

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A vázizom  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának módosulása egyes  
regulatórikus- és csatornafehérjék overexpressziója esetén**

**Oláh Tamás**

Témavezető:

Prof. Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Élettan és Neurobiológia Ph.D. program

DEBRECEN

2012

**A vázizom Ca<sup>2+</sup>-homeosztázisának módosulása egyes regulatórikus- és csatornafehérjék overexpressziója esetén**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Oláh Tamás okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus  
tagok: Dr. Krasznai Zoltán, kandidátus  
Dr. Ivanics Tamás, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. augusztus 28.

Az értekezés bírálói:

Dr. Várnai Péter, az MTA doktora  
Dr. Vámosi György, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus  
tagok: Dr. Krasznai Zoltán, kandidátus  
Dr. Ivanics Tamás, Ph.D.  
Dr. Várnai Péter, az MTA doktora  
Dr. Vámosi György, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. augusztus 28.

## Bevezetés

### A vázizom felépítése és élettani sajátosságai

Gerincesekben a vázizomzat a csontok egymáshoz képest történő elmozdítására szolgál, ezáltal a hely- és helyzetváltoztató mozgások kivitelezésében alapvető szerepet tölt be. Az egyedfejlődés során a kezdetben különálló izomsejtek (myoblastok) többmagvú izomcsövekké (myotubulusokká), majd hosszú, henger alakú, nem elágazó óriássejttekké, izomrostokká fuzionálnak. Az izomrostok kontrakciója az elektromechanikai csatolás (ECC) folyamata során valósul meg. A motoneuronról érkező akciós potenciál aktiválja a felszíni membrán feszültségérzékelőit – a dihidropiridin-receptorokat (DHPR) –, melyek konformációjuk megváltoztatásával a szarkoplazmatikus retikulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornáin, a rianodinreceptorokon (RyR) keresztül  $\text{Ca}^{2+}$ -ot szabadítanak fel. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) megemelkedése aktiválja az izomrostok kontraktilis rendszerét, és kiváltja az összehúzódást.

### Az inozitol 1,4,5-triszfoszfát ( $\text{IP}_3$ ) útvonal

Az izomdifferenciálódás korai szakaszában, a myoblastokban az ECC-hez szükséges bonyolult struktúrák még nem alakulnak ki. Továbbá az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  megváltozása nem csak a kontrakcióhoz, hanem egyéb életfolyamatok, pl. a sejtmozgás, a sejtosztódás, a differenciálódás, a szekréció, és az apoptózis szabályozásához is szükséges. Így a myoblastokban – a nem-ingerlékeny sejtekhez hasonlóan – a RyR szerepe alárendelt a másik fő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadításért felelős csatorna, az inozitol 1,4,5-triszfoszfát ( $\text{IP}_3$ ) receptoréhoz ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) képest. A sejtet érő stimulusok különféle, a plazmamembránban található receptorokat aktiválhatnak (pl. a V1 vazopresszin-, és a B2 bradykinin receptorokat), melyek ezután  $G_q$ -proteineken keresztül a foszfolipáz C (PLC)  $\beta$  enzimet aktiválják. A PLC a plazmamembránt alkotó foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfátot ( $\text{PIP}_2$ ) hidrolizálja, aminek következtében  $\text{IP}_3$  és diacilglicerol

(DAG) keletkezik. Az  $IP_3$  másodlagos hírvivőként fontos szerepet játszik az  $IP_3R$  megnyitásán keresztül az intracelluláris raktárakból történő  $Ca^{2+}$ -felszabadításban, míg a DAG a membránhoz kötve marad és a proteinkináz C (PKC) egyes izoformáit aktiválja.

Az  $IP_3R$ -ok nagyméretű alegységekből felépülő tetramer molekulák, az ER/SR membránjába horgonyzott C-terminussal és a citoplazmába karfiolszerűen kitüremkedő N-terminussal. Legalább háromféle altípusuk ismert ( $IP_3R$ -I, II és III), melyek szöveti elterjedése és szabályozhatósága is eltér. A RyR-éhez hasonló szerkezete ellenére eddig kevés olyan molekulát írtak le, ami részt vesz az  $IP_3R$  szabályozásában vagy közvetlenül kapcsolódik hozzá.

### **A 32 kDa-os vázizom triadin (Trisk 32)**

A triadin fehérjéket vázizomból és szívizomból is leírták. Mindkét szövettípusban többféle izoformájuk ismert, melyek alternatív splicing következtében jönnek létre. Az SR-ben lokalizálódnak, rövid citoplazmatikus N-terminális szegmentummal, transzmembrán  $\alpha$ -hélixszel, és változatos hosszúságú, egyedi lumenális C-terminális résszel rendelkeznek. A vázizomban megtalálható nagyobb – 95 kDa-os és 51 kDa-os – izoformák a differenciálódás későbbi szakaszában jelennek meg és a RyR-t szabályozzák. A legkisebb – 32 kDa-os – vázizom triadin izoforma (Trisk 32) azonban már myoblast stádiumban megjelenik, és nevével ellentétben nem a triádban, hanem az SR longitudinális tubulusában helyezkedik el. Mivel az  $IP_3R$ -hoz kapcsolódik, feltételezték róla, hogy annak a szabályozásában vehet részt, azonban ezt funkcionális mérésekkel eddig még nem bizonyították. Értekezésem első felében a Trisk 32 funkcióját és az  $IP_3R$ -ra gyakorolt szabályozó hatását vizsgáltam.

### **A raktár által vezérelt $Ca^{2+}$ -belépés (SOCE)**

Mind az  $IP_3R$ , mind a RyR működése csökkenti az SR  $Ca^{2+}$ -tartalmát. A felszabaduló  $Ca^{2+}$  egy részét a szarko-endoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáz

(SERCA) visszajuttatja az SR-be, más része eltávolítódik a sejtéből. Ez egy idő után az SR teljes kiürüléséhez vezetne, ha nem lenne olyan mechanizmus, amely az extracelluláris térből  $\text{Ca}^{2+}$ -ot juttat be a raktár újrafeltöltéséhez. Ez a mechanizmus a raktár által vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -belépés (SOCE). A SOCE feladata nem merül ki az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak újra feltöltésében, ugyanis szerepet játszik az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció megemelkedésével járó jelátviteli útvonalakban, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk amplitúdójának fenntartásában is.

Először azt feltételezték, hogy a SOCE a kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornákon (TRPC) keresztül valósul meg, ám a bizonyítékok sokszor ellentmondásosak voltak. A SOCE mechanizmus folyamata teljes részleteiben még mindig nem tisztázott, bár a helyzet sokat javult az SR  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzora, a sztrómális kölcsönható molekula 1 (STIM1), és az egyik legfontosabb raktár által vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna, az Orai1 felfedezése óta. A raktár ürülésének hatására a STIM1 molekulák az SR felszíni membrán közeli régiójába aggregálódnak, ún. pontákat képeznek, és megnyitják az Orai1 csatornákat, melyeken keresztül beáramlik a  $\text{Ca}^{2+}$ . Újabb kutatások eredményei alapján azonban a STIM1 képes megnyitni a TRPC1 csatornákat is, melyek így szintén raktár által vezérelten működhetnek. A SOCE a vázizomban is jelentős szerepet tölt be, csökkenése myopátiát okozhat.

### **A kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusa (TRPC1)**

A TRPC1 nem szelektív,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeábilis kationcsatorna, ami más TRPC csatornákkal képez funkcionális tetramereket. A SOCE mechanizmusban betöltött szerepe mindeztáig nem teljesen tisztázott, a különböző szerzők eltérő eredményeket kaptak arra vonatkozóan, hogy a TRPC1 a STIM1-Orai1 rendszer része, vagy független attól. Néhány kutatócsoport még azt is kétségbe vonja, hogy egyáltalán raktár által vezérelten működik-e. Értekezésem második felében a TRPC1 és a SOCE kapcsolatát vizsgáltam, és megpróbáltam tisztázni ezen ellentmondások egy részét.

## Célkitűzések

### A Trisk 32 funkciójának vizsgálata

A vázizom triadin négy izoformája közül a Trisk 32 élettani szerepéről van szinte a legkevesebb információnk. A fehérjét felfedező kutatócsoport – az SR longitudinális tubulusában való lokalizációja és az IP<sub>3</sub>-receptorral való kapcsolódása alapján – az IP<sub>3</sub>-receptoron keresztüli jelátvitelben betöltött szerepét tartotta valószínűnek.

- Kísérleteink első részeként célunk volt egy, a Trisk 32-t stabilan overexpresszáló L6 myoblast sejtvonal létrehozása, ami alkalmas a fehérje funkciójának vizsgálatára.
- Meg kívántuk vizsgálni a túltermelt és az endogén Trisk 32 expresszióját L6.G8 myoblastokban, valamint a kolokalizációjukat az IP<sub>3</sub>-receptorral, hogy ezen a sejtvonalon is alátámasszuk a felnőtt izomrostokról és tranziensen transzfektált tenyészetekről már leírt adatokat.
- Fluoreszcens [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mérésekkel és konfokális mikroszkóppal kívántuk vizsgálni a Trisk 32 túltermelésének hatását az IP<sub>3</sub>-receptor működésére. Ennek érdekében többféle agonistával, különböző sejtfelszíni receptorokon keresztül kívántuk aktiválni az IP<sub>3</sub>-útvonalat, és közvetlenül az IP<sub>3</sub>R-t.

Kutatásunktól azt reméltük, hogy a kapott eredmények segítségével igazoljuk a Trisk 32 IP<sub>3</sub>-receptor szabályozására gyakorolt feltételezett szerepét.

### A TRPC1 funkciójának vizsgálata

A TRPC1 SOCE mechanizmusban betöltött szerepe – a témával foglalkozó számos cikk ellenére – még mindig ellentmondásos. Arról sem egyeznek meg a vélemények, hogy a fehérje milyen kapcsolatban van a SOCE jobban ismert másik két fő résztvevőjével, a STIM1 és Orai1 fehérjékkel.

Kutatásunk során a TRPC1 differenciálódó myotubulusokban betöltött szerepének a tisztázását tűztük ki célul.

- Ehhez először egy TRPC1-et overexpresszáló C2C12 sejtvonalat kívántunk létrehozni, aminek segítségével a túltermelt fehérje funkciójára a kontroll tenyészetekkel való összehasonlítás után fény derülhet.
- Legfontosabb kérdésünk a TRPC1 túltermelésének a SOCE mechanizmusban betöltött szerepére vonatkozott, így következő lépésként funkcionális  $[Ca^{2+}]_i$  mérésekkel kívántuk igazolni, hogy a TRPC1 raktár által vezérelt csatornaként viselkedik.
- A TRPC1 túltermeltetésének a  $Ca^{2+}$ -homeosztázisban részt vevő többi fehérje expressziójára gyakorolt hatását is vizsgálni kívántuk, hogy ez által felfedhessük a köztük lévő kapcsolatot. Közülük is leginkább a STIM1 és az Orai1 expressziójának és működőképességének megváltozása érdekelt minket.
- Mivel a TRPC1-ről leírták, hogy szerepet játszik a vázizomsejtek differenciálódásában, meg kívántuk nézni, hogy ez az általunk használt tenyészetekben változik-e.

Eredményeinktől azt vártuk, hogy hozzájárulnak a TRPC1 SOCE mechanizmusban és a vázizom differenciálódásban betöltött szerepének, valamint a STIM1-Orai1 rendszerrel való kapcsolatának megértéséhez.

## **Anyagok és módszerek**

### **L6.G8 és C2C12 vázizomsejtek tenyésztése**

Az L6.G8 (továbbiakban L6) és C2C12 myoblastokat 10% foetalis borjúsérumot tartalmazó Dulbecco által módosított Eagles's Mediumban (DMEM) tenyésztettük. A sejteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubáltuk. A C2C12 sejtek myotubulussá történő differenciálódását a tápoldat módosításával biztosítottuk 90%-os konfluencia elérését követően.

### **Liposzóma mediált stabil transzfekció**

Az L6 sejtek transzfekciójához Trisk 32 cDNS-sel, míg a C2C12 sejtekéhez TRPC1 cDNS-sel klónozott pcDNA3.1 eukarióta expressziós vektort használtuk. A transzfekciót Opti-MEM tápoldatban végeztük, lipofectamine 2000 reagens felhasználásával. 48 órás expressziót követően a transzfektált tenyészeteket 1000 µg/ml geneticint tartalmazó DMEM tápoldatban tenyésztettük tovább. A szelekció 14–15. napján transzfektált sejtkolóniákat izoláltunk. Transzfekciós kontrollként üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált tenyészeteket használtunk. A fehérjék túltermelésének hatékonyságát az egyes klónokban immuncitokémiával, RT-PCR-ral és Western-blottal ellenőriztük. A funkcionális méréseket kontroll, és transzfektált L6 myoblastokon, illetve kontroll, és transzfektált, differenciáltatott 5-6 napos, sokmagvú C2C12 izomcsöveken végeztük.

### **RT-PCR**

Az RT-PCR analízishez a tenyészetekből teljes RNS-t izoláltunk Qiagen RNeasy® Mini Kit illetve Trizol reagens segítségével. Az így nyert RNS-mintából Omniscript reverz transzkripció kit felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációjához használt primereket az interneten hozzáférhető nukleotid-

szekvenciák alapján állítottuk elő. A PCR-mintákat végül 2%-os agarózgélben vizsgáltuk, EZ-Vision Three reagenssel, vagy etídium-bromiddal megfestve.

### **Immuncitokémia**

Az alábbiakban tárgyalt immunfestési technikát egyaránt alkalmaztuk az L6 és a C2C12 sejtvonalakon a Trisk 32, az IP<sub>3</sub>R, a B2 bradykinin receptor, a V1a arginin-vazopresszin (AVP) receptor, a TRPC1, a STIM1, ill. az Orai1 fehérjék kimutatására. A sejt kultúrákat jég hideg 4%-os paraformaldehid oldattal vagy -20 °C-os 100%-os metanollal 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 fluoreszcenciával vagy Cy3-mal konjugált másodlagos IgG-t alkalmaztunk. A sejtmagokat DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenilindol) tettük láthatóvá. Az eredményeket konfokális mikroszkóppal értékeltük.

### **Western-blot analízis, ko-immunoprecipitáció**

A Trisk 32, a TRPC1, a STIM1, az Orai1, az IP<sub>3</sub>R-I, II, III, a calsequestrin (CSQ), a RyR, a SERCA, az aktivált T-sejtek nukleáris faktorának 1. típusa (NFAT1), és az aktin kimutatásához teljes sejt lizátumot illetve sejtmagfrakciót készítettünk a tenyészetekből. A Western blot vizsgálathoz használt mintákat szonikálással feltártuk, majd 1/5 térfogatú, ötszörös töménységű elektroforetikus mintapuffer hozzáadásával kezeltük és 5 percig 80 °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 °C-on) inkubáltuk a primer antitest hozzáadása után. Háromszor 10 perc PBST-s (0,1% Tween 20-szal kiegészített PBS) mosás után a membránokat torma peroxidázzal konjugált IgG-vel inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcenciás reakcióval detektáltuk.

A Trisk 32 és az IP<sub>3</sub>R III. altípusának (IP<sub>3</sub>R-III) kapcsolatának felderítéséhez a ko-immunoprecipitációs vizsgálatokat kollaborációs partnerünk, Sarah Oddoux végezte. A tőlünk kapott sejtekből sejtlizátumot készített, majd ezt Trisk 32 elleni antitesttel inkubálta, és protein A-Sepharose-zal reagáltatta. Ezután az immunkomplexeket megtisztította, majd Western-blottal vizsgálta.

### **Apoptózis, életképesség, proliferáció vizsgálata**

A C2C12 tenyészetekben végbemenő apoptotikus folyamatok kimutatására a MitoProbe DilC<sub>1</sub>(5) Assay Kitet használtuk. A sejtek mitokondriális membránpotenciáljával arányos fluoreszcens jeleket 630 nm-es gerjesztő és 670 nm-es emissziós hullámhosszon vizsgáltuk FLIPR készülékkel.

Az L6 és C2C12 sejtek életképességét MTT assay-vel vizsgáltuk. A sejteket 2 órán keresztül MTT reagenssel inkubáltuk, majd a képződött formazán kristályok koncentrációját kolorimetriásan, 570 nm-es hullámhosszon határoztuk meg.

Az L6 sejtek proliferációjának mértékét <sup>3</sup>H-timidin beépülés mérésével határoztuk meg. A tenyészeteket 1 µCi/mL <sup>3</sup>H-timidin tartalmú tápoldatban inkubáltuk 16 órán keresztül, majd triklórecetsavval kicsaptuk a szolubilis fehérjét, és kiszáritást követően szcintillációs folyadék használatával detektáltuk a minták radioaktivitását.

A kontroll és transzfektált C2C12 sejtek proliferációjának és differenciálódásának összehasonlításához a sejteket azonos körülmények között tenyésztettük, és naponta felvételeket készítettünk róluk. A proliferációs ráta kiszámításához minden nap megszámloltuk a sejtmagokat és elosztottuk az előző nap során számoltakkal. A fúziós index kiszámításához a differenciáltatás elindítása után a többmagvú izomcsövekben található magok számát osztottuk el az összes sejtmag számával.

## **NFAT-riporter rendszer, X-Gal festés**

A C2C12 sejtekben az NFAT aktivitását HSP-NRE lacZ plazmiddal történő transzfekció segítségével vizsgáltuk. A transzfektált sejtek az NFAT aktivitás függvényében  $\beta$ -galaktozidázt expresszáltak a plazmidról. A myotubulusok fixálás után,  $K_4Fe(CN)_6$ -ot és  $K_3Fe(CN)_6$ -ot tartalmazó reakciós pufferben oldott 1 mg/ml X-Gal hatására, a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás mértékében kékes elszíneződést mutattak. Az elszíneződés intenzitását ImageJ program segítségével határoztuk meg.

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

A sejtek intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  változásait a Fura-2-AM fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -kötő festék segítségével mértük. A feltöltést 37 °C-on, termosztátban, 60 percen át végeztük. A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta Scan<sup>TM</sup> 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  $[Ca^{2+}]$ -t:

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

A sejteket folyamatosan perfundáltuk normál- (NTY) vagy kalciummentes Tyrode-oldattal egy külső perfúziós rendszer segítségével, és a különböző mérőoldatokat egy lokálperfúziós rendszeren keresztül adagoltuk közvetlenül a vizsgálni kívánt sejtekre.

