

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

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

Matta Csaba



Témavezető: Dr. Zákány Róza

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ANATÓMIA, SZÖVET- ÉS FEJLŐDÉSTANI INTÉZET**

DEBRECEN, 2009.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés és célkitűzés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. A porcszövet.....	10
2.2. A porcdifferenciáció tanulmányozására szolgáló modellek	13
2.3. A porcdifferenciáció lépései.....	15
2.3.1. A porcdifferenciáció intracelluláris szabályozása	17
2.3.2. A MAP-kináz kaszkád és szerepe a porcdifferenciáció szabályozásában	20
2.4. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szerepe a sejtek életfolyamatainak szabályozásában.....	21
2.4.1. A cytosol szabad Ca^{2+} extra- és intracelluláris forrásai	23
2.4.2. Intracelluláris kalciumkötő fehérjék	25
2.4.3. A kalciumjel leállítása és a cytosol Ca^{2+} eltávolítása	25
2.4.4. A kalciumjel térbeli és időbeli tulajdonságai	26
2.5. Az oxidatív stressz és a hialinporc kapcsolata	28
2.5.1. A poli(ADP-ribóz)-polimeráz-1 szerepe az oxidatív stressz okozta károsodásokban.....	30
2.5.2. A PARP aktivitásának szabályozása.....	32
2.5.3. A PARP aktiválódása és a cytosol kalciumkoncentrációja közötti kapcsolat	32
2.5.4. A PARP szerepe az arthritis patogenezisében	33
3. Anyagok és módszerek	34
3.1. Sejtenyésztés	34
3.2. A cytosol szabad Ca^{2+} -koncentrációjának meghatározása.....	35
3.3. Az intracelluláris kalciumraktárak töltöttségének vizsgálata ciklopiazonsavval és koffeinnel	37
3.4. Spontán Ca^{2+} -tranziensek vizsgálata és analízise.....	38
3.5. Az F12-tápcolat kalciumkoncentrációjának meghatározása.....	38
3.6. A kultúrák kezelése EGTA-val, A23187 Ca^{2+} -ionoforral és ciklosporin-A-val	39
3.7. Oxidatív stressz előidézése hidrogén-peroxiddal és peroxinitrittel, valamint a PARP-aktivitás gátlása 3-amidobenzamiddal	39
3.8. A képződött porcmatrix fénymikroszkópos vizsgálata és mennyiségének szemikvantitatív meghatározása	40
3.9. A sejtproliferáció vizsgálata ^3H -timidin-beépülés mérésével	41
3.10. A sejtek mitokondriális aktivitásának meghatározása	42
3.11. A sejtek túlélési rátájának vizsgálata áramlási citometriával.....	42

3.12. RT-PCR analízis.....	43
3.13. Sejtkivonatok preparálása	45
3.14. Western blot analízis.....	46
3.15. Kalcineurin-enzimaktivitás mérése	47
3.16. Poli(ADP-ribóz)-polimerek kimutatása immunocitokémiával	47
3.17. PARP-aktivitás <i>in situ</i> kimutatása	48
3.18. A sejtek NAD ⁺ -tartalmának meghatározása	49
4. Eredmények	50
4.1. A porcosodó HD-kultúrák Ca ²⁺ -homeosztázisának vizsgálata	50
4.1.1. A kontroll körülmények között tenyésztett kultúrák sejteinek szabad cytosol Ca ²⁺ -koncentrációja jellegzetes mintázatot követ a differenciálódás során.....	50
4.1.2. A háromnapos kultúrák sejtei periodikus Ca ²⁺ -oszcillációkat mutatnak	51
4.1.3. A differenciálódás során a HD-kultúrák sejteiben mérhető megemelkedett cytosol Ca ²⁺ -koncentráció forrása elsősorban az extracelluláris tér	53
4.1.4. A chondrogenikus sejtek cytosol Ca ²⁺ -koncentrációjának megemelése kettős hatást vált ki.....	56
4.1.5. A chondrogenikus sejtek belső raktárai tartalmaznak bizonyos mennyiségű kalciumot, de ez nyugalmi körülmények között nem befolyásolja jelentősen a sejtek Ca ²⁺ -homeosztázisát.....	60
4.1.6. A HD-kultúrák sejtei rianodinreceptort és IP ₃ -receptort is expresszálnak	63
4.1.7. Az EGTA, az A23187 Ca ²⁺ -ionofor és a CPA hatása a HD-kultúrák sejteinek osztódási rátájára, mitokondriális aktivitására és túlélőképességére	65
4.1.8. A kalcineurin aktivitása és expressziója érzékenyen reagál a cytosol kalciumkoncentrációjának változásaira	69
4.2. Az oxidatív stressz <i>in vitro</i> porcképződésre kifejtett hatásainak vizsgálata.....	72
4.2.1. Az oxidatív stressz poli(ADP-ribóz)-polimeráz-dependens módon gátolja a porcdifferenciációt	72
4.2.2. A 3-AB-kezelések bizonyos mértékben csökkentik a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit káros hatásait	75
4.2.3. Oxidatív stressz hatására változik a HD-kultúrák sejteiben mérhető intracelluláris kalciumkoncentráció	77
4.2.4. Az oxidatív stressz hatására módosul a porcspecifikus markerek expressziós mintázata	78
4.2.5. A HD-kultúrákban a hidrogén-peroxiddal és peroxinitrittel kiváltott oxidatív stressz hatására poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok aktiválódnak.....	80
5. Megbeszélés.....	82
5.1. A porcosodó HD-kultúrák sejteinek Ca ²⁺ -homeosztázisa	82
5.1.1. A chondrogenikus mesenchymalis kultúrák sejteinek Ca ²⁺ -homeosztázisa elsősorban a külső közeg kalciumkoncentrációjától függ.....	84

5.1.2.	A belső Ca^{2+} -raktárak nem játszanak szerepet a differenciálódás napján kimutatható Ca^{2+} -csúcs kialakításában	87
5.1.3.	A Ca^{2+} -oszcillációk is fontosak a differenciáció szempontjából.....	88
5.1.4.	A calcineurin lehet a HD-kultúrák cytosol kalciumkoncentráció-változásainak egyik target- és effektormolekulája	89
5.2.	Az oxidatív stressz és a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok kapcsolata a porcosodó HD-kultúrák sejtjeiben.....	91
5.2.1.	A cytosol Ca^{2+} -koncentráció és a PARP-aktivitás kapcsolata	93
5.2.2.	Poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok szerepe az <i>in vitro</i> chondrogenézisben	94
5.3.	Záró gondolatok	95
6.	Összefoglalás	96
7.	Summary	97
9.	Köszönetnyilvánítás.....	106
10.	Közlemények listája.....	107
11.	Függelék	108

Rövidítések jegyzéke

3-AB: 3-aminobenzamid	dNTP: dezoxinukleotid-trifoszfát
AAS: atomabszorpciós spektrometria (atomic absorption spectrometry)	DTT: ditiotritol
ADP: adenzin-difoszfát	ECM: extracelluláris matrix
ADPR: ADP-ribóz	EDTA: etilén-diamin-tetraacetát
AM: acetoxi-metilészter	EGF: epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
AP-1/2: aktivátor protein-1/2	EGTA: etilén-glikol-tetraacetát
ARC: arachidonsav által szabályozott kalciumcsatorna (arachidonate-regulated Ca^{2+} channel)	ER: endoplasmaticus retikulum
ATP: adenzin-trifoszfát	ERK: extracelluláris jelek által szabályozott kináz (extracellular signal-regulated kinase)
BMP: csont morfogénikus fehérje (bone morphogenic protein)	FACS: fluorescence associated cell sorter
BSA: borjú szérumalbumin (bovine serum albumine)	FBS: foetalis borjúsérum (fetal bovine serum)
CaMK: Ca^{2+} /kalmodulin-dependens protein-kináz	FGF: fibroblast-eredetű növekedési faktor (fibroblast growth factor)
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát	GAG: glükózaminoglikán
CBP: CREB-kötő fehérje (CREB-binding protein)	Gly: glicin
cDNS: komplementer DNS	GPX: glutation-peroxidáz
cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát	H_2O_2 : hidrogén-peroxid
CICR: kalciumindukált kalciumfelszabadulás (calcium-induced calcium-release)	HClO: hipoklórsav
CMF-PBS: kalcium- és magnéziummentes poszfátpuffer (calcium and magnesium free phosphate buffered saline)	HD: nagy sűrűségű (high density) sejt kultúra
CMP: cartilage matrix protein	HEPES: 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
COMP: cartilage oligomeric matrix protein	IP_3 : inozitol-triszfoszfát
CPA: ciklopiazonsav (cyclopiazonic acid)	IP_3 -R: inozitol-triszfoszfát-receptor
CRAC: raktárak által vezérelt kalciumcsatorna (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel)	JNK: Jun N-terminális kináz
CREB: cAMP válaszadó elemhez kapcsolódó fehérje (cAMP response element binding protein)	MAPK: mitogén-aktivált protein-kináz
CsA: ciklosporin-A	MAPKK: MAPK-kináz
DAPI: diamino-fenilindol	MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid
DMMK: dimetil-metilénkék	NAD: nikotinamid adenin dinukleotid
DMSO: dimetil-szulfoxid	N-CAM: idegi sejtdhéziós molekula (neural-cell adhesion molecule)
DNS: dezoxiribonukleinsav	NFAT: aktiválódott T-limfociták sejtmagi antigénje (nuclear factor of activated T lymphocytes)
	NMDA: N-metil-D-aszpartát
	NMNAT: NMN (nikotinamid-mononukleotidáz)-adenilil-transzferáz
	NOS: nitrogén-monoxid-szintetáz

NXC: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger	ROS: reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species)
OA: okadánsav (okadaic acid)	RT: reverz transzkriptáz
OD: optikai denzitás (optical density)	RT-PCR: reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
ONOO: peroxinitrit	RyR: rianodinreceptor
PARG: poli(ADP-ribóz)-glikohidroláz	SDS: nátrium-dodecil-szulfát (sodium-dodecyl-sulphate)
PARP: poli(ADP-ribóz)-polimeráz	SEM: az átlag standard hibája (standard error of the mean)
PBS: foszfátpuffer (phosphate buffered saline)	Ser: szerin
PBST: PBS+0,1% Tween-20	SERCA: sarco(endo)plazmatikus retikulum- Ca^{2+} -ATPáz
PDGFR: vérlemezke-eredetű növekedési faktor-receptor	SMOC: másodlagos messengerek szabályozta kalciumcsatorna (second messenger-operated channel)
PG: proteoglikán	SOCE: raktárak által irányított kalciumbelépés (store-operated Ca^{2+} entry)
PI: propídium-jodid	SOD: szuperoxid-diszmutáz
PKA: protein-kináz A	SR: sarcoplasmaticus retikulum
PKC: protein-kináz C	TGF: transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
PKG: protein-kináz G	Thr: treonin
PLC: foszfolipáz-C	TK: toluidinkék
PMCA: plazmamembrán-kalcium-ATPáz (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase)	TRP: tranziens receptor-potenciál kalciumcsatorna
PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid	Tyr: tirozin
PMT: fotoelektron-sokszorozó cső (photo electron multiplier tube)	VOCC: feszültségvezérelt kalciumcsatorna (voltage-operated calcium channel)
PP: protein-foszfatáz	
PP1, PP2A, PP2B: protein-foszfatáz 1, 2A, 2B	
RNS: ribonukleinsav	
ROCC: ligand- vagy receptorvezérelt kalciumcsatorna (receptor-operated calcium channel)	

1. Bevezetés és célkitűzés

A mozgásszervi megbetegedések – különösképpen a testünk ízületeinek degeneratív károsodása, az *arthrosis* és az *arthritis*, valamint az oly sok ember életét megkeserítő porckorong-bántalmak – a társadalom döntő többségét érintő, az életminőséget jelentősen rontó elváltozások. Tekintve, hogy e betegségek súlyos formái elsősorban az időskorra jellemzőek, és tudván azt, hogy napjainkban a fejlett országokban – köztük hazánkban is – a társadalom korösszetételének kedvezőtlen irányú változása figyelhető meg, ezekkel a problémákkal a közeljövőben még hangsúlyosabban kell számolnunk. Az ENSZ Egészségügyi Világszervezete (WHO), felismerve a csont és ízületi megbetegedések társadalomra gyakorolt igen jelentős hatásait és az ezzel kapcsolatosan felmerülő problémák súlyosságát, a 2000-től 2010-ig tartó időszakot a Csont és Ízület Évtizedének nyilvánította [1]. A program legfontosabb céljai között a mozgásszervi kórképekben szenvedő betegek számának csökkentése és életminőségének javítása, a betegségek okozta szociális és gazdasági problémák visszaszorítása, valamint megelőzésének, diagnosztikájának, kezelésének javítása, a prevenció és a hatékony kezelési módszerek kutatásának elősegítése szerepel. Mindezek a nemes célok azonban nem érhetők el anélkül, hogy a legmodernebb kutatási módszerekkel felfegyverkezve ne próbálnánk meg minél többet megtudni az érintett szervek, szövetek – köztük a *porcszövet* – alapvető biológiai sajátosságairól, kialakulását és működését irányító gének és jelátviteli útvonalak felépítéséről.

Kutatócsoportunk, az Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézet Sejt- és Szövettenyésztő Laboratóriumának legfőbb profilját évtizedek óta az *in vitro* porcdifferenciálódás különböző aspektusainak vizsgálata adja. Kísérleteinket egy széles körben alkalmazott differenciációs modellen, a csirkeembriók végtagtelepeiből izolált mesenchymalis sejtekből előállított primer high density sejt kultúrákon végezzük. Az irodalomból ismert tény, hogy a differenciálódással párhuzamosan jelentős intracelluláris Ca^{2+} -szint-változások figyelhetők meg bizonyos sejteknél, köztük mesenchymalis őssejteknél is [2]. Napjainkra számos, a legkülönbözőbb funkciót betöltő sejt típus Ca^{2+} -homeosztázisát leírták már, és nincs ez másként a chondrocyták esetében sem. Érthető módon azonban – lévén, hogy a különféle arthrosisok és porckopásos megbetegedések, valamint a fejlődési rendellenességek különösképpen ezeket a régiókat érintik – elsősorban a már érett ízületi porcban, valamint az epiphysis-porckorongban lévő érett, vagy (az utóbbi esetén) terminálisan differenciálódó hipertrófiás porcsejtek irodalma kiterjedtebb [3,4]. A mesenchymalis sejtek

primer, porcsejt irányba történő differenciálódása és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció esetleges kapcsolatáról egyelőre nincsenek adatok. Joggal feltételezhetjük azonban, hogy – a mesenchymalis őssejtekhez hasonlóan – a cytosol kalciumkoncentrációja jelentős változásokon esik át a differenciálódó chondroprogenitor sejtekben is. Ennek megfelelően céljaink a következők voltak:

1. Mérhető-e, és ha igen, milyen változásokat követ a kísérleteink során használt sejt kultúrák differenciálódó sejtjeiben detektálható cytosol szabad kalciumkoncentráció?
2. Mi lehet a cytosol kalciumionjainak forrása: a belső raktárakból szabadulnak-e fel, vagy az extracelluláris közegből áramlanak be a sejtek belsejébe?
3. Milyen hatása van a differenciációs folyamatra a sejtek nyugalmi cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának modulálása?
4. Hogyan módosul az *in vitro* porcdifferenciáció egyik pozitív regulátorának, a kalcineurinnak az aktivitása a cytosol Ca^{2+} -koncentráció megváltoztatásának hatására?

A differenciálódó sejtek Ca^{2+} -homeosztázisának felderítése mellett a sejtek életének egy másik aspektusát is vizsgálni kívántuk. Mivel az érett porcsejtek általában hipoxiás körülmények között töltik be funkciójukat, életük folyamán gyakran kerülnek kapcsolatba reaktív oxigén- és nitrogéngyökökkel. Ezért kíváncsiak voltunk a következőkre is:

5. Milyen módon hatnak a reaktív oxigén- és nitrogéngyökök az *in vitro* porcdifferenciálódásra?
6. Kimutatható-e valamiféle kapcsolat az oxidáló ágensek okozta károsodások és a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok aktiválódása között?
7. Milyen szerepet játszhat a poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) a nyugalmi körülmények között tenyésztett differenciálódó mesenchymalis sejtek életfolyamatainak szabályozásában?
8. Van-e kapcsolat a differenciálódó sejtek cytosol kalciumkoncentrációjának változása és a PARP-aktivitás között?

Egyetemi doktori értekezésemben tehát – a porc szövet differenciálódásában és az érett szövet működésének fenntartásában szerepet játszó legfontosabb gének és azok

fehérjetermékeinek áttekintése után – az élettan, a fejlődésbiológia és a biokémia határterületén, ezen az eddig viszonylag keveset kutatott területen szerzett eredményeinkről: az intracelluláris kalciumkoncentráció és az *in vitro* porcdifferenciálódás kapcsolatáról számolok be, de szó esik az oxidatív stressz egy lehetséges effektora, a poli(ADP-ribóz)-polimeráz és az *in vitro* porcdifferenciáció kapcsolatáról is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A porcszövet

A porcszövet a gerincesek – és így az ember – egyik alapvető kötő- és támasztószövege. Mind a fejlődő, mind a kifejlett egyedek esetében sokrétű szereppel bír: a korai embrió vázrendszere túlnyomó többségében porcszövetből áll, ami túl azon, hogy strukturális támaszt nyújt, egyben a később belőle *endochondralis csontosodással* kialakuló csontok vázát, modelljét is adja. A csontosodás folyamán a kezdetben az egész sablont felépítő porcszövet csak részlegesen alakul át csontszövevé, és két helyen, a gyermek- és serdülőkorban bekövetkező gyors hossznövekedésért felelős *epiphysis-porckorong* területén, valamint a csontok ízesülési felszínét borító és azok rendkívüli kopásállóságáért és a rázkódások csökkentéséért felelős *ízületi porc* formájában megmarad, ez utóbbi helyen egész életünk folyamán. Mindezekén túl porcszövet található a fej és az arc számos területén (orr, fül), rugalmasságát biztosítva ezeknek a struktúráknak [5].

A porcszövet – bár felületes szemlélő számára egységesnek tűnik – valójában mind fejlődését, mind pedig szerkezetét és funkcióját tekintve több csoportra osztható. A korai embrionális élet során például több csíralemez sejtjei is porcszövevé differenciálódhatnak. A *ganglionléc (crista neuralis)* sejtjei elsősorban a fej-nyaki régió porcképződményeiért felelősek, míg a testünk többi részén található porcszövet a középső csíralemez származéka: a törzs csontjainak vázát adó porckezdemények a *paraxialis mesoderma* szegmentálódásaként létrejövő szomiták *sclerotom* nevű komponenseiből fejlődnek, míg a végtagtelepek porctemplátjai az oldallemez-mesodermából kialakult mesenchymalis szövet származékai [6]. A már kialakult porcszövet sem egységes: az elkülönítést makroszkópos és mikroszkópos morfológiai sajátosságok, a porcsejtek alaki és funkcionális, valamint az extracelluláris matrix (ECM) szerkezeti és biomechanikai eltérései indokolják. Ezek alapján a porcszövetet három nagy csoportba soroljuk: *hyalinporc (üvegporc)*, *elasztikus porc* és *rostos porc*, ahol a három szövet jellemző sajátosságainak kialakításában az ECM különbözőségei az alapvetőek. Jelen értekezés tárgya a hyalinporc, ezért a továbbiakban részletesen csak ezzel foglalkozom.

A hyalinporc az állati szervezetben három, funkcionális szempontból különböző megjelenési formában fordul elő: *ízületi porc*, az egyes zsigerek (gége, légcső, bronchusok) vázát adó úgynevezett *állandósult porc*, valamint az endochondralis csontosodással kialakuló csontok alakjának sablonjául szolgáló porcok. Mindhárom megjelenési formára jellemző, hogy a viszonylagosan kis térfogatarányban jelen lévő sejteket (a chondrocytákat) egy nagy

menyiségű, komplex, porcspecifikus ECM-makromolekulákból álló sejtközi állomány veszi körül. Ez a speciális összetételű matrix három fő molekulacsoportból tevődik össze [7].

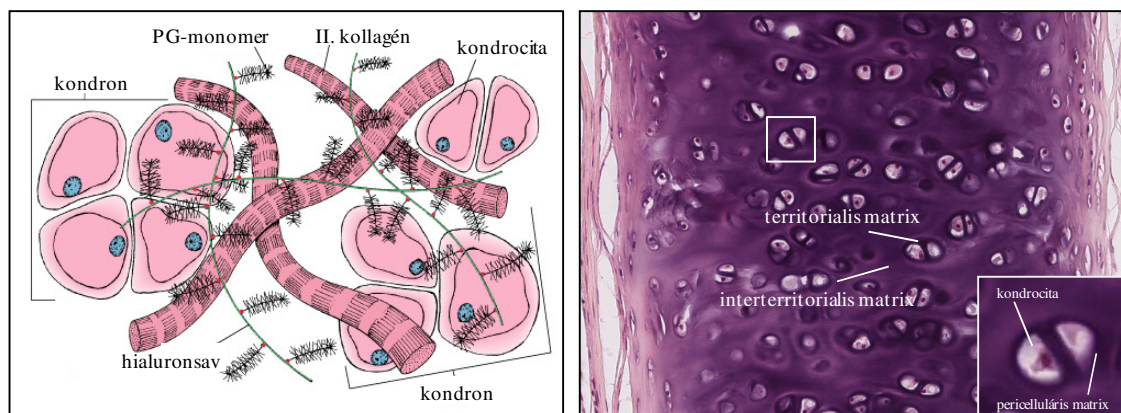
A legfontosabb alkotóelemek a *kollagének*, közülük is elsősorban a II. kollagén, mely a porcmatrix összes kollagénjének mindegy 80%-át teszi ki. Jelentős szerep tulajdonítható azonban a kisebb részarányban jelen lévő kollagéneknek is: a IX. kollagén a többi matrixalkotónak a kollagénhálózathoz való kapcsolásáért felelős, a X. kollagén a kollagénfibrillumok szabályos hálózatba történő szervezésében játszik szerepet, a XI. kollagén a rostok hosszának szabályozását végzi, míg a VI. kollagén a chondrocyták és a matrix közti kapcsolat fenntartásának fontos szereplője.

Egy másik nagyon fontos makromolekula-család, a *proteoglikánok* legjellegzetesebb képviselője az aggregáló porcproteoglikán, az *aggrekán*. A monomerek, melyek egy központi tengelyfehérjéből és az ahhoz kémcsőmosókefe-szerűen csatlakozó kondroitin-szulfát és keratan-szulfát oldalláncokból állnak, egy a porcmatrix egyik alapvető *glükózaminoglikán*jához, a hialuronsavhoz kapcsolódva hatalmas proteoglikán-aggregátumokat hoznak létre. A glükózaminoglikán-oldalláncok nagy negatív töltésfeleslegükkel fogva erőteljes vízkötő-képességgel bírnak. Az aggrekán mellett más, egyéb kötőszövet-féleségben is előforduló kis proteoglikánok (dekorin, biglikán, fibromodulin) is jelen vannak a hialinporc alapállományában, melyek a matrix szerkezetének fenntartásáért felelősek.

A porcmatrix makromolekuláinak harmadik csoportjába a *multiadhezív glikoproteidek* (tenascin, fibronectin, kondronektin) tartoznak, melyek a proteoglikánokat, valamint a porcsejteket kapcsolják a kollagénfibrillumok alkotta vázhoz. Idetartozik az aggrekánt a hialuronsavhoz rögzítő kötőfehérje, a CMP (*cartilage matrix protein*), mai nevén matrilin-1, valamint a COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) is [8].

A kerekded chondrocyták a porcmatrixon belül úgynevezett *lacunák*ban foglalnak helyet, a szomszédos porcsejtek néhány sejtől álló csoportokat, *chondron*okat alkotnak (2.1. ábra). A porcmatrix makromolekuláinak eloszlása nem egyenletes: a porcsejtcsoportokhoz viszonyított helyzetüktől függően eltérő megoszlást mutatnak. A sejteket a *pericellularis matrix* határolja közvetlenül. Mivel a chondrocytákat az itt elhelyezkedő makromolekulák (VI. kollagén, laminin, dekorin, kondronektin és számos szulfatált proteoglikán) kapcsolják a matrixhoz, ezért az ebben a régióban jelen lévő negatív töltésű molekulák igen nagy koncentrációja miatt a pericellularis matrix jellegzetesen erősen bazofil festődésű *porctok*ként jelenik meg a közönséges fénymikroszkópos készítményeken. A pericellularis matrixot

körülvevő *territoralis matrix* a viszonylag nagy koncentrációban jelenlévő proteoglikánok miatt szintén bazofil, de az előzőnél kevésbé erős festődést mutat. Az egyes chondronok közötti térséget, amit *interterritorialis matrix*nek nevezünk, kollagénben gazdagabb, ezért erősebben eozinofil matrixrészletek töltik ki [7].



2.1. ábra. A hyalinporc morfológiai egysége, a chondronok sémás (bal oldali panel) és fénymikroszkópos (jobb oldali panel) felépítése (Ross és Pawlina, 2006 [7] nyomán).

A porcszövet jellegzetes tulajdonsága, hogy matrixállományában – eltérően a többi kötő- és támasztószövet-féleségtől – nem találhatóak erek. Mivel a porc táplálása diffúzióval történik a porcot körülvevő kötőszövet, a perichondrium vagy az ízületi üreget kitöltő synovialis folyadék felől, lassú anyagcseréjű, ún. *braditrof* szövetnek tekinthető (lásd később). E vonatkozásban is nagy szerepet tulajdoníthatunk a matrix erősen szulfatált glükózaminoglikánjaihoz kötötten előforduló *jelentős víztartalom*nak, mely a diffúzió közegét adja.

A növekedés befejeződése után az ízületi és az állandósult porcban található chondrocyták elveszítik osztódóképességüket, és fiziológiás körülmények között gyakorlatilag immortalizált sejtekként foghatók fel. Az érett chondrocyták elektronmikroszkópos ultrastruktúráját a jól fejlett durvafelszínű endoplasmaticus retikulum és a viszonylagosan nagyméretű Golgi-apparátus jellemzi. A matrixkomponensek aktív szintézisében részt nem vevő, nyugalmi fázisú chondrocyták ezzel szemben kevésbé bazofilak, és bennük nagyméretű, glikogént és lipideket tartalmazó zárványok figyelhetők meg [7]. Az állandó porcok sejtei a perichondrium belső rétegében található *chondrogenikus őssejtekből* fiziológiás körülmények között is pótlódhatnak, az ízületi porcsejtek regenerációja azonban a perikondrium hiánya miatt nem lehetséges. Ezért a porckutatás régi, de még ma is

egyik fontos irányvonala a porcregeneráció lehetőségeinek felderítése. Az utóbbi három évtized sejtdifferenciációs vizsgálatainak egyik fontos felismerése, hogy felnőttben pluripotens mesenchymalis őssejtek találhatók többek között a vörös csontvelőben, a zsírszövetben, a perimysiumban és a periosteumban, melyek megfelelő körülmények között akár chondrocytákká is differenciálódhatnak [9]. A chondrogenikus és a pluripotens mesenchymalis őssejtek proliferációja, porcsejt irányba elkötelezett sejté válása, a porcsejt fenotípus elnyerése, végül a porcszövet kialakítása egyaránt függenek genomiális tényezőktől, transzkripciós faktoroktól, a plazmamembrán- és sejtmagi receptorok mintázatától és azok intra- és extracelluláris ligandjaitól, valamint különböző lokális mikrokörnyezeti tényezők (autokrin és parakrin faktorok, ECM- és sejtdhéziós molekulák) alakulásától [5]. Nem szabad elhanyagolnunk azokat a biomechanikai hatásokat sem, amelyek a fejlődés során érik a porcszövetet, s amelyek elsősorban a sejt–matrix kölcsönhatás befolyásolásán keresztül fejtik ki hatásukat [10]. A differenciáció kezdeti szakaszában a porcsejt-fenotípus még labilis: ha a fiatal sejt elveszíti a megfelelő matrixszubsztrátot és/vagy a fenotípus megőrzéséhez szükséges mikrokörnyezetet, hamar dedifferenciálódik [11,12]. A porcsejtek differenciációját így módon tehát számos, különböző forrásból származó faktor szabályozza.

2.2. A porcdifferenciáció tanulmányozására szolgáló modellek

Mivel a porcszövet a fentiek alapján meglehetősen gazdag feladatkörrel bír az emberi test fejlődése és egészséges működése szempontjából egyaránt, nem meglepő, hogy igen sok olyan rendellenességet ismerünk, melyek valamilyen módon kapcsolatba hozhatók a porcszövet kóros fejlődésével, illetve működésével [5]. Éppen ezért nagyon fontos, hogy minél alaposabban megismerjük azokat a meglehetősen bonyolult jelátviteli folyamatokat, amelyek a porcszövet kialakulásában és működésében játszanak szerepet. A porcszövet differenciálódása azonban a korai embrionális életben zajlik, és ezért *in vivo* nehezen tanulmányozható. A porcdifferenciációt vizsgálni kívánó kutatócsoportok ezért számos *in vitro* modellt fejlesztettek ki és írtak le az elmúlt évtizedek során.

Az egyik legáltalánosabban elterjedt *in vitro* porcdifferenciációs modell a Hamburger és Hamilton szerinti 22–24-es fejlődési stádiumban [13] lévő csirkeembriók mellső és hátsó végtagtelepeiből izolált, elsősorban chondroprogenitor mesenchymalis sejtekből álló primer, nagy sejtsűrűségű, ún. high density (HD) sejtenyészet [14,15]. Az így előállított sejt kultúrák összetételüket tekintve nem homogének: a mesenchymalis sejtpopuláción kívül viszonylag

nagy számban tartalmaznak fibroblastokat – melyek a kultúrák kitapadását biztosítják –, valamint kevés myoblastot és hámsejtet is. Ez utóbbiak azonban az alkalmazott tenyésztési körülmények között (lásd alább) nem fejlődnek tovább, és a mesenchymalis sejtpopuláció túlnövi őket. A csirkeembriók végtagtelepein alapuló modellnek létezik egy rágsálókra kifejlesztett analógja is [16], melynek azonban megkérdőjelezhetetlen hátránya az előbbivel szemben az anyaállatok szükségszerű feláldozása a megfelelő fejlettségű embriók eltávolítása során. Az elmúlt évek során néhány, rágsálókból származó multipotens mesenchymalis sejtvonalat is kialakítottak (C3H10T1/2 eger, RCJ 3.1 patkány sejtvonal), melyek a mikrokörnyezeti paraméterek változtatásával és egyes anyagoknak a médiumhoz való adásával nem csupán porcsejteké, hanem vázizom-, csont- vagy zsírsejteké is differenciálódhatnak [17-19].

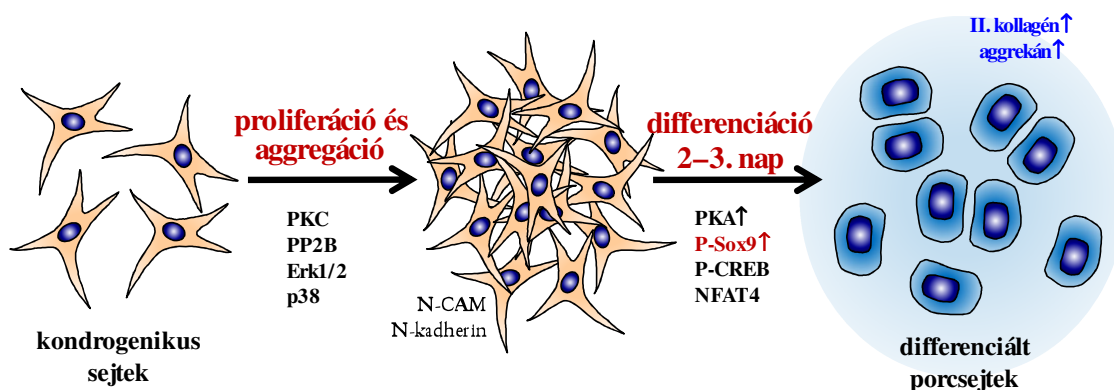
A primer HD-kultúrák a differenciáció eltérő fázisaiban lévő sejtek elegyeként foghatók fel, amelyeket mesterséges, általában műanyag vagy üvegfelszínen növesztünk. A módszer előnye, hogy a chondrogenikus mesenchymalis sejtek mindenféle külső faktor hozzáadása nélkül, pusztán a megfelelő differenciáltsági fokuk és a nagy kezdeti sejtsűrűség következtében hajtják végre differenciálódási programjukat, és a kísérletek befejezését jelentő 6. nap végére spontán porcsejteké alakulnak. Minthogy egyelőre nem ismerünk olyan sejtfelszíni markereket, amelyek a porcsejtekre kizárólagosan jellemzőek volnának, a differenciáció folyamatát a porcspecifikus matrixmolekulák, valamint az azok átírásáért felelős transzkripciós faktorok (lásd később) expressziójának monitorozásával követhetjük nyomon. Ennél jóval egyszerűbb és igen hatékony eljárás, ha alacsony pH-n metakromáziás festékkel (pl. dimetilmetilénkékkel) festjük meg a preparátumainkat. Ily módon ugyanis a porcmatrixban nagy mennyiségben jelenlévő, erősen polianionos karakterű szulfatált glükózaminoglikánok és proteoglikánok kimutatására nyílik lehetőség. A porcmatrix szulfatált molekuláihoz kötődő festékmolekulák alacsony pH-n történő visszaoldásával, és a minták optikai denzitásának meghatározásával a keletkezett porcmatrix relatív mennyiségére is következtethetünk.

A biológiai folyamatok modellezésére szolgáló kísérleti rendszerek *per se* nem vesznek, és nem is vehetnek figyelembe minden, az élőben természetesen jelen lévő faktort. Nincs ez másként a porcdifferenciálódás *in vitro* modellezésére szolgáló HD-kultúrák esetében sem. Noha az *in vivo* és *in vitro* zajló porcdifferenciáció alapvetően hasonlóan megy végbe, köztük fundamentális különbségek is megfigyelhetők. A fejlődő embrió testében térben és időben szigorúan meghatározott sorrendben más-más formájú és elhelyezkedésű

porcszigetek képződése zajlik, míg az *in vitro* sejt kultúrákban megközelítőleg homogén eloszlású, és a meglehetősen nagyfokú strukturáltságot mutató ízületi porccal szemben amorf szerkezetű porcszövet alakul ki. Ezt a tényt nem szabad figyelmen kívül hagynunk, amikor a modell segítségével szerzett eredményeinket az élőben lejátszódó folyamatokra próbáljuk alkalmazni. Amennyiben a HD-sejt kultúrák sajátosságaiból fakadó korlátokat szem előtt tartjuk a kísérleti eredmények értékelésénél, ez a könnyen reprodukálható kísérleti modell számos információval szolgálhat a porcdifferenciáció egyes lépéseinek szabályozásáról és exogén tényezőkkel való befolyásolhatóságáról. A chondroprogenitor mesenchymalis sejtekből létrehozott primer HD-kultúrák széles körű elfogadottságát, és felhasználhatóságának sokrétűségét számos, az elmúlt években megjelent közlemény támasztja alá [15,20-24].

2.3. A porcdifferenciáció lépései

Az egyedfejlődés korai szakaszában a chondrogenikus mesenchymalis sejtek (legyenek azok akár a crista neuralis, akár a paraxialis vagy az oldallemez-mesoderma származékai) egy bonyolult, többlépéses folyamat végeredményeképpen differenciálódnak porcsejteké (2.2. ábra) [9]. A chondrogenézis fontos kezdeti lépéseként a chondrogenikus sejtek kisebb sejtaggregátumokba (ún. *nodulus*okba) csoportosulnak. A kondenzálódás ezen korai szakasza még nem jár a sejthalak megváltozásával, ezért az aggregálódott sejtek morfológiailag megkülönböztethetetlenek a többi mesenchymalis sejtől. A kísérleti modellként alkalmazott HD-kultúrákban a chondrogenikus sejtek kondenzációja az első, a *nodulus*ok sejteinek porcsejteké való differenciálódása dominánsan a második és harmadik tenyésztési napon zajlik [14]. A kondenzálódás kezdeti lépéseihez a chondrogenikus sejtek felszínén megjelenő, sejt–sejt kapcsolatok kialakításáért felelős molekulák (N-CAM és N-cadherin) expressziója szükséges [12,25]. Erre a fejlődési stádiumra jellemző a szomszédos sejtek közötti számos gap junction megjelenése is [26], ami a sejtek közötti kommunikációs mechanizmusok jelentőségére utal. A *nodulus*okba aggregálódott prekursorsejtek közötti kapcsolatok kialakulását követően a sejtek cytoskeletonja is átalakul, és az addigi nyúlványos, fibroblast-szerű sejthalak kerekké válik [27].



2.2. ábra. A HD-kultúrákban a 6 napos tenyésztési periódus alatt a kondrogenikus sejtek bonyolult, soklépéses folyamat eredményeképpen differenciálódnak porcsejteké, melyek speciális összetételű matrixot termelnek.

A chondrogenezist igen nagyszámú faktor irányítja; mind közül mégis a nodulusok kialakulása bír a legnagyobb jelentőséggel a mezenchimasejtek porcra való elköteleződésének szabályozásában [5]. Az ennek során létrejövő sejt–sejt és sejt–matrix kapcsolatok következtében aktiválódik az a cytoplasmaticus apparátus, mely végső soron az érett fenotípus kialakításáért felelős. A differenciálódást meghatározó citokinek és növekedési faktorok az így aktiválódó protein-kinázokon és foszfatázokon (lásd később) keresztül fejtik ki hatásukat. A citokinek – többek között a TGF- β családba tartozó bone morphogenetic proteinek (BMP) és a fibroblast növekedési faktorok (FGF) – a differenciáció több fázisában is befolyásolják a porcképződést [28-30]. E fehérjetermészetű anyagok mellett szteránvázas vegyületeknek (retinoidok, D-vitamin) a porcdifferenciáció szabályozásában betöltött szerepéről is ismerünk adatokat [31,32].

A fent részletezett változások mellett a differenciálódó sejteket körülvevő ECM is jelentős módosuláson megy keresztül. A sejtkondenzáció előtt és annak során a chondrogenikus sejtek nagy mennyiségű fibronectint választanak ki az ECM-ba, miközben felszínükön fibronectint kötő integrineket (elsősorban $\alpha 5\beta 1$) expresszálnak. A sejtaggregátumok kialakulását követően mind a fibronectin termelése, mind az integrinek expressziója erősen csökken, a fibronectinben gazdag matrix ugyanis a továbbiakban erősen gátolja a porcképződést [33]. A korai porctelepekben átmenetileg a tenascin-C is megjelenik [34], amely fibronectinkötő régiója révén valószínűleg meggátolja a sejtek adhézióját a pericelluláris fibronectinhez. A végtagbimbók mesenchymájában viszonylag nagy koncentrációban jelen lévő hialuronsav gátolja a sejtek chondrogenikus differenciálódását, azonban a kondenzálódás kezdeti lépései során termelése erőteljesen visszaesik, sőt a sejtek

aktívan, receptor-mediált endocitózissal és ezt követő intracelluláris emésztéssel távolítják el a matrixból [21]. A mesenchymalis sejtek osztódását elősegítő I. típusú kollagén koncentrációja is a nodulusok kialakulása előtt a legmagasabb, majd a differenciálódás időpontjában fokozatosan csökken [35]. A továbbiakban a sejtek megkezdik a porcspecifikus ECM makromolekulák szintézisét, valamint a megkötésükhöz szükséges receptorok expresszióját. A valódi, érett porcszövetre jellemző ECM a harmadik tenyésztési nap második felétől van jelen metakromáziás festéssel detektálható mennyiségben a HD-kultúrákban. Ez az egyedi összetételű porcmatrix nagy fontossággal bír a fiatal chondrocyták labilis fenotípusának kialakításában és fenntartásában [11].

2.3.1. A porcdifferenciáció intracelluláris szabályozása

Az extracelluláris tényezők mellett természetesen számos intracelluláris faktor irányítja a chondrogenézist. A szintén mesenchymalis prekursorokból fejlődő myoblastokhoz, adipocytákhoz vagy osteoblastokhoz hasonlóan a chondroblastok esetében is sejt-specifikus *transzkripciós faktorok* felelősek a differenciáció lépéseinek szabályozásáért. A chondrogenézis „mestergénjének” tekinthető *sox9* egy HMG (high mobility group)-box típusú DNS-kötő régióval rendelkező, az embrionális fejlődés egyik kulcsfontosságú csoportjához, a Sox-fehérjékhez tartozó transzkripciós faktort kódol [36]. A porcspecifikus Sox9 mellett a Sox-fehérjecsaládba tartozó Sox5 és Sox6 is részt vesz a chondrocyták differenciálódásának szabályozásában [37]. A Sox9 – egyéb szövetekben kimutatható alacsony szintű jelenlétén kívül – csak a chondroprogenitor sejtekben és a chondroblastokban (valamint az értekezés tárgyától messze álló herében) mutat magas expressziós szintet, és – mint a BMP-út vonal közvetlen céljának [38] – kifejeződése minden esetben egybeesik a II. kollagén expressziójával. Egereken végzett génkiütéses vizsgálatokban sikerült igazolni, hogy a Sox9 a chondrocyta-specifikus enhancerek megfelelő DNS-szekvencia motívumaihoz kötődve valóban serkenti a II., a IX. és a XI. kollagént (*Col2a1*, *Col9a2* és *Col11a2*), valamint az aggregán tengelyfehérjét kódoló gének átírását [36].

Mivel a Sox9 a chondroprogenitor mesenchymalis sejtek differenciálódásának esszenciális komponense, nem meglepő, hogy expresszióját és aktivitását számos intracelluláris molekula befolyásolja. Az egyik ilyen, az eukarióta sejtek működésének szinte valamennyi folyamatában – így a génexpresszió szabályozásában is – megtalálható folyamat a reverzibilis fehérjefoszforiláció [39], melynek során a foszforilációért felelős protein-kinázok,

valamint a foszfátcsoporthoz lehasítását katalizáló foszfoprotein-foszfatazok játsszák a legfontosabb szerepet. Az így szabályozható fehérjék nagy része (több mint 90%-a) Ser és Thr, kisebb hányada pedig Tyr aminosav-oldalláncokon foszforilálódhat. A fehérjék működésének ily módon történő szabályozását annak számtalan előnye – gyorsasága, a folyamat visszafordíthatósága és a szubsztrátum (foszfátcsoporthoz) szinte korlátlan mennyiségű előfordulása – teszi a kovalens módosítások legelterjedtebb formájává.

A chondrogenikus sejtekben a Ser/Thr-specifikus protein-kinázok közé tartozó *cAMP*-függő protein-kináz A (PKA) az egyik olyan enzim, amely bizonyítottan foszforilálja a Sox9-et, ezzel aktiválva a porcspecifikus ECM fő tömegét adó II. kollagén és az aggregátum tengelyfehérjéjének a génjeit. A foszforiláció nem feltétlenül szükséges a Sox9 transzkripciót aktiváló hatásának létrejöttéhez, de jelentősen fokozza azt [36]. A porcdifferenciáció során a PKA *cAMP* és BMP-2 hatására egyaránt aktiválódik [40]. A Sox9 transzkripció faktor foszforilálásáért felelős *cAMP*-út vonal egyik potenciális aktiváló molekulája a parathormonszerű fehérje (parathormon-related peptide; PTHrP) [36]. A PKA egy másik lehetséges célmolekulája a CREB (*cAMP* Response Element Binding Protein), melynek foszforilációja a chondrogenikus sejtekben mind *cAMP*, mind BMP-2 hatására kimutathatóan megemelkedik [40]. Az is ismert, hogy a Sox9 a CBP (CREB-binding protein, p300) fehérjét koaktivátorként megkötve fejti ki transzkripciót aktiváló hatását [41].

Bár nem a Sox9 foszforilálásán keresztül, de a többek között a később részletezendő intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció által szabályozott, több mint 10 izoformát magába foglaló protein-kináz C (PKC)-izoenzimes család [42] is a porcképződés pozitív regulátorainak tekinthető [43]. Ezt a Ser/Thr-specifikus protein-kináz enzimes családot szerkezeti felépítésük és aktiválódásuk mechanizmusa alapján három fő csoportra: a klasszikus PKC-izoenzimek (PKC α , β_1/β_2 és γ), az új típusú PKC-izoenzimek (PKC δ , ϵ , η és θ) és az atípusos PKC-izoenzimek (PKC ζ és ι/λ) csoportjára oszthatjuk. A klasszikus PKC-izoenzimek valódi Ca^{2+} -szenzitív kinázok: aktiválódásukhoz – a Ca^{2+} -ionokon kívül – foszfatidil-szerin és diacil-glicerol szükséges. Az új típusú PKC-k aktiválódásához csak diacil-glicerol és foszfatidil-szerin szükséges, míg az atípusos PKC-k teljesen más mechanizmussal (elsősorban foszforiláció útján) válnak katalitikusan aktívvá. Külön kell megemlíteni a mind felépítését, mind aktiválódásának mechanizmusát tekintve egyik csoportba sem sorolható PKC μ -izoenzimet. Munkacsoportunk volt az első, aki a PKC μ jelenlétét, és a sejtek differenciációs állapotától függő expressziós szintjét leírta a porcosodó mesenchymalis kultúrákban [44].

Egyes adatok arra utalnak, hogy – bár más rendszerekben, de – a PKC-út vonal a CREB transzkripciós faktor aktiválásához vezethet [45]. Arra nézve azonban egyelőre nincsenek adatok, hogy a porcdifferenciáció során a PKC közvetlenül foszforilálja-e a Sox9-et vagy a CREB-et. Fontos szem előtt tartanunk, hogy a PKA és PKC aktivitását jelentős mértékben befolyásolja maguknak az enzimeknek a foszforiláltsági állapota is [46].

A jelátviteli kutatások kezdetben érdekes módon elsősorban a protein-kinázok funkciójára és működésére irányultak, az ugyanolyan fontos szerepet betöltő *foszfoprotein-foszfátázok* irodalma azonban meglehetősen szegényes. Munkacsoportunk korábbi közleményeiben [44,47] a *protein-foszfátáz 2A (PP2A)* porcdifferenciáció szabályozásában betöltött negatív szerepéről számolt be: az enzim gátlása a CREB foszforiláltsági szintjének emelésén keresztül fokozza a porcdifferenciációt. Egy másik protein-foszfátáz, a *protein-foszfátáz 2B (PP2B)* vagy másnéven *kalcineurin* chondrogenézisben betöltött szerepét is csak nemrégiben írták le [48]. Ez a szinte valamennyi szövetben jelen lévő foszfo-Ser/Thr-specifikus, heterotetramer szerkezetű protein-foszfátáz két alegységből: a katalitikus (kalcineurin-A) és a szabályozó (kalcineurin-B) alegységből áll; az ez utóbbin elhelyezkedő Ca^{2+} -kalmodulin-kötőhely teszi lehetővé, hogy az enzimet legfőbbképpen az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásai szabályozzák [49]. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció a kalcineurin aktivitását fokozza, s ez a chondrogenézis egyik fontos, az eddigiekben nem említett transzkripciós faktorának, az NFAT4-nek (*nuclear factor of activated T lymphocytes*) a defoszforilációjához, s így aktivációjához vezet [48]. Az NFAT-k családjába valójában ötféle transzkripciós faktor tartozik (NFAT1–5), melyek immunsejtektől különböző sejtekben, szövetekben betöltött szerepéről – túl azon, hogy egyes citokinek (pl. BMP-k) és sejtfelszíni receptorok (pl. FasL) átírásában vesznek részt – egyelőre nem sok információval rendelkezünk. Nyugvó sejtekben az NFAT-fehérjék állandóan foszforilált állapotban vannak, és a citoplazmában lokalizálódnak. Egyik legfontosabb regulátoruk, a kalcineurin által katalizált defoszforilálásuknak hatására az addig rejtett sejtmagi lokalizációs szignál exponálódik a fehérje felszínén, ami az NFAT-fehérjék sejtmagi transzlokációját eredményezi [50]. Chondrogenikus mesenchymalis sejtekben az NFAT4 aktivációja fokozott BMP2-termeléshez, és így a differenciálódás elősegítéséhez vezet. Ennek megfelelően a kalcineurin gátlása farmakológiai inhibitorokkal, ciklosporin-A-val (CsA) vagy FK506-tal (tacrolimus) a porcképződés csökkenésével jár [22].

2.3.2. A MAP-kináz kaszkád és szerepe a porcdifferenciáció szabályozásában

A protein-kináz C-izoenzimek közül elsősorban a klasszikus PKC-k közé tartozó PKC α -t érdemes kiemelni, amely az N-cadherin, a fibronectin és az azt kötő $\alpha 5\beta 1$ -integrin expressziójának fokozását a *MAPK* (mitogén-aktivált protein-kináz)-kaszkád modulálásán keresztül éri el [51]. A MAP-kinázok molekuláris szintű jelátalakítókként és kapcsolókként foghatók fel, melyek a sejten kívüli tér felől ható változatos ingereket specifikus sejtválaszokká alakítják, és a jelek kombinációjától, valamint a sejt belső állapotától függően a sejt sorsát illető kérdéseken: osztódás vagy differenciálódás, öngyilkosság (apoptózis) vagy túlélés között hoznak döntéseket. Mindezeket túl a génexpresszió szabályozását és az extracelluláris környezethez való alkalmazkodást is MAP-kinázok irányítják [52]. Az eukarióta sejtekben leírt három, egymástól független MAPK-út vonal – az *ERK1/2* (extracellular signal-regulated kinase), a *JNK* (Jun N-terminal kinase) és a *p38* – közös tulajdonsága, hogy a résztvevő enzimek kaszkádszerűen aktiválódnak, és a láncreakció végén álló MAP-kinázok aktiválásához Tyr és Ser/Thr-foszforiláció egyaránt szükséges. E kettős foszforilációt a MAPK-specifikus MAPK-kinázok katalizálják. A kaszkád célfehérjéi között számos transzkripciós faktort és újabb kinázokat találunk. Maguk a MAPK-ok Ser/Thr-specifikusak, azaz szubsztrátjaikat ezen aminosavmaradékokon foszforilálják [53].

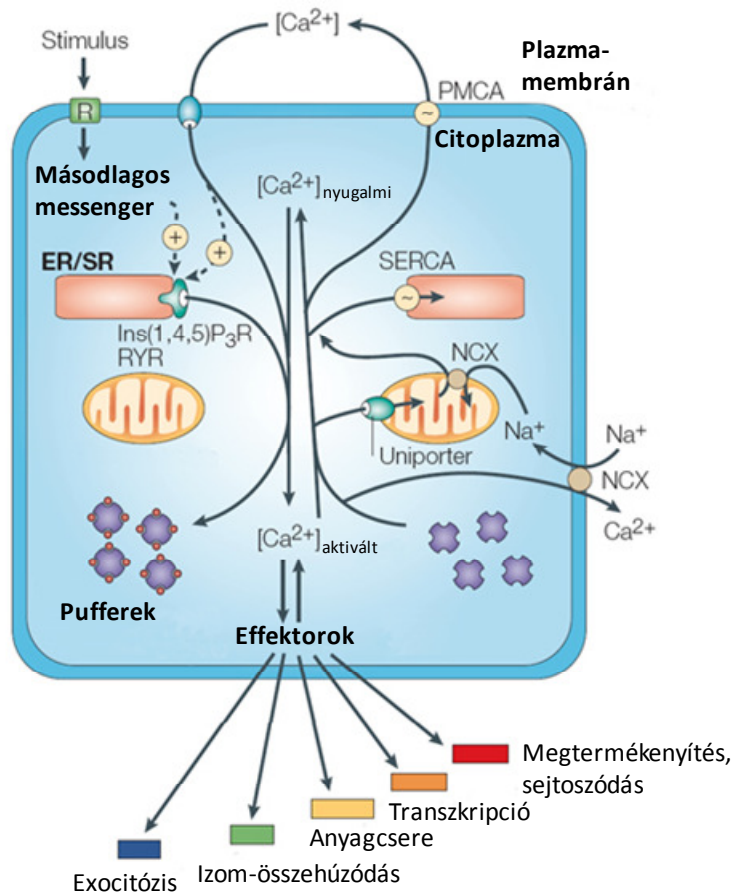
Míg a JNK- és a p38-MAPK-út vonalakat elsősorban az extracelluláris hatások (UV-sugárzás, gyulladásos citokinek) stimulálják, az ERK-út vonal számos sejt típus differenciációjának fontos eleme. A chondrogenézisben a JNK-út vonal nem játszik szerepet, a másik kettő viszont – igaz, egymással ellentétes módon – bizonyíthatóan fontos szabályozó tényezője a porcdifferenciálásnak, melynek során a p38 foszforilációja fokozódik, az ERK-foszforiláció pedig csökken. Ezzel teljes összhangban van az a megfigyelés, hogy a p38-út vonal gátlása a porcképződés csökkenését, míg az ERK-út vonal gátlása a porcdifferenciáció fokozódását idézi elő [54]. Mindkét MAPK elsősorban a differenciálódás kezdeti lépései során fejt ki pozitív vagy negatív hatását, és számos extracelluláris szignál (TGF- β család tagjai, EGF, FGF, retinsav) jeleit továbbítja.

Mint már említettem, a PKC-út vonal a MAPK-kaszkádon keresztül fejt ki a porcképződésre gyakorolt pozitív hatásait; a PKC-izoenzimek (elsősorban a klasszikus PKC) aktivitását pedig az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásai befolyásolják. Hasonló mechanizmusok szabályozzák a chondrogenézis másik pozitív regulátorát, a kalcineurint is.

2.4. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szerepe a sejtek életfolyamatainak szabályozásában

A *kalcium* – az oxigén, a szén, a hidrogén és a nitrogén után – testünk ötödik leggyakoribb kémiai eleme: egy átlagos felnőtt ember mintegy 1 kg kalciumot tartalmaz, aminek döntő többsége (99%-a) a csontokban és a fogakban található, és csak a fennmaradó alig 1% vesz részt az életfolyamatok rendkívül sokrétű szabályozásában [55]. Az extracelluláris térhez képest, ahol 10^{-3} M koncentrációban van jelen, a citoplazmában nagyságrendekkel alacsonyabb ($\sim 10^{-7}$ M) a kalciumion koncentrációja. Hasonló, szintén a citoplazma irányába mutató gradiens áll fenn a belső kalciumraktárként is működő endoplasmaticus retikulum és a cytosol között. Megfelelő stimulusok hatására a nagy elektrokémiai gradiens terhére a membránokban (értve ez alatt mind a plazmamembránt, mind pedig az endoplasmaticus retikulum membránját) elhelyezkedő kalciumcsatornákon (lásd később) keresztül Ca -ionok áramlanak a cytosolba. A megemelkedett cytosol Ca^{2+} -koncentráció a továbbiakban részletezett mechanizmusok segítségével kialakítja a sejtválaszt. A választ a bazális Ca^{2+} -koncentrációra történő visszatérés állítja le, melynek során a Ca^{2+} aktív pumpamechanizmusok segítségével az extracelluláris térbe vagy az endoplasmaticus retikulumba kerül (2.3. ábra).

A Ca^{2+} ily módon másodlagos jelátviteli faktorként (másodlagos „messengerként”) működik, és minden sejt (és így a szervezet) szinte valamennyi életműködésében alapvető jelentőséggel bír: az elsőként megfigyelt, a vázizomsejtek elektromechanikai kapcsolásában betöltött szerepén túl az exocitózisnak, a neurotranszmitterek felszabadításának, a hormonális hatásokra adott sejtválasz kialakításának, enzimreakciók szabályozásának, a génexpressziós folyamatok irányításának, a sejtciklus szabályozásának, az apoptózis beindításának, a differenciálódásnak és a synapticus plaszticitásnak egyaránt kulcsfontosságú regulátora. A többi, az evolúció során később kialakult



2.3. ábra. A cytosol kalciumkoncentrációja rendkívül precízen szabályozott paraméter, amit számos, sejttípustól függő kombinációban jelen lévő csatorna- és pumpafehérje befolyásol (Berridge és mtsai., 2003 [56] nyomán).

Ins(1,4,5)P₃R: inozitol(1,4,5)-triszfoszfát-receptor

másodlagos messengerekkel (pl. cAMP) szemben nagy előnye, hogy a Ca²⁺ – túl azon, hogy mivel nem molekula, nem igényel szintézist és az ahhoz szükséges enzim(rendszer)eket – a sejten kívüli térségben gyakorlatilag korlátlan mennyiségben van jelen. A fentebb említett nagy (mintegy 10⁴ ×) elektrokémiai gradiens miatt pedig szintje a cytosolban femtoszekundumok alatt több nagyságrenddel is megemelhető egyszerű, membrán-lokalizált csatornák segítségével. A kalciumalapú jelátviteli mechanizmusok további előnyös tulajdonsága, hogy nemcsak időben (az exocitózis például mikroszekundumok alatt lejátszódó folyamat, míg a gének transzkripció szintű szabályozása esetleg csak órák múlva nyilvánul meg), hanem térben is precízen szabályozható: a cytosolban jelen lévő számos nagy affinitású Ca²⁺-kötőhely következtében ugyanis, melyek gyorsan megkötik és gátolják diffúzióját, a Ca²⁺-szint sok esetben csak lokálisan emelkedik meg, ami különösen idegsejteknel, a synapticus plaszticitás kialakításánál kap nagy jelentőséget. Más sejttípusoknál (pl. sima- és

vázizom) az egész citoplazma kalciumszintjének megemelkedése szükséges az összehúzóódáshoz.

Hogyan lehetséges, hogy egy egyszerű ion, mint a Ca^{2+} , a sejtélettani folyamatok ilyen széles spektrumának központi szereplőjévé vált? Mivel maga a kalciumion minden sejtben megtalálható, és mégis sejtípustól függő sejtválaszokat tud kialakítani, a választ azokban a célfehérjékben kell keresnünk, amelyeken keresztül a Ca^{2+} kifejti hatását. Valamennyi, a Ca^{2+} -homeosztázisban bármilyen szerepet játszó fehérje egy globális „eszköztár” (Ca^{2+} -signalling toolkit) tagjaként is felfogható, és minden sejtípus a számára megfelelő fehérjét „válogatja ki” és expresszálja ebből a készletből, melynek komponensei gyakorlatilag mindenféle megkötés nélkül, szabadon variálhatóak [56]: így a sejt működése szempontjából legalkalmasabb Ca^{2+} -csatornafehérjék helyezkednek el a külső és/vagy a belső membránokban; ugyancsak a legmegfelelőbb aktív pumpamechanizmusok működnek a Ca^{2+} kipumpálására; és nem más a helyzet azokkal a fehérjékkel kapcsolatban sem, amelyek az intracelluláris Ca^{2+} -szenzitív jelátviteli útvonalakat alakítják ki. Az eszköztár tagjai közé – a teljesség igénye nélkül – sejtfelszíni receptorok (pl. metabotróp muszkarinerg acetilkolin-receptorok, Tyr-kináz aktivitással bíró vérlemezke-eredetű növekedési faktor-receptor [PDGFR]), G-fehérjék, feszültség- és ligandvezérelt Ca^{2+} -csatornák, az endoplasmaticus retikulum receptorai (inozitol-1,4,5-triszfoszfát-receptor [IP_3R], rianodinreceptor [RyR]), chaperonok (kalszekvesztrin, kalretikulin), Ca^{2+} -pumpák és effektorok (kalmodulin, miozin könnyűlánc-kináz, klasszikus PKC-izoenzimek, NFAT és CREB transzkripció faktorok) tartoznak [56].

2.4.1. A cytosol szabad Ca^{2+} extra- és intracelluláris forrásai

A cytosol Ca^{2+} -tartalma mind sejtben kívüli forrásokból, mind pedig a plazmamembránon belül elhelyezkedő kalciumraktárakból származhat. A plazmamembránban elhelyezkedő csatornákat négy nagyobb csoportba sorolhatjuk. Az excitábilis sejtek Ca^{2+} -csatornáiról tudjuk a legtöbbet, tekintettel arra, hogy az érdeklődés középpontjában álló idegsejtek és a harántcsíkolt izomrostok egyaránt ebbe a kategóriába sorolhatók. Ezek a sejtek a *feszültségvezérelt kalciumcsatornák* (voltage-operated calcium channel, VOCC) számos típusát (elsősorban a T- és L-típusokat) expresszálják, melyek legnagyobb előnye gyorsaságukban rejlik. A feszültségvezérelt csatornák mellett a *ligand- vagy receptorvezérelt kalciumcsatornák* (receptor-operated calcium channel, ROCC) is fontos

szereplői a sejtek Ca-eszköztárának. Ezek közül például az elsőként idegsejtek felszínén leírt, de később más, nem excitábilis sejteken (köztük chondrocytákon) is megtalált NMDA-receptorok (N-metil-D-aszpartát) említhetők [57], de idetartoznak az extracelluláris nukleotidok (elsősorban az ATP) receptoraiként működő ionotrop P2X-purinoreceptorok is [58]. A külső térben lévő Ca-ionok beáramlásáért felelős csatornák harmadik csoportját a *másodlagos messengerek szabályozta Ca²⁺-csatornák* (second messenger-operated channel, SMOC) alkotják, melyek egyik tagja az arachidonsav által szabályozott Ca²⁺-csatorna (arachidonate-regulated Ca²⁺ channel, ARC) [59]. Ennek az egyelőre kevésbé karakterizált csatornaféleségnek a különleges jelentőségét az adja, hogy nem excitábilis sejtek Ca²⁺-beáramlásában játszik szerepet. Végül az intracelluláris raktárak kiürülésekor aktiválódó, *raktárak által vezérelt csatornákat* (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels, CRAC) kell megemlíteni, melyek az ilyenkor megfigyelhető Ca²⁺-beáramlásért (store-operated Ca²⁺ entry, SOCE) felelősek [59]. Ezeket a nem excitábilis sejteken leírt csatornákat egyelőre nem sikerült azonosítani, de egyes feltételezések szerint az ún. *transziens receptor-potenciál csatornák* (TRP) közé tartozhatnak. Ez utóbbiaknak egyébként három nagy csoportját különbözteti meg az irodalom: a hagyományos TRPC-család, a vanilloidreceptorok (TRPV) és a melastatin-receptorok (TRPM) családja [60].

Ca-ionok nemcsak az extracelluláris közegből áramolhatnak be a citoplazmába, hanem megfelelő csatornafehérjéken át a *belső raktárakból* is felszabadulhatnak. A belső raktárak a sejtek döntő többségében az endoplasmaticus retikulum (ER; izomsejtekben sarcoplasmaticus retikulum, SR) ciszternáiból állnak. A külső közegből történő Ca²⁺-beáramlással ellentétben a belső raktárak kétféle csatornán keresztül képesek kiengedni a raktározott kalciumot. Az egyik ilyen a meglehetősen kiterjedt irodalommal rendelkező *inotizol-1,4,5-triszfoszfát-receptorok* (IP₃R) családja. Három csoportba oszthatók: az IP₃R-1, IP₃R-2 és IP₃R-3 eltérő szöveti eloszlást és expressziós mintázatot követnek. A hatalmas (több mint 1 MDa tömegű), négy alegységből (melyek egyenként mintegy 2700 aminosav hosszúságúak) felépülő Ca²⁺-csatornák ligandjaik, a Ca²⁺, és a foszfolipáz-C (PLC) útvonal aktivizálódásának eredményeképpen felszabaduló IP₃ megkötésére nyílnak, és az ER lumenében raktározott kalciumionokat engedik ki a cytosolba [61]. Az, hogy a Ca²⁺ egyben a receptor ligandjaként is működik, arra utal, hogy a kalcium felszabadulása (részben) öngerjesztő folyamat (calcium-induced calcium-release, CICR), legalábbis amíg a kalciumkoncentráció viszonylag alacsony. Magasabb koncentráció elérése esetén a Ca²⁺ gátolja további kalciumionok felszabadulását. A receptort más jelátviteli útvonalak – így a Ca²⁺/kalmodulin-dependens kináz II (CaMKII), a

PKA, a PKC, a cGMP-dependens protein-kináz G (PKG), valamint a protein-foszfatáz 1 és 2A (PP1 és PP2A) – is képesek szabályozni [56].

A másik, szintén a belső raktárak membránjában lokalizálódó csatornaféleség a *ryanodinreceptor* (RyR). Nevét a rianodin nevű alkaloidához való erős affinitása után kapta. Emlősökben 3 izoformáját azonosították: a RyR1 elsősorban harántcsíkolt izomban, a RyR2 a szívben és az agyban expresszálódik, míg a RyR3 kifejeződése nem mutat kifejezett szövetspecifitást [62]. A RyR az IP₃R-nál még nagyobb, 2,2 MDa tömegű homotetramer komplexum, és ahhoz hasonlóan alacsony Ca²⁺-koncentráció esetén mutat aktivitást, magas (mM-os nagyságrendű) Ca²⁺-koncentráció már gátolja működését. Talán nem véletlen, hogy elsősorban a szív- és vázizomban előforduló izoformának a legnagyobb az irodalma. Ezekről azt is tudjuk, hogy működésüket foszforiláció (PKA) és defoszforiláció (PP1 és PP2A) is szabályozza [56].

2.4.2. Intracelluláris kalciumkötő fehérjék

Bármelyik forrásból származzék is a cytosolban megjelenő Ca²⁺, csak töredéke marad valóban szabadon, döntő többsége az ott elhelyezkedő kalciumpufferek vagy -effektorok valamelyikének nagy affinitású kalcium-kötőhelyéhez kapcsolódik. Ezek közül a fehérjék közül már több mint 200-at ismerünk [56]. E pufferek alapvető fontosságát nem lehet eléggé hangsúlyozni: segítségükkel a kalciumjel precíz térbeli és időbeli finomhangolása érhető el, és a Ca²⁺-tranziensek amplitúdója és frekvenciája széles határok között szabályozható. A citoplazmatikus Ca²⁺-pufferek közül a kalbindin, a kalretinin és a parvalbumin említhető, míg a legfontosabb ER/SR-pufferek tagjai között a kalnexin, a kalretikulin és a kalszekvesztrin érdemel említést. A fentebb már említett Ca²⁺-érzékeny jelátviteli útvonalakban pedig egyértelműen *kalmodulin* a legfontosabb kalciumeffektor.

2.4.3. A kalciumjel leállítása és a cytosol Ca²⁺ eltávolítása

Minden másodlagos messengerre igaz, hogy feladatuk betöltése – vagyis a biológiai jel, a sejtválasz beindítása – után már nincs rájuk szükség, és a sejtek igyekeznek hamar visszaállítani a nyugalmi állapotra jellemző eloszlást. Fokozottan igaz ez a Ca²⁺-ra, mert jelenléte egyrészt állandó jelgenerálásra készítené a szignalizációs apparátust, másrészt magas cytosolicus koncentrációja kifejezetten toxikus a sejtekre nézve, oldhatatlan foszfátsóinak

kicsapódása következtében. A sejtek az extracelluláris tér, illetve a belső raktárak irányába próbálják eliminálni a cytosol szabad Ca-ionjait, és mivel e folyamatok az elektrokémiai gradienssel szemben kell hogy működjenek, aktív pumpamechanizmusok töltik be ezt a szerepkört. A nyugalmi kalciumszint a legtöbb sejtben 100 nM körüli értéknek detektálható. Az *extracelluláris térbe* elsősorban a *plazmamembrán-kalcium-ATPáz* (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA), valamint a $3 \text{ Na}^+ / 1 \text{ Ca}^{2+}$ sztöchiometriával dolgozó $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -exchanger (NCX) juttatja vissza a kalciumionokat. Az *intracelluláris raktárak* (ER, SR) irányába az azok membránjában elhelyezkedő *sarco(endoplasmaticus retikulum-Ca²⁺-ATPáz* (SERCA) aktív mechanizmusai pumpálják vissza a Ca^{2+} -ot. A negyedik pumpamechanizmus a mitokondriumok membránjában található *mitokondriális uniporter* [56].

2.4.4. A kalciumjel térbeli és időbeli tulajdonságai

A sejtek kalcium-eszköztárának vázolt rendkívüli sokfélesége mellett a Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonalak széles körű elterjedéséhez az ilyen folyamatok térbeli és időbeli precíz szabályozása is hozzájárult. A *térbeliségnek* különösen rendkívül gyors sejtválaszok kialakulása esetén van jelentősége, amikor az egymást követő lépéseket katalizáló szignalizációs fehérjék egymás közvetlen közelében helyezkednek el, és hatalmas makromolekuláris komplexumokat hoznak létre. Ezekben a komplexumokban a kalciumérzékeny molekulák nagyfokú rendezettsége figyelhető meg. Ami még fontosabbá teszi e modulok jelenlétét például szívizomban vagy idegsejtekben, az az, hogy ezek az egységek egymástól független működésre is képesek, ami rendkívül fontos például a tanulás és a memória szempontjából. Más esetekben – különösen a génexpresszió vagy a sejtciklus szabályozásakor –, amikor a kalciumjel tranziensek vagy hullámok formájában az egész citoplazmát érinti, a térbeli jellemzők kevésbé fontosak [56].

Az *időbeli szabályozás* tekintetében a jelenség még összetettebb. Bizonyos sejtekben (szívizom- vagy idegsejtekben) az effektorok a cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának változásaira milliszekundumos skálán belül válaszolnak, míg más rendszerekben a változások másodperces vagy inkább perces intervallumon belül mozognak. Számos sejtípus (és nem csak az ingerlékeny sejtek) esetében az is kiderült, hogy hosszantartó ingerlés hatására a Ca^{2+} -tranziensek oly módon követik egymást, hogy *oszcillációkat* hoznak létre. Az oszcillációk során a citoplazma Ca^{2+} -szintje körülbelül 50–600 nM-os emelkedést mutat. Terjedési sebességük viszonylag gyors (mintegy 2–6 $\mu\text{m}/\text{sec}$), amit a csatornák tranziens megnyílása

okoz. Az is nyilvánvalóvá vált, hogy az oszcillációk jelenléte következtében a Ca^{2+} -jelek amplitúdója mellett még egy dimenzióval, a frekvenciával is számolnunk kell [63]. A kalcium oszcilláló koncentrációváltozása valószínűleg egyedülállóvá teszi azt a másodlagos messengerek között (eltekintve az IP_3 koncentrációjának bizonyára másodlagos, a Ca^{2+} koncentrációváltozásait követő pulzáló változásaitól). Az oszcillációk pontos fiziológiai jelentőségével még ma sem vagyunk teljesen tisztában, de tény, hogy szinte valamennyi eddig megfigyelt sejttypusnál leírták ezeket a periodikus változásokat. Az egyik feltételezés szerint a cytosol Ca^{2+} -koncentráció periodikus változtatásával kivédhetők a hosszan tartó, magas kalciumkoncentrációnak a sejtre nézve esetleg végzetes következményei [55]. Mindenesetre a Ca^{2+} -oszcilláció jelenségét számos sejttypus rendkívül sokrétű folyamatánál leírták már, úgy mint az oocita kortikális régiójában a megtermékenyítés pillanatában, agykérgi neuronok axonnövekedésekor, a legkülönbözőbb sejtfeleségek migrációjakor és differenciálódásakor fellépő periodikus ingadozások.

Noha a nem excitábilis sejtekben fellépő Ca^{2+} -oszcillációk pontos és minden részletre kiterjedő jellemzésétől még távol vagyunk, az biztosnak tűnik, hogy a periodikus ingadozások során megemelkedő Ca^{2+} -koncentráció forrása a belső raktár, minthogy az extracelluláris térségből történő Ca^{2+} -felvétel rátája nem mutat ilyen periodikus ingadozásokat [64]. Ugyanakkor az is nyilvánvaló, hogy – mivel a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisa érzékenyen függ a külső közeg kalciumtartalmától – a legtöbb sejttypus egy idő után nem mutat Ca^{2+} -oszcillációkat a Ca-ionok extracelluláris közegből történő eltávolítása után.

A kalciumhullámok másik, roppant érdekes tulajdonsága, hogy az oszcillációk nemcsak sejten belül, hanem sejtről sejtre is képesek terjedni. A jelenséget számos nem excitábilis sejttypusnál (köztük például májsejteken, [65]) leírták már, számunkra azonban a legérdekesebb az a tanulmány, mely szerint laboratóriumi körülmények között tenyésztett, érett ízületi porcból származó chondrocyták között figyelték meg a Ca^{2+} -hullámok sejtről sejtre történő terjedését [66]. A jel továbbításában réskapcsolatok vesznek részt.

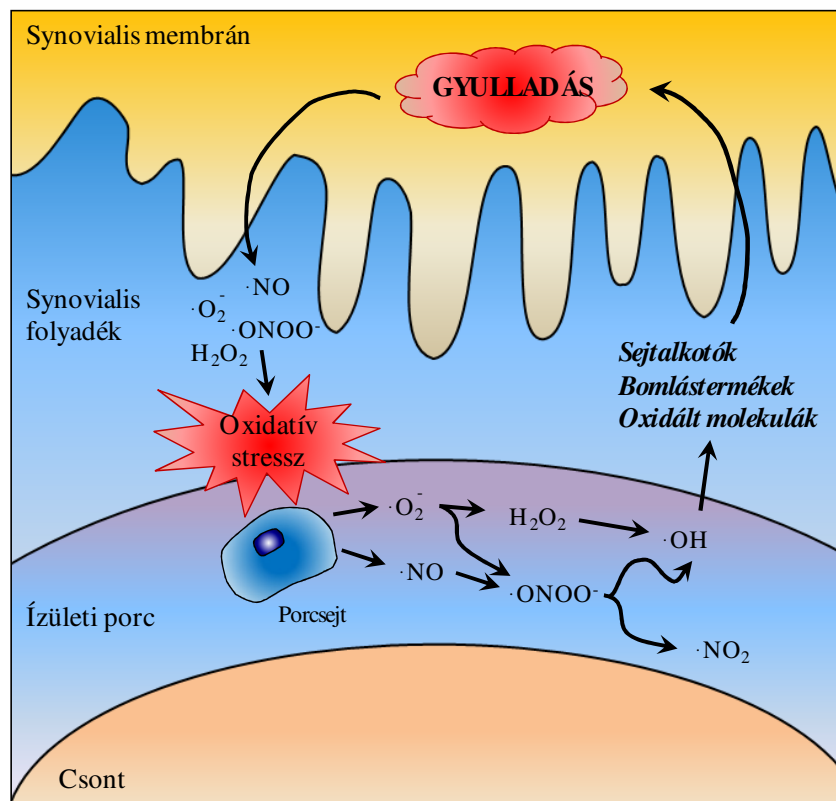
2.5. Az oxidatív stressz és a hialinporc kapcsolata

A porcszövet ereket nem tartalmazó, ún. avaszkuláris szövet, ahol *per se* hipoxiás viszonyok uralkodnak. Különösképpen igaz ez az ízületi porcra, ahol az oxigén az amúgy is rendkívül alacsony oxigéntenziójú (a légköri nyomásnak kb. 7%-a) synovialis folyadék felől diffundál a szövetbe. A diffúziós folyamatok tökéletlensége miatt a porcszövet belsejében lévő, matrixszal körülvett differenciált sejtek, a chondrocyták olyan körülményeket kénytelenek elviselni, ahol az oxigén tenziója a légkörinek kevesebb mint 0,1%-a [67]. Nem meglepő tehát, hogy a chondrocyták jól alkalmazkodtak a hipoxiához, és metabolizmusukra elsősorban az anaerob útvonalak dominanciája jellemző.

Az ízületi porcot érintő megbetegedések, mint a rheumatoid arthritis vagy az osteoarthritis során, a synovialis folyadék oxigénfelhasználása fokozódik, illetve a synovialis membrán kapillárisaiból történő oxigénleadás is csökken [68]. Ez a csökkent oxigénszaturáció a fiziológiásnál is nagyobb hipoxiának és stressznek teszi ki a chondrocytákat. A változások a sejtek redox-egyensúlyát is befolyásolják. Amennyiben az oxidánsok és az antioxidánsok kényes egyensúlyának felborulása oly mértéket ölt, hogy az sejtszintű és funkcionális változásokhoz vezet, a kialakult állapotot *oxidatív stressznek* nevezzük [69]. Az oxidatív stressz hatására a sejtek reaktív oxigéngyököket (*reactive oxygen species*, ROS) kezdenek el termelni [70]. A chondrocyták termelte reaktív oxigéngyökök leggyakoribb típusai közé a nitrogén-monoxid (NO) és a szuperoxid-anion (O_2^-) tartozik, melyek peroxinitrit (ONOO^-) és hidrogén-peroxid (H_2O_2) felszabadulásához vezetnek. A nitrogén-monoxidot a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) enzim termeli. A chondrocyták az enzim három izoformája (eNOS, nNOS, iNOS) közül a konstitutívan kifejeződő endotheliális eNOS-t és az indukálható iNOS-t is expresszálják. A szuperoxid-aniont a két membránkötött fehérjéből (Rap1A nevű szabályozó fehérjéből és a flavocitokrómból) álló NADPH-oxidáz enzimkomplex hozza létre molekuláris oxigén redukciójával. A chondrocytákban a hipoklórsav (HClO) előállítását katalizáló mieloperoxidázt is sikerült kimutatni. Fe(II)-ionok és hidrogén-peroxid jelenlétében a porcsejtek hidroxil-gyököket ($\text{OH}^\bullet$) szabadítanak fel, ami a telítetlen membránlipidekkel reakcióba lépve hosszabb élettartamú lipidgyököket hoz létre [70].

Reaktív oxigéngyökök nemcsak kóros körülmények között, hanem az aerob légzési lánc során normál körülmények között is képződhetnek a sejtekben. Ilyenkor ezen oxidánsok szintje nem lépi túl a sejtekben lévő redukáló ágensek kapacitását, amivel a chondrocyták is fel vannak fegyverkezve. A porcsejtek *antioxidáns-rendszerének* tagjai közé a konstitutívan

expresszálódó kataláz, a glutation-peroxidáz (GPX) és a szuperoxid-diszmutáz (SOD) két fajtája (a cytosol Cu/Zn és a mitokondriális Mn SOD) tartozik. Kontroll körülmények között a reaktív oxigéngyökök a sejtek számos jelátviteli útvonalának szabályozásában vesznek részt, melyek között a proliferáció, a sejthalál és számos gén (citokinek, sejtdhéziós molekulák, matrix-komponensek stb.) expressziójának szabályozása említhető. Ez utóbbit transzkripciós faktorok (NF- κ B, AP-1) működésének módosításán keresztül érik el [69]. Arra nézve is ismerünk adatokat, hogy a ROS közvetlenül aktiválja a MAPK-útvonalakat [70].



