

A Vanilloid Receptor 4 (TRPV4) szerepe egér porcosodó kultúrákban

Nemes Nóra Panna

Biológia BSc

3. évfolyam

Debreceni Egyetem,

Természettudományi és Technológiai Kar

Témavezetők:

Dr. Zákány Róza, egyetemi docens

Somogyi Csilla, egyetemi gyakornok

Debreceni Egyetem,

Általános Orvostudományi Kar,

Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

2025.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Porcszövet	4
2.2. Kísérleti modell	5
2.3. Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 4 (TRPV4)	6
3. Célkitűzés	8
4. Anyagok és módszerek	9
4.1. Egér micromass kultúra	9
4.2. Immunhisztokémia	9
4.3. Konfokális és Fáziskontraszt mikroszkópia	10
4.4. Hematoxin-eozin (HE) és Dimetil-metilénkék (DMMK) festési eljárások	10
5. Eredmények	12
5.1. TRPV4 expressziójának vizsgálata	12
5.2. Klasszikus festési eljárások TRPV4 ioncsatorna modulált kultúrákon	14
5.2.1. Fáziskontraszt felvételek	14
5.2.2. Hematoxin-eozin festés a micromass kultúráknál	15
5.2.3. Savas dimetil-metilénkék (sDMMK) festés a porcmátrix kimutatására	16
6. Diskusszió és konklúzió	18
7. Önállóan és segítséggel végzett munkák	20
8. Köszönetnyilvánítás	20
9. Rövidítések listája	21
10. Források és függelékek	22

1. Bevezetés

A modern korral járó egészségtelen táplálkozás és mozgásszegény életmód, valamint az egyre kitolódó átlag életkor miatt egyre elterjedtebb a mozgásszervi, azon belül is az ízületi megbetegedések száma a társadalomban. Manapság egyre népszerűbb téma és számos kutatás foglalkozik ezért a vázrendszeri deformitásokkal és azok kialakulásáért felelős tényezőkkel. Ezen defektusok gyógyítására elsősorban műtéti beavatkozások állnak rendelkezésre, a porcszövet gyenge regenerációs képessége miatt. Ilyen problémák felléphetnek sportolóknál elhanyagolt sérülések következtében történő mechanikai deformitások formájában, valamint az összes korosztályt érintő olyan megbetegedéseknél, mint az osteoarthritis, köszvény, álköszvény. Az osteoarthritis, más néven degeneratív ízületi betegség, az egyik leggyakoribb formája krónikus ízületi gyulladásnak. Nem csak a porcszövet degradációjával jár, de maga az ízület teljes szerkezeti változását okozza. [1] Az ízületi gyulladások közé soroljuk a köszvényt és az álköszvényt. Míg a köszvény nátrium-urát kristályokkal köthető össze, az álköszvény esetén az ízületi gyulladás kalcium-pirofoszfát-dihidrát kristályok lerakódásával jön létre. Ezen problémákra az orvostudomány a mai napig nem tud végleges, hosszú távú megoldást biztosítani, csak a tünetek enyhítésére van lehetőség, melyek többek között gyógytorna, gyulladáscsökkentők alkalmazása és különféle műtéti beavatkozások. [1]

