

# EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

---

## A KALCIUMHOMEOSZTÁZIS ÉS A POLI(ADP-RIBOZ)ILÁCIÓS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA PORCOSODÓ MESENCHYMALIS SEJTKULTÚRÁKBAN

Matta Csaba

Témavezető: Dr. Zákány Róza



**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

---

**DEBRECEN, 2009.**

**TÉMAVEZETŐ:**

Dr. Zákány Róza, Ph.D.

**DOKTORI ISKOLA:**

Molekuláris orvostudomány

Prof. Dr. Kovács László akadémikus, egyetemi tanár

**DOKTORI PROGRAM:**

Molekuláris és sejtbiológia: a sejtek jelátviteli folyamatainak tanulmányozása

**A SZIGORLATI BIZOTTSÁG TAGJAI:**

*A bizottság elnöke:* Prof. Dr. Kovács László, akadémikus

*Bizottsági tagok:* Dr. Deák Ferenc, Ph.D.  
Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

**A VÉDÉSI BIZOTTSÁG TAGJAI:**

*A bizottság elnöke:* Prof. Dr. Kovács László, akadémikus

*Opponensek:* Dr. Rusznák Zoltán, Ph.D.  
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D.

*Bizottsági tagok:* Dr. Deák Ferenc, Ph.D.  
Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

*A védés időpontja:* 2009. május 27., 13 óra, DE OEC I. Belgyógyászati Klinika

## **BEVEZETÉS**

### *Az in vitro porcdifferenciáció tanulmányozására szolgáló modellek*

Az egyik legáltalánosabban elterjedt *in vitro* porcdifferenciációs modell a Hamburger és Hamilton szerinti 22–24-es fejlődési stádiumban lévő csirkeembriók végtagtelepeiből izolált, chondrogenitor mesenchymalis sejtekből álló primer *high density* (HD) sejtenyészet. A módszer legfontosabb előnye, hogy a chondrogenikus sejteket megfelelő kísérleti körülmények között és nagy sejtsűrűségben tenyésztve, azok spontán hajtják végre differenciálódási programjukat, és a kísérletek befejezését jelentő 6. nap végére aprócska csomókba szerveződött, jelentős mennyiségű hyalinporc keletkezik a kultúrákban. A differenciáció folyamata és a porcképződés mértéke a porcspecifikus matrixmolekulák, valamint az azok átírásáért felelős transzkripciós faktorok expressziójának monitorozásával követhető nyomon.

### *A porcdifferenciáció lépései és fehérjefoszforiláción alapuló intracelluláris szabályozása*

A chondrogenézis kezdeti lépéseként a chondrogenikus mesenchymalis sejtek kisebb sejtcsoportokba (ún. *nodulusokba*) tömörülnek. A HD-kultúrákban a sejtek kondenzációja az első, a nodulusok sejtjeinek porcsejteké váló differenciálódása dominánsan a második és harmadik tenyésztési napon következik be. A kondenzálódás során a sejtek felszínén expresszálandó, sejt–sejt kapcsolatok kialakításáért felelős molekulák (N-CAM és N-cadherin) és a sejtek közötti *gap junction* megjelenése jellemző. A nodulusokba aggregálódott prekurzor-sejtek cytoskeletonja is átalakul, az addigi nyúlványos, fibroblast-szerű sejtalak kerekdeddé válik. Ezzel párhuzamosan a differenciálódó sejteket körülvevő ECM jelentős módosuláson megy keresztül; a valódi, érett porcszövetre jellemző, proteoglikánban egyre gazdagabb matrix a harmadik tenyésztési nap második felétől van jelen metakromáziás festéssel detektálható mennyiségben.

A porcspecifikus matrixmolekulák, így a II., a IX. és a X. kollagén, valamint az aggregán tengelyfehérjéjét kódoló gének átírásáért a Sox9 transzkripciós faktor a felelős, melyet a chondrogenesis „mestergénjének” tekinthető *sox9* gén kódol. A Sox9 expresszióját és aktivitását számos intracelluláris molekula befolyásolja. A *protein-kináz A (PKA)* az egyik olyan enzim, amely bizonyítottan foszforilálja a Sox9-et, és bár a foszforiláció nem feltétlenül szükséges a Sox9 transzkripciót aktiváló hatásának létrejöttéhez, de jelentősen fokozza azt. A PKA a CREB transzkripciós faktor foszforilálásával is elősegítheti a porcképződést. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció által szabályozott *protein-kináz C (PKC)*-enzimcsalád is a porcképződés pozitív regulátorainak tekinthető. Arra nézve nincsenek adatok, hogy a porcdifferenciáció során a PKC közvetlenül foszforilálja a Sox9-et.

Egyes *foszfoprotein-foszfatazok* szerepe a fehérjefoszforiláció reverzibilitását biztosítva ugyancsak alapvető jelentőségű. A *protein-foszfataz 2A (PP2A)* a porcdifferenciáció negatív regulátora: az enzim gátlása a CREB foszforiláltsági szintjének emelésén keresztül fokozza a porcdifferenciációt. A *protein-foszfataz 2B (PP2B, calcineurin)* chondrogenesisben betöltött szerepét a közelmúltban írták le. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció változásaira érzékeny calcineurin az NFAT-t aktiválja, ami a chondrogenikus sejtekben elősegíti a differenciálódást. Ennek megfelelően a calcineurin gátlása farmakológiai inhibitorával, ciklosporin-A-val (CsA) a porcképződés csökkenéséhez vezet.

#### *Az intracelluláris kalciumkoncentráció és a porcképződés kapcsolata*

Egyes PKC-izoenzimek (elsősorban a klasszikus PKC típusok) aktivitását az *intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció változásai* is befolyásolják. Hasonló mechanizmusok szabályozzák a chondrogenesis másik pozitív regulátorát, a calcineurint is. Míg számos sejtípus, többek között pluripotens embrionális sejtek  $Ca^{2+}$ -homeosztázisát és az abban szerepet játszó fehérjéket (sejtfelszíni receptorokat, feszültség- és ligandvezérelt  $Ca^{2+}$ -csatornákat, az endoplasmaticus

retikulum receptorait és  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpákat) már felderítették, a differenciálódó chondroprogenitor sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartásáról nincsenek adatok.