## **Konfokális mikroszkópos mérések**

Vizsgálatainkban a Zeiss LSM 510 META lézer-pásztázó mikroszkópot használtuk Fluo-4 fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -kötő festékkel feltöltött L6 sejtek  $Ca^{2+}$  tranzienseinek nyomkövetésére. Az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$ , és így a festék által

kötött  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségének emelkedésekor a festék fluoreszcenciája fokozódik, ami fényintenzitás növekedésként detektálható. A fluoreszcencia-intenzitás változását line-scan módszerrel vizsgáltuk.

A festéket argonion-lézerrel gerjesztettük (488 nm), és a fluoreszcencia intenzitást 500–570 nm-es áteresztő szűrő segítségével detektáltuk. A sejteket kalciummentes Tyrode-oldattal folyamatosan perfundáltuk egy külső perfúziós rendszer segítségével, a mérőoldatok adagolása lokálperfúziós rendszer segítségével történt. A felvételeket egy, az intézetünkben fejlesztett program segítségével elemeztük ki. A felvételek fluoreszcenciáját (F) az alap fluoreszcenciára ( $F_0$ ) normalizáltuk, majd a tranziensek amplitúdóját  $\Delta F/F_0$ -ként határoztuk meg.

## Eredmények

### A Trisk 32 funkciójának vizsgálata

A Trisk 32 fehérje szintézisét pcDNA3.1 plazmid-vektor rendszerrel erősítettük föl L6 sejtvonalonban. A geneticines szelekció után RT-PCR, immuncitokémia, és Western-blot segítségével választottuk ki a fehérjét legnagyobb mértékben túltermelő sejtklónt, és a további kísérleteket ezen a klónon végeztük. Transzfekciós kontrollként üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált sejteket használtunk. Az üres és a Trisk 32-t tartalmazó vektorral történő transzfekció nem befolyásolta a sejtek életképességét, azonban azonos mértékben, szignifikánsan csökkentette a myoblastok proliferációját.

### *A Trisk 32 fokozza az IP<sub>3</sub>R-on keresztüli Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást*

Western-blot segítségével kimutattuk, hogy a kontroll és transzfektált sejtekben azonos mennyiségben volt jelen az IP<sub>3</sub>R-I és III, míg az IP<sub>3</sub>R-II nem volt kimutatható bennük. A domináns izoforma az IP<sub>3</sub>R-III volt. Immuncitokémiai kettős jelöléssel és ko-immunoprecipitációval igazoltuk az IP<sub>3</sub>R-III és a Trisk 32 közvetlen kölcsönhatását is a transzfektált sejtekben.

Az overexpresszió funkcionális hatásának kimutatásához az IP<sub>3</sub> útvonalat a V1 vazopresszin- és a B2 bradykinin receptorokon keresztül kívántuk aktiválni. A két receptor jelenlétét immuncitokémiával bizonyítottuk a vizsgált sejteken. Konfokális mikroszkóppal, line-scan üzemmódban végeztünk méréseket kontroll és Trisk 32-t túltermelő sejteken. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> hiányában, 0,1 μM AVP lokális adagolásával aktiváltuk az IP<sub>3</sub> útvonalat. Az AVP által kiváltott Ca<sup>2+</sup>-tranziensek amplitúdója szignifikánsan magasabb volt ( $p < 0,01$ ) a Trisk 32-t túltermelő sejtekben ( $3,25 \pm 0,23$ ,  $n=34$ , F/F<sub>0</sub>-ként kifejezve), mint a kontroll ( $1,45 \pm 0,17$ ,  $n=21$ ) és az üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált ( $2,02 \pm 0,23$ ,  $n=25$ ) myoblastokban, azonban a kontroll és az üres vektorral transzfektált sejtek esetében a tranziensek amplitúdója nem különbözött szignifikánsan. Az IP<sub>3</sub>R antagonistája, a Xestospongin C, ezeknek a tranzienseknek az amplitúdóját

szignifikánsan lecsökkentette, ami arra utalt, hogy valóban az IP<sub>3</sub>R-on keresztül szabadult fel a Ca<sup>2+</sup>. Az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> egyedi sejten történő mérésével, 20 μM bradykinin alkalmazásával, is hasonló eredményeket kaptunk mind 1,8 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> jelenlétében (a tranziensek amplitúdója 76±12 nM, n=23 volt a kontroll, és 426±84 nM, n=27 a Trisk 32-t túltermelő sejtekben, *p*<0,01; a felszálló szárak meredeksége 3,3±1,1 nM/s volt kontroll sejtekben, és 35,1±9,6 nM/s a Trisk 32-t túltermelő sejtekben, *p*<0,01), mind [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> hiányában (a tranziensek amplitúdója 97±29 nM, n=31 volt a kontroll sejtekben, illetve 217±41 nM, n=21 a Trisk 32-t túltermelő sejtekben, *p*<0,02). Megemlítendő, hogy ezek a különbségek nem a nyugalmi [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> növekedésének köszönhetőek, ugyanis az lényegében azonos volt a kontroll és transzfektált sejtekben (73±2 nM, n=31 illetve 74±2 nM, n=21, *p*>0,9) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> hiányában.

Az IP<sub>3</sub>R-t 50 μM thimerosal lokális adagolásával közvetlenül aktiválva, az így kiváltott Ca<sup>2+</sup>-tranzিয়েnssek lényegében egyformák (*p*>0,8) voltak mind az amplitúdójukat (84,2±5,4, 82,7±7,4, illetve 83,1±4,8 nM), mind a felszálló szárak meredekségét illetően (0,26±0,04 a kontroll, 0,25±0,01 az üres vektorral transzfektált, és 0,27±0,04 nM/s a Trisk 32-t túltermelő sejtekben).

#### *A Trisk 32 overexpressziója nem befolyásolja a SOCE-t*

Az IP<sub>3</sub> útvonal aktiválásakor megfigyelt nagyobb Ca<sup>2+</sup>-tranzিয়েnssek egyik magyarázata a SOCE fokozódása lehetett. A sejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-raktárát Ca<sup>2+</sup>-mentes közegben, 2 μM thapsigarginnal (TG) kiürítve, a normál [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> visszaállítása után a SOCE-t kísérő Ca<sup>2+</sup>-tranzিয়েns amplitúdója (105±18 nM, n=22 kontroll, és 126±22 nM, n=21 Trisk 32-t túltermelő sejtekben; *p*>0,4), és felszálló szárának meredeksége (0,8±0,2 nM/s kontroll és 1,4±0,4 nM/s Trisk 32-t túltermelő sejtekben; *p*>0,2) nem különbözött szignifikánsan. Emellett Western-blottal kimutattuk, hogy a STIM1 expressziója lecsökkent, míg a TRPC1 expressziója nem változott a transzfektált sejtekben. Az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> változások mérése lehetőséget adott az SR Ca<sup>2+</sup>-tartalmának vizsgálatára is.

Kontroll és Trisk 32-t túltermelő sejtekben összehasonlítottuk a TG által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek paramétereit. Sem a TG által kiváltott tranziensek integrálja ( $p>0,8$ ;  $27,0\pm 3,1 \text{ mM}\cdot\text{s}$ ,  $n=7$  és  $28,7\pm 4,5 \text{ mM}\cdot\text{s}$ ,  $n=15$ ), sem az amplitúdója ( $p>0,1$ ;  $146\pm 19$ ,  $n=7$  és  $199\pm 25$ ,  $n=15$ ) nem változott meg szignifikánsan az overexpresszió hatására.

#### *A Trisk 32-t túltermelő myoblastokban nem változik a RyR működése*

Az  $\text{IP}_3\text{R}$ -on keresztül felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  a RyR-on keresztül  $\text{Ca}^{2+}$ -indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást (CICR) válthat ki. Annak vizsgálatára, hogy a Trisk 32 overexpressziója a RyR-en keresztül fejti-e ki a hatását, 30 mM koffein adagolásával aktiváltuk a receptorokat, azonban a sejtek jelentős része nem reagált az anyagra, és a megfigyelt tranziensek amplitúdója is hasonló ( $p>0,3$ ) volt a kontroll ( $61\pm 7 \text{ nM}$ ,  $n=19$ ) és transzfektált ( $53\pm 6 \text{ nM}$ ,  $n=20$ ) sejtekben. Emellett a RyR expressziója sem volt kimutatható a sejtekben Western-blot segítségével. Amikor a RyR antagonistája, 10  $\mu\text{M}$  rianodin jelenlétében a Trisk 32-t túltermelő sejteket bradykininnel vagy AVP-vel stimuláltuk, a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek amplitúdója nem különbözött szignifikánsan a gátlószer alkalmazása nélkül kapott eredményekhez képest, ami alapján a CICR szerepe elhanyagolhatónak tekinthető ezekben a sejtekben.

#### **A TRPC1 funkciójának vizsgálata**

A TRPC1 fehérje szintézisét pcDNA3.1 plazmid-vektor rendszerrel erősítettük föl C2C12 myotubulusokban. 2 hét geneticines szelekció után RT-PCR, immuncitokémia, és Western-blot segítségével választottuk ki a fehérjét legnagyobb mértékben túltermelő sejtklont. Transzfekciós kontrollként üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált sejteket használtunk. A funkcionális mérésekhez kontroll és TRPC1-et overexpresszáló, differenciáltatott, 5 napos izomcsöveket használtunk. MTT assay és  $\text{DilC}_1(5)$  Assay segítségével

kimutattuk, hogy az overexpresszió hatására nem csökkent a sejtek életképessége, és nem nőtt az apoptózisra való hajlamuk sem.

#### *A TRPC1 túltermeltetése fokozza a SOCE-t*

A TRPC1 overexpresszió SOCE-ra gyakorolt hatásának kimutatásához a sejtek belső  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárát  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Tyrode-oldatban  $4\ \mu\text{M}$  thapsigarginnal kiürítettük, majd a normál,  $1,8\ \text{mM}$ -os  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  visszaállítása után mértük az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változását. A TRPC1 overexpresszió következményeként a SOCE-t kísérő  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens amplitúdója ( $129\pm 6\ \text{nM}$ ,  $n=14$  a kontroll, és  $210\pm 19\ \text{nM}$ ,  $n=24$  a TRPC1-et overexpresszáló sejtekben) és felszálló szárának meredeksége ( $3,7\pm 0,6\ \text{nM/s}$ ,  $n=20$  a kontrollban, és  $6,1\pm 0,7\ \text{nM/s}$ ,  $n=24$  a TRPC1-et túltermelő sejtekben) szignifikánsan nőtt a transzfektált izomcsövekben. A TRPC1-et kisebb mértékben túltermelő sejtklónokban a SOCE nagysága a TRPC1 expresszió mértékével korrelált. Az üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált myotubulusokban a SOCE a kontrollhoz hasonló nagyságú volt ( $3,0\pm 0,3\ \text{nM/s}$ ,  $n=12$  a felszálló szár meredeksége, és  $155\pm 10\ \text{nM}$ ,  $n=13$  az amplitúdója;  $p>0,3$ ). A nyugalmi  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a kontroll és TRPC1-et túltermelő sejtekben közel azonos volt, ráadásul a thapsigargin által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek amplitúdójában sem volt szignifikáns különbség, ami arra utal, hogy az SR  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalma nem változott a TRPC1 overexpressziójának hatására. Amikor a kontroll és a transzfektált izomcsöveket a thapsigargin adagolásával egy időben a TRPC inhibitor YM-58483-mal kezeltük, a SOCE tulajdonságaiban mutatkozó különbségek nem csak megszűntek, hanem a SOCE kialakulásának sebessége a TRPC1-et túltermelő izomcsövekben ( $1,1\pm 0,2\ \text{nM/s}$ ,  $n=16$  a tranziensek felszálló szárának meredeksége) még a kontrollnál ( $1,8\pm 0,3\ \text{nM/s}$ ,  $n=19$ ) is alacsonyabb volt. Az anyag jelenlétében a SOCE kis mértékben, de nem szignifikánsan, kisebb volt a TRPC1-et túltermelő sejtekben a kontrollhoz képest, ami ezekben a sejtekben a STIM1-Orai1 rendszer csökkent működésére utalhat.