2.4. ábra. A reaktív oxigén- és nitrogéngyökök szerepe az ízületi porc degenerációjában és a synovialis gyulladás létrejöttében. (Henrotin és mtsai, 2003 [70] nyomán)

Ha azonban a sejtek antioxidáns-kapacitása nem elég a ROS hatástalanítására – és ilyen feltételek állnak fenn a korábbiakban említett arthritisek esetén, hiszen a chondrocyták mellett a gyulladt ízület synovialis folyadékában lévő polimorfonukleáris granulociták és makrofágok is termelnek hidrogén-peroxidot [71] –, az oxidánsok relatív túlsúlya a celluláris hatások (sejtmembrán és nukleinsavak károsítása, fehérjék oldalláncainak oxidálása és nitrálása) mellett a matrix alkotóelemeit (proteoglikánok, kollagének) is roncsolja. Érdemes külön kiemelni, hogy a ROS a porcmatrix vázát képező hialuronsav depolimerizálásával járul hozzá leginkább az arthritisek során megfigyelhető porcdegenerációhoz [72]. A sejtekben

felhalmozódó károsodott fehérjék és nukleinsavak végül apoptotikus vagy nekrotikus sejthalálhoz vezetnek, és a különösen ez utóbbi folyamat során a sejtközi térségbe kerülő sejtalkotók és újonnan keletkező reaktív oxigénradikálok csak tovább fokozzák a szinovialis gyulladást (2.4. ábra).

2.5.1. A poli(ADP-ribóz)-polimeráz-1 szerepe az oxidatív stressz okozta

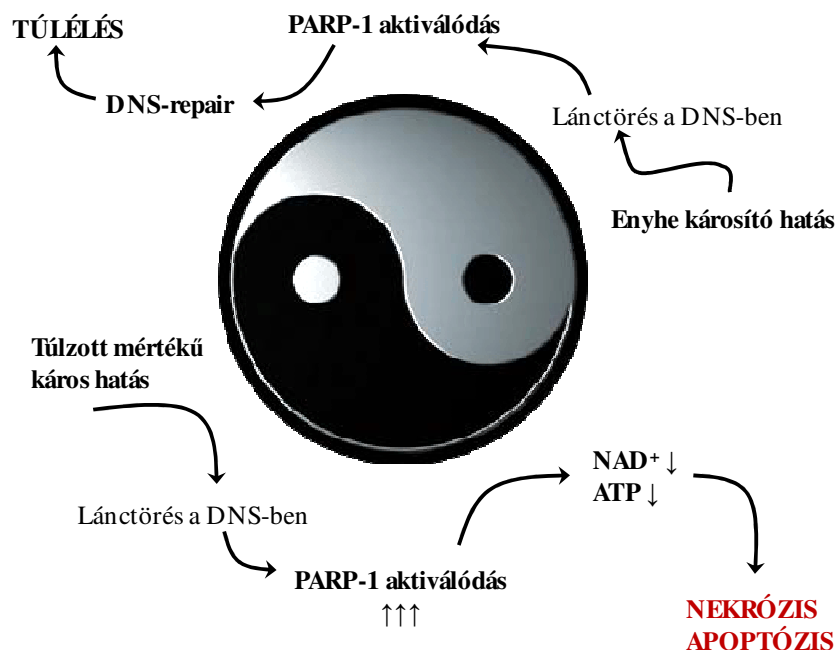
károsodásokban

A reaktív oxigénradikálok és azok származékai (különösen a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit) tehát elsősorban genotoxikus (a DNS-t roncsoló) hatásuk révén károsítják a sejteket. A közvetlen hatások mellett a poli(ADP-ribóz)-polimerek nagy mennyiségű megjelenését is leírták [73]. A polimerek szintéziséért a *poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP)* enzim a felelős.

Az eukarióta sejtek magjában lokalizálódó PARP-enzim meglehetősen konzervatív szekvenciával bír, ami a sejtek életében betöltött alapvető fontosságára utal. Az enzim aktiválódásának legismertebb oka a genotoxikus hatásokra bekövetkező egyes- és kétszálú DNS-lánctörések megjelenése a sejtmagban. A PARP három nagyobb doménből: egy N-terminálisan elhelyezkedő, két cinkujj-motívumot is tartalmazó DNS-kötő doménből, egy C-terminális helyzetű katalitikus doménből és egy közöttük található automodifikációs doménből épül fel. Cinkujj-motívumán keresztül a károsodott DNS-hez kötődik és homodimerizálódása után szerzi meg katalitikus aktivitását: a sejtekben lévő NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja. Az enzim ez utóbbi terméket hatalmas (akár 200 ADP-egységből álló), elágazó láncú polimerekké építi, melyeket különböző sejtmagi fehérjékhez kapcsol. A nagyméretű és nagy negatív töltéssel bíró polimerek természetesen hatással vannak a kovalens módosításon átesett fehérjék működésére. A legerősebben poli(ADP-riboz)ilált fehérje maga a PARP; a kovalens módosítás az enzim aktivitását csökkenti. A PARP-on kívül a hisztonok a poli(ADP-ribóz)-polimerek második legfontosabb akceptorai – a módosítás hatására a hisztonok eltávolodnak a DNS-től, és a nukleoszóma szerkezetének megváltozása a kromatin átrendeződésének, a DNS-hibajavító folyamatoknak és a transzkripciónak egyaránt fontos kezdeti lépése. A PARP ugyanis számos transzkripció faktor (pl. NF- κ B, AP-2), jelátviteli molekulákat (pl. protein-kináz D, p53) és DNS-repair-fehérjéket is poli(ADP-riboz)ilál. Mindezekért a funkciókért valójában a *PARP-1* enzim a felelős, homológjainak (PARP-2, vPARP, TcPARP, tankiráz-1, -2 és -3) szerepe egyelőre vagy nem tisztázott, vagy a

sejtműködés más területein fontosak (pl. a telomeráz szabályozása) [74]. A poli(ADP-riboz)iláció – a foszforilációhoz hasonlóan – dinamikus folyamat, a poli(ADP-riboz)-polimerek lebontásáért – és így a fehérjék működésének visszaállításáért – a *poli(ADP-riboz)-glikohidroláz (PARG)* és az *ADP-ribozil protein-liáz* enzimek felelősek.

A PARP-1 rendkívül sokrétű biológiai funkcióval bír. Első – és egyben legfontosabb – feladata a DNS-károsodások „figyelemmel kísérése”, és a genom integritásának fenntartása; ilyen értelemben annak „őrangyalaként” is felfogható: a DNS-károsodások következtében aktiválódó PARP-1 a repair-enzimek működését fokozva kijavítja a hibákat. Az enzim számos fehérje expresszióját is szabályozza; talán a legfontosabb PARP-mediálta fehérje a gyulladásos mediátorok termelésének egyik kulcsfontosságú szereplője, a chondrocyták által is expresszált iNOS, melynek kifejeződését az NF- κ B transzkripció faktor modulálásán keresztül szabályozza.



2.5. ábra. A PARP aktivációjának jin-jang-ja. Ha az oxidatív stressz okozta DNS-károsodás nem túl nagy mértékű, a PARP aktiválódása elősegíti a DNS-repair-folyamatokat és hozzájárul a sejtek túléléséhez. Ha azonban a PARP aktiválódása túlzott mértékű, a sejt NAD^+ - és ATP-tartalékai lemerülnek és a sejt elpusztul. (Virág és Szabó, 2002 [74] nyomán)

Egyik legérdekesebb funkciója azonban az enzim – első megközelítésben – eléggé ellentmondásos működésében rejlik. Azok a sejtek, amelyek erős DNS-károsító hatásoknak (pl. UV-sugárzás, γ -irradiáció stb.) voltak kitéve, nekrozissal pusztulnak el. Mi is történik ilyenkor a PARP-1-gyel? Megfigyelték, hogy ezekben a sejtekben az enzim túlságosan aktívvá válik, s az extrém módon felgyorsult katalitikus aktivitás közvetlen

következményeként a sejtek NAD^+ -, majd ATP-tartalékai kimerülnek, és a sejt elpusztul. A „közepesen” károsodott sejtek a repair-mechanizmusok elégtelensége miatt a p53-útvonalon keresztüli apoptózissal pusztulnak el; a folyamat korai lépéseiben aktiválódó kaszpáz-7 és a kaszpáz-3 egyik szubsztrátja maga a PARP-1 [74]. A PARP-1 tehát meglehetősen komplex szereppel bír a sejtek túlélésének és nekrotikus/apoptotikus halálának szabályozásában (2.5. ábra).

2.5.2. A PARP aktivitásának szabályozása

Mint említettük, a PARP-1 működését fiziológias körülmények között elsősorban autokatalitikus aktivitása [az enzim poli(ADP-ribozil)álódása] szabályozza. A NAD^+ hasítása során keletkező nikotinamid is fiziológias gátlófaktornak tekinthető. Az évek során azonban farmakológiai inhibitorok garmadáját sikerült kifejleszteni, melyek nagy részének közös tulajdonsága, hogy kompetitív antagonistaként gátolják a NAD^+ bekötődését, lévén annak szerkezeti analógjai. A leggyakrabban alkalmazott ilyen szerkezetű PARP-inhibitor a 3-aminobenzamid (3-AB). Egy másik, az előzőektől teljesen eltérő szerkezetű, mégis hatásos és azoktól specifikusabbnak tekinthető PARP-inhibitor a PJ34-fantázianeveű, N-(6-oxo-5,6-dihidro-fenantridin-2-il)-N,N-dimetil-acetamid kémiai összetételű vegyület [74].

A PARP aktivitása természetesen nemcsak farmakológiai inhibitorokkal szabályozható. Nemrégiben derült ki, hogy a PARP működését fehérjefoszforilációs folyamatok is szabályozzák. Az enzimhez asszociálódó (és annak működését fokozó) egyik fehérje, az NMNAT-1 (NMN-adenilil-transzferáz) PKC-foszforilációs helyeket tartalmaz, melyek segítségével a sejtek bonyolult jelátviteli útvonalai ily módon is kifejthetik hatásukat a poli(ADP-ribozil)ációs folyamatok szabályozására [75]. A közelmúltban írták le azt is, hogy maga a PARP is tartalmaz foszforilációs helyeket. A PARP kinázainak és foszfatázainak azonosítása egyelőre még várat magára, de bizonyos MAP-kinázok és a PKC-izoenzimesalád tagjainak szerepe valószínűsíthető [76,77].

2.5.3. A PARP aktiválódása és a cytosol kalciumkoncentrációja közötti kapcsolat

Bár a PARP aktiválódásának pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert teljes egészében, az irodalomban fellelhető adatok szerint a PARP-aktiváció közvetlenül nem kalciumigényes folyamat [74]. Egyes kutatócsoportok eredményei alapján azonban feltételezhető, hogy bizonyos sejtípusokban a hidrogén-peroxiddal kiváltott PARP-aktiváció, és az ennek következtében megemelkedő ADPR-polimerek a cytosol kalciumszintjének

megemelkedéséhez vezetnek, a TRP-receptorok közé tartozó TRPV2M aktiválása eredményeképpen [78]. Ez a – legalábbis részben – PARP-dependens aktiváció felveti annak lehetőségét, hogy az oxidatív stressz során mérhető megemelkedett citoplazmatikus Ca^{2+} -szint kialakításában poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok is részt vehetnek.

2.5.4. A PARP szerepe az arthritis patogenezisében

Több kutatócsoport is beszámolt arról, hogy a PARP bizonyos helyi gyulladásos folyamatok során is aktiválódik [79]. Nincs ez másként az arthritis esetében sem; sőt, azt is megfigyelték, hogy a betegség egérmódeljében a PARP-aktivitás 3-aminobenzamiddal történő gátlása késlelteti a tünetek kialakulását [80]. Ezt a védőhatást számos más PARP-inhibitorral sikerült azóta kimutatni, ami a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok jelentőségére utal. A PARP arthritisben betöltött pontos szerepét azonban még azóta sem sikerült részleteiben felderíteni [74]. Noha részleges eredmények már születtek azzal kapcsolatban, hogy a PARP valamilyen funkcióval bír a chondrogenézisben [81], arról, hogy a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok pontosan milyen szerepet játszanak az HD-kultúrákon kiváltott oxidatív stresszre adott válaszok szabályozásában, egyelőre nem rendelkezünk adatokkal.

3. Anyagok és módszerek

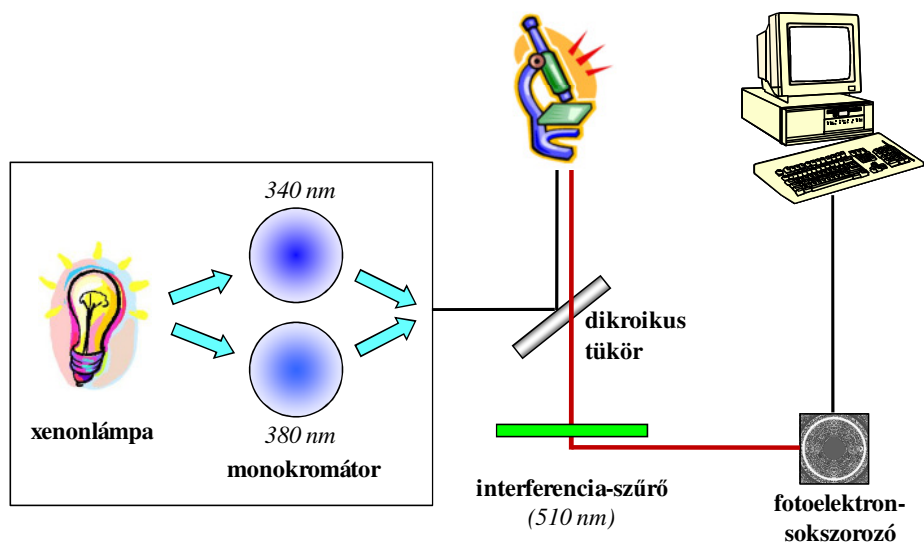
3.1. Sejtenyésztés

A porcosodó, nagy sejtsűrűségű mesenchymalis sejt kultúrák, más néven high density (HD) kultúrák alkalmazása a porcdifferenciáció tanulmányozására az egyik legismertebb és évtizedek óta használt módszer. A chondroprogenitor mesenchymalis sejteket Ross-fajtájú fehér húshibrid csirkeembriók disztális végtagtelepeiből izoláltuk. A kísérleteinkhez felhasznált embriók a Hamburger és Hamilton szerinti 22–24-es stádiumnak [13] megfelelő fejlettségűek voltak. A laboratóriumunkban eredetileg alkalmazott protokollon [14,15], saját kísérleteink igényeit figyelembe véve, a következő módosításokat hajtottuk végre. A tojásokból steril körülmények között kivett csirkeembriók disztális végtagtelepeit sztereomikroszkóp alatt csipeszek segítségével távolítottuk el, és a végtagtelepeket kalcium- és magnéziummentes foszfátpufferbe (calcium and magnesium free phosphate buffered saline, CMF-PBS; pH 7,4) raktuk. Az így összegyűjtött végtagtelepeket 0,25% tripszinben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 37 °C-on termosztálva 1 órán át emésztettük. A tripszines emésztést 1:1 térfogat mennyiségű főtális borjúsérummal (*fetal bovine serum*, FBS) állítottuk le, és a sejteket 10 percig tartó centrifugálással (800 ×g) választottuk el a felülúszótól.

Az eredeti leírás szerinti 2×10^7 sejt/ml sűrűségű szuszpenziók helyett kísérleteink során $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségűeket használtunk és 5, egyenként 10–10 µl-es csepp helyett – a kísérlet céljától függően – egyetlen 15, 30 vagy 100 µl-es cseppet cseppentettünk megfelelő méretű üveg fedőlemezre (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Németország) vagy műanyag Petri-csészékbe, illetve tenyésztő plate-ek (Orange Scientifique, Braine-l'Alleud, Belgium) lyukaiba. A fedőlemezeket tartalmazó műanyag Petri-csészéket és plate-eket 37 °C-on, 5% CO₂ és 80% relatív páratartalom mellett termosztálva a sejteket 2 órán át hagytuk kitapadni, majd 10% FBS-sel kiegészített, antibiotikumokat (50 egység/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, TEVA, Debrecen, Magyarország) és antimikotikumot (1,25 µg/ml Fungizone, TEVA) tartalmazó Ham F12 (N6760, Sigma-Aldrich) tápoldattal tápláltuk. A tápoldatot (amennyiben a kísérlet menete másképp nem diktálta) kétnaponta cseréltük. A kicseppentés napját a tenyésztés 0. napjának tekintjük.

3.2. A cytosol szabad Ca^{2+} -koncentrációjának meghatározása

A különböző korú sejt kultúrák sejtjeinek cytosol szabad Ca^{2+} -koncentrációját fluoreszcens módszerrel mértük meg, a Bíró és mtsai [82] közleményében leírt protokoll alapján. A mérés előtt a sejteket Fura-2 (TEFLabs, Austin, TX, USA) Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük fel. A módszer alapelve, hogy a festék kétféle abszorpciós maximummal rendelkezik: 340 nm-en a Ca^{2+} -ot nem kötött, míg 380 nm-en a Ca^{2+} -ot kötött forma gerjeszthető. A két különböző abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon gerjesztve a festékkel feltöltött sejtet, a két hullámhosszon való gerjesztést követően emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kiszámolható [83]. A mérések előtt a sejtszuszpenzió 15 μl -es cseppjeit nagyméretű (30 mm átmérőjű) üveg fedőlemezekre cseppentettük ki, és Petri-csészékben tenyésztettük őket. A mérések kivitelezéséhez a kultúrákat 2 ml friss Ham F12 médiumba vittük át, amit a következő anyagokkal egészítettünk ki: 10 μl Fura-2-AM (a festék acetoxi-metilészter formája; 10 μM) és 4 μl neostigmin (0,3 nM); ez utóbbi az extracelluláris kolin-észterázok gátlószere és így a Fura-2-AM extracelluláris hasítását akadályozza meg. A kultúrákat CO_2 -inkubátorban 37 °C-on 60 percig inkubáltuk. A sejtek feltöltését követően a kultúrákat kétszer átmostuk Tyrode-oldattal (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM Hepes–NaOH, 1 g/l glükóz; pH 7,4). Erre azért volt szükség, hogy az extracelluláris matrixhoz kötődött Fura-2-AM-et eltávolítsuk. Azok a sejtek, amelyek felvették a Fura-2-t, fluoreszcens mikroszkóppal (Diaphot, Nikon, Kowasaki, Japán), 40x-es olajimmerziós objektívet használva kékes fényben fluoreszkáltak. A méréseket Tyrode-oldatot tartalmazó perfúziós kamrában végeztük egy forgótükrös sugárosztóval kiegészített kettős monokromátoros berendezést használva (DeltaScan™, Photon Technologies International, Lawrenceville, KY, USA; 3.1. ábra). A rendszer fényforrása egy xenonlámpa, melynek fényét egy forgótükrös sugárosztó két nyalábra osztja. A keletkező sugarakat külön-külön monokromátoron vezetjük át, melynek eredménye a méréseinkhez szükséges 340, illetve 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb. A monokromátorokból a fényt egy dikroikus tükrön keresztül az invertáló mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett sejtekre vezetjük. A Fura-2-vel feltöltött sejtek által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en – egy interferenciaszűrő közbeiktatásával – fotoelektron-sokszorozó (PMT) segítségével detektáltuk. A jeleket 10 Hz gyakorisággal regisztráltuk. A háttérfluoreszcenciát a tárgylemezek sejtmentes helyein mértük, melyet a program automatikusan levont a detektált fluoreszcenciaértékekből.



3.1. ábra. A fluoreszcenciás módszerrel történő cytosol Ca^{2+} -koncentráció meghatározására szolgáló PTI mérőrendszer elvi sémája.

A két hullámhosszon való gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) az irodalomból ismert egyenlet [83] alapján számítottuk ki az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkat:

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

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

A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A regisztrálás során kontroll Tyrode-oldatot áramoltattunk át 3 ml/perc sebességgel a sejteket tartalmazó kádon bal oldalról, jobbról alkalmazva az elszívást. Agonisták és antagonisták (koffein, ciklopiazonsav) hatásának vizsgálatakor a mérést ezért a jobb oldali sejteken kezdtük és balra haladtunk, így a korábbi mérésekkor alkalmazott anyagokat nem mostuk rá a később mérendő sejtekre. Egy kis perfúziós kapillárist (Perfusion Pencil™; AutoMate Scientific, San Francisco, CA, USA) pedig az éppen mért sejt közvetlen közelébe állítottunk be, amin perfúziós rendszer (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific) segítségével 4 $\mu\text{l}/\text{sec}$ sebességgel adagoltuk a vizsgált oldatot, majd az adott mérés befejeztével lokálisan is Tyrode-oldatot áramoltattunk az agonista kimosására. A regisztrátumokat számítógépes programmal rögzítettük.

A számítások és a statisztikai analízis elvégzéséhez egy, az Élettani Intézetben kifejlesztett számítógépes programot használtunk, mellyel a nyugalmi és a maximális

intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkat számoltuk ki. A sejtek cytosol szabad Ca^{2+} -koncentrációját a kitapadásukat követő 2. óra után, majd a többi tenyésztési napon ugyanazon napszakban mértük, minden esetben 30–30 sejtet megmérve, 5 független mérési sorozatban. Szignifikáns változások kimutatására a Student-féle kétmintás t -próbát használtuk.

3.3. Az intracelluláris kalciumraktárak töltöttségének vizsgálata ciklopiazonsavval és koffeinnel

Ahhoz, hogy képet alkossunk arról, vajon az intracelluláris kalciumraktárak (elsősorban a simafelszínű endoplasmaticus retikulum) szerepet játszanak-e a differenciálódó mesenchymalis sejtek ic. Ca^{2+} -koncentrációjának szabályozásában, megvizsgáltuk, hogy nyugalmi körülmények között mennyi kalciumot tartalmaznak. Kalciummérés közben az éppen vizsgált sejtekre mikrokapillárisal a simafelszínű endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -pumpájának (SERCA) inhibitorát, ciklopiazonsavat (CPA) adagoltunk. A CPA-t (Sigma-Aldrich) DMSO-ban oldottuk, és a 10 mM-os törzsoldatot felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A vizsgálatok megkezdése előtt a CPA-törzsoldatot kalciummentes Tyrode-oldatban (a normál oldat összetételétől annyiban különbözik, hogy CaCl_2 helyett 5 mM EGTA-t tartalmaz) hígítottuk a mérés során használt 10 μM -os koncentrációra. A CPA hatásának vizsgálata előtt a sejtekre először kalciummentes Tyrode-oldatot adagoltunk kb. 2 percen át, hogy a sejt környezetében lévő és a méréseinket megzavaró szabad Ca-ionokat eltávolítsuk. A CPA hatását 5 perces adagolás során regisztráltuk.

A CPA-t nemcsak kalciumméréskor, hanem közvetlenül a sejtek tápoldatához is hozzáadtuk 10 μM koncentrációban, hogy megvizsgáljuk, milyen hatása van a porcdifferenciálódásra, ha a belső Ca^{2+} -raktárakat hosszú távon (12 órán át) üresen tartjuk. A vizsgálatokat 2 és 3 napos kultúrákkal végeztük. A kísérletek kezdetekor egyes kultúrákat az ionofor oldószerének (DMSO) megfelelő koncentrációival kezeltünk. Mivel a DMSO-t kapott és a kezeletlen kontroll kultúrák között nem tapasztaltunk eltérést, ezért a későbbiek során csak kezeletlen kontrollokat alkalmaztunk.

A rianodinreceptorok fiziológiai vizsgálatára koffeint (Sigma-Aldrich), a receptor agonistáját adagoltuk a vizsgált sejtekhez kalciummérés alkalmával. A koffeint normál Tyrode-oldatban oldottuk és 15 mM koncentrációban juttattuk a sejtekre. A regisztrátumokat 100 sec-ig tartó koffeinadagolás során rögzítettük.

3.4. Spontán Ca^{2+} -tranziensek vizsgálata és analízise

A különböző korú kultúrák sejteiben megfigyelhető spontán Ca^{2+} -tranzienseket szintén fluoreszcenciás módszerrel, LSM 510 META Laser Scanning konfokális mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével regisztráltuk. A módszer elve hasonló a fent leírtakhoz: a mérés előtt a sejteket $10\ \mu\text{M}$ Fluo-4-AM kalciumérzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük fel. A festéket F12-tápoldatban oldottuk és a töltést $37\ ^\circ\text{C}$ -on, CO_2 -inkubátorban végeztük 1 órán át. A tranzienseket normál Tyrode-oldatban regisztráltuk. A méréseket $63\times$ -os vízimmerziós objektívvel végeztük. A Fluo-4-gyel töltött sejteket Ar-lézerrel előállított $488\ \text{nm}$ hullámhosszú fénnel gerjesztettük, a kibocsátott fluoreszcenciát pedig 500 , illetve $570\ \text{nm}$ -en detektáltuk.

A spontán Ca^{2+} -tranziensek során bekövetkező intenzitásváltozásokat x - y analízissel és ún. line scan analízissel vizsgáltuk. Az x - y analízis során 50 felvételt rögzítettünk $48,4\ \text{sec}$ intervallum alatt. A line scan analízishez a felvételeket $1,54\ \text{ms/vonal}$ sebességgel, $512\ \text{pixel/vonal}$ felbontásban vettük fel, alkalmanként 4096 vonalat vizsgálva. A regisztrátumokat egy, az Élettani Intézetben kifejlesztett számítógépes program segítségével elemeztük.

3.5. Az F12-tápoldat kalciumkoncentrációjának meghatározása

A sejtek tápközegének (10% FBS-sel kiegészített F12 médium) kalciumkoncentrációját lángatomabszorpciós spektrometriával (AAS) határoztuk meg [84]. A módszer alapelve, hogy a mintát magas hőmérsékletű lángban atomizáljuk, majd az atomok vegyértékelektronjait megfelelő hullámhosszúságú fotonok segítségével gerjesztjük, és az analitikai jelet az abszorpcióból származtatjuk. Kísérleteinket Philips PU9200X készülék (Philips, Cambridge, Egyesült Királyság) segítségével végeztük. Méréseink során acetilén/levegő összetételű, részgőben égő lángot alkalmaztunk, melynek hőmérséklete 2400 – $2700\ \text{K}$. A mintában lévő kalciumatomokat a $422,7\ \text{nm}$ -es hullámhosszon detektáltuk. A mintákat háromszor mértük le, a mérések 4 másodpercig tartottak. A kalciumkoncentrációt standard addíciós módszerrel határoztuk meg: az eredeti oldat tízszeres hígításához (a hígítást $0,1\ \text{M}$ salétromsavval végeztük) egyre növekvő mennyiségű, ismert koncentrációjú kalciumot adtunk ($1\ \text{g/l}$ Ca-standard formájában). Az AAS-készülékkel kapott mérési eredményekből számítógépes program segítségével számoltuk ki a kalciumkoncentrációt.

3.6. A kultúrák kezelése EGTA-val, A23187 Ca²⁺-ionoforral és ciklosporin-A-val

A HD-kultúrák sejtjeinek Ca²⁺-homeosztázisát az extracelluláris térbe adagolt anyagokkal próbáltuk befolyásolni. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással van az *in vitro* porcdifferenciálódásra az extracelluláris közeg szabad Ca-ionjainak megvonása, bizonyos kultúrákat a tápközeg kalciumtartalmával ekvimoláris mennyiségű, 0,8 mM koncentrációjú EGTA-t (Amresco, Solon, OH, USA) tartalmazó F12-táppoldattal tápláltuk 12 órán keresztül a tenyésztés 2., illetve 3. napján. Az EGTA-t szérumentes F12-táppoldatban oldottuk fel, majd a megfelelő pH beállítása után (pH 7,4) sterilre szűrtük. Szérumot (10%) csak ezt követően adtunk hozzá.

A sejtek intracelluláris Ca²⁺-koncentrációjának megemeléséhez a kultúrákat A23187 Ca²⁺-ionofort (Sigma-Aldrich) tartalmazó táppoldattal tápláltuk. Az A23187-et kétféle koncentrációban (0,1 és 5 mg/l) alkalmaztuk a tenyésztés 2. és 3. napján, 1 órán keresztül. Az A23187 Ca²⁺-ionofort 1 mg/ml törzsoldatként DMSO-ban feloldva felhasználásig –20 °C-on tároltuk, és a táppoldatban hígítottuk tovább.

A kalcineurin aktivitását ciklosporin-A (CsA; Sigma-Aldrich), az enzim egyik inhibitorának hozzáadásával gátoltuk. A CsA-t 2 mM törzsoldatként DMSO-ban feloldva felhasználásig –20 °C-on tároltuk, majd a táppoldatban hígítottuk tovább a kívánt 2 µM koncentrációra. A CsA-t az 1. tenyésztési napon adtuk hozzá a kultúrákhoz, és a tenyésztés végét jelentő 6. napig folyamatosan jelen volt.

3.7. Oxidatív stressz előidézése hidrogén-peroxiddal és peroxinitrittel, valamint a PARP-aktivitás gátlása 3-amidobenzamiddal

Oxidatív stresszt hidrogén-peroxid vagy peroxinitrit hozzáadásával váltottunk ki. Mindkét anyagot 30 percen keresztül tartottuk a sejteken. A hidrogén-peroxidot steril desztillált vízzel hígítottuk 9 M törzsoldatból (Sigma-Aldrich) a megfelelő végkoncentrációk eléréséhez (0,1; 1 és 4 mM). A peroxinitritet (Calbiochem, San Diego, CA, USA), amit –70 °C-on tároltunk felhasználásig, lúgos (pH 12,0) izotóniás sóoldattal hígítottuk a kívánt (100, 300 és 600 µM) koncentrációkra. A hidrogén-peroxidos kezelések kontrolljaként megfelelő

mennyiségű desztillált vizet, míg a peroxinitrit-kezelések alkalmával lebomlott (30 percig pH 7,0 közegben tartott) peroxinitritet adtunk a kultúrákhoz.

A PARP-aktivitás gátlásához 3-aminobenzamidot (3-AB; Sigma-Aldrich) használtunk. Mindkét inhibitort az oxidatív stressz előtt 30 perccel adtuk a kultúrák sejtiéhez. Az 5 mM koncentrációjú 3-AB-oldatot úgy állítottuk elő, hogy a gátlószert közvetlenül a tápoldatban oldottuk fel.

3.8. A képződött porcmatrix fénymikroszkópos vizsgálata és mennyiségének szemikvantitatív meghatározása

A porcmatrixot a *metakromázias festődés* jelenségének felhasználásával tettük láthatóvá. A porcmatrix nagy mennyiségű, erősen negatív töltésű proteoglikánt és glükózaminoglikánt tartalmaz, így vörös metakromatikus színben látszik az alacsony pH-n történő dimetil-metilénkék (DMMK)-festést követően, míg az ortokromatikus kék festődés elhanyagolható ilyen körülmények között [85].

A kiindulási sejtszuspenzió 30 µl-es cseppjeit 24-lyukú plate-ek lyukaiba helyezett 10 mm átmérőjű üveg fedőlemezek közepére cseppentettük, és a továbbiakban ugyanolyan körülmények között tenyésztettük, mint a Petri-csészékben tenyésztett kultúrákat. A kezelt és kezeltelen HD-kultúrákat a tenyésztés végét jelentő 6. napon CMF–PBS-ben történő öblítést követően 40% formaldehid és abszolút alkohol 4:1 arányú keverékével fixáltuk. A kultúrákat DMMK (Aldrich, Steinheim, Németország) 3% ecetsavban oldott 0,1% oldatával 5 percig festettük, 3% ecetsavval mostuk, majd kristályragasztóval lefedtük [47]. Az így megfestett kultúrákról fénymikroszkópra (Nikon Eclipse E-800, Nikon Co., Japán) szerelt digitális kamera és Spot Advanced számítógépes program segítségével készítettünk felvételeket, 4× nagyítású objektívet használva.

A szulfatált matrixkomponensek mennyiségének szemikvantitatív meghatározását a negatív töltésű proteoglikánokhoz kötődő toluidinkék (Reanal, Budapest, Magyarország) kioldását követő optikai denzitometrálással végeztük. A 6 napos kultúrákat CMF–PBS-es öblítést követően Kahle-féle rögzítővel (28% abszolút etanol, 4% formalin és 2% jégcet) fixáltuk 15 percig, majd glicin–HCl-pufferben (pH 1,8) oldott 0,1% toluidinkékkel festettük, újabb 15 percen át. A nem kötődött toluidinkéket a már említett glicin–HCl-pufferrel mostuk ki egy órán keresztül, a szulfatált matrixkomponensekhez kötődött festéket pedig abszolút

etanolban oldott 8% HCl segítségével oldottuk ki. A visszaoldott toluidinkéket tartalmazó minták optikai denzitását 625 nm-en mértük mikroplate-leolvasó készülék segítségével (Chameleon, Hidex, Turku, Finnország). A kísérleti csoportonként 5–5 különböző kultúrából visszaoldott festék mennyiségét 5 független mérés során határoztuk meg. Az adatokat statisztikai szempontból Student-féle kétmintás *t*-próba segítségével elemeztük.

3.9. A sejtproliferáció vizsgálata ^3H -timidin-beépülés mérésével

A sejtek osztódóképességét a DNS egyik alapvető építőköveként ismert timidin egy radioaktív izotóppal (trícium, ^3H) jelölt formája beépülésének monitorozásával követtük nyomon. A DNS-üket szintetizáló sejtek a 16 óra inkubációs idő alatt beépítik örökítőanyagukba a triciált timidint, s az inkubációs idő leteltével és többszöri mosást követően a mintában detektálható radioaktivitás a sejtek proliferációs rátájával arányos.

A tenyésztéshez használt sejtuszuspenzió 15 μl -es cseppjeit speciális, fehér belsejű 96-lyukú mikrotiter plate-ek (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) lyukaiba cseppentettük, és ugyanolyan kísérleti körülmények között tenyésztettük, mint a Petri-csészékben és 24-lyukú plate-ekben növe sejt kultúrákat. A 3. tenyésztési napon, a kezeléseket követően 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidint (törzsoldat: metil- ^3H -timidin, 1 mCi/ml; Amersham, Little Chalfont, Egyesült Királyság) adtunk minden egyes kultúra tápfolyadékához, és 16 órán át tartottuk rajtuk. A radioaktív izotóppal jelölt nukleotidot tartalmazó médium eltávolítása után 4 °C-os CMF–PBS-sel kétszer átmostuk a kultúrákat, majd jéghideg 5% triklórecetsav 20 perces alkalmazásával kicsaptuk a szolubilis fehérjét. Az inkubációs idő lejártával a fixált kultúrákról CMF–PBS-es öblítésekkel távolítottuk el a triklórecetsavat. A CMF–PBS leszívása után a plate-eket foszfor-pentoxidot tartalmazó exsikkátorba helyeztük 48 órára ahhoz, hogy a mintáinkat teljesen vízmentessé tegyünk. A kiszáritást követően a mérések előtt 50 μl szcintillációs folyadékot (MaxiLight; Hidex, Finnország) pipettáztunk a plate-ek lyukaiba, majd erőteljes összerázás után a minták radioaktivitását folyadékszcintillációs üzemmódban használt 96-lyukú plate-leolvasó készülék (Chameleon) segítségével detektáltuk. A HD-kultúrák sejtjeinek proliferációs rátáját 5 független kísérlet során, kísérleti csoportonként 10–10 kultúrát megmérve határoztuk meg. Szignifikáns változások kimutatására Student-féle kétmintás *t*-próbát használtunk.

3.10. A sejtek mitokondriális aktivitásának meghatározása

A sejtek metabolikus aktivitását („életképességét”) MTT-assay-vel (Sigma-Aldrich) határoztuk meg. A módszer az élő sejtek azon tulajdonságán alapul, hogy mitokondriális oxidázaik révén képesek a sárga színű tetrazóliumsót, amit MTT-reagens formájában adunk hozzájuk, oldhatatlan, lila színű formazánkristályokká alakítani. A formazánkoncentrációt kolorimetriás módszerrel megmérve az élő sejtek mitokondriális aktivitására („életképességére”) következtethetünk [86].

A kísérletekhez használt sejtszuszpenzió 15 µl-es cseppeit 96-lyukú plate-ekben tenyésztettük. A tenyésztés 3. napján a kezeléseket követően 10 µl, 5 mg/ml koncentrációjú, PBS-ben oldott MTT-reagenst [3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid] mértünk a sejtek tápoldatába (0,5 mg/ml végkoncentrációban), és 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk őket CO₂-termosztátban. Az inkubációs idő lejártával az MTT-tartalmú tápoldatot eltávolítottuk, a képződött formazánkristályokat 100 µl MTT-szolubilizáló oldatban (10% Triton X-100 és 0,1 M HCl vízmentes izopropanolban) feloldva a minták abszorbanciáját 570 nm-en mértük fotométer-üzemmódban állított mikroplate-leolvasó készülék (Chameleon) segítségével. A méréseket 5 független kísérlet során végeztük el, csoportonként 10–10 minta értékeit véve alapul. Az adatok statisztikai értékelését Student-féle *t*-teszttel végeztük.

3.11. A sejtek túlélési rátájának vizsgálata áramlási citometriával

Az áramlási citometria a sejtek fényszórását és fluoreszcenciáját vizsgálja. A módszer segítségével elhatárolhatók a vizsgálni kívánt sejtpopulációk (esetünkben az apoptotikus, illetve a nekrotikus sejtek) az ún. ortogonális fényszórást (Side Scatter vagy SS) és a kis szögű fényszórást (Forward Scatter vagy FS) összevető hisztogramon meghatározott elektronikus ablakban. Ez az analízis lehetővé teszi a pozitív festődésű és a negatívnak tekintett események megkülönböztetését, és mint ilyen, sokkal pontosabb eredményeket szolgáltat, mint a csak populációs szinten értelmezhető MTT-teszt.

A mérésekhez használt kultúrákat, melyeket a kiindulási sejtszuszpenzió 100 µl-es cseppeiből hoztunk létre, Petri-csészékben tenyésztettük. Az A23187 vagy EGTA-kezeléseket követően a sejteket CMF–PBS-ben öblítettük, és 250 µl Annexin-V DY647 reagenst (Central European Biosystems, Budapest, Magyarország) adtunk a kultúrákhoz. Más kultúrákat 10 µg/ml koncentrációjú propídium-jodid jelenlétében inkubáltuk. Az annexin-

assay a korai apoptotikus sejtek kimutatására szolgál, és azon alapul, hogy az annexinek nagy specifitással kötik az apoptózis egyik első eseményeként a plazmamembrán extracelluláris oldalán exponálódó foszfatidilszerin-oldalláncokat. Propídium-jodiddal a nekrotizált sejtek DNS-állománya festhető meg. Voltak olyan kultúrák is, amelyeket Annexin-V-tel és propídium-jodiddal egyaránt kezeltük, míg ismét másokat csak CMF–PBS-ben inkubáltunk. Ez utóbbiakat negatív kontrollként használtuk.

A 10 percig tartó, szobahőmérsékleten történő inkubáció lejártával és CMF–PBS-sel történő mosást követően a kultúrákat 15 percen át tripszinizáltuk (0,25% tripszin–EDTA), hogy a mintákat az áramlási citometriás vizsgálatokhoz alkalmas sejtszuszpenzióvá alakítsuk. A sejteket centrifugálással (800 $\times$ g, 10 perc) gyűjtöttük össze és 1–1 ml FACS-pufferben (1% borjú szérum albumin [BSA] és 0,05% Na-azid PBS-ben oldva) szuszpendáltuk fel. A sejtek túlélési rátáját CyFlow® space Flow Cytometer (Partec GmbH, Münster, Németország) készülékkel határoztuk meg. Az Annexin-V DY647 reagenssel jelölt sejteket 670 nm-en, míg a propídium-jodidot felvetteket 620 nm-en detektáltuk. Az adatok kiértékelését a WinMDI 2.8 számítógépes program (freeware) segítségével végeztük.

3.12. RT-PCR analízis

A polimeráz láncreakció specifikus génszakaszok erősítését teszi lehetővé megfelelő primerek és egy hőstabil DNS-polimeráz enzim alkalmazásával, egy szabályozható termosztát segítségével. Ha a módszert reverz transzkripcióval kapcsoljuk össze, vagyis a sejtek által expresszált mRNS-eket cDNS-sé írjuk át, akkor az adott pillanatban (kontroll körülmények között és bizonyos kezeléseket követően) az éppen kifejeződő géneken (ez az ún. transzkriptom) végezhetjük el a specifikus erősítést.

A Petri-csészében tenyésztett, 100 μ l sejtszuszpenzióból előállított kultúrákat – a megfelelő kezelések után – RNáz-mentes, 4 °C-os fiziológiás nátrium-klorid oldattal mostuk és folyékony nitrogénben lefagyasztva felhasználásig –70 °C-on tároltuk. A kultúrák sejtjeiből a totál RNS-t Quiagen RNeasy® Micro Kit (Quiagen, Hilden, Németország) segítségével, a gyártó cég utasításait követve nyertük ki. Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop (NanoDrop Technologies, Bio-Science, Magyarország) készülék segítségével ellenőriztük. Az így nyert RNS-mintából Omniscript reverz transzkripció kit (Quiagen) felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A reverz transzkriptáz (RT) reakcióhoz használt oldat mintánként 500 ng RNS-t, 0,25 μ l RNáz

inhibitor, 0,25 µl oligo(dT)-t, 1 µl dNTP-t (200 µM) és 200 egység M-MLV RT-t tartalmazott 1× RT-pufferben.

A specifikus cDNS-szekvenciák erősítése olyan primerekkel történt, amelyeket az interneten hozzáférhető (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) csirke nukleotid-szekvenciák alapján állítottunk elő. A primereket Primer Premier 5.0 számítógépes program segítségével (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) terveztük, és az IDT cégtől (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA) rendeltük. A PCR-reakciókhoz használt primer-párok legfontosabb adatait a *3.1. táblázat* foglalja össze. Az egyenként 50 µl össztérfogatú PCR-reakcióelegyek az alábbi összetevőket tartalmazták: 2 µl sense és antisense primer (0,4 mM), 1 µl dNTP (200 µM), és 5 egység Promega GoTaq® DNS-polimeráz 1× pufferben. A DNS-szakaszok specifikus felerősítéséhez programozható termosztátot (Eppendorf Mastercycle, Netheler, Hinz GmbH, Hamburg, Németország) használtunk a *3.2. táblázatban* látható hőmérsékleti profilok mellett. A PCR-mintákat 1,5%-os agarózgélben elektroforézissel választottuk el (90 V feszültség mellett), és etídium-bromiddal történő festést követően elemeztük. A jelintenzitás kvantifikálását ImageJ 1.40g verziószámú (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) számítógépes program segítségével végeztük, és a kontroll minták értékeire normalizáltuk.

3.1. táblázat. A polimeráz láncreakciók során specifikus DNS-szakaszok erősítésére használt primer-párok nukleotidszekvenciái és a reakciók körülményei

Gén	Primerek	Nucleotidszekvencia (5'→3')	GenBank Accession No.	Annellációs hőmérséklet	Ciklus- szám	Amplimer mérete (bp)
Sox9	sense	CCC CAA CGC CAT CTT CAA (713–731)	<u>NM_204281</u>	54 °C	30	381
	antisense	CTG CTG ATG CCG TAG GTA (1075–1093)				
Aggrekán tengelyfehérje	sense	CAA TGC AGA GTA CAG AGA (276–294)	<u>XM_001232949</u>	54 °C	30	429
	antisense	TCT GTC TCA CGG ACA CCG (688–704)				
II. kollagén	sense	CCC TCA AAT CCC TCA ACA ATC A (3616–3628)	<u>NM_204426</u>	52 °C	30	120
	antisense	AAT CTC CGC TCT TCC ACT CG (3735–3755)				
Kalcineurin	sense	CTG CTC TGA TGA ACC AAC AGT T (575–597)	<u>NM_001030340</u>	54 °C	30	504
	antisense	ACG GCA AGG ACC AGG TAA ACA (1058–1078)				
GAPDH	sense	AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT GG (115–138)	<u>NM_002046.3</u>	56 °C	35	322
	antisense	AAT GAG CCC CAG CCT TCT CCA T (415–437)				

3.13. Sejtkivonatok preparálása

Valamennyi sejtkivonatot Petri-csészében tenyésztett, 100 µl kiindulási sejtuszpenzióból származó kultúrákból készítettük, a tenyésztés különböző napjain. A teljes sejt-lizátumok előállításához a megfelelő korú kontroll, illetve kezelt kultúrákat fiziológiás sóoldatban történő mosást követően gumi sejtkaparó lapáttal arattuk le, és 100 µl lízispufferben (50 mM Tris–HCl puffer [pH 7,0], 10 µg/ml Gordox, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM fenil-metil-szulfonil [PMSF], 5 mM benzamidin és 10 µg/ml tripszininhibitor) szuszpendáltuk fel. A mintákat ezután folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, és felhasználásig –70 °C-on tároltuk. A sejteket közvetlenül a kísérletek folytatása előtt ultrahangos szonikálással tártuk fel folyamatos, olvadó jégen történő hűtés közben: a mintákat 4 alkalommal, egyenként 30 másodpercig (50-es ciklusszámot használva) szonikáltuk (Branson Sonifier, Danbury, USA).

A HD-kultúrák *endoplasmaticus membránfrakciójának* (mikroszóma-frakció) előállításához 3 napos kultúrákat használtunk. Fiziológiás sóoldatban történő mosást követően a kultúrákat Dounce homogenizátorban 5 mM HEPES-sel és 320 mM szacharózzal kiegészített lízispufferben (3,4 µg/ml Gordox, 3,4 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1,6 mM benzamidin és 3,4 µg/ml tripszininhibitor; pH 7,4) szuszpendáltuk. A mintát 4 500 ×g-vel 20 percen át centrifugáltuk, majd a felülészót egy tiszta centrifugacsőben újra centrifugáltuk

10 000 $\times g$ -vel 15 percig. Ezt követően az üledéket eldobtuk, és a felülúszót ultracentrifugával 150 000 $\times g$ -vel centrifugáltuk 2 órán át. Az endoplasmaticus retikulum membránrendszerét tartalmazó üledéket (a mikroszóma-frakciót) lízispufferben (proteáz-inhibitorokkal [lásd fentebb] kiegészített 50 mM Tris–HCl puffer; pH 7,2) vettük fel, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

3.14. Western blot analízis

A fent leírt módon előállított sejtlizátumokat és szeparált endoplasmaticus membránfrakciókat immunoblot technikával elemeztük [87]. A minták fehérjetartalmát módosított BCA próbával (BCATM Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A lizátumokat ötszörös töménységű SDS–PAGE mintapufferben (310 mM Tris–HCl, pH 6,8; 10% SDS, 50% glicerol, 100 mM DTT, 0,01% brómfenolkék) vettük fel, és 10 percig főztük. Az elektroforézishez 7,5% akrilamid gélt használtunk, és sávonként 40 μg fehérjét vittünk fel. A szeparálást követően a mintákat elektromos erőter segítségével nitrocellulóz membránra vittük át. A membránokat PBS-ben oldott 5% sovány tejjel blokkoltuk 30 percig, majd a 3.2. táblázatban összefoglalt antitestek megfelelő, blokkoló oldatban történt hígításainak jelenlétében inkubáltuk $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán át. Az inkubációs idő lejártával a membránokat háromszor 10 percig PBST-ben (0,1% Tween-20-szal kiegészített PBS) mostuk, majd a második antitest (lásd 3.2. táblázat) megfelelő hígításával inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán át. A második antitestet minden esetben 1% sovány tejjel tartalmazó PBS-ben hígítottuk. Az inkubációs idő végén az immunreakív sávokat erősített kemilumineszcenciás Western blot detektáló készlet (ECL Western Blotting Detection Kit; Amersham Biosciences, Budapest, Magyarország) segítségével mutattuk ki fényérzékeny film felhasználásával. A jelintenzitás kvantifikálását ImageJ 1.40g verziószámú számítógépes program segítségével végeztük, és a kontroll minták értékeire normalizáltuk.

3.2. táblázat. A Western blot analízis során használt elsődleges és másodlagos antitestek

<i>Kimutatandó fehérje</i>	<i>Elsődleges antitest</i>	<i>Másodlagos antitest</i>
kalcineurin	monoklonális anti-kalcineurin	anti-nyúl IgG

	(α -alegység); 1:200	1:1000
	Upstate, Dundee, Skócia	Sigma-Aldrich
Sox9	poliklonális anti-Sox9	anti-nyúl IgG
	1:200	1:1000
	Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság	Sigma-Aldrich
Foszfo-Sox9	poliklonális anti-foszfo-Sox9	anti-nyúl IgG
	1:200	1:1000
	Sigma, Budapest, Magyarország	Sigma-Aldrich
Rianodinreceptor (RyR)	monoklonális anti-RyR	anti-egér IgG
	1:1000	1:1000
	Affinity BioReagents, Golden, CO, USA	Sigma-Aldrich
Inozitol-1,4,5-triszfósfát-receptor I (IP₃R)	poliklonális anti-IP ₃ R I	anti-nyúl IgG
	1:250	1:1000
	Sigma, Budapest, Magyarország	Sigma-Aldrich

3.15. Kalcineurin-enzimaktivitás mérése

A kalcineurin enzimaktivitását a Cohen és mtsai. [88] közleményében leírt módszerrel mértük: a radioaktív izotóppal (^{32}P) jelölt inhibitor-1 nevű szubsztrátból (780 cpm/pmol) az enzim által lehasított $^{32}\text{P}_i$ radioaktivitásának mértéke arányos az enzimaktivitással. Az enzimaktivitás-mérésekhez jéghideg fiziológiás sóoldattal leöblített, a kiindulási sejtszuszpenzió 100 μl -es cseppjeiből tenyésztett kultúrák sejtlizátumait használtuk, melyeket lízispufferben (lásd fentebb) történő feltárást követően azonnal szonikáltuk, és 10 000 $\times g$ -n, 4 °C-on való centrifugálásukat követően a felülúszót használtuk a méréseinkhez.

A méréseket 30 μl térfogatú közegekben végeztük. A reakcióközegek 50 mM Tris–HCl pufferben (pH 7,0) oldott 3,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gordoxot, 3,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptint, 1 mM PMSF-t, 1,6 mM benzamidint, 3,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripszininhibitort, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kalmomodulint, 0,2 mM CaCl_2 -ot, 100 nM okadánsavat (OA), 2 nM protein-foszfátáz inhibitor-2-t, megfelelő mennyiségű (2–3 mg/ml) sejt kivonatot és ^{32}P -vel jelölt inhibitor-1-et (20–30 000 cpm/reakcióközeg) tartalmaztak. A reakcióközegeket 20 percen át 30 °C-on inkubáltuk, majd 100 μl 20% triklórecetsav és 100 μl 6 mg/ml BSA-oldat egyidejű hozzáadásával állítottuk le a reakciókat. Centrifugálás után a felülúszó 180 μl -éből határoztuk meg a $^{32}\text{P}_i$ mennyiségét folyadékszintillációs detektor (Pharmacia, Uppsala, Svédország) felhasználásával.

3.16. Poli(ADP-ribóz)-polimerek kimutatása immunocitokémiával

A kontroll körülmények között tartott, valamint oxidatív stressz hatásának kitett HD-kultúrákban képződött poli(ADP-ribóz)-polimereket immunocitokémiai festéssel mutattuk ki a Bürkle és mtsai. [89] közleményében leírt módszer alapján.

A 24-lyukú plate-ekbe helyezett 10 mm átmérőjű üveg fedőlemezekre cseppentett kultúrákat a kezeléseket követően 4 °C-os fiziológiás sóoldattal öblítettük, majd jéghideg, 10% triklórecetsavval fixáltuk 3 percig. A gyors fixálást követő PBS-es mosás után a kultúrákat tovább fixáltuk Sainte-Marie rögzítőben (abszolút etanol és jégcet 99:1 arányú elegye; [90]) szobahőmérsékleten 1 órán át. Fixálás után a kultúrákat PBS-ben öblítettük, és az aspecifikus kötőhelyeket 0,1% Triton X-100 és 5% lószérum (HS; Vector, Burlingame, CA, USA) PBS-es oldatával blokkoltuk szobahőmérsékleten. 1 órával később a kultúrákat monoklonális anti-poli(ADP-ribóz) antitest (laboratóriumunkban hibridóma-módszerrel előállított antitest) 1:300 hígításával inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. A primer antitestet a blokkoló oldatban hígítottuk. Az inkubációs idő leteltével a kultúrákat ötször 5 percig mostuk PBS-ben, majd biotinilált ló anti-egér IgG-vel (Vector) inkubáltuk őket szobahőmérsékleten 45 percig. A másodlagos antitestet 1:300 hígításban használtuk és PBS-ben hígítottuk. A nem kötődött másodlagos antitesteket ötszöri 0,1% Triton X-100–PBS-es mosással távolítottuk el. A mintákhoz ezután streptavidinnel konjugált Alexa-546-ot (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) adtunk és 30 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A streptavidin–Alexa-546 konjugátumot 0,1% Triton X-100–PBS-ben hígítottuk, és 1:100 arányban használtuk. A sejtmagokat 1 µg/ml koncentrációjú, 0,1% Triton X-100–PBS-ben hígított DAPI-val festettük 30 percen át szobahőmérsékleten. A festést követően a fedőlemezeket 5× mostuk 0,1% Triton X-100–PBS-sel, és a fluoreszcens festékek gyors kiégését gátló (ún. „antifade”) fedőanyaggal (Vector) fedtük le. A felvételeket Zeiss Axiolab fluoreszcens mikroszkópra szerelt Zeiss Axiocam digitális kamerával készítettük.

3.17. PARP-aktivitás *in situ* kimutatása

A PARP aktivitásának *in situ* kimutatását a Bakondi és mtsai. [91] közleményében olvasható protokoll alapján végeztük, kisebb módosításokkal. Az enzim aktivitását 30 µl-es, 24-lyukú plate-be helyezett 10 mm átmérőjű üveg fedőlemezekre cseppentett kultúrákon mértük. A megfelelő kezeléseket követően a kultúrák eredeti tápoldatát PARP reakciópufferre (56 mM HEPES, pH 8.0; 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) cseréltük, amihez közvetlenül a felhasználás előtt 0,01% digitonint és 12,5 µM biotinilált NAD⁺-ot (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) adtunk. 37 °C-on, CO₂-termosztátban történő, 1 óra hosszáig tartó inkubálást követően a kultúrákat 10 percen át jéghideg 10% triklórecetsavban fixáltuk, majd újabb 10 percig –20 °C-on abszolút etanolban tartottuk őket. A fixálás után a

kultúrákat 10 percen át PBS-ben mostuk, majd 0,1% Triton X-100–PBS-ben permeabilizáltuk a sejteket 20 percig. A permeabilizálást követően az aspecifikus kötőhelyek blokkolását 30 percig tartó, PBS-ben oldott 1% BSA-ban végeztük. 0,1% Triton X-100–PBS-es mosás után a beépült biotint streptavidin–Alexa-546 konjugátum hozzáadásával mutattuk ki, 30 perces, szobahőmérsékleten történő inkubálást követően. A konjugátumot 1:100 hígításban használtuk, és 0,1% Triton X-100–PBS-ben hígítottuk. A sejtmagok DAPI-s festését és a minták fedését az előzőekben leírtakkal megegyező módon végeztük.

3.18. A sejtek NAD^+ -tartalmának meghatározása

A vizsgálatokat 6-lyukú plate-ekben tenyésztett, 100 μl kiindulási sejtszuszpenzióból létrehozott kultúrákon végeztük a Bakondi és mtsai. közleményében [92] leírt módszer alapján, amit saját kísérleteinknek megfelelően módosítottunk. A HD-kultúrákat a megfelelő kezelések után 0,5 N HClO_4 -val tártuk fel, amit 3 M KOH/125 mM Gly–Gly-pufferrel (pH 7,4) állítottunk le. A mintákat 10 000 $\times g$ -vel 5 percen át centrifugáltuk, és a továbbiakban a felülúszót használtuk, amit megfelelő mennyiségű reakcióeleggyel (61 mM Gly–Gly-puffer, pH 7,4; 0,1 mM MTT, 0,9 mM fenazin-metoszulfát, 13 egység/ml alkohol-dehidrogenáz, 100 mM nikotinamid és 5,7% etanol) kevertünk össze. Az 560 nm-en mérhető fényelnyelést közvetlenül a reakcióelegyek összemérése után és 10 perc leteltével is megmértük. A kultúrákban mérhető NAD^+ mennyiségét ismert koncentrációjú NAD^+ -standardok eredményei alapján megrajzolt standard görbe alapján számoltuk ki. A méréseket 5 független kísérlet során, kísérleti csoportonként 10 minta meghatározásával végeztük. Az adatokat statisztikai szempontból Student-féle kétmintás t -próba segítségével elemeztük.

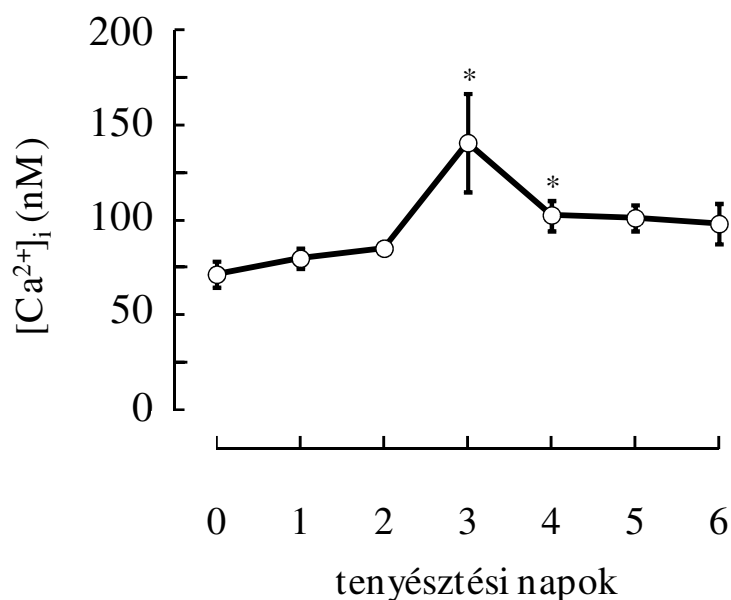
4. Eredmények

4.1. A porcosodó HD-kultúrák Ca^{2+} -homeosztázisának vizsgálata

4.1.1. A kontroll körülmények között tenyésztett kultúrák sejtjeinek szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációja jellegzetes mintázatot követ a differenciálódás során

Kísérleteink kezdetén különböző korú (0–6. napos) kultúrákat töltöttünk fel Fura-2 kalciumérzékeny fluoreszcens festékkel. A töltést a kicseppentést követő 2. órában, illetve ezt követően mindennap ugyanabban a napszakban végeztük, normál (1,8 mM Ca^{2+} -tartalmú) Tyrode-oldatban. A cytosol szabad Ca^{2+} -szintjét mind az erősebben, mind a gyengébben világító (a Fura-2 festéket nagyobb, illetve kisebb mennyiségben felvett) sejtekben megmértük, de a kétféle sejtpopuláció értékei között nem találtunk eltérést. Méréseink során csak azokat a kerekded, chondrocyta-morfológiájú sejteket vizsgáltuk, melyek a porcosodó sejtsomók belsejében helyezkednek el. A kultúrák szélén és felszínén lévő, nyúlványos fibroblast-jellegű sejteket, valamint a szintén a felszínen található, erősen megnyúlt fenotípust mutató izomsejteket kizártuk a mérésekből. A fenti különbségtételre természetesen csak a 2. naptól nyílt lehetőségünk: a tenyésztés 0. és 1. napján a telepek kizárólag nyúlványos morfológiájú mesenchymalis sejtekből állnak, de ekkor is a telepek belsejében levő sejteket vizsgáltuk.

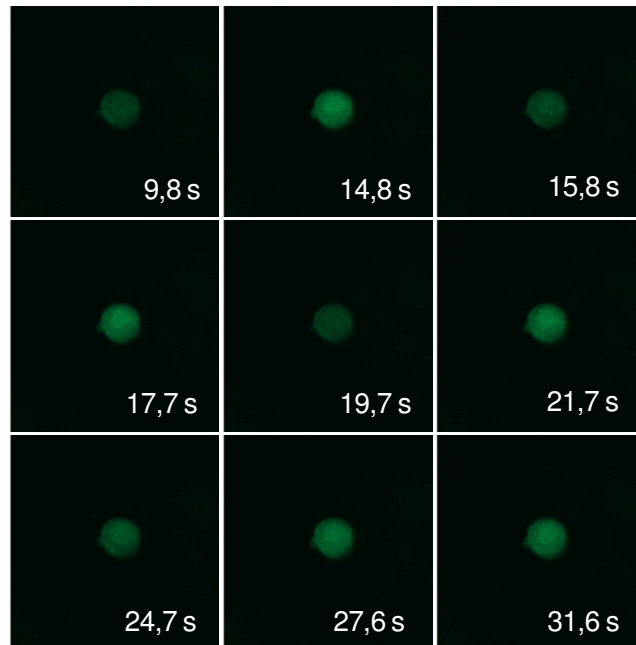
A különböző korú kultúrák sejtjeinek cytosol Ca^{2+} -koncentrációját 5 független mérési sorozatban megmérve egy érdekes, a differenciációval párhuzamosan változó mintázatot figyeltünk meg (4.1. ábra). A fiatal (0. napos) tenyészetek sejtjeiben a kalciumszint viszonylag alacsony (~75 nM) körüli értékeket mutat, kis szórással. A kalciumkoncentráció ezt követően a differenciáció előrehaladtával párhuzamosan kismértékű emelkedést mutat, majd a tenyésztés 3. napján magas (mintegy 140 nM) csúccsal tetőzik. Fontos hangsúlyoznunk, hogy a chondrogenikus sejtek nagy része a tenyésztés 3. napján válik véglegesen elkötelezetté [15]. Az ezen a napon tapasztalható relatíve nagy szórás a kultúrák sejtjeinek heterogenitásából adódhat. A 4. naptól kezdődően a Ca^{2+} -koncentráció újra alacsonyabb értékeket vesz fel, de már nem esik vissza a differenciálódást megelőző szintre, hanem tendenciáját tekintve magasabb (~100 nM) tartományban marad. Ez arra utal, hogy a differenciált chondroblastok és chondrocyták szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációja kis mértékben magasabb, mint a differenciálatlan chondrogenikus sejteké.



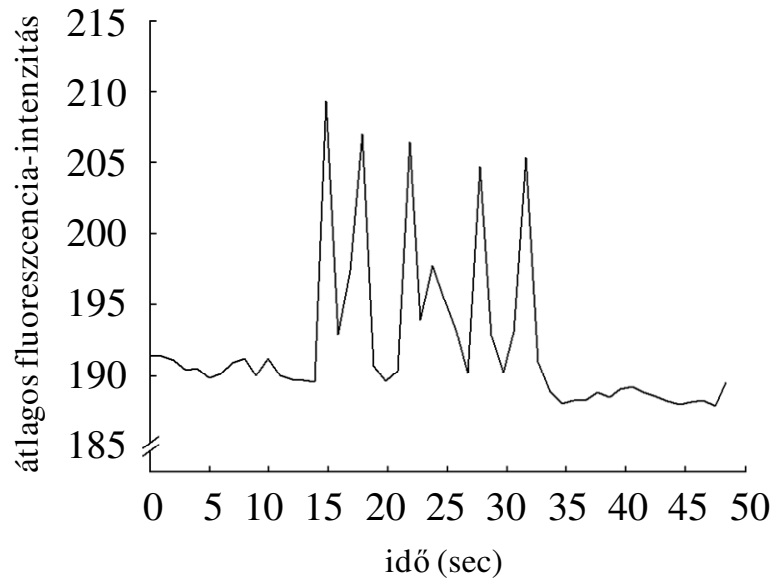
4.1. ábra. A porcosodó mesenchymalis kultúrák sejteiben mérhető cytosol Ca^{2+} -szint változása a tenyésztés során. A Ca^{2+} -koncentrációt Fura-2-vel töltött sejtekben határoztuk meg. A grafikonon 5 kísérlet adatainak jellemző tendenciáját ábrázoltuk. Az ábrázolt pontok mindegyike 30 sejt intracelluláris kalciumszintjének átlagát mutatja, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Csillagok (*) mutatják az egymást követő napok közötti szignifikáns (* $P < 0,01$) változásokat.

4.1.2. A háromnapos kultúrák sejtei periodikus Ca^{2+} -oszcillációkat mutatnak

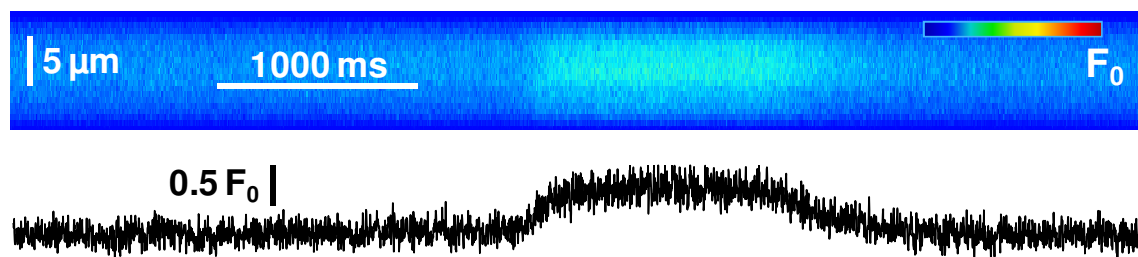
A Ca^{2+} -oszcillációkat Fluo-4-gyel feltöltött, 3 napos sejtekben vizsgáltuk, konfokális mikroszkóp segítségével. A méréseinket csak normál (1,8 mM) Ca^{2+} -koncentrációjú Tyrode-oldatban végeztük. A megfigyelt sejtek mintegy 75%-a spontán, mindenféle külső behatás nélkül periodikus Ca^{2+} -oszcillációkat mutatott (4.2. ábra). A rögzített oszcillációk mind frekvenciájukat, mind pedig amplitúdójukat tekintve széles határok között változtak. A frekvencia átlagos értéke $4 \pm 1,2 \text{ min}^{-1}$ körülnek adódott, a maximum amplitúdók 15–20%-kal voltak magasabbak az átlagos nyugalmi fluoreszcencia-intenzitásnál (4.3. és 4.4. ábra). Oszcillációkat a tenyésztés egyéb napjain is detektáltunk, ezeket azonban alaposabb analízisnek egyelőre nem vetettük alá. Lényegesnek tartjuk megjegyezni, hogy ezek a vizsgálatok pusztán a jelenség leírására korlátozódtak és a Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásának mechanizmusáról semmit sem mondtak. A közeljövőben további, részletesebb vizsgálatokkal kívánjuk feltérképezni a differenciálódó sejtekben megfigyelt kalcium-oszcillációk természetét.



4.2. *ábra.* Spontán Ca^{2+} -tranziensek 3 napos HD-kultúrákban. A méréseket Fluo-4-gyel feltöltött sejteken végeztük. A fluoreszcencia-intenzitás változásait 50 sec intervallumon keresztül rögzítettük. A reprezentatív ábra egy sejtről készült x–y analízis eredményeit mutatja.



4.3. *ábra.* A fenti, x–y analízissel vizsgált sejten mérhető átlagos fluoreszcencia-intenzitás időbeli változásainak regisztrátuma. Reprezentatív rekord.



4.4. ábra. Egy reprezentatív Ca^{2+} -tranziens line-scan analízissal rögzített rekordja 3 napos, Fluo-4 kalciumérzékeny festékkel feltöltött sejtben.

4.1.3. A differenciálódás során a HD-kultúrák sejtjeiben mérhető megemelkedett cytosol Ca^{2+} -koncentráció forrása elsősorban az extracelluláris tér

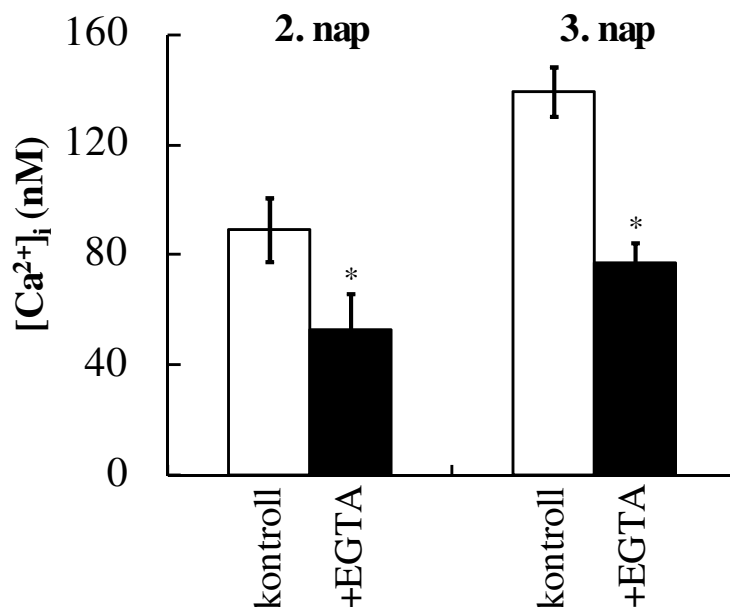
Miután sikerült megfigyelnünk, hogy a differenciálódással párhuzamosan jelentős és jellegzetes intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozások figyelhetők meg a HD-kultúrák sejtjeiben, a kalcium-homeosztázis felderítésének első lépéseként a differenciálódás napján megemelkedett cytosol kalciumkoncentráció forrását kívántuk azonosítani. Elsőként azt vizsgáltuk, milyen hatással van a porcdifferenciációra az extracelluláris tér szabad Ca^{2+} -ionjainak megkötése. Erre a célra egy Ca^{2+} -kelátort, EGTA-t használtunk, ami az irodalomban is elfogadott módszernek számít [93]. Az EGTA-t ekvimoláris mennyiségben kívántuk alkalmazni, ehhez azonban meg kellett határoznunk a 10% FBS-sel kiegészített F12-táplódat Ca^{2+} -koncentrációját. A méréseket atomabszorpciós spektrometriával (AAS) végeztük, és eredményeink alapján (4.1. táblázat) a sejtek tenyésztéséhez használt tápfolyadék kalciumtartalma mintegy 0,8 mM-nak (0,78 mM) adódott.

4.1. táblázat. A 10% FBS-sel kiegészített F12-táplódat kalciumtartalma AAS-mérések alapján

	Ca-koncentráció (mM)
1. mérés	0,728
2. mérés	0,833
3. mérés	0,791
Átlag $\pm$ SEM	0,784 $\pm$ 0,0305

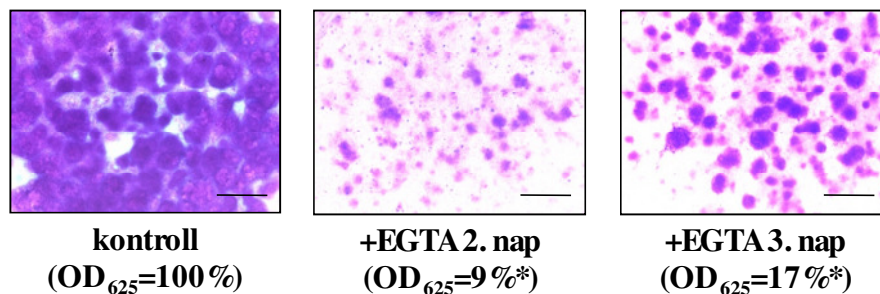
A külső közeg Ca^{2+} -ionjainak megkötésére az EGTA-t ekvimoláris (0,8 mM) koncentrációban adtuk a sejtek tápközegébe a tenyésztés 2. és 3. napján, 12 óra időtartamra. A 12 órás kezelések bizonyultak hatásosnak: ha a kultúrákat hosszabb időre tettük ki az EGTA

hatásának, a tenyészetek felúsztak és elpusztultak. A magasabb (5 mM) koncentrációjú EGTA-kezelések szintén hasonló hatással voltak a kultúrákra. Várakozásainknak megfelelően EGTA hatására jelentősen (mintegy 60%-kal) csökkent a sejtekben mérhető szabad cytosol Ca^{2+} -koncentráció, mindkét kísérleti napon (4.5. ábra).



4.5. ábra. Szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációk kontroll körülmények között és 12 órás EGTA-kezelést kapott kultúrák sejteiben. A méréseket Fura-2 fluoreszcens festékkel feltöltött sejteken végeztük, közvetlenül a kezeléseket után. A diagram 5 kísérlet adatai alapján a jellemző tendenciát mutatja. Az oszlopok mindegyike 30 sejt intracelluláris kalciumkoncentrációjának átlagát ábrázolja, a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Csillagok (*) mutatják a kezeletlen és a kezelt csoportok közötti szignifikáns (* $P < 0,01$) különbségeket.

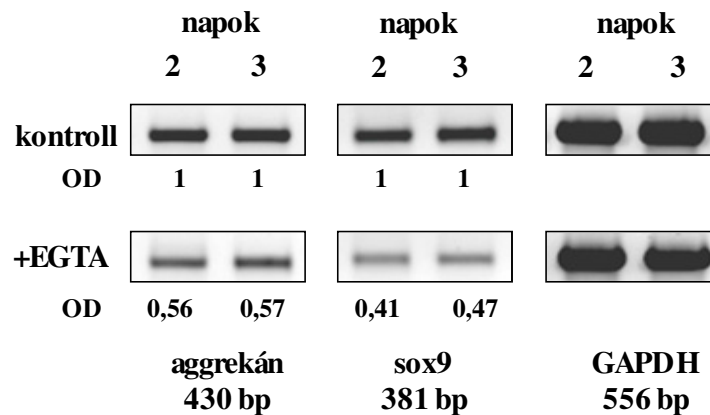
A 12 órás EGTA-kezelések nemcsak a sejtekben mérhető szabad Ca^{2+} -koncentrációt csökkentették le, hanem a 6. tenyésztési napon vizsgált, metakromáziásan festődő porcterületek nagysága is drámai mértékben alulmaradt a kezeletlen kontrollokhoz képest (4.6. ábra), és csak néhány DMMK-pozitív csomót tudtunk megfigyelni. A 2. napon erőteljesebb gátlóhatást tapasztaltunk, mint a 3. napon: a kontroll kultúrákban képződött metakromáziásan festődő porcmatrix mennyiségéhez képest csak 9, illetve 17%-ot detektáltunk a tenyésztés 6. napján végzett DMMK- és TK-festésekkel. Ha az EGTA-t a 4. napon vagy azt követően adtuk a kultúrák tápfolyadékához, nem tapasztaltunk gátlóhatást (nem közölt adatok).



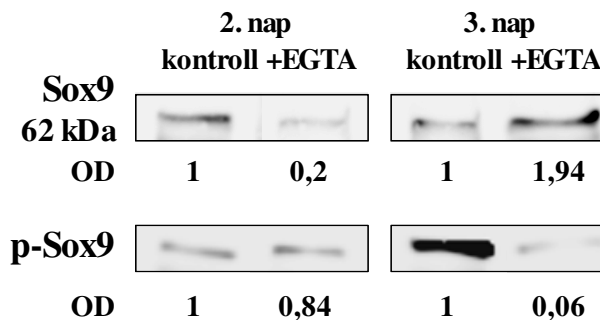
4.6. *ábra.* EGTA hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A felvételek 5 kísérlet adatai közül a jellemző tendenciákat mutatják. A kultúrákat 3% ecetsavban oldott DMMK-kel festettük. Az eredeti nagyítás 4× volt. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd abszolút etanol és 8% sósav elegyével a kultúrákból visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD_{625}) értékei $\pm 5\%$. A számadatok kísérleti csoportonként 10 minta átlagértékei. A kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (* $P < 0,01$) változásait csillagok (*) mutatják. Skála: 500 μm .

A Ca-ionok megvonásának porcmatrix-termelésre kifejtett negatív hatását molekuláris biológiai módszerekkel is megvizsgáltuk. A porcdifferenciáció mértéke a chondrogenesis mestergénjének tekintett sox9 expressziójának monitorozásával jól nyomon követhető, míg a matrixtermelés az egyik fő komponens, az aggregátum tengelyfehérjéjét kódoló gén átírásának vizsgálatával ítéltető meg. Kimutattuk, hogy EGTA hatására mindkét markergén mRNS-expressziója jelentős csökkenést mutatott a kezelt kontroll kultúrákhoz képest mind a 2., mind pedig a 3. napon (4.7. *ábra*). A sox9 expressziójának a kontrollhoz képest alacsonyabb mértéke arra utal, hogy a szabad Ca-ionok extracelluláris térből való elvonása gátolja a porcdifferenciációt. Alátámasztja ezt az elképzelést az aggregátum tengelyfehérje mRNS-expressziójának alacsony szintje, és a 6. napon vizsgált érett porckultúrákban megfigyelhető csökkent matrixfestődés is.

A chondrogenesis szempontjából fontos markergének mRNS-expressziós mintázatának változásához hasonlóan a Sox9-fehérjeexpresszió is hasonló tendenciákat mutatott a 12 órás EGTA-kezelés hatására (4.8. *ábra*). Megfigyeltük, hogy a 2. napon EGTA hatására csökkent a Sox9 fehérje Western blottal kimutatható mennyisége, azonban a 3. napon több kísérletet elvégezve sem találtunk hasonló változásokat. A Sox9 chondrogenesis szempontjából aktívabb, foszforilált formájának szintjét az extracelluláris Ca-ionok megkötése azonban különösen a 3. napon csökkentette jelentős mértékben. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a 6. napon megfigyelt csökkent matrixtermelés a porcos differenciálódás Sox9-dependens gátlásának következménye lehet, de a Ca^{2+} -jelátvitel mechanizmusa valószínűleg különbözik a túlnyomórészt még csak éppen differenciálódásnak indult (2 napos), és a végleges elköteleződés fázisában levő (3 napos) chondrogenikus sejtekben.



4.7. ábra. EGTA-kezelés hatása a chondrogenezis nyomon követésére használt markergének expressziójára. Az RT-PCR-reakciókhoz GAPDH-t használtunk kontrollként. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire normalizáltuk. Az ábrán szereplő eredmények 5 kísérlet eredményei közül a jellemző tendenciát mutatják.