#### *Az oxidatív stressz és a hialinporc*

A porcszövet ereket nem tartalmazó szövet, ahol *per se* hipoxiás viszonyok uralkodnak. A chondrocyták jól alkalmazkodtak a hipoxiához, és metabolizmusukra elsősorban az anaerob útvonalak dominanciája jellemző. Az ízületi porcot érintő megbetegedések (rheumatoid arthritis vagy osteoarthritis) során a synovialis folyadék oxigénfelhasználása fokozódik, illetve a synovialis membrán kapillárisaiból történő oxigénleadás is csökken, ami a fiziológiásnál is nagyobb hipoxiának és stressznek teszi ki a chondrocytákat: az oxidánsok és az antioxidánsok egyensúlya felborul, a kialakult állapotot *oxidatív stressznek* nevezzük. Reaktív oxigéngyökök (ROS) nemcsak kóros, hanem az aerob légzési lánc során normál körülmények között is képződhetnek a sejtekben.

#### *A poli(ADP-ribóz)-polimeráz szerepe az oxidatív stressz okozta károsodásokban*

Ha a sejtek antioxidáns-kapacitása nem elég a ROS hatástalanítására, az oxidánsok relatív túlsúlya a celluláris hatások (sejtmembrán és nukleinsavak károsítása, fehérjék oldalláncainak oxidálása és nitrálása) mellett a matrix alkotóelemeit (proteoglikánok, kollagének) is roncsolja. A ROS és azok származékai (különösen a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit) elsősorban *genotoxikus* (a DNS-t roncsoló) hatásuk révén károsítják a sejteket. A közvetlen hatások mellett a *poli(ADP-ribóz)-polimerek* nagy mennyiségű megjelenését is leírták, a polimerek szintéziséért a *poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP)* enzim a felelős. Az enzim a károsodott DNS-hez kötődik és a sejtekben lévő  $\text{NAD}^+$ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd ez utóbbi terméket elágazó láncú polimerekké építi, melyeket különböző sejtmagi fehérjékhez kapcsol. Ez a fehérjemódosítás serkenti a DNS-repairt. Azok a sejtek azonban, amelyek erős DNS-károsító hatásoknak (pl. UV-sugárzás,  $\gamma$ -irradiáció stb.) voltak kitéve,

nekrózissal pusztulnak el. Ilyen esetekben az enzim túlságosan aktívvá válik, s az extrém módon felgyorsult katalitikus aktivitás közvetlen következményeként a sejtek  $\text{NAD}^+$ -, majd ATP-tartalékai kimerülnek, a sejt elpusztul. A mérsékelt károsodást szenvedett sejtek a repair-mechanizmusok elégtelensége miatt a p53-útvonalon keresztül apoptózissal pusztulnak el. A fenti hatások az enzim farmakológiai inhibitorával, a *3-aminobenzamiddal* (3-AB) részben kivédhetőek.

#### *A PARP szerepe az arthritis patogenezisében*

A PARP bizonyos helyi gyulladásos folyamatok (pl. arthritis) során is aktiválódik. Megfigyelték, hogy a betegség egérmódeljében a PARP-aktivitás 3-aminobenzamiddal történő gátlása késlelteti a tünetek kialakulását. Ezt a védőhatást számos más PARP-inhibitorral sikerült kimutatni, ami a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok jelentőségére utal. A PARP arthritisben betöltött pontos szerepét azonban még nem sikerült részleteiben felderíteni. Noha részleges eredmények már születtek azzal kapcsolatban, hogy a PARP valamilyen funkcióval bír a chondrogenézisben, arról, hogy a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok pontosan milyen szerepet játszanak az HD-kultúrákon kiváltott oxidatív stresszre adott válaszok szabályozásában, nem rendelkezünk adatokkal.

#### *Az oxidatív stressz és az intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció kapcsolata*

A reaktív oxigéngyökök az irodalomból ismert adatok alapján a cytosol kalciumkoncentrációjának modulálásán keresztül is kifejthetik káros hatásaikat. A nyugalmi kalciumkoncentráció adott határ fölé történő megemelése felborítja a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisát, ami végső soron apoptotikus vagy nekrotikus sejthalálhoz vezethet. A PARP bizonyos kationcsatornák aktivitásának modulálásán keresztül közvetlenül is képes megemelni a nyugalmi kalciumkoncentrációt, s ezáltal elősegíteni a sejtek apoptotikus vagy nekrotikus halálát.



## CÉLKITŰZÉSEK

A differenciálódással párhuzamosan jelentős intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációváltozások figyelhetők meg bizonyos sejteknél, köztük mesenchymalis őssejteknél is. Ugyan a chondrogenikus mesenchymalis sejtek primer, porcsejt irányba történő differenciálódása és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció esetleges kapcsolatáról egyelőre nem találtunk adatokat, de a számos  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny jelátviteli molekula porcképződést szabályozó szerepe alapján mégis feltételezhető, hogy a cytosol kalciumszintje jelentős változásokon esik át a differenciálódó chondroprogenitor sejtekben is. Ennek megfelelően az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Milyen változásokat követ a HD-kultúrák differenciálódó sejtjeiben detektálható szabad cytosol kalciumkoncentráció?
2. Mi lehet a cytosol kalciumionok forrása: a belső raktárakból szabadulnak-e fel, vagy az extracelluláris közegből áramlanak be a sejtek belsejébe?
3. Milyen hatása van a differenciációs folyamatra és a calcineurin aktivitására a sejtek nyugalmi cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjának modulálása?

A differenciálódó sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának feltérképezése mellett a sejtek életének egy másik aspektusát is vizsgálni kívántuk. Az érett porcsejtek általában hipoxiás körülmények között töltik be funkciójukat, és gyakran kerülnek kapcsolatba reaktív oxigén- és nitrogényökökkel. Ezért további vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

4. Milyen módon hatnak a reaktív oxigén- és nitrogényökök az *in vitro* porcdifferenciálódásra?
5. Kimutatható-e valamiféle kapcsolat az oxidálószeres okozta károsodások és a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok aktiválódása között?
6. Milyen szerepet játszhat a PARP a nyugalmi körülmények között tenyésztett differenciálódó mesenchymalis sejtek életfolyamatainak szabályozásában?





## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Sejtenyésztés*

A chondroprogenitor mesenchymalis sejteket Ross-fajtájú, a Hamburger és Hamilton szerinti 22–24-es stádiumnak megfelelő fejlettségű csirkeembriók disztális végtagtelepeiből izoláltuk és a  $1,5 \times 10^7$  sejt/ml sűrűségű sejtszuspenzióból 15, 30 vagy 100  $\mu$ l-t cseppentettük üveg fedőlemezekre, műanyag Petri-csészékbe, illetve tenyésztő plate lyukaiba. Az így készített high density (HD) kultúrákat 10% FBS-sel kiegészített Ham's F12 tápoldattal tápláltuk.