### *A TRPC1-et túltermelő sejtekben csökken a STIM1 és a SERCA expressziója*

Ahhoz, hogy az előző feltevést bizonyítsuk, a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli útvonalakban részt vevő fontosabb fehérjék expresszióváltozását Western-blottal vizsgáltuk. Eredményeink alapján a STIM1 és a SERCA expressziója szignifikánsan csökkent, míg az aktin, az Orail, a RyR és a calsequestrin expressziója nem változott. Azonban immuncitokémiával megfigyeltük, hogy a lecsökkent mennyiségű STIM1 is képes ponttákkba rendeződni, ezáltal funkcionális maradhat.

A SERCA expressziócsökkenés élettani hatásainak vizsgálatához 120 mM KCl-dal depolarizáltuk az izomcsöveket, és az így kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket vizsgáltuk. Sem a tranziensek amplitúdója ( $235 \pm 30$  nM,  $n=16$  a kontroll, és  $230 \pm 23$  nM,  $n=26$  a transzfektált sejteknél), sem az SR-ből történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás fluxusa ( $188 \pm 21$   $\mu\text{M/s}$  az előbbinél, és  $193 \pm 14$   $\mu\text{M/s}$  az utóbbinál) nem változott szignifikánsan ( $p > 0,8$ ) a TRPC1-et túltermelő izomcsöveken, ami arra utal, hogy sem a RyR-on keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás, sem a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák működése nem változott. Másrészt viszont, a tranzienseket követően az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szignifikánsan lassabban csökkent és magasabb alapértékre állt be a transzfektált izomcsövekben (a nyugalmi  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  különbsége a tranziensek előtti és utáni állapot között  $3,5 \pm 0,6$  nM volt a kontroll, és  $11,0 \pm 1,2$  nM volt a TRPC1-et túltermelő sejtekben), ami a SERCA pumpák csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -felvevő kapacitására utal. Ezt a  $\text{PV}_{\text{max}}$  számolásával számszerűsítettük, ami szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) csökkent a TRPC1-et túltermelő izomcsövekben ( $342 \pm 20$   $\mu\text{M/s}$ ) a kontrollhoz ( $465 \pm 39$   $\mu\text{M/s}$ ) képest.

### *A TRPC1 túltermeltetése zavarokat okoz a sejtek differenciálódásában*

A TRPC1-et túltermelő tenyészetek morfológiájának eltérését is megfigyelhettük a kontrollhoz képest a differenciálódás során. Azonos körülmények között tenyésztve, a többmagvú izomcsövek később jelentek meg

és vékonyabb átmérőjűek voltak a TRPC1-et túltermelő tenyészetekben, mely megfigyeléseket a proliferációs ráta és a fúziós index számolásával számszerűsítettük. A morfológiai változások okát keresve, az NFAT1 nevű transzkripciós faktor csökkent magbéli aktivitását fedeztük fel a TRPC1-et túltermelő sejtekben Western-blot, illetve HSP-NRE NFAT-riporter plazmid és X-Gal festés ( $p < 0,05$ ;  $57,5 \pm 1,4$  AU,  $n=75$  kontroll, és  $46,1 \pm 2,6$  AU,  $n=45$  TRPC1-et overexpresszáló myotubulusokban) alkalmazásával.

## Megbeszélés

Disszertációmban két olyan fehérjét vizsgáltam, melyek élettani szerepe nem teljesen ismert. Mindkettőről feltételezik, hogy részt vesz a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának szabályozásában, az egyik a szarkoplazmatikus retikulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárából történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulásban, a másik a raktárürülést követő extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlásban (SOCE mechanizmusban) tölthet be fontos szerepet. A disszertációmát megalapozó kísérletek során bebizonyosodott, hogy vizsgálataim egyik tárgya, a vázizom triadin 32 kDa-os izoformája (Trisk 32) erőteljesen fokozza az  $\text{IP}_3$  receptoron ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást, míg a kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusa (TRPC1) a SOCE mechanizmusban vesz részt  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornaként.

### A Trisk 32 fokozza az $\text{IP}_3\text{R}$ működését

Patkány vázizomban a triadin fehérjének négy izoformája azonosítható, melyek ugyanazon génről képződő splicing variánsok. A Trisk 32 élettani szerepéről kevés információval rendelkezünk. Feltételezések szerint a szarkomer struktúrájának fenntartásában és az  $\text{IP}_3\text{R}$ -on keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás szabályozásában vehet részt.

Kutatásunk során patkány eredetű L6.G8 myoblastokat használtunk, melyek nem képesek myotubulusokká differenciálódni, így bennük az  $\text{IP}_3$  út vonal a RyR zavaró hatása nélkül tanulmányozható. A sejtekben stabil transzfekcióval túltermeltettük a Trisk 32 fehérjét, melyet RT-PCR, immuncitokémia, és Western-blot segítségével igazoltunk. Kimutattuk az  $\text{IP}_3\text{R}$  és a Trisk 32 kolokalizációját a transzfektált sejtekben, valamint ko-immunoprecipitációval igazoltuk a két fehérje közvetlen kapcsolódását is.

A Trisk 32 overexpressziójának funkcionális hatását konfokális mikroszkóppal és egyedi sejten történő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -méréssel vizsgáltuk. Az  $\text{IP}_3$  mediált  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást arginin-vazopresszin és bradykinin lokális adagolásával értük el. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok során

bebizonyosodott, hogy 0,1  $\mu\text{M}$  AVP lokális adagolására a Trisk 32-t túltermelő sejtek szignifikánsan nagyobb amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket produkálnak a kontroll és az üres vektorral transzfektált sejtekhez képest. A 20  $\mu\text{M}$  bradykinin által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek amplitúdója és felszálló szárának meredeksége is szignifikánsan nagyobb volt a Trisk 32-vel transzfektált sejtekben a kontroll sejtekhez képest, normál extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) mellett és  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes közegben egyaránt. Az, hogy az V1 vazopresszin és B2 bradykinin receptor stimulálása is hasonlóan megemelkedett választ váltott ki a Trisk 32-t túltermelő sejtekben, arra utal, hogy a vizsgált fehérje nem közvetlenül a két membránreceptorra hat.