Az elmúlt évtizedben számos tanulmány azonosított olyan Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 4 (TRPV4) ioncsatorna mutációkat emberekben, melyek mozgásszervi megbetegedéseket okoznak. Ezen betegségekben megjelenő TRPV4 szerepének és működésének feltérképezése a mutációk okozta mechanizmusok megértését vonhatja maga után. Bár a TRPV4 számos szövetben expresszálódik, a mutációk hatása elsősorban a támasztószöveti rendszerekben és az idegrendszerben jelentkezik, ez is jelzi, hogy ezekben a szövetekben a TRPV4 kulcsfontosságú szerepet tölt be. A TRPV4 mutációk okozta vázrendszeri betegségeket két nagy kategóriára tudjuk sorolni: vázrendszeri diszpláziák és ízületi betegségek (artropátia). Előbbinek széles skálája ismert, melynek legenyhébb változata a szkoliózis, rövidült test-, végtag- és ujjhossz, míg a legsúlyosabb diszplázia típusok újszülöttkori elhaláláshoz vezet. [12] A vázrendszeri diszpláziákat okozó TRPV4 mutációk közül sok olyan „gain-of-function” mutáció van, ahol a mutáció növeli a csatorna Ca^{2+} permeabilitását. Az ízületi megbetegedések ezzel szemben a kor előrehaladtával alakulnak ki, fájdalmas, deformált ízülettel és ízületi gyulladással járnak. [13] Itt a csatorna funkciójának csökkenése, részlegesen a TRPV4 csatornák normális Ca^{2+} permeabilitása korlátozódik. [2]

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Porcszövet

A porcszövet a kötő- és támasztószövetek közé tartozó avaszkuláris szövet. Ezen szövet csoporton belül három típust, a rugalmas-, rostos- és a hyalinporcot különítjük el összetétel és funkció alapján. A leggyakoribb forma a hyalinporc, vagy üvegporc, mely az ízületek felszínén vagy a légcsőben jelenik meg legnagyobb mennyiségben. Laboratóriumunk évtizedekre visszamenően hyalinporccal foglalkozik. A szövet sejtjeit chondrocytának hívjuk, melyeket üvegporcra jellemző sejtközzötti állomány, proteoglikánokban gazdag extracelluláris mátrix (ECM) veszi körül. A porcszövet avaszkuláris, vagyis érmentes szövet, és beidegzése sincs. [3]

A légcsővek C porca vagy a bordaporc olyan **hyalinporc**, melyet **porchártya** (perichondrium) borít. A perichondriumot 2 főbb rétegre oszthatjuk, a tömött rostos kötőszövetben gazdagabb stratum fibrosum, valamint egy belső lemezre, melyet stratum chondroblasticumnak hívunk. Utóbbi még differenciálatlan chondroprogenitor sejtekből áll, melyek a porc növekedésével chondroblast sejtek, majd chondrocytákká fejlődnek. A chondroprogenitor sejtek mesenchymális őssejtekből (MSC) differenciálódnak és alakulnak ki. A porchártyában találhatunk ereket, melyek lassú diffúzióval látják el a porcszövet sejtjeit tápanyaggal, valamint oxigénnel. A porcmátrix alapegysége a chondron, mely az egy chondroprogenitor sejtől létrejött chondrocytákat foglalja magába. A chondronban a chondrocyták felé haladva emelkedik az aggregát proteoglikán koncentrációja, mely a II-es típusú kollagénhez hialuronsavon keresztül kötődik. A porcszövet ezeknek a chondronok az összességéből és azok közötti interterritoriális mátrixból áll. [3]

