

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Dr. Hajdú Tibor

Témavezető: Dr. Zákány Róza, PhD



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

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

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

Írta: Dr. Hajdú Tibor okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Zákány Róza, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
Dr. Tóvári József, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet
(Élettudományi Központ 3.009-010, könyvtár)
2022. április 1. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
Dr. Tóvári József, PhD
Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Anatómiai, Szövet- és
Fejlődéstani Intézet tanterme
2022. április 1. 13 óra

Bevezetés

Az N-metil-D-aszpartát receptor

Az ionotróp glutamát receptorok (iGluR) családját két alcsoportra oszthatjuk, melyet a szintetikus iGluR agonista, az N-metil-D-aszpartát (NMDA) nagyfokú specificitása tett lehetővé. Ennek megfelelően beszélhetünk NMDA és nem-NMDA típusú glutamát receptorokról. Bár az NMDAR-ok a többi iGluR-hoz hasonlóan nem szelektív kationcsatornaként funkcionálnak, a nem-NMDA típusú receptorokkal szemben mégis leginkább Ca^{2+} -okra permeábilisak.

Az NMDAR-ok három alegység típus kombinációjából (GluN1, GluN2 és GluN3) szerveződhetnek di- vagy triheterotetramer komplexekké. Az alegységek számos splice variánssal rendelkeznek, továbbá a GluN2 és GluN3 alegységeknek több izoformája is ismert (GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, illetve GluN3A és GluN3B). Az ioncsatorna létrejöttéhez elengedhetetlen két GluN1 alegység részvétele, ugyanis ezek képezik a csatorna pórúsát, továbbá a koaktivációhoz szükséges glicin kötőhelyét is biztosítják. Az alegység GluN1-1a splice variánsának intracelluláris doménje egy funkcionális szempontból releváns nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) rendelkezik. A receptor glutamát (és NMDA) kötőhelyét a GluN2 alegységeken találjuk. A GluN3 alegység nem köt L-glutamátot, de a GluN1-hez hasonlóan rendelkezik glicin kötőhellyel. *In vivo* funkcionális vizsgálatok szerint a GluN3 alegység a GluN1 és GluN2 alegységekkel közösen alkot csatornát. Az ilyen triheterotetramer komplexek *bonafide* NMDAR-oknak tekinthetők, azonban a konvencionális NMDAR-okhoz képest árnyaltabb funkciókkal jellemezhetők.

Azok az NMDAR-ok, melyek GluN1-GluN3 diheterotetramerek kötőhely hiányában nem reagálnak L-glutamátra vagy NMDA-ra. Az ilyen NMDAR-ok tehát tulajdonképpen glicin kapuzott, excitatórikus ioncsatornák. Az alternatív glicin receptorként felfogható, serkentő jellegű GluN1-GluN3 NMDAR-ok *in vivo* létezése ellentmondásos, azonban farmakológiai vizsgálatok egyre precízebb lehetőségeket biztosítanak a pontosabb meghatározáshoz.

A kalcium és a sejtek jelátviteli folyamatai

Mivel az NMDAR-ok elsősorban Ca^{2+} -okra permeábilisak, ezért feltétlenül szükséges néhány szót külön szólnom a Ca^{2+} -ok sejtéletbeni folyamatokban betöltött szerepeiről. A Ca^{2+} -ok evolúciós szempontból a legősibb másodlagos jelátviteli hírvivők, melyek nem igényelnek enzimeket a szintézisükhöz, gyorsan mobilizálhatók, illetve eliminálhatók, mindemellett

koncentrációváltozásaik, az igények függvényében, generalizáltak vagy lokálisak is lehetnek, azaz térben jól szabályozhatók. Hosszantartó ingerlés és a csatornák gyors, egymás utáni megnyílásai következtében a Ca^{2+} -tranziensek oly gyakran követhetik egymást, hogy oszcillációkat hoznak létre.

A Ca^{2+} -ok legfőbb előnye, amellyel egyedülállóvá váltak a jelátvitel számára, hogy a lehetőségek számtalan, egyedi kombinációit biztosítják. Mivel a Ca^{2+} -ok bekötődése nagyszámú citoszolikus fehérje működését módosítja, ezért ezt a sejtkompartmentet alapvetően igen alacsony Ca^{2+} -koncentráció jellemzi. A Ca^{2+} -csatornák megnyílásainak következtében a citoszolban felszabaduló Ca^{2+} -ok szinte valamennyi sejtélettani funkcióban szerepet játszanak. Külön kiemelendő ezek közül a génexpresszió irányítása és befolyásolása, mely elsősorban a Ca^{2+} -ok kötése következtében sejtmagba kerülő transzkripciós faktorok révén valósul meg.

Az idegrendszeren kívül I.: az ízületi porc

A porcszövetről röviden

A porcszövet a gerincesek – és így az ember – egyik alapvető kötő- és támasztószöve. A porcszövetben a kerekded porcsejtek (chondrocyták) termelik az összetett és jellegzetes makromolekulákból álló, arányaiban nagy mennyiségű extracelluláris mátrixot (ECM), melynek jelenléte elengedhetetlen előfeltétele a porcsejt fenotípus megőrzésének.

A porcmátrix kötőszöveti rostokból és alapállományból áll. A rostok alkotói nagyobbbrészt kollagén molekulák, melyek jelentős többsége II. típusú kollagén a hyalinporcban. A porcmátrix rostok közötti alapállományát proteoglikánok (PG) és multiadhezív, nem kollagén glikoproteinek alkotják. A hyalinporc PG-jai közül kitűnik az aggregán, ami a porcmátrixra leginkább specifikus molekulának tekinthető. Az aggregán monomer a nagyszámú kondroitin-szulfát és keratán-szulfát glükózaminoglikánok (GAG) oldalláncnak egy központi tengelyfehérje mentén való, kémcsőmosókefe-szerű rendeződése révén jön létre és hialuronsavhoz kapcsolódva hatalmas molekula-aggregátumokat alakít ki. Ezek felelősek a porc-alapállomány jelentős víztartalmáért.

Az érett porcban a porcsejtek kikerülnek a sejtciklusból, gyakorlatilag posztmitotikus sejtekké válnak és ez szövetsérülés esetén sem változik. Emellett a porcszövet érmentes, így az egyik legcsekélyebb regenerációs képességgel jellemezhető alapszövetünk, ami pedig döntő faktor a porc patológiás elváltozásainak kialakulásában. Az is egyre nyilvánvalóbb tehát, hogy az ízületi porcot érintő betegségek kialakulásáért sok esetben a porcfejlődéshez köthető gének, illetve

celluláris mechanizmusok patológiás változásai tehetők felelőssé, ezért a porcdifferenciációt szabályozó folyamatok pontosabb megismerése elősegítheti e betegségek oki kezelésére szolgáló gyógyszerek, módszerek fejlesztését.

