

DEBRECENI EGYETEM
Orvos és Egészségtudományi Centrum
ÉLETTANI INTÉZET

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A kalciumhomeosztázis szabályozásában szerepet játszó fehérjék vizsgálata
mesenchymalis eredetű, differenciálódó sejtmodellekben**

Írta:
Fodor János



Témavezető:
Dr. Csernoch László

**DEBRECEN
2009.**

A kalciumhomeosztázis szabályozásában szerepet játszó fehérjék vizsgálata mesenchymalis eredetű, differenciálódó sejtmodellekben

Témavezető:

Dr. Csernoch László, az MTA doktora

Doktori Iskola:

Molekuláris orvostudomány

Doktori program:

Élettan-neurobiológia

A szigorlati bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Dr. Tózsér József, az MTA doktora

Bizottsági tagok:

Dr. Krasznai Zoltán, PhD

Dr. Zádor Ernő, PhD

A védési bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Dr. Tózsér József, az MTA doktora

Opponensek:

Dr. Papp Zoltán, PhD

Dr. Zsembery Ákos, PhD

Bizottsági tagok:

Dr. Krasznai Zoltán, PhD

Dr. Zádor Ernő, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2009. március 30.

Bevezetés

A hyalinporc felépítése és élettani sajátosságai

Az embrió kezdeti fejlődése során a vázrendszer túlnyomó többségében porcszövetből áll. A hyalinporc a belőle később *endochondrális csontosodással* kialakuló csontok vázát alkotja. A csontosodás folyamán a hyalinporc képezi a gyermek- és serdülőkorban bekövetkező gyors hossznövekedésért felelős *epiphysis porckorongot*. Felnőtt korban az ízesülő csontok felszínét borítja mint ízületi porc, azoknak rendkívüli kopásállóságot biztosítva egész életünk során. Megtalálható ezenkívül az egyes zsigerek (gége, légcső, bronchusok) vázát adó állandósult porc formájában is. A porc érmentes szövet, a porcsejtek diffúzióval táplálkoznak a perichondriumból, a környező szövetekből, valamint ízületi porc esetén a synoviális folyadékból. Ezen tulajdonság miatt a porc lassú anyagcseréjű, bradytrop szövetnek tekinthető. A makroszkópos és mikroszkópos morfológiai sajátosságok alapján a porcszövet három nagy csoportba sorolható:

- A *hyalinporc* (üvegporc), melyet homogén, amorf mátrix jellemez.
- Az *elasztikus porc*, melynek mátrixa rugalmas rostokat tartalmaz.
- A *rostos porc*, melynek mátrixa tömött kollagénkötegekből áll.

A különböző típusok között csak a kerekded morfológiájú *chondrocyták* jelentik a hasonlóságot, melyek jelentős mennyiségű, speciális összetételű és szerkezetű extracelluláris mátrixba (ECM) ágyazódnak. Jelen kutatásaink tárgyát a hyalinporc képezte, mivel az ízületi porc degeneratív elváltozása az *arthrosis*, valamint annak gyulladásszerű eredetű megbetegedései, az *arthritis* és a *rheumatoid arthritis* a társadalom jelentős részét érintő problémák.

A porcdifferenciálódás tanulmányozására szolgáló modellek. A nagy sűrűségű (high density, HD) sejttenyészet

A Hamburger - Hamilton szerinti 22–24-es fejlődési stádiumban lévő csirkeembriók végtagtelepeiből izolált primer HD sejttenyészet az egyik leggyakrabban használt *in vitro* porcdifferenciálódási modell. Ezen

mesenchymalis kultúrákban a chondrogenikus sejtek proliferációja, kondenzációja az első tenyésztési nap folyamán zajlik, majd a második és harmadik napon a nodulusok sejtjei elvesztik fibroblast-szerű morfológiájukat, kerekded porcsejteké differenciálódnak. A tenyészetek sejtjei autokrin és parakrin faktorokat választanak ki, mintegy önmaguk számára biztosítva ezzel a differenciálódáshoz szükséges feltételeket. A megfelelő sejtsűrűség függvényében a HD sejtenyészetben 6 nap alatt spontán differenciálódás megy végbe.

A porcdifferenciálódás intracelluláris szabályozása

A mesenchymalis prekurzorokból fejlődő chondroblastok esetében alapvető a Sox9 „mestergén” szerepe mind a mesenchymalis kondenzációban, mind a korai chondroblast differenciálódásban. Ez a transzkripciós faktor felelős a II-es típusú kollagén és aggrekán magfehérje génjeinek átíródásáért. Ugyanakkor a *protein-kináz C (PKC)* izoenzim-család által szabályozott MAP-kinázok (Erk1/2) is fontos szereppel bírnak a molekuláris szintű szabályozásban, melyek a sejtet érő külső ingerek, valamint a sejt belső állapotától függően osztódás vagy differenciálódás, apoptózis vagy túlélés irányába terelik a sejt további sorsát. A porcdifferenciálódás szabályozása során a döntő jelentőségű folyamatok Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonalak révén szabályozottak, hasonlóan más, nem-ingerelhető sejtek esetén leírtakhoz. Korábbi eredményeink alapján a porcdifferenciálódás folyamán a citoszólikus $[Ca^{2+}]$ jellegzetes változásokat mutat. A differenciálódás napján mérhető megemelkedett $[Ca^{2+}]$ -hoz szükséges ionokat a sejtek elsősorban az extracelluláris térből veszik fel, feltehetően ionotróp purinoreceptorokon keresztül.