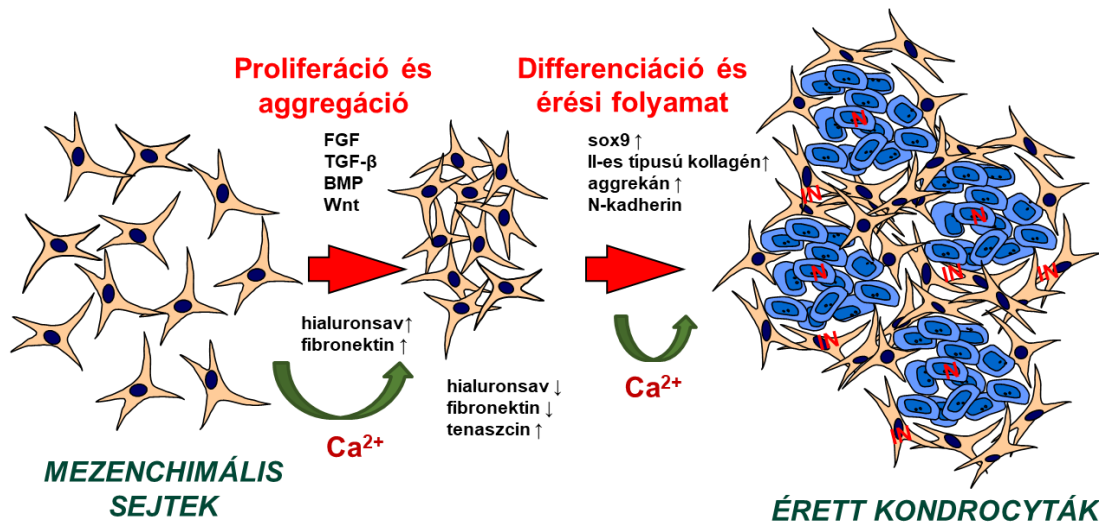
Az **embrionális fejlődés** során is megjelenik az üvegporc, ugyanis az enchondrális csontosodás során a hyalinporc biztosítja a csontok templátját. A porcszövet fokozatos elmeszesedésével csontszövet válik a porcszövetet. A hosszirányú növekedést az epifízisek határán megjelenő **növekedési porckorong** fogja biztosítani. Ebben a struktúrában a porcsejtek folyamatos osztódáson mennek végig, de maga a porckorong mérete változatlan marad. Négy rétegét különíthetjük el, ahol az első a nyugalmi zóna: itt a chondrocyták nyugalmi állapotban vannak. Az osztódási zónában a chondrocyták fokozott osztódási/proliferációs rátával jellemezhetőek és oszlopokba rendeződnek. Ezt követően a sejtek maturáción mennek keresztül, majd a **hypertrophiás** zónában a sejtek jelentős megnagyobbodáson, hipertrófián

mennek keresztül, mellyel párhuzamosan megindul a kalcifikáció a sejtoszlopok közti hosszanti lefutású porcmátrix-gerendákban. A negyedik rétegben, mely közvetlenül a diaphysis felett helyezkedik el, a chondrocyták apoptózison mennek át, törmeléküket chondroclastok, porcszövetre jellemző makrofágok távolítják el. A vérereken keresztül érkező osteoprogenitor sejtek sorozatos osztódásba kezdenek és az elmeszesedett porcgerendákon megtapadnak. A belőlük létrejövő utódsejtek osteoblastokká differenciálódnak és a csontmátrixra jellemző ECM-et kezdenek el termelni. A hosszú csöves csontok növekedése embernél olyan 22 éves korra lezárul és a növekedési porckorong elcsontosodik. Ezen porcos alapú csontosodási folyamatok vizsgálata megoldást adhat olyan vázrendszeri defektusokra, mint az achondroplasiás törpenövés.

Ízületi porcnak nevezzük azt a típusú hyalinporcot, mely a synoviális ízületek ízületi felszínét borítja. Az ilyen elhelyezkedésű üvegporc nem rendelkezik perichondriummal. Négy réteget különíthetünk el egymástól a bennük található chondrocyták alakja, valamint az interterritoriális mátrix kollagénrostok lefutása alapján. [3] “A felszíni (I.) zónában a kollagénrostok az ízületi felszínnel párhuzamosan futnak, a középső (II.) zónában egymást keresztezve hajlanak a mélybe, míg a mély (III.) zónában lefutási irányuk a felszínre merőleges. Az ízületi porcrétegnek a legmélyebb, a subchondralis csontszövettel határos zónájában a mátrix elmeszesedett. [3]