A porcdifferenciáció

A porcszövet kialakulása az embrionális élet korai szakaszában kezdődik, ez pedig megnehezíti a fiatal porcszövettel történő *in vivo* kísérletek kivitelezhetőségét. Az egyik leginkább elterjedt *in vitro* megközelítés a Hamburger és Hamilton szerinti 22–24-es fejlődési stádiumban lévő csirkeembriók mellső és hátsó végtagtelepeiből izolált primer, nagy sejtsűrűségű, ún. high density (HD) sejt kultúrák, melyek döntően chondroprogenitor mesenchymalis sejtekből állnak. A módszer előnye, hogy a kezdeti mesenchymalis sejtek úgy válnak érett porcsejteké a sejttenyésztés végét jelentő 6. napra, hogy differenciációs programjuk spontán, a nagy kezdeti sejtsűrűség és a fokozatosan elért differenciáltsági állapotok következtében, automatikusan végbemegy.

A porcfejlődés kezdetekor a chondroprogenitor sejtek csomókat, ún. nodulusokat formálnak, majd a sejttenyésztés 2–3. napján, mely a differenciálódás kritikus időpontja ezekben a sejt kultúrákban, porcsejteké alakulnak. A nodulusképződés kezdete olyannyira kritikus a porcfejlődés során, hogy ezt a lépést már eleve tekinthetjük a chondroprogenitor sejtek chondrogenicus irányba történő elköteleződésének.

A sejt-sejt kapcsolatok kialakulása következtében a citoskeletális organizáció megváltozik, a nyúlványos, fibroblast-szerű sejtek lekerekednek és a porcképződést serkentő citokineket, illetve növekedési faktorokat kezdenek termelni. A csont morfogénikus protein (BMP), a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) és a fibroblast növekedési faktor (FGF) szignalizációk a porcfejlődésben kulcsfontosságú SOX9 transzkripciós faktor expresszióját fokozzák. A SOX9-fehérjék a porcspecifikus ECM-komponens gének expresszióját fokozzák. A SOX9 aktivitását a molekula foszforilációja felerősíti, ezért – direkt vagy indirekt módon – különféle kinázok (pl. protein kináz A, protein kináz C) és foszfatázok (pl. foszfoprotein foszfatáz 2A, foszfoprotein foszfatáz 2B) alapvetően befolyásolják azt.

Amit vázrendszeri sejtekben az NMDAR-okról és a Ca^{2+} -okról eddig tudunk

Közel 20 éve, hogy az NMDAR alegységek expresszióját azonosították porcsejteken. Az érett, humán ízületi porcsejteken detektált NMDAR-ok feltehetően mechanotranszdukciós útvonalakat szabályoznak és fontos szerepük lehet a porcsejtek osteoarthritisben megváltozott

viselkedésében. Ennek ellenére az NMDAR-ok chondrogenicus folyamatokban betöltött szerepe azonban idáig felderítetlen terület maradt.

Függetlenül attól, hogy milyen alegység-összetételű NMDAR-okról beszélünk, receptor-aktiváció hatására végeredményben Ca^{2+} -ok áramlanak az intracelluláris térbe. Jelenlegi ismereteink szerint a Ca^{2+} -függő jelátviteli útvonalak fontos szerepet tölthetnek be a mesenchymalis sejtek differenciációjában. Laboratóriumunk korábbi eredményei szerint a HD kultúrákban differenciálódó porcsejtek citoszoljában mérhető Ca^{2+} -szintjük a hosszabb távon (napi léptékben) változó bazális intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mellett gyors változásokat is mutattak. Szintén laboratóriumunk dokumentálta a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés (SOCE) szerepét is a chondrogenicus folyamatokban.

Az idegrendszeren kívül II.: egészséges és patológiás pigmentsejtek

Melanocyták a bőr epidermisében

A melanocyták pigmentek termeléséért felelős nyúlványos sejtek, melyek elsősorban a bőr epidermisének bazális sejtrétegében fordulnak elő. A pigmentsejtek legfőbb feladata a melanin nevű pigment szintézise, ami citoplazmatikus, membránnal körülvett sejtorganellekben, az ún. melanoszómbákban történik. Mivel a melanin képes elnyelni az ultraibolya (UV) sugárzás 50–75%-át, ezért a pigmentek legfontosabb szerepének az UV-sugárzással szembeni védelmet tekintjük. A keratinocytákba transzportált pigment tartalmú melanoszómbák a citoplazmában a sejtek magjai fölé rendeződnek így egyfajta „sapkát” képeznek és védik a sejtmag DNS-tartalmát az UV-sugárzás mutagén hatásaitól. Természetesen az epidermisben ily módon képződő „pigment ernyő” a dermis sejteinek számára is védelmet nyújt.

Melanoma malignum cutis

A melanoma malignum cutis a bőr melanocytáinak rosszindulatú daganata. Ugyan a melanoma malignum cutis csak 4%-át adja a bőr eredetű daganatos eseteknek, mégis jelentős részét képezik az ezekből kifolyó halálozásoknak. A betegséget növekvő incidenciája és mortalitása miatt a legveszélyesebb proliferatív elváltozások közé szokták sorolni.

A melanoma kialakulásáért felelős rizikófaktorok közt megkülönböztetünk környezeti és genetikai hatásokat. Az egyik legnyilvánvalóbb környezeti ágens a napsugárzás részét képező UV-irradiáció. A rizikófaktorok közt említést érdemelnek bizonyos mutációk is (ciklin-dependens kináz inhibitor 2A, BRAF, NRAS), melyek daganatképződést eredményeznek.

A kialakuló daganat többlépcsős folyamatban juthat el a legkedvezőtlenebb kimenetelű klinikai stádiumig, mely során jól definiálható hisztológiai progressziót írhatunk le. A kezdeti stádiumban a tumor *in situ*, azaz a hám bazális sejtrétegét nem lépi át (I. stádium). Egy ponton túl azonban a daganatos sejtek áttörnek a membrana basalist és elkezdnek behatolni a papilláris dermisbe (II. stádium). Ezt követően a daganatos sejtek betérjednek előbb a reticularis dermisbe (III. stádium), majd a subcutisba (IV. stádium). A progresszió következő szakaszát az áttétek képzése jelenti. A melanomával kapcsolatos halálozásért leginkább a távoli áttétek tehetőek felelőssé, amikor a metasztázisok különböző szerveket érintenek.

Amit humán pigmentsejtekben az NMDAR-okról és a Ca^{2+} -okról eddig tudunk

Mivel a melanocyták az epidermisben való megtelepedésük előtt a neuroectodermából, azon belül is a dúclécből (*crista neuralis*) vándorolnak ki, nem meglepő, bár kevésbé és nem rég ismert, hogy NMDAR alegységeket (GluN2A, GluN2C) expresszálnak; ezek pontos összetételéről azonban még nincsenek információk. A GluN2(A) tehát a melanocytákkal (és a melanoma sejtekkel is) leginkább összefüggésbe hozott NMDAR alegység, míg e tekintetben a GluN1 és GluN3 alegységek funkciói homályosak. A melanocyták nem képesek glutamátot termelni, így elképzelhető, hogy a melanocyták glutamához köthető jelátviteli folyamatai a keratinocytákkal alkotott szoros funkcionális kapcsolataira vezethetők vissza. Az $[Ca^{2+}]_i$ változásai fontos szabályozó tényezők a melanocyták sejtleletani folyamataiban. Érintik a melanocyták fejlődését, a mitogén stimulusokra adott válaszaikat, a melanintermelést és a fotoprotektív funkcióikat.