A vázizom felépítése és élettani sajátosságai

A vázizomzat a mozgás aktív szerve, legfontosabb feladata a test vázát alkotó elemek elmozdítása egymáshoz képest, ezáltal a test helyének, illetve

helyzetének a módosítása. A vázizomzat elemi egységei a vázizomrostok, amelyeknek alapvető működési formája az idegi utasításra bekövetkező összehúzódnás (kontrakció). Az izomroston belül a myofilamentumok myofibrillumokba tömörülnek, utóbbiakat a vázizom igen fejlett intracelluláris membránrendszere, a sarkoplasmaticus reticulum (SR) veszi körül. A transzverzális vagy T-tubulusok a felszíni membrán betüremkedései és a terminális ciszternákkal együtt alkotják a harántcsíkolt izom funkcionális egységét, a triádot. A kontrakció létrehozásához szükséges Ca^{2+} az SR terminális ciszternáiból szabadul fel az elektromechanikai kapcsolat révén. Ezen szerkezetileg és funkcionálisan együttműködő molekulakomplex működésének lényege, hogy a sarkolemmán, valamint a T-tubulus membránon végighaladó akcióspotenciál a membránban elhelyezkedő dihidropiridin-receptor (DHPR) konformációváltozását okozza, mely megnyitja a belső Ca^{2+} -raktárként szolgáló SR Ca^{2+} -csatornáját, a rianodinreceptort (RyR), ezáltal Ca^{2+} -felszabadulást eredményezve. A vázizommal kapcsolatban is megemlíthetőek olyan szerzett vagy öröklött betegségek, mint a *myotoniák*, *progresszív izomdystrophiák*, *izomatrophia*, melyek gyakran fatális kimenetelűek, még az idősor elérését megelőzően.

Az izomfejlődés modellezése az izom Ca^{2+} -háztartásának vizsgálatára alkalmas sejt kultúrákban

Az izomfejlődés *in vitro* vizsgálatára két modell terjedt el. A kifejlett izomból preparált szatellitasejtek tenyésztésével nyert primer kultúra mellett immortalizált sejtvonalakból indított izomtenyészetek (pl. C2C12-egér, L6-patkány myoblastok). A myogenesis korai szakaszában a myoblastok Ca^{2+} -háztartása leginkább a simaizomsejtekre hasonlít. A későbbi érés és myotubulussá történő differenciálódás során megvalósul az SR folyamatos szerveződése, megjelenik a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás, majd az egyre fejlettebb SR megjelenésével döntő szerep jut a rianodinreceptorokon keresztül

történő, elektromechanikai kapcsolat révén megvalósuló, feszültség-indukált Ca^{2+} -felszabadulásnak (VICR).

A Ca^{2+} -felszabadulás szabályozása és a vázizom intracelluláris Ca^{2+} -eseményei

A triadinról, az SR membrán egyik integráns fehérjéről, kimutatták, hogy kapcsolatban áll mind a RyR-rel, mind az SR lumenben található Ca^{2+} -kötő fehérjével, a calsequestrin-nel. Ezen szoros kölcsönhatás következtében feltételezhető, hogy a triadin befolyásolja a RyR működését. A primer vázizomtenyészetben megfigyelhető spontán Ca^{2+} -tranziensek a T-tubulus membránon végigfutó akciós potenciál következtében jönnek létre az elektromechanikai kapcsolat eredményeként. Az akciós potenciálok a membránpotenciál helyi ingadozásai miatt keletkeznek, melyek a feszültségfüggő Na^+ -csatornák megnyitására keresztül aktiválják a dihidropiridin receptorokat, majd az SR Ca^{2+} -csatornáit. Az *emberek* és *sparkok* egyetlen vagy néhány (10-50) rianodinreceptor megnyílásának eredményeként lokálisan keletkező, elemi Ca^{2+} -felszabadulási események (Elementary Calcium Release Events, ECRE).

Célkitűzések

Fontos, hogy a rendelkezésre álló legmodernebb ismeretek, tudományos kutatási módszerek birtokában próbáljuk megismerni az egyes szervek, szövetek kialakulásának és működésének sajátosságait, génjeinek és fehérjéinek az intakt fiziológiai állapotot biztosító együttműködését. Egyetemi doktori értekezésemben két mesenchymalis eredetű szövettípus, a porcszövet és a vázizomszövet Ca^{2+} -homeosztázisával, továbbá a differenciálódást és az érett szövet fenntartását biztosító, intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -t szabályozó fehérjékkel kapcsolatos legújabb kutatásainkról számolok be. Az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ és annak megfelelő szabályozása alapvető fontosságú ezen szövetek mind intrauterin és posztnatális fejlődésében, mind egészséges működésében. Az élettan és molekuláris biológia határterületén mozogva vizsgáltuk az eddig kevésbé kutatott *in vitro* primer porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ változásokat, valamint a purinoreceptorok feltételezett szerepét a kutatócsoportunk által már igazolt, a differenciálódást kísérő intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedésben. Kutatásaink másik részében a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisának optimális szabályozásában részt vevő, de eddig pontos funkcióját tekintve ismeretlen Trisk 95 (a triadin 95 kDa molekulásúlyú izoformája) vázizomfehérje szerepét próbáltuk felderíteni, expressziójának módosítására irányuló kísérletek révén. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével line-scan technikát alkalmazva elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket vizsgáltunk kontroll és triadint overexpresszáló, ill. shRNS technika révén csökkentett fehérje expressziót mutató izomsejteken. Annak megállapítását tűztük ki célul, hogy a sejtek által termelt triadin mennyiségének módosítása befolyásolja-e ezen események jellegzetes paramétereit, az amplitúdót, frekvenciát és félértékszélességet. Az említett sejteken lehetőség nyílt egész sejten történő fluoreszcens intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ mérésre is, melynek során myotubulusokon különböző módokon kiváltott Ca^{2+} -tranziensek összehasonlító vizsgálatát végeztük el.

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

Primer, nagy sűrűségű (high density, HD) porctenyészet

A porcosodó mesenchymalis sejteket Ross fajtájú, fehér húshibrid csirkeembriók distalis végtagtelepeiből izoláltuk. A végtagtelepeket fénymikroszkóp alatt eltávolítottuk és azok enzimátikus emésztését követően a sejtekből nagy sűrűségű ($1,5 \times 10^7$ sejt/ml) sejtszuszpenziót készítettünk. A szuszpenzióból 100-100 μ l-es cseppeket vittünk műanyag Petri-csészékben elhelyezett fedőlemezekre. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ és 80% relatív páratartalom mellett termosztálva, Ham's F12 tápoldatban tenyésztettük. A kicseppentés napját tekintettük a tenyésztés nulladik napjának. Az így létrehozott primer porcosodó kultúrákban a 2., ill. 3. napon történik a porcsejtek kialakulása. A tenyésztés befejezését jelentő 6. tenyésztési napon nagy mennyiségű extracelluláris mátrix-szal körülvett porccsomók láthatók a megfestett tenyészetek mikroszkópos vizsgálata során.

