

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Humán mesenchymális őssejtek és szemlencse epithél sejtek oszteogenikus differenciálódásának vizsgálata

Balogh Enikő

Témavezető: Dr. Jeney Viktória



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Humán mesenchymális őssejtek és szemlencse epithél sejtek oszteogenikus differenciálódásának vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Balogh Enikő

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Jeney Viktória, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Bacsó Zsolt, PhD
Dr. Veréb Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2018. október 3. 11⁰⁰

helye: Gyermekhematológiai-Onkológiai Tanszék, tárgyaló

Az értekezés bírálói: Dr. Várkonyi Judit, PhD
Dr. Katona Éva, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Várkonyi Judit, PhD
Dr. Katona Éva, PhD
Dr. Bacsó Zsolt, PhD
Dr. Veréb Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2018. október 3. 13⁰⁰

Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. Bevezetés és Irodalmi áttekintés

Az oszteogenikus differenciálódás fiziológiás és pathofiziológiás folyamatokban is szerepet játszik. Fiziológiás jelentősége a mineralizált szövetek kialakulásában, illetve a csontátépülésben van. A pathofiziológiás oszteogenikus differenciálódás pedig a lágyszövetek mineralizációjához köthető.

Az őssejtek oszteogén irányú differenciálódása egy komplex folyamat, melynek eredményeként oszteoblasztok jönnek létre, melyek a csontmátrix felépítésében vesznek részt. Az oszteogén differenciálódás gátlása a csontszövet anatómiai és strukturális integritásának csökkenését eredményezi. Régóta ismert, hogy a krónikus vas túltelítettség csontvesztéssel társul, melynek hátterében számos mechanizmust azonosítottak.

A lágyszövetek mineralizációja vagy más néven ektópiás kalcifikáció során a csontmátrixhoz hasonló hidroxiapatit kristályokat tartalmazó extracelluláris mátrix lerakódása figyelhető meg extraszkeletális szövetekben. Az ektópiás kalcifikáció legismertebb formája a vaszkuláris kalcifikáció, melynek hátterében jelenlegi ismereteink alapján a vaszkuláris simaizomsejtek oszteogén irányú transz-differenciálódása áll. Érdekes módon a kalcifikált erekben található hidroxiapatit kristályokhoz hasonló anyag jelenlétét figyelték meg kataraktás szemlencséiben és csarnokvízben. A kataraktás szemlencséiben lévő hidroxiapatit kristályok képződésének mechanizmusára jelenlegi ismereteink nem szolgálnak magyarázattal.

1.1. Az oszteogenikus differenciálódás jelentősége a csontképződésben

1.1.1. A mesenchymális őssejtek (MSCs)

Azokat a multipotens szöveti őssejteket, amelyekből a stroma összes sejtje típusa (csont-, porc-, zsír, valamint a vértképzést támogató stroma) kialakulhat, mesenchymális őssejteknek nevezzük. A MSCs önmegújulásra képes, könnyen izolálható, nagy osztódó- és migrációs képességű sejtek. A MSCs jelenlétét

elsőként a csontvelőben figyelték meg, majd a későbbiekben számos – neonatális és felnőtt – szövetből izolálták, mint például köldökzsínór, placenta, zsírszövet, máj, lép, bőr, tüdő. A MSCs orsó alakú, letapadó sejtek, melyek *in vitro* körülmények között egysejtréteget képeznek és megtartják oszteoblaszt, adipocita és kondrocita irányú differenciálódási képességüket.

1.1.2. A MSCs elköteleződése, és a többirányú differenciálódás képessége

A már említett csont-, porc-, és zsírsejt irányú differenciálódáson kívül a MSCs további sejttypusokká is képesek differenciálódni, így kialakulhat belőlük például szív-, váz-, illetve simaizomsejt vagy fibroblaszt is.

A MSCs oszteogén irányú elköteleződését és differenciálódását a Runx2, a kondrogén differenciálódást a Sox9, míg az adipocita irányú differenciálódást a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma (PPAR γ) mester transzkripciósfaktorok irányítják.

1.1.3. A MSCs oszteoblaszt irányú differenciálódása

A MSC-k oszteogenikus differenciálódását számos növekedési- és differenciációs faktor kiváltja, mint például a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β), a csont morfogenetikus protein (BMP) és a fibroblaszt növekedési faktor (FGF). A TGF- β , BMP, illetve FGF szignálútvonalak mellett a MSCs oszteogén differenciálódásában fontos szerepet játszik a Wingless (Wnt), és a Hedgehog jelátviteli út is.

A szignálútvonalak összehangolt aktivációja eredményezi a Runx2 mester oszteogén transzkripciósfaktor expressziójának, illetve aktivitásának emelkedését. A Runx2 embrionális csontfejlődésben betöltött kitüntetett szerepét bizonyítja, hogy a Runx2 hiányos egérben nincsenek differenciált oszteoblasztok, mely a csontképződés elmaradásával jár együtt. E miatt a Runx2 hiányos egerek nem életképesek, és születésük után rövidesen elpusztulnak.

1.1.4. A MSCs szerepe az oszteoporózis kialakulásában

Az oszteoporózis vagy csonttritkulás a csont ásványianyag tartalmának csökkenését jelenti. Az oszteoporózis jelenleg a világon az egyik legjelentősebb egészségügyi

probléma, globálisan körülbelül évi 9 millióra tehető az oszteoporózissal összefüggésbe hozható csonttörések száma. Hazai adatok alapján, Magyarországon mintegy 600 ezer nő és 300 ezer férfi él oszteoporózissal.

Egyre világosabbá válik a MSC-k szerepe az öregedést kísérő csonttrikulás folyamatában. Számos tanulmányban kimutatták, hogy az idősebb egyénekből származó MSC-k oszteogén irányú differenciálódási képessége lecsökken, ezzel párhuzamosan erősödik az adipogén differenciálódási hajlam.

1.2. Az oszteoporózis és a vastöbbllet összefüggései

1.2.1. Klinikai megfigyelések

A vastültelítettség örökletes és szerzett formáiban gyakori a csontérintettség, mely csont fájdalmak, csigolya csont deformitások, oszteopénia, oszteoporózis illetve patológiás törések formájában jelentkezhet. Például a hemokromatózis a betegek 40-80%-ában oszteopéniával, 25-34%-ában oszteoporózissal társul. A sarlósejes anémiás betegek csontdenzitásának csökkenése pedig korrelál a hemolízis mértékével és a hemoglobin szint csökkenésével.

A menopauzával összefüggésben álló oszteoporózis az 50 évnél idősebb nők mintegy 30%-át érinti. A betegséget a fokozódó csontvesztés, és a csonttörések rizikójának emelkedése jellemzi. Háttérben az ösztrogén szint csökkenését valószínűsítik. Ugyanakkor megfigyelték, hogy a menopauza után a szérum ferritin szint 2-3-szorosára emelkedik, mely szintén szerepet játszhat a menopauzát kísérő oszteoporózis kialakulásában.

1.3. Az oszteogenikus differenciálódás ektópiás kalcifikációban

Az ektópiás kalcifikáció a lágy szövetek patológiás mineralizációja, melynek során hidroxiapatit halmozódik fel az érintett lágy szövetben. Leggyakoribb megjelenési formája a vaszkuláris kalcifikáció, illetve az aortabillentyűk kalcifikációja, de számos egyéb szervet/szövetet is érinthet, úgymint tüdő, izmok, szem. Az ektópiás kalcifikációt hosszú időn keresztül passzív folyamatként, az öregedés velejárójaként tartották számon. Napjainkra bebizonyosodott, hogy a vaszkuláris kalcifikáció háttérben az érfali sejtek oszteogén/kondrogén differenciálódása áll.

A differenciálódás során a mineralizálódó sejtekben indukálódnak az oszteogén és a kondrogén differenciálódás mester transzkripciós faktora Runx2, illetve a Sox9. Ennek következtében a mineralizálódó sejtek génexpressziós mintázata jelentősen megváltozik, a simaizomsejtekben például lecsökken a jellegzetes simaizom markerek expressziója, és megemelkedik az oszteoblaszt-specifikus fehérjék szintézise.

1.3.1. Ektópiás kalcifikáció a szemben

A szemet érintő ektópiás kalcifikációnak számos megjelenési formája van, és néha más szerveket is érintő ektópiás kalcifikációs kórkép részeként jelenik meg. Így például a pseudoxanthoma elasticum (PXE) rendellenességet a bőr, a retina és a keringési rendszer elasztikus rostjainak egyidejű kalcifikációja jellemzi. Egy esettanulmányban veseelégtelenséggel összefüggő másodlagos hiperparatireózisban szenvedő beteg csarnokvíz mintájában magas foszfát és Ca szinteket mértek, valamint hiroxiapatit kristályok jelenlétét mutatták ki. A szaruhártya kalcifikációja is előfordul, általában krónikus szemgyulladás kísérő tüneteként vagy szövődményeként. Végezetül, a kataraktás szemlencsében a kalcifikálódott érfalban található hidroxipatithoz hasonló kémiai összetételű és szerkezetű Ca-foszfát kristályok jelenlétét írták le.

1.3.2. A katarakta epidemiológiája

A szürkehályog, vagy más néven katarakta, a szemlencse elhomályosulása, ami világszerte a vezető vaksági ok. A Global Burden of Diseases Study adatai alapján 2010-ben 35,1 millióan szenvedtek katarakta okozta látáscsökkenéstől a világon. A WHO 2010-es kimutatása alapján világszerte 285 millió ember szenved látáscsökkenéstől, 39 millióan pedig vakságtól, amelynek mintegy harmadát szürkehályog okozza. A katarakta leggyakrabban idős korban alakul ki, előfordulási gyakorisága 65 év felett 25%, 80 év felett pedig 50%. Az európai társadalom progresszív öregedése magával vonja a szürkehályog incidenciájának és prevalenciájának emelkedését. Napjainkban gyógyításának egyetlen módja a műtéti beavatkozás.

1.3.3. A katarakta kialakulásának mechanizmusa

A krisztallinok a szemlencse vízben oldódó fehérjéinek mintegy 80%-át alkotják, hosszú életű fehérjék, melyek a szem öregedésével módosulnak, dajkafunkciójuk romlik. Ennek következtében a lencsében oldhatatlan fehérje aggregátumok keletkeznek, melyeken a lencsébe jutó fény szóródik, mely folyamat kóroki szereppel bír a katarakta kialakulásában.

Kimutatták, hogy a kor előrehaladtával a lencsében csökken az antioxidáns molekulák mennyisége és aktivitása, melynek következtében a szem belsejében az oxidációs folyamatok olyan mértékben károsíthatják a szemlencsében található fehérjéket és lipideket, amely hozzájárulhat a katarakta kialakulásához.

E mellett az is ismert, hogy a katarakta etiológiájában fontos szerepet játszó tényezők, mint például a fokozott UV sugárzás vagy a magas glükóz szint a lencse epithél sejtekben apoptózist indukálnak. Szakirodalmi adatok alapján az apoptózis mellett a lencse epithél sejtek mesenchymális irányú differenciálódása (epithel-mesenchymal transition: EMT) is szerepet játszik a katarakta kialakulásában.