Melanoma eredetű szövetmintákon végzett kísérletek igazolták, hogy a melanoma sejtek jelentősebb mennyiségű glutamátot képesek felszabadítani egy feltételezett autokrin hurok révén. Az NMDAR-okat illetően azt találták, hogy a GluN2A génjében (*GRIN2A*) gyakran fordulnak elő mutációk, melyek jelenléte a melanomás betegek túlélésének csökkenésével korrelált. Megállapításra került továbbá, hogy a *GRIN2A* tumorszuppresszor génnek tekinthető melanomában, mivel aktivitásának csökkenése kontrollálatlan sejtosztódáshoz vezet. A Ca^{2+} -ok fontos szerepet töltenek be a malignus pigmentsejtek celluláris folyamataiban is. Többek között proliferációs jeleket generálhatnak, míg a SOCE-n keresztül például a sejtek inváziós képességei fokozódhatnak.

Célkitűzések

Főként porckutatással foglalkozó kutatócsoportunk, a Debreceni Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének Jelátviteli Laboratóriuma, a 2000-es évek közepén fordította érdeklődését az NMDAR-ok felé. Mivel az ezredfordulót követően több tudományos közlemény is elkezdett foglalkozni bizonyos neuronális receptorok idegrendszeren kívüli jelenlétével és szerepével, ezért az ízületi porc joggal vált ígéretes vizsgálatok tárgyává.

Az NMDAR-okat már előttünk, tőlünk függetlenül is kimutatták vázrendszeri elemekben. A fejlődő porcsejtekben azonban még nem vizsgálták az NMDAR-ok szerepét, különös tekintettel a porcfejlődés során végbemenő jelátviteli mechanizmusokra, melyek jelentős része érzékeny az $[Ca^{2+}]_i$ változásaira.

Ennek megfelelően munkám céljai voltak, hogy:

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

Munkacsoportunk a 2010-es évek fordulóján pigmentsejtekkel, egészen pontosan humán melanoma sejtekkel, majd bőr eredetű melanocyttákkal is elkezdett foglalkozni. A melanoma malignum cutis a bőr normál pigmentsejtjeiből, a melanocyttákból kiinduló rosszindulatú daganatos folyamat. Agresszivitása és gyors áttétképző képessége okán rossz prognózissal és rendkívül magas halálozási rátával jellemezhető. A normál és patológiás pigmentsejteken kapott *in vitro* kísérleti eredmények összevetése gyakorlati jelentőségű tapasztalatokat jelenthetnek a bőrgyógyászat és a patológiai diagnosztika számára.

Az NMDAR-ok pigmentsejteken való *in vitro* vizsgálata az első, ígéretes projektjeink közé tartozott, különös tekintettel a téma gyér irodalmára. Legelső melanoma sejteken végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy bizonyos NMDAR-okat befolyásoló farmakonok

hatására a Ca^{2+} -koncentráció változások vizsgálatára alkalmas fluoreszcens festék (Fura-2), különösen a sejt központi (a sejtmagnak megfelelő) területén, emelkedett Ca^{2+} -szintet jelzett. Ez a megfigyelés vezetett az NMDAR-ok feltételezett sejtmagi jelenlétének hipotéziséhez, ami figyelembe véve, hogy melanoma sejteken szerzett tapasztalat, akár a daganatos fenotípussal is összefüggésbe hozható. Így kezdtem, 2013-ban, tudományos doktori projektem fő témáját, a daganatos sejtek NMDAR profiljának részletes feltérképezését. Munkám előrehaladtával a projekt kiegészült a kontrollként alkalmazott melanocyták NMDAR-ainak vizsgálatával is.

A 2000-es években fokozatosan bővültek ismereteink funkcionálisan aktív receptorok patológiás elváltozásokban, elsősorban daganatokban betöltött szerepéről.

Mindezek tükrében értekezésem célkitűzéseit azzal folytatnám, hogy:

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

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

Anyagok és módszerek

Porcosodó, mesenchymalis, nagy sejtsűrűségű (HD) kultúrák

A HD kultúrák létrehozásához szükséges chondroprogenitor mesenchymalis sejteket 4,5 napos, Ross-fajtájú, fehér, húshibrid csirkeembriók végtagtelepeinek distalis részéből nyertük ki. Az izolált végtagbimbó darabokat 0,25%-os tripszin oldatban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) emésztettük, majd a sejteket centrifugálással szeparáltuk.

Kísérleteinkhez $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségű sejtszuszpenziókat használtunk. A sejtek 37°C-on, 5% CO₂ és 80% relatív páratartalom mellett 2 óra alatt kitapadtak. Ezt követően a kultúrák 10% FBS-sel kiegészített Ham F12 (N6760, Sigma-Aldrich) tápoldatot kaptak. A kultúrák iniciálását a tenyésztés 0. napjának tekintettük. A fejlődő kultúrákat 6 vagy 10 napig tartottuk fenn. A csirkeembriókon végzett kísérletekhez nem volt szükség a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyére.

Melanocytá és melanoma sejt kultúrák

A kísérleteinkhez használt normál humán epidermális melanocytá (NHEM) sejt kultúrákat (PromoCell GmbH, Heidelberg, Németország) juvenilis bőr minták epidermiséből állították elő. Vizsgálatainkat emellett öt különböző melanoma sejt vonalon is elvégeztük (A2058, HT168M1, HT199, M35/01 és WM35). Az A2058 és WM35 kultúrákat az ATCC-től szereztük be (ATCC® CRL-1661™, Manassas, VA, USA). A HT168M1, a HT199 és az M35/01 sejt vonalakra Ladányi Andrea (Országos Onkológiai Intézet, Budapest) szíves segítségével tettünk szert. A melanocytákat Melanocyte Medium-ban (PromoCell GmbH), a melanoma sejteket RPMI-1640 sejttenyésztő médiumban (Sigma-Aldrich) szaporítottuk 37°C-on, 5%-os CO₂ és 80%-os páratartalom mellett.

Az mRNS expresszió vizsgálata

A tenyésztett kultúrákból kinyert RNS-mintákból High Capacity RT kit (Applied Biosystems) felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-eket írtunk. A cDNS írása 2 órán keresztül programozható termosztátban (Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) történt 37°C-on.

A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációja olyan primer párok segítségével történt, amelyeket az interneten hozzáférhető humán, illetve csirke nukleotid-szekvenciák alapján állítottunk elő (GenBank, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, online

elérhetőség: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A humán primerek tervezése a Primer Premier 5.0 szoftverrel (Premier Biosoft, Palo, Alto, CA, USA), míg a csirke primereké a Primer BLAST web service-szel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) történt. A Primer Premier 5.0-val tervezett primerek specificitását *in silico* ellenőriztük a Primer BLAST segítségével.

