

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A kalciumhomeosztázis regulációjában szerepet játszó fehérjék vizsgálata porc- és vázizomsejtekben

Tóth Adrienn

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN
2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés.....	6
Irodalmi áttekintés.....	6
A porc- és a vázizomszövet közös mezenhimális eredete	6
A porcszövet	7
A porc fejlődése, táplálása, öregedése	7
A hialinporc felépítése	8
A porcdifferenciálódás tanulmányozására szolgáló modellek.....	10
A porcdifferenciálódás lépései.....	12
A porcdifferenciálódás intracelluláris szabályozása	12
Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szerepe a differenciálódási folyamatban	13
Purinreceptorok.....	15
A vázizom.....	17
A vázizomsejtek.....	17
A vázizom morfológiai sajátosságai.....	18
Izomfejlődés.....	19
A vázizom élettani sajátosságai	20
Rianodin receptor (RyR).....	21
Szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATP-áz (SERCA)	21
Az intracelluláris kalcium sejtelettani jelentősége az izomfejlődés során.....	23
Célkitűzés.....	25
Anyagok és módszerek.....	27
Sejtkultúrák.....	27
Porctenyészet	27
C2C12 vázizomsejtek	28
Liposzóma mediált transzfekció.....	28
Immuncitokémia.....	30
RT-PCR analízis.....	31
Fehérjeminták készítése.....	34
Western-blot analízis	34
Egyedi sejteken történő fluoreszcens intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -mérés.....	36
A sejtprolifерáció és differenciáció vizsgálata.....	40

Kalcineurin-enzimaktivitás mérése	40
Statisztikai analízis	41
Eredmények.....	42
Eredmények I.-Porcszövet.....	42
Az IP ₃ -receptoron keresztül, a belső raktárból felszabaduló Ca ²⁺ spontán Ca ²⁺ -tranzienseket okoz CPC sejteken	42
A belső Ca ²⁺ -raktár fehérjéinek expressziós vizsgálata	46
A Ca ²⁺ -tranziensek kialakításában szerepet játszó szignalizációs útvonal felderítése	46
Az ATP szerepének vizsgálata a spontán Ca ²⁺ -oszcillációk kialakulásában.....	52
Eredmények II.-Vázizomszövet	53
C2C12 sejtenyészetek, transzfekció	53
A vázizom Ca ²⁺ -homeosztázisában és differenciálódásában résztvevő fehérjék expressziós mintázatainak alakulása a csökkent SERCA1b fehérjeszint hatására	54
A csökkent SERCA expresszió hatása a Ca ²⁺ -homeosztázisra.....	56
A SERCA1b csökkent expressziója módosítja a differenciálódó izom növekedését	61
Megbeszélés	66
Porcszövet-kondroprogenitor sejtenyészetek	66
A citoszólikus [Ca ²⁺] dinamikus változása	66
A kondroprogenitor sejtek belső Ca ²⁺ -raktárának funkcionális jellemzése és szerepe a Ca ²⁺ -oszcilláció kialakításában	67
Purinerg szignalizáció és a Ca ²⁺ -oszcilláció autokrin/parakrin szabályozása	68
Vázizomszövet-C2C12 sejtenyészetek.....	70
A SERCA1b fehérje expresszió csökkenése és a Ca ²⁺ -homeosztázisban résztvevő fehérjék expressziójára gyakorolt hatása	70
Az elektromechanikai csatolás vizsgálata kontroll és SERCA1b specifikus shRNS-sel transzfektált sejtekben.....	72
Összefoglalás.....	75
Summary	77
Irodalomjegyzék.....	79
Közleménylista.....	90
Idézhető, angol nyelvű absztraktok:	92
Angol nyelvű posztterek:	92
Magyar nyelvű posztterek:	93
Előadások:	93
Köszönetnyilvánítás	94

Rövidítések jegyzéke

7TM receptor: 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptor

$[Ca^{2+}]_e$: extracelluláris kalciumkoncentráció

$[Ca^{2+}]_i$: intracelluláris kalciumkoncentráció

2-APB: 2-aminoethoxidifenil borát

ATP: adenzin-trifoszfát

ATP γ S: adenzin-5'-O-(3-tiotrifoszfát)

ADP: adenzin-difoszfát

AdoraR-1/2A/2B/3: adenzin receptor 1/2A/2B/3

AMP: adenzin-monofoszfát

AM: acetoxi-metilészter

4-AP: 4-aminopiridin

BCA: bicinchoninic acid

BMP: bone morphogenic protein, csont morfogenetikus fehérje

BSA: bovine serum albumin, borjúsérum albumin

CaN: calcineurin, kalcineurin

Ca $_{\text{pan}}$: feszültségfüggő Ca $^{2+}$ -csatorna

CCPA: 2-Chloro-N 6 -cyclopentyladenosine

CICR: calcium-induced calcium release, kalcium-indukált kalciumfelszabadulás

CMF-PBS: Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ free phosphate-buffered saline, Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -mentes foszfát puffer oldat

COMP: cartilage oligomeric matrix protein, porc mátrix fehérje

CPA: cyclopiazonic acid, ciklopiazonsav

CPC: kondro progenitor cell, kondroprogenitor sejt

CRAC: Ca $^{2+}$ release activated Ca $^{2+}$ channel, Ca $^{2+}$ -felszabadulás által aktivált Ca $^{2+}$ -csatorna

CREB: cAMP response element-binding protein, cAMP-re reagáló elem

CSQ: calsequestrin, kalszekvesztrin

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole

DHPR: dihydropyridin receptor, dihidropiridin-receptor

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, Dulbecco által módosított Eagle-féle médium

ECC: excitation-contraction coupling, elektromechanikai csatolás

ECM: extracellular matrix, extracelluláris mátrix

ER: endoplasmic reticulum, endoplazmatikus retikulum

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, extracelluláris szignál szabályozta kináz 1 és 2

ESCs: embryonic stem cells, embrionális őssejtek

FBS: foetal bovine serum, főtális borjúsérum

FGF: fibroblast growth factor, fibroblaszt növekedési faktor

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

FTHM: full time at half maximum, időbeli féltértékszélesség

GAG: glükózaminoglikán

G-protein: guanin nukleotid kötő protein

GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

HD: high density cell culture, nagy sűrűségű sejtenyészet

HMG: high mobility group, nagy mobilitású csoport

HRP: horse-radish peroxidase, tormaperoxidáz

HS: horse serum, lószérum

IP $_3$: inozitol 1,4,5-triszfoszfát

IP $_3$ R: inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor

IP $_3$ R-1/2/3: inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor 1/2/3 altípusa

JNK: c-Jun N-terminal kinase, c-jun N-terminális kináz

KO egér: knockout egér

MAPK: mitogen-activated protein kinase, mitogén-aktivált protein kináz

MCIP1.4: modulatory calcineurin interacting protein

2-MeS-ATP: 2-metiltio-ATP

MyoD: myogenic transcription factor, miogenikus transzkripció faktor

MSC: mesenchymal stem cell, humán mezenhimális őssejt

NFAT: nuclear factor of activated T-cells, aktivált T-sejtek nukleáris faktora

NCX: Na^+ - Ca^{2+} exchanger, Na^+ - Ca^{2+} -cserélő fehérje

NMDA: N-metil-D-aszpartát

NTY: normál Tyrode-oldat

PBS: phosphate-buffered saline, foszfát puffer-oldat

PCR: polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció

PKA: protein kináz A

PKC: protein kináz C

PLC: foszfolipáz C

pLP1/2: proteolipid protein 1, 2 fehérjék

PMCA: plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz

PP2A: protein-foszfátáz 2A

PP2B: protein-foszfátáz 2B

PSM: presomitic mesoderm, presomítikus mezoderma

PTI: Photon Technology International

PV_{max} : a Ca^{2+} -pumpa maximális transzportkapacitása

ROCC: receptor-operated calcium channel, ligand-vagy receptorvezérelt Ca^{2+} -csatornák

RT-PCR: reverz transzkripció polimeráz láncreakció

RyR: ryanodine receptor, rianodinreceptor

RyR1/2/3: ryanodine receptor type1/2/3, rianodinreceptor 1/2/3 altípusa

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, Na^+ -dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis

SE: standard error, standard hiba

SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, szarko-endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz

SERCA1a/1b/2a/2b/3: szarko- endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz 1a/1b/2a/2b/3 izoformái

siRNS: kis interferáló RNS

shRNS: small hairpin RNS

SMOC: second messenger-operated channel, másodlagos messengerek szabályozta Ca^{2+} -csatornák

SOCE: store-operated calcium-entry, raktár által vezérelt kalciumbelépés

suramin: 8-(3-benzamido-4-metilbenzamido)-naftalén-1,3,5-triszulfonsav

SR: szarkoplazmatikus retikulum

STIM1: stromal interaction molecule 1, sztrómális kölcsönható molekula 1. altípusa

TG: thapsigargin, tapszigargin

TM: transmembrane, transzmembrán

VICR: Voltage Induced Calcium Release, feszültség által kiváltott kalciumfelszabadulás

VOCC: voltage-operated calcium channel, feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák

VSVG: *Vesicular stomatitis Indiana virus* G-proteinje

YM-58483: 4-metil-40-[3,5-bisz(trifluorometil)-1pirazol-1-yl]-1,2,3-tiadiazol-5-karboxanilid

Key words: skeletal muscle, sarcoplasmic reticulum, SERCA1b protein, store operated Ca^{2+} -entry (SOCE), purinergic receptor, single cell Ca^{2+} -measurement, Ca^{2+} -oscillations

Kulcsszavak: vázizom, szarkoplazmatikus retikulum, SERCA1b fehérje, raktár által vezérelt kalciumbelépés (SOCE), purinreceptorok, egyedi sejten történő Ca^{2+} -mérés, Ca^{2+} -oszcilláció

Bevezetés

Irodalmi áttekintés

A porc- és a vázizomszövet közös mezenhimális eredete

A mozgásszervi megbetegedések - különösképpen az ízületi porckopás és a különböző degeneratív ízületi betegségek - az 50 éven felüli lakosság körében leggyakrabban előforduló, az életminőséget jelentősen rontó elváltozások. Az *oszteoarthritisz (OA)* és a *reumatoid arthritisz* az ENSZ Egészségügyi Világszervezete jóslatai alapján 2020-ra a negyedik vezető ok lesz a mozgáskorlátozottság kialakulásában [1,2]. Nem elhanyagolható továbbá a szerzett vagy öröklött vázizombetegségek – disztrófiák, miozitiszek, miopáthiák – előfordulási gyakorisága sem, amelyek mind a tünetek alapján, mind pedig a nemek között nagy heterogenitást mutatnak. Figyelembe véve azt, hogy e betegségek súlyos formái leginkább az idősebb korosztályt érintik, és napjaink vezető problémái közé tartozik a társadalom elöregedése, ezért ezekkel a problémákkal a közeljövőben még hangsúlyosabban kell foglalkoznunk. Így munkánk során a legfontosabb céljaink között szerepelt az érintett szövetek, így a porcszövet és izomszövet részletesebb feltérképezése.

A porc- és vázizomszövet egyedfejlődése a gerincesekben sok szempontból megegyezik: a gasztruláció során a *paraxiális mezoderma* elkülönül az *axiális és laterális mezodermától*, és a velőcső két oldalán szegmentálatlan mezodermacsíkot hoz létre, amit az irodalom *preszomitikus mezodermának* (PSM) nevez. A PSM kialakulását követően jön létre gerincesekben a tengelyváz, valamint a törzs- és a végtagizmok. A szegmentálatlan PSM különböző molekuláris és morfogenetikai változásokon esik át a szegmentálódásig, mely következményeként jönnek létre a szomiták. A 4. hét kezdetére a szomiták ventrális és mediális falát alkotó sejtjei elveszítik addigi kompakt szerveződésüket, a gerinchúr irányába vándorolnak, majd körülveszik azt létrehozva a *szklerotomot*, ami az embrionális mezenhima laza szövetét alkotja. A *miotóm* és *dermatóm* a dorzális szomitafal sejtjeiből áll. A korai embrionális élet során több csíralemez sejtjei is porcszövetté differenciálódhatnak. Testünk porcszöveitei a fej-nyak régió kivételével a középső csíralemez származékai: a törzs csontjainak vázát adó porckezdemények a *paraxiális mezoderma* szegmentálódásaként létrejövő szomiták *szklerotom* komponenseiből fejlődnek, míg a végtagtelepek porctemplátjai a *lateralis mezodermából* kialakult mezenhimális szövet származékai. A fej-nyaki régió porcképződményeiért a *velőléc (crista neuralis)* sejtjei felelősek. Az izomszövet prekursor

sejtjei (*premioblasztok*) a miotóm sejtjeinek osztódásával alakulnak ki, és további fejlődéssel és fúzióval képezik a vázizomrostokat [3].

A porcszövet

A porcszövet egy olyan speciális szövet, amely nemcsak az embrionális korban, hanem a kifejtett egyedek esetében is sokrétű feladattal bír. Ez a speciális kötő- és támasztószövet a korai embrionális korban strukturális támaszt nyújt, majd az egyedfejlődés egy későbbi szakaszában ebből a szövetből, *endokondriális csontosodással* alakul ki a csontok váza. Gyermekek- és serdülőkorban a csontosodási folyamat során a porcszövet csak részben alakul át csontszövvé, az *epifízis-porckorong* területén, valamint az *ízületi porc* formájában megmarad. Az *epifízis-porckorong* a gyors hossznövekedésért felelős, ezért csak a pubertás kor befejeztéig funkcionál, míg az *ízületi porc* az egész életünk folyamán megmarad [4]. Porcszövet található továbbá a fej és az arc számos területén (orr, fül) is.

A már kialakult porcszövet nem egységes: a makroszkópos és mikroszkópos morfológiai sajátosságok eltérőek lehetnek alaki és funkcionális szempontból, továbbá az extracelluláris mátrixot (ECM) tekintve, szerkezeti és biomechanikai szempontból is eltérések figyelhetők meg. Ezek alapján a porcszövetet három nagy csoportba soroljuk: *hialinporc* (*üvegporc*), *elasztikus porc* és *rostos porc*. Jelen értekezés tárgya a hialinporc, ezért részletesen csak ezzel foglalkozom.

A porc fejlődése, táplálása, öregedése

A porc kialakulásának első lépése a *mezenhimális sejtek* gyors szaporodása, melyek a későbbi porctelepnek megfelelően *blasztémát* (sűrűn elhelyezkedő sejtekből álló csoport) képeznek. A sejtek lekerekednek, majd maguk körül porcmátrixot termelnek, ezáltal széttolódnak egymástól. Az így kialakult *kondroblasztok* limitáltan osztódnak, de a sejteket a kialakult porcudvar már nem engedi széttolódnak egymástól. Ezt a növekedést *intersticiális növekedésnek* nevezzük, amely leginkább az embrionális fejlődésre jellemző. A porcszövet a felszín felől képződő, új porcszövet ráakódásával is növekedhet, amit *appozicionális növekedésnek* nevezünk. E folyamat során a porchártya belső rétegét képező sejtek, a *kondroblasztok* differenciálódnak. A kezdetben ellapult alakból kerekdeddé válnak. A differenciált porcsejtek a növekedés befejezte után normális körülmények között már nem osztódnak tovább. Ezért a porc sérülése esetén, felnőtt korban a regeneráció minimális, így az elpusztult porcszövet helyét csont- vagy tömött kötőszövet tölti ki.

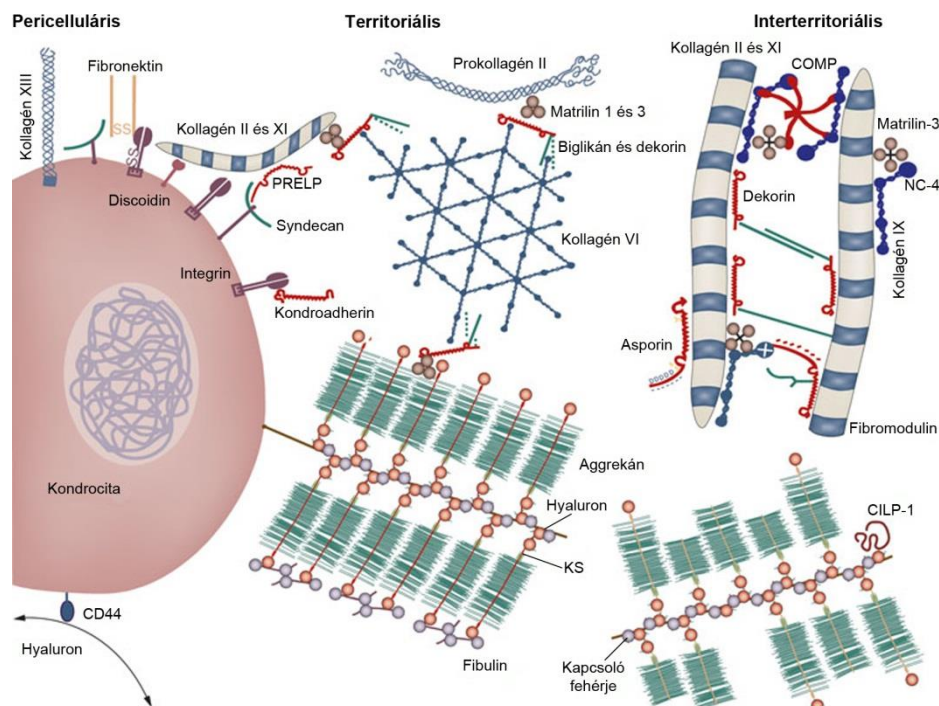
A porc érmentes szövet, egészséges porcszövetben ereket csak kivételes esetben találunk. A porcsejteknek, a többi sejttől eltérően, lassú és anaerob jellegű anyagcseréje van. A porchártya ereiből, a környező szövetekből vagy épp a szinoviális folyadékból (ízületi porcok esetében) kapják a tápanyagokat, amelyek a porcmátrixon keresztül diffundálnak [5].

A porcnak, úgy, mint más szövetfeleségeknél is, az élet folyamán bizonyos szintű adaptációt kell mutatnia a környezeti megterhelésekkel szemben. A lebomló mátrix egyes komponenseit a porcsejtek újratermelik bonyolult jelátviteli mechanizmusokon keresztül. A kor előrehaladtával a *kondrociták* alkalmazkodóképessége csökken, és a porcmátrix is kémiai változásokon megy keresztül. Ezért idősebb korban gyakran előfordul, hogy testünk egyes részein a porcszövet elmeszesedik, elcsontosodik. Az ízületi porc regenerációjának csaknem teljes hiánya miatt napjainkban egyre szélesebb körben alkalmazzák az ún. mozaikplasztikai eljárást. A kis és közepes porchiányok (1-2,5 cm²) kezelésére ajánlott műtéti eljárás alapötlete, hogy a térdízületi porcborításából azon részeket, melyek nem vesznek részt a teherviselésben, kis henger alakban szabadon eltávolítva beültetik a porchiány helyére. A beültetett porcos-csontos hengerek a befogadó csontba beépülnek, és körülbelül fél-egy év elteltével az ízület porcborítása teljes egészében épnek tűnik. A módszer hátránya, hogy a hengerek a saját ízületből kerülnek eltávolításra, emiatt az érintett területen fájdalom jelentkezhet [6].

A hialinporc felépítése

Felnőtt szervezetben a hialinporcnak három megjelenési formája van: *ízületi porc*, *állandósult porc* (gége, légcső, bronchusok), valamint az endokondriális csontosodással kialakuló csontok alakjának stabilitását szolgáló porcok [7]. A hialinporcot a porchártya veszi körül. Külső lemeze (*stratum fibrosum*) főként I-es típusú kollagénrostokat tartalmaz, szerepe a túlzott hajlítás következtében esetlegesen létrejövő törés elleni védelem. Belső lemeze (*stratum chondroblasticum*) differenciálatlan sejteket tartalmaz, amelyek a porc növekedésének stádiumában *kondroblasztokká* alakulnak, porcmátrixot termelnek. A porchártyában találjuk az ereket és az érző idegvégződéseket is. A porcsejtek az alapállományban csoportokat alkotnak, ún. *kondront* létrehozva [5]. A sejteket közvetlenül a *pericelluláris mátrix* határolja. Mivel a kondrocitákat az itt elhelyezkedő makromolekulák (VI. kollagén, dekorin, laminin, szulfatált proteoglikánok) kapcsolják a mátrixhoz, a pericellularis mátrix jelenlévő negatív töltésű molekulák igen nagy koncentrációja miatt erősen bazofil festődésű *porctokként* jelenik meg. Körülötte találhatjuk meg a *territoriális*

mátrixot vagy másnéven *porcudvart*, amely a nagy koncentrációban jelenlévő proteoglikánok miatt szintén bazofil festődést mutat. A kondronok közötti halványabb festődésű területet *interterritoriális mátrix*nak nevezzük, amely kollagénben gazdag [7].



1. ábra: A porcszövet vázlatos felépítése. A kondrocita és az azt körülvevő mátrixkomponensek szerveződése. (CILP-1: pirofoszfo-hidroláz 1; COMP: porc mátrix fehérje; KS: keratán szulfát; PRELP: prolin, arginin és leucin gazdag fehérje, [8])

A csoportosan elhelyezkedő differenciált porcsejtek kerekded alakúak, egy vagy több sejtmagot tartalmaznak. A fiatal, mátrixtermelésben aktívabb sejtekben fejlett, durva felszínű endoplazmatikus retikulum és terjedelmes Golgi-apparátus figyelhető meg. Ezek a sejtek a porchártyához közel helyezkednek el. Ezzel ellentétben a kevésbé aktív, idősebb sejtek többnyire a porc belsejében találhatóak meg, kevesebb sejtorganelumot tartalmaznak, citoplazmájuk jelentős részét glikogén és zsírcseppek töltik ki.

A porcszövet jellegzetes mechanikai sajátságait a kollagénrostok, proteoglikánok, a hialuronsav és a különböző glikoproteinből felépülő mátrix adja (1. ábra). A porcban főleg a *II-es típusú kollagén* molekula fordul elő. A II-es típusú kollagénhez a fibrillumok alkotórészeként kis mennyiségben a XI-es és IX-es típusú kollagénmolekulák csatlakoznak, melyek a többi mátrixalkotót kapcsolják a kollagénhálózathoz. A X-es típusú kollagén a kollagénfibrillumok szabályos hálózatba történő szervezésében játszik szerepet, és az epifízis

porckorong hipertrófiás és degenerációs zónájának egyik alkotóeleme. A VI-os típusú kollagén a kondrociták és a mátrix közötti kapcsolat fenntartásában játszik fontos szerepet.

A porcszövetben található *proteoglikánok* legjelentősebb képviselője az aggregán. Az aggregán központi fehérjeszállához kovalens kötással kondroitinszulfátot és keratán szulfátot tartalmazó glükózaminoglikán- (GAG) láncok kapcsolódnak. A központi fehérjeszállhoz kötődő nagyszámú GAG-molekula a polianionos jelleg miatt egymást taszítja, ezért a fehérje tengelyére merőlegesen, sugarasan helyezkednek el. Az aggregán további jellegzetessége, hogy a hialuronsavhoz kapcsolódva hatalmas proteoglikán-aggregátumokat hoznak létre, melyeket az ún. kötőfehérje erősít egymáshoz. A porcszövet 60-78%-a víz, és ennek nagy része a proteoglikán-aggregátumokhoz kötődik, mert a GAG-láncok polianionos tulajdonságuk miatt jelentős vízkötő-kapacitással rendelkeznek.

A porcmátrix makromolekuláinak harmadik csoportjába a *járvulékos fehérjék* tartoznak. Ezek a molekulák csak kis mennyiségben vannak jelen, de a porcszövet szerkezetének kialakításában, a porc működésében, illetve a porcmátrix és a kondrociták közötti kapcsolattartásban elengedhetetlen a szerepük. Ide tartozik például a kondrokalcin, a porcmátrix-protein (CMP), valamint a kondronektin és fibronektin is. Sok tanulmány foglalkozik a matrilin-1 és -3 mátrixfehérje szerepével is [9].

A porcdifferenciálódás tanulmányozására szolgáló modellek

A porckutatás már régóta foglalkoztatja a kutatókat, mert igen sok olyan kóros állapotot ismerünk, melyek valamilyen módon kapcsolatba hozhatóak a porcszövet rendellenes fejlődésével vagy működésével [4]. A porcszövet differenciálódása a korai embrionális életben zajlik, ezért *in vivo* nehezen tanulmányozható. Ezért számos olyan *in vitro* modellt fejlesztettek ki és írtak le az elmúlt évtizedek során, amelyek megteremtik a porcdifferenciálódás vizsgálatának lehetőségét. Az első ilyen jellegű tudományos eredmény a 70-es évekből származik, amikor is Reddi és Huggins megalapozták a porcdifferenciálódás tanulmányozására szolgáló modellek létrejöttét [10]. A 80-as évek elejére Thompsonnak és munkatársainak sikerült létrehozni egy olyan *in vitro* modellt, amelynek segítségével tanulmányozni tudták embrionális patkányból származó mezenhimális összejték kondrogén irányba történő indukcióját, proliferációját és differenciálódását is [11]. A porcregeneráció lehetőségeinek minél alaposabb megismeréséhez szükség van a bonyolult jelátviteli folyamatok felderítéséhez, melyeket a modellek létrejötte nélkül nehezen lehetne tanulmányozni.

Az egyik legáltalánosabban elterjedt *in vitro* porcdifferenciálódás modell a Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumban [12] lévő csirkeembriók mellső és hátsó végtagtelepeiből izolált, elsősorban kondroprogenitor mezenhimális sejtekből álló primer, nagy sejtsűrűségű, ún. high density (HD) sejttenyészet [13,14]. Ezek a sejttenyészetek a mezenhimális sejtpopuláción kívül nagy számban tartalmaznak fibroblasztokat, valamint elenyésző számú mioblasztot és hámsejtet is. Ez utóbbiak az alkalmazott tenyésztési körülmények között nem fejlődnek tovább. A modell előnye, hogy a kondrogenikus mezenhimális sejtek külső faktorok hozzáadása nélkül hajtják végre a differenciálódást, és a 6. nap végére spontán porcsejtekke alakulnak. Habár az *in vivo* és *in vitro* porcdifferenciálódás alapvetően hasonlóan megy végbe, de vannak lényegi különbségek is. A fejlődő embrióban szigorúan meghatározott módon megy végbe a fejlődés, porcszigetek képződése zajlik, míg az *in vitro* sejt kultúrákban gyakorlatilag homogén eloszlású és amorf szerkezetű porcszövet alakul ki. Ez lényeges szempont, amikor a modell segítségével szerzett eredményeinket az élő szervezetben lejátszódó folyamatokban szeretnénk alkalmazni. A modell jó reprodukálhatóságát a legfrissebb közlemények is alátámasztják [15,16,17]. Az elmúlt évek során rágcslókból származó multipotens mezenhimális sejt vonalat is létrehoztak, így például a C3H10T1/2 eger eredetű vagy a RCJ 3.1 patkány eredetű sejt vonalakat. Ezeknek a sejt kultúráknak a jellegzetessége, hogy a mikrokörnyezeti paraméterek és a médium változtatásával nem csupán porcsejtekke, hanem vázizom-, csont- vagy esetleg zsírsejtekke is differenciálódhatnak [18,19,20].

Jelen értekezésem egyik részét a humán kondrogenikus progenitor sejtekkel (CPC-kkel) végzett kísérletek képezik. Ezek a sejtek olyan oszteoartritiszes területről származnak, amelyek leginkább érintettek az oszteoarthritisz következményeként kialakult elváltozástól, és migratorikus tulajdonsággal rendelkeznek. A CPC-k az őssejtekre jellemző felszíni markerekkel, és az őssejtekéhez hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például a klonogenitás, a migratorikus aktivitás és a multipotencialitás. A CPC-k mind oszteogénikus, mind kondrogenikus transzkripció faktorokat expresszálnak (*Runx2* és *Sox9*) [21], és *in vivo* csak kis mértékben képesek a regenerációra. A porcsejtek működésének megértéséhez, fontos megvizsgálni a szignalizációs útvonalakat, amelyek hozzájárulhatnak az extracelluláris mátrix zavartalan szintéziséhez, és a regenerációs folyamat zavartalan létrejöttéhez. A modell létrehozását az „Anyagok és módszerek” fejezet bővebben taglalja.

A porcdifferenciálódás lépései

A porcdifferenciálódás kezdeti lépéseként a kondrogenikus sejtek sejtaggregátumokba, ún. *nodulusok*ba csoportosulnak. A differenciálódás ezen szakaszában még nem történik morfológiai változás, ezért az aggregálódott sejtek morfológiailag megkülönböztethetetlenek a többi mezenhimális sejttől. Ezen fejlődési stádiumban elengedhetetlenek a sejt-sejt közötti kapcsolatok kialakításáért felelős molekulák (N-CAM, N-cadherin) expressziója [22,23]. A második és harmadik napon a kialakult nodulusok sejtjei elvesztik fibroblaszt-szerű morfológiájukat, és kerekded porcsejteké differenciálódnak [13,24]. A szomszédos sejtek között számos réskapcsolat (gap junction) alakul ki [25]. A differenciálódásban fontos szerepet játszó citokinek és növekedési faktorok a protein kinázokon és foszfatázokon keresztül fejtik ki hatásukat. A csont morfogenetikus fehérjék (BMP) és a fibroblaszt növekedési faktorok (FGF) jelentősen befolyásolják a porcképződést [26]. Továbbá a D-vitamin, a retinoidok, ill. a kondroitin- és glükózamin-szulfátok jelenléte is elengedhetetlen, amelyek szerepéről az irodalomban is találunk adatokat [27]. Fontos szerepe van az ECM-nek is, amely szintén módosuláson megy keresztül. Kezdetben megnő, majd csökken a fibronektin mennyisége, mivel a fibronektinben gazdag mátrix a későbbi fázisban gátolja a porcképződést. Megjelenik továbbá a tenascin-C, a hialuronsav [28,29], valamint az I. típusú kollagén is [30].

A porcdifferenciálódás intracelluláris szabályozása

Az intracelluláris szabályozás olyan precízen szabályzott folyamat, melynek zavartalan működéséért *transzkripciós faktorok* felelősek. A kondrogenézis talán legfontosabb génje, a Sox9, egy HMG (high mobility group)-box típusú DNS-kötő régióval rendelkezik, és a Sox-fehérjékhez tartozó transzkripciós faktort kódol [31]. A Sox9 a BMP-út vonal fontos célgénje, melynek transzkripciója egybeesik a II. típusú kollagén termelésével [32]. A Sox9 expressziójának szabályozásában számos intracelluláris molekula vesz részt.

Az egyik legfontosabb szabályozó molekula a Szerin/Treonin-specifikus protein kinázok közé tartozó *cAMP-függő protein kináz A* (PKA) által valósul meg. Ez az enzim bizonyítottan foszforilálja a Sox9-et, ezzel aktiválva a II. típusú kollagén és az aggregán tengelyfehérjéjének a génjeit [31]. A PKA szintén foszforilálhatja még a CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) molekulát, aminek következtében a cAMP és a BMP-2 szintje megemelkedik [33].

A porcképződésben szintén fontos szerepet tölt be a *protein kináz C* (PKC)-izoenzimcsalád, melynek már több mint 10 izoformája ismert [34]. 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 [35]. Kollaborációs partnerünk (Debreceni Egyetem, ÁOK, Anatómia Intézet) írta le először a PKC μ jelenlétét és szerepét az *in vitro* porcképződés szabályozásában [36]. A PKC izoenzimek közül a PKC α a MAPK (mitogén-aktivált protein kináz)-kaszkádot modulálja [37]. A MAP-kinázok alapvető szereppel bírnak azon folyamatok molekuláris szintű szabályozásában, melyek a sejt belső állapotától függő osztódás vagy differenciálódás, apoptózis vagy túlélés irányát határozzák meg. Mindezekén túl a génexpresszió szabályozását és az extracelluláris környezethez való alkalmazkodást is MAP-kinázok irányítják [38]. A MAP-kinázoknak az eukarióta sejtekben három, egymástól független útvonalát írták már le: az ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), a JNK (Jun N-terminal kinase) és a p38. Míg a JNK- és a p38-MAPK-útvonalakat elsősorban az extracelluláris hatások stimulálják, addig az ERK-útvonal számos sejtípus differenciációjának fontos eleme. A foszforilált (aktív) ERK1/2 a proliferáció irányába tolja a sejtek fejlődési állapotát, ugyanakkor a defoszforilált ERK1/2 a porcképződést és differenciálódást segíti elő.

Ugyancsak leírták már a *protein-foszfataz 2A* (PP2A) porcdifferenciálódás szabályozásában betöltött negatív szerepét az *in vitro* porcfejlődés szabályozásában [36]. Az enzim gátlása a CREB foszforiláltsági szintjének emelésén keresztül fokozza a porcdifferenciálódást. A *protein-foszfataz 2B* (PP2B vagy kalcineurin) egy katalitikus (kalcineurin-A) és egy szabályzó (kalcineurin-B) alegységből áll. A kalcineurin-B alegységen található egy Ca²⁺-kalmodulin-kötőhely, amely lehetővé teszi, hogy az enzimet az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció változásai szabályozzák [39]. Az [Ca²⁺]_i emelkedése a kalcineurin aktivitását fokozza, ami a kondrogenezis egyik fontos transzkripciós faktorának, az NFAT4-nek (*nuclear factor of activated T lymphocytes*) az aktivációjához vezet [40].

Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció szerepe a differenciálódási folyamatban

A kalcium az egyik legismertebb és talán legfontosabb másodlagos hírvivő molekula. Gerincesekben a legnagyobb mennyiségben előforduló kation. A kalcium legnagyobb része a csontokban található hidroxipatitként, ahonnan hormonális hatásokra nagy mennyiségű kalciumion mobilizálható, így az extracelluláris tér szabad kalciumion-homeosztázisa fenntartható (szabad Ca²⁺-koncentráció: ~1,2 mM) [41]. A citoszólban mérhető

koncentrációja ($\sim 10^{-7}$ M) mintegy 4 nagyságrenddel alacsonyabb, mint az extracelluláris tér $[Ca^{2+}]$ -ja. A sejtek élete szempontjából döntő jelentőségű folyamatok, mint a proliferáció, a differenciálódás és apoptózis irányítása Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonalak révén valósul meg. Hasonlóan más, nem ingerlékeny sejtek esetén leírtakhoz, a porcdifferenciálódás szabályozása során is nagyon fontos szerepet játszik az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ precíz beállítása [42,43]. A citoszól Ca^{2+} -tartalma két forrásból: az extracelluláris tér felől és/vagy az intracelluláris Ca^{2+} -raktár irányából emelkedhet. A plazmamembránban elhelyezkedő csatornák 4 csoportra oszthatók. Az első csoportba tartoznak a *feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák* (VOCC, voltage-operated calcium channel), amelyek leginkább az idegsejteken és a harántcsíkolt izomrostokon expresszálódnak. A másik csoportba tartoznak a *ligand- vagy receptorvezérelt Ca^{2+} -csatornák* (ROCC, receptor-operated calcium channel), mint az NMDA-receptor (N-metil-D-aszpartát), amely a kondrocitákon is megtalálható [44], vagy az ionotróp P2X-purinreceptorok [45], melyekről a dolgozat későbbi részében még szó esik. A harmadik csoport tagjai a *másodlagos messengerek által szabályzott Ca^{2+} -csatornák* (SMOC, second messenger-operated channel), melyek egyik tagja a kortikális neuronokban található *diacilglicerol-szenzitív csatorna* [46]. Végül ide tartoznak még a *raktár által vezérelt Ca^{2+} -csatornák* (CRAC, Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels), melyek az intracelluláris raktárak kiürülésekor aktiválódnak, és a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépésért felelősek (SOCE, store-operated Ca^{2+} entry) [47,48].

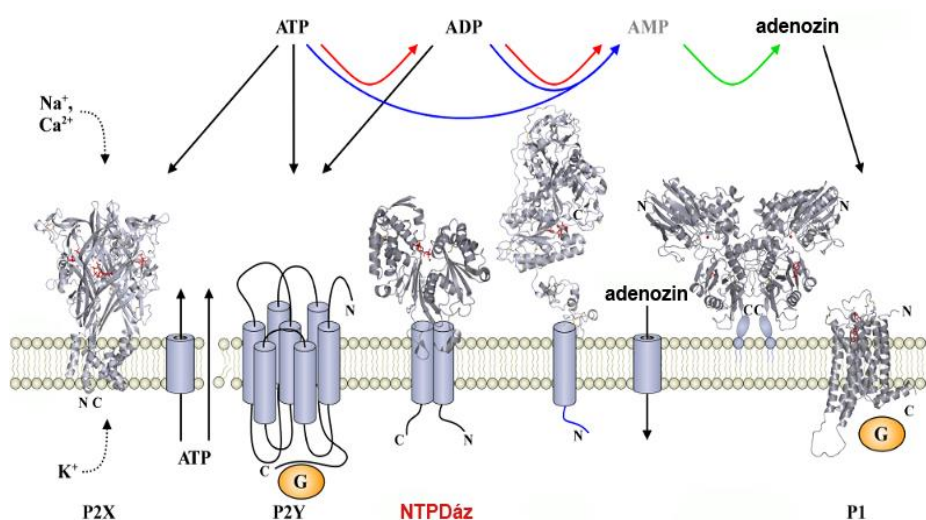
A belső raktár a legtöbb sejt esetében az endoplazmatikus retikulum (ER), míg izomsejtekben a szarkoplazmatikus retikulum (SR). A belső raktárból kétféle csatornán keresztül képes a kalcium kilépni az intracelluláris térbe. Az egyik csoportba az *inozitol-1,4,5-trifoszfát receptorok* (IP_3R) tartoznak. Egy meglehetősen jól feltérképezett receptor családról van szó, melyek tagjai, az IP_3R -1, IP_3R -2 és IP_3R -3, mind szöveti eloszlásuk, mind pedig az expressziós mintázatuk tekintetében heterogenitást mutatnak. A négy alegységből (melyek egyenként mintegy 2700 aminosav hosszúságúak) felépülő Ca^{2+} -csatornák a Ca^{2+} és a foszfolipáz C (PLC) útvonal aktiválódásának eredményeképpen felszabaduló IP_3 megkötésére nyílnak, és az ER lumenében raktározott Ca^{2+} -okat kiengedik a citoszólba [49]. A Ca^{2+} egyben a receptor ligandjaként is működik, és pozitív visszacsatolási folyamat (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release CICR) révén a raktárból további Ca^{2+} -felszabadulást indukál, mindaddig, amíg a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ viszonylag alacsony. Magasabb koncentráció elérése esetén a Ca^{2+} gátolja a további Ca^{2+} -felszabadulást.

A másik csoportba a belső raktárak membránjában lokalizálódó *rianodinreceptor* (RyR) tartozik, melynek részletes bemutatása a bevezetés vázizomra vonatkozó részében található.

Purinreceptorok

A purinerg jelátvitel

Az adenozinvegyületek az evolúció fontos mérföldkövei. A csoportba tartozó ATP szerepe igen sokrétű. Amellett, hogy az ATP (adenozin-trifoszfát) makroerg kötése révén energiaraktárként funkcionál, elengedhetetlen szerepe van a nukleinsavak felépítésében, valamint a jelátviteli folyamatok kialakulásában is. Kimutatták szimpatikus, paraszimpatikus idegvégződésben és a *neuromuszkuláris junkció*ban is. Kétféle módon juthat az extracelluláris térbe: kotranszmitterként exocitózissal vagy sejtlézió során. Az ATP-t az extracelluláris térben az ectoATP-áz bontja ADP-n (adenozin-difoszfát), majd AMP-n (adenozin-monofoszfát) keresztül adenozinra. Ezt követően vagy inozinra bomlik le, vagy pedig visszakerül az idegvégkészülékekbe, ahol újra ATP képződik (2. ábra). Humán mezenhimális őssejtekben (MSC) Kawano és munkatársai rávilágítottak az autokrin/parakrin purinerg szignalizációs hurok szerepére, mely a Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásáért felel. A humán MSC-kben az ATP felszabadulását követően a P2Y₁ receptorok aktiválódnak, majd G_q-proteinen keresztül a PLC útvonalat aktiválják és így IP₃-felszabadítás révén a citoplazma kalcium-koncentrációjának növekedését okozzák [50].



2. ábra: Purinerg szignalizációs folyamatok. A purinerg szignalizációban az ATP szerepe elengedhetetlen. Kotranszmitterként exocitózissal vagy sejtlézió során jut az extracelluláris térbe, ahol az ectoATP-áz bontja ADP-n, majd AMP-n keresztül adenozinra. Az NTPDáz (ekto-nukleozid trifoszfát difoszfahidroláz) az ATP defoszforilálásában játszik szerepet, jelenleg 8 altípusa ismert a humán szervezetben [51].

A purinreceptorok osztályozása

A purinreceptorok, mint azt az irodalomból tudjuk, kitüntetett szereppel bírnak az alapvető biológiai folyamatok létrejöttében. A 2. ábrán jól látható, hogy a purinreceptorok extracelluláris nukleotidokra érzékenyek. Ezeket a receptorokat először idegsejtekben fedezték fel, de nem sokkal később kiderült, hogy szinte minden szövetben megfigyelhető az expressziójuk. Az immunrendszerben például a purinerg szignalizáció hatására aktiválódnak és migrálódnak a makrofágok [52,53]. A purinreceptorokat két nagyobb családra oszthatjuk: a P1-receptorcsalád adenozinra, a P2-receptorcsalád pedig ATP-re, ADP-re és UTP-re érzékeny. Az utóbbi csoport két további altípusra, a P2X- és P2Y-receptorokra osztható [54].

A P1-receptorok négy különböző altípusának mindegyike G proteinhez kapcsolt, 7 transzmembrán domént tartalmazó fehérje. A négy receptortípus a következő: Adora 1 (A_1R), Adora 2 ($A_{2A}R$), Adora 2B ($A_{2B}R$) és Adora 3 (A_3R) [55]. Az Adora 1 receptor agonistája a CCPA (2-Kloro- N^6 -ciklopentiladenozin), antagonistái a metilxantinok. Az Adora 2A agonistái a DPMA (N6-(2-(3,5-dimetoxifenil)-2-(2-metilfenil)etil)adenozin) és a regadenozon, az antagonistái az ATL-444 és MSX-3. Az Adora 2B agonistái a NECA (N-etilkarboxamidoadenozin) és a BAY 60-6583, antagonistái az ATL-801 és MRS-1706. Az Adora 3 agonistái a 2-(1-hexinil)-N-metiladenozin és a CF-101, -102, antagonistái a KF-26777 és a MRS-545. A legfrissebb irodalmi adatok protektív szerepet tulajdonítanak a P1-receptoroknak, például az ateroszklerózisos betegeknek [56].

Az *ionotróp P2X receptoroknak* 7 típusát ismerjük, amelyek a $P2X_{1-7}$ alegységek homo- vagy heteromultimerizációjával jönnek létre [57]. Az alegységek két transzmembrán domént tartalmaznak, intracelluláris C- és N-terminálissal, valamint egy nagy extracelluláris hurokkal rendelkeznek. Amikor az extracelluláris oldal megfelelő helyéhez ATP kötődik, az $[Ca^{2+}]_i$ megnő (közvetlenül a külső térből), és a belépő Ca^{2+} ionok CICR-t indukálnak. A P2X receptorok nyitása emellett depolarizálja a sejtet. Megkülönböztetünk lassan deszenzitizálódó purinreceptorokat, melyek közé a $P2X_2$, $P2X_4$, $P2X_5$ és $P2X_6$ receptor tartozik. Vannak azonban gyorsan deszenzitizálódó receptorok is, így például a $P2X_1$ és $P2X_3$. A $P2X_7$ receptort egy külön csoportba sorolhatjuk, mivel ez a receptor deszenzitizációt nem mutat [58]. A $P2X_7$ receptor fontos szerepet játszik az apoptózisban, és a tumorgenezisben mára elfogadott tumormarker [59]. A szerepét leírták már perifériás idegrendszeri bántalmakban [60], valamint szepszisben is [61].

A *metabotróp P2Y*-csoport tagjai G-proteinhez kapcsolt, 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptorok (7-TM receptorok) [58]. Emlősökben eddig nyolcféle P2Y receptor ismert [62]. A P2Y legkorábban megismert 4 típusa (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆) G_q-proteinen keresztül a PLC-t aktiválja és így IP₃-felszabadítás révén hozza létre a citoplazma kalcium-koncentrációjának növekedését. A másik 4 típus (P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) esetében az aktiválás G_s-proteinen keresztül történik, a gátlás pedig G_i-proteinen keresztül valósul meg. A purinerg receptorok legfontosabb agonistáit és antagonistáit az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: A purinerg receptorok legfontosabb agonistái és antagonistái. (suramin: 8-(3-benzamido-4-metilbenzamido)-naftalén-1,3,5-triszulfonsav; ATP_γS: adenzin-5'-O-(3-tiotrifoszfát); 2-MeS-ATP: 2-metiltio-ATP)

P2X receptor-típusok	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇	
Agonisták	ATP, ATP _γ S							
Antagonisták	Suramin (kivéve P2X ₆)							
P2Y receptor-típusok	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	P2Y ₁₄
Agonisták	ATP (kivéve P2Y ₁₂)							
	ADP	UTP	UTP	UDP	2-MeS-ATP	ADP	ADP	UDP-glükóz
Antagonisták	Suramin (kivéve P2Y ₄)							

A vázizom

A vázizomsejtek

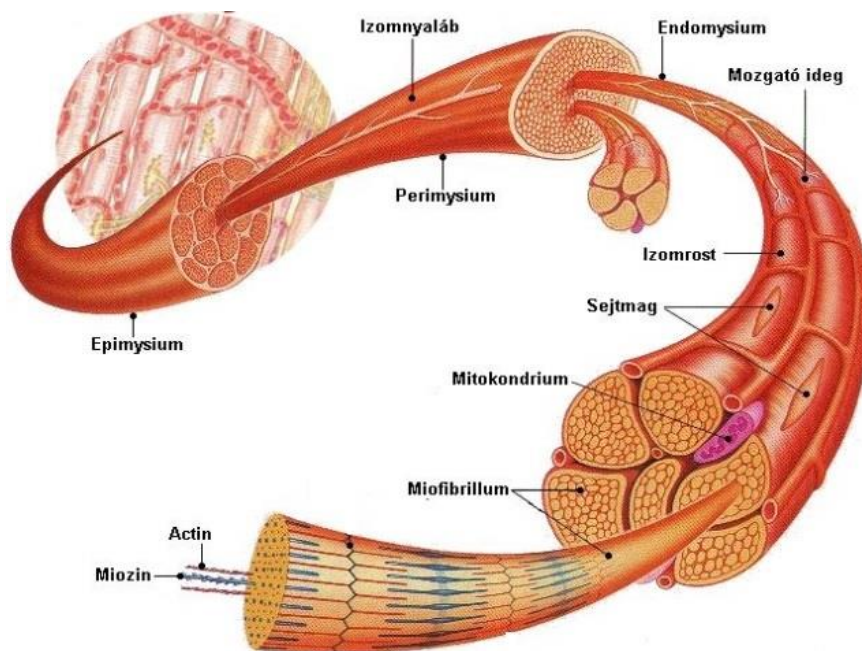
Az izomsejt rendszeres és jól szabályozott összehúzódásokra specializálódott sejtféleség. A gerincesekben, szövettani jellegzetességük alapján, az izomszövet két típusát különítjük el. Az egyik típusba tartozik a harántcsíkolt izomszövet, mely fénymikroszkópban harántcsíkolatot mutat. Ebbe a csoportba tartozik a vázizomszövet (a csontváz axiális és perifériás részeihez kapcsolódik), a vizcerális harántcsíkolt izomszövet (nyelv, nyelőcső felső része) és a szívizomszövet. A másik típusba tartozik a simaizomszövet, mely nem mutat a harántcsíkolt izomhoz hasonló rendezettséget [63].

Az izomszövet különböző módon differenciálódott típusai biztosítják a soksejtű állati szervezetek helyváltoztatását és belső szerveik mozgását. Az izomsejtek mellett számos egyéb mezodermális eredetű sejt is képes az aktin- és miozinfilamentumok kölcsönhatása révén megvalósuló összehúzódásra.

A vázizom morfológiai sajátosságai

A vázizmot durva kötőszövetes tok, az epimízium határolja, melyen belül az izomrostok kötegei a perimíziumba zárva helyezkednek el (3. ábra). A többmagvú izomrostot az endomízium burkolja, mely vér- és nyirokereket, valamint idegeket tartalmaz. Az izomrostok hosszú, henger alakú, nem elágazó óriássejtek, melyek a sejtek szélén, a sejtmembrán alatt ellapult sejtmaggal rendelkeznek. A magok száma akár sok száz is lehet az izomrost hosszától függően, amely néhány millimétertől akár 30-40 cm-ig is terjedhet, átmérője pedig 10 és 100 μm között változik. Szövettani metszeteken, speciális festési eljárással világos és sötét sávok figyelhetők meg a citoplazmájában. A sötétén festődő sávok anizotrópok (A-sáv), a világosan festődő sávok pedig izotrópok (I-sáv). Az I-sáv közepén vékony sötét vonal látható, melyet Z-vonálnak nevezünk. A sejt citoplazmájának, melyet vázizom esetében szarkoplazmának vagy mio plazmának is neveznek, jelentős tömegét a miofibrillumok alkotják, melyek a vékony (aktin) és vastag (miozin) miofilamentumokból épülnek fel. A miofibrillum két Z-vonala közé eső, ismétlődő szakaszokat szarkomereknek nevezzük. A szarkomer miozint tartalmazó részei alkotják az A-sávot (anizotróp), a csak aktint tartalmazó részek pedig az I-sávot (izotróp). Előbbi közepén a H-zóna, az utóbbi közepén pedig a Z-vonal található. Az aktin szabályozó fehérjéi a tropomiozin és a troponin. Bizonyos fehérjék ugyan nem játszanak szerepet sem a kontrakció folyamatában, sem annak szabályozásában, mégis elengedhetetlen szerepük van a szigorú rendezettség fenntartásában [5]. Ilyen például a nebulin, ami valószínűleg az aktinhosszt szabályozza, a titin, amely az izomrostok rugalmasságát biztosítja, valamint az obscurin, amely a titin és az ankirin megkötésében játszik szerepet. A titin érdekessége, hogy ez az eddig ismert legnagyobb polipeptid (molekulasúly: 3000 kDa) [64]. Az egyes izomrostokat sejtmembrán, a szarkolemma veszi körül. A szarkolemma felépítése azonos más ingerelhető és nem 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 szarkolemmában Cl^- és Ca^{2+} -csatornák, valamint különféle receptormolekulák is találhatók. A vázizom igen fejlett intracelluláris membránrendszerrel rendelkezik, mely nem más, mint a szarkoplazmatikus retikulum (SR). A SR-t a rost hossztengelyével 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 harántcsikolt izom funkcionális egységét, a triádot, melynek

alapvető szerepe van az elektromechanikai csatolás folyamataiban. Ennek részletes tárgyalása „A vázizom élettani sajátosságai” című fejezetben található.



3. ábra: A vázizom felépítése (www.mkk.szie.hu nyomán). A képen egy harántcsíkolt izomrost vázlatos rajza látható a fontosabb sejtalkotókkal.

Izomfejlődés

Az izomfejlődés és –differentiálódás, valamint a sérülést követő izomregeneráció precízen szabályozott, többlépcsős fejlődési folyamat. A mezoderális eredetű mezenhimális sejtek bipoláris vagy orsó alakú monopoláris sejtek, melyek az izom irányú differentiálódás első lépéseként prembiasztokká, izom prekursor sejtekké alakulnak. A csíralemezek kialakulását és migrációját követően jönnek létre a törzs és a végtagok izomzatának kezdeményei. A migráció során ezek a mezenhimális sejtek intenzív proliferációval jellemezhetők, amivel párhuzamosan létrejönnek a terminális differentiálódás előtt álló miobiasztok. Ezen sejtek fúziójával történik meg a miotubulusok képződése, először primer miotubulusok keletkeznek, majd pedig a primer izomcsövek körül kialakulnak a szekunder miotubulusok [65]. Az izomcsövek további miobiasztokkal fuzionálva növekszenek, majd elkezdődik az izomspecifikus fehérjék szintézise (vékony és vastag filamentumok), a sejtmagok a szarkolemma alá szorulnak és megjelenik az izomrost. Ez a folyamat szigorú genetikai szabályozás alatt áll [66].

A teljesen differentiálódott izomrost szarkolemmájához hozzácsatlakozva, a lamina bazálisra belül vannak olyan kevésbé differentiált sejtek, amelyekből az izomrost részlegesen

regenerálódhat, ezek az ún. *satellitasejtek*. Az izomrostok felszínéhez M-kadherin sejtadhéziós molekulával kapcsolódnak. Ezek a sejtek nyugvó, tartalék mioblasztoknak felelnek meg, és az egész élet során osztódásra képesek maradnak. Megfelelő növekedési faktorok hatására aktiválódhatnak, osztódhatnak és hozzájárulhatnak a sérült izomrost regenerációjához. Azonban ha az endomízium a sérüléskor szétszakad, a károsodott területre fibroblasztok vándorolnak és hegszövet alakul ki [67].

A vázizom élettani sajátosságai

A vázizomzat működésének elemi megnyilvánulása az egyes izomrostok kontrakciója, amelynek mind a nagysága, mind pedig a kialakulási sebessége membránpotenciál-függő jelenség. Az izomrost a vázizom elemi egysége, a membránján kialakuló akciós potenciálra a „minden vagy semmi” törvény érvényes. A szarkolemmán 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 idő telik el, amit látenciaidőnek hívunk. Ez alatt az idő alatt mennek végbe azon folyamatok, melyeket összefoglaló néven elektromechanikai vagy excitációs-kontrakciós kapcsolatnak nevezünk. A csatolás első lépése az akciós potenciál terjedése a T-tubulusok membránján az izomrost belsejébe. A T-tubulusok egyik funkcionális jelentősége az, hogy lehetővé teszik a vázizomrost teljes keresztmetszetének közel egyidejű aktiválódását. A T-tubulus membrán depolarizációját követően a Ca^{2+} -ok intracelluláris tárolóhelyekről szabadulnak fel. A terminális ciszterna az izomrost Ca^{2+} -raktárát képzik, bennük a Ca^{2+} részben szabadon, részben a kalszekvesztrin nevű Ca^{2+} -kötő fehérjéhez kötötten található meg. A felszíni membrán depolarizációját követően a mioplazmában a Ca^{2+} -koncentráció a kontrakció kialakulását megelőzően kezd el növekedni. A szarkolemmán, valamint a T-tubulus membránon végighaladó akciós potenciál a membránban elhelyezkedő dihidropiridin-receptor (DHPR) konformációváltozását okozza, és ez megnyitja a belső Ca^{2+} -raktárként szolgáló szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -csatornáját, a rianodinreceptort (RyR). Nyugalomban a mioplazma Ca^{2+} -koncentrációja 100 nM körüli érték, a kontrakció kialakulásához szükséges koncentráció kb. 1 μM . Kifejlett vázizomban az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ megemelkedésének forrása csaknem teljesen a sejten belüli Ca^{2+} -raktár.

A Ca^{2+} -kiáramlás kezdetén, maga a Ca^{2+} is aktiválhatja a RyR-t pozitív visszacsatolás révén, ezt a folyamatot, mint arra korábban utaltunk, CICR-nak nevezzük. A kiáramló Ca^{2+} -

okat aktív transzportfolyamat juttatja vissza a SR-ba a SERCA pumpa segítségével. Az izomkontrakció alapja a rendezett kontraktilis fehérjék, aktin és a miozin egymás melletti elcsúszása, ezáltal a szarkomerhossz rövidülése. A vázizomrostok aktiválásának eredményeként kétféle kontrakciót különböztethetünk meg: izotóniás és izometriás kontrakciót [68].

Rianodin receptor (RyR)

A RyR nélkülözhetetlen szerepet játszik az elektromechanikai csatolás kialakításában. Maga a receptormolekula a SR membránjában található, a molekula legnagyobb része a citoplazma felé néz, és a vázizomban közvetlen kapcsolatba kerül a DHPR-ral. Alegységei homotetramereket képezve hozzák létre az ioncsatornát, melynek tömege kb. 2,2 MDa. A receptornak három típusa ismert, a vázizomra jellemző RyR1, a szívizomban előforduló RyR2 és először az agyban detektált RyR3 [69].

Szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATP-áz (SERCA)

A mioplazmába kijutott Ca^{2+} visszavétele a SR-be aktív transzportfolyamat révén valósul meg. A „visszavett” Ca^{2+} nagy része a kalszekvesztrinhoz kapcsolódik a terminális ciszternákban, melyhez diffúzióval jut el és ezután ismét alkalmas lesz a következő kontrakció létrehozására. A mioplazmatikus Ca^{2+} koncentráció mindaddig magas marad, amíg a korábban felszabadult Ca^{2+} vissza nem jut a SR-be.

A SERCA a P típusú ATP-ázok közé tartozik, melyek közös jellemzője, hogy integráns membránfehérjék, foszforilációjuk egy meghatározott aszparaginsav oldalláncon keresztül történik, aminosavsorrendjükben nagyfokú hasonlóságot mutatnak és mindegyik gátolható a foszfát analóg vanadáttal. A SERCA, szemben a plazmamembrán-kalciumpumpával, nem igényel kalmodulinkötést működéséhez [70]. A SR- Ca^{2+} -pumpa többlépéses konformáció változás által hajtott folyamatban juttat át két Ca^{2+} -t a citoszólból a SR belsejébe az ATP hidrolíziséből származó energia segítségével. A SERCA a nagy affinitású Ca^{2+} -transzportrendszerekhez tartozik ($K_m \sim 400 \text{ nM}$), emiatt érzékenyen reagál a citoszól Ca^{2+} -koncentrációjának a megváltozására. A 110 kDa mólsúlyú transzmembrán fehérje a SR longitudinális szakaszán helyezkedik el [71].

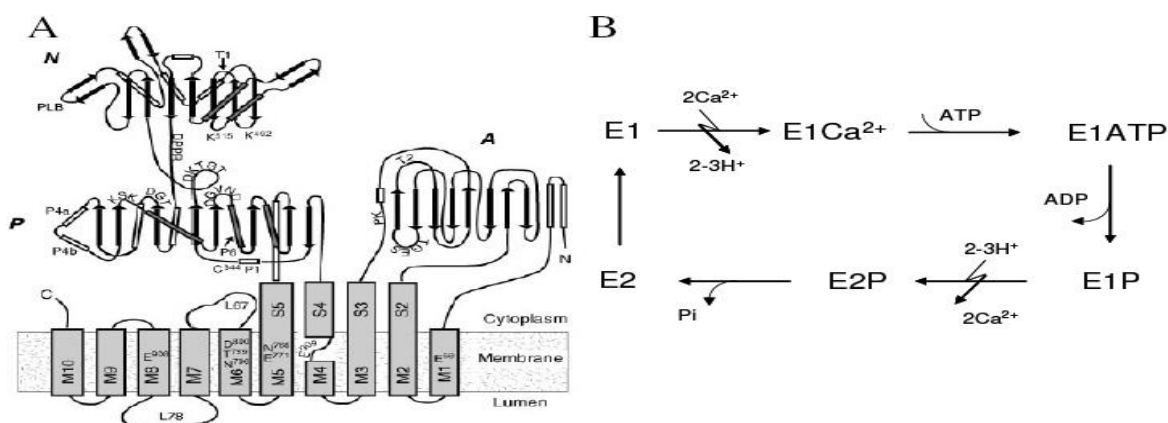
A SERCA az emberi szervezetben több izoformában fordul elő. A SERCA1b az újszülött szervezet gyors rostjaiban van túlnyomórészt jelen. A fejlődés során fokozatosan felváltja a SERCA1a, mely a felnőttkorban már a domináns formát jelenti. A SERCA2a a

szívizomsejtekben és a lassú típusú vázizomrostokban található, de nagy mennyiségben expresszálódik a neonatális gyors típusú izomrostokban is. A SERCA2b jelentős mennyiségben a simaizomokban expresszálódik, de gyakorlatilag minden sejtféleségben kimutatható. A szervezetben elsősorban nem-izom típusú sejtekben mutatták ki a SERCA3 gén termékét [72,73,74].

A SERCA terciér szerkezetére vonatkoztatott hipotetikus modell alapján 3 fő egység különíthető el (4. ábra A):

- Citoplazmatikus fejrész, ami magába foglalja az ATP-kötő, a foszforilációs és az ún. energia transzdukciós domént.
- Penta-helikális szár, ami a nagy affinitású Ca^{2+} -kötő részt tartalmazza és biztosítja a kapcsolatot a fejrész és az intramembrán domén között.
- Intramembrán régió, melynek feladata a molekula kihorgonyozása a lipid kettősréteghez és a Ca^{2+} membránon át történő áramlásának a biztosítása. Legalább 10 transzmembrán hélixből áll.

A SERCA-nak kétféle konformációs változata van, az E1 és az E2. Az E1 konformáció kristályosítható kalcium vagy lantanida jelenlétében. Az E2 konformáció akkor jelenik meg, ha a kalciummentes közegben vanadát vagy anorganikus foszfát magas koncentrációban van jelen. Az E1 és E2 közötti konformációs átmenetek a fehérjék másodlagos szerkezetében kevés változást eredményeznek, inkább a domének csúszó és forgó mozgása figyelhető meg. Az E1 konformációs állapotú fehérje két Ca^{2+} -t köt meg a SR- membrán citoplazmatikus oldalán. Ezután a fehérje foszforilálódik egy aszpartilgyök béta-karboxil csoportján miközben ATP-t használ fel. A folyamat eredményeként az enzim konformációs állapota megváltozik (E1-E2 átmenet), s ennek következtében a két Ca^{2+} átjut a membránon és az intraluminális oldalon ledisszociál a fehérjéről. Végül a pumpa defoszforilálódik és magnéziumion segítségével újra felveszi az E1 konformációs állapotot. Megfelelő körülmények között a folyamat megfordítható, ilyenkor két Ca^{2+} átvitele történik a SR-ból a citoplazmába miközben egy molekula ATP keletkezik (4. ábra B).



4. ábra: A SERCA modellje (A) A SR Ca²⁺ ATP-áz szerkezeti modellje. A citoplazmatikus fejrész magában foglalja az ATP –kötő (N), a foszforilációs (P) és az ún. energia-transzdukciós domént (A), valamint a proteolitikus hasítási helyeket. Az intramembrán régiót legalább 10 transzmembrán hélix alkotja [75]. **(B)** A SR Ca²⁺ ATP-áz ciklikus működése [76].

A SERCA nem-kompetitív inhíbitora a tapszigargin (TG), amely nagy affinitással és irreverzibilisen kötődik az enzimhez [77]. A SERCA-t specifikusan blokkolja az *Aspergillus* fajok által termelt mikotoxin, a ciklopiazonsav (CPA), melynek hatása reverzibilis és affinitása kisebb a TG-nál. A kutatásokban használatosak kevésbé specifikus blokkolók is, mint a 4-aminopiridin (4-AP), a fluorid, a TBQ (2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohidrokinon)[78], a vanadát és a CrATP [75].

Az intracelluláris kalcium sejtelettani jelentősége az izomfejlődés során

A differenciálódási folyamat során a mioblasztok fúziójával kialakuló primer, majd szekunder miotubulusok izomspecifikus fehérjéket szintetizálnak [79]. Ezen folyamat számos lépése Ca²⁺-függő [80]. A belső Ca²⁺-raktárként funkcionáló SR még fejletlen, annak hálózata, integritása csak fokozatosan alakul ki, ezért a miogenezis korai szakaszában az intracelluláris [Ca²⁺] növekedésének döntő forrása az extracelluláris tér. A belső raktárakból a Ca²⁺-felszabadulás főleg az IP₃ receptorokon keresztül történhet, G-proteinhez kapcsolt foszfolipáz C (PLC) aktiváció következtében. A PLC több izoformájáról leírták már, hogy aktivitásuk elengedhetetlen a differenciációs folyamatok létrejöttében. A külső Ca²⁺ belépése depolarizáció hatására a feszültség függő „T”- és „L”-típusú Ca²⁺-csatornákon keresztül történik. A mioblasztokban Ca²⁺-belépést biztosítanak még a felszíni membránban diffúzan elhelyezkedő nikotin típusú kolinerg receptorok, valamint a szintén Ca²⁺-permeábilis P2X purinerg receptorok. Az érés és a miotubulussá történő differenciálódás során valósul meg a

SR folyamatos szerveződése, megjelenik a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás. Később, az egyre fejlettebb SR megjelenésével döntő szerep jut az elektromechanikai kapcsolat révén megvalósuló, RyR-on keresztül történő feszültség-indukált Ca^{2+} -felszabadulásnak (VICR) [81].

Célkitűzés

Munkánk egyik részében izomtenyészeteken vizsgáltuk az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázist, és az abban szerepet játszó kulcsfehérjék expressziós mintázatát. Munkánk másik részében pedig az Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézet Sejt- és Szövettenyésztő Laboratóriumának munkatársaival együtt a humán eredetű kondroprogenitor sejtek (CPC-k) vizsgálatával foglalkoztunk. Irodalmi adatokból ismert, hogy bizonyos sejt típusoknál – vázizomsejteken és kondrocitákon – a differenciálódási folyamat előre haladtával intracelluláris Ca^{2+} -szint változások figyelhetők meg [82]. A proliferáció és differenciálódás ideje alatt számos hormon, citokin, valamint különböző gének átíródása befolyásolja a sejt folyamatokat, de a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ központi szabályozó szereppel bír [83,84]. Napjaink leginkább kutatott területét képezik a mezenhimális őssejtek, amelyek potenciális szerepet játszanak az oszteogenikus, kondrogenikus differenciálódási folyamatokban. A mezenhimális őssejtek porcsejt irányba történő differenciáltatása, és terápiás célra történő alkalmazása az orvostudomány egyik fiatal területét képviselik. A csontvelőből származó őssejtek esetleges transzplantációját már több betegség kapcsán is tanulmányozzák, például a miokardiális infarktuson átesett betegeknél [85,86], az autoimmun megbetegedéseknél [87], és természetesen a krónikus vázizom és kötőszöveti megbetegedésként számon tartott *oszteoarthritisnél* is, amely kutatásunk egyik fő tárgyát képezte. Ez az ízületi károsodással járó autoimmun megbetegedés a hatvan év feletti 15%-át érinti a nyugati populációban. A betegség kialakulásáért elsősorban a mátrixbontó proteínáz enzimek kontrollálatlan termelődése, a proteoglikánok fokozatos elvesztése, az extracelluláris mátrix átalakulása, valamint a porcsejtek túlzott mértékű differenciálódása tehető felelőssé [88]. A gyulladásos folyamatok csak másodlagos tünetként alakulnak ki a betegség során, de jelentős mértékben hozzájárulhatnak a tünetek súlyosbodásához. A porc- és izomszöveti területek kóros elváltozásai gyakran egymás kórkövetkezményeként jönnek létre. A fájdalom mozgásra, terhelésre fokozódik, és sántítás alakulhat ki. Előrehaladott esetben, akár mozgáskorlátozottság is létrejöhet. Ezen ismeretek birtokában a céljaink a következők voltak:

1. A kondrogenikus progenitor sejtek (CPC-k) Ca^{2+} -homeosztázisának részletes megismerése.
2. A belső Ca^{2+} -raktárak funkcionális jellemzése.
3. A Ca^{2+} -tranziensek kialakításáért felelős szignalizációs útvonalak feltérképezése.

4. A szignalizációs útvonalban szerepet játszó fehérjék expressziós mintázatának vizsgálata.

A proliferálódó porcsejtek mellett, az egér eredetű C2C12 vázizomsejteken a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz 1b fehérje (SERCA1b) expresszió csökkenés hatását is vizsgálni kívántuk. Egyre több izombetegség kapcsán felmerül a gyanú, hogy a SERCA valamelyik izoformájának defektusa tehető felelőssé a betegség kialakulásáért. A szívizom transzportfolyamatai, csatornafehérjéi a tudomány egyik leginkább kutatott területét képezik, hiszen csak Európában jelenleg 20 millió regisztrált szívbeteg él. Mára már köztudottá vált az is, hogy a szívinfarktus kialakulásáért a SERCA2a fehérje csökkent expressziója okolható [89], míg a Brody miopátiaként ismert izombetegség kialakulásáért a SERCA1 izoformát kódoló gén mutációja felelős [90]. Az irodalomból ismert, hogy a SERCA fontos szerepet játszik a Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában, mert a kiáramló Ca^{2+} -okat aktív transzportfolyamat révén juttatja vissza a szarkoplazmatikus retikulumba. Kíváncsiak voltunk arra, hogy egy ilyen fontos Ca^{2+} -pumpa expresszió csökkenése vagy esetleges hiánya milyen változásokat eredményez. Azt szem előtt tartva, hogy a SERCA1b a domináns izoforma a C2C12 sejtekben, a következő kérdésekre kerestük a választ:

5. Hogyan változik a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisában és differenciálódásában résztvevő fehérjék expressziós mintázata a csökkent SERCA1b hatására?
6. A SERCA1b fehérje expressziójának csökkenése milyen hatással van az elektromechanikai csatolásra és a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulásra?
7. A SERCA1b csökkent expressziója milyen morfológiai változásokat idéz elő, illetve módosítja-e a differenciálódó izom növekedését?

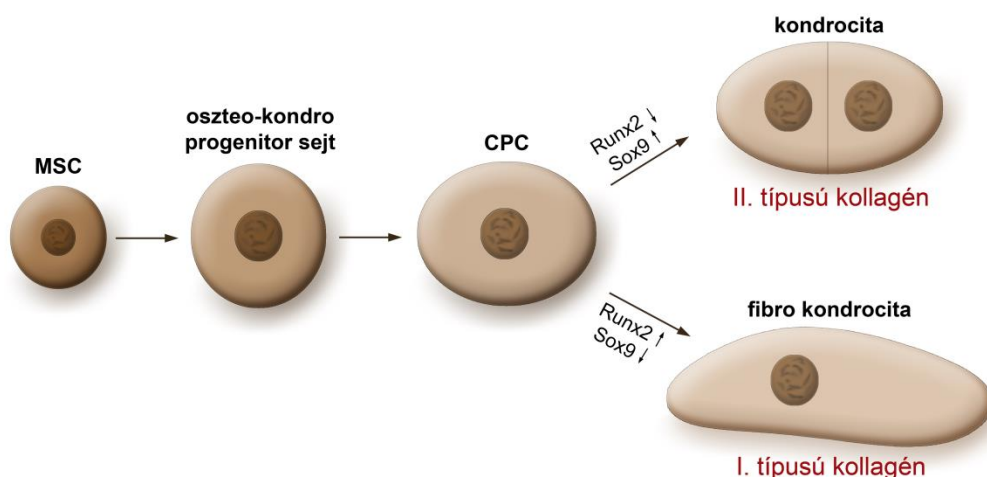
Egyetemi doktori értekezésemben az intracelluláris Ca^{2+} -szerepét vizsgálom *in vitro* CPC tenyészetben, valamint bemutatom a SERCA1b fehérje expresszió csökkentés Ca^{2+} -homeosztázisra és a differenciálódásra gyakorolt hatásait vázizomtenyészeteken.

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

Porctenyészet

Kísérleteink első részében migratorikus, kondrogenikus progenitor sejteket (CPC-k) használtunk. A kondrogenikus progenitor sejtek izolálását, immortalizálását Nicolai Miosge és munkatársai végezték [21]. Egy oszteoarthritisben szenvedő betegből (65-75 év), a térdprotézis műtét során levett mintából hozták létre a primer kultúrát. A szövetdarab a leginkább érintett oszteoarthritiszes szövet melletti területől származott. A CPC sejtek immortalizációját lentivirális expressziós rendszerrel alakították ki (pLenti6/v5-hTERT). Az expressziós rendszer proteolipid protein 1, 2 fehérjét (pLP1, pLP2) és VSVG plazmidot is tartalmazott az immortalizációs hatékonyság növelése érdekében. A *Vesicular stomatitis Indiana virus* G-proteinje, a VSVG segíti a vírus bejutását a sejtbe. A lentivirális transzfekciót követően a sejtek 10 mg mL^{-1} blaszticidinnel kiegészített tápoldatban szelektálódtak 1 hétig. A sikeres transzfekció eredményeképpen létrejött CPC 531 sejtvonalat használtuk kísérleteinkhez (5. ábra). A sejteket Dulbecco által módosított Eagle's Mediumban (DMEM) tenyésztettük, amelyet 10% főtális borjúsérummal, 50 U/ml penicillinnel, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinnel, valamint L-glutaminnal egészítettünk ki (10 mM).



5. ábra: A CPC tenyészet fejlődése. Az ábrán jól látható, hogy a mezenhimális őssejt előbb oszteo-kondro progenitor sejté, majd kondroprogenitor sejté differenciálódik. A CPC-k mind oszteogenikus, mind kondrogenikus transzkripciós faktorokat expresszálnak (Runx2, Sox9). A Runx2 és Sox9 expressziós szintjétől függően differenciálódhatnak tovább kondrocitává vagy fibro kondrocitává.

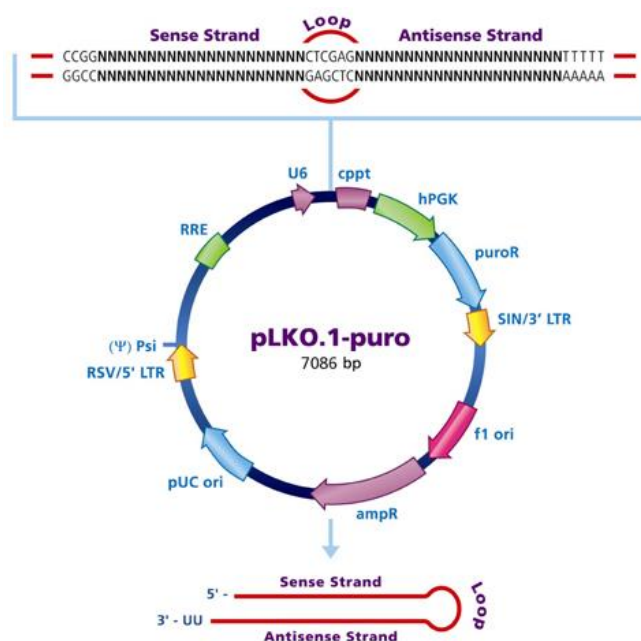
C2C12 vázizomsejtek

A C2C12 sejtek felnőtt C3H egértörzs lábának harántcsíkolt izomzatából nyert immortalizált mioblasztok (ECACC, European Collection of Cell Cultures, United Kingdom), melyeket DMEM-ben tenyésztettünk. A DMEM tápoldatot még 10% főtális borjúsérummal, 50 U/ml penicillin és 50 µg/ml streptomycin antibiotikum keverékkel egészítettük ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében inkubáltuk. A sejtek miotubulusokká történő differenciálódását, 80%-os konfluencia elérését követően, a tápoldat megfelelő módosításával biztosítottuk (DMEM 5% lószérummal, valamint a már említett antibiotikum kombinációval kiegészítve).

Liposzóma mediált transzfekció

Az egér eredetű C2C12 vázizomtenyészetekben RNS interferencia módszert alkalmaztunk az endogén SERCA1b fehérje expressziójának csökkentésére. Az általunk használt small hairpin RNS (shRNS) a magban történő expresszió során keletkező 70-80 bp-nyi nukleotidszekvencia. A megfelelő átíródás biztosítása H1 vagy U6 promóter és terminációs szignál segítségével történik. Az shRNS a sense-loop-antisense szakaszokból épül fel. A „sense” specifikusan megegyezik a gátolni kívánt fehérje mRNS szekvencia részletével, míg az „antisense” ennek specifikus komplementere. A sejt specifikus Dicer fehérjéje a loop (hurok) szakaszt hasítva egy duplaszálú siRNS-t eredményez, amelynek „antisense” szála a RISC-komplex segítségével kapcsolódik a mRNS specifikus szakaszához. Az így keletkezett, egy szakaszán duplaszálúvá alakuló mRNS a sejt számára értelmezhetetlenné válik, feldarabolódik, ezáltal a kódolt fehérje transzlációjának elmaradását eredményezi. A SERCA1b fehérje mRNS-ére specifikus shRNS-t a Sigma-Aldrich Kft.-től (Magyarország, Budapest) rendeltük. A SERCA1b fehérje csendesítésére használt target szekvencia a következő volt: 5-*ctatctggaggatccagaa*-3, amely a 21. exon utolsó 11 bázisát (3121–3131b, egér SERCA1 cDNS, acc. No. NM_007504), valamint a 23. exon első 8 bázisát foglalja magában (3174–81b). A 22. exon egy splicing következtében kivágódik. A kiválasztott shRNS sense régiója 5'-*ctatctggaggatccagaa*, az antisense régiója pedig 5'-*ttctggatcctccagatag* volt. A SERCA1b szekvenciájára vonatkozó homológiát blast filtering programmal ellenőriztük, továbbá az shRNS nonspecifikus hatásait scrambled RNS alkalmazásával zártuk ki. A kiválasztott shRNS szekvenciát pLKO.1-puro-CMV-tGFP expressziós vektorba klónozták (6. ábra). A SERCA1b fehérje gátlását Western-blot technikával vizsgáltuk az izomdifferenciálódás különböző szakaszaiban (proliferáció-terminálisan differenciáltatott miotubulusok). Az shRNS-t liposzóma mediált transzfekcióval (Lipofectamine 2000,

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) juttattuk a sejtekbe a proliferáció megkezdését követő 24-30 órával. A lipofektamin magába zárja a negatív töltésű DNS-t és így át tud jutni a sejtmembránon. A transzfekciót Opti-MEM tápoldatban 2,5 órán keresztül végeztük 37 °C-on termosztátban (500 ng shRNS/6 lyukú plate), majd 48 órán keresztül a korábban említett DMEM tápoldatban hagytuk a sejteket proliferálni. 48 órát követően az eredeti tápoldatot lecseréltük 1,5 µg/ml puromycin (AppliChem, Darmstadt, Németország) tartalmú tápoldatra. A szelekciót követő 14.-15. napon egyedi kolóniák alakultak ki, amelyekben a sejtek felaratását követően vizsgáltuk az esetleges SERCA1b fehérje csökkenését vagy gátlását. 12 egyedi klón fehérjemintáját vizsgáltuk Western-blot technika segítségével, melyek közül az 1. klont (C1) és az 5. klont (C5) használtuk további kísérleteinkben. A fel nem szedett egyedi klónokat a tenyésztőedény faláról eltávolítottuk, s a sejtek összességét a későbbi vizsgálatokban egy mintaként kezeltük (pool tenyészet). A vizsgálatok elvégzését követően azt tapasztaltuk, hogy a C1 sejtekben szinte teljes mértékben sikerült a SERCA1b expresszióját gátolni, míg a C5 sejtekben csak részben. Kontrollként a parentális sejtek mellett scrambled shRNS-el transzfektált sejteket (Scr) is használtunk. A vizsgálathoz specifikus SERCA1b ellenes antitestet alkalmaztunk, amely kizárólag csak a fehérje terminális oktamerjéhez kapcsolódik. 80%-os konfluenciát elérve a korábbi proliferáló tápoldatot differenciáló tápoldatra cseréltük, majd 5 napos, terminálisan differenciálódott miotubulusokat használtunk a vizsgálatainkhoz.



6. ábra: A pLKO.1-puro vektor felépítése (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>).

Immuncitokémia

Az immuncitokémiai módszer a specifikus antigén-antitest reakcióra épül, ahol a cél az, hogy az antitest által felismert antigént annak természetes előfordulási helyén tegyünk láthatóvá. Az immunválasz során aktiválódó B-limfocitákból differenciálódó plazmasejtek termelik az ellenanyagot. *In vivo* immunizálás során a szérumból, míg *in vitro* körülmények között a sejt kultúrák felülszójából nyerhetők antitestek. A hagyományos immunizálással előállított ellenanyagok poliklonális eredetűek, azaz több B-sejt klón termékei, ezért a szérumból izolálható ellenanyag-populáció heterogénnek tekinthető. Előnye, hogy ugyanannak az antigénnek különböző determinánsait felismerő molekulákat tartalmaznak, így keresztkötésen, aggregáción alapuló módszerek esetében alkalmazhatók. Hátránya, hogy rokon szerkezetű antigénnel való keresztreagáló képességük nem küszöbölhető ki. A monoklonális ellenanyagok egy-egy aktiválódó B-sejt klón utódsejtjeinek termékei, tehát homogénnek tekinthetők. Jól meghatározható egyedi tulajdonságokkal rendelkeznek és korlátlan mennyiségben előállíthatók. Az összetett antigének egyes determinánsainak felismerése és az egymástól csak néhány epitópban eltérő struktúrák megkülönböztetése is lehetséges használatukkal. Monoklonális ellenanyag előállításra leggyakrabban olyan egér B-sejt eredetű mielómák használatosak, melyekre a stabilitás, a könnyű fenntarthatóság és a gyors szaporodóképesség jellemző. Fontos szempont, hogy ne termeljenek endogén ellenanyagot és rendelkezzenek valamilyen enzimhiánnyal, aminek a kihasználásával elkülöníthetők a B-sejt-mielóma hibridektől [91].

Az elsődleges antitest annak Fc-szakasza ellen termeltetett másodlagos antitesttel jelölhető (fontos a fajazonosság), 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 sejt vonalon SERCA1a és 1b fehérje kimutatására alkalmaztuk.

A sejt kultúrákat foszfát pufferes sóoldattal (PBS) átmostuk, majd 20 percen keresztül jég hideg 70%-os metanollal 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). Ezt követően a sejteket primer antitesttel inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Vázizomtenyészeteken a SERCA1a/b, SERCA1b és dezmin antitesteket használtuk (2. táblázat). A SERCA1a/b antitest a fehérje C-

terminálisának 506. aminosav szekvenciájú epitópját ismeri fel, a SERCA1b antitest pedig a terminális oktamert. Ezt követően fluoreszcenciával 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 konfokális mikroszkóp segítségével értékeltük.

2. táblázat: Az immuncitokémiai kimutatáshoz használt antitestek listája.

Kimutatandó fehérje	Elsődleges antitest	Másodlagos antitest
SERCA1	monoklonális anti-SERCA1 1:1000 Thermo Scientific	anti-egér FITC 1:500 Vector Labs
SERCA1b	monoklonális anti-SERCA1b 1:800 Szegedi Tudományegyetem (Zádor Ernő)	anti-nyúl FITC 1:500 Vector Labs
Dezmin	monoklonális anti-dezmin 1:500 Sigma-Aldrich	anti-egér FITC 1:500 Vector Labs

RT-PCR analízis

A polimeráz láncreakció egy olyan molekuláris biológiai módszer, melynek során specifikus génszakaszok felerősítése válik lehetővé megfelelő primerek és egy hőstabil DNS-polimeráz alkalmazásával. Ha a sejtek által expresszált mRNS-eket cDNS-sé írjuk át (reverz transzkripció), akkor az adott pillanatban az éppen kifejeződő géneken (ún. transzkriptom) végezhetjük el a specifikus erősítést.

Az RT-PCR analízishez 10 cm átmérőjű Petri-csészében (Nunc, Naperville, IL, USA) tenyésztettük a C2C12 sejteket, majd a terminálisan differenciálódott kultúrákat először hideg foszfát pufferes sóoldattal mostuk át, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és felhasználásig - 70 °C-on tároltuk. Az összegyűjtött sejtenyészetekből teljes RNS-t izoláltunk Qiagen Rneasy® Mini Kit segítségével a gyártó által mellékelte protokoll alapján (BioMarker Kft., Gödöllő, Magyarország). Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop (NanoDrop Technologies, Bio-Science, Magyarország) készülék segítségével ellenőriztük. Az így nyert RNS-mintából Omniscript reverz transzkripció kit (Qiagen) felhasználásával, oligo (dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A reverz transzkripció reakció elegye 500 ng RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibitor, 0,25 µl oligo (dT)-t, 2 µl dNTP-t (200 µM) és 1 µl M-MLV RT-t tartalmazott 1× RT-pufferben. A reakció végtérfogata 20 µl volt. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációja olyan primerekkel történt, amelyeket az interneten hozzáférhető

(GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) humán nukleotidszekvenciák alapján állítottunk elő (3. táblázat). A primereket Primer Premier 5.0 számítógépes program segítségével (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) terveztük.

3. táblázat: A specifikus DNS-szakaszok erősítésére használt primer párok nukleotidszekvenciái és a reakciókörülmények.

Gén	Primer	Nukleotid szekvencia (5'→3')	GenBank ID	Annelációs hőmérséklet	Amplimer mérete (bp)
Vázizom differenciálódás					
Miosztatin	sense	ACTGGAATCCGATCTCTGAAACTT (665-688)	NM_010834	58.0°C	233
	antisense	GACCTCTTGGGTGTGTCTGTCAC (897-875)			
MCIP1.4	sense	AAGGAACCTCCAGCTTGGGCT (25-45)	NM_019466.3	60.0°C	160
	antisense	CCCTGGTCTCACTTTCGCTG (184-165)			
Háztartási gén-Kontroll					
GAPDH	sense	AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG (99–121)	NM_001289726.1	56.0°C	322
	antisense	AATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT (420–399)			

Az egyenként 50 µl össztérfogatú PCR-reakció elegyek a következő összetevőket tartalmazták: 1 µl cDNS, 2 µl forward és reverz primer (0,4 µM), 1 µl dNTP (200 µM), és 5 egység Promega GoTaq® DNS-polimeráz puffer. A kívánt DNS-szakaszok specifikus felerősítéséhez programozható termosztátot használtunk (Thermal Cycler C1000, Bio-Rad, Budapest, Hungary) a következő beállításokkal: 2 perc 95 °C-on a kezdeti denaturációhoz, amelyet ismétlődő ciklusok követnek: 94 °C 1 perc, majd primertől függő (3. táblázat), optimális hőmérsékleten történő anneláció (1 perc), a lánchosszabbítás (elongáció) 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 agarózgélben vizsgáltuk.

A 10 cm átmérőjű Petri-csészében tenyésztett megfelelő porckultúrákat először szintén jéghideg RN-áz mentes fiziológiás NaCl-oldattal mostuk. Ezt követően TRIzol (Applied Biosystems, Foster City, CA) reagensben a sejtkultúrákat összegyűjtöttük és 20%-os RN-áz mentes kloroform (Sigma-Aldrich) hozzáadását követően a mintákat 10000 g-n, 15 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. A totál RNS-t tartalmazó mintákat 500 µl izopropanollal inkubáltuk 1 órán keresztül -20 °C-on, majd újra centrifugálás következett 10000 g mellett, 10 percig, 4 °C-on. A felülúszó leöntését követően a pellethez 1 ml 75%-os etanolt adtunk, majd pedig az előző centrifugálási protokoll megismétlése következett. Végül a cseppmentesre száradt

pelletet nukleáz-mentes vízben beoldottuk és felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Az így nyert RNS-mintából High Capacity RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával cDNS-t készítettünk. A reverz transzkriptáz reakcióhoz használt oldat 1000 ng RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibítort, 2 µl random primert, 0,8 µl dNTP Mix-et (4 mM) és 1 µl MultiScribe RT-t tartalmazott 1× RT-pufferben 20 µl reakció végtérfogóban. Az RT elegyet 2 órán keresztül 37 °C-on tartottuk. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációja olyan primerekkel történt, amelyeket az interneten hozzáférhető (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) humán nukleotidszekvenciák alapján állítottunk elő (4. táblázat). A primereket itt is a Primer Premier 5.0 számítógépes program segítségével terveztük. Az amplifikációhoz használt primer párok szekvenciáit a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat: A specifikus DNS-szakaszok erősítésére használt primer párok nukleotidszekvenciái és a reakciókörülmények.

Gén	Primer	Nukleotid szekvencia (5'→3')	GenBank ID	Annelációs hőmérséklet	Amplimer mérete (bp)
P2Y Metabotrop purinerg receptorok					
P2RY5	sense	TAC CCA TTT AAG TCA AAG AC (358–377)	BC070295	50.0°C	268
	antisense	TTA GCA CCA TAC TAG AAC AAG (625–605)			
P2RY8	sense	CAG CGT GTT GCC TTT CCA (219–236)	NM_178129	60.0°C	285
	antisense	TGC ACC GGG TAG GTG AGA T (503–485)			
P2RY9 (LPAR4)	sense	GGG TTT ATC ATT CCT CTA (634–651)	NM_005296	49.0°C	260
	antisense	CAC AAG GTG ATT GGG TA (893–877)			
P2RY10	sense	TTG GTC GGG ATG ATT AC (583–599)	NM_198333	52.0°C	256
	antisense	CAA CGG GAC AAC TGC TA (838–822)			
P2RY12	sense	AGT TCG GTC TAG TCT GGC (542–559)	NM_176876	54.0°C	249
	antisense	TTT GGC TCA GGG TGT AA (790–774)			
P2RY13	sense	TTC CCA GCC CTC TAC AC (139–155)	NM_176894	56.5°C	269
	antisense	AGC CCT AAC AGC ACG AT (407–391)			
P2RY14	sense	TCT GCC GTG CTC TTC TA (289–305)	NM_001081455	56.0°C	211
	antisense	CCT CCC TAA CAC TCT GGT (499–482)			
Háztartási gén-Kontroll					
GAPDH	sense	CCA GAA GAC TGT GGA TGG CC (726–745)	NM_002046.4	54.0°C	411
	antisense	CTG TAG CCA AAT TC GTT GTC (1136–1117)			

Az egyenként 25 µl össztérfogató PCR-reakció elegyek a következő összetevőket tartalmazták: 1 µl forward és reverz primer (10 µM), 0,5 µl cDNS, 0,5 µl dNTP Mix (200 µM)

és 1 egység (0,2 µl) Promega GoTaq® 1x DNS-polimeráz puffer. A kívánt DNS-szakaszok specifikus felerősítéséhez programozható termosztátot használtunk (Labnet MultiGene 96-well Gradient Thermal Cycler, Labnet International, Edison, NJ, USA) a következő beállításokkal: 2 perc 95 °C-on a kezdeti denaturációhoz, amelyet ismétlődő ciklusok követnek: 94 °C 30 s, majd primertől függő (4. táblázat), optimális hőmérsékleten történő annealáció (45 s), majd lánchosszabbítás (elongáció) 72 °C-on, 1,5 percig. Az utolsó, 35. ciklus után további lánchosszabbítási lépés következett 72 °C-on, 7 percig. A PCR-mintákat végül 1,2%-os agarózgélben vizsgáltuk.

Fehérjeminták készítése

A tenyészeteket jéghideg PBS-sel mostuk le, majd homogenizációs pufferben (összetevői: 20 mM Tris-Cl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil) benzoszulfonil fluorid, 20 µM leupeptin, pH 7,4; Sigma Aldrich) gyűjtöttük össze. A mintákat folyékony nitrogénes gyorsfagyasztás után a felhasználásig -70 °C-on tároltuk. A minták feltárását jégen, 5-ször 10-10 másodpercig történő szonikálással végeztük (Branson Sonifier, Danbury, USA). A minták fehérjekoncentrációját módosított BCA (bicinchoninic acid) protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, melynek során BSA-t használtunk standardként.

Western-blot analízis

A fehérjekimutatáshoz teljes sejtlizátumot használtunk mindkét sejttípus esetében. A vázizomtenyészetből származó mintákat, szonikálást követően 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. Az immunológiai detektálásához 30 µg fehérjét szeparáltunk 7,5% SDS-PAGE gélben. A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (BioRad, Bécs, Ausztria). A membránokat PBS-ben oldott sovány tejpor 5%-os oldatával blokkoltuk, majd egy éjszakán át primer antitestekkel (4 °C-on) inkubáltuk. Háromszor 10 perc PBST-s (0,1% Tween 20-szal kiegészített PBS) mosás után a membránokat szekunder antitestekkel, torna peroxidázzal (HRP) konjugált IgG-vel (Bio-Rad) inkubáltuk, 1:1000 hígításban, 5%-os tejporos PBS oldatban hígítva, 1 órán át (5. táblázat). A jeleket kemilumineszcenciás reakcióval, az intézetünkben rendelkezésünkre álló Gel Logic 1500 előhívó rendszerrel detektáltuk.

5. táblázat: A Western-blot analízis során használt elsődleges és másodlagos antitestek vázizomtenyészetből származó minták esetében.

Kimutatandó fehérje	Elsődleges antitest	Másodlagos antitest
MyoD	monoklonális anti-MyoD 1:200 Santa Cruz	anti-egér IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
p-Akt	monoklonális anti-p-Akt 1:1000 Cell Signaling	anti-egér IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
SERCA1b	monoklonális anti-SERCA1b 1:800 Szegedi Tudományegyetem (Zádor Ernő)	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
SERCA1	monoklonális anti-SERCA1 1:1000 Thermo Scientific	anti-egér IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
SERCA2a	monoklonális anti-SERCA2a 1:20000 University of Rotterdam (F. Wuytack)	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
Kalcineurin (PP2B)	poliklonális anti-Pan-Kalcineurin 1:1000 Cell Signaling	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
Kalszekvesztrin	poliklonális anti-kalszekvesztrin 1:1000 Thermo Scientific	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
STIM1	monoklonális anti-STIM1 1:500 BD Laboratories	anti-egér IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
Aktin	poliklonális anti-aktin 1:500 Santa Cruz	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.

A porcsejtekből származó minták esetében a teljes sejtlizátumot 2000 g mellett, 10 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd a sejtpelletet 100 µl RIPA pufferrel (Radio Immuno Precipitation Assay) szuszpendáltuk (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris, 0,1% sodium dodecyl sulphate (SDS; pH 8,0), proteáz inhibitorok: aprotinin (10 µg mL⁻¹), 5 mM benzamidine, leupeptin (10 µg mL⁻¹), trypsin inhibitor (10 µg mL⁻¹), valamint 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 8 mM Na-fluoride, 1 mM Na-orthovanadate). A szonikálást követően a mintákat szintén 1/5 térfogatú, ötszörös töménységű elektroforézis mintapuffer hozzáadásával kezeltük, és 5 percig 95 °C-on főztük. Az immunológiai detektálásához 50 µg fehérjét szeparáltunk 7,5% SDS-PAGE gélben (6. táblázat). A továbbiakban ugyanúgy jártunk el, mint a vázizomtenyészetből származó minták esetében.

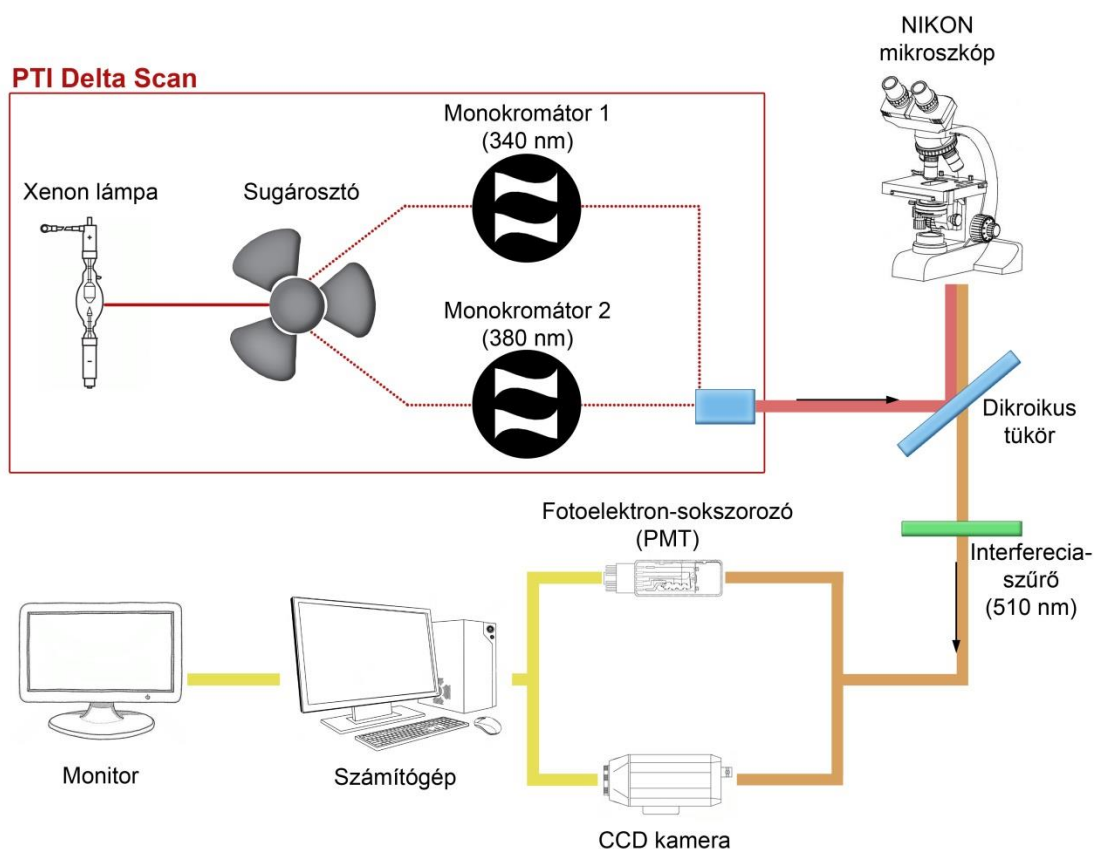
6. táblázat: A Western-blot analízis során használt elsődleges és másodlagos antitestek porctenyészetből származó minta esetében.

Kimutatandó fehérje	Elsődleges antitest	Másodlagos antitest
STIM1	monoklonális anti-STIM1 1:500 BD Laboratories	anti-egér IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
Orai1	poliklonális anti-Orai1 1:100 Sigma-Aldrich	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
IP₃RI	poliklonális anti-IP ₃ RI 1:200 Santa Cruz	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
IP₃RII	poliklonális anti-IP ₃ RII 1:200 Santa Cruz	anti-kecske IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
IP₃RIII	monoklonális anti-IP ₃ RIII 1:2000 BD Laboratories	anti-egér IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2X₁	poliklonális anti-P2X ₁ 1:100 Alomone Labs	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2X₄	poliklonális anti-P2X ₄ 1:100 Alomone Labs	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2X₅	poliklonális anti-P2X ₅ 1:200 Santa Cruz	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2X₆	poliklonális anti-P2X ₆ 1:200 Santa Cruz	anti-kecske IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2X₇	poliklonális anti-P2X ₇ 1:100 Alomone Labs	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2Y₁	poliklonális anti-P2Y ₁ 1:100 Sigma-Aldrich	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2Y₂	poliklonális P2Y ₂ 1:200 Alomone Labs	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2Y₄	poliklonális P2Y ₄ 1:200 Santa Cruz	anti-kecske IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
P2Y₆	poliklonális P2Y ₆ 1:200 Santa Cruz	anti-kecske IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.
Aktin	poliklonális anti-aktin 1:200 Santa Cruz	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Hungary Kft.

Egyedi sejteken történő fluoreszcens intracelluláris [Ca²⁺]-mérés

A CPC sejtenyészetek, valamint a vázizomtenyészetek (C1 klón, C5 klón, Scr és kontroll sejtek) sejtjeinek intracelluláris [Ca²⁺]-változásait Fura-2-AM fluoreszcens Ca²⁺-kötő festék segítségével mértük. A mérés alapelve, hogy a Ca²⁺-t kötött festék abszorpciós maximuma (380 nm) eltér a Ca²⁺-t nem kötött festékétől (340 nm), így a két hullámhosszon történő gerjesztést követően emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából meghatározható az intracelluláris [Ca²⁺]. A méréshez a CPC sejtenyészeteket és a

vázizomtenyészeteket azonos módon készítettük elő. A sejteket 30 mm-es üveg fedőlemezen tenyésztettük. A feltöltéshez Fura 2-AM festék 10 μ M-os törzsoldatából 10 μ l végkoncentrációt alkalmaztunk, a festék acetoximetilészter formája biztosítja a sejtmembránon keresztüli festékfelvételt. A 2 ml inkubációs 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 végeztük a további vizsgálatokat. A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM kettős monokromátoros berendezése biztosította (7. ábra). 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 vezetik a fényt egy csatoló egységen, valamint egy dikroikus 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 méréseket szobahőmérsékleten végeztük.



7. ábra: A PTI mérőrendszer felépítése. A sejtekben lévő Ca^{2+} -érzékeny festéket 340 és 380 nm hullámhosszon gerjesztjük, majd az emissziót 510 nm-en detektálva, a hányadosukból az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kiszámítható.

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

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R), \quad (1.)$$

ahol K_D a festék disszociációs állandója, $R_{\max}$ az a fluoreszcencia hányados, 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 körülmények (oldatok) az 1-4 napos CPC sejttenyészetek, valamint a vázizomtenyészetek esetén különbözőek voltak.

Vázizomtenyészetek esetén az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -t valamint a sejtek válaszaiként megjelenő Ca^{2+} -tranzienseket 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) és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban vizsgáltuk. Utóbbi esetben a CaCl_2 elhagyása mellett az oldat 5 mM EGTA-t tartalmazott. Depolarizáló hatású oldatként 120 mM koncentrációjú KCl-t tartalmazó oldatot alkalmaztunk, melyet normál Tyrode-oldatból készítettünk azonos mennyiségű NaCl

elhagyásával. Az oldatok adagolásához lokális perfúziós rendszert használtunk (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific, USA), a vizsgált anyagok oldatát egy vékony lokál-perfúziós tű (belső átmérő: 250 µm, áramlási sebesség: 1,5 µL/s, Perfusion Pencil™, AutoMate Scientific) segítségével juttattuk a mérni kívánt sejtek közvetlen közelébe. A mérési eredményeket egy a Debreceni Egyetem Élettani Intézetében kifejlesztett program segítségével értékeltük ki.

CPC sejtenyészetek esetében a méréseket normál Tyrode- vagy Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban végeztük. Az aspecifikus IP_3R inhibítort, a 2-aminoethoxidifenil borátot (2-APB) Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban 75 µM végkoncentrációban (törzsoldat: 1M, DMSO-ban); a nem specifikus TRPC antagonistát, a YM-58483-t 1 µM végkoncentrációban (törzsoldat: 1 mM, DMSO-ban); az aspecifikus Ca^{2+} -csatorna blokkoló LaCl_3 -t pedig 500 µM végkoncentrációban (törzsoldat: 300 mM, DMSO-ban) normál Tyrode-oldatban oldottuk be. A normál Tyrode-ból készített koffein-oldatot (30 mM) a RyR stimulálására, valamint a P1 adenozin receptor antagonizálására használtuk. A szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA) inhibítora a ciklopiazon sav (CPA; 10 µM) Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban került alkalmazásra (törzs: 10 µM, DMSO-ban). Az általánosan használt P2X és P2Y purinerg receptor agonista ATP-t (180 µM) normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban is beoldottuk, hasonlóan a P2Y purinerg receptor agonistához (ADP, UTP, UDP; mindegyik 100 µM végkoncentrációjú). A Ca^{2+} -mentes ATP, ADP, UDP és UTP alkalmazását megelőzően a sejtekre 150 másodpercig adagoltunk Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatot. Az aspecifikus, P2X és P2Y purinerg receptorok inhibitoraként ismert suramin-oldatot normál Tyrode-oldatból készítettük 10 µM végkoncentrációban. A Ca^{2+} -mentes ATP adagolást megelőzően a sejteket 150 másodpercig Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban tartottuk. A P1 receptor agonistájaként ismert adenozint 100 µM végkoncentrációban, normál Tyrode-oldatban használtuk.

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a Ca^{2+} -pumpa aktivitásának analízisa

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ számítását a fluoreszcencia intenzitás hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$), az (1.) egyenlet segítségével *in vivo* kalibráltuk. A kalibráció során kapott értékek a következők voltak: $R_{\min} = 0.2045$, $R_{\max} = 8.315$, $K_d \times \beta = 1183$ nM. A Ca^{2+} -pumpa aktivitását és a Ca^{2+} -fluxust, az intracelluláris kötőhelyek Ca^{2+} -kötését, valamint az intracelluláris térből történő Ca^{2+} -eltávolítást munkacsoportunk korábban publikált közleményei alapján határoztuk meg [47,92]. A Ca^{2+} -kötődés mértékének meghatározásánál figyelembe vettük a SERCA-pumpa, a troponin C, a parvalbumin és a festék által megkötött Ca^{2+} -t, valamint annak eltávolítását is. A

Ca^{2+} -pumpa maximális transzportkapacitása (PV_{max}) a Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárára illesztett görbéből határozható meg, az intézetünk által kifejlesztett, a legkisebb négyzetek módszerét alapul vevő számítógépes program segítségével. A modell többi paraméterét állandóként kezeltük az irodalomból vett adatokat felhasználva [93].

A sejtproliferáció és differenciáció vizsgálata

A C2C12 sejteket 3 cm átmérőjű műanyag Petri-csészékben tenyésztettük, és a tenyésztés 1. napjától az 5. napig felvételeket készítettünk, a fázis kontraszt mikroszkóphoz csatlakoztatott fényképezőgép segítségével (Canon EOS-300D, Japan). A nem transzfektált sejtek mellett a SERCA1b shRNS-el transzfektált sejteket (C1, C5, Scr) is nyomon követtük, kontroll és ciklosporinnal (CSA) kezelt körülmények között egyaránt. A 200 nM-os CSA oldattal minden 2. nap kezeltük a sejteket. A tenyésztés minden egyes napján képeket készítettünk a tenyésztőedények (kezelt és kontroll) 5-5 véletlenszerűen kiválasztott látóteréről. A DAPI-val megfestett sejtmagokat manuálisan körberajzoltuk, majd kvantitatív analízisnek vetettük alá őket. A sejtproliferációt a sejtmagok számából határoztuk meg úgy, hogy minden sejttípus sejtmagszámát (C1, C5, Scr, kontroll) a saját 24 órás sejtmagszáma normalizáltuk. A differenciált miotubulusok kvantitatív paramétereit 20-20 random látótérből, 3 független kísérlet eredményeiből állapítottuk meg (40×olajimmerziós objektív, LSM 510 META, Zeiss). A miotubulusok átmérőjét Image Browser (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével értékeltük ki.

Kalcineurin-enzimaktivitás mérése

Az *in vitro* kalcineurin-enzimaktivitás (CaN) méréséhez 10 cm átmérőjű műanyag Petri-csészében tenyésztettük a sejteket, majd fiziológiás sóoldatos mosást követően összegyűjtöttük a mintát. Centrifugálást követően a sejtpelletet, 100 μL RIPA -pufferben (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% nátrium-deoxikolat, 50 mM Tris, pH 8,0) homogenizáltuk, amely tartalmazott még proteáz-inhibitorokat is (aprotinin (10 $\mu\text{g/mL}$), benzamidin (5 mM), leupeptin (10 $\mu\text{g/mL}$), tripszin inhibitor (10 $\mu\text{g/mL}$), PMSF (1 mM), EDTA (5 mM), EGTA (1 mM), Na-fluorid (8 mM), Na-ortovanadát (1 mM)). A szonikálását követően (Cole-Parmer, Illinois, USA) a mintákat centrifugáltuk (10000 g, 10 perc, 4°C), s a felülúszó fehérje koncentrációjának meghatározását (BCA) követően végeztük az enzimaktivitás mérést. A kalcineurin aktivitás detektálásához RII foszfopeptid szubsztrátot adtunk a mintákhoz, és meghatároztuk a felszabaduló PO_4^{3-} mennyiségét malachite green kolorimetriás assay segítségével (Abcam, Cambridge, UK). Az assay útmutatóját követve minden mérési

csoportban 6 db tenyészetet használtunk fel, 2 független kísérleti sorozatban. A detektálást 650 nm-en végeztük Multifunctional plate reader (Chameleon Hidex, Turku Finland) segítségével.

Statisztikai analízis

Minden értéket az $\text{átlag} \pm \text{az átlagok standard hibája (SE)}$ formában adtuk meg. A statisztikai szignifikanciát Student-féle t -próbával számoltuk, $p < 0,05$ értékeket tekintve szignifikánsnak. Az eredményeink legalább 2 független kísérlet eredményeit tükrözik (az esetek döntő többségében 3 független kísérlet).

Eredmények

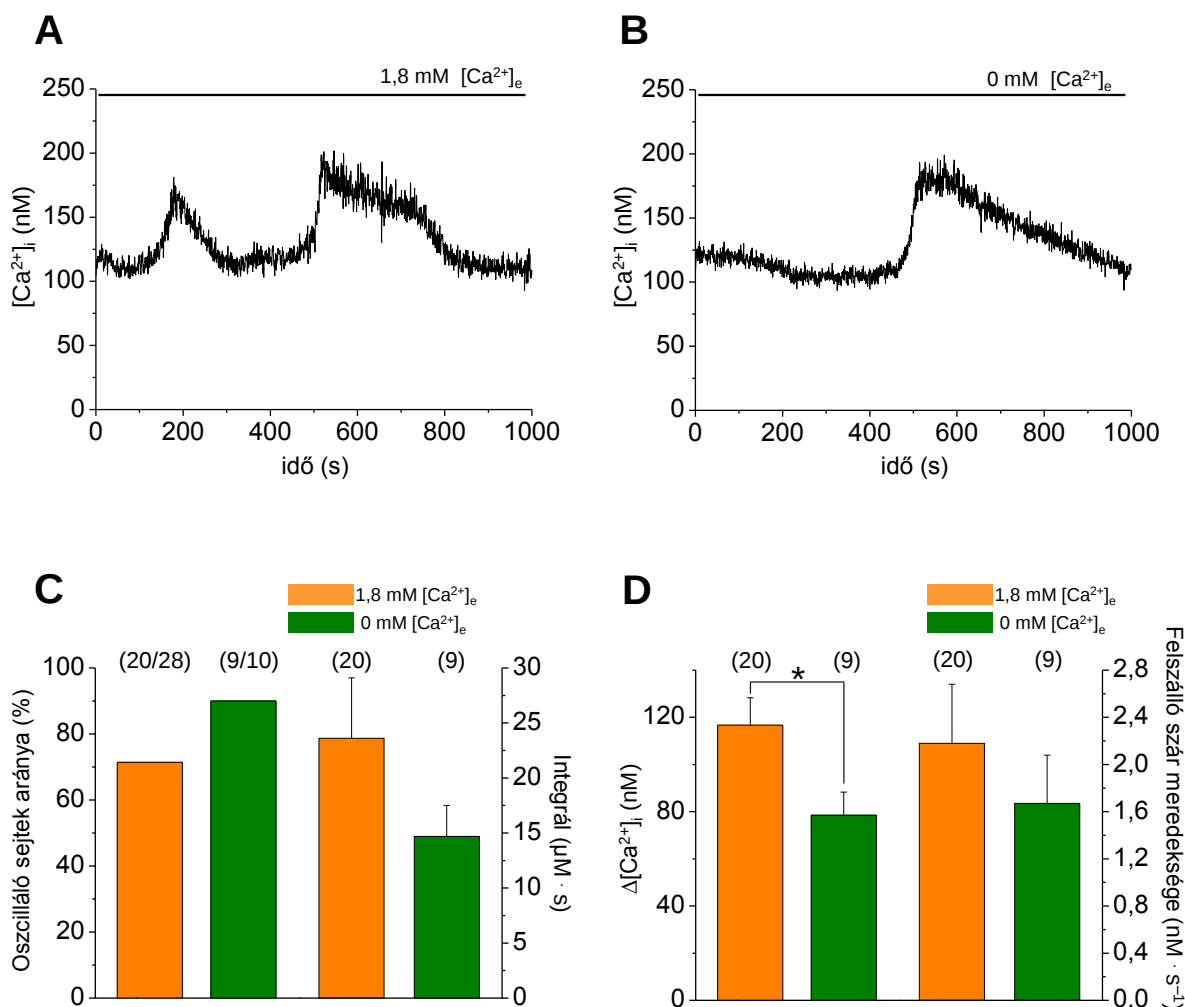
Eredmények I.-Porcszövet

Az IP₃-receptoron keresztül, a belső raktárból felszabaduló Ca²⁺ spontán Ca²⁺-tranzienseket okoz CPC sejteken

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy primer porcsejtek differenciálódásakor (a tenyésztés 3. napján) jelentősen megemelkedik az intracelluláris [Ca²⁺]. A citoplazmatikus [Ca²⁺] a differenciálódás kezdetén mérhető viszonylag alacsony (80 nM) szintről a differenciálódás napjára szignifikánsan magasabb (140 nM) értéket ér el, majd ezt követően újra alacsonyabb (kb. 100 nM) értéken stabilizálódik. Ez a változás szoros összefüggést mutat a differenciálódással, annak egyik előfeltétele. Munkacsoportunknak sikerült azt is igazolnia, hogy a differenciálódás napján mérhető megemelkedett Ca²⁺-szinthez szükséges ionok elsősorban az extracelluláris térből származnak [15].

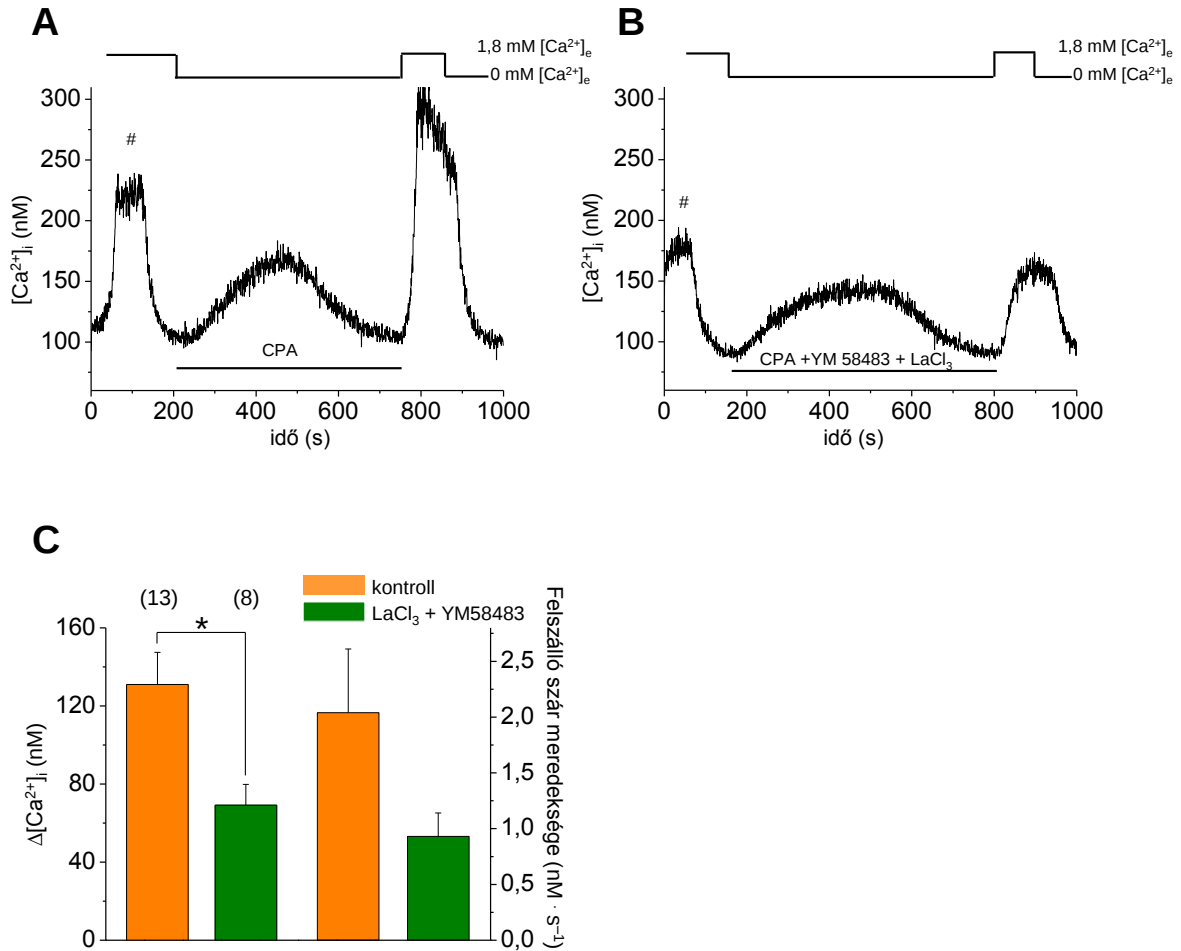
Kísérleteink kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a CPC sejtenyészetek sejtjein megjelennek-e olyan funkcionális receptorfehérjék, melyek a spontán kialakuló Ca²⁺-oszcillációk háttérében állhatnak. A Fura-2-AM festékkel feltöltött porcsejtek intracelluláris [Ca²⁺]-ját 1000 s-on keresztül detektáltuk. Tapasztalataink szerint a sejtek többsége (28 sejtől 20 sejt, 71%) eltérő frekvenciával és amplitúdóval spontán Ca²⁺-tranzienseket produkált normál Tyrode-oldatban (8. ábra A, C, D). A tranziensek átlagos frekvenciája $1,3 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-4}$ Hz volt, az időegység alatt felszabaduló [Ca²⁺] mennyiségének átlagértéke $23,6 \pm 5,4 \mu\text{M} \cdot \text{s}$, a Ca²⁺-tranziensek átlagos amplitúdó értéke 117 ± 12 nM, a felszálló szár meredeksége pedig $2,2 \pm 0,5$ nM $\cdot$ s⁻¹ volt. Minden esetben 20 sejt átlagát vettük figyelembe. Annak eldöntésére, hogy a citoszól megemelkedett Ca²⁺-szintjéért a belső raktár felelős vagy pedig a plazmamembrán Ca²⁺-csatornákon keresztül érkező Ca²⁺, további kísérletekre volt szükség. Először Ca²⁺-mentes Tyrode-oldatban vizsgáltuk a sejtek [Ca²⁺]_i változásait. Azt tapasztaltuk, hogy a porcsejteken még ilyen körülmények között is megfigyelhetők spontán Ca²⁺-tranziensek (10 sejtől 9 sejt), habár az amplitúdó és a frekvencia is csökkent az extracelluláris Ca²⁺-ot tartalmazó oldatban mértékhez képest (8. ábra B, D). Ez utóbbi esetben a tranziensek átlagos frekvenciája $1,4 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-4}$ Hz, az átlagos amplitúdó mértéke $78,5 \pm 9,8$ nM, az egységnyi idő alatt felszabaduló [Ca²⁺] mennyiségének átlagértéke $14,7 \pm 2,8 \mu\text{M} \cdot \text{s}$, a felszálló szár meredeksége pedig $1,7 \pm 0,4$ nM $\cdot$ s⁻¹ -nak adódott. A normál Tyrode-oldatban és a Ca²⁺-mentes Tyrode-oldatban mért sejtek Ca²⁺-tranzienseinek amplitúdó értékei között szignifikáns eltérést tapasztaltunk, de sem a felszabaduló [Ca²⁺]-ban, sem pedig a felszálló szár meredekségében nem találtunk szignifikáns

különbséget a kontroll sejtek értékeihez képest (8. ábra C, D). Az eredményeink arra utalnak, hogy a plazmamembrán ioncsatornáin keresztül megvalósuló Ca^{2+} -influx bár hozzájárul az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedéséhez, de nagyrészt a belső raktárból felszabaduló Ca^{2+} -nak köszönhető a spontán oszcilláció. Ezen állítás bizonyítására újabb kísérleteket hajtottunk végre.



8. ábra: Spontán Ca^{2+} -tranziensek a CPC sejtekben és az összesített eredmények. (A) Normál körülmények között mért Ca^{2+} -oszcilláció agonista alkalmazása nélkül (1,8 mM Ca^{2+} -tartalmú Tyrode-oldat, szobahőmérséklet). **(B)** Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban detektált Ca^{2+} -oszcilláció agonista alkalmazása nélkül. **(C)** Oszcilláló sejtek aránya (%) és a Ca^{2+} -tranziensek integrál értékei. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. **(D)** A tranziensek amplitúdóinak és a felszálló szár meredekségének átlagértékei ($d[\text{Ca}^{2+}]_i/dt$). A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. A csillag (*) szignifikáns ($p < 0,05$) változást mutat a normál Ca^{2+} -tartalmú és a Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban detektált tranziensek amplitúdó értékei között.

Először azt vizsgáltuk, hogy a belső raktárból felszabaduló Ca^{2+} milyen mértékű és milyen útvonalakat aktivál. A kalcium visszavételezéséért felelős SERCA pumpa gátlására CPA-oldatot alkalmaztunk ($10\ \mu\text{M}$), míg a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés (SOCE) gátlására LaCl_3 -t ($500\ \mu\text{M}$) és YM-58483-t ($1\ \mu\text{M}$) tartalmazó koktélt adagoltunk a sejtekre. Miután a sejtek nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációja stabil értékre beállt, a perfúziós rendszer segítségével a mérőkádban az oldatot Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatra cseréltük, majd CPA-t tartalmazó oldat ($10\ \mu\text{M}$) adagolásával kiürítettük a raktárat (9. ábra A). Az ekkor tapasztalt belső Ca^{2+} -raktárból történő Ca^{2+} -felszabadulás valószínűleg az IP_3 -receptoron keresztül valósul meg. Mivel a SERCA gátolva volt, ezért a regisztrátumon megjelenő tranziensért más csatornák is felelőssé tehetők, például a plazmamembrán Ca^{2+} -ATP-ázok (PMCA) vagy a Na^{2+} - Ca^{2+} exchanger-ek (NCX), amelyek egyes izoformáit sikerült kimutatnunk mRNS-szinten. A regisztrált adatokból számolt felszabadult Ca^{2+} -mennyisége $22,2 \pm 2,4\ \mu\text{M} \cdot \text{s}$ -nak adódott ($n=25$), ami jó egyezést mutat az irodalomban található más sejttípusok esetében mért értékekkel [94]. Amikor az oldatot lecseréltük $1,8\ \text{mM}$ Ca^{2+} -tartalmú Tyrode-oldatra, akkor nagy amplitúdójú ($131,0 \pm 16,4\ \text{nM}$ vs. $69,2 \pm 10,6\ \text{nM}$) Ca^{2+} -tranzienszt detektáltunk, ami a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés (SOCE) eredménye. A kísérletet nem specifikus SOCE gátlószerek, a YM-58483 ($1\ \mu\text{M}$) és LaCl_3 ($500\ \mu\text{M}$) együttes jelenlétében megismételve, szignifikánsan kisebb amplitúdójú tranzienseket regisztráltunk ($n=13$ és $n=8$, $p=0,005$). Bár a felszálló szár meredekségében nem találtunk szignifikáns különbséget a két eset között ($2,0 \pm 0,5\ \text{nM} \cdot \text{s}^{-1}$, normál Tyrode-oldatban regisztrált vs. $0,9 \pm 0,2\ \text{nM} \cdot \text{s}^{-1}$, SOCE-gátlók jelenlétében regisztrált; $n=13$ és $n=8$, $p=0,16$; 9. ábra B, C), de az eredményekből arra következtettünk, hogy a belső Ca^{2+} -raktárnak kitüntetett szerepe van a spontán Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásában.



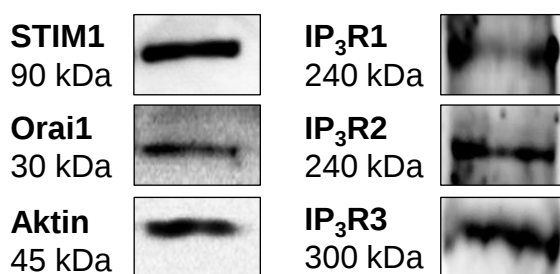
9. ábra: A belső Ca^{2+} -raktárak funkcionális vizsgálata kondroprogenitor sejtekben. (A) A raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés vizsgálata Fura-2-AM-el feltöltött sejteken PTI mérőrendszer segítségével. A sejtek belső Ca^{2+} -raktárát először kiürítettük Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban alkalmazott 10 μ M CPA-val (500-600 s), amelyet a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ jelez. Normál Ca^{2+} -tartalmú oldatra való visszatérés során, viszonylag nagy Ca^{2+} -transziens alakult ki, amely a SOCE mechanizmusát szemlélteti. A kettős kereszt (#) a mérés elején bekövetkező spontán Ca^{2+} -oszcillációt jelzi. (B) A raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés vizsgálata Fura-2-AM-el feltöltött sejteken PTI mérőrendszer segítségével. A SOCE-t 500 μ M LaCl₃ és 1 μ M YM-58483 együttes adásával gátoltuk. A kettős kereszt (#) a mérés elején bekövetkező spontán Ca^{2+} -oszcillációt jelzi. (C) Összesített eredmények kontroll és kezelt sejtek esetében (LaCl₃ + YM-58483) az amplitúdó és a felszálló szár meredekségének vonatkozásában. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. A csillag (*) a kontroll és kezelt sejtek közötti szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget mutatja.

A továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az ER-ból milyen receptoron keresztül valósul meg a Ca^{2+} -felszabadulás. Ennek kiderítésére célul tűztük ki az IP₃-receptor szerepének megvizsgálását. A vizsgálat első lépéseként egy aspecifikus IP₃-receptor blokkoló szert, az APB-t (75 μ M) alkalmaztunk Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban. Ebben az oldatban nem tapasztaltunk spontán Ca^{2+} -oszcillációt, így a hipotézisünk, miszerint a Ca^{2+} -felszabadulás IP₃-

receptoron keresztül történik, helytállónak bizonyult. Ezzel ellentétben, 30 mM koffein adagolása nem befolyásolta sem a spontán kialakuló tranzienseket, sem pedig a nyugalmi Ca^{2+} -szintet. Ezen megfigyelések arra engedtek következtetni, hogy porcsejteken a RyR-nak nincs szabályozó szerepe a spontán oszcillációk kialakulásában.

A belső Ca^{2+} -raktár fehérjéinek expressziós vizsgálata

Az ER membránban elhelyezkedő IP_3 -receptornak meghatározó szerepe van a spontán létrejött Ca^{2+} -tranziensek kialakulásában. További kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a belső Ca^{2+} -raktár területén milyen fehérjék lokalizálódnak porcsejteken. Specifikus PCR primer párokat terveztünk, hogy azonosítani tudjuk a Ca^{2+} -felszabadulásban/visszavételben résztvevő fehérjék mRNS-transzkriptumait. Kísérleteink során azt az eredményt kaptuk, hogy mindhárom IP_3 -receptor izoforma (IP_3R -1, 2, 3) megtalálható porcsejteken. A RyR izoformák közül egyet sem tudtunk detektálni. A SOCE-ban szerepet játszó STIM izoformákat (STIM1, STIM2), ill. a plazmamembránban található CRAC csatorna 3 izoformáját (Orai1, Orai2, Orai3) szintén sikerült mRNS-szinten azonosítanunk. A következő lépésben megpróbáltuk kimutatni ezen csatornákat fehérje-szinten is, Western-blot technika segítségével. Ehhez a kimutatáshoz az adott fehérjére nézve specifikus antitestet használtunk, és sikerült fehérje-szinten is kimutatnunk az IP_3 -receptor izoformákat, ugyanakkor a SOCE-ban résztvevő fehérjék közül csak a STIM1 és Orai1 fehérjék jelenlétére találtunk bizonyítékot (10. ábra).

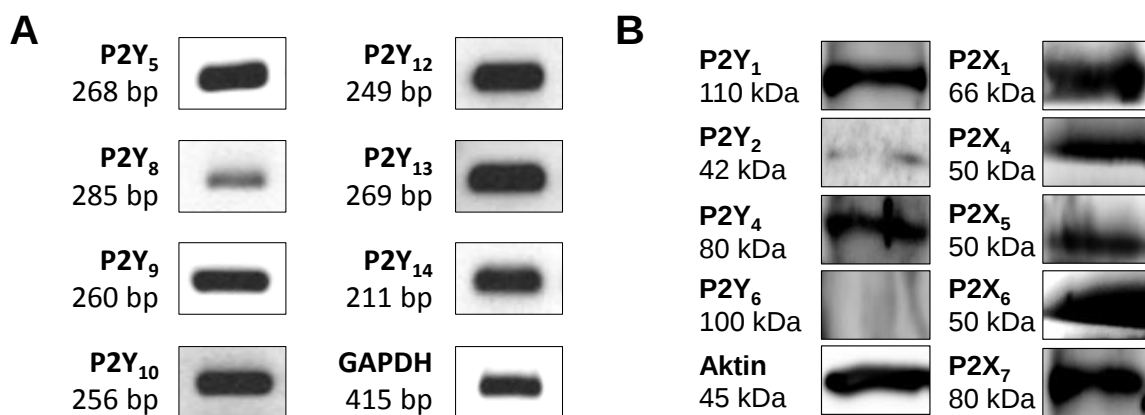


10. ábra: A SOCE mechanizmusában résztvevő fehérjék (STIM1, Orai1) és a Ca^{2+} -felszabadulásban szerepet játszó csatornák ($\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$, $\text{IP}_3\text{R3}$) izotípusainak fehérje expressziós vizsgálata. Kontrollként aktint használtunk. A reprezentatív ábrák 3 független kísérlet eredményei.

A Ca^{2+} -tranziensek kialakításában szerepet játszó szignalizációs útvonal felderítése

Következő kísérleteinkben az IP_3 -receptoron keresztül felszabaduló Ca^{2+} -tranziensek létrejöttéhez szükséges extracelluláris szignálok felderítését tűztük ki célul. Irodalmi adatok

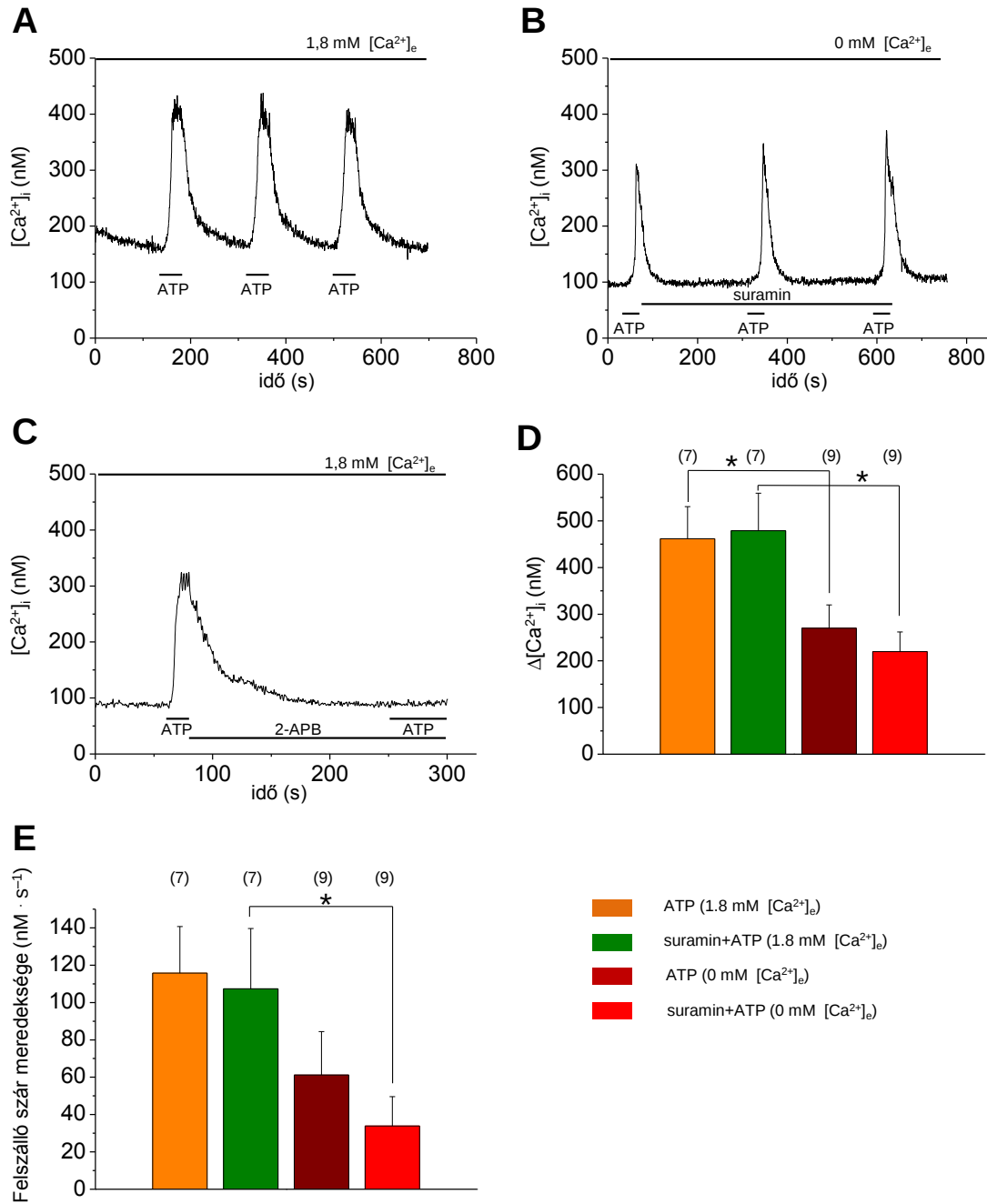
arra utalnak, hogy humán mezenhimális őssejtekben (MSC-k) a Ca^{2+} -tranziensek kialakításáért az autokrin/parakrin szignalizációs hurok felelős [50], valamint hogy csirke kondroprogenitor sejtekben az ionotróp purinreceptor, a P2X_4 bizonyítottan fontos szerepet játszik a differenciálódásban [17]. Ezek alapján feltételeztük, hogy a purinerg szignalizációs folyamatok szerepet játszhatnak migratorikus progenitor sejtek kalciumhomeosztázisában is. Hipotézisünk bizonyítása érdekében először mRNS-szinten vizsgáltuk a Ca^{2+} -homeosztázisban résztvevő purinerg receptorok kifejeződését. Eredményeink alapján elmondható, hogy az A_1 adenosin-receptor altípusai az A_3 kivételével expresszálódnak (A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$, $\text{A}_{2\text{B}}$), a P2X ionotróp purinerg receptorok közül a P2X_1 , P2X_4 , P2X_5 , P2X_6 , P2X_7 kimutatható, illetve a G_q -fehérjéhez kapcsolt P2Y metabotróp purinerg receptor altípusok is detektálhatóak RT-PCR segítségével a CPC-kben (4. táblázat, 11. ábra A). Következő lépésként ezen transzkriptumok fehérje-szintű kifejeződését is megvizsgáltuk (11. ábra B). A P2Y receptorok közül csak a G_q -fehérjéhez kapcsolt receptor altípusokat vizsgáltuk, így a P2Y_1 -t, P2Y_2 -t, P2Y_4 -t, P2Y_6 -t és P2Y_{11} -t. Amíg a P2X receptor 5 izoformáját sikerült kimutatnunk, addig a P2Y receptor közül csak a P2Y_1 és P2Y_4 , valamint a P2Y_2 csak nagyon gyengén volt detektálható.



11. ábra: Purinerg receptorok vizsgálata RT-PCR és Western-blot technika segítségével. (A) A P2Y receptorok altípusainak mRNS-szintű expressziós profilja. A reprezentatív ábrák 3 független kísérlet eredményei. Kontrollként GAPDH-t használtunk. **(B)** A purinerg receptorok altípusainak kimutatása Western-blottal. A vizsgálatokhoz teljes sejtlizátumot használtunk (minden minta esetében 30 μg fehérjét). Kontrollként aktint alkalmaztunk. Az eredmények 3 független kísérletből származnak.

A fent említett receptorok funkciójának megállapítására egyedi sejten történő Ca^{2+} -mérést végeztünk, P1 és P2 receptor agonisták adagolása révén. Az általánosan elfogadott P2 receptor agonista ATP-t 180 μM -os koncentrációban alkalmazva a sejteken, gyors és nagy

amplitúdójú (338 ± 29 nM, $n=44$ sejt a 48-ból, 91%) Ca^{2+} -tranzienst sikerült detektálnunk normál Tyrode-oldatban, melyet újabb ATP adagolása mellett ismételten tudtunk detektálni (4. táblázat, 12. ábra A). A tranziensek átlagos időtartamát az időbeli félértékszélességgel (FTHM, full time at half maximum) jellemeztük, ami $16,1 \pm 2,6$ s-nak adódott. Ahhoz, hogy bizonyítani tudjuk a P2X és P2Y receptorok funkcionális szerepét, nem-specifikus P2 receptor antagonistát, suramint ($10 \mu\text{M}$) alkalmaztunk. Suramin adagolására a Ca^{2+} -tranziensek jellemző paraméterei nem változtak a csak ATP adagolása mellett rögzített adatsorhoz képest, sem normál, sem pedig Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban regisztrált adatsorokban (12. ábra B, D, E), ami arra utal, hogy a Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásáért a főbb suramin-inszenzitív P2 purinerg receptorok (P2X₄, P2X₆ és/vagy P2Y₄) a felelősek. A kísérletet Ca^{2+} -mentes körülmények között megismételve a repetitív tranziensek ugyanúgy detektálhatóak voltak, de a kontrollhoz képest szignifikánsan kisebb amplitúdóval (205 ± 25 nM, $n=35$; 12. ábra D). Ugyancsak szignifikáns különbséget tapasztaltunk a felszálló szár meredekségében is, a kontroll és Ca^{2+} -mentes körülmények között regisztrált adatsorban ($72,9 \pm 12,6$ nM $\cdot$ s⁻¹ vs. $35,4 \pm 8,8$ nM $\cdot$ s⁻¹, $p < 0,05$; 12. ábra E). Ugyanakkor nem találtunk jelentős különbséget a tranziensek időtartama között a két mérési adatsorban ($20,6 \pm 3,1$ s; $p = 0,29$). A fent említett eredmények azt sugallják, hogy mind az ionotróp P2X, mind pedig a metabotróp P2Y purinerg receptorok és/vagy a SOCE hozzájárulnak a spontán Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásához. Azonban, amikor az IP₃-receptor inhibitorát, a 2-APB-t az ATP-vel együtt adagoltuk a sejtekre, tranzienszt csak néhány esetben sikerült detektálnunk ($n=2$ a 19 sejtből, 10%; 12. ábra C), ezért úgy gondoljuk, hogy a tranziensek létrejötte leginkább a metabotróp P2Y receptor aktivitásából adódik, vagy a 2-APB aspecifikusan gátolja a Ca^{2+} -belépést.

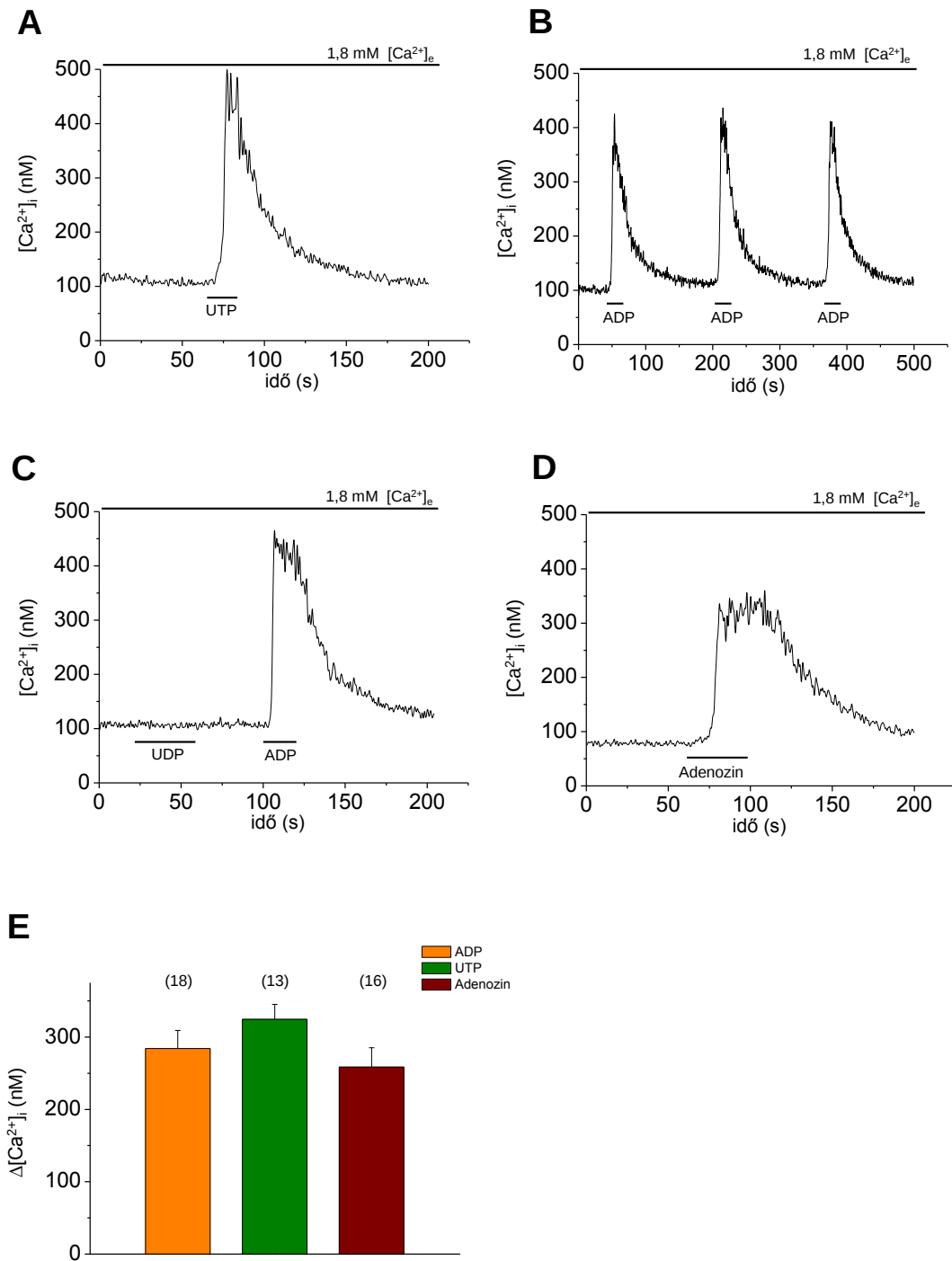


12. ábra: A P2 purinerg receptorok funkcionális karakterizálása. **(A)** ATP adagolására bekövetkező Ca^{2+} -tranziensek reprezentatív ábrája. **(B)** A P2 receptor nem-specifikus antagonistájának, a suraminnak (10 μ M) hatása az ATP-vel kiváltott Ca^{2+} -tranziensekre Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban. **(C)** Normál Tyrode-oldatban mért Ca^{2+} -tranziens ATP és az aspecifikus IP_3 R blokkoló 2-APB jelenlétében. **(D)** Az ATP hatására kialakult Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóinak értéke normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban. Kontrollnak a suramin adagolása előtti Ca^{2+} -tranzienszt tekintettük. **(E)** Az ATP-vel kiváltott Ca^{2+} -tranziensek felszálló szárának meredeksége normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban. Kontrollként a suramin adagolása előtti Ca^{2+} -tranzienseket használtuk. A zárójelben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. A csillag (*) a normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban regisztrált tranziensek közötti szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget mutatja.

A kondroprogenitor sejtek Ca^{2+} -homeosztázisában kulcsszerepet játszó P2Y receptorok szerepének további, precízebb felderítésére a következő kísérleteket végeztük el. Különböző P2Y receptor agonistákat alkalmaztunk a Ca^{2+} -mérések során (7. táblázat). Az UTP (P2Y₂ és P2Y₄ agonista, 100 μM ; 13. ábra A) és az ADP (P2Y₁, P2Y₁₂ és P2Y₁₃ agonista, 100 μM ; 13. ábra B) adagolása nagy Ca^{2+} -tranzienseket váltott ki (325 ± 21 nM és 284 ± 25 nM) a detektált sejtek többségében ($n=13$ a 15 sejtből és $n=18$ a 20 sejtből; 13. ábra E), míg az UDP (P2Y₆ agonista, 100 μM) alkalmazása mellett semmilyen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást nem tudtunk detektálni ($n=0$ a 11 sejtből; 13. ábra C). A P1 adenosin receptorok funkcionális szerepét adenosin (100 μM) adagolásával vizsgáltuk meg. Eredményeink szerint a legtöbb sejtben létrejött Ca^{2+} -tranziens ($n=16$ a 18 sejtből; 13. ábra D), melyek amplitúdójának átlagos értéke 259 ± 27 nM volt. A P1 receptor blokkoló koffein (30 mM) adenosinnal történő egyidejű alkalmazása mellett azonban az intracelluláris kalciumkoncentrációra kifejtett hatás elmaradt (10 sejtből egy sem válaszolt). Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a P1 receptornak, valamint a P2Y receptoroknak kitüntetett szerepük van a Ca^{2+} -tranziensek létrejöttében. A mérésekből született fontosabb adatokat a 7. táblázat foglalja össze.

7. táblázat: Nyugalmi ($[\text{Ca}^{2+}]_{i,\min}$) és maximális ($[\text{Ca}^{2+}]_{i,\max}$) Ca^{2+} -koncentráció érték, amplitúdó és időbeli félértékszélesség értékek (FTHM) agonista stimuláció hatására (ATP, ADP, UDP, UTP, Adenosin). A p érték az ATP adagolása következtében kialakult, normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban regisztrált tranziensek közti különbséget mutatja. Az adatok az átlagokat $\pm$ az átlagok standard hibáját (SEM) mutatják.

	$[\text{Ca}^{2+}]_{i,\min}$ (nM)	$[\text{Ca}^{2+}]_{i,\max}$ (nM)	Amplitúdó (nM)	FTHM (s)
ATP, 180 μM ($[\text{Ca}^{2+}]_e=1,8$ mM), $n=44$	$121,19 \pm 3,47$	$452,80 \pm 28,93$	$338,19 \pm 28,56$	$16,11 \pm 2,63$
ATP, 180 μM ($[\text{Ca}^{2+}]_e=0$ mM), $n=35$	$97,02 \pm 4,20$	$301,68 \pm 27,03$	$204,65 \pm 25,03$	$20,63 \pm 3,09$
p	$2,8 \cdot 10^{-7}$	0,0002	0,0009	0,29
ADP, 100 μM ($[\text{Ca}^{2+}]_e=1,8$ mM), $n=18$	$112,04 \pm 3,12$	$396,11 \pm 24,85$	$284,07 \pm 25,02$	$24,13 \pm 2,47$
UTP, 100 μM ($[\text{Ca}^{2+}]_e=1,8$ mM), $n=13$	$98,24 \pm 3,86$	$422,83 \pm 23,19$	$324,58 \pm 20,50$	$23,03 \pm 2,59$
Ade, 100 μM ($[\text{Ca}^{2+}]_e=1,8$ mM), $n=16$	$119,56 \pm 11,5$	$378,06 \pm 34,60$	$258,49 \pm 26,71$	$23,04 \pm 3,15$



13. ábra: P1 és P2Y receptorok funkcionális karakterizálása. (A) UTP adagolását követően kialakult Ca^{2+} -tranzienst reprezentatív ábrája. A méréseket minden esetben normál Tyrode-oldatban végeztük. **(B)** Ismételt ADP (100 μ M) adagolására kialakult Ca^{2+} -tranzienst reprezentatív ábrája. **(C)** 100 μ M UDP hatása az intracelluláris Ca^{2+} -szintre. **(D)** Adenozin hatására kialakult Ca^{2+} -tranzienst, amely bizonyítja az A1 receptorok funkcionális szerepét a porcsejtekben. **(E)** Átlagos amplitúdó értéket mutató összesített eredmények. Az adatok az átlagokat $\pm$ az átlagok standard hibáját (SEM) mutatják. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

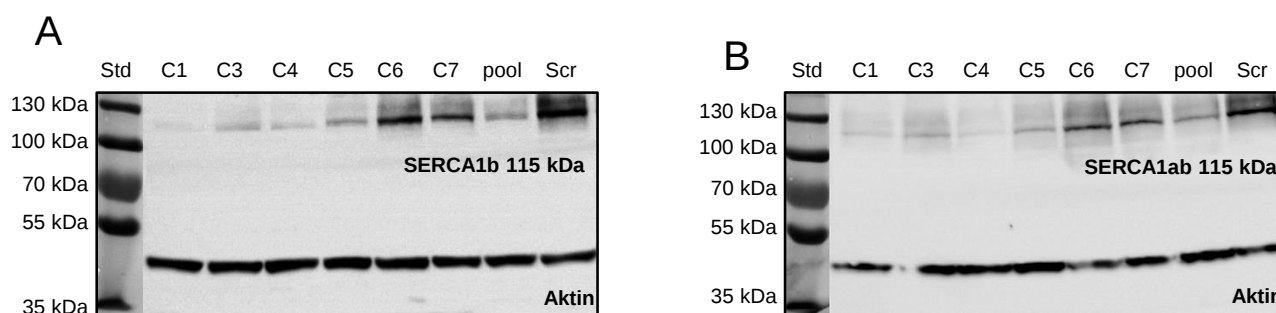
Az ATP szerepének vizsgálata a spontán Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásában

Ahogy azt már korábban említettem, a humán MSC-kben az autokrin/parakrin purinerg szignalizációs hurok felelős a Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásáért, ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy a purinerg receptorok miként játszanak szerepet az ismétlődő Ca^{2+} -tranziensek kialakulásában. Ennek kiderítésére ekto-ATP-difoszfahidrolázt alkalmaztunk, amely ADP-áz vagy apiráz néven is ismert, egy plazmamembránhoz kötött enzim, mely defoszforilálja az extracelluláris adenozin 5'-trifoszfátot (ATP) és adenozin 5'-difoszfátot (ADP), adenozin 5-monofoszfáttá (AMP). Ezt az enzimet korábban CD39 néven azonosították, a B-limfocitákon található aktivációs marker alapján [95]. Magát az enzimet $5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ koncentrációban alkalmaztuk az egyedi sejten történő Ca^{2+} -mérés ideje alatt. Apiráz jelenlétében nem alakult ki ismétlődő Ca^{2+} -tranziens ($n=5$), amiből arra következtettünk, hogy az extracelluláris ATP jelenléte elengedhetetlen a spontán Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásában.

Eredmények II.-Vázizomszövet

C2C12 sejtenyészetek, transzfekció

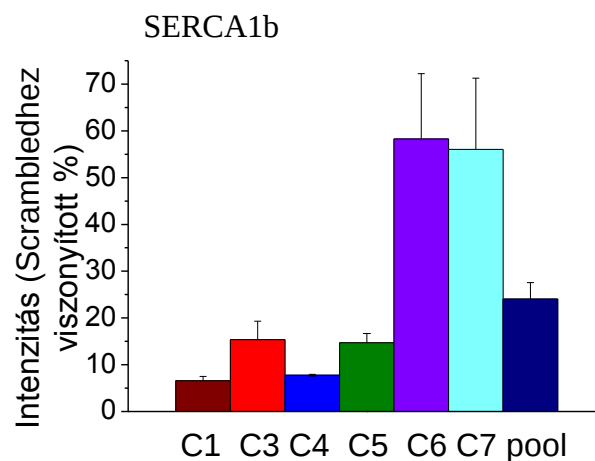
Irodalmi adatokból ismert, hogy a SR Ca^{2+} -pumpájának neonatális izoformája -a SERCA1b- meghatározó szerepet tölt be a miotubulusok és a fiatal állatok vázizmának Ca^{2+} -homeosztázisában [96,97]. Kísérleteink ezen részében ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a SERCA1b pumpa géncsökkentésének esetleges hatásait. A kísérletek kivitelezéséhez C2C12 egér eredetű vázizomsejteket használtunk, és olyan expressziós vektort terveztünk, amely tartalmazza a SERCA1b elleni specifikus shRNS szekvenciát (pLKO.1-puro-CMV-tGFP). A sejtenyészeteken liposzóma mediált transzfekciót alkalmaztunk. A transzfekciós hatékonyságot a SERCA1b fehérjére specifikusan tervezett antitesttel ellenőriztük, Western-blot technika segítségével. A 14. ábra szemlélteti, hogy 6 klónból négyben sikerült a fehérje expresszióját csökkentenünk (C1, C3, C4 és C5 klón).



14. ábra: A csökkent SERCA1b fehérje expresszió vizsgálata C2C12 miotubulusokban. (A-B) A SERCA fehérje expressziójának vizsgálata SERCA1b-specifikus shRNS-el transzfektált sejtekben Western-blot technika segítségével. A stabil transzfekciót követően 6 klónt vizsgáltunk, valamint a scrambled és pool tenyészetet. A 115 kDa-os izoformát kétféle antitesttel detektáltuk: az egyik kizárólag csak a SERCA1b izoformát ismeri fel (A), a másik pedig mind a SERCA1a és mind az 1b izoformákat (B). Kontrollként aktint használtunk.

Bár az irodalomból ismert, hogy C2C12 vázizomsejtekben csak a SERCA1b expresszálódik [97], ennek alátámasztása érdekében ugyanezen mintákban a SERCA fehérje kimutatását megismételtük olyan antitesttel, amely felismeri a SERCA1a (felnőtt szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz izoforma) és 1b szekvenciákat is (14. ábra B). A két kísérletben hasonló eredményt kaptunk, azaz a 6 klónból négyben jelentősen csökkent a fehérje expressziója a géncsökkentést követően. A Western-blot eredmények kvantitatív elemzését követően olyan klónokat kerestünk, amelyekben a SERCA1b fehérje expressziója teljesen vagy csak részben csökkent. Így esett a választás az 1. klónra (C1), ahol szinte teljes mértékben csökkent az expresszió, és az 5. klónra (C5), ahol csak részben sikerült lecsökkentenünk a SERCA1b fehérje

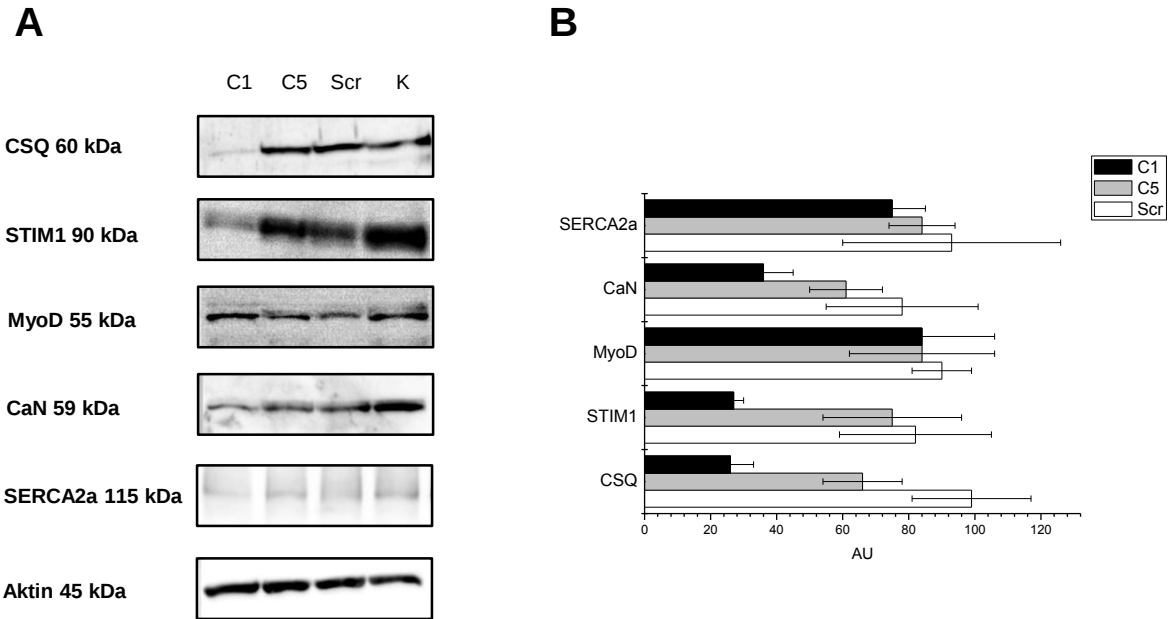
expresszióját (14. ábra A). A scrambled sejtekhez viszonyított optikai denzitás mértéke az 1. klónban $6,6 \pm 0,8\%$, az 5. klónban pedig $14,7 \pm 1,9\%$ volt (15. ábra). Ezeken a klónokon puromycines szelekciót hajtottunk végre és az így létrejött stabil klónokat használtuk a scrambled és kontroll sejtek mellett a további kísérletekhez. Minden kísérlethez kizárólag csak terminálisan differenciálódott miotubulusokat használtunk fel.



15. ábra: A stabilan transzfektált klónok denzitometriás analízise. Az optikai denzitás mértékét a scrambled sejtekhez viszonyítottuk. A hét klónból kettő került kiválasztásra (C1, C5). Ahogy az az ábrán is jól látható, a C1 sejtekben szinte teljes mértékben csökkent a SERCA1b expresszió, míg a C5 sejtekben csak részben.

A vázizom Ca^{2+} -homeosztázisában és differenciálódásában résztvevő fehérjék expressziós mintázatainak alakulása a csökkent SERCA1b fehérjeszint hatására

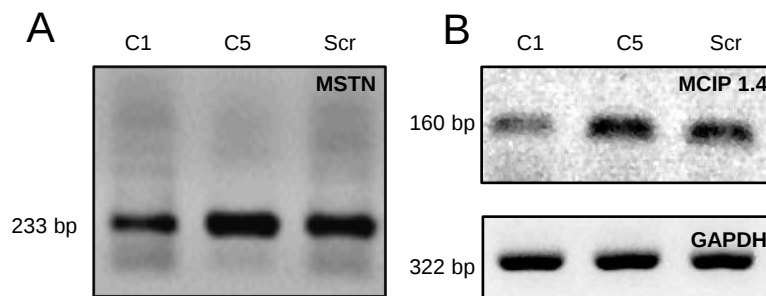
Következő kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk azon fehérjék expressziós szintjének a változását, amelyek fontos szerepet játszanak a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisában és differenciálódásban. Vizsgáltuk a kalszekvesztrin (CSQ), a sztrómális interakciós molekula1 (STIM1), a miogenikus transzkripciós faktor (MyoD), a kalcineurin (CaN), a dihidropiridin receptor (DHPR), valamint a SERCA2a expressziós szintjének alakulását a SERCA1b géncsendesítést követően. A CSQ a legfontosabb Ca^{2+} -kötő fehérje a SR-ban, a STIM1 fehérje pedig a SOCE kalcium szenzora a SR-ban. Eredményeink azt mutatják, hogy a CSQ expressziós szintje az 1. klónban csökkent az 5. klón, a scrambled és kontroll mintákhoz viszonyítva (16. ábra A). A STIM1 expressziós szintje hasonlóan alakult a CSQ-hez, az 1. klónban csökkent expressziót figyelhetünk meg, míg a Scr és C5 sejtekben csak nagyon kis mértékű a csökkenés (16. ábra A).



16. ábra: A Ca^{2+} -homeosztázisban és differenciálódásban résztvevő fehérjék expressziós mintázata és denzitometriás analízisük. (A) A SR Ca^{2+} -kötő fehérje (CSQ) expressziós vizsgálata a C1, C5, Scr és kontroll sejtekben. A SOCE mechanizmusában fontos szerepet játszó STIM1 molekula expressziós mintázata. A differenciálódás fontos szereplőinek expressziós mintázata: MyoD és CaN, valamint a belső kontrollként használt aktin fehérje expressziója. A Western-blot analízis során minden minta esetében 30 μg fehérjét, valamint kizárólag terminálisan differenciálódott miotubulusokat használtunk. Az ábrák 3 független kísérlet eredményeit reprezentálják. **(B)** Az (A) panelen bemutatott fehérjék denzitometriás analízise.

A MyoD expressziós szintje nem változott a transzfekciót követően, míg a CaN expressziója az 1. és 5. klónban is jelentős csökkenést mutatott (16. ábra A). Az eredmények kvantitatív analízisét követően megállapítottuk, hogy a SERCA1b géncsendesítés hatására a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan csökkent a CSQ, a STIM1 és a CaN expressziós szintje a C1 sejtekben (16. ábra B). Sikerült kimutatnunk a SERCA2a izoformát is, ami leginkább a lassú típusú harántcsíkolt izomban és a szívizomban fordul elő. Pozitív kontrollként egér szívizom mintát használtunk. Az egyes minták SERCA2a expressziós szintje között nincs különbség (16. ábra A, B).

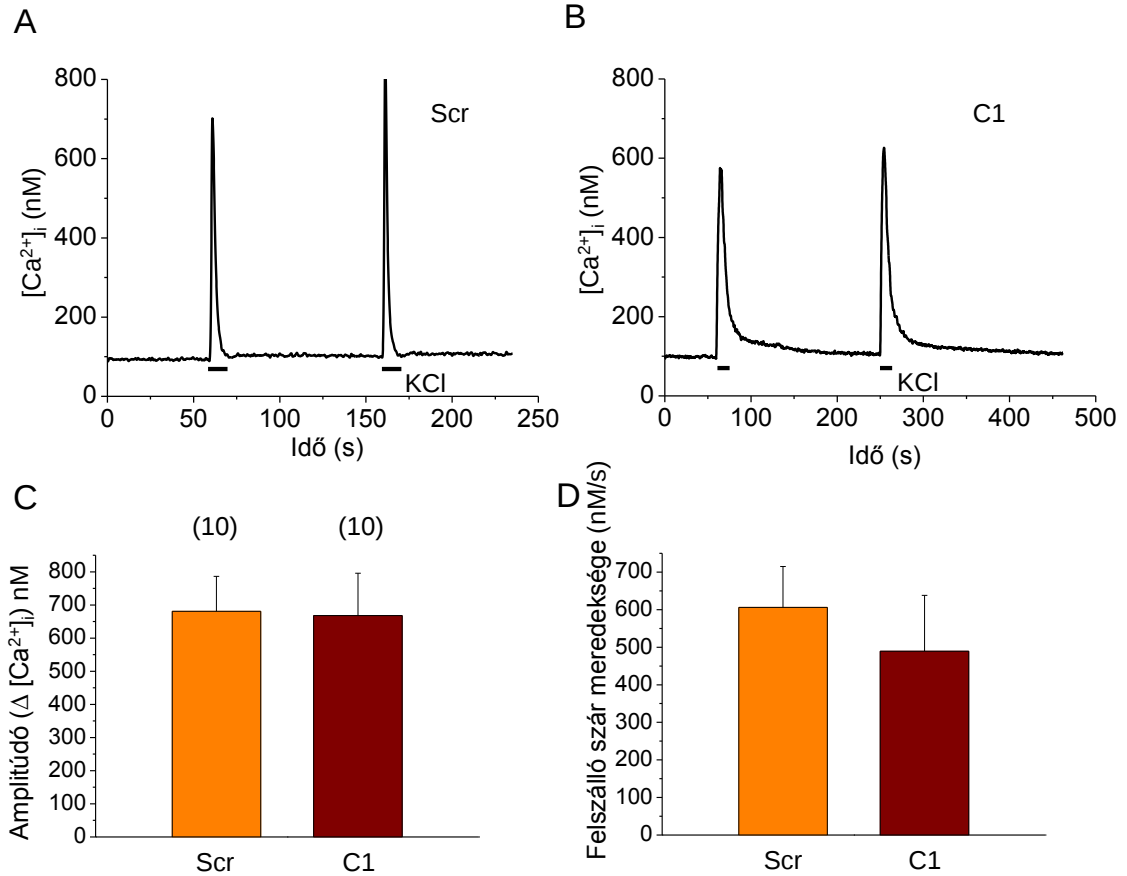
Kísérleteink további részében a mRNS-szintű változásokat követtük nyomon. Ehhez specifikus primer párokat terveztünk. Vizsgáltuk a vázizom differenciálódás negatív regulátorát a miosztatint, valamint a CaN aktivitását jelző modulatory calcineurin interacting protein-t, az MCIP1.4-t. A PCR reakcióval felerősített amplimerek detektálása során azt tapasztaltuk, hogy mind a miosztatin, mind a MCIP1.4 szintje csökkenést mutatott a C1 sejtekben a kontrollhoz viszonyítva. A denzitometriás kiértékelés során a kapott eredményeket mindig a GAPDH expressziós szintjére normalizáltuk (18. ábra).



18. ábra: mRNS-szintű vizsgálat RT-PCR technika segítségével. (A-B) A MSTN (A) és a calcineurin aktivitását jelző MCIP1.4 fehérje (B) mRNS-szintű vizsgálata C1, C5 és Scr sejteken. Kontrollként GAPDH-t használtunk.

A csökkent SERCA expresszió hatása a Ca^{2+} -homeosztázisra

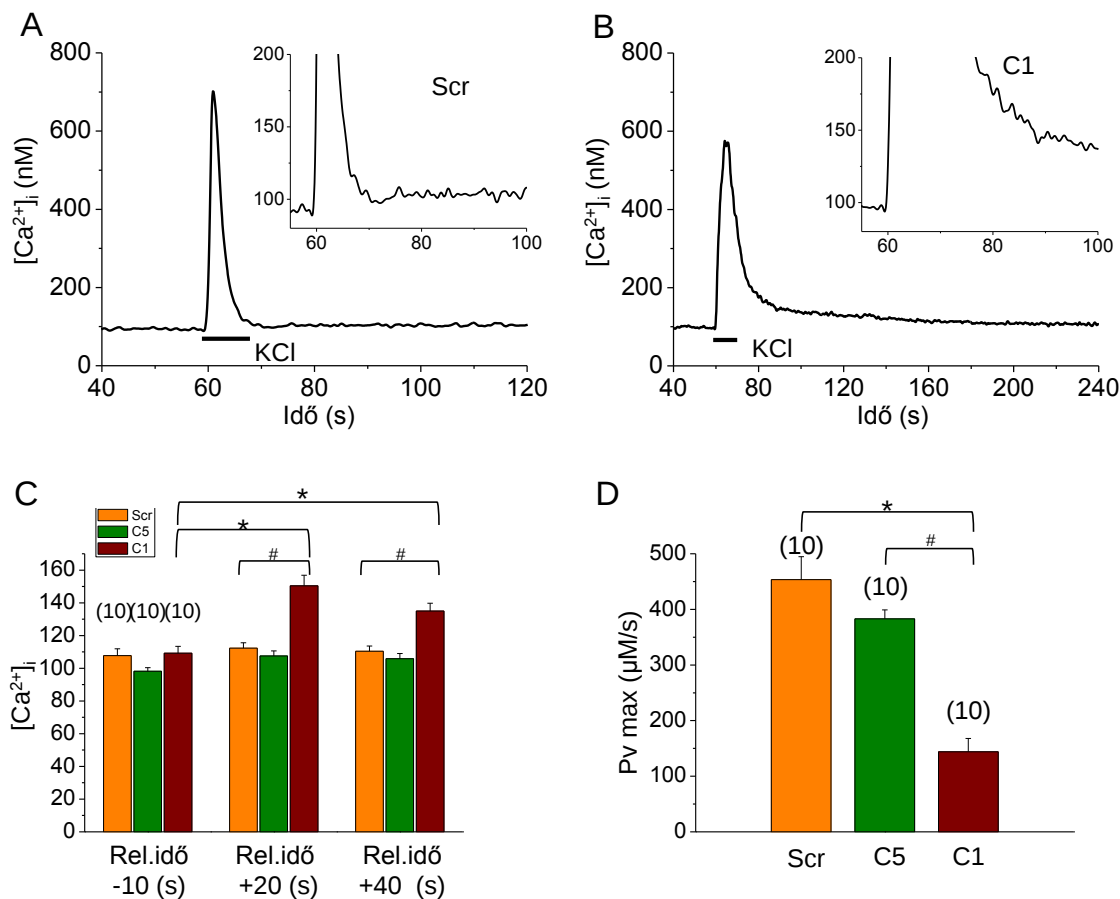
Következő kísérleteinkben a SERCA1b fehérje expresszió csökkentésének hatását vizsgáltuk az elektromechanikai csatolásra és a depolarizáció által történő Ca^{2+} -felszabadulásra a C1 és Scr sejtekben. A tranzienseket 120 mM KCl extracelluláris térbe történő adagolásával váltottuk ki (19. ábra A, B). A mérések kiértékelése során azt az eredményt kaptuk, hogy sem a tranziensek amplitúdóiban (681 ± 105 , $n=10$ vs. 668 ± 128 nM, $n=10$; kontroll és C1 sejtek esetében), sem pedig a felszálló szár meredekségében (606 ± 108 $\mu\text{M/s}$ vs. 489 ± 149 $\mu\text{M/s}$) nincs szignifikáns különbség ($p > 0,05$) a C1 és a scrambled sejtek között (Scr tenyészet; 19. ábra C, D).



19. ábra: A csökkent SERCA1b fehérje expresszió hatása a depolarizáció következtében kialakult Ca^{2+} -tranzienésekre. (A-B) Repetitív Ca^{2+} -tranziensek 120 mM KCl adagolása mellett scrambled és C1 miotubulusok esetén. A méréseket normál Tyrode-oldatban végeztük. **(C)** A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó értékei. **(D)** A felszálló szár meredekségének értéke a Scr és C1 sejtek esetében. Az adatok az átlagokat $\pm$ az átlagok standard hibáját (SEM) mutatják. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

További vizsgálatainkban a pumpa működésében esetlegesen bekövetkezett változások hatásait kívántuk feltárni (PV_{max}) a Scr, C1 és C5 sejtekben. A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ értékei között a tranziensek kialakulása előtt (108 ± 4 nM a Scr sejtek esetében, 109 ± 4 nM a C1 sejtek esetében) nem találtunk szignifikáns különbséget. A KCl által kiváltott tranziensek azonban a C1 miotubulusokban lassabban tértek vissza a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ szintre, ahogy azt a 20. ábra A és B panelje is mutatja. A KCl adagolását követő 20. és 40. másodpercben a $[Ca^{2+}]_i$ értékét meghatároztuk, s míg a kontroll sejtekben ezek az értékek 112 ± 3 nM-nak (20. s-ban) és 110 ± 3 nM-nak (40. s-ban) adódtak, addig a C1 sejtek esetén 150 ± 7 nM (20. s-ban) és 135 ± 5 nM (40. s-ban) volt. Ezek az értékek a SERCA1b géncsökkentett sejteken található pumpák aktivitására utalnak (20. ábra C). Ennek további bizonyítására meghatároztuk a PV_{max} értékeket is, az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak alapján. Szignifikáns különbséget

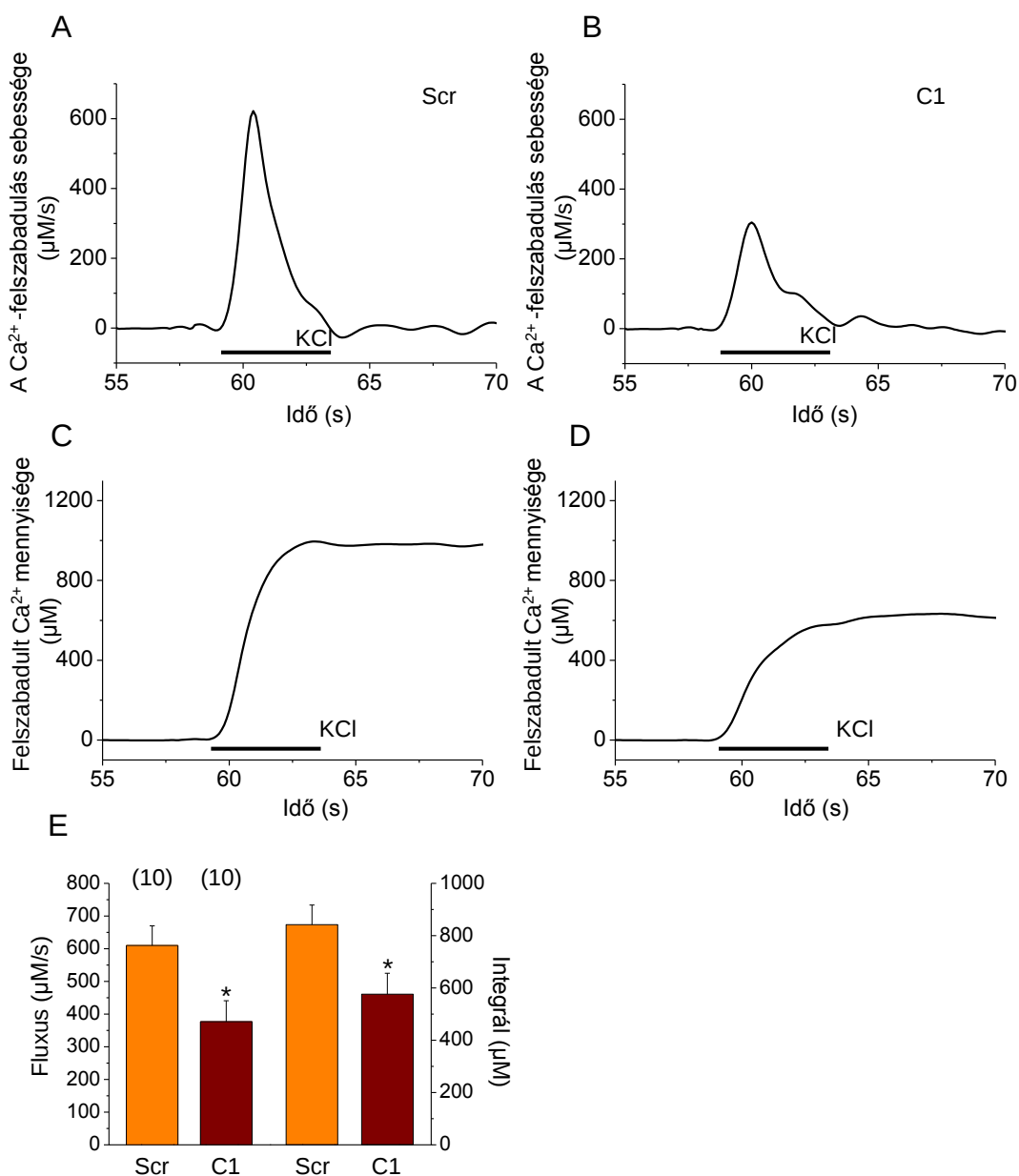
($p<0,01$) találtunk a C1 miotubulusokban ($144\pm24 \mu\text{M/s}$), a C5 ($382\pm16 \mu\text{M/s}$) és a Scr miotubulusokhoz képest ($454\pm41 \mu\text{M/s}$; 20. ábra D). A kapott értékek megerősítették, hogy a SERCA1b fehérje expressziójának csökkentése nagy mértékben hozzájárul a pumpaaktivitás csökkenéséhez is.



20. ábra: A csökkent SERCA1b expresszió következtében kialakult módosult pumpa aktivitás. (A-B) 120 mM KCl által kiváltott Ca²⁺-tranziensek Scr (A) és C1 (B) miotubulusokban. Az (A) és (B) panelek jobb felső sarkában kinagyított leszálló szár a módosult pumpa aktivitást reprezentálja. **(C)** A tranziensek kialakulása előtt és után mért [Ca²⁺]_i átlagértékei C1, C5 és Scr sejtek esetében. Az ábrán jól látható, hogy a C1 miotubulusokban a Ca²⁺-koncentráció értéke hosszabb ideig és magasabb értéken tartott a többi sejthez viszonyítva. A csillag (*) szignifikáns ($p<0,01$) különbséget mutat a normál Tyrode-oldatban -10, +20 és +40 s-ban regisztrált C1 miotubulusok között. A kettős kereszt (#) szignifikáns ($p<0,01$) különbséget mutat a normál Tyrode-oldatban +20 és +40 s-ban regisztrált C1 és Scr miotubulusok között. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. **(D)** A Ca²⁺-pumpa maximális transzportkapacitása (Pv_{max}) Scr, C5 és C1 sejtek esetében. A csillag (*) szignifikáns ($p<0,01$) különbséget mutat a C1 és Scr miotubulusok között. A kettős kereszt (#) szignifikáns ($p<0,01$) különbséget mutat a C1 és C5 miotubulusok között. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Következő lépésben kiszámoltuk a fluxust, amely a RyR-on keresztül folyó Ca²⁺-árammal arányos, valamint a felszabadítható Ca²⁺ mennyiségének értékét, majd összevetettük a Scr

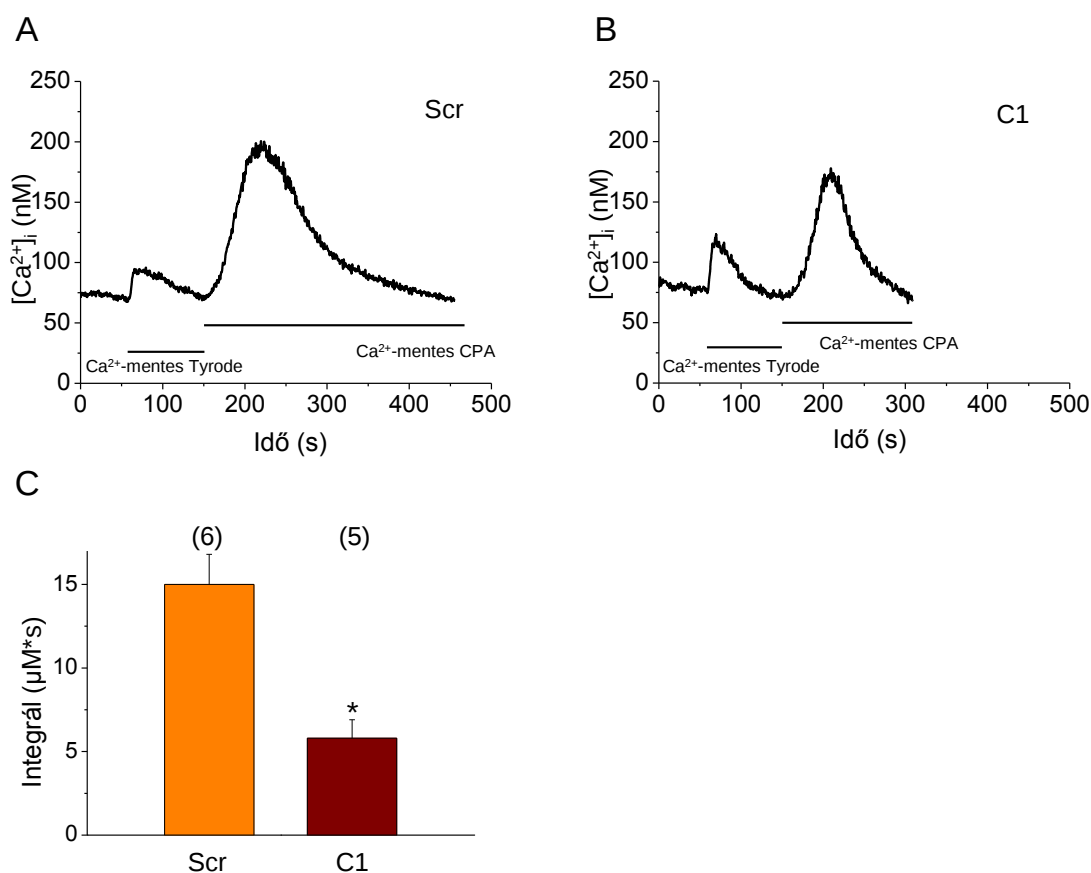
sejtek adatait a C1 sejtekével (21. ábra A, B). A fluxus értékei között szignifikáns ($p < 0,01$) eltérést találtunk (610 ± 60 (Scr) vs. 377 ± 64 $\mu\text{M/s}$ (C1)), amely összhangban van a SERCA1b csendesítés eredményeivel. Ugyancsak meghatároztuk a felszabadított Ca^{2+} mennyiségét is, és itt is szignifikánsan alacsonyabb értékeket találtunk a C1 sejtekben a kontrollhoz viszonyítva (576 ± 80 μM vs. 843 ± 75 μM ; $p < 0,05$). Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a SR Ca^{2+} -tartalma lényegesen kisebb, ezáltal a raktárból felszabadítható Ca^{2+} mennyiség is kevesebb a SERCA1b géncsendesített miotubulusokban (21. ábra E).



21. ábra A csökkent SERCA1b expresszió hatása a Ca^{2+} -felszabadulás sebességére és -mennyiségére KCl által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseken. (A-B) A Ca^{2+} -felszabadulás sebessége Scr és C1 sejtek esetében. (C-D) A felszabadított Ca^{2+} -mennyisége Scr és C1 sejtek esetében. A felszabadított Ca^{2+} -mennyiségét az (A) és (B) ábrákon bemutatott görbék integrálásával határoztuk meg. (E) Az összesített fluxus és integrál értékek. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. A csillag (*) szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget mutat a normál Tyrode-oldatban regisztrált C1 és Scr miotubulusok tranziensei között.

Az eddigi eredményekből levont következtetések további alátámasztására Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban kezdtük a detektálást, majd CPA-oldatot (10 μM) adagoltunk a sejtekre szintén Ca^{2+} -mentes körülmények között. Az így megfigyelhető Ca^{2+} -felszabadulás a SR-ból a RyR-on keresztül valósult meg, a Ca^{2+} -visszavétel a SERCA gátlása miatt akadályozva volt

(22. ábra A, B). Az ábrán bemutatott tranzienseken megfigyelhető, hogy azok amplitúdója és időbeli félértékszélessége a Scr sejten lényegesen nagyobb volt, mint a C1 miotubulus esetén. Ez arra utalt, hogy a csökkent SERCA1b expresszió következtében a Ca^{2+} -felszabadulás sebessége és –mennyisége is jelentősen csökkent. Ennek kvantitatív igazolására kiszámítottuk a tranziensek görbe alatti területét, mely a SR-ból felszabadítható Ca^{2+} mennyiségének jó közelítését adja. Az így kapott adatok átlagolása után megállapítható volt, hogy a belső raktárból felszabadítható Ca^{2+} mennyisége szignifikánsan alacsonyabb a C1 miotubulusokban a Scr miotubulusokhoz viszonyítva ($5,8 \pm 1,1 \mu\text{M} \cdot \text{s}$ és $15,7 \pm 1,8 \mu\text{M} \cdot \text{s}$; $p < 0,001$; 22. ábra C).

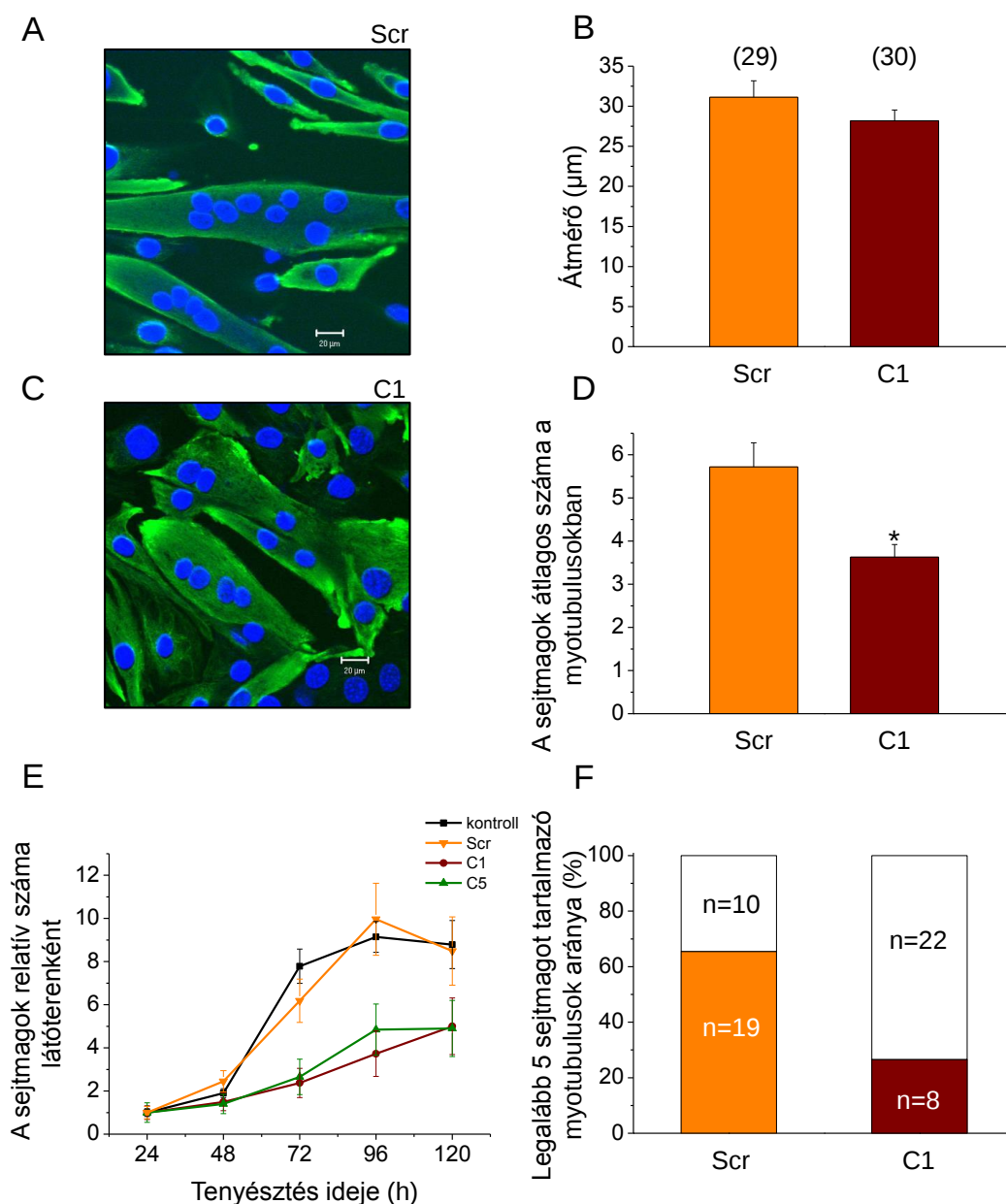


22. ábra: A felszabadítható Ca^{2+} -mennyiségének összehasonlítása Scr és C1 miotubulusokban. (A-B) A belső Ca^{2+} -raktár kiürítésének reprezentatív görbéje Scr (A) és C1 (B) sejtek esetében. A regisztrálás Ca^{2+} -mentes körülmények között történt $10 \mu\text{M}$ CPA-oldat jelenlétében. **(C)** Az összesített eredmények integrál értékei. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. A csillag (*) szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget mutat a Scr és C1 sejtek Ca^{2+} -tranziensei között.

A SERCA1b csökkent expressziója módosítja a differenciálódó izom növekedését

Morfológiai vizsgálataink során nyomon követtük a proliferációs és differenciációs periódusokat transzfektált és nem transzfektált sejtek esetében. A proliferációs ráta

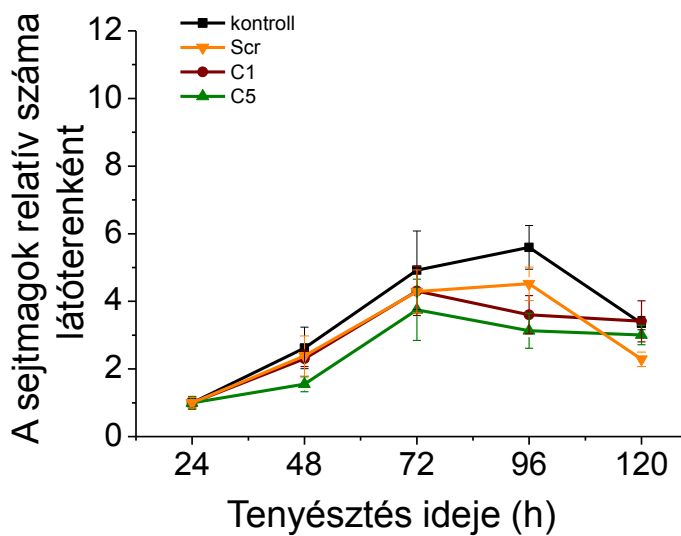
meghatározására 10^3 sejtet raktunk ki tenyésztőedényenként (3 cm átmérőjű Petri csésze), és az 1. naptól az 5. napig random látótereket fotóztunk, majd megszámoltuk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A sejtmagok számát mindig az 1. napon számolt sejtmagszámra normalizáltuk. A tenyészetekről kapott adatok kiértékelése alapján a 4. tenyésztési napon a C1 sejtek normalizált sejtmagszáma szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,05$) volt a kontroll sejtek sejtmagszámahoz viszonyítva ($3,7 \pm 1,1$ és $9,1 \pm 0,7$; 23. ábra E). További kísérleteinkben a terminálisan differenciálódott, sokmagvú miotubulusokat fixáltuk, majd a korábban leírt módszer alapján immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk, melyhez dezmint jelölő elsődleges antitestet használtunk. Az antitest kötődését FITC konjugált másodlagos antitesttel tettük láthatóvá (23. ábra A, C). Az eredmények kiértékelését követően azt tapasztaltuk, hogy a terminálisan differenciálódott miotubulusok átmérőjében nincs szignifikáns eltérés ($p > 0,05$) a C1 és Scr sejtekben (23. ábra B). Ezzel szemben a sejtmagok átlagos száma szignifikánsan kisebb a C1 sejtekben a kontrollhoz viszonyítva ($3,6 \pm 0,2$ vs. $5,7 \pm 0,5$; $p < 0,01$; 23. ábra D), illetve az 5 vagy több sejtmagot tartalmazó miotubulusok százalékos aránya is alacsonyabb a C1 sejtekben (23. ábra F). Ezen eredmények megerősítették a feltevésünket, miszerint a SERCA1b csökkent expressziója módosítja a vázizom differenciálódást.



23. ábra: A csökkent SERCA1b expresszió hatása a C2C12 sejtek proliferációjára és differenciálódására.

(A, C) Terminálisan differenciálódott miotubulusok immuncitokémiai festése Scr (A) és C1 (C) miotubulusokban. A morfológiai különbségek láthatóvá tételéhez izomspecifikus dezmin antitestet használtunk, amit FITC-konjugált másodlagos antitesttel jelöltünk meg. A sejtmagokat DAPI-val festettük. (B, D, F) A sokmagvú, terminálisan differenciálódott miotubulusok kvantitatív paramétereinek elemzése. Vizsgáltuk a Scr és C1 sejtek átmérőjét (B), a sejtmagok átlagos számát (D), valamint az 5 vagy több sejtmagot tartalmazó miotubulusok %-os arányát (F). A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik. Az adatok az átlagokat $\pm$ az átlagok standard hibáját (SEM) mutatják. A csillag (*) szignifikáns ($p < 0,01$) különbséget mutat a C1 és Scr sejtek között. A differenciált miotubulusok kvantitatív paramétereit 20-20 random látótérből, 3 független kísérlet eredményeiből állapítottuk meg. (E) A proliferációs ráta vizsgálata a C1, C5, Scr és kontroll sejtek esetében. A sejtproliferációt a sejtmagok számából határoztuk meg úgy, hogy minden sejtípus sejtmagszámát (C1, C5, Scr, kontroll) a saját 24 órás sejtmagszámára normalizáltuk.

A kalcineurin (PP2B) fő targetjének a transzkripciós faktorok családjába tartozó NFAT-t (Nuclear Factor of Activated T-cell) tartják. Az NFAT foszforilált állapotban a citoplazmában van jelen, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése a kalcineurin aktivitását fokozza, azaz a kalcineurin defoszforiláló hatására, az NFAT a sejtmagba juthat és transzkripciós folyamatokat indíthat be, amely a differenciálódás elősegítéséhez vezet. A PP2B leghatásosabb, legspecifikusabb és legismertebb inhibitorai immunosuppresszív anyagok, ilyen pl. a ciklosporin-A (CSA), amely a kalcineurint citoplazmatikus receptoraikkal a ciklofilinnel és FKBP-vel alkotott komplexek révén gátolja. Annak igazolására, hogy a SERCA1b gátlása a PP2B-n keresztül vezet a proliferáció csökkenéséhez, a C1, C5, Scr és kontroll sejtek proliferációját megvizsgáltuk ciklosporin (CSA) kezelés mellett is. A CSA oldatot 200 nM koncentrációban használtuk, és minden 2. nap kezeltük a sejteket. A tenyésztés minden napján képeket készítettünk minden egyes Petri-csésze (kezelt és kontroll) 5-5 véletlenszerűen kiválasztott látóteréről (24. ábra). A kísérletek elvégzését és kiértékelését követően azt tapasztaltuk, hogy a CSA csökkentette mind a kontroll, mind pedig a C5 és Scr sejtek proliferációs rátáját, azonban a C1 sejtek további proliferációjának csökkenését nem okozta. Az eredményeink alapján a kontroll sejtek relatív sejtmagszáma $9,1 \pm 0,7$ és $5,6 \pm 0,6$ volt kontroll és CSA-kezelt sejtek esetében ($p < 0,05$), míg a C1 sejtek esetében ez az érték $3,6 \pm 0,5$ és $3,7 \pm 1,1$ -nak adódott kezelt és kontroll esetben ($p > 0,4$), amely összhangban van a CaN csökkent expressziós szintjével.



24. ábra: Proliferációs ráta vizsgálata CSA kezelés mellett C1, C5, Scr és kontroll miotubulusokban. A CSA oldatot 200 nM koncentrációban használva minden 2. nap kezeltük a sejteket, és a tenyésztés minden napján képeket készítettünk minden egyes Petri-csésze 5-5 random kiválasztott látóteréről. A sejtproliferációt a korábban leírt módszer alapján határoztuk meg. Ahogy az az ábrán is látható, a CSA csökkentette mind a kontroll, mind pedig a C5 és Scr sejtek proliferációs rátáját, azonban a C1 sejtek további proliferációjának csökkenését nem okozta.

Megbeszélés

Porcszövet-kondroprogenitor sejtenyészetek

A citoszolikus $[Ca^{2+}]$ dinamikus változása

A Ca^{2+} a sejtek legtöbb életfolyamatában fontos szabályozó szerepet játszik, így a differenciálódásban is kitüntetett szereppel bír. Munkám egyik részében arra kerestük a választ, hogy humán eredetű CPC-kben milyen útvonalon keresztül valósul meg a repetitív Ca^{2+} -oszcilláció, és milyen fehérjék vesznek részt a szabályozásban. A nem excitábilis sejtek kalciumhomeosztázisával kapcsolatban kiterjedt irodalommal rendelkezünk, így ismerjük a legtöbb transzkripciós faktor, az NFAT, az NF- κ B vagy a CREB szignalizációs mechanizmusban betöltött szerepét [98], valamint a protein kinázok modulációjában játszott szerepüket is [99,100]. Mindezek mellett számos irodalmi adatot találunk arra vonatkozóan, hogy a Ca^{2+} -oszcilláció hogyan valósul meg a hasnyálmirigyben található β -sejtekben [101], embrionális őssejtekben (ESC-k) [102], kondroblasztokban [48,82], kondrocitákban [103] vagy épp humán csontvelő-eredetű mezenhimális őssejtekben (MSCs) [50,104]. Munkánkban elsőként mutattuk be és térképeztük fel a CPC-k Ca^{2+} -homeosztázisában szerepet játszó purinerg szignalizációs útvonalat, és az abban szerepet játszó fehérjék expresszióját. Ahhoz, hogy ezeket a humán eredetű oszteoartritiszes szövetből származó porcsejteket fel tudjuk használni vizsgálatainkhoz, elengedhetetlen volt a sejtek lentivirális transzfekcióval történő immortalizációja. Mindemellett fontos szempont volt az is, hogy ezek a sejtek a proliferáció ideje alatt monolayer kultúrát hozzanak létre. Koelling és munkatársai (2009) már korábban feltérképezték a CPC-k kologenitását, migratorikus aktivitását [21], ezért célul tűztük ki a CPC-k kondrogenikus markereinek mRNS-szintű detektálását. Ellentétben az embrionális csirke végtagtelepből izolált kondrogenikus sejtek magas frekvenciájú (8×10^{-2} Hz) Ca^{2+} -oszcillációjával, a CPC-kben a Ca^{2+} -oszcilláció frekvenciája jóval alacsonyabb (1.3×10^{-3} Hz), hasonlóan a MSC-kben leírtakhoz [104,105]. Különbség továbbá az is, hogy a CPC-k esetében a Ca^{2+} -oszcillációt a belső Ca^{2+} -raktárakból felszabaduló Ca^{2+} szabályozza, míg az embrionális csirke végtagtelepből izolált kondrogenikus sejtek gyors Ca^{2+} -oszcillációjáért az extracelluláris térből bejutó Ca^{2+} tehető felelőssé, feltehetően a jóval kisebb Ca^{2+} -raktár miatt [48,106].

A kondroprogenitor sejtek belső Ca^{2+} -raktárának funkcionális jellemzése és szerepe a Ca^{2+} -oszcilláció kialakításában

Ahhoz, hogy karakterizálni tudjuk a belső Ca^{2+} -raktárat, meg kellett vizsgálnunk a szabályozásban érintett fehérjék expressziós mintázatát. Az endoplazmatikus retikulum (ER) két a Ca^{2+} -felszabadításban fontos szerepet játszó csatornáját vizsgáltuk, az IP_3R altípusait, valamint a RyR-t, melynek expresszióját nem sikerült kimutatnunk. Ezen megfigyelésünk megegyezik a MSC-kben leírt eredményekkel [104,105]. Kollaborációs partnereinknek korábban az embrionális csirke végtagtelepből izolált kondrogenikus sejtekben csak az $\text{IP}_3\text{R1}$ izoformáját sikerült detektálni [15]. Az ESC-kben ezzel ellentétben mind a három IP_3R altípus expresszálódik [107], valamint a RyR is [102]. A CPC-kben mind a három IP_3R altípus detektálható. A Ca^{2+} -oszcilláció kialakulása az IP_3R altípusainak relatív expressziós szintjétől, illetve endogén modulátorok, mint az IP_3 , Ca^{2+} és ATP megjelenésétől függ. Irodalmi adatok alapján az $\text{IP}_3\text{R2}$ erőteljes, hosszantartó, szabályosan ismétlődő Ca^{2+} -oszcillációt okoz, az $\text{IP}_3\text{R1}$ ezzel szemben kevésbé rendezett Ca^{2+} -oszcillációt alakít ki, az $\text{IP}_3\text{R3}$ pedig a legkevésbé érzékeny az IP_3 jelenlétére, így ez az altípus monofázisos Ca^{2+} -tranzienseket generál [108,109]. Az altípusok felosztásának ismerete elengedhetetlen a CPC-k Ca^{2+} -oszcillációjának jellemzéséhez (frekvencia, amplitúdó). A belső Ca^{2+} -raktárból történő IP_3R -mediált Ca^{2+} -felszabadulás nélkülözhetetlen a Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásához, ezért az egyedi sejten történő Ca^{2+} -mérés során egy aspecifikus IP_3R blokkolót, a 2-APB-t használtuk, melynek hatására a spontán bekövetkező Ca^{2+} -események eltűntek. Ez az eredmény jó egyezést mutat a MSC-kben [104,107] és az ESC-kben [107] leírt eredményekkel, így joggal feltételezhetjük, hogy ez a mechanizmus egy univerzális módja a Ca^{2+} -oszcilláció létrejöttének az őssejtekben.

Megvizsgáltuk továbbá a SOCE mechanizmusát is, amely szintén esszenciális szerepet tölt be a CPC-k Ca^{2+} -oszcillációjában. Feltételezésünk szerint, a CPC-kben kialakuló Ca^{2+} -oszcilláció alappillére az IP_3R -on keresztül történő Ca^{2+} -felszabadulás, és a SOCE mechanizmus révén a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés. Ezt az elképzelésünket alátámasztják a CPA-val végzett kísérleteink eredményei is (9. ábra). Arra a kérdésre azonban, hogy a Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásának hátterében milyen fehérjék állnak, az irodalomban nem találtunk adatot, CPC-kben ilyen még nem vizsgáltak. A Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában szerepet játszó SOCE kulcsfehérjéit, a STIM1-t és az Orai1-t MSC-kben már leírták [104,110], illetve a csirke kondroprogenitor sejtekben szintén detektálták már a STIM1, STIM2 és Orai1 fehérjék expresszióját [48]. A STIM2 fehérjéről irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az ER

Ca^{2+} -tartalmának már egészen kicsi csökkenését is érzékeli, és a csökkenés következtében azonnal aktiválódik, míg a STIM1 csak a Ca^{2+} -raktár teljes kiürülését követően válik aktívá [111].

A CPC-k esetében csak a STIM1 expresszióját sikerült kimutatnunk. A spontán Ca^{2+} -tranziensek kialakulásában a STIM1 fehérjének meghatározó szerepe van, és esszenciális szerepet tölt be az Orai1 fehérjék pontákba történő rendeződésénél is. Habár az Orai izoformáknak több típusa ismert, a CPC-k csak az Orai1-t expresszálják (10. ábra).

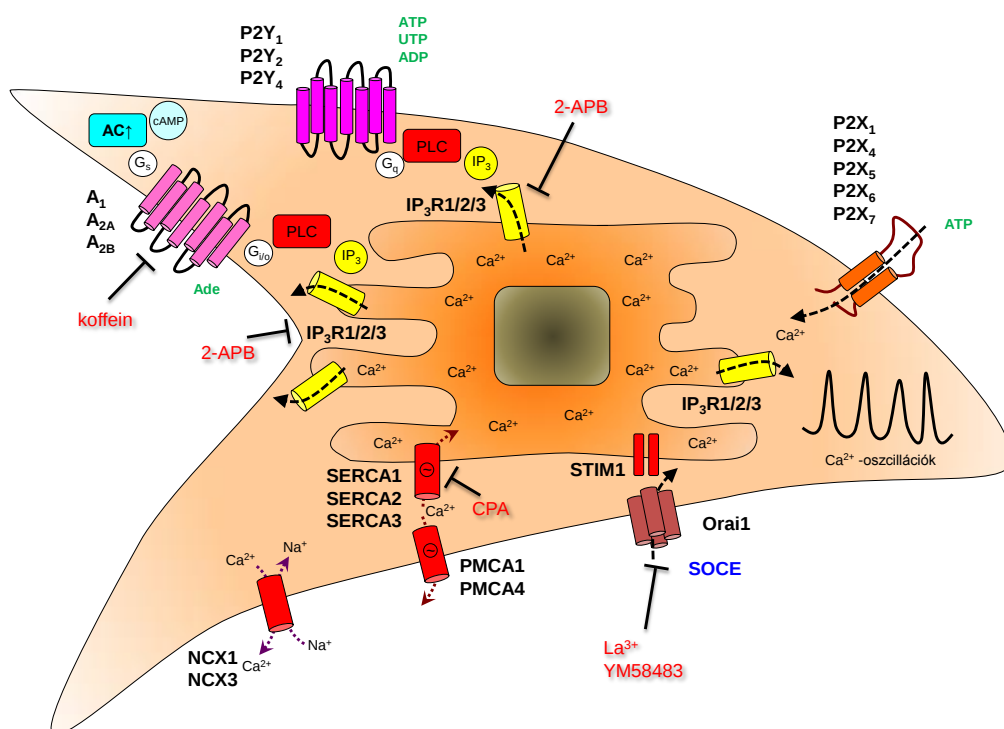
Purinerg szignalizáció és a Ca^{2+} -oszcilláció autokrin/parakrin szabályozása

Humán MSC-kben a Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásáért egy autokrin/parakrin purinerg hurok tehető felelőssé, ahol ATP felszabadulását követően a P2Y_1 metabotróp purinerg receptor stimulálódik, majd a PLC útvonal aktiválódik [50]. Kollaborációs partnereink korábbi közleményeikben hasonló autoregulatorikus útvonalat vizsgáltak csirke kondroprogenitor sejtekben, ahol a P2X_4 ionotróp purinerg receptor játszott kitüntetett szerepet [17,48]. Ezen tények ismeretében kíváncsiak voltunk arra, hogy a humán CPC-kben, ahol az extracelluláris nukleotidok gyulladásos mediátorokkal együtt szabadulnak fel [112], milyen szerepet töltenek be a purinerg receptorok.

Tekintettel arra, hogy a P1 receptor altípusok a kondrocitákban is expresszálódnak [113], először a P1 purinerg receptor profil megvizsgálását tűztük ki célul. Eredményeink szerint CPC-kben az A_1 [114], $\text{A}_{2\text{A}}$ [115] és $\text{A}_{2\text{B}}$ [116] expressziója megfigyelhető, ugyanúgy, mint a MSC-kben, míg az A_3 receptor expressziója nem volt detektálható. Ezen eredmények jó korrelációt mutatnak az irodalmi adatokkal. Irodalmi adatok alapján ugyancsak ismert, hogy az A_1 és $\text{A}_{2\text{B}}$ receptor-mediált szignalizáció indítja el az MSC-k oszteogenikus differenciációját [114,117]. Míg az $\text{A}_{2\text{B}}$ receptorok aktivációja az oszteogenikus gének aktivációját indukálja az MSC-kben, addig az A_1 és $\text{A}_{2\text{A}}$ receptorok expressziós szintjének a növekedése adipogenikus irányba tolja el a differenciációt [118].

Következő lépésben a P2 purinerg receptorokat tanulmányoztuk. Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés során, extracelluláris ATP adagolásával Ca^{2+} -tranzienseket váltottunk ki normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban, ahol a Ca^{2+} -mentes körülmények között szignifikánsan kisebbnek bizonyult mind a nyugalmi, mind pedig a maximális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ érték, valamint az amplitúdó és az FTHM is (7. táblázat). Ezzel a kísérlettel mind a P2X , mind pedig a P2Y receptor izoformákat vizsgálni tudtuk. Ezzel ellentétben, amikor az ATP-t együtt alkalmaztuk

az IP₃R nem specifikus inhibitorával, a 2-APB-vel [119], a vizsgált sejtek többsége nem válaszolt, bizonyítva ezzel, hogy az extracelluláris nukleotidok elsődleges kötődési célpontjaik a metabotróp P2Y receptorok. További vizsgálatainkban különböző P2 receptor agonistákat (ATP, ADP, UTP és UDP, 7. táblázat)[120], valamint egy nem specifikus antagonistát, a suramint alkalmaztuk, így sikerült igazolnunk a P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2X₄ és P2X₆ receptorok funkcionális aktivitását CPC-kben. Ezek az eredmények összhangban vannak a Zippel és munkatársai által publikált eredményekkel, ahol MSC-kben vizsgálták a P2 receptor altípusokat és a P2X₆, P2Y₄, P2Y₁₄ jelenlétét igazolták [121]. Ezek a P2 receptor altípusok az adipogenikus és az oszteogenikus differenciáció során is reguláló szerepet töltenek be [121], így joggal feltételezhetjük, hogy a CPC-k differenciációjában is hasonló szerepük lehet. Ciciarello és munkatársai az MSC-k adipogenikus differenciációját vizsgálták, amit eredményük szerint a P2Y₁ és P2Y₄ receptorok mediáltak. Ugyanakkor, ha az A_{2B} adenosin receptorokat stimulálták, a differenciáció oszteogenikus irányba tolódott el [122]. A CPC-k is képesek oszteogenikus, adipogenikus és kondrogenikus irányba is differenciálódni [21], valamint a P1 és P2 receptor profiljuk is jól korrelál az irodalomban talált adatokkal.



25. ábra: Összefoglaló ábra a kondroprogenitor porcsejteken végzett kísérletes eredményeinkről. Az ábrán jól látható a szabályozásban érintett fehérjék lokalizációja és szerepük a Ca²⁺-oszcilláció kialakításában. A SOCE mechanizmus mellett a purinerg szignalizáció is fontos szerepet tölt be a spontán Ca²⁺-oszcilláció létrejöttében.

Jól ismert tény az is, hogy a purinerg receptorok aktivációja számos sejttípusban Ca^{2+} -oszcillációt hoz létre [17,50,123,124]. Munkánk során arra törekedtünk, hogy felderítsük a CPC-kben kialakuló spontán Ca^{2+} -oszcilláció háttérében álló folyamatokat (25. ábra). Megállapítottuk, hogy a spontán kialakuló Ca^{2+} -oszcilláció háttérében purinerg szignalizáció áll. Ezek az eredmények jól illeszkednek a publikációs adatbázisban található eredményekkel [50,55]. A szignalizációban érintett fehérjéket mRNS- és fehérjeszinten is megvizsgáltuk, valamint funkcionálisan is karakterizáltuk őket. Bízunk benne, hogy ezek az eredmények hozzájárulnak majd az oszteoarthritisz során kialakuló porcszövet degeneráció celluláris folyamatainak jobb megértéséhez.

Vázizomszövet-C2C12 sejtenyészetek

A SERCA izoformák zavartalan működése elengedhetetlen a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisának fenntartásában. A SERCA két Ca^{2+} -t transzportál egy ATP hidrolíziséből származó energiával a citoszólból a lumenbe. Jelen értekezés második felében a neonatalis SERCA izoforma, a SERCA1b szerepét és annak expressziójában bekövetkező csökkenés következményeinek hatását vizsgáltuk C2C12 vázizomsejteken. A SERCA1b fehérje domináns izoforma a neonatalis korban [125,126,127], amit vázizom esetén később a SERCA1a vált fel, ugyanakkor egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy izomregeneráció során újra megjelenik a SERCA1b izoforma [128].

A SERCA1b fehérje expresszió csökkenése és a Ca^{2+} -homeosztázisban résztvevő fehérjék expressziójára gyakorolt hatása

A C2C12 sejtek stabil transzfekcióját követően sikerült létrehozniunk olyan klónokat, amelyekben teljesen (C1 sejtek) vagy csak részben (C5 sejtek) csökkentettük a SERCA1b fehérje expresszióját. A vázizomra specifikus, SERCA1a/b antitesttel megvizsgálva a mintákat azt tapasztaltuk, hogy azokban a sejtekben, ahol csökkent a SERCA1b expresszió, a SERCA1a expressziós szintje nem növekedett, tehát nem kompenzálta a másik izoforma csökkenését. Ez az eredmény összhangban van az irodalomban talált azon eredménnyel, miszerint a SERCA1 izoformák közül a C2C12 sejtekben csak a SERCA1b expresszálódik [97]. Ugyanez a tanulmány rávilágít arra, hogy rágcsálók vázizmában a felnőtt és a neonatalis izoforma szigorú transzlációs kontroll alatt áll, a mioblasztokban és a miotubulusokban a SERCA1a izoforma nem detektálható, az intakt felnőtt izomban pedig a SERCA1b izoforma expressziója nem mutatható ki, annak ellenére, hogy mRNS szinten megtalálható a megfelelő transzkriptum [97]. Egy másik izomspecifikus SR kalciumpumpa, a SERCA2a expresszióját

megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a SERCA1b expresszió csökkenés hatására a SERCA2a expressziója sem változott.

In vivo körülmények között regenerálódó izomban, mind lassú (*musculus soleus, SOL*), mind pedig gyors (*musculus extensor digitorum longus, EDL*) típusú izomrostokban a miotubulusok fejlődése során a SERCA1b fehérje expressziója szignifikáns növekedést mutat [97,129]. A SERCA1b fehérje mioblasztokban csak kis mértékben expresszálódik, míg miotubulusokban ennél jóval nagyobb expressziót mutat, bizonyítva ezzel, hogy jelenléte elengedhetetlen a miotubulusok és a SR fejlődése során [97]. A mioblasztok, mint a legtöbb sejttípus, expresszálják a SERCA2b izoformát, mely alacsonyabb ATP-áz aktivitással, de magasabb Ca^{2+} -iránti affinitással jellemezhető, összehasonlítva a lassú típusú izomra jellemző SERCA2a izoformával [130,131,132].

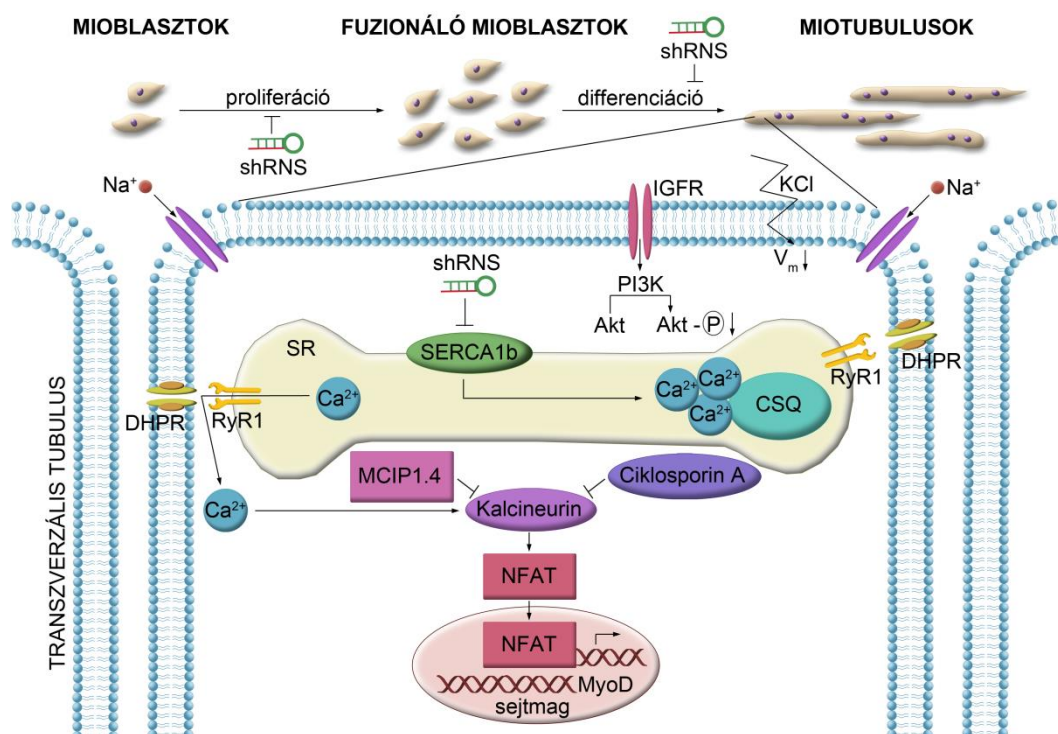
Western-blot analízis segítségével vizsgáltuk a SOCE-ban érintett fehérjék expressziós szintjét, így a STIM1-t, CSQ-t, DHPR-t, valamint kíváncsiak voltunk még a CaN és a MyoD expressziós szintjére is. A kísérleteink elvégzését követően azt találtuk, hogy a SERCA1b shRNS-el transzfektált sejtekben, mind a C1, mind pedig a C5 tenyészetekben csökkent a CaN expressziója, azonban a CaN aktivitását jelző marker, az MCIP1.4 mRNS szinten csak a C1 sejtekben mutatott csökkenést. Ugyanezen sejtek esetében expressziós szint csökkenést tapasztaltunk a CSQ fehérje esetében is, amely a SR legfontosabb Ca^{2+} -kötő fehérjéje. Ez a csökkenés a SR alacsonyabb Ca^{2+} -kötését okozhatja (16. ábra A). A STIM1 a SOCE mechanizmus egyik kulcsszereplője. Azok a miotubulusok, amelyekben a STIM1 molekula hiányzik, jóval alacsonyabb SR Ca^{2+} -tartalommal bírnak és fáradékonyabbak is [133,134]. Leírták továbbá, hogy a SERCA1 endogén inhibitorának a szarkolipinnek az expressziós szintje a STIM1 hiányos miotubulusokban csökken, így a SOCE aktivitása kisebb lesz, valamint a miotubulusok fejlődése is zavart szenved [133]. A SERCA1b-hez hasonlóan a STIM1 molekulának is elengedhetetlen szerepe van az izomfejlődés során [97]. Ezt a szoros kapcsolatot megerősítik a mi eredményeink is, hiszen ott ahol a SERCA1b fehérje expressziója csökkent, a Ca^{2+} -szenzorként is ismert STIM1 molekula expressziója is csökkent. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a SERCA1b fehérje és a STIM1 molekula expressziós szintjének csökkenése a mioplazmából egy lassabb Ca^{2+} -visszavételt eredményez. Ezzel összefüggésbe hozható továbbá a korábban említett CSQ expressziós szint csökkenése, ami a SR alacsonyabb Ca^{2+} -szintjéért tehető felelőssé. Azonban a miogenikus transzkripciós faktor, a MyoD expressziós szintjében nem találtunk különbséget, így valószínűleg a SERCA1b nem a miogenikus differenciációban játszik szerepet, hanem a

differentiáció későbbi folyamataiban. Ugyanakkor a CaN expressziós szintje csökkent a C1 miotubulusokban, ami pedig a MCIP1.4 mRNS-szintű csökkenését okozta. PCR technika segítségével megvizsgáltuk még az izomdifferentiálódás negatív regulátorát is, a miosztatin fehérjét, és eredményeink arra utalnak, hogy a C1 sejtekben csökkent a miosztatin expressziója. Ezen fehérje ugyan nincs közvetlen kapcsolatban a SOCE-val, azonban munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a miosztatin hiányos egerekben a SOCE megváltozik [135].

Az elektromechanikai csatolás vizsgálata kontroll és SERCA1b specifikus shRNS-sel transzfektált sejtekben

Kísérleteink során megvizsgáltuk a SERCA1b géncsendesítés hatását az elektromechanikai csatolásra. Ismételt Ca^{2+} -tranziensek kiváltása során magas K^{+} -koncentráció adagolása mellett, sem a tranziensek amplitúdóiban, sem a felszálló szár meredekségében nem tapasztaltunk eltérést a C1 sejtekben a Scr sejtekhez viszonyítva, így a RyR és a feszültség-vezérelt csatornák működése feltételezhetően nem módosult a géncsendesítés hatására. Ez arra enged következtetni, hogy a SR Ca^{2+} -raktára még a SERCA1b hiánya esetén is bizonyos mértékben újratöltődik [136], valószínűleg egy másik SERCA izoforma közreműködésével (SERCA2a). A kiszámolt maximális pumpaaktivitás értékek azt mutatták, hogy a csökkent SERCA1b expressziót mutató miotubulusok nyugalmi Ca^{2+} -szintje lassabban állt vissza a normál állapotra. Mivel a SERCA2a izoforma az egyetlen, amely intakt formában fordul elő a C1 sejtekben, és a nyugalmi Ca^{2+} -szint csak lassan állt vissza az eredeti állapotba, ezért úgy gondoljuk, hogy a normális Ca^{2+} -visszavételben ennek az izoformának nincs kitüntetett szerepe, míg a SERCA1b-nek annál inkább esszenciális a jelenléte. Ezt a hipotézist erősíti az a tény is, hogy a SERCA1 *knock-out* egerek, melyekben a SERCA1a mellett a SERCA1b is érintett, Ca^{2+} -visszavétele jóval lassabban zajló folyamat [137]. A tanulmányból kiderül továbbá az is, hogy ezek az egerek a születésüket követő 1-5 órán belül meghalnak. A SERCA1b expressziót nem (C1) vagy csak részben csökkent expressziót mutató sejtek (C5) a kontroll sejtekhez képest csökkent proliferációt mutattak, a miotubulusok pedig kevesebb sejtmagot tartalmaztak. A sejtproliferáció során, a SERCA1b fehérje jelenlétének esszenciális szerepe van a kalcineurin regulált jelátviteli útvonalban, mert amikor a CaN gátlószerét, CSA-t adtunk a tápoldathoz, a kontroll és a Scr sejtek proliferációja lecsökkent, míg a C1 sejtek proliferációja nem mutatott további csökkenést. A CSA hatása sejtspecifikus, mert míg idegsejtekben segíti a sejtek túlélését [138], addig a vesesejtekben egy CaN független útvonalon keresztül toxikus hatást mutat [139]. Ezzel ellentétben az

oszteoblaszt sejtvonalakban, és a kondrogenikus sejtekben a CSA egy potenciális CaN inhibitor [16]. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CSA-val történő gátlás a kondrogenikus sejtek proliferációs rátáját csökkenti [140]. Kísérleteink során a CSA-val történő kezelés hatására a teljes mértékben csökkent SERCA1b expressziót mutató sejtekben (C1) a proliferációs ráta nem csökkent tovább, ami arra enged következtetni, hogy a CaN aktivitás CSA-függő komponensét nagy mértékben befolyásolja a SERCA1b aktivitás (24. ábra).



26. ábra: Összefoglaló ábra a C2C12 miotubulusokon végzett kísérletes eredményeinkről. A SERCA1b fehérje jelenléte esszenciális szerepet tölt be a proliferáció és a differenciálódás ideje alatt a C2C12 sejtekben.

A vázizom differenciálódás egyik feltétele az, hogy egy adott területen belül a mioblasztokból álló kultúra konfluenssé váljon. Ekkor kialakulnak a 4-6 sejtmagból álló *primer miotubulusok*, majd pedig a mioblasztok további fúziójával képződnek a *szekunder miotubulusok*, melyek több sejtmagot tartalmaznak [141]. A C1 és Scr miotubulusok sejtmagszáma között szignifikáns különbséget találtunk. Hasonló eredményre jutottak Porter és munkatársai is [142], akik a SERCA pumpa gátlására használt tapszigarginnal kezelték a C2C12 sejteket, és a miogenikus differenciáció zavarát tapasztalták. Megfigyeléseink szerint a SERCA1b gécscsendesített C1 miotubulusok átlagosan kevesebb, mint 5 sejtmagot tartalmaztak. Feltételezhetően a primer miotubulus képződés szenvedett zavart, ezáltal a későbbi differenciálódás is gátlódott. Ez az eredmény hasonló egy, az irodalomban talált eredménnyel, miszerint BC3H1 miogenikus sejtekben a szekunder miotubulusok kialakulásáért a SERCA1a

izoforma felel, mivel ezek a sejtek nem expresszálják a SERCA1b izoformát [97]. Ez a megfigyelés rávilágít arra is, hogy a SERCA2a izoforma nem képes egyedüli izoformaként kompenzálni a SERCA1b hiányát a differenciálódási folyamatban. Ezt a tényt alátámasztják a mi eredményeink is, hiszen a C1 sejtekben, amelyben a SERCA1b teljesen hiányzik, a miotubulusok fejletlenek, kevés sejtmagot tartalmaznak, míg a C5 sejtekben, ahol csak részben gátolt a SERCA1b expressziója, a miotubulusok fejlettebbek és több sejtmagot tartalmaznak. A SERCA1b izoformának tehát elengedhetetlen a jelenléte mind a proliferáció, mind pedig a differenciálódás ideje alatt C2C12 sejtekben. Összefoglalásként elmondható, hogy fontos szerepet játszik a Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában, és expressziós szintjének változása befolyásolja a SOCE-ban érintett fehérjék, a STIM1, CSQ, valamint a CaN expresszióját is (26. ábra).

Összefoglalás

A doktori értekezésemben bemutatott munka során a migratorikus, kondrogenikus progenitor sejtek purinerg szignalizációját, valamint a SERCA1b fehérje csökkent expressziójának hatását vizsgáltuk vázizomsejtekben. Az értekezésben szereplő legfontosabb új eredményeket az alábbiakban foglaltam össze:

- A CPC-kben spontán megjelenő Ca^{2+} -oszcillációért elsősorban a belső raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulás és a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés tehető felelőssé. Ezek a sejtek mind a STIM1, Orai1 fehérjéket, mind pedig az IP_3R izoformákat expresszálják, de a RyR altípusai nem mutathatóak ki rajtuk.
- Feltételezésünk szerint a purinerg szignalizációs folyamatok is szerepet játszanak a CPC-k kalciumhomeosztázisában, ezért ennek bizonyítása érdekében mRNS szinten és fehérje szinten is megvizsgáltuk a purinerg receptorok altípusainak kifejeződését. Az adenosin receptorok altípusai az A_3 kivételével expresszálódnak, a P2X ionotróp purinerg receptorok közül a P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₆ és P2X₇ altípusok voltak kimutathatóak. A P2Y metabotróp purinerg receptorok altípusait is sikerült detektálnunk. Amíg Western-blot technika segítségével a P2Y receptorok közül csak a P2Y₁ és P2Y₄ volt detektálható, addig a P2X receptorok 5 izoformáját sikerült kimutatnunk.
- Az apiráz alkalmazásával defoszforiláltuk az ATP-t és az ADP-t AMP-vé, ami a Ca^{2+} -tranziensek megszűnését eredményezte. Mindebből arra következtettünk, hogy autokrin/parakrin purinerg szignalizáció állhat a Ca^{2+} -tranziensek létrejöttének hátterében, és a Ca^{2+} -függő regulatorikus mechanizmusok fontos szerepet töltenek be a CPC-k differenciációjának folyamatában.
- A további vizsgálatainkban sikerült specifikus SERCA1b shRNS-sel stabilan transzfektálnunk C2C12 vázizomsejteket, majd a puromycines szelekciót követően vizsgálni tudtunk olyan sejtpopulációkat, melyekben teljes mértékben (C1) vagy csak részben (C5) sikerült csökkentenünk a SERCA1b expressziót.
- Vizsgáltuk a géncsendesítés differenciálódásra kifejtett hatását. A vázizom differenciálódása során megjelenő szabályozó fehérjék expresszióját Western-blot (MyoD, STIM1, CSQ, CaN) és RT-PCR technika (miosztatin, MCIP1.4) segítségével detektáltuk. A teljes mértékben csökkent SERCA1b expressziót mutató sejtekben (C1) a STIM1, CSQ, CaN expressziós szintje csökkenést mutatott, míg a MyoD expressziós

szintje nem változott. Továbbá a miosztatin és a MCIP1.4 szintje is csökkent a C1 miotubulusokban.

- A funkcionális vizsgálatok során ismétlődő Ca^{2+} -tranzienseket váltottunk ki 120 mM KCl adagolása mellett a SERCA1b expressziót nem mutató sejtekben. A KCl adagolásának kezdő időpontját követően a 20. és a 40. s-ban is szignifikánsan magasabb volt a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ebből arra következtettünk, hogy a Ca^{2+} -visszavétel ezekben a sejtekben jóval lassabb, melyet jól jellemez a maximális pumpa aktivitás megfigyelt csökkenése.
- A SERCA1b-t nem expresszáló C1 sejtek csökkent proliferációt mutattak, valamint a miotubulusokban a sejtmagszám is alacsonyabb volt, összehasonlítva a C5, Scr és kontroll sejtek sejtmagszámával.

Kulcsszavak: purinerg szignalizáció, migratorikus kondroprogenitor sejtek, Ca^{2+} -oszcilláció vázizom differenciálódás, neonatalis SERCA1b fehérje, raktár által vezérelt kalciumbelépés (SOCE)

Summary

This Ph.D thesis summarizes the results of investigation of the role of purinergic signalling pathway in migratory kondrogenic progenitor cells and the effect of SERCA1b genesilencing on the differentiation of skeletal muscle cells. The new results presented in this work are the follows:

- Ca^{2+} -oscillations observed in CPCs were predominantly dependent on Ca^{2+} -release and store replenishment via store-operated Ca^{2+} entry. The CPCs express STIM1, Orai1 proteins and all three IP_3Rs , but no RyR subtypes were detected.
- Since periodic Ca^{2+} transients in MSCs could be attributed to an autocrine/paracrine purinergic signalling loop and we hypothesised the presence of a similar purinergic signal transduction mechanism also in CPCs. We first carried out a comprehensive mRNA transcript screening for all purinergic receptor mRNAs involved in Ca^{2+} homeostasis and found that of the A1 adenosine receptor subtypes A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$ and $\text{A}_{2\text{B}}$, but not A_3 adenosine receptor transcripts; of the P2X ionotropic purinergic receptor subtypes P2X_1 , P2X_4 , P2X_5 , P2X_6 and P2X_7 , but not P2X_2 and P2X_3 ; and mRNAs for all G_q -coupled P2Y metabotropic purinergic receptor subtypes were detectable using RT-PCR. Next, we applied immunoblot analyses to confirm the presence of these molecules at the protein level. While all five P2X ionotropic purinergic receptor subtypes were confirmed, only P2Y_1 and P2Y_4 could be identified.
- Enzymatic breakdown of extracellular nucleotides by apyrase completely abrogated Ca^{2+} oscillations, suggesting that an autocrine/paracrine purinergic mechanism may drive Ca^{2+} oscillations in these cells. Ca^{2+} -dependent regulatory mechanisms can be supposed to influence their differentiation potential.
- The role of neonatal SERCA1b on C2C12 cells has also been established. To understand its role during skeletal muscle differentiation, its synthesis has been interfered with specific shRNA sequence. Decreased protein expression was confirmed in the selected clones using a SERCA1b specific antibody at the miotube stage. Clone C1 and another clone (C5) – in which SERCA1b was downregulated to a lesser extent – were selected for further experiments.
- The expression of the regulatory proteins of skeletal muscle differentiation was examined either by Western-blot at the protein level (MyoD, STIM1, CSQ, CaN) or by RT-PCR (myostatin, MCIP1.4). The expression level of CSQ and STIM1 were studied by Western-blot analysis. The scrambled shRNA transfection did not modify

the expression level of CSQ, while in the clone C5 myotubes the expression showed a moderate decrease. Furthermore, in clone C1 cells only a very weak band could be detected. Similarly, STIM1 expression was slightly reduced in scrambled shRNA transfected and clone C5 cells as compared to the parental cells, while the STIM1 expression was hardly detectable in clone C1. MyoD and CaN were clearly detectable at protein level. The expression of MyoD was found to be unaffected. On the other hand, the CaN showed a remarkable decrease in clone C1 and even in clone C5, as compared to control cell types. Using specific primer pairs, an mRNA transcript analysis of myostatin and the MCIP1.4 was performed. Myostatin showed a significantly decreased mRNA expression in clone C1 as compared to scrambled shRNA transfected cells, thus the myostatin transcript level correlated with the SERCA1b silencing. In parallel MCIP1.4 was proved to be statistically modified in clone C1.

- In order to examine the functional consequences of the decreased expression of SERCA1b, repetitive Ca^{2+} -transients have been evoked by applications of 120 mM KCl. The significantly higher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured at the 20th and 40th seconds after the beginning of KCl application indicated a decreased Ca^{2+} -uptake capability which was quantified by extracting the maximal pump rate.
- In parallel, clone C1 cells showed inhibited cell proliferation and decreased myotube nuclear numbers as compared with scrambled control cells.

Key words: purinergic signalling, migratory kondrogenic progenitor cells, Ca^{2+} -oscillations, skeletal muscle differentiation, neonatal SERCA1b, Store-operated calcium entry (SOCE)

Irodalomjegyzék

1. Woolf A, Pflieger B (2003.) Burden of major musculoskeletal conditions. Bull World Health Organ 81: 646-656
2. Schminke B, Miosge N (2014) Cartilage repair in vivo: the role of migratory progenitor cells. Curr Rheumatol Rep 16: 461.
3. Sadler TW (2013) Langman's Medical Embryology. Wolters Kluwer Health.
4. Shum L, Nuckolls G (2002) The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. Arthritis Res 4: 94-106. .
5. Röhlich Pál (2009) Szövektan. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft.
6. Hangody L, Vásárhelyi G, Hangody L, Sükösd Z, Tibay G, et al. (2008) Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. Injury 39.
7. M H, Ross., W P (2006) Histology, A text and atlas. Lippincott Williams & Wilkins; 5th edition edition.
8. Dick H, Tore S (2011) The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. Nature Reviews Rheumatology 7.
9. Klatt A, Becker A, Neacsu C, Paulsson M, Wagener R (2011) The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly. Int J Biochem Cell Biol 43: 320-330.
10. Reddi A, Huggins C (1971) Lactic-malic dehydrogenase quotients during transformation of fibroblasts into cartilage and bone. Proc Soc Exp Biol Med 137: 127-129.
11. Thompson A, Piez K, Seyedin S (1985) Chondrogenesis in agarose gel culture. A model for chondrogenic induction, proliferation and differentiation. Exp Cell Res 157: 483-494.
12. Hamburger V, Hamilton H (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. Dev Dyn 195: 231-272.
13. Ahrens P, Solursh M, Reiter R (1977) Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. Dev Biol 60: 69-82.
14. Hadházy C, László M, Kostenszky K (1982) Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds. Acta Morphol Acad Sci Hung 30: 65-78.
15. Matta C, Fodor J, Szigyártó Z, Juhász T, Gergely P, et al. (2008) Cytosolic free Ca²⁺ 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 44: 310-323.

16. Zákány R, Szíjgyártó Z, Matta C, Juhász T, Csontos C, et al. (2005) 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* 305: 190-199.
17. Fodor J, Matta C, Juhász T, Oláh T, Gönczi M, et al. (2009.) Ionotropic purinergic receptor P2X4 is involved in the regulation of chondrogenesis in chicken micromass cell cultures. *Cell Calcium* 45: 421-430.
18. Bradham D, Passaniti A, Horton WJ (1995) Mesenchymal cell chondrogenesis is stimulated by basement membrane matrix and inhibited by age-associated factors. *Matrix Biol* 14: 561-571.
19. Grigoriadis A, Heersche J, Aubin J (1988) Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 106: 2139-2151.
20. Shea C, Edgar C, Einhorn T, Gerstenfeld L (2003) BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 90: 1112-1127.
21. Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path J, Sadowski B, et al. (2009) Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4: 324-335.
22. DeLise A, Fischer L, Tuan R (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 309-334.
23. DeLise A, Tuan R (2002) Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn* 225: 195-204.
24. San Antonio J, Tuan R (1986) Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations. *Dev Biol* 115: 313-324.
25. Kelley R, Fallon J (1978) Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud. *J Embryol Exp Morphol* 46: 99-110.
26. Haas A, Tuan R (1999) Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation* 64: 77-89.
27. Wali R, Bissonnette M, Jiang K, Niedziela S, Khare S, et al. (1995) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the phosphorylation of two acidic membrane proteins of 42,000 and 48,000 daltons in rat colonocytes: an effect modulated by vitamin D status. *J Cell Physiol* 162: 172-180.

28. Tavella S, Bellese G, Castagnola P, Martin I, Piccini D, et al. (1997) Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 1997 Sep;110 (Pt 18):2261-70 110: 2261-2270.
29. Mackie E, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R (1987) Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol* 105: 2569-2579.
30. Dessau W, von der Mark H, von der Mark K, Fischer S (1980) Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 57: 51-60.
31. Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W (2000) Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation *Matrix Biol* 19: 389-394.
32. Zehentner B, Dony C, Burtscher H (1999) The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J Bone Miner Res* 14: 1734-1741.
33. Lee Y, Chuong C (1997) Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J Cell Physiol* 170: 153-165.
34. Newton A (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9: 161-167.
35. Choi B, Chun J, Lee Y, Sonn J, Kang S (1995) Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 1034-1040.
36. Zákány R, Szucs K, Bakó E, Felszeghy S, Czifra G, et al. (2002) Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res* 275: 1-8.
37. Chang S, Oh C, Yang M, Kang S, Lee Y, et al. (1998) Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 273: 19213-19219.
38. Stanton L, Underhill T, Beier F (2003) MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 263: 165-175.
39. Rusnak F, Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80: 1483-1521.
40. Tomita M, Reinhold M, Molkentin J, Naski M (2002) Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J Biol Chem* 277: 42214-42218.
41. Szabó G (2009) *Sejtbiológia. Medicina Könyvkiadó Zrt.*
42. Jorgensen N, Geist S, Civitelli R, Steinberg T (1997) ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol* 139: 497-506.

43. Bakondi E, Gönczi M, Szabó E, Bai P, Pacher P, et al. (2003) Role of intracellular calcium mobilization and cell-density-dependent signaling in oxidative-stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 121: 88-95.
44. Ramage L, Martel M, Hardingham G, Salter D (2008) NMDA receptor expression and activity in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1576-1584.
45. Soto F, Garcia-Guzman M, Stühmer W (1997) Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J Membr Biol* 160: 91-100.
46. Tu P, Kunert-Keil C, Lucke S, Brinkmeier H, Bouron A (2009) Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J Neurochem* 108: 126-138.
47. Oláh T, Fodor J, Ruzsnavszky O, Vincze J, Berbey C, et al. (2011) Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells. *Cell Calcium* 49: 415-425
48. Fodor J, Matta C, Oláh T, Juhász T, Takács R, et al. (2013) Store-operated calcium entry and calcium influx via voltage-operated calcium channels regulate intracellular calcium oscillations in chondrogenic cells. *Cell Calcium* 54: 1-16.
49. Parker A, Gergely F, Taylor C (2004) Targeting of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to the endoplasmic reticulum by multiple signals within their transmembrane domains. *J Biol Chem* 279: 23797-23805.
50. Kawano S, Otsu K, Kuruma A, Shoji S, Yanagida E, et al. (2006) ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 39: 313-324.
51. Herbert Z, Matthias Z, Norbert S (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8: 437-502.
52. Junger W (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11: 201-212.
53. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig H (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509: 310-317
54. Desai B, Leitinger N (2014) Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity. *Front Immunol* 5.
55. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8: 437-502.

56. Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, la Sala A (2015) Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 21: 184-192.
57. North R (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067.
58. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492.
59. Ruzsnavszky O, Telek A, Gönczi M, Balogh A, Remenyik E, et al. (2011) UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* 105: 113-118.
60. Song X, Xu X, Zhu J, Guo Z, Li J, et al. (2015) Up-regulation of P2X7 receptors mediating proliferation of Schwann cells after sciatic nerve injury. *Purinergic Signal* 11: 203-213.
61. Santana P, Benjamim C, Martinez C, Kurtenbach E, Takiya C, et al. (2015) The P2X7 Receptor Contributes to the Development of the Exacerbated Inflammatory Response Associated with Sepsis. *J Innate Immun* 7(4):417-27. doi: 10.1159/000371388.
62. Burnstock G (2007.) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1483.
63. Röhlich P (2006) Szövektan. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft.
64. Meyer L, Wright N (2013) Structure of giant muscle proteins. *Front Physiol* 4.
65. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, et al. (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202: 59-68.
66. Muntoni F, Brown S, Sewry C, Patel K (2002) Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 12: 438-446.
67. Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay J, et al. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 15: 867-877.
68. Attila F, Erzsébet L (2008) Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt.
69. Fernando J A, Peter B S, Masahiro E, Mitsuhiro I (2013) Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure–function studies. *FEBS Journal* 280.
70. Veronika Á, László D (2004) Orvosi biokémia. Medicina Könyvkiadó Zrt.
71. MacLennan D, Rice W, Green N (1997) The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* 272: 28815-28818
72. Lytton J, Westlin M, Burk S, Shull G, MacLennan D (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267: 14483-14489.

73. Loukianov E, Ji Y, Baker D, Reed T, Babu J, et al. (1998) Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoforms and their role in muscle physiology and pathology. *Annals NY Acad Sci* 853: 251-259.
74. Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32: 279-305
75. Stokes D, Zhang P, Toyoshima C, K. Y, H. O, et al. (1998) Cryoelectron microscopy of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum: two crystal forms reveal two different conformations. . *Acta Physiol Scand* 163: 35-43.
76. Martonosi AN, Pikula S (2003) The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochem* 50: 1-30.
77. Thastrup O, Cullen P, Drobak B, Hanley M, Dawson A (1990) Thapsigargin, a tumor promotor, discharges intracellular calcium stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Proc natn Acad Sci*: 2466-2470.
78. Inesi G, Sagara Y (1994) Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *J Memb Biol* 141: 1-6.
79. Musumeci G, Castrogiovanni P, Coleman R, Szychlinska M, Salvatorelli L, et al. (2015) Somitogenesis: From somite to skeletal muscle. *Acta Histochem* 117: 313-328.
80. Conti F, Blumberg W, de Gier J, Pocchiari F (1982) Physical methods on biological membranes and their model systems. *Life Sciences* Vol. 71.
81. Murayama T, Ogawa Y (2002) Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med*: 305-311.
82. Matta C, Zakany R (2013) Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair. *Front Biosci (Schol Ed)* 5: 305-324.
83. Jaiswal R, Jaiswal N, Bruder S, Mbalaviele G, Marshak D, et al. (2000) Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 9645-9652.
84. Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
85. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8: 726-736.
86. Burt R, Loh Y, Pearce W, Beohar N, Barr W, et al. (2008) Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA* 299: 925-936. .

87. Figueroa F, Carrión F, Villanueva S, Khoury M (2012) Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res* 45: 269-277.
88. Bertrand J, Cromme C, Umlauf D, Frank S, Pap T (2010) Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1594-1601.
89. Stammers A, Susser S, Hamm N, Hlynsky M, Kimber D, et al. (2015) The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol* 19: 1-12.
90. Hovnanian A (2007) SERCA pumps and human diseases. *Subcell Biochem* 45: 337-363.
91. Erdei A (2012) Immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt.
92. Sztretye M, Deli T, Szentesi P, Szigeti G, Csernoch L (2007) Effect of TPEN on the calcium release of cultured C2C12 mouse myotubes. *J Muscle Res Cell Motil* 28: 421-428.
93. Schuhmeier R, Dietze B, Ursu D, Lehmann-Horn F, Melzer W (2003) Voltage-activated calcium signals in myotubes loaded with high concentrations of EGTA. *Biophys J*: 1065-1078.
94. Carroll S, Ravid K (2013.) Differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and chondrocytes: a focus on adenosine receptors. *Expert Rev Mol Med* 15:e1. doi: 10.1017/erm.2013.2.
95. Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, et al. (2000) CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 6: 591-603.
96. Zádor E, Mendler L, Ver Heyen M, Dux L, Wuytack F (1996) Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *Biochem J* 320 107-113.
97. Zádor E, Vangheluwe P, Wuytack F (2007) The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. *Cell Calcium* 41: 379-388
98. Dolmetsch R, Lewis R, Goodnow C, Healy J (1997.) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386: 855-858.
99. Kupzig S, Walker S, Cullen P (2005) The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the ERK/MAPK cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7577-7582.
100. Matta C, Mobasher A (2014) Regulation of chondrogenesis by protein kinase C: Emerging new roles in calcium signalling. *Cell Signal* 26: 979-1000.

101. Stout C, Costantin J, Naus C, Charles A (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277(12):10482-8.: 10482-10488.
102. Sauer H, Hofmann C, Wartenberg M, Wobus A, Hescheler J (1998) Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells. *Exp Cell Res* 238: 13-22.
103. Nguyen C, Lieberherr M, Bordat C, Velard F, Côme D, et al. (2012) Intracellular calcium oscillations in articular chondrocytes induced by basic calcium phosphate crystals lead to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1399-1408.
104. Kawano S, Shoji S, Ichinose S, Yamagata K, Tagami M, et al. (2002) Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 32: 165-174.
105. Tao R, Sun H, Lau C, Tse H, Lee H, et al. (2011) Cyclic ADP ribose is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ oscillations in human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 15: 2684-2696.
106. Varga Z, Juhász T, Matta C, Fodor J, Katona É, et al. (2011) Switch of voltage-gated K⁺ channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca²⁺-oscillations and cartilage formation. *PLoS One* 6: 27957.
107. Kapur N, Mignery G, Banach K (2007) Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: 1510-1518.
108. Miyakawa T, Maeda A, Yamazawa T, Hirose K, Kurosaki T, et al. (1999) Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP₃ receptor subtypes. *EMBO J* 18: 1303-1308.
109. Zhang S, Fritz N, Ibarra C, Uhlén P (2011) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations. *Neurochem Res* 36: 1175-1185.
110. Hu J, Qin K, Zhang Y, Gong J, Li N, et al. (2011) Downregulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca²⁺ influx in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 411: 786-791. .
111. Hoth M, Niemeyer B (2013) The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Curr Top Membr* 71: 237-271.
112. Picher M, Graff R, Lee G (2003) Extracellular nucleotide metabolism and signaling in the pathophysiology of articular cartilage. *Arthritis Rheum* 48: 2722-2736.

113. Rosenthal A, Hempel D, Kurup I, Masuda I, Ryan L (2010) Purine receptors modulate chondrocyte extracellular inorganic pyrophosphate production. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 1496-1501.
114. D'Alimonte I, Nargi E, Lannutti A, Marchisio M, Pierdomenico L, et al. (2013.) Adenosine A1 receptor stimulation enhances osteogenic differentiation of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells via WNT signaling. *Stem Cell Res* 11: 611-624.
115. Katebi M, Soleimani M, Cronstein B (2009) Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J Leukoc Biol* 85: 438-444.
116. Ryzhov S, Goldstein A, Novitskiy S, Blackburn M, Biaggioni I, et al. (2012) Role of A2B adenosine receptors in regulation of paracrine functions of stem cell antigen 1-positive cardiac stromal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 341: 764-774.
117. Shih Y, Hwang Y, Phadke A, Kang H, Hwang N, et al. (2014) Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 990-995.
118. Gharibi B, Abraham A, Ham J, Evans B (2011.) Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Res* 26: 2112-2124.
119. Bootman M, Collins T, Mackenzie L, Roderick H, Berridge M, et al. (2002.) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J* 16: 1145-1150.
120. Jacobson K, Ivanov A, de Castro S, Harden T, Ko H (2009) Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors. *Purinergic Signal* 5: 75-89.
121. Zippel N, Limbach C, Ratajski N, Urban C, Luparello C, et al. (2012) Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 21: 884-900.
122. Ciciarello M, Zini R, Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, et al. (2013.) Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev* 22: 1097-1111.
123. Grierson J, Meldolesi J (1995.) Shear stress-induced [Ca²⁺]_i transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP. *J Biol Chem* 270: 4451-4456.

124. Kwon H, Ohmiya Y, Honma K, Honma S, Nagai T, et al. (2012) Synchronized ATP oscillations have a critical role in prechondrogenic condensation during chondrogenesis. *Cell Death Dis* 278.
125. Kósa M, Zádor E (2013) Transfection efficiency along the regenerating soleus muscle of the rat. *Mol Biotechnol* 54: 220-227.
126. Brandl C, Green N, Korczak B, MacLennan D (1986) Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 44: 597-607.
127. Zádor E, Kósa M (2014) The neonatal sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1b): a neglected pump in scope. *Pflugers Arch* 467(7):1395-401. doi: 10.1007/s00424-014-1671-3.
128. Zádor E, Owsianik G, Wuytack F (2011) Silencing SERCA1b in a few fibers stimulates growth in the entire regenerating soleus muscle. *Histochem Cell Biol* 135: 11-20
129. Mendler L, Szakonyi G, Zádor E, Görbe A, Dux L, et al. (1998) Expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPases in the rat extensor digitorum longus (EDL) muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 777-785
130. Genteski-Hamblin A, Greeb J, Shull G (1988) A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem* 263: 15032-15040.
131. Burk S, Lytton J, MacLennan D, Shull G (1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 264: 18561-18568.
132. Vangheluwe P, Sipido K, Raeymaekers L, Wuytack F (2006) New perspectives on the role of SERCA2's Ca²⁺ affinity in cardiac function. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1216-1228.
133. Seth M, Li T, Graham V, Burch J, Finch E, et al. (2012) Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) stores by stromal interaction molecule 1 and sarcolipin during muscle differentiation. *Dev Dyn* 241: 639-647
134. Stiber J, Hawkins A, Zhang Z, Wang S, Burch J, et al. (2008) STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 10: 688-697.

135. Sztretye M, Geyer N, AlGhaadi D, Bodnár D, Oláh T, et al. (2014) Mstn-Cmpt D11Abc-Mice. A Mouse Model to Study Muscle Weakness, Fatigue and Soce. 58th Annual Meeting of the Biophysical Society Baltimore 661-Pos Board B416.
136. Collet C, Ma J (2004) Calcium-dependent facilitation and graded deactivation of store-operated calcium entry in fetal skeletal muscle. *Biophys J* 87: 268-275
137. Pan Y, Zvaritch E, Tupling A, Rice W, de Leon S, et al. (2003) Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice. *J Biol Chem* 278: 13367-13375
138. Sachewsky N, Hunt J, Cooke M, Azimi A, Zarin T, et al. (2014) Cyclosporin A enhances neural precursor cell survival in mice through a calcineurin-independent pathway. *Dis Model Mech* 7: 953-961.
139. Kim H, Choi S, Jeung E, Yoo Y (2014) Cyclosporine A induces apoptotic and autophagic cell death in rat pituitary GH3 cells. *PLoS One* 9.
140. Juhász T, Matta C, Katona É, Somogyi C, Takács R, et al. (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signalling enhances osteogenesis in UMR-106 cell line. *J Mol Neurosci* 54: 555-573.
141. Zhang M, McLennan I (1995) During secondary myotube formation, primary myotubes preferentially absorb new nuclei at their ends. *Dev Dyn* 204: 168-177.
142. Porter G, Makuck R, Rivkees S (2002) Reduction in intracellular calcium levels inhibits myoblast differentiation. *J Biol Chem* 277: 28942-28947.

Elektronikus hivatkozás:

1. www.mkk.szie.hu
2. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>
3. www.ncbi.nlm.nih.gov

Közleménylista



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/117/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Adrienn
Neptun kód: G1AMQY
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037613

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, A.**, Fodor, J., Vincze, J., Oláh, T., Juhász, T., Zákány, R., Csernoch, L., Zádor, E.: The Effect of SERCA1b Silencing on the Differentiation and Calcium Homeostasis of C2C12 Skeletal Muscle Cells.
PLoS One. 10 (4), 25 p., 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123583>
IF:3.534 (2013)
2. Matta, C., Fodor, J., Miosge, N., Takács, R., Juhász, T., Rybaltovszki, H., **Tóth, A.**, Csernoch, L., Zákány, R.: Purinergic signalling is required for calcium oscillations in migratory chondrogenic progenitor cells.
Pflugers Arch. 467 (2), 429-442, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-014-1529-8>
IF:3.073 (2013)





További Közlemények

3. Nagy, D., Gónczi, M., Dienes, B., Szóőr, Á., Fodor, J., Nagy, Z., **Tóth, A.**, Fodor, T., Bai, P., Szűcs, G., Rusznák, Z., Csernoch, L.: Silencing the KCNK9 potassium channel (TASK-3) gene disturbs mitochondrial function, causes mitochondrial depolarization, and induces apoptosis of human melanoma cells.
Arch. Dermatol. Res. 306 (10), 885-902, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-014-1511-5>.
IF:2.27 (2013)
4. Fodor, J., Matta, C., Oláh, T., Juhász, T., Takács, R., **Tóth, A.**, Dienes, B., Csernoch, L., Zákány, R.: Store-operated calcium entry and calcium influx via voltage-operated calcium channels regulate intracellular calcium oscillations in chondrogenic cells.
Cell Calcium. 54, 1-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2013.03.003>
IF:4.21

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,087

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,607

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

Debrecen, 2015.06.03.



Idézhető, angol nyelvű absztraktok:

Tóth Adrienn, Fodor János, Vincze János, Oláh Tamás, Juhász Tamás, Zádor Ernő, Csernoch László: The effect of SERCA 1b shRNA on the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells. *Acta Physiologica* Volume 211, Issue Supplement s697, Pages 75-76, August 2014. DOI: 10.1111/apha.12362

Oláh Tamás, Bodnár Dóra, **Tóth Adrienn**, Fodor János, Kovács Adrienn, Farkas Anna, Nádró Bíborka, Szentesi Péter, Csernoch László: Cannabinoids and muscle weakness – Investigating the function of CB1 receptors in mammalian skeletal muscle. *Acta Physiologica* Volume 211, Issue Supplement s697, Pages 82-83, August 2014. DOI: 10.1111/apha.12362

Tóth Adrienn, Fodor János, Vincze János, Oláh Tamás, Juhász Tamás, Zádor Ernő, Csernoch László: Investigation of the role of SERCA1b in the calcium homeostasis of C2C12 skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* (2015) 36:132. DOI 10.1007/s10974-015-9407-3

Fodor János, **Tóth Adrienn**, Vincze János, Oláh Tamás, Dienes Beatrix, Zádor Ernő, Csernoch László: The effect of follistatin on the calcium homeostasis and differentiation of the C2C12 skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* (2015) 36:131. DOI 10.1007/s10974-015-9407-3

Oláh Tamás, Bodnár Dóra, **Tóth Adrienn**, Fodor János, Kovács Adrienn, Farkas Anna, Nádró Bíborka, Szentesi Péter, Csernoch László: CB1 cannabinoid receptors are involved in the regulation of excitation–contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* (2015.) 36:129. DOI 10.1007/s10974-015-9407-3

Angol nyelvű poszterek:

Adrienn Tóth, János Fodor, János Vincze, Tamás Oláh, Tamás Juhász, Beatrix Dienes, Ernő Zádor, László Csernoch (2014.): Investigation of the role of SERCA1b in the Ca²⁺ homeostasis of C2C12 skeletal muscle cells (Salzburg, EMC)

Adrienn Tóth, János Fodor, János Vincze, Tamás Oláh, Tamás Juhász, Ernő Zádor, László Csernoch (2014.): The effect of SERCA 1b shRNA on the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells (Budapest, FEPS)

János Fodor, **Adrienn Tóth**, János Vincze, Tamás Oláh, Ernő Zádor, László Csernoch (2014): The effect of follistatin on the Ca^{2+} -homeostasis and differentiation of the C_2C_{12} skeletal muscle cells (Salzburg, EMC)

Magyar nyelvű posztterek:

Nagy Dénes, **Tóth Adrienn**, Fodor János, Kovács Adrienn, Rusznák Zoltán, Szűcs Géza, Csernoch László (2012): A mitokondriális elhelyezkedésű TASK-3 fehérje szerepe melanoma sejtekben (A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2012. évi közös Tudományos Kongresszusa, Debrecen)

Tóth Adrienn, Fodor János, Cseri Karolina, Csernoch László (2013.): Follistatin kezelés hatása C_2C_{12} vázizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisára (A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest)

Fodor János, **Tóth Adrienn**, Matta Csaba, Takács Roland, Zákány Róza, Csernoch László, Miosge Nicolai (2013.): Humán kondroprogenitor sejtek Ca^{2+} -háztartásának vizsgálata (A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest)

Oláh Tamás, Bodnár Dóra, **Tóth Adrienn**, Fodor János, Kovács Adrienn, Farkas Anna, Szentesi Péter, Csernoch László (2014): A CB1 kannabinoid receptor funkciójának vizsgálata emlős vázizmon (44. Membrán-transzport konferencia, Sümeg) - Kovács Tibor díjas előadás

Előadások:

2013. Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, The effect of follistatin on the Ca^{2+} homeostasis of the C_2C_{12} skeletal muscle cells.

2014. Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, The effect of SERCA 1b shRNA on the differentiation of C_2C_{12} skeletal muscle cells.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Csernoch László professzor úrnak, aki lehetővé tette számomra, hogy az intézetben végezhessem el az értekezés alapjául szolgáló kísérletes munkát, és akihez mindig bátran fordulhattam, ha segítségre volt szükségem.

Továbbá köszönettel tartozom két kollegámnak, Dr. Fodor Jánosnak és Dr. Oláh Tamásnak, akik már a TDK-s éveimtől fogva segítettek munkámat, és akik nélkül biztosan nem jöhetett volna létre ez a munka. Külön köszönöm János örök optimizmusát, ami segített átlendíteni a nehezebb napokon, Tamásnak pedig azt, hogy mindig mindenben segítségemre volt.

Itt szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Gönczi Mónikának, akitől rengeteget tanultam mind ifjú kutatóként, mind magánemberként. Köszönöm neki, hogy időt és fáradságot nem kímélve segítette munkámat.

Hálával tartozom még a munkacsoportunk minden tagjának, amiért barátságos légkört teremtettek, és amiért a laborgyűlések mindig jó hangulatban teltek.

Köszönet Dr. Vargáné Kiss Ibolya, valamint Őri Róza asszisztensnőknek, akik a kísérletek elvégzéséhez szükséges technikai háttérrel biztosították.

Köszönettel tartozom minden társszerzőmnek és kollaborációs partnereinknek, Dr. Zákány Rózának és munkacsoportjának, valamint Dr. Zádor Ernőnek az eredményes közös munkáért.

Köszönet illeti még az intézetünk egykori TDK-hallgatóját, Garami Nórát, valamint barátnőmet Szabó Krisztinát, aki az ábráim elkészítésében nyújtott nagy segítséget.

Mindenekelőtt köszönöm családomnak és páromnak, akik szeretete és biztatása segített céljaim megvalósításában.

Ezt a munkát nagy szeretettel ajánlom Nagyapámnak, aki sajnos már nincs köztünk!