

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Chondrogenikus modellek összehasonlító elemzése és a
kalciumhomeosztázis vizsgálata differenciálódó
porcsejtekben**

Takács Roland Ádám

Témavezető: Dr. Zákány Róza



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2020.

Chondrogenikus modellek összehasonlító elemzése és a kalciumhomeosztázis vizsgálata differenciálódó porcsejtekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Takács Roland Ádám**

okleveles molekuláris biológus (biokémikus)

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja keretében

Témavezető: Dr. Zákány Róza

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Prof. Em. Dr. Madarász Emília, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2020. július 31. 11 óra, Debreceni
Egyetem ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet

Az értekezés bírálói:

Dr. Szentandrásyné Gönczi Mónika, PhD
Dr. Rauch Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Prof. Em. Dr. Madarász Emília, az MTA doktora
Dr. Szentandrásyné Gönczi Mónika, PhD
Dr. Rauch Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2020. július 31. 13 óra, Debreceni
Egyetem ÁOK, In Vitro Diagnosztikai
Tömb előadó

BEVEZETÉS

A musculoskeletális rendellenességek a betegségek egy olyan csoportját képezik, amik a népesség jelentős részét érintik életük különböző szakaszaiban. Tipikus esetben ezek a rendellenességek olyan elváltozásokkal járnak, amik jelentős mértékben rontják az egyén életminőségét, különösképp osteoarthritis és discopathias esetekben. Az utóbbit – nem véletlenül – a központi idegrendszeri megbetegedések között is számon tartják. A fenti musculoskeletális betegségek súlyos formái erősen kor- és testsúlyfüggőek, ami a nyugati társadalmak összetételének tendenciáit figyelembe véve még inkább nyugtalanító problémát vázol fel a jövőre nézve. Az ENSZ Egészségügyi Világszervezete (WHO) felismerte az ebben rejlő veszélyt és a 2000 és 2010 közötti időszakot a Csont és Ízület Évtizedének nyilvánította, hogy ezáltal világszerte csökkentse a musculoskeletális betegségek által az egyénekre és társadalmakra rótt terheket. A szervezet mandátumát – a feladatának fontosságát és a krízis hosszútávú természetét szem előtt tartva – 2010-ben meghosszabbították. E nemes célok eléréséhez alapvető fontosságú, hogy élvonalbeli kutatások történjenek, melyek eredményei segítenek megérteni az érintett szövetek alapvető biológiai folyamatait. Ilyen például a fejlődő vagy az érett ízületi porc különböző funkcióit működtető jelátviteli útvonalak és genetikai tényezők feltérképezése.

Kutatócsoportunk az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkacsoportjaként több évtizednyi tapasztalattal rendelkezik az *in vitro* porcfejlődés kutatása terén. Ahogyan az ebben a munkában is visszatükröződik, komoly erőfeszítéseket teszünk azért, hogy a kísérleteinket különböző chondrogenikus sejtmodellekkel bővítsük. Továbbá azon is dolgozunk, hogy kondicionális géniütött egerek bevonásával *in vivo* kísérletekben tanulmányozhassuk bizonyos gének funkcióját. Habár állnak rendelkezésre tanulmányok a C3H10T1/2 sejtvonalon, valamint a primer végtagtelep-eredetű high density (HD) kultúrák porcdifferenciációjának analízisét illetően, arra a következtetésre jutottunk, hogy egy sztenderdizált körülmények közt elvégzett, több modellt magába foglaló összehasonlító elemzés, ami számos, különböző mesenchymális differenciálódási útvonalakat

fémjelző gén mRNS expressziós profiljára kiterjed, hiánypótló jelleget töltene be. Egy ilyen tanulmány egyúttal lehetővé teszi egérből és csirkéből előállított, valamint primer és sejtvonal alapú chondrogenikus modellek közvetlen összevetését.

Az *in vitro* porcdifferenciációs modellek napjainkig egyik legelterjedtebb képviselője a Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumú (4.5 napos) csirkeembriók végtagtelepeiből kinyert chondroprogenitor mesenchymális sejtekből létrehozott HD sejttenyészet. Ennek legfontosabb előnye, hogy a megfelelő kísérleti körülmények és nagy sejtsűrűség biztosítása mellett a porcdifferenciáció spontán végbemegy; a 6. tenyésztési napra már jelentős mennyiségű, nodulusokba rendeződött hyalinporc képződik. A modell létjogosultságát és sok szempontból ideális mivoltát az alább bemutatandó eredmények is alátámasztják, ebből is adódóan a munka másik részében bemutatásra kerülő kísérleteinkben e kultúrákat vizsgáltuk.

A kalciumion univerzális másodlagos jelátvivő a sejtés élőlények számos élettani folyamatában. Az egyik legkorábban leírt ilyen funkciója a Ca^{2+} -nak a vázizom elektromechanikai összekapcsolása, azóta viszont igen nagyszámú egyéb funkcióját is felfedték; ezek a teljesség igénye nélkül: a sejtciklus szabályozása, differenciáció, génexpresszió, apoptózis és enzimműködés kontrollálása, valamint az exocytosisnak, neurotranszmitterek felszabadulásának és a sejtek hormonális hatásokra történő válaszainak irányítása. Az ehhez szükséges kalciumjelek térben és időben is igen jól szabályozottak, hiszen időtartamukat és sejten belüli lokalizációjukat tekintve is igen változatos sejtbiológiai jelenségekről van szó. Az már bizonyítást nyert, hogy a kalciumion a porcfejlődésben is kulcsfontossággal bír másodlagos messengerként, viszont a differenciálódó porcsejtek Ca^{2+} -homeosztázisához kapcsolódóan még számos molekula és folyamat nem pontosan ismert.

Ebből kifolyóan a bemutatásra kerülő munka másik részében a porcfejlődésben meghatározó Ca^{2+} jelátviteli folyamatok további tanulmányozásával foglalkoztunk a csirke primer kultúrákban. Laboratóriumunk jelentősen gazdagította a porcfejlődéssel, különösképp az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ események leírásával, valamint az ezekkel összefüggő szignalizációs molekulákkal és útvonalakkal kapcsolatos szakirodalmat az

elmúlt években. Alább a raktárvezérelt Ca^{2+} belépésben (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) szerepet játszó komponensek és a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák (voltage-dependent Ca^{2+} channels, VDCC) molekuláris jelenlétét, a nagyfrekvenciájú ismétlődő Ca^{2+} tranziensek kiváltásában és fenntartásában, és ezáltal a porcfejlődésben betöltött szerepét alátámasztó adataink is bemutatásra kerülnek. Véleményünk szerint mindez kiemelkedő fontossággal bír, hiszen a porcszövet gyógyítását célzó sejterápiás megközelítések minden bizonnyal a mesenchymális sejtek porcsejtté való differenciálódásában szereplő jelátviteli események részletes ismeretén kell majd, hogy alapuljanak. Ezekben – a munkacsoportunk hozzájárulásának is köszönhetően – a Ca^{2+} szerepe már ismert prominens másodlagos hírvivőként.

Ezekből fakadóan jelen munka kísérletet tesz egy nehezen definiálható tudományterületen gyűjtött eredményeink szintézisére. Az embriológiából, a sejtbiokémiából és a sejtélettanból is ihletet merítve küzdünk az előrehaladásért a chondropathias megbetegedések ideális gyógymódjához, azaz a porckutatás Szent Gráljához vezető úton. Következésképp ez a munka magában foglalja több jelentős chondrogenikus modell összehasonlító elemzését, valamint a chondrogenesis és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásainak összefüggésében megismert új tényezőket és eredményeinket.

CÉLKITŰZÉSEK

A fent vázoltaknak megfelelően a célunk az volt, hogy az alábbi kérdésekre válaszokat kapjunk:

1. Miként alakulnak a gondosan kiválogatott markergének mRNS expressziós szintjei egy prolongált tenyésztési időszak során kontroll és BMP-2-t overexpresszáló C3H10T1/2 (a továbbiakban c- valamint b-C3H10T1/2), illetve egér és csirke embrionális végtagtelep-eredetű micromass kultúrákban?
2. Milyen képet mutatnak az osteo- és chondrogenikus irányba mutatott differenciációs potenciálok markergén mRNS szintek alapján? Vannak-e a kultúrákban sejtek, melyek adipogenikus differenciálódáson mennek keresztül?
3. A sejtek morfológiáját, chondrogenikus differenciációját, matrix-mineralizációját valamint lipidfelhalmozását kimutató szövettani festések vajon tárnak-e fel morfológiai különbségeket a vizsgált modellek kultúráiban? Amennyiben igen, mik ezek? Egybevágó-e az eredmények a markergének expressziójából levont következtetésekkel?
4. Vannak-e a HD kultúrákban pluripotens állapotukat megtartó sejtek? Ha vannak, eltér-e a pluripotencia markerek expressziója az egyes modellek között?
5. A vizsgált modellek közül melyik (melyek) a legalkalmasabb(ak) a porcejlődés kutatására (már amennyiben van egy kétségtelenül a többi felett álló)? Mik a főbb gyakorlati megfontolások?
6. Rendelkeznek-e a csirke HD kultúrák differenciálódó chondrocytái VDCC-kkel, illetve a SOCE folyamatához szükséges molekulákkal?
7. Milyen szerepe van a belső kalciumraktáraknak, valamint a Ca^{2+} -felszabadulás által aktivált Ca^{2+} -csatornáknak (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels, CRAC) és a VDCC-knek a nagyfrekvenciájú ismétlődő Ca^{2+} tranziensek kiváltásában és fenntartásában; ezáltal pedig olyan sejtfunkciók modulálásában, mint a differenciáció, metabolizmus és proliferáció?

8. Magas tér- és időbeli felbontás mellett milyen dinamikát mutatnak az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek lézeres konfokális pásztázó mikroszkópos nyomonkövetéssel, Fluo-4 fluoreszcens Ca^{2+} -kötő festékkel feltöltött porcosodó sejtekben. Változik-e az így megfigyelt dinamika az extracelluláris ionösszetétel megváltoztatásának vagy SOCE- és/vagy VDCC-gátlás hatására?
9. A raktárürítés hatására bekövetkező SOCE során sikerül-e megerősítenünk a SOCE-blokkoló kezelések következményeit egyedi sejteken történő Ca^{2+} mérésekkel?
10. A csirke chondrogenikus HD telepek olyan sejtes paramétereiben, mint a differenciáció, metabolikus aktivitás és a proliferáció milyen változásokat lehet megfigyelni a CRAC aktivációban kulcsfontosságú septinek átrendeződését gátló kezelések hatására?
11. Végezetül célunk volt az is, hogy egy olyan finomított modellel szolgáljunk az *in vitro* porcosodó csirke HD kultúrák Ca^{2+} jelátvitelét illetően – a Ca^{2+} beáramlását és felszabadulását is ideértve –, ami a SOCE egy újonnan feltárt szabályozóját is magában foglalja.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

A C3H10T1/2 egy egér embryonalis mesenchymális őssejt-vonal, amit az ATCC-től (American Type Culture Collection) szereztünk be. Továbbá – G. Gross nagyvonalú adományaként – rendelkezésünkre áll ennek a sejtvonalnak egy módosított változata is (b-C3H10T1/2), amit stabilan transzfektáltak a pMBC-2T-fl nevű, a humán BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) cDNS-ét tartalmazó eukaryota expressziós vektorral. A fenti sejtek tenyésztése magas cukortartalmú DMEM médiumban történt. A b-C3H10T1/2 sejtek médiuma továbbá $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromycint is tartalmazott a vektor expressziójának stabilitását biztosítandó. A sejtkultúrákat párásított CO_2 inkubátorban tenyésztettük 37°C -on; passzálásukat 80%-os konfluenciánál végeztük. HD kultúrák készítésekor a sejtsűrűséget számlálás útján 1.5×10^7 sejt $\cdot\text{mL}^{-1}$ -re állítottuk be. A kicseppentés napját minden esetben a tenyésztés 0. napjának vettük. Csirke primer HD kultúrák létrehozásához Hamburger-Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumú (4.5 napos), Ross hibrid embriókat használtunk. A mellső és hátsó végtagbimbók distalis részét eltávolítottuk majd emésztéssel szuszpenziót képeztünk belőlük. A sejteket 10% FCS-sel kiegészített Ham's F12 médiumban vettük fel számlálást követően. Az egér végtagtelepekből izolált mesenchymális sejtkultúrákat a fenti protokoll módosított változatával hoztuk létre. Az NMRI laboratóriumi egereket egy éjszakán át pároztattuk, majd a hüvelyi plug észlelésének időpontját tekintettük a terhesség 0. napjának. A 11.5 napos vemhes egereket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának (DEMÁB) előírásainak betartása mellett, cervicalis dislocatioval áldoztuk fel (engedélyszám: 11/2010/DE MÁB). Végül az állatok uterusának eltávolítását követően az azokból kinyert E11.5 stádiumú embriókat használtuk fel a chondroprogenitor sejtsuszpenzió előállításához.

Gátlószeres kísérletek

A kalciumhomeosztázis megváltoztatásának hosszútávú hatásainak vizsgálatához csirke differenciálódó chondrocytáiban az alábbi

kezelőanyagokat adtuk hozzá a HD kultúrák médiumához. Az L-típusú VDCC-
ket gátló nifedipine az 1. tenyésztési naptól került a médiumba 10 μM -os
végkoncentrációban. A belső kalciumraktárak szerepét 10 μM SERCA
inhibitorral (cyclopiazonic acid – CPA) történő kezelést követően vizsgáltuk, a
SOCE-t pedig a nem-specifikus TRPC antagonistá YM-58483 és LaCl_3 (1 μM
valamint 500 μM) együttes alkalmazásával gátoltuk. A belső raktárak szerepét
célzó kezeléseket a 2. tenyésztési napon, 24 órán át applikáltuk. A septinek
átrendeződését 200 μM forchlorfenuron (FCF) hozzáadásával, 24 órás
kezeléssel blokkoltuk a tenyésztés 1. vagy 2. napján.

RT-PCR analízis

A tenyésztés meghatározott napjain 100 μL -es cseppekből létrehozott
HD kultúrák kerültek felhasználásra TRIZOLos teljes RNS izoláláshoz. A reverz
transzkripciót High Capacity RT kit segítségével végeztük 37°C-on, 2 órás
inkubációval. A kiválasztott cDNS szakaszokat specifikus primerpárok
segítségével amplifikáltuk, melyeket a GenBank-ben elérhető csirke és egér
nukleotid szekvenciák alapján terveztünk a Primer Premier 5.0 nevű
programmal. *In vitro* alkalmazásuk előtt a primerpárok specificitását *in silico*
teszteltük az NCBI Primer-BLAST nevű szolgáltatásával. Az egyes PCR
termékeket reprezentáló sávokat FluoChem E géldokumentációs rendszerrel
rögzítettük etidium-bromidot tartalmazó, 1.2%-os agaróz gélben történő
elektroforézist követően. A PCR termékek sávjainak optikai denzitását az
ImageJ nevű program 1.46-os verziójával határoztuk meg.

Kvantitatív PCR

Az RNS izoláláshoz és reverz transzkripcióhoz használt protokoll
gyakorlatilag megegyezett az előző pontban bemutatottakkal. A cél DNS
szakaszok amplifikációjára specifikus primerpárokat az NCBI Primer-BLAST
nevű szolgáltatásában úgy terveztük, hogy az amplimer mérete 100 és 200
bázispár közé essen, valamint – amennyiben az lehetséges – foglaljon magába
egy exon-exon junkciót. A chondrogenikus és pluripotencia markergének,
valamint a SOCE-ben résztvevő molekulák relatív génexpressziós szintjeit
QuantStudio 3 Real-Time PCR System segítségével határoztuk meg 96-well

lemezekben, 2 × GoTaq® qPCR Master Mix-et használva. Az adatok normalizálásához a következő három referencia gén stabilitását vizsgáltuk: *Ppia*, *Rplp0* és *Gapdh*. Az *Rplp0* adta a legkisebb SD értéket, így ez került kiválasztására a $\Delta\Delta Ct$ módszerrel történő génexpressziós szint meghatározásához.

SDS-PAGE, western blot és protein BLAST analízis

A vizsgált molekulák immunológiai detektálásához 50 µg fehérjét preparáltunk az egyes mintákból, amit utána 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gélen elektroforézissel (SDS-PAGE) szeparáltunk. Ezután a fehérjéket elektroforetikusán nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd blokkolás után a membránokat a primer antitestekkel másnapig inkubáltuk 4 °C-on. Végül mosást követően a membránokat HRP-konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk. A fokozott kemilumineszcencia reakcióval előhívott membránokat FluoChem E géldokumentációs rendszerrel rögzítettük. A sávok optikai denzitását az ImageJ 1.46-os verziójával határoztuk meg. A STIM1 elleni monoklonális antitestünk termeltetéséhez felhasznált szekvencia protein BLAST analízisét az NCBI BLAST tutorial szerint végeztük.

Szövetteni elemzés

A konvencionális haematoxylin és eosin festésekhez abszolút etanol és tömény formalin 4:1 arányú keverékében fixált HD kultúrákat használtunk. Rehidrációt követően ezeket Gill's haematoxylin No. 2-vel és eosin Y-nal festettük. A festett telepek digitális rögzítését egy Nikon Eclipse E800 típusú mikroszkópra szerelt Olympus DP72 kamerával végeztük a cellSense Entry 1.5 nevű program segítségével. A porcmatrix-termelésének kvalitatív elemzése metachromáziás, savas dimetil-metilénkék (DMMK) festéssel történt. Félkvantitatív megközelítésként a visszaoldott toluidinkék abszorbanciáját mértük 625 nm-es hullámhosszon microplate olvasó segítségével. A mátrix-mineralizációt Alizarin Red S festéssel követtük. Ezen vizsgálataink során a telepeket desztillált vízben oldott, 2%-os (w/v) Alizarin Red S-szel festettük 2 percre. A sejtek lipidfelhalmozódását Oil Red O festéssel vizsgáltuk. Fixálást követően az Oil Red O munkaoldatot szobahőn adtuk hozzá a mintákhoz 5

percre. A fölösleges festéket folyó csapvíz alatt távolítottuk el, majd 20 másodpercnyi haematoxylin festéssel jelöltük a sejtmagokat.

Proliferáció, kollagéntermelés és mitokondriális aktivitás meghatározása

A HD kultúrák sejtosztódási rátáját meghatározandó a sejtek tápközegéhez ^3H -timidint adtunk. Mosást és fixálást követően a 96-well lemezeket kiszárítottuk, közvetlenül a mérések előtt 50-50 μL szcintillációs koktélt adtunk az egyes well-ekhez, majd folyadék szcintillációs számlálóval meghatároztuk a sejtek által megkötött radioaktivitást.

A kollagéntermelést a fent leírtakhoz nagyon hasonló módon mértük. A 24 órás kezelési idő alatt, a tenyésztés 1. vagy 2. napján ^3H -prolint adtunk a kezelt vagy kontroll telepekhez.

A mitokondriális dehidrogenázok aktivitását MTT-assay-vel vizsgáltuk közvetlenül a kezeléseket követően. A sejteket 2 órán át 37°C -on inkubáltuk az MTT-t tartalmazó Ham's F12 médiumban. A tápközeg eltávolítását követően 100 μL of MTT-szolubilizáló oldatot adtunk hozzá, majd 10 percnyi rázatást követően 570 nm-en mértük az abszorbanciát.

Konfokális mikroszkópia

A line-scan analíziseket LSM 510 META Laser Scanning konfokális mikroszkóp segítségével készítettük. Az 1 illetve 2 napos csirke HD kultúrák sejtjeit Fluo-4-AM-rel töltöttük fel. A képképzést normál vagy kalciummentes Tyrode oldatban végeztük. A $63\times$ vízimmerziós objektívvel készült felvételeket rögtön az oldatok illetve kezelőanyagok hozzáadását követően elindítottuk. A felvételek analízisét az Élettani Intézetnél dolgozó kollaborációs partnereink által kifejlesztett automatikus eseménydetektáló program segítségével végeztük. X-Y vizsgálatokat szintén 1 illetve 2 napos, Fluo-4-töltött HD kultúrák sejtjein végeztük LIVE 5 Laser Scanning konfokális mikroszkóppal az EC Plan-Neofluar $20\times/0.50$ M27 objektívet használva, $2\times$ digitális nagyítással. X-Y sorozatfelvételek rögzítésére véletlenszerű látóterek kiválasztását követően került sor. A képképzést ebben az esetben is normál vagy kalciummentes Tyrode oldatban végeztük. A képrögzítés rátája 10 s^{-1} volt, az adatok elemzéséhez a Zeiss Enhanced Navigation programját használtuk.

Egysejtes fluoreszcens Ca^{2+} -koncentráció mérések

A méréseket a 2. tenyésztési napon kalciumérzékeny Fura-2-vel feltöltött sejteken végeztük, amiket inverz mikroszkópra helyezve vizsgáltunk 40× olajimmerziós objektív segítségével. A képalkotást normál vagy kalciummentes Tyrode oldatban végeztük. A SOCE gátlószereit és a raktárürítésért felelős CPA-t egyaránt kalciummentes Tyrode-ban hígítottuk végső koncentrációjukra. Az adatkinyeréshez használt szoftver automatikusan kivonta a jelekből a háttérfluoreszcenciát. A citoszólikus kalciumkoncentrációt a mért fluoreszcenciaintenzitások hányadosából határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

1. Különböző chondrogenikus HD kultúrák összehasonlító analízise

Primer és sejtvonala eredetű micromass kultúrák eltérő morfológiája

A C3H10T1/2 sejtekből készült kultúrákkal ellentétben mindkét primer végtagtelep-eredetű sejt kultúrában megfigyelhetők voltak nodulusok, míg a nodulusok közti területeket alacsony sejt sűrűség jellemezte. Az irodalmi adatokkal megegyezően, a DMMK festéseink eredményei azt mutatják, a chondroprogenitor sejtek a nagy sejtsűrűségű területeket preferálják a telepen belül, itt tudnak tovább differenciálódni chondroblastokká. A nodulusokkal ellentétben az internoduláris területben található ECM nem mutatott metachromáziás festődést. A sejtvonalaiból készült HD kultúrákban sem nodulusok, sem internoduláris területek nem voltak láthatók.

A vizsgált modellek különböző mértékben mutatnak a porcdifferenciációra utaló jeleket

Savas DMMK festéssel vizsgáltuk a különböző napokon learatott kultúrákban szintetizált metachromáziás ECM volumenét. Az egyes modellekben eltérő időbeli mintázatok mutatkoztak a porcmatrix felhalmozódását illetően; a végtagtelepekből létrehozott HD kultúrákban már a tenyésztés 3. napján kiterjedt metachromáziás területek voltak láthatók a nodulusokon belül. A 15 napos tenyésztési periódus végére mindkét primer HD kultúráról elmondható volt, hogy az ECM teljes mértékben metachromáziássá vált, a teljes térfogata megnövekedett, továbbá morfológiailag hipertrófiás chondrocyták is megjelentek. Ugyanezen tenyésztési periódus alatt a chondrogenikus markergének mRNS expressziós profiljait is nyomonkövettük. A *Sox9* esetében állandó expressziós szintet figyeltünk meg primer és b-C3H10T1/2 telepekben egyaránt. A *Col2a1* gén esetében hasonló tapasztalatunk volt, de ez esetben az összes vizsgált micromass kultúrában. Az *Acan* mRNS teljesen hiányzott c-C3H10T1/2 telepekben. A *Hapln1* jelentős mértékben expresszálódik mind primer, mind BMP-2-t túltermelő kultúrákban anélkül, hogy a c-C3H10T1/2 telepeinél hasonló jelentkezne. A *Snorc* mRNS

szintjének határozott növekedése volt megfigyelhető a 3. tenyésztési napot követően az egér differenciálódó kolóniákban (primer és BMP-2-overexpresszáló sejtvonala). A *Prg4* mRNS expressziós mintázatából az látszik, hogy a erőteljesebb kifejeződés a 6. tenyésztési nap után jelenik meg az egér végtagtelep micromass kultúrákban. A primer kultúrákban egyenletes vagy kissé növekvő módon fejeződik ki a *Col10a1* mRNS, míg a sejtvonalból készült telepeknél alacsony expressziós szint és nehezen értelmezhető időbeli mintázat volt megfigyelhető.

Csontdifferenciáció értékelése

A kalcifikált mátrixfelhalmozódását Alizarin Red S festéssel próbáltuk megbecsülni. A c-C3H10T1/2 kultúrák nem mutattak kalcifikációra utaló jeleket, ugyanezen sejtvonálnak a BMP-2-t túltermelő változata azonban erős pozitívást mutatott a tenyésztés 6. napját követően. Másrészt viszont a primer micromass kultúrák számottevő kalcifikációt csak az elporcosodó nodulusaikon belül mutattak a tenyésztés 10. napját (csirkében 6.) követően. Az osteogénikus differenciációt jelző gének RT-PCR analízise során a *Runx2* stabil expressziót mutatott az összes differenciálódó HD kultúrában, míg c-C3H10T1/2 telepeken progresszív csökkenést figyeltünk meg. Az *Osx* expressziója szabálytalan és relatíve gyenge jelek formájában jelent meg a c-C3H10T1/2 kultúrákban, de a primer egér és b-C3H10T1/2 telepeken már a 3. naptól erős sávokat mutat. A *Col1a1* mRNS expressziója állandó és jelentős mértékű volt mindkét primer illetve a b-C3H10T1/2 tenyészetekben egyaránt. Az *Oc* és *Op* jelű, késői osteogénikus markerek esetében rendezetlen mintázatot és gyenge mRNS expressziót tapasztaltunk c-C3H10T1/2 micromass telepeken. Ugyanezen modellben az *Ap* expresszióját jelző sávok egyáltalán nem látszóttak, míg a differenciálódó egér modellekben erős emelkedést mutattak.

Adipogénikus differenciáció

Egyéb differenciálódási irányok is figyelmet érdemelnek amikor mesenchymális eredetű sejteket vizsgáltuk. Ezek közül az adipogenezisnek tulajdonítható kiemelt jelentőség. A lipidcseppek felhalmozódásának

vizsgálatára Oil Red O festést alkalmaztunk, míg a sejtmagokat haematoxylinnal jelöltük. A végtagtelepekből származó kultúrákban még a tenyésztési idő végén sem jelentek meg nagy lipidcseppek, csak olyanok, amik a chondrocyták finomszerkezetével összeegyeztethetők. Ellenben a C3H10T1/2 sejtvonalon alapuló modellek sejtjei számos, jelentős méretű Oil Red O-val jelölődő cseppet tartalmaztak, főként a tenyésztés későbbi fázisában. Még a c-C3H10T1/2 HD kultúrák is számos adipocytá-szerű sejtet tartalmaztak, ami egy elviekben nem differenciálódó modelltől váratlan eredmény. Az adipogénikus markergéneket célzó RT-PCR-os elemzés alapján az *Fabp4* mRNS-ét az összes vizsgált HD kultúrában ki tudtuk mutatni, kifejezett emelkedést pedig a b-C3H10T1/2 és végtagtelep-eredetű micromass telepekben láttunk a tenyésztés későbbi fázisaiban. Mindemellett a *Ppar γ 2* az összes modellünkben elhanyagolható mértékben expresszáldott, kivéve a b-C3H10T1/2 sejtek HD telepeit a tenyésztés késői szakaszában. Ez a látszólag váratlan eredmény összhangban van azokkal a megállapításokkal, amik szerint a BMP-2 alacsony koncentrációkban stimulálhatja az adipogenezist.

Pluripotens sejtek a micromass telepekben

Modeljeinkben kulcsfontosságú ESC gének – *Nanog*, *Sox2* és *Oct4* (vagy annak madarakban található homológja: a *PouV*) – esetében is kiértékeljük azok mRNS expressziójának mintázatát. Az *Oct4*-et nem tudtuk egér HD kultúrák mintáiban detektálni. Ennek ellenére a *PouV* markánsan megjelent a csirke modellben a tenyésztés előrehaladtával párhuzamosan határozott expressziós csökkenést mutatva. A *Nanog* és a *Sox2* az összes egér modellben azonosítható volt. A *Sox2* mérsékelt mennyiségben az összes differenciálódó modellben jelen volt a tenyésztés elején, majd a differenciálódás előrehaladtával nagyrészt downregulálódott. Erős *Nanog*-upregulációt tapasztaltunk a differenciálódó egér modellekben, főként a BMP-2-t overexpresszió HD kultúrákban, miközben a csirke telepekben nem volt kimutatható expresszió. A fenti markerek egyikénél sem tudunk szabályszerű expressziós mintázatról beszámolni a c-C3H10T1/2 tenyészetek esetében.

2. Ca^{2+} jelátviteli folyamatok vizsgálata csirke HD kultúrákban

A differenciálódó csirke HD kultúrák sejtjeiben gyors spontán Ca^{2+} oszcillációk figyelhetők meg

Kombináltuk a LIVE konfokális mikroszkópiát a Fluo-4 festékkel történő fluoreszcens kalcium imaging technikával. Az így megfigyelt oszcillációk viszonylag széles spektrumot ölelnek fel amplitúdó és frekvencia tekintetében. A tenyésztés 1. napján a 240 vizsgált sejtből 45, míg a 2. napra már az összes vizsgált sejt 55%-a mutatott spontán kalcium oszcillációkat. Az oszcillációk frekvenciája esetében jelentős csökkenést észleltünk a tenyésztés 2. napján, ezzel párhuzamosan viszont az átlagos amplitúdójuk szignifikáns mértékben növekedett. Ugyanakkor a félértékisélesség nem mutatott szignifikáns eltérést a két vizsgált tenyésztési nap között.

A Ca^{2+} oszcillációk változásai

A következőkben X-Y felvételeket regisztráltunk, hogy vizsgálhassuk a spontán Ca^{2+} oszcillációk tulajdonságait a 2. tenyésztési napon. Minden egyes paramétert a megfelelő időpontban a kontroll adott értékéhez normalizáltunk. A nifedipine-nel történő kezelés nem okozott meggyőző eltérést az oszcilláló sejtek arányában vagy az egyes tranziensek amplitúdójában, az oszcillációk frekvenciájában azonban csökkenést váltott ki. A SOCE gátlószerei viszont minden vizsgált időpontban szignifikáns mértékű csökkenést váltottak ki az oszcilláló sejtek kontroll csoporthoz viszonyított arányában. Sőt, a kezelt sejtekben 5 perccel később már nem látszóttak Ca^{2+} tranziensek, továbbá a Ca^{2+} oszcillációk amplitúdója és frekvenciája szintén csökkenést mutatott a kezelés hatására. Magasabb időbeli felbontást alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy a LaCl_3 és YM-58483 hozzáadása megszünteti a Ca^{2+} oszcillációkat. CPA kombinált alkalmazása a SOCE gátlószereivel azonnali jelleggel leállítja a Ca^{2+} oszcillációkat. Kalciummentes Tyrode oldatban a sejtek oszcillációi csökkenő amplitúdók mellett fokozatosan megszűntek.

A Ca²⁺ oszcillációk mögött álló molekuláris apparátus részei

A VDCC-k több különböző alegységből tevődnek össze, a kalciumszelektív pórusalkotó α_1 alegység elengedhetetlen szerepet tölt be a működőképes csatorna felépítésében. Ennek megfelelően a csirke HD kultúrák sejtjeiben sikeresen azonosítottunk bizonyos L- (*Ca_v1.2* és *Ca_v1.3*), R- (*Ca_v2.3*) és T-típusú (*Ca_v3.1*, *Ca_v3.2* és *Ca_v3.3*) csatorna α_1 alegységeket, továbbá fehérjeszinten is azonosítottuk a VDCC α_1 alegység expresszióját. A funkcionáló CRAC-hez szükséges molekulák karakterizálását is elvégeztük. Az *Orai1*, *Stim1* és *Stim2* esetében egyaránt stabil mRNS expressziós mintázatot láttunk a tenyésztés teljes időtartama alatt. Továbbá kimutattuk, hogy a STIM1 fehérje a differenciáció szempontjából fontosabb napokon emelkedett expressziós szintet mutatott. Protein BLAST kereséseink arról tanúskodnak, hogy ugyanezen antitest a STIM2-t is felismerheti.

A VDCC-k és SOC-ok precíz működése szükséges a chondrogenesishez

Figyelemre méltó módon, a 24 óránál tovább tartó kezelések, amik során egyszerre ürítettük a kalcium raktárat és gátoltuk a SOCE-t, teljes mértékben kivédtek a porcképződést, a folyamatos nifedipine kezelés komolyan csökkentette a 6. tenyésztési napra a metachromáziás porcmatrix termelését, de meg kell jegyezni, hogy az általunk alkalmazott koncentráció a farmakon terápiás plazmaszintjénél egy nagyságrenddel magasabb. Hasonlóan számottevő chondrogenikus gátlás volt megfigyelhető amikor az ER kalciumraktárának ürítését a SOCE gátlószereivel kombináltuk egy mindössze 24 órás kezelés erejéig a 2. tenyésztési napon. A nifedipine nem okozott jelentős eltérést a vizsgált chondrogenikus markergének mRNS expressziójában, míg a SOX9 fehérje expressziója úgy csökkent észrevehető mértékben, hogy közben a foszforilált formájának mennyisége nem változott. A SOCE gátlószereinek együttes alkalmazása a kalciumraktárak ürítésével határozottan csökkentette a ECM komponenseinek mRNS expresszióját anélkül, hogy a *Sox9* transzkriptumok szintjére hasonló hatást gyakorolt volna. A SOX9 fehérjeszinten hasonlóan válaszolt a nifedipine kezeléseknél leírthoz. Ezenkívül végeztünk MTT tesztekét és vizsgáltuk a ³H-thymidine beépülését a

3. tenyésztési napon, hogy információt nyerjünk a sejtek metabolikus státuszára és proliferációjára vonatkozóan. Említést érdemel, hogy egyik vizsgált kezelésünk sem változtatta meg jelentősen a metabolikus aktivitást, de volt amelyik majdnem teljesen blokkolta a proliferációt.

A septinek átrendeződésének gátlása

A septinek átrendeződését gátló inhibitorral, azaz FCF-fel történő kezelés hatásait szintén vizsgáltuk a csirke HD kultúrákban. A tenyésztés 6. napján metachromáziásan festett telepek jól láthatóan csökkent mértékű porcmatrix-termelést demonstráltak. Mindkét vizsgált kezelési napon emelkedett mitokondriális metabolizmust detektáltunk, de a proliferációs ráta drámaian lecsökkent. Az elvégzett ^3H -prolin-inkorporációs assay szerint a kollagéntermelés szintén szignifikáns mértékben csökkent. Mindkét kezelési napon drasztikus csökkenés mutatkozott a chondrogenikus markerek mRNS expressziójában; mindegyik vizsgált gén esetén csak az adott oldószeres kontroll 20%-át érte el az mRNS szint. Az *Orai1* kifejeződése alig változott az 1. napon történt kezelést követően, de igen erős emelkedés látszott a 2. napi esetében. Eközben az itt vizsgált pluripotencia marker, a *PouV*, jelentős növekedést mutatott mindkét esetben.

Egyedi sejteken történő fluoreszcens kalciummérés

Annak érdekében, hogy vizsgáljuk az általunk generált SOCE paramétereit megfelelő gátlószerek hozzáadása mellett és nélkül, fluoreszcens intracelluláris Ca^{2+} méréseket végeztünk Fura-2-vel feltöltött csirke HD telepeken, a tenyésztés 2. napján. Kalciummentes Tyrode oldatban felvett, CPA-val történő előkezelést követően visszaállítottuk a normális extracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt, majd rögzítettük egyedi sejtekben az így kialakuló citoszólikus Ca^{2+} -koncentráció változásokat. A SOCE gátlószereinek jelenlétében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mind a tranziensek amplitúdójában, mind azok emelkedésének maximális rátájában a kontrollban számított értékekhez viszonyítva.

DISZKUSSZIÓ

1. Különböző chondrogenikus HD kultúrák összehasonlító analízise

Mesenchymális differenciációs útvonalak, pluripotencia

A vizsgált chondrogenikus modellek morfológiai összehasonlítása felfedte, hogy a prechondrogenikus nodulusok jelenléte vagy hiánya jelenti az egyik legkézenfekvőbb különbséget a végtagtelepekből származó és a sejtvonalból létrehozott HD kultúrák között. Feltételezhető, hogy a primer micromass kultúrák viszonylag nagy számban fejezik ki az intercelluláris junkciókat, főként N-cadherineket, amiknek köszönhetően ezek jobban reprezentálják az *in vivo* szöveteket, ahol szintén megjelennek a nodulusok. Mindazonáltal az N-cadherineket a C3H10T1/2 sejtvonali kultúráiban is kifejeződik és hatással vannak a migrációs potenciálra. A b-C3H10T1/2 sejtek csökkent motilitást mutattak a c-C3H10T1/2 kultúrák sejtjeivel összehasonlítva, ami egybevág azon eredményekkel, amik szerint a BMP-2 szükséges az N-cadherin expressziójának fokozódásához. A kísérleteinkben érintett micromass kultúrák chondrogenikus kapacitásának vizsgálata során stabil mRNS expressziós profilt detektáltunk a kulcsfontosságú chondrocyta-specifikus gének többségének esetében mind a primer, mind a BMP-2-t túltermelő HD kultúrákban. A *Prg4* kizárólag egér végtagtelep-eredetű kultúrákban mutatott jelentős expressziót (sajnálatos módon e gén mRNS szekvenciája nem volt elérhető a vizsgált adatbázisokban (NCBI, DDBJ és EMBL-EBI)), ami jelentős bizonyíték arra nézve, hogy a primer kultúrák nagyobb egyezést mutathatnak a natív ízületi porc szövettel. A metachromáziás ECM morfológiáját, elrendeződését és minőségét vizsgálva is megerősítettük ezt a megfigyelést. Ugyanakkor, tapasztalataink szerint a differenciálódáson áteső modelljeink mindegyike számottevő osteogenikus differenciációt és matrix-mineralizációt mutat. A legfontosabb osteogenikus transzkripciós faktorok (*Runx2* és *Osx*) mRNS transzkriptumaira vonatkozó eredményeink értelmében a differenciációt mutató kultúrák (a c-C3H10T1/2 kivételével az összes) csontosodásra utaló változásokon is átesnek már a tenyésztés kezdetétől. Korábbi tanulmányok már megerősítették azt, hogy mindkét végtagtelep-

eredetű, illetve a BMP-2-vel kezelt C3H10T1/2 micromass kultúra rendelkezik osteogenikus potenciállal. Az osteogenesis viszonylag korai megindulását további osteogenikus markergének mRNS expressziója is megerősíti. Azt, hogy ezek a modellek hasonló rátával és útvonalon keresztül szimulálják az embrionális endochondrális csontosodást, az Alizarin Red festéssel megjelenített matrix-mineralizáció is megerősítette. Érdekesség, hogy az ízületi porc markereinek (mint a *Snorc* és a *Prg4*) megjelenése nem különül el élesen időben a csontosodást fémjelző génektől (nevesen az *Oc* és az *Op*), ami azt sugallja, hogy itt a chondro- és osteogenesis az *in vivo* végtagfejlődéstől eltérően nem szekvenciális módon történik. A szakirodalmi adatokat figyelembe véve az adipogenesisre utaló jeleket is megvizsgáltuk a kísérletekbe bevont modellekben. Az *Fabp4* mRNS-ét mindegyik micromass kultúrában ki tudtuk mutatni, de a tenyésztés későbbi szakaszában csak a differenciálódó modellek mutattak upregulációt, a c-C3H10T1/2 telepei nem. A *Ppar γ* -t illetően az eredményeink arra utalnak, hogy csak a b-C3H10T1/2 kultúrákban zajlik adipogenikus differenciáció, elsősorban a tenyésztés későbbi fázisában. Ezen eredmény tudatában 25 napig tenyésztettünk egyes b-C3H10T1/2 HD kultúrákat, ezekben Oil Red O festéssel nagyszámú, egyetlen nagy zsírcseppet tartalmazó sejtet (nagy valószínűséggel adipocytákat) találtunk. Figyelemreméltó módon a lipidcseppek felhalmozódását c-C3H10T1/2 telepek sejtjeiben is megfigyeltük, míg a végtagtelepekből létrehozott kultúrák esetében jóval kevesebb, kis méretű lipidcsepp volt látható. Ezek azonban betudhatók az érett chondrocyták természetes strukturális komponensének. Ezeket túl azt is megvizsgáltuk, vajon a HD kultúrák sejtjeinek egy része megtartja-e pluripotens állapotát. A főbb pluripotencia markerek mRNS expressziós vizsgálatával kapott eredményeink rámutatnak arra, hogy a sejtek egy része akár hosszabb távon is megőrizheti differenciálatlan állapotát.

Megtalálni a megfelelő chondrogenikus modellt

A bemutatott kísérletekkel a porcosodó micromass kultúrákban mindhárom vizsgált fontosabb mesenchymális differenciációs útvonal jelenlétét igazoltuk, valamint bizonyítást nyert, hogy pluripotenciájukat megtartó sejtek is maradnak a kultúrákban, amint azt morfológiai és mRNS

expressziós eredményeink is alátámasztják. Ez impliciten azt jelenti, hogy ezen *in vitro* kultúrák sejtjei a szekvencialitás helyett inkább szimultán módon válnak elkötelezetté, és differenciálódnak az egyes eltérő útvonalakon. Ráadásul a legfontosabb osteo- és chondrogenikus transzkripciós faktorok mRNS-ei rögtön a tenyésztés elején kimutathatók, míg az adipogenesishez kulcsfontosságú *Ppar γ 2* expressziója csak e periódus második felében jelenik meg és kizárólag a b-C3H10T1/2 telepeken. Másrészt viszont az egér primer HD kultúrákban észrevehetően upregulálódott mindhárom útvonal markergénjeinek kifejeződése a 15. tenyésztési napra. A csirke primer HD telepeken is hasonló tendenciák láthatók/feltételezhetők. Az adipogenesis legmeggyőzőbb jelei a b-C3H10T1/2 HD kultúrákban láthatók, ellenben a primer végtagtelep-eredetű micromass kolóniák esetében a megfigyeléseink olyan lipidcseppek jelenlétét mutatják, amik vélhetően az érett chondrocyták normális alkotórészei. Adataink szilárdan megerősítik, hogy a végtagtelep-eredetű modellek szorosabban modellezik az embrionális porcképződést és az endochondrális csontképződést. E modellek közül a csirke eredetű rendszer alkalmazása lényegesen kényelmesebb, köszönhetően az egyszerűségének, reprodukálhatóságának, magas hozamának és költséghatékonyságának. Amennyiben a modell ismert hátrányai (bizonyos jelátviteli útvonalak fordított szabályozása, egyes antitestek és szekvenciák elérhetetlensége, némely kezelőanyag hatástalansága) nem érintik hátrányosan a tervezett kísérleteket vagy az adatok értelmezhetőségét, a felsorolt előnyök könnyedén ellensúlyozzák az egyéb tényezőket.

2. Ca²⁺ jelátviteli folyamatok vizsgálata csirke HD kultúrákban

VDCC-k a chondrogenikus sejtekben

A kalcium iont széles körben elismerik mint a legáltalánosabb másodlagos messengert. Egyre több adat áll rendelkezésre azt alátámasztandó, hogy a nem-excitábilis sejtek mint az MSC-k és chondrocyták a Ca²⁺-kapcsolt jelátviteli útvonalakat a differenciálódásuk alapvető mediátoraként használják a fejlődés során. Az, hogy az L-típusú VDCC-re specifikus gátlószerek, például nifedipine és verapamil gyengítették a

porcdifferenciációt egér végtagtelep-eredetű micromass kultúrákban, már megalapozta ezeknek a plazmamembrán Ca^{2+} csatornáknak a jelentőségét e modellben. Ezzel laboratóriumunk korábbi eredményei is szépen egybevágnak. A kalciumdependens jelátvitel fontosságát az itt bemutatott adatok is tisztán jelzik, ezen belül is egyértelmű szerepe van az extracelluláris Ca^{2+} -nak, ami a chondrogenesisben fontos kalciumforrás a plazmamembránon keresztüli beáramlás révén.

Elvégeztük a $Ca_v \alpha_1$ alegységek átfogó mRNS expressziós analízisét, és megerősítettük két L-típusú ($Ca_v1.2$ és $Ca_v1.3$), egy R-típusú ($Ca_v2.3$) és mindhárom T-típusú ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ and $Ca_v3.3$) csatorna jelenlétét. A VDCC-k porcdifferenciációban betöltött szerepét azáltal is megerősítettük, hogy úgy találtuk, a $Ca_v \alpha_1$ alegység fehérjei folyamatosan jelen vannak a teljes tenyésztési periódus alatt, illetve a nifedipine folyamatos alkalmazásából származó eredményeink is erre utalnak. Továbbá a porcspecifikus ECM-termelés és a SOX9 fehérje kifejeződése egyaránt markáns csökkenést mutatott a kezelés hatására. A T-típusú VDCC-k különösen valószínű, hogy fontos szerepet töltenek be a nem-excitábilis sejtek sejtciklusának szabályozásában, többek között annak köszönhetően, hogy a nyugalmi membránpotenciál viszonylag kis változásaira is igen érzékeny. Figyelemre méltó módon mindhárom T-típusú VDCC folyamatosan kifejeződik a csirke HD kultúrákban, ami fontosságukat jelzi. Mivel a nagy sejtsűrűség kiemelkedően fontos az *in vitro* porcosodáshoz, várható volt, hogy a proliferációt akadályozó kezelések (a VDCC-k gátlása révén) gátolni fogják a HD kultúrák chondrogenikus differenciációját. Eredményeink azt igazolták, hogy a nifedipine lényegesen csökkentette a sejtosztódási rátát. Ezen megfigyelésekből következtetünk arra, hogy a VDCC-k nagy valószínűséggel jelentős hatást gyakorolnak a sejtosztódásra, amivel kapcsolatban pedig ismert, hogy a mesenchymális chondrogenesis kondenzációs fázisának hangsúlyos előfeltétele.

SOCE a differenciálódó chondrocytákban

A citoszólikus kalciumion koncentráció megemelkedéséhez további források is hozzájárulhatnak. Ezek között jelentős a Ca^{2+} -raktárakból történő felszabadulás InsP3R vagy RyR csatornákon keresztül. Az InsP3R esetében annak mRNS és fehérje expresszióját is sikerült kimutatnunk a modellünkben, a RyR funkcionális kifejeződése azonban nem volt azonosítható. Azok a jelátviteli útvonalak, amik InsP3 termeléshez vezetnek, könnyen kiüríthetik az a csirke végtagtelepekből létrehozott kultúrák sejtjeinek ER Ca^{2+} -raktárait, mivel ezek a raktárak rendszerint kis kapacitással bírnak nem-excitábilis sejtekben. A raktárürítés következményeként CRAC-aktiváció történik az ER raktárak feltöltésének érdekében, így megvalósul a SOCE. Fontos és igazán újszerű eredményünk a CRAC-ek és egyéb SOCE-hez kapcsolódó molekulák jelenlétének igazolása, ami korábban sem érett, sem fejlődő chondrocytákban nem került még leírásra. Az *Orai1*, *Stim1* és *Stim2* mRNS expressziós szintjei egyaránt stabilnak mutatkoztak a tenyésztés teljes időtartama alatt. Továbbá a STIM1 expresszióját fehérje szinten is kimutattuk. Ezeken kívül a SERCA gátlását SOCE-blokkolókkal együtt alkalmazva az *in vitro* porcosodás majdnem teljes megszűnését tapasztaltuk, ami arra utal, hogy az ER raktárak és a SOCE kulcsszerepet tölthetnek be a differenciálódó chondrocyták kalciumhomeosztázisában. Erősen hasonló eredményeket hoztak a SOCE-t alternatív úton gátló kísérleteink, ahol a septin filamentumok átrendeződését gátoltuk. Ez a CRAC-aktivációnak egy a közelmúltban ismertté vált lépése. Miután a Ca^{2+} -homeosztázis az ER kalciumraktárak elégtelen újratöltése miatt zavart szenved, a sejtproliferáció merül fel mint a csökkent porcképződés egyik lehetséges oka. Ezzel összhangban vannak a kapott eredményeink, az osztódási ráta a raktárürítéssel kombinált SOCE-blokk és a septinek átrendeződésének gátlása mellett nagyon alacsony szintre esett, míg a mitokondriális metabolizmus nem, vagy csak kis mértékben változott. Az szintén említést érdemel, hogy a *PouV* expressziója a differenciáció stádiumának megfelelően válaszol a SOCE befolyásolására, ami azt sugallja, hogy a kalciumhomeosztázis szerepe túlmutat a proliferációs ráta fenntartásán. Továbbá az *Orai1* mRNS expressziójának a differenciáció

kulcsperiódusára időzített FCF-kezelést követő erős megemelkedése egy esetleges kompenzatórikus mechanizmus létezését, illetve a funkcionáló CRAC-ek porcdifferenciációban (és nem csak a proliferációban) betöltött fontos szerepét proponálja.

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen doktori értekezésben bemutatott eredmények összegezni hivatottak a C3H10T1/2 sejtvonalból és az embrionális végtagtelepekből létrehozott high density kultúrák különböző mesenchymális irányokban történő differenciálódását vizsgáló összehasonlító elemzésünk, valamint az embrionális csirke eredetű primer micromass kultúrák Ca^{2+} homeosztázisát célzó kísérleteink tapasztalatait. A disszertáció legfontosabb eredményei és következtetései a következők:

- Az összehasonlító tanulmányunk egyik jelentős tanulsága, hogy a morfológiai és molekuláris vizsgálataink túlnyomó részben jó korrelációban állnak. Analízisünk szerint a végtagtelep-eredetű sejt kultúrák előnyösebb alternatívát képeznek az osteochondrális differenciálódás *in vitro* modellezésére, mint a vizsgált sejt vonal; a chondrogenikus nodulusok képződése, a releváns marker gének erőteljesebb kifejeződése és az adipogenesis látható hiánya mind azt sugallja, hogy a primer kultúrákban képződő porcszövet jobb tulajdonságokkal bír.
- Az adipogenesis morfológiai jeleit elsősorban a c- és a b-C3H10T1/2 nagy sejtsűrűségű (HD – high density) kultúrák mutatják. Ezzel párhuzamosan a BMP-2-t overexpresszáló sejtekben a *Ppar γ 2* felülszabályozása is megfigyelhető, ami egy zsírsejt-specifikus magi receptor és az adipogenesis egyik fő regulátoraként ismert.
- Habár a pluripotencia markereinek mRNS szintjei meglehetősen zavaros mintázatot mutatnak, az *Oct4* csirke homológjának, azaz a *PouV*-nek, szabályos csökkenő tendenciát mutató kifejeződése egyértelműen a differenciálódás előrehaladását jelzi. Ennek során a végtagtelep-eredetű HD kultúra egyre több sejtje veszíti el a pluripotens jellegét, feltételezhető azonban, hogy a vizsgált periódus legvégéig maradnak pluripotens sejtek a sejt kultúrákban.
- A differenciálódó csirke HD kultúrák sejtjeinél a tenyésztés első és második napján jellemző gyors lefutású Ca^{2+} tranzienseket

figyeltünk meg, amelyek megjelenése a porcfejlődés előrehaladtával jelentősen változott a kifejező sejtek számának és arányának tekintetében.

- A chondrogenikus sejtek kalciumhomeosztázisának laboratóriumunk által korábban leírt komponensein túl az oszcillációk képzéséhez és fenntartásához szükséges molekuláris gépezet számos nélkülözhetetlen elemét kimutattuk: mRNS szinten a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák (L-, R- és T-típusú VDCC-k) $\alpha 1$ alegységeit és a SOCE folyamatáért közvetlenül felelős molekulákat (*Stim1/Stim2* és *Orai1*) írtuk le. Fehérje szinten pedig a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák kalciumszelektív pórus doménjét alkotó $\alpha 1$ alegységek, valamint a STIM1/STIM2 fehérjék jelenlétét igazoltuk.
- Csirke végtagtelep HD kultúrákon végzett egysejtes Ca^{2+} mérések során kimutattuk, hogy az alkalmazott SOCE gátlás jelentősen csökkenti a raktárürítést követő Ca^{2+} influx, azaz a SOCE paramétereit.
- Úgy tűnik, a Ca^{2+} belépését gátló anyagok önmagukban is képesek komoly zavarokat okozni a porcosodó csirke sejt kultúrák Ca^{2+} -homeosztázisában. Ezt a kezelést a belső raktárak ürítésével kombinálva még kifejezettebb hatást tapasztaltunk, aminek ténye egyaránt kiemeli a raktárak és az extracelluláris közeg szerepét is a Ca^{2+} oszcillációk fenntartásában. Az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák gátlása megfigyeléseink szerint csak a Ca^{2+} tranziensek frekvenciáját befolyásolta, míg Ca^{2+} -mentes Tyrode oldatban az oszcillációk amplitúdója fokozatosan nullára csökkent. Utóbbi állapot – amellett, hogy az extracelluláris Ca^{2+} szerepét még jobban kihangsúlyozza – az itt nem vizsgált eltávolító mechanizmusok szerepére is rávilágít.

Funkcionális vizsgálataink során mind az L-típusú Ca^{2+} csatornák gátlása, mind a SOCE inhibíciója csökkentette a tenyésztési periódus során képződött metachromatikus porcmatrix mennyiségét. Érdekes módon egyedül a SOCE

gátlása volt az, ami mRNS szinten is csökkenést okozott kulcs chondrogenikus markergének expressziójában, míg a fehérje szintű változások valamivel nehezebben áttekinthető képet mutatnak, de konzekvens módon a SOX9 aktív, foszforilált formájának mennyiségében itt is a SOCE gátlása okozott számottevő csökkenést. Rendkívül érzéketesen szemlélteti a Ca^{2+} jelátvitel fontosságát a sejtciklus normális lefutásában az a tény, hogy mindkét kezelésünk esetében úgy kaptunk jelentős csökkenést a proliferációra nézve, hogy közben a sejtek mitokondriális aktivitása („életképessége”) csak elhanyagolható mértékben változott.

Eredményeink azt sugallják, hogy a Ca^{2+} -homeosztázis egyes komponensei más-más mértékű és jellegű hatást fejtenek ki adott sejtbiológiai folyamatokra és/vagy jelátviteli útvonalakra hatva. Vagyis úgy tűnik, hogy például a specifikus porc ECM molekulák mRNS expresszióját inkább a SOCE határozza meg, mintsem a VDCC-k, míg a proliferáció látszólag bármilyen olyan változására érzékeny, aminek során a citoszólikus [Ca^{2+}] változásainak fiziológiás mintázata megváltozik.



Nyilvántartási szám: DEENK/66/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Takács Roland Ádám
Neptun kód: U1K98N
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Takács, R. Á.**, Matta, C., Somogyi, C., Juhász, T., Zákány, R.: Comparative Analysis of Osteogenic/Chondrogenic Differentiation Potential in Primary Limb Bud-Derived and C3H10T1/2 Cell Line-Based Mouse Micromass Cultures.
Int. J. Mol. Sci. 14 (8), 16141-16167, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140816141>
IF: 2.339
2. Fodor, J., Matta, C., Oláh, T., Juhász, T., **Takács, R. Á.**, Tóth, A., Dienes, B., Csernoch, L., Zákány, R.: Store-operated calcium entry and calcium influx via voltage-operated calcium channels regulate intracellular calcium oscillations in chondrogenic cells.
Cell Calcium. 54, 1-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2013.03.003>
IF: 4.21





További közlemények

3. Alagha, M. A., Vágó, J., Katona, É., **Takács, R. Á.**, Veen, D. v. d., Zákány, R., Matta, C.: A Synchronized Circadian Clock Enhances Early Chondrogenesis. *Cartilage*. [Epub ahead of print], 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1947603520903425>
IF: 2.961 (2018)
4. Matta, C., Juhász, T., Fodor, J., Hajdú, T., Mészár, K. 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: 5.111 (2018)
5. Juhász, T., Szentlélek, E., Somogyi, C., **Takács, R. Á.**, Dobrosi, N., Engler, M., Tamás, A., Reglödi, D., Zákány, R.: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Pathway Is Induced by Mechanical Load and Reduces the Activity of Hedgehog Signaling in Chondrogenic Micromass Cell Cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (8), 17344-17367, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160817344>
IF: 3.257
6. Somogyi, C., Matta, C., Földvári, Z., Juhász, T., Mészár, K. 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
7. Matta, C., Fodor, J., Miosge, N., **Takács, R. Á.**, Juhász, T., Rybaltovszki, H., Tóth, A., Csernoch, L., Zákány, R.: Purinergic signalling is required for calcium oscillations in migratory chondrogenic progenitor cells. *Pflugers Arch.* 467 (2), 429-442, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-014-1529-8>
IF: 3.654
8. Juhász, T., Matta, C., Somogyi, C., Mészár, K. É., **Takács, R. Á.**, Soha, R. F., Szabó, I. A., Cserhádi, C., Szódy, R., Karácsonyi, Z., Bakó, É., Gergely, P., Zákány, R.: Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell. Signal.* 26 (3), 468-482, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.001>
IF: 4.315





9. Juhász, T., Matta, C., Mészár, K. É., Somogyi, C., **Takács, R. Á.**, Hajdú, T., Helgadóttir, 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
10. Juhász, T., Matta, C., Mészár, K. É., Somogyi, C., **Takács, R. Á.**, Gergely, P., Csernoch, L., Panyi, G., Tóth, G., Reglődi, D., Tamás, A., Zákány, R.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: implication of calcineurin as a downstream target.
PLoS One. 9 (3), [1-15], 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091541>
IF: 3.234

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,681

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,549

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, 2020.03.05.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném sokrétű és igen nagy hálámat kifejezni a témavezetőm – Dr. Zákány Róza – felé. A tapasztalata és az új iránti folytonos érdeklődése mindig jelentős motivációt jelentett számomra, személyes szinten pedig egy kivételes, jószívű és az elvárható szinten messze túlmutatóan empátikus embert ismertem meg benne. Ezek a kvalitásai alapjaiban határozzák meg azt, hogy a kutatócsoportunkra szinte családomként tudok tekinteni.

Dr. Matta Csabát, akit nemcsak kollégámnak, de barátomnak is tekintek, szintén a legelsőik között kell megemlítenem. Azon túl, hogy nagyszerű ember és tudós, bármely férfi kutató számára példaértékűnek tartom hihetetlen eltökéltségét, valamint a családi és professzionális élet közti egyensúlyozásban mutatott kiváló érzékét. Mindezen felül kiemelt köszönettel tartozom neki az itt prezentált munkához és a tudományos előmenetelemhez való jelentős hozzájárulásáért.

Rendkívül hálás vagyok az asszisztensnőnknek, Bíróné Barna Krisztinának is, aki sok évnyi folyamatosan kiváló technikai segítségnyújtásán túl barátommá, illetve érzelmi támaszommá is vált.

A Jelátviteli Kutatócsoportunk összes jelenlegi és korábbi munkatársát – ideértve a TDK hallgatóinkat is – szintén megilleti a dicséret odaadó munkájáért, segítőkészségéért és a rendkívül jó hangulat fenntartásáért.

Különleges köszönettel adózom az Élettani Intézetben dolgozó kollaborációs partnereink felé is, akik közül kiemelném Dr. Fodor Jánost a fáradhatatlan munkavégzése és elmés hozzájárulása okán, valamint Prof. Dr. Csernoch Lászlót, amiért sokrétűen segítette gyümölcsöző kollaborációnk kiépülését; ez szintén nélkülözhetetlen volt e munka létrejöttéhez.

Nagyra értékelem Intézetünk vezetőjét, Dr. Szücs Pétert, aki nem csak lehetővé teszi számomra, hogy egy ilyen magas színvonalú kutatóműhelyben dolgozhassak, de a kutatócsoportunk igényeiről is igen nagyvonalúan gondoskodik.

Messzemenően hálás vagyok családom és baráti köröm minden tagjának, akik számtalan nehézségen segítettek át eddigi utam során. Külön ki

szeretném emelni a feleségemet, Barbarát, a szeretetéért, felbecsülhetetlen támogatásáért és türelméért, amikre mind komoly szükségem volt, illetve a csodálatos kisfiamat, Rolandot, aki – még ha jelenleg tudtán kívül is – mérhetetlen motivációt és energiát ad ahhoz, hogy önmagam egy jobb verziójává váljak, és nem utolsó sorban ezt a munkát is befejezzem.

Végezetül szeretném ezt a munkát néhai nagymamám, Elvira emlékének szentelni. Megszámlálhatatlan oka van, amiért különleges helye van a szívemben és mélyen elszomorít, hogy nem tud köztünk lenni, hogy láthassa e fejezet lezárultát.