A DNS-szakaszok amplifikációjához programozható termosztátunkat (Labnet International) használtunk. A polimeráz láncreakcióval (PCR) kapott termékeket etídium-bromidot és 1,5% agarózt tartalmazó gélben horizontálisan elektroforetizáltuk. A reakció eredményeit gél dokumentációs rendszerünkben (Fluorchem E, Protein Simple, San Jose, CA, USA) hívtuk elő. A kapott jelek optikai denzitásainak (OD) számszerűsítését az ImageJ 1.8.0_112 verziószámú (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) számítógépes program segítségével végeztük.

Fehérjeexpressziós vizsgálatok

A fehérjeexpresszió vizsgálatát célzó western blot (wb) analízisünkhöz teljes sejtlizátumokra és szubcelluláris frakciókra volt szükségünk. Első lépésként a sejteket fiziológias sóoldattal mostuk, majd lekapartuk, $2000 \times g$ -n centrifugáltuk, majd az üledékeket Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) pufferrel szuszpendáltuk.

A teljes lizátumok előállításához a fehérjéket ultrahangos szonikálással tártuk fel. A citoszol frakciók izolálásához a mintákat szonikáltuk, majd $50000 \times g$ -n, 4°C -on, 90 percig centrifugáltuk. Ezt 1%-os TritonX-100 (Reanal, Budapest, Hungary) detergens-tartalmú RIPA pufferben történő triturálás követte, majd újabb centrifugálás után a kapott felülúszókat óvatosan szeparáltuk, ugyanis ezek tartalmazták a sejtek membrán frakcióit. A sejtmag frakciók izolálása cukorgrádiens alapján történt. A kiindulási sejtüledékeket puffer-A-ban oldottuk és Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) hozzáadását követően Dounce homogénizátorral szuszpendáltuk. Ezután $770 \times g$ -n, 4°C -on, 10 percig centrifugáltunk, majd az üledékeket 2,2 mM szacharóz-puffer-A oldatban reszuszpendáltuk. Ezt egy második centrifugálási lépés követte $40000 \times g$ értéken, 4°C -on, 90 percig. A végeredményben kapott üledékeket 0,25 mM szacharóz-puffer-A oldatban oldottuk.

A minták fehérjetartalmát módosított BCA próbával (BCATM Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. Az alegységek detektálásához a mintáinkat 7,5%-os akrilamid gélben elektroforetizáltuk. A szeparált mintákat a Bio-Rad Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) elektromos erőterének segítségével nitrocellulóz membránokra (Bio-Rad) transzferáltuk. A membránokat sovány

tejpor 5%-os PBS-oldatával blokkoltuk, majd primer antitestek jelenlétében inkubáltuk egy éjszakán át, 4 °C-on.

A következő napon a membránokat torna peroxidáz konjugált szekunder antitestek (anti-nyúl vagy anti-egér IgG (Bio-Rad Laboratories) 1:1500-as hígításával inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Ezután az immunreaktív sávokat erősített kemilumineszcenciával hívtuk elő. A kemilumineszcens jeleket géldokumentációs rendszereinkben (DNR Bio-Imaging Systems Ltd. Jeruzsálem, Izrael és Fluorchem E, Protein Simple, San Jose, CA, USA) rögzítettük. A jelek OD értékeinek kvantifikálását ImageJ 1.8.0_112 freeware segítségével végeztük.

Immuncitokémiai reakciók és konfokális mikroszkópia

Az NMDAR alegységek pontos szubcelluláris lokalizációjának feltérképezéséhez immuncitokémiai reakciókat végeztünk. A HD kultúrákat a porcdifferenciáció 3. napján Sainte-Marie fixálószerrel (99% etanol és 1% ecetsav elegye), míg a melanocytá és melanoma kultúrákat 4%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) fixáltuk 1 órán keresztül. Ezután a fixálószer maradványait kimostuk, majd blokkoltuk a reakciók szempontjából aspecifikus kötőhelyeket BSA (bovine serum albumine; Amresco) 1%-os PBS-oldatával 30 percig, 37°C-on.

Ezután a kultúrákat egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk az első primer antitesttel. Ez a háromnapos HD kultúrák esetében az anti-GluN1 (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) monoklonális vagy az anti-GluN2B (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) poliklonális antitestek voltak, míg a pigmentsejtek esetében az anti-GluN2A (Cell Signaling) vagy az anti-GluN3B (Alomone Labs) poliklonális antitestek voltak. Mindegyik antitestet nyúlban termeltették és 1:50 arányában hígítottuk PBST-ben.

A kísérlet második napján kecskében termelt, biotinilált, anti-nyúl szekunder antitesteket (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pipettáztunk a mintákra. A biotinilált antitesteket 1:1000 arányában oldottuk PBST-ben, mellyel 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltunk. Ezután újabb 4°C-os inkubáció következett a második primer antitesttel egy éjszakán keresztül. Ezek a HD kultúrák esetében vagy az anti-GluN2B, vagy az anti-GluN3B antitestek voltak. A pigmentsejtek reakcióinak második primer antitestjei az egyik kísérleti felállásban (amikor az első primer antitest az anti-GluN3B antitest volt) vagy az anti-GluN1 antitest, vagy az anti-GluN1-1a antitest volt, míg a másik kísérleti konstellációban (amikor az első primer antitest az anti-GluN2A antitest volt) vagy az anti-GluN1 antitest, vagy az anti-

GluN3B antitest volt. Mindegyik antitestet nyúlban állították elő. A második primer antitesteket a korábbiakhoz hasonlóan PBST-ben oldottuk 1:50 hígítási arányban.

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

A reakciók eredményeiről fluoreszcens képeket rögzítettünk az Olympus FV3000 konfokális mikroszkóp (Olympus Corporation, Tokió, Japán) segítségével. A felvételek elkészítéséhez 60 × nagyítású PlanApo N olaj-immersiós objektívet (NA: 1,42) alkalmaztunk. Az alkalmazott gerjesztési lézerek 488 és 555 nm hullámhosszúak voltak. A z-tengely mentén készített sorozatfelvételek optikai szeletvastagsága 1 µm-es volt. Eredményeink digitális rögzítéséhez az FV31S-SW szoftvert (Olympus Corporation) használtuk.

A szekretált glutamát koncentráció meghatározása

A chondrogenicus sejtek által a sejtenyésző médiumba felszabadított glutamát koncentrációját a Glutamine/Glutamate Determination Kit (Sigma-Aldrich) segítségével határoztuk meg. A porcfejlődés különböző napjain 4 × 200 µl tápoldatot távolítottunk el a kultúrákról, amiben megvizsgáltuk a szekretált glutamát mennyiségét. A háttér értékeket vak minták (steril víz és Ham's F12 médium) segítségével határoztuk meg. Az abszorbanciát 340 nm-en detektáltuk microplate olvasóval (Chameleon, Hidex, Turku, Finnország). A méréseket 3 független kísérletben végeztük 4 párhuzamos mintán a porcfejlődés minden egyes napján.