Az  $\text{IP}_3\text{R}$  thimerosallal történő közvetlen ingerlése a kontroll és transzfektált sejtekben azonos nagyságú  $\text{Ca}^{2+}$ -válaszokat váltott ki, aminek két oka lehet. Az egyik lehetőség az, hogy az  $\text{IP}_3\text{R}$  konduktanciája nem változott a Trisk 32 overexpresszió következtében. A másik pedig az, hogy a Trisk 32 az  $\text{IP}_3\text{R}$ -I-et nem, csak az  $\text{IP}_3\text{R}$ -III-at szabályozza, ez utóbbira pedig nem hat a szer.

Az endoplazmás retikulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmának kiürülése során a belső raktárak feltöltésére az extracelluláris térből  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás történik. E jól szabályozott  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételi mechanizmust raktár által vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -belépésnek nevezzük. A Trisk 32 overexpressziójának következtében a SOCE-t kísérő  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens amplitúdója és meredeksége nem változott szignifikánsan a benne részt vevő STIM1 fehérje expressziójának módosulása ellenére.

Az  $\text{IP}_3\text{R}$ -on keresztül felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  a szomszédosan elhelyezkedő rianodinreceptorok megnyílását, és rajtuk keresztül további  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulását okozhatja ( $\text{Ca}^{2+}$ -indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás). A RyR szerepét a receptor agonistája, (30 mM koffein) illetve antagonistája (10  $\mu\text{M}$  rianodin) alkalmazásával vizsgáltuk, mely esetekben nem volt szignifikáns különbség a két sejtípus között. Ez arra utal, hogy a Trisk 32 overexpressziója nem befolyásolja sem a RyR működését, sem a CICR-t a vizsgált sejtekben.

Eredményeink arra utalnak, hogy a Trisk 32 nem csak közvetlenül kapcsolódik az IP<sub>3</sub> receptorhoz, de jelentős mértékben részt vesz az azon keresztül történő Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás szabályozásában is.

### **A TRPC1 overexpressziója felerősíti a SOCE-t**

Munkám második felében a TRPC1 funkcióját vizsgáló kísérleteinkről számoltam be. Itt a TRPC1 overexpressziójának hatását vizsgáltuk a SOCE mechanizmusra, melynek működése számos fehérje (STIM1, Orai1 és TRPC1) együttműködésétől függ. Ismert, hogy a STIM1 feladata a [Ca<sup>2+</sup>] érzékelése az ER-ben, az Orai1 a felszíni membrán Ca<sup>2+</sup>-csatornája, míg a TRPC1 szerepe – mint raktár által vezérelt csatorna, vagy ennek része – és kapcsolata az előbbi két fehérjével nem teljesen tisztázott.

Kísérleteinkben liposzóma-mediált plazmid transzfekcióval C2C12 egér eredetű vázizomsejtekben túltermeltettük a TRPC1 fehérjét. Az overexpressziót mRNS szinten RT-PCR-ral, fehérje szinten pedig immuncitokémiával és Western-blot technikával igazoltuk.

A TRPC1 overexpresszió eredményeként a SOCE-t kísérő Ca<sup>2+</sup>-tranziens amplitúdója és felszállási meredeksége szignifikánsan nőtt a TRPC1-et túltermelő C2C12 myotubulusokban. Ez az overexpresszió mértékével korrelálni látszott. A TRPC antagonistá YM-58483 alkalmazása során a TRPC1-et overexpresszáló myotubulusokban a SOCE-val együtt járó Ca<sup>2+</sup>-tranziens meredeksége szignifikánsan, amplitúdója pedig kissé, de nem szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, ami a túltermelődött TRPC1 gátolhatósága mellett a STIM1-Orai1 rendszer csökkent működésére is utalhat.

Ezekben a sejtekben a STIM1 valamint a SERCA expressziójának csökkenését Western-blot technikával igazoltuk is. Utóbbi magyarázhatja azon megfigyelésünket, hogy 120 mM KCl által kiváltott Ca<sup>2+</sup>-tranzienseket követően a Ca<sup>2+</sup>-visszavétel lassult, és magasabb nyugalmi [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> volt megfigyelhető. A két fehérje expressziócsökkenése feltehetőleg a sejtek kompenzációs válasza

volt a TRPC1 overexpressziójára. A STIM1 csökkenése – bár a ponttákkba rendeződésre továbbra is képes maradt – a SOCE másik útvonala, az Orai1-en keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -belépés csökkentését okozhatta, míg a SERCA csökkenése a raktár túltöltődésétől védhette meg a sejteket.

A TRPC1 fehérje túltermeltetésének hatására morfológiai változásokat is észleltünk, a myoblastok differenciálódása később kezdődött, és a myotubulusok vékonyabbak voltak a kontroll sejtkultúrákhoz viszonyítva. Ezekért, a myotubulusok fúziójának beindításához szükséges, NFAT1 (aktivált T-sejtek nukleáris faktora 1) nevű transzkripciós faktor csökkent sejtmagon belüli aktivitását tettük felelőssé, melyet magfrakció izolálásával és az ezen végzett Western-blot vizsgálattal igazoltunk is. Mivel az NFAT aktivitásváltozása  $[\text{Ca}^{2+}]$ -függő folyamat, a TRPC1 túltermeltetés következtében megváltozott SOCE, vagy a KCl által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek utáni magasabb nyugalmi  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ezen keresztül okozhatta a sejtek csökkent differenciálódási képességét. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a transzfektált myotubulusok életképessége és apoptózisra való hajlama nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest.

Eredményeink arra utalnak, hogy a TRPC1 expressziójának növelése a SOCE fokozódását okozza, és negatív visszacsatolással szabályozza a STIM1-Orai1 rendszert és a SERCA aktivitását, valószínűvé téve ezen fehérjék együttműködését.

## Összefoglalás

Értekezésemben olyan fehérjék szerepét vizsgáltam, amelyek részt vesznek a vázizom differenciálódás korai stádiumaiban az IP<sub>3</sub> receptor (IP<sub>3</sub>R) és a raktár által vezérelt Ca<sup>2+</sup>-belépés (SOCE) szabályozásában.