2.2. Kísérleti modell

Laboratóriumunk évtizedek óta alkalmazza a chondroprogenitor sejtekből előállított primer, nagy sejtsűrűségű, micromass sejtenyészetet. A kutatások során az egyik legkedveltebb használt *in vitro* porcdifferenciációs modell. A sejtenyészetek elsősorban porcosodó mesenchymális sejtekből állnak, de a fibroblaszt populáció mellett kevés myoblasztot és hámsejtet is tartalmaznak. A micromass kultúrákon alapuló, könnyen reprodukálható kísérleti modell sokrétű információval szolgálhat a porcdifferenciációs mintázat változásairól, a jelátviteli útvonalak szabályozásáról és exogén faktorokkal való befolyásolhatóságáról. Ezekben a kultúrákban az idő előrehaladtával spontán lejátszódik a porcosodás folyamata. A mesenchymális sejtek osztódóképessége megemelkedik (proliferáció), a sejtek csomókba rendeződnek, úgynevezett nodulusokat alakítanak ki (aggregáció), elveszítik nyúlványaikat, lekerekednek.



1. ábra: Sematikus ábra a chondrocyta differenciáció folyamatáról micromass kultúrában. N: Noduláris tér. IN: Internoduláris tér.

2.3. Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 4 (TRPV4)

A kutatás célmolekulája a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 4 (TRPV4) ioncsatorna, melynek szerepe lehet a fentiekben említett ízületi és egyéb vázrendszeri deformitások kialakulásában. A TRPV4 a Tranziens Receptor Potenciál (TRP) csatornák közül negyedik tagja a vanilloid alcsaládnak. A TRPV4 egy nonszelektív kationcsatorna, azonban kalcium áteresztő képessége a legjelentősebb. A csatorna tetramer szerkezetű és minden alegység transzmembrán doménből áll. A Transzmembrán (TM) 5 és 6 domének között húzódó pórushurok között pozitív töltésű ionok transzportja történik. [6,7] A fehérje 871 aminosavból áll és C-, illetve N-terminálisa egyaránt intracellulárisan helyezkedik el. (2. ábra). A receptor aktivitását számos ligand befolyásolja, melyek lehetnek exogén vagy endogén eredetűek. A TRPV4 agonisták közül a leggyakrabban használtak a GSK1016790A és a 4 α -Phorbol-12,13-didecanoát (**4 α PDD**). Fontos megjegyezni, hogy előbbi akár 300-szor erősebb, mint az utóbbi kezelőanyag. Mindkettő szelektív agonista anyagok, melyet széles körben alkalmaznak a TRPV4 aktiválásának in vitro és in vivo farmakológiai vizsgálatokban [9]. Nem szelektív TRPV4 antagonistá, vagyis gátló hatású anyag létezik, például háromértékű kationok, mint a gadolínium-ion (Gd³⁺), valamint a kapszazepin, vagy ruténium-vörös (RR). Vizsgálataink során a **HC-067047** nevű antagonistá kezelőanyagot használtuk. Ezen kívül a cég, több gátló hatású antagonistá molekulát is közzétett, például a GSK2193874 jelzésű antagonistá

kezelőanyagot. Természetes eredetű TRPV4-csatorna blokkoló anyagok is előfordulnak, ilyen például a citromfő egyik jellegzetes ízt adó komponense, a citrál, melyet gyakran ízfokozóként használnak. [9]

A receptor nagyon széles szöveti/szervi kifejeződéssel jellemezhető; expresszáldik a vesékben, tüdőben, szívben, agyban, endothel-sejtekben. Vázrendszeri elemekben, csont és porcsejtekben is nagy mennyiségben egyaránt kifejeződik. Laborunk is kimutatta a TRPV4 receptort az általunk alkalmazott nagy sejtsűrűségben kicseppentett kondogénikus kultúrában és különböző stádiumú és eredetű porcsejtekben. Mindezen túl számos szerepe lehet az adott szövetben, mint például a sejtek osztódásában, migrációjában, apoptózisában, differenciáltsági állapotának megtartásában. A TRPV4 csatornák polimodális ioncsatornák, mely annyit jelent, hogy számos különböző ingerre képesek aktiválódni, mint például a mechanikai, hő, oxigén koncentrációbeli és ozmotikus változások.