2. Célkitűzések

Az előzőekben részletesen bemutatott klinikai megfigyelések és szakirodalmi eredmények alapján az alábbi hipotéziseket és célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. **Hipotézis:** A vastöbbllet gátolja a MSCs oszteogén irányú differenciálódását.

Ennek kapcsán az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- 1.1 Megvizsgáljuk, hogy a vastöbbllet gátolja-e csontvelői eredetű MSCs (BMSCs) oszteogén irányú differenciálódását és mineralizációját *in vitro*.
- 1.2 Vizsgáljuk a ferritin hatását BMSCs oszteogén irányú differenciálódására.
- 1.3 Célul tűztük ki a krónikus vas túltelítettség hatásának vizsgálatát a kompakt csont eredetű oszteoprogenitor sejtek oszteogén differenciálódására *in vivo*.
- 1.4 További célunk volt annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a vastöbbllet befolyásolja-e BMSCs adipogén illetve kondrogén irányú differenciálódását.

2. **Hipotézis:** A lencse epithél sejtek oszteogén stimulus hatására oszteogén differenciálódáson mennek keresztül, mely folyamat hozzájárulhat a kataraktás szemlencsében található hidroxipatit kristályok kialakulásához.

Ennek kapcsán az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- 2.1 Megvizsgáljuk, hogy humán lencse epithél sejtekben (HuLECs) oszteogén stimulussal előidézhető-e oszteogén irányú differenciálódás és mineralizáció *in vitro*.
- 2.2 Célul tűztük ki az eltérések és hasonlóságok vizsgálatát a HuLECs oszteogenikus differenciálódása és az EMT között.
- 2.3 További célunk volt a kataraktás szemlencsében oszteogén differenciálódásra utaló markerek vizsgálata.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Sejtenyésztes

A kísérleteket humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejteken (BMSCs, ScienCell) és humán lencse epithél (HuLECs, ScienCell) sejteken végeztünk. A BMSCs-et 10% FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban tenyésztettük. A HuLECs-et 10% FBS tartalmú EpiCM tápfolyadékban tenyésztettük.

3.2. BMSCs és HuLECs oszteogenikus differenciációjának indukálása

A sejtek oszteoblaszt irányú differenciálódását megemelt kalcium (CaCl_2) és Pi ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4) tartalmú oszteogenikus médiummal indukáltuk. A hozzáadott CaCl_2 mennyisége 0-1.2 mmol/L között változott, míg a hozzáadott Pi mennyisége 0-3,5 mmol/L volt.

3.3. BMSCs adipogén és kondrogén differenciálódásának indukálása

A sejtek konfluenssé válása után a tenyésztő médiumot kondrogén differenciáló médiumra, illetve adipogén differenciáló médiumra cseréltük.

3.4. Alizarin vörös festés

Az eljárás során a 96 lyukú tenyésztőedényben tenyésztett és kezelt sejteket PBS-sel mostuk, majd 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk (10 perc, szobahőmérséklet). A fixálást követően a sejteket Alizarin vörös oldattal (2%, pH 4,3) festettük.

3.5. Alcian kék festés

A kondrogén differenciálódás nyomonkövetésére Alcian kék festést végeztünk, melyet a NovaUltra Special Stain Kit segítségével kivitelezünk a gyártó utasításai szerint.

3.6. Oil Red O festés

Ennek során a sejteket mostuk PBS-sel, majd fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldattal 30 percig. A fixálás után újból mostuk a sejteket majd 60%-os izopropanollal inkubáltuk 5 percig. Megfestettük a sejteket 10 percig szobahőmérsékleten. Az Oil Red O festéket eltávolítottuk, a sejteket mostuk

desztillált vízzel, majd fénymikroszkópban megtekintettük az eredményt és lefényképeztük.

6.7. Kalcium mennyiségi meghatározása

Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát QuantiChrome Calcium Assay Kit segítségével határoztuk meg. A kísérlet végeztével eltávolítottuk a médiumot, a lemezt mostuk PBS-sel, majd az extracelluláris mátrix Ca tartalmát sósavval (0,6 mol/L) oldottuk ki (30 perc, szobahőmérséklet). A minták abszorbanciáját 612 nm-en Powerwave XS lemezolvasóval (Bio-Tek) mértük meg. A minták Ca tartalmát fehérje tartalomra normalizáltuk.

6.8. Sejtek életképességének meghatározása

A kísérlet végeztével a sejteket PBS-sel mostuk és hozzáadtunk 150 μ L MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) reagenst, majd a lemezt 4 órára visszahelyeztük a sejtenyészítő inkubátorba. Ezt követően az MTT oldatot eltávolítottuk, és a keletkezett formazán kristályokat 100 μ L dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldottuk, majd meghatároztuk a minták optikai denzitását 570 nm-en.

6.9. Az extracelluláris mátrix OCN tartalmának meghatározása

A kezelések végeztével a sejteket PBS-sel mostuk, majd 100 μ L 0,5 mol/L EDTA oldattal (pH: 6,9) 30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a felülúszót összegyűjtöttük és a minták OCN tartalmát ELISA módszerrel (Human Osteocalcin Instant ELISA) határoztuk meg. A minták OCN tartalmát fehérje tartalomra normalizáltuk. A fehérjetartalom meghatározásához az EDTA eltávolítása után a sejteket szolubilizáltuk a következő összetételű lízis pufferben: 5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 0,5% Igepal CA-630, 1% Triton-X 100, 1% Complete Mini proteáz inhibitor (Roche, Svájc). A lizátumok fehérjetartalmát BCA módszerrel határoztuk meg.

6.10. ALP aktivitás meghatározása

A kezelést követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd 100 μ L szolubilizáló oldatban lizáltuk őket. Az aktivitás méréséhez 35 μ L sejtlizátumhoz 130 μ L szubsztrátot (ALP Yellow Liquid Szubsztrát) adtunk, majd 405 nm-en 30 percig 37

°C-on inkubálva követtük nyomon a 4-nitrofenol képződését. A minták ALP aktivitását fehérje tartalomra normalizálva adtuk meg.

6.11. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A sejteket a kezelések végeztével Trizol (RNA-STAT60) reagenssel tártuk fel. Ezt követően mintánként 2 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé, melyhez High Capacity cDNA RT kitet használtunk. A PCR reakciót valós idejű qPCR készülékben végeztük el. A target gének amplifikációja során iTaq™ Universal Probes Supermix master mixet és validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát, és hozzá tervezett primereket alkalmaztunk. A relatív génexpressziós változásokat delta-delta Ct módszerrel számítottuk ki.

6.12. Western Blot analízis

A sejteket szolubilizáló oldatban lizáltuk. A fehérjéket 10%-os SDS poliakrilamid gélen elválasztottuk majd a mintákat nitrocellulóz membránra blottoltuk. Ezt követően a membránt tejpör oldattal (6%-os) blokkoltuk, majd a membránhoz adtuk az elsődleges antitestet 1%-os tejpör oldatban (4°C, 12 óra). A kísérletek során felhasznált elsődleges antitestek a következők voltak: nyúl anti-human-Sox9, nyúl anti-Runx2, nyúl anti-ALP, nyúl anti-FtH, nyúl anti-FtL, nyúl anti-AGG, nyúl anti-Fabp4, egér anti-GAPDH. A membránt 1 órán keresztül inkubáltuk a torna peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (Amersham), az előhíváshoz Western ECL reagenst használtunk, és az eredményt röntgenfilmen jelenítettük meg.

6.13. Egér kísérletek

Kísérletünkben 10 darab C57BL/6 egeret (8-10 hetes, hím) használtunk fel. A vas túltelítettséget (N=5) vas-dextrán (200 mg/ testtömeg kg, 200 µl végtérfogatban PBS-ben hígítva) intraperitoneális (i.p.) adásával váltottuk ki a kontroll egereket 200 µl PBS-sel kezeltük (N=5). A kezelést háromszor ismételtük meg, egy-egy nap szünetet tartva. Az egerek életét szén-dioxiddal való lélegeztetéssel oltottuk ki, majd eltávolítottuk az egerek síp-és combcsontját.

6.14. Oszteoprogenitor sejtek izolálása kompakt csontból

A síp-és combcsontokról a leválasztást követően eltávolítottuk az epifizist. A csontdarabokat mozsárban összetörtük jéghideg 2% FBS-t, 1 mmol/L EDTA-t tartalmazó PBS-ben. Ezt követően a csontszövetet 0,25%-os I. típusú kollagenáz enzimmal emésztettük 5 percig, szobahőmérsékleten, majd a csontokat 1-2 mm-es darabkákra szeleteltük, és további 45 percen keresztül 37 °C-on emésztettük őket. Az így kinyert szuszpenziót 70 µm-es pórusméretű szűrőn átszűrtük és lecentrifugáltuk (300g, 10 perc, szobahőmérséklet).

6.15. Humán lencse minták

A humán lencse minták katarakta eltávolító műtéten átesett betegekből származtak (N=10, 6/4 nő/férfi, átlagéletkor: $71,5 \pm 9,1$). Az összes katarakta minta szenilis típusú volt. A kontroll lencse minták humán kadáver szemből (N=10, 7/3 nő/férfi, átlagéletkor: $64,4 \pm 11,5$) származtak. A lencse mintákból Ca tartalmat és OCN szinteket határoztunk meg. A Ca méréshez a minta egy-negyed részét 300 µL sósavban (0,6mol/L) egy órán keresztül szobahőmérsékleten rázogatva inkubáltuk. Ezt követően a mintákat centrifugáltuk (2000 g, 5 perc, szobahőmérséklet). OCN méréséhez a maradék mintát 300 µL EDTA-ban (0,5 mol/L, pH 6.9) tártuk fel. Végezetül a mintákat centrifugáltuk (2000 g, 5 perc, 4 °C).

6.16. Statisztika

Az eredményeket átlagérték $\pm$ standard deviáció formában adtuk meg. Az eredmények statisztikai analízisét t-próbával vagy többszörös összehasonlítás esetén ANOVA módszerrel végeztük el. A statisztikai analízist GraphPadPrism 5.02 Windows szoftverrel végeztük. A $p < 0,05$ eredményeket tekintettük szignifikáns módon eltérőnek.

4. Eredmények

4.1. A Pi és a Ca szinergista módon fokozza a BMSCs oszteogén differenciálódását.

Első célunk az optimális Pi és Ca dózisok beállítása volt, mely előidézi a BMSCs oszteogén differenciálódását a sejtek életképességének számottevő befolyásolása nélkül. Ennek érdekében a BMSCs-et 0-3 mmol/L Pi-tal és 0-1,2 mmol/L Ca-mal kiegészített tápfolyadékkal kezeltük 5 napon keresztül, majd az extracelluláris mátrix mineralizációját Alizarin vörös festéssel vizsgáltuk. A Pi és a Ca önmagában nem, de együttesen adva előidézte az extracelluláris mátrix mineralizációját. Ezzel párhuzamosan megfigyeltük az extracelluláris mátrix Ca tartalmának emelkedését is, mely arra utal, hogy a Pi és Ca szintek emelése oszteogén differenciálódást indukál a BMSCs-ben.

A sejtek életképességét megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az általunk alkalmazott Pi és Ca dózisok nem befolyásolják a BMSCs életképességét 5 napos kezelést követően. A dózisgörbék alapján kiválasztottuk azt a Pi és Ca dózist, melyet a munka további részében alkalmaztunk a BMSCs oszteogén differenciálódásának kiváltására. Így a továbbiakban az oszteogén differenciálódást 3 mmol/L Pi-tal és 1,2 mmol/L Ca-mal kiegészített tápfolyadékkal (oszteogenikus médium) idéztük elő.

Annak bizonyítására, hogy az oszteogenikus médium jelenlétében kialakuló mineralizáció a sejtek aktív részvételével zajló folyamat, a kezeléseket a fehérjeszintézist gátló cikloheximid (CHX) jelenlétében is elvégeztük, és 5 nap elteltével megmértük az extracelluláris mátrix Ca tartalmát. CHX jelenlétében nem tapasztaltunk mineralizációt, ami azt bizonyítja, hogy a BMSCs mineralizációjához *de novo* fehérjeszintézis szükséges.

4.2. A vastöbbllet gátolja a BMSCs oszteogenikus differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját.

A következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a vastöbbllet befolyásolja-e BMSCs oszteogén differenciálódását. A BMSCs-t vastöbbllet jelenlétében illetve

hiányában oszteogenikus tápfolyadékkal kezeltünk, és Alizarin vörös festéssel vizsgáltuk az extracelluláris mátrix mineralizációját. A vasat vas-ammónium citrát formájában 1-50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációtartományban alkalmaztuk. A vastöbbslet dózisfüggő módon gátolta a BMSCs mineralizációját, és 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a mineralizáció teljes elmaradását eredményezte.

Ezt követően megvizsgáltuk a vastöbbslet hatását az oszteogenezis mester transzkripció faktorának, a Runx2-nek a szintjére. Oszteogén stimulus hatására a Runx2 mRNS szintje 1,6-szorosára emelkedett, mely emelkedést a vas 25 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban teljes mértékben gátolt. A mRNS szinttel párhuzamosan az oszteogén stimulus hatására megemelkedett a BMSCs Runx2 fehérje expressziója. Érdekes módon a vas 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a Runx2 fehérje expresszióját a kontroll sejtek expressziója alá csökkentette. Oszteogenikus stimulus hatására jelentősen megemelkedett az OCN szintje a BMSCs extracelluláris mátrixában. Ezt a hatást a vas dózisfüggő módon gátolta, 25 $\mu\text{mol/L}$ és a feletti koncentrációban teljes inhibíciót okozva.

4.3. A ferritin a vashoz hasonlóan gátolja a BMSCs oszteogenikus differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját.

A vastöbbslet indukálja a ferritin vastároló fehérje expresszióját és korábbi eredmények alapján feltételeztük, hogy a megemelkedett ferritin szerepet játszhat a BMSCs oszteogén differenciálódásának vas általi gátlásában. A sejteket oszteogenikus tápfolyadékban 1, illetve 2 mg/ml-es ferritin koncentrációk jelenlétében tartottuk 5 napon keresztül. A ferritin alacsonyabb dózisa mellett gyenge, míg a magas dózis mellett egyáltalán nem tapasztaltunk Alizarin vörös pozitivitást, és az extracelluláris mátrix Ca szintjének oszteogén stimulus által keltett megemelkedése is elmaradt ferritin jelenlétében. Továbbá a ferritin gátolta a Runx2 mRNS és fehérje szintjének valamint az ALP és OCN oszteogén stimulus által keltett emelkedését.

4.4. A vastöbbslet csökkenti az oszteoprogenitor sejtek Runx2 expresszióját in vivo.

C57BL/6 egerekben vas-dextrán adásával vas túltelítettséget hoztunk létre, és összehasonlítottuk a belőlük izolált kompakt csont eredetű oszteoprogenitor sejtek FtH és Runx2 mRNS szintjeit kontroll egerekével. A vas-dextrán kezelés hatására több mint négyszeresére emelkedett a sejtek FtH mRNS szintje, amiből arra következtettünk, hogy a vas túltelítés létrehozása sikeres volt, és érintette a kompakt csontban található oszteoprogenitor sejtpopulációt is. E mellett a vassal túltelített egerek oszteoprogenitor sejtjeiben jelentős mértékű Runx2 mRNS szint csökkenést észleltünk.

4.5. Az oszteogenikus stimuláció indukálja a HuLECs oszteogén differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját.

A kataraktás szemlencsében a kalcifikálódott érfalban található hidroxiapatit-hoz hasonló kémiai összetételű és szerkezetű Ca-foszfát kristályok jelenlétét írták le. Hipotézisünk szerint a hidroxiapatit kristályok kialakulásában szerepet játszhat a lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódása és az extracelluláris mátrix mineralizációja. Ennek tesztelése céljából HuLECs-et Pi-tal (0-3.5 mmol/L) és Ca-mal (0-1.2 mmol/L) kiegészített oszteogenikus médiumban tartottuk 7 napon keresztül. A foszfát többlet 3,5 mmol/L koncentrációban indukálta a HuLECs extracelluláris mátrix mineralizációját. Ezzel szemben a megemelt Ca koncentráció nem idézett elő mineralizációt, viszont szinergista módon fokozta a megemelt Pi által indukált mineralizációt. Az extracelluláris mátrix mineralizációja mellett oszteogén stimulus hatására megemelkedett a HuLECs-ben a Runx2 oszteogén, és Sox9 kondrogén mester transzkripciós faktorok mRNS szintje és fehérje expressziója. Ezzel párhuzamosan fokozódott az ALP enzim mRNS és fehérje expressziója, valamint aktivitása és az OCN jelenléte az extracelluláris mátrixban.

4.6. Eltérések és hasonlóságok a HuLECs oszteogenikus differenciációja és az EMT között.

A katarakta kialakulásában szerepet játszik a HuLECs mesenchymális sejt irányú differenciálódása is. A következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az oszteogén stimulus EMT-hoz hasonló változásokat indukál-e HuLECs-ben. E célból a sejteket kontroll vagy oszteogenikus körülmények között tartottuk, és meghatároztuk az α -SMA, Slug, Pax-6 és E-cadherin mRNS expresszióját 24 óra után és öt napos kezelést követően. Megállapítottuk, hogy az oszteogén stimulus hatására jelentősen csökkent az α -SMA mRNS szintje. Ezzel szemben oszteogén stimulus hatására átmeneti csökkenést figyeltünk meg a Pax6 epithelsejt marker mRNS szintjében, mely az EMT során is megfigyelhető. Végezetül az EMT-ben fontos szerepet játszó Snail szupercsaládba tartozó Slug transzkripciós faktor, és az általa regulált E-cadherin mRNS expresszióját vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az EMT-ben megfigyeltékhez hasonló módon az oszteogenikus stimulus hatására emelkedett a Slug mRNs szintje, mely az E-cadherin mRNS szintjének csökkenésével társult.

4.7. Az oszteogenikus differenciálódás markereinek kimutatása humán kataraktás szemlencsében.

Végezetül azt vizsgáltuk, hogy a kataraktás szemlencsében kimutathatóak-e az oszteogén differenciálódásáa utaló markerek. Kísérletünkben 10 kataraktás egyén katarakta műtét során eltávolított lencsáját és 10 kontroll lencsét használtunk fel. Elsőként a lencsék Ca tartalmát mértük meg. A kataraktás lencsék Ca tartalma több mint hatszorosa volt a kontroll minták Ca tartalmának. Ezt követően a lencse minták OCN koncentrációját határoztuk meg ELISA módszerrel. A kontroll minták OCN szintje minden esetben a detekciós határ alatt volt. Ezzel szemben a 10 kataraktás lencséből 2 esetben tudtunk OCN-t detektálni (0.52 ng/mL és 0.69 ng/mL). OCN pozitivitást a legmagasabb Ca tartalmú lencse minták mutattak.

5. Megbeszélés

Jelen munkánkban kimutattuk, hogy a vastöbbllet gátolja a BMSCs oszteogén irányú differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját. Kísérleteink során az oszteogén differenciálódás kiváltására magas Pi és Ca tartalmú oszteogén médiumot használtunk. Ezt a fajta oszteogén médiumot a szakirodalomban elsőként használtuk BMSCs oszteogén differenciálódásának előidézésére. Megállapítottuk továbbá, hogy a magas Pi és Ca tartalmú oszteogén médium hatására a BMSCs oszteogén differenciálódása sokkal gyorsabban bekövetkezik, mint a korábbiakban említett induktorok esetében (5 nap vs. 8-14 nap). A vastöbbllet 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a BMSCs oszteogén differenciálódásának és az extracelluláris mátrix mineralizációjának teljes gátlását idézte elő. Ez az eredmény összhangban áll Zarjou et al. korábbi eredményével, melyben kimutatták, hogy a vastöbbllet 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a VSMCs oszteogén transzdifferentiálódásának teljes gátlását okozza. Zarjou et al. korábbi munkájában kimutatta, hogy a vas oszteogén differenciálódást gátló hatásáért a ferritin indukciója a felelős.

Kísérleteink igazolták, hogy a ferritin a VSMCs oszteogén transzdifferentiálódásához hasonlóan a BMSCs oszteogén differenciálódását is gátolja. Az oszteogén differenciálódás mester transzkripció faktor a Runx2, melynek legfontosabb bizonyítéka, hogy a Runx2 hiányos egerben nincsenek differenciált oszteoblasztok, a csontképződés elmarad. Munkánk során megállapítottuk, hogy a vastöbbllet a Runx2 transzkripció faktor expressziójának csökkentésén keresztül gátolja az oszteogén differenciálódást. Érdekes az a megfigyelésünk, hogy a vastöbbllet oszteogén körülmények mellett a Runx2 transzkripció faktor expresszióját a kontroll sejtek Runx2 expressziója alá csökkentette. Kimutattuk, hogy a vastöbbllet *in vivo* körülmények között is csökkenti a kompakt csontban található oszteoprogenitor sejtek Runx2

expresszióját. Véleményünk szerint ez a mechanizmus szerepet játszhat a vastűtelítettséggel társult oszteoporózis kialakulásában.

Vizsgáltuk a vastöbblet hatását a BMSCs kondrogén illetve adipogén irányú differenciálódására is. A vastöbblet nem befolyásolta a BMSCs kondrogén illetve adipogén differenciálódását, így megállapítottuk, hogy a szakirodalomból ismert inverz kapcsolat a BMSCs oszteogén és adipogén differenciációs képessége között vastöbblet esetén nem áll fenn.

Az ektópiás kalcifikáció, a hidroxipatit lerakódása a lágyszövetekben, számos szervet, többek között a szemet is érintheti. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiás és Raman mikrospektroszkópiás vizsgálatok a kataraktás szemlencsében a kalcifikálódott érfalban található hidroxipatithoz hasonló kémiai összetételű és szerkezetű Ca-foszfát kristályok jelenlétét írták le. A HuLEC sejteken végzett kísérleteink elsődleges célja annak a megállapítása volt, hogy ezek a sejtek a VSMCs-hez hasonló módon képesek-e oszteogén irányú transzdifferenciálódásra. A HuLECs oszteogén differenciálódását magas Pi és Ca tartalmú oszteogén tápfolyadékkal indukáltuk. A Pi dózisfüggő módon indukálta a HuLECs extracelluláris mátrixának mineralizációját, melyet a Ca nagymértékben fokozott.

Újabb eredmények arra utalnak, hogy a vaszkuláris kalcifikáció nem tisztán oszteogén irányú, inkább oszteo-kondrogén differenciálódásnak tekinthető, melyre a Sox9 fokozott expressziója utal. Ennek ismeretében vizsgáltuk az oszteogén stimulus hatását HuLECs Runx2 és Sox9 expressziójára. Kimutattuk, hogy oszteogén stimulus hatására fokozódik a Runx2 és Sox9 mRNS és fehérje expressziója. A nem szövetspecifikus ALP enzimek szinte mindenféle szövetben expresszálódnak, legnagyobb mértékben a májban, a vesében és a csontokban. Az ALP expressziója és aktivitása jelentősen megemelkedik kalcifikált VSMCs-ben. Érdekes módon a kataraktás betegek plazmájában az ALP aktivitása jelentős emelkedést mutat, bár ennek hátterében inkább májkárosodást valószínűsítene. Ezen eredmények nyomán vizsgáltuk az ALP expressziójának és

enzimaktivitásának oszteogén stimulus hatására bekövetkező változását HuLECs-ben. A VSMCs-hez hasonlóan oszteogén stimulus hatására emelkedett a HuLECs ALP expressziója és enzimaktivitása. Az OCN a Runx2 transzkripciók kontrollja alatt álló csontspecifikus fehérje, mely jelentős expressziót mutat mineralizált csontmátrixban, porcban és dentális szövetekben. E mellett magas OCN szinteket mértek mineralizált extraszkeletális szövetekben, például kalcifikált erekben és calciophylaxisban szenvedő betegek bőr léziójában. Munkánk során vizsgáltuk az oszteogén stimulus hatását HuLECs OCN expressziójára, és megállapítottuk, hogy a HuLECs oszteogén differenciálódása során fokozódik az OCN expressziója. Az OCN expresszióját kataraktás szemlencsékben is vizsgáltuk. Az általunk vizsgált 10 betegből származó kataraktás lencsék közül kettőben találtunk detektálható mennyiségű OCN-t, míg a kontroll lencsék egyikében sem detektáltunk OCN-t. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az esetek némelyikében előfordulhat a lencse epithél sejtek oszteogén irányú differenciálódása.

BMSCs-en végzett munkánk legfőbb limitációja, hogy nem tártuk fel a vas/ferritin anti-oszteogén hatásának háttérében álló szignál transzdukciós útvonalat/útvonalakat. Ezeket a vizsgálatokat a jövőben mindenképpen szeretnénk elvégezni. A lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódásával kapcsolatos munkánk folytatásában szeretnénk néhány a katarakta kialakulásában releváns induktor (glükóz, szteroid) oszteogén differenciálódást kiváltó hatását tesztelni HuLECs sejteken *in vitro* körülmények között, valamint *in vivo* egérmodellben szeretnénk tovább vizsgálni az oszteogén differenciálódás szerepét a katarakta kialakulásában.

6. Összefoglalás

Munkánk során BMSCs és HuLECs oszteogén differenciálódási folyamatait tanulmányoztuk. A BMSCs-en végzett kísérleteink fő célja annak a vizsgálata volt, hogy a vas túltelítettség hogyan befolyásolja a BMSCs oszteoblaszt irányú differenciálódását. Kimutattuk, hogy a vastöbblet gátolja a BMSCs oszteogén stimulussal indukált oszteogén differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját. E hatás mögött a Runx2 oszteogén mester transzkripció faktor indukciójának vas általi gátlása áll, melynek következtében elmarad a Runx2 által szabályzott csontosodásban szerepet játszó fehérjék oszteogén stimulus hatására bekövetkező indukciója. A vas túltelítettséget egerekben létrehozva az oszteoprogenitor sejtek csökkent Runx2 mRNS szintjét figyeltük meg. A BMSCs többirányú differenciációra képes multipotens őssejt, így vizsgáltuk a vastöbblet hatását adipogén és kondrogén irányú differenciálódásban is, és azt tapasztaltuk, hogy a vastöbblet ezeket az útvonalakat nem befolyásolta.

HuLECs-en végzett munkánk célja annak a vizsgálata volt, hogy oszteogén stimulus kiváltja-e a HuLECs oszteogén differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját. Kimutattuk, hogy oszteogén stimulussal a HuLECs oszteogén differenciálódása, és az extracelluláris mátrix mineralizációja kiváltható. A mineralizáció hátterében a Runx2 oszteogén, és a Sox9 kondrogén mester transzkripció faktorok. Humán szemlencséken végzett vizsgálataink során megállapítottuk, hogy néhány kataraktás szemlencsében kimutatható mennyiségben volt jelen a csontmátrix egyik fontos fehérjéje, az OCN, míg a kontroll lencsékben az OCN expressziója minden esetben az általunk használt módszer kimutathatósági határa alatt volt. Összességében munkánk hozzájárulhat a vastúltelítettséggel társuló csontabnormalitások, valamint a katarakta kapcsán megfigyelt hidroxipapatit depozíció hátterében álló folyamatok jobb megértéséhez.

7. Saját közlemények jegyzéke



**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/79/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Balogh Enikő
Neptun kód: G2J99Q
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balogh, E.**, Tolnai, E., Nagy, B. J., Nagy, B., Balla, G., Balla, J., Jeney, V.: Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1862 (9), 1640-1649, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.003>
IF: 5.476
2. **Balogh, E.**, Tóth, A., Tolnai, E., Bodó, T., Bányai, E., Szabó, D. J., Petrovski, G., Jeney, V.: Osteogenic differentiation of human lens epithelial cells might contribute to lens calcification.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1862, 1724-1731, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.012>
IF: 5.476

További közlemények

3. Potor, L., Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Jeney, V., Pethő, D., Vasas, A., Pálincás, Z., **Balogh, E.**, Gyetvai, Á., Whiteman, M., Torregrossa, R., Wood, M. E., Olvasztó, S., Nagy, P., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen Sulfide Abrogates Hemoglobin-Lipid Interaction In Atherosclerotic Lesion.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-16, 2018.
IF: 4.593 (2016)
4. Erdei, J., Tóth, A., **Balogh, E.**, Nyakundi, B. B., Bányai, E., Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Induction Of NLRP3 Inflammasome Activation By Heme In Human Endothelial Cells.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-14, 2018.
IF: 4.593 (2016)





5. **Balogh, E.**, Nagy, B. J., Gyetvai, Á., Bene, Z., Hendrik, Z., Jeney, V., Nagy, P., Papp, Á., Balla, J., Balla, G., Kappelmayer, J., Nagy, B.: Impaired Immunosuppressive Effect of Bronchoalveolar Mesenchymal Stem Cells in Hypersensitivity Pneumonitis: preliminary findings.
Cytom. Part B-Clin. Cytom. [Epub ahead of print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21490>
IF: 2.474
6. Becs, G., Zarjou, A., Agarwal, A., Sikura, K. É., Becs, Á., Nyitrai, M., **Balogh, E.**, Bányaí, E., Eaton, J. W., Arosio, P., Poli, M., Jeney, V., Balla, J., Balla, G.: Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 20 (2), 217-230, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12682>
IF: 4.499
7. Bányaí, E., **Balogh, E.**, Fagyas, M., Arosio, P., Hendrik, Z., Király, G., Szemán-Nagy, G., Tánczos, B., Pócsi, I., Balla, G., Balla, J., Bánfalvi, G., Jeney, V.: Novel functional changes during podocyte differentiation: increase of oxidative resistance and H-ferritin expression.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 1-10, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/976394>
IF: 3.516
8. Ruzsnavszky, O., Dienes, B., Oláh, T., Vincze, J., Gáll, T., **Balogh, E.**, Szemán-Nagy, G., Bátorfi, R., Lontay, B., Erdődi, F., Csernoch, L.: Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes.
PLoS One. 8 (4), e61507, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061507>
IF: 3.534
9. Horváth, E., Szemán-Nagy, G., Turáni, M., **Balogh, E.**, Papp, G., Pollák, E., Pócsi, I., Pestí, M., Bánfalvi, G.: Effect of the fungal mycotoxin patulin on the chromatin structure of fission yeast.
J. Basic Microbiol. 52 (6), 642-652, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100515>
IF: 1.198

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,359

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,952

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

Debrecen, 2018.03.26.



8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Jeney Viktóriának*, aki magasszintű szakmai tudásával az elmúlt évek során segítette munkámat, akihez bármikor fordulhattam segítségért, nélkülözhetetlen támogatást nyújtott eredményeim eléréséhez és segített elsajátítani a kutatói szakma alapjait. Hálásan köszönöm, hogy követendő példát adott számomra munkaszeretetből, és az igényességre való törekvésből.

Hálásan köszönöm *Dr. Balla József és Dr. Balla György* professzor uraknak, hogy lehetővé tették számomra, hogy az értekezésem alapjául szolgáló kísérleteim egy részét a Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratóriumban végezhettem.

Köszönetemet fejezem ki *Dr. Paragh György* professzor úrnak és *Dr. Seres Ildikónak*, akik biztosították számomra, hogy tudományos munkámat a Belgyógyászati Intézet Kutató Laboratóriumában folytathassam.

Köszönöm a Belgyógyászati Intézet jelenlegi és volt munkatársainak, különösen *Dr. Bányai Emesének, Dr. Becs Gergelynek, id. Dr. Nagy Bélának és Dr. Nagy Béla Jr.-nak, Dr. Gyetvai Ágnesnek, Dr. Balázsne Szőnyi Anikónak és Dr. Bodó Tímeának* a sok tanácsot és a közös munkát.

Köszönettel tartozom *Tóth Andrea* PhD hallgatónak, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a kísérletek megvalósításában.

Köszönöm a kutatócsoport jelenlegi PhD hallgatóinak, így *Erdei Juditnak és Bogonko Benard Nyakundinak* a támogatását.

Külön szeretném megköszönni *Orosz Józsefnek*, aki az állatkísérletekkel kapcsolatban támogatta munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni *családomnak*, de legfőképpen *nagymamámnak* illetve *barátaimnak*, mert az ő szeretetük és biztatásuk nélkül jelen disszertáció nem készülhetett volna el.

Balogh Enikő az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság (ÚNKP-16-3-III) és Nemzeti Tehetség Program (NTP-EFÖ-P15) támogatásában részesült. A kutatás pénzügyi háttérét az alábbi pályázatok biztosították: OTKA Kutatási Pályázat (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFI-6 K116024/2015) és GINOP-2.3.2-15-2016-00005.

Ezt a munkát szeretett nagymamám emlékének ajánlom!