

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A kalciumhomeosztázis regulációjában szerepet játszó fehérjék
vizsgálata porc- és vázizomsejtekben**

Tóth Adrienn

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

DEBRECEN
2015

A kalciumhomeosztázis regulációjában szerepet játszó fehérjék vizsgálata porc- és vázizomsejtekben

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

Írta: **Tóth Adrienn** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Ivanics Tamás, PhD

Dr. Szentmiklósi József, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
2.305-2.306 szoba
2015. október 20. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD

Dr. Krasznai Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Ivanics Tamás, PhD

Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD

Dr. Krasznai Zoltán, PhD

Dr. Szentmiklósi József, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. október 20. 13:00 óra

Bevezetés

A mozgásszervi megbetegedések az 50 éven felüli lakosság körében leggyakrabban előforduló, az életminőséget jelentősen rontó elváltozások. Az *oszteoarthritisz* és a *reumatoid arthritisz* az ENSZ Egészségügyi Világszervezete jóslatai alapján 2020-ra a negyedik vezető ok lesz a mozgáskorlátozottság kialakulásában. Nem elhanyagolható a szerzett vagy öröklött vázizombetegségek – disztrófiák, miozitiszek, miopátiák – előfordulási gyakorisága sem, amelyek mind a tünetek tekintetében, mind pedig a nemek között nagy heterogenitást mutatnak. Figyelembe véve azt, hogy e betegségek súlyos formái leginkább az idősebb korosztályt érintik, és napjaink vezető problémái közé tartozik a társadalom előregedése, ezért ezekkel a problémákkal a közeljövőben még hangsúlyosabban kell foglalkoznunk.

Kutatócsoportunk elsősorban vázizom kutatással foglalkozik, melynek során mind izomtenyészeteken, mind pedig egerek végtagjaiból izolált izomrostokon vizsgáljuk az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázist, és az abban szerepet játszó kulcsfehérjék expressziós mintázatát. Kollaboráció keretén belül vizsgáljuk az *in vitro* porcdifferenciálódás szabályozó mechanizmusait is. Irodalmi adatokból ismert, hogy vázizomsejteken és kondrocitákon a differenciálódási folyamat előre haladtával intracelluláris Ca^{2+} -szint változások figyelhetők meg. Napjaink leginkább kutatott területét képezik a mezenhimális őssejtek, amelyek potenciális szerepet játszanak az oszteogenikus és kondrogenikus differenciálódási folyamatokban. A proliferálódás és differenciálódás ideje alatt számos hormon, citokin vagy transzkripciós faktor modulálhatja a sejteket, de sok esetben ezek a hatások az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ befolyásolásán keresztül fejtik ki hatásukat. A mezenhimális őssejtek primer, porcsejt irányba történő differenciáltatása, és terápiás célra való alkalmazása egyre kutatottabb terület napjainkban. Az oszteoarthritisz ízületi károsodással járó autoimmun megbetegedés, a hatvan év felettiek 15%-át érinti a nyugati populációban. A betegség kialakulásáért elsősorban a mátrixbontó proteináz enzimek kontrollálatlan termelődése, a proteoglikánok fokozatos

elvesztése, az extracelluláris mátrix átalakulása, valamint a porcsejtek túlzott mértékű differenciációja tehető felelőssé. A gyulladásos folyamatok csak másodlagos tünetként alakulhatnak ki a betegség során, de jelentős mértékben hozzájárulhatnak a tünetek súlyosbításához. A porc- és az izomszöveti terület kóros elváltozásai gyakran egymás kórkövetkezményeként jönnek létre.

Célkitűzés

A bevezetésben említett irodalmi ismeretek birtokában céljaink a következők voltak:

1. A kondrogenikus progenitor sejtek (CPC-k) Ca^{2+} -homeosztázisának részletes megismerése.
2. A Ca^{2+} -tranziensekért felelős szignalizációs útvonalak feltérképezése.
3. A belső Ca^{2+} -raktárak funkcionális karakterizálása.
4. A szignalizációs útvonalban szerepet játszó fehérjék expressziós szintű vizsgálata.

A proliferálódó porcsejtek mellett, az egér eredetű C2C12 sejteken a SERCA1b fehérje expresszió csökkenésének hatását is vizsgálni kívántuk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a belső Ca^{2+} -raktárak Ca^{2+} -pumpájának expresszió csökkenése vagy esetleges hiánya milyen változásokat eredményez. Mivel a SERCA1b a domináns izoforma ezen sejtekben, ezért célul tűztük ki a következő vizsgálatokat:

5. Hogyan változik a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisában és differenciációjában résztvevő fehérjék expressziós mintázata a csökkent SERCA 1b fehérje hatására?
6. A SERCA 1b fehérje expressziójának csökkenése milyen esetleges hatással van az E - C kuplungra és a depolarizáció által történő Ca^{2+} -felszabadulásra?
7. A SERCA 1b csökkent expressziója milyen morfológiai változásokat idéz elő, módosítja-e a differenciálódó izom növekedését?

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

A kondrogenikus progenitor sejtek izolálását, immortalizálását Nicolai Miosge és munkatársai írták le elsőként. Az oszteoartrózisban szenvedő betegekből (65-75 év) térdprotézis műtétet követően mintát vettek, amelyből létrehozták a primer kultúrát. A sejteket Dulbecco által módosított Eagle's Mediumban (DMEM) tenyésztették, amelyet 10 % foetalis borjúsérummal, 50 U/ml penicillinnel, 50 µg/ml streptomycin antibiotikumokkal, valamint L-glutaminnal (10 mM) egészítettek ki. A CPC sejtek immortalizációját lentivirális expressziós rendszerrel érték el (pLenti6/v5-hTERT). A sikeres transzfekció eredményeképpen létrejött az ún. CPC 531 sejtvonala, amelyet a további kísérleteinkhez használtunk.

