációt állapított meg a tápoldatokban (4.5. ábra). A glutamátszekréció kapcsán RT-PCR és wb vizsgálatok megerősítették, hogy a porcsejtek a vezikuláris glutamát transzporter 1-et és 2-t (VGLUT1, VGLUT2) expresszálják a chondrogenesis során.



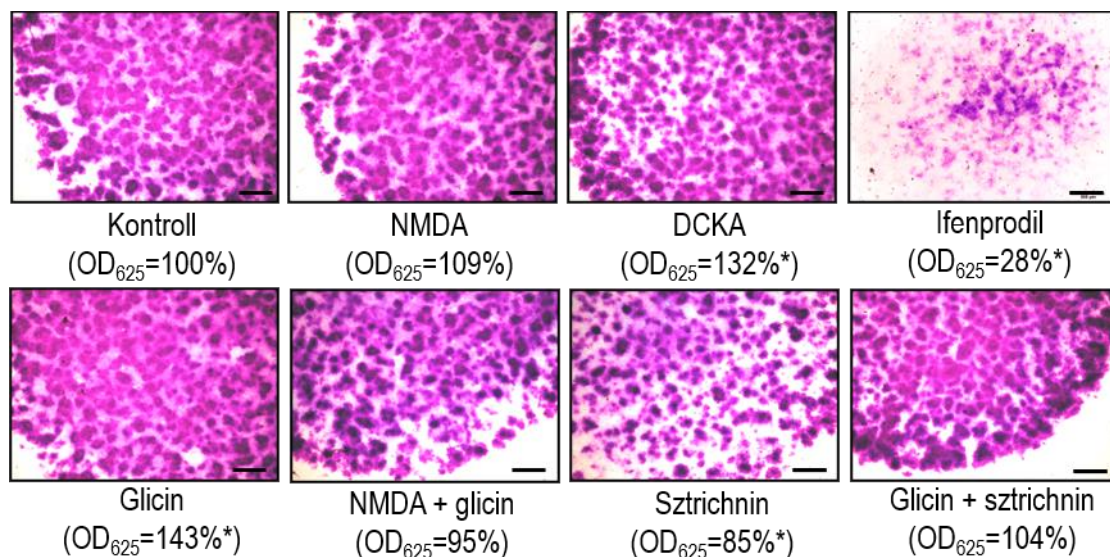
**4.5. ábra: A chondrogenicus sejtek glutamátszekréciója, valamint a folyamatban részt vevő vezikuláris glutamát transzporter 1/2 (VGLUT1/2) expressziója.** **A.** Kolorimetriás assay által meghatározott glutamát koncentrációk a sejttenyésztő médiumban a chondrogenesis során. A csillagokkal jelölt napokon statisztikailag szignifikáns (\* $P < 0,05$ ) különbségeket találtunk a differenciálódó porcsejtek által szekretált glutamát mennyiségében az előző napi értékhez képest. A méréseket 4 párhuzamos mintán végeztük a porcfejlődés minden napján. **B.** Az SLC17A7-ről (a VGLUT1 génje) és az SLC17A6-ról (a VGLUT2 génje) íródó mRNS-ek expressziós profilja csirke eredetű HD kultúrák valamennyi fejlődési stádiumában, reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciókkal demonstrálva. **C.** A VGLUT1 és 2 fehérjeexpressziós profilja a chondrogenesis során teljes sejtligázatumokban. Ez a reprezentatív felvétel az egyike annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló expressziós profilt mutattak. Az optikai denzitás (OD) értékeket a 0. napi kultúrák értékeire normalizálva ábrázoltuk. Az adott napi fehérjeexpressziós értékek OD-it minden esetben az előző napi értékekhez viszonyítottuk és a szignifikáns változásokat csillagokkal jelöltük (\* $P < 0,05$ ).

### 4.1.4. Az NMDAR-ok farmakológiai modulálása változatos hatásokat okoz

Abban az esetben, amikor a tenyésztés első napjától kezdve folyamatosan 20  $\mu$ M NMDA-t adagoltunk a porcosodó kultúrákhoz, akkor a metakromatikus mátrix termelése a kontrollhoz képest még a 6. napon is változatlan volt. Mivel az NMDA önmagában (20  $\mu$ M) nem volt

hatással a chondrogenesisre, ezért az első tenyésztési naptól glicint is adagoltunk önmagában (10  $\mu$ M), illetve az NMDA-val kombinálva is. Míg a glicin szignifikánsan fokozta a metakromatikus mátrix termelését, addig a glicin és az NMDA együttesen képtelen volt a 6. tenyésztési napra érdemben változtatni a porcmátrix mennyiségén a kontrollhoz képest. Annak céljából, hogy a glicin hatásait más receptorokon is megvizsgáljuk az NMDAR mellett/helyett, 5  $\mu$ M koncentrációban sztrichnint adtunk a sejt kultúráinkhoz. A sztrichnin a GlyR-ok hatékony gátlószere. Ez a farmakon önmagában lecsökkentette a porcmátrix termelését, glicinnel való együttes alkalmazása viszont a kontrollhoz képest változatlanul hagyta a mátrixképződést (4.6. ábra). Ez a kombináció úgy gondoljuk, hogy a glicin NMDAR-kon kifejtett hatását demonstrálja.

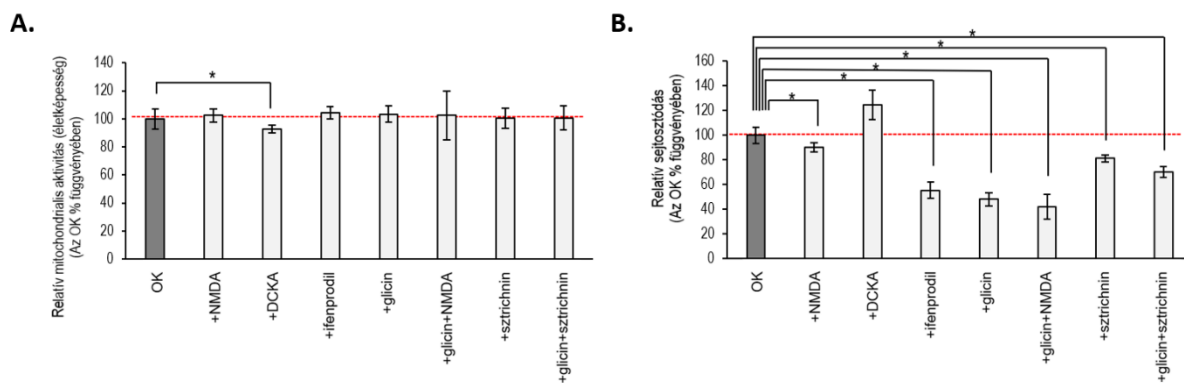
Amennyiben a GluN1 alegység glicin kötőhelyének kompetitív antagonistáját, a DCKA-t (10  $\mu$ M) alkalmaztuk a porcdifferenciáció első napjától kezdve, úgy a metakromatikus porcmátrix termelődésének szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Ezzel ellentétben az ifenprodil 20  $\mu$ M-os alkalmazása szinte teljesen meggátolta a porcképződést (4.6. ábra).



**4.6. ábra: Az N-metil-D-aszpartát receptorok farmakológiai befolyásolásának hatásai a fejlődő porcsejtek extracelluláris mátrix (ECM) termelésére.** A hatnapos high density (HD) kultúrák metakromatikus porcmátrix területeit 3%-os ecetsavban (pH: 1,8) oldott dimetil-metilénkék (DMMK) festéssel vizualizáltuk. A metakromatikus (lila színű) struktúrák a porc nodulusokat és a glükózaminoglikánokban gazdag ECM-et reprezentálják. A 625 nm-en mért optikai denzitásokat (OD<sub>625</sub>) toluidinkékkel (TK) festett, hatnapos kultúrák abszolút alkohol 8%-os HCl-oldata által kioldott felüliszóiban határoztuk meg. Ez a reprezentatív eredmény sor az egyike azon 3 független kísérlet eredményeinek, melyek hasonló DMMK- és TK-festődést mutattak. Az OD<sub>625</sub> értékek oldószeres kontrollokhoz viszonyított statisztikailag releváns különbségeit csillaggal jelöltük (\*  $P < 0,05$ ). Az eredeti nagyítás 2  $\times$ , a lépték 1 mm-es.

Mivel a gyors proliferáció és a szükségszerűen nagyszámú életképes sejt szinte előfeltétele az *in vitro* chondrogenesisnek, ezért a farmakológiai kezelések során ezen paraméterek vizsgálatát sem hagyhattuk figyelmen kívül (4.7. ábra). A DCKA kivételével egyik kezelőanyag esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változásokat a sejtek mitokondriális aktivitásában.

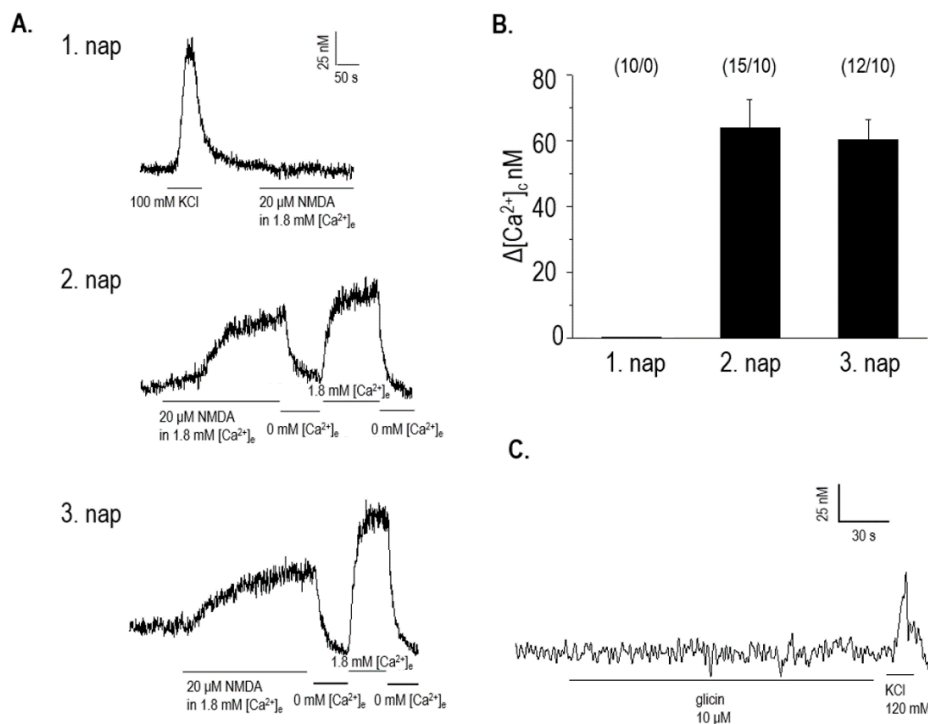
A sejtosztódás ugyanakkor sokkal érzékenyebben reagált a farmakológiai kezelésekre: a <sup>3</sup>H-timidin beépülés mértéke erősen lecsökkent az ifenprodil és a glicin (egyedül, vagy NMDA-val, vagy sztrichninnel kombinálva), valamint a sztrichnin önálló alkalmazásának hatására, míg a DCKA a proliferációt szignifikánsan fokozta (4.7. ábra)



**4.7. ábra: Az N-metil-D-aszpartát receptorok farmakológiai befolyásolásának hatásai a fejlődő porcsejtek mitokondriális aktivitására és proliferációjára.** **A.** Mitokondriális enzimaktivitás kolorimétrás meghatározásával vizsgált életképesség háromnapos high density (HD) kultúrákban különböző farmakonok alkalmazását követően. Ez a reprezentatív diagram az egyike, annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló eredményeket hoztak MTT-assay-eket követően. Az abszorbancia értékek oldószeres kontrollokhoz viszonyított statisztikailag releváns különbségeit csillaggal jelöltük (\* $P < 0,05$ ). **B.** <sup>3</sup>H-timidin inkorporációs assay-vel végzett sejtosztódás vizsgálat háromnapos HD kultúrákban különböző farmakonok alkalmazását követően. Ez a reprezentatív diagram az egyike, annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló eredményeket hoztak <sup>3</sup>H-timidin inkorporációs assay-eket követően. A mért értékek oldószeres kontrollokhoz viszonyított statisztikailag releváns különbségeit csillaggal jelöltük (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.1.5. A lokálisan adagolt NMDA Ca<sup>2+</sup>-tranzienseket eredményez

Ezt követően az NMDAR-ok és a differenciálódó porcsejtek Ca<sup>2+</sup>-homeosztázisának kapcsolatát vizsgáltuk meg. A Ca<sup>2+</sup>-tranzienseket különböző tenyésztési napokon mértük 20 μM-os NMDA, lokális applikációját követően (4.8. ábra).

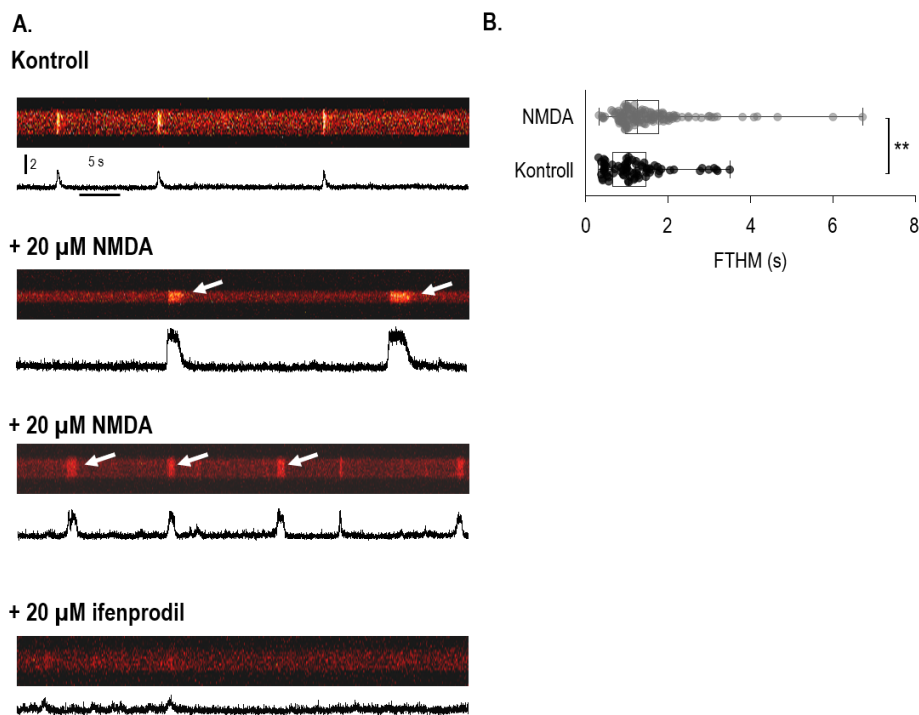


**4.8. ábra: Lokálisan alkalmazott farmakonok hatásai a citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációra Fura-2-vel töltött chondrogenicus sejtekben.** **A.** Az N-metil-D-aszpartát (NMDA) által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek a porcdifferenciáció első három napján. Ez a reprezentatív diagram az egyike annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló mérési eredményeket mutattak. A görbék a latti vonalak az NMDA ( $20 \mu\text{M}$ ), a KCl ( $120 \text{ mM}$ ) vagy a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Tyrode-oldat alkalmazását jelölik, szobahőmérsékleten. **B.** Változások az NMDA kiváltotta  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek átlagos amplitúdójában a porcdifferenciáció különböző napjain. Az oszlopok feletti számok az NMDA-ra reagáló sejtek arányát mutatják. Az adatok 3 független kísérlet reprezentatív eredményei; a 3 kísérlet hasonló trendet hozott. **C.** A regisztrátum a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek hiányát jelezte szobahőmérsékleten,  $10 \mu\text{M}$  glicin a dagolását követően,  $1,8 \text{ mM}$  extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) jelenlétében. Ez a dia gram 3, hasonló mérési eredményeket mutató, független kísérlet egyikéből származó reprezentatív a datok a lapján készült.

A porcdifferenciáció első napján a lokálisan adagolt  $100 \text{ mM}$  KCl depolarizációt váltott ki és a citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) rapid növekedést mutatott, ellenben az NMDA kezeléssel, melyre a mesenchymalis sejtek nem válaszoltak. A differenciációs időszak második napjától kezdve azonban az NMDA kifejezett emelkedést okozott a fejlődő porcsejtek  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -jában. Az NMDA-ra adott válasz lassan alakult ki és egyértelműen függött a sejteken kívüli  $\text{Ca}^{2+}$ -ok jelenlététől. Ez utóbbit jól demonstrálja, hogy a külső, extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -ok ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) megvonása a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  nyugalmi értékeire való visszaesését eredményezte, míg  $1,8 \text{ mM}$   $[\text{Ca}^{2+}]_e$  visszaadása a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  ismételt növekedését váltotta ki. A jelenség során a Fura-2 fluoreszcenciája nem növekedett aspecifikusan. Ezek szerint az NMDA lokális alkalmazása indirekten, az NMDAR-okon kívül, más  $\text{Ca}^{2+}$ -influxot eredményező csatornákat is nyithatott vagy befolyásolhatott a sejtmembránban, melyek lassan aktiválódtak és lassan is inaktiválódtak. Az NMDA kezelésekre hatására kialakuló  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -növekedések átlagos amplitúdója (ún.  $\text{Ca}^{2+}$ -csúcsok)  $60 \text{ nM}$  volt a differenciáció második és harmadik napján is.

Habár a glicin feltétlenül szükséges az NMDAR-ok működéséhez (koagonistaként a GluN1 alegységhez kötődve vagy agonistaként aktiválva a GluN1-GluN3 diheterotetramert), de önmagában 10  $\mu$ M glicin alkalmazása egyik tenyésztési napon sem befolyásolta a  $[Ca^{2+}]_c$ -t.

Az NMDAR-ok és a spontán  $Ca^{2+}$ -oszcillációk kapcsolatának további vizsgálatához 20  $\mu$ M NMDA és 20  $\mu$ M ifenprodil kezeléseket alkalmaztunk konfokális  $[Ca^{2+}]$ -mérések során (4.9. ábra). Az NMDA adagolása megváltoztatta a spontán  $Ca^{2+}$ -események hosszát; a nagyon rövid idejű (0,5 s) események frekvenciája lecsökkent, míg a hosszabbaké (1,5-2,5 s) megnőtt a kontrollhoz képest ( $P=0,0002$ ). Mindeznagyon hasonló volt az egyedi sejteken végzett mérések eredményeihez. Az ifenprodil-kezeléssel kiváltott NMDAR gátlást követően a  $Ca^{2+}$ -oszcillációk teljesen megszűntek, ami az NMDAR-ok alapvető szerepét jelzi a chondrogenicus sejtek spontán  $Ca^{2+}$ -eseményei során.

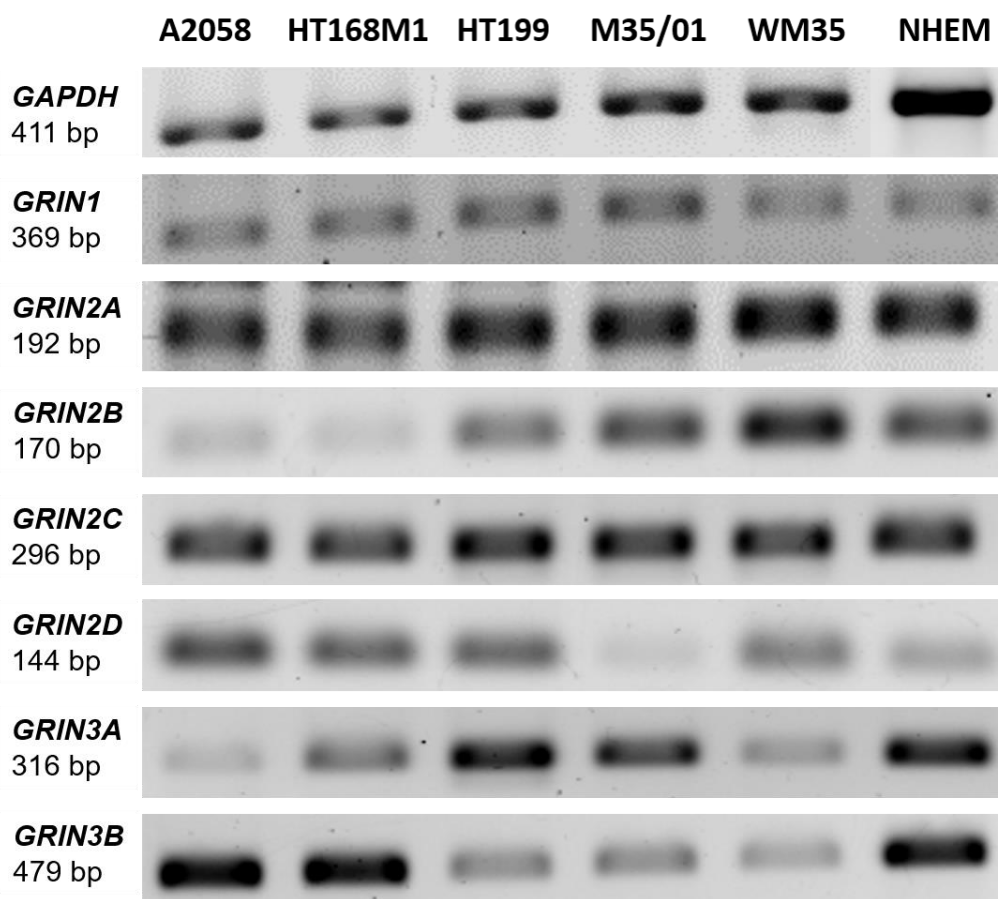


**4.9. ábra: Spontán  $Ca^{2+}$ -oszcillációk high density (HD) kultúrákban a porcdifferenciációs periódus második napján.** A méréseket megelőzően a sejteket 30 percen keresztül Fluo-4 kalciumérzékeny festékkel töltöttük. A  $Ca^{2+}$ -oszcillációkat agonista stimulus nélkül obszerváltuk 1,8 mM extracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációjú ( $[Ca^{2+}]_e$ ) Tyrode-oldatban, szobahőmérsékleten. A line scan felvételek rögzítését a mérőoldat cseréjét követően azonnal megkezdttük. **A.** Spontán  $Ca^{2+}$ -oszcillációk normál (1,8 mM  $[Ca^{2+}]_e$ ) Tyrode-oldatban, valamint 20  $\mu$ M NMDA (N-metil-D-aszpartát), illetve 20  $\mu$ M ifenprodil kezelést követően. A line scan diagramok 3 független kísérlet reprezentatív eredményeit ábrázolják. A nyilak a felső NMDA line scan felvételen a hosszabb idejű (1,5-2,5 s) és kontrollhoz képesti na gyobb frekvenciájú  $Ca^{2+}$ -oszcillációkat, míg az alsó NMDA line scan regisztrátumon a rövidebb idejű (0,5 s) és kontrollhoz képesti kisebb frekvenciájú  $Ca^{2+}$ -oszcillációkat jelöli. **B.** A box plot a spontán események hosszának eloszlását mutatja; a kontroll sejtek feketék, az NMDA-kezelt sejtek szürkék. A box plotok a detektált spontán tranziensek maximális amplitúdó felénél mért időt (FTHM) ábrázolják. Az NMDA-kezelést követő események hosszában szignifikáns változást detektáltunk a kontrollhoz képest (\*\* $P<0,01$ ).

## 4.2. NMDAR-ok vizsgálata humán melanocytákban és melanoma sejtekben

### 4.2.1. A pigmentsejteket teljes NMDAR alegység mRNS készlet jellemzi

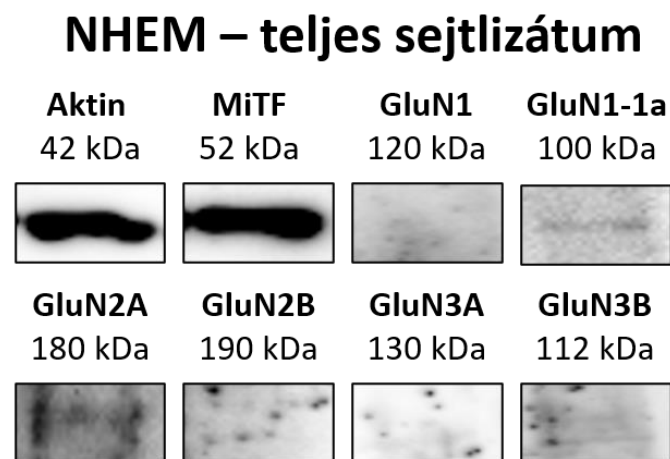
Az NMDAR alegységek expressziós profiljának feltérképezését, a fejlődő porcsejtekhez hasonlóan, RT-PCR analízissel kezdtük humán melanocytáinkban, illetve különböző eredetű melanoma sejtvonalainkban (A2058, HT169M1, HT199, M35/01, WM35). A reakció eredményei igazolták az esszenciális GluN1 (*GRIN1*) alegység, valamint a GluN2 (*GRIN2*) és GluN3 (*GRIN3*) alegységek, illetve izoformáik, mRNS-szintű jelenlétét mindegyik vizsgált kultúrában (4.10. ábra).



**4.10. ábra: N-metil-D-aszpartát receptor alegység mRNS-ek expressziós vizsgálata reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciókkal (RT-PCR) melanoma sejtekben és melanocytákban.** Az RT-PCR-ek igazolták a receptor alegységek kifejeződését az A2058, HT169M1, HT199, M35/01 és WM35 sejtvonalakban, illetve a normál humán epidermális melanocytákban (NHEM) is. A kísérletek pozitív kontrolljaként humán agyszövet mintát használtunk és mindegyik alegység esetében gradiens PCR reakciókkal határoztuk meg az optimális anellációs hőmérsékletet. Vizsgálatainkat 3 különböző biológiai mintán végeztük, 3 független kísérletben. Ez a reprezentatív felvétel az egyike annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló expressziós profilt mutattak. A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS expressziója a reakciók belső kontrolljaként szolgált.

## 4.2.2. Az alegységek fehérjeexpressziója eltér melanocytákban és melanoma sejtekben

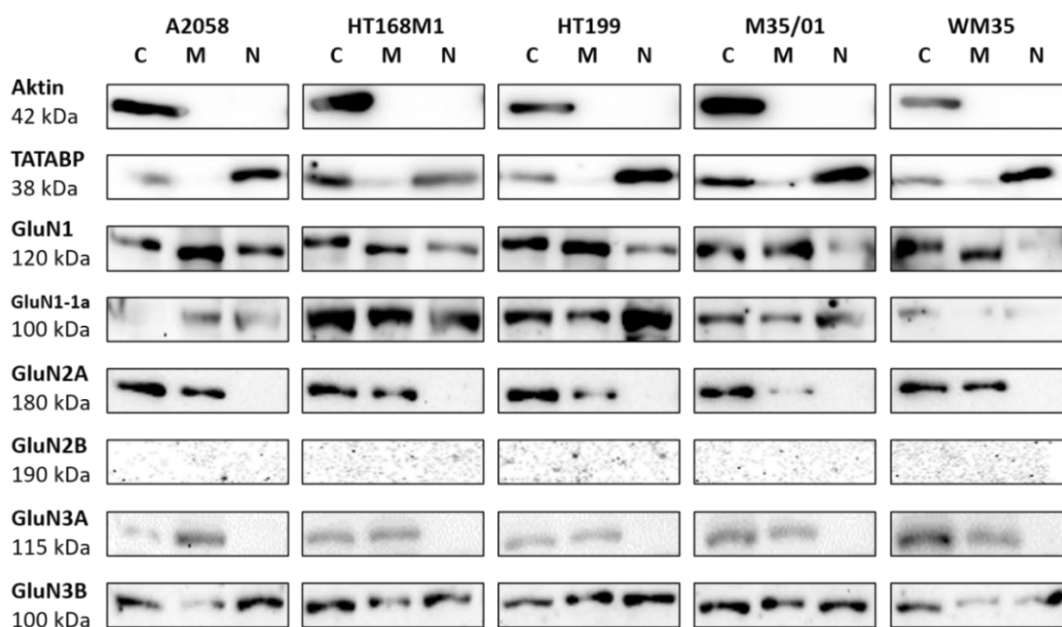
A melanocytá kultúrákból kinyert teljes lizátumokon végzett fehérjeexpressziós vizsgálatok a GluN2A alegység jelenlétét erősítették meg, azonban a GluN1, a GluN2B, a GluN3A és a GluN3B alegységek kifejeződése nem érte el a detektálás küszöbét. Bár az összes splice variáns felismerésére alkalmas anti-GluN1 antitest reakciója nem eredményezett kemilumineszcens jelet, de az NLS-t tartalmazó GluN1-1a alegység szignáljait sikerült azonosítanunk (4.11. ábra).



**4.11. ábra: N-metil-D-aszpartát receptor alegységek expressziója normál humán epidermális melanocyták (NHEM) teljes lizátumában.** A GluN1-1a splice variáns és a GluN2A alegység megjelent az egészséges pigmentsejtekben, a többi alegység azonban nem érte el a detektálás küszöbét. A kísérletek pozitív kontrolljaként humán agyszövet mintát használtunk (az ábrán nincs feltüntetve). Vizsgálatainkat 3 különböző biológiai mintán végeztük 3 független kísérletben. Ez a reprezentatív felvétel az egyike annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló expressziós profilt mutattak. Az aktin expressziója a reakciók belső kontrolljaként szolgált. A microphthalmia asszociált transzkripciós faktor (MiTF) ellenes antitestet a melanocytá differenciáció nyomon követésére használtuk.

A melanoma sejtekből izolált szubcelluláris frakciókon végzett wb-ok részletes képet adnak az NMDAR alegységek jelenlétéről a citoszolikus, a membrán, illetve a sejtmagi kompartmentekben (4.12 ábra). A melanoma sejtek citoszol és membrán frakcióiban sikerült igazolnunk a GluN1, a GluN2A, a GluN3A és a GluN3B alegységek jelenlétét. Mindemellett egyöntetű expressziós jeleket tapasztaltunk az NLS-t tartalmazó GluN1-1a splice variáns kapcsán is.

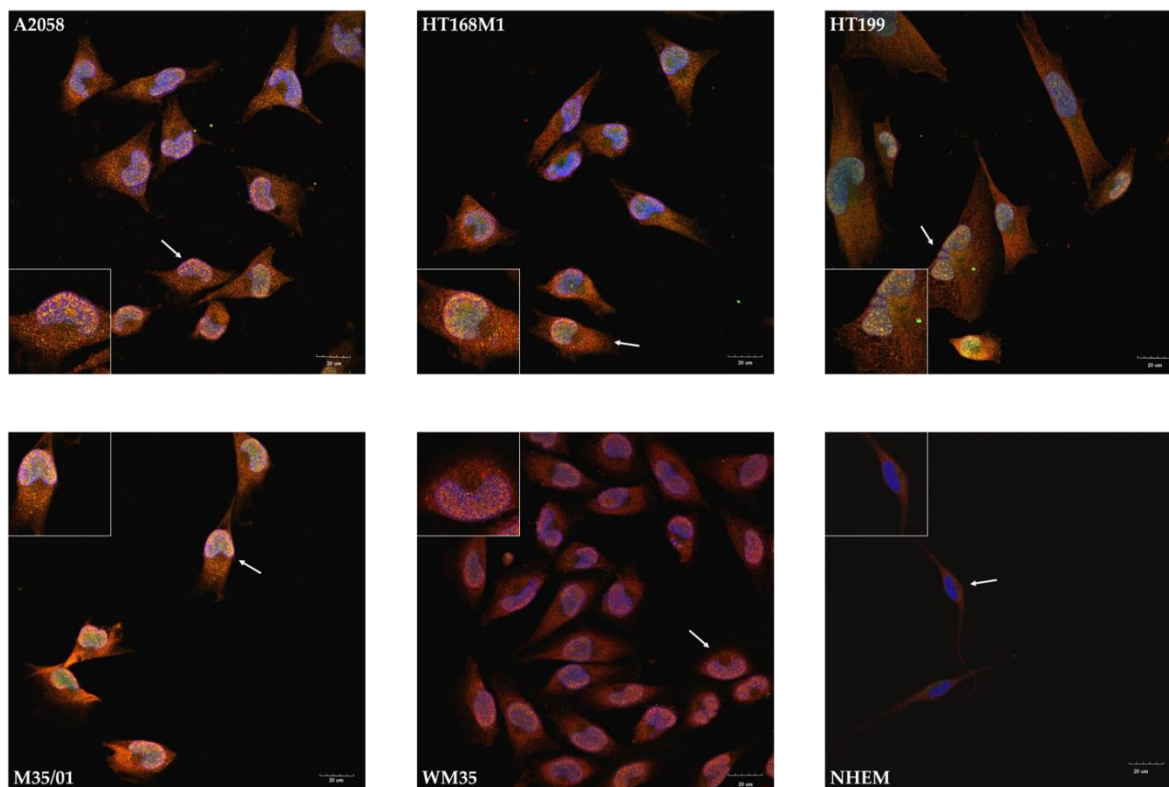
Igazoltuk továbbá a GluN1, a GluN1-1a és a GluN3B alegységek sejtmagi expresszióját is, azonban a GluN2A és a GluN3A alegységek teljesen hiányoztak ebből a frakcióból. A GluN2B alegység jelei egyik kompartmentben sem voltak detektálhatóak, ami a fehérje hiányára vagy extrém alacsony szintjére enged következtetni.



**4.12. ábra: Melanoma sejtek szubcelluláris frakcióin végzett fehérjeexpressziós vizsgálatok.** A GluN1, a GluN1-1a és a GluN3B a legységek mindegyik vizsgált melanoma sejt vonal (A2058, HT168M1, HT199, M35/01 és WM35) citoszol (C), membrán (M) és nukleáris (N) frakciójában kifejeződik. Az előbbiekhöz hasonlóan a GluN2A és a GluN3A a legységek is expresszálódnak mindegyik sejt vonal citoszol és membrán frakciójában, a sejt magban azonban nem. A GluN2B-t egyik kompartmentben sem tudtuk azonosítani. A kísérletek pozitív kontrolljaként humán agyszövet mintát használtunk (az ábrán nincs feltüntetve). Vizsgálatainkat az 5 melanoma sejt vonal 3-3 különböző biológiai mintájából származó citoszol, membrán és mag frakciókon végeztük 3 független kísérletben. Ez a reprezentatív felvétel az egyike annak a 3 független kísérletnek, melyek hasonló expressziós profilt mutattak. A sejtfrakciók tisztaságának igazolására többféle kontrollt használtunk. Az aktin kifejeződését részben a citoszol és a membrán, részben a citoszol és a mag frakciók összehasonlítására használtuk belső kontrollként. A magi frakciók analizéséhez továbbá a TATA box kötő fehérje (TATABP) ellenes antitesteket használtuk belső kontrollként.