Farmakológiai kezelések és funkcionális vizsgálatok porcosodó sejteken

Az NMDAR-okhoz köthető lehetséges funkciókat különféle kezelőanyagok igénybevételével vizsgáltuk. Ezen kezelőanyagok közé tartozott az NMDAR-ok mesterséges agonistája, az NMDA (20 µM-os koncentrációban alkalmazva; Sigma-Aldrich), a GluN1 és GluN3 alegységekhez koagonistaként kötődni képes glicin (10 µM; Amresco), a GluN1 alegységek glicin-kötőhelyének kompetitív antagonistája, a DCKA (5,7-diklorokinurénsav; 10 µM; Tocris Bioscience, Ellisville, MI, USA), a GluN2B alegységek gátlószere, az ifenprodil (20 µM;

Sigma-Aldrich), illetve a glicin receptorok (GlyR) specifikus antagonistája, a sztrichnin (5 μ M; Sigma-Aldrich). Az NMDA-t, a DCKA-t, az ifenprodilt és a sztrichnint folyamatosan alkalmaztuk porcosodó kultúráinkon az izolálás napjától (0. nap) kezdve. A glicint egyrészt az első naptól kezdve, másrészt a porcfejlődés 2. és 3. napján 2×4 órán keresztül kapták a kultúrák. A sejtek metabolikus aktivitásának (vagy életképességének) vizsgálatához MTT-assay-t használtunk. Az MTT-assay során egy sárga színű tetrazólium só, az MTT (VWR International, Debrecen, Hungary) oldatát adtuk a kultúráinkhoz (MTT-oldat: 5 mg MTT/1 ml PBS). Ezután 2 órán keresztül inkubáltuk a sejteket 37°C -on, ami alatt a mitokondriális enzimek az MTT-t lila színű, oldhatatlan formázán kristályokká alakítják. A csapadékot 500 μ l MTT szolubilizáló oldat segítségével oldhatóvá tesszük, ami a teljesen lila színűvé váló oldat OD-jának vizsgálatát teszi lehetővé. Az abszorbancia meghatározását 570 nm-en végeztük és a kísérleti csoportok OD értékeit a százalékos változás formájában tüntettük fel.

A sejtek osztódási rátáját a radioaktív triciált timidinnek (^3H -timidin) az osztódó sejtek DNS-ébe történő beépülését (inkorporációját) követően határoztuk meg. Az inkorporációs assay-hez a porcsejteket szcintillációs plate-ekben (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) tenyésztettük. A sejtek a ^3H -timidint (Amersham Biosciences, Budapest, Magyarország) tartalmazó médiumot (1 $\mu\text{Ci/ml}$) a differenciáció 3. (vagy 10.) napján kapták meg az NMDAR agonistákkal és antagonistákkal való kezeléseket követően. A ^3H -timidinnel való 16 órás inkubáció után a kultúrák fehérjeit 5%-os triklórecetsav (Acros Organics, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) jéghideg oldatával precipitáltuk. Ezután a plate-eket két hétig szárítottuk, majd a minták radioaktivitását folyadékszintillációs üzemmódban használt microplate olvasónk (Chameleon, Hidex) segítségével határoztuk meg. A kísérleti csoportok szcintillációs értékeit a százalékos változás formájában tüntettük fel.

A porcmátrix termelés analízise

Az ECM minőségi és mennyiségi analízisét 6 vagy 10 napos HD kontroll/kezelt kultúrák metakromáziás festődésére alapozva végeztük. Egyrészt a tenyészeteket alkohol:formalin 4:1 arányú elegyével fixáltuk és 3%-os ecetsavban oldott 1%-os dimetil-metilénkékkel (DMMK; Aldrich, Németország) festettük. A kultúrák metakromatikusan festődött nodulusairól a Nikon Eclipse E800 mikroszkóphoz (Nikon, Tokió, Japán) csatlakoztatott Spot Advanced kamerával készítettünk felvételeket. Másrészt a 6-napos kultúrákat Kahle-féle fixálóval (28% etanol, 4% formalin és 2% jégcet) fixáltuk, majd glicin-HCl pufferben oldott 0,1%-os toluidinkék (TK; Reanal) oldattal festettük 5 percig. A metakromatikusan festett minták festéktartalmát 625 nm-

en történő leolvasással határoztuk meg, mely eredményeként a fő ECM komponensek mennyisége az OD értékekkel arányosnak mutatkozik. Az OD-kat 3 különböző kísérlet mindegyik kísérleti csoportjának 3-3 különböző biológiai mintájában megvizsgáltuk.

A citoszolikus Ca²⁺-koncentráció és Ca²⁺-tranziensek vizsgálata

A Ca²⁺-tranziensekre vonatkozó méréseinket Fura-2 használatával végeztük 1-, 2- és 3-napos HD kultúrákon. A Fura-2-vel töltött sejteket invertált fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Kowasaki, Japán) alatt vizsgáltuk. Vizsgálataink során a teszt oldatot (20 µM NMDA Tyrode-oldatban oldva), illetve a Ca²⁺-mentes Tyrode-oldatot közvetlenül a sejteken alkalmaztuk. A spontán Ca²⁺-tranzienseket az LSM 510 META lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) line scan analízissel vizsgáltuk. A 2-napos kultúrákat 30 percig 37°C-on inkubáltuk 10 µM Fluo-4-AM koncentrációjú F12 médiumban. A felvételeket standard Tyrode-oldatban rögzítettük, míg a teszt oldatok NMDA-t és a ifenprodil-t tartalmaztak 20-20 µM-os koncentrációban.

Statisztikai analízis

A bemutatott reprezentatív adatok minden esetben legalább három párhuzamos kísérlet közül mutatják a jellemző változásokat. A számadatok átlagértékek ± standard hiba (SEM). A statisztikai elemzést a wb-ok, illetve az életképesség, az osztódóképesség és a metakromáziás porcterületek vizsgálata során Student-féle páratlan kétvégű *t*-teszttel, majd ezt követően Dunnett-féle próbával végeztük (**P*< 0,05). A spontán Ca²⁺-események hosszának statisztikai eloszlását NMDA-val történő kezelést követően χ^2 , valamint Mann-Whitney teszttel végeztük.

Eredmények

NMDAR-ok vizsgálata chondrogenicus sejtekben

A differenciálódó porcsejtek NMDAR alegységeket expresszálnak

A csirke GluN1 (*GRIN1*), GluN2A (*GRIN2A*), GluN2B (*GRIN2B*), GluN2C (*GRIN2C*), GluN2D (*GRIN2D*), GluN3A (*GRIN3A*) és GluN3B (*GRIN3B*) NMDAR alegységek mRNS-einek expresszióját reverztranszkripciót követő polimerázláncreakcióval (RT-PCR) vizsgáltuk nagy sűrűségű, porcosodó kultúráinkban. Az RT-PCR-rel kapott eredmények a GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN3A és GluN3B NMDAR alegységek mRNS-einek meglétét igazolták a chondrogenicus mesenchymalis sejtek valamennyi fejlődési stádiumában. A kivételt a GluN2C és GluN2D alegységek képezték, melyek expresszióját nem tudtuk detektálni mintáinkban.