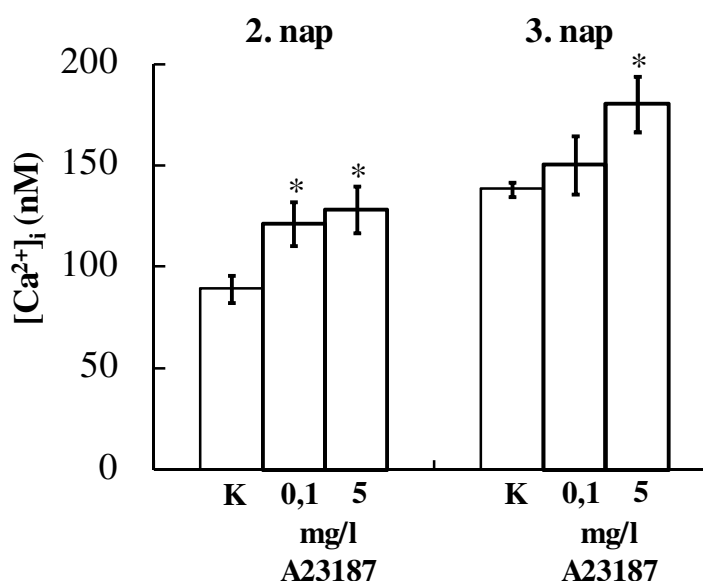
4.8. ábra. A chondrogenezisben kulcsfontosságú szerepet betöltő Sox9 transzkripciós faktor fehérjeexpressziójának és foszforiláltságának változása 12 órás EGTA-kezelés hatására. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire normalizáltuk. Az ábrán szereplő eredmények 5 független kísérlet adatai közül a jellemző tendenciát mutatják.

4.1.4. A chondrogenikus sejtek cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának megemelése kettős hatást vált ki

Miután láttuk, hogy az extracelluláris Ca-ionok megkötése jelentősen csökkenti a cytosol kalciumkoncentrációt, ami valószínűleg a chondrogenezis programjának gátlásához vezethet, kíváncsiak voltunk arra, vajon mi történik az ellenkező esetben: milyen hatásai lehetnek a szabad cytosol Ca^{2+} -koncentráció megemelésének? Ezért további kísérleteink során a sejteket az A23187 kalcium-ionoforral kezeltük. Az A23187 egy karrier-típusú ionofor, ami kettős pozitív töltésű ionokat (fiziológiai körülmények között elsősorban Ca-ionokat) juttat át a biológiai membránokon elektrokémiai gradiensüknek megfelelő irányban. A kísérleteket 1,8

mM kalciumkoncentrációjú közegben végeztük, és mivel a koncentráció-gradiens ilyen körülmények között a cytosol irányába mutatott, ionofor hatására a sejtek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációja megemelkedett.

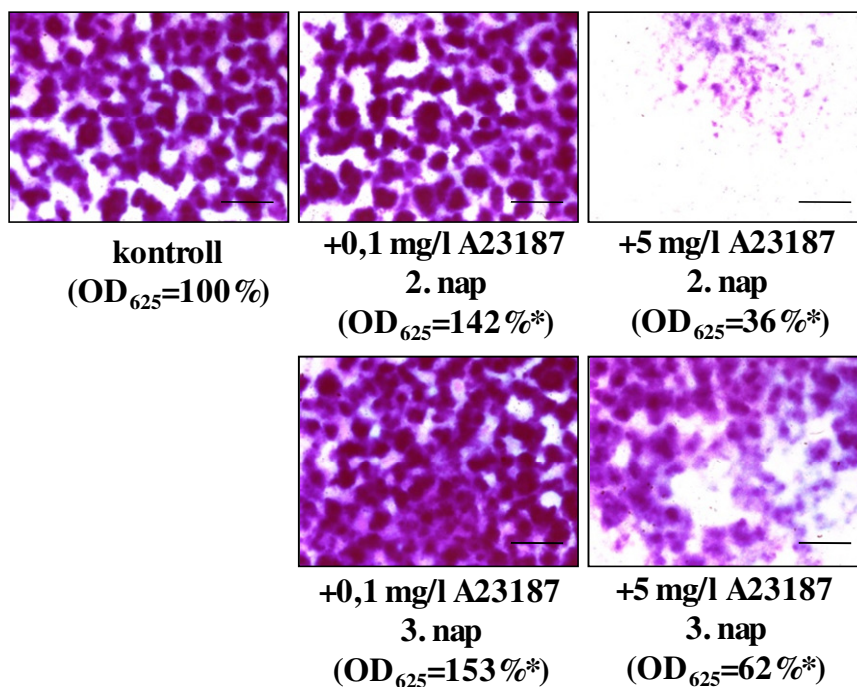
Az A23187-et két koncentrációban (0,1 és 5 mg/l) használtuk, és a tenyésztés 2. és 3. napján 1–1 órán keresztül kezeltük vele a kultúrákat. Ennél alacsonyabb (0,01 mg/l) koncentrációjú ionofor alkalmazásával semmiféle változást nem tudtunk detektálni, míg magasabb (10 mg/l) koncentráció esetén a kultúrák rövidesen felváltak az aljzatról és elpusztultak. A 4. naptól egyik ionofor-koncentráció sem okozott számottevő változást a porcképződés mértékét tekintve (nem közölt adatok). Várakozásainknak megfelelően az ionofor-kezeléseket követően a szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációt megmérve mindkét koncentráció esetében a kezeletlen kontrollhoz képest magasabb értékeket detektáltunk (4.9. ábra). A 0,1 mg/l koncentrációban alkalmazott ionofor a kontroll esetében mérhető értékeknél mintegy 25%-kal, míg az 5 mg/l koncentrációjú A23187 körülbelül 50%-kal magasabb intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt eredményezett.



4.9. ábra. A HD-kultúrák sejteiben mérhető szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációk kontroll körülmények között és 1–1 órás A23187 Ca^{2+} -ionofor-kezelést követően. A méréseket Fura-2 kalciumérzékeny festékkel feltöltött sejteken végeztük, közvetlenül a kezelések után. A diagramon 5 kísérlet adatai alapján a jellemző tendencia látható. Valamennyi oszlop 30 sejt intracelluláris kalciumkoncentrációk átlagát ábrázolja, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik. A kezeletlen és a kezelt csoportok cytosol kalciumkoncentrációja közötti szignifikáns (* $P < 0,01$) különbségeket csillagokkal (*) jelöltük.

Míg az EGTA-kezelések következtében mérhető alacsonyabb cytosol Ca^{2+} -szinttel párhuzamosan csökkent porcképződést detektáltunk a 6. tenyésztési nap végére, a citoplazma

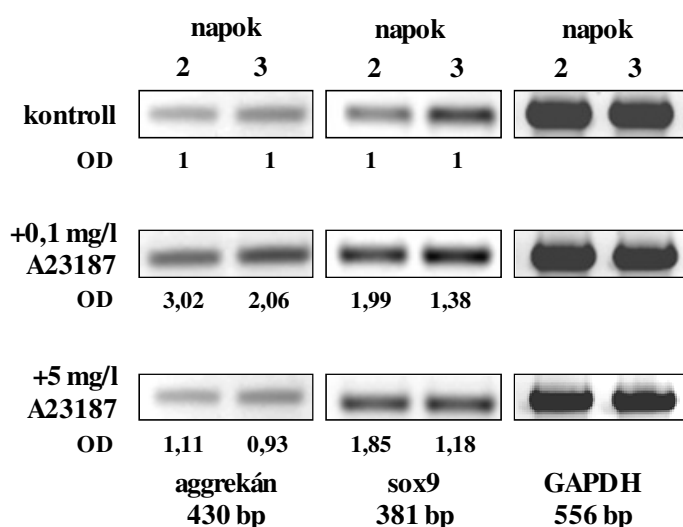
kalciumkoncentrációjának megemelése ennél ellentmondásosabb hatással volt a chondrogenezisre. A kétféle koncentrációban alkalmazott ionofor-kezeléseket követően ugyanis éppen ellenkező hatásokat figyeltünk meg (4.10. ábra). A kisebb koncentrációjú (0,1 mg/l) A23187-kezelések után szignifikánsan fokozottabb matrixtermelést detektáltunk a 6. napon. Ez az erőteljes porcképződést serkentő hatás még kifejezettebb volt, ha a 0,1 mg/l koncentrációjú A23187-kezelést a 3. napon végeztük el; ekkor a kezeletlen kontroll kultúrákhoz képest több mint 50%-kal több matrixot detektáltunk. A kultúrák nemcsak síkbeli kiterjedésükben, hanem vastagságukat tekintve is terebélyesebbé váltak. Ezzel szemben, ha a kultúrákat a magasabb (5 mg/l) koncentrációjú ionoforral kezeltük 1 órán át, a 6. napra jelentősen visszaesett a matrixtermelés mértéke (4.10. ábra). Különösen akkor láttunk kifejezett gátlóhatást, ha a kezelést a tenyésztés 2. napján végeztük el: ekkor a kezeletlen kontroll kultúrák matrix-mennyiségének csupán mintegy 35%-át tudtuk kimutatni.



4.10. ábra. A23187 Ca^{2+} -ionofor hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A felvételek 5 kísérlet adatai közül a jellemző változásokat mutatják. A kultúrák festését 3% ecetsavban oldott DMMK-kel végeztük. Az eredeti nagyítás 4× volt. A zárójelben szereplő értékek az erősen szulfált GAG-okhoz kötődött, majd abszolút etanol és 8% sósav elegyével a kultúrákból visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD_{625}) adatai $\pm 6\%$. Az adatok csoportonként 10 minta átlagát mutatják. Csillagokkal (*) jelöltük a kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (* $P < 0,01$) változásait. Skála: 500 μm .

Az EGTA-kezelések molekuláris szintű hatásának felderítéséhez hasonlóan RT-PCR és Western blot analíziseket végeztünk az A23187 Ca^{2+} -ionoforral kezelt kultúrákon (4.11. és

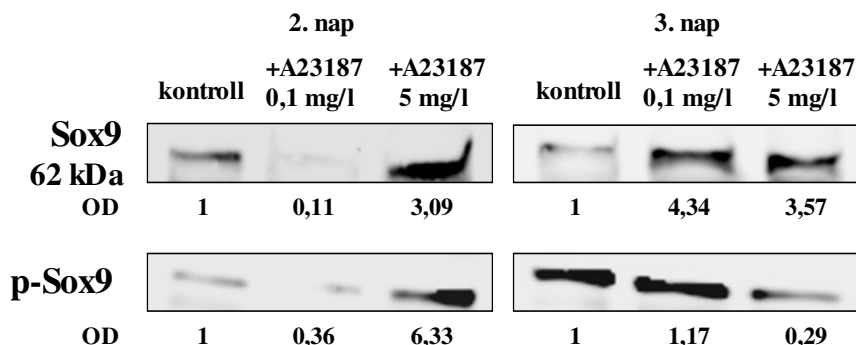
4.12. ábra). A kisebb, 0,1 mg/l koncentrációjú ionofor hatására mind a Sox9-et, mind pedig az aggregán tengelyfehérjét kódoló gén mRNS-e fokozott expressziót mutatott (4.11. ábra), ami összhangban van a 6. napon megfigyelt erőteljesebb matrixtermeléssel. A magasabb (5 mg/l) koncentrációnál a kapott eredmények azonban nem egyértelműek: ekkor ugyanis – a 6. napra erőteljesen lecsökkent matrixképződéssel ellentétben – a sox9 esetén nem tapasztaltunk csökkenést, míg a Sox9 mRNS-expressziója kismértékben csökkent. Ezek alapján valószínűsíthetjük, hogy a magasabb koncentrációjú ionoforral kezelt kultúrákban a porcmatrix képződésének erőteljesen lecsökkent volta nem a Sox9-útvonál változásaival magyarázható.



4.11. ábra. A23187 Ca^{2+} -ionofor-kezelés hatása a porcképződés monitorozására használt markergének expressziójára. Az RT-PCR-reakciók kontrolljaként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk. Az ábrán szereplő eredmények 5 kísérlet eredményei közül a jellemző változásokat mutatják.

A Sox9 fehérje mennyiségének vizsgálata sem oldotta fel a fenti ellentmondást (4.12. ábra). A Western blot analízisek eredményeiből az derült ki, hogy a 2. tenyésztési napon – várakozásainkkal ellentétben – a magasabb koncentrációjú ionofor-kezelést követően nőtt meg a Sox9 fehérje mennyisége és foszforilációs szintje, míg a kis koncentrációjú kezelés hatására mindkét esetben épp ellenkező változást: csökkenést tapasztaltunk a kezeltetlen kontroll kultúrákhoz képest. A 3. napon csak a foszfo-Sox9 változásai állnak összhangban korábbi megfigyeléseinkkel: a kis koncentrációjú ionoforral történő kezelés hatására csekély mértékben ugyan, de nőtt a foszforilált fehérje szintje, míg az 5 mg/l koncentráció erőteljesen csökkentette azt. A nem foszforilált fehérje mennyisége azonban ugyanolyan változási tendenciát mutat mindkét koncentrációjú Ca^{2+} -ionofor kezelést követően. Ezek az

eredmények is alátámasztják a fenti feltételezésünket, miszerint ezek a változások minden bizonnyal nem a Sox9-útvonalon keresztül nyilvánulnak meg. A cytosol Ca^{2+} -szintjének kalcium-ionoforral történő megemelése és a porcdifferenciáció szabályozása közötti kapcsolat pontos mibenlétét további kísérletekkel szeretnénk vizsgálni.



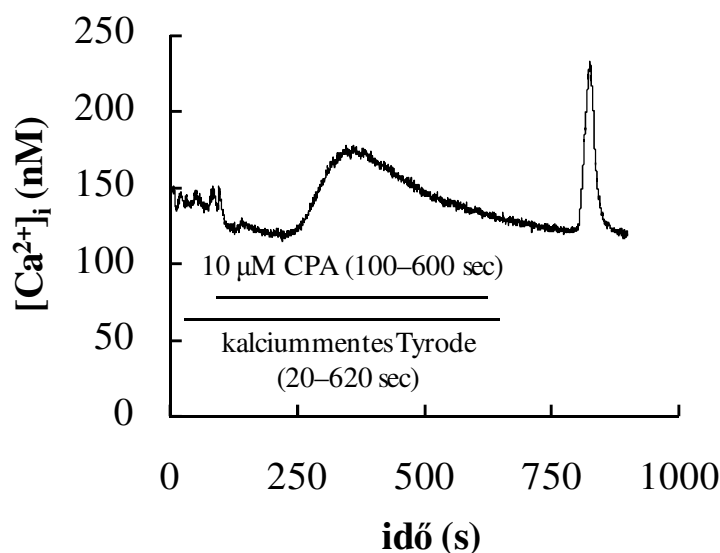
4.12. ábra. A chondrogenezist irányító Sox9 fehérjeexpressziójának és foszforiláltsági szintjének változása A23187 kalcium-ionoforral történő 1 órás kezelés hatására. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk. Az ábrán szereplő eredmények 5 független kísérlet adatai közül a jellemző változásokat mutatják.

4.1.5. A chondrogenikus sejtek belső raktárai tartalmazzanak bizonyos mennyiségű kalciumot, de ez nyugalmi körülmények között nem befolyásolja jelentősen a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisát

Miután megvizsgáltuk, hogy a HD-kultúrák chondrogenikus sejtjeinek cytosol szabad Ca^{2+} -szintje érzékenyen függ a külső tér kalciumkoncentrációjától, kíváncsiak voltunk arra is, hogy a belső kalciumraktárak (elsősorban az endoplasmaticus retikulum) milyen szerepet játszanak a nyugalmi Ca^{2+} -koncentráció kialakításában.

Elsőként a belső raktárak töltöttségét vizsgáltuk. Ismeretes, hogy az endoplasmaticus retikulum cisztárnáiban raktározott kalcium dinamikus kapcsolatban áll a cytosol Ca^{2+} -tartalmával: a nagy koncentráció-gradiens következtében a raktározott kalciumionok spontán módon, a membránban elhelyezkedő Ca^{2+} -csatornákon keresztül a citoplazmába távozhatnak, ahonnan aktív pumpamechanizmusok (például a már említett SERCA) juttatják vissza a kalciumot a raktárakba. A Ca^{2+} -ATPáz működése rendkívül fontos a raktárak töltöttsége szempontjából, így ha a pumpát gátoljuk, az ER cisztárnáiból a kalciumionok a cytosolba ürülnek, ahol a Ca^{2+} -szint átmeneti emelkedése figyelhető meg. Kísérleteinkhez a SERCA egyik inhibitorát, a ciklopiazonsavat (CPA) használtuk, és a méréseket 3 napos sejteken végeztük. Kalciumméréskor a CPA-t mikropapillárisal juttattuk az éppen vizsgált sejt

közvetlen közelébe. Mivel a CPA-t kalciummentes Tyrode-oldatban hígítottuk a kívánt 10 μM koncentrációra, a mérés megkezdése előtt a sejtek közeléből kalciummentes Tyrode-oldat lokális alkalmazásával el kellett távolítanunk a vizsgálatainkat zavaró szabad Ca^{2+} -ionokat. Megfigyelhető, hogy a szabad cytosol Ca^{2+} -koncentráció milyen érzékenyen reagál az extracelluláris kalciumionok eltávolítására: a kiindulási, mintegy 140 nM-os értékről rövid idő alatt ~120 nM-os értéken stabilizálódik, ami megint csak arra hívja fel a figyelmet, hogy a HD-kultúrák mesenchymalis sejteinek Ca^{2+} -homeosztázisa érzékenyen függ az extracelluláris térség kalciumkoncentrációjától (4.13. ábra). A CPA-t mintegy 8 percen át adagoltuk. Körülbelül 2 perc elteltével a cytosol kalciumkoncentrációja lassú emelkedésbe kezdett, ami egyértelműen arra utal, hogy a sejtek endoplasmaticus retikuluma – bár nem túl nagy mennyiségben, de – kalciumraktárként is funkcionál. Mindazonáltal a regisztrátum lefutásából azt a következtetést vonhatjuk le, hogy egyrészt az ER ciszternái nem tartalmazznak túl sok kalciumot, másrészt a szivárgás üteme nem túl nagy (4.13. ábra).

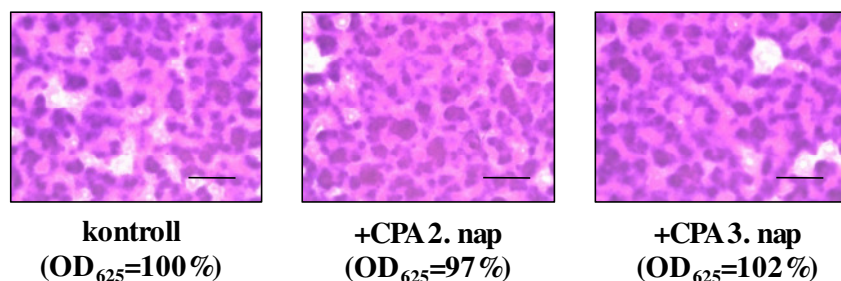


4.13. ábra. Ciklopiazonsav (CPA) hatása a 3 napos HD-kultúrák sejteinek szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációjára. A CPA-t kalciummentes Tyrode-ban oldottuk. Az ábrán szereplő reprezentatív regisztrátum 5 független kísérlet során mért 30 sejten megfigyelt változási tendenciát mutatja.

A regisztrátumon az is látható, hogy a CPA adagolását követően, az extracelluláris térség kalciumkoncentrációjának (1,8 mM) visszaállításakor egy határozott Ca^{2+} -tranziens jelent meg (4.13. ábra). A cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának átmeneti megemelkedése a raktárak által irányított kalciumbelépés (SOCE) jelenségének tulajdonítható: a raktárak kimerülése valamilyen, eddig általunk részleteiben nem vizsgált folyamaton keresztül gyors Ca^{2+} -beáramlást indukált, s az így belépett kalciumionok rövidesen feltehetőleg a raktárakba

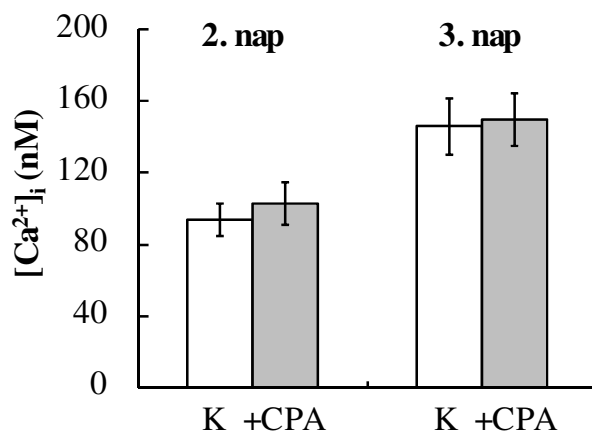
kerültek. A folyamat lépéseit további kísérletekkel szeretnénk tisztázni, jelen munka keretein belül csak a jelenséget figyeltük meg.

Ahhoz, hogy megállapíthassuk, hogy a differenciálódás napján megfigyelt megemelkedett cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának kialakításában a belső raktárakban tárolt kalciumionok is szerepet játszanak-e, további kísérleteket végeztünk. A CPA-t nemcsak kalciumméréskor és rövid (~10 perc) ideig adagoltuk a sejtekhez, hanem bizonyos kultúrákat a 2., illetve a 3. tenyésztési napon 12 órán át CPA folyamatos jelenlétében tenyésztettünk. Noha ennek a meglehetősen hosszú ideig tartó gátlásnak minden bizonnyal teljesen ki kellett ürítenie a belső raktárakat, mégsem láttunk változást a 6. napon a képződött porcmatrix mennyiségét tekintve (4.14. ábra). A kezeléseket követően a cytosol szabad Ca^{2+} -koncentrációja kismértékben, de nem szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kezeltlen kontroll kultúrák sejteiben mérhetőnél (4.15. ábra), ami bizonyára az imént említett SOCE-útvonalak aktiválódásának következménye.



4.14. ábra. 12 órás ciklopiazonsav-kezelés hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A felvételek 5 kísérlet adatai közül a jellemző tendenciákat mutatják. A kultúrák festését 3% ecetsavban oldott DMMK-kel végeztük. Az eredeti nagyítás 4× volt. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd abszolút etanol és 8% sósav elegyével a kultúrákból visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD_{625}) adatai $\pm 7\%$. A számértékek csoportonként 10 minta átlagát mutatják. Skála: 500 μm .

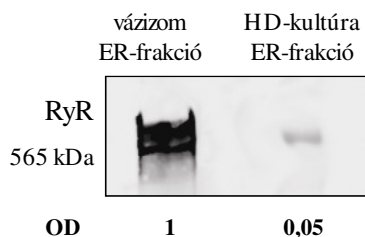
Ha a 12 órás CPA-kezelést 0,8 mM EGTA jelenlétében végeztük el a 2, illetve 3 napos kultúrákon, a tenyésztés végét jelentő 6. napon egyáltalán nem tudtunk metakromáziás porcterületeket kimutatni (nem közölt adatok). Ezek a megfigyelések is arra utalnak, hogy az *in vitro* chondrogenezist rendkívüli mértékben kalcium-dependens folyamatok irányítják: ha ugyanis mind a belső raktárakból, mind pedig a külső térből történő Ca^{2+} -beáramlást gátoljuk, a differenciálódás teljesen elmarad.



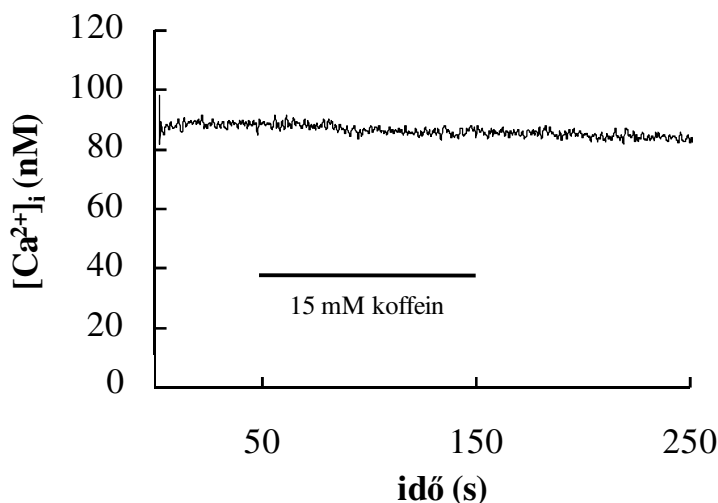
4.15. ábra. A HD-kultúrák sejtjeiben mérhető szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációk kontroll körülmények között és 12 órás CPA-kezelést követően. A méréseket Fura-2 festékkel feltöltött sejteken végeztük, közvetlenül a kezelések után. A diagramon 5 független kísérlet adatai alapján a jellemző tendencia látható. Valamennyi oszlop 30 sejt intracelluláris kalciumszintjének átlagát ábrázolja, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik.

4.1.6. A HD-kultúrák sejtjei rianodinreceptort és IP_3 -receptort is expresszálnak

A fentiekből kiderült, hogy a chondrogenikus mesenchymalis sejtek belső raktárai tartalmazznak bizonyos mennyiségű mobilis kalciumot. A raktárak Ca^{2+} -homeosztázisban betöltött szerepének további vizsgálata során arra voltunk kíváncsiak, vajon milyen, a kalcium felszabadításában szerepet játszó csatornafehérjék vannak jelen és funkcionálnak a sejtekben. Elsőként a rianodinreceptorok expresszióját vizsgáltuk. Mivel a teljes sejt-lizátumokból Western blot analízissel nem sikerült kimutatnunk a fehérje jelenlétét, ezért a 3 napos kultúrákból mikroszóma-frakciót izoláltunk. A szeparált ER-frakción elvégezve a Western blot analízist csak meglehetősen gyenge jelet kaptunk (4.16. ábra), ami viszonylag alacsony szintű receptor-expresszióra utal. A rianodinreceptorok funkcionalitását koffein adagolásával vizsgáltuk. Kalciummérés során a vizsgált 3 napos sejtek közvetlen környezetébe mikrokapilláris segítségével koffeint adagoltunk. A rianodinreceptorok funkcionalitása esetén a cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának megemelkedését vártuk volna, azonban a regisztrátumokon egyik esetben sem következett be változás (4.17. ábra). A megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy bár a RyR – ugyan csak kis mennyiségben, de – jelen van a chondrogenikus mesenchymalis sejtek endoplasmaticus retikulumának belső membránrendszerében, nyugalmi körülmények között valószínűleg nem funkcionál, és így bizonyára nem játszik fontos szerepet a szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának szabályozásában.



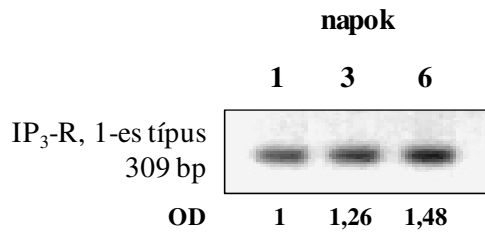
4.16. ábra. Rianodinreceptor-fehérjeexpresszió 3 napos HD-kultúrákból izolált mikroszóma-frakción. A Western blot analízishez vázizomból szeparált mikroszóma-frakciót használtunk kontrollként, és az optikai denzitás (OD) értékét is erre normáltuk. Reprezentatív adatok 3 független kísérlet adataiból.



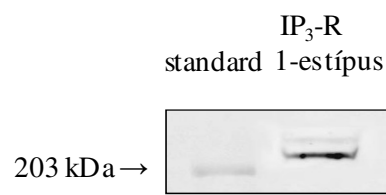
4.17. ábra. Koffein hatása a 3 napos HD-kultúrák sejteinek szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációjára. A koffeint normál Ca^{2+} -tartalmú Tyrode-ban oldottuk. Az ábrán szereplő reprezentatív regisztrátum 3 független kísérlet során mért 15 sejten megfigyelt tendenciát mutatja.

A RyR tanulmányozása után a szintén az ER membránjában lokalizálódó Ca^{2+} -csatornaféleség, az IP_3 -receptorok expresszióját vizsgáltuk. Az IP_3 -R háromféle izotípusa közül csak az 1-es típusú receptor mRNS-ét sikerült kimutatnunk RT-PCR-reakciókkal, melynek expressziója a tenyésztés – és a differenciálódás – előrehaladtával egyre fokozódik (4.18/a. ábra). Az IP_3 -R fehérjét azonban – a RyR-hez hasonlóan – csak a szeparált mikroszóma-frakcióból sikerült detektálnunk Western-blot technikával, és még ebben az esetben is meglehetősen gyenge jelet kaptunk (4.18/b. ábra). Az IP_3 -R alacsony expressziója szintén alátámasztja az eddigieket: a chondrogenikus sejtek belső raktárai valószínűleg nem játszanak fontos szerepet a nyugalmi kalciumszint és a differenciálódáskor megjelenő magasabb cytosol Ca^{2+} -koncentráció szabályozásában.

A. RT-PCR reakció



B. Western blot



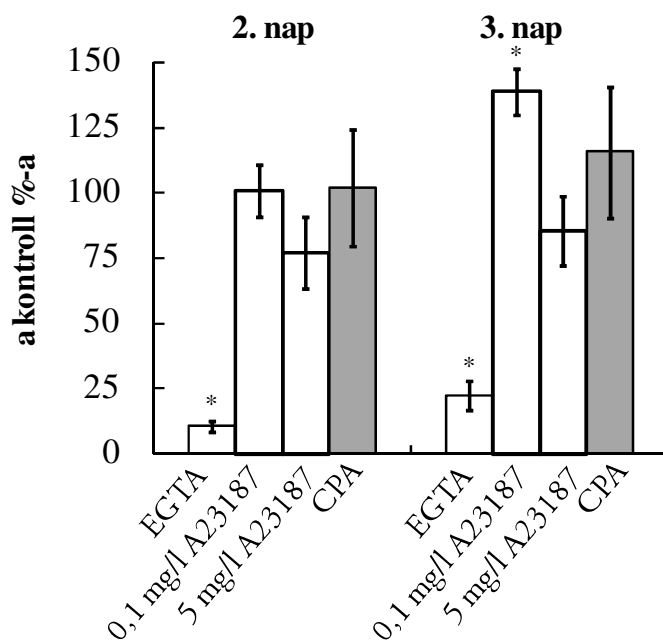
4.18. ábra. Az IP₃-receptor 1-es típusának mRNS- és fehérjeexpressziója. A. A receptor mRNS-ének azonosítása RT-PCR reakcióval. A reakciók kontrolljaként GAPDH-t használtunk (az ábrán nem szerepel). Az optikai denzitás (OD) értékeit az 1. napos kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk. B. A receptor fehérjeexpressziójának vizsgálata 3 napos HD-kultúrákból izolált mikroszóma-frakción. Reprezentatív adatok 3 független kísérlet adataiból.

4.1.7. Az EGTA, az A23187 Ca²⁺-ionofor és a CPA hatása a HD-kultúrák sejteinek osztódási rátájára, mitokondriális aktivitására és túlélőképességére

Amint azt a porcdifferenciációs modellek bemutatásánál is hangsúlyoztuk, az *in vitro* porcdifferenciáció lépései nagymértékben függenek a sejtszámtól: ha a sejtek sűrűsége nem optimális, nem alakulnak ki a megfelelő sejt–sejt és sejt–matrix kapcsolatok, és mivel a sejtek differenciálódási programja zavart szenved, a 6. napra detektálható porcmatrix mennyisége is lecsökken. Ennek megfelelően, ha a sejtek osztódási rátája és/vagy mitokondriális aktivitása („életképessége”), illetve az apoptotikus/nekrotikus sejthalálának üteme módosul valamelyik korábban alkalmazott vegyület hatására, a tenyésztés végén megfigyelt csökkent mértékű porcképződés csupán az alacsonyabb osztódási, illetve magasabb sejtpusztulási ráta eredményeképpen kialakuló kisebb sejtszám következménye is lehet.

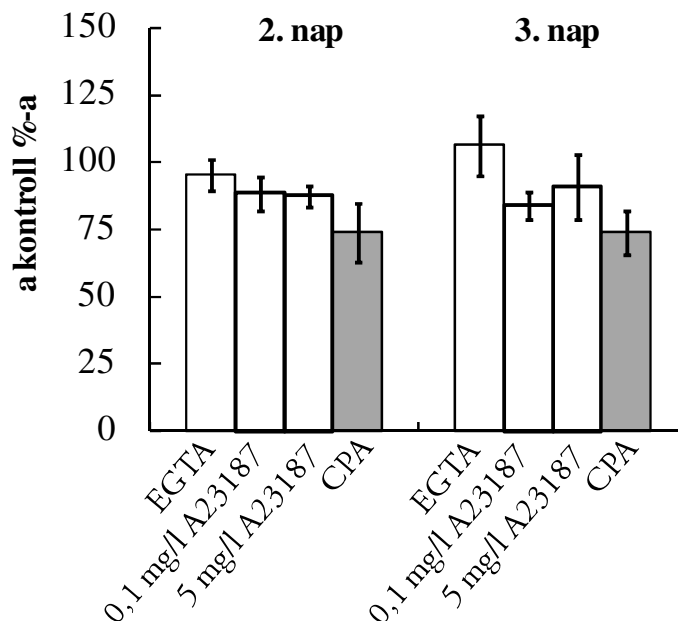
Elsőként a sejtek osztódóképességét vizsgáltuk (4.19. ábra). A méréseket radioaktív izotóppal jelzett timidin beépülésének monitorozásával, közvetlenül a kezeléseket követően végeztük, a 2. és a 3. napon. Megfigyelhető, hogy a 12 órás EGTA-kezelés hatására a sejtek osztódási rátája mindkét napon drámaian lecsökkent. Különösen nagymértékű csökkenést figyeltünk meg a 2. napi kezelésekre: ekkor a kezeletlen kontroll kultúrákban mérhető értékek alig valamivel több mint 10%-át detektáltuk. Az ionofor két különböző koncentrációja – várakozásunknak megfelelően – eltérő hatással volt a sejtek osztódóképességére: a nagyobb, 5 mg/l-es koncentrációban kismértékű, de nem szignifikáns csökkenést okozott, míg a kisebb (0,1 mg/l) koncentrációban alkalmazva a 3. napon

szignifikánsan fokozta a sejtek proliferációját. A CPA egyik napon sem befolyásolta jelentősen a sejtek osztódási rátáját.



4.19. ábra. EGTA, A23187 Ca^{2+} -ionofor és CPA hatása a HD-kultúrák sejtjeinek osztódóképességére. A sejtek proliferációs rátáját ^3H -timidin beépülésének vizsgálatával monitoroztuk. A méréseket közvetlenül a kezeléseket követően végeztük. Az ábrán szereplő adatok 5 független kísérlet közül a jellemző változásokat mutatják. Az ábrázolt értékek 10–10 kultúrára vonatkozó átlagok a megfelelő kezletlen kontroll kultúrákhoz viszonyítva, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Csillagok (*) jelölik a kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns (* $P < 0,01$) különbségeket.

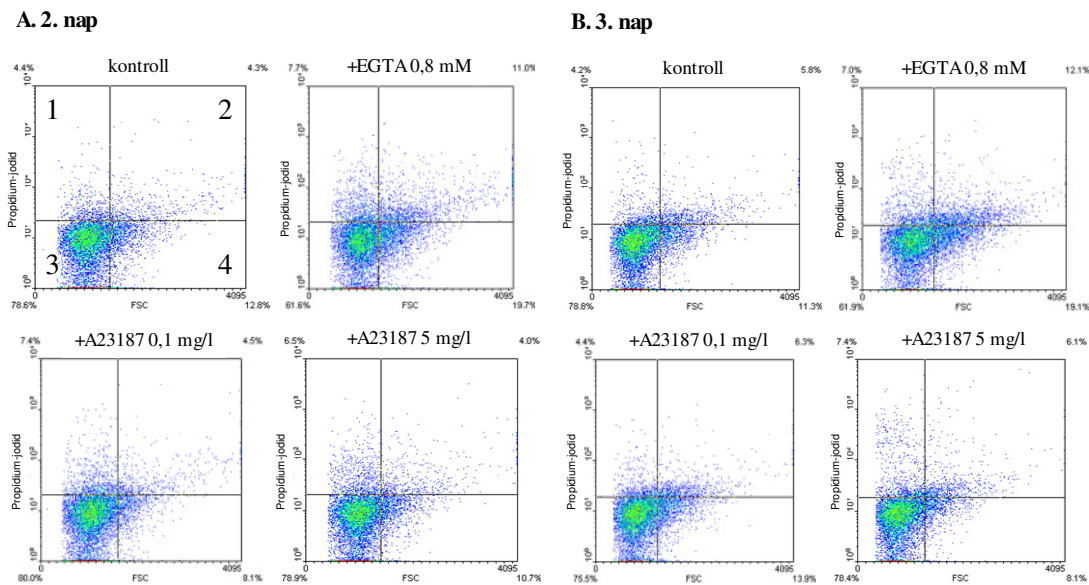
A HD-kultúrák sejtjeinek mitokondriális aktivitását, ami az aktuálisan jelen lévő sejtek számával („életképességével”) arányos, MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk (4.20. ábra). A méréseket szintén közvetlenül a kezeléseket után, a 2. és 3. tenyésztési napon egyaránt elvégeztük. Látható, hogy – a proliferációs teszt eredményeivel szöges ellentétben – sem az EGTA, sem az ionofor nem befolyásolta érdemben a sejtek mitokondriális aktivitását. A CPA – csakúgy, mint a sejtek osztódóképességére – a mitokondriális aktivitásra sem volt érdemleges hatással.



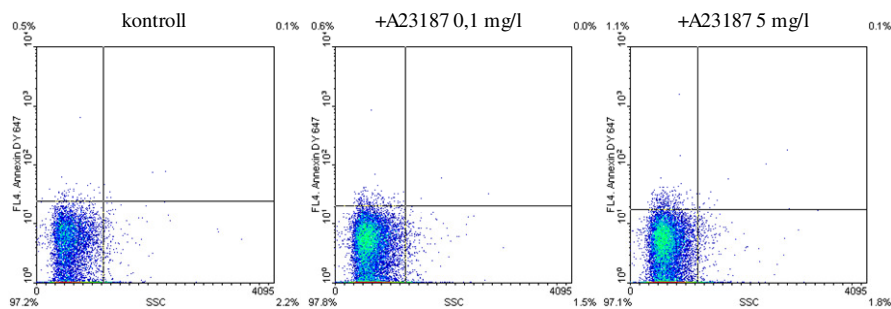
4.20. ábra. EGTA, A23187 Ca^{2+} -ionofor és CPA hatása a HD-kultúrák sejtjeinek mitokondriális aktivitására. A sejtek mitokondriális aktivitását („életképességét”) MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A méréseket közvetlenül a kezeléseket követően végeztük. Az ábrán szereplő adatok 5 független kísérlet közül a jellemző változásokat mutatják. Az ábrázolt értékek 10–10 kultúrára vonatkozó átlagok a megfelelő kezeltlen kontroll kultúrákhoz viszonyítva, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Statisztikailag szignifikáns (* $P < 0,01$) változásokat nem tudunk kimutatni.