A C2C12 myoblastok egér eredetű vázizomsejtek, melyeket szintén DMEM-ben tenyésztettünk, amelyet 10 % foetalis borjúsérummal, 50 U/ml penicillinnel, valamint 50 µg/ml streptomycin antibiotikumokkal egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ jelenlétében tartottuk fenn. A sejtek myotubulusokká történő differenciálódását, 80 %-os konfluencia elérését követően, a tápoldat módosításával biztosítottuk. A differenciáltató tápoldat szintén DMEM volt 5 % lószérummal, valamint a már említett antibiotikumokkal kiegészítve.

Liposzóma mediált transzfekció

Az egér eredetű C2C12 vázizom-tenyészetekben RNS interferencia módszert alkalmaztunk az endogén SERCA 1b fehérje expressziójának csökkentésére. Az shRNS-t liposzóma mediált transzfekcióval juttattuk a sejtekbe a proliferáció megkezdését követő 24-30 órával. A transzfekciót Opti-MEM tápoldatban 2,5 órán keresztül végeztük 37 °C-on termosztátban, majd pedig 48 órán keresztül a korábban említett DMEM tápoldatban hagytuk a sejteket proliferálni. 48 órát követően a sejteket 1,5 µg/ml puromycin tartalmú tápoldatban szelektáltuk.

Immuncitokémia

Az alábbiakban tárgyalt immunfestési technikát C2C12 sejtvonalon SERCA1a és -1b fehérje kimutatására alkalmaztuk. A sejt kultúrákat foszfát pufferes sóoldattal átmostuk, majd 20 percen keresztül jég hideg 70 %-os etanollal fixáltuk. A sejtmembrán permeabilizálását 15 perces kezelés során 0,1 %-os Triton X-100-zal biztosítottuk, majd az aspecifikus helyek blokkolására 1% borjúsérum-albumin oldatot (BSA) használtunk. Ezután a sejteket primer antitesttel inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán keresztül. Ezt követően minden tenyészet esetén fluoreszceinnel konjugált másodlagos IgG-t alkalmaztunk 1:500 arányban PBS-ben hígítva, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A sejtmagokat DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenilindol) tettük láthatóvá. Az eredményeket konfokális mikroszkóppal értékeltük.

Western-blot

Vázizomtenyészetek esetében a SERCA1a, SERCA1b, SERCA2a, CaN, CSQ, STIM1, MyoD és az aktin; CPC tenyészetek esetében a STIM1, Orai1, IP₃R altípusok, ionotróp és metabotróp purinerg receptorok és az aktin kimutatásához teljes sejtlizátumot készítettünk a tenyészetekből. A Western-blot vizsgálathoz használt mintákat szonikálással feltártuk, majd 1/5 térfogatú, ötszörös töménységű elektroforetikus mintapuffer hozzáadásával kezeltük és 5 percig 80 °C-on főztük. A fehérjéket elektroforézissel szétválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat PBS-ben oldott sovány tejpor 5%-os oldatával blokkoltuk, majd egy éjszakán át (4 °C-on) inkubáltuk a primer antitesttel. Háromszor 10 perc PBST-s (0,1% Tween 20-szal kiegészített PBS) mosás után a membránokat torma peroxidázzal konjugált IgG-vel inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcenciás reakcióval detektáltuk.

RT-PCR

Az RT-PCR analízishez a tenyészetekből teljes RNS-t izoláltunk Qiagen RNeasy® Mini Kit, illetve Trizol reagens segítségével. Az így nyert RNS-mintából Omniscript reverz transzkripció kital felhasználásával, oligo(dT)

primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációjához használt primereket az interneten hozzáférhető nukleotid-szekvenciák alapján állítottuk elő. A PCR-mintákat végül 1,5%-os agarózgélben vizsgáltuk, EZ-Vision Three reagenssel megfestve.

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

A sejtek intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásait Fura-2-AM fluoreszcens Ca^{2+} -kötő festék segítségével mértük. A feltöltést 37 °C-on, 60 percen át végeztük. A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM kettős monokromátoros berendezés biztosította. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en, interferenciaszűrő közbeiktatásával, egy fotoelektron-sokszorozó (PMT) segítségével detektáltuk. A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcencia-értékek hányadosából ($R=F_{340}/F_{380}$) az alábbi egyenlet alapján számítottuk ki az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t:

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

A sejteket folyamatosan perfundáltuk normál vagy kalciummentes Tyrode-oldattal egy külső perfúziós rendszer segítségével, és a különböző mérőoldatokat egy lokálperfúziós rendszeren keresztül adagoltuk közvetlenül a vizsgálni kívánt sejtekre.

A sejtprolifерáció és differenciálódás vizsgálata

A C2C12 sejteket 3 cm átmérőjű műanyag Petri-csészékben tenyésztettük, és az 1. naptól az 5. napig felvételeket készítettünk fázis kontraszt mikroszkóphoz csatlakoztatott fényképezőgép segítségével. A kontroll sejtek mellett a SERCA 1b shRNS-el transzfektált sejteket (C1, C5, Scr) is nyomon követtük, kontroll és ciklosporinnal (CSA) kezelt körülmények között. A CSA oldatot 200 nM koncentrációban használtuk, és minden 2. nap kezeltük a sejteket. A tenyésztés minden egyes napján képeket készítettünk minden Petri-csésze (kezelt és kontroll) 5-5 véletlenszerűen kiválasztott látóteréről. A sejtmagokat manuálisan körberajzoltuk, majd morfometrikus analízisnek vetettük alá őket.

Kalcineurin-enzimaktivitás mérése

Az *in vitro* kalcineurin-enzimaktivitás (CaN) méréshez 10 cm átmérőjű műanyag Petri-csészében tenyésztettük a sejteket, majd fiziológias sóoldattal lemostuk és felkapartuk a tenyészetet. Centrifugálást követően a sejtpelletet 100 µl RIPA-pufferben homogenizáltuk, amely proteáz-inhibitorokat is tartalmazott. A minták szonikálását követően centrifugálási lépés következett ($10,000\times g$, 10 perc, 4°C). A felülúszó fehérje koncentrációjának meghatározását követően (BCA) kezdtük el az enzimaktivitás mérést. A kalcineurin aktivitás detektálásához RII foszfopeptid szubsztrátot adtunk a mintákhoz, és meghatároztuk a felszabaduló PO_4^{3-} mennyiségét malachite green kolorimetriás assay segítségével.

Eredmények

I.-Porcszövet –CPC sejtenyészetek

Az IP_3 -receptoron keresztül, a belső raktárból felszabaduló Ca^{2+} spontán Ca^{2+} -tranzienseket okoz

Kísérleteink kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a CPC sejtenyészetek sejtjein megjelennek-e olyan funkcionális receptorfehérjék, melyek a spontán kialakuló Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásáért felelősek. A Fura-2-AM festékkel feltöltött porcsejtek intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -ját 1000 s-on keresztül detektáltuk. Tapasztalataink szerint a sejtek többsége (28 sejtből 20 sejt, 71%), eltérő frekvenciával és amplitúdóval, spontán Ca^{2+} -tranzienseket produkált normál Tyrode-oldatban. A tranziensek átlagos frekvenciája $1,3 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-4}$ Hz, az időegység alatt felszabaduló $[\text{Ca}^{2+}]$ mennyiségének átlagértéke $23,6 \pm 5,4 \mu\text{M} \cdot \text{s}$, a Ca^{2+} -tranziensek átlagos amplitúdó értéke 117 ± 12 nM, a felszálló szár meredeksége pedig $2,2 \pm 0,5 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$ volt. Minden esetben 20 sejt átlagát vettük figyelembe. Annak eldöntésére, hogy a citoszól megemelkedett Ca^{2+} -szintjéért a belső raktárakból felszabaduló vagy a plazmamembrán Ca^{2+} -csatornáin keresztül bejutó Ca^{2+} a felelős, további kísérletekre volt szükség. Először Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban vizsgáltuk a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásait és azt tapasztaltuk, hogy a

porcsejteken ilyen körülmények között is megfigyelhetők spontán Ca^{2+} -tranziensek (10 sejtből 9 sejt), az amplitúdó és a frekvencia is csökkent az extracelluláris Ca^{2+} -ot tartalmazó oldatban mértekhez képest. Extracelluláris Ca^{2+} hiányában a tranziensek átlagos frekvenciája $1,4 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-4}$ Hz, az átlagos amplitúdó $78,5 \pm 9,8$ nM, az egységnyi idő alatt felszabaduló $[\text{Ca}^{2+}]$ mennyiségének átlagértéke $14,7 \pm 2,8$ $\mu\text{M} \cdot \text{s}$, a felszálló szár meredeksége pedig $1,7 \pm 0,4$ $\text{nM} \cdot \text{s}^{-1}$ – nak adódott. A normál Tyrode-oldatban és a Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban mért Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó értékei között szignifikáns eltérést tapasztaltunk, de sem a felszabaduló $[\text{Ca}^{2+}]$ -ban, sem pedig a felszálló szár meredekségében nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll sejtek értékeihez képest. Eredményeink arra utalnak, hogy a spontán oszcillációk kialakulásáért nagyrészt a belső raktárból felszabaduló Ca^{2+} felelős. Ezen állítás további bizonyítására újabb kísérleteket terveztünk, mely során azt vizsgáltuk, hogy a belső raktárból felszabaduló Ca^{2+} milyen jelátviteli és egyéb útvonalakat aktivál. A kalcium visszavételezéséért felelős SERCA pumpa gátlására CPA-oldatot alkalmaztunk (10 μM) normál Tyrode-oldatban, míg a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés (SOCE) gátlására LaCl_3 -t (500 μM) és YM-58483-t (1 μM) tartalmazó koktélt adagoltunk a sejtekre. Miután a sejtek nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációja stabil értékre beállt, a perfúziós rendszer segítségével a mérőkádban az oldatot Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatra cseréltük, majd CPA-t tartalmazó oldat (10 μM) adagolásával kiürítettük a raktárat. A regisztrált adatokból számolt felszabadult Ca^{2+} -mennyisége $22,2 \pm 2,4$ $\mu\text{M} \cdot \text{s}$ -nak adódott ($n=25$). Amikor az oldatot lecseréltük 1,8 mM Ca^{2+} -tartalmú Tyrode-oldatra, akkor nagy amplitúdójú ($131,0 \pm 16,4$ nM vs. $69,2 \pm 10,6$ nM) Ca^{2+} -tranzienst detektáltunk, ami a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés (SOCE) eredménye. A kísérletet nem specifikus SOCE gátlószerek, a YM-58483 (1 μM), és LaCl_3 (500 μM) együttes jelenlétében megismételve, szignifikánsan kisebb amplitúdójú tranzienseket regisztráltunk ($n=13$ és $n=8$, $p=0,005$). Ezen eredményekből arra következtettünk, hogy a belső Ca^{2+} -raktárnak kitüntetett szerepe van a spontán Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásában.

A továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az ER-ból milyen receptoron keresztül valósul meg a Ca^{2+} -felszabadulás. A vizsgálat első lépéseként egy aspecifikus IP_3 -receptor blokkoló szert, az APB-t ($75\ \mu\text{M}$) alkalmaztuk Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban. Ebben az oldatban nem tapasztaltunk spontán Ca^{2+} -oszcillációt, így hipotézisünk, miszerint a Ca^{2+} -felszabadulás IP_3 -receptoron keresztül történik, helytállónak bizonyult. Ezzel ellentétben, 30 mM koffein adagolása nem befolyásolta sem a spontán kialakuló tranzienseket, sem pedig a nyugalmi Ca^{2+} -szintet.

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

Kísérleteink további részében azt vizsgáltuk, hogy a belső Ca^{2+} -raktár területén milyen fehérjék lokalizálódnak porcsejtekben. Specifikus PCR primer párokat terveztünk, hogy azonosítani tudjuk a Ca^{2+} -felszabadulásban/visszavételben résztvevő fehérjék mRNS-transzkriptumait. Eredményeink szerint mindhárom IP_3 -receptor izoforma ($\text{IP}_3\text{R-1}$, 2, 3) megtalálható a porcsejtekben. A RyR izoformák közül egyet sem tudtunk detektálni. A SOCE-ban szerepet játszó STIM izoformákat (STIM1 , STIM2), ill. a plazmamembránban található CRAC csatorna 3 izoformáját (Orai1 , Orai2 , Orai3) szintén sikerült mRNS-szinten azonosítanunk. A következő lépésben megpróbáltuk kimutatni ezen csatornákat fehérjeszinten is, Western-blot technika segítségével. Ehhez az adott fehérjére specifikus antitestet használtunk, és sikerült fehérjeszinten is kimutatnunk az IP_3 -receptor izoformákat, ugyanakkor a SOCE-ban résztvevő fehérjék közül csak a STIM1 és Orai1 fehérjék jelenlétére találtunk bizonyítékot.