A vázizom triadin 32 kDa-os izoformájának (Trisk 32) élettani szerepéről eddig nem voltak konkrét információink. L6 myoblastokban túltermeltetve kimutattuk a kolokalizációját és közvetlen kölcsönhatását az IP<sub>3</sub>R-ral, és ennek a funkcionális következményeit is megfigyeltük. Az IP<sub>3</sub> útvonalat mind a B2 bradykinin, mind a V1 AVP receptorokon keresztül aktiválva a megfigyelt Ca<sup>2+</sup>-tranziensek jóval nagyobbak voltak a Trisk 32-t overexpresszáló sejtekben, mint a kontrollban. Ezek a nagyobb tranziensek azonban nem a rianodinreceptor aktivitása vagy a SOCE mechanizmus fokozódása által jöttek létre, hanem sokkal valószínűbb, hogy a Trisk 32 közvetlenül hatással van az IP<sub>3</sub>R megnyílására.

A SOCE mechanizmus több fehérje összehangolt működése révén valósul meg. A legtöbben elfogadják, hogy a kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusa (TRPC1) is részt vesz a folyamatban, ám a szerepe sok esetben ellentmondásos. A TRPC1-et C2C12 myotubulusokban termeltettük túl, és kimutattuk, hogy a transzfektált sejtekben az overexpresszió mértékével arányosan fokozódik a SOCE mértéke. Ezekben a sejtekben megfigyeltük a sztrómális kölcsönható molekula 1 (STIM1) – az SR Ca<sup>2+</sup>-szenzora – és a szarko-endoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPáz (SERCA) expresszió-csökkenését is, amely kompenzációs válasz lehetett a raktár túltöltődésének elkerülése érdekében. A TRPC1-et túltermelő sejtek differenciálódásában is zavarok keletkeztek, melyért az aktivált T-sejtek nukleáris faktora 1 (NFAT1) transzkripciós faktor csökkent sejtmagi aktivitását tettük felelőssé. Eredményeink alapján a TRPC1 részt vesz a SOCE mechanizmusban és negatív visszacsatolással hatással van a STIM1-Orai1 rendszer működésére is.

# Közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

---

Iktatószám: DEENKÉTK /7/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Oláh Tamás

Neptun kód: AG9SAN

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oláh, T.**, Fodor, J., Oddoux, S., Ruzsnavszky, O., Marty, I., Csernoch, L.: Trisk 32 regulates IP3 receptors in rat skeletal myoblasts.  
*Pflugers Arch. Epub ahead of print (2011)*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-011-1001-y>  
IF:3.354 (2010)
2. **Oláh, T.**, Fodor, J., Ruzsnavszky, O., Vincze, J., Berbey, C., Allard, B., Csernoch, L.: Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells.  
*Cell Calcium. 49 (6), 415-425, 2011.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.012>  
IF:3.553 (2010)



### További Közlemények

3. Varga, Z., Juhász, T., Matta, C., Fodor, J., Katona, É., Bartók, Á., **Oláh, T.**, Sebe, A., Csernoch, L., Panyi, G., Zákány, R.: Switch of voltage-gated k channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic ca-oscillations and cartilage formation.  
*PloS One.* 6 (11), e27957, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027957>  
IF:4.411 (2010)
4. **Oláh, T.**, Fodor, J., Ruzsnavszky, O., Berbey, C., Allard, B., Csernoch, L.: The Alterations of Store-Operated Calcium Entry in TRPC1-Overexpressing C2C12 Myotubes.  
*Biophys. J.* 98 (3 Suppl. 1), 152a-153a, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.820>
5. Fodor, J., Matta, C., Juhász, T., **Oláh, T.**, Gönczi, M., Szíjgyártó, Z., Gergely, P., Csernoch, L., Zákány, R.: Ionotropic purinergic receptor P2X4 is involved in the regulation of chondrogenesis in chicken micromass cell cultures.  
*Cell Calcium.* 45 (5), 421-430, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2009.02.004>  
IF:4.288
6. Fodor, J., Gönczi, M., Sztretye, M., Dienes, B., **Oláh, T.**, Szabó, L., Csoma, E., Szentesi, P., Szigeti, G.P., Marty, I., Csernoch, L.: Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca<sup>2+</sup> release events and global Ca<sup>2+</sup> signals in skeletal muscle cells in culture.  
*J. Physiol.* 586 (23), 5803-5818, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160457>  
IF:4.649

**Összesített impakt faktor: 20.255**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.907**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.01.10

*Az értekezés témájához kapcsolódó előadások listája:*

**Oláh T:** Trisk 32 regulates IP<sub>3</sub> receptors in rat skeletal myoblasts. PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine. Debrecen, 2011.

Fodor J, **Oláh T**, Ruzsnavszky O, Oddoux S, Szentesi P, Marty I, Csernoch L: Role of Trisk 32, the 32 kDa triadin isoform, in the calcium homeostasis of skeletal muscle. XXXIX European Muscle Conference (EMC). Padova, Olaszország, 2010.

**Oláh T:** The alterations of store-operated calcium entry in TRPC1-overexpressing C2C12 myotubes. PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine. Debrecen, 2010.

**Oláh T:** A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az IP<sub>3</sub> receptoron keresztül történő Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokon. Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola szimpóziuma. Debrecen, 2009.

*Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája:*

**Oláh T**, Fodor J, Ruzsnavszky O, Berbey C, Allard B, Csernoch L: The alterations of store-operated calcium entry in TRPC1-overexpressing C2C12 myotubes. Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA, 2010.

**Oláh T**, Fodor J, Ruzsnavszky O, Tóth A, Tóth J, Marty I, Csernoch L: A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az IP<sub>3</sub> receptorokon keresztül történő Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokban. A Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése. Budapest, 2009.

Fodor J, **Oláh T**, Berbey C, Csernoch L, Allard B: A TRPC1 overexpresszió hatása a raktár által vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -belépésre C2C12 myotubulusokban. A Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése. Budapest, 2009.

**Oláh T**, Fodor J, Ruzsnavszky O, Tóth A, Marty I, Csernoch L: A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az  $\text{IP}_3$  receptorokon keresztül történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokban. 39. Membrán Transzport Konferencia. Sümeg, 2009.