Az RT-PCR-rel igazolt alegységek fehérje-szintű megjelenését wb-tal ellenőriztük. A teljes lizátumokban a GluN1 alegység szintje fokozatosan csökkent a chondrogenesis során, míg a GluN2A alegység kifejeződése a kultúrák érett stádiumában hirtelen csökkent le. A GluN2B expressziója ezzel szemben a második és harmadik fejlődési napokon ért el kiugró értékeket, amikor is a porcra jellemző ECM-termelésben részt vevő chondroblastok megjelennek. A GluN3A a harmadik differenciációs naptól mutatott erősödő kemilumineszcens jeleket, míg a GluN3B a teljes tenyésztési időszakban változatlan módon kifejeződött.

A porcsejtek membrán frakciójában a GluN1, a GluN2B, a GluN3A és a GluN3B alegységek kifejeződését detektáltuk. A GluN1 expressziója egy fokozatosan emelkedő trendet követett, míg a GluN2B és GluN3B alegységek a fejlődés második napján mutattak szignifikánsan intenzívebb jeleket. A GluN3A alegység membrán-jelenlétét csak a fejlődési periódus 6. napjának végén tudtuk detektálni. A GluN2A esetében egyik fejlődési napon sem észleltünk kemilumineszcens jeleket.

A porcfejlődés kritikus napján az alegységek lokalizációi csatornaformálást sejtetnek

A porcdifferenciáció 3. napján kulcsfontosságú változások következnek be, ezért kísérleteinkhez 3 napos kultúrákat használtunk. A felvételeken látható, hogy a GluN1 alegység a GluN2B és GluN3B alegységekkel is kolokalizál. Mivel hármasszoros immuncitokémiai jelölést technikailag nem tudunk kivitelezni az antitestekkel, ezért következő lépésként csak az anti-GluN2B és anti-GluN3B antitesteket alkalmaztuk közös reakcióban. A kísérlet eredményei szerint a GluN2B alegységek immunfluoreszcens jelei kolokalizálnak a GluN3B alegységgel.

A chondrogenicus sejtek glutamátot termelnek

A HD kultúrák felülúszójában minden tenyésztési napon nagyobb glutamát koncentrációt figyeltünk meg a sejtmentes tápoldathoz viszonyítva, ami a sejtek spontán endogén glutamát felszabadítására utal. A kolorimetriás glutamin/glutamát szint meghatározó assay 0,2–1,1 nmol/ml szekretált glutamát koncentrációt állapított meg a tápoldatokban. A glutamátszekréció kapcsán RT-PCR és wb vizsgálatok megerősítették, hogy a porcsejtek a vezikuláris glutamát transzporter 1-et és 2-t (VGLUT1, VGLUT2) expresszálják a chondrogenesis során.

Az NMDAR-ok farmakológiai modulálása változatos hatásokat okoz

Abban az esetben, amikor a tenyésztés első napjától kezdve folyamatosan 20 μ M NMDA-t adagoltunk a porcosodó kultúrákhoz, akkor a metakromatikus mátrix termelése a kontrollhoz képest még a 6. napon is változatlan volt. Mivel az NMDA önmagában (20 μ M) nem volt hatással a chondrogenesisre, ezért az első tenyésztési naptól glicint is adagoltunk önmagában (10 μ M), illetve az NMDA-val kombinálva is. Míg a glicin szignifikánsan fokozta a metakromatikus mátrix termelését, addig a glicin és az NMDA együttesen nem változtatták meg érdemben a 6. tenyésztési napra termelt porcmátrix mennyiségét a kontrollhoz képest. Annak céljából, hogy a glicin hatásait más receptorokon is megvizsgáljuk az NMDAR mellett/helyett, 5 μ M koncentrációban sztrichnint adtunk a sejt kultúráinkhoz. A sztrichnin a GlyR-ok hatékony gátlószere. Ez a farmakon önmagában lecsökkentette a porcmátrix termelését, glicinnel való együttes alkalmazása viszont a kontrollhoz képest változatlanul hagyta a mátrixképződést. Ez a kombináció úgy gondoljuk, hogy a glicin NMDAR-kon kifejtett hatását demonstrálja. Amennyiben a GluN1 alegység glicin kötőhelyének kompetitív antagonistáját, a DCKA-t (10 μ M) alkalmaztuk a porcdifferenciáció első napjától kezdve, úgy a metakromatikus porcmátrix termelődésének szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Ezzel ellentétben az ifenprodil 20 μ M-os alkalmazása szinte teljesen meggátolta a porcképződést. A DCKA kivételével egyik kezelőanyag esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változásokat a sejtek mitokondriális aktivitásában. A sejtosztódást tekintve azonban a 3 H-timidin beépülés mértéke erősen lecsökkent az ifenprodil és a glicin (egyedül, vagy NMDA-val, vagy sztrichninnel kombinálva), valamint a sztrichnin önálló alkalmazásának hatására, míg a DCKA a proliferációt szignifikánsan fokozta.

A lokálisan adagolt NMDA Ca²⁺-tranzienseket eredményez

A Ca²⁺-tranzienseket különböző tenyésztési napokon mértük 20 µM-os NMDA lokális applikációját követően. A porcdifferenciáció első napján a lokálisan adagolt 100 mM KCl depolarizációt váltott ki és a citoszolikus Ca²⁺-koncentráció ([Ca²⁺]_c) rapid növekedést mutatott, míg az NMDA kezelésre, melyre a mesenchymalis sejtek nem válaszoltak. Ezzel ellentétben a differenciációs időszak második napjától kezdve az NMDA kifejezett emelkedést okozott a fejlődő porcsejtek [Ca²⁺]_c-jában. Az NMDA-ra adott válasz lassan alakult ki és egyértelműen függött a sejteken kívüli Ca²⁺-ok jelenlététől. Ez utóbbit jól demonstrálja, hogy a külső, extracelluláris Ca²⁺-ok ([Ca²⁺]_e) megvonása a [Ca²⁺]_c nyugalmi értékre való visszaesését eredményezte, míg 1,8 mM [Ca²⁺]_e visszaadása a [Ca²⁺]_c ismételt növekedését váltotta ki. A jelenség során a Fura-2 fluoreszcenciája nem növekedett aspecfikusan. Ezek szerint az NMDA lokális alkalmazása indirekten, az NMDAR-okon kívül, más Ca²⁺-influxot eredményező csatornákat is nyithatott vagy befolyásolhatott a sejtmembránban, melyek lassan aktiválódtak és lassan is inaktiválódtak. Az NMDA kezelések hatására kialakuló [Ca²⁺]_c-növekedések átlagos amplitúdója (ún. Ca²⁺-csúcsok) 60 nM volt a differenciáció második és harmadik napján is. Habár a glicin feltétlenül szükséges az NMDAR-ok működéséhez, de önmagában 10 µM glicin alkalmazása egyik tenyésztési napon sem befolyásolta a [Ca²⁺]_c-t.