Vázizomtenyészetek és a fehérjeexpresszió módosítása céljából alkalmazott transzfekeciós technikák

C2C12 vázizomsejtek tenyésztése

A C2C12 myoblastokat Dulbecco által módosított 10% foetalis borjúsérumot tartalmazó Eagles's Mediumban (DMEM) tenyésztettük. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében inkubáltuk. A sejtek myotubulussá történő differenciálódását a tápoldat módosításával biztosítottuk 90%-os konfluencia elérését követően.

C2C12 sejtek – liposzóma mediált plazmid transzfekeció

A C2C12 sejtek transzfekeciójához a Trisk 95 cDNS-sel klónozott pcDNA 3.1 eukarióta expressziós vektort használtuk. A transzfekeciót Opti-MEM tápoldatban végeztük, lipofectamine 2000 reagens felhasználásával. 48

órás expressziót követően a transzfektált tenyészeteket 1000 µg/ml geneticin tartalmazó DMEM tápoldatban tenyésztettük tovább. A szelekció 14–18. napján transzfektált sejtkolóniákat izoláltunk. A Trisk 95 fehérje túltermelésének hatékonyságát az egyes klónokban immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük. A funkcionális méréseket mind kontroll, mind transzfektált myoblastokból differenciáltatott 5 - 7 napos, sokmagvú izomcsöveken végeztük.

Primer vázizomtenyészetek

Ezen tenyészetek készítéséhez újszülött, 1 napos egér, valamint 5-10 napos patkány egyedeket használtunk. A felhasznált állatokat a Debreceni Egyetem Állat-Etikai Bizottsága által jóváhagyott protokoll szerint áldoztuk fel, a vázizmokat az állatok hátsó végtagjaiból preparáltuk ki, Hank-oldatba helyeztük, majd apró darabokra vágtuk. Az izomszövetet emésztettük, majd az enzimreakciót 10% lószérum hozzáadásával állítottuk le. Szűrés és centrifugálás után Ham's F12 proliferáltató tápoldatban 37 °C-on, 5%-os CO₂ tenzió mellett inkubáltuk őket. Két nap múlva a sejtek myotubulusokká történő differenciálódását 5% lószérumot tartalmazó DMEM tápoldattal indukáltuk.

Egér eredetű, primer vázizomtenyészet – adenovírus mediált géntranszfer

A primer, egér eredetű vázizomtenyészetekben rekombináns adenovírust használtunk a Trisk 95 vázizomfehérje expressziójának módosítására. Kontroll vírusként rAdV5-DsRed-t, amely a piros fluoreszcens protein cDNS-ét tartalmazta és expresszálta, valamint az rAdV5-Trisk95-ires-DsRed rekombináns vírust, amely a piros fluoreszcens proteinen kívül a vázizom Trisk 95 teljes szekvenciáját is hordozta CMV promóter szabályozása alatt. A proliferáló primer myoblastok fertőzése 90%-os konfluenciánál, 40-szeres multiplicitást alkalmazva, szérummentes Ham's F12 tápoldatban történt. A funkcionális vizsgálatokat az infekció/differenciálódás után 55–60 óra elteltével, konfokális mikroszkópos technikával végeztük differenciált myotubulusokon.

Primer, patkány eredetű, vázizomtenyészet – liposzóma mediált shRNS transzfekeció

A primer patkány eredetű vázizomtenyészetekben RNS interferencia módszert alkalmaztunk az endogén Trisk 95 fehérje expressziójának csökkentésére/gátlására. A Trisk 95 fehérje mRNS-ére specifikus shRNS szekvencia sense régiója: 5'GGCAAAGATGTAAAGCCTAAA, antisense régiója: 5'TTTAGGCTTTACATCTTTGCC. A Trisk 95 fehérje megjelenését immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk az izomdifferenciálódás különböző szakaszaiban (2–4. napig). Az shRNS-t liposzóma mediált transzfekecióval juttattuk a sejtekbe a differenciálódás megkezdését követő 24–30 órával, a Trisk 95 fehérjének a myotubulusokban történő megjelenését megelőzően. Az RNS interferencia hatékonyságát immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük. Az ugyanilyen korú myotubulusokon Ca^{2+} -méréseket végeztünk konfokális mikroszkóp segítségével.

Immuncitokémia

Az alábbiakban tárgyalt immunfestési technikát egyaránt alkalmaztuk C2C12 sejtvonalon és primer, vázizom sejt kultúrán a Trisk 95 fehérje kimutatására, valamint primer HD sejttenyészeteken a P2X ionotróp purinoreceptorok vizsgálatára. A sejt kultúrákat jég hideg 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk. A sejtmembrán permeabilizálását 0,1%-os Triton X-100-zal biztosítottuk, majd az aspecifikus helyek blokkolására 1% borjúsérum albumin oldatot (BSA-t) használtunk. Ezt követően a sejteket primer antitesttel inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán keresztül. Ezt követően minden tenyészet esetén fluoreszcinnel konjugált másodlagos IgG-t alkalmaztunk. A sejt magokat DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenilindol) tettük láthatóvá. Az eredményeket fluoreszcens vagy konfokális mikroszkóppal értékeltük.

RT-PCR

Az RT-PCR analízishez a különböző korú HD tenyészetek sejtjeiből teljes RNS-t izoláltunk Quiagen Rneasy® Micro Kit segítségével. Az így nyert RNS-mintából Omniscript reverz transzkripciós kit felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációjához használt primerek-et az interneten hozzáférhető csirke nukleotid-szekvenciák alapján állítottuk elő. A PCR-mintákat végül 1,5%-os, ethídium-bromiddal megfestett agarózgélen vizsgáltuk.