### *A cytosol szabad $Ca^{2+}$ -koncentráció meghatározása*

A különböző korú sejt kultúrák sejtjeinek cytosol szabad  $Ca^{2+}$ -koncentrációját fluoreszcens módszerrel mértük meg. A mérés előtt a sejteket Fura-2  $Ca^{2+}$ -érzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük fel. A méréseket Tyrode-oldatot tartalmazó perfúziós kamrában végeztük egy forgótükros sugárosztóval kiegészített kettős monokromátoros berendezést használva. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk, a Fura-2-vel feltöltött sejtek által kibocsátott fluoreszcens fényt pedig fotoelektron-sokszorozó segítségével 510 nm-en, 10 Hz gyakorisággal regisztráltuk. A két hullámhosszon való gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ( $R = F_{340}/F_{380}$ ) a következő egyenlet alapján számítottuk ki az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációkat:

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

ahol  $K_D$  a disszociációs állandó,  $R$  a mért fluoreszcenciaértékek hányadosa,  $R_{min}$  az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék egyáltalán nem köt  $Ca^{2+}$ -ot,  $R_{max}$  az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék  $Ca^{2+}$ -mal telített,  $\beta$  a rendszerre jellemző állandó. Agonisták és antagonisták hatásának vizsgálatakor egy kis perfúziós kapillárist az éppen mért sejt közvetlen közelébe állítottunk be, amin perfúziós rendszer segítségével adagoltuk a vizsgált oldatot. Az intracelluláris

kalciumraktárak töltöttségének vizsgálata során a simafelszínű endoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpájának (SERCA) inhibitorát, ciklopiazonsavat (CPA) adagoltunk 10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban. A CPA-t kalciummentes Tyrode-oldatban alkalmaztuk. A rianodinreceptorok fiziológiai vizsgálatára 15 mM koffeint, a receptor agonistáját adtuk a vizsgált sejtekhez.

#### *Spontán $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek vizsgálata és analízise*

A különböző korú kultúrák sejtjeiben a spontán  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket fluoreszcenciás módszerrel, konfokális mikroszkóp segítségével regisztráltuk. A mérés előtt a sejteket 10  $\mu\text{M}$  Fluo-4-AM kalciumérzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük fel, a töltést 37 °C-on,  $\text{CO}_2$ -inkubátorban végeztük 1 órán át. A tranzienseket normál Tyrode-oldatban regisztráltuk. A spontán  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek során bekövetkező intenzitásváltozásokat x–y analízissel és line scan analízissel vizsgáltuk.

#### *A kultúrák kezelése EGTA-val, A23187 $\text{Ca}^{2+}$ -ionoforral, CPA-val és ciklosporin-A-val*

Az extracelluláris közeg szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -ionjait a tápközeg kalciumtartalmával ekvimoláris mennyiségű, 0,8 mM koncentrációjú EGTA hozzáadásával kötöttük meg a tenyésztés 2. és 3. napján. A sejtek intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjának megemeléséhez a kultúrákat 0,1 és 5 mg/l koncentrációjú A23187  $\text{Ca}^{2+}$ -ionofort tartalmazó tápoldattal tápláltuk a tenyésztés 2. és 3. napján, 1 órán keresztül. A belső raktárak kiürítését 12 órás CPA-kezeléssel értük el. A kalcineurin aktivitását 2  $\mu\text{M}$  CsA folyamatos hozzáadásával gátoltuk.

#### *Oxidatív stressz előidézése, valamint a PARP-aktivitás gátlása 3-amidobenzamiddal*

Oxidatív stresszt hidrogén-peroxid vagy peroxinitrit hozzáadásával váltottunk ki. Mindkét anyagot 30 percen keresztül tartottuk a sejteken. A

hidrogén-peroxidot 0,1; 1 és 4 mM, a peroxinitritet 100, 300 és 600  $\mu$ M koncentrációban alkalmaztuk. A PARP-aktivitás gátlásához 3-AB-t használtunk, amit az oxidatív stressz előidézését megelőző 30 percben adtunk a kultúrák sejtjeihez.

#### *A porcmatrix fénymikroszkópos vizsgálata és szemikvantitatív meghatározása*

A porcmatrixot a metakromáziás festődés felhasználásával tettük láthatóvá. A HD-kultúrákat a tenyésztés végét jelentő 6. napon fixáltuk, majd DMMK 3% ecetsavban oldott 0,1% oldatával festettük, fénymikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket. A matrixkomponensek szemikvantitatív meghatározását toluidinkék kioldását követő optikai denzitometrálással végeztük: a 6 napos kultúrákat glicin–HCl-pufferben oldott 0,1% toluidinkékkel festettük, a szulfatált matrixkomponensekhez kötődött festéket abszolút etanolban oldott 8% HCl segítségével oldottuk ki, és a minták optikai denzitását 625 nm-en mértük.

#### *A sejtproliferáció, életképesség és túlélési ráta vizsgálata*

A sejtosztódást  $^3\text{H}$ -timidin-beépülés mérésével határoztuk meg. A 3. tenyésztési napon, a kezeléseket követően 1  $\mu\text{Ci/ml}$  aktivitású  $^3\text{H}$ -timidint adtunk a kultúrákhoz és 16 órán át tartottuk rajtuk. A radioaktív izotóppal jelölt nukleotidot tartalmazó médium eltávolítása után triklórecetsav alkalmazásával kicsaptuk a szolubilis fehérjéket, majd kiszáritást követően szcintillációs folyadékot pipettáztunk a plate-ek lyukaiba, és a minták radioaktivitását folyadékszcintillációs üzemmódban használt plate-leolvasó készülékkel detektáltuk.

A sejtek életképességét MTT-assay-vel vizsgáltuk. A tenyésztés 3. napján a kezeléseket követően PBS-ben oldott MTT-reagenst mértünk a sejtek tápoldatába és 2 órás inkubálást követően a képződött formazánkristályokat MTT-szolubilizáló oldatban feloldva a minták abszorbanciáját 570 nm-en mértük.

A sejtek túlélési rátáját áramlási citometriával vizsgáltuk. Az A23187 vagy EGTA-kezeléseket követően Annexin-V DY647 reagenst és/vagy propidium-jodidot adtunk a kultúrákhoz. Az inkubáció lejártával a kultúrákat tripszinizáltuk és centrifugáltuk, majd FACS-pufferben szuszpendáltuk. Az áramlási citometria során az Annexin-V DY647 reagenssel jelölt sejteket 670 nm-en, míg a propidium-jodidot felvetteket 620 nm-en detektáltuk. Az adatok kiértékelését a WinMDI 2.8 számítógépes program (freeware) segítségével végeztük.

#### *RT-PCR analízis*

A kultúrák sejtjeiből totál RNS-t izoláltunk, majd Omniscript reverz transzkripció kit felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A specifikus cDNS-szekvenciák erősítése olyan primerekkel történt, amelyeket az interneten hozzáférhető csirke nukleotidszekvenciák alapján Primer Premier 5.0 számítógépes program segítségével terveztünk. A PCR-reakciókat a primerpároknak megfelelő hőmérsékleti profilok mellett végeztük. A PCR-mintákat 1,5%-os agarózgélben elektroforézissel választottuk el, és etídium-bromid festést követően elemeztük. A jelintenzitás kvantifikálását ImageJ számítógépes program segítségével végeztük, és a kontroll minták értékeire normalizáltuk.

#### *Sejtkivonatok preparálása és Western blot analízis*

A teljes sejt-lizátumok előállításához a megfelelő korú kontroll, illetve kezelt kultúrákat gumi sejtkaparó lapáttal arattuk le és lízispufferben szuszpendáltuk. A mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk és felhasználásig  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A sejteket közvetlenül a kísérletek folytatása előtt ultrahangos szonikálással tártuk fel. Az *endoplasmaticus membránfrakció* előállításához a 3 napos kultúrákat homogenizátorban HEPES-sel és szacharózzal kiegészített lízispufferben szuszpendáltuk. A minták centrifugálását követően a felülúszót ultracentrifugával  $150\ 000\ \times g$ -vel

centrifugáltuk 2 órán át, az üledéket lízispufferben vettük fel, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és felhasználásig  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mintákat a szokásos módon készítettük elő az elektroforézishez, 7,5% akrilamid gélt használtunk, és sávonként 40  $\mu\text{g}$  fehérjét vittünk fel. A szeparálást követően a mintákat elektromos erőter segítségével nitrocellulóz membránra vittük át. A membránokat tejfehérjével blokkoltuk, majd a megfelelő antitestek jelenlétében egy éjszakán át  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. A membránokat a második antitesttel szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 órán át, és az immunreaktív sávokat erősített kemilumineszcenciás módszerrel mutattuk ki. A jelintenzitás szemikvantitatív kiértékelését ImageJ programmal végeztük, és a kontroll minták értékeire normalizáltuk.

#### *Kalcineurin-enzimaktivitás mérése*

A kalcineurin enzimaktivitását  $^{32}\text{P}$ -vel jelölt inhibitor-1 szubsztrátból az enzim által lehasított  $^{32}\text{P}_i$  radioaktivitásának meghatározásával mértük. A mérésekhez sejtlizátumokat használtunk, 20 percig tartó,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálás után a reakciókat 20% triklórecetsav és BSA-oldat egyidejű hozzáadásával állítottuk le. Centrifugálás után a felülúszóból határoztuk meg a  $^{32}\text{P}_i$  mennyiségét folyadékszintillációs detektor felhasználásával.

#### *Poli(ADP-ribóz)-polimerek kimutatása immunocitokémiával*

A kultúrákat a kezeléseket követően 10% triklórecetsavval, majd Saint-Marie rögzítővel fixáltuk. Az aspecifikus kötőhelyeket 0,1% Triton X-100 és 5% lószérum PBS oldatával blokkoltuk, majd a kultúrákat monoklonális anti-poli(ADP-ribóz) antitest jelenlétében inkubáltuk  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán át. Ezt követően biotinilált ló anti-egér IgG-vel inkubáltuk 45 percig, majd streptavidinnel konjugált Alexa-546-ot adtunk 30 percig. A sejtmagokat DAPI-val festettük.

### *PARP-aktivitás in situ kimutatása*

A kezeléseket követően a kultúrák eredeti tápoldatát  $\text{NAD}^+$ -ot tartalmazó PARP reakció-pufferre cseréltük.  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 1 óra hosszúra tartó inkubálást követően a kultúrákat 10% triklórecetsavban és  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -os abszolút etanolban fixáltuk. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását PBS-ben oldott 1% BSA-ban végeztük. A beépült biotint streptavidin–Alexa-546 konjugátum hozzáadásával mutattuk ki, a sejtmagokat DAPI-val festettük.

### *A sejtek $\text{NAD}^+$ -tartalmának meghatározása*

A HD-kultúrákat a megfelelő kezelések után  $\text{HClO}_4$ -val tártuk fel, centrifugálás után méréseinkhez a felülúszót használtuk, amit megfelelő mennyiségű reakcióeleggyel kevertünk össze. Az  $560\text{ nm}$ -en mérhető fényelnyelést közvetlenül a reakcióelegyek összemérése után és 10 perc leteltével is megmértük. A kultúrák  $\text{NAD}^+$  mennyiségét ismert koncentrációjú  $\text{NAD}^+$ -standardok segítségével számoltuk ki.

### *Adatfeldolgozás és statisztikai analízis*

A mérési eredményeket átlagoltuk és kiszámítottuk a standard hibákat (SEM). Az adatokat statisztikai szempontból Student-féle kétmintás  $t$ -próba segítségével elemeztük, és azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol  $p < 0,05$ .

## EREDMÉNYEK

### **A porcosodó HD-kultúrák $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisa**

*A kultúrák sejtjeinek cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációja jellegzetes mintázatot követ*

A különböző korú (0–6. napos), Fura-2 kalciumérzékeny fluoreszcens festékkel feltöltött kultúrák sejtjeinek cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjában a differenciációval párhuzamosan változó mintázatot figyeltünk meg: a 0. napos tenyészetek sejtjeiben a kalciumkoncentráció viszonylag alacsony értékeket mutat, ezt követően a differenciáció előrehaladtával kismértékű emelkedés figyelhető meg, ami a tenyésztés 3. napján magas (mintegy 140 nM) csúccsal tetőzik. A 4. naptól kezdődően a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció újra alacsonyabb értékeket vesz fel. A Fluo-4-gyel feltöltött háromnapos kultúrák sejtjeinek túlnyomó többsége spontán periodikus  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációkat mutatott. Konfokális mikroszkóp segítségével végzett mérések alapján a frekvencia átlagos értéke  $4 \pm 1,2 \text{ min}^{-1}$ , a maximum amplitúdók 15–20%-kal voltak magasabbak az átlagos nyugalmi fluoreszcencia-intenzitásnál.

*A differenciálódás során megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció forrása az extracelluláris tér*

A külső közeg  $\text{Ca}^{2+}$ -ionjainak megkötésére EGTA-t adtuk a sejtek tápközegébe. Ennek hatására szignifikánsan csökkent a sejtekben mérhető cytosol szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció, és a metakromáziásan festődő porcterületek nagysága is a kezeletlen kontrollokhoz képest. A kezelések hatására a Sox9 mRNS- és fehérje-expressziója, valamint foszforilációja is jelentős csökkenést mutatott, ezért feltételezhető, hogy a szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok extracelluláris térből való elvonása a differenciációs folyamatok gátlása révén eredményezi a matrix-termelés csökkenését.



*A cytosol  $Ca^{2+}$ -koncentráció megemelése kettős hatást vált ki*

Az A23187  $Ca^{2+}$ -ionofort két koncentrációban (0,1 és 5 mg/l) használtuk. A cytosol szabad  $Ca^{2+}$ -koncentrációját mindkét ionofor-koncentráció jelentősen fokozta. A matrixtermelés tekintetében eltérő hatásokat figyeltünk meg. A kisebb koncentrációjú A23187-kezelések után szignifikánsan több matrixot detektáltunk, míg a magasabb koncentrációjú ionoforral kezelt kultúrákban jelentősen visszaesett a matrixtermelés mértéke. A 0,1 mg/l koncentrációjú ionofor hatására a Sox9 és az aggrekán mRNS fokozott expressziót mutatott. Ezzel ellentétben, 5 mg/l ionofor-koncentrációnál sem a Sox9, sem az aggrekán mRNS expressziós szintje nem csökkent. Mivel a Western blot analízisek eredményei nincsenek összhangban a matrixtermelésben bekövetkezett változásokkal, valószínűsíthetjük, hogy a magasabb koncentrációjú ionoforral kezelt kultúrákban a porcmatrix képződésének csökkenése nem a Sox9-útvonal változásaival magyarázható.

*A chondrogenikus sejtek belső raktárai tartalmazzak bizonyos mennyiségű kalciumot*

A belső raktárak töltöttségét a SERCA egyik inhibitorával, a ciklopiazon-savval (CPA) vizsgáltuk. A CPA adagolásának megkezdése után a cytosol kalciumkoncentráció lassan emelkedett kezdett, ami arra utal, hogy az ER ciszternái nem tartalmazzak túl sok kalciumot, a szivárgás üteme nem túl nagy. Kimutattuk, hogy a CPA adagolását követően, az extracelluláris tér kalciumkoncentrációjának (1,8 mM) visszaállításakor határozott  $Ca^{2+}$ -tranziens jelent meg, ami a raktárak által irányított kalciumbelépés (SOCE) jelenségének tulajdonítható. A CPA-t nemcsak kalciumméréskor és rövid ideig (~10 perc) adagoltuk a sejtekhez, hanem bizonyos kultúrákat a 2., illetve a 3. napon 12 órán át CPA folyamatos jelenlétében tenyésztettünk. Ez a hosszú ideig tartó gátlás minden bizonnyal teljesen kiürítette a belső raktárakat, mégsem láttunk változást a 6. napon a képződött porcmatrix mennyiségét tekintve.

A kalcium ER-ből történő felszabadításában szerepet játszó csatornafehérjék vizsgálatából kiderült, hogy a rianodinreceptor jelen van ugyan a chondrogenikus mesenchymalis sejtek endoplasmaticus retikulumának belső membránrendszerében, nyugalmi körülmények között azonban valószínűleg nem funkcionál, és így bizonyára nem játszik fontos szerepet a szabad cytosol  $Ca^{2+}$ -koncentráció szabályozásában. Az 1-es típusú  $IP_3$ -receptorok gyenge mRNS- és fehérjeexpressziója hasonló következtetésekre vezetett.

*Az EGTA, a  $Ca^{2+}$ -ionofor és a CPA hatása a 2 és 3 napos kultúrák sejteinek osztódási rátájára, mitochondriális aktivitására és túlélőképességére*

EGTA-kezelés hatására a sejtek osztódási rátája mindkét napon drámaian lecsökkent (a kontroll 10%-ára), ugyanakkor a nekrotizáló/apoptotizáló sejtek gyakorisága megnőtt. A sejtek életképességét az EGTA-kezelések nem befolyásolták. Az ionofor kétféle koncentrációja eltérő hatással volt a sejtek osztódóképességére: 5 mg/l koncentrációban kismértékű csökkenést okozott, míg 0,1 mg/l koncentrációban alkalmazva a 3. napon szignifikánsan fokozta a sejtek proliferációját. A másik két paramétert azonban az ionofor érdemben nem befolyásolta. A CPA egyik napon sem volt jelentős hatással a sejtek osztódási rátájára, sem azok mitochondriális aktivitására.

*A kalciumkoncentráció módosítja a kalcineurin expresszióját és aktivitását*

EGTA-kezelés következtében mindkét vizsgált napon jelentősen visszaesett a kalcineurin aktivitása. A kalciumkoncentráció emelésének kevésbé egyértelmű hatásait figyeltük meg: a 2. napon az A23184 mindkét koncentrációjának hatására az enzim aktivitása fokozódott, a 3. napon pedig mindkét esetben csökkent a kalcineurin aktivitása. A kalcineurin mRNS-szintje csak a 2. napi kezeléseket követően mutat bárminemű változást, a 3. napon változatlan marad. A 2. napon az alacsonyabb mRNS-szint eredményeképpen csökkent fehérjeexpressziót detektáltunk valamennyi kezelés hatására, míg a 3.

napon az 5 mg/l koncentrációban alkalmazott ionofor hatására erősebb jelet kaptunk.

A calcineurin inhibitora, a CsA 2  $\mu$ M koncentrációban alkalmazva az enzim aktivitását mintegy 40%-kal csökkenti, és ezzel párhuzamosan a képződött porcmatrix mennyisége is jelentős csökkenést mutat.

### **Az oxidatív stressz és a chondrogenézis kapcsolata**

*Az oxidatív stressz poli(ADP-ribóz)-polimeráz-dependens módon gátolja a porcdifferenciációt*

A hidrogén-peroxid koncentrációfüggő módon gátolta a porcképződést. Az oxidatív stressz kiváltása előtt a PARP egyik inhibitorával, 3-AB-vel előkezelve a sejteket, jelentős védőhatás figyelhető meg. A folyamatos 3-AB-kezelés önmagában is hatással volt a matrixtermelésre: a kezeletlen kontroll kultúrákban mérhető értékeknek mintegy másfélszeresét kaptuk.

A peroxinitrit (hidrogén-peroxidhoz hasonlóan) koncentrációfüggő módon gátolta a sejtek osztódását: már a kis (100  $\mu$ M) koncentrációjú peroxinitrit is a kezeletlen kontroll értékének mintegy felére csökkentette a sejtproliferációt. A 3-AB-előkezelések az osztódási ráta tekintetében gyakorlatilag nem mutattak védőhatást. A sejtek mitochondriális aktivitása koncentráció-dependens módon csökkent peroxinitrit-kezelések hatására. A PARP-aktivitás gátlása 3-AB-vel a legtöbb esetben képes volt kivédeni a reaktív oxigén- és nitrogéngyökök káros hatásait.

*Oxidatív stressz hatására változik a HD-kultúrák sejteiben mérhető intracelluláris kalciumkoncentráció*

Mint hogy a sejtek cytosol  $Ca^{2+}$ -koncentrációja érzékenyen reagál az extracelluláris stimulusokra, megvizsgáltuk, vajon oxidatív stressz hatására változik-e a chondrogenikus mesenchymalis sejtekben mérhető intracelluláris  $Ca^{2+}$ -

koncentráció. Míg a kis (0,1 mM) koncentrációjú hidrogén-peroxid hatására érdemben nem változik a nyugalmi  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció, a magas (4 mM) koncentráció hatására különösen a harmadik napon figyelhető meg drámai változás: a differenciálódás napján kontroll körülmények között is magasabb kalciumkoncentráció még erőteljesebb emelkedést mutat.

*Az oxidatív stressz hatására módosul a porcspecifikus markerek expressziós mintázata*

Az oxidatív stressz jelentősen csökkenti mind a Sox9, mind az aggrecán mRNS-expresszióját. A porcmatrix-termelés vizsgálata során megfigyelt változásokhoz hasonlóan a 3-AB a markergének expresszióját a metakromáziás festések eredményeivel összhangban befolyásolta: bizonyos mértékben képes volt kivédeni a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit káros hatásait. A 3-AB önmagában alkalmazva jelentősen, mintegy 50%-kal fokozta mindkét gén mRNS-ének expresszióját, ami szintén összhangban van a metakromáziás festések során kapott eredményeinkkel. A Sox9 fehérjeexpresszió-változásai hűen követik az mRNS-szintű változásokat: a reaktív oxigén- és nitrogényökök hatására kevesebb fehérje mutatható ki a mintákban, amit a 3-AB-előkezelések képesek voltak kompenzálni.

*A HD-kultúrákban a hidrogén-peroxiddal és peroxinitrittel kiváltott oxidatív stressz hatására poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok aktiválódnak*

Az oxidatív stressznek kitett és a kontroll kultúrákban meghatároztuk a PARP aktivitását biotinilált  $\text{NAD}^+$  beépülését vizsgálatával. Kontroll körülmények között nem detektáltunk kimutatható mértékű PARP-aktivitást, és 3-AB-kezelések hatására is hasonló eredményeket kaptunk. Hidrogén-peroxid, és főként peroxinitrit-kezeléseket követően azonban a sejtek magjában

jelentősen fokozódott a biotin beépülése, ami a PARP-inhibitor hatására csökkent. A PARP aktivitásának vizsgálata mellett a képződött poli(ADP-ribóz)-polimereket is sikerült kimutatnunk: reaktív oxigén- és nitrogényökök hatására egyaránt erős jeleket kaptunk, és 3-AB-előkezelések hatására a polimer mennyisége jelentősen kisebb maradt, mint a csak oxidatív stressz hatásának kitett kultúrákban.

## MEGBESZÉLÉS

### *A porcosodó HD-kultúrák sejtjeinek $Ca^{2+}$ -homeosztázisa*

A tenyésztés kezdetén mérhető alacsony  $Ca^{2+}$ -koncentráció a differenciálódó sejtekben emelkedik, majd határozott csúcsot mutat, ezt követően az érett chondroblastokban ismét alacsonyabb értékeket vesz fel. Eredményeink összhangban vannak az epifízis-porcszövet chondrocytaiban mért intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációértékekkel. Azt is megfigyeltük, hogy a chondrogenikus mesenchymalis sejtek nyugalmi  $Ca^{2+}$ -koncentrációja periodikus változásokat (oszcillációkat) mutat, ami az irodalmi adatok alapján más differenciálódó sejtekre is jellemző. A  $Ca^{2+}$ -oszcillációk bizonyos transzkripciófaktorok aktiválásán keresztül fokozhatják a differenciációt, az oszcillációk hatására nemcsak az NFAT, hanem a CREB is aktiválódhat.

Méréseink folytatásaként megvizsgáltuk, hogy a differenciálódás napján mérhető megemelkedett cytosol kalciumkoncentráció forrása extra- vagy intracelluláris eredetű-e. A HD-kultúrák külső közegébe a kalciumkoncentrációval ekvimoláris (1,8 mM) EGTA-t adtunk, s ezáltal megkötöttük a szabad  $Ca^{2+}$ -ionokat. A kezeléseket a differenciáció szempontjából fontos 2., illetve 3. napon végezve jelentősen visszaesett a matrixtermelés mértéke, és ezzel párhuzamosan a sejtekben mérhető cytosol szabad  $Ca^{2+}$ -koncentráció is lecsökkent, sőt a 3 napos kezeletlen kontroll kultúrákra jellemző megemelkedett  $Ca^{2+}$ -koncentráció sem volt kimutatható. Az alacsony extracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció hatására a HD-kultúrák sejtjeinek proliferációs rátája drámaian lecsökkent, anélkül hogy a mitochondriális aktivitásukban számottevő változás következett volna be. Ezzel párhuzamosan a Sox9 mRNS- és fehérjeexpressziója is lecsökkent. Mindezen változások alapján feltételezhetjük, hogy az extracelluláris térség szabad kalciumionjainak a differenciációs folyamatok beindításában és a kezdeti lépések irányításában van nélkülözhetetlen szerepe, hiszen a kalciumionok megkötése csak a tenyésztés első 3 napján alkalmazva gátolja a sejtek normál differenciációs ciklusát.

Eredményeink jól illeszkednek az irodalomban közölt adatokhoz, miszerint az *in vitro* porcdifferenciáció az extracelluláris tér kalciumkoncentrációjának megemelésével modulálható; a magasabb  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció azonban csak a differenciációs folyamat kezdetén fejt ki pozitív hatást.

A cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját A23187 kalcium-ionofor alkalmazásával emeltük meg, a kis koncentrációjú ionofor fokozta, míg a nagy koncentrációjú ionofor erőteljesen gátolta a matrixtermelést. A kis dózisban alkalmazott ionofor a megfigyelt változásokkal összhangban befolyásolta a Sox9 transzkripció faktor mRNS- és fehérjeexpresszióját, a nagy dózisú kezelések azonban kissé ellentmondásos eredményekre vezettek, ami alapján valószínűsíthetjük, hogy az ionofor részben Sox9-independens útvonalakon keresztül befolyásolja a porcképződést.

A belső raktárak töltöttségének vizsgálatához CPA-val, a SERCA gátlószerével kezeltük a kultúrák sejtjeit, és kimutattuk, hogy a chondrogenikus mesenchymalis sejtek belső raktárai tartalmaznak bizonyos mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$ -t, azonban ennek mennyisége az excitábilis sejtekhez képest elhanyagolható. A sejtekben a külső közeg  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjának helyreállítása után átmeneti cytosol kalciumkoncentráció-emelkedés következett be, ami SOCE-csatornák működésére utal. A kalcium-eszköztár azon összetevői közül, amelyek a belső raktárakból történő kalciumfelszabadításért lehetnek felelősek, a chondrogenikus sejtek a rianodinreceptort és az  $\text{IP}_3$ -receptor I-es típusát expresszálják. A fehérjék gyenge, alig kimutatható expressziója és a raktárak csekély mértékű töltöttsége következtében az ily módon felszabaduló kalciumionok valószínűleg csak lokálisan emelhetik meg a cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját, a differenciálódás során mérhető nagymértékű, tartós emelkedés minden bizonnyal a külső közegből származik.

*A kalcineurin lehet a HD-kultúrák cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációváltozásainak egyik target- és effektormolekulája*

A calcineurin aktivitása érzékenyen reagál a sejtek cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjának modulálására: a cytosol kalciumkoncentrációjának csökkenésével párhuzamosan az enzim aktivitása is visszaesik, az ionofor hatására pedig a 2. napon fokozódott, a 3. napon viszont csökkent az enzimaktivitás. A calcineurin valószínűleg képes aktívan részt venni a cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjának szabályozásában. Azokban a kultúrákban, melyekben a calcineurint CsA-val gátoltuk, magasabb bazális  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációértékeket detektáltunk, de a kontroll körülmények között megfigyelhető  $\text{Ca}^{2+}$ -csúcs elmaradt. A calcineurin tehát bizonyára fontos szerepet játszik a 3. napon a megemelkedett kalciumkoncentráció kialakításáért például bizonyos, a plazmamembránban lokalizálódó  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák aktiválásával. Ezt a feltételezésünket azok a közlemények támasztják alá, melyek arról számolnak be, hogy a calcineurin a kalcium-eszköztár számos tagjának (pl.  $\text{IP}_3$ -receptorok, SERCA,  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchangerek stb.) működését képes befolyásolni.

*Az oxidatív stressz és a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok kapcsolata a porcosodó HD-kultúrák sejtjeiben*

Ismeretes, hogy a reaktív oxigéngyökök gátolják a porcmatrixtermelést, és hozzájárulnak a már kialakult extracelluláris matrix degradációjához is. Megfigyeltük, hogy a peroxinitrit a hidrogén-peroxidhoz hasonló, koncentrációfüggő módon gátolta a HD-kultúrák matrixtermelését. Az oxidáló ágensek hatására a sejtek proliferációs rátája és mitochondriális aktivitása, valamint a porcdifferenciáció markergénje, a Sox9 mRNS- és fehérjeexpressziója egyaránt lecsökkent. Ezzel párhuzamosan az oxidatív stressznek kitett sejtekben a cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció megemelkedett.

A reaktív oxigén- és nitrogéngyökök elsősorban genotoxikus hatásaik révén károsítják a sejteket, melynek következtében a poli(ADP-ribóz)-polimeráz enzim aktivitásának fokozódása figyelhető meg. A PAR-polimerek hatására az enzimek működése módosul, s ezáltal számos, többek között a DNS-repair



folyamataiban szerepet játszó fehérje aktiválódik. A PARP túlzott mértékű aktivációja azonban a sejt  $\text{NAD}^+$ - és ATP-készleteinek kimerítése következtében már káros hatású, ami a sejteket végső soron öngyilkosságba kergeti.

Mivel a 3-AB-előkezelések a sejtproliferáció-csökkenést nem tudták kivédeni, feltételezhetjük, hogy a reaktív oxigén- és nitrogénygyökök a PARP-tól független útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat a sejtosztódásra, például a sejtosztódást szabályozó bizonyos enzimek szerkezetének módosításával. A mitochondriális aktivitásban bekövetkező csökkenést a 3-AB-előkezelések képesek voltak kivédeni, így valószínű, hogy a HD-kultúrák sejtjeinek túlélőképességére utaló paramétert PARP-dependens folyamatok befolyásolják. A HD-kultúrák sejtjeiben  $\text{NAD}^+$ -depleciót csak a nagy koncentrációjú reaktív oxigén- és nitrogénygyökök alkalmazása okozott. A PARP aktivitására és működésére az enzim terméke, a PAR-polimerek kimutatása adta a legfőbb bizonyítékát. Kontroll körülmények között nem tudunk detektálható mennyiségű polimert kimutatni a HD-kultúrák sejtjeiben, oxidatív stressz hatására azonban határozott jeleket kaptunk. Érdekes megfigyelésünk, hogy a kezeletlen kontroll kultúrák sejtjeinek magvacskáiban polimerek vannak, melyek a 30 perces 3-AB-előkezelések hatására sem eliminálódtak.

Az irodalomban az eredmények megoszlanak a chondrogenézis és a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok kapcsolatának tekintetében. Saját eredményeink alapján kísérleti rendszerünkben a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit egyaránt PARP-dependens módon gátolták a porcmatrix-termelést, és minden valószínűség szerint beindítják a 'DNS-károsodás  $\rightarrow$  PARP-aktiválódás  $\rightarrow$  sejt-diszfunkció' útvonalat. Mivel az erőteljes oxidatív stressznek kitett sejtekben a cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációja a magas ionofor-koncentrációk alkalmazásával összevethető mértékű, a kontrollokénál lényegesen magasabb volt, és mindkét kezelés a porcképződés csökkenését vonta maga után, ezért joggal feltételezhetjük, hogy a porcosodó sejteket érő oxidatív stressz részben

Ca<sup>2+</sup>-dependens módon befolyásolja a chondrogenezist. Ennek bizonyítása további kísérleteket igényel.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Felderítettük a differenciálódó chondrogenikus mesenchymalis sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának egyes aspektusait, valamint megfigyeltük, hogy PARP-dependens folyamatok kontroll körülmények között és oxidatív stressz hatásának kitett kultúrák sejtjeiben is hatással vannak a porcmatrix termelésére.

A differenciálódó mesenchymalis sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjának kismértékű megemelése elősegíti a sejtek differenciációs programját, míg a magas, illetve hosszantartó emelkedés már gátló hatású. Megfigyeltük, hogy a cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció csökkentése ugyancsak gátolja a sejtek differenciációs programját. A sejtekben karakterisztikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció-változások detektálhatók a differenciálódással párhuzamosan, melyekre hosszú- és rövidtávú  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció-ingadozások (oszcillációk) egyaránt jellemzőek és a differenciációval közvetlen összefüggésben jelentős cytosol szabad  $\text{Ca}^{2+}$  csúcs jelenik meg. Eredményeink alapján a differenciálódó chondrogenikus sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisa igen nagymértékben függ a külső közeg kalciumtartalmától, amit a belső raktárak vizsgálatával is alátámasztottunk. Sikerült megfigyelnünk, hogy a chondrogenesis pozitív regulátorának tekinthető calcineurin a cytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -változások egyik effektora lehet.

Igazoltuk, hogy az oxidatív stressz fokozza a HD-kultúrák sejtjeiben a poli(ADP-riboz)ilációs mechanizmusokat, ami végső soron a porcképződés csökkenéséhez vezet. Az, hogy a PARP-inhibitor 3-AB önmagában is jelentős hatást – a matrixképződés erőteljes fokozását – váltott ki, arra utal, hogy a poli(ADP-riboz)-ilációs folyamatok a matrixtermelés negatív regulátorai lehetnek. Mivel az erőteljes oxidatív stressz jelentősen megemelte az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt is, így a PARP-dependens szabályozás mellett  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny jelátviteli folyamatok módosulása is szerepet játszhat annak porcképződést gátló hatásában.

## KÖZLEMÉNYEK

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*

Zákány R, Bakondi E, Juhász T, Matta C, Szíjgyártó Z, Erdélyi K, Szabó E, Módis L, Virág L, Gergely P.: Oxidative stress-induced poly(ADP-ribose)ation in chick limb bud-derived chondrocytes. *Int J Mol Med* 2007, 4:597–605. (IF: 1,847)

Matta C\*, Fodor J\*, Szíjgyártó Zs, Juhász T, Gergely P, Csernoch L, Zákány R: Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> 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(3):310–323. (IF: 4,338<sup>#</sup>) \*: megosztott első szerzők

### *Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények*

Zákány R, Szíjgyártó Zs, Matta C, Juhász T, Csontos C, Szűcs 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. *Experimental Cell Research* 2005, **305**:190-199. (IF: 4,148)

Juhász T, Matta C, Veress G, Nagy G, Szíjgyártó Z, Molnár Z, Fodor J, Zákány R, Gergely P: Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35. *Int J Onc* 2009, **34**:995-1003. (IF: 2,295<sup>#</sup>)

Fodor J\*, Matta C\*, Juhász T, Oláh T, Gönczi M, Szíjgyártó Z, Gergely P, Csernoch L, Zákány R: Ionotropic Purinergic Receptor P2X<sub>4</sub> is Involved in the Regulation of Chondrogenesis in Chicken Micromass Cell Cultures. Közlésre elfogadva: *Cell Calcium* (2009) (IF: 4,338<sup>#</sup>) \*: megosztott első szerzők

### *Tudományos mutatók*

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 6,185

Kumulatív impakt faktor: 16,966

Független citációk száma: 7

<sup>#</sup>: az értekezés elkészültekor még nem álltak rendelkezésre a 2008-as impakt faktorok, ezért az így jelölt adatok a 2007-es évre vonatkoznak.

*Az értekezés témájához kapcsolódó előadások*

Zákány Róza, Szíjgyártó Zsolt, Bakondi Edina, Virág László, Czifra Gabriella, Szűcs Kornélia, Juhász Tamás, Matta Csaba, Bíró Tamás, Módis László, Gergely Pál: Az oxidatív stressz hatásai az *in vitro* porcdifferenciációra. II. Jelátviteli Konferencia, Hőgyész (2003)

Zákány Róza, Szíjgyártó Zsolt, Juhász Tamás, Matta Csaba, Szűcs Kornélia, Czifra Gabriella, Bíró Tamás, Módis László, Gergely Pál: A porcdifferenciációt szabályozó jelátviteli pályák változásai az oxidatív stressz során. XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs (2004)

Matta Csaba, Juhász Tamás, Bakondi Edina, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza, Virág László: A poli(ADP-ribozil)áció változása oxidatív stressz hatására kondrogenikus primer sejt kultúrákban. XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger (2005)

Matta Csaba, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az oxidatív stressz befolyásolja a poli(ADP-ribozil)ációt a porcosodó high density kultúrákban. Magyar Anatómus Társaság XIII. Kongresszusa, Pécs (2005)

Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Deli Tamás, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az intracelluláris Ca-koncentráció változásai az *in vitro* porcdifferenciáció során. Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs

Zákány Róza, Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál: Kalcium-érzékeny jelátviteli útvonalak az *in vitro* porcképződés szabályozásában. Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs

Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az *in vitro* porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció-változások. 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg (2008)

*Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek*

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-változások vizsgálata. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest (2006)

Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Csernoch László, Szíjgyártó Zsolt, Gergely Pál, Zákány Róza: Ionotrop purinoreceptorok szerepe a porcképződésben. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred (2007)

Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Zákány Róza: Ionotrop purinerg receptorok a differenciálódó kondrocitákon. Magyar Biokémia Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen (2007)

Sebe Attila, Panyi György, Zákány Róza, Juhász Tamás, Matta Csaba, Varga Zoltán: Ioncsatornák szerepe differenciálódó porcsejteken. 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg (2008)

Fodor János, Matta Csaba, Oláh Tamás, Gönczi Mónika, Juhász Tamás, Csernoch László, Zákány Róza, Gergely Pál: A primer porcsejtek purinerg-dependens differenciálódása. 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg (2008)

Juhász Tamás, Szentésiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Fodor János, Karácsonyi Zoltán, Csernoch László, Zákány Róza: NMDA-receptorok a differenciálódó porcsejteken. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen (2008)

Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásainak vizsgálata az *in vitro* porcdifferenciáció során. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen (2008)

Attila Sebe, György Panyi, Roza Zakany, Tamas Juhasz, Csaba Matta, Zoltan Varga: The Role of Ion Channels in Differentiating Chondrocytes. *Bio-physical Journal*, (February 2009), Volume 96, Issue 3, Supplement 1, Page 670, 3458-Pos