A fenti tesztek azonban csak populációs szintű vizsgálatok elvégzésére alkalmasak, s az eredmények helyes interpretálása nem mindig egyszerű. Ezért eddigi méréseinket kiegészítendő mindkét napon FACS-vizsgálatokat is végeztünk, melyek során egyértelműen megítélhetővé vált a nekrotizáló sejtek aránya (4.21. ábra). Az áramlási citometriás vizsgálat előtt a sejteket propidium-jodiddal inkubáltuk, ami a nekrotizáló sejtek DNS-éhez kötődve szelektíven megjelöli azokat. Megfigyeltük, hogy EGTA hatására a nekrotizáló sejtek aránya is emelkedést mutat: a 2. napon a sejtek 10%-a, míg a 3. napon 9,1%-a jelölődött. Az ionofor egyik koncentrációban sem okozott jelentős nekrotikus sejtpusztulást: a kisebb, 0,1 mg/l koncentráció esetén a 2. napon a sejtek 3,2%-a, a 3. napon 0,7%-a mutatott PI-pozitivitást, míg az 5 mg/l koncentráció hatására ugyanezek a paraméterek rendre 1,8% és 3,5% értéket mutattak. Mivel a magasabb koncentrációjú ionofor-kezelés jelentősen gátolta a 6. napon mérhető porcmatrix-termelést, de voltaképpen egyik vizsgált paramétert sem befolyásolta érdemben, ezért megvizsgáltuk, vajon a sejtek apoptotikus rátájára van-e valamilyen hatással. A vizsgálatokat szintén áramlási citometriával végeztük (4.22. ábra), a mérések előtt a 3 napos kultúrák sejtjeit foszfatidilszerin-érzékeny annexin-reagens jelenlétében inkubáltuk.

Megfigyeltük, hogy az A23187 egyik alkalmazott koncentrációban sem emelte meg a sejtek apoptotikus rátáját (rendre 0,1%, illetve 0,6% emelkedést detektáltunk).



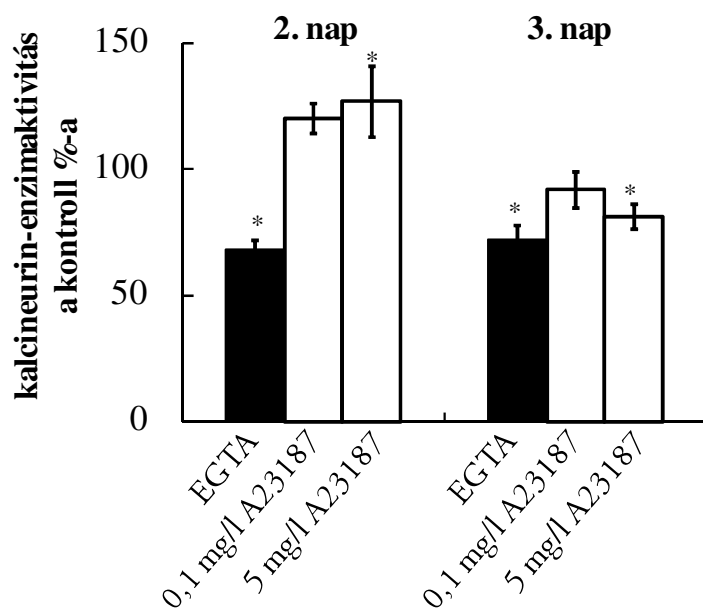
4.21. ábra. EGTA és A23187 Ca^{2+} -ionofor hatása a HD-kultúrák sejteinek nekrotikus rátájára. A vizsgálatokat áramlási citometriával végeztük, közvetlenül a kezeléseket követően. Az ábrán szereplő adatok 5 független kísérlet közül a jellemző változási tendenciákat mutatják. Az A panel 1. diagramján látható számok a megfelelő kvadránsokban lévő sejtpopulációkra utalnak. 1–2: a propidium-jodidot felvett (nekrotikus); 3–4: propidium-jodidot fel nem vett (élő) sejtek.



4.22. ábra. A23187 Ca^{2+} -ionofor hatása a HD-kultúrák sejteinek apoptotikus rátájára. A vizsgálatokat áramlási citometriával végeztük, közvetlenül a kezeléseket követően a 3. napon. Az ábrán szereplő adatok 3 független kísérlet közül a jellemző változásokat mutatják. A diagramok kvadránsaiban lévő sejtpopulációkra eloszlása a fentiekhez hasonló, azzal a különbséggel, hogy az 1–2. kvadráns az annexin-pozitív (apoptotikus), a 3–4. kvadráns az annexin-negatív (élő) sejteket tartalmazza.

4.1.8. A kalcineurin aktivitása és expressziója érzékenyen reagál a cytosol kalciumkoncentrációjának változásaira

Mivel a Ca^{2+} -szenzitív protein-foszfatazok közé tartozó *kalcineurin* a chondrogenézis egyik fontos pozitív regulátora, megvizsgáltuk, vajon módosul-e, és ha igen, hogyan változik a kalcineurin enzimatiskus aktivitása és expressziója, ha beavatkozunk a HD-kultúrák sejtjeinek Ca^{2+} -homeosztázisába. Elsőként az enzimaktivitás-méréseket végeztük el (4.23. ábra). Megfigyeltük, hogy EGTA-kezelés következtében mindkét vizsgált napon – bizonyára a szabad cytosol Ca^{2+} -koncentráció csökkenése eredményeképpen – jelentősen alacsonyabb értékeket detektáltunk. A cytosol kalciumkoncentráció emelésének már kevésbé egyértelmű hatásait figyeltük meg: a 2. napon az ionofor mindkét koncentrációjának hatására az enzim aktivitása is fokozódott; a változás elsősorban a magasabb koncentrációnál bizonyult jelentősnek. A 3. napon érdekes módon mindkét koncentráció esetében csökkent a kalcineurin aktivitása; 5 mg/l koncentráció esetén statisztikailag szignifikáns csökkenést tapasztaltunk.

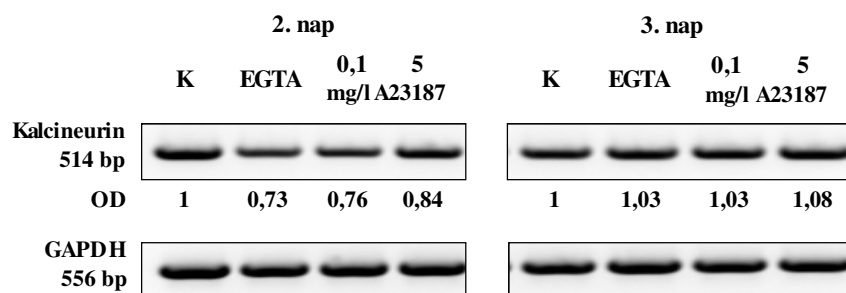


4.23. ábra. EGTA és A23187 Ca^{2+} -ionofor hatása a kalcineurin enzimaktivitására. A méréseket közvetlenül a kezeléseket követően végeztük. A diagramon szereplő értékek 3 független kísérlet eredményének átlagai, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (* $P < 0,01$) változásait csillagokkal (*) jelöltük.

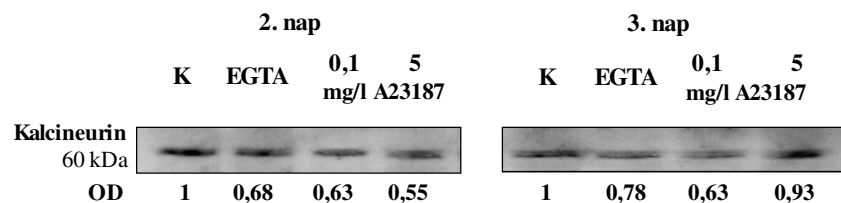
Az enzim aktivitásának változása nemcsak valódi, biokémiai aktivitásváltozást tükrözhet, hanem a lecsökkent kalcineurinexpresszió másodlagos hatása is lehet. Ennek

kiderítésére RT-PCR reakciókat és Western blot analízist végeztünk, hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolja az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció módosulása az enzim mRNS- és fehérjeszintű expresszióját (4.24. ábra). Megfigyelhető, hogy a kalcineurin mRNS-szintje csak a 2. napi kezeléseket követően mutat bármilyen változást, a 3. napon gyakorlatilag változatlan marad. A 2. napon az alacsonyabb mRNS-szint eredményeképpen csökkent fehérjeexpressziót detektáltunk valamennyi kezelés hatására, míg a 3. napon csak az alacsonyabb ionofor koncentráció alkalmazása okozott látványos kalcineurin fehérje-szint csökkenést. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy az enzimaktivitás-mérések során, az ionofor-kezelések nyomán detektálható magasabb aktivitási értékek valóban funkcionális változásokat tükröznek.

A. RT-PCR analízis



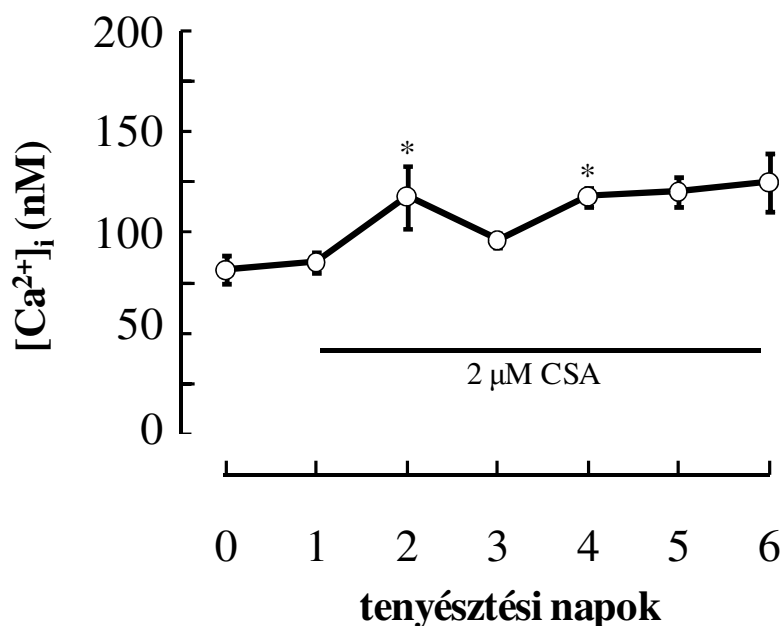
B. Western blot



4.24. ábra. 0,8 mM EGTA, valamint 0,1 és 5 mg/l A23187 Ca^{2+} -ionofor hatása a kalcineurin mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B). Az analíziseket közvetlenül a kezelések befejezése után végeztük. Az ábrán szereplő reprezentatív eredmények 3 független kísérlet során kapott jellemző tendenciákat mutatják. Az RT-PCR reakciókhoz GAPDH-t használtunk kontrollként. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

A kalcineurin az *in vitro* chondrogenézis pozitív regulátora. Inhibitora, a ciklosporin-A (CsA) 2 μM koncentrációban alkalmazva az enzim aktivitását mintegy 40%-kal csökkenti a chondrogenikus sejtekben, és ezzel párhuzamosan a tenyésztés végét jelentő 6. napra a képződött porcmatrix mennyisége is jelentős, mintegy 80% csökkenést mutat [22]. Ezért a fenti mérések elvégzése után arra is kíváncsiak voltunk, vajon hogyan befolyásolja a cytosol

Ca^{2+} -koncentrációját a calcineurin farmakológiai gátlása. Bizonyos kultúrák tápfolyadékához a tenyésztés 1. napjától kezdve $2\ \mu\text{M}$ CsA-t adtunk, és az így kezelt sejtekben mindennap megmértük a cytosol szabad Ca^{2+} -koncentrációját (4.25. ábra). A CsA-kezelés hatására a kezeletlen kontroll kultúrák Ca^{2+} -koncentrációjához képest szinte minden esetben magasabb értékeket mértünk, azonban a kontroll körülmények között megfigyelhető, a differenciálódás napjára jellemző Ca^{2+} -csúcs elmaradt, míg az ezt megelőző, 2. napon egy kisebb, de szignifikáns csúcsot detektáltunk.



4.25. ábra. Ciklosporin-A ($2\ \mu\text{M}$) hatása a HD-kultúrák sejtjeiben mérhető cytosol Ca^{2+} -koncentrációra a tenyésztés során. A Ca^{2+} -koncentrációt Fura-2-vel töltött sejtekben mértük. A CsA az 1. tenyésztési naptól kezdve folyamatosan jelen volt a sejtek tápfolyadékában. A reprezentatív grafikon 5 független kísérlet során tapasztalt jellemző változásokat mutat. Az ábrázolt pontok mindegyike 30 sejt intracelluláris kalciumszintjének átlaga, a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Csillagok (*) mutatják az egymást követő napok közötti statisztikailag szignifikáns (* $P < 0,01$) különbségeket.

4.2. Az oxidatív stressz *in vitro* porcképződésre kifejtett hatásainak vizsgálata

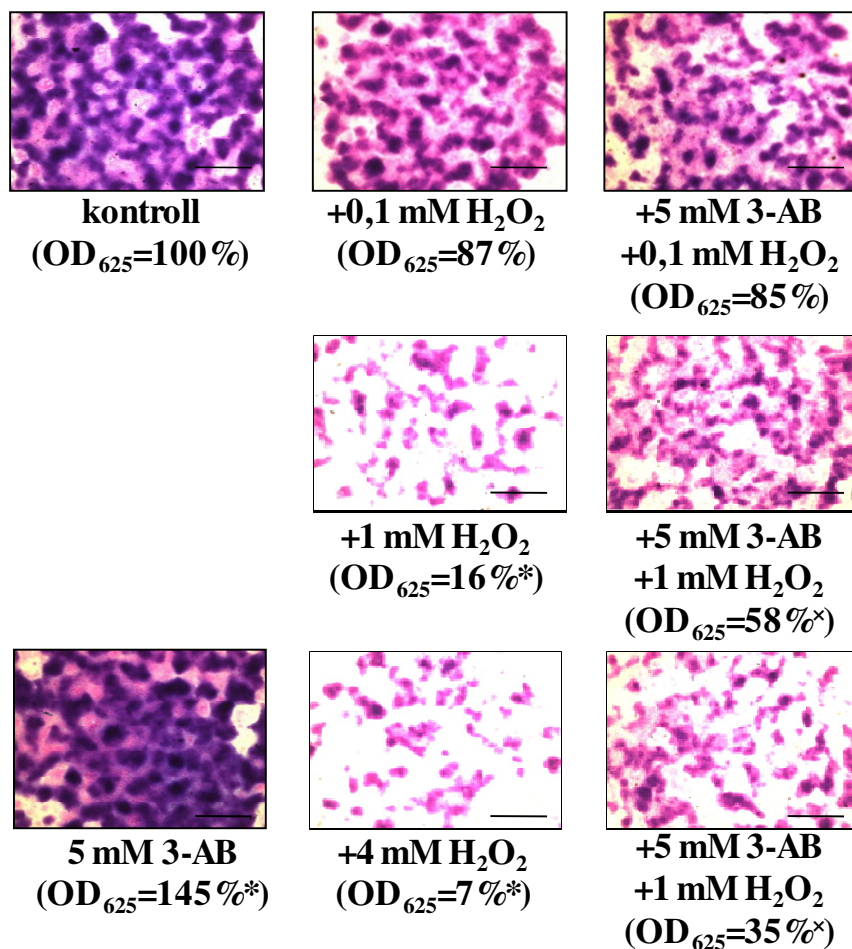
4.2.1. Az oxidatív stressz poli(ADP-ribóz)-polimeráz-dependens módon

gátolja a porcdifferenciációt

Korábbi kísérleteink során már kimutattuk, hogy a reaktív oxigéngyökök (például a hidrogén-peroxid) koncentrációfüggő módon gátolják a 6. napon metakromáziás festéssel kimutatható matrixképződést, ha a kezeléseket a differenciálódást megelőző 2. napon, illetve a differenciálódás napján, a 3. napon végezzük [22]. Kísérleteink folytatásaként kíváncsiak voltunk, vajon a reaktív nitrogéngyökök is hasonló hatással bírnak-e. Ezért a tenyésztés 2. napján peroxinitritet adtunk a kultúrák tápfolyadékához. Azon kultúrák adatai, melyeket a tenyésztés 3. napján kezeltünk a fenti anyagokkal, terjedelmi korlátok miatt nem szerepelnek az értekezésben, de a megfigyelt változások gyakorlatilag azonosak voltak a 2. napos kezelések eredményeivel. A 6. napon elvégzett metakromáziás festések eredményeiből látható, hogy a peroxinitrit a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stresszhez hasonlóan koncentrációfüggő módon gátolta a porcképződést: 600 μM koncentrációban a kezeletlen kontroll kultúrákban képződött matrixmennyiségnek alig 5%-át tudtuk kimutatni (4.26. és 4.27. ábra).

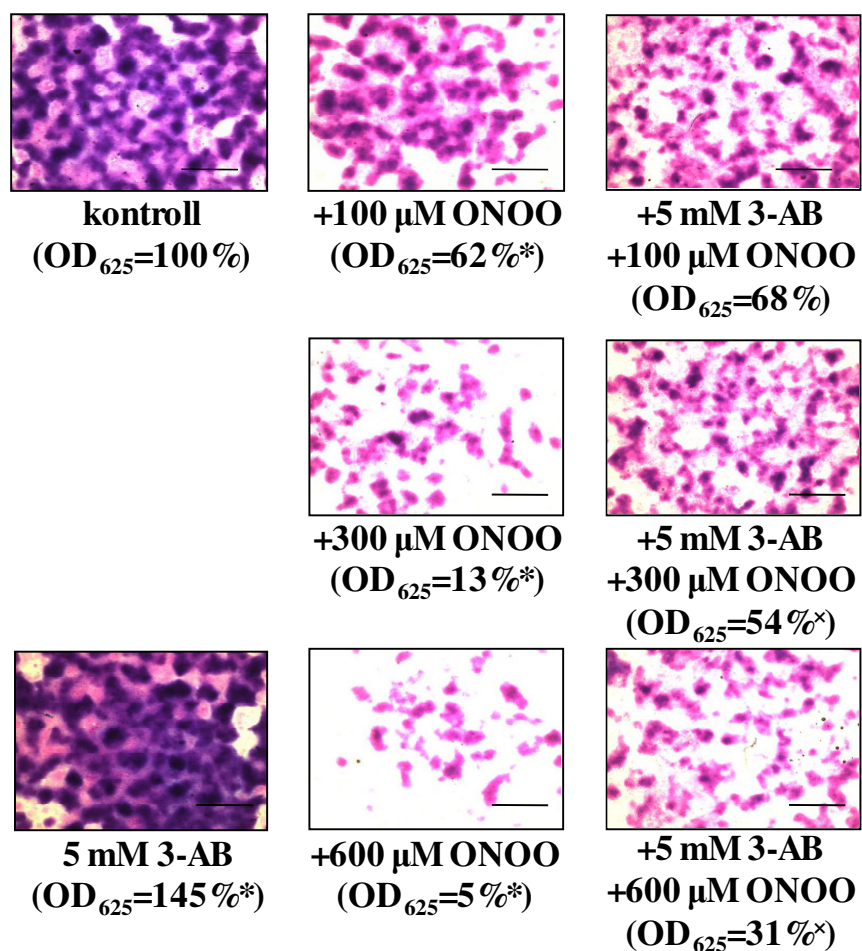
Annak eldöntésére, hogy poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok is szerepet játszanak-e a matrixtermelés csökkenésében, bizonyos kultúrákat az oxidatív stressz kiváltása előtt a PARP egyik inhibitorával, 5 mM koncentrációjú 3-aminobenzamiddal inkubáltuk 30 percen át. Megfigyelhető, hogy a rövid 3-AB-előkezelések jelentős védőhatást biztosítottak az oxidatív stressz kiváltotta porcmatrix-termelés csökkenésének tekintetében; ezek a hatások különösen a magasabb koncentrációjú hidrogén-peroxid, illetve peroxinitrit-kezelések esetén bizonyultak statisztikailag is szignifikánsnak (4.26. és 4.27. ábra). Érdeemes megfigyelni, hogy a folyamatos, a 2. naptól a tenyésztés végét jelentő 6. napig tartó 3-AB-kezelés önmagában is hatással volt a matrixtermelésre: a PARP-inhibitor hatására a kezeletlen kontroll kultúrákban mérhető értékeknek mintegy másfélszeresét kaptuk. Mindezek a hatások arra utalnak, hogy a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok a porcmatrix-termelés negatív regulátorainak tekinthetők.

kezelések a 2. napon



4.26. ábra. Hidrogén-peroxid és 3-aminobenzamid (3-AB) hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A felvételek 4 kísérlet adatai közül a jellemző változásokat mutatják. A kultúrák festését 3% ecetsavban oldott DMMK-kel végeztük. Az eredeti nagyítás 4× volt. A zárójelben szereplő értékek az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd abszolút etanol és 8% sósav elegyével a kultúrákból visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) adatai ± 3%. Az adatok csoportonként 5 minta átlagát mutatják. Csillagokkal (*) jelöltük a kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,01) változásait, a 3-AB által kiváltott szignifikáns (°P<0,01) védőhatásokat kereszt (°) mutatja. Skála: 500 µm.

kezelések a 2. napon



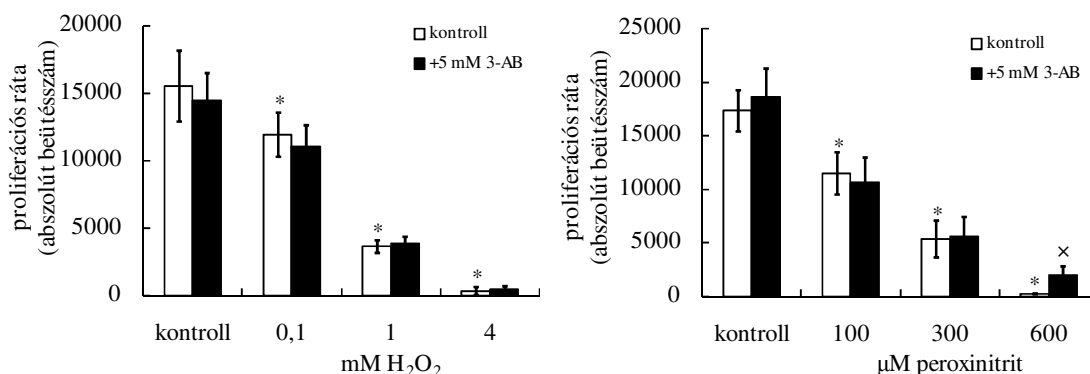
4.27. ábra. Peroxinitrit és 3-AB-kezelés hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A felvételek 4 kísérlet adatai közül a jellemző tendenciákat mutatják. A kultúrák festését 3% ecetsavban oldott DMMK-kel végeztük. Az eredeti nagyítás 4× volt. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd abszolút etanol és 8% sósav elegyével a kultúrákból visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) adatai ± 4%. A számértékek csoportonként 5 minta átlagára vonatkoznak. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,01) változásait csillagok (*) mutatják, a 3-AB által kiváltott szignifikáns ([×]P<0,01) védőhatásokat kereszttel ([×]) jelöltük. Skála: 500 μm.

4.2.2. A 3-AB-kezelések bizonyos mértékben csökkentik a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit káros hatásait

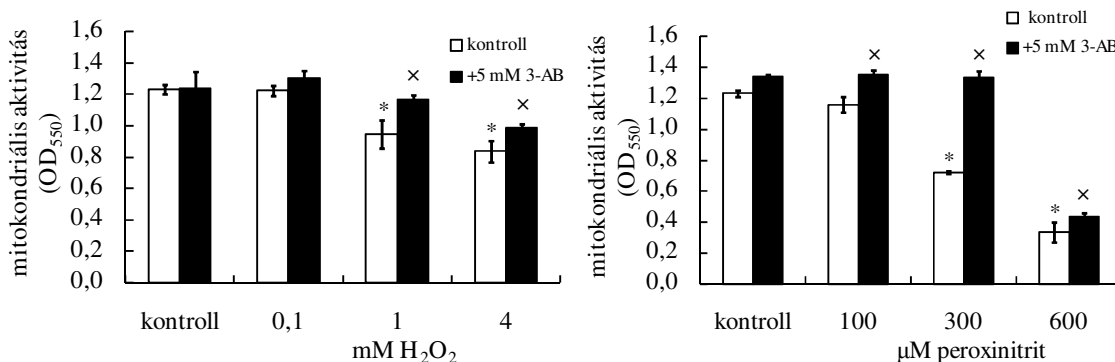
Míthogy az *in vitro* porcdifferenciáció erősen függ a sejtszámtól, ezért – korábbi kísérleteinkhez hasonlóan – az oxidatív stresszt, kiváltó ágensekkel való kezeléseket követően is megvizsgáltuk, hogyan változik a sejtek osztódási rátája és mitokondriális aktivitása. A proliferációs rátát triciált timidin beépülésének monitorozásával detektáltuk. Az eredményeinkből látható, hogy a peroxinitrit – hasonlóan a korábban leírt hidrogén-peroxid hatásához – koncentrációfüggő módon gátolta a sejtek osztódását: már a kis (100 μM) koncentrációjú peroxinitrit is a kezeletlen kontroll értékének mintegy felére csökkentette a sejtproliferációt (4.28. ábra). Megfigyelhető, hogy a 3-AB-előkezelések az osztódási ráta tekintetében gyakorlatilag nem mutatnak védőhatást. A sejtek mitokondriális aktivitása szintén koncentráció-dependens módon csökkent peroxinitrit-kezelések hatására, a hidrogén-peroxid esetében megismert tendenciához hasonlóan (4.29. ábra).

A sejtproliferációs kísérletek eredményeivel összevetve látható, hogy a PARP-aktivitás gátlása 3-AB-vel a legtöbb esetben képes kivédeni a reaktív oxigén- és nitrogéngyökök káros hatásait. A fenti eredmények alapján az oxidatív stressz valószínűleg PARP-independens módon befolyásolja a sejtek osztódási rátáját, de a sejtek mitokondriális aktivitásában bekövetkező csökkenés PARP-dependens folyamatok következménye lehet, mert ez utóbbi hatás az enzim inhibitorával, 3-AB-vel részben kivédhetőnek bizonyult. Ismeretes, hogy a PARP túlzott aktivációja a sejt ATP-, majd NAD^+ -készleteinek kimerüléséhez és így sejthalálhoz vezethet.

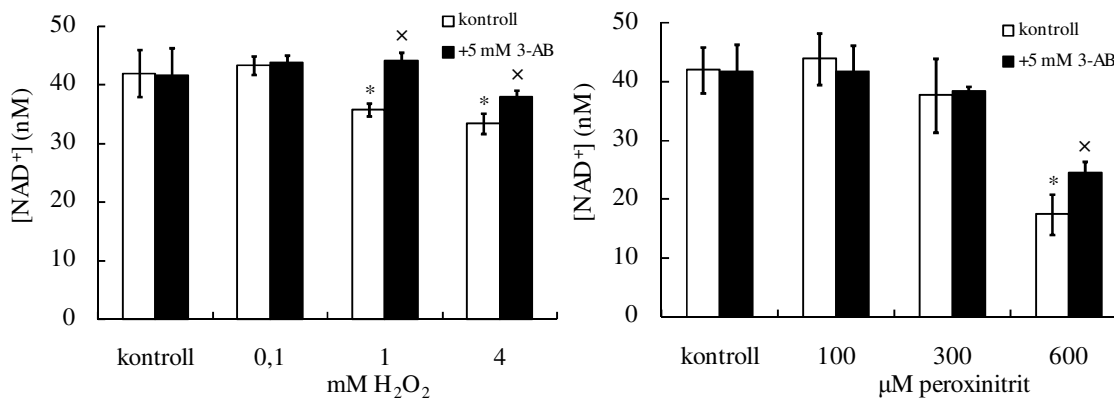
Mivel az MTT-teszttel megfigyelt hatások részben a sejtek NAD^+ -depléciójának következményei is lehetnek, ezért további kísérleteinkben megvizsgáltuk az oxidatív stressznek kitett porcosodó kultúrák sejteiben mérhető NAD^+ -szintet (4.30. ábra). Érdekes módon csak a magas koncentrációjú (1 és 4 mM H_2O_2 , illetve 600 μM peroxinitrit) kezelések hatására találtunk statisztikailag szignifikáns NAD^+ -szint csökkenést. Mivel azonban ezek a hatások legalább részben kivédhetőek voltak 3-AB-előkezelésekkel, joggal feltételezhetjük, hogy a porcosodó HD-kultúrákban az oxidatív stressz által okozott káros hatások kialakításában PARP-dependens folyamatok is szerepet játszanak.



4.28. ábra. Hidrogén-peroxid és peroxinitrit, valamint 3-AB hatása a porcosodó kultúrák sejtosztódására. A sejtek proliferációs rátáját ³H-timidin beépülésének vizsgálatával monitoroztuk. A méréseket 4 órával a kezeléseket követően végeztük a 2. tenyésztési napon. Az ábrán szereplő adatok 3 független kísérlet közül a jellemző változásokat mutatják. Az ábrázolt értékek 10–10 kultúrára vonatkozó átlagok, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Csillagok (*) jelölik a kontrollcsoportéhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns (*P<0,01) különbségeket; kereszt (x) mutatja a 3-AB-előkezelés hatására kimutatható szignifikáns (*P<0,01) eltérést.



4.29. ábra. Hidrogén-peroxid, peroxinitrit és 3-AB hatása a HD-kultúrák sejtjeinek mitokondriális aktivitására. A sejtek mitokondriális aktivitását („életképességét”) MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A méréseket 4 órával a kezeléseket követően végeztük, a 2. tenyésztési napon. Az ábrán szereplő adatok 3 független kísérlet közül a jellemző változásokat mutatják. Az ábrázolt értékek 10–10 kultúrára vonatkozó átlagok, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. A kezeletlen kontroll kultúrákhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns (*P<0,01) változásokat csillagok (*), míg a 3-AB szignifikáns (*P<0,01) védőhatását kereszt (x) jelölik.

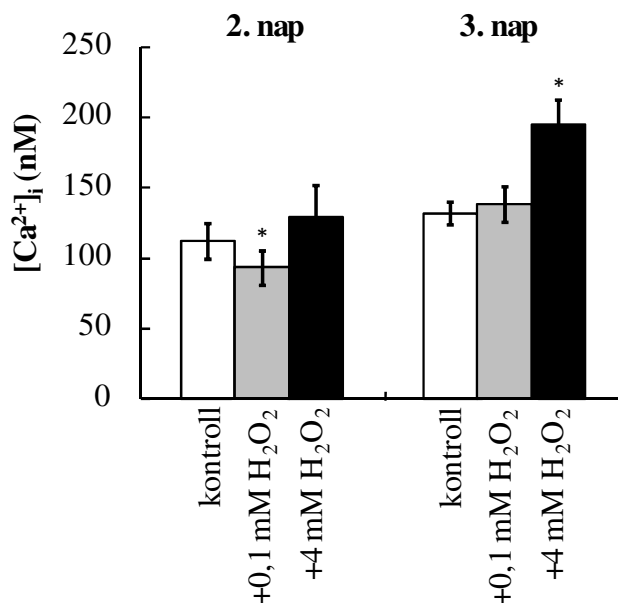


4.30. ábra. Hidrogén-peroxid, peroxinitrit és 3-AB hatása a HD-kultúrák sejtjeiben mérhető NAD⁺-koncentrációra. A méréseket 90 perccel a kezeléseket követően végeztük, a 2. tenyésztési napon. Az ábrán szereplő adatok 3 független kísérlet eredményei közül a jellemző változási tendenciákat mutatják. Az ábrázolt értékek 10–10 kultúrára vonatkozó átlagok, a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. A kezeletlen kontroll kultúrák értékeihez viszonyított statisztikailag szignifikáns (*P<0,01) változásokat csillagok (*), a 3-AB-kezelések szignifikáns (*P<0,01) védőhatását keresztek (x) jelölik

4.2.3. Oxidatív stressz hatására változik a HD-kultúrák sejtjeiben mérhető

intracelluláris kalciumkoncentráció

Míthogy a sejtek cytosol kalciumkoncentrációja érzékenyen reagál az extracelluláris stimulusokra, és korábbi kísérleteink alapján a porcosodó kultúrák sejtjeiben érzékeny indikátora a differenciációs folyamatokba történő beavatkozásoknak, ezért kíváncsiak voltunk arra, vajon oxidatív stressz hatására változik-e, és ha igen, milyen irányban a chondrogenikus mesenchymalis sejtekben mérhető intracelluláris Ca²⁺-koncentráció. Látható, hogy míg a kis (0,1 mM) koncentrációjú hidrogén-peroxid hatására érdemben nem változik a nyugalmi kalciumszint, a magas (4 mM) koncentráció hatására különösen a harmadik napon figyelhető meg drámai változás: a differenciálódás napján kontroll körülmények között is magasabb kalciumszint még erőteljesebb emelkedést mutat (4.31. ábra). Ez a hatás párhuzamba állítható az 5 mg/l koncentrációjú A23187 Ca²⁺-ionofor esetében megfigyelttel (lásd 4.9. ábra).

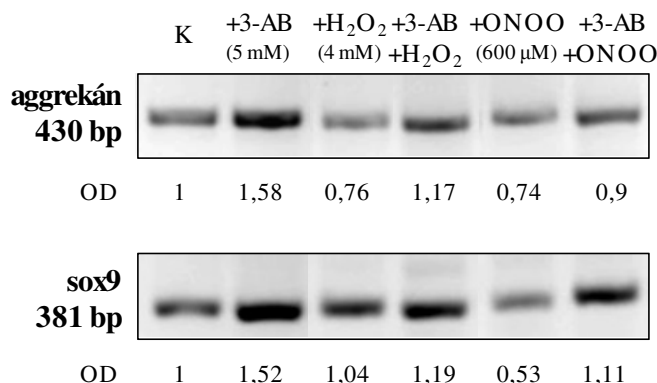


4.31. ábra. A HD-kultúrák sejtjeiben mérhető szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációk kontroll körülmények között és 30–30 perces hidrogén-peroxid-kezelést követően. A méréseket Fura-2 kalciumérzékeny festékkel feltöltött sejteken végeztük, közvetlenül a kezelések után. A diagramon 3 kísérlet adatai alapján a jellemző tendencia látható. Valamennyi oszlop 30 sejt intracelluláris kalciumszintjének átlagát ábrázolja, a hibásávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik. A kezeletlen és a kezelt csoportok cytosol kalciumszintje közötti szignifikáns (* $P < 0,01$) különbségeket csillagok (*) jelölik.

4.2.4. Az oxidatív stressz hatására módosul a porcspecifikus markerek expressziós mintázata

Miután láttuk, hogy a reaktív oxigén- és nitrogénygyökök koncentrációfüggő módon gátolják a porcmatrixtermelést, megvizsgáltuk, hogyan változik a porcdifferenciáció szempontjából fontos markerek mRNS- és fehérjeexpressziója ezen ágensek hatására. A porcdifferenciáció mértékét a Sox9 transzkripciós faktort kódoló gén mRNS-ének expressziójával ítéltük meg, míg a matrixképződés indikátoraként a porcszövetre jellemző aggregálódó proteoglikán, az aggregán tengelyfehérjéjét kódoló gént vizsgáltuk (4.32. ábra). Az RT-PCR reakciók eredményeiből látható, hogy az oxidatív stressz jelentősen csökkenti mind a Sox9, mind az aggregán mRNS-expresszióját. Az értekezésben a terjedelmi korlátok miatt csak a legmagasabb koncentrációk eredményei szerepelnek; kisebb koncentrációk esetén dóziszfüggő hatásokat figyeltünk meg. A porcmatrix-termelés vizsgálata során megfigyelt változásokhoz hasonlóan a 3-AB a markergének expresszióját a metakromáziás festések eredményeivel összhangban befolyásolta: bizonyos mértékben képes volt kivédeni a

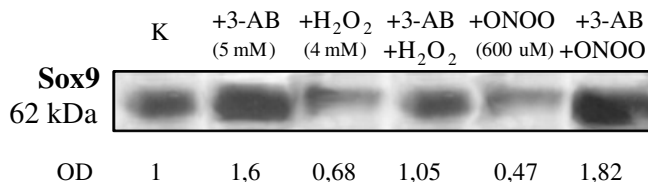
hidrogén-peroxid és a peroxinitrit káros hatásait. Az is megfigyelhető, hogy a 3-AB önmagában alkalmazva jelentősen, mintegy 50%-kal fokozta mindkét gén mRNS-ének expresszióját, ami szintén összhangban van a metakromáziás festések során kapott eredményeinkkel.



4.32. ábra. Hidrogén-peroxid, peroxinitrit és 3-AB hatása az aggrecán és a sox9 mRNS-expressziójára. Az analíziseket közvetlenül a kezelések befejezése után végeztük. Az ábrán szereplő reprezentatív eredmények 3 független kísérlet során kapott jellemző tendenciákat mutatják. Az RT-PCR reakciókhoz GAPDH-t használtunk kontrollként.

Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

Mivel az mRNS-expressziós változások nem mindig nyilvánulnak meg a fehérjeexpresszió szintjén, ezért az RT-PCR reakciók elvégzését követően a Sox9 fehérje mennyiségét immunoblottal is ellenőriztük (4.33. ábra). A Western-blot kísérletek eredményeiből látható, hogy a Sox9 fehérjeexpresszió-változásai hűen követik az mRNS-szintű változásokat: a reaktív oxigén- és nitrogénygyökök hatására kevesebb fehérje mutatható ki a mintákban, amit a 3-AB-előkezelések képesek voltak kompenzálni.

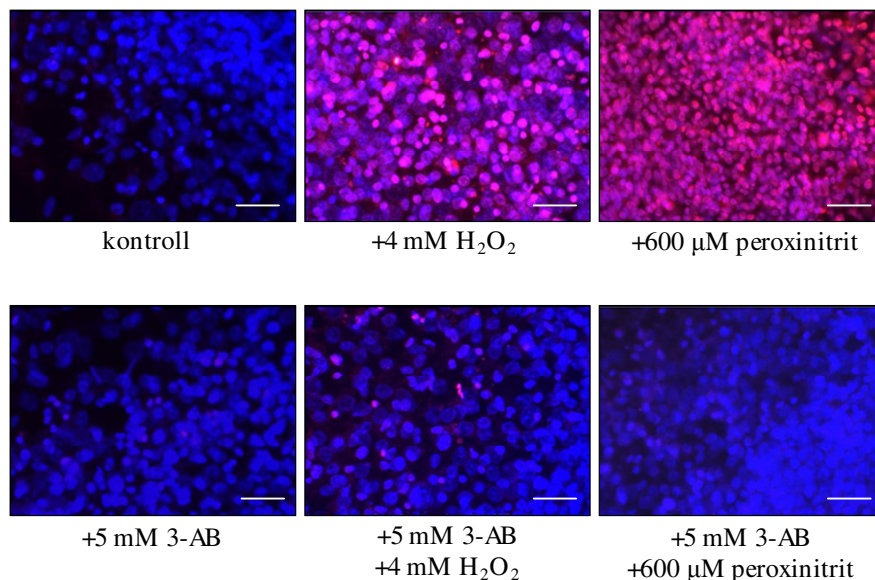


4.33. ábra. A chondrogenezist irányító Sox9 fehérjeexpressziójának változása hidrogén-peroxiddal, peroxinitrittel és/vagy 3-AB-vel történő kezelések hatására. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk. Az ábrán szereplő eredmények 3 független kísérlet adatai közül a jellemző változásokat mutatják.

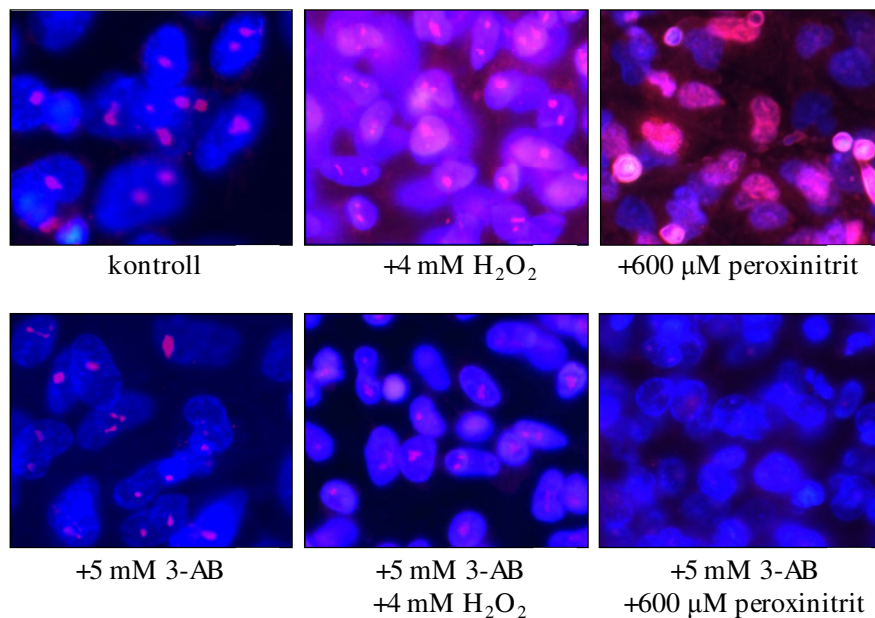
4.2.5. A HD-kultúrákban a hidrogén-peroxiddal és peroxinitrittel kiváltott oxidatív stressz hatására poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok aktiválódnak

Ismeretes, hogy az oxidatív stresszt előidéző ágensek – így a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit is – DNS-lánc-töréseket okozhatnak, ami a PARP aktiválódásához vezet. Korábbi kísérleteink – indirekt módon – megalapozták azt a feltételezésünket, miszerint a porcosodó HD-kultúrák sejtjeiben is poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok indulnak be, ami a matrixtermelés és a differenciálódás csökkenését vonja maga után. Ahhoz, hogy minden kétséget kizáróan alátámasszuk a feltételezésünket, az oxidatív stressznek kitett és a kontroll kultúrákban meghatároztuk a PARP aktivitását. Az *in situ* enzimaktivitás-mérések során biotinilált NAD^+ beépülését vizsgáltuk 2 napos kultúrákban (4.34. ábra). Kontroll körülmények között a tenyésztés egyetlen napján sem detektáltunk kimutatható mértékű PARP-aktivitást, és 3-AB-kezelések hatására is hasonló eredményeket kaptunk. Hidrogén-peroxid, és főként peroxinitrit hatására azonban a sejtek magjában jelentősen fokozódott a biotin beépülése. Megfigyeltük azt is, hogy PARP-inhibitor hatására a jel nagysága csökkent. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a peroxinitrit- és hidrogén-peroxid-kezelések hatására a PARP valóban aktiválódott a HD-kultúrák sejtjeiben.

A PARP aktivitásának vizsgálata mellett a képződött poli(ADP-ribóz)-polimereket is sikerült kimutatnunk a 2 napos kultúrákban monoklonális anti-PAR-antitestek segítségével (4.35. ábra). Érdekes módon a kezeletlen kontroll kultúrák sejtjeiben, egészen pontosan azok sejtmagvacskáiban is kimutattuk a polimer jelenlétét. Ez a jel ráadásul 3-AB-kezelések hatására sem csökkent, ami PARP-1-independens folyamatokra utal. Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban reaktív oxigén- és nitrogéngyökök hatására egyaránt erős jeleket kaptunk: a sejtmagvakban a polimer gyakorlatilag homogén eloszlásban volt jelen. Várakozásainknak megfelelően pedig 3-AB-előkezelések hatására a polimer mennyisége jelentősen kisebb marad, mint a csak oxidatív stressz hatásának kitett kultúrákban.



4.34. ábra. PARP-aktivitás kezeletlen kontroll és oxidatív stressz hatásának kitett HD-kultúrákban 3-AB-előkezeléseket követően, illetve azok nélkül. A kezeléseket a tenyésztés 2. napján, 30–30 percig végeztük. A PARP aktivitását a kezelések után 20 perccel mértük, biotinilált NAD^+ beépülésének monitorozásával. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük (kék), a biotint AlexaFluor-546 fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá (lila). Valamennyi kultúrát azonos beállításokkal fényképeztük, az eredeti nagyítás 4× volt. Az ábrán látható felvételek 3 független kísérlet adataiból a jellemző változásokat mutatják. Skála: 50 μm .



4.35. ábra. PAR-polimerek kezeletlen kontroll és oxidatív stressz hatásának kitett HD-kultúrákban 3-AB-előkezeléseket követően, illetve azok nélkül. A kezeléseket a tenyésztés 2. napján végeztük, 30 percig. A PAR-polimereket a kezelések után 20 perccel detektáltuk immunocitokémiával. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük (kék), a bekötődött másodlagos antitesteket AlexaFluor-546 fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá (lila). Valamennyi kultúrát azonos beállításokkal fényképeztük, és a felvételeket Adobe® Photoshop® 8.0 számítógépes program segítségével vetítettük egymásra. Az eredeti nagyítás 40× volt. Az ábrán látható felvételek 3 független kísérlet adataiból a jellemző változási tendenciákat mutatják. Skála: 10 μm .

5. Megbeszélés

5.1. A porcosodó HD-kultúrák sejtjeinek Ca^{2+} -homeosztázisa

A Ca^{2+} egyike a legalapvetőbb és legelterjedtebb másodlagos hírvivőknek, és a sejtek szinte valamennyi életfolyamatának szabályozásában nélkülözhetetlen szerepet játszik. A számos kalciumdependens szignalizációs útvonal között a sejtek differenciációjának szabályozásáért felelős folyamatokat is megtaláljuk. Nem alaptalan azt feltételeznünk, hogy a differenciálódás során, amikor egyféle sejtől számos más sejtípus fejlődhet ki, a cytosol kalciumkoncentrációja, és az azzal összefüggő jelátviteli folyamatok is alapvető változásokon mennek keresztül, sőt, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásai lehetnek – legalábbis részben – a jelátviteli folyamatok irányítói is. Noha az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció és a sejt differenciáció közötti szoros korreláció nyilvánvalónak tűnhet, talán a folyamat rendkívüli komplexitása miatt a primer porcdifferenciációval kapcsolatos tudományterületen egyelőre vajmi kevés tudományos közlemény született. Talán nem véletlen, hogy ezek többsége a nem is oly távoli jövőben talán mindennapos terápiás eszközként alkalmazható *embrionális őssejtek*re és azok differenciálódási folyamataira vonatkozik [2,94,95].

A nem excitábilis sejtek kalciumhomeosztázisával kapcsolatos mai tudásunk minden bizonnyal a csontvelő-eredetű mesenchymalis őssejtek tekintetében a legteljesebb. Ez nem meglepő, ha belegondolunk a következőkbe: a sejtek csontvelőből történő izolálása és szeparálása viszonylag egyszerűnek tekinthető, valamint számos őssejt vonal kereskedelmi forgalomban is kapható, így ezekhez a sejtekhez viszonylag könnyű hozzájutni. Ezenkívül ismeretes, hogy a mesenchymalis őssejtek csont-, porc- és zsírsejtek mellett excitábilis, ideg- és főleg szívizomszerű sejtekké is képesek differenciálódni, és ily módon rendkívüli terápiás potenciállal rendelkeznek [96]. A kezdeti bátorító terápiás eredmények arra serkentették a kutatócsoportokat, hogy alaposabban megismerjék e sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait, és ily módon célirányosabban elősegítsék az őssejtek adott sejtípusá, például kardiomiocitává történő differenciálódását. Amíg azonban a mesenchymalis őssejtek pluripotensnek számítanak – vagyis többféle, eltérő funkciójú sejtípus létrehozásának lehetőségét hordozzák magukban –, a chondroprogenitor mesenchymalis sejtekből az általunk is alkalmazott kísérleti körülmények között chondroblastok és chondrocyták differenciálódnak. A chondrogenikus sejtek Ca^{2+} -homeosztázisáról gyakorlatilag nem találhatók adatok az irodalomban, ami már csak azért is meglepő, mert tudjuk, hogy a chondrogenézist számos, a cytosol Ca^{2+} -koncentrációjára érzékeny jelátviteli útvonal irányítja. A klasszikus, kalciumérzékeny protein-

kináz C-izoenzymeik közül a PKC α például a MAP-kináz útvonal befolyásolásán keresztül szabályozza a sejtosztódást és a proliferációt [97]. A foszoprotein-foszfatazok közül a Ca²⁺-kalmodulin-dependens kalcineurin szintén fontos pozitív regulátora a porcdifferenciálódásnak: az enzim aktivitásának gátlása inhibitorával, a CsA-val a porcmatrix termelődésének csökkenéséhez vezet [22]. Bár mindkét enzim működésének szabályozásában kulcsszerepet játszik a cytosol szabad Ca²⁺-koncentrációja és annak esetleges változásai, a differenciálódó chondroprogenitor sejtek ez irányú feltérképezése mind ez idáig nem történt meg. Ugyanakkor azt az irodalomból ismert tényt sem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy a porcdifferenciáció első lépéseként zajló kondenzáció során a chondrogenikus mesenchymalis sejtek Ca²⁺-dependens sejtkapcsoló struktúrák (elsősorban kadherineik) segítségével kapcsolódnak egymáshoz. A kadherineik funkciójának gátlása a kondenzáció elmaradásához, és a porcképződés gátlásához vezet [25].

Az érett chondrocyták kalciumhomeosztázisáról a fentiekhez képest bővebb ismeretekkel rendelkezünk. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy az endokondrális csontosodási folyamat során porcszövet teremti meg a csontképződés lehetőségét, később pedig a csontok hossznövekedéséért is ez a szövet a felelős. A csontképződési zavarok hátterének felderítésére irányuló kísérletek mintegy „melléktermékeként” sikerült feltérképezni az érett és hipertrófiás chondrocyták Ca²⁺-homeosztázisát is [98]. Az előzőeknél talán még fontosabb és talán még alaposabban vizsgált terület az ízületi porc, melyet annak nagyszámú és az életminőséget általában súlyosan érintő rendellenességei következtében szintén behatóan vizsgáltak. Az irodalomban szép számmal lelhetők fel az ízületi porc chondrocytáinak intracelluláris kalciumszintjére és annak különböző környezeti hatásokkal történő befolyásolhatóságára vonatkozó közlemények [99]. Ezek az adatok természetesen semmit sem árulnak el a primer differenciációs folyamatok és a cytosol szabad Ca²⁺-koncentrációja közötti kapcsolatáról. Fontos azt is megjegyezni, hogy az irodalomban fellelhető méréseket legnagyobbbrészt nem *in situ* rendszerekben, hanem izolált, vagyis sajátos szerkezetű extracelluláris matrixuktól megfosztott és lokális mikrokörnyezetükből kiszakított sejteken végezték. Mivel a chondrocyta-fenotípus fenntartásához és a sejtek megfelelő működéséhez a matrixszal való állandó kapcsolatuk elengedhetetlenül szükséges [11], ezért ezek az eredmények csak erős fenntartásokkal fogadhatók el. Mindenesetre nagy általánosságban elmondható, hogy a nem ingerlékeny sejtek Ca²⁺-homeosztázisát napjaink intenzív kutatásai ellenére sem ismerjük még megfelelően.

Vizsgálatainkat arra a feltételezésre alapoztuk, miszerint a chondroprogenitor mesenchymalis sejtek differenciáltsági foka, és a bennük mérhető szabad cytosol Ca^{2+} -szint között valamilyen összefüggés lehetséges. A vizsgálatok elvégzésére a laboratóriumunkban alkalmazott modell megfelelő alanynak mutatkozott: a megbízhatóan reprodukálható és könnyen ismételhető kísérletek mellett rendkívül nagy előnye, hogy használatával a differenciálódó sejtek kalciumkoncentrációja *in situ*, mindenféle enzimátikus vagy mechanikai előkezelés nélkül is mérhetőnek bizonyult. Kísérleteink első lépéseként – a mérési rendszer beállítása után – a tenyésztés minden napján meghatároztuk a porcosodó kultúrák sejtjeinek cytosol szabad Ca^{2+} -koncentrációját, a méréseket mindig ugyanabban a napszakban végezve. Kimutattuk, hogy a HD-kultúrák sejtjeiben a fluoreszcenciás módszerrel mérhető kalciumkoncentráció jellegzetes, a sejtek differenciálódásával párhuzamosan változó mintázatot követ. A tenyésztés kezdetén, amikor a kultúrák differenciálatlan, illetve a differenciálódási folyamat kezdetén lévő sejteket tartalmaznak, viszonylag alacsony (~75 nM) értékeket mértünk. A tenyésztés 3. napján azonban, amikor a mesenchymalis sejtek döntő többsége chondroblastokká alakul át, a differenciálódó sejtekben 140 nM-os Ca^{2+} -koncentráció-csúcsot detektáltunk. A következő naptól kezdve a tenyésztés végét jelentő 6. napig a már differenciált sejtek kalciumszintje ismét alacsonyabb értékeket (~100 nM) mutatott, de nem esett vissza a kiindulási értékre. Mindezek arra utalnak, hogy az érett chondroblast-, illetve chondrocyta-fenotípusra 100 nM körüli cytosol Ca^{2+} -koncentrációértékek jellemzők, míg a pre-chondroblastok alacsonyabb cytosol kalciumszinttel rendelkeznek. Eredményeink összhangban vannak az epifízis-porcszövet chondrocytaiban mért értékekkel [98], és más, nem excitábilis sejtek (pl. HaCaT-keratinociták) nyugalmi cytosol kalciumkoncentrációja is hasonló (80–100 nM) értékeket mutat [100].

5.1.1. A chondrogenikus mesenchymalis kultúrák sejtjeinek Ca^{2+} -homeosztázisa elsősorban a külső közeg kalciumkoncentrációjától függ

Méréseink folytatásaként a fent leírt jelenséget próbáltuk alaposabban megvizsgálni. Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy a differenciálódás napján mérhető megemelkedett cytosol kalciumkoncentráció forrása extra- vagy intracelluláris eredetű-e. San Antonio és Tuan [101] kísérleteinek eredményeképpen tudjuk, hogy az *in vitro* porcdifferenciáció az extracelluláris tér kalciumkoncentrációjának megemelésével modulálható: a magasabb Ca^{2+} -szint koncentrációfüggő módon erőteljesebb porcképződést eredményezett. Eredményeik

alapján joggal adódik a feltételezés, miszerint az extracelluláris tér Ca-ionjai elsősorban a porcképződés kezdeti, kondenzációs és proliferációs lépéseiben játszanak fontos szerepet. Ezt az elképzelést támasztja alá többek között a kalciumdependens sejtkapcsoló struktúrák korábbiakban említett jelentősége a porcdifferenciáció kezdeti lépései során. Ráadásul a külső térben lévő magasabb kalciumkoncentráció csak a differenciációs folyamat kezdetén fejt ki a fenti pozitív hatást; ha a tenyésztés 3. napját követően is ilyen tápközegeben tartották fenn a kultúrákat, az a porcképződésre már gátló hatásúnak bizonyult. Saját kísérleteinkben más megközelítést alkalmaztunk: kíváncsiak voltunk, mi történik akkor, ha a HD-kultúrák külső közegébe a kalciumkoncentrációval ekvimoláris (1,8 mM) EGTA-t adva megkötjük a szabad Ca-ionokat. EGTA hatására – ha a kezeléseket a differenciáció szempontjából fontos 2., illetve 3. napon végeztük – jelentősen csökkent a matrixtermelés mértéke. A hatás több vizsgált paraméterben bekövetkező változások eredményeképpen nyilvánulhatott meg. A San Antonio és Tuan közleményében [101] szereplő eredményeket támasztja alá az a megfigyelésünk, miszerint alacsony extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció hatására a HD-kultúrák sejtteinek proliferációs rátája igen erőteljesen visszaesik, anélkül hogy a mitokondriális aktivitásukban és apoptotikus/nekrotikus sejthaláluk gyakoriságában számottevő változás következne be (bár tény, hogy a kezelések kismértékben fokozták a nekrotikus sejtek arányát). Ugyanakkor megfigyeltük, hogy EGTA hatására a HD-kultúrák sejteiben mérhető bazális szabad cytosol Ca^{2+} -koncentráció is lecsökken, és elmarad a 3 napos kezeletlen kontroll kultúrákra jellemző megemelkedett Ca^{2+} -szint is. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációja érzékenyen függ az extracelluláris közeg kalciumtartalmától. Ezzel párhuzamosan a porcdifferenciáció mestergénjének tartott Sox9 transzkripciós faktor mRNS- és fehérjeexpressziója is lecsökkent. Mindezen változások alapján feltételezhetjük, hogy az extracelluláris térség szabad kalciumionjainak a differenciációs folyamatok beindításában és a kezdeti lépések irányításában nélkülözhetetlen szerepe van, hiszen a kalciumionok megkötése gátolja a sejtek normál differenciációs ciklusát. A kontroll kultúrák sejteiben mérhetőnél alacsonyabb nyugalmi cytosol Ca^{2+} -szint többek között a kalciumdependens PKC α működésének gátlásán keresztül is csökkentheti a HD-kultúrák sejtteinek proliferációs rátáját; erről az enzimről ugyanis ismert, hogy a MAPK-út vonalat befolyásolva szabályozza a sejtek osztódását és differenciációját [51]. Feltételezésünket azok, a jelen értekezésben nem közölt kísérleti adataink is alátámasztják, melyek szerint a 4. napos, tehát a differenciációs lépésen már túljutott HD-kultúrákban EGTA-kezeléseknek nincs szignifikáns hatása a porcmatrix termelődésére.

Az extracelluláris tér szabad Ca^{2+} -tartalmának manipulálására bekövetkező változásokhoz hasonlóan az intracelluláris tér kalciumszintjének befolyásolása is érdekes eredményekhez vezetett. A cytosol Ca^{2+} -koncentrációját A23187 kalcium-ionofor alkalmazásával emeltük meg, amit két koncentrációban is használtunk. A közvetlenül az ionofor alkalmazását követően megmért cytosol Ca^{2+} -koncentrációértékek alapján mind a 0,1 mg/l, mind az 5 mg/l koncentrációjú A23187 – várakozásainknak megfelelően – a kontroll kultúrákhoz képest rendre mintegy 25, illetve 50%-kal emelte meg a sejtek kalciumszintjét. A kezelések azonban teljesen ellentétes módon befolyásolták a 6. npra képződött porcmatrix mennyiségét: a kis koncentrációjú ionofor jelentősen megnövelte, míg a nagy koncentrációjú ionofor erőteljesen csökkentette azt. Az ionofor hatásainak értelmezéséhez újra megvizsgáltuk az EGTA-kezelések kapcsán említett paramétereket. Megállapítottuk, hogy az A23187 sem a sejtek proliferációját, sem azok mitokondriális aktivitását, sem pedig az apoptotikus/nekrotikus sejthalál mértékét nem befolyásolta jelentősen (az egyetlen szignifikáns változás a kisdózisú ionofor hatására bekövetkező proliferáció-fokozódás volt). Míg a kis dózisban alkalmazott ionofor nagyjából a megfigyelt porcképződési-változásokkal összhangban befolyásolta a Sox9 transzkripciós faktor mRNS- és fehérjeexpresszióját, a nagy dózisú kezelésekről ugyanezt nem mondhatjuk el: mRNS-szinten főleg a 2. napon a várt változásokhoz képest épp ellenkező tendenciákat figyeltünk meg. Emellett Western blottokkal az erőteljesen gátolt porcképződés ellenére mintegy háromszoros Sox9 fehérje expressziót és kb. hatszoros foszforilációs-szint fokozódást láttunk. Az ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy létezik olyan, a porcdifferenciációt szabályozó jelátviteli folyamat, amely a Sox9 hatásait felülírja, ha a chondrogenikus sejtek Ca^{2+} -homeosztázisa zavart szenved. Az ilyen, rendszerint szintén kalciumdependens folyamatokat a sejtek meglehetősen gyakran alkalmazzák a jelátviteli rendszerek finomhangolására [102]. Mindenesetre tény, hogy a differenciálódó mesenchymalis sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjának kismértékű megemelése elősegíti a sejtek differenciációs programját, míg túlságosan magas, illetve hosszantartó emelkedés már gátló hatású. Ugyanakkor az intracelluláris Ca^{2+} -szint változásai valószínűleg nincsenek számottevő hatással a differenciált porcsejtek matrixtermelő képességére, hiszen az EGTA-kezelések kapcsán megfigyeltékhez hasonlóan, az ionofor kezelések sem befolyásolták érdemben a 6. napon detektálható porcmatrix mennyiségét, ha a kezeléseket a 4. napon vagy azt követően végeztük.

5.1.2. A belső Ca^{2+} -raktárak nem játszanak szerepet a differenciálódás napján kimutatható Ca^{2+} -csúcs kialakításában

Azt a feltételezésünket, miszerint a chondrogenikus mesenchymalis sejtek Ca^{2+} -homeosztázisa elsősorban az extracelluláris közeg kalciumtartamától függ, a belső raktárak és az azok membránján lokalizálódó csatornafehérjék vizsgálata is alátámasztotta. Ismeretes, hogy a simafelszínű endoplasmaticus retikulum ciszternáiban különböző kalciumkötő fehérjékhez kötődve jelentős mennyiségű Ca -ion raktározódik, ami dinamikus egyensúlyban áll a cytosol szabad Ca -ionjaival: az ER membránjában lokalizálódó csatornafehérjéken át – a koncentrációgradiens következtében – kismértékű szivárgás áll fenn, amit ugyancsak az ER membránjához kötött aktív pumpamechanizmusok (például a SERCA) állítanak helyre [56]. Amennyiben ez utóbbi folyamatokat gátoljuk, elegendően hosszú idő alatt a két kompartmentum között fennálló gradiens kiegyenlítődik, és a raktárak „kiürülnek”. Saját kísérleteinkben a SERCA gátlószerével, CPA-val kezeltük a kultúrák sejtjeit, miközben folyamatosan regisztráltuk a citoplazmatikus kalciumszint-változásokat. Kimutattuk, hogy a chondrogenikus mesenchymalis sejtek belső raktárai is tartalmaznak bizonyos mennyiségű Ca -iont, azonban ennek mennyisége excitábilis sejtekhez képest elhanyagolhatóan kicsinek bizonyult.

A CPA-val végzett kísérletek egy másik, érdekes megfigyelést is szolgáltatottak: a raktárak kiürítését követően, az extracelluláris Ca -ionok koncentrációjának helyreállításának eredményeképpen a sejtekben egy átmeneti cytosol kalciumszint-emelkedésnek voltunk tanúi. Ez a tranziens emelkedés minden bizonnyal a raktárak töltöttségét érzékelő, molekuláris szinten mind ez idáig kevéssé karakterizált ún. SOCE-csatornák működésére utal. Noha jelen munkánkban nem volt cél e fehérjék karakterizálása, a SOCE-csatornák funkcionalitását valószínűleg minden kétséget kizáróan sikerült megfigyelünk, ami ismételten arra utal, hogy a differenciálódó chondrogenikus sejtek Ca^{2+} -homeosztázisa igen nagymértékben függ a külső közeg kalciumtartalmától. A HD-kultúrák chondroprogenitor mesenchymalis sejtjei ebben a vonatkozásban igen hasonlóak az embrionális őssejtekhez: Kawano munkacsoportja egér mesenchymalis őssejtek Ca^{2+} -homeosztázisának karakterizálása során gyakorlatilag megegyező jelenségeket írt le [103], sőt feltételezik, hogy az őssejtek elsősorban ilyen útvonalakon keresztül veszik fel a külső tér kalciumionjait.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a chondrogenikus mesenchymalis sejtek milyen, a belső raktárakból történő kalciumfelszabadításért felelős fehérjéket expresszálnak a

„kalcium-eszköztár” összetevői közül. Az excitábilis sejtekre jellemző rianodinreceptort alig sikerült kimutatnunk, és koffein hatására egyetlen alkalommal sem detektáltunk Ca^{2+} -tranzienseket. Ezen eredményünk jól egybevág a humán mesenchymalis őssejteken végzett megfigyelésekkel: a koffein ezeken a sejteken is hatástalannak bizonyult [2]. Az I-es típusú inozitol-triszfoszfát-receptor ($\text{IP}_3\text{-R}$) viszont – bár gyengén, de – expresszálódik a HD-kultúrák sejtjeiben. Ez a megfigyelés összhangban áll korábbi feltételezéseinkkel és ismereteinkkel: az irodalomban is leírt, a differenciáció különböző folyamataiban kulcsszerepet játszó kalciumdependens kináz- és foszfátáz-útvonalak (klasszikus PKC; PP2B) a belső raktárakban szekvesztrált Ca-ionokat nagy valószínűség szerint az IP_3 -receptorok segítségével mozgósítják, és az IP_3 -receptorokat humán mesenchymalis őssejteken is kimutatták [2]. A raktárak csekély mértékű töltöttsége miatt azonban az ily módon felszabaduló kalciumionok csak lokálisan emelik meg a cytosol Ca^{2+} -szintjét, a differenciálódás során mérhető nagymértékű emelkedés minden bizonnyal a külső közegből származik. Erre utalnak azok a méréseink is, melyek során a SERCA működését 12 órán át gátoltuk. Ennyi idő alatt a belső raktárak minden valószínűség szerint teljesen kiürültek, mégsem tapasztaltuk a 6. napon detektálható porcmatrix mennyiségének csökkenését. Ugyanakkor, ha a CPA- és EGTA-kezeléseket kombináltuk, azaz mind a külső térből, mind a belső raktárakból elimináltuk a szabad kalciumionokat, a porcképződés teljes mértékben elmaradt.

5.1.3. A Ca^{2+} -oszcillációk is fontosak a differenciáció szempontjából

Kawano munkacsoportjának eredményei között szerepel, hogy az egér és humán mesenchymalis őssejtek cytosol kalciumszintje periodikus változásokat, oszcillációkat mutat [2,103,104]. Bár nem tartozott szorosan vizsgálódásaink tárgykörébe, de néhány kezdeti kísérletet magunk is elvégeztünk a 3 napos HD-kultúrák sejtjein, Fluo-4 kalciumérzékeny festékkel történő feltöltést követően. Megfigyeltük, hogy a chondrogenikus mesenchymalis sejtek nyugalmi Ca^{2+} -szintjében is jelentkeznek periodikus változások, igaz, ezek frekvenciája jóval meghaladja az embrionális őssejteken mérhető. A Ca^{2+} -oszcillációk jelentőségét – melyeknek pontos fiziológiai karakterizálását a jövőben kívánjuk elvégezni – valószínűleg nem lehet túlbecsülni. Ismert ugyanis, hogy a cytosol kalciumszintje bizonyos transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozása révén befolyásolja a génexpressziós változásokat, köztük a sejtek differenciálódását irányító gének expresszióját is. Közlemények számolnak be arról, hogy a hosszan tartó, nagy amplitúdójú cytosol kalciumszint-emelkedés hatására

osteoblastokban az NFAT defoszforilációja és magba történő transzlokációja mutatható ki [105]. Ugyanakkor számos kutatócsoport leírta, hogy Ca^{2+} -oszcillációk hatására nemcsak az NFAT, hanem a CREB is aktiválódhat [106,107]. Mindkét transzkripció faktorról ismeretes, hogy a chondrogenézis jelátviteli útvonalának is fontos szereplői. Azt, hogy a nem ígérlekeny sejtek differenciációjában a rövid távú és nagy frekvenciájú cytosol kalciumkoncentráció-változások alapvető fontosságúak, az a megfigyelés is alátámasztja, miszerint humán mesenchymalis őssejtekben a Ca^{2+} -oszcillációkat autokrin módon szekretált ATP generálhatja [106]. Saját kísérleteink szerint a HD-kultúrák sejtjei is képesek ATP-t elválasztani a tápközegbe, valamint annak receptorait, a purinoreceptorokat is expresszálják felszínükön. Mivel a purinoreceptorok elsősorban kalciumot áteresztő kationcsatornák, saját kísérleti eredményeink is megerősítik azt a feltételezést, hogy a chondrogenikus sejtek meglehetősen komplex eszköztárral rendelkeznek a cytosol kalciummennyiségének szabályozására. Ráadásul kísérleteink alapján a HD-kultúrák sejtjei elsősorban az ionotrop P2X-receptorokat expresszálják a felszínükön, melyek a külső térségből származó Ca-ionok beáramlásáért lehetnek felelősek. A P2X₄-receptor expressziós mintázata egybeesik a sejtek differenciálódásával, ami igen valószínűvé teszi, hogy ez a csatornafehérje játszhat főszerepet a differenciálódás napján mérhető megemelkedett cytosol Ca^{2+} -szint kialakításában.

5.1.4. *A kalcineurin lehet a HD-kultúrák cytosol kalciumkoncentráció-változásainak egyik target- és effektormolekulája*

A cytosol kalciumkoncentráció megemelkedésének az *in vitro* porcifferenciációban betöltött pontos szerepét egyelőre kevésbé ismerjük. Eredményeink interpretálásának érdekében egy olyan kalciumdependens citoplazmatikus célmolekulát kerestünk, amiről ismeretes, hogy tagja a chondrogenézist irányító jelátviteli masinériának. Választásunk a *kalcineurin*ra esett, amely a T-limfociták aktiválásán, valamint a kardiomiociták hipertrófiájának és apoptózisának szabályozásán át a miogenezisig számos rendkívül diverz biológiai folyamat fontos résztvevője [49], és jelentőségét a differenciálódási folyamatokban is leírták már [108]. A kalcineurin egyike az *in vitro* porcdifferenciáció pozitív regulátorainak [22].

Megfigyeltük, hogy az enzim aktivitása érzékenyen reagál a sejtek cytosol Ca^{2+} -koncentrációjának modulálására, bár nem hűen követi azt. Míg a cytosol kalciumszintjének csökkenésével párhuzamosan az enzim aktivitása is visszaesik, az ionofor hatására kevésbé

egyértelmű változásokat kaptunk: a 2. napon a kalcineurin aktivitása megemelkedett az ionofor hatására, de a 3. napon az A23187 mindkét koncentrációban csökkentette ezt a paramétert. Fontos ismételt megjegyezni, hogy a 2. napon a chondroprogenitor mesenchymalis sejtek gyors osztódása és feltehetőleg a differenciációs folyamatokat irányító jelátviteli útvonalak tagjainak előkészítése zajlik, míg a 3. nap jellemző történése a differenciált sejtek számának gyors emelkedése. Feltételezve azt, hogy a kalcineurin enzimaktivitásának precíz szabályozásában az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kulcsszerepet játszik, valószínű, hogy a differenciálódás szempontjából legkritikusabb 3. napon a cytosol kalciumtartalmának megváltoztatására az enzim aktivitása mintegy kiszabadulván a sejt szabályozása alól látszólag rendszertelenül változik. Az a megfigyelés, hogy a cytosol szabad kalciumszint megemelkedésének hatására a kalcineurin aktivitása is fokozódik, más rendszereken már leírásra került [109]. További méréseink alapján joggal feltételezhetjük, hogy a kalcineurin nemcsak „elszenvedője” a cytosol szabad Ca^{2+} -koncentráció-változásainak, hanem képes aktívan részt venni annak szabályozásában is. Ciklosporin-A, az enzim farmakológiai gátlószerének hatására a porcképződés csökken [22]. Mivel ez a hatás igen hasonló az EGTA-kezelések porcmatrix-képződést csökkentő hatásához, úgy gondoltuk, hogy a CsA valamilyen módon gátolhatja a kalciumionok beáramlását, és a kontroll kultúrákhoz képest alacsonyabb értékeken tartja azt. Feltételezésünkkel szemben a kalcineurin gátlása azonban éppen ellentétes hatást váltott ki: a kezeletlen kultúrákhoz képest jóval magasabb intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció értékeket detektáltunk, és azt is megfigyeltük, hogy a kontroll körülmények között látott, a differenciálódás napjára jellemző karakterisztikus cytosol Ca^{2+} -csúcs elmaradt. A megfigyelt eltérések több szempontból is alátámasztják eddigi teóriánkat: egyrészt a kezdeti magas cytosol kalciumszint – a nagydózisú ionofor-kezeléshez hasonlóan – a porcképződés szempontjából káros, másrészt azt is megerősíti, hogy a 3. napon kontroll körülmények között detektálható Ca^{2+} -csúcs jelenléte abszolút elengedhetetlen a differenciáció megfelelő lejárásához. Ezek alapján joggal feltételezhetjük, hogy a kalcineurin fontos szerepet játszik a 3. napon a megemelkedett kalciumszint kialakításában, például bizonyos, a plazmamembránban lokalizálódó Ca^{2+} -csatornák aktiválásával. Ezt a feltételezésünket azok a közlemények támasztják alá, melyek arról számolnak be, hogy a kalcineurin a kalcium-eszköztár számos tagjának (pl. IP_3 -receptorok, SERCA, Ca^{2+} -csatornák, Na^+ - Ca^{2+} -exchangerek stb.) működését képes befolyásolni [110,111]. Irodalmi adatok alapján a kalcineurin lehet az egyik olyan faktor, mely a differenciálódó mesenchymalis őssejtek intracelluláris kalciumszint-változásaiban rejlő információt a génexpreszsiós folyamatok beindulásához kapcsolja [112]. Ismeretes, hogy a Ca^{2+} -oszcillációk hatására az NFAT

defoszforilálódik és a sejtmagba transzlokálódik. Az NFAT defoszforilálásnak kulcsfigurája pedig maga a kalcineurin, ami az oszcillációk következtében megemelkedő cytosol Ca^{2+} -szint hatására aktiválódik [106]. Hasonló útvonal működése valószínűsíthető a chondrogenikus mesenchymalis sejtekben is.

5.2. Az oxidatív stressz és a poli(ADP-ribóz)ilációs folyamatok kapcsolata a porcosodó HD-kultúrák sejteiben

Ismeretes, hogy mind az érett, mind a differenciálódó porcsejtek olyan mikrokörnyezetben élnek, ahol különösen nagy az esélye annak, hogy reaktív oxigén- vagy nitrogéngyökök károsítsák őket. Még nagyobb eséllyel következik be ez különböző kóros esetekben, például oszteoarthritis során. Több kutatócsoport – köztük a miénk is – beszámolt arról, hogy a reaktív oxigéngyökök gátolják a matrixtermelést, és hozzájárulnak a már kialakult extracelluláris matrix degradációjához is [22,113]. Megfigyeltük, hogy a peroxinitrit, az egyik legreaktívabb nitrogéngyök, a hidrogén-peroxidhoz hasonló, koncentrációfüggő módon gátolta a HD-kultúrák matrixtermelését. Ez a hatás a kultúrák sejteinek szinte valamennyi, általunk vizsgált paraméterét érintette: az oxidáló ágensek hatására a sejtek proliferációs rátája és – kisebb mértékben – mitokondriális aktivitása, valamint a porcdifferenciáció markergénje, a Sox9 mRNS- és fehérjeexpressziója egyaránt lecsökkent. Azt azonban, hogy pontosan mi áll az általunk megfigyelt változások háttérében, egyelőre nem vizsgálták részletesen.

Ismert, hogy a reaktív oxigén- és nitrogéngyökök elsősorban genotoxikus hatásaik révén károsítják a sejteket [73]. Mivel a DNS-lánc-törések következtében a sejtekben a poli(ADP-ribóz)-polimeráz enzim aktivitásának fokozódása figyelhető meg, ami a NAD^{+} -ot használja szubsztrátként, és belőle bizonyos sejtmagi fehérjéket kovalensen módosít azáltal, hogy hosszú, elágazó láncú PAR-polimereket kapcsol hozzájuk. A kovalens módosítás hatására az enzimek működése módosul, s ezáltal számos, többek között a DNS-repair folyamataiban szerepet játszó fehérje aktiválódik. A PARP túlzott mértékű aktivációja azonban a sejt NAD^{+} - és ATP-készleteinek kimerítése következtében már káros hatású, és a sejt-folyamatok kisiklása következtében végső soron apoptózist indukál. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy az oxidatív stressz koncentrációfüggő módon gátolja a kultúrák sejteinek proliferációs rátáját. 3-AB-előkezelések ezt a hatást nem tudták kivédeni, így feltételezhetjük, hogy a reaktív oxigén- és nitrogéngyökök a PARP-től független útvonalon keresztül fejtik ki

hatásukat: a reaktív nitrogénygyökök például képesek közvetlenül befolyásolni a MAPK-út vonalat, s ezáltal szerepet játszhatnak a sejtosztódás szabályozásában [114]. A MAPK-kaskád és a PARP közötti kapcsolat azonban korántsem egyoldalú. A MAP-kinázok közé tartozó ERK1/2 funkciója ugyanis éppen az extracelluláris jelek (köztük az oxidatív stressz) továbbítása a sejtmag felé [115]. Korábbi kísérleteink alapján [22] oxidatív stressz hatására a HD-kultúrák sejtjeiben fokozódott az ERK1/2 foszforiláltsága. Ez a megfigyelésünk megegyezik más rendszerekben mért hasonló vizsgálatok eredményeivel [116]. Ez utóbbi közlemény arról számol be, hogy az ERK1/2 a PARP-1 közvetlen, foszforiláláson keresztüli aktiválásával fejt ki hatását az oxidatív stresszt követő sejtválasz kialakításában. Ez felveti annak lehetőségét is, miszerint hasonló kapcsolat a porcosodó HD-kultúrákban is létezhet. Noha az ERK1/2 farmakológiai gátlása önmagában is fokozza a chondrogenézist, a korábbi kísérleteinkben használt PD098059 és hidrogén-peroxid együttes alkalmazására megfigyelt rendkívül erőteljes porcmatrixtermelés-fokozódás [22] legalább részben a PARP-1 foszforilálódásának hiánya és így aktivitásának csökkent volta következtében alakulhatott ki.

A fentiekkel ellentétes megfigyeléseket tettünk a sejtek mitokondriális aktivitásának tekintetében: a 3-AB-előkezelések ugyanis képesek voltak csökkenteni a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit káros hatásait. Feltételezhetjük tehát, hogy a HD-kultúrák sejtjeinek túlélőképességére utaló mitokondriális aktivitásváltozás PARP-dependens folyamatok révén valósul meg. Ezek a megfigyeléseink összhangban vannak a HaCaT-keratinocitákon végzett vizsgálatok eredményeivel, ahol hasonló tendenciák voltak detektálhatók [117]. A HD-kultúrák sejtjeiben még a nagydózisú reaktív oxigén- és nitrogénygyökök esetén sem tudtunk kimutatni jelentős NAD^+ -depléciót (kivételt képez ez alól a 600 μM koncentrációjú peroxinitrit-kezelés), amit a 3-AB-előkezelések is csak részlegesen tudtak kivédeni, ezért a korábbiakban említett, PARP-independens folyamatok fontosságát semmiképpen sem szabad alábecsülnünk.

A PARP aktivitására és működésére az enzim terméke, a PAR-polimerek kimutatása adta a legfőbb bizonyítékot. Kontroll körülmények között nem tudtunk detektálható mennyiségű polimert kimutatni a HD-kultúrák sejtjeiben, oxidatív stressz hatására azonban határozott jeleket kaptunk. Érdekes volt az a megfigyelésünk, miszerint a telepek belsejében a sejtek általában gyengébb festődést mutattak, míg a periférián található, nyúlványos karakterű sejtek jóval erősebb szignálokat produkáltak. Hasonló, inhomogén festődés mutatható ki HaCaT-keratinociták esetében is: úgy tűnik, hogy a sejt-sejt-kontaktusok gátolják az oxidatív stressz-dependens PARP-aktivációt [100]. Azt is érdemes kiemelni, hogy a kezeletlen kontroll

kultúrákban a chondrogenikus mesenchymalis sejtek magvacskáiban egyértelműen polimerek jelenlétét mutattuk ki. Az a tény, hogy a magvacskáiban lévő polimerek a 30 perces 3-AB-kezelések hatására sem tűntek el, arra enged következtetni, hogy ezen polimerek féléletideje jelentősen hosszabb a sejtmag többi részében található polimerek mintegy 1 perces élettartamánál. Ezt a feltételezésünket támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a PARP-aktivitás vizsgálata során nem tapasztaltunk erősebb NAD^+ -beépülést a sejtmagvacskák területén, ezért feltételezhetjük, hogy az itt lévő polimerek hosszabb élettartamáért az azok lebontásáért felelős PARG-enzimek csökkent aktivitása, esetleg hiánya tehető felelőssé. Ez utóbbi feltételezésünket támasztják alá azok az adatok, melyek szerint a sejtekben detektálható összes PARG-aktivitás túlnyomó többsége (mintegy 80–90%-a) a citoplazmára korlátozódik [118]. Bár más sejtek sejtmagvacskáiban is kimutattak már poli(ADP-ribóz)-polimereket [119], a HD-kultúrák sejteiben detektált magi szignál jelentőségét további kísérletekkel szeretnénk vizsgálni.

5.2.1. A cytosol Ca^{2+} -koncentráció és a PARP-aktivitás kapcsolata

Az oxidatív stressz és a reaktív oxigén- és nitrogénygyökök természetesen nem csak a PARP-1 aktiválásán keresztül fejthetik ki hatásaikat. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy oxidatív stressz esetén megemelkedik a sejtek cytosol Ca^{2+} -koncentrációja [120]. Saját kísérleteinkben hasonló eredményeket kaptunk: különösen a differenciálódás szempontból fontos 3. napon a hidrogén-peroxid koncentrációfüggő módon fokozta a sejtek cytosol kalciumkoncentrációját. A 4 mM H_2O_2 alkalmazása esetén mért mintegy 200 nM-os Ca^{2+} -koncentráció összemérhető a nagydózisú ionofor esetén detektált értékekkel.

A cytosol kalciumkoncentráció-emelkedése általában kétfázisú: elsőként a belső raktárakból szabadul fel a Ca^{2+} , a raktárak kiürülését pedig a külső térből származó kalcium-influx követi. Abdallah és mtsai. [121] kimutatták, hogy ez utóbbi folyamat létrehozásában a poli(ADP-ribóz)ilációs folyamatok is szerepet játszanak. Noha a mechanizmus pontos identifikálása egyelőre várat magára, az mindenesetre valószínűnek látszik, hogy a PARP terméke, a poli(ADP-ribóz)-polimerek bizonyos TRP-receptorok aktiválásán keresztül képesek fokozni a Ca^{2+} -influxot. Ezt a feltételezést más kutatócsoportok eredményei is megerősíteni látszanak [78].

5.2.2. Poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok szerepe az in vitro chondrogenézisben

Az irodalomban megoszlanak az eredmények a chondrogenézis és a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok kapcsolatának tekintetében: egyes kutatócsoportok a PARP-inhibitorok hatására csökkent mértékű porcképződést detektáltak [122], mások ezzel éppen ellentétes eredményeket kaptak [123]. Saját eredményeink ez utóbbi kutatócsoport munkájával vágnak egybe; nevezetesen, kísérleti rendszerünkben a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit egyaránt PARP-dependens módon gátolták a porcmatrix-termelést, és minden valószínűség szerint beindítják a 'DNS-károsodás → PARP-aktiválódás → sejt-diszfunkció' útvonalat. Az, hogy a 3-AB-kezelések önmagukban is jelentős hatást – a matrixképződés erőteljes fokozását – váltanak ki, arra utalhat, hogy a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok esetleg a matrixtermelés közvetlen negatív regulátorai lehetnek. Leírták ugyanis, hogy a PARP bizonyos transzkripciós faktorok (NF- κ B, p53 stb.) regulátoraként is funkcionálhat [74], s már a PARP alapaktivitása is csökkentheti bizonyos matrixfehérjék génjeinek átírását. A másik útvonal, melyet nem szabad figyelmen kívül hagynunk a PARP chondrogenézisre kifejtett hatásainak kiértékelése során, a TRP-receptorok aktiválása és az ennek következtében fellépő cytosol kalciumszint-emelkedés. A PARP-aktivitást követő Ca^{2+} -szint-emelkedést saját rendszerünkben is kimutattuk, a TRPM-receptorok pedig Gavenis és mtsai. [124] közleménye alapján chondrocytákon is expresszálódnak.

Kísérleteinkkel tehát igazoltuk, hogy az oxidatív stressz fokozza a HD-kultúrák sejtjeiben a poli(ADP-riboz)ilációs mechanizmusokat, ami végső soron a porcképződés csökkenéséhez vezet. A folyamat számos lépése azonban még nem világos, ezért ahhoz, hogy az oxidatív stressz által indukált PARP-dependens és -independens változások pontos molekuláris hátterét felderíthessük, további kísérletek sorát kell még elvégeznünk.

5.3. Záró gondolatok

Az itt bemutatott kísérleti eredmények korántsem tekinthetők minden részletre kiterjedőnek. A HD-kultúrák differenciálódó sejtjeiben végbemenő rendkívül összetett és bonyolult változások teljes megértésétől még ugyan nagyon messze vagyunk, az itt leírt információk mégis egy lépéssel közelebb vihetnek a porcsejtek differenciálódását szabályozó folyamatok megismeréséhez.

A differenciálódó chondrogenikus mesenchymalis sejtek kalciumhomeosztázisának részleges felderítéséből számos, az irodalomban eddig nem fellelhető információt nyertünk. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a porcosodó kultúrák sejtjeinek szabad cytosol Ca^{2+} -koncentrációja rendkívül precízen szabályozott paraméter, melynek kisebb emelkedése ugyan elősegíti a porcképződést, ettől nagyobb – bármely irányú – eltérés azonban gátolja a differenciációs programot. Munkánkból az a következtetés is levonható, hogy a rendszer jóval érzékenyebb a negatív irányú eltérésekre: a kalciumérzékeny enzimek aktivitásának hiánya ugyanis bizonyára erős gátat szab a differenciálódás intracelluláris masinériája számára, míg az ugyanazon enzim(ek) túlzott aktivitását minden bizonnyal önszabályozó mechanizmusok terelik a sejtek számára optimális tartományba.

Az oxidatív stressz pontos hatásmechanizmusának felderítése szintén várat magára, azonban a poli(ADP-riboz)ilációs folyamatok általunk leírt jelentőségét semmiképpen sem szabad figyelmen kívül hagyni. Külön említést érdemel azon eredményünk, miszerint egy alig kimutatható, bazális PARP-aktivitás konstitutívan kordában tarthatja a differenciálódó sejtek matrixtermelését, ami potenciálisan terápiás eljárások célpontja lehet.

Eredményeink ugyan közvetlenül nem ültethetők át a gyakorlatba, ám a közeljövőben többek között talán éppen az általunk közölt eredmények vezethetnek el egy brilliáns és rendkívül hatékony gyógymód kifejlesztéséhez. Kutatásaink céljai között végső soron az a nem éppen szerénytelen cél szerepel, hogy az *in vitro* porcképződés molekuláris folyamatainak feltérképezése során szerzett ismereteink hozzájárulhatnak az emberek millióinak életét megkeserítő, az ízületi porcot érintő megbetegedések leküzdésére irányuló próbálkozások eredményességéhez és a terápiás lehetőségként adódó autológ porcimplantátumok kifejlesztéséhez.

6. Összefoglalás

A doktori értekezésben bemutatott munka során a porcosodó mesenchymalis kultúrák kalciumhomeosztázisát, valamint az oxidatív stressz során kialakuló PARP-dependens folyamatokat vizsgáltuk. A disszertációban szereplő legfontosabb új eredmények az alábbiakban foglalhatók össze:

- Kimutattuk, hogy az *in vitro* porcképződés során a chondrogenikus sejtek cytosol kalciumkoncentrációja a differenciációval párhuzamosan változik, és a 3. napon jelentős csúccsal tetőzik. Ez a Ca^{2+} -koncentráció-emelkedés elengedhetetlenül fontos a porcdifferenciáció szempontjából. A differenciálódás napján a megemelkedett cytosol kalciumszint forrása elsősorban az extracelluláris tér.
- A sejtek érzékenyen reagálnak a nyugalmi Ca^{2+} -koncentráció bárminemű modulálására (elsősorban csökkentésére), és igyekeznek azt szűk (100–140 nM) tartományon belül tartani. A kalciumszint változására legérzékenyebb paraméter a sejtek osztódási rátája.
- A chondrogenesis egyik pozitív kalciumszenzitív regulátora, a *kalcineurin* aktivitása is érzékenyen reagál a nyugalmi Ca^{2+} -szint modulálására, és eredményeink alapján ez a foszfatáz lehet az egyik olyan faktor, amelyen keresztül a cytosol kalciumkoncentrációjának változásai megnyilvánulnak.
- További kísérleteink során megállapítottuk, hogy az oxidatív stressz hatására megfigyelt csökkent mértékű porcmatrixtermelés legalább részben a PARP-1 aktiválódásának és az ennek következtében lejátszódó poli(ADP-riboz)ilációs folyamatoknak tudható be.
- A chondrogenikus sejtekben nyugalmi körülmények között is megfigyelhető egy alig kimutatható mértékű bazális PARP-aktivitás, amely a matrixtermelés negatív regulátoraként funkcionálhat.
- Az oxidatív stressz során megfigyelt megemelkedett cytosol Ca^{2+} -koncentrációt legalább részben a fokozott PARP-aktivitás okozhatja, mely ezáltal tovább csökkentheti a károsodott sejtek túlélési esélyét.

Tárgyszavak: *in vitro* porcdifferenciáció, csirke porcosodó mesenchymalis HD-kultúra, cytosol Ca^{2+} -koncentráció, kalcineurin, oxidatív stressz, PARP

7. Summary

Calcium homeostasis and poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP) dependent pathways represent two important aspects of *in vitro* chondrogenesis. This PhD thesis summarises the results of our research into these processes in chicken chondrifying mesenchymal high density cell cultures. The new results presented in this work are as follows:

- We have shown that the cytosolic free Ca^{2+} concentration of chondrogenic mesenchymal cells changes in a characteristic pattern parallel to *in vitro* cartilage differentiation with a definitive peak on day 3. This peak-like elevation of cytosolic Ca^{2+} , whose major source proved to be the extracellular space, is indispensable to proper chondrogenesis.
- Chondrogenic cells are highly sensitive to any kind of modulation (especially the decrease) of the tightly regulated (kept between 100–140 nM) basal cytosolic Ca^{2+} concentration. Cellular proliferation proved to be the most Ca^{2+} sensitive parameter.
- Enzyme activity of the calcium-sensitive protein-phosphatase *calcineurin*, one of the positive regulators of *in vitro* chondrogenesis, is sensitive to the changes of cytosolic free Ca^{2+} concentration. Since calcineurin has been described to regulate a variety of cellular functions, it might act as a factor through which changes of cytosolic Ca^{2+} concentration take effect.
- Furthermore, we have shown that activation of PARP mediated pathways can be at least partially accounted for the decrease in cartilage matrix production as a result of oxidative stress.
- A basal PARP activity was detected in untreated control cells of HDC, which probably has a negative effect on cartilage matrix production.
- Elevated cytosolic Ca^{2+} concentration followed by oxidative stress in cells of HDC can be at least partially caused by higher PARP activity, which can have detrimental effects on cellular survival.

Key words: *in vitro* cartilage differentiation, chicken mesenchymal high density cell culture, cytosolic Ca^{2+} concentration, calcineurin, oxidative stress, PARP

8. Hivatkozások

1. M.Y.Yeung, D.K.Smith, M.S.Chan, C.M.Li, B.C.Wong, K.M.Cheung, K.D.Luk, K.S.Cheah, P.Sham, D.Chan, Y.Q.Song (2007). iCartiGD: the Integrated Cartilage Gene Database. *BMC.Genet.* **8**, 4.
2. S.Kawano, S.Shoji, S.Ichinose, K.Yamagata, M.Tagami, M.Hiraoka (2002). Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **32**, 165-174.
3. G.A.Karpouzas, R.A.Terkeltaub (1999). New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification. *Curr.Rheumatol.Rep.* **1**, 121-127.
4. W.Wang, J.Xu, T.Kirsch (2005). Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Exp.Cell Res.* **305**, 156-165.
5. L.Shum, G.Nuckolls (2002). The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res.* **4**, 94-106.
6. T.W.Sadler Langman's Medical Embryology, 9 ed., Lippincott Williams&Wilkins, 2004.
7. M.H.Ross, W.Pawlina Histology - A Text and Atlas With correlated cell and molecular biology, 5 ed., 2006.
8. D.Heinegard, A.Oldberg (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* **3**, 2042-2051.
9. R.Cancedda, C.F.Descalzi, P.Castagnola (1995). Chondrocyte differentiation. *Int.Rev.Cytol.* **159**, 265-358.
10. E.M.Hasler, W.Herzog, J.Z.Wu, W.Muller, U.Wyss (1999). Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthetic response. *Crit Rev.Biomed.Eng* **27**, 415-488.
11. R.Cancedda, P.Castagnola, F.D.Cancedda, B.Doizin, R.Quarto (2000). Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int.J.Dev.Biol.* **44**, 707-714.
12. A.M.DeLise, L.Fischer, R.S.Tuan (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis.Cartilage.* **8**, 309-334.
13. V.Hamburger, H.L.Hamilton (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev.Dyn.* **195**, 231-272.
14. P.B.Ahrens, M.Solursh, R.S.Reiter (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev.Biol.* **60**, 69-82.
15. C.Hadhazy, M.B.Lazlo, K.S.Kostenszky (1982). Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds. *Acta Morphol.Acad.Sci.Hung.* **30**, 65-78.
16. L.A.Stanton, S.Sabari, A.V.Sampaio, T.M.Underhill, F.Beier (2004). p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *Biochem.J.* **378**, 53-62.
17. H.E.Young, M.L.Mancini, R.P.Wright, J.C.Smith, A.C.Black, Jr., C.R.Reagan, P.A.Lucas (1995). Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev.Dyn.* **202**, 137-144.
18. C.M.Shea, C.M.Edgar, T.A.Einhorn, L.C.Gerstenfeld (2003). BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J.Cell Biochem.* **90**, 1112-1127.
19. A.E.Grigoriadis, J.N.Heersche, J.E.Aubin (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. C.Matta, J.Fodor, Z.Szijgyarto, T.Juhasz, P.Gergely, L.Csernoch, R.Zakany (2008). Cytosolic free Ca(2+) concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: A possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium*.
21. Y.Li, B.P.Toole, C.N.Dealy, R.A.Kosher (2007). Hyaluronan in limb morphogenesis. *Dev.Biol.* **305**, 411-420.
22. R.Zakany, Z.Szijgyarto, C.Matta, T.Juhasz, C.Csortos, K.Szucs, G.Czifra, T.Biro, L.Modis, P.Gergely (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.
23. K.M.Daumer, A.C.Tufan, R.S.Tuan (2004). Long-term in vitro analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling. *J.Cell Biochem.* **93**, 526-541.
24. L.Modis, C.Hadhazy, M.B.Laszlo, K.S.Kostenszky, I.Foldes (1988). Proteoglycan biosynthesis is stimulated by D-penicillamine in chondrifying high density cell cultures. *Exp.Pathol.* **35**, 159-176.
25. A.M.DeLise, R.S.Tuan (2002). Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev.Dyn.* **225**, 195-204.
26. R.O.Kelley, J.F.Fallon (1978). Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **46**, 99-110.
27. K.Daniels, M.Solursh (1991). Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J.Cell Sci.* **100** (Pt 2), 249-254.
28. W.M.Kulyk, B.J.Rodgers, K.Greer, R.A.Kosher (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev.Biol.* **135**, 424-430.
29. A.R.Haas, R.S.Tuan (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.
30. A.E.Denker, A.R.Haas, S.B.Nicoll, R.S.Tuan (1999). Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* **64**, 67-76.
31. H.Jiang, D.R.Soprano, S.W.Li, K.J.Soprano, J.D.Penner, M.Gyda, III, D.M.Kochhar (1995). Modulation of limb bud chondrogenesis by retinoic acid and retinoic acid receptors. *Int.J.Dev.Biol.* **39**, 617-627.
32. C.Farquharson, J.S.Rennie, N.Loveridge, C.C.Whitehead (1996). In vivo and in vitro effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D3 on the proliferation and differentiation of avian chondrocytes: their role in tibial dyschondroplasia. *J.Endocrinol.* **148**, 465-474.
33. S.Tavella, G.Bellese, P.Castagnola, I.Martin, D.Piccini, R.Doliana, A.Colombatti, R.Cancedda, C.Tacchetti (1997). Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J.Cell Sci.* **110** (Pt 18), 2261-2270.
34. E.J.Mackie, I.Thesleff, R.Chiquet-Ehrismann (1987). Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J.Cell Biol.* **105**, 2569-2579.
35. W.Dessau, M.H.von der, M.K.von der, S.Fischer (1980). Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **57**, 51-60.
36. C.B.de, V.Lefebvre, R.R.Behringer, W.Bi, S.Murakami, W.Huang (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* **19**, 389-394.
37. V.Lefebvre, R.R.Behringer, C.B.de (2001). L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis.Cartilage.* **9 Suppl A**, S69-S75.

38. B.K.Zehentner, C.Dony, H.Burtscher (1999). The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J.Bone Miner.Res.* **14**, 1734-1741.
39. D.Barford, A.K.Das, M.P.Egloff (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **27**, 133-164.
40. Y.S.Lee, C.M.Chuong (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.
41. M.Tsuda, S.Takahashi, Y.Takahashi, H.Asahara (2003). Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J.Biol.Chem.* **278**, 27224-27229.
42. A.C.Newton (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 161-167.
43. B.Choi, J.S.Chun, Y.S.Lee, J.K.Sonn, S.S.Kang (1995). Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **216**, 1034-1040.
44. R.Zakany, K.Szucs, E.Bako, S.Felszeghy, G.Czifra, T.Biro, L.Modis, P.Gergely (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.
45. H.Xie, T.L.Rothstein (1995). Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J.Immunol.* **154**, 1717-1723.
46. T.A.Millward, S.Zolnierowicz, B.A.Hemmings (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem.Sci.* **24**, 186-191.
47. R.Zakany, E.Bako, S.Felszeghy, K.Hollo, M.Balazs, H.Bardos, P.Gergely, L.Modis (2001). Okadaic acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A enhances chondrogenesis in chicken limb bud micromass cell cultures. *Anat.Embryol.(Berl)* **203**, 23-34.
48. M.Tomita, M.I.Reinhold, J.D.Molkentin, M.C.Naski (2002). Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J.Biol.Chem.* **277**, 42214-42218.
49. F.Rusnak, P.Mertz (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* **80**, 1483-1521.
50. G.R.Crabtree (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J.Biol.Chem.* **276**, 2313-2316.
51. S.H.Chang, C.D.Oh, M.S.Yang, S.S.Kang, Y.S.Lee, J.K.Sonn, J.S.Chun (1998). Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signaling. *J.Biol.Chem.* **273**, 19213-19219.
52. L.A.Stanton, T.M.Underhill, F.Beier (2003). MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Dev.Biol.* **263**, 165-175.
53. Z.Chen, T.B.Gibson, F.Robinson, L.Silvestro, G.Pearson, B.Xu, A.Wright, C.Vanderbilt, M.H.Cobb (2001). MAP kinases. *Chem.Rev.* **101**, 2449-2476.
54. C.D.Oh, S.H.Chang, Y.M.Yoon, S.J.Lee, Y.S.Lee, S.S.Kang, J.S.Chun (2000). Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. *J.Biol.Chem.* **275**, 5613-5619.
55. M.Endo (2006). Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling. *J.Pharmacol.Sci.* **100**, 519-524.
56. M.J.Berridge, M.D.Bootman, H.L.Roderick (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 517-529.

57. D.M.Salter, M.O.Wright, S.J.Millward-Sadler (2004). NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* **41**, 273-281.
58. F.Soto, M.Garcia-Guzman, W.Stuhmer (1997). Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J.Membr.Biol.* **160**, 91-100.
59. T.J.Shuttleworth, J.L.Thompson, O.Mignen (2004). ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology.(Bethesda.)* **19**, 355-361.
60. D.E.Clapham, L.W.Runnels, C.Strubing (2001). The TRP ion channel family. *Nat.Rev.Neurosci.* **2**, 387-396.
61. C.W.Taylor, P.C.da Fonseca, E.P.Morris (2004). IP(3) receptors: the search for structure. *Trends Biochem.Sci.* **29**, 210-219.
62. G.Giannini, A.Conti, S.Mammarella, M.Scrobogna, V.Sorrentino (1995). The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J.Cell Biol.* **128**, 893-904.
63. C.Fewtrell (1993). Ca²⁺ oscillations in non-excitabile cells. *Annu.Rev.Physiol* **55**, 427-454.
64. T.J.Shuttleworth, O.Mignen (2003). Calcium entry and the control of calcium oscillations. *Biochem.Soc.Trans.* **31**, 916-919.
65. L.D.Robb-Gaspers, A.P.Thomas (1995). Coordination of Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ waves in the intact liver. *J.Biol.Chem.* **270**, 8102-8107.
66. P.D'Andrea, F.Vittur (1996). Gap junctions mediate intercellular calcium signalling in cultured articular chondrocytes. *Cell Calcium* **20**, 389-397.
67. G.Martin, R.Andriamanalijaona, S.Grassel, R.Dreier, M.Mathy-Hartert, P.Bogdanowicz, K.Boumediene, Y.Henrotin, P.Bruckner, J.P.Pujol (2004). Effect of hypoxia and reoxygenation on gene expression and response to interleukin-1 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **50**, 3549-3560.
68. T.Matsushita, K.Fukuda, K.Yamazaki, N.Yamamoto, S.Asada, K.Yoshida, H.Munakata, C.Hamanishi (2004). Hypoxia-induced nitric oxide protects chondrocytes from damage by hydrogen peroxide. *Inflamm.Res.* **53**, 344-350.
69. Y.Henrotin, B.Kurz, T.Aigner (2005). Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis.Cartilage.* **13**, 643-654.
70. Y.E.Henrotin, P.Bruckner, J.P.Pujol (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis.Cartilage.* **11**, 747-755.
71. S.Asada, K.Fukuda, M.Oh, C.Hamanishi, S.Tanaka (1999). Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. *Inflamm.Res.* **48**, 399-403.
72. K.Yamazaki, K.Fukuda, M.Matsukawa, F.Hara, K.Yoshida, M.Akagi, H.Munakata, C.Hamanishi (2003). Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: involvement of the hydroxyl radical. *Pathophysiology.* **9**, 215-220.
73. C.G.Cochrane (1991). Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol.Aspects Med.* **12**, 137-147.
74. L.Virag, C.Szabo (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol.Rev.* **54**, 375-429.
75. F.Berger, C.Lau, M.Ziegler (2007). Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyl transferase 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 3765-3770.

76. S.Aoufouchi, S.Shall (1997). Regulation by phosphorylation of *Xenopus laevis* poly(ADP-ribose) polymerase enzyme activity during oocyte maturation. *Biochem.J.* **325** (Pt 2), 543-551.
77. P.I.Bauer, G.Farkas, L.Buday, G.Mikala, G.Meszaros, E.Kun, A.Farago (1992). Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **187**, 730-736.
78. M.Naziroglu, A.Luckhoff (2008). A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem.Res.* **33**, 1256-1262.
79. C.Szabo, L.H.Lim, S.Cuzzocrea, S.J.Getting, B.Zingarelli, R.J.Flower, A.L.Salzman, M.Perretti (1997). Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J.Exp.Med.* **186**, 1041-1049.
80. W.Ehrlich, H.Huser, H.Kroger (1995). Inhibition of the induction of collagenase by interleukin-1 beta in cultured rabbit synovial fibroblasts after treatment with the poly(ADP-ribose)-polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Rheumatol.Int.* **15**, 171-172.
81. A.Nishio, S.Nakanishi, J.Doull, E.M.Uyeki (1983). Enhanced chondrocytic differentiation in chick limb bud cell cultures by inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **111**, 750-759.
82. T.Biro, I.Szabo, L.Kovacs, J.Hunyadi, L.Csernoch (1998). Distinct subpopulations in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch.Dermatol.Res.* **290**, 270-276.
83. G.Gryniewicz, M.Poenie, R.Y.Tsien (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* **260**, 3440-3450.
84. W.G.Robertson, R.W.Marshall (1979). Calcium measurements in serum and plasma--total and ionized. *CRC Crit Rev.Clin.Lab Sci.* **11**, 271-304.
85. K.Kiraly, T.Lapvetelainen, J.Arokoski, K.Torronen, L.Modis, I.Kiviranta, H.J.Helminen (1996). Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectrophotometry. *Histochem.J.* **28**, 577-590.
86. T.Mosmann (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* **65**, 55-63.
87. U.K.Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
88. P.Cohen, J.G.Foulkes, C.F.Holmes, G.A.Nimmo, N.K.Tonks (1988). Protein phosphatase inhibitor-1 and inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **159**, 427-437.
89. A.Burkle, G.Chen, J.H.Kupper, K.Grube, W.J.Zeller (1993). Increased poly(ADP-ribosyl)ation in intact cells by cisplatin treatment. *Carcinogenesis* **14**, 559-561.
90. G.Sainte-Marie (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J.Histochem.Cytochem.* **10**, 250-256.
91. E.Bakondi, P.Bai, E.E.Szabo, J.Hunyadi, P.Gergely, C.Szabo, L.Virag (2002). Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J.Histochem.Cytochem.* **50**, 91-98.
92. E.Bakondi, P.Bai, K.Erdelyi, C.Szabo, P.Gergely, L.Virag (2004). Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp.Dermatol.* **13**, 170-178.

93. J.P.Gardner, M.Balasubramanyam (1996). Na-Ca exchange in circulating blood cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **779**, 502-514.
94. E.Szabo, Y.Qiu, S.Baksh, M.Michalak, M.Opas (2008). Calreticulin inhibits commitment to adipocyte differentiation. *J.Cell Biol.* **182**, 103-116.
95. J.H.Park, M.Y.Lee, J.S.Heo, H.J.Han (2008). A potential role of connexin 43 in epidermal growth factor-induced proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺/PKC, p44/42 and p38 MAPKs pathways. *Cell Prolif.* **41**, 786-802.
96. J.F.Heubach, E.M.Graf, J.Leutheuser, M.Bock, B.Balana, I.Zahanich, T.Christ, S.Boxberger, E.Wettwer, U.Ravens (2004). Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J.Physiol* **554**, 659-672.
97. Y.M.Yoon, C.D.Oh, S.S.Kang, J.S.Chun (2000). Protein kinase A regulates chondrogenesis of mesenchymal cells at the post-precartilage condensation stage via protein kinase C-alpha signaling. *J.Bone Miner.Res.* **15**, 2197-2205.
98. M.J.Zuscik, M.D'Souza, A.M.Ionescu, K.K.Gunter, T.E.Gunter, R.J.O'Keefe, E.M.Schwarz, J.E.Puzas, R.N.Rosier (2002). Growth plate chondrocyte maturation is regulated by basal intracellular calcium. *Exp.Cell Res.* **276**, 310-319.
99. M.J.Kerrigan, A.C.Hall (2008). Control of chondrocyte regulatory volume decrease (RVD) by [Ca²⁺]_i and cell shape. *Osteoarthritis.Cartilage.* **16**, 312-322.
100. E.Bakondi, M.Gonczi, E.Szabo, P.Bai, P.Pacher, P.Gergely, L.Kovacs, J.Hunyadi, C.Szabo, L.Csernoch, L.Virag (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.
101. J.D.San Antonio, R.S.Tuan (1986). Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations. *Dev.Biol.* **115**, 313-324.
102. C.G.Proud (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem.J.* **403**, 217-234.
103. E.Yanagida, S.Shoji, Y.Hirayama, F.Yoshikawa, K.Otsu, H.Uematsu, M.Hiraoka, T.Furuichi, S.Kawano (2004). Functional expression of Ca²⁺ signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Calcium* **36**, 135-146.
104. S.Kawano, K.Otsu, S.Shoji, K.Yamagata, M.Hiraoka (2003). Ca(2+) oscillations regulated by Na(+)-Ca(2+) exchanger and plasma membrane Ca(2+) pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **34**, 145-156.
105. M.Zayzafoon (2006). Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *J.Cell Biochem.* **97**, 56-70.
106. S.Kawano, K.Otsu, A.Kuruma, S.Shoji, E.Yanagida, Y.Muto, F.Yoshikawa, Y.Hirayama, K.Mikoshiba, T.Furuichi (2006). ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **39**, 313-324.
107. C.Larrucea, P.Castro, F.J.Sepulveda, G.Wandersleben, J.Roa, L.G.Aguayo (2008). Sustained increase of Ca²⁺ oscillations after chronic TRPV1 receptor activation with capsaicin in cultured spinal neurons. *Brain Res.* **1218**, 70-76.
108. T.Nishiyama, N.Yoshizaki, T.Kishimoto, K.Ohsumi (2007). Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature* **449**, 341-345.

109. M.Nieves-Cintrón, G.C.Amberg, M.F.Navedo, J.D.Molkentin, L.F.Santana (2008). The control of Ca²⁺ influx and NFATc3 signaling in arterial smooth muscle during hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 15623-15628.
110. O.Mignen, J.L.Thompson, T.J.Shuttleworth (2003). Calcineurin directs the reciprocal regulation of calcium entry pathways in nonexcitable cells. *J.Biol.Chem.* **278**, 40088-40096.
111. G.Bultynck, E.Vermassen, K.Szłufcik, S.P.De, R.A.Fissore, G.Callewaert, L.Missiaen, S.H.De, J.B.Parys (2003). Calcineurin and intracellular Ca²⁺-release channels: regulation or association? *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **311**, 1181-1193.
112. R.C.Riddle, A.F.Taylor, D.C.Genetos, H.J.Donahue (2006). MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **290**, C776-C784.
113. J.Schalkwijk, W.B.van den Berg, L.B.van de Putte, L.A.Joosten (1985). Hydrogen peroxide suppresses the proteoglycan synthesis of intact articular cartilage. *J.Rheumatol.* **12**, 205-210.
114. K.Oh-hashi, W.Maruyama, H.Yi, T.Takahashi, M.Naoi, K.Isobe (1999). Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **263**, 504-509.
115. S.Namura, K.Iihara, S.Takami, I.Nagata, H.Kikuchi, K.Matsushita, M.A.Moskowitz, J.V.Bonventre, A.Alessandrini (2001). Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 11569-11574.
116. T.M.Kauppinen, W.Y.Chan, S.W.Suh, A.K.Wiggins, E.J.Huang, R.A.Swanson (2006). Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 7136-7141.
117. E.Szabo, L.Virag, E.Bakondi, L.Gyure, G.Hasko, P.Bai, J.Hunyadi, P.Gergely, C.Szabo (2001). Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J.Invest Dermatol.* **117**, 74-80.
118. M.L.Meyer-Ficca, R.G.Meyer, D.L.Coyle, E.L.Jacobson, M.K.Jacobson (2004). Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp.Cell Res.* **297**, 521-532.
119. K.Kawashima, M.Izawa (1981). Poly(ADP-ribose) synthesis in nucleoli and ADP-ribosylation of nucleolar proteins in mouse ascites tumor cells in vitro. *J.Biochem.* **89**, 1889-1901.
120. Y.Ladilov, C.Schafer, A.Held, M.Schafer, T.Noll, H.M.Piper (2000). Mechanism of Ca(2+) overload in endothelial cells exposed to simulated ischemia. *Cardiovasc.Res.* **47**, 394-403.
121. Y.Abdallah, D.Gligorievski, S.A.Kasseckert, L.Dieterich, M.Schafer, C.R.Kuhlmann, T.Noll, H.Sauer, H.M.Piper, C.Schafer (2007). The role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. *Cardiovasc.Res.* **73**, 568-574.
122. R.J.Midura, B.W.Cherny, A.I.Caplan (1985). The relationship of nicotinamide adenine dinucleotide to the chondrogenic differentiation of limb mesenchymal cells. *Dev.Biol.* **111**, 232-242.
123. S.Nakanishi, E.M.Uyeki (1985). Benzamide on chondrocytic differentiation in chick limb bud cell culture. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **85**, 163-175.
124. K.Gavenis, C.Schumacher, U.Schneider, J.Eisfeld, J.Mollenhauer, B.Schmidt-Rohlfing (2009). Expression of ion channels of the TRP family in articular chondrocytes from osteoarthritic patients: changes between native and in vitro propagated chondrocytes. *Mol.Cell Biochem.* **321**, 135-143.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Zákány Rózának tartozom köszönettel, akitől kezdettől fogva rengeteget tanultam – mind ifjú kutatóként, mind magánemberként. Állandó lelkesedésének, ötleteinek, ambícióinak és nem utolsósorban rendkívüli személyiségének köszönhetően mindig gondoskodott a megfelelő iránymutatásról és kutatási feltételekről.

Külön köszönet illeti két közvetlen munkatársamat és barátomat, Fodor Jánost és Juhász Tamást, akik fáradságot és időt nem kímélve mindig készek voltak, hogy segítsenek. Nélkülük egészen biztosan nem születhetett volna meg ez a munka.

Hálámat szeretném kifejezni laboratóriumunk volt és jelenlegi asszisztensnőinek, Bárány Sándornénak és Bíróné Barna Krisztinának is. Az ő szakmai tapasztalatuk, segítőkészségük és önzetlen munkájuk nagyban hozzájárult a kiválóan reprodukálható eredmények színvonalához. Ezeken túl azonban mindkettejük nagyszerű személyiségét szeretném kiemelni, melynek köszönhetően a laborban mindig jókedvvel és derűvel teltek a munkaórák.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Gergely Pál professzor úrnak türelméért, jó tanácsaiért és hasznos útmutatásaiért és a kutatási feltételeink jelentős előmozdításáért.

Köszönettel tartozom Módis László professzor úrnak, hogy nagy hírű laboratóriumának tagja lehetek, és Antal Miklós professzor úrnak, amiért lehetővé tette, hogy kísérletes munkám nagy részét az általa vezetett intézet falai között végezhettem. Ugyanezért tartozom köszönettel Csernoch László professzor úrnak is, és külön köszönöm, hogy a két munkacsoport közötti gyümölcsöző együttműködést engedélyezte.

Egyetemünk Orvosi Vegytani és Élettani Intézeteiben dolgozó szerzőtársaimat és kollaborációs partnereimet is köszönet illeti hasznos munkájukért és segítségükért. Természetesen nem feledkezem meg a laboratóriumunkban dolgozó fiatal TDK-s hallgatókról sem, akik nagyon sokat segítettek a kísérletek elvégzésében.

10. Közlemények listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Matta C*, Fodor J*, Szíjgyártó Zs, Juhász T, Gergely P, Csernoch L, Zákány R: Cytosolic free Ca^{2+} concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium* 2008, 44(3):310–23. (IF: 4,338[#]) *: megosztott elsőszervezők
[#]: 2007-es IF, mert a 2008-as adat még nem áll rendelkezésre

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

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Zákány R, Szíjgyártó Zs, Matta C, Juhász T, Csontos C, Szűcs K, Czifra G, Bíró T, Módis L, Gergely P: Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways. *Exp Cell Res* 2005, **305**:190-199. IF: 4,148

Juhász T, Matta C, Veress G, Nagy G, Szíjgyártó Z, Molnár Z, Fodor J, Zákány R, Gergely P: Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35. *Int J Onc* 2009, **34**:995-1003. (IF: 2,295[#])
[#]: 2007-es IF, mert a 2008-as adat még nem áll rendelkezésre

Fodor J*, Matta C*, Juhász T, Oláh T, Gönczi M, Szíjgyártó Z, Gergely P, Csernoch L, Zákány R: Ionotropic Purinergic Receptor P2X₄ is Involved in the Regulation of Chondrogenesis in Chicken Micromass Cell Cultures. Átdolgozott változat benyújtva: *Cell Calcium* (2009) (IF: 4,338[#]) *: megosztott elsőszervezők
[#]: 2007-es IF, mert a 2008-as adat még nem áll rendelkezésre

Tudományos mutatók

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 6,185

Kumulatív impakt faktor: 16,966

Független citációk száma: 7

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások

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

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

Matta Csaba, Juhász Tamás, Bakondi Edina, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza, Virág László: A poli(ADP-ribozil)áció változása oxidatív

- stressz hatására kondrogenikus primer sejt kultúrákban. XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger (2005)
- Matta Csaba, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az oxidatív stressz befolyásolja a poli(ADP-ribozil)ációt a porcosodó high density kultúrákban. Magyar Anatómus Társaság XIII. Kongresszusa, Pécs (2005)
- Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Deli Tamás, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az intracelluláris Ca-koncentráció változásai az *in vitro* porcdifferenciáció során. Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs
- Zákány Róza, Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál: Kalcium-érzékeny jelátviteli útvonalak az *in vitro* porcképződés szabályozásában. Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs
- Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az *in vitro* porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció-változások. 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg (2008)
- Az értekezés témájához kapcsolódó posztetek*
- Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Deli Tamás, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az *in vitro* porcdifferenciáció során zajló intracelluláris Ca-koncentráció-változások vizsgálata. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest (2006)
- Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Csernoch László, Szíjgyártó Zsolt, Gergely Pál, Zákány Róza: Ionotrop purinoreceptorok szerepe a porcképződésben. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred (2007)
- Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Zákány Róza: Ionotrop purinerg receptorok a differenciálódó kondrocitákon. Magyar Biokémia Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen (2007)
- Sebe Attila, Panyi György, Zákány Róza, Juhász Tamás, Matta Csaba, Varga Zoltán: Ioncsatornák szerepe differenciálódó porcsejteken. 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg (2008)
- Fodor János, Matta Csaba, Oláh Tamás, Gönczi Mónika, Juhász Tamás, Csernoch László, Zákány Róza, Gergely Pál: A primer porcsejtek purinerg-dependens differenciálódása. 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg (2008)
- Juhász Tamás, Szentesiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Fodor János, Karácsonyi Zoltán, Csernoch László, Zákány Róza: NMDA-receptorok a differenciálódó porcsejteken. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen (2008)
- Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásainak vizsgálata az *in vitro* porcdifferenciáció során. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen (2008)

11. Függelék

Az értekezést megalapozó közlemények különlenyomatai.