Az NMDAR-ok és a spontán Ca²⁺-oszcillációk kapcsolatának további vizsgálatához 20 µM NMDA és 20 µM ifenprodil kezeléseket alkalmaztunk konfokális [Ca²⁺]-mérések során. Az NMDA adagolása megváltoztatta a spontán Ca²⁺-események hosszát; a nagyon rövid idejű (0,5 s) események frekvenciája lecsökkent, míg a hosszabbaké (1,5-2,5 s) megnőtt a kontrollhoz képest ($P=0,0002$). Mindez nagyon hasonló volt az egyedi sejteken végzett mérések eredményeihez. Az ifenprodil-kezeléssel kiváltott NMDAR gátlást követően a Ca²⁺-oszcillációk teljesen megszűntek, ami az NMDAR-ok alapvető szerepét jelzi a chondrogenicus sejtek spontán Ca²⁺-eseményei során.

NMDAR-ok vizsgálata humán melanocytákban és melanoma sejtekben

A pigmentsejteket teljes NMDAR alegység mRNS készlet jellemzi

Az RT-PCR eredmények az esszenciális GluN1 (*GRIN1*) alegység, valamint a GluN2 (*GRIN2*) és GluN3 (*GRIN3*) alegységek, illetve izoformáik, mRNS-szintű jelenlétét igazolták humán

melanocyták kultúráinkban, illetve különböző eredetű melanoma sejtvonalainkban (A2058, HT169M1, HT199, M35/01, WM35).

Az alegységek fehérjeexpressziója eltér melanocytákban és melanoma sejtekben

A melanocyták kultúrákból kinyert teljes lizátumokon végzett fehérjeexpressziós vizsgálatok a GluN2A alegység jelenlétét erősítették meg, azonban a GluN1, a GluN2B, a GluN3A és a GluN3B alegységek kifejeződése nem érte el a detektálás küszöbét. Bár az összes splice variáns felismerésére alkalmas anti-GluN1 antitest reakciója nem eredményezett kemilumineszcens jelet, de az NLS-t tartalmazó GluN1-1a alegység kapcsán sikerült szignálokat azonosítanunk. A melanoma sejtek citoszol és membrán frakcióiban sikerült igazolnunk a GluN1, a GluN2A, a GluN3A és a GluN3B alegységek jelenlétét. Mindemellett egyöntetű expressziós jeleket tapasztaltunk az NLS-t tartalmazó GluN1-1a splice variáns kapcsán is. Igazoltuk továbbá a GluN1, a GluN1-1a és a GluN3B alegységek sejtmagi expresszióját is, azonban a GluN2A és a GluN3A alegységek teljesen hiányoztak ebből a frakcióból. A GluN2B alegység jelei egyik kompartmentben sem voltak detektálhatóak, ami a fehérje hiányára vagy extrém alacsony szintjére enged következtetni.

Az alegységek sejtmagi kolokalizációt mutatnak melanoma sejtekben

A GluN1 alegység mindegyik melanoma sejtvonalban citoszolikus expressziót mutatott, míg ehhez képest a GluN3B kifejeződése kevésbé volt diffúz ebben a kompartmentben. Mindazonáltal a GluN1 és GluN3B alegységek immunpozitív jelei mindegyik melanoma sejtvonalon figyelemre méltó sejtmagi kolokalizációt mutattak. Bár a GluN1 és GluN3B alegységeket sikerült demonstrálnunk a melanocyták citoplazmájában, a melanoma sejteken szerzett tapasztalatainkkal szemben sejtmagi expressziójukat már nem tudtuk detektálni.

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

A GluN1–GluN2A reakcióban az A2058 és WM35 melanoma sejtvonal esetében a korábbiakhoz hasonló GluN1 eloszlást láttunk a citoszolban és a sejtmagban, míg a GluN2A

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

Az A2058 és WM35 sejtek GluN2A–GluN3B reakcióinak eredményeiből az látható, hogy a GluN3B jelei szétszlanak a citoszolban, illetve a sejtmag belső részeiben is jól demonstrálhatók, azonban az immunpozitív pöttyök hiányoznak egy jól meghatározható, nagy valószínűséggel a sejtmagvacskának megfelelő magi területen. A GluN2A alegység citokémiai eredményeivel és natív felvételekkel összevetített képeken nemcsak a maghártyában, hanem a citoszolban is láthattuk a két alegység folszerű kolokalizációját. Melanocytákban a GluN3B expresszióját bizonyos nyúlványokban figyelhettük csak meg, ezt leszámítva pedig a korábbiakban tapasztalt, gyér citoszolikus mintázatot írhattuk le. A GluN2A fluoreszcens felvételeivel összevetített képeken így érdemi kolokalizációt nem tudtunk demonstrálni.

Megbeszélés

Az NMDAR-ok szerepe chondrogenicus sejtek differenciációjában

Az NMDAR alegységei expresszálódnak a porcosodó kultúrákban

Kísérleteink első lépéseként a chondrogenicus sejtek NMDAR-expressziós profilját és glutamáttermelő képességét vizsgáltuk meg. Ezek eredményei szerint a fejlődő porcsejtek a GluN1, GluN2B, GluN3A és GluN3B NMDAR alegységeket fejezik ki membrán frakcióikban, azonban a GluN2A alegység expresszióját csak a teljes lizátumokban detektáltuk. Háromnapos porcosodó kultúrákon megerősítettük a GluN1-GluN2B, a GluN1-GluN3B, valamint a GluN2B-GluN3B kolokalizációkat is. Mindez azt sejteti, hogy a differenciálódó porcsejtekben nemcsak diheterotetramer, hanem triheterotetramer komplexek is jelen lehetnek a chondrogenesis kritikus időszakában.

Megfigyeltük továbbá, hogy a porcosodó sejtek differenciációjuk során glutamátot szekretálnak, illetve, hogy expresszálják a VGLUT1/2-t, azaz a differenciálódó porcsejtek egyéb környezeti szövetektől független, autokrin/parakrin mechanizmusú glutamát jelátvitelre lehetnek képesek akár *in vivo* körülmények között is.

Az NMDAR-ok farmakológiai modulálása befolyásolja a chondrogenesist

Korábbi kísérletes tapasztalataink szerint az *in vitro* porcosodó kultúrák rendkívül érzékenyek a $[Ca^{2+}]_i$ precízen beállított időbeli mintázatának manipulációjára. Ezért megvizsgáltuk az $[Ca^{2+}]_i$ -t egyértelműen érintő NMDAR agonisták és antagonisták porcfejlődésre kifejtett lehetséges hatásait. A farmakonok érintették a metakromáziás porcmátrix termelését, a porcsejtek osztódását és metabolikus aktivitását.

A chondrogenicus sejtek NMDAR-mediált Ca^{2+} -jelei

Az NMDAR-ok funkcionalitásának igazolása érdekében Ca^{2+} -méréseket végeztünk élő sejteken. Modellünkben az NMDA által direkt vagy indirekt módon aktivált Ca^{2+} -csatomák csak mérsékelt szenzitivitást mutattak és Ca^{2+} -permeabilitásuk is meglehetősen alacsony volt (a Ca^{2+} -csúcsok amplitúdója kb. 60 nM volt). Ez fokozottan igaz volt az első tenyésztési napon, amikor az NMDA kezelés nem váltott ki Ca^{2+} -tranzienseket. Összehasonlításképpen ugyanebben a modellben az adozin-trifoszfát (ATP) által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek relatíve nagy amplitúdóval (kb. 180 nM) jellemezhetők a porcfejlődés 3. napján. Az NMDA-val

ellentétben a glicin alkalmazását követően nem tudtunk Ca^{2+} -jeleket detektálni a HD kultúrák sejteiben. A GluN3 alegységeket tartalmazó, és nagy valószínűséggel jelen lévő triheterotetramer NMDAR-ok egyedi tulajdonságai vélhetően a chondrogenicus sejtek chondroblastokká történő elköteleződése során fontosak.

A porcosodó sejtek spontán, viszonylag nagy frekvenciájú $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -változásokat képesek produkálni. A GluN2B specifikus antagonistá, az ifenprodil szinte teljesen megszüntette a Ca^{2+} -oszcillációkat, ami arra enged következtetni, hogy az NMDAR-ok által mediált Ca^{2+} -influx szükséges a chondrogenicus sejtek spontán Ca^{2+} -oszcillációjához.

Kísérleti eredményeink bizonyították, hogy a differenciálódó porcsejtek által expresszált NMDAR alegységek funkcionáló csatornákká szerelődnek össze, melyek működése hatással van a porcsejtek elköteleződésére, osztódására és életképességére. E hatásokért nagy valószínűséggel az NMDAR-ok Ca^{2+} -ra permeábilis csatornáként történő működése felel, mely modulálja a sejtek Ca^{2+} -oszcillációit. A csatornákat a fejlődő porcsejtek autokrin/parakrin úton, glutamátot szekretálva, autonóm módon képesek aktiválni.

Az NMDAR-ok összefüggései a daganatos sejtfenotípussal humán pigmentsejtekben

Az egészséges és patológias pigmentsejtek NMDAR alegység expressziója eltérő

Humán pigmentsejteken végzett kísérleteink értékes adatokkal szolgálnak a bőr melanocytáinak NMDAR alegység expressziós mintázatát illetően, továbbá egyedi funkcionális karakterrel jellemezhető NMDAR-okat azonosítottunk a melanoma sejtek magjában is. RT-PCR eredményeink azt mutatták, hogy NHEM-ben, illetve melanoma sejtvonalainkban mindegyik NMDAR alegység kifejeződik mRNS szinten. A melanocyták teljes lizátumain végzett wb-ok azonban csak a GluN1-1a és a GluN2A alegységek fehérjeexpresszióját jelezték biztonsággal. A daganatos sejtek szubcelluláris frakcióin végzett analízis szerint csak a GluN1 és a GluN3B alegységek fejeződtek ki mindegyik vizsgált celluláris kompartmentben (a GluN2A és a GluN3A csak a melanoma sejtek citoszol és membrán frakcióiban). A GluN2B protein szinten sem a melanocytákban, sem a melanoma sejtekben nem jelent meg.

Szokatlan összetételű NMDAR-ok a melanoma sejtek magjában

Az immuncitokémiai reakciók eredményei a GluN1 és GluN3B alegységek kolokalizációját demonstrálták a melanoma sejtek magjaiban, mely nukleáris lokalizációjú molekuláris

heteromerek alkotását sejteti. A GluN1, illetve a GluN1-1a alegységek GluN3B-vel való kolokalizációját nem tapasztaltuk egészséges pigmentsejtek magjaiban és immunfluoreszcens jelek az egész sejtet illetően gyengének minősültek. Mindezeket figyelembe véve eredményeink a sejtmagi kompartmentben megjelenő GluN1/1-1a–GluN3B összetételű NMDAR-ok és a malignus pigmentsejt fenotípus megjelenésének összefüggését sugallják.

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

Idegrendszeren kívüli, nem excitábilis sejtek az NMDAR-ok és Ca²⁺-ok keresztmetszetében

Doktori értekezésem kísérleti eredményei egy klasszikus, központi idegrendszerből ismert receptor, az NMDAR jelenlétét és potenciális funkcióit hivatottak demonstrálni *in vitro* sejt kultúrákban, ezáltal betekintést engedni az NMDAR-ok idegrendszeren kívüli, nem excitábilis sejtekben betöltött szerepébe. Az NMDAR-ok nem specifikus kationcsatornák, leginkább Ca²⁺-okra permeábilisak, ezért főként Ca²⁺-csatornákként tekinthetünk rájuk. A Ca²⁺-ok a sejtek életében elengedhetetlen fontosságúak, hiszen a jelátviteli folyamatok legrégebbi és legelterjedtebb másodlagos messenger-eiként szolgálnak. Számos kísérleti megfigyelés támasztja alá, hogy a legtöbb nem excitábilis sejt, olyan Ca²⁺-csatornákat expresszál a Ca²⁺-jelátviteli eszköztár részeként, melyek lehetőséget teremtenek a Ca²⁺-ok sejtbe való bejutására és ezáltal sejtélettani folyamataik befolyásolására, illetve finomhangolására.

Kísérleteink megerősítették, hogy az NMDAR-ok által mediált szignalizáció fontos szerepet tölthet be a chondrogenesis korai fázisában a differenciálódó mesenchymalis sejtek Ca²⁺-oszcillációinak befolyásolása révén. Eredményeink megerősítik és kiegészítik más kutatócsoportok beszámolóit, melyek többek között az NMDAR-ok felnőtt ízületi porcsejtek mechanotranszdukciójában betöltött szerepéről, illetve a receptorok gyulladásszerű ízületi betegségekben leírt megváltozott kompozíciójáról és funkciójáról számolnak be. A

differentiálódó porcsejtekben látott, differenciációs stádiumonként változó NMDAR-összetétel az egyik legfontosabb megfigyelésünknek tekinthető ebben a modellben és úgy gondoljuk, hogy a sejtek az eltérő alegység-összetételből fakadóan különböző tulajdonságú Ca^{2+} -áramok révén finomhangolhatják saját jelátviteli folyamataikat.

Ezzel szemben az NMDAR-okról humán pigmentsejteken szerzett tapasztalataink egy malignus transzformációhoz köthető, sejtmagi Ca^{2+} -szignalizáció lehetőségét vetik fel a melanoma sejtekben. A közelmúltban publikált *in vitro* tanulmányok sikeresen igazolták NMDAR (és iGluR) antagonisták hatásait carcinoma és melanoma sejteken. A glutamát jelátvitelt érintő terápiák tehát új alternatívákat nyújthatnak a melanoma kezelésében.

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

Új eredmények

Az értekezésben szereplő legfontosabb új eredmények az alábbiak szerint összegezhetők:

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

Összefoglalás

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

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

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

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

Közlemények listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/483/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,915

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

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

Debrecen, 2021.11.04.