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

Következő kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a Ca^{2+} -tranziensek kialakításában milyen szignalizációs útvonalak játszanak szerepet. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy humán mezenhimális őssejtekben (MSC-k) a Ca^{2+} -tranziensek kialakításáért az autokrin/parakrin szignalizációs loop felelős. Ezek alapján feltételeztük, hogy a purinerg szignalizációs folyamatok szerepet

játszhatnak migratorikus progenitor sejtek kalciumhomeosztázisában is. Hipotézisünk bizonyítása érdekében először mRNS-szinten vizsgáltuk a Ca^{2+} -homeosztázisban részt vevő purinerg receptorok kifejeződését. Eredményeink alapján elmondható, hogy az A_1 adenosin-receptor altípusai az A_3 kivételével expresszálódnak (A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$, $\text{A}_{2\text{B}}$), a P_2X ionotróp purinerg receptorok közül a P_2X_1 , P_2X_4 , P_2X_5 , P_2X_6 , P_2X_7 kimutatható, illetve a G_q -fehérjéhez kapcsolt P_2Y metabotróp purinerg receptor altípusok (P_2Y_5 , P_2Y_8 , P_2Y_9 , P_2Y_{10} , P_2Y_{12} , P_2Y_{13} , P_2Y_{14}) is detektálhatóak RT-PCR segítségével a CPC-kben. Következő lépésként ezen transzkriptumok fehérjeszintű kifejeződését is megvizsgáltuk. Amíg a P_2X receptor 5 izoformáját sikerült kimutatnunk, addig a P_2Y receptor közül csak a P_2Y_1 és P_2Y_4 , valamint a P_2Y_2 csak nagyon gyengén volt detektálható.

A fent említett receptorok funkciójának megállapítására egyedi sejten történő Ca^{2+} -mérést végeztünk, P_1 és P_2 receptor agonisták adagolásával. Az általánosan elfogadott P_2 receptor agonista ATP-t $180\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva a sejteken, gyors, nagy amplitúdójú ($338 \pm 29\text{ nM}$, $n=44$ sejt a 48-ból, 91%) Ca^{2+} -tranzienst sikerült detektálnunk normál Tyrode-oldatban, melyet újabb ATP adagolása mellett ismételten detektálni tudtunk. A tranziensek átlagos időtartamát az időbeli félértékszélességgel (FTHM, full time at half maximum) jellemeztük, ami $16,1 \pm 2,6\text{ s}$ -nak adódott. Ahhoz, hogy bizonyítani tudjuk a P_2X és P_2Y receptorok funkcionális szerepét, nem-specifikus P_2 receptor antagonistát, suramint ($10\text{ }\mu\text{M}$) alkalmaztunk. Suramin adagolása mellett a Ca^{2+} -tranziensek jellemző paraméterei nem változtak a csak ATP adagolása mellett rögzített adatsorhoz képest, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásáért a suramin-inszenzitív P_2 purinerg receptorok (P_2X_4 , P_2X_6 és/vagy P_2Y_4) a felelősek. A kísérletet Ca^{2+} -mentes körülmények között megismételve a repetitív tranziensek ugyanúgy detektálhatóak voltak, de a kontrollhoz képest szignifikánsan kisebb amplitúdóval ($205 \pm 25\text{ nM}$, $n=35$). Ugyancsak szignifikáns különbséget tapasztaltunk a felszálló szár

meredekségében is, a kontroll és Ca^{2+} -mentes körülmények között regisztrált adatsorban ($72,9 \pm 12,6 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$ vs. $35,4 \pm 8,8 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$, $p < 0,05$). Ugyanakkor nem találtunk jelentős különbséget a tranziensek időtartama között a két mérési adatsorban ($20,6 \pm 3,1 \text{ s}$; $p = 0,29$). A fent említett eredmények azt sugallják, hogy mind az ionotróp P2X, mind pedig a metabotróp P2Y purinerg receptorok és/vagy a SOCE hozzájárulnak a spontán Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásához. Amikor azonban az IP_3 -receptor inhibitorát, a 2-APB-t az ATP-vel együtt adagoltuk a sejtekre, tranzienszt csak néhány esetben sikerült detektálnunk ($n = 2$ a 19 sejtéből, 10%), ezért úgy gondoljuk, hogy a tranziensek létrejötte leginkább a metabotróp P2Y receptor aktivitásából adódik, vagy a 2-APB aspecifikusan gátolja a Ca^{2+} -belépést.

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

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

Szerettük volna megvizsgálni, hogy a purinerg receptorok milyen módon játszanak szerepet az ismétlődő Ca^{2+} -tranziensek kialakulásában. Ennek kiderítésére apirázt alkalmaztunk, mely defoszforilálja az extracelluláris adenzin 5'-trifoszfátot (ATP) és adenzin 5'-difoszfátot (ADP), adenzin 5-monofoszfáttá (AMP). Magát az enzimet $5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ koncentrációban alkalmaztuk az egyedi sejten történő Ca^{2+} -mérés ideje alatt. Apiráz jelenlétében nem alakult ki ismétlődő Ca^{2+} -tranziens ($n=5$), amiből arra következtettünk, hogy az extracelluláris ATP jelenléte elengedhetetlen a spontán Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásában.

II.-Vázizomszövet-C2C12 sejtenyészetek

C2C12 sejtenyészetek, transzfekció

Irodalmi adatokból ismert, hogy az SR Ca^{2+} -pumpájának neonatális izoformája - a SERCA1b- meghatározó szerepet tölt be a myotubulusok és a fiatal állatok vázizmának Ca^{2+} -homeosztázisában. Kísérleteinkben ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a SERCA1b géncsendesítésének hatásait. A kísérletek kivitelezéséhez C2C12 egér eredetű vázizomsejteket használtunk, és olyan expressziós vektort terveztünk, amely tartalmazza a SERCA1b elleni specifikus shRNS szekvenciát (pLKO.1-puro-CMV-tGFP). A sejtenyészeteken liposzóma mediált transzfekciót alkalmaztunk. A transzfekciós hatékonyságot a SERCA1b fehérjére specifikusan tervezett antitesttel ellenőriztük, Western-blot technika segítségével.

Olyan klónokat kerestünk, amelyekben a SERCA1b fehérje expressziója teljesen vagy csak részben csökkent. A puromycinnel szelektált sejtkolóniákból kiválasztottuk az 1. klónt (C1), ahol szinte teljes mértékben csökkent az expresszió, és az 5. klónt (C5), ahol csak részben sikerült lecsökkentenünk a SERCA1b fehérje expresszióját. Ezekből a klónokból puromycines tápoldatban tartva stabil klónokat hoztunk létre, és ezeket használtuk a scrambled és kontroll

sejtek mellett a további kísérletekhez. Minden kísérlethez kizárólag csak terminálisan differenciálódott myotubulusokat használtunk fel.

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

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

A MyoD expressziós szintje nem változott a transzfekciót követően, míg a CaN expressziója az 1. és 5. klónban is jelentős csökkenést mutatott. Az eredmények kvantitatív analízisét követően megállapítottuk, hogy a SERCA1b géncsendesítés hatására a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan csökkent a CSQ, a STIM1 és a CaN expressziós szintje a C1 sejtekben. Sikertelenül kimutatnunk a SERCA2a izoformát is, de az egyes minták expressziós szintje között nem találtunk különbséget.

Kísérleteink további részében a mRNS-szintű változásokat követtük nyomon. Ehhez specifikus primer párokat terveztünk. Vizsgáltuk a vázizom differenciálódás negatív regulátorát a myostatin-t, valamint a CaN aktivitását jelző modulatory calcineurin interacting protein-t, az MCIP1.4-t. A PCR reakcióval felerősített amplimerek detektálása során azt tapasztaltuk, hogy mind

a myostatin, mind a MCIP1.4 szintje csökkenést mutatott a C1 sejtekben a kontrollhoz viszonyítva.

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

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

További vizsgálatainkban a pumpa működésében esetlegesen bekövetkezett változások hatásait kívántuk feltárni (PV_{max}) a Scr, C1 és C5 sejtekben. A nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékei között a tranziensek kialakulása előtt nem találtunk szignifikáns különbséget (108 ± 4 nM a Scr sejtek esetében, 109 ± 4 nM a C1 sejtek esetében). A KCl által kiváltott tranzienseket követően azonban az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a C1 myotubulusokban lassabban tért vissza a nyugalmi szintre. A KCl adagolását követő 20. és 40. másodpercben a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékét meghatároztuk, s míg a kontroll sejtekben ezek az értékek 112 ± 3 nM-nak (20. s-ban) és 110 ± 3 nM-nak (40. s-ban) adódtak, addig a C1 sejtek esetén az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ugyanezen időpontokban 150 ± 7 nM (20. s-ban) és 135 ± 5 nM (40. s-ban) volt. Ezek az értékek a SERCA1b géncsendesített sejteken található pumpák csökkent aktivitására utalnak. A továbbiakban meghatároztuk a PV_{max} értékeket is. Szignifikáns különbséget ($p < 0,01$) találtunk a C1 myotubulusokban (144 ± 24 $\mu\text{M/s}$), a C5 (382 ± 16 $\mu\text{M/s}$) és a Scr myotubulusokhoz képest (454 ± 41 $\mu\text{M/s}$). A kapott értékek megerősítették, hogy a SERCA1b fehérje expressziójának csökkentése nagy mértékben hozzájárul a pumpaaktivitás csökkenéséhez is.

Következő lépésben kiszámoltuk a fluxust, amely a RyR-on keresztül felszabaduló Ca^{2+} -árammal arányos, majd összevetettük a Scr sejtek adatait a C1 sejtekével. A fluxus értékei között szignifikáns ($p < 0,01$) eltérést találtunk (610 ± 60 (Scr) vs. 377 ± 64 $\mu\text{M/s}$ (C1)). Ugyancsak meghatároztuk a felszabadított Ca^{2+} mennyiségét is, itt is szignifikánsan alacsonyabb értékeket kaptunk a C1 sejtekben a kontrollhoz viszonyítva (576 ± 80 μM vs. 843 ± 75 μM ; $p < 0,05$). Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az SR Ca^{2+} -tartalma lényegesen kisebb, és ezáltal a raktárból felszabadítható Ca^{2+} mennyiség is kevesebb a SERCA1b géncsendesített myotubulusokban.

Az eddigi eredményekből levont következtetések további bizonyítására a következő méréssorozatot hajtottuk végre: Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban kezdtük a detektálást, majd CPA-oldatot (10 μM) adagoltunk a sejtekre szintén Ca^{2+} -mentes körülmények között. A kialakult tranziensek amplitúdója és időbeli félértékszélessége a Scr sejten lényegesen nagyobb volt, mint a C1 myotubulus esetén. Ez arra utalt, hogy a csökkent SERCA1b expresszió következtében a Ca^{2+} -felszabadulás sebessége és mennyisége is jelentősen csökkent. Ennek kvantitatív igazolására kiszámítottuk a tranziensek görbe alatti területét, mely az SR-ból felszabadítható Ca^{2+} mennyiségének jó közelítését adja. Az így kapott adatok átlagolása után megállapítható volt, hogy a belső raktárból felszabadítható Ca^{2+} mennyisége szignifikánsan alacsonyabb a C1 myotubulusokban a Scr myotubulusokhoz viszonyítva ($5,8 \pm 1,1$ $\mu\text{M} \cdot \text{s}$ és $15,7 \pm 1,8$ $\mu\text{M} \cdot \text{s}$; $p < 0,001$).

A SERCA1b csökkent expressziója módosítja a differenciálódó izom növekedését

Morfológiai vizsgálataink során nyomon követtük a proliferációs és differenciációs periódusokat transzfektált és nem transzfektált sejtek esetében. A proliferációs ráta meghatározására 10^3 sejtet raktunk ki tenyésztőedényenként (3 cm átmérőjű Petri csésze), és az 1. naptól az 5. napig random látótereket fotóztunk, majd megszámoltuk a sejtmagokat. A sejtmagok számát mindig az 1.

napon számolt sejtmagszámra normalizáltuk. A tenyészetekről kapott adatok kiértékelése alapján a 4. tenyésztési napon a C1 sejtek normalizált sejtmagszáma szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,05$) volt a kontroll sejtek sejtmagszámahoz viszonyítva ($3,7 \pm 1,1$ és $9,1 \pm 0,7$). További kísérleteinkben a terminálisan differenciálódott myotubulusokat fixáltuk, majd immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk, melyhez dezmint jelölő elsődleges antitestet használtunk. Az antitest kötődését FITC konjugált másodlagos antitesttel tettük láthatóvá. Az eredmények kiértékelését követően azt tapasztaltuk, hogy a terminálisan differenciálódott myotubulusok átmérőjében nincs szignifikáns eltérés ($p > 0,05$) a C1 és Scr sejtekben. Ezzel szemben a sejtmagok átlagos száma szignifikánsan kisebb a C1 sejtekben a kontrollhoz viszonyítva ($3,6 \pm 0,2$ vs. $5,7 \pm 0,5$; $p < 0,01$), illetve az 5 vagy több sejtmagot tartalmazó myotubulusok százalékos aránya is alacsonyabb a C1 sejtekben. Ezen eredmények megerősítették a feltevésünket, miszerint a SERCA1b csökkent expressziója módosítja a vázizom differenciálódást.

Annak igazolására, hogy a SERCA1b gátlása a PP2B-n keresztül vezet a proliferáció csökkenéséhez, a C1, C5, Scr és kontroll sejtek proliferációját megvizsgáltuk ciklosporin A (CSA) kezelés mellett is. A CSA oldatot 200 nM koncentrációban használtuk, és minden 2. nap kezeltük a sejteket. A tenyésztés minden napján képeket készítettünk minden egyes Petri-csésze (kezelt és kontroll) 5-5 véletlenszerűen kiválasztott látóteréről. A kísérletek elvégzését és kiértékelését követően azt tapasztaltuk, hogy a CSA csökkentette mind a kontroll, mind pedig a C5 és Scr sejtek proliferációs rátáját, azonban a C1 sejtek további proliferációjának csökkenését nem okozta. Eredményeink alapján a kontroll sejtek relatív sejtmagszáma $9,1 \pm 0,7$ és $5,6 \pm 0,6$ volt kontroll és CSA-kezelt sejtek esetében ($p < 0,05$), míg a C1 sejtek esetében ez az érték $3,6 \pm 0,5$ és $3,7 \pm 1,1$ -nak adódott kezelt és kontroll esetben ($p > 0,4$), amely összhangban van a CaN csökkent expressziós szintjével.

Megbeszélés

I. Porcszövet-A kondroprogenitor sejtek belső Ca^{2+} -raktárának funkcionális jellemzése és a Ca^{2+} -oszcilláció kialakításában betöltött szerepének vizsgálata

A Ca^{2+} a sejtek legtöbb életfolyamatában fontos szabályozó szerepet játszik, így a differenciálódásban is kitüntetett szereppel bír. Munkám egyik részében arra kerestük a választ, hogy humán eredetű CPC-kben milyen útvonalon keresztül valósul meg a repetitív Ca^{2+} -oszcilláció, és milyen fehérjék vesznek részt ennek szabályozásában. Ahhoz, hogy karakterizálni tudjuk a belső Ca^{2+} -raktárat, meg kellett vizsgálnunk a szabályozásban érintett fehérjék expressziós mintázatát. Az endoplazmatikus retikulum (ER) két, a Ca^{2+} -felszabadításban fontos szerepet játszó csatornáját vizsgáltuk, az IP_3R altípusait, valamint a RyR-t, mely utóbbi expresszióját nem sikerült kimutatnunk. A CPC-kben mind a három IP_3R altípus detektálható. A Ca^{2+} -oszcilláció kialakulása az IP_3R altípusainak relatív expressziós szintjétől, illetve endogén modulátorok, mint az IP_3 , Ca^{2+} és ATP megjelenésétől függ. A belső Ca^{2+} -raktárból történő, IP_3R -mediált Ca^{2+} -felszabadulás nélkülözhetetlen a Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásában, ezért az egyedi sejten történő Ca^{2+} -mérés során egy aspecifikus IP_3R blokkolót, a 2-APB-t használtuk, melynek hatására a spontán bekövetkező Ca^{2+} -események eltűntek. Megvizsgáltuk továbbá a SOCE mechanizmusát is, amely szintén esszenciális szerepet tölt be a CPC-k Ca^{2+} -oszcillációjában. Feltételezésünk szerint, a CPC-kben kialakuló Ca^{2+} -oszcilláció alapja az IP_3R -on keresztül történő Ca^{2+} -felszabadulás, és a SOCE mechanizmus révén a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés. Ezt az elképzelésünket alátámasztják a CPA-val végzett kísérleteink eredményei is. Arra a kérdésre azonban, hogy a CPC-kben megfigyelhető Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásának hátterében milyen fehérjék állnak, az irodalomban nem találtuk meg a választ. A CPC-k esetében csak a STIM1 expresszióját sikerült kimutatnunk. A spontán Ca^{2+} -tranziensek kialakulásában a STIM1 fehérjének meghatározó szerepe van, és esszenciális szerepet tölt be az Orail

fehérjék pontákba történő rendeződésénél is. Habár az Orai izoformáknak több típusa ismert, a CPC-k csak az Orai1-t expresszálják.

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

Humán MSC-kben a Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásáért egy autokrin/parakrin purinerger loop tehető felelőssé, ahol ATP felszabadulását követően a P2Y_1 metabotróp purinerger receptor stimulálódik, majd a PLC útvonal aktiválódik. Ezen tények ismeretében kíváncsiak voltunk arra, hogy a humán CPC-kben, ahol az extracelluláris nukleotidok gyulladásos mediátorokkal együtt szabadulnak fel, milyen szerepet töltenek be a purinerger receptorok.

Tekintettel arra, hogy a P1 receptor altípusok a kondrocitákban is expresszálódnak, először a P1 purinerger receptor profilra voltunk kíváncsiak. Eredményeink szerint CPC-kben az A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$ és $\text{A}_{2\text{B}}$ expressziója megfigyelhető, míg az A_3 receptor expressziója nem volt detektálható. Következő lépésben a P2 purinerger receptorok expressziós mintázatának alakulását tanulmányoztuk. Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés során, extracelluláris ATP adagolásával Ca^{2+} -tranzienseket váltottunk ki normál és Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban, ahol a Ca^{2+} -mentes körülmények között szignifikánsan kisebbnek bizonyult mind a nyugalmi, mind pedig a maximális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ érték, valamint az amplitúdó és az FTHM is. Ezzel ellentétben, amikor az ATP-t együtt alkalmaztuk az IP_3R nem specifikus inhibitorával, a 2-APB-vel, a vizsgált sejtek többsége nem válaszolt, bizonyítva ezzel, hogy az extracelluláris nukleotidok elsődleges kötődési célpontjaik a metabotróp P2Y receptorok. További vizsgálatainkban különböző P2 receptor agonistákat (ATP, ADP, UTP és UDP), valamint egy nem specifikus antagonistát, a suramint alkalmaztuk, így sikerült igazolnunk a P2Y_1 , P2Y_2 , P2Y_4 , P2X_4 és P2X_6 receptorok funkcionális aktivitását CPC-kben.

Összegzésként elmondható, hogy elsőként mutattuk be és térképeztük fel a CPC-k Ca^{2+} -homeosztázisában szerepet játszó purinerger szignalizációs útvonalat, és az abban szerepet játszó fehérjék expresszióját. Bízunk benne, hogy ezek az

eredmények hozzájárulnak majd az oszteoartrózis során kialakuló porcszövet degeneráció celluláris folyamatainak jobb megértéséhez.

II.Vázizomszövet- A SERCA1b fehérje expresszió csökkentése és ennek a Ca^{2+} -homeosztázisban résztvevő fehérjék expressziójára gyakorolt hatása

A SERCA izoformák zavartalan működése elengedhetetlen a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisának fenntartásában. Jelen értekezés második felében a neonatalis SERCA izoforma, a SERCA1b szerepét és csökkent expressziójának hatását vizsgáltuk C2C12 vázizomsejteken. A C2C12 sejtek stabil transzfekcióját követően sikerült létrehozni olyan klónokat, amelyekben teljesen (C1 sejtek) vagy csak részben (C5 sejtek) csökkentettük a SERCA1b fehérje expresszióját. A SERCA1b fehérje myoblastokban csak kis mértékben expresszálódik, míg myotubulusokban ennél jóval nagyobb expressziót mutat, bizonyítva ezzel, hogy jelenléte elengedhetetlen a myotubulusok és az SR fejlődése során.

Western-blot módszer segítségével vizsgáltuk a SOCE-ban érintett fehérjék (STIM1, CSQ, DHPR) expressziós szintjét, valamint kíváncsiak voltunk még a CaN és a MyoD expressziós szintjének változására is. A kísérleteink elvégzését követően azt találtuk, hogy a SERCA1b shRNS-el transzfektált sejtekben, mind a C1, mind pedig a C5 tenyészetekben csökkent a CaN expressziója, míg a CaN aktivitását jelző marker, a MCIP1.4 mRNS szintje csak a C1 sejtekben mutatott csökkenést. Ugyanezen sejtek esetében expressziós szint csökkenést tapasztaltunk a CSQ fehérje esetében is, amely a SR legfontosabb Ca^{2+} -kötő fehérjéje, így a kapott adat az SR alacsonyabb Ca^{2+} -kötését mutatja. A STIM1 a SOCE mechanizmus egyik kulcsszereplője. A SERCA1b-hez hasonlóan a STIM1 molekulának is elengedhetetlen szerepe van az izomfejlődés során. Ezt a szoros kapcsolatot megerősítik a mi eredményeink is, hiszen ott ahol a SERCA1b fehérje expressziója csökkent, a Ca^{2+} -szenzorként is ismert STIM1 molekula expressziója is csökkent. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a SERCA1b fehérje és a STIM1 molekula expressziós szintjének csökkenése a myoplazmából egy lassabb Ca^{2+} -visszavételt eredményez. Ezzel összefüggésbe

hozható továbbá a korábban említett CSQ expressziós szint csökkenése, ami a SR alacsonyabb Ca^{2+} -szintjéért tehető felelőssé. A myogenikus transzkripciós faktor, a MyoD expressziós szintjében nem találtunk különbséget, így valószínűleg a SERCA1b nem a myogenikus differenciációban játszik szerepet, hanem a differenciáció későbbi folyamataiban. A CaN expressziós szintje csökkent a C1 myotubulusokban, ami pedig a MCIP1.4 mRNS-szintű csökkenését okozta. PCR technika segítségével vizsgáltuk még az izomdifferenciálódás negatív regulátorát, a myostatin fehérjét is, és eredményeink szerint a C1 sejtekben csökkent a myostatin expressziója. Ezen fehérje ugyan nincs közvetlen kapcsolatban a SOCE-val, azonban munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a myostatin hiányos egerekben a SOCE megváltozik.

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

Kísérleteink során megvizsgáltuk a SERCA1b géncsendesítés hatását az elektromechanikai csatolásra. Ismételt Ca^{2+} -tranziensek kiváltása során magas K^{+} -koncentráció adagolása mellett, sem a tranziensek amplitúdóiban, sem a felszálló szár meredekségében nem tapasztaltunk eltérést a C1 sejtekben a Scr sejtekhez viszonyítva, így a RyR és a feszültség-vezérelt csatornák működése feltételezhetően nem módosult a géncsendesítés hatására. Ez arra enged következtetni, hogy az SR Ca^{2+} -raktára még a SERCA1b hiánya esetén is bizonyos mértékben újratöltődik, valószínűleg egy másik SERCA izoforma közreműködésével (SERCA2a). A kiszámolt maximális pumpaaktivitás értékek azt mutatták, hogy a csökkent SERCA1b expressziót mutató myotubulusok nyugalmi Ca^{2+} -szintje lassabban állt vissza a normál állapotra. Mivel a SERCA2a izoforma az egyetlen, amely intakt formában fordul elő a C1 sejtekben, és a nyugalmi Ca^{2+} -szint csak lassan állt vissza az eredeti állapotba, ezért úgy gondoljuk, hogy a normális Ca^{2+} -visszavételben ennek az izoformának

nincs kitüntetett szerepe, míg a SERCA1b-nek annál inkább esszenciális a jelenléte.

A SERCA1b expressziót nem (C1), vagy csökkent expressziót mutató sejtek (C5) a kontroll sejtekhez képest csökkent proliferációt mutattak, a myotubulusok pedig kevesebb sejtmagot tartalmaztak. A sejtproliferáció során a SERCA1b fehérje jelenlétének esszenciális szerepe van a kalcineurin regulált jelátviteli útvonalban, mert amikor a CaN gátlószert, CSA-t adtunk a tápoldathoz, a kontroll és a Scr sejtek proliferációja lecsökkent, míg a C1 sejtek proliferációja nem mutatott további csökkenést. Kísérleteink során a CSA-val történő kezelés hatására a SERCA1b expressziót nem mutató sejtekben (C1) a proliferációs ráta nem csökkent tovább, ami arra enged következtetni, hogy a CaN aktivitás CSA-függő komponensét nagy mértékben befolyásolja a SERCA1b aktivitás. A C1 és Scr myotubulusok sejtmagszáma között ugyancsak szignifikáns különbséget találtunk. Megfigyeléseink szerint a SERCA1b géncsendesített C1 myotubulusok átlagosan kevesebb, mint 5 sejtmagot tartalmaztak. Feltételezhetően a primer myotubulus képződés szenvedett zavart, ezáltal a későbbi differenciálódás is gátlódott. A SERCA1b izoformának tehát elengedhetetlen a jelenléte mind a proliferáció, mind pedig a differenciálódás ideje alatt a C2C12 sejtekben. Összefoglalásként elmondható, hogy a SERCA1b fontos szerepet játszik a Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában, és expressziós szintjének változása befolyásolja a SOCE-ban érintett fehérjék, a STIM1, CSQ, valamint a CaN expresszióját is.

Összefoglalás

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

- A CPC-kben spontán megjelenő Ca^{2+} -oszcillációért elsősorban a belső raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulás és a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés tehető felelőssé. Ezek a sejtek mind a STIM1 és Orai1 fehérjéket, mind pedig az IP_3R izoformákat expresszálják, de a RyR altípusai nem mutathatóak ki rajtuk.
- Feltételezésünk szerint a purinerg szignalizációs folyamatok is szerepet játszanak a CPC-k kalciumhomeosztázisában, ezért ennek bizonyítása érdekében mRNS szinten és fehérje szinten is megvizsgáltuk a purinerg receptorok altípusainak kifejeződését. Az adenosin receptorok altípusai az A_3 kivételével expresszálódnak, a P2X ionotróp purinerg receptorok közül a P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₆ és P2X₇ altípusok voltak kimutathatóak. A P2Y metabotróp purinerg receptorok altípusait is sikerült detektálnunk. Amíg Western-blot technika segítségével a P2Y receptorok közül csak a P2Y₁ és P2Y₄ volt detektálható, addig a P2X receptorok 5 izoformáját sikerült kimutatnunk.
- Apiráz alkalmazásával defoszforiláltuk az ATP-t és az ADP-t AMP-vé, ami a Ca^{2+} -tranziensek megszűnését eredményezte. Mindebből arra következtettünk, hogy autokrin/parakrin purinerg szignalizáció állhat a Ca^{2+} -tranziensek létrejöttének hátterében, és a Ca^{2+} -függő regulatorikus mechanizmusok fontos szerepet töltenek be a CPC-k differenciációjának folyamatában.
- A további vizsgálatainkban sikerült specifikus SERCA1b shRNS-sel transzfektálnunk C2C12 vázizomsejteket, majd a puromycines szelekciót

követően vizsgálni tudtunk olyan sejtpopulációkat, melyekben teljes mértékben (C1) vagy csak részben (C5) sikerült csökkentenünk a SERCA1b expressziót.

- Vizsgáltuk a SERCA1b géncsendesítés differenciálódásra kifejtett hatását. A vázizom differenciálódása során megjelenő szabályozó fehérjék expresszióját Western-blot (MyoD, STIM1, CSQ, CaN) és RT-PCR technika (myostatin, MCIP1.4) segítségével detektáltuk. A teljes mértékben csökkent SERCA1b expressziót mutató sejtekben (C1) a STIM1, CSQ, CaN expressziós szintje csökkenést mutatott, míg a MyoD expressziós szintje nem változott. A myostatin és a MCIP1.4 szintje szintén csökkent a C1 myotubulusokban.
- A funkcionális vizsgálatok során ismétlődő Ca^{2+} -tranzienseket váltottunk ki 120 mM KCl adagolása mellett a SERCA1b expressziót nem mutató sejtekben. A KCl adagolásának kezdő időpontját követően a 20. és a 40.s-ban is szignifikánsan magasabb volt a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ebből arra következtettünk, hogy a Ca^{2+} -visszavétel ezekben a sejtekben jóval lassabb, ezt mutatja a maximális pumpa aktivitás megfigyelt csökkenése.
- A SERCA1b-t nem expresszáló C1 sejtek csökkent proliferációt mutattak, valamint a myotubulusokban a sejtmagszám is alacsonyabb volt, összehasonlítva a C5, Scr és kontroll sejtek sejtmagszámával.



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További Közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,087

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

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

Debrecen, 2015.06.03.