Membrán-frakció preparálás

A minták begyűjtéséhez a tenyésztés minden napján (1–6. nap) sejt kultúrákat arattunk. A sejt pelletet homogenizációs pufferben szuszpendáltuk. A mintákat folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk és felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A HD sejttenyészetek plazmamembrán-frakciójának izolálására a szonikált mintákat $50\ 000\ \text{g}$ -n centrifugáltuk 90 percig, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az üledéket $50\ \mu\text{l}$ 1% Triton X-100-zal kiegészített homogenizációs pufferben trituráltuk jégén. Egy óra triturálás után ismét $50\ 000\ \text{g}$ -n centrifugáltunk 55 percig, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on; a felülúszó tartalmazta a plazmamembrán-frakciót, amit a Western-blot analízishez használtunk.

Western-blot analízis

A Western blot vizsgálathoz használt mintákat $1/5$ térfogatú, ötszörös töménységű elektroforetikus mintapuffer hozzáadásával kezeltük és 5 percig $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on főztük. A fehérjéket elektroforézis segítségével nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat PBS-ben oldott sovány tejpor 5%-os oldatával blokkoltuk, majd egy éjszakán át ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) inkubáltuk a primer antitest hozzáadása után. Háromszor 10 perc PBST-s (0,1% Tween 20-szal kiegészített PBS) mosás után a membránokat torna peroxidázzal konjugált nyúl

ellen termeltetett IgG-vel inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcenciás reakcióval detektáltuk.

A porcmátrix mennyiségének meghatározása extracelluláris ATP, ADP, UDP, UTP és suramin alkalmazását követően

A HD sejttenyészetek tápoldatát egyszeri 100 μ M ATP-vel, 180 μ M ADP, UDP és UTP-vel, valamint 10 μ M suraminnal egészítettük ki a tenyésztés 3. napján. A HD sejttenyészeteken a porcmátrix mennyiségét metakromáziás festéssel tettük láthatóvá: *Dimetil-metilénkék festés* (DMMB) esetén alkohol és formalin 4:1 elegyében fixáltuk a differenciált porctenyészetet, minden esetben a tenyésztés 6. napján. A festéshez 0,1%-os DMMB-t használtunk 3%-os ecetsavban oldva (5 perc). Az eredményt vizuálisan értékeltük. *Toluidinkék festésnél* (TB) fixálást (28% etanol, 4% formalin és 2% ecetsav) követően a tenyészeteket glicin-HCl pufferben (pH: 1,8) oldott 0,1% toluidinkékkel festettük, majd a kontroll ill. kezelt tenyészetekből kivont festék abszorbanciáját 625 nm-en (OD_{625}) fotometriás módszerrel mértük meg.

A HD sejttenyészetek által a tápoldatba szekretált ATP meghatározása

A HD tenyészetek sejtjei által szekretált ATP-mennyiség meghatározása az adenzin 5'-trifoszfát Bioluminescent Assay Kit felhasználásával történt. A rendszer elve a luciferáz enzim által katalizált reakció: $ATP + luciferin \rightarrow Adenyl-luciferin + PP_i$ $Adenyl-luciferin + O_2 \rightarrow Oxyluciferin + AMP + CO_2 + fényreakció$. A méréshez minden alkalommal a sejtekről származó és pH 7,8-ra állított tápoldat 50 μ l-ét használtuk, 2 párhuzamos kísérlet során. A minták lumineszcenciáját microwell plate reader készülékkel mértük.

Egyedi sejteken történő fluoreszcens, intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -mérés

A különböző korú HD sejttenyészetek, valamint a vázizomtenyészetek sejtjeinek intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásait a Fura-2-AM fluoreszcens Ca^{2+} -kötő

festék segítségével mértük. A feltöltést 37 °C-on, termosztátban, 90 percen át végeztük. A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta Scan™ kettős monokromátoros berendezés biztosította. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en interferenciaszűrő közbeiktatásával egy fotoelektron-sokszorozó (PMT) segítségével detektáltuk. A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcencia-értékek hányadosából ($R=F_{340}/F_{380}$) az alábbi egyenlet alapján számítottuk ki az intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ -t:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R).$$

Konfokális mikroszkópos mérések

Vizsgálatainkban a Zeiss LSM 510 META lézer-pásztázó mikroszkópot használtuk Fluo-3 vagy Fluo-4 fluoreszcens Ca^{2+} -kötő festékkel feltöltött sejtek Ca^{2+} tranzienseinek nyomonkövetésére. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ és így a festék által kötött Ca^{2+} mennyiségének emelkedésekor a festék fluoreszcenciája fokozódik, ami fényintenzitás növekedésként detektálható. A normalizált fluoreszcencia-intenzitást line-scan imaging (x,t), illetve kétdimenziós (x,y) leképezési módszerrel vizsgáltuk és jelenítettük meg.

A Fluo3-at és a Fluo4-et argonion-lézerrel gerjesztettük (488 nm), és a fluoreszcencia intenzitást 500–570 nm-es áteresztő szűrő segítségével detektáltuk. A képeket automatikus eseménydetektáló programmal analizáltuk, melyet az intézetünkben fejlesztettek ki. A program a felismert események paramétereit – amplitúdó ($\Delta F/F_0$), FWHM (Full Width at Half Maximum, azaz a félértékszélesség, a maximális amplitúdó felénél levő távolság) és az időtartam – is számolja.

Eredmények

Porcszövet – primer, HD sejtenyészetek

Az extracellulárisan alkalmazott ATP citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ emelkedést eredményez a differenciálódó primer porcsejteken

Mint azt már korábbi kísérleteinkben kimutattuk, a primer porcsejteken a differenciálódáskor, mely a tenyésztés 3. napján történik, jelentősen megemelkedik az intracelluláris $[Ca^{2+}]$. Az ehhez szükséges Ca^{2+} -okat a sejtek elsősorban az extracelluláris térből veszik fel, egyelőre még nem tisztázott mechanizmusok révén. Kísérleteink kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a különböző korú HD tenyészetek sejtjein megjelennek-e olyan funkcionális receptorfehérjék, melyek révén az extracellulárisan adagolt $180 \mu M$ ATP hatására a sejtek belsejében megemelkedik a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$. A 3. napos kultúrákban a sejtek túlnyomó többsége, mintegy 90 %-a válaszolt az agonistára, ugyanakkor a 2., a 4., és a 6. napos tenyészetekben az ATP-érzékeny sejtek aránya elenyésző, az 1. napon pedig nem sikerült reagáló sejtet találnunk. Megfigyelhető továbbá, hogy mind az ATP-adagolás után a válasz kialakulásához szükséges idő, mind a Ca^{2+} -tranziensek átlagos amplitúdói (a maximális intracelluláris $[Ca^{2+}]$ növekedés) differenciálódás-függő mintázatot mutattak.

Ezt követően az ATP adagolásakor az extracelluláris közegből elvontuk a szabad Ca^{2+} -okat, ebben az esetben a vizsgált sejtek egyikénél sem volt detektálható ATP-vel kiváltott Ca^{2+} -tranziens, ami erősíti azon felvetésünket, hogy az extracellulárisan adagolt ATP hatásáért Ca^{2+} -belépés, valamint ionotrop purinoreceptorok lehetnek felelősek. A továbbiakban az ATP adagolása előtt a sejteket $10 \mu M$ suraminnal (nem specifikus P2X antagonistá) előkezeltük és azt tapasztaltuk, hogy az ATP-indukált Ca^{2+} -válasz gyakorlatilag változatlan maradt, vagyis a differenciálódó chondrogenikus sejteken funkcionáló P2X-altípusok, a P2X₄ és a P2X₆ receptorok lehetnek. Az ATP többszöri, egymás utáni alkalmazása az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ ismételt, tranziens emelkedéseit

eredményezte a 3. napos HD tenyészeteken. A deszenzitizáció hiánya tovább erősíti a P2X₄ vagy P2X₆ receptorok lehetséges expresszióját és funkcionalitását a vizsgált primer porcsejteken.

A chondrogenikus mesenchymalis sejtek különböző P2X receptortípusokat expresszálnak a sejtenyészet korától és a differenciálódási stádiumtól függően

A PCR reakciót követően a várt molekulasúlyú amplimereket detektáltuk minden rendelkezésre álló cDNS minta esetében. Eredményeink alapján a primer porcdifferenciálódás folyamán a P2X₄ és P2X₅ receptorok mutatták a legerősebb mRNS szintű expressziót. Mindkét receptor esetében a jel az első napon vált egyértelműen intenzívvé, majd a tenyésztés végéig folyamatosan gyengült.

A különböző P2X receptor altípusok fehérjeszintű expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk. Eredményeink alapján a P2X₂ altípus egyik esetben sem volt detektálható és nem kaptunk pozitív jelet P2X₃, valamint P2X₆ receptor esetén sem. A primer HD tenyészetek sejtjeiben a P2X₄ receptor fehérjeszintű megjelenése bizonyult a legérdekesebbnek. A teljes fehérjefrakcióban a 4. napon mutatta a legerősebb pozitívítást, a plazmamembrán esetén a receptor a 3. tenyésztési napon jelenik meg, majd csökkenő intenzitást mutat a 4. és 6. napon. A teljes lizátumban a 4. napon megfigyelhető feldúsulás hipotézisünk szerint a receptor membránból történő visszavételezésének következménye.

A differenciálódás napján a tenyésztő tápoldat ATP-vel történő kiegészítése fokozza a primer porcsejtek mátrixtermelését

A tenyésztés 3. napján különböző koncentrációban ATP-t adagoltunk a HD sejtenyészetek tápoldatához. 100 µM ATP egyszeri alkalmazása fokozott mátrixprodukción eredményezett a 6. napon, amit a DMMB, valamint TB festéssel igazoltunk. A suramin önmagában történő, illetve ATP-vel kombinált alkalmazása nem eredményezett változást a termelt porcmátrix mennyiségében.

Az az irodalomból ismert tény, hogy a suramin gátolja a hialuronsav szintetáz enzimet, magyarázhatja a mátrix termelés kismértékű csökkenését. A 2. ill. a 4. napon történő ATP-alkalmazás nem módosította a porc mátrix termelését. A II-es típusú kollagén és aggregán tengelyfehérje mRNS-szintje az emelkedett mátrix képződésnek megfelelően szintén fokozódott a 3. napon történő ATP-kezelés hatására. Bár a Sox 9 esetén mRNS-szintű változást nem sikerült detektálnunk, ezen transzkripciós faktor fehérje szintű expressziója sokkal intenzívebbé vált az ATP-hozzáadás következtében, amely jelenség a nem-specifikus P2X antagonistával nem volt gátolható, –tovább erősítve a P2X₄ feltételezett szerepét.

A HD tenyésztetek sejtjei ATP-t szekretálnak a sejtek tápfolyadékába

Annak ismeretében, hogy az ATP-adagolás milyen hatással van a differenciálódó porcsejtek mátrix termelésére, felvetődött a kérdés, hogy a porcosodó kultúrák sejtjei szekretálnak-e ATP-t a tápoldatba mint autokrin-parakrin mediátort, hogy elősegítsék vagy gyorsítsák saját differenciálódásukat. A kísérlet során a tenyésztés során mintát vettünk a sejtek tápfolyadékából és ATP assay-t végeztünk. A tenyésztés valamennyi napján kis mennyiségű ATP (2-10 nM koncentrációban) volt detektálható.

A P2Y receptorok vizsgálata

Bár a fenti eredmények a P2X receptorok alapvető fontosságát igazolják a porcdifferenciálódás során, kísérleteket végeztünk a P2Y receptorok lehetséges szerepének felderítése céljából is. Az egész sejten történő, fluoreszcens [Ca²⁺] mérés során megvizsgáltuk az intracelluláris Ca²⁺-raktárban jelenlevő és abból az IP₃ útvonalon keresztül felszabadítható Ca²⁺ jelenlétét. Chondrocytákon már igazolták ezen útvonalat aktiváló, funkcionális bradykinin receptorok expresszióját, ennek megfelelően a 3. napos sejtekre adagolt bradykinin (20 μM) átlagosan 30 nM amplitúdójú Ca²⁺-tranzienseket eredményezett a sejtek 60%-

nál. Kísérleteink folytatásaként ADP-t, UDP-t és UTP-t mint nem-specifikus P2Y agonistákat adagoltunk a HD tenyészetek sejteire 180 μM koncentrációban. A sejtek 50%-nál kismértékű intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedést tapasztaltunk a P2Y₂ és P2Y₄ agonista UTP adagolását követően. Másrészt a P2Y₁ receptor agonista ADP és a P2Y₆ receptor agonista UDP alkalmazása nem eredményezett Ca^{2+} -tranzienseket a 3. napos HD tenyészetek sejtjein.

A GenBank adatbázisban a P2Y₁, P2Y₃, P2Y₅ receptorok mRNS-szekvenciái állnak rendelkezésre. Az RT-PCR reakció alapján mindhárom metabotróp purinoreceptor stabil mRNS-expressziót mutatott a tenyésztés folyamán. Western blot analízissel a P2Y₁, P2Y₂ és P2Y₄ fehérje jelenlétét vizsgáltuk teljes, valamint plazmamembrán fehérje-frakciókban. A tenyésztés első napján a P2Y₁ receptor jelenléte nem volt kimutatható, ezt követően azonban mind a két frakcióban annak stabil expressziója volt detektálható egészen a 6. napig, amikor kismértékű expresszió-csökkenés volt tapasztalható. A P2Y₂ fehérje jelenléte a tenyésztés 2.-4. napjáig mutatkozott legerősebbnek a teljes fehérje-frakcióban. A plazmamembrán-frakcióban azonban állandó expressziós szintet detektáltunk a 6. nap kivételével, amikor csökkenő expressziót mutatott. A P2Y₄ receptor esetén a teljes fehérje-lizátumban nem tapasztaltunk immunpozitivitást, míg a membrán-frakcióban a 2. napon volt a legmeghatározóbb a fehérje jelenléte.

A metakromáziás színreakció alapján, egyszeri 180 μM ADP, UDP illetve UTP adagolása a tenyésztő tápoldathoz a 3. napon, nem eredményezett változást a porcmátrix termelésében.

Vázizomszövet - *in vitro* vázizomtenyészetek

Trisk 95 overexpresszió C2C12 izomsejtekben

A Trisk 95 overexpresszió hatását egér eredetű, vázizomsejtvonalon vizsgáltuk. A sejtekben a Trisk 95 túltermelését pcDNA3.1 expressziós plazmid rendszerrel biztosítottuk. A stabil transzfekciót követően a protein

túltermelődését a szelektált klónokban mind myoblast, mind myotubulus stádiumban immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük. A fluoreszcencia intenzitások kvantitatív analízise során a fehérje 94%-os túltermelését detektáltuk a kontroll, üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált C2C12 sejtekhez képest. A továbbiakban 5-7 napos, terminálisan differenciált C2C12 myotubulusokon funkcionális méréseket végeztünk.

Az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulás csökken Trisk 95-öt túltermelő C2C12 izomsejteken

Kísérleteink kezdetén azt vizsgáltuk, hogy a fehérje túltermelés módosítja-e a myotubulusok Ca^{2+} -homeosztázisát. A nyugalmi intracelluláris [Ca^{2+}] esetében nem volt szignifikáns különbség a kontroll ill. transzfektált myotubulusokat összehasonlítva ($77,4 \pm 5,2$ nM, $n=48$ a kontroll sejtekben és $71,3 \pm 4,8$ nM, $n=54$ a Trisk 95 túltermelő sejtekben). További méréseink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a koffein által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját illetően a vizsgált kontroll és Trisk 95 transzfektált sejtekben (142 ± 10 nM, $n=41$ illetve 123 ± 11 nM, $n=44$). Extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében a KCl által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdói nem különböztek lényegesen a kontroll és Trisk 95 myotubulusokban (168 ± 10 nM, $n=48$ és 200 ± 31 nM, $n=54$). Ezzel ellentétben a Ca^{2+} -mentes oldatban alkalmazott KCl depolarizáció hatására a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdói szignifikánsan csökkentek a Trisk 95 fehérjét túltermelő myotubulusokban (98 ± 10 nM, $n=42$) a kontroll sejtekkel összehasonlítva (170 ± 14 nM, $n=29$).

Elemi Ca^{2+} -felszabadulási események Trisk 95 túltermelő C2C12 izomsejteken

Kontroll izomcsöveken mind sparkok (nagy amplitúdójú, rövid idejű, lokalizált Ca^{2+} -felszabadulási események), mind emberek (kis intenzitású, hosszú idejű események) rendre megfigyelhetőek voltak. Ugyanakkor a transzfektált myotubulusokban a kis amplitúdójú Ca^{2+} sparkok relatív

megjelenési gyakorisága emelkedett a triadin overexpresszió következtében, míg a nagy amplitúdójú sparkok előfordulási frekvenciája csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva. Az összesített eredmények alapján elmondható, hogy a Trisk 95 túltermelő myotubulusokban a sparkok átlagos amplitúdója szignifikánsan kisebb a kontroll myotubulusokhoz viszonyítva ($0,59\pm 0,01$ és $0,81\pm 0,01$; $p<0,001$), ugyanakkor az emberek átlagos amplitúdójára csak csekély hatással volt a Trisk 95 túltermelés ($0,22\pm 0,01$ és $0,26\pm 0,02$; $p<0,01$). Az átlagos FWHM érték sparkok esetében ugyanakkor szignifikánsan csökkent a fokozott Trisk 95 termelés következtében ($1,26\pm 0,07$ μm ; transzfektált sejtekben és $1,86\pm 0,06$ μm kontroll sejteknél $p<0,01$). A vizsgált spontán, elemi Ca^{2+} -felszabadulási események előfordulási gyakorisága mind sparkok esetén ($1,04\pm 0,14$ Hz Trisk 95 sejtekben és $1,85\pm 0,21$ Hz kontroll sejtekben), mind emberek esetén ($0,09\pm 0,04$ Hz Trisk 95 sejtekben és $0,19\pm 0,02$ kontroll sejtekben) szignifikánsan csökkent ($p<0,05$) Trisk 95 myotubulusokban.

Trisk 95 túltermelés egér eredetű, primer vázizomtenyészetben

A triadin overexpressziót az egér eredetű, primer vázizomtenyészetekben adenovírus transzfekció alkalmazásával hoztuk létre. Mind a kontroll, mind a transzfektált izomcsövek spontán bekövetkező Ca^{2+} -tranzienseket produkáltak, melyeknek mind amplitúdója, mind előfordulási gyakorisága szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest ($0,56\pm 0,03$ és $0,26\pm 0,01$ Hz, $n=71$; $p<0,02$ és $0,001$, a Trisk 95 sejtekben valamint $0,68\pm 0,02$ és $0,75\pm 0,04$ Hz, $n=169$, a kontroll, csak DsRed-et expresszáló sejtekben). Az előzőleg leírt Ca^{2+} -tranzienseket megvizsgáltuk külső elektromos impulzus által indukált körülmények között is. Ennek eredményeként a Trisk 95 overexpresszió következtében a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója szignifikánsan csökkent a kontroll sejtekhez képest ($0,64\pm 0,09$ $n=17$, 4 kontroll sejt és $0,46\pm 0,05$ $n=45$, 9 transzfektált sejt alapján).

Ca²⁺-tranziensek az endogén Trisk 95 fehérjét kisebb mértékben expresszáló patkány eredetű, primer myotubulusokban

A tenyésztés különböző szakaszaiban immuncitokémiai vizsgálattal igazoltuk az endogén Trisk 95 megjelenését. A differenciálódó myotubulusokat rodamin vörössel jelzett Trisk 95-specifikus shRNS-el transzfektáltuk. A transzfektált sejteken fluoreszcens [Ca²⁺] mérést végeztünk. A koffein által kiváltott Ca²⁺-tranziensek amplitúdójának összesített értékelése alapján az shRNS transzfecció egyértelmű, szignifikáns csökkenést eredményezett a csökkent triadin termelést produkáló sejtekben, amely alapján az SR csökkent Ca²⁺-tartalma feltételezhető. Ennek megfelelően, a transzfektált sejtekben emelkedett nyugalmi [Ca²⁺]-t tapasztaltunk Ca²⁺-mentes extracelluláris oldatban mérve (64,9±3,3 és 85,7±6,9 nM; n = 15 és 12; kontroll és csökkentett triadin termeléssel jellemzett myotubulusok esetében). Továbbá a KCl depolarizáció Ca²⁺-felszabadulást eredményezett az SR-ből Ca²⁺-mentes extracelluláris környezet esetében, ami igazolja, hogy a csökkent triadin expresszió nem módosítja az elektromechanikai kapcsolat működését. A csökkentett Trisk 95 expressziót mutató sejtek esetén a már igazolt kisebb SR Ca²⁺-tartalom ellenére a kontroll sejtekhez hasonló amplitúdójú KCl által kiváltott Ca²⁺-tranzienseket mértünk.

Ca²⁺-felszabadulási események csökkentett, endogén Trisk 95 fehérje termelődéssel rendelkező patkány eredetű, primer myotubulusokban

A kontroll sejteken a spontán bekövetkező, globális tranziensek voltak megfigyelhetőek. Ezen tranziensek átlagos amplitúdója 0,62±0,05 volt (n=553, 23 myotubuluson), míg átlagos előfordulási gyakoriságuk 1,01±0,22 Hz-nek adódott. Ugyanakkor a lokális Ca²⁺-felszabadulási események, mind a sparkok, mind az emberek, csak esetenként voltak detektálhatóak, és a képek nagy részén (225-ön a 279-ből) hiányoztak, valamint a számuk is igen alacsonynak bizonyult (54 képen 143 spark és 23 ember). A triadin expresszió csökkentése igen drámai

hatással volt az események megjelenésére. A transzfektált sejteken Ca^{2+} sparkok és emberek rendre megfigyelhetőek voltak (649 spark és 117 ember, 5 myotubuluson, 385 felvett képből 218 esetében). Az események előfordulási gyakorisága mellett azok jellemző paraméterei is módosultak a csökkent Trisk 95 expresszió következtében. A sparkok átlagos amplitúdója jelentősen megemelkedett a Trisk 95 szuppresszált myotubulusokban ($0,49 \pm 0,03$ a kontroll sejtekben és $0,89 \pm 0,04$ az shRNS Trisk 95 sejtekben ($p < 0,01$)). Ilyen intenzív eseményeket a kontroll sejteken elvértve lehetett tapasztalni, míg felnőtt rostokon hasonlókat soha nem írtak le. Nemcsak elemi Ca^{2+} -felszabadulási események, de spontán Ca^{2+} -tranziensek is megfigyelhetőek voltak a transzfektált sejteken. Ezen események megközelítőleg ugyanolyan frekvenciával ($0,99 \pm 0,16$ Hz; $n=888$ 20 myotubuluson), de sokkal nagyobb amplitúdóval ($1,39 \pm 0,08$; $p < 0,01$) jelentek meg a kontroll sejtekhez viszonyítva (lásd fentebb).

Összefoglalás

Kutatómunkám során az általam alkalmazott mesenchymalis sejtmodellekben sikerült rávilágítanom olyan szabályozó mechanizmusokra, és az ezekben szereplő fehérjék feltételezett szerepére, amelyek a porcszövet, valamint a vázizomszövet Ca^{2+} -homeosztázisának, és ezáltal globális működésének jobb megértését segíthetik.

Porcszövet - primer HD sejtenyészetek

Az *in vitro* porcképződés egy dinamikus, soklépcsős folyamat, melynek szabályozásában többféle molekuláris mechanizmus szerepel. Ezek többségében szerepet játszó protein kináz és foszfatáz enzimek aktiválódása, valamint inaktiválódása fokozottan függ az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -tól. A csirke mesenchymalis HD sejtenyészetben a chondrogenikus sejtek chondroblastokká, majd érett, kerekded chondrocytákká differenciálódnak a 6 napos tenyésztési

ciklus folyamán. A tenyésztés 3. napjától a chondroblasztok által termelt porcspecifikus ECM termelődése indul meg. Mint arról korábbi közleményünkben beszámoltunk, a chondrogenikus sejtekben a tenyésztés 3. napján a citoplazmatikus, szabad $[Ca^{2+}]$ átmeneti, szignifikáns emelkedést mutat. Ennek háttérében álló extracelluláris Ca^{2+} -felvétel alapvető jelentőségű a porcdifferenciálódás lezajlásában. Jelen munkánkban igazoltuk a chondrogenikus sejtek differenciálódás során megvalósuló ATP szekrécióját. ATP-adagolása a sejteken Ca^{2+} -tranzienseket váltott ki extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében, ez csak a tenyésztés 3. napján volt megfigyelhető, amikor a chondroblasztok végleges elkötelezettsége megtörténik. Ezen túlmenően az ATP-nek a sejtek tápoldatához történő hozzáadása következtében fokozódott a chondrogenikus transzkripciós faktor (Sox9) expressziója, valamint az extracelluláris porc mátrix termelődése. A suramin alkalmazása nem védte ki az ATP hatását, ezenkívül a $P2X_4$ receptor a 3. napon megjelent a plazmamembrán frakcióban és ugyanezen napon erős pozitívást mutatott immuncitokémiai jelöléssel is. A $P2X_1$, $P2X_4$, $P2X_5$ és $P2X_7$ ionotróp purinoreceptorok mellett, a $P2Y_1$, $P2Y_3$ és $P2Y_5$ metabotróp purinoreceptorok mRNS szintű, valamint a $P2Y_1$, $P2Y_2$ és $P2Y_4$ fehérje szintű expressziója is kimutatható volt a sejteken. A metabotróp purinoreceptor agonista ADP és UDP nem eredményezett Ca^{2+} -tranzienseket a HD tenyészetek sejtjeiben és nem indukált fokozott mátrix képződést sem. Másrészt az UTP alkalmazását követően kis amplitúdójú Ca^{2+} -tranziensek megfigyelhetőek voltak, de ezen nukleotid sem fokozta a porcmátrix termelődését a chondrogenézis folyamán. Mindezen adatok alapján feltételezzük a $P2X_4$ receptor szerepét az ATP-függő intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedésben a primer chondroblast differenciálódás során.

Vázizomszövet - *in vitro* vázizomtenyészetek

Jelen munkánkban az elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket és a Ca^{2+} -tranzienseket tanulmányoztuk konfokális lézer mikroszkóp segítségével C2C12 izomsejteken és primer, vázizomtenyészeteken. Liposzóma és adenovírus mediált overexpressziót, valamint RNS interferencia módszert alkalmaztunk a Trisk 95 fehérje expressziójának módosítására. A stabil overexpresszió csökkentette egyrészt a Ca^{2+} sparkok amplitúdóját és frekvenciáját, másrészt a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket a C2C12 sejtekben. Ehhez hasonlóan a Trisk 95 adenovírus mediált overexpresszióját követően csökkent a spontán, egész sejtre kiterjedő Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és előfordulási gyakorisága is, valamint ugyanezt az eredményt kaptuk elektromos ingerlés során is. Ugyanakkor az endogén triadin expresszió shRNS-sel történő gátlása ellentétes változásokat eredményezett. Kontroll, endogén Trisk 95-öt expresszáló patkány eredetű, primer vázizomtenyészetekben rendre megfigyelhetőek spontán Ca^{2+} -tranziensek, míg ezen tenyészetek sparkokat csak kis gyakorisággal generálnak. Az shRNS transzfekciót követően a Trisk 95-specifikus immunpozitivitás jelentősen csökkent. Az ezen sejteken történő funkcionális mérések alapján a koffeinnel kiváltott Ca^{2+} -tranziensek jellemzően csökkentek, ugyanakkor az elemi Ca^{2+} -felszabadulási események jelentősen nagyobb gyakoriságot mutattak. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a Trisk 95 fehérje negatívan szabályozza a RyR működését, azáltal, hogy csökkenti a lokalizált, elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket, valamint a globális Ca^{2+} -tranzienseket vázizomtenyészetekben.

Közlemények

A téziseket megalapozó in extenso közlemények:

J Fodor, M Gönczi, M Sztretye, B Dienes, T Oláh, L Szabó, E Csoma, P Szentesi, GP Szigeti, I Marty, L Csernoch

Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture. *J Physiol.* 2008. 586: 5803-18. **IF.:4,580**

J Fodor, C Matta, T Juhász, T Oláh, M Gönczi, Zs Szíjgyártó, P Gergely, L Csernoch and R Zákány

Ionotropic Purinergic Receptor P2X_4 is Involved in the Regulation of Chondrogenesis in Chicken Micromass Cell Cultures. *Cell Calcium* 2009. *Közlésre elfogadva IF.:4,338*

A tézisekben fel nem használt in extenso közlemények

T Juhász, C Matta, G Veress, G Nagy, Zs Szíjgyártó, Zs Molnár, **J Fodor**, R Zákány and P Gergely

Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35. *Int J Onc* 2008. *Közlésre elfogadva IF.:2,295*

C Matta, **J Fodor**, Zs Szíjgyártó, T Juhász, P Gergely, L Csernoch, R Zákány
Cytosolic free Ca^{2+} 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: 310-23. **IF.:4,338**

Z Rusznák, G Bakondi, L Kosztka, K Pocsai, B Dienes, **J Fodor**, A Telek, M Gönczi, G Szűcs, L Csernoch

Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells *Virchows Arch.* 2008. 452: 415-26. **IF.:2,029**

T Deli, N Varga, A Ádám, I Kenessey, E Rásó, GL Puskás, J Tóvári, **J Fodor**, M Fehér, GP Szigeti, L Csernoch, J Timar

Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer.* 2007. 121: 55–65. **IF.:4,555**

K Pocsai, L Kosztka, G Bakondi, M Gönczi, **J Fodor**, B Dienes, P Szentesi, I Kovacs, R. Feniger-Barish, E Kopf, D Zharhary, G Szűcs, L Csernoch, Z Rusznák

Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. 63: 2364-76. **IF.:5,239**

Összesített impakt faktor: 27,374