A fehérje természetben előforduló számos pontmutációja általában vázrendszeri deformitásokat okoz. Ezekre a csontváz szabálytalan növekedése jellemző, aránytalan fejlődést, például szkoliózist idéz elő. A csontrendszeri megbetegedéseken belül két fő csoport alakulhat ki: a csontrendszeri diszplázia és az artropátia okozta mutációk széles skálája. A legenyhébb csontrendszeri diszplázia a scoliosis, aminek tünete az alacsonyabb termet, rövidebb végtagokkal [16], míg a legsúlyosabb diszplázia perinatálisan halálos [12]. Másrészt az artropátiát okozó mutációval rendelkező személyek születés után normálisan megjelenő csontváza felnőttkorban fájdalmas, deformálódó ízületi gyulladás tapasztal [13]. Ezeknek a csontrendszeri rendellenességeknek a többsége a TRPV4 funkcionyeréses mutációinak eredménye, ahol a csatornán keresztül fokozott Ca^{2+} beáramlás van [12, 16]. Érdekes módon TRPV4 génkiütött egereknél nem figyeltek meg súlyos vázrendszeri defektusokat, de ezen állatok csontozata megemelkedett ásványanyag-tartalommal és az ízületi struktúrák elmeszedésével jellemezhető.

3. Célkitűzés

A kalcium permeábilis ozmo-mechanoreceptor Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid ioncsatorna 4 (TRPV4) nagy mennyiségben van jelen az ízületi porcsejtekben. TRPV4 ioncsatorna defektus ízületi artropathiával, osteoarthritiszel és vázrendszeri defektussal, súlyosabb esetben perinatális halállal is járhat. A fenotípusos jegyek mögött álló folyamatokat a mai napig nem ismerjük. A kísérleteink során alkalmazott egér micromass kultúra kitűnő kísérleti modell a chondrogenikus folyamatok vizsgálatához. Ezért célul tűztük ki, hogy nyomon követjük:

- a TRPV4 ioncsatorna micromass kultúrán belüli kifejeződését
- az ioncsatorna kifejeződését ezekben a kultúrákban TRPV4 aktiválás és gátlás során (4 α PDD; HC067047).
- a kultúrák morfológiai változását (fáziskontraszt-felvétel; hematoxilin-eozin; savas dimetil-metilénkék) TRPV4 ioncsatorna aktivitásának módosítása (4 α PDD; HC067047) során.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Egér micromass kultúra

A kultúrák létrehozásához NMRI (Naval Medical Research Institute) állatházi egereket alkalmaztunk. A nőstény egereket a vemhesség 11 és feledik napján feláldoztuk a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Bizottság (11/2010/DE MÁB) által előírt és kiadott engedélynek megfelelően. Operatív sztereomikroszkóp használatával az embriókat eltávolítottuk a méhszarvakkól és az embriók elülső (anterior) és hátulsó (posterior) végtagbimbóit PBS oldattal történő mosás után eltávolítottuk. Az izolálás után 0.25%-os tripszin-EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav) oldatban 55 percen át emésztettük. Centrifugálást és többszöri átmosást követően a sejteket $1,5 \times 10^7$ koncentrációban kicseppenttem. 10%-os FBS-sel, 0,5 mM L-glutaminnal és 1%-os penicillin/sztreptomicinnel elegyített mediumot pipettáztunk a kicseppentett kultúrákra. A táptalajt minden második, vagy a kezelések után cseréltük. A kicseppentés napja a 0. napnak tekintendő. A kicseppentett mesenchymális sejtek 7 nap alatt spontán differenciálódással chondrocytává képesek alakulni. A kultúrákban két zóna figyelhető meg fáziskontraszt mikroszkóppal; a noduláris és a közöttük elhelyezkedő internoduláris zóna. A nodulusokban ovoid alakú chondroblast és chondrocyta sejtípusok figyelhetők meg, míg az internoduláris térben elnyúlt, perichondriális jegyekkel bíró mesenchimális és chondroprogenitor sejtek figyelhetőek meg. A kultúrákat TRPV4 agonistákkal és antagonistákkal kezeltük a tenyésztés első napjától folyamatosan a hatodik napig. A kezelőanyagok a 10 μ M HC067047 (Sigma Aldrich), amely specifikus TRPV4 antagonistaként és a 10 μ M 4aPDD (Sigma Aldrich), amely TRPV4 agonistaként alkalmaztunk. A kísérleti modell több, a laboratóriumunk által publikált cikkben is be van mutatva, mely megfelelő templátként szolgál a módszer elsajátítására [8, 14, 17].