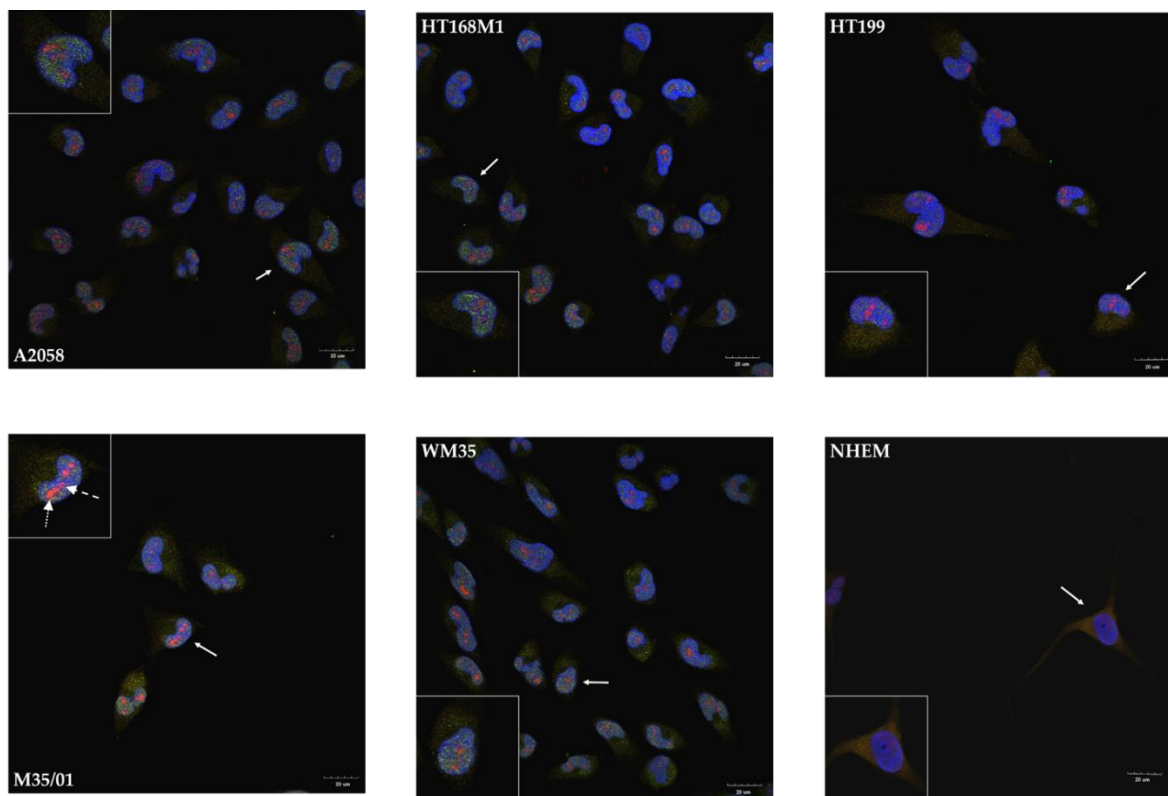
#### 4.2.3. Az alegységek sejtmagi kolokalizációt mutatnak melanoma sejtekben

Az alegységek szubcelluláris (ko)lokalizációjának vizsgálatához első megközelítésben GluN1–GluN3B és GluN1-1a–GluN3B immuncitokémiai reakciókat végeztünk. A reakciókat követő konfokális mikroszkópiai analízis meglepő eredményeket hozott. A GluN1 alegység mindegyik melanoma sejt vonalban citoszolikus expressziót mutatott, míg ehhez képest a GluN3B kifejeződése kevésbé volt diffúz ebben a kompartmentben. Mindazonáltal a GluN1 és GluN3B alegységek immunpozitív jelei mindegyik melanoma sejt vonalon figyelemre méltó sejtmagi kolokalizációt mutattak. A prominens nukleáris kolokalizáció jellemzően inkább diffúzan jelent meg a sejtmagokban, mintsem konkrétan egy-egy magi régióban (pl. sejtmagboríték, perinukleáris tér, sejtmagvacska) (4.13. ábra). Bár a GluN1 és GluN3B alegységeket sikerült demonstrálnunk a melanocyták citoplazmájában, a melanoma sejteken nyert tapasztalatainkkal szemben sejtmagi expressziójukat már nem tudtuk detektálni (4.13. ábra).



**4.13. ábra:** Az immuncitokémiai reakciók eredményei a GluN1 és GluN3B alegységek kolokalizációját jelzik melanoma sejtek magjaiban, azonban a melanocytákéban nem. A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken a GluN1 alegység (pirossal jelölve) mindegyik melanoma sejtvonal citoszoljában azonosítható volt, míg a GluN3B alegység (zölddel jelölve) kevésbé diffúzan oszlott szét a citoplazmában. A felvételeken plazmamembránhoz köthető immunfluoreszcens jeleket nem láttunk, ezzel szemben a GluN1 és GluN3B kolokalizációját figyeltük meg a melanoma sejtek magjaiban. A nukleáris immunpozitív jelek demonstrálásához azt az 1  $\mu\text{m}$ -es optikai szeletet választottuk ki, amely a látótérben lévő sejtek magjain keresztülhalad. Ezek a reprezentatív felvételek 3 független, hasonló expressziós mintázatot mutató kísérlet közül lettek kiválasztva. Mindegyik panelen egy-egy reprezentatív sejtet inzeremben kiemeltünk. A lépték 20  $\mu\text{m}$ -es.

Hasonló nukleáris immunpozitív mintázatot detektáltunk a GluN1-1a–GluN3B immuncitokémiai reakciók eredményeként is: az NLS-t tartalmazó GluN1 splice variáns alig volt észlelhető a citoszolban, az ellene termeltetett antitestek szinte teljes mértékben csak a magban jelentek meg, ahol többnyire a GluN3B alegységgel kolokalizáltak. A GluN1 alegységhez hasonlóan, a GluN1-1a is expresszálódik melanocyták citoszoljában, viszont a GluN1 és a GluN3B alegységekkel ellentétben az anti-GluN1-1a antitest reakciója nagyon gyengén észlelhető sejtmagi immunpozitív jeleket produkál (4.14. ábra).

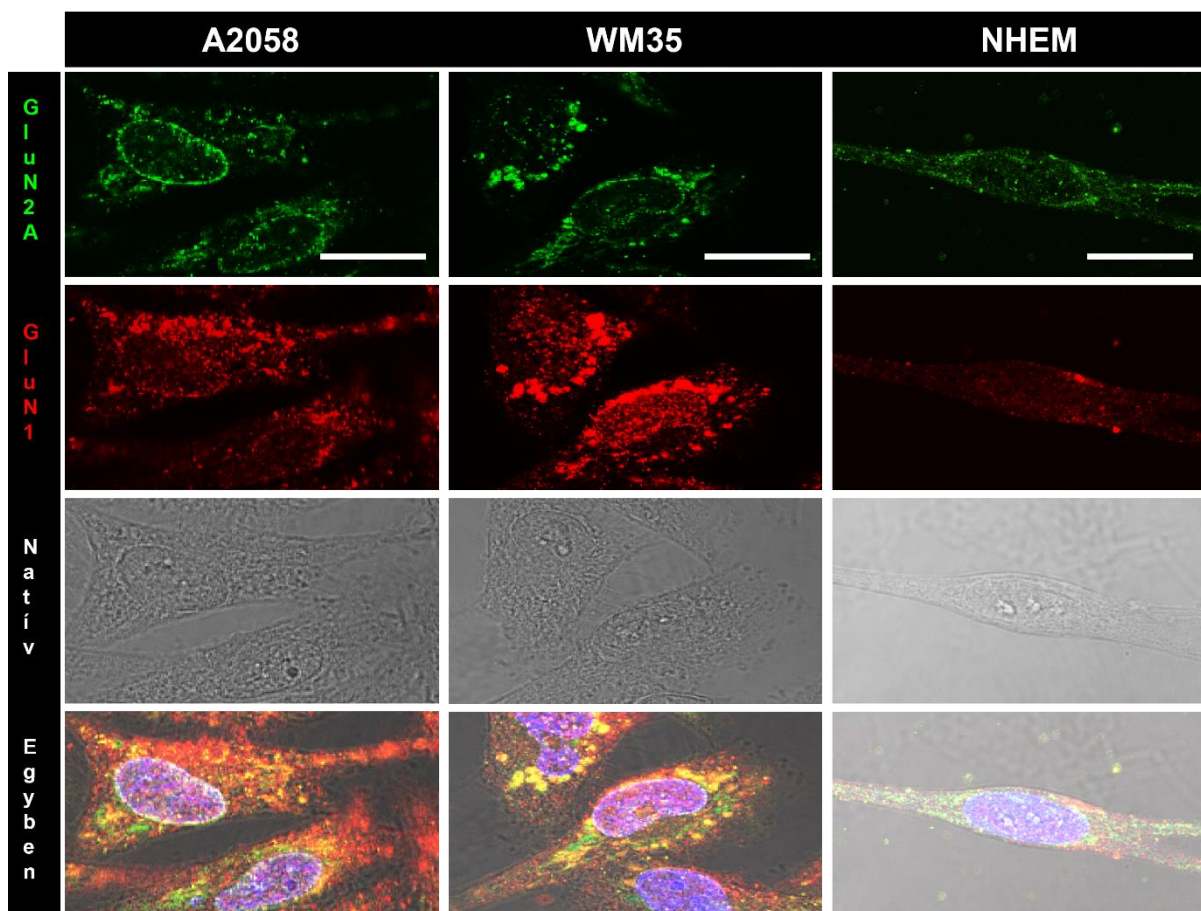


**4.14. ábra: Az immuncitokémiai reakciók eredményei a GluN1-1a splice variáns és GluN3B alegységek kolokalizációját jelzik melanoma sejtekben.** A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken a GluN1-1a splice variáns (pirossal jelölve) hasonló sejtmagi kolokalizációt jelez a GluN3B alegységgel (zölddel jelölve) melanoma sejtekben, mint a GluN1. A melanocyták magjai rendkívül gyenge GluN1-1a jeleket mutatnak. Ugyan a GluN1-1a a melanocyták citoszoljában is megjelenik, a azonban egyik kompartmentben sem figyelhető meg a GluN3B-vel való kolokalizáció. A nukleáris immunpozitív jelek demonstrálásához az az 1  $\mu\text{m}$ -es optikai szeletet választottuk ki, amely a látótérben lévő sejtek magjain keresztülhalad. Ezek a reprezentatív felvételek 3 független, hasonló expressziós mintázatot mutató kísérlet közül lettek kiválasztva. Mindegyik panelen egy-egy reprezentatív sejtet inzertben kiemeltünk. Az M35/01 melanoma sejtek paneljének inzertjében kétféle jelölő nyíl is használunk: a szaggatott vonallal jelölt nyíl egy olyan területre mutat, ahol a GluN1-1a (piros) immunfluoreszcens jele a DAPI-val (kék) kolokalizál, ami lila színt eredményez, míg a pöttyözött nyíl egy olyan területet jelöl, ahol a GluN1-1a a GluN3B-vel kolokalizál és ez narancssárga színt okoz. A jelenség valamilyen melanoma sejtvonal esetében tapasztalható. A lépték 20  $\mu\text{m}$ -es.

A doktori értekezés alapjául szolgáló publikációk eredményei az értekezésben betöltött szerepükből kifolyólag további immuncitokémiai reakciók elvégzését követelték meg. Ehhez a metasztatikus melanoma nyirokcsomó áttétéből előállított A2058 és az *in situ* melanomából létrehozott WM35 sejtvonalat, illetve az NHEM sejtvonalat vettem igénybe. Az immuncitokémiai reakciók célja a melanoma sejtek membrán frakcióiban, valamint a melanocyták teljes lizátumában azonosított GluN2A alegység szubcelluláris lokalizációinak és potenciális kolokalizációinak vizsgálata volt.

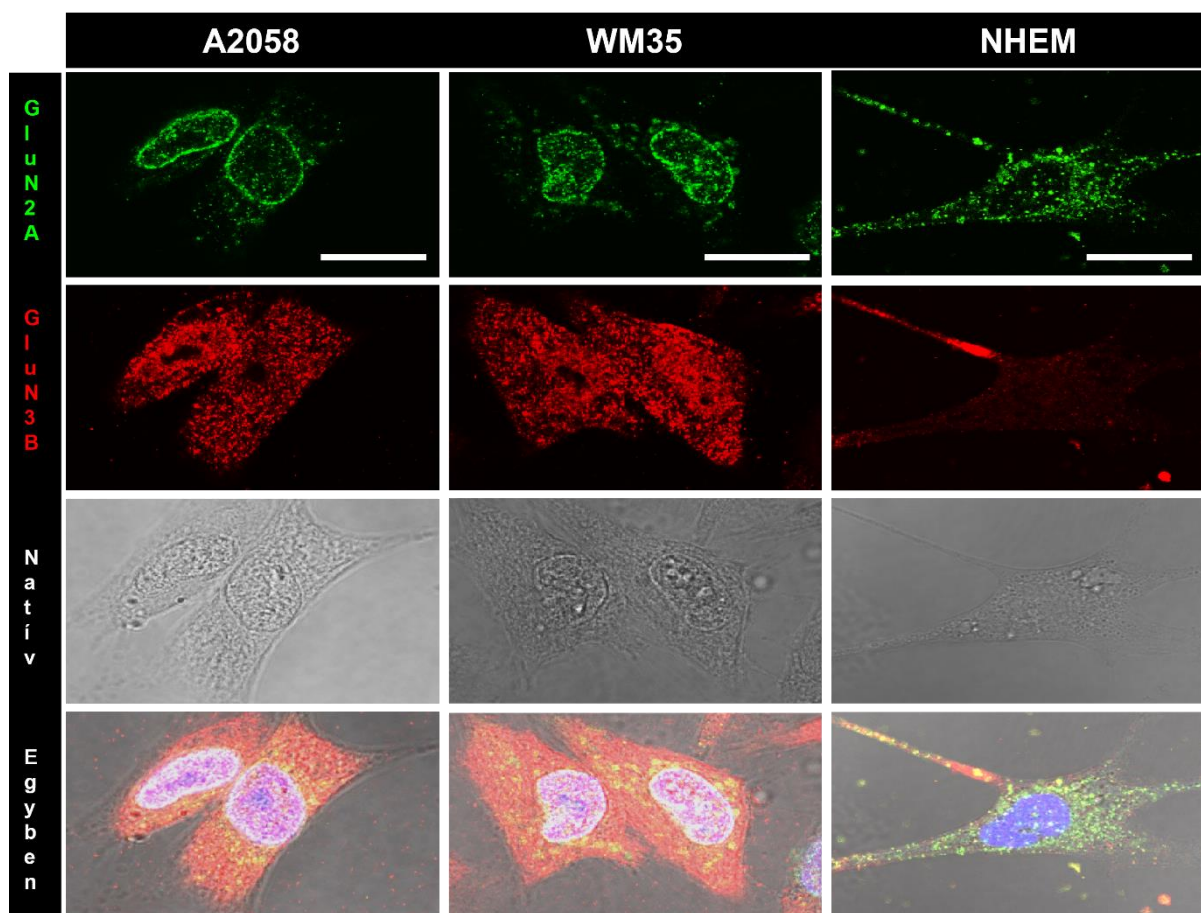
A GluN1–GluN2A reakcióban mindkét melanoma sejtvonal esetében a korábbiakhoz hasonló GluN1 eloszlást látunk a citoszolban és a sejtmagban, míg a GluN2A esetében figyelemreméltó,

a sejtmagot körül rajzoló (véltetően maghártya) jeleket detektáltunk. A maghártya érintettségét a minták áteső fényben rögzített natív felvételeinek fluoreszcens képekkel való összevetítését követően tudtuk megerősíteni. A GluN2A emellett a citoszolban diffúzan kevés szignált mutatott, a sejtmagon belül pedig egyáltalán nem (4.15. ábra). A melanocytákban a korábban már tapasztalt GluN1 expressziós mintázatot láttuk, azonban a GluN2A kifejeződése kevésbé volt jellegzetes, mint a melanoma sejtek esetében. A GluN2A jelei diffúzak és szemmel láthatóan kisebb intenzitásúak, mint a melanoma sejtekben, továbbá a sejtmag pereme is alig rajzolódik ki az immunpozitivitások által (4.15. ábra).



**4.15. ábra:** Az immuncitokémiai reakciók eredményei a GluN1 és GluN2A alegységek kolokalizációját jelzik melanoma sejtek magja körül, mely a melanocytákban kevésbé jellemző. A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken a GluN1 alegység (pirossal jelölve) a melanoma sejtek citoszoljában azonosítható volt, míg a GluN2A alegység (zölddel jelölve) diffúzan jelent meg a citoszolban. A felvételeken a plazmamembránhoz köthető immunfluoreszcens jelek megítélése továbbra is nehézkes, azonban a GluN2A fluoreszcens szignáljai lényegében kirajzolják a sejtmagot. A feltételezhetően a maghártyát jelölő mintázatban az összevetített képeken a GluN1 alegységgel való kolokalizáció is látható. Mindez a melanocyták esetében alig figyelhető meg. A nukleáris immunpozitív jelek demonstrálásához azt az 1 µm-es optikai szeletet választottuk ki, amely a látótérben lévő sejtek magjain keresztülhalad. Ezek a reprezentatív felvételek 3 független, hasonló expressziós mintázatot mutató kísérlet közül lettek kiválasztva. A lépték 20 µm-es.

A melanoma sejtek GluN2A–GluN3B reakcióinak eredményeiből az látható, hogy a GluN3B jelei szétoszlanak a citoszolban, illetve a sejtmag belső részeiben is jól demonstrálhatók, azonban az immunpozitív pöttyök hiányoznak egy jól meghatározható, nagy valószínűséggel a sejtmagvacskának megfelelő magi területen. A GluN2A alegység citokémiai eredményeivel és natív felvételekkel összevetített képeken nemcsak a maghártyában, hanem a citoszolban is láthattuk a két alegység foltszerű kolokalizációját (4.16. ábra). Melanocytákban a GluN3B expresszióját bizonyos nyúlványokban figyelhattuk csak meg, ezt leszámítva pedig csak a korábbiakban tapasztalt, gyér citoszolikus mintázatot írhattuk le. Így a GluN2A fluoreszcens felvételeivel összevetítve érdemi kolokalizációt nem tudtunk demonstrálni (4.16. ábra).



**4.16. ábra:** Az immuncitokémiai reakciók eredményei a GluN2A és GluN3B alegységek kolokalizációját jelzik melanoma sejtek citoplazmájában és magja körül, mely a melanocytákban nem jellemző. A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken a GluN3B alegység (pirossal jelölve) a melanoma sejtek citoszoljában azonosítható volt, míg a GluN2A alegység (zölddel jelölve) diffúzan jelent meg a citoszolban. A felvételeken a plazmamembránhoz köthető immunfluoreszcens jelek megítélése továbbra is nehézkes, azonban a GluN2A fluoreszcens szignáljai lényegében kirajzolják a sejtmagot. A feltételezhetően a maghártyát jelölő mintázatban az összevetített képeken a GluN3B alegységgel való kolokalizáció is látható. Elszórt, kisebb foltok formájában kolokalizációk figyelhetők még meg továbbá a daganatos sejtek citoplazmájában. Mindezek a melanocyták esetében alig figyelhetők meg. A nukleáris immunpozitív jelek demonstrálásához azt az 1 µm-es optikai szeletet választottuk ki, amely a látótérben lévő sejtek magjain keresztül halad. Ezek a reprezentatív felvételek 3 független, ha sonló expressziós mintázatot mutató kísérlet közül lettek kiválasztva. A lépték 20 µm-es.

A primer antitestek pozitív kontrolljai humán agyszövet mintán végzett wb-ok voltak. A kétféle, nyúlban termeltetett antitest együttes használatának ellenőrzése céljából végzett kontrollunk során az első primer antitestet (anti-GluN3B/anti-GluN2A) biotiniláltuk, a második primert (anti-GluN1/anti-GluN1-1a/anti-GluN3B) azonban nem adtuk a mintáinkhoz. A Streptavidin Alexa Fluor 488 és az Alexa Fluor 555 konjugált anti-nyúl antitestek hozzáadását követően a reakció értékelése során csak zöld szín megjelenését tapasztaltuk (azaz nem volt kolokalizáció). Feltételezéseink szerint a biotinilált anti-GluN3B, illetve anti-GluN2A antitest és a Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugált anti-nyúl antitest által alkotott komplex a GluN3B/GluN2A fehérje felszínének jelentős részét lefedi, ezáltal sztérikus okokkal magyarázhatóan megakadályozza az Alexa Fluor 555 konjugált anti-nyúl antitest kötődését. Mivel a kontroll kísérlet eredményeként szigorúan csak zöld immunpozitivitásokat észleltünk, ezért kijelenthetjük, hogy a GluN1–GluN3B, a GluN1-1a–GluN3B, a GluN1–GluN2A és a GluN2A–GluN3B reakciók során tapasztalt kolokalizációk nem fals pozitívak.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Az NMDAR-ok szerepe chondrogenicus sejtek differenciációjában

Habár a közelmúltban számos tudományos publikáció jelent meg a glutamátergjelátvitel felnőtt vázrendszerben betöltött szerepéről [153-155], az ízületi porc fejlődése azonban relatíve ismeretlen terep maradt a kérdésben. Ennek megközelítése érdekében végeztük kísérleteinket, melyek eredményeiből az alábbi következtetéseket vontuk le.

#### 5.1.1. Az NMDAR alegységei expresszálódnak a porcosodó kultúrákban

Kísérleteink első lépéseként a chondrogenicus sejtek NMDAR-expressziós profilját és glutamátermelő képességét vizsgáltuk meg. Ezek eredményei szerint a fejlődő porcsejtek a GluN1, GluN2B, GluN3A és GluN3B NMDAR alegységeket fejezik ki membrán frakcióikban, azonban a GluN2A alegység expresszióját csak a teljes lizátumokban detektáltuk. Utóbbit azzal magyarázhatjuk, hogy az alegység citoplazmatikus jelenléte ellenére nem transzlokálódik membránokba, így feltételezhetően nem vesz részt működőképes receptorok kialakításában. A fehérje esetleges, NMDAR-alegységként betöltött funkcióján túlmutató szerepéről nincsenek ismeretek. Az egyes NMDAR alegységek expressziói változó mintázatokat követtek a porcfejlődés során. A GluN2B expressziós csúcsa egybeesett a porcosodó sejtek végső elköteleződésének és chondrogenicus differenciációjának időszakával (2. és 3. tenyésztési nap). A GluN2B alegységhez hasonlóan a GluN3B kifejeződése is túlnyomórészt a differenciálatlan sejtekben és a korai chondroblastokban volt megfigyelhető (a membrán frakciót illetően). Ezzel szemben a GluN3A inkább az érett kultúrákban (a 4. tenyésztési nap után) volt jellemző. A membrán frakciókban egyedül a tetramerek kialakításában elengedhetetlen GluN1 alegység expressziója volt relatíve konstansnak tekinthető. Ez utóbbi eredményünk egyfajta pozitív kontrollját is adja a membrán frakció megfelelőségének, valamint a többi alegység kapcsán kapott sajátos, a porcdifferenciáció előrehaladtával tapasztalt alegység-váltásnak.

Háromnapos porcosodó kultúrákon végzett immuncitokémiai reakcióink a GluN1 alegység GluN2B és GluN3B alegységgel való kolokalizációját is megerősítették. Emellett az anti-GluN2B és anti-GluN3B antitestek közös reakcióban való alkalmazása e két alegység meglepő kolokalizációját is igazolta. Mindez azt sejteti, hogy a differenciálódó porcsejtekben nemcsak GluN1-GluN2 vagy GluN1-GluN3 diheterotetramer, hanem GluN1-GluN2-GluN3

kompozíciójú triheterotetramer komplexek is jelen lehetnek a chondrogenesis kritikus időszakában. Ez az alegység-összetétel irodalmi adatok szerint fokozott glicin érzékenységgel és csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást biztosító fiziológiai sajátosságokkal ruházza fel a csatornát [156].

Megfigyeltük továbbá, hogy a porcosodó sejtek differenciációjuk során glutamátot szekretálnak a sejtenyészítő folyadékba, illetve, hogy expresszálják a transzportban fontos VGLUT1/2-t. Az általunk regisztrált glutamát koncentráció értékek (0,2–1,1 nmol/ml) megközelítőleg korrelálnak a patkány bordaporc eredetű chondrocyták esetében tapasztaltakkal (~2–4 nmol/ml) [157] és csak egy kicsit kevesebb egy átlagos felnőtt ember vérplazmájában mérhető értékeknél [158]. Endogén glutamát felszabadítást leírtak már az SW1353 humán chondrosarcoma sejtvonal, illetve patkány ízületi porcsejtek kapcsán is [10]. Ezek a kiegészítő eredmények alátámasztják azt, hogy a differenciálódó porcsejtek egyéb környezeti szövetektől független, autokrin/parakrin mechanizmusú glutamát jelátvitelre lehetnek képesek akár *in vivo* körülmények között is.

Az általunk leírt NMDAR alegység expressziós mintázat részben megegyezik más modellekben korábban már közölt adatokkal. A GluN1, GluN2D és GluN3A alegységek mRNS expresszióját például patkány bordaporc eredetű chondrocytákban detektálták [11]. A GluN1 és GluN2A alegységek kifejeződését egészséges emberi ízületi porcsejtekben, míg a GluN2B alegység expresszióját OA-eredetű porcsejtekben demonstrálták [13]. A korábban már említett SW1353 sejtvonalban például a GluN2D alegység kifejeződése mutatkozott a legerőteljesebbnek, de emellett a GluN1, a GluN2A és a GluN2C alegységek mRNS-eit is kimutatták a sejtvonalban [10]. Osteoblastok kapcsán több publikáció is beszámol NMDAR alegységek expressziójáról, melyek a GluN1 kifejeződésében megegyeznek, de a többi alegység esetében már változatos expressziós kombinációkról szólnak [159-161]. Csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtekben is valamennyi NMDAR alegység expresszióját dokumentálták már, melyek túlnyomó többsége a GluN2C és GluN2D alegységekhez köthető [162]. Az NMDAR alegységek vázrendszeri eredetű sejtekben leírt, néha szinte követhetetlen expressziós variációit az alkalmazott detektáló módszerek (konvencionális és real-time PCR, immunhisztokémia, wb, *in situ* hibridizáció) érzékenysége és specificitása közötti különbségekkel, illetve az alkalmazott kísérleti modellek és a sejtek differenciációs státuszának eltérőségével magyarázhatjuk. Ramage és munkatársai például OA-s chondrocytákban figyelték meg, hogy a GluN2A tartalmú receptorok helyett GluN2B összetételű heteromerek jelentek meg, amiknek szerepe lehet a patológiás fenotípus kialakításában [13]. Észszerű tehát

feltételeznünk, hogy a kísérleteink során tapasztalt GluN2B-, GluN3A- és GluN3B-motívumváltások összefüggésben állnak a sejtek aktuális differenciációs státuszával.

### **5.1.2. Az NMDAR-ok farmakológiai modulálása befolyásolja a chondrogenesist**

Korábbi kísérletes tapasztalataink szerint az *in vitro* porcosodó kultúrák rendkívül érzékenyek a  $[Ca^{2+}]_i$  precízen beállított időbeli mintázatának manipulációjára [6]. Ezért meg akartuk vizsgálni az  $[Ca^{2+}]_i$ -t egyértelműen érintő NMDAR agonisták és antagonisták porcfejlődésre kifejtett lehetséges hatásait. Amikor az NMDA (önállóan vagy glicinnel kombinálva) a teljes tenyésztési periódusban jelen volt a sejtenyésztő médiumban, akkor a metakromázias porcmátrix mennyisége lényegében változatlan maradt. Ezzel szemben a glicin önmagában is képes volt stimuláló hatást kifejteni a porcmátrix termelődésére. A glicin hatásai elsősorban GlyR-okon érvényesülnek, melyek neuronokból jól ismert, hiperpolarizációt okozó  $Cl^-$ -csatornák [163].  $Cl^-$ -csatornákat korábban már demonstráltak chondrocytákon [164] és mi is GlyR-ok széles spektrumát azonosítottuk a chondrogenesis különböző fázisaiban (nem bemutatott eredmények). A GlyR-ok gátlására (és a potenciálisan jelen lévő glicin-szenzitív NMDAR-ok vizsgálatára) sztrichnint használtunk. A sztrichnin önmagában alkalmazva erőteljesen gátolta a porcképződést, ami a sztrichnin-szenzitív GlyR-okon keresztül megvalósuló  $Cl^-$ -áram porcfejlődésben betöltött fontos szerepét mutatja. A glicin hatásai a sztrichnin-inhibíció mellett már kevésbé érvényesültek, azonban a GlyR-ok gátlásából fakadó porcképződési blokk sem volt tapasztalható. A glicin mintegy kiegyensúlyozó hatása a chondrogenicus sejtekben feltételezhetően a jelen lévő NMDAR-ok (esetleg a GluN1-GluN3 összetételű diheterotetramer komplexek) mátrixtermelést befolyásoló folyamatokban betöltött szerepével magyarázható.

A chondrogenicus differenciáció fokozása ellenére a glicin antiproliferatív hatásokat eredményezett, melynek háttérében a beáramló  $Cl^-$ -ok okozta hiperpolarizáció és a következményes sejtproliferáció moduláló hatás állhat [165, 166]. Bár az MTT assay-vel a proliferációs assay-hez képest eltérő eredményeket figyeltünk meg, ez a jelenség elsősorban annak tulajdonítható, hogy utóbbit rövid idejű tesztként végeztük, így elsősorban a különböző farmakonok mitokondriális aktivitásra kifejtett azonnali hatásait tudtuk megvizsgálni.

Habár az NMDA adagolása önmagában nem befolyásolta a porc mátrix képződését, a GluN2B alegységeket blokkoló ifenprodil kifejezetten gátolta a chondrogenesist. Mindez alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a GluN2B alegységet tartalmazó receptorok által biztosított  $\text{Ca}^{2+}$ -influx elengedhetetlen a porcfelődés folyamatának gördülékenységéhez. Az ifenprodil emellett drasztikusan csökkentette a sejtosztódási rátát is, ami tovább fokozta anti-chondrogenicus hatásait. Amikor a GluN1 alegység glicin kötőhelyének kompetitív antagonistáját, a DCKA-t alkalmaztuk, a mátrixtermelés ütemének erőteljes emelkedését tapasztaltuk, ez azonban nagy valószínűséggel egy NMDAR-októl független jelenséggel magyarázható. Mivel a DCKA alapvegyülete, a kinurénsav, egy triptofán metabolit, ezért hatásai számos sejtfolyamatot érinthetnek. Ezek közül említésre méltók a poli(ADP)ribóz-polimerázhoz (PARP) köthető folyamatok [167]. A PARP bizonyítottan fontos szabályozó szereppel bír a HD kultúrák chondrogenicus differenciációjában és például a 3-aminobenzamid nevű PARP-gátlószer a DCKA-hoz hasonló mátrixképződést serkentő hatásokat eredményezett [168]. Összességében azonban a DCKA által fokozott mátrixképződési folyamatok pontos mechanizmusa továbbra is kérdéses maradt.

### **5.1.3. A chondrogenicus sejtek NMDAR-mediált $\text{Ca}^{2+}$ -jelei**

Az NMDAR-ok funkcionalitásának igazolása érdekében  $\text{Ca}^{2+}$ -méréseket végeztünk élő sejteken. Modellünkben az NMDA által direkt vagy indirekt módon aktivált  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák csak mérsékelt szenzitivitást mutattak és  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilitásuk is meglehetősen alacsony volt (a  $\text{Ca}^{2+}$ -csúcsok amplitúdója kb. 60 nM volt). Ez fokozottan igaz volt az első tenyésztési napon, amikor is az NMDA kezelés nem váltott ki  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket. Összehasonlításképpen ugyanebben a modellben az adozin-trifoszfát (ATP) által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek relatíve nagy amplitúdóval (kb. 180 nM) jellemezhetők a porcfelődés 3. napján [151]. Tapasztalataink az NMDA által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket illetően jól korrelálnak nagyagykérgi neuronok egyedi triheterotetramer (GluN1, GluN2 és GluN3 összetételű) csatornáiról kapott mérési eredményeivel [169]. A chondrogenicus sejtek NMDA hatására mért  $\text{Ca}^{2+}$ -jeleinek lassú inaktivációja ráadásul nagyon hasonló a mesenchymalis őssejtekben NMDA-kezelést követően dokumentált értékekhez [162]. Az NMDA-val ellentétben azonban a glicin alkalmazását követően nem tudtuk  $\text{Ca}^{2+}$ -jeleket detektálni a HD kultúrák sejtjeiben. Ez alapján persze nem tudjuk megítélni, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelek hiánya a potenciálisan jelen lévő GlyR-ok indirekt hatásainak következményeként, vagy a GluN1-GluN3 kolokalizációs jelek alapján feltételezett

diheterotetramerek működésképtelenségeként magyarázható-e. Mindazonáltal a GluN3 alegységek membránpotenciál-független aktivációt biztosítanak a di- vagy triheterotetramer NMDAR-oknak és jelentékenyen csökkentik azok  $\text{Ca}^{2+}$ -konduktanciáját [156]. A GluN3 alegységeket tartalmazó, és nagy valószínűséggel jelen lévő triheterotetramer NMDAR-ok egyedi tulajdonságai vélhetően a chondrogenicus sejtek chondroblastokká történő elköteleződése során fontosak, amikor is a finoman szabályozott és precíz  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -változások elengedhetetlenek a megfelelő differenciációhoz [6].

A porcosodó sejtek spontán, viszonylag nagy frekvenciájú  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -változásokat képesek produkálni, melyek érzékenyek a feszültségfüggő  $\text{K}_v1.1$   $\text{K}^+$ -csatornák gátlására [101], illetve kapcsolatban állnak a belső  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárakkal [102, 170]. Az NMDAR-ok spontán  $\text{Ca}^{2+}$ -eseményekben betöltött szerepét vizsgálva azt találtuk, hogy az NMDA megnövelhette a csatornák nyitási valószínűségét, ami főként hosszabb idejű és nagyobb amplitúdójú spontán eseményekhez vezetett, a kontrollhoz képest. A GluN2B specifikus antagonistá, az ifenprodil szinte teljesen megszüntette a  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációkat, ami arra enged következtetni, hogy az NMDAR-ok által mediált  $\text{Ca}^{2+}$ -influx szükséges a chondrogenicus sejtek spontán  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációjához. Patkányok oliva inferior eredetű neuronjaiban már igazolták a  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk NMDAR-függőségét [171]. Ezzel egybecseng az a megfigyelés is, miszerint az NMDA növelni képes a hippocampus eredetű neuronok  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációinak amplitúdóját [172]. Ezzel szemben az NMDAR-ok csupán minimálisan járultak hozzá tenyésztett idegsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációihoz [173]. Nem idegrendszeri sejtekben nem találtunk ilyen értelmű közölt adatokat, így ezek a kísérleti eredmények az elsők, amelyek nem ingerlékeny sejtekben vetik fel az NMDAR-ok  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációkban betöltött szerepét.

A HD kultúrák két- és háromnapos sejtjein voltage clamp módban végzett patch clamp méréseket is végeztünk az NMDAR-okon keresztül megvalósuló  $\text{Ca}^{2+}$ -áram még pontosabb vizsgálatához, azonban érdemi mérési adatokat nem sikerült detektálnunk (nem bemutatott eredmények). A mérhető  $\text{Ca}^{2+}$ -áramok hiánya leginkább a 300  $\mu\text{M}$ -os NMDA és 10  $\mu\text{M}$ -os glicin kezeléseket követő  $\text{Ca}^{2+}$ -jelek miniatűr jellegével magyarázható.

## 5.2. Az NMDAR-ok összefüggései a daganatos sejtfenotípussal humán pigmentsejtekben

A glutamáterg szignalizáció epidermális melanocytákban betöltött szerepét Hoogduijn és munkatársai részletesen feltérképezték. Eredményeik szerint a bőrből izolált melanocyták nem szabadítanak fel L-glutamátot sem spontán módon, sem KCl stimulust követően. Microarray analízis segítségével azonban számos glutamát receptor alegység (az NMDAR esetében csak a GluN2C alegység) és glutamát transzporter expresszióját, míg wb-tal többek között a GluN2A kifejeződését sikerült igazolniuk [140]. Megerősítették továbbá Genever és munkatársainak megfigyelését is, miszerint humán epidermális keratinocyták képesek L-glutamát spontán felszabadítására [144]. Az *in vitro* melanocyták szubpopulációi  $[Ca^{2+}]_i$ -növekedéssel reagáltak 10  $\mu$ M AMPA, illetve 10  $\mu$ M és 10 mM NMDA-kezelésekre. Ezen szubpopulációk sejtjei jellemzően kevésbé pigmentáltak voltak és kevesebb nyúlvánnyal is rendelkeztek a nem válaszoló sejtekhez képest [140]. Továbbá a melanocyták iGluR receptorait befolyásoló farmakonok a sejtek morfológiai változásait és a melanoszóma transzfer regulációjának módosulását eredményezték [141]. A bőr melanocytái tehát egy glutamáterg szignalizációs eszköztárral jellemezhetők, melyhez a glutamát forrásul feltételezhetően az epidermális keratinocyták szolgálnak, illetve melynek  $[Ca^{2+}]_i$ -t befolyásoló hatásait kísérletes eredmények is alátámasztják.

A melanocytákkal ellentétben a melanoma szövetmintákból kinyert daganatos pigmentsejtek képesek voltak L-glutamátot szekretálni, ami valószínűleg egy autokrin-parakrin hurok révén fejti ki hatásait [17]. A glutamát szignalizációs eszköztár komponenseit és azok farmakológiai befolyásolását számos publikáció dokumentálta [18, 136], azonban az NMDAR-ok estében főként a GluN2A alegységgel és annak génjével (*GRIN2A*) kapcsolatban vannak ismereteink. Mivel melanomában a *GRIN2A* aktivitásának csökkenése kontrollálatlan proliferációt eredményez, ezért a GluN2A génjét tumorszuppresszornak is tekintik [139]. Exome-szekvenálási vizsgálatok ráadásul frekvenciánként mutált területnek azonosították a *GRIN2A*-t [137], mely mutációk sok esetben egyúttal csökkent túlélési esélyeket is jelentettek [138]. A GluN2 alegységek mellett a melanocytákban és melanoma sejtekben valószínűsíthetően jelen lévő NMDAR-ok GluN1 és GluN3 alegységeiről érdemi információkkal idáig nem rendelkezünk. Kísérleteinkkel nemcsak feltártuk az egészséges és patológiás pigmentsejtek expressziós profiljait, de a potenciális NMDAR-működések egészét tekintve is újszerű megfigyeléseket tettünk, melyek összefüggésben állhatnak a neoplasticus folyamatokkal.

### **5.2.1. Az egészséges és patológiás pigmentsejtek NMDAR alegység expressziója eltérő**

Humán pigmentsejteken végzett kísérleteink értékes adatokkal szolgálnak a bőr melanocytáinak NMDAR alegység expressziós mintázatát illetően, továbbá egyedi funkcionális karakterrel jellemezhető NMDAR-okat azonosítottunk melanoma sejtek magjában is. Míg a Hoogduijn és munkatársai által végzett microarray analízisek a GluN2C alegység expresszióját és a GluN2B alegység hiányát igazolták melanocytákban [140], addig RT-PCR eredményeink azt mutatták, hogy NHEM-ben mindegyik NMDAR alegység kifejeződik mRNS szinten. A melanocyták teljes lizátumain végzett wb-ok azonban csak a GluN1-1a és a GluN2A alegységek fehérje expresszióját jelezték biztonsággal, míg a GluN1, GluN2B, GluN3A és GluN3B alegységek expressziói nem érték el a detektálás küszöbét. Az A2058, HT168M1, HT199, M35/01 és WM35 melanoma sejtek PCR vizsgálatai, a melanocytákhoz hasonlóan, valamennyi NMDAR alegység mRNS-ének kifejeződését megerősítették. Az alegységek fehérje expressziós analízisét, a pontosabb feltérképezés érdekében, a daganatos sejtek szubcelluláris frakcióin folytattuk. E szerint a GluN2A és a GluN3A alegységek egyöntetűen a melanoma sejtek citoszol és membrán frakcióiban, de nem a magi frakciókban jelentek meg, míg a GluN2B alegység valamennyi sejt-kompartimentben hiányzott. A GluN2B-ről így elmondható, hogy protein szinten sem a melanocytákban, sem a melanoma sejtekben nem jelent meg. A GluN1 és a GluN3B alegységek ezzel szemben mindegyik vizsgált celluláris kompartimentben kifejeződtek.

### **5.2.2. Szokatlan összetételű NMDAR-ok a melanoma sejtek magjában**

Az NMDAR-ok pontosabb szubcelluláris elhelyezkedésének meghatározásához és a frakcionált mintákon végzett wb eredmények alátámasztásához immuncitokémiai reakciókat végeztünk pigmentsejt kultúráinkon, melyek eredményeit konfokális mikroszkóppal értékeltük. A felvételek a GluN1 és GluN3B alegységek kolokalizációját demonstrálták a melanoma sejtek magjaiban, mely nukleáris lokalizációjú molekuláris heteromerek alkotását sejteti. A kolokalizációs szignálok inkább jellegzetes, pöttyözött megjelenést mutattak, mintsem konkrét magi régiókra lokalizálódtak volna. A GluN1, illetve a GluN1-1a alegységek GluN3B-vel való kolokalizációját nem tapasztaltuk egészséges pigmentsejtek magjaiban és immunfluoreszcens jelek az egész sejtet illetően gyengének minősültek. (Habár nem volt célunk a melanocyták és melanoma sejtek fluoreszcencia intenzitásainak összevetése, mégis ismételt hangsúlyozom,

hogy a konfokális mikroszkóp beállítási paraméterei a különböző kultúrák vizsgálatakor változatlanok voltak.) Mindezeket figyelembe véve eredményeink a sejtmagi kompartmentben megjelenő GluN1/1-1a–GluN3B összetételű NMDAR-ok és a malignus pigmentsejt fenotípus megjelenésének összefüggését sugallják.

Amint azt a bevezetőben is említettem a GluN1-1a a GluN1 alegység egyetlen olyan splice variánsa, amely NLS-t tartalmaz [41]. Más NMDAR alegység splice variánsok kapcsán egyelőre nem rendelkezünk publikált adatokkal afelől, hogy rendelkeznek-e NLS-sel vagy sem. Mivel általában véve az NLS nem egy konstans, egyszerűen meghatározható szekvencia, ezért a Holmes és munkatársai által a GluN1-1a variánsbanközölt NLS-ek szekvenciáit vettük alapul a GluN3B alegység vizsgálatához, melynek kiindulási alapját a GluN1 és GluN3B alegységek közti szekvencia homológia képezte. A GluN1-1a-ban dokumentált NLS-eket egy internetes adatbázisban ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) vetettük össze a GluN3B teljes protein szekvenciájával. A módszer segítségével a GluN1-1a alegységben azonosítottakhoz hasonló, NLS-szerű motívumokat sikerült kimutatnunk a GluN3B C-terminálisán (a 922. és 933. aminosavak között). Ennek alapján jogos lehet a feltételezés, hogy a GluN3B NLS-sel rendelkezik, ami magyarázatul szolgálhat az alegység magi lokalizációjára. Éppen ezért a GluN3B alegység NLS-gyanús területe további alapos vizsgálatokat kíván és funkcionális bizonyítékokon alapuló megerősítést igényel [174].

Tovább árnyalják a képet a membrán frakciókban azonosított GluN2A alegységek szubcelluláris lokalizációit feltérképezni kívánó immuncitokémiai reakciók. Az anti-GluN2A antitest immunfluoreszcens jelei elsősorban a melanoma sejtek magjait rajzolták körül és a GluN1-hez, illetve GluN3B-hez képest alig jelentek meg intranukleárisan. A GluN2A expressziós mintázata tehát potenciális maghártya lokalizációra hívja fel a figyelmet. Figyelemre méltó továbbá, hogy a fluoreszcens felvételek összevetítése során a GluN2A jelei a GluN1-gyel és a GluN3B-vel is kolokalizáltak, ami a triheterotetramer NMDAR-ok jelenlétének lehetőségét veti fel a maghártyában. A melanocytákban ezzel szemben lényegesen kevesebb és szemmel láthatóan kisebb intenzitású GluN2A jeleket figyelhettünk meg, melyek a GluN1-gyel és a GluN3B-vel a melanoma sejtekhez képest elenyésző módon (vagy egyáltalán nem) kolokalizálnak.

Végeredményben tehát azt mondhatjuk, hogy a melanoma sejtekben szokatlan lokalizációjú és variábilis összetételű NMDAR-ok demonstrálhatók. A sejtmag belsejében inkább GluN1–GluN3B kompozíciójú diheterotetramerek, míg a maghártyában GluN1–GluN2A di- és/vagy GluN1–GluN2A–GluN3B összetételű triheterotetramer komplexek feltételezhetők. Míg előbbi

a korábbiakban már részletezett alternatív glicin receptornak, addig utóbbiak L-glutamátra érzékeny NMDAR-oknak felelhetnek meg. Összességében tehát azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a különböző kompozíciójú NMDAR-ok nukleáris jelenléte egy patológiás jelenség részeként biztosíthat alternatívákat a kompartment  $\text{Ca}^{2+}$ -eseményeinek manipulálására a pigmentsejtekben.

### **5.3. Idegrendszeren kívüli, nem excitábilis sejtek az NMDAR-ok és $\text{Ca}^{2+}$ -ok keresztmetszetében**

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ok a sejtek életében elengedhetetlen fontosságúak, hiszen a jelátviteli folyamatok legrégebbi és legelterjedtebb másodlagos messenger-eiként szolgálnak. Számos kísérleti megfigyelés támasztja alá, hogy a legtöbb nem excitábilis sejt, olyan  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat expresszál a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátviteli eszköztár részeként, melyek lehetőséget teremtenek a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok sejtbe való bejutására és ezáltal sejtélettani folyamataik befolyásolására, illetve finomhangolására. Az értekezésem tárgyát képező NMDAR-ok szerepét a nem excitábilisnak számító porc- és pigmentsejteken vizsgáltam és kísérleti eredményeink a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis tekintetében új funkcionális tapasztalatokat jelentenek a porcfejlődés molekuláris értelmezésében, illetve számos meglepő implikációt hordoznak a melanoma experimentális megközelítésében.

#### **5.3.1. Az NMDAR-ok a differenciálódó porcsejtek $\text{Ca}^{2+}$ -jelátviteli eszköztárának tagjai**

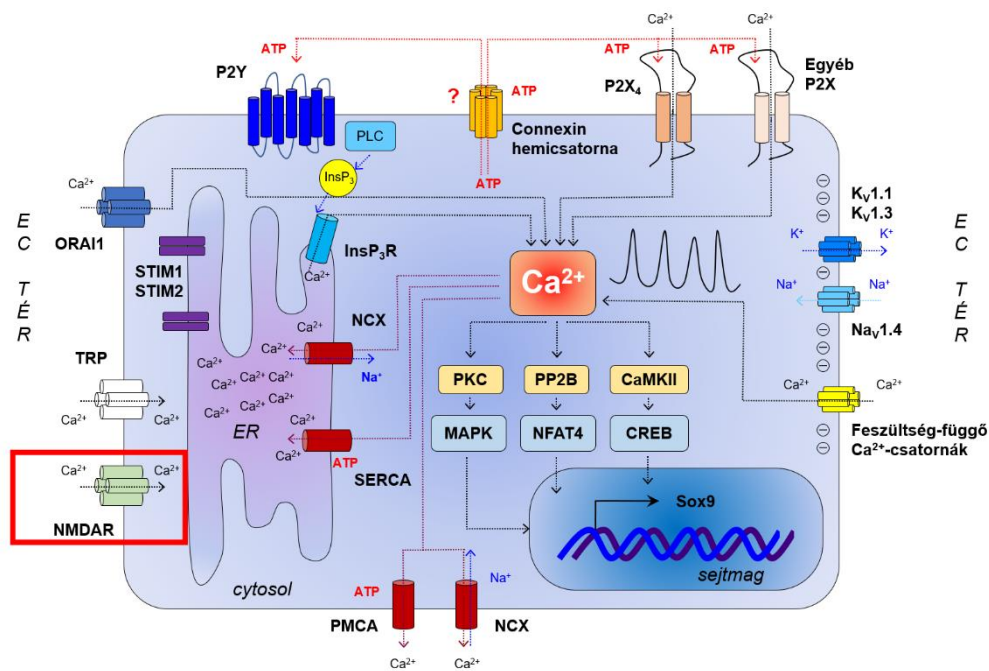
Laboratóriumunk korábbi kísérleti tapasztalatai szerint a mesenchymalis sejtek chondrogenicus elköteleződésének idején a csirke eredetű HD kultúrák sejtjeinek  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változásai kulcsfontosságúak a folyamat egésze szempontjából [70]. Bár a chondrogenicus sejtek spontán  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációiban rendkívül fontos szerepet töltenek be az IC  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak, ám ezek az ingerlékeny sejtekhez képest kevesebb  $\text{Ca}^{2+}$ -ot tartalmaznak, gyorsan kiürülnek. Ezért az elsődleges forrásként mégis az EC tér szolgál, melyből a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákon keresztül juthatnak be a differenciálódó porcsejtekbe. Az alábbiakban azt a három mechanizmust mutatom be röviden, melyek révén  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk létrejöhetnek a chondrogenicus sejtekben. Ebben a modellben igyekszem demonstrálni az NMDAR-ok helyét és szerepét.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk első lépéseként az egyik legjobban dokumentált mechanizmust, a purinerg receptorokat veszem alapul. A porcosodó mesenchymalis sejtek egy autokrin-parakrin hurok révén ATP-t képesek szekretálni, mely a plazmamembránban elhelyezkedő, ionotróp P2X és metabotróp P2Y receptoraikat aktiválhatja [151]. A ligandum kapuzott P2X receptorok  $\text{Ca}^{2+}$ -influxot eredményeznek, míg a P2Y receptorok a PLC-InsP<sub>3</sub> útvonalon keresztül  $\text{Ca}^{2+}$ -okat szabadítanak fel a belső raktárakból. Mindkét esetben átmeneti jelleggel megemelkedik a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , melyet aktív pumpamechanizmusok állítanak helyre. Mivel a P2X receptorok nem szelektív kationcsatornák, ezért a beáramló  $\text{Ca}^{2+}$ -ok mellett bizonyos mértékű  $\text{Na}^+$ -influxot és  $\text{K}^+$ -effluxot is megfigyelhetünk. Természetesen a kezdeti  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást nemcsak purinerg receptorok válthatják ki, hanem az arachidonsav vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák, a TRP-k (e csoporton belül említést érdemelnek a differenciálódó porcsejteken laboratóriumunk által részletesen vizsgált TRP vanilloid csatornák is [175]), és mint értekezésem kísérleti eredményei is mutatják, az NMDAR-ok is. Kísérleteink igazolták, hogy a differenciálódó porcsejtek képesek glutamátot termelni, ami az ATP-hoz hasonlóan autokrin-parakrin módon aktiválhatja az NMDAR-okat (és más potenciálisan expresszálódó glutamát receptorokat). Az NMDAR-ok GluN1-GluN2 vagy GluN1-GluN3 diheterotetramer, illetve GluN1-GluN2-GluN3 összetételű triheterotetramer komplexekként is előfordulhatnak a chondrogenicus sejtekben a porcdifferenciáció kritikus fázisában, ami erősíti azt az elképzelést, miszerint a sejtek az eltérő alegység-összetételből fakadóan különböző tulajdonságú  $\text{Ca}^{2+}$ -áramok révén finomhangolhatják saját jelátviteli folyamataikat.

Visszatérve a  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk mechanizmusaihoz azt láthatjuk tehát, hogy az első lépésben aktiválódó receptorok végeredményben a plazmamembrán depolarizációját okozzák [176], ami következésképpen az oszcillációk második mechanizmusához, a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák megnyílásához vezet. Mint említettem korábban, a posztzinaptikus neuronok plazmamembránjában a GluN1-GluN2 kompozíciójú klasszikus NMDAR-ok aktivációjához elengedhetetlen az előzetes membrádepolarizáció [23]. A porcsejtek GluN1-GluN2 összetételű receptorai, feszültségfüggő jellegükből adódóan, a  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk második mechanizmusában (is) szerepet játszhatnak azáltal, hogy az előzetes membrán depolarizáció hatására kinyíló feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák hatásait potenciózzák.

Az oszcillációk kialakulásához vezető harmadik út a metabotróp receptorokon (mint pl. a P2Y receptor) és a PLC-InsP<sub>3</sub> útvonalon keresztül eredményez  $\text{Ca}^{2+}$ -kiáramlást a belső raktárakból. Az ER  $\text{Ca}^{2+}$ -depléciója az ER membránban elhelyezkedő STIM fehérjék és a plazmamembránban található Orai-csatornák interakcióját váltja ki. Az Orai-csatornák  $\text{Ca}^{2+}$ -

felszabadulás aktiválta  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák, melyek a STIM fehérjékkel együtt a SOCE fő komponensei. Végeredményben a megnyíló Orai-csatornákon keresztül  $\text{Ca}^{2+}$ -ok áramlanak a sejtbe és a belső raktárak feltöltődnek. Ezzel kapcsolatban megvizsgáltuk a chondrogenicus sejtek metabotrop glutamát receptor expressziós profilját is (nem bemutatott eredmények) és főként azon mGluR receptorok mRNS-eit sikerült azonosítanunk, amelyek a mGluR-ok II-III. csoportjába tartoznak. Ezek a receptorok az idegsejtekben preszinaptikus lokalizációjúak,  $G_i$  fehérjén keresztül hatnak és elsősorban az NMDAR aktivitásra vannak gátló hatással, ezáltal védve a neuronokat a glutamát excitotoxicitástól [24]. Így a glutamát feltételezetten jelen lévő metabotrop receptorai, szemben a P2Y receptorokkal, nem eredményeznek  $\text{Ca}^{2+}$ -depléciót a belső raktárakban és következményes SOCE-t, ellenben az NMDAR-ok aktivitásának fontos szabályozói lehetnek. Az 5.1. ábra a  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációkkal kapcsolatos ismereteket demonstrálja a chondrogenicus sejtekben.



**5.1. ábra: A spontán  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk generálásának, fenntartási lehetőségeinek és következményeinek sémás áttekintése egy chondrogenitor sejtben.** A  $\text{Ca}^{2+}$ -ok P2X purinerg receptorokon, tranziens receptor potenciál (TRP) és feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákon, valamint, eredményeink tekintetében, N-metil-D-aszpartát receptorokon (NMDAR) (piros keretben) keresztül juthatnak be a chondrogenicus sejtekbe. Az oszcillációk fenntartásában rendkívül fontosak még az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak, azonban az NMDAR-ok és más feltételezett metabotrop glutamát receptorok nem játszanak szerepet a raktár által vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -belépésben. A megemelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció nyugalmi állapota történő visszaállításában az endoplazmatikus retikulum (ER) szarko/endoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz (SERCA) pumpái és  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchangerei (NCX), illetve a plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz pumpái (PMCA) és NCX-ei elengedhetetlenek. A kép forrása: [177] (módosítva).

A porcosodó sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációi által hordozott információk jelátviteli dekódolása részben a CaMKII-CREB útvonalon, részben a foszfoprotein foszfatáz 2B-NFAT kaszkád révén valósul meg, ami végeredményben a mesenchymalis sejtek chondrogenicus differenciációját segíti elő. A  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  által befolyásolt, porcképződésben fontos molekuláris tényezők között említést érdemel továbbá a PKC-MAPK útvonal és a SOX9 magi transzlokációja is [178]. A fentiekben részletezett folyamatok harmóniája elengedhetetlen a chondrogenicus sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisában és a differenciációs program gördülékenységében.

### 5.3.2. Újszerű alternatívák a melanoma sejtek $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisában

Az elmúlt húsz évben a sejtmag a sejtszintű  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis interpretációjában új értelmezést nyert, lévén kísérletes bizonyítékok igazolták a nukleáris kompartment  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli folyamatainak egyediségét [179-181]. A sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$  forrása azonban ellentmondásos kérdés. Vajon a sejtmagban megfigyelt  $[\text{Ca}^{2+}]$ -változások citoszolikus eredetűek vagy esetleg magi forrásokhoz köthetőek? A citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziesek gyakorlatilag leárnyékolják a magi eredetű  $\text{Ca}^{2+}$ -jeleket [182], ami jelentősen megnehezíti a nukleáris eredetű tranziensek azonosítását. A kilencvenes években a kérdés megközelítéséhez izolált sejtmagokból létrehozott tenyészeteken végeztek vizsgálatokat. A tanulmány szerint a májsejtekből kinyert sejtmagok ATP-függő módon képesek  $\text{Ca}^{2+}$ -okat felvenni, ami ezáltal a maghártya laminái közti perinukleáris térbe kerül, majd onnan  $\text{InsP}_3\text{R}$ -ok vagy ciklikus adenzin-difoszfát-ribóz receptorok által mediált módon képes felszabadulni [183]. Ezzel összhangban egy másik kutatócsoport működőképes  $\text{InsP}_3\text{R}$ -okat és rianodin receptorokat azonosított osteoblastok maghártyáján [184]. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a perinukleáris tér alkalmas raktára lehet a sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$ -függő folyamatoknak. Azonban Luo és munkatársai még tovább mentek és megállapították, hogy a maghártya belső laminájának, illetve a maghártya mindkét lemezének a sejtmag belsejébe irányuló invaginációjával létrejövő nukleoplazmatikus retikulum (NR) és maga a nukleoplazma is képes autonóm  $\text{Ca}^{2+}$ -szignálokat generálni újszülött patkányok cardiomyocytáiban [185]. További vizsgálatok azt igazolták, hogy a sejtmag belső tere igen gazdag  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátviteli komponensekben. A korábban már a maghártya kapcsán említett  $\text{InsP}_3$ , rianodin és ciklikus adenzin-difoszfát-ribóz receptorokon kívül [186] nikotinsavamid adenin difoszfát receptorokat, SERCA-pumpákat és NCX-et is találtak az NR-ben [187], illetve a nukleoplazmában [179]. Természetesen ezek a receptorok és pumpák nem csak szabadon „úszkálnak” a nukleoplazmában. Az  $\text{InsP}_3\text{R}$ -ok például

magfoltokban és nanovezikulumokban lehetnek jelen [188]. A magfoltok és az 50 nm-nél is kisebb nanovezikulumok  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárakként szolgálhatnak és diszkrét szubdoménekben tehetik lehetővé a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok felszabadulását [189]. Az  $\text{InsP}_3\text{R}$  antitestek sejtmagi, pöttyözött immunfluoreszcens mintázata nemcsak magfolt- vagy nanovezikulum-lokalizációval magyarázható, hanem az NR-nek megfelelő maghártya-lefűződésekben való expresszióval is [190]. Hasonló pöttyözött megjelenést tapasztaltunk az NMDAR alegységek kapcsán is a melanoma sejtek magjában, ami az előbbieket fényében arra enged következtetni, hogy a GluN1–GluN3B összetételű NMDAR-ok vélhetően a maghártya befűződésein vagy a nukleáris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak felszínén lehetnek jelen. Az elmúlt két évtized kísérleti tapasztalatai mindenesetre egy független sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátviteli teóriát támasztanak alá, ami az NMDAR alegységek nukleáris expressziójának relevanciáját erősítik.

A sejtmagi  $[\text{Ca}^{2+}]_n$ -változások ( $[\text{Ca}^{2+}]_n$ ) funkcionális aspektusai közelebb vihetnek minket ahhoz, hogy miért is fontos őket elkülöníteni a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  változásoktól. Utóbbiak számos sejtfolyamatot befolyásolhatnak, melyek közé például a transzkripciós faktorok aktivációja is tartozik. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ok hatására aktiválódó transzkripciós faktorok a sejtmagba jutva közvetlenül (pl.: NFAT, NF $\kappa$ B) vagy közvetetten (pl.: MAPK) lehetnek hatással a génexpresszióra [57]. Számos közelmúltban publikált közlemény hasonló szerepet jósol a  $[\text{Ca}^{2+}]_n$ -változásoknak is. A CREB és a myocytin enhancer factor 2 aktivitását a  $[\text{Ca}^{2+}]_n$  emelkedése például fokozni képes [191]. A  $[\text{Ca}^{2+}]_n$  növekedése azonban bizonyos transzkripciós faktorok gátlását is eredményezheti.  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására a downstream regulatórikus elem antagonistikus modulátor fehérje affinitása csökken a downstream regulatórikus elemet tartalmazó génekkel szemben, aminek következtében a modulátor disszociál a DNS-ről és ez a kérdéses gének transzkripciójának derepresszióját okozza [192]. A  $[\text{Ca}^{2+}]_n$ -változások azonban nemcsak transzkripciós faktorok befolyásolásán keresztül fejthetik ki génexpressziót érintő hatásaikat, hanem a kromatin-struktúra megváltoztatásán keresztül is [57]. Emellett szívizomsejtekben kimutatták, hogy bizonyos epigenetikai szabályozó molekulák, például egyes hiszton deacetylázok működését is befolyásolják  $\text{Ca}^{2+}$ -függő enzimek (CaMKII) [193]. Mindezen tapasztalatok azt sugallják, hogy a sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$ -ok funkcionális szempontból meghatározóak az intranukleáris jelátviteli folyamatokban, melyek tér- és időbeliségében a sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak finomhangoló megközelítést biztosítanak.

Nemrégiben megjelent összefoglaló tanulmányok szerint metabotróp, elsősorban G fehérjékhez kötött receptorok széles köre van jelen számos sejttípus (pl. cardiomyocyták, HEK293 és HeLa sejtek) magjában [194]. Beszámolók szerint működőképes mGluR-okat (konkrétan az

mGluR5-öt) találtak HEK293 sejtek és kérgi idegsejtek maghártyáin. A mGluR5 valószínűsíthetően sejtmagi PLC-t aktivál, ami nukleáris  $\text{InsP}_3$  termelődéséhez és következményes  $\text{Ca}^{2+}$ -jelekhez vezet [195, 196]. Nemcsak a metabotróp, de a nukleáris ionotróp receptorok témakörében is bővültek ismereteink: proteomikai analízisek R-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat azonosítottak a maghártyában, és ezek mellett  $\text{K}^+$ - és  $\text{Cl}^-$ -csatornákat is sikerült sejtmagi patch clamp technikával igazolni [197, 198].

A sejtmagot illetően az NMDAR-okról, vagy bármely más iGluR-okról idáig nem jelentek meg tudományos beszámolók, ugyanis a nukleáris NMDAR-funkciók megközelítése nem egyszerű technikai kihívás. A konvencionális NMDAR-okat két, glicin kötő hellyel rendelkező GluN1 és két, glutamát kötésre képes GluN2 alegység alkotja, melyek hatásos aktivációjához glutamát és glicin szimultán bekötődése szükséges. Mivel a GluN1 mellett a GluN3 alegységek sem képesek a glutamát, csak a glicin kötésére, ezért a melanoma sejtek magjában azonosított GluN1–GluN3B heteromerek egyfajta alternatív glicin receptorokként is értelmezhetők, melyek  $\text{Ca}^{2+}$ -ra permeábilisak [199]. Azonban a glutamát-inszenzitivitás és a tény, hogy az előzetes membránpolarizáció szükségtelen a csatorna kinyílásához [38], megnehezíti a GluN1–GluN3B összetételű heteromerek farmakológiai megközelítésű funkcionális vizsgálatát. Kiemelendő továbbá, hogy a GluN1–GluN3 diheterotetramer konstelláció  $\text{Ca}^{2+}$ -áramokra vonatkozó elektrofiziológiai tulajdonságai is eltérnek a szokványos GluN1–GluN2 diheterotetramer és a GluN1–GluN2–GluN3 triheterotetramer csatornákétól [45]. A GluN1–GluN2–GluN3 triheterotetramer NMDAR-ok abban megegyeznek a GluN1–GluN3 diheterotetramerekkel, hogy nyitásuk nem függ az előzetes membránpolarizációtól, azaz nem érzékenyek a  $\text{Mg}^{2+}$ -okra és hogy agonista bekötődését követően kis amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$ -áram valósul meg rajtuk keresztül [199]. Amiben eltérnek, hogy a GluN1–GluN3 kompozíciójú csatornák csak glicint tudnak kötni és excitatórikus glicin receptorokként foghatók fel, míg a GluN1–GluN2–GluN3 összetételű heteromerek képesek glutamátot is kötni, azonban a konvencionális GluN1–GluN2 csatornák  $\text{Ca}^{2+}$ -áramaival szemben a különbséget épp a triheterotetramer szerkezetben jelen lévő GluN3 alegység biztosítja [199]. A GluN1–GluN3 és a GluN1–GluN2–GluN3 összetételű NMDAR-okon keresztül megvalósuló  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek által aktivált jelátviteli útvonalak közti különbségek egyelőre még nem karakterizáltak pontosan. Ezek tükrében tehát a melanoma sejtek magjában, illetve maghártyájában megjelenő, feltételezetten funkcionáló NMDAR-ok, eltérő összetételükből fakadóan, valószínűleg különböző jelátviteli lépésekért és funkciókért felelhetnek.

Mivel a sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátvitel funkcionális vizsgálata meghaladja a doktori értekezés és a laboratóriumunk technikai lehetőségeit, ám mégis megkerülhetetlen téma, ezért az alábbiakban csak röviden megemlíteném a jelenleg ismert legkorszerűbb vizsgálati megközelítéseket. A  $[\text{Ca}^{2+}]_n$ -változások pontos vizsgálata sok éven át okozott nehézségeket, ami a téma körül ellentmondásokat szült. Napjainkban a nukleáris  $\text{Ca}^{2+}$ -okhoz köthető folyamatok *in vitro* és *in vivo* tanulmányozásának legmegbízhatóbb módszereit a biolumineszcencián alapuló  $\text{Ca}^{2+}$ -próbák és a rekombináns  $\text{Ca}^{2+}$ -indikátorok virális vektorok útján való bejuttatása jelentik; ezeket pedig kifinomult képalkotó technikákkal lehet követni (pl. két-foton mikroszkópia, szál-optikai technológia) [181, 200]. Elképzelhető továbbá a  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák izolált sejtmagok külső vagy belső membránján történő patch clamp vizsgálata is [201].

A sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátvitelt fokozása vagy legalább is modulálása már napjainkban is hasznos része lehet neurodegeneratív betegségek, a szorongás és a poszttraumás stressz kezelésének [200], mindemellett NMDAR (és iGluR) antagonisták *in vitro* hatékonyságát is igazolták már rákos és melanoma sejteken [202]. Habár a nukleáris  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátvitelt érintő újszerű melanoma (és egyéb daganat) terápiák számos kérdést felvetnek, de a lehetőségek adottak a további vizsgálatok számára, hogy tisztázzák a sejtmagi  $\text{Ca}^{2+}$ -ok szerepét, amelyben, mint eredményeink is alátámasztják, érdemi szerepet tölthetnek be a GluN1-GluN3B és a GluN1-GluN2-GluN3 összetételű NMDAR-ok.

#### **5.4. Záró gondolatok**

Doktori értekezésem kísérleti eredményei egy klasszikus, központi idegrendszerből ismert receptor, az NMDAR jelenlétét és potenciális funkcióit hivatottak demonstrálni *in vitro* sejt kultúrákban, ezáltal betekintést engedni az NMDAR-ok idegrendszeren kívüli, nem excitábilis sejtekben betöltött szerepét illetően. Az NMDAR-ok nem specifikus kationcsatornák, leginkább  $\text{Ca}^{2+}$ -okra permeábilisak, ezért főként  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornáként tekinthetünk rájuk. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ok a legősibb és egyik leggyakoribb másodlagos messenger-ek, melyek számtalan jelátviteli folyamatot érintve változatosabbnál változatosabb sejt válaszokat eredményeznek.

Természetesen eredményeim és következtetésem korántsem terjednek ki minden részletre. Az NMDAR-ok nem excitábilis sejtekben betöltött funkcióinak és azok molekuláris hátterének pontos megértésétől még nagyon messze vagyunk, azonban az értekezésemben összefoglalt kísérletes eredmények és az azokból levont következtetések esetlegesen közelebb vihetnek

minket a klinikai gyakorlat számára levonható tapasztalatokhoz. Mindemellett az NMDAR-okkal kapcsolatos megfigyeléseink más, központi idegrendszerből ismert receptorok számára is kinyithatják a kapukat a nem excitábilis sejtek világába.

Kísérleteink megerősítették, hogy az NMDAR-ok által mediált szignalizáció fontos szerepet tölthet be a chondrogenesis korai fázisában a differenciálódó mesenchymalis sejtek  $Ca^{2+}$ -oszcillációinak befolyásolása révén. Az NMDAR-ok fontosságát különféle farmakonok segítségével is alátámasztottuk. Eredményeink megerősítik és kiegészítik más kutatócsoportok beszámolóit, melyek többek között az NMDAR-ok felnőtt ízületi porcsejtek mechanotranszdukciójában betöltött szerepéről, illetve a receptorok gyulladássos ízületi betegségekben (pl.: OA) leírt megváltozott kompozíciójáról és funkciójáról számolnak be. A differenciálódó porcsejtekben látott, differenciációs stádiumonként változó NMDAR-összetétel az egyik legfontosabb megfigyelésünknek tekinthető ebben a modellben és úgy gondoljuk, hogy a sejtek az eltérő alegység-összetételből fakadóan különböző tulajdonságú  $Ca^{2+}$ -áramok révén finomhangolhatják saját jelátviteli folyamataikat.

Ezzel szemben az NMDAR-okról humán pigmentsejteken szerzett tapasztalataink egy malignus transzformációhoz köthető, sejtmagi  $Ca^{2+}$ -szignalizáció lehetőségét vetik fel a melanoma sejtekben, mely új perspektívákat jelenthet kutatás és klinikum számára. A közelmúltban publikált *in vitro* tanulmányok sikeresen igazolták NMDAR (és iGluR) antagonisták hatásait carcinoma és melanoma sejteken. A glutamát jelátvitelt érintő terápiák tehát új alternatívákat nyújthatnak a melanoma kezelésében. Ebből a szempontból pedig a sejtmagi  $Ca^{2+}$ -jelátvitelben érintett szereplők célpontokként való bevonása már nem is tűnik annyira bizarr gondolatnak.

Végezetül érdekesnek és érdemesnek tartom megjegyezni azt a megfigyelést, mi szerint az NMDAR-ok szemlátomást eltérő „irányú” folyamatokban vesznek részt az *in vitro* porc- és pigmentsejteken. Míg az NMDAR-ok a porcsejtek kapcsán a korai differenciálatlan mesenchymalis sejtekben jelennek meg és segítenek a chondrogenicus sejtek differenciációjában, addig a receptorok expressziója a pigmentsejtek esetében éppen, hogy a malignusan transzformált sejtekben látszik intenzívebbnek, így az alegységek által képzett heteromerek vélhetően a neoplasticus folyamat részét képező dedifferenciációval hozhatók összefüggésbe. Persze az, hogy utóbbi ok vagy következmény, egyelőre tisztázatlan marad.

## 6. Új eredmények

Az értekezésben szereplő legfontosabb új eredmények az alábbiak szerint összegezhetők:

- 1) A fejlődő porcsejtekben a differenciáció kritikus, 2. és 3., napján GluN1, GluN2B és GluN3B NMDAR alegységek expresszálódnak, illetve kolokalizálnak egymással.
- 2) Az érettebb porcsejtekben ettől eltérő alegység-összetételű (GluN1, GluN3A) NMDAR-ok, csökkenő expresszióval jellemzőek.
- 3) A chondrogenicus sejtek képesek L-glutamátot, az NMDAR természetes agonistáját termelni.
- 4) Farmakológiai megközelítésű vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy az NMDAR-ok szerepet játszanak a porcdifferenciáció optimális megvalósulásában, illetve a porcsejtek osztódásában.
- 5) Az NMDAR-ok mesterséges agonistája, az NMDA módosította a differenciálódó porcsejtek spontán  $Ca^{2+}$ -oszcillációinak mintázatát, míg az NMDAR antagonistá ifenprodil teljesen megszüntette ezeket a  $Ca^{2+}$ -jelenségeket.
- 6) Normál humán epidermális melanocytákban elsőként mutattuk ki a GluN1 alegység legalább egyik splice variánsát.
- 7) A melanoma sejtek szubcelluláris frakciókra is kiterjedő fehérjeexpressziós vizsgálatok a GluN1, a GluN1-1a és a GluN3B alegységek citoszolikus, membrán és sejtmagi jelenlétét erősítették meg.
- 8) A melanoma sejtek magjaiban azonosított alegységek kolokalizálnak egymással.

## 7. Összefoglalás

A doktori értekezésemben bemutatott kísérletes munka során az N-metil-D-aszpartát típusú glutamát receptorokat vizsgáltuk csirke eredetű nagy sejtsűrűségű kultúrák chondrogenicus sejteiben, illetve egészséges és patológiás humán pigmentsejtekben. Lévéen az NMDAR-okon elsősorban  $Ca^{2+}$ -áram halad keresztül, ezért a receptorfunkciók tekintetében elsősorban a  $Ca^{2+}$ -homeosztázis porcdifferenciációs és molekuláris onkológiai folyamatokban bekövetkező változásait vettük górcső alá.

A chondrogenicus sejtekben kimutatott GluN1, GluN2B és GluN3B NMDAR alegységek molekuláris heteromerek jelenlétére utalnak a porcdifferenciáció korai szakaszában és a sejtek L-glutamát szekréciója nagy valószínűséggel összefügg a chondrogenicus folyamatokkal. Az NMDAR aktivitás farmakológiai módosítása alátámasztotta a receptorok szerepét a fejlődő porcsejtek általunk vizsgált celluláris funkcióiban. Kísérleteink igazolták, hogy az NMDAR-ok közvetetten és közvetlenül is hozzájárulhatnak a differenciálódó sejtek finoman hangolt  $Ca^{2+}$ -oszcillációihoz, illetve, hogy a  $Ca^{2+}$ -jelek összefüggésben vannak az optimális porcfejlődéssel.

Normál humán epidermális melanocytákban korábban csak a GluN2A alegységet detektálták biztonsággal, azonban nekünk sikerült elsőként azonosítanunk a csatornaformálásért felelős GluN1 alegység legalább egyik splice variánsát. Az NMDAR alegységek melanoma sejtek szubcelluláris frakciókra is kiterjedő fehérjeexpressziós vizsgálata nemcsak az egészséges és patológiás pigmentsejtek közti lényeges különbségekre hívta fel a figyelmet, hanem arra is, hogy a melanoma sejtek a sejtmagot is bevonhatják  $Ca^{2+}$ -függő jelátviteli folyamataikba. A melanoma sejtek magjaiban azonosított alegységek felvetik annak a lehetőségét, hogy a potenciálisan működőképes NMDAR-ok beleszóljanak a sejtmag saját  $Ca^{2+}$ -homeosztázisába és ennek révén összefüggésben legyenek magával a daganatos jelenséggel is.

Kísérleteinkkel *in vitro* körülmények között tenyésztett, idegrendszeren kívüli, nem excitábilis sejtekben elsőként mutattunk ki funkcionáló NMDAR-okat (csirke eredetű HD kultúrák differenciálódó porcsejtjei), illetve NMDAR alegységek által képzett sejtmagi lokalizációjú, molekuláris heteromereket (melanoma sejtek). Az előbbi által befolyásolt  $Ca^{2+}$ -függő folyamatok az optimális porcfejlődéshez nélkülözhetetlenek, míg utóbbiak a malignus transzformáció következményeként jelenhetnek meg és a  $Ca^{2+}$ -szignalizáció új kapuit nyithatják meg.

## 8. Summary

The experimental work presented in this thesis was based on studies involving *N*-methyl-D-aspartate type glutamate receptors in chondrogenic cells of chicken high density cultures, as well as in healthy and pathological pigment cells. Given that NMDARs primarily mediate  $\text{Ca}^{2+}$  currents, we focused on the changes of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis during chondrogenesis and tumorigenesis.

Chondroprogenitor cells express GluN1, GluN2B, and GluN3B NMDAR subunits in the early stages of cartilage formation, indicating the presence of heteromeric receptors and L-glutamate secretion by the cells possibly correlates with the course of chondrogenesis. Studies involving pharmacological modulators of NMDARs indicate their involvement in regulating cellular functions of the differentiating chondrocytes. Our experiments proved that NMDARs may have direct and indirect roles in the very precisely regulated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations of chondroprogenitor cells, and NMDAR-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signals are closely associated with optimal chondrogenic differentiation.

Normal human epidermal melanocytes have so far only been reported to express GluN2A subunits; we were the first to describe the expression of at least one splice variant of the pore-forming GluN1 subunit. The detailed analyses of NMDAR subunit protein expression profiles in melanoma cells, involving subcellular fractions, not only revealed major differences between healthy and malignant pigment cell phenotypes, but they also implicated the putative role of the nucleus in  $\text{Ca}^{2+}$  dependent signalling processes in melanoma cells. The receptor subunits in the nuclei of melanoma cells, in case of potentially functional receptor formation, raise the possibility of NMDAR involvement in nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and through that in the neoplastic phenomenon.

We demonstrated *in vitro*, for the first time, in non-excitabile cells from outside the nervous system the presence of functional NMDARs (in differentiating cells of chicken limb bud-derived high density cultures), and the nuclear localisation of heteromeric NMDARs (in melanoma cells). The former mediate  $\text{Ca}^{2+}$  dependent pathways that are indispensable to chondrogenesis, while the latter may have appeared as a result of malignant transformation and might mediate novel aspects of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling.

## 9. Hivatkozások

1. Watkins, J.C. and D.E. Jane, *The glutamate story*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S100-8.
2. Al Maini, M., et al., *A global perspective on the challenges and opportunities in learning about rheumatic and musculoskeletal diseases in undergraduate medical education : White paper by the World Forum on Rheumatic and Musculoskeletal Diseases (WFRMD)*. Clin Rheumatol, 2020. **39**(3): p. 627-642.
3. Hunter, D.J. and S. Bierma-Zeinstra, *Osteoarthritis*. Lancet, 2019. **393**(10182): p. 1745-1759.
4. Shum, L. and G. Nuckolls, *The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton*. Arthritis Res, 2002. **4**(2): p. 94-106.
5. Hollander, A.P., S.C. Dickinson, and W. Kafienah, *Stem cells and cartilage development: complexities of a simple tissue*. Stem Cells, 2010. **28**(11): p. 1992-6.
6. Matta, C. and R. Zakany, *Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair*. Front Biosci (Schol Ed), 2013. **5**: p. 305-24.
7. Matta, C., et al., *Purinergic signalling-evoked intracellular Ca(2+) concentration changes in the regulation of chondrogenesis and skeletal muscle formation*. Cell Calcium, 2016. **59**(2-3): p. 108-16.
8. Spencer, G.J., C.J. McGrath, and P.G. Genever, *Current perspectives on NMDA-type glutamate signalling in bone*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(6): p. 1089-104.
9. Hinoi, E., S. Fujimori, and Y. Yoneda, *Modulation of cellular differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors in osteoblasts*. FASEB J, 2003. **17**(11): p. 1532-4.
10. Piepoli, T., et al., *Glutamate signaling in chondrocytes and the potential involvement of NMDA receptors in cell proliferation and inflammatory gene expression*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. **17**(8): p. 1076-83.
11. Takahata, Y., et al., *Differential regulation of cellular maturation in chondrocytes and osteoblasts by glycine*. Cell Tissue Res, 2008. **333**(1): p. 91-103.
12. Wang, L., et al., *Abolition of chondral mineralization by group III metabotropic glutamate receptors expressed in rodent cartilage*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(5): p. 732-43.
13. Ramage, L., et al., *NMDA receptor expression and activity in osteoarthritic human articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(12): p. 1576-84.
14. Cummins, D.L., et al., *Cutaneous malignant melanoma*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(4): p. 500-7.
15. Hinoi, E., et al., *Glutamate signaling in peripheral tissues*. Eur J Biochem, 2004. **271**(1): p. 1-13.
16. Stepulak, A., et al., *Glutamate and its receptors in cancer*. J Neural Transm (Vienna), 2014. **121**(8): p. 933-44.
17. Namkoong, J., et al., *Metabotropic glutamate receptor 1 and glutamate signaling in human melanoma*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2298-305.
18. Teh, J.L. and S. Chen, *Glutamatergic signaling in cellular transformation*. Pigment Cell Melanoma Res, 2012. **25**(3): p. 331-42.
19. Hayashi, T., *Effects of sodium glutamate on the nervous system*. Keio J Med, 1954. **3**: p. 192-3.
20. Curtis, D.R., J.W. Phillis, and J.C. Watkins, *The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids*. J Physiol, 1960. **150**: p. 656-82.
21. Somogyi, P., et al., *Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex*. Brain Res Brain Res Rev, 1998. **26**(2-3): p. 113-35.
22. Hanada, T., *Ionotropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors*. Biomolecules, 2020. **10**(3).
23. Traynelis, S.F., et al., *Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 405-96.
24. Niswender, C.M. and P.J. Conn, *Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 295-322.
25. Bellone, C., C. Luscher, and M. Mamei, *Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(18): p. 2913-23.

26. Pinheiro, P.S. and C. Mulle, *Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(6): p. 423-36.
27. Moreno Delgado, D., et al., *Pharmacological evidence for a metabotropic glutamate receptor heterodimer in neuronal cells*. Elife, 2017. **6**.
28. Hogan-Cann, A.D. and C.M. Anderson, *Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2016. **37**(9): p. 750-767.
29. Teh, J. and S. Chen, *mGlu Receptors and Cancerous Growth*. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal, 2012. **1**(2): p. 211-220.
30. Malenka, R.C. and R.A. Nicoll, *Long-term potentiation--a decade of progress?* Science, 1999. **285**(5435): p. 1870-4.
31. Mayer, M.L. and G.L. Westbrook, *Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones*. J Physiol, 1987. **394**: p. 501-27.
32. Paoletti, P., *Molecular basis of NMDA receptor functional diversity*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(8): p. 1351-65.
33. Paoletti, P., C. Bellone, and Q. Zhou, *NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(6): p. 383-400.
34. Sobolevsky, A.I., M.P. Rosconi, and E. Gouaux, *X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor*. Nature, 2009. **462**(7274): p. 745-56.
35. Riou, M., et al., *An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35134.
36. McIlhinney, R.A., et al., *Assembly of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 4): p. 865-8.
37. Kohr, G., *NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 439-46.
38. Chatterton, J.E., et al., *Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits*. Nature, 2002. **415**(6873): p. 793-8.
39. Valdivielso, J.M., et al., *Glutamate-Gated NMDA Receptors: Insights into the Function and Signaling in the Kidney*. Biomolecules, 2020. **10**(7).
40. Kalderon, D., et al., *A short amino acid sequence able to specify nuclear location*. Cell, 1984. **39**(3 Pt 2): p. 499-509.
41. Holmes, K.D., et al., *The C-terminal C1 cassette of the N-methyl-D-aspartate receptor 1 subunit contains a bi-partite nuclear localization sequence*. J Neurochem, 2002. **81**(6): p. 1152-65.
42. Ciabarra, A.M., et al., *Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family*. J Neurosci, 1995. **15**(10): p. 6498-508.
43. Nishi, M., et al., *Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner*. J Neurosci, 2001. **21**(23): p. RC185.
44. Perez-Otano, I., R.S. Larsen, and J.F. Wesseling, *Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS*. Nat Rev Neurosci, 2016. **17**(10): p. 623-35.
45. Smothers, C.T. and J.J. Woodward, *Pharmacological characterization of glycine-activated currents in HEK 293 cells expressing N-methyl-D-aspartate NR1 and NR3 subunits*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **322**(2): p. 739-48.
46. Matsuda, K., et al., *Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors*. J Neurosci, 2003. **23**(31): p. 10064-73.
47. Zhu, Z., et al., *Negative allosteric modulation of GluN1/GluN3 NMDA receptors*. Neuropharmacology, 2020. **176**: p. 108117.
48. Endo, M., *Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(5): p. 519-24.
49. Fewtrell, C., *Ca<sup>2+</sup> oscillations in non-excitable cells*. Annu Rev Physiol, 1993. **55**: p. 427-54.

50. Contreras, L., et al., *Mitochondria: the calcium connection*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 607-18.
51. Pinton, P., T. Pozzan, and R. Rizzuto, *The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum*. EMBO J, 1998. **17**(18): p. 5298-308.
52. Gerasimenko, J.V., et al., *Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes*. Curr Biol, 1998. **8**(24): p. 1335-8.
53. Rodriguez, A., et al., *Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 93-104.
54. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
55. Taylor, C.W., P.C. da Fonseca, and E.P. Morris, *IP(3) receptors: the search for structure*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(4): p. 210-9.
56. Giannini, G., et al., *The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues*. J Cell Biol, 1995. **128**(5): p. 893-904.
57. Mellstrom, B., et al., *Ca<sup>2+</sup>-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 421-49.
58. Machaca, K., *Ca(2+) signaling, genes and the cell cycle*. Cell Calcium, 2011. **49**(5): p. 323-30.
59. Holder, N., *An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint*. J Embryol Exp Morphol, 1977. **39**: p. 115-27.
60. Archer, C.W., G.P. Dowthwaite, and P. Francis-West, *Development of synovial joints*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003. **69**(2): p. 144-55.
61. Ross, M.H.P., W., *Histology: A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*. Vol. 6th. 2010: Lippincott Williams & Wilkins, 6th ed.
62. Heinegard, D. and A. Oldberg, *Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules*. FASEB J, 1989. **3**(9): p. 2042-51.
63. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. J Morphol, 1951. **88**(1): p. 49-92.
64. Ahrens, P.B., M. Solursh, and R.S. Reiter, *Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture*. Dev Biol, 1977. **60**(1): p. 69-82.
65. Hadhazy, C., M.B. Lazlo, and K.S. Kostenszky, *Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds*. Acta Morphol Acad Sci Hung, 1982. **30**(1): p. 65-78.
66. Yosimichi, G., et al., *Roles of PKC, PI3K and JNK in multiple transduction of CCN2/CTGF signals in chondrocytes*. Bone, 2006. **38**(6): p. 853-63.
67. Grigoriadis, A.E., J.N. Heersche, and J.E. Aubin, *Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone*. J Cell Biol, 1988. **106**(6): p. 2139-51.
68. Young, H.E., et al., *Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs*. Dev Dyn, 1995. **202**(2): p. 137-44.
69. Shea, C.M., et al., *BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis*. J Cell Biochem, 2003. **90**(6): p. 1112-27.
70. Matta, C., et al., *Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells*. Cell Calcium, 2008. **44**(3): p. 310-23.
71. Li, Y., et al., *Hyaluronan in limb morphogenesis*. Dev Biol, 2007. **305**(2): p. 411-20.
72. Zakany, R., et al., *Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways*. Exp Cell Res, 2005. **305**(1): p. 190-9.
73. Daumer, K.M., A.C. Tufan, and R.S. Tuan, *Long-term in vitro analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling*. J Cell Biochem, 2004. **93**(3): p. 526-41.
74. Modis, L., et al., *Proteoglycan biosynthesis is stimulated by D-penicillamine in chondrifying high density cell cultures*. Exp Pathol, 1988. **35**(3): p. 159-76.

75. DeLise, A.M., L. Fischer, and R.S. Tuan, *Cellular interactions and signaling in cartilage development*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(5): p. 309-34.
76. Delise, A.M. and R.S. Tuan, *Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro*. Dev Dyn, 2002. **225**(2): p. 195-204.
77. Kelley, R.O. and J.F. Fallon, *Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud*. J Embryol Exp Morphol, 1978. **46**: p. 99-110.
78. Tavella, S., et al., *Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation*. J Cell Sci, 1997. **110 ( Pt 18)**: p. 2261-70.
79. Dessau, W., et al., *Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis*. J Embryol Exp Morphol, 1980. **57**: p. 51-60.
80. Ichinose, S., et al., *Comparative sequential morphological analyses during in vitro chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels*. Med Mol Morphol, 2013. **46**(1): p. 24-33.
81. Kulyk, W.M., et al., *Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta*. Dev Biol, 1989. **135**(2): p. 424-30.
82. Carballo, C.B., et al., *Basic Science of Articular Cartilage*. Clin Sports Med, 2017. **36**(3): p. 413-425.
83. Kawakami, Y., J. Rodriguez-Leon, and J.C. Izpisua Belmonte, *The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 723-9.
84. Zehentner, B.K., C. Dony, and H. Burtscher, *The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(10): p. 1734-41.
85. de Crombrughe, B., et al., *Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation*. Matrix Biol, 2000. **19**(5): p. 389-94.
86. Lefebvre, V., R.R. Behringer, and B. de Crombrughe, *L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9 Suppl A**: p. S69-75.
87. Quintana, L., N.I. zur Nieden, and C.E. Semino, *Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(1): p. 29-41.
88. Cancedda, R., et al., *Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis*. Int J Dev Biol, 2000. **44**(6): p. 707-14.
89. Lee, Y.S. and C.M. Chuong, *Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis*. J Cell Physiol, 1997. **170**(2): p. 153-65.
90. Piera-Velazquez, S., et al., *Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB*. Exp Cell Res, 2007. **313**(6): p. 1069-79.
91. Zakany, R., et al., *Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during in vitro chondrogenesis*. Exp Cell Res, 2002. **275**(1): p. 1-8.
92. Zakany, R., et al., *Okadaic acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A enhances chondrogenesis in chicken limb bud micromass cell cultures*. Anat Embryol (Berl), 2001. **203**(1): p. 23-34.
93. Crabtree, G.R., *Calcium, calcineurin, and the control of transcription*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2313-6.
94. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. Biochem J, 1998. **332 ( Pt 2)**: p. 281-92.
95. Choi, B., et al., *Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(3): p. 1034-40.
96. Oancea, E. and T. Meyer, *Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals*. Cell, 1998. **95**(3): p. 307-18.
97. Matta, C., et al., *PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures*. Biochimie, 2011. **93**(2): p. 149-59.
98. Chang, S.H., et al., *Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 19213-9.

99. Apati, A., T. Berecz, and B. Sarkadi, *Calcium signaling in human pluripotent stem cells*. Cell Calcium, 2016. **59**(2-3): p. 117-23.
100. Shimazaki, A., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human articular chondrocytes*. Biorheology, 2006. **43**(3,4): p. 223-33.
101. Varga, Z., 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**(11): p. e27957.
102. Fodor, J., et al., *Store-operated calcium entry and calcium influx via voltage-operated calcium channels regulate intracellular calcium oscillations in chondrogenic cells*. Cell Calcium, 2013. **54**(1): p. 1-16.
103. Mobasher, A., et al., *The chondrocyte channelome: A narrative review*. Joint Bone Spine, 2019. **86**(1): p. 29-35.
104. Fitzpatrick, T.B. and A.S. Breathnach, *[the Epidermal Melanin Unit System]*. Dermatol Wochenschr, 1963. **147**: p. 481-9.
105. Miyamura, Y., et al., *Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation*. Pigment Cell Res, 2007. **20**(1): p. 2-13.
106. Costin, G.E. and V.J. Hearing, *Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 976-94.
107. Ito, S. and K. Wakamatsu, *Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(3): p. 582-92.
108. Lin, J.Y. and D.E. Fisher, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 843-50.
109. Simon, J.D., et al., *Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function*. Pigment Cell Melanoma Res, 2009. **22**(5): p. 563-79.
110. Brenner, M. and V.J. Hearing, *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(3): p. 539-49.
111. Kárpáti S., K.L.R.É., *Bőrgyógyászat és venerológia, 2nd ed*. 2019: Medicina Könyvkiadó
112. Elder, D.E., *Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites*. Mod Pathol, 2006. **19 Suppl 2**: p. S4-20.
113. Damsky, W.E. and M. Bosenberg, *Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship*. Oncogene, 2017. **36**(42): p. 5771-5792.
114. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 51-65.
115. Nikolaou, V. and A.J. Stratigos, *Emerging trends in the epidemiology of melanoma*. Br J Dermatol, 2014. **170**(1): p. 11-9.
116. Toth, V., Somlai, B. and Karpati, S., *Epidemiological survey of patients with melanoma diagnosed at the Department of Dermatology, Dermatocology and Venerology, Semmelweis University*. Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle, 2015. **91**(1): p. 29-33.
117. Balatoni, T., et al., *[Epidemiology of malignant melanoma (Clinical experience at the National Institute of Oncology in Hungary)]*. Orv Hetil, 2011. **152**(25): p. 1000-6.
118. Watson, M., et al., *Melanoma burden and recent trends among non-Hispanic whites aged 15-49 years, United States*. Prev Med, 2016. **91**: p. 294-298.
119. MacKie, R.M., *Risk factors for the development of primary cutaneous malignant melanoma*. Dermatol Clin, 2002. **20**(4): p. 597-600.
120. Armstrong, B.K. and A. Kricger, *The epidemiology of UV induced skin cancer*. J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 8-18.
121. Fitzpatrick, T.B., *The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI*. Arch Dermatol, 1988. **124**(6): p. 869-71.
122. Maresca, V., E. Flori, and M. Picardo, *Skin phototype: a new perspective*. Pigment Cell Melanoma Res, 2015. **28**(4): p. 378-89.
123. Thompson, J.F., R.A. Scolyer, and R.F. Kefford, *Cutaneous melanoma*. Lancet, 2005. **365**(9460): p. 687-701.

124. Nelson, A.A. and H. Tsao, *Melanoma and genetics*. Clin Dermatol, 2009. **27**(1): p. 46-52.
125. Rouzaud, F., et al., *MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation*. Mutat Res, 2005. **571**(1-2): p. 133-52.
126. Bataille, V., *Genetics of familial and sporadic melanoma*. Clin Exp Dermatol, 2000. **25**(6): p. 464-70.
127. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 180-6.
128. Da Forno, P.D. and G.S. Saldanha, *Molecular aspects of melanoma*. Clin Lab Med, 2011. **31**(2): p. 331-43.
129. Doma, V. and E. Gulya, *[Genetic diversity and immunological characteristics of malignant melanoma: the therapeutic spectrum]*. Orv Hetil, 2015. **156**(15): p. 583-91.
130. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 19-20.
131. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
132. Guerry, D.t., et al., *Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent*. J Invest Dermatol, 1993. **100**(3): p. 342S-345S.
133. American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the, A.o.M., et al., *Early detection of melanoma: reviewing the ABCDEs*. J Am Acad Dermatol, 2015. **72**(4): p. 717-23.
134. Friedman, R.J., D.S. Rigel, and A.W. Kopf, *Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin*. CA Cancer J Clin, 1985. **35**(3): p. 130-51.
135. Elder, D.E., *Melanoma progression*. Pathology, 2016. **48**(2): p. 147-54.
136. Song, Z., et al., *Blocking glutamate-mediated signalling inhibits human melanoma growth and migration*. Exp Dermatol, 2012. **21**(12): p. 926-31.
137. Wei, X., et al., *Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma*. Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 442-6.
138. D'Mello S, A., et al., *Evidence That GRIN2A Mutations in Melanoma Correlate with Decreased Survival*. Front Oncol, 2014. **3**: p. 333.
139. Prickett, T.D., et al., *Somatic mutation of GRIN2A in malignant melanoma results in loss of tumor suppressor activity via aberrant NMDAR complex formation*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(9): p. 2390-2398.
140. Hoogduijn, M.J., et al., *Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF*. Pigment Cell Res, 2006. **19**(1): p. 58-67.
141. Ni, J., et al., *The effect of the NMDA receptor-dependent signaling pathway on cell morphology and melanosome transfer in melanocytes*. J Dermatol Sci, 2016. **84**(3): p. 296-304.
142. Devi, S., et al., *Calcium homeostasis in human melanocytes: role of transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) and its regulation by ultraviolet light*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(3): p. C679-87.
143. Belote, R.L. and S.M. Simon, *Ca<sup>2+</sup> transients in melanocyte dendrites and dendritic spine-like structures evoked by cell-to-cell signaling*. J Cell Biol, 2020. **219**(1).
144. Genever, P.G., et al., *Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(3): p. 337-42.
145. Maiques, O., et al., *Immunohistochemical analysis of T-type calcium channels in acquired melanocytic naevi and melanoma*. Br J Dermatol, 2017. **176**(5): p. 1247-1258.
146. Barcelo, C., et al., *T-Type Calcium Channels: A Potential Novel Target in Melanoma*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
147. Macia, A., et al., *Calcium channel expression and applicability as targeted therapies in melanoma*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 587135.
148. Stanis, H., et al., *The role of Orai-STIM calcium channels in melanocytes and melanoma*. J Physiol, 2016. **594**(11): p. 2825-35.

149. Umemura, M., et al., *Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89292.
150. Sun, J., et al., *STIM1- and Orai1-mediated Ca(2+) oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion*. J Cell Biol, 2014. **207**(4): p. 535-48.
151. Fodor, J., et al., *Ionotropic purinergic receptor P2X4 is involved in the regulation of chondrogenesis in chicken micromass cell cultures*. Cell Calcium, 2009. **45**(5): p. 421-30.
152. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
153. Salter, D.M., M.O. Wright, and S.J. Millward-Sadler, *NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction*. Biorheology, 2004. **41**(3-4): p. 273-81.
154. Szczesniak, A.M., et al., *Mechanical loading modulates glutamate receptor subunit expression in bone*. Bone, 2005. **37**(1): p. 63-73.
155. Li, J.L., et al., *NMDA enhances stretching-induced differentiation of osteoblasts through the ERK1/2 signaling pathway*. Bone, 2008. **43**(3): p. 469-75.
156. Cavara, N.A. and M. Hollmann, *Shuffling the deck anew: how NR3 tweaks NMDA receptor function*. Mol Neurobiol, 2008. **38**(1): p. 16-26.
157. Wang, L., et al., *Release of endogenous glutamate by AMPA receptors expressed in cultured rat costal chondrocytes*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(6): p. 990-3.
158. Divino Filho, J.C., et al., *Glutamate concentration in plasma, erythrocyte and muscle in relation to plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1 and insulin in patients on haemodialysis*. J Endocrinol, 1998. **156**(3): p. 519-27.
159. Fujita, H., et al., *Possible modulation of process extension by N-methyl-D-aspartate receptor expressed in osteocytic MLO-Y4 cells*. J Pharmacol Sci, 2012. **119**(1): p. 112-6.
160. Gu, Y. and S.J. Publicover, *Expression of functional metabotropic glutamate receptors in primary cultured rat osteoblasts. Cross-talk with N-methyl-D-aspartate receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34252-9.
161. Itzstein, C., et al., *Molecular identification of NMDA glutamate receptors expressed in bone cells*. J Cell Biochem, 2001. **82**(1): p. 134-44.
162. Li, X., et al., *NMDA receptor activation inhibits the antifibrotic effect of BM-MSCs on bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018. **315**(3): p. L404-L421.
163. Choe, K.Y., E. Trudel, and C.W. Bourque, *Effects of Salt Loading on the Regulation of Rat Hypothalamic Magnocellular Neurosecretory Cells by Ionotropic GABA and Glycine Receptors*. J Neuroendocrinol, 2016. **28**(4).
164. Barrett-Jolley, R., et al., *The emerging chondrocyte channelome*. Front Physiol, 2010. **1**: p. 135.
165. Blackiston, D.J., K.A. McLaughlin, and M. Levin, *Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle*. Cell Cycle, 2009. **8**(21): p. 3527-36.
166. Wohlrab, D., et al., *Is the proliferation of human chondrocytes regulated by ionic channels?* J Orthop Sci, 2001. **6**(2): p. 155-9.
167. Turski, M.P., et al., *Kynurenic Acid in the digestive system-new facts, new challenges*. Int J Tryptophan Res, 2013. **6**: p. 47-55.
168. Zakany, R., et al., *Oxidative stress-induced poly(ADP-ribosyl)ation in chick limb bud-derived chondrocytes*. Int J Mol Med, 2007. **19**(4): p. 597-605.
169. Sasaki, Y.F., et al., *Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons*. J Neurophysiol, 2002. **87**(4): p. 2052-63.
170. Zhou, Y., et al., *Spontaneous calcium signaling of cartilage cells: from spatiotemporal features to biophysical modeling*. FASEB J, 2019. **33**(4): p. 4675-4687.
171. Placantonakis, D. and J. Welsh, *Two distinct oscillatory states determined by the NMDA receptor in rat inferior olive*. J Physiol, 2001. **534**(Pt 1): p. 123-40.
172. Huang, L., et al., *In vitro dose-dependent inhibition of the intracellular spontaneous calcium oscillations in developing hippocampal neurons by ketamine*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59804.

173. Dravid, S.M. and T.F. Murray, *Spontaneous synchronized calcium oscillations in neocortical neurons in the presence of physiological [Mg(2+)]: involvement of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors*. Brain Res, 2004. **1006**(1): p. 8-17.
174. Cokol, M., R. Nair, and B. Rost, *Finding nuclear localization signals*. EMBO Rep, 2000. **1**(5): p. 411-5.
175. Somogyi, C.S., et al., *Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) Ion Channels in Chondrogenic Cells*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 18412-38.
176. Erb, L., et al., *P2 receptors: intracellular signaling*. Pflugers Arch, 2006. **452**(5): p. 552-62.
177. Feske, S., E.Y. Skolnik, and M. Prakriya, *Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 532-47.
178. Argentaro, A., et al., *A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33839-47.
179. Resende, R.R., et al., *Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 14.
180. Bootman, M.D., et al., *An update on nuclear calcium signalling*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 14): p. 2337-50.
181. Alonso, M.T. and J. Garcia-Sancho, *Nuclear Ca(2+) signalling*. Cell Calcium, 2011. **49**(5): p. 280-9.
182. Shirakawa, H. and S. Miyazaki, *Spatiotemporal analysis of calcium dynamics in the nucleus of hamster oocytes*. J Physiol, 1996. **494** ( Pt 1): p. 29-40.
183. Gerasimenko, O.V., et al., *ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca2+ from the nuclear envelope*. Cell, 1995. **80**(3): p. 439-44.
184. Adebajo, O.A., et al., *Novel biochemical and functional insights into nuclear Ca(2+) transport through IP(3)Rs and RyRs in osteoblasts*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(5): p. F784-91.
185. Luo, D., et al., *Nuclear Ca2+ sparks and waves mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neonatal rat cardiomyocytes*. Cell Calcium, 2008. **43**(2): p. 165-74.
186. Marius, P., et al., *Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum*. Cell Calcium, 2006. **39**(1): p. 65-73.
187. Echevarria, W., et al., *Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 440-6.
188. Alcazar-Roman, A.R. and S.R. Wenthe, *Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression*. Chromosoma, 2008. **117**(1): p. 1-13.
189. Huh, Y.H., et al., *Presence of a putative vesicular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive nucleoplasmic Ca2+ store*. Biochemistry, 2006. **45**(5): p. 1362-73.
190. Leite, M.F., et al., *Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2975-80.
191. Dolmetsch, R.E., et al., *Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway*. Science, 2001. **294**(5541): p. 333-9.
192. Carrion, A.M., et al., *DREAM is a Ca2+-regulated transcriptional repressor*. Nature, 1999. **398**(6722): p. 80-4.
193. Dewenter, M., et al., *Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes*. Circ Res, 2017. **121**(8): p. 1000-1020.
194. Campden, R., N. Audet, and T.E. Hebert, *Nuclear G protein signaling: new tricks for old dogs*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015. **65**(2): p. 110-22.
195. Jong, Y.J., et al., *Functional metabotropic glutamate receptors on nuclei from brain and primary cultured striatal neurons. Role of transporters in delivering ligand*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30469-80.
196. Kumar, V., Y.J. Jong, and K.L. O'Malley, *Activated nuclear metabotropic glutamate receptor mGlu5 couples to nuclear Gq/11 proteins to generate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca2+ release*. J Biol Chem, 2008. **283**(20): p. 14072-83.

197. Bkaily, G., L. Avedanian, and D. Jacques, *Nuclear membrane receptors and channels as targets for drug development in cardiovascular diseases*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009. **87**(2): p. 108-19.
198. Matzke, A.J., T.M. Weiger, and M. Matzke, *Ion channels at the nucleus: electrophysiology meets the genome*. *Mol Plant*, 2010. **3**(4): p. 642-52.
199. Low, C.M. and K.S. Wee, *New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function*. *Mol Pharmacol*, 2010. **78**(1): p. 1-11.
200. Bading, H., *Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(9): p. 593-608.
201. Mak, D.O., et al., *Nuclear patch-clamp electrophysiology of Ca<sup>2+</sup> channels*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2013. **2013**(9): p. 885-91.
202. Ribeiro, M.P., J.B. Custodio, and A.E. Santos, *Ionotropic glutamate receptor antagonists and cancer therapy: time to think out of the box?* *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017. **79**(2): p. 219-225.

## 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/483/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hajdú Tibor  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10048328

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Matta, C., Juhász, T., Fodor, J., **Hajdú, T.**, Katona, É., Somogyi, C., Takács, R. Á., Vágó, J., Oláh, T., Bartók, Á., Varga, Z., Panyi, G., Csernoch, L., Zákány, R.: N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor expression and function is required for early chondrogenesis.  
*Cell Commun Signal.* 17 (1), 1-19, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-019-0487-3>  
IF: 4.344
2. **Hajdú, T.**, Juhász, T., Somogyi, C., Rácz, K., Zákány, R.: NR1 and NR3B Composed Intranuclear N-methyl-d-aspartate Receptor Complexes in Human Melanoma Cells.  
*Int. J. Mol. Sci.* 19 (7), 1-14, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19071929>  
IF: 4.183

### További közlemények

3. Szász, I., Koroknai, V., Patel, V., **Hajdú, T.**, Kiss, T., Ádány, R., Balázs, M.: Cell Proliferation Is Strongly Associated with the Treatment Conditions of an ER Stress Inducer New Anti-Melanoma Drug in Melanoma Cell Lines.  
*Biomedicines.* 9 (2), 1-19, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9020096>  
IF: 6.081 (2020)
4. Józsa, G., Fülöp, B. D., Kovács, L., Czibere, B., Szegeczki, V., Kiss, T., **Hajdú, T.**, Tamás, A., Helyes, Z., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Lack of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation.  
*J. Mol. Neurosci.* 71 (8), 1543-1555, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-019-01448-z>  
IF: 3.444 (2020)





5. **Hajdú, T.**, Kovács, P., Zsigrai, E., Takács, R. Á., Vágó, J., Cho, S., Sasi Szabó, L. A., Becsky, D., Keller-Pintér, A., Emri, G., Rácz, 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, 1-15, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.681603>  
IF: 6.244 (2020)
6. Matta, C., Lewis, R., Fellows, C. R., Diszházi, G., Almássy, J., Miosge, N., Dixon, J. E., Uribe, M. C., May, S., Póliska, S., Barrett, J. R., Fodor, J., Szentesi, P., **Hajdú, T.**, Keller-Pintér, A., Henslee, E., Labeed, F. H., Hughes, M. P., Mobasher, A.: Transcriptome-based screening of ion channels and transporters in a migratory chondroprogenitor cell line isolated from late-stage osteoarthritic cartilage.  
*J. Cell. Physiol.* 236 (11), 7421-7439, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.30413>  
IF: 6.384 (2020)
7. Szentlélek, E., Szegeczki, V., Karanyicz, E., **Hajdú, T.**, Tamás, A., Tóth, G., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures.  
*Int. J. Mol. Sci.* 20 (1), 1-22, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20010168>  
IF: 4.556
8. Katona, É., Juhász, T., Somogyi, C., **Hajdú, T.**, Szász, C., Rácz, K., Kókai, E., Gergely, P., Zákány, R.: PP2B and ERK1/2 regulate hyaluronan synthesis of HT168 and WM35 human melanoma cell lines.  
*Int. J. Oncol.* 48 (3), 983-997, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2015.3313>  
IF: 3.079
9. Somogyi, C., Matta, C., Földvári, Z., Juhász, T., Katona, É., Takács, R. Á., **Hajdú, T.**, Dobrosi, N., Gergely, P., Zákány, R.: Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) Ion Channels in Chondrogenic Cells.  
*Int. J. Mol. Sci.* 16 (8), 18412-18438, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160818412>  
IF: 3.257





10. Juhász, T., Matta, C., Katona, É., Somogyi, C., Takács, R. Á., **Hajdú, T.**, Helgadottir, S. L., Fodor, J., Csernoch, L., Tóth, G., Bakó, É., Reglődi, D., Tamás, A., Zákány, R.: Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Signalling Enhances Osteogenesis in UMR-106 Cell Line.  
*J. Mol. Neurosci.* 54 (3), 555-573, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-014-0389-1>  
IF: 2.343

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,915**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
8,527**

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

Debrecen, 2021.11.04.



## 11. Tárgyszavak

N-metil-D-aszpartát receptor, NMDAR, glutamát jelátvitel, glicin, kalcium,  $\text{Ca}^{2+}$ , sejtmag, in vitro, nem excitábilis, chondrogenesis, porcsejt, melanocyta, melanoma sejt, melanoma malignum cutis

## 12. Keywords

N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR, glutamate signalling, glycine, calcium, Ca<sup>2+</sup>, cell nucleus, in vitro, non-excitabile, chondrogenesis, chondrocyte, melanocyte, melanoma cell, cutaneous malignant melanoma

## 13. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zákány Rózának, a TDK-s korom óta nyújtott témavezetését és a munkám során biztosított segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá jelenlegi kollégáimnak, Dr. Matta Csabának, Dr. Juhász Tamásnak, Dr. Takács Rolandnak, Dr. Szegeczki Vincének, Szűcs Csillának, Katona Évának és Vágó Juditnak, illetve korábbi munkatársaimnak Dr. Engler Máténak, Dr. Dobrosi Nórának és Karanyicz Edinának, akikkel szuper csapatban, jó hangulatban tudtam együtt dolgozni. Hálával gondolok továbbá első TDK-s társszerzőmre, Dr. Radovitsné Dr. Kiscsatári Laurára is. Hálával tartozom laboratóriumunk asszisztensének, Bíróné Barna Krisztinának is, aki munkájával jelentősen hozzájárult a színvonalas eredmények létrejöttéhez.

Köszönöm az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének, Prof. Dr. Antal Miklósnak és Dr. Szűcs Péternek, hogy lehetővé tették számomra az intézetben való kutatómunkát.

Köszönöm az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkatársainak is az elmúlt évek eddigi közös munkáját.

Köszönöm a kollaborációs partnereinknek, akikkel kutatásaim során együtt dolgozhattam, hogy segítségükkel új módszerekről és szemléletekről szerezhettem tapasztalatokat.

Köszönöm a tudományos diákköri hallgatóimnak, Dr. Hamad Alyami-nak, Dr. Sinyoung Chonak, Dr. Kovács Patriknak és Dr. Zsigrai Emesének a fantasztikusan sikeres közös munkát és a konferencia élményeket.

Végezetül külön köszönöm családomnak, Szüleimnek és Húgomnak, az örök támogatást, valamint Menyasszonyomnak, Dr. Zsigrai Emesének, a szeretetet, a türelmet és a varázslatos inspirációt, ami az út során nélkülözhetetlen volt.

A disszertáció kísérletes eredményeinek elkészültét az alábbi pályázatokból nyert források biztosították: TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, GOP-1.1.1-11-2012-0197, EFOP-3.6.2-16-2017-00006, ED 18-1-2019-0028.

## **14. Függelék**

Az értekezést megalapozó közlemények különnyomatai.