

DEBRECENI EGYETEM
Orvos és Egészségtudományi Centrum
ÉLETTANI INTÉZET

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

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Írta:
Fodor János



Témavezető:
Dr. Csernoch László

**DEBRECEN
2009.**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés.....	6
Irodalmi háttér.....	6
<i>A porcshövet és a vázizomszövet közös mesenchymalis eredete</i>	6
<i>A porcshövet fejlődése</i>	6
<i>A hyalinporc felépítése és élettani sajátosságai</i>	7
<i>A porcdifferenciálódás tanulmányozására szolgáló modellek</i>	9
<i>A porcdifferenciálódás intracelluláris szabályozása</i>	11
<i>Az intracelluláris [Ca²⁺] változásainak szerepe a differenciálódási folyamatokban</i>	13
<i>A purinoreceptorok</i>	14
<i>A vázizom fejlődése</i>	15
<i>A vázizom felépítése és élettani sajátosságai</i>	16
<i>Az izomfejlődés modellezése az izom Ca²⁺-háztartásának vizsgálatára alkalmas sejt kultúrákban</i>	18
<i>Az intracelluláris [Ca²⁺] jelentősége az izomfejlődés során</i>	19
<i>A rianodinreceptor (RyR)</i>	20
<i>A triadin 95 vázizomfehérje (Trisk 95)</i>	20
<i>Egyéb triadin izoformák</i>	22
<i>A nyugalmi citoplazmatikus [Ca²⁺] visszaállítása, fenntartása</i>	22
<i>A vázizom intracelluláris kalcium eseményei</i>	22
Célkitűzések.....	24
Anyagok és módszerek.....	25
Sejt kultúrák.....	25
<i>Primer, nagy sűrűségű (High Density, HD) porc tenyésztet</i>	25
<i>Vázizom tenyésztetek és a fehérje expresszió módosítása céljából alkalmazott transzfekciós technikák</i>	25
Immuncitokémia.....	28
RT-PCR.....	29
Membránfrakció-preparálás.....	31
Western-blot analízis.....	31
A porcmátrix mennyiségének meghatározása extracelluláris ATP, ADP, UDP, UTP és suramin alkalmazását követően.....	32
A HD sejttenyésztetek által a tápoldatba szekretált ATP meghatározása.....	32
Egyedi sejteken történő fluoreszcens, intracelluláris [Ca ²⁺]-mérés.....	33
Konfokális mikroszkópos mérések.....	35
Eredmények I.	38
Porcshövet – primer HD sejttenyésztetek.....	38
<i>Az extracellulárisan alkalmazott ATP citoplazmatikus [Ca²⁺] emelkedést eredményez a differenciálódó primer porcsejteken</i>	38
<i>A chondrogenikus mesenchymalis sejtek különböző P2X-receptortípusokat expresszálnak a sejttenyésztet korától és a differenciálódási stádiumtól függően</i>	40
<i>A differenciálódás napján a tenyésztő tápoldat ATP-vel történő kiegészítése fokozza a primer porcsejtek mátrixtermelését</i>	44
<i>A HD tenyésztetek sejtjei ATP-t szekretálnak a tenyésztőtápoldatba</i>	44
<i>A P2Y-receptorok vizsgálata</i>	45
Eredmények II.	49
Vázizomszövet - <i>in vitro</i> vázizomtenyésztetek.....	49

<i>Trisk 95 overexpresszió C2C12 izomsejtekben</i>	49
<i>Ca²⁺-tranziensek Trisk 95 túltermelő C2C12 izomsejteken</i>	50
<i>Elemi Ca²⁺-felszabadulási események Trisk 95 túltermelő C2C12 izomsejteken</i>	52
<i>Trisk 95 túltermelés egér eredetű, primer vázizomtenyészetben</i>	54
<i>Az endogén triadinexpresszió gátlása RNS interferencia módszer alkalmazásával patkány eredetű, primer vázizomtenyészetekben</i>	55
<i>Ca²⁺-tranziensek az endogén Trisk 95 fehérjét kisebb mértékben expresszáló patkány eredetű, primer myotubulusokban</i>	57
<i>Ca²⁺-felszabadulási események csökkentett endogén Trisk 95 fehérje termeléssel rendelkező patkány eredetű, primer myotubulusokban</i>	59
<i>A Trisk 95 fehérje csökkent expressziójának hatása a calsequestrin és a rianiodinreceptor megjelenésére</i>	62
Megbeszélés	63
Porcszövet – primer, HD sejttenyészetek	63
Vázizomszövet - <i>in vitro</i> vázizomtenyészetek	66
<i>Ca²⁺-tranziensek myotubulusokban a triadinexpresszió módosítását követően</i>	67
<i>Lokalizált, elemi Ca²⁺-felszabadulási események a triadinexpresszió módosítását követően</i>	68
Összefoglalás	70
Porcszövet – primer, HD sejttenyészetek	70
Vázizomszövet - <i>in vitro</i> vázizomtenyészetek	70
Summary	72
Irodalomjegyzék	74
Közlemények	81
Előadások, Poszterek	82
Köszönetnyilvánítás	84

Rövidítések jegyzéke

- BMP - Bone Morphogenic Protein - csontképző fehérje
- BSA - Bovine Serum Albumine - borjúsérum albumin
- [Ca²⁺] - Calcium concentration - kalciumkoncentráció
- cAMP - Cyclic Adenosine Monophosphate - ciklikus adenzin monofoszfát
- CICR - Calcium Induced Calcium Release - kalcium-indukált kalciumfelszabadulás
- CLSM - Confocal Laser Scanning Microscope - konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp
- CMF-PBS - Ca²⁺-Mg²⁺ Free Phosphate Buffer Solution - Ca²⁺-Mg²⁺-mentes foszfát puffer-oldat
- CMP - Cartilage Matrix Protein - porc mátrix fehérje
- COMP - Cartilage Oligomeric Matrix Protein - oligomer porc mátrix fehérje
- CPA - Cyclopiazonic Acid - ciklopiazonsav
- CREB - cAMP Response Element Binding Protein
- DHPR - Dihydropyridin Receptor - dihidropiridin receptor
- DMMB - Dimethylmethylene Blue – dimetil-metilénkék
- ECM - Extracellular Matrix - extracelluláris mátrix
- ECRE - Elementary Calcium Release Events - elemi kalciumfelszabadulási események
- ER - Endoplasmic Reticulum - endoplazmatikus retikulum
- FBS - Fetal Bovine Serum - foetalis borjúsérum
- FWHM - Full Width at Half Maximum - a maximális amplitúdó feléhez tartozó szélesség
- GAG - Glucoseaminoglycane - glükózaminoglikán
- HD - High Density cell culture - nagy sűrűségű sejttenyészet
- HMG - High Mobility Group - nagy mobilitású csoport
- HRP - Horse-Radish Peroxidase - tormaperoxidáz
- IP₃ - Inositol Trisphosphate - inozitol triszfoszfát
- N-CAM - Neural-Cell Adhesion Molecule - neuronális sejt adhéziós molekula
- NCX - Na⁺-Ca²⁺ exchanger - Na⁺-Ca²⁺-cserélő fehérje
- NECA - N-[2-(4-aminofenyl)ethyl]-adenosine - N-[2-(4-aminofenil)etil]-adenozin
- NMDA - N-metil-D-aszpartát
- PGE₂ - Prostaglandine E₂- prosztaglandin E₂
- PLC - Phospholipase C - foszfolipáz C
- PKA - Protein Kinase A - protein kináz A
- PMCA - Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase - plazmamembrán Ca²⁺-pumpa

PSM - presomitic mesoderm - preszomítikus mezoderma
RyR - Ryanodine Receptor - rianodinreceptor
SDS-PAGE - Sodiumdodecil Sulphate-Poliacrilamide gelectrophoresis -
Na⁺-dodecylszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis
SERCA - Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase - szarko(endo)plazmatikus retikulum
Ca²⁺-pumpa
shRNS - small hairpin Ribonucleic Acid
SOCE - Store Operated Calcium Entry - raktár által vezérelt kalcium-belépés
SR - Sarcoplasmic Reticulum - szarkoplazmatikus retikulum
TB - Toluidine Blue - toluidinkék
TGF - Transforming Growth Factor - növekedési faktor
Trisk 95 - Skeletal Triadin 95 - triadin 95 vázizomfehérje
TRPC - Transient Receptor Potential Channel - tranziens-receptorpotenciál csatorna
VICR - Voltage Induced Calcium Release - feszültség által kiváltott kalciumfelszabadulás

Key words: *in vitro* cartilage formation, High Density cell culture, Fura-2, single cell
Ca²⁺-measurement, P2X receptors, P2Y receptors, ATP-secretion, immunocytochemistry,
skeletal muscle, calcium spark, triadin

Kulcsszavak: *in vitro* porcképződés, nagy sűrűségű sejtenyészet, Fura-2, egyedi sejten
történő Ca²⁺-mérés, purinoreceptorok, ATP-szekréció, immuncitokémia, vázizom, Ca²⁺-spark,
triadin

Bevezetés

Irodalmi háttér

A porcszövet és a vázizomszövet közös mesenchymalis eredete

Az ízületi porc degeneratív elváltozása, az *arthrosis*, valamint annak gyulladásszerű eredetű megbetegedései, az *arthritis és rheumatoid arthritis* a társadalom jelentős részét érintő problémák. Ugyanakkor a szerzett vagy öröklött vázizombetegségek mint a *myotonia, progresszív izomdystrophia, izomatrophia*, nagy részben fatális kimenetelűek, még az idősor elérését megelőzően. A két szöveti terület kóros elváltozásai gyakran egymás kórkövetkezményeként alakulnak ki. A két szövetfejlődése részben közös: a gastruláció során a paraxiális mesoderma elkülönül az axiális és laterális mesodermától, és a velőcső két oldalán két megegyező, szegmentálatlan mesodermacsíkot hoz létre, amit presomiticus mesodermának (PSM) nevezünk. Gerincesekben a PSM hozza létre a tengelyvázat, valamint a törzs- és a végtagizmokat. A PSM mint nem szegmentált szövet különböző molekuláris és morfogenetikai változások során szegmentálódik, és létrejönnek a somiták. A 4. hét kezdetére a somiták ventralis és medialis falát alkotó sejtek elveszítik addigi kompakt szerveződésüket, a gerinchúr irányába vándorolnak, majd körülveszik azt; létrehozva a sclerotomot, ami az embrionális mesenchyma laza szövetét alkotja. A dorsalis somitafal sejtjei képezik a myotomot és dermatomot. A korai embrionális élet során több csíralemez sejtjei is porcszövetté differenciálódhatnak. A fej-nyak régió kivételével testünk porcszöveitei a középső csíralemez származékai: a törzs csontjainak vázát adó porckezdemények a *paraxialis mesoderma* szegmentálódásaként létrejövő somiták *sclerotom* komponenseiből fejlődnek, míg a végtagtelepek porctemplátjai a laterális mesodermából kialakult mesenchymalis szövet származékai. A fej-nyaki régió porcképződményeiért a *velőléc (crista neuralis)* sejtjei felelősek. Az izomszövet prekursor sejtjei (premyoblastok) a myotom sejtjeinek osztódásával alakulnak ki, és további fejlődéssel és fúzióval képezik a majdani vázizomrostokat [1].

A porcszövet fejlődése

A porcszövet a gerincesek egyik alapvető támasztószöve. A porcszövet fejlődése a mesenchymalis sejtek gyors szaporodásával kezdődik, és kétféle módon mehet végbe; nevezetesen interstitialis vagy appositionalis növekedés formájában. Az interstitialis növekedés során (amely elsősorban az embrionális fejlődésre jellemző) az endochondralis csontosodást megelőzően az embrionális kötőszövetből (mesenchymából) porcos váz alakul ki. A folyamat első lépését a chondroprogenitor mesenchymalis sejtek kondenzációja jelenti.

A sejtek ezután kis csomókat képeznek, és kiterjedt sejt–sejt kapcsolatokat hoznak létre, amik jelentősen hozzájárulnak a chondroblastok differenciálódásához. Ennek során a sejtek fibroblast-szerű, nyúlványos morfológiájukat gömbölyűre váltják, és porcspecifikus extracelluláris mátrixot termelnek, amely II. típusú kollagénben és aggregánban gazdag. Az appositionalis növekedés során a porcszövet a felszín felől képződő, új porcszövet rárakódásával növekszik. Ilyenkor a porchártya (perichondrium) belső rétegét képző, kevésbé differenciált sejtek chondroblastokká differenciálódnak, maguk körül porc alapállományt képeznek, amely a pericelluláris és kissé távolabb a territoriális mátrix alkotója lesz. A sejtek nyúlványos alakú morfológiája eközben megváltozik, és ellapult, kerekded sejtekké alakulnak.

A már kialakult porcszövet nem egységes. Alapállománya a szervezet különböző helyi követelményeihez alkalmazkodva, egyes helyeken rugalmas rostokkal, más helyeken tömött kollagénrost-nyalábokkal egészül ki. A makroszkópos és mikroszkópos morfológiai sajátosságok alapján a porcszövetet három nagy csoportba sorolható:

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

A különböző porctípusok között csak a kerekded morfológiájú chondrocyták jelentik a hasonlóságot, melyek jelentős mennyiségű, speciális összetételű és szerkezetű extracelluláris mátrixba (ECM) ágyazódnak [2]. Jelen kutatásaink tárgyát a hyalinporc képezte.

A hyalinporc felépítése és élettani sajátosságai

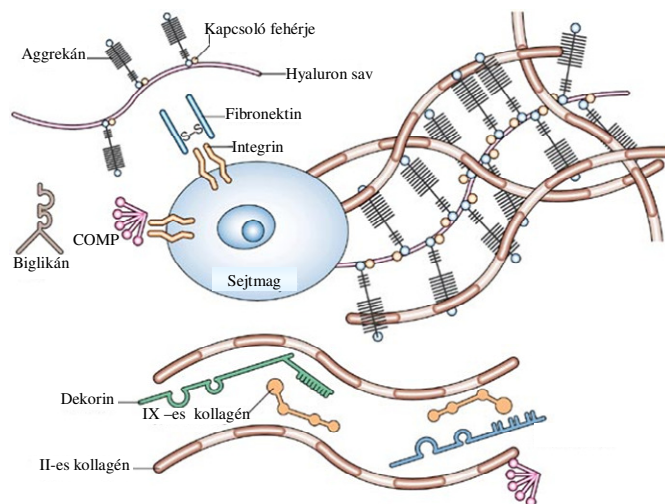
Az embrió kezdeti fejlődése során a vázrendszer túlnyomó többségében porcszövetből áll. A hyalinporc a belőle később *endochondralis csontosodással* kialakuló csontok vázát alkotja. A csontosodás folyamán hyalinporc képezi a gyermek és serdülőkorban bekövetkező gyors hossznövekedésért felelős *epiphysis porckorongot*. Felnőtt korban az ízesülő csontok felszínét borítja mint ízületi porc, azoknak rendkívüli kopásállóságot biztosítva egész életünk során. Megtalálható ezenkívül az egyes zsigerek (gége, légcső, bronchusok) vázát adó állandósult porc formájában is. Szövettani jellemezője a kis térfogatarányban jelenlevő chondrocyták, és az azokat körülvevő porcspecifikus extracelluláris mátrix. A hyalinporcot az ízületi porcfelszín kivételével porchártya (perichondrium) borítja, melyet szövettanilag rostban gazdag külső lemez (stratum fibrosum), valamint sejtűs belső lemez (stratum chondroblasticum) képez. Utóbbinak a sejtjei felelősek a már említett appositionalis növekedésért. A differenciált porcsejt kerekded morfológiával jellemezhető. A fiatal,

mátrixtermelésben aktívabb sejtek a fokozott fehérjeszintézis morfológiai jegyeit mutatják, míg a porc belsejében lokalizálódó kevésbé aktív, idősebb sejtek kevesebb sejtorganellumot tartalmaznak, citoplazmájuk jelentős részét glikogén és zsírcseppek töltik ki. A mátrix fénymikroszkópban egyneműnek látszik, festődése basophil. A porcsejtek kisebb csoportokban az alapállomány üregeiben (lacunákban) helyezkednek el. A sejtcsoport és az azt övező territoriális mátrix alkotja a porcszövet alapegységének tekinthető chondront. A chondronban a közepén elhelyezkedő chondrocytákat vékony, erősen basophil festődésű porctok (pericelluláris mátrix) veszi körül. A speciális összetételű mátrix az alábbi fő molekulacsoportból tevődik össze:

Kollagének. A porcra alapvetően jellemző a fibrillumokat képező II-es típusú kollagénmolekula; ám jelentős szerep tulajdonítható a kisebb részarányban jelen lévő kollagéneknek is. A IX-es és XI-es típusú kollagének a többi mátrixalkotónak a kollagénhálózathoz való kapcsolásáért felelősek, a X-es típusú kollagén a kollagénfibrillumok szabályos hálózatba történő szervezésében játszik szerepet, és az epiphysis porckorong hypertrophiás zónájának egyik alkotóeleme. A VI-os típusú kollagén a chondrocyták és a mátrix közötti kapcsolat fenntartásának fontos szereplője.

Proteoglikánok. Legjellegzetesebb képviselőjük az aggregán. Az aggregán monomerek egy központi tengelyfehérjéből és az ahhoz csatlakozó glükózaminoglikán (GAG) oldalláncokból (chondroitin-szulfát és keratán-szulfát) állnak, és a porc mátrix hyaluronsavláncjaihoz kapcsolódva hatalmas proteoglikán aggregátumokat hoznak létre. Az aggregán és a hyaluronsav közti kötődést a kötőfehérje („link protein”) erősíti. A GAG oldalláncok nagy negatív töltésfeleslegüknel fogva erőteljes vízkötőképességgel rendelkeznek. A porcszövet 60-78%-a víz, ennek nagy része a proteoglikán aggregátumokhoz kötődik. Az aggregán mellett más, egyéb kötőszövet-féleségben is előforduló kis proteoglikánok (dekorin, biglikán, fibromodulin) is jelen vannak a hyalinporc alapállományában, melyek a mátrix szerkezetének fenntartásáért felelősek.

Glikoproteinek. Kis mennyiségben jelenlevő, de a chondrocyta-porc mátrix kapcsolatban alapvető fontosságú fehérjék. Nagy részük csak az elmúlt években került felfedezésre, ilyen például a cartilage matrix protein (CMP), valamint a cartilage oligomeric matrix protein (COMP) (1. ábra).



1. ábra A porcszövet vázlatos felépítése. A chondrocyta és az azt körülvevő mátrixkomponensek szerveződése.

A porc érmentes szövet, a porcsejtek diffúzióval táplálkoznak a perichondriumból, a környező szövetekből, valamint ízületi porc esetén a synoviális folyadékból. Ezen tulajdonság miatt a porc lassú anyagcseréjű, bradytrop szövetnek tekinthető; anaerob anyagcseréje miatt az alacsony oxigéntenzíójú környezet a legoptimálisabb számára.

Az állandó porcok sejtjei a perichondrium belső rétegében található *chondrogenicus őssejtekből* fiziológias körülmények között is pótlódhatnak, az ízületi porcsejtek regenerációja azonban a perichondrium hiánya miatt igen minimális mértékű, és inkább csont vagy kötőszövet tölti ki az elpusztult porcszövet helyét [2]. Az ízületi porc regenerációjának csaknem teljes hiánya különösen a napjainkban egyre szélesebb körben alkalmazott ún. mozaikplasztikai eljárások elterjedését korlátozza [3]. A módszer során az ízületek kevésbé terhelt felszínéről távolítanak el az egészséges ízületi porcot az alatta levő spongiozával együtt tartalmazó hengereket, melyeket a sérült felszín megfelelően kiképzett csatornáiba ültetnek. A donorcsatornák betömészelése kiemelkedő fontossággal bír, ennek hiányában az ízület üregébe történő esetleges posztoperatív vérzés az ízületi alkotók épségét nagyban veszélyeztetheti. A donorcsatornáknak spontán képződő hegyszövet azonban sajnos leggyakrabban rostos porc formáját ölti.

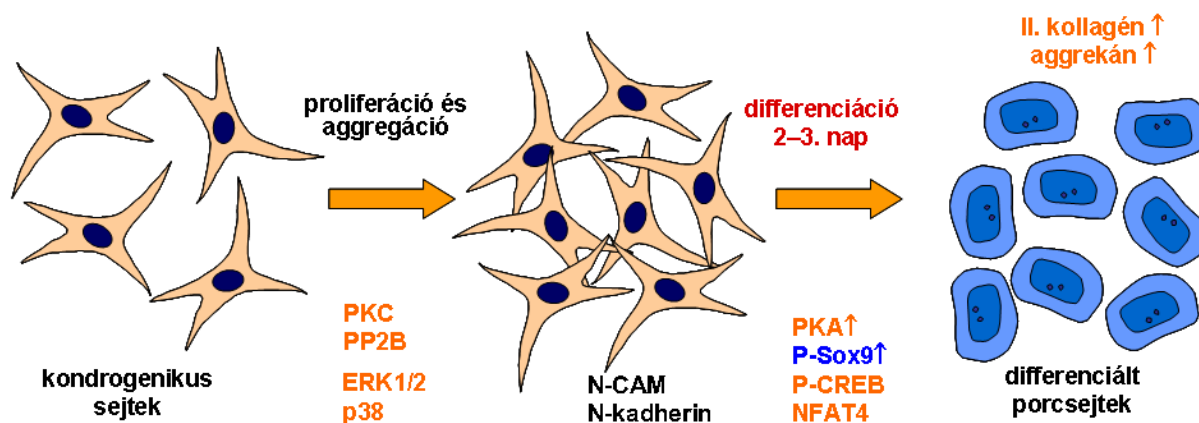
A porcdifferenciálódás tanulmányozására szolgáló modellek

A nagy sűrűségű (High Density, HD) sejtenyészet

A Hamburger–Hamilton szerinti 22–24-es fejlődési stádiumban [4] lévő csirkeembriók végtagtelepeiből izolált primer, nagy sűrűségű (HD) sejtenyészet [5, 6] az egyik leggyakrabban használt *in vitro* porcdifferenciálódási modell. Az elmúlt években néhány, rágszálókból származó porcosodó mesenchymalis sejtvonalat is kialakítottak (C3H10T1/2

egér sejtvonal), melyek egyes anyagoknak a médiumhoz való adásával nem csupán porcsejteké, hanem vázizom-, csont- vagy zsírsejteké is differenciálódhatnak [7-9]. Az általunk használt, csirke eredetű HD sejtenyészet egyértelmű előnyei között a módszer nagyfokú reprodukálhatósága, és az a nem elhanyagolható tény említhető, hogy az embriók kinyeréséhez nem szükséges kifejlett állatok feláldozása. A sejtenyészetek elsősorban porcosodó mesenchymalis sejtekből állnak, de a viszonylag nagy számban jelenlevő, és a kultúrák kitapadását biztosító fibroblast-populáció mellett kevés myoblastot és hámsejtet is tartalmaznak. Ez utóbbi sejttípusokba tartozó sejtek száma a sajátos, nagy sejtsűrűségű kultúrákban minimálisra csökken a porcdifferenciáció során. A primer HD sejtenyészeteken alapuló, könnyen reprodukálható kísérleti modell sokrétű információval szolgálhat a porcdifferenciációval kapcsolatos génexpressziós mintázat változásairól, a jelátviteli útvonalak szabályozásáról, és exogén faktorokkal történő befolyásolhatóságáról. A porcosodó mesenchymalis sejtekből létrehozott primer HD sejtenyészetek elfogadottságát és alkalmazásának létjogosultságát számos, az elmúlt években megjelent közlemény is alátámasztja [10-14].

A mesenchymalis kultúrákban a chondrogenicus sejtek proliferációja, kondenzációja az első tenyésztési nap folyamán zajlik, majd a második és harmadik napon a kialakult sejthalmazok (nodulusok) sejtszomszédok elvesztik fibroblast-szerű morfológiájukat, és kerekded porcsejteké differenciálódnak [5, 15]. A korai sejt-sejt kapcsolatok a chondrogenicus sejtek felszínén megjelenő N-CAM és N-cadherin molekulák révén valósulnak meg [16, 17], de a szomszédos sejtek között számos gap junction is megjelenik [18]. A TGF-családba tartozó citokinek a differenciálódás több fázisában is befolyásolják a porcképződést [19, 20]. A *bone morphogenic proteinek* (BMP) például nagy mennyiségben vannak jelen a kolóniákban a sejtkondenzáció során, a chondrogenicus sejtek pedig ebben a fejlődési stádiumban és a kondenzációt közvetlenül követő differenciálódás során nagy számban expresszálják felszínükön a BMP-k megkötéséhez szükséges receptorokat [12]. Ez a modell nagyon fontos előnyét jelenti, mivel a tenyészetek sejtszomszédok autocrin és paracrin módon BMP-eket (pl. BMP-4) és más faktorokat választanak el, mintegy önmaguk számára biztosítva ezzel a differenciálódáshoz szükséges feltételeket. A rendszer a tenyésztés során jellemző nagy sejtsűrűség következtében 6 nap alatt spontán differenciálódik (2. ábra).



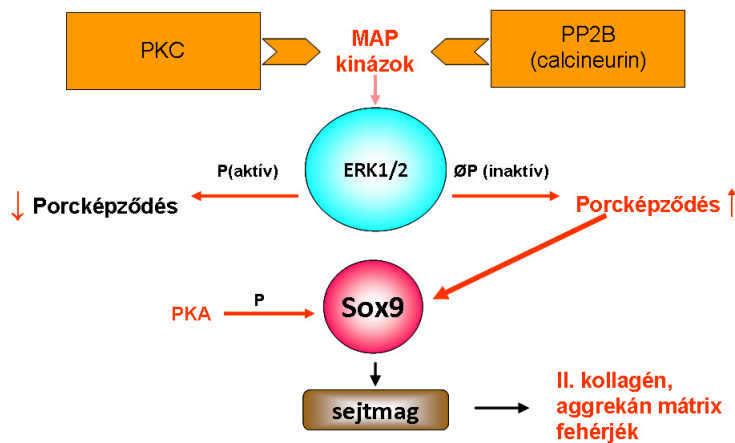
2. ábra Az *in vitro* porcdifferenciálódás folyamata. A 6 napos tenyésztés folyamán lezajló morfológiai és molekuláris változások vázlatos történései.

Noha az *in vivo* és *in vitro* zajló porcdifferenciálódás hasonlóan megy végbe, alapvető különbségek is megfigyelhetők. A fejlődő embrió testében térben és időben szigorúan meghatározott sorrendben különböző formájú és lokalizációjú porcszigetek képződnek, míg az *in vitro* sejt kultúrákban megközelítőleg homogén eloszlású és amorf szerkezetű porcszövet alakul ki. Sejttenyésztési körülmények között nehézségekbe ütközik az embrió *in vivo* porcképződését befolyásoló mechanikai ingerek modellezése is. A HD sejttenyésztés korlátait szem előtt tartva, és azt a kísérletek értékelésénél figyelembe véve az általunk használt rendszer sok értékes információval szolgálhat a porcdifferenciálódás egyes lépéseinek szabályozásáról és exogén tényezőkkel való befolyásolhatóságáról.

A porcdifferenciálódás intracelluláris szabályozása

A porcdifferenciálódás során számos, egymással jól összehangolt folyamat zajlik párhuzamosan. A mesenchymalis prekursorokból fejlődő chondroblastok esetében sejtspecifikus *transzkripciós faktorok* felelősek a differenciálódás lépéseinek szabályozásáért. A sejtek elkötelezettségében alapvető a Sox9 „mestergén” szerepe, mely egy HMG (high mobility group)-box típusú DNS-kötő régióval rendelkező transzkripciós faktort kódol. A Sox9 már a kondenzáció előtt megjelenik, erősen expresszálódik az előporcban és a chondroblastokban, de kikapcsolódik a pre-hypertroph porcsejtekben, melyek a csontosodás során a porcszövet csont felé eső hypertroph zónájában helyezkednek el [21]. Szerepe nélkülözhetetlen a mesenchymalis kondenzációban, és a korai chondroblast differenciálódásban. A porcosan differenciálódó sejtek jelentős mennyiségű PGE2-t is termelnek, ami prostaglandin (EP) receptorokon keresztül az intracelluláris cAMP szintjének

emelkedéséhez vezet [22]. A cAMP intracelluláris hatásaiért a Ser–Thr-specifikus protein kinázok csoportjába tartozó cAMP-függő protein kináz (PKA) aktiválódása a felelős. A chondrogenicus sejtekben a PKA bizonyítottan foszforilálja a Sox9-et, és ezzel aktiválja a porcspecifikus ECM-et kialakító II-es típusú kollagén és az aggregán központi fehérjék génjeinek transzkripcióját [23, 24]. A PKA másik lehetséges célpontja a CREB-család (*cAMP Response Element Binding Protein*), melynek foszforilációja a kondrogenikus sejtekben mind cAMP, mind BMP-2 hatására kimutathatóan megemelkedik [25]. A differenciáció során az egyes PKC-izoenzimek (α , γ , ϵ) expressziójának szintje változik, míg mások (λ és ζ) mindvégig azonos mértékben expresszálódnak a porcosodó sejtekben [26]. A közelmúltban a Debreceni Egyetem Anatómiai Intézetének egyik laboratóriuma - kollaborációs partnerünk - írta le a PKC μ szerepét az *in vitro* porcképződés szabályozásában [27]. A *protein-kináz C* (PKC)-izoenzimcsalád a porcképződés pozitív szabályozója, mivel a MAP-kináz (Erk1/2) aktivitása (foszforiláltsága) a PKC-aktivitás gátlásával párhuzamosan emelkedik (az Erk1/2 expressziójának szintje azonban nem változik). Kiderült, hogy a PKC gátlása az Erk1/2 aktiválódásán keresztül gátolja a porcdifferenciációt, mivel a PKC gátlása a MAP-kináz-foszfataz aktivitását gátolja, és az Erk1/2 foszforiláltsági szintje a foszfataz-működés inaktiválása miatt fokozódik [28]. A MAP-kinázok alapvető szereppel bírnak a molekuláris szintű szabályozásban, melyek a sejtet érő külső ingerek, valamint a sejt belső állapotától függő osztódás vagy differenciálódás, apoptózis vagy túlélés irányát határozzák meg a sejt további működése szempontjából. Mindezekon túl a génexpresszió szabályozását és az extracelluláris környezethez való alkalmazkodást is MAP-kinázok irányítják [29]. A foszforilált (aktív) Erk1/2 a proliferáció irányába tolja a sejtek fejlődési állapotát, ugyanakkor a defoszforilált Erk1/2 a porcképződést és differenciálódást segíti elő. Természetesen nemcsak a protein-kinázok, hanem azok funkcionális párjai, a foszfoprotein-foszfatazok is legalább ugyanilyen fontosságú szereplői a porcdifferenciálódást szabályozó jelátviteli útvonalaknak. Szintén az Anatómiai Intézet említett laboratóriuma írta le a Ca²⁺-érzékeny protein-foszfataz 2B (PP2B vagy calcineurin) szerepét az *in vitro* porcfejlődés szabályozásában, (3. ábra) ami az Erk1/2 útvonal modulálásán keresztül fejt ki hatását [13].



3. ábra A porcdifferenciálódás intracelluláris jelátvitelének vázlatja. Az Erk1/2 aktiváltsági állapota igen jelentős a porcképződésben. A részletes ismertetést lásd a „Bevezetés” fejezetben.

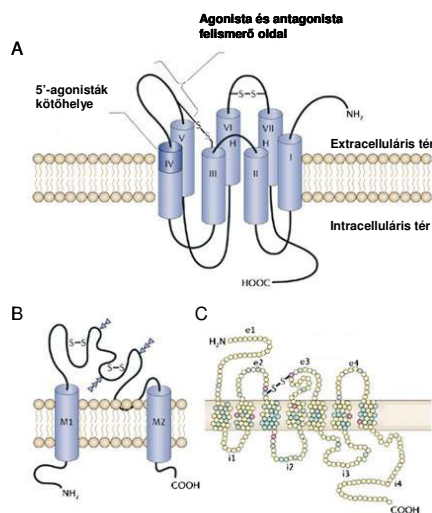
Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásainak szerepe a differenciálódási folyamatokban

A Ca^{2+} az egyik legalapvetőbb másodlagos hírvivő. A citoszólban mérhető koncentrációja ($\sim 10^{-7}$ M) mintegy 4 nagyságrenddel alacsonyabb, mint az extracelluláris tér $[Ca^{2+}]$ -ja. Hasonló, szintén a citoplazma irányába mutató gradiens áll fenn a belső Ca^{2+} -raktárak és a citoszól között. A sejtek ezt a kritikus eloszlást Ca^{2+} -pumpák és egyéb fehérjék (például: Na^+ - Ca^{2+} exchanger, NCX) segítségével tartják fenn. A sejtekben a szabad citoszólikus $[Ca^{2+}]$ precíz szabályozása alapvető, mivel sok jelátviteli folyamatban játszik szerepet a legkülönbözőbb sejtípusokban. A sejtek élete szempontjából döntő jelentőségű folyamatok irányítása, mint a proliferáció, a differenciálódás és apoptózis, Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonalak révén valósul meg. A porcdifferenciálódás szabályozása során is nagyon fontos szerepet játszik az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ precíz beállítása hasonlóan más, nem ingerlékeny sejtek esetén leírtakhoz [30, 31]. A különböző sejtekben a citoszól szabad $[Ca^{2+}]$ -ja két forrásból: az extracelluláris tér felől és/vagy az intracelluláris Ca^{2+} -raktár irányából emelkedhet. A belső Ca^{2+} -raktár a sejtek döntő többségében, így a chondrocyták esetében is az endoplasmaticus reticulum (ER). A belső raktárak kétféle csatornákon keresztül képesek kiengedni a raktározott Ca^{2+} -okat. A rianodinreceptorok (RyR), melyek részletes tárgyalása a bevezetés vázizomra vonatkozó részében található, illetve az inozitol-1,4,5-triszfoszfát-receptorok (IP₃R) családja. Utóbbiak három csoportba sorolhatóak: az IP₃R-1, IP₃R-2 és IP₃R-3 eltérő szöveti eloszlást és expressziós mintázatot követnek. A hatalmas, négy alegységből (melyek egyenként mintegy 2700 aminosav hosszúságúak) felépülő Ca^{2+} -csatornák ligandjaik, a Ca^{2+} és a foszfolipáz-C (PLC) útvonal aktivizálódásának eredményeképpen felszabaduló IP₃ megkötésére nyílnak, és az ER lumenében raktározott Ca^{2+} -okat engedik ki a citoszólba [32]. A Ca^{2+} egyben a receptor ligandjaként is működik, és

pozitív visszacsatolási folyamat (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release CICR) révén indukálja a raktárból történő Ca^{2+} -felszabadulást, mindaddig amíg a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ viszonylag alacsony. Magasabb koncentráció elérése esetén a Ca^{2+} gátolja további Ca^{2+} -ok felszabadulását. A nem excitábilis porcsejteken a külső térből történő Ca^{2+} -felvételnek a *ligand- vagy receptorvezérelt kalciumcsatornák* (receptor-operated calcium channel, ROCC) a legfontosabb szereplői. Ezek közül az elsőként idegsejtek felszínén leírt, de később más, nem excitábilis sejteken (pl. chondrocitákon) is megtalált NMDA-receptorok (N-metil-D-aszpartát) említhetők [33], de ide tartoznak az extracelluláris nukleotidok (elsősorban az ATP) receptoraiként működő ionotróp P2X-purinoreceptorok is [34]. Eredményeink alapján a porcdifferenciáció folyamán a citoszólikus $[\text{Ca}^{2+}]$ jellegzetes változásokat mutat. A differenciálódás napján mérhető megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]$ -hoz szükséges ionokat a sejtek elsősorban az extracelluláris térből veszik fel, egyelőre még nem tisztázott mechanizmusok révén [14]. A porcsejteken végzett vizsgálatainkban a purinoreceptorok pontos szerepét próbáltuk tisztázni ezen folyamatban.

A purinoreceptorok

A purinoreceptorok extracelluláris nukleotidokra érzékenyek, amelyeket többféle sejttípus szecernálhat lokálisan ható autokrin és parakrin mediátorként [35]. A purinoreceptoroknak két nagyobb típusuk van: a P1-receptorcsalád adenzinra, a P2-receptorcsalád pedig ATP-re, ADP-re és UTP-re érzékeny. Az utóbbi csoport két további altípusra osztható: P2X- és P2Y-receptorokra (4. ábra).



4. ábra A purinoreceptorok típusai és szerkezete. **A.** A P1-receptorok szerkezete. **B.** A P2X ionotróp purinoreceptorok szerkezete. **C.** A P2Y metabotróp purinoreceptorok szerkezete. (Fields és munkatársai: Purinergic signalling in neuron-glia interactions. Nat Rev Neurosci. 2006.)

A *P1-receptorok* négy különböző altípusra oszthatók, melyek mindegyike G proteinhez kapcsolt, 7 transzmembrán domént tartalmazó fehérjéből áll. Az elsőként leírt agonista (adenozin) mellett további, nagyobb stabilitású analógokat is szintetizáltak az adeninyűrű N6 és C2 pozícióinak, valamint az adenozin ribózának 5'-módosításával. Ilyen vegyület például a NECA (N-[2-(4-aminofenil)etil]-adenozin). A xantin és további xantinszármazékok, beleértve a természetes teofillin- és koffein-származékokat is, a P1-receptorok nem-szelektív antagonistái.

Az **ionotróp P2X-receptorok** ATP-vezérelt ioncsatornák, amelyek gyors (10 ms-on belüli) szelektív permeabilitást biztosítanak kationok (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) számára. Ingerlékeny sejteken (simaizom-, ideg-, és gliasejteken) is kimutatták jelenlétüket, melyek intercelluláris kapcsolataiban az ATP mint mediátor fontos szerepet játszik a neurotranszmisszió folyamatában, mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben. P2X-receptorok jelenlétét leírták már különböző nem-ingerlékeny sejteken (pl. hámsejteken) is [36]. Fontos megemlíteni, hogy először a P2X-alegységeket klónozták, és nem magát a teljes receptort. Két külön transzmembrán alegység önmagában nem képezhet ioncsatornát, ezért feltételezhető, hogy a két alegység a sejtmembránon belül egy hidrofób hurok segítségével kapcsolódva alkot funkcionális egységet. Farmakológiai elkülönítésüket segíti, hogy a P2X₁-, valamint P2X₃-receptorok érzékenyek α, β -meATP-re, míg az antagonistá suraminnal a P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅ és P2X₇ gátolható [37].

A **metabotróp P2Y-csoport** tagjai G-proteinhez kapcsolt, 7 transzmembrán domént tartalmazó receptorok, amelyek a PLC jelátviteli útvonalához kapcsolódnak. Ezen útvonal eredményeképpen az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emeléséhez szükséges ionok az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃)-dependens belső Ca^{2+} -raktárakból szabadulnak fel. A humán P2Y-receptorokat a ma érvényben lévő felosztás szerint 8 csoportba soroljuk: P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆-, P2Y₁₁-, P2Y₁₂-, P2Y₁₃- és P2Y₁₄- receptorok. Farmakológiai karakterizálásuk ATP, ADP, UTP, UDP szenzitivitásuk alapján történhet [37].

A vázizom fejlődése

A mesodermális eredetű mesenchymalis sejtek bipoláris vagy orsó alakú monopoláris sejtek, melyek az izom irányú differenciálódás első lépéseként premyoblastokká, izom prekursor sejtekké alakulnak. Ezen sejtek genetikai struktúrája és génexpressziója megváltozik, ami irreverzibilisen beszűkíti a sejt további sorsát. Kialakulnak a monopotens myoblastok, melyek izomspecifikus fehérjék termelését kezdik meg, valamint fokozott fúziós készséggel bírnak [38]. A mononukleáris myoblastok a harántcsíktolt izom kialakulási helye

körül halmozódnak fel. Egy részük az embrionális izomzatot alkotja, míg egy elkülönülő sejtvonalból szatellitasejtek alakulnak ki. A szatellitasejtek az érett vázizomrostok membránja és alaphártyája között található, nem osztódó, nyugvó állapotban levő sejtek, amelyek az izom sérülésekor aktiválódnak, és belőlük indulhat meg a sérült vagy elpusztult izomrost regenerációja [39]. A szatellitasejtek osztódó myoblasttá alakulva ugyanazt a fejlődési és differenciálódási útvonalat járják be, amely embrionálisan a vázizomrostok kialakulásához vezet [40].

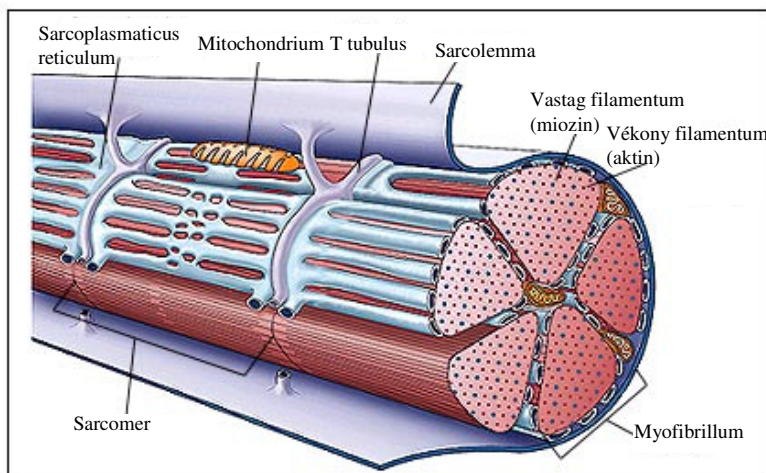
A myoblastok a sejtfelszíni adhéziós molekulák speciális átalakulása után syncytiummá fuzionálnak, melyeket myotubulusoknak (izomcsöveknek) nevezünk. A myotubulusok elongált, cilindrikus, sokmagvú sejtek, melyek kötegekbe rendezett kontraktilis fehérjéket tartalmaznak. A sejtmagok centrális elhelyezkedésűek, és a myofibrillumokat, melyeken már a szarkomerek is megfigyelhetők, perifériás irányba tolják. A primer myotubulusok még kisebbek, közelükben myoblastok helyezkednek el, ezek összeolvadásával jönnek létre a szekunder myotubulusok. A továbbra is szintetizálódó kontraktilis fehérjék következtében a myofibrillumok megnövekedett tömege a sejtmagokat a perifériára szorítja, s így kialakulnak a kifejlett izomrostok. Az egyes rostokat endomysium veszi körül, az izomrostok kötegeit pedig peri-, ill. epimysium burkolja. A változó méretű izmok növekedése hypertrophiával és hyperplasiával lehetséges. Emlősökben az izomrostok száma születés előtt, vagy közvetlenül a születés után meghatározódik, és később már nem változik. Így a fő szerep a hypertrophiának jut, mely hossznövekedés (új sarcomerek képződése) és vastagodás (új myofilamentumok általi átmérőnövekedés) révén valósul meg.

A vázizom felépítése és élettani sajátosságai

A vázizomzat a mozgás aktív szerve, legfontosabb feladata a test vázát alkotó elemek elmozdítása egymáshoz képest, ezáltal a test helyének illetve helyzetének a módosítása. A vázizomzat elemi egységei a vázizomrostok, amelyeknek alapvető működési formája az idegi utasításra bekövetkező összehúzódás (kontrakció). A mozgató neuron és az általa beidegzett izomrostok összessége a motoros egység. Az egyedfejlődés során a vázizmot alkotó sejtek kezdetben különállóak, majd fúziójuk következtében hosszú, többmagvú egységek jönnek létre, amelyeket izomrostoknak nevezünk. A vázizomzat rostjainak mérete fajonként és izmonként is változó. Az emberi vázizomrostok átmérője 10-100 μm közötti, hosszuk akár a 40 cm-t is elérheti. Az izomrostokat kötőszövetes állomány borítja, különböző nagyságú rostkötegeket és végső soron magukat az izmokat létrehozva. Az egyes izomrostokat sejtmembrán veszi körül, melynek speciális neve a **sarcolema**. A sarcolema felépítése

azonos más ingerelhető membránokéval: lipid kettősréteg, benne integráns fehérjemolekulákkal. Az izomrost működése szempontjából döntő a feszültségfüggő gyors Na^+ - és a késői típusú K^+ -csatornák jelenléte, ezek teszik lehetővé az akciós potenciál terjedését. A sarcolemmában Cl^- és Ca^{2+} - csatornák, valamint különféle receptormolekulák is találhatóak.

A vázizomrost intracelluláris terében helyezkednek el a myofilamentumok, amelyek döntően a kontraktilis fehérjéket tartalmazzák. A vastag filamentumok vázát a miozin-, a vékony filamentumokét az aktinmolekulák alkotják. Megtalálhatók a rostokban a kontrakció szabályozásához szükséges fehérjék (tropomiozin, troponin), valamint olyan elemek, amelyeknek valószínűleg a szerkezet fenntartásában, valamint az izomszövet mechanikai jellegzetességeinek meghatározásában van szerepük (connectin, α -aktinin). Az izomroston belül a myofilamentumok myofibrillumokba tömörülnek, utóbbiakat a vázizom igen fejlett intracelluláris membránrendszere, a **sarcoplasmaticus reticulum (SR)** veszi körül. Az SR-t a rost hossz tengelyével párhuzamosan elhelyezkedő vékony csövek (longitudinális, vagy **L-tubulusok**) alkotják, melyek terminális ciszternákban végződnek. A transzverzális vagy **T-tubulusok** a felszíni membrán betüremkedései, és a terminális ciszternákkal együtt alkotják a harántcsíkolt izom funkcionális egységét, a triádot (5. ábra).



5. ábra A vázizom felépítése. A képen a T-tubulus rendszer és a sarcoplasmaticus reticulum vázlatos kapcsolata látható egy vázizomrost anatómiai struktúrájában.

A vázizomrostok működésének alapvető formája a rándás, amit a sarcolemmán kialakuló akciós potenciál idéz elő. Az akciós potenciálra a „minden vagy semmi” törvény érvényes. A sarcolemmán keletkező és terjedő akciós potenciál felszálló száráért a tetrodotoxin érzékeny gyors Na^+ -csatornák aktiválódása, a repolarizációért ugyanezen

csatornák feszültségfüggő inaktiválódása, illetve a késői K^+ -csatornák megnyílása a felelős. A felszíni membrán depolarizálódása és a kontrakció kialakulása között 2-4 ms hosszú látenciaidő telik el. Ez alatt az idő alatt mennek végbe azon folyamatok, melyeket összefoglaló néven elektromechanikai kapcsolatnak nevezünk. A terminális ciszternák képezik az izomrost Ca^{2+} -raktárát, bennük a Ca^{2+} részben szabadon, részben a calsequestrin nevű Ca^{2+} -kötő fehérjéhez kötötten van jelen. A kontrakció létrehozásához szükséges Ca^{2+} az SR terminális ciszternákból szabadul fel az elektromechanikai kapcsolat révén. Ezen szerkezeti és funkcionális együttműködő molekulakomplex működésének lényege, hogy a sarcolemmán, valamint a T-tubulus membránon végighaladó akciós potenciál a membránban elhelyezkedő dihidropiridin-receptor (DHPR) konformációváltozását okozza, mely megnyitja a belső Ca^{2+} -raktárként szolgáló sarcoplasmaticus reticulum Ca^{2+} -csatornáját, a rianodinreceptort (RyR) (6.ábra). Ennek eredményeként a nyugalmi, mintegy 100 nmol/l körüli citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ 10-szeresére emelkedik, biztosítva az izomkontrakcióhoz szükséges szintet. A DHPR feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} -csatorna ezen rendszerben tehát mint mechanikai aktivátor szerepel, csatornafunkciója elhanyagolható. A kifejlett vázizomban az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ megemelkedésének forrása csaknem teljesen a sejten belüli Ca^{2+} -raktár.

A RyR-t pozitív visszacsatolás révén, a Ca^{2+} -kiáramlás kezdetén, maga a Ca^{2+} is aktiválja (CICR). A kiáramló Ca^{2+} -okat aktív transzportfolyamat juttatja vissza az SR-ba, annak Ca^{2+} -pumpája révén (SERCA). A vázizomrostok fénymikroszkóppal is megfigyelhető sajátossága a harántcsíkoltat, a hossz tengely mentén az anizotróp és izotróp szakaszok váltakozásának eredménye. Az izomkontrakció alapja a rendezett kontraktilis fehérjék (aktin és miozin) egymás melletti elcsúszása, ezáltal a sarcomerhossz rövidülése. A sarcomer az izomrost két Z-lemez közti szakasza, mely lemezek a vékony filamentumok kapcsolódási helyei. A vázizomrostok aktiválásának eredményeként kétféle állapot alakulhat ki: az izom eredési és tapadási pontja közeledik egymáshoz, (izotóniás kontrakció), vagy változatlan rosthosszúság mellett csak az izom feszülése fokozódik (izometriás kontrakció) [41].

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

Az izomfejlődés *in vitro* vizsgálatára két modell terjedt el. A kifejlett izomból preparált szatellitasejtek tenyésztésével nyert primer kultúra mellett, immortalizált sejt vonalakból indított izomtenyészetek (Pl.: C2C12-egér, L6-patkány myoblastok). A sejt vonal hátránya a primer izomtenyészetrel szemben az, hogy az *in vivo* körülményektől

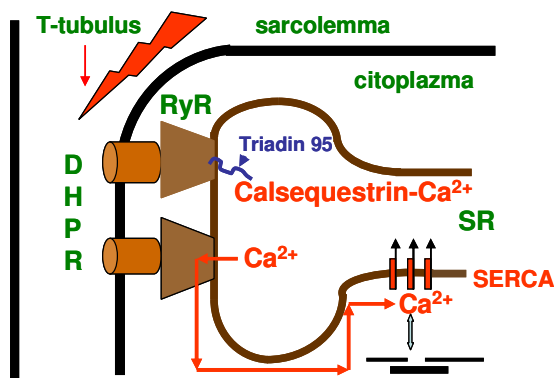
távolabb van, így az élő szervezetben végbemenő folyamatokat kevésbé jól modellezi, viszont könnyebben kezelhető és ismételhető, így nagyobb esetszámon történő vizsgálat lehetőségét teremti meg. A C2C12 sejtek Yaffe és mtsai munkájának eredményeként 1977. óta állnak a kutatók rendelkezésére [42]. A sejtek felnőtt C3H egértörzs lábának harántcsíktal izomzatából nyert immortalizált myoblastok, melyek lószérum hatására myotubulusokat képeznek. A differenciáltatásnál fontos szerepe van a proliferáló sejtek konfluencia szintjének, valamint a passzázsszámnak, - amely ideális esetben 30 alatti -, mivel a differenciálódási képesség a passzázsszám növekedésével csökken. A differenciáltatást 90%-os sejtsűrűségnél kell megkezdeni, ugyanis ezen mértékű denzitás biztosítja a sejtfúziót megelőző sejt-sejt interakció meglétét. A kontraktilis myotubulusok jellegzetes izomfehérjéket (dystrophin, különböző sarcolemmális illetve SR-hez kapcsolódó regulatórikus és csatorna-fehérjék) termelnek, ezért kiválóan alkalmasak az izomdifferenciálódás, valamint myogenezis vizsgálatára.

Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ jelentősége az izomfejlődés során

A myoblastok fúziójával kialakuló primer, majd szekunder myotubulusok izomspecifikus fehérjéket szintetizálnak. Az érési-differenciálódási folyamat számos lépése Ca^{2+} -függő; mind az adhézio, mind a fúzió külső Ca^{2+} -ot igényel [43]. A myogenesis korai szakaszában az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ növekedésének döntő forrása a sejten kívüli tér, a belső Ca^{2+} -raktárként funkcionáló SR még fejletlen, annak hálózata, integritása csak fokozatosan alakul ki. A myoblastok Ca^{2+} -háztartása leginkább a simaizomsejtekre hasonlít. A belső raktárakból a Ca^{2+} -felszabadulás főleg az IP_3 receptorokon keresztül történhet, G-proteinhez kapcsolt foszfolipáz C aktiváció következtében. A külső Ca^{2+} belépése depolarizáció hatására a feszültség függő „T”- és „L”-típusú Ca^{2+} -csatornákon keresztül történik. A Ca^{2+} -belépés másik módja a ligandfüggő mechanizmus. A myoblastok tekintetében ilyen lehetőséget biztosítanak a felszíni membránban diffúzan elhelyezkedő nikotin típusú kolinerg receptorok, valamint a szintén Ca^{2+} -permeábilis P2X purinerg receptorok. A későbbi érés és myotubulussá történő differenciálódás során megvalósul az SR folyamatos szerveződése, megjelenik a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás mint az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ növelésének módja. Az egyre fejlettebb SR megjelenésével döntő szerep jut a rianodinreceptorokon keresztül történő, elektromechanikai kapcsolat révén megvalósuló, feszültség-indukált Ca^{2+} -felszabadulásnak (VICR) [44].

A rianodinreceptor (RyR)

A rianodinreceptorok a harántcsíktolt izom sarcoplasmaticus reticulumának membránjában találhatóak, a T-tubulus és a terminális ciszterna funkcionális érintkezési helyén. A kapcsolat a RyR és a DHPR között jön létre. A RyR-nek több izoformája van, melyek közül emlősökben eddig hármat klónoztak. A RyR₁ található a vázizomban, a RyR₂ a myocardiumban, a RyR₃ pedig szinte az összes szövetben megtalálható, de leginkább az agyban és a simaizomban fordul elő. A receptor négy identikus alegységből épül fel, az aminosavláncok kisebb része a terminális ciszterna membránjában helyezkedik el, a nagyobb rész, melyet „foot regio”-nak nevezünk, a myoplasmába, a triád centrumában levő T-tubulus irányába nyúlik [45-47]. A receptor direkt agonistái a suramin és a 4-kloro-m-krezol. A xantin származékok, mint például a koffein, szintén a rianodinreceptor aktivátorainak tekinthetők, hiszen fokozzák a receptor érzékenységét a természetes ligand, a Ca²⁺ iránt. A rianodinreceptor antagonistái közé sorolható maga a rianodin nevű növényi alkaloida, mely nmol/l koncentrációban félig zárt állapotban stabilizálja a RyR-t, μmol/l koncentrációban pedig teljesen zárja a receptort. A receptor antagonistái közé tartoznak még egyes helyi érzéstelenítők, mint a dantrólén, a prokain és a tetrakain, valamint a ruténium vörös [48, 49].

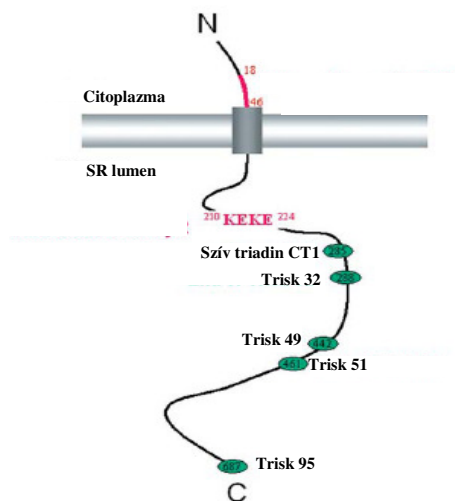


6. ábra Az elektromechanikai kapcsolat vázlatos szerveződése. A T-tubulus és az SR terminális ciszterna funkcionális érintkezésénél található, a Ca²⁺-felszabadulásban szerepet játszó fehérjék.

A triadin 95 vázizomfehérje (Trisk 95)

A triadin 95 kDa izoformája egy az SR-ben lokalizálódó integráns membránfehérje [50, 51], mely N-terminális részével a rianodinreceptorhoz, C-terminális részével pedig a sarcoplasmaticus reticulum Ca²⁺-kötő fehérjéjéhez, a calsequestrinhez kapcsolódik (6. ábra). Ezen fehérjének a vázizom Ca²⁺-homeosztázisban betöltött szerepe ezidáig nem pontosan tisztázott. A triadinnak több izoformája ismert, melyek ugyanazon gén alternatív splicing

során keletkező fehérjetermékei, és a C-terminálisaik hosszában különböznek. A vázizomban előforduló izoformák szokásos elnevezése a Trisk 32, 49, 51, 95 nomenklatúra alapján történik, ahol a számok a kDa-ban kifejezett molekulatömegeket jelentik. [52]. A Trisk elnevezés a **triadin-skeletal** rövidítésből ered. Minden triadin izoforma azonos N-terminális citoplazmatikus résszel, valamint transzmembrán alfa-hélixszel, és variábilis luminális résszel rendelkezik [53]. A fehérjéről feltételezik, hogy a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisának és a belső Ca^{2+} -raktárból történő Ca^{2+} -felszabadulásnak a szabályozásában, valamint a triád, mint funkcionális struktúra, integritásának biztosításában tölt be fontos szerepet (7. ábra). A Trisk 95 luminális doménje alternáló lizin- és glutaminsav-maradékok többszörös ismétlődését tartalmazza, melyet „KEKE motívumként” írtak le, és amely valószínűleg a fehérjekapcsolatok stabilizálásában játszik szerepet [54]. Emlősállatok harántcsíkolt izmaiban a rianodinreceptor, a triadin, a junctin és a calsequestrin egy kvaterner komplexet formálnak az SR lumenében. Feltehetően a RyR luminális részében levő negatív töltésű aminosavak felelősek a RyR és a triadin interakciójáért [55]. Az irodalomban ismeretesek olyan vizsgálatok, melyek esetén triadin citoplazmatikus, valamint luminális aminosavszakaszt és glutation S-transzferáz fúziós proteinekét expresszáltattak annak megállapítására, hogy a triadin milyen fehérjékkel áll kapcsolatban. Az eredmények azt sugallják, hogy a triadin egy olyan transzmembrán protein, amely a calsequestrint az SR junctionális régiójához horgonyozza, és szerepet játszik a calsequestrin és a RyR közötti funkcionális kapcsolat létrejöttében [56].



7. ábra A triadin izoformáinak szerkezete, az alternatív splicing hasítási helyei (Marty (2004): *Triadin: a multi-protein family for which purpose? Cell Mol Life Sci.61(15):1850-3*) alapján.

Egyéb triadin izoformák

Legújabb irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a triadin fehérje két kisebb, 32 valamint 49 kDa tömegű változata nem triád-specifikus, és ezen izoformák funkciójának felderítése még további kutatásokat igényel. Patkány *extensor digitorum longus* izmain végzett immunhisztokémiai vizsgálat alapján az SR L-tubulusainak különböző részeiben lokalizálódnak [57]. Egyikük sem áll kapcsolatban a rianodinreceptorral, a Trisk 49 valószínűleg a titinhez kapcsolódik, míg a Trisk 32 az IP₃ receptorral asszociálódik. A triadinnak a patkányban leírt negyedik izoformája a Trisk 51, ami egyedi C-terminálissal rendelkezik. A Trisk 51 szintén a triádban helyezkedik el, és a humán vázizomzat fő triadin izoformája [58]. Különböző triadin izoformák, mint például a triadin 1, a szívizomzatban is előfordulnak. Itt is integráns membránfehérjeként szerepelnek, és kapcsolatban állnak a R_yR₂-receptorral valamint a calsequestrinnel [59].

A nyugalmi citoplazmatikus [Ca²⁺] visszaállítása, fenntartása

Vázizomban a magas citoplazmatikus [Ca²⁺] a troponin C fehérjén keresztül biztosítja az izomkontrakciót; az izomrelaxáció ugyanakkor az intracelluláris [Ca²⁺] nyugalmi szintre történő visszatérését igényli. A sejtek az extracelluláris tér és a belső raktárak irányába próbálják eltávolítani a citoszólban található szabad Ca²⁺-t. Tekintettel arra, hogy ezen folyamatok az elektrokémiai gradienssel szemben működnek, aktív pumpamechanizmusok funkcióját igénylik, melyek a nyugalmi [Ca²⁺]-t a vázizomban, hasonlóan a legtöbb sejthez 100 nmol/l körüli értéken tartják. Az extracelluláris térbe elsősorban a plazmamembrán-Ca²⁺-ATPáz (plasma membrane Ca²⁺-ATPase, PMCA), valamint a 3 Na⁺/1 Ca²⁺ sztöchiometriával dolgozó Na⁺/Ca²⁺-exchanger juttatja vissza a Ca²⁺-okat. Az intracelluláris raktárak (ER, SR) irányába az azok membránjában elhelyezkedő sarco(endo)plasmaticus reticulum-Ca²⁺-ATPáz (SERCA) aktív mechanizmusai pumpálják vissza a Ca²⁺-ot. Itt kell megemlíteni a mitochondriumok membránjában található mitochondriális uniportert is [60].

A vázizom intracelluláris kalcium eseményei

A primer eredetű vázizomtenyészetben megfigyelhető spontán Ca²⁺-tranziensek a szarkolemmán, valamint a T-tubulus membránon végigfutó akciós potenciál következtében jönnek létre. Az akciós potenciálok a membránpotenciál helyi ingadozásai miatt keletkeznek, melyek a feszültségfüggő Na⁺-csatornák megnyitására keresztül aktiválják a dihidropiridin-receptorokat, majd az SR Ca²⁺-csatornáit. Az akciós potenciálok hatására létrejövő Ca²⁺-

tranziensek konfokális mikroszkóppal mint tovaterjedő fluoreszcenciahullámok azonosíthatóak.

Az emberek és sparkok egyetlen vagy néhány (10-50) rianodinreceptor megnyílásának eredményeként lokálisan keletkező, elemi Ca^{2+} -felszabadulási események (Elementary Calcium Release Events, ECRE) [61-63]. A sparkokat először szívizomzatból izolált myocytákban detektálták konfokális lézermikroszkópos technika segítségével. A későbbiekben ezen elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket leírták és tanulmányozták felnőtt vázizomrostokban, valamint embrionális vázizomban is [64, 65]. Míg kétéltűek izomrostjaiban a Ca^{2+} -sparkok gyakoriak, és ugyancsak megfigyelhetőek emlős primer eredetű vázizom tenyészetben, addig emlős, felnőtt izomrostokban jellemzően nem detektálhatóak [66]. Azon megfigyelés alapján azonban, hogy az emlős izomrostokat megfosztva felszíni és T-tubuláris membránjuktól ezen preparátumok rendre sparkokat produkálnak, feltételezhető, hogy fiziológias körülmények között a T-tubulus és SR membrán közti szerkezeti kapcsolat eredményezi a sparkok kialakulásának gátlását [64, 67]. Ezen állítást erősíti az a megfigyelés is, miszerint vázizomtenyészetekben a sparkok a T-tubulustól megfosztott területekre korlátozódnak [68]. A sparkok kialakulásáért embrionális vázizomban a RyR_1 és RyR_3 altípusok a felelősek. A felnőtt emlősök elveszítik a 3-as típusú rianodinreceptoraikat, és azt a képességüket is, hogy sparkokat produkáljanak. Felnőtt korban már csak a diaphragma tartalmaz RyR_3 -at. Kutatások szerint exogén RyR_3 -at expresszáló izomrostokban depolarizáció hatására ismét számos spark volt detektálható, míg RyR_1 overexpressziója esetén ez nem következett be [69]. A sparkok vizsgálata során arra is választ keresnek, hogy mi eredményezi a Ca^{2+} -felszabadulás megszűnését. Míg szívizom esetében bizonyított, hogy a Ca^{2+} -felszabadulás lecsengése a Ca^{2+} -raktárak kiürülése révén jön létre, a harántcsíkolt izmok esetében a Ca^{2+} -felszabadulás leállításának mechanizmusa még a mai napig ismeretlen. Rios és munkatársai kísérleteikben a Ca^{2+} -felszabadulásában betöltött szabályozó szerepet a calsequestrinnek és a hozzá asszociált fehérjéknek tulajdonították [70, 71].

Célkitűzések

Fiatal kutatói ambícióimat az táplálja, hogy a kutatóintézetben folyó (alap)kutatás a klinikumot, végső soron az emberiség tudásának gyarapodását, ezáltal életminőségének javulását szolgálja. Fontos, hogy a rendelkezésre álló legmodernebb ismeretek, tudományos kutatási módszerek birtokában próbáljuk megismerni az egyes szervek, szövetek kialakulásának és működésének sajátosságait, génjeinek és fehérjéinek az intakt fiziológiai állapotot biztosító együttműködését. Egyetemi doktori értekezésemben két mesenchymalis eredetű szövettípus, a porcszövet és vázizomszövet Ca^{2+} -homeosztázisával, továbbá annak szabályozásában résztvevő fehérjékkel kapcsolatos legújabb kutatásainkról számolok be. Az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ és annak megfelelő szabályozása alapvető fontosságú ezen szövetek intrauterin és posztnatális fejlődésében, valamint egészséges működésében egyaránt.

Az élettan és molekuláris biológia határterületén mozogva vizsgáltuk az eddig kevésbé kutatott *in vitro* primer porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ változásokat, valamint az ionotróp purinoreceptorok feltételezett szerepét a kutatócsoportunk által már igazolt, a differenciálódást kísérő intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedésben. Kutatásaink másik részében a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisának optimális szabályozásában részt vevő, de eddig pontos funkcióját tekintve ismeretlen triadin 95 (Trisk 95) vázizomfehérje szerepét próbáltuk felderíteni, expressziójának módosítására irányuló kísérletek révén. Konfokális lézermikroszkóp segítségével line-scan technikát alkalmazva elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket vizsgáltunk kontroll és triadint overexpresszáló, ill. shRNS technika révén csökkentett fehérjeexpressziót produkáló izomsejteken. Annak megállapítását tűztük ki célul, hogy a sejtek által termelt triadin mennyiségének módosítása befolyásolja-e ezen események jellegzetes paramétereit; az amplitúdót, frekvenciát és félértékszélességet. Az említett sejteken lehetőség nyílt egész sejten történő fluoreszcens intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ mérésre is, melynek során myotubulusokon különböző módokon kiváltott Ca^{2+} -tranziensek összehasonlító vizsgálatát végeztük el.

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

Primer, nagy sűrűségű (High Density, HD) porctenyészet

A porcosodó mesenchymalis sejteket Ross fajtájú, fehér húshibrid csirkeembriók distalis végtagtelepeiből izoláltuk. A kísérletekhez használt embriók Hamburger és Hamilton szerinti 22–24-es fejlődési stádiumban voltak. A végtagtelepeket fénymikroszkóp alatt eltávolítottuk, és azok enzimátikus emésztését (0,25% tripszin, Ca^{2+} - Mg^{2+} -mentes foszfátpufferben [CMF–PBS] oldva 37 °C-on 1 órán át) követően a sejtekből nagy sűrűségű ($1,5 \times 10^7$ sejt/ml) sejtuszpenziót készítettünk. A szuszpenzióból 100-100 μl -es cseppeket vittünk műanyag Petri-csészékben (Nunc, Naperville, IL, USA) elhelyezett 10 vagy 30 mm átmérőjű fedőlemezekre (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany.). A Petri-csészéket 37 °C-on, 5% CO_2 és 80% relatív páratartalom mellett termosztálva, a sejteket 2 órán át hagytuk kitapadni, majd 10% foetalis borjúsérummal (FBS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) kiegészített, antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó Ham's F12 tápoldatban (Sigma, Budapest, Magyarország) tenyésztettük. A kicseppentés napját tekintettük a tenyésztés nulladik napjának. A tápoldatot (amennyiben a kísérlet menete másképp nem diktálta) kétnaponta cseréltük. Az így létrehozott primer porcosodó kultúrákban a 2., ill. 3. napon történt a porcsejtek kialakulása. A tenyésztés befejezését jelentő 6. tenyésztési napon nagy mennyiségű extracelluláris mátrixszal körülvevő porccsomók voltak láthatók a megfestett kultúrák mikroszkópos vizsgálata során.

Vázizomtenyészetek és a fehérjeexpresszió módosítása céljából alkalmazott transzfekciós technikák

A vázizomkultúrák tenyésztési metodikáját, valamint azok transzfekciós eljárásait ezen fejezetben összevontan tárgyalom, tekintettel arra, hogy egymást feltételező és kiegészítő technikákról esik szó.

C2C12 vázizomsejtek

A C2C12 myoblastokat Dulbecco által módosított Eagles's Mediumban (DMEM) tenyésztettük, kiegészítve 10% foetalis borjúsérummal, 50 U/ml penicillin és 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin antibiotikumokkal. A sejteket 37 °C-on, 5% CO_2 jelenlétében inkubáltuk.

A sejtek myotubulussá történő differenciálódását a tápoldat módosításával biztosítottuk – DMEM 5% lószérummal, valamint a már említett antibiotikum kombinációval kiegészítve – 90%-os konfluencia elérését követően.

C2C12 sejtek – liposzóma mediált plazmid transzfekció

A C2C12 sejtek transzfekciójához a pcDNA 3.1 eukarióta expressziós vektor EcoR1 hasító helyére klónozott Trisk 95 vázizomfehérje teljes cDNS szekvenciáját használtuk. A 6-lyukú tenyésztőedényben tenyésztett sejtek transzfekcióját csökkentett szérumtartalmú Opti-MEM tápoldatban végeztük, 50-60%-os sejtkonfluenciánál lipofectamine 2000 reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával. A liposzóma-DNS komplex sejtbe történő bejutását 3 órán keresztül 37 °C -os termosztátban biztosítottuk (5 µg DNS/tenyésztőlyuk). 48 órás expressziót követően a transzfektált tenyészeteket 1000 µg/ml geneticint tartalmazó DMEM tápoldatban tenyésztettük tovább. A geneticin mint eukarióta fehérjeexpressziót gátló antibiotikum biztosította a nem transzfektált sejtek pusztulását. A szelekció 14-18. napján transzfektált sejt kolóniákat izoláltunk. A Trisk 95 fehérje túltermelésének hatékonyságát az egyes klónokban immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük, a fehérje C-terminálisa ellen termeltetett specifikus antitest felhasználásával. Az egyes transzfektált klónok fehérje-túltermelése a sejtbe bejutott plazmid kópiaszámától és a gazdasejt genomjába történő integrációtól függ. A funkcionális méréseket mind kontroll, mind transzfektált myoblastokból differenciáltatott, 5-7 napos, sokmagvú izomcsöveken végeztük.

Primer vázizomtenyészetek

Ezen tenyészetek készítéséhez újszülött, 1 napos egér, valamint 5-10 napos patkány egyedeket használtunk. A felhasznált állatokat a Debreceni Egyetem Állat-Etikai Bizottsága által jóváhagyott protokoll szerint áldoztuk fel. A tenyészetek alapját a vázizomrostok membránja és alaphártyája között található szatellitasejtek képezik, melyek osztódó myoblasttá alakulva ugyanazt a fejlődési, differenciálódási útvonalat indítják be, mint amely az embrionális vázizomzat kialakulásához vezet. Az állatok éteres altatását és cervicalis dislocatio-ját követően a vázizmokat az állatok hátsó végtagjaiból preparáltuk ki, Hank-oldatba helyeztük, majd apró darabokra vágtuk. Az izomszövetet 37 °C-on, 0,75 mg/ml kollagenáz és 1,5 mg/ml tripszin tartalmú CMF-PBS-ben 15 percig emésztettük, majd az enzimreakciót 10% lószérum hozzáadásával állítottuk le. Többretegű nylonmembránon történő átszűrés után a sejteket 10 percen keresztül 1000 /perc fordulaton centrifugáltuk. Centrifugálás után 15% FBS-t és penicillin-streptomycin antibiotikumot tartalmazó HAM F12

proliferáltató tápoldatban fedőlemezekre szélesztettük őket, majd termosztátba helyeztük (37 °C, 5% CO₂) tenzió mellett. Két nap múlva a sejtek myotubulusokká történő differenciálódását 5% lószérumot tartalmazó DMEM tápoldattal indukáltuk.

Egér eredetű, primer tenyészet – adenovírus mediált géntranszfer

A primer, egér eredetű vázizomtenyészetekben rekombináns adenovírust használtunk a Trisk 95 vázizomfehérje expressziójának módosítására. A duplaszálú DNS-t hordozó adenovírus kiválóan alkalmas idegen gének tranziens, rövid idejű expresszáltatására, nem integrálódik a gazdasejt genomjába, a sejtek receptor mediált endocitózis révén fertőződnek. Az általunk használt rendszerben kétféle adenovírus vektort használtunk: egy kontroll vírust (rAdV5-DsRed), amely a piros fluoreszcens protein cDNS-ét tartalmazta és expresszálta; és egy (rAdV5-Trisk95-ires-DsRed) rekombináns vírust, amely a piros fluoreszcens proteinen kívül a vázizom Trisk 95 teljes szekvenciáját is hordozta CMV promóter szabályozása alatt. A vírusokat a Gene Vector Production Network, Genethon III (Evry, France) tervezte és készítette. A proliferáló primer myoblastokat 90%-os konfluenciánál, 10 órás inkubáció során fertőztük 40-szeres multiplicitást alkalmazva (a sejtmag-vírus arány 1:40), szérummentes HAM F12 tápoldatban, majd a tápoldat differenciáltató oldatra történő cseréjével differenciálódást indukáltunk.

A kontroll sejteket a kontroll vírussal (rAdV5-DsRed), a később triadint overexpresszáló izomcsöveket pedig rAdV5-Trisk95-ires-DsRed vírussal fertőztük. A funkcionális vizsgálatokat az infekció és differenciálódás után 55-60 órával, konfokális mikroszkópos technikával végeztük.

Patkány eredetű primer tenyészet – liposzóma mediált shRNS transzfekció

A primer patkány vázizom-tenyészetekben RNS interferencia módszert alkalmaztunk az endogén Trisk 95 fehérje expressziójának csökkentésére vagy gátlására. Az általunk alkalmazott small hairpin RNS (shRNS) a magban történő expresszió (valójában egy dsDNS szekvencia transzfekciójáról van szó mely a magban hatásos shRNS-sé íródik át) során keletkező 70-80 bp-nyi nukleotidszekvencia. Megfelelő átíródását H1 vagy U6 promóter és terminációs szignál biztosítja. Az shRNS a sense-loop-antisense szakaszból épül fel. A „sense” specifikusan megegyezik a gátolni kívánt fehérje mRNA szekvencia részletével, míg az „antisense” ennek specifikus komplementere. A sejt specifikus Dicer fehérjéje a „loop” szakaszt hasítva eredményezi egy duplaszálú siRNS képződését, amelynek „antisense” szála a RISC-komplex segítségével kapcsolódik a mRNA specifikus szakaszához. Az így létrejövő,

egy szakaszán duplaszálúvá alakuló mRNS a sejt számára értelmezhetetlenné válik, feldarabolódik, ezáltal a kódolt fehérje translációjának elmaradását eredményezi. A Trisk 95 fehérje mRNS-ére specifikus shRNS-t a Construct Builder (Genscript, Piscataway, NJ, USA) segítségével terveztük és azt a SigmaGenosys állította elő. A választott shRNS sense régiója: 5'GGCAAAGATGTAAAGCCTAAA, antisense régiója: 5'TTAGGCTTTACATCTTTGCC volt. A szekvencia Trisk 95-re vonatkozó homológiáját blast filtering programmal ellenőriztük, továbbá az shRNS nonspecifikus hatásait scrambled RNS alkalmazásával zártuk ki. A Trisk 95 fehérje megjelenését immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk az izomdifferentiálódás különböző szakaszaiban (2-4. napig). Az shRNS-t liposzóma mediált transzfekcióval (Lipofectamine 2000) juttattuk a sejtekbe a differentiálódás megkezdését követő 24-30 órával, még a fehérjének a myotube-okban történő megjelenését megelőzően. A transzfekciót Opti-MEM tápoldatban 3 órán keresztül végeztük 37 °C-on, termosztátban (500 ng shRNS/6 lyukú plate). Az RNS interferencia hatékonyságát 3-4 napos, terminálisan differentiált állapotú, transzfektált izomcsöveken immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük. Az ugyanilyen korú myotubulusokon Ca^{2+} -méréseket végeztünk konfokális mikroszkóp segítségével.

Immuncitokémia

Az immuncitokémiai módszerek segítségével minden olyan anyag kimutatható, amely antigénként képes viselkedni. Az immuncitokémiai vizsgálatok során poliklonális és monoklonális antitestek egyaránt használatosak. Egy antigéne több antitestkötő hely (epitóp) is található, ezek mindegyike ellen termelhető antitest. A *poliklonális antitest*-savóban az antigén több epitópja ellen is található ellenanyag, így a kapott reakció erős festődésű, de kevésbé specifikus. A *monoklonális antitest* ezzel szemben az antigén egyetlen epitópjához kötődik, így a reakció kevésbé erős, de specifikusabb. Az elsődleges antitesthez annak Fc-szakasza ellen termeltetett másodlagos antitestet kötünk (fontos a faj azonosság), amelyhez jelzőanyagokat (pl. fluoreszcein-izotiocianátot [FITC], vagy más fluoreszcens festéket) kapcsolva a célfehérje lokalizációja specifikusan láthatóvá tehető fluoreszcens mikroszkóp alkalmazásával.

Az alábbiakban tárgyalt immunfestési technikát C2C12 sejtvonalon és primer vázizom sejt kultúrán a Trisk 95 fehérje kimutatására, valamint primer HD sejttenyészetben a P2X ionotróp purinoreceptorok vizsgálatára alkalmaztuk.

A sejt kultúrákat foszfát pufferes sóoldattal átmostuk, majd 20 percen keresztül jég hideg 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk. A sejtmembrán permeabilizálását

15 perces kezelés során 0,1%-os Triton X-100-zal biztosítottuk, majd az aspecifikus helyek blokkolására 1% borjúsérum-albumin oldatot (BSA) használtunk (30 perc szobahő). Ezután a sejteket primer antitesttel inkubáltuk (4 °C-on, egy éjszakán keresztül) az alábbiak szerint:

- vázizomtenyészeteken az *anti Trisk 95 antitestet* (Dr. I. Marty, Grenoble, France ajándéka) 1:500 arányban hígítva. Az antitest a Trisk 95 fehérje C-terminálisának 673-687 aminosav szekvenciájú epitópját ismeri fel;
- HD sejttenyészeteken az *anti P2X-receptor antitestet* (Alomone Labs. Jeruzsálem, Izrael) 1:100 arányban hígítva.

Ezt követően minden tenyészet esetén fluoreszcéinnel konjugált másodlagos IgG-t alkalmaztunk 1:500 arányban hígítva PBS-ben, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A sejtmagokat DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenilindol) tettük láthatóvá (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Az eredményeket fluoreszcens vagy konfokális mikroszkóppal értékeltük.

RT-PCR

Ezen kísérletekkel a HD sejttenyészetek által expresszált különböző típusú P2X-, valamint P2Y₁-, P2Y₃-, P2Y₅-purinoreceptorok, a Sox9 transzkripciós faktor, az aggregán fehérje, valamint a II-es típusú kollagén mRNS szintű jelenlétét igazoltuk a tenyésztés különböző stádiumaiban (0-6. napig) RT-PCR segítségével. Kontrollként GAPDH-t használtunk.

Az RT-PCR analízishez a tenyésztett sejtszuszpenzió 100 µl-es cseppjeit műanyag Petri-csészék felszínére cseppentettük ki, ezt követően a megfelelő porckultúrákat először RNáz-mentes fiziológiás NaCl oldattal mostuk át, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Ezután a különböző korú HD sejttenyészetekből teljes RNS-t izoláltunk Quiagen Rneasy® Micro Kit segítségével a gyártó által mellékelt protokoll alapján (Quiagen, Budapest, Magyarország). Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop (NanoDrop Technologies, Bio-Science, Magyarország) készülék segítségével ellenőriztük. Az így nyert RNS-mintából Omniscript reverz transzkripciós kit (Quiagen, Magyarország) felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A reverz transzkriptáz reakcióhoz használt oldat 500 ng RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibitor, 0,25 µl oligo(dT)-t, 1 µl dNTP-t (200 µM) és 200 egység M-MLV RT-t tartalmazott 1× RT-pufferben 20 µl reakció végtérfogatban. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációja olyan primerekkel történt, amelyeket az interneten hozzáférhető (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) csirke nukleotidszekvenciák alapján állítottunk elő. A primereket

Primer Premier 5.0 számítógépes program segítségével (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) terveztük. Az amplifikációhoz felhasznált primer-párok szekvenciái a következők voltak:

Gén	Primerek	Nukleotid szekvencia (5' → 3')	GenBank Accession No.	Amplimer mérete (bp)
P2X₁	forward	ATA CAT CAT AGG GTG GGT TT (211–230)	<u>NM_204519</u>	359
	reverz	AGA TTT CGC AGG TCT TCA T (551–569)		
P2X₂	forward	CGC AGT TCA CCA TCC TCA TC (1119–1139)	<u>XM_415287</u>	338
	reverz	CTT GGC AAA CCT GTA GTT GTA GC (1434–1456)		
P2X₃	forward	CTC GGT GTT CGT GGT GGT C (324–342)	<u>XM_426413</u>	377
	reverz	GTG GCT GTT GCT CGG GAT (683–700)		
P2X₄	forward	CTA TCA CAT ACC CAA TCC G (512–530)	<u>NM_204291</u>	413
	reverz	TTT CAA TGC CAC TAC TAT CC (905–924)		
P2X₅	forward	TCC TAC CTA AAG ACC TGC CAC T (643–664)	<u>AJ308518</u>	345
	reverz	TGC CTT GCC ATT CAC CAT (970–987)		
P2X₇	forward	TCC TAT GAT CCT CGC ACC T (1228–1246)	<u>XM_001235162</u>	378
	reverz	GAT GAT GGC TCT GTC CTC C (1587–1605)		
Sox9	forward	CCC CAA CGC CAT CTT CAA (713–731)	<u>NM_204281</u>	381
	reverz	CTG CTG ATG CCG TAG GTA (1075–1093)		
Aggregán core protein	forward	CAA TGC AGA GTA CAG AGA (276–294)	<u>XM_001232949</u>	429
	reverz	TCT GTC TCA CGG ACA CCG (688–704)		
Collagén, II-es típus	forward	CCC TCA AAT CCC TCA ACA ATC A (3616–3628)	<u>NM_204426</u>	120
	reverz	AAT CTC CGC TCT TCC ACT CG (3735–3755)		
GAPDH	forward	AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT GG (115–138)	<u>NM_002046.3</u>	322
	reverz	AAT GAG CCC CAG CCT TCT CCA T (415–437)		
P2Y₁	forward	ACC TGC CCA CCG TCT ACA TC (301–320)	<u>NM_205333</u>	348
	reverz	CGG CGT TCT TCT TCT TCA GC (629–648)		
P2Y₃	forward	AGT GCC TGC CCA CCT TTG T (484–502)	<u>X98283</u>	240
	reverz	CGG CCT TGT CCT TCT TCT TG (704–723)		
P2Y₅	forward	AAC AAC ACG GAG CAA AGA A (556–574)	<u>NM_205199</u>	351
	reverz	CAG GGT GAC AGG GTA CAT AG (887–906)		

Az egyenként 50 µl össztérfogatú PCR-reakció elegyek a következő összetevőket tartalmazták: 2 µl forward és reverz primer (0,4 µM), 1 µl dNTP (200 µM), és 5 egység Promega GoTaq® DNS-polimeráz pufferben. A kívánt DNS-szakaszok specifikus felerősítéséhez programozható termosztátot használtunk (Eppendorf Mastercycler, Netheler,

Hinz GmbH, Hamburg, Németország) a következő beállításokkal: 2 perc 95 °C-on a kezdeti denaturációhoz, amelyet ismétlődő ciklusok követnek: 94 °C 1 perc, majd primertől függő, optimális hőmérsékleten történő annealáció (1 perc), a lánchosszabbítás (elongáció) pedig 72 °C-on történt, 1,5 percig. Az utolsó, 35. ciklus után további lánchosszabbítási lépés következett 72 °C-on, 10 percig. A PCR-mintákat végül 1,5%-os, ethídium-bromiddal megfestett agarózgélben vizsgáltuk.

Membránfrakció-preparálás

A HD sejttényészetekben a felszíni membránban lokalizálódó P2X-purinoreceptorok fehérjeszintű vizsgálatához mind teljes sejtlizátumot, mind plazmamembrán-frakciót alkalmaztunk. A minták begyűjtéséhez a tenyésztés minden napján (1–6. nap) sejt kultúrákat arattunk. A sejt pelletet 100 µl homogenizációs pufferben (50 mM Tris-HCl puffer [pH 7,0], 10 µg/ml GordoX, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM fenil-metil-szulfonil (PMSF), 5 mM benzamidin, 10 µg/ml tripszin-inhibitor és 0,5% Triton X-100) szuszpendáltuk. A mintákat folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, és felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Feltárás során a mintákat 4 alkalommal, egyenként 30 másodpercig szonikáltuk (Branson Sonifier, Danbury, USA). A HD sejttényészetek plazmamembrán-frakciójának izolálására a szonikált mintákat 50 000 g-n centrifugáltuk 90 percig, 4 °C-on. Az üledéket 50 µl 1% Triton X-100-zal kiegészített homogenizációs pufferben trituráltuk jégen. Egy óra triturálás után ismét 50 000 g-n centrifugáltuk 55 percig, 4 °C-on; a felülúszó tartalmazta a plazmamembrán-frakciót, amit a Western-blot analízishez használtunk.

Western-blot analízis

A fehérjekimutatás során a mintákat 1/5 térfogatú, ötszörös töménységű elektroforézis mintapuffer (310 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS, 50% glicerol, 100 mM DTT, 0,01% brómfenolkék) hozzáadásával kezeltük, és 5 percig 80 °C-on főztük. A purinoreceptorok immunológiai detektálásához 50 µg fehérjét szeparáltunk 7,5% SDS-PAGE gélben. A fehérjéket elektroforézis segítségével transzferáltuk nitrocellulóz membránra. A membránokat PBS-ben oldott sovány tejpor 5%-os oldatával blokkoltuk, majd a membránokat egy éjszakán át (4 °C-on) inkubáltuk, a P2X-receptorok karboxi-terminálisa (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael), a P2Y₄ receptor karboxi-terminálisa (Sigma, Budapest, Hungary), a P2Y₁-receptor amino-terminálisa (Sigma, Budapest, Magyarország), valamint a P2Y₂ receptor 3. intracelluláris loop-ja (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) ellen termelt, 1:200 hígítású primer antitest hozzáadása után. Háromszor 10 perc PBST-s (0,1% Tween 20-szal kiegészített PBS)

mosás után a membránokat szekunder antitestekkel, torma peroxidázzal (HRP) konjugált IgG-vel (Sigma, Budapest, Magyarország) inkubáltuk, 1:1000 hígításban, 5%-os tejporos PBS oldatban hígítva, 1 órán át. A jeleket kemilumineszcenciás reakcióval, a laboratóriumunkban rendelkezésre álló készülék segítségével (Amersham Biosciences, Budapest, Magyarország) detektáltuk.

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

A tenyésztés 3. napján a HD sejttenyészetek tápoldatát egyszeri 100 μM ATP-vel, 180 μM ADP, UDP, UTP-vel vagy 10 μM suraminnal egészítettük ki egyes kísérletekben, hogy az említett farmakonoknak a porc képződését és differenciálódásának mértékét befolyásoló hatását tanulmányozzuk. A HD sejttenyészeteken a porcmátrix mennyiségét metakromáziás festéssel tettük láthatóvá, dimetil-metilénkék (DMMB), valamint toluidinkék (TB) alkalmazásával. A színreakció alapját az képezi hogy az említett anyagok nagy affinitással kötődnek a porcmátrix erősen szulfatált (SO_4^{2-}) proteoglikán és glükózaminoglikán (GAG) komponenseihez, lila színű festődést eredményezve. A festődő mátrix mennyisége arányos a porcképződés mértékével.

DMMB festés esetén 28% etanolt, 4% formalint és 2% ecetsavat tartalmazó oldattal fixáltuk a differenciált porctenyészetet, minden esetben a tenyésztés 6. napján. A jelöléshez 0,1%-os DMMB-t használtunk 3%-os ecetsavban oldva (5 perc). Az eredményt vizuálisan értékeltük.

Toluidinkék festés esetén az előbb leírt fixálást követően a tenyészeteket glicin-HCl pufferben (pH: 1,8) oldott 0,1% toluidinkékkel festettük 15 percen keresztül. A nem kötött festék pufferes mosását követően a kötött festék abszolút etanolban oldott 8% HCl alkalmazásával kivonható (savas extrakció). A kontroll ill. kezelt tenyészetekből kivont festék abszorbanciáját 625 nm-en (OD_{625}) fotometriás módszerrel mértük meg (Chameleon, Hidex, Turku, Finland). Az értékek átlagát 5 független kísérletből kaptuk. Az OD_{625} értékeket minden esetben a kontrollra normáltuk.

A HD sejttenyészetek által a tápoldatba szekretált ATP meghatározása

A sejtek által szekretált ATP-koncentráció meghatározása az adenozin 5'-trifoszfát (ATP) Bioluminescent Assay Kit (Sigma, Budapest, Magyarország) felhasználásával történt. A rendszer elve a luciferáz enzim által katalizált reakció: $\text{ATP} + \text{luciferin} \rightarrow \text{Adenyl-luciferin} + \text{PP}_i$ $\text{Adenyl-luciferin} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{CO}_2 + \text{fényreakció}$. A mérés a

gyártó cég által megadottak alapján történt. 200 mm-es Petri-csészébe egyenként 100 μ l mesenchymalis sejtszuszpenziót oltottunk, majd a tápoldatba szekretált ATP koncentrációjának meghatározását minden tenyésztési napon ugyanazon időpontban végeztük. A méréshez minden alkalommal a sejtekről leszívott és pH 7,8-ra állított tápoldat 50 μ l-ét használtuk, 2 párhuzamos kísérlet során. A háttér fényemissziót steril vízzel és kontroll, nem sejtekről származó HAM F12 tápoldattal határoztuk meg. Az ATP Assay keverék nagyfokú bomlékonysága miatt minden mérést megelőzően új standard görbét készítettünk 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} és 10^{-10} mol/l koncentrációjú ATP-oldatok felhasználásával. A minták lumineszcenciáját microwell plate reader készülékkel (Chameleon, Hidex, Turku, Finland) mértük.

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

A különböző korú HD sejttenyészetek, valamint a vázizomtenyészetek sejtejinek intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -változásait a Fura-2-AM fluoreszcens Ca^{2+} -kötő festék segítségével mértük. A mérés alapelve, hogy a Ca^{2+} -t kötött festék abszorpciós maximuma (380 nm) eltér a Ca^{2+} -t nem kötött festékétől (340 nm), így a két hullámhosszon történő gerjesztést követően emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából meghatározható az intracelluláris $[Ca^{2+}]$. A méréshez a HD sejttenyészeteket és a vázizomtenyészeteket azonos módon készítettük elő. A sejtek tenyésztése 30 mm-es üveg fedőlemezen történt. A feltöltéshez 2 mM-os Fura 2-AM festék törzsoldatból 10 μ l-t (10 μ M) alkalmaztunk. A festék acetoximetilészter formája biztosítja a sejtmembránon keresztüli festékfelvételt. A 2 ml feltöltő tápoldatot – mely megegyezik a sejtek tenyésztő tápoldatával – további 4 μ l, 150 nM-os neostigminnel egészítettük ki, az esetlegesen jelenlevő extracelluláris acetilkolin-észteráz gátlása céljából. A feltöltést 37 °C-on, termosztátban, 90 percen át végeztük. A feltöltött sejteket egy invertáló fluoreszcens mikroszkóp állványára helyeztük, majd 40 x-es olajimmerziós objektív segítségével vizsgáltuk. A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM kettős monokromátoros berendezés biztosította (8. ábra). A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. Fényforrásként a rendszer xenonlámpája szolgált, melynek fényét egy forgótükrös sugárosztó két nyalábra osztja. A keletkező sugarak külön-külön monokromátoron haladtak át, melyek eredménye a méréseinkhez szükséges 340 és 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb. A monokromátorokból optikai szálak vezették a fényt egy csatoló egységen, valamint egy dichroikus tükrön keresztül a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett sejtekre. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en

interferenciaszűrő közbeiktatásával egy fotoelektron-sokszorozó (PMT) segítségével detektáltuk. A jeleket 10 Hz gyakorisággal regisztráltuk. A háttérfluoreszcenciát a tárgylemezek sejtmentes helyein mértük, ezt a program automatikusan levonta a mért fluoreszcenciaértékekből.

A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ($R=F_{340}/F_{380}$) az alábbi egyenlet alapján számítottuk ki az intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ -t:

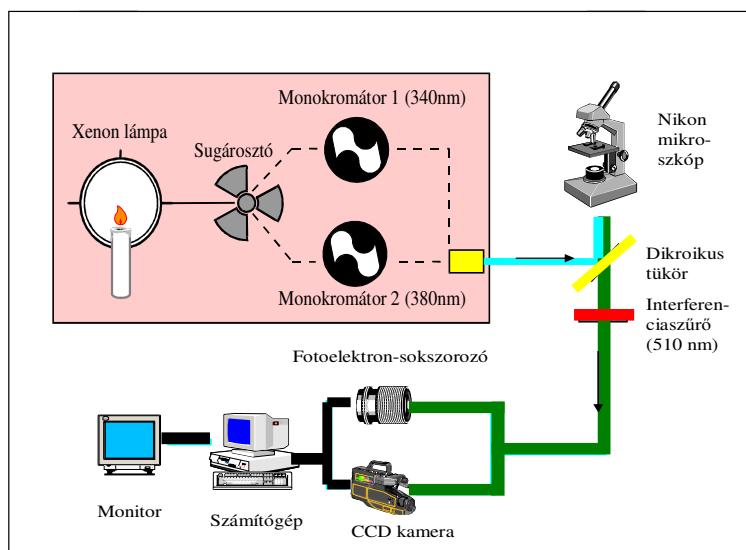
$$[Ca^{2+}]_i = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R),$$

ahol K_D a disszociációs állandó, R_{max} az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék Ca^{2+} -mal telített, R_{min} az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék egyáltalán nem köt Ca^{2+} -ot, R a mért fluoreszcenciaértékek hányadosa, β a rendszerre jellemző állandó.

A kísérleti elrendezés az 1-6 napos HD sejtenyészetek, valamint a vázizomtenyészetek esetén különböző volt.

HD sejtenyészetek esetén a méréseket normál Tyrode-oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 11,8 mM HEPES, 1 g/L glükóz, pH 7,4) vagy Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban végeztük. Utóbbi esetben a $CaCl_2$ elhagyása mellett az oldat 5 mM EGTA-t tartalmazott. Az ATP oldatot normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatból 180 μ M végkoncentrációban, ADP, UDP, UTP oldatokat 180 μ M végkoncentrációban, valamint bradykinin oldatot 20 μ M végkoncentrációban Ca^{2+} -mentes Tyrode oldatból készítettük. A Ca^{2+} -mentes ATP, ADP, UDP és UTP alkalmazását megelőzően a sejtekre 150 másodpercig adagoltunk Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatot. Az alkalmazott suramin-oldat normál Tyrode-oldatból készült 10 μ M végkoncentrációban. A Ca^{2+} -mentes ATP adagolást megelőzően a sejteket 150 másodpercig kezeltük Ca^{2+} mentes Tyrode-oldattal.

Vázizomtenyészetek esetén az intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ -t valamint a sejtek különböző anyagokra kialakuló Ca^{2+} -tranzienseit normál Tyrode-oldatban és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban vizsgáltuk. Depolarizáló hatású oldatként 120 mM koncentrációjú KCl-t tartalmazó oldatot használtunk, melyet normál Tyrode-oldatból készítettünk azonos mennyiségű NaCl elhagyásával. A RyR-t stimuláló koffein-oldat (15 mM) szintén normál Tyrode alapú volt. A különböző oldatok adagolásához lokális perfúziós rendszert használtunk (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific, USA), a vizsgált anyagok oldatát egy nagyon vékony lokál-perfúziós tű (belső átmérő: 250 μ m, áramlási sebesség: 1,5 μ L/s Perfusion Pencil™; AutoMate Scientific, San Francisco, CA, USA) segítségével juttattuk a mérni kívánt sejtek közvetlen közelébe. A mérési eredményeket egy a Debreceni Egyetem Élettani Intézetében kifejlesztett program segítségével értékeltük ki.



8. ábra A PTI fluoreszcens Ca^{2+} -mérőrendszer sematikus működése. A Fura 2-AM gerjesztése a két monokromátor, az emisszió detektálása a fotoelektron-sokszorozó segítségével történik.

Konfokális mikroszkópos mérések

Konfokális mikroszkópos vizsgálatokat csak a vázizomtenyészeteken végeztünk. A konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (confocal laser scanning microscope, CLSM) olyan optikai mikroszkóp, mely megoldotta azon problémát, hogy a vastagabb biológiai preparátumokban, szövetmintákban, sejtekben a különböző, egymáshoz közel levő rétegekből egyszerre érkező információ csökkenti az előállított kép kontrasztosságát. A CLSM felépítéséből adódóan csak egy adott keskeny rétegből származó sugarak jutnak a detektorra és kerülnek leképezésre. Egy féligáteresztő tükrön áthaladó, a mintára fókuszált pásztázó lézersugár által gerjesztett fluoreszcens fény a tér minden irányába emittálódik. Ezen fénynek a megfelelő irányba haladó részét az objektív lencse összegyűjti, és így az egy féligáteresztő tükör segítségével egy lencsére jut. A lencse fókuszában egy μm nagyságrendű apertúra (pinhole) van, és csak az ezen kicsiny lyukon keresztülhaladó fény jut a detektorra. A lézer jelentősége abban van, hogy a keskeny aperturán áthaladó fény intenzitása igen legyengül, a lézerfény intenzitása azonban még ekkor is elegendő ahhoz, elektronikusan észlelhető jelet kapjunk. A mintának a beállított fókuszmélységen kívül eső rétegekből származó fény ebben a rendszerben nem jut el a detektorig, ezt az említett apertúra akadályozza meg. A leképezési réteg egyes pontjaiból jövő információ begyűjtését a CLSM pásztázó (scanning) rendszere teszi lehetővé. Vizsgálatainkban a Zeiss LSM 510 pásztázó lézer mikroszkópot használtuk Fluo-3 vagy Fluo-4 fluoreszcens Ca^{2+} -kötő festékekkel feltöltött sejtek Ca^{2+} -tranzienzeinek

nyomonkövetésére. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$, és így a festék által kötött Ca^{2+} mennyiségének emelkedésekor a festék fluoreszcenciája fokozódik, ami fényintenzitás-növekedésként detektálható. A normalizált fluoreszcenciaintenzitást line-scan imaging (x,t), illetve kétdimenziós (x,y) leképezési módszerrel vizsgáltuk és jelenítettük meg.

Elemi Ca^{2+} -felszabadulási események vizsgálata kontroll és transzfektált sejteken

A C2C12 myotubulusokat 2-3 percig 0,002% szaponint tartalmazó relaxáló oldattal kezeltük (125 mM K-glutamát, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM Na-ATP, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 0,13 mM $CaCl_2$, 8% dextrán). A felszíni membrán permeabilizációjának ellenőrzése 50 μ M Fluo-3 hozzáadásával történt, ezáltal az izomcsövek láthatóvá váltak. Ezt követően az oldatot lecseréltük egy 0,1 mM Fluo-3-at tartalmazó belső oldatra (125 mM K-glutamát, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM Na-ATP, 10 mM NA-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 0,13 mM $CaCl_2$, 8% dextrán), amiben a méréseinket végeztük.

Az egér vagy patkány eredetű primer myotubulusokat 1 órán keresztül 37 °C-on 10 μ M Fluo 4-AM tartalmú differenciálós tápoldatban inkubáltuk. A Ca^{2+} -mérést normál Tyrode-oldatban végeztük. X-Y képek és line-scan mérések segítségével rögzítettük a fluoreszcenciaintenzitást, azaz az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásait.

A line-scan felvételek lényege, hogy a fluoreszcenciaintenzitást $F(x,t)$ az eltelt idő (t) és a kiválasztott vizsgált vonal 0 kezdőpontjától való távolság (x) függvényeként ábrázoljuk. A mért értéket normalizált $F(x,t)/F_0(x)$ - fluoreszcenciaintenzitásként jelenítettük meg, ahol $F_0(x)$ az alap fluoreszcenciaintenzitás, melyet az $F(x,t_1-t_2)$ olyan időintervallumban végzett átlagolásával nyertünk, ahol a vizsgált t_1-t_2 időszak alatt nem volt semmilyen intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t érintő esemény.

Vizsgálórendszerünk a vizsgált vonal mentén levő pontok fluoreszcenciaintenzitását 2 μ s/pixel sebességgel pásztázta végig (vagyis a pásztázás időtartama a vonal hosszától függ), majd a vonal újbóli végigpásztázását 1,5 ms elteltével kezdte újra. A line-scan képeket 1,54 ms/vonal és 512 pixel/vonal sebességgel, 63x vízimmerziós objektív használatával készítettük. A detektálás iránya párhuzamos volt az izomsejt tengelyével.

A kétdimenziós leképezés esetén a pásztázó rendszer végigpásztázza a sejtet reprezentáló pixeleket, és az egyes fluoreszcencia-intenzitásokat x-y koordinátarendszerben ábrázolja. Ennek eredményeként a sejt fluoreszcenciaintenzitásának egy adott pillanatban (a „pillanat” a pásztázás idejével megegyező hosszúságú, az 512x512 pixel nagyságú képek esetén 500-600 ms) meglévő kétdimenziós képét kapjuk.

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

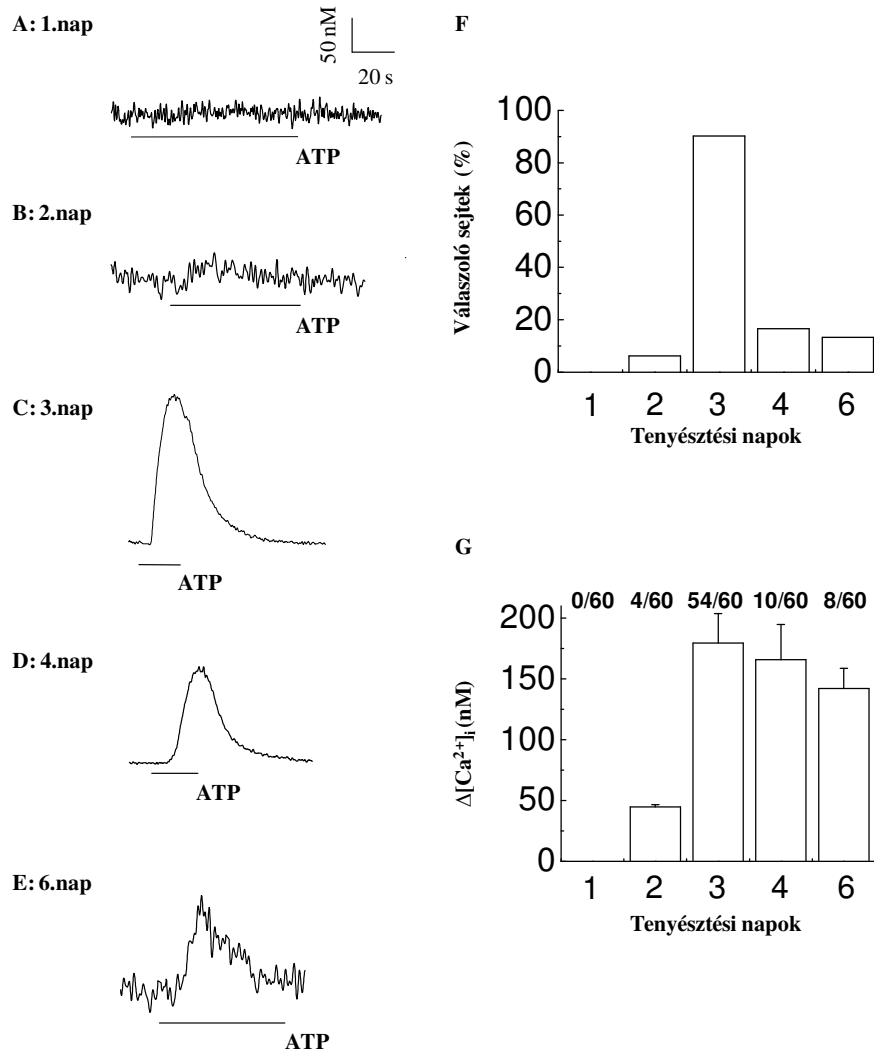
Eredmények I.

Porcszövet – primer HD sejttenyészetek

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

Mint azt már korábbi kísérleteinkben kimutattuk, a primer porcsejteken a differenciálódáskor, mely rendszerint a tenyésztés 3. napján történik, jelentősen megemelkedik az intracelluláris $[Ca^{2+}]$. A folyamat kezdetén kimutatható viszonylag alacsony (80 nM) szintről a differenciálódás napjára szignifikáns (140 nM) emelkedés detektálható, majd a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ újra alacsonyabb (de a kiindulásánál valamivel magasabb; kb. 100 nM) értéken stabilizálódik. Eredményeink alapján a leírt változás a differenciálódásnak nem pusztán kísérőjelensége, hanem szorosan összefügg vele, mint annak egyik előfeltétele. Sikertült azt is igazolnunk, hogy a differenciálódás napján mérhető megemelkedett Ca^{2+} -szinthez szükséges ionokat a sejtek elsősorban az extracelluláris térből veszik fel, egyelőre még nem tisztázott mechanizmusok révén [14]. Ahhoz, hogy megpróbáljuk azonosítani azon csatornafehérjéket, amelyek felelőssé tehetőek a differenciálódáshoz nélkülözhetetlen megemelkedett intracelluláris $[Ca^{2+}]$ létrehozásáért, olyan Ca^{2+} -csatorna-családot kerestünk, melynek tagjai a differenciálódási folyamattal párhuzamosan változó expressziós mintázatot mutatnak, precízen szabályozottak, és amelyekről irodalmi adatok alapján ismert, hogy részt vesznek más sejtípusok differenciálódásának szabályozásában is. Erre a szerepre a legígéretesebb jelöltnek a purinoreceptorok tűntek [72, 73]. Kísérleteink kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a különböző korú HD sejttenyészetek sejtjein, mint nem ingerelhető sejteken, megjelennek-e olyan funkcionális receptorfehérjék, melyek révén az extracellulárisan adagolt 180 μ M ATP hatására a sejtek belsejében megemelkedik a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$. Az ATP-oldatot az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak alapján - a sejtek közvetlen környezetébe juttatva azt találtuk, hogy mind az ATP adagolás után a válasz kialakulásához szükséges idő, mind a Ca^{2+} -tranziensek átlagos amplitúdói (a maximális intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -növekedés) differenciálódásfüggő mintázatot mutattak (9. ábra A-E, G), megfigyelhető továbbá, hogy a 3. napos kultúrákban a sejtek túlnyomó többsége, mintegy 90 %-a válaszolt az agonistára, addig a 2., a 4., és a 6. napos tenyészetekben az ATP-érzékeny sejtek aránya elenyésző, az 1. napon pedig nem sikerült reagáló sejtet találnunk (9. ábra F). Érdeemes kihangsúlyozni, hogy a tenyésztés 3. napján differenciálódik a sejtek túlnyomó többsége porcsejteké, és ugyancsak ezen a napon regisztráltunk egy szignifikánsan magasabb nyugalmi intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t is. A válasz kiváltásához szükséges legrövidebb ATP-adagolás, valamint a legnagyobb amplitúdó is ezen a tenyésztési napon volt

megfigyelhető (9. ábra C) Az 1. tenyésztési napokon még 100 másodperces ATP-adagolás sem indukált citoszólikus $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést (9. ábra A), valamint a 2. napon is alig tudunk jellemző Ca^{2+} -választ detektálni (9. ábra B). A 6. napon a folyamat lecsengésére utal az ATP-adagolás szükséges idejének újbóli emelkedése, valamint az amplitúdó csökkenése (9. ábra E).

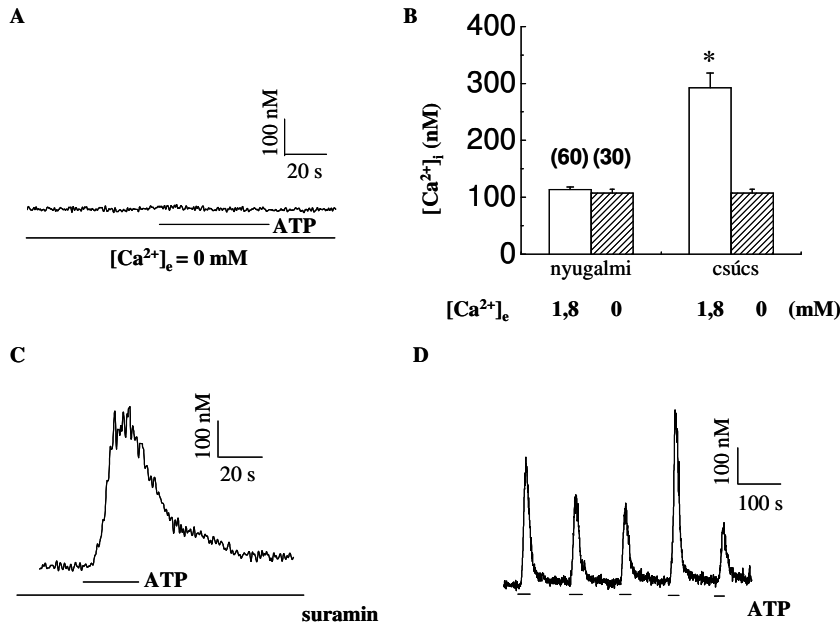


9. ábra (A-E). A tenyésztés különböző napjain a HD tenyészetek sejtjein 180 μM ATP adagolása után, az adott tenyésztési napra jellemző Ca^{2+} -tranziensek, 1,8 mM extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében. A Ca^{2+} -tranziensek előtti nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ értékek: A: 76 nM, B: 87 nM, C: 113 nM, D: 97 nM, E: 77 nM. A vízszintes vonalak az ATP adagolás idejét jelölik. A bemutatott regisztrátumok 5 mérés közül a tipikus sejtválaszokat mutatják. (F). Az egyes tenyésztési napokon az ATP-re válaszoló sejtek aránya. (G). A különböző tenyésztési napokon mért Ca^{2+} -tranziensek csúcserősségeinek változása. A számok az ATP-re válaszoló sejtek arányát mutatják. Az adatok 5 független mérésből származnak.

Ezt követően megpróbáltuk meghatározni az ATP hatására a citoszólban mérhető megemelkedett $[Ca^{2+}]$ forrását, valamint, hogy metabotróp avagy ionotróp purinoreceptorok felelősek-e a kiváltott hatásért. Ezt a legegyszerűbben úgy tudtuk megtenni, hogy az ATP adagolásakor az extracelluláris közegből elvontuk a szabad Ca^{2+} -okat, Ca^{2+} -mentes Tyrode oldat ($CaCl_2$ nélkül, 5 mM EGTA) alkalmazásával. Ebben az esetben a különböző tenyésztési napokon megvizsgált mintegy 30 sejt egyikénél sem volt ATP-vel kiváltott Ca^{2+} -tranzienst detektálható (10. ábra A-B), ami erősíti azon felvetésünket, hogy az extracellulárisan adagolt ATP hatásáért Ca^{2+} -belépés, valamint ionotrop purinoreceptorok (P2X-receptorok) lehetnek felelősek, melyek az extracelluláris térből engedik be a szabad Ca^{2+} -okat a citoszólba. Kísérleteink következő fázisában farmakológiai módszerekkel, nevezetesen suramin, egy nem-szelektív P2X-antagonista, adagolásával próbáltuk meghatározni az ATP-válasz kialakításáért felelős receptoraltípusokat. A suramin a P2X₄-és P2X₆-altípusok kivételével, gátolja az összes P2X-receptort [37]. Ezt kihasználva az ATP-adagolása előtt a sejteket 10 μ M suraminnal előkezeltük és azt tapasztaltuk, hogy az ATP-indukált Ca^{2+} -válasz gyakorlatilag változatlan maradt, vagyis a differenciálódó chondrogenikus sejteken funkcionáló P2X-altípusok a már említett P2X₄-és a P2X₆-receptorok lehetnek (10. ábra C). Az ATP többszöri, egymás utáni alkalmazása az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ ismételt, tranzienst emelkedéseit eredményezte a 3 napos HD sejtenyészeteken. Viszonylag rövid, mintegy 100 másodperces kimosás elégségesnek bizonyult, hogy a sejtek visszanyerjék nyugalmi $[Ca^{2+}]$ -jukat az ATP-adagolásokat követően. A deszenzitizáció hiánya tovább erősíti a P2X₄-vagy P2X₆-receptorok lehetséges expresszióját és funkcionalitását a vizsgált HD tenyészeteken (10. ábra D).

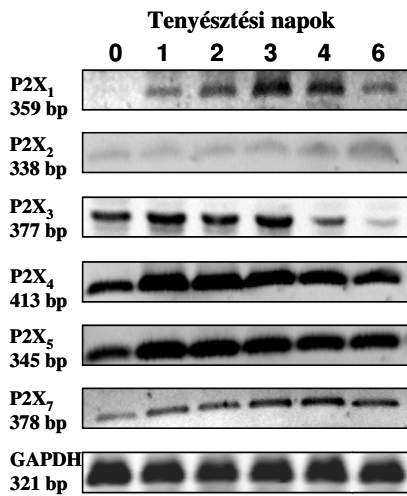
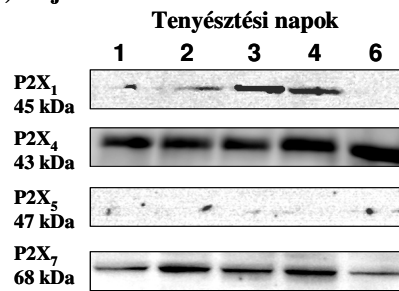
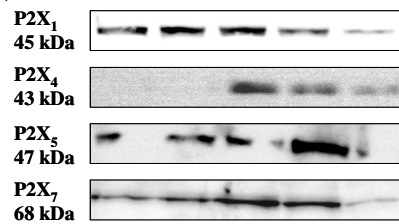
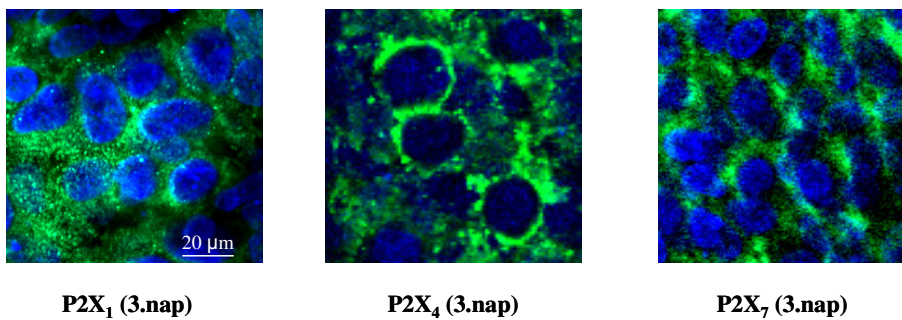
A chondrogenikus mesenchymalis sejtek különböző P2X-receptortípusokat expresszálnak a sejtenyészet korától és a differenciálódási stádiumtól függően

A csirke mesenchymalis sejtek chondrogenikus differenciálódása során jelenlévő különböző P2X-receptortípusok expressziós mintázatának felderítésére céljából RT-PCR reakciókat végeztünk. A csirkében expresszáladó P2X-receptorok mRNS szekvenciáit a GenBank adatbázisból töltöttük le, és valamennyi fellelt szekvenciára specifikus primerpárokat terveztünk az „Anyag és módszer” fejezetben leírtak alapján. A P2X₆-receptor esetében sajnos nem állt rendelkezésre mRNS szekvencia.



10. ábra Az ATP-adagolás hatása 3 napos HD tenyészeteken. (A) Extracelluláris Ca^{2+} hiányában az ATP-indukált Ca^{2+} -tranzienst elmarad. (B) A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ és az ATP hatására létrejövő tranziensek csúcsértékeinek alakulása extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében és hiányában. Az adatok az intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ -k átlagait mutatják 5 független kísérletből, zárójelben a lemért sejtek számával. (C) A P2X antagonistá suramin hatása (10 μ M) az ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranzienst extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (D) Extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében az ATP ismételt alkalmazásának hatása mutatja a nem deszenzitizálódó P2X-receptorok jelenlétét a differenciálódó chondrocytákon.

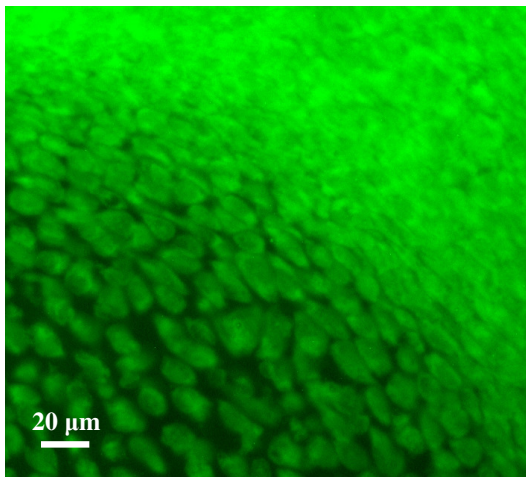
A PCR reakciót követően a várt molekulasúlyú amplimereket detektáltuk minden rendelkezésre álló cDNS minta esetében, azonban a P2X₂-receptornál csak nagyon gyenge pozitívítást tapasztaltunk. A P2X₁-valamint P2X₇-receptorok mRNS szintű expresszióját egy differenciálódással párhuzamosan emelkedő intenzitás jellemzi, amely a folyamat végét jelentő 6. npra mérséklődik. A P2X₃-receptor mintázatának tekintetében változatos megjelenést tapasztaltunk, az 1-3. tenyésztési napokon megfigyelhető, legerősebb mRNS-szintű kifejeződéssel. Eredményeink alapján a primer porcdifferenciálódás folyamán a P2X₄-és P2X₅-receptorok mutatták a legerősebb mRNS-szintű expressziót. Mindkét receptor esetében a jel az első napon vált egyértelműen intenzívvé, majd a tenyésztés végéig folyamatosan gyengült (11. ábra A).

A: RT-PCR**B: Western blot****(1) Teljes lizátum****(2) Plazmamembrán- frakció****C: Immuncitokémia**

11. ábra A különböző P2X-receptorok expressziós mintázata a HD sejtenyészetek sejtjeiben a tenyésztés különböző napjain. (A) Az RT-PCR reakciókkal detektált mRNS-szintű kifejeződés vizsgálata specifikus primerekkel kapott megfelelő méretű amplimerek révén (a P2X₆-receptor kivételével). Kontrollként GAPDH-specifikus primereket alkalmaztunk. (B) A P2X-receptor altípusok fehérjeszintű vizsgálata Western-blot analízissel a HD sejtenyészetek különböző fejlődési stádiumaiban. Teljes lizátum és membránfrakció mintái voltak analizálva, a felvitt fehérjemennyiség minden esetben 50 μg volt. Az eredmények 3 független kísérletből és 3-3 párhuzamos tenyésztésből származnak. (C) 3 napos porctenyészetek immuncitokémiai jelölése a P2X₁-, P2X₄-, valamint P2X₇-receptorok jelenlétének detektálására. 40X nagyítás mellett, a reprezentatív képek 3 független kísérletből, és 3-3 párhuzamos tenyésztésből származnak.

A különböző P2X-receptoraltípusok fehérjeszintű expresszióját Western-blot technikával vizsgáltuk (11. ábra B). 3 különböző tenyésztésből kapott eredményeink alapján a P2X₂-altípus egyik esetben sem volt detektálható és nem kaptunk pozitív jelet P2X₃-, valamint

P2X₆-receptor esetén sem. A fehérjeexpresszió vizsgálatát mind teljes fehérjelizátum, mind izolált membránfrakció használatával elvégeztük. A P2X₁-receptor megjelenése a teljes lizátumban az mRNS mintázatnak megfelelően alakult, míg a membránfrakcióban a tenyésztés 1-3. napján igen erős jelet detektáltunk, amit a további napokon jelentős expressziócsökkenés követett. Ellentétben az RT-PCR eredményeivel, a P2X₅-receptor alig kimutatható mennyiségben volt jelen a teljes lizátumban, erős pozitívítást detektáltunk azonban a plazmamembránban a 4. napon. A teljes lizátum vizsgálata alapján a P2X₇-receptor változó mintázatot mutatott a 2. és a 4. napon tapasztalt legerősebb jelekkel, a plazmamembránban viszont egy csúcs-szerű mintázatot követve a 2., 3., és 4. napokon lehet megfigyelni ezen receptortípus legmarkánsabb jelenlétét. A primer HD sejtenyészetekben a P2X₄ receptor fehérje szintű megjelenése bizonyult a legérdekesebbnek. A teljes fehérjefrakcióban a 4. napon mutatta a legerősebb pozitívítást, a plazmamembrán esetén a receptor a 3. tenyésztési napon jelenik meg, majd csökkenő intenzitást mutatott a 4. és 6. napon. A teljes lizátumban a 4. napon megfigyelhető feldúsulás hipotézisünk szerint a receptor membránból történő visszavételezésének következménye. Ezen eredmény összhangban van azzal a megfigyeléssel miszerint a chondrogenikus mesenchymalis sejtek túlnyomó többsége a 3. tenyésztési napon válaszolt az ATP-adagolásra, valamint ez az a nap ami a differenciálódás „kulcsperiódusaként” jellemezhető a már említett szignifikánsan megemelkedő citoplazmatikus [Ca²⁺]-val. A P2X₁-, P2X₄- és P2X₇-receptorok jelenlétét immuncitokémiai jelöléssel is igazoltuk, melynek során jól látható a P2X₄-receptor membránhoz kötött lokalizációja (11. ábra C).



12. ábra 8 napos csirkeembrió végtagtelepének P2X₄- expressziójának detektálása immunhisztokémiai vizsgálattal.

Fontos megemlíteni, hogy a P2X₄-receptor a csirkeembrió fejlődő végtagtelepéből készített szövettani metszeten szintén kimutatható volt. Az immunhisztokémiai vizsgálatot 8 napos embrió esetén végeztük el, amely fejlődési stádium megközelítőleg megfelel a 3-4 napos fejlettségű primer porc kultúra állapotának (12. ábra).

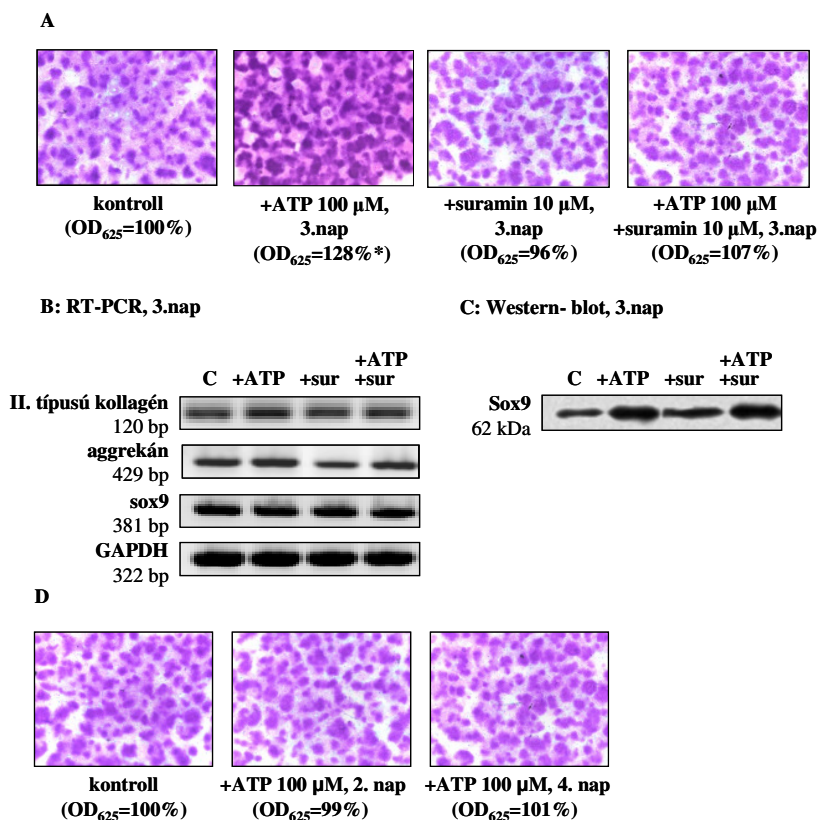
A differenciálódás napján a tenyésztő tápoldat ATP-vel történő kiegészítése fokozza a primer porcsejtek mátrixtermelését

Azon hipotézisünk megerősítése céljából, miszerint a chondrogenikus mesenchymalis sejtek extracelluláris térből történő Ca²⁺ felvétele P2X-, különösen P2X₄-receptorokon keresztül történik, további kísérleteket végeztünk. A tenyésztés 3. napján különböző koncentrációban ATP-t adagoltunk a HD sejtenyészetek tápoldatához. Megfigyeléseink szerint 100 μM ATP egyszeri alkalmazása szignifikánsan több mátrixtermelődést eredményezett a 6. napra, amit a dimetil-metilénkék, valamint toluidinkék (TB) festéssel igazoltunk. A suramin önmagában történő, illetve ATP-vel kombinált alkalmazása nem eredményezett változást a termelt porcmátrix mennyiségében a tenyésztés végét jelentő 6. napra. (13. ábra A). Az az irodalomból ismert tény, hogy a suramin gátolja a hyaluronsav-szintetáz enzimet, magyarázhatja a mátrixtermelődés kismértékű csökkenését [74]. A 2. ill. a 4. napon történő ATP alkalmazás nem módosította a porcmátrix termelődését (13. ábra D). A II-es típusú kollagén és aggregán magfehérje mRNS-szintje az emelkedett mátrixképződésnek megfelelően szintén fokozódott a 3. napon történő ATP kezelés hatására (13. ábra B). Bár a Sox 9 esetén mRNS-szintű változást nem sikerült detektálnunk, ezen transzkripciós faktor fehérjeszintű expressziója sokkal intenzívebbé vált az ATP-hozzáadás következtében, amely jelenség a nem-specifikus P2X antagonistá suraminnal nem volt gátolható, tovább erősítve a P2X₄ feltételezett szerepét. (13. ábra C). Mindezen változások azt mutatják, hogy az ATP-nek pozitív hatása van a mátrixképződésre és porcdifferenciálódásra, de csak a chondroprogenitor sejtek elkötelezetté válásának időszakában. Sem az éretlen porc, sem a már differenciált rendszer nem érzékeny a külső ATP hozzáadásra.

A HD tenyészetek sejtjei ATP-t szekretálnak a tenyésztőtápoldatba

Annak ismeretében, hogy az ATP adagolás milyen hatással van a differenciálódó porcsejtek mátrixtermelésére, felvetődött a kérdés, hogy vajon a porcosodó tenyészetek sejtjei szekretálnak-e ATP-t a tápoldatba mint autokrin-parakrin mediátort, hogy elősegítsék vagy gyorsítsák saját differenciálódásukat. Ezen kérdés kiderítése érdekében a tenyésztés napjain mintát vettünk a sejtek tápfolyadékából, és ATP assay-t végeztünk. A tenyésztés valamennyi

napján kis mennyiségű ATP (2-10 nM) volt detektálható. Ezen eredmény megegyezik más nem excitábilis sejtek tápoldatában mért adatokkal [75].



13. ábra 100 μM ATP és 10 μM suramin hatása a porcfejlődésre porcosodó HD sejtenyészetekben. (A és D) 3%-os ecetsavban oldott DMMB-vel láthatóvá tett metakromáziás porcterületek 6 napos tenyészetekben. A mintákból extrahált toluidinkék optikai denzitásának meghatározása 625 nm-en. Az adatok minden kísérleti csoport 5 mérésének átlagát jelentik. A csillag a kivont toluidinkék OD-jának szignifikáns emelkedését (*P < 0,01) jelzi a kontrollhoz viszonyítva. (B) A II-es típusú kollagén, aggregán és Sox 9 mRNS expressziója ATP és/vagy suramin kezelés hatására; kontrollként GAPDH-t használtunk. (C) ATP és/vagy suramin hatása a Sox 9 fehérje expressziójára. A B és C panelek esetében a reprezentatív ábrák 3 független kísérletből, 3-3 párhuzamos tenyésztésből származnak.

A P2Y-receptorok vizsgálata

Bár a fenti eredmények a P2X receptorok alapvető fontosságát igazolják a porcdifferenciálódás során, az ionotróp purinoreceptorok vizsgálatát követően további kísérleteket végeztünk a metabotróp, P2Y-receptorok jelenlétének és funkcionalitásának felderítése céljából, mivel a már leközölt eredményeink alapján ismert, hogy a HD kultúra

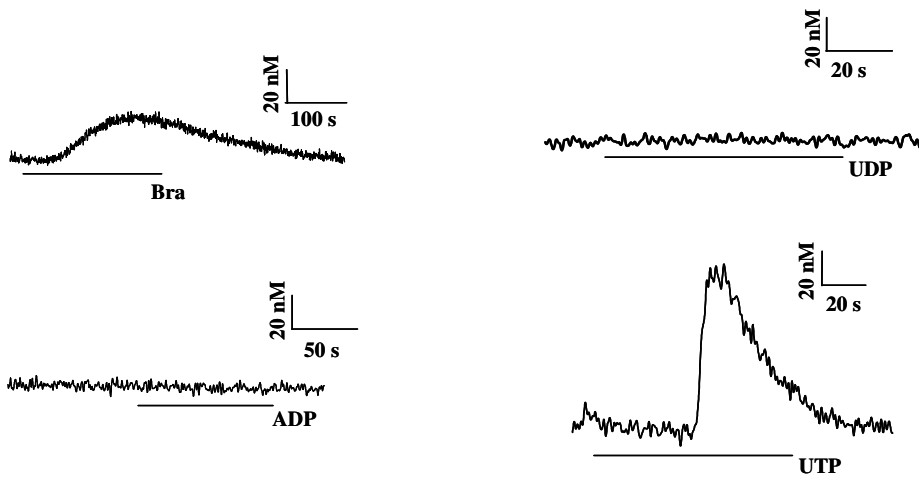
sejtjei tartalmaznak a belső raktárból felszabadítható Ca^{2+} -ot, valamint IP_3 -receptort [14]. Mindezek tükrében kíváncsiak voltunk, hogy a porcsejtek expresszálnak-e P2Y -receptorokat, és ha igen, ezek funkciója az ATP-n kívül más nukleotiddal igazolható-e.

Az egész sejten történő, fluoreszcens $[\text{Ca}^{2+}]$ mérés során megvizsgáltuk az intracelluláris Ca^{2+} -raktárban jelenlevő és abból az IP_3 útvonalon keresztül felszabadítható Ca^{2+} jelenlétét. Chondrocytákon már igazolták ezen útvonalat aktiváló, funkcionális bradykinin receptorok expresszióját [76], ennek megfelelően a 3. napos sejtekre adagolt bradykinin (20 μM) átlagosan 30 nM amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienseket eredményezett a sejtek 60%-nál. Kísérleteink folytatásaként ADP-t, UDP-t és UTP-t mint nem-specifikus P2Y -agonistákat adagoltunk a HD tenyészetek sejtjeire 180 μM koncentrációban. A sejtek 50%-nál kismértékű, - átlagosan 57 nM amplitúdójú - intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedést tapasztaltunk a P2Y_2 és P2Y_4 agonista UTP adagolását követően. Másrészt a P2Y_1 receptor agonista ADP és a P2Y_6 receptor agonista UDP alkalmazása nem eredményezett Ca^{2+} -tranzienseket a 3. napos HD tenyészetek sejtjein (14. ábra A).

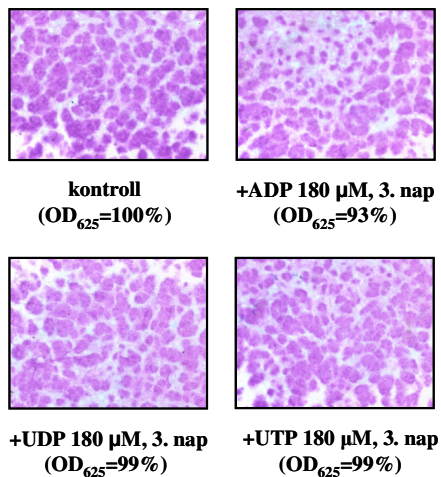
A metakromáziás színreakció alapján, egyszeri 180 μM ADP, UDP illetve UTP adagolása a tenyésztő tápoldathoz a 3. napon, nem eredményezett változást a porcmátrix termelődésében (14. ábra B).

A GenBank adatbázisban a P2Y_1 , P2Y_3 , P2Y_5 receptorok mRNS-szekvenciái állnak rendelkezésre. Az RT-PCR reakció alapján mindhárom metabotróp purinoreceptor stabil mRNS-expressziót mutatott a tenyésztés folyamán (14. ábra C). Western-blot analízissel a P2Y_1 , P2Y_2 és P2Y_4 fehérje jelenlétét vizsgáltuk teljes, valamint plazmamembrán fehérje-frakciókban. A tenyésztés első napján a P2Y_1 receptor jelenléte nem volt kimutatható, ezt követően azonban mind a két frakcióban annak stabil expressziója volt detektálható egészen a 6. napig, amikor kismértékű expresszió-csökkenés volt tapasztalható. A P2Y_2 fehérje jelenléte a tenyésztés 2.-4. napjáig mutatkozott legerősebbnek a teljes fehérje-frakcióban. A plazmamembrán-frakcióban azonban állandó expressziós szintet detektáltunk a 6. nap kivételével, amikor csökkenő expressziót mutatott. A P2Y_4 receptor esetén a teljes fehérjelizátumban nem tapasztaltunk immunpozitivitást, míg a membrán-frakcióban a 2. napon volt a legmeghatározóbb a fehérje jelenléte (14. ábra D).

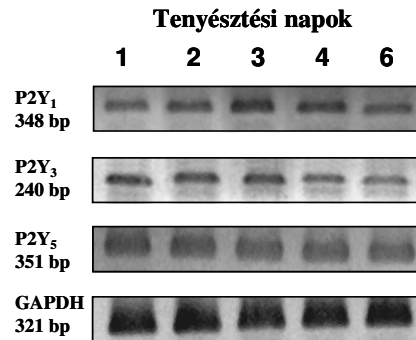
A



B

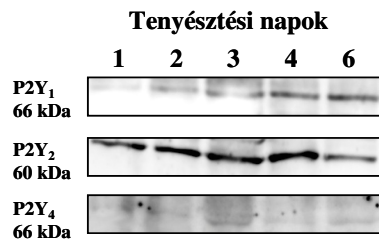


C: RT-PCR

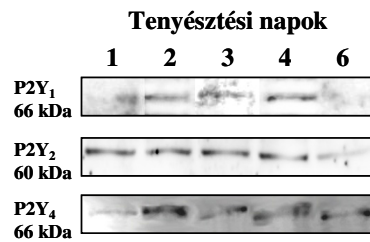


D: Western-blot

(1) Teljes lizátum



(2) plazmamembrán-frakció fraction



14. ábra A P2Y receptorok expressziójának és funkcionalitásának vizsgálata a HD sejtenyészeteken. (A) 20 μ M bradykinin, 180 μ M ADP, UDP, valamint UTP-vel kiváltott Ca^{2+} -tranziensek extracelluláris Ca^{2+} hiányában. A vonalak az agonisták adagolásának idejét jelzik. A reprezentatív görbék 3 független kísérletből származnak. (B) 3%-os ecetsavban oldott DMBB-vel láthatóvá tett metakromáziás porcterületek 6 napos tenyészetekben. A mintákból extrahált toluidinkék optikai denzitásának meghatározása 625 nm-en. Az adatok

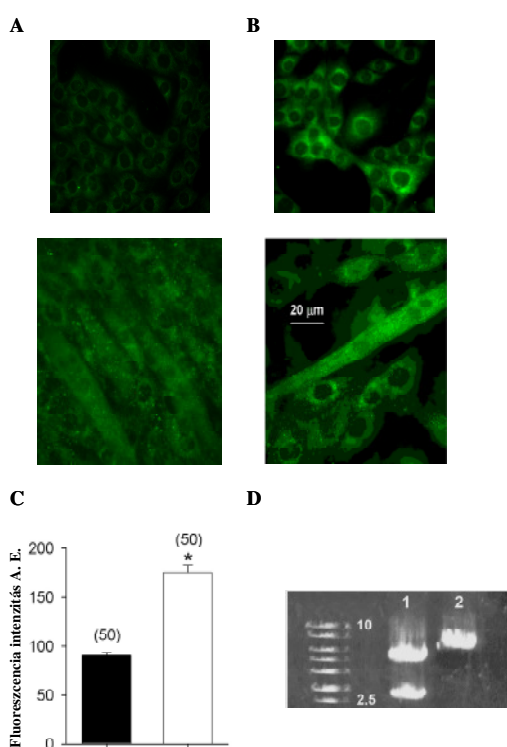
minden kísérleti csoport 4-4 párhuzamos mérésének átlagát jelentik 3 független kísérletből. (C) A különböző P2Y-receptorok mRNS-szintű expressziója. Az RT-PCR reakció során az altípusok amplifikációja specifikus primerpárokkal történt. Kontrollként GAPDH-t használtunk. A reprezentatív ábrák 3 független kísérletből, 3-3 párhuzamos tenyésztésből származnak. (D) A P2Y₁-, P2Y₂-, és P2Y₄- fehérjék Western-blot analízise HD sejtenyészetekből. Teljes lizátumot és membránfrakciót használtunk, sávonként 50 µg felvitt fehérjemintával. A reprezentatív ábrák 3 független kísérletből, 3-3 párhuzamos tenyésztésből származnak.

Eredmények II.

Vázizomszövet - *in vitro* vázizomtenyészetek

Trisk 95 overexpresszió C2C12 izomsejtekben

A Trisk 95 overexpresszió hatását egér eredetű, vázizom sejtvonalon vizsgáltuk. Ezen szabályozó fehérje endogén expressziójára jellemző, hogy míg a myoblastokban nem mutatható ki a fehérje jelenléte, addig a differenciálódás utáni stádiumban levő myotubulusok kimutathatóan expresszálják azt (15. ábra A). A sejtekben a Trisk 95 túltermelését pcDNA3.1 expressziós plazmid rendszerrel biztosítottuk [52]. A vectorba a Trisk 95 fehérje teljes cDNS-ét klónoztuk, a ligáció sikerességét agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük (15. ábra D).



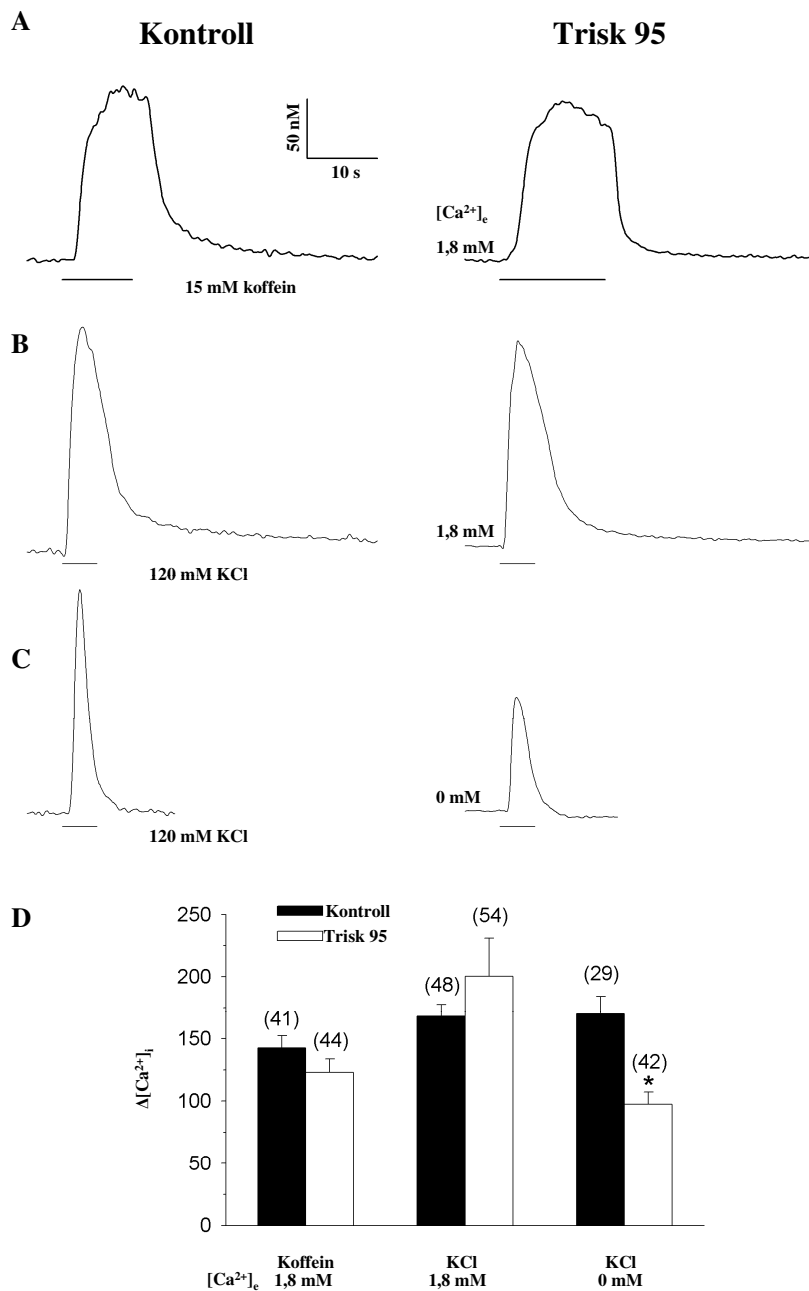
15. ábra *Trisk 95 expresszió C2C12 egér vázizom sejtvonalon. (A) Az endogén Trisk 95 expressziója az üres vektorral transzfektált C2C12 myoblastokban és myotubulusokban. (B) A Trisk 95 fehérjét stabilan overexpresszáló C2C12 klón. A kalibráció mind a 4 fluoreszcens ábrára vonatkozik. (C) A Trisk 95 expressziója kontroll (fekete oszlop) és transzfektált (fehér oszlop) myotubulusokban mért fluoreszcenciaintenzitás-értékek összehasonlítása alapján. A csillag a kontroll-hoz viszonyított szignifikáns különbséget jelzi ($p < 0,05$). A számok a 10-10 sejten összesen leértékelte region of interest (ROI)-k számát jelölik. (D) Ethidium-bromiddal jelölt agaróz gél elektroforézis a Trisk 95 cDNS és üres pcDNA 3.1 vektor (1. sáv), valamint az emésztetlen klónozott vektor (2. sáv) ellenőrzésére.*

A stabil transzfekciót követően a protein túltermelését a szelektált klónokban mind myoblast, mind myotubulus stádiumban immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük (15. ábra B). A fluoreszcenciaintenzitások kvantitatív analizise során a fehérje 94%-os túltermelését detektáltuk a kontroll, üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált C2C12 sejtekhez képest (15. ábra C). Kísérleteinkhez abszolút kontroll C2C12 sejteket is használtunk, melyek a transzfekciós kontrollhoz hasonlítva nem mutattak szignifikáns különbséget. A kontroll és Trisk 95 overexpresszáló 5-7 napos, terminálisan differenciált C2C12 myotubulusokon funkcionális méréseket végeztünk.

Ca²⁺-tranziensek Trisk 95 túltermelő C2C12 izomsejteken

Kísérleteink elején azt vizsgáltuk, hogy a fehérje túltermelés módosítja-e a myotubulusok Ca²⁺-homeosztázisát. A nyugalmi intracelluláris [Ca²⁺] esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll ill. transzfektált myotubulusokat összehasonlítva (77,4±5.2 nM, [n=48] a kontroll sejtekben és 71,3±4.8 nM, [n=54] a Trisk 95 túltermelő sejtekben). A továbbiakban agonistákkal kiváltott intracelluláris [Ca²⁺] változások amplitúdóját vizsgáltuk. A funkcionális rianodinreceptor jelenlétét, ill. az SR-ből potenciálisan felszabadítható Ca²⁺ mennyiségét 15 mM koffeinoldat alkalmazásával bizonyítottuk (16. ábra A). Méréseink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a koffein által kiváltott Ca²⁺-tranziensek amplitúdóját illetően a vizsgált kontroll és Trisk 95 transzfektált sejtekben (142±10 nM, [n=41] és 123±11 nM, [n=44]). A depolarizáció-indukált Ca²⁺-tranzienseket 120 mM KCl oldat alkalmazásával vizsgáltuk normál (1,8 mM extracelluláris [Ca²⁺]) és Ca²⁺-mentes Tyrode-oldatban (16. ábra B, C). Extracelluláris Ca²⁺ jelenlétében a KCl által kiváltott Ca²⁺-tranziensek amplitúdói nem különböztek lényegesen a kontroll és Trisk 95 myotubulusokban (168±10 nM, [n=48] és 200±31 nM, [n=54]). Ezzel ellentétben a Ca²⁺-mentes oldatban alkalmazott KCl által kiváltott Ca²⁺-tranziensek amplitúdói szignifikánsan csökkentek a Trisk 95 fehérjét túltermelő myotubulusokban (98±10 nM, [n=42]) a kontroll sejtekkel összehasonlítva (170±14 nM, [n=29]). Mivel a triadin overexpresszióinak csak csekély hatása volt a koffein-indukált Ca²⁺-felszabadulásra, feltételezhető hogy az SR felszabadítható Ca²⁺ mennyisége nem változott a Trisk 95 túltermelés következtében. Másrészt, az extracelluláris Ca²⁺ hiányában kiváltott depolarizáció-indukált Ca²⁺-tranziensek vizsgálata során a külső Ca²⁺-megvonás eredményeként, a Ca²⁺-ok egyértelműen a belső raktárból származtak. Így a Ca²⁺-tranziensek amplitúdóinak szignifikáns csökkenéséből (16. ábra D) a belső raktárból történő Ca²⁺-

felszabadulás megváltozott szabályozására következtethetünk, amely megegyezik azon eredményekkel amit korábban patkány eredetű, primer vázizomtenyészetben már leírtak [77].

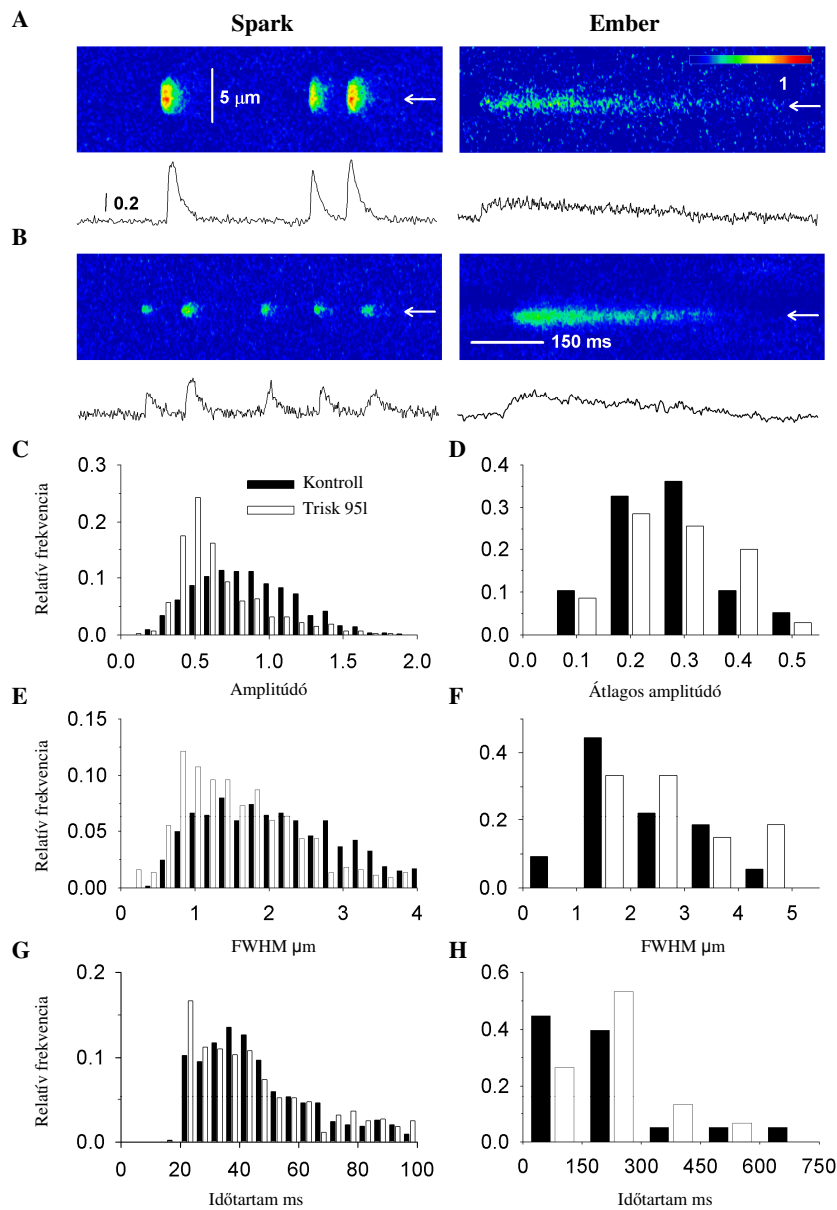


16. ábra Egész sejten történő [Ca²⁺]-mérés kontroll és Trisk 95 overexpresszáló myotubulusokon. (A-C) 15 mM koffein és 120 mM KCl által kiváltott Ca²⁺-tranziensek, kontroll (bal oszlop) és Trisk 95 (jobb oszlop) sejteken. A KCl hatása extracelluláris Ca²⁺ jelenlétében (B), ill. hiányában (C). (D) Az intracelluláris [Ca²⁺] változások (Δ[Ca²⁺]_i) összesített adatai. Zárójelben a lemért sejtek száma; a csillag a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést mutatja p<0,0001.

Elemi Ca²⁺-felszabadulási események Trisk 95 túltermelő C2C12 izomsejteken

A Trisk 95 túltermelés hatására bekövetkező, az SR-ből történő csökkent Ca²⁺-felszabadulás alaposabb megértéséhez és további igazolásához lokalizált Ca²⁺-események vizsgálatát végeztük el. Ezen funkcionális méréseket kontroll és triadin túltermelő myotubulusokon végeztük lézer konfokális mikroszkóp alkalmazásával. Kontroll izomcsöveken mind sparkok (nagy amplitúdójú, rövid idejű, lokalizált Ca²⁺-felszabadulási események 17. ábra A, bal panel), mind emberek (kis intenzitású, hosszú idejű események 17. ábra A, jobb panel) rendre megfigyelhetőek voltak. Megjegyzendő azonban, hogy a sparkok megjelenési gyakorisága messze nagyobb volt, mint az embereké. Méréseink alapján a transzfektált myotubulusok is produkáltak hasonló Ca²⁺-eseményeket (17. ábra B), ezek jellemző paraméterei azonban markáns változásokat mutattak. Az eredményeket reprezentáló hisztogramokból látható (17. ábra C és D), hogy a kis amplitúdójú Ca²⁺-sparkok relatív megjelenési gyakorisága emelkedett a triadin overexpresszió következtében, ugyanakkor a nagy amplitúdójú sparkok előfordulási frekvenciája csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva (17. ábra C). Az emberek átlagos amplitúdója ezzel szemben nem változott a triadin túltermelő sejtekben (17. ábra D). A sparkokra vonatkoztatott maximális amplitúdó felénél mért szélesség - amint azt az FWHM hisztogram balra tolódása reprezentálja - csökkent triadin túltermelés hatására (17. ábra E), ugyanakkor emberek esetén ezen paraméter változatlan maradt (17. ábra F). Az események időbelisége változatlan maradt mind sparkok (17. ábra G), mind emberek esetében (17. ábra H) a Trisk 95 túltermelés hatására. Az összesített eredmények alapján elmondható, hogy a Trisk 95 túltermelő myotubulusokban a sparkok átlagos amplitúdója szignifikánsan kisebb a kontroll myotubulusokhoz viszonyítva ($0,59 \pm 0,01$ és $0,81 \pm 0,01$; $p < 0,001$), ugyanakkor az emberek átlagos amplitúdójára csak csekély hatással volt a Trisk 95 túltermelés ($0,22 \pm 0,01$ és $0,26 \pm 0,02$; $p > 0,07$). Az események időbeli kiterjedését tekintve nem tudtunk különbséget megfigyelni sem sparkok ($47,1 \pm 0,9$ és $51,1 \pm 1,8$ ms), sem emberek esetén (215 ± 21 és 224 ± 21 ms) a kontroll ill. transzfektált sejtek összehasonlításában. Hasonló helyzetet tapasztaltunk a csúcs (max. amplitúdó) eléréséhez szükséges idő elemzésekor is a két csoport összevetésében ($14,1 \pm 0,4$ vs. $15,7 \pm 0,6$ ms; $p > 0,1$). Az átlagos FWHM érték sparkok esetében ugyanakkor szignifikánsan csökkent a fokozott Trisk 95 termelés következtében ($1,26 \pm 0,07$ μ m transzfektált sejtekben és $1,86 \pm 0,06$ μ m kontroll sejteknél; $p < 0,01$). Ugyanezen érték emberek esetén változatlan maradt. A vizsgált spontán, elemi Ca²⁺-felszabadulási események előfordulási gyakorisága mind sparkok esetén ($1,04 \pm 0,14$ Hz a Trisk 95 túltermelő sejtekben és $1,85 \pm 0,21$ Hz kontroll sejtekben), mind

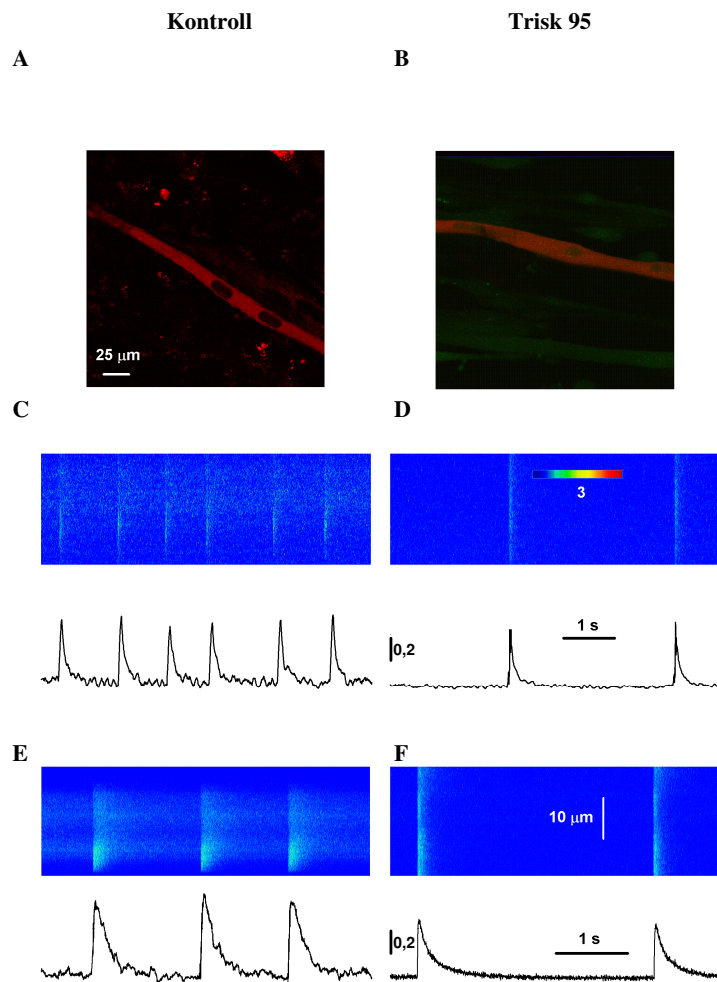
emberek esetén ($0,09 \pm 0,04$ Hz a Trisk 95 túltermelő sejtekben és $0,19 \pm 0,02$ kontroll sejtekben) szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$).



17. ábra. Elemi Ca^{2+} -felszabadulási események kontroll és Trisk 95 túltermelő myotubulusokon. (A) Lokalizált események line-scan felvételei kontroll körülmények között. A klasszikus Ca^{2+} -spark (bal panel) és kis amplitúdójú ember (jobb panel). (B) Mindkét típusú esemény detektálható Trisk 95 overexpresszáló sejteken, de különösen a sparkok morfológiai változása szembetűnő. A függőleges skála $5 \mu\text{m}$, a vízszintes skála 150 ms minden kép esetében. (C-D) Ca^{2+} -sparkok (C) és emberek (D) amplitúdóhistogramjai kontroll és transzfektált sejtek adataiból. (E-F) FWHM histogramok sparkok (E) és emberek (F) esetében. (G-H) Az események időbeliségét bemutató histogramok sparkok (G) és emberek (H) esetén.

Trisk 95 túltermelés egér eredetű, primer vázizomtenyészetben

A triadin overexpressziót az egér eredetű, primer vázizomtenyészetekben adenovírus transzfekció alkalmazásával hoztuk létre. A méréseket differenciált primer myotubulusokon végeztük, kontroll esetben DsRed fluoreszcens proteint kódoló ill. Trisk95-DsRed rekombináns vírussal történő infekciót követően (18. ábra A és B).



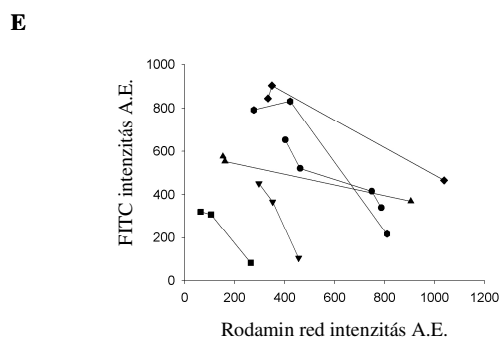
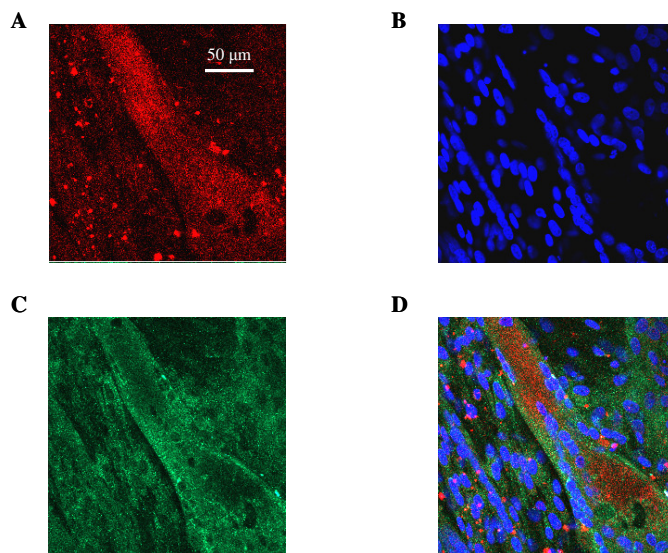
18. ábra. Spontán Ca^{2+} -tranziensek adenovírussal transzfektált egér eredetű, primer myotubulusokon. (A) Kontroll, csak DsRed-et, (B) DsRed és Trisk 95 fehérjéket expresszáló primer sejtek. A piros fluoreszcencia biztosította a transzfektált sejtek azonosítását, a zöld fluoreszcencia a Fluo 4-AM feltöltés eredménye. (C-D) Spontán Ca^{2+} -tranziensek line-scan felvételei kontroll, (csak DsRed-et expresszáló C) és Trisk 95 túltermelő (D) myotubulusokon. A képek alatti görbék a Fluo-3 fluoreszcencia változását jelzik a háttérfluoreszcenciához (F/F_0) képest. (E-F) Elektromos ingerlés által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek kontroll (E) és Trisk 95 (F) myotubulusokon. A képek alatti görbék az előzőekhez (C-D) hasonlóan voltak készítve.

Mind a kontroll, mind a transzfektált izomcsövek spontán bekövetkező Ca^{2+} -tranzienseket produkáltak (18. ábra C, D), melyek háttérben feltételezhetően a sejtek ingadozó nyugalmi membránpotenciálja, és a TTX-el gátolható Na^+ -csatornák működése következtében kialakuló spontán akciós potenciálok sorozata állt. Ezen események vizsgálata konfokális mikroszkóppal történt, line-scan mérések során. Az értékelt eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált Ca^{2+} -tranziensek esetében azok mind amplitúdója, mind előfordulási gyakorisága szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest ($0,56 \pm 0,03$ és $0,26 \pm 0,01$ Hz, $n=71$; $p < 0,02$ és $p < 0,001$, a Trisk 95 túltermelő sejtekben, valamint $0,68 \pm 0,02$ és $0,75 \pm 0,04$ Hz, $n=169$, a kontroll, csak DsRed-et expresszáló sejtekben; 18. ábra C, D). Az adatok 6 kontroll és 4 transzfektált myotubulus méréséből származnak. Külső elektromos impulzus alkalmazásával is előidéztünk Ca^{2+} -tranzienseket (18. ábra E, F). Az így kiváltott Ca^{2+} -tranziensek esetén az előzőek alapján várt eredményt kaptuk, nevezetesen, a Trisk 95 overexpresszió következtében a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója szignifikánsan csökkent a kontroll sejtekhez képest ($0,64 \pm 0,09$ [n=17, 4 kontroll sejt] és $0,46 \pm 0,05$ [n=45, 9 transzfektált sejt alapján]).

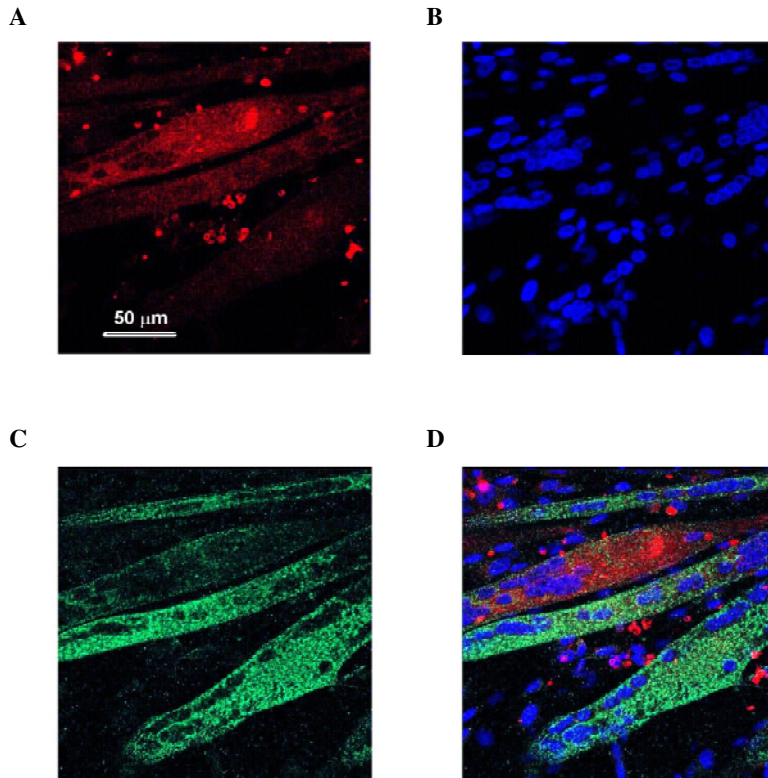
Az endogén triadinexpresszió gátlása RNS interferencia módszer alkalmazásával patkány eredetű, primer vázizomtenyészetekben

A triadin túltermelés hatásainak vizsgálatát követően célul tűztük ki a csökkent endogén Trisk 95 expresszió okozta változások felderítését is, mindezt egy olyan rendszerben ahol a lokális Ca^{2+} -felszabadulási események gyakorisága viszonylag alacsony kontroll körülmények között. A tenyésztés különböző szakaszaiban immuncitokémiai vizsgálattal igazoltuk az endogén Trisk 95 megjelenését, mely alapján elmondható, hogy a fehérje a differenciálódás megkezdését követően a 2-3. napon jelenik meg az érett myotubulusokban. A differenciálódás ezen szakaszában sokmagvú izomcsövek formálódnak, melyekben a Trisk 95 megjelenése pontozott mintázatot mutat (19. ábra C). A differenciálódó myotubulusokat rodaminvörössel jelzett Trisk 95-specifikus shRNS-sel transzfektáltuk liposzóma mediált transzfekciós technika segítségével. Két nappal a transzfekciót követően a transzfektált sejtek a piros fluoreszcenciájuk alapján könnyen azonosíthatóak voltak. Számos myotubulus esetén a piros fluoreszcencia nem mutatkozott homogénnek, intenzív és kevésbé intenzív területek voltak elkülöníthetőek (19. ábra A), ami feltehetően annak volt köszönhető, hogy transzfektált és nem transzfektált sejtek egyaránt részt vettek a sejtfúzióban a myotubulus differenciálódása során. A Trisk 95-specifikus immunjelöléssel az intenzív piros területeken találtuk a fehérje fokozottabban csökkent expresszióját (19. ábra C, D). Az shRNS kazetta transzfekció során

az effektív szekvencia termelődése nem folyamatos, hanem egyszeri (ellentétben a vektorról történő expresszáltatással), és ezért a transzfekció hatása némileg lokalizált maradt annak megfelelően, hogy mennyi transzfectált és nem transzfectált sejt vett részt az adott myotubulus képzésében. Minden tenyészet esetében (n=6) megfigyelhető volt azonban az a tendencia hogy a piros és zöld fluoreszcencia negatív korrelációt mutatott (19. ábra E). Az shRNS hatásának bemutatása a (20 ábrán) szintén demonstrálva van.



19. ábra Csökkent Trisk 95 expresszió rodamin vörössel jelölt shRNS transzfekciót követően. (A) A transzfectált myotubulusok azonosítását piros fluoreszcenciájuk tette lehetővé. (B) A differenciált sejtek nagyszámú, DAPI-val láthatóvá tett sejtmagot tartalmaznak. (C) Trisk 95 expresszió kimutatása specifikus elsődleges és nyúlban termeltetett FITC-el (zöld) konjugált másodlagos antitesttel. (D) A bemutatott kép az A-C képek egymásra vetítésével készült. A vízszintes kalibráció minden kép esetén 50 µm. (E) A triadinexpresszió csökkentésének hatékonysága. A fehérjét jelző zöld ill. az shRNS-t jelölő piros fluoreszcencia volt összehasonlítva ugyanazon területeken. Összesen 6 tenyészetben 19 terület volt analizálva, a szimbólumok a különböző tenyészeteket jelölik.

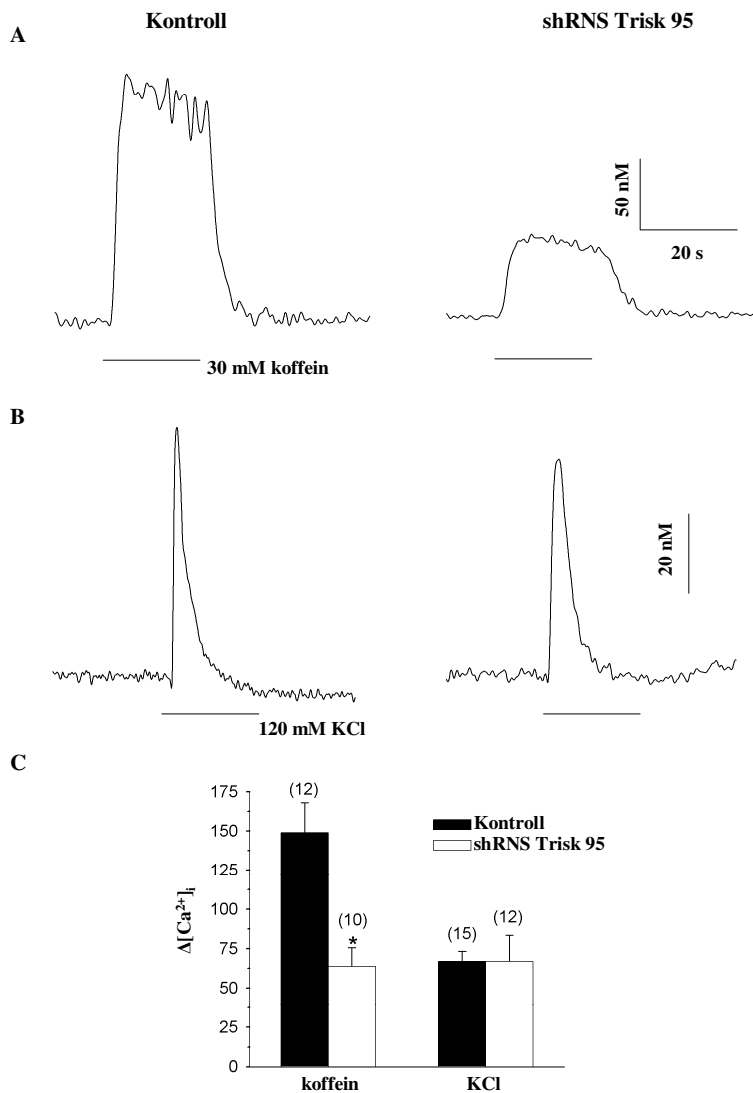


20. ábra A transzfektált és nem transzfektált myotubulusokban a Trisk 95-re jellemző pontozott megjelenés változása, bizonyítva az expresszió csökkenését az endogén kontroll sejtekhez képest. A színek a 19. ábrával megegyező jelentésűek.

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

Az shRNS-sel transzfektált sejteken fluoreszcens [Ca²⁺]-mérést is végeztünk. 30 mM koffein Ca²⁺-tranzienseket eredményezett mind a kontroll, mind a transzfektált sejteken (21. ábra A). Ezen koffein által kiváltott Ca²⁺-tranziensek amplitúdóinak összesített értékelése alapján az shRNS transzfekció egyértelmű, szignifikáns csökkenést eredményezett a csökkent triadin termelést produkáló sejtekben, amely alapján az SR csökkent Ca²⁺-tartalma feltételezhető (21. ábra A és C). Ezen megfigyeléssel összhangban, a transzfektált sejtekben emelkedett nyugalmi [Ca²⁺]-t tapasztaltunk Ca²⁺-mentes extracelluláris oldatban mérve: (64,9±3,3 és 85,7±6,9 nM; n = 15 és 12; kontroll és csökkentett triadin termeléssel jellemzett myotubulusok esetében). Továbbá a depolarizáció, - amit 120 mM KCl alkalmazásával értünk el - Ca²⁺-felszabadulást eredményezett az SR-ből Ca²⁺-mentes extracelluláris környezet esetében, ami azt igazolja, hogy a csökkent triadin expresszió nem módosítja az elektromechanikai kapcsolat működését (21. ábra B). Ez a megfigyelés ellentétesnek tűnik a

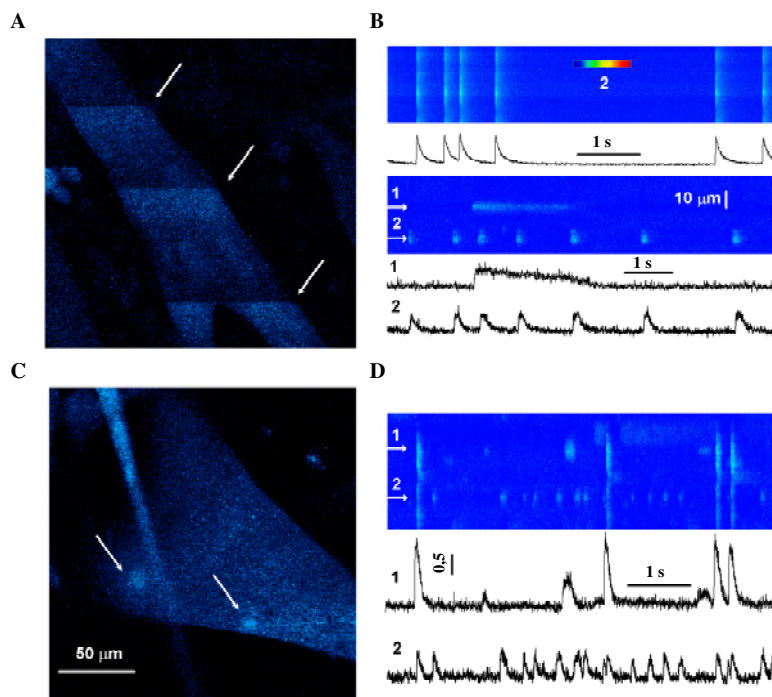
triadintúltermelő sejteknél kapott eredményekkel, azonban mégis egyértelművé teszi a látottakat az a tény, hogy a csökkentett Trisk 95 fehérje expressziójú sejtek esetén a már igazolt kisebb SR Ca^{2+} -tartalom ellenére a kontrollhoz hasonló KCl által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket mértünk (21. ábra C).



21. ábra Ca^{2+} -tranziensek kontroll és Trisk 95 shRNS-sel transzfektált patkány myotubulusokban. (A-B) 30 mM koffein (A) ill. 120 mM KCl depolarizáció (B) által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek reprezentatív görbéi. A koffein esetén normál, a KCl esetén Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatot alkalmaztunk a mérés során. (C) Az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ változások ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) összesített értékelése. A kontroll mérések scrambled shRNS-sel transzfektált primer tenyészeteken történtek. A csillag a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést mutatja ($p < 0,0004$, míg a zárójelben a vizsgált sejtek száma van feltüntetve).

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

Az egész sejten történő intracelluláris [Ca²⁺]-mérés eredményei alapján prognosztizálható volt azon feltevésünk, hogy talán a triadin overexpresszióval ellentétes hatást tapasztalunk kísérleteink során. Azon célból, hogy igazoljuk hipotézisünket spontán Ca²⁺-tranzienseket és elemi, lokális Ca²⁺-felszabadulási eseményeket vizsgáltunk a patkány, primer vázizomtenyészeteken konfokális mikroszkóp alkalmazásával. A kontroll sejteken a spontán bekövetkező, tovaterjedő tranziensek rendre megfigyelhetőek voltak, melyeket mind X-Y (22. ábra A), mind line-scan mérések során (22. ábra B) sikerült regisztrálnunk. Ezen tranziensek átlagos amplitúdója 0,62±0,05 volt (n=553, 23 myotubuluson), míg átlagos előfordulási gyakoriságuk 1,01±0,22 Hz-nek adódott.

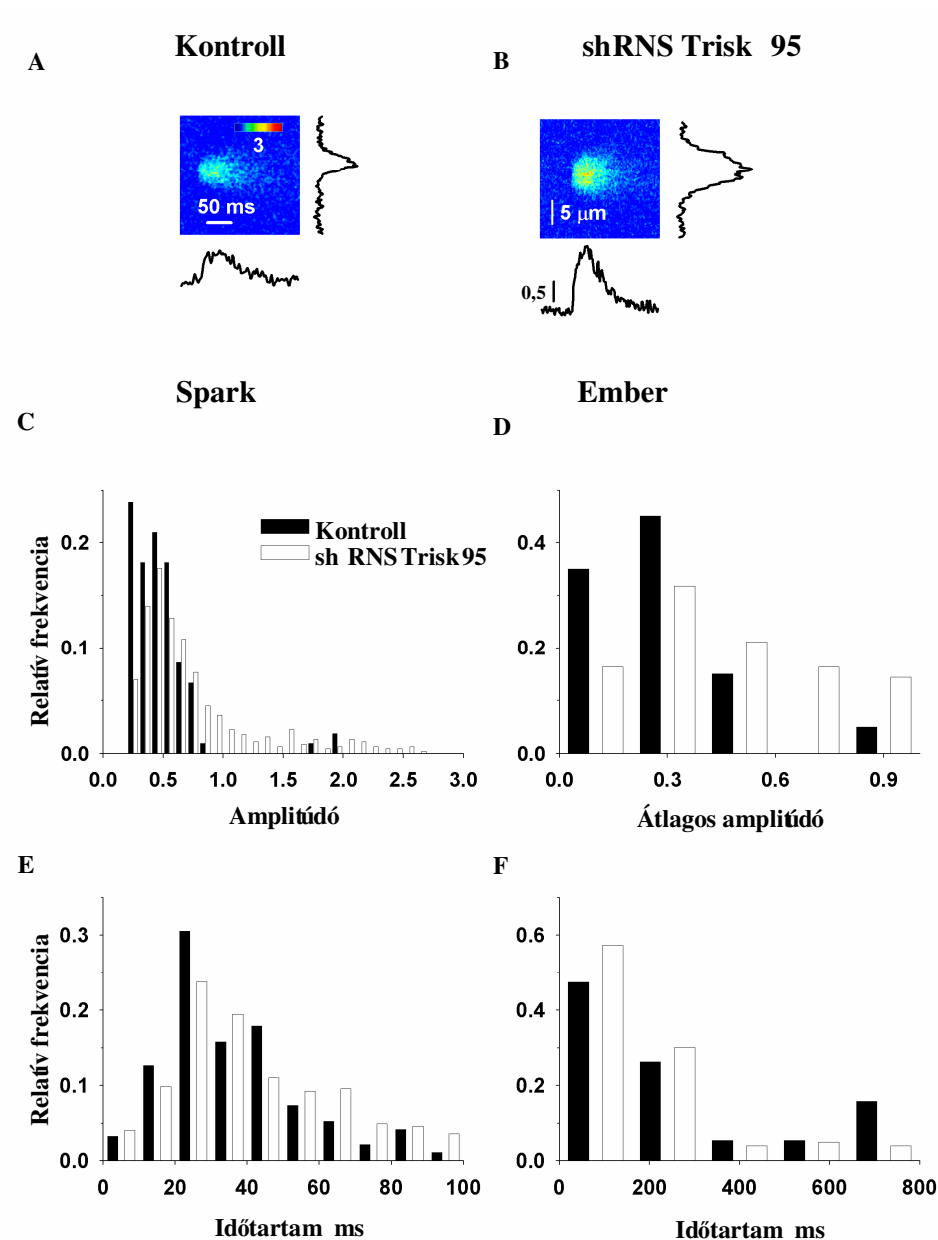


22. ábra Spontán Ca²⁺-tranziensek és Ca²⁺-felszabadulási események patkány eredetű, primer myotubulusokon. (A) Spontán Ca²⁺-tranziensek (nyilakkal jelölve) X-Y felvétele Fluo-3-mal töltött kontroll sejteken. (B) Spontán Ca²⁺-tranziensek (felső kép) és lokális Ca²⁺-események (alsó kép) line-scan felvételei patkány eredetű, primer myotubulusokon. A képek alatti görbék a Fluo-3 fluoreszcencia időbeli változását mutatják. (C) ShRNS-sel transzfektált myotubulus X-Y felvétele. A nyilak lokális, elemi Ca²⁺-felszabadulási eseményeket jeleznek. (D) Csökkent triadin 95 expresszió eredményeként kialakuló, spontán Ca²⁺-felszabadulási események. A görbék a B panelhez hasonlóan készültek.

A lokális Ca^{2+} -felszabadulási események ugyanakkor igen kis gyakorisággal fordultak elő a kontroll sejteken, és a felvett képek nagy részén (225 a 279-ből) hiányoztak ezen események (22. ábra B panel, felső kép). Bár mind sparkok, mind emberek esetenként detektálhatóak voltak (22. ábra B panel alsó kép), számuk nagyon alacsonynak bizonyult (54 képen: 143 spark és 23 ember). Ezen események átlagos frekvenciája: $0,0032 \pm 0,0019 \text{ s}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$ és $0,0024 \pm 0,0014 \text{ s}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$ volt.

A triadinexpresszió csökkentése igen drámai hatással volt a lokális, ECRE megjelenésére. A transzfektált sejteken Ca^{2+} -sparkok és emberek rendre megfigyelhetőek voltak mind X-Y felvételeken (22. ábra C), mind line-scan mérések során ($n=649$ a sparkok és $n=117$ az emberek esetén, 5 myotubuluson, 385 felvett képből 218 esetében; 22. ábra D). Nemcsak elemi Ca^{2+} -felszabadulási események, de spontán Ca^{2+} -tranziensek is jelen voltak a transzfektált sejteken (22. ábra D). Ezen események megközelítőleg ugyanolyan frekvenciával ($0,99 \pm 0,16 \text{ Hz}$; $n=888$, 20 myotubuluson), de sokkal nagyobb amplitúddal ($1,39 \pm 0,08$; $p < 0,01$) jelentek meg a kontroll sejtekhez viszonyítva (*lásd fentebb*). ECRE esetén nemcsak azok előfordulási gyakorisága, de jellemző paramétereik szintén módosultak a csökkent Trisk 95 expresszió következtében. A 23. ábra A és B részén bemutatott két tipikus Ca^{2+} -sparkot kontroll és szuppresszált triadin expresszióval rendelkező sejteken mértük.

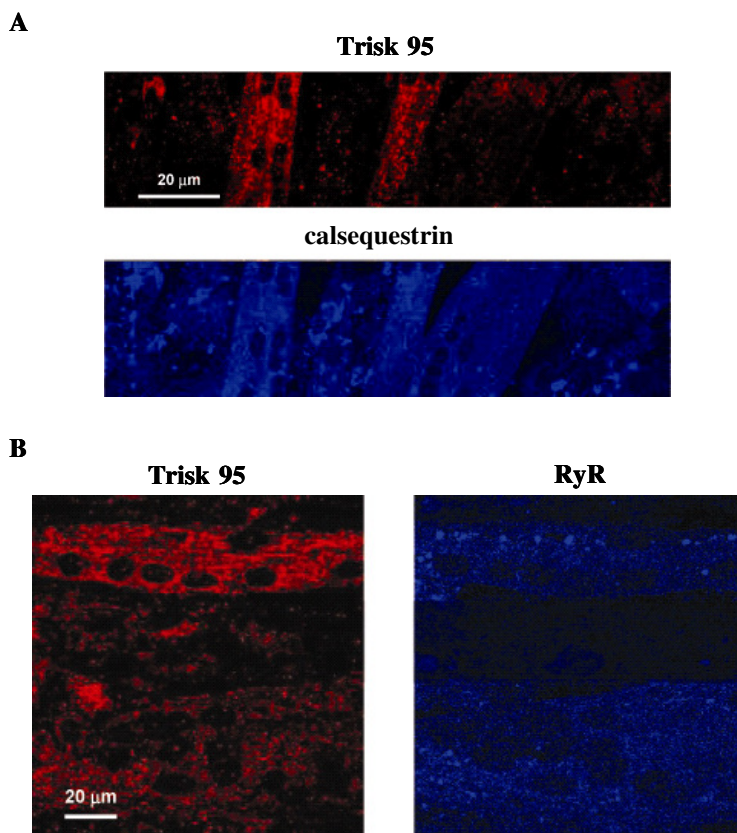
Ezen képek, valamint az amplitúdóhisztogram alapján elmondható, hogy a nagy amplitúdójú sparkok aránya jelentősen megemelkedett a csökkentett Trisk 95 expresszióval rendelkező myotubulusokban. Ebből következően az összes spark átlagának tekintetében az amplitúdó szignifikáns emelkedését tapasztaltuk a kontroll sejtekhez képest ($0,49 \pm 0,03$ a kontroll sejtekben és $0,89 \pm 0,04$ a Trisk 95 shRNS-sel transzfektált sejtekben ($p < 0,01$). Nemcsak a sparkok amplitúdója, de az emberek átlagos amplitúdója is emelkedett a kontroll sejtekhez viszonyítva ($0,27 \pm 0,05$ -ről $0,49 \pm 0,03$ -ra; $p < 0,01$; 23. ábra D). Ez főleg azon eseményeknek köszönhető, melyek 0,6-nál nagyobb amplitúddal jellemezhetőek. Ilyen intenzív eseményeket a kontroll sejteken elvértve lehetett tapasztalni, míg felnőtt rostokon hasonlókat soha nem írtak le. Másrészt sem az emberek átlagos időtartama (229 ± 33 a kontroll és $198 \pm 13 \text{ ms}$ és shRNS-sel kezelt myotubulusokban, 23. ábra F), sem a sparkok hasonló paramétere ($39,7 \pm 4,3$ és $44,0 \pm 2,5 \text{ ms}$) nem változott szignifikánsan ($p > 0,3$ és $p > 0,07$). Ugyanakkor a sparkok térbeli kiterjedése csökkent ($1,67 \pm 0,16$ -ről $1,38 \pm 0,07$ -ra; $p < 0,02$), míg a csúcs eléréséhez szükséges idő megemelkedett ($15,4 \pm 2,2$ -ről $22,0 \pm 2,9 \text{ ms}$ -ra; $p < 0,01$) a csökkentett Trisk 95 expresszió következtében.



23. ábra Ca^{2+} -sparkok paraméterei kontroll és csökkent mennyiségű Trisk 95 fehérjét expresszáló myotubulusokon. (A-B) Tipikus Ca^{2+} -sparkok kontroll (A) és Trisk 95 shRNS-sel transzfektált sejteken (B). A képek alatt és mellett elhelyezkedő görbék a fluoreszcenciaintenzitás térbeli és időbeli kiterjedését mutatják. (C) Kontroll és Trisk 95 shRNS-sel transzfektált sejteken mért sparkok amplitúdóhistrogramjai. (D) Az ember típusú Ca^{2+} -felszabadulási események átlagos amplitúdóját mutató histrogram. (E-F) A sparkok és emberek időtartam- eloszlását bemutató histrogramok.

A Trisk 95 fehérje csökkent expressziójának hatása a calsequestrin és a rianiodinreceptor megjelenésére

Munkánk következő szakaszában megvalósult a korábbi kísérleteknél leírt shRNS szekvencia siRNS expressziós vektorba klónozása, mellyel szintén sikeres expressziócsökkenést sikerült elérnünk. A klónozott vektort patkány eredetű, primer myotubulusokba transzfektáltuk, és azt vizsgáltuk, hogy a módosított Trisk 95 expresszió hatással van-e a két hozzá asszociált fehérje, a calsequestrin (24. ábra A), és a RyR (24. ábra B) termelődésére. Immuncitokémiai eredményeink alapján megállapítható volt, hogy nincs jelentős változás az említett fehérjék expressziójában.



24. ábra A Ca^{2+} -felszabadulásban szerepet játszó fehérjék immuncitokémiai vizsgálata Trisk 95 shRNS-sel transzfektált sejtekben. (A) A triadin fehérje Cy3-mal jelölt másodlagos antitesttel (piros fluoreszcencia), míg a calsequestrin AMCA Blue-val jelölt másodlagos antitesttel (kék fluoreszcencia) volt jelölve. (B) A triadin (Cy3) és a RyR (AMCA Blue) kimutatása.

Megbeszélés

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

Porcszövet – primer, HD sejtenyészetek

Az *in vitro* porcképződés egy dinamikus, soklépcsős folyamat, melynek szabályozásában többféle molekuláris mechanizmus szerepel. Az ezek többségében szerepet játszó protein kináz és foszfatáz enzimek aktiválódása és inaktíválódása fokozottan függ az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -tól. A csirke mesenchymalis HD sejtenyészetben a chondrogenikus sejtek chondroblastokká, majd érett, kerekded chondrocytákká differenciálódnak a 6-napos tenyésztési ciklus folyamán. A tenyésztés 3. napjától a chondroblastok által termelt porcspecifikus ECM termelődése indul meg. Mint arról korábbi közleményünkben beszámoltunk [14], a chondrogenikus sejtekben a tenyésztés 3. napján a citoplazmatikus, szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ átmeneti, szignifikáns emelkedést mutat. Ennek hátterében álló extracelluláris Ca^{2+} -felvétel alapvető jelentőségű a porcdifferenciálódás lezajlásában. Korábbi kísérleteinkben szintén bizonyítottuk, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak tartalmazzak felszabadítható Ca^{2+} -ot, és a SERCA gátló ciklopiazonsav (CPA) alkalmazása során a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ csak kismértékű emelkedést mutatott. Ezenkívül a RyR-és az IP_3 -receptor expresszióját is kimutattuk, azonban a RyR aktiválása nem eredményezett intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -emelkedést. Ezen eredmények alapján az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak feltehetően a sejtek nyugalmi, citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ -jának fenntartásáért felelősek [14]. Jelen munkánk során a P2X- és P2Y-ligand-vezérelt purinoreceptorok feltételezett szerepét igazoltuk a chondrogenikus sejtek Ca^{2+} -homeosztázisának szabályozásában. A purinoreceptorokról ismert, hogy embrionális szövetekben expresszálódnak [78], és feltehetően fontos szerepet játszanak az ingerlékeny, valamint a nem-ingerlékeny sejtek differenciálódási folyamataiban [79,80]. Jelenleg azonban nem állt rendelkezésre irodalmi adat a primer porcsejtek differenciálódása során, a Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásában betöltött szerepüket illetően. A tenyésztés különböző napjain egész sejten történő, fluoreszcens intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ mérést végeztünk. Ennek során ATP-t mint P2-receptor agonistát adagoltunk a Fura 2-AM-mel töltött sejtekre. A HD tenyészet sejtjein az ATP Ca^{2+} -

tranzienseket váltott ki, de ez a sejtek többségénél csak a tenyésztés 3. napján volt megfigyelhető. Ez a tenyésztés azon időszaka amikor a chondroblast differenciálódás végbemegy. Azon jelenség, miszerint a sejtek kis hányada a tenyésztés más napjain is reagált az ATP-re azzal magyarázható, hogy a HD tenyésztet sejtjei különbözhetnek a differenciálódás irányába történő elkötelezettség időbeliségét illetően. Bizonyos sejtek hamarabb, mások kicsit később érik el ezen stádiumot a tenyésztés során. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a sejtek extracelluláris Ca^{2+} -felvételéért feltehetően P2X-ionotróp purinoreceptorok lehetnek felelősek.

További kísérleteink során a metabotróp purinoreceptorok és a belső Ca^{2+} -raktárak lehetséges szerepét vizsgálva, az ATP Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban történő alkalmazása egy esetben sem eredményezett intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedést a HD tenyésztet sejtjeiben. A P2X₁-, P2X₄-, P2X₅- és P2X₇-ionotróp purinoreceptorok mellett, a P2Y₁-, P2Y₃- és P2Y₅-metabotróp purinoreceptorok mRNS-szintű, valamint a P2Y₁-, P2Y₂- és P2Y₄-fehérjeszintű expressziója is kimutatható volt a sejteken. A metabotróp P2Y₁-purinoreceptor agonista ADP és P2Y₆-agonista UDP alkalmazása szintén nem eredményezett Ca^{2+} -tranzienseket a HD tenyésztet sejtjeiben és nem indukált fokozott mátrix képződést sem. Másrészt a P2Y₂- és P2Y₄-agonista UTP adagolását követően kis amplitúdójú Ca^{2+} -tranziensek megfigyelhetőek voltak, de ezen nukleotid sem fokozta a porcmátrix termelődését a chondrogenézis folyamán.

Sejtkultúránkban a P2X-receptorok mRNS-szintű expressziója kor-függő mintázatot mutatott a tenyésztés során. Ez a purinerg szignalizáció esetleges szerepét valószínűsíti a chondrogenézisben. A P2X-receptorok differenciálódás-függő expressziója összevethető a haemopoetikus sejtvonallal leírt eredményekkel [81]. Fehérje szinten csak a P2X₁-, P2X₄-, P2X₅, és a P2X₇-receptor altípusok termelődését sikerült kimutatnunk, melyek eltérő expressziós mintázatot mutattak a teljes fehérjelizátum illetve a membránfrakció vizsgálata esetén. Ez a különbség különösen markáns volt a P2X₄-esetében, amely a membránfrakcióban a tenyésztés 3. napján jelent meg egy igen erős jellel, majd annak intenzitása a 4. és a 6. napra gyengült. A P2X₄-receptor ezen expressziós mintázata alapján feltételeztük, hogy mint ligandvezérelt Ca^{2+} -csatorna biztosítja a sejtek számára az extracelluláris Ca^{2+} -felvételét és a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ megemelkedését a primer porcdifferenciálódás során. Bár más P2X-receptorok is jelen voltak a plazmamembrán-frakcióban, a suramin jelenlétében történő ATP-adagolás nem csökkentette vagy szüntette meg a Ca^{2+} -tranzienseket. Mivel a suramin - a P2X₄-receptoron kívül – gátolja az összes, a HD tenyésztet sejtjei által expresszált P2X-receptort, feltételezhető, hogy a többi P2X-receptor altípus a bazális citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ beállításában és fenntartásában játszik szerepet.

Annak érdekében, hogy igazoljuk a P2X₄-receptor közvetlen szerepét a chondrogenézisben, extracelluláris ATP-t adagoltunk a sejtek tápfolyadékához a differenciálódás folyamán. Ez a chondrogenézis során kulcsszerepet játszó Sox9 transzkripciófaktor expressziójának növekedését eredményezte. Továbbá, az ATP-vel kezelt HD sejttenyészetekben a metakromáziás porcmátrix megemelkedett mennyiségét detektáltuk a 6-napos tenyésztési periódus végére. Ezen fokozott mátrixtermelés azonban csak abban az esetben volt kimutatható, ha az extracelluláris ATP-adagolás a 3. napon történt. Sem a differenciálódást megelőzően (2. napon), sem az azt követően (4. napon) alkalmazott ATP-hozzáadás nem eredményezett változást a HD tenyészet sejteit által termelt porcmátrix mennyiségében. Ezen megfigyelés tovább erősíti az ATP alapvető szerepét a porcképződés folyamatában, valamint az érett porc ECM-termelésének biztosításában. Annak ellenére, hogy a suramin nem szüntette meg az ATP által kiváltott Ca²⁺-tranzienseket a chondrogenikus sejtekben, ezen gátlószer jelenlétében elmaradt az ATP hatására bekövetkező fokozott metakromáziás porcmátrix termelődés. Ez a jelenség feltehetően nem a chondrogenézis gátlásaként értelmezhető, mivel a Sox9 expressziója nem csökkent suramin hatására, valamint a II-es típusú kollagén és az aggregán expressziója is változatlan maradt. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a suramin gátolja a fibroblasztokban a hyaluronsav szintézisét [82], és mivel a hyaluronsav biztosítja az aggregán magfehérjék integritását a porcmátrix-állományban ez fontos tényezőnek tekinthető a metakromáziás jelölés szempontjából. A csökkent mennyiségű hyaluronsav ugyanis az aggregán fokozott elvesztését okozhatja, ami csökkent porcmátrix-termelésre utal a metakromáziás festés során. Kísérleteinkben kimutattuk továbbá, hogy a HD tenyészet sejteit ATP-t szekretálnak a tápfolyadékba. Ezen ATP mint autokrin-parakrin mediátor szerepelhet, biztosítva az adott illetve a szomszédos sejtek differenciálódásának elősegítését. A tápoldatban mért ATP-koncentráció sokkal kisebb, mint az általunk a mátrixtermelődésre gyakorolt hatás vizsgálatokhoz alkalmazott ATP dózis. Fontos megemlíteni, hogy az ATP assay-t 20 ml tenyésztő tápoldatból végeztük, ebből adódóan a lemért tápoldat térfogata mintegy 1000-szerese magának a sejttenyészet térfogatának. Így a sejtek által szekretált ATP várhatóan sokkal nagyobb koncentrációban van jelen azok közvetlen közelében. Ennek megfelelően az általunk mért – a chondrogenikus sejtek által szekretált – ATP-koncentráció feltehetően abba a tartományba esik amelyikben, mint ligand képes aktiválni a P2X-receptorokat [83, 84]. A metabotróp purinoreceptorok tekintetében, bár az UTP mint nem-szelektív P2Y-agonista Ca²⁺-tranzienseket eredményezett, de ezen tranziensek az ATP-által kiváltott tranziensekhez hasonlítva kisebb amplitúdóval jellemezhetőek, másrészt a tenyésztőtápoldathoz adagolt P2Y-agonisták egyike sem

módosította a porcmátrix-termelődést. Feltételezésünk szerint a metabotróp purinoreceptorok – a Ca^{2+} -raktárak szabályozása révén – a bazális, citoszólikus $[\text{Ca}^{2+}]$ fenntartásáért lehetnek felelősek.

Végezetül, eredményeink bizonyítékot szolgáltatottak a porcfejlődés során nagy valószínűséggel fontos szerepet játszó purinerg szabályozás működésére és arra nézve, hogy a purinoreceptorok a HD primer porctenyészet Ca^{2+} -„eszköztárának” tagjaiként, alapvető szereppel bírnak a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ szabályozásában, beállításában a porc differenciálódása során.

Vázizomszövet - *in vitro* vázizomtenyészetek

A triadin egy az SR membránban található integráns fehérje, melyről kimutatták, hogy kapcsolatban áll mind a rianodinreceptorral, mind az SR lumenben működő Ca^{2+} -kötő fehérjével, a calsequestrinnel. Ez valószínűleg egy funkcionális tri-, vagy tetra-molekuláris komplex, mivel feltehetően a junctin fehérje is részét képezi ezen egymást kiegészítő és szabályozó fehérjestruktúrának [85, 86]. Ezen szoros kölcsönhatás következtében feltételezhető, hogy a triadin befolyásolja a RyR működését, közvetítve felé a lumináris $[\text{Ca}^{2+}]$ változásait. A triadin túltermelés hatásáról már korábban leírták, hogy csökkenti a Ca^{2+} -tranzienseket *in vitro* patkány myotubulusokban [77]. Nincs azonban információ arra vonatkozóan, hogy a triadin túltermelés módosítja-e a lokalizált, elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket, a RyR megváltozott működésének következtében. Hasonlóan, nincs irodalmi közlemény annak tekintetében, hogy a triadinexpresszió átmeneti csökkentése hatással van-e az ECRE-re és a Ca^{2+} -tranziensekre. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a Trisk 95 fehérje túltermelődése, valamint annak csökkent expressziója is hatással van mind a Ca^{2+} -tranziensekre, mind a lokalizált, elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményekre tenyésztett vázizomsejtekben. A kapott eredmények ellentétes irányú változásokat tükröznek, ami alátámasztja a Trisk 95 feltételezhető szerepét a RyR működésének szabályozásában. Triadin túltermelés esetén mind a spontán, mind a depolarizáció-indukált Ca^{2+} -tranziensek amplitúdói csökkentek, valamint az ECRE-k száma és azok amplitúdója is kisebb lett. A triadinfehérje transzlációjának csökkentése ugyanakkor a Ca^{2+} -tranziensek és az elemi események amplitúdóinak emelkedését eredményezte. Ezen eredmények alapján, miszerint az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulást a nagyobb mértékű triadin expresszió visszafogta, illetve a csökkent mennyiségű triadin esetében következetesen ellentétes hatást tapasztaltunk, feltételezhető, hogy a triadin fehérje *in situ* negatív szabályozó hatást gyakorol a RyR működésére/megnyílására.

Ca²⁺-tranziensek myotubulusokban a triadinexpresszió módosítását követően

A Trisk 95 expresszió módosítását követően az egész sejten kialakuló Ca²⁺-tranziensek megváltozását tapasztaltuk, függetlenül attól, hogy ezek KCl által kiváltott depolarizáció, vagy spontán illetve feszültség hatására kiváltott akciós potenciálok révén keletkeztek. Az itt bemutatott, illetve korábban már megjelent irodalmi adatok alapján [77, 87], elmondható, hogy a Trisk 95 overexpresszió csökkenti a depolarizáció által kiváltott Ca²⁺-tranzienseket. Meg kell említeni azonban, hogy extracelluláris Ca²⁺ jelenlétében csak az akciós potenciál által kiváltott Ca²⁺-tranziensek csökkentek, míg a 120 mM KCl alkalmazásával előidézett Ca²⁺-felszabadulás nem módosult. Ezen ellentmondásos megfigyelésnek két lehetséges magyarázata lehet. Elsőként említhető, hogy az extracelluláris Ca²⁺-beáramlás nagymértékben hozzájárul az intracelluláris [Ca²⁺] változásához viszonylag hosszantartó depolarizáció esetén. Bár ez felveti a myotubulusokon lassan aktiválódó L-típusú Ca²⁺-áram jelenlétét [88], számításokkal igazolható, hogy az ennek során a citoplazmába bekerülő Ca²⁺-mennyiség nem elegendő a fenti jelenség magyarázatához [89]. A másik, és sokkal valószínűbb lehetőség, hogy az L-típusú Ca²⁺-csatornákon belépő Ca²⁺ aktiválja a RyR-okat, és ez a Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulás elfedi a triadin overexpresszió következtében létrejövő gátló hatást. Ugyanakkor az akciós potenciálok által kiváltott Ca²⁺-tranziensek csökkenését is magyarázhatja ezen jelenség, hiszen az akciós potenciál időtartama túl rövid ahhoz, hogy az említett Ca²⁺-belépés megtörténhessen. Szintén meg kell említenünk, hogy az akciós potenciál által kiváltott Ca²⁺-tranziensek esetén a Ca²⁺-felszabadulás módosulása lehet magának az akciós potenciál megváltozásának következménye is. Bár van bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a Trisk 95 kapcsolatban áll a felszíni membrán ioncsatornáival (lásd lentebb), vázizomban nem valószínűsíthető a Trisk 95, valamint az akciós potenciál kialakulásáért felelős Na⁺-illetve K⁺-csatornák közötti kölcsönhatás. Viszonylag új kutatási adatok állnak rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a csökkent triadinexpresszió hogyan hat a Ca²⁺-tranziensekre, ezen adatok „knock-out” állatok vizsgálataiból származnak [90]. Ezekben az egerekben mind a nagyobb, 95 és 60 kDa triadin izoformák, mind a kisebb molekulásúlyú 40 és 35 kDa típusok hiányoztak. Ezen állatok nem mutattak ugyan egyértelmű fenotípusos eltéréseket, de a vázizomban megemelkedett nyugalmi [Ca²⁺] volt megfigyelhető, és mind az SR Ca²⁺-tartalma, mind a koffein, mind a KCl okozta depolarizáció által kiváltott Ca²⁺-tranziensek csökkentek. Érdekes megfigyelés volt továbbá, hogy a triád bizonyos fehérjéinek (junctin, junctophilin, calsequestrin) expressziója csökkent a felnőtt állatok ú.n. gyors izmaiban, míg az állatok szatellitesejtjeiből differenciáltatott myotubulusokban ez a változás nem volt detektálható. Laboratóriumunkban

az shRNS transzfekciót követő vizsgálataink szerint emelkedett nyugalmi, citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ -t és csökkent koffeinválaszt detektáltunk a csökkentett Trisk 95 expresszióval rendelkező sejtekben, mely eredmények alapvetően megegyeznek a Shen és munkatársai [90] által közöltekkel. Hasonlóan, sejteken megfigyelt, agonista által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulás csökkenéséről számoltak be Goonasekera és munkatársai is a RyR és triadin kapcsolat megszakítását követő kísérleteikben [91]. Másrészről, mi nem találtunk különbséget a KCl depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket illetően, a kontroll és csökkentett triadin expressziót produkáló sejteket összehasonlítva. Mindez annak ellenére volt megfigyelhető, hogy előzőleg csökkent koffeinválaszt detektáltunk, feltehetően az SR csökkent Ca^{2+} -tartalma következtében. Ennek magyarázata az lehet, hogy míg az említett munkacsoportok kísérleteiben a RyR és triadin kapcsolat teljesen hiányzott, a mi vizsgálatainkban a két fehérje közti kölcsönhatás csak csökkent a kisebb mértékű triadinexpresszió következtében. Ebből adódóan az SR Ca^{2+} -tartalma is feltehetően kisebb mértékben csökkent az általunk vizsgált sejtekben. A háttérben valószínűleg a részleges triadin hiány miatt bekövetkező, fokozott RyR aktivitás szerepel. Mindezek mellett a megváltozott triadinexpresszió következtében nemcsak a spontán Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója, de azok előfordulási gyakorisága is módosult; nevezetesen a csökkent expresszió növelte, míg a fokozott triadinexpresszió csökkentette a frekvenciáját ezen eseményeknek. Jelenleg nincs bizonyíték arra vonatkozóan, hogy vajon a triadin fehérje módosíthatja-e a felszíni membrán ingerlékenységét, de több közlemény alapján a triadin a felszíni membrán ioncsatornához is kapcsolódhat. Feltehetően kapcsolat van a triadin és a DHPR között, amely mintegy strukturális és funkcionális összeköttetést jelent a T-tubulus és az SR között [51]. Továbbá valószínűsíthető, hogy a triadin fehérje részt vesz a Ca^{2+} -raktárak által vezérelt Ca^{2+} -belépésben is (SOCE) [92], mely egy funkcionális kapcsolatot feltételez a tranziens receptor potenciál csatornák (TRPC), a RyR és a Trisk 95 fehérjék között [93].

Lokalizált, elemi Ca^{2+} -felszabadulási események a triadinexpresszió módosítását követően

Mostanáig nem állt rendelkezésre olyan irodalmi adat amely a módosított triadinexpresszió lokalizált, elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményekre kifejtett hatásáról számolna be, azonban a triadin fehérje lipid bilayerbe épített RyR-hoz történő hozzákapcsolása a csatorna nyitási valószínűségének csökkenését eredményezte [94]. Ezen megfigyelés alapján várható, hogy a triadin az egész sejtre kiterjedő Ca^{2+} -tranziensekhez hasonlóan az ECRE-t is csökkenti, illetve gátolja. Eredményeink alapján a Trisk 95 overexpressziót követően az elemi Ca^{2+} -felszabadulási események előfordulási gyakorisága

csökkent, míg gátolt triadinexpresszió esetén ugyanezen paraméter emelkedett. Nemcsak ezen események gyakoriságára, de azok átlagos amplitúdójára és térbeli paramétereire szintén hatással volt a triadinexpresszió módosítása. A triadint overexpresszáló sejtekben a sparkok kisebbek voltak mind amplitúdó, mind FWHM tekintetében, ami arra utal, hogy az adott esemény létrehozásáért felelős csatornák száma csökkent ezen sejtekben. Ugyanakkor az emberek jellemző paraméterei változatlanok maradtak a kontroll sejtekhez hasonlítva. A csökkent Trisk 95 expresszió következtében, az előzőekkel ellentétben, a sparkok előfordulási gyakorisága és amplitúdója is emelkedett, jelezve azt, hogy több csatorna megnyílása eredményezte az adott eseményt. Megfigyelhető volt továbbá, hogy 0,6-nél nagyobb amplitúdójú emberek jelentek meg a csökkent triadin termelés következtében. Ennek hátterében vagy a csatornák megnövekedett vezetőképessége, vagy az esemény során nyitva levő csatornák nagyobb száma állhat. Ezen magyarázatok közül a csatornák számának változása tűnik a legvalószínűbbnek, mivel a RyR, triadin kötést érintő mutációja esetén a csatorna vezetőképessége nem változott a lipid bilayer kísérletek során [91]. A közelmúltban megjelent irodalmi adatok alapján felvetődik a 3-as típusú RyR (RyR₃), valamint az IP₃ szerepe a lokalizált, elemi Ca²⁺-felszabadulási események kialakításában [69]. Adódik a kérdés, vajon a mi eredményeinkkel összefüggésbe hozható-e ezen receptorok szerepe. A Trisk 95 és az IP₃-receptor sejten belüli lokalizációja eltérő. A Trisk 95 pontozott megjelenést mutat és junctionális, triáddhoz kapcsolódó elhelyezkedés jellemzi. Ezzel szemben az IP₃-receptorok diffúzabb megjelenést mutatnak és a triadin másik, 32 kDa tömegű izoformájával kapcsolódnak [57]. Bár a RyR₃ triád-specifikus elhelyezkedésű, azonban kapcsolata a Trisk 95-tel ezidáig nem bizonyított. Végezetül érdekes lehet azon lehetőségek vizsgálata, hogy a Trisk 95 expresszió módosítása következtében más, a Ca²⁺-felszabadulásban érintett fehérjék (RyR, calsequestrin) mennyisége változik-e, és ezáltal az általunk tapasztalt változásokat magyarázhatja-e. Ennek érdekében megvizsgáltuk ezen fehérjék expressziós szintjét, és nem találtunk eltérést azok mennyiségében a csökkent triadintermelés következtében. Ezt a megfigyelésünket megerősíti Perez és munkatársai által közölt eredmény, akik azt igazolták, hogy sem a RyR₁, sem a RyR₃ túltermelése nem befolyásolta a triadin expresszióját [95].

Összefoglalás

Porcszövet – primer, HD sejtenyészetek

Mint azt előző közleményünkben ismertettük, a szabad citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ megemelkedése a primer kondrogenikus sejtek differenciálódása során, Ca^{2+} -beáramlás következménye és ezen jelenség alapvetően fontos a csirke mesenchymalis HD sejtenyészetek porccá történő differenciálódásában. Jelen munkánkban igazoltuk, a chondrogenikus sejtek differenciálódás során történő ATP szekrécióját. ATP adagolása a sejteken Ca^{2+} -tranzienseket váltott ki extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében, mely csak a tenyésztés 3. napján volt megfigyelhető, amikor a chondroblastok végleges elkötelezettsége megtörténik. Ezen túlmenően az ATP-nek a sejtek tápoldatához történő hozzáadása következtében fokozódott a chondrogenikus transzkripciós faktor (Sox9) expressziója, valamint az extracelluláris porcmátrix termelődése. A suramin alkalmazása, amely gátolja az összes P2X-receptort, - a P2X₄-kivételével - nem védte ki az ATP hatását, ezenkívül a P2X₄- a 3. napon megjelent a plazmamembrán frakcióban és ugyanezen napon erős pozitivitást mutatott immuncitokémiai jelöléssel is. Bár P2X₁-, P2X₄-, P2X₅- és P2X₇-típusú ionotróp purinoreceptorok mellett, a P2Y₁-, P2Y₃- és P2Y₅- metabotróp purinoreceptorok mRNS-szintű, valamint a P2Y₁-, P2Y₂- és P2Y₄- fehérjeszintű expressziója is kimutatható volt a sejteken. A metabotróp P2Y₁-purinoreceptor agonista ADP és P2Y₆- agonista UDP alkalmazása szintén nem eredményezett Ca^{2+} -tranzienseket a HD tenyészetek sejtjeiben és nem indukált fokozott mátrix képződést sem. Másrészt a P2Y₂- és P2Y₄- agonista UTP adagolását követően kis amplitúdójú Ca^{2+} -tranziensek megfigyelhetőek voltak, de ezen nukleotid sem fokozta a porcmátrix termelődését a chondrogenézis folyamán.. Mindezen adatok alapján feltételezzük a P2X₄ receptor szerepét az ATP-függő intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedésben a primer chondroblast-differenciálódás során.

Vázizomszövet - *in vitro* vázizomtenyészetek

Bár a triadin-nak a Ca^{2+} -homeosztázisban betöltött szerepét napjainkban többen tanulmányozzák, nem áll rendelkezésre irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy a Trisk 95 fehérje túltermelése, illetve expressziójának csökkentése vagy gátlása milyen hatással van a lokális, elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményekre. Jelen munkánkban az ECRE-t és a Ca^{2+} -tranzienseket tanulmányoztuk konfokális lézer mikroszkóp segítségével C2C12 izomsejteken és primer vázizomtenyészeteken. Liposzóma és adenovírus mediált overexpressziót, valamint RNS-interferencia módszert alkalmaztunk a Trisk 95 fehérje expressziójának módosítására. A

stabil overexpresszió csökkentette mind a Ca^{2+} sparkok amplitúdóját és frekvenciáját, mind a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket C2C12 sejtekben. Ehhez hasonlóan, a Trisk 95 adenovírus mediált overexpresszióját követően csökkent a spontán, egész sejtre kiterjedő Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és előfordulási gyakorisága is. Ugyanakkor az endogén triadinexpresszió shRNS-el történő gátlása ellentétes változásokat eredményezett. Kontroll, endogén Trisk 95-öt expresszáló patkány, primer vázizomtenyészetekben rendre megfigyelhetőek voltak spontán Ca^{2+} -tranziensek, viszont ezen tenyészetek sparkokat csak kis gyakorisággal generálnak. Az shRNS transzfekciót követően a Trisk 95-specifikus immunpozitivitás jelentősen csökkent. Ezen sejteken történő funkcionális mérések alapján a koffeinnel kiváltott Ca^{2+} -tranziensek jellemzően csökkentek, ugyanakkor az ECRE-k jelentősen nagyobb gyakoriságot mutattak. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a Trisk 95 fehérje negatívan szabályozza a RyR működését, azáltal, hogy csökkenti a lokalizált, elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket, valamint a globális Ca^{2+} -tranzienseket vázizomtenyészetekben.

Summary

Primary, HD cultures

In vitro chondrogenesis is a dynamic, multistep process regulated by a variety of molecular processes, many of which involve activation and deactivation of protein kinases and phosphatases sensitive to changes of intracellular $[Ca^{2+}]$. In chicken HD mesenchymal cell cultures, chondrogenic mesenchymal cells differentiate into chondroblasts and then to chondrocytes during a 6-day-long culturing period. The majority of chondroblasts, characterised by the ability of production of a cartilage specific ECM, appear from culturing day 3. We have previously demonstrated that elevation of free cytosolic $[Ca^{2+}]$ at the time of differentiation of chondroblasts was mainly due to a Ca^{2+} -influx and it was indispensable to cartilage formation in chicken HD mesenchymal cell cultures. In the present work we describe, that chondrogenic cells secreted ATP during the differentiation period. Administration of ATP to the culture medium evoked Ca^{2+} -transients exclusively in the presence of extracellular Ca^{2+} and mostly on day 3 of culturing, when the final commitment of chondroblasts occurs. Moreover, ATP caused elevated protein expression of the chondrogenic transcription factor Sox9 and ATP also stimulated cartilage matrix production. Administration of suramin, which blocks all P2X receptors but not P2X₄ did not impede the effects of ATP, furthermore, P2X₄ appeared in the plasma membrane fraction and gave signals with immunocytochemistry only from day 3. Expressions of both ionotropic purinergic receptors P2X₁, P2X₄, P2X₅ and P2X₇ and metabotropic purinergic receptors P2Y₁, P2Y₃ and P2Y₅ at the mRNA level and P2Y₁, P2Y₂ and P2Y₄ at the protein level were detected. Among the agonists of the metabotropic receptors, ADP and UDP did not evoke any Ca^{2+} -transients in HDC and had no influence on cartilage formation. On the other hand administration of UTP resulted in transient elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration in 3-day-old HDC but did not stimulate matrix production during the chondrogenesis. Based on these data, we suggest a role of P2X₄ in the generation of ATP-dependent Ca^{2+} -transients of differentiating chondroblasts.

Skeletal muscle cultures

The 95 kDa triadin (Trisk 95), an integral protein of the sarcoplasmic reticulum membrane in skeletal muscle, interacts with both the ryanodine receptor (RyR) and calsequestrin. While its role in the regulation of Ca^{2+} -homeostasis has been extensively studied, data is not available on whether the overexpression or the interference with the expression of Trisk 95 would affect Ca^{2+} sparks the localized, elementary Ca^{2+} -release events (ECRE). In the present study ECRE and Ca^{2+} -transients were studied using laser scanning

confocal microscopy on C2C12 cells and on primary cultures of skeletal muscle. Liposome or adenovirus-mediated Trisk 95 overexpression and shRNA interference with triadin translation were used to modify the level of the protein. Stable overexpression in C2C12 cells significantly decreased the amplitude and frequency of Ca^{2+} sparks, and the frequency of embers. In line with these observations, depolarisation-evoked Ca^{2+} -transients were also suppressed. Similarly, adenoviral transfection of Trisk 95 into cultured mouse skeletal muscle cells significantly decreased both the frequency and amplitude of spontaneous global Ca^{2+} -transients. Inhibition of endogenous triadin expression by RNA interference caused opposite effects. Primary cultures of rat skeletal muscle cells expressing endogenous Trisk 95 readily generated spontaneous Ca^{2+} -transients but rarely produced Ca^{2+} sparks. Their transfection with specific shRNA sequence significantly reduced the triadin-specific immunoreactivity. Functional experiments on these cells revealed that while caffeine-evoked Ca^{2+} -transients were reduced, ECRE appeared with higher frequency. These results suggest that Trisk 95 negatively regulates RyR function by suppressing localized Ca^{2+} -release events and global Ca^{2+} - signals in cultured muscle cells.

Irodalomjegyzék

- [1] T.W. Sadler, Langman's: Medical Embriology, Lippincott Williams-Wilkins, (2004).
- [2] Röhlich Pál: Szövettan Budapest (1999).
- [3] Hangody L, Vásárhelyi G, Hangody LR, Sükösd Z, Tibay G, Bartha L, Bodó G.: Autologous osteochondral grafting–technique and long-term results. Injury. (2008); 39 Suppl 1:S32–9.
- [4] Hamburger V., Hamilton H.L.: A series of normal stages in the development of the chick Embryo. Dev. Dyn. (1992) **195**, 231–272.
- [5] Ahrens P.B., Solursh M., Reiter R.S.: Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. Dev. Biol. (1977) **60**, 69–82.
- [6] Hadhazy C., Lazlo M.B., Kostenszky K.S.: Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds. Acta Morphol. Acad. Sci. Hung. (1982) **30**, 65–78.
- [7] H.E.Young, M.L.Mancini, R.P.Wright, J.C.Smith, A.C.Black, Jr., C.R.Reagan, P.A.Lucas: Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs Dev.Dyn. (1995) **202**,137-144.
- [8] C.M.Shea, C.M.Edgar, T.A.Einhorn, L.C.Gerstenfeld: BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis J.Cell Biochem. (2003) **90**, 1112-1127.
- [9] A.E.Grigoriadis, J.N.Heersche, J.E.Aubin: Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone J.Cell Biol. (1988) **106**, 2139-2151.
- [10] Chang S.H., Oh C.D., Yang M.S., Kang S.S., Lee Y.S., Sonn J.K., Chun J.S.: Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signaling, J. Biol. Chem. (1998) **273**, 1921–19219.
- [11] Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT.: Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. Dev Dyn. (1999) **215**, 69–78.
- [12] Pizette S, Niswander L.: BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. Dev Biol. (2000) 15;**219**, 237–49.
- [13] Zákány R, Szíjgyártó Z, Matta C, Juhász T, Csontos C, Szucs K, Czifra G, Bíró T, Módis L, Gergely P.: Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways. Exp Cell Res. (2005) 15;**305**, 190–9.

- [14] Matta C, Fodor J, Szígyártó Z, Juhász T, Gergely P, Csernoch L, Zákány R.: Cytosolic free Ca^{2+} concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: A possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium*. (2008) **19**.
- [15] San Antonio J.D., Tuan R.S.: Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations, *Dev. Biol.* (1986) **115**, 313–324.
- [16] Widelitz RB, Jiang TX, Murray BA, Chuong CM.: Adhesion molecules in skeletogenesis:II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J Cell Physiol*. (1993) **156**, 399–411
- [17] Oberlender SA, Tuan RS.: Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun*. (1994) **2**, 521–37.
- [18] Kelley RO, Fallon JF.: Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud. *J Embryol Exp Morphol*. (1978) **46**, 99–110.
- [19] Kulyk WM, Rodgers BJ, Greer K, Koshier RA.: Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev Biol*. (1989) **135**, 424–30.
- [20] Leonard CM, Fuld HM, Frenz DA, Downie SA, Massagué J, Newman SA.: Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev Biol*. (1991) **145**, 99–109.
- [21] Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P.: The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*. (1995) **9**, 15-20.
- [22] Biddulph DM, Dozier MM, Capehart AA.: Inhibition of prostaglandin synthesis reduces cyclic AMP levels and inhibits chondrogenesis in cultured chick limb mesenchyme. *Methods Cell Sci*. (2000) **22**, 9–16.
- [23] Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B.: SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*. (1997) **17**, 2336–46.
- [24] de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W.: Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*. (2000) **19**, 389–94.
- [25] Y.S.Lee, C.M.Chuong: Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis *J.Cell Physiol*. (1997) **170**, 153-165.
- [26] Choi, B., Chun, J. S., Lee, Y. S., Sonn, J. K., Kang, S. S.: Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. (1995) **216**, 1034–1040.

- [27] Zákány R, Szucs K, Bakó E, Felszeghy S, Czifra G, Bíró T, Módis L, Gergely P.: Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res.* (2002) **15**;275, 1–8.
- [28] Haneda, M., Sugimoto, T. and Kikkawa, R.: Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *European Journal of Pharmacology* (1999) **365**, 1–7.
- [29] L.A.Stanton, T.M.Underhill, F.Beier: MAP kinases in chondrocyte differentiation *Dev.Biol.* (2003) **263**, 165-175.
- [30] Bakondi E., Gonczi M., Szabo E., Bai P., Pacher P., Gergely P., Kovacs L., Hunyadi J., Szabo C., Csernoch L., Virag L.: Role of intracellular calcium mobilization and cell density-dependent signaling in oxidative-stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes, *J. Invest Dermatol.* (2003) **121**, 88–95.
- [31] Jorgensen N.R., Geist S.T., Civitelli R., Steinberg T.H.: ATP- and gap junction dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells, *J. Cell Biol.* (1997) **139**, 497–506.
- [32] C.W.Taylor, P.C.da Fonseca, E.P.Morris: IP(3) receptors: the search for structure *Trends Biochem.Sci.* (2004) **29**, 210-219.
- [33] D.M.Salter, M.O.Wright, S.J.Millward-Sadler: NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction *Biorheology* (2004) **41**, 273-281.
- [34] F.Soto, M.Garcia-Guzman, W.Stuhmer: Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors) *J.Membr.Biol.* (1997) **160**, 91-100.
- [35] Tatur S, Groulx N, Orlov SN, Grygorczyk R.: Ca²⁺-dependent ATP release from A549 cells involves synergistic autocrine stimulation by coreleased uridine nucleotides. *J Physiol.* (2007) **584**, 419–35.
- [36] Tschöp J, Braun GS, Borscheid R, Horster MF, Huber SM.: Ontogeny of purinergic receptor-regulated Ca²⁺ signaling in mouse cortical collecting duct epithelium. *Cell Physiol Biochem.* (2002) **12**, 75–82.
- [37] Ralevic V, Burnstock G.: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* (1998) **50**, 413–92.
- [38] Bishoff R., Holtzer H.: Inhibition of myoblast fusion after one round of DNA synthesis in 5- bromodeoxyuridine. *J Cell Biol.* (1970) **44**, 134-50
- [39] Asakura A, Kumaki M, Rudnicki M.: Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation.* (2001) **68**, 245-53.
- [40] Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard: J.Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther.* (2007) **15**, 867-77.

- [41] Fonyó Attila: Az orvosi élettan tankönyve Budapest (1999).
- [42] Yaffe D, Saxel O.: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. (1977) 22-29;**270**(5639):725-7.
- [43] David JD, See WM, Higginbotham CA.: Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: role of calcium influx preceding membrane union. *Dev Biol*. (1981) **82**, 297-307.
- [44] Murayama T., Ogawa Y.: Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med*. (2002) **12**, 305-11.
- [45] Fill M., Copello A. J.: Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev*. (2002) **82**, 893-922.
- [46] Hamilton S. L.: Ryanodine receptors. *Cell Calcium* (2005) **38**, 253-260.
- [47] Rossi D. & Sorrentino V.: Molecular genetics of ryanodine receptors Ca^{2+} release channels. *Cell Calcium* (2002) **32**, 307-319.
- [48] Meissner G.: Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol*. (1994) **56**, 485-508.
- [49] Zucchi R., Ronca-Testoni, S.: The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev*. (1997) **49**, 1-51.
- [50] Brandt NR., Caswell AH., Wen SR. & Talvenheimo JA.: Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J. Membr Biol* (1990) **113**, 237-251.
- [51] Caswell AH., Brandt NR., Brunschwig JP. & Purkerson S.: Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* (1991) **30**, 7507-7513.
- [52] Marty I., Thevenon D., Scotto C., Groh S., Sainnier S., Robert M., Grunwald D., Villaz M.: Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem*. (2000) **275**, 8206-12.
- [53] Marty I.: Triadin: a multi-protein family for which purpose? *Cell Mol Life Sci*. (2004) **61**, 1850-3.
- [54] Kobayashi Y., M., Alseikhan B. A., Jones L.R.: Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem*. (2000) **275**, 17639-46.
- [55] Lee, J.M., Rho S.H., Shin D.W., Cho C., Park W. J., Eom S. H., Ma J., Kim D. H.: Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of the ryanodine receptor are involved in the interaction with triadin. *J Biol Chem*. (2004) **279**, 6994-7000.

- [56] Guo W., Campbell K.P.: Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of sarcoplasmic reticulum, *J Biol Chem.* (1995) **270**, 9027-30.
- [57] Vassilopoulos S.,Thevenon D., Rezqui S.S., Brocard J.,Chapel A., Lacampagne A., Lunardi J., Dewaard M., Marty I.: Triadins are not triad specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* (2005) **280**, 28601-9.
- [58] Thevenon D.,Smida-rezqui S., Chevessier F., Groh S., Henry-Berger J., Beatriz Romero N., Villaz M., DeWaard M., Marty I.: Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform,Trisk 51. *Biochem Biophys Res Commun.* (2003) **303**, 669-75.
- [59] Terentyev D., Cala S.E., Houle T. D., Viatchenko-Karpinski S., Gyorke I.,Terentyeva R.,Williams S.C.,Gyorke S.: Triadin overexpression stimulates excitation-contraction coupling and increases predisposition to cellular arrhythmia in cardiac myocytes. *Circ. Res.* (2005) **96**, 651-8.
- [60] M.J.Berridge, M.D.Bootman, H.L.Roderick: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* (2003) **4**, 517-529.
- [61] Tsugorka A, Ríos E & Blatter LA.: Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* (1995) **269**, 1723-1726.
- [62] Klein MG, Cheng H, Santana LF, Jang YH, Lederer WJ., & Schneider MF.: Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* (1996) **379**, 455-458.
- [63] Gonzalez A, KirschWG, Shirokova N, Pizarro G, Stern MD & Rios E.: The sparks and its ember: separately gated local components of Ca²⁺ release in skeletal muscle. *J Gen Physiol* (2000) **115**, 139-157.
- [64] Kirsch WG, Uttenweiler D & Fink RH.: Spark- and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J Physiol* (2001) **537**, 379-389.
- [65] Chun LG., Ward CW & Schneider MF.: Ca²⁺ sparks are initiated by Ca²⁺ entry in embryonic mouse skeletal muscle and decrease in frequency postnatally. *Am J Physiol Cell Physiol* (2003) **285**, 686-C697.
- [66] Shirokova N., Garcia J & Rios E.: Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* (1998) **512**, 377-384.
- [67] Zhou J, Brum G, Gonzalez A, Launikonis BS, Stern MD & Rios E.: Ca²⁺ sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J Gen Physiol* (2003) **122**, 95-114.
- [68] Zhou J, Yi J, Royer L, Launikonis BS, Gonzalez A, Garcia J & Rios E.: A probable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca²⁺ sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006) **290**, C539-C553.

- [69] Pouvreau S., Royer L., Yi J., Brum G., Meissner G., Rios E., Zhou J.: Ca²⁺ sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* (2007) **104**, 5235-40.
- [70] Rios E., Launikonis B. S., Royer L., Brum G., Zhou J.: The elusive role of store depletion in the control of intracellular calcium release. *J Muscle Res Cell Motil.* (2006) **27**, 337-50.
- [71] Szentesi P, Szappanos H, Szegedi C, Gönczi M, Jona I, Cseri J, Kovács L & Csernoch L.: Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. *Biophys J* (2004) **86**, 1436-1453.
- [72] Ryten M, Hoebertz A, Burnstock G.: Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle. *Dev Dyn.* (2001) **221**, 331-4.
- [73] Xiang Z, Burnstock G.: Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia.* (2005) **52**, 119-26.
- [74] E.M. August, K.L. Duncan, N.M. Malinowski, R.L. Csyk.: Inhibition of fibroblast hyaluronic acid production by suramin, *Oncol. Res.* (1993) **5**, 415-422.
- [75] A.L. Taylor, B.A. Kudlow, K.L. Marrs, D.C. Gruenert, W.B. Guggino, E.M. Schwiebert.: Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia, *Am.J.Physiol* (1998) **275**, 1391-C1406.
- [76] M. Koolpe, J.J. Rodrigo, H.P. Benton.: Adenosine 5'-triphosphate, uridine 5'-triphosphate, bradykinin, and lysophosphatidic acid induce different patterns of calcium responses by human articular chondrocytes, *J. Orthop. Res.* (1998) **16**, 217-226.
- [77] Rezgui SS, Vassilopoulos S, Brocard J, Platel JC, Bouron A, Arnoult C, Oddoux S, Garcia L, De Waard M, Marty I.: Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem.* (2005) **280**, (47)39302-8.
- [78] V.H. Roberts, L.H. Waters, T. Powell, Purinergic receptor expression and activation in first trimester and term human placenta, *Placenta* (2007) **28**, 339-347.
- [79] P. Majumder, C.A. Trujillo, C.G. Lopes, R.R. Resende, K.N. Gomes, K.K. Yuahasi, L.R. Britto, H. Ulrich: New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders, *Purinergic. Signal.* (2007) **3**, 317-331.
- [80] K. Inoue, M. Denda, H. Tozaki, K. Fujishita, S. Koizumi, K. Inoue: Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes, *J. Invest Dermatol.* (2005) **124**, 756-763.
- [81] M.K. Bernhard, K. Ulrich: RT-PCR study of purinergic P2 receptors in hematopoietic cell lines, *Biochemistry (Mosc.)* (2006) **71**, 607-611.
- [82] E.M. August, K.L. Duncan, N.M. Malinowski, R.L.: Csyk, Inhibition of fibroblast hyaluronic acid production by suramin, *Oncol. Res.* (1993) **5**, 415-422.

- [83] S.L. Xia, L. Wang, M.N. Cash, X. Teng, R.A. Schwalbe, C.S. Wingo: Extracellular ATP-induced calcium signaling in mIMCD-3 cells requires both P2X and P2Y purinoceptors, *Am. J. Physiol Renal Physiol* (2004) **287**, F204-F214.
- [84] E.M. Schwiebert, A. Zsembery: Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* (2003) **1615**, 7-32.
- [85] Györke I, Hester N, Jones LR & Györke S.: The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J* (2004) **86**, 2121-2128.
- [86] Wei L, Varsányi M, Dulhunty AF & Beard NA.: The conformation of calsequestrin determines its ability to regulate skeletal ryanodine receptors. *Biophys J* (2006) **91**, 1288-1301.
- [87] Csernoch L, Fodor J, Fehér M, Dienes B, Deli T, Szentesi P, Szabó L & Marty I.: Suppressed SR calcium release and modified elementary calcium release events in Triadin-overexpressing cultured myotubes. *Biophys J* (2007) 92 Suppl., 79a.
- [88] O'Connell KM & Dirksen RT Prolonged depolarization promotes fast gating kinetics of L-type Ca²⁺ channels in mouse skeletal myotubes. *J Physiol* (2000) **529**, 647-659.
- [89] Szappanos H, Cseri J, Deli T, Kovács L & Csernoch L.: Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Methods* (2004) **59**, 89-101.
- [90] Shen X, Franzini-Armstrong C, Lopez JR, Jones LR, Kobayashi YM, Wang Y, Kerrick WG, Caswell AH, Potter JD, Miller T, Allen PD & Perez CF Triadins modulate intracellular Ca²⁺ homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem* (2007) **282**, 37864-37874.
- [91] Goonasekera SA, Beard NA, Groom L, Kimura T, Lyfenko AD, Rosenfeld A, Marty I, Dulhunty AF & Dirksen RT.: Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J Gen Physiol* (2007) **130**, 365-378.
- [92] Vassilopoulos S, Brocard J, Garcia L, Marty I & Bouron A.: Retrograde regulation of store-operated calcium channels by the ryanodine receptor-associated protein triadin 95 in rat skeletal myotubes. *Cell Calcium* (2007) **41**, 179-185.
- [93] Lee EH, Cherednichenko G, Pessah IN & Allen PD.: Functional coupling between TRPC3 and RyR1 regulates the expressions of key triadic proteins. *J Biol Chem* (2006) **281**, 10042-10048.
- [94] Groh S, Marty I, Ottolia M, Prestipino G, Chapel A, Villaz M & Ronjat M.: Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem* (1999) **274**, 12278-12283.
- [95] Perez CF, López JR & Allen PD.: Expression levels of RyR1 and RyR3 control resting free Ca²⁺ in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* (2005) **288**, 640-649.

Közlemények

A téziseket megalapozó in extenso közlemények:

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

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

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

Ionotropic Purinergic Receptor P2X_4 is Involved in the Regulation of Chondrogenesis in Chicken Micromass Cell Cultures. *Cell Calcium* 2008. *Közlésre elfogadva IF.:4,338*

A tézisekben fel nem használt in extenso közlemények

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

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

C Matta, **J Fodor**, Zs Szíjgyártó, T Juhász, P Gergely, L Csernoch, R Zákány

Cytosolic free Ca^{2+} concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium.* 2008. 44: 310-23. **IF.:4,338**

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

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

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

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

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

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

Előadások, Poszterek

Magyar nyelvű előadások

Orvos- és Egészségtudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar Ph.D. és TDK. Tudományos Diáktalálkozója: (2006. és 2007. évben)

Fodor János, Gönczi Mónika, Sztretye Mónika, Dienes Beatrix, Szabó László, Csoma Eszter, Szentesi Péter, Szigeti Gyula Péter, Isabelle Marty, Csernoch László: A triadin fehérje szerepének vizsgálata *in vitro* izomtenyészetben

Fodor János, Gönczi Mónika, Sztretye Mónika, Dienes Beatrix, Szabó László, Csoma Eszter, Szentesi Péter, Szigeti Gyula Péter, Isabelle Marty, Csernoch László: A triadin 95 expresszió gátlása módosítja az elektromechanikai kapcsolatot patkány, primer myotubulusok-ban

A Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlés 2007, Pécs

Fodor János, Gönczi Mónika, Sztretye Mónika, Dienes Beatrix, Szabó László, Csoma Eszter, Szentesi Péter, Szigeti Gyula Péter, Isabelle Marty, Csernoch László: A triadin 95 expresszió gátlása módosítja az elektromechanikai kapcsolatot patkány, primer myotubulusok-ban (2007)

A Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs

Matta Csaba, Juhász Tamás, **Fodor János**, Deli Tamás, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásai az *in vitro* porcdifferenciáció során (2006)

Magyar nyelvű poszterek

LXXII. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Debrecen

Fodor János, Matta Csaba, Oláh Tamás, Gönczi Mónika, Juhász Tamás, Zákány Róza, Gergely Pál, Csernoch László: A primer porcsejtek purinerg dependens differenciálódása (2008)

38. Membrán Transzport Konferencia (Sümege)

Fodor János, Matta Csaba, Oláh Tamás, Gönczi Mónika, Juhász Tamás, Zákány Róza, Gergely Pál, Csernoch László: A primer porcsejtek purinerg dependens differenciálódása (2008)

VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (Balatonfüred)

Matta Csaba, Juhász Tamás, **Fodor János**, Csernoch László, Sziójgyártó Zsolt, Gergely Pál, Zákány Róza: Ionotrop purinoreceptorok szerepe a porcképződésben (2007)

Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése (Debrecen):

Matta Csaba, **Fodor János**, Juhász Tamás, Sziójgyártó Zsolt, Csernoch László, Zákány Róza: Ionotrop purinerg receptorok a differenciálódó kondrocitákon (2006)

V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest:

Matta Csaba, Juhász Tamás, **Fodor János**, Deli Tamás, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az *in vitro* porcdifferenciáció során zajló intracelluláris Ca -koncentráció vizsgálata: (2006)

A Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlés 2005, Budapest

Fodor János, Lakatos Andrea, Szentesi Péter, Szigeti Gyula Péter, Csernoch László:
Géntranszfer alkalmazása fehérjeexpresszió módosítására patkány harántcsíkkolt izmán
(2005)

Angol nyelvű poszterek

L Csernoch, **J Fodor**, M Fehér, B Dienes, T Deli, P Szentesi, L Szabó, I Marty:
Suppressed SR calcium release and modified elementary calcium release events in Triadin
overexpressing cultured myotubes 2007 Biophys J, 92 Suppl., 79a

European Muscle Conference 2006, Heidelberg, Germany :

J Fodor, M Fehér, T Deli, P Szentesi, L Csernoch: Triadin modifies EC coupling in
C2C12 myotubes (2006)

Köszönetnyilvánítás

Itt szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, és a mögötte rejlő elméleti tudásom megszerzésében.

Elsőként **Dr. Kovács László** professzor úrnak, aki elindította pályafutásomat.

Dr. Csernoch László professzor úrnak, a DE. OEC. Élettani Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette számomra, hogy az Élettani Intézetben végezzem kísérleteimet és irányította munkámat.

Dr. Vargáné Kiss Ibolya, valamint Óri Róza asszisztens nőknek, akik tudásukat és idejüket korlátlanul rám áldozták.

Ezentúl köszönet az egész **Élettani Intézetnek**, ahol mindig segítő szándékkal fordultak felém.

És mindenekeelőtt köszönettel tartozom a **feleségemnek** és a **fiamnak**.