4.2. Immunhisztokémia

A TRPV4 fehérje térbeli expressziójának vizsgálatát a nagy sejtsűrűségű kultúrákban, immunhisztokémiai vizsgálattal végeztük. A chondrogenikus kultúrát a 7. tenyésztési napon 4%-os paraformaldehides oldattal fixáltuk, mostuk és a fagyasztvametszéshez szükséges mediumba (Killik, Bio-Optica) ágyasztuk. A 10 μ m vastagságú fagyasztott metszeteket kriotómmal készítettük el, és felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz ezen metszetekből kioldottuk a Killik ágyazóanyagot, majd hő indukálta antigén feltárást (HIER) végzünk, 95°C-on minden metszeten 5 percig. Ezt követően az aspecifikus

kötődés elkerülése végett egy 1 órás 10%-os kecskeszérumos blokkolást végeztünk. A primer, nyúlban termeltetett poliklonális TRPV4 antitestet 1:1000 arányban hígítottuk és egy éjszakan át rajta tartottuk. Másnap a kecskében termeltetett Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG antitest 1:2000-ben hígítottuk és egy órán keresztül sötét helyen inkubáltuk vele a mintákat. Mosást követően a sejtmagfestő DAPI tartalmú fedőanyaggal fedtük le a metszeteket. A metszetek lefedése után azokat hűtőben tároltam.

4.3. Konfokális és Fáziskontraszt mikroszkópia

A TRPV4 kultúrán belüli elhelyezkedésének vizsgálatához Olympus FV1000S konfokális mikroszkóppal (Olympus Co. Tokyo, Japán) 60-szoros objektívvel (NA: 1,3), felvételeket készítettünk. Az átlagos pixelidő 4 µs volt. Az Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 488 és DAPI képsorokat a 10.0-ás verziójú Adobe Photoshop szoftverrel hoztuk létre.

A farmakológiai kezelés hatással van a telepek natív morfológiájára, ezért a kultúrákról a tenyésztés hatodik napján fáziskontraszt felvételeket készítettünk Leica fáziskontraszt-mikroszkóp segítségével, 5x és 40x nagyítású objektívvel vizsgálva a mintát. A módszer elve szerint a kondenzorlencse alá olyan átlátszatlan lemezt helyeznek, amelyen a fényzáró réteg gyűrű alakú áteresztő területet tartalmaz („gyűrű-diafragma”) [3]. A kondenzorból a preparátum felé kilépő sugár ezért henger-vagy kúppalást mentén halad át a tárgyon, majd képeződik le az objektív gyújtópontjában. Az objektív felett gyűrű alakú rápárolgatott réteget tartalmazó lemez van, amely a hengerpalást mentén jövő (összehasonlítható) fénysugarat a hullámhossz negyedrésszel fázisban eltolja („fázislemez”). A vizsgálandó preparátum optikailag sűrűbb rétegeiből jövő, fáziskésést szenvedett tört sugarak nem haladnak át a fázisgyűrűn és a képsíkban egyesülnek, majd interferálnak az összehasonlító sugarakkal. Ez ahhoz vezet, hogy a sugarak kioltják (vagy vastagabb struktúrák esetén erősítik) egymást, miáltal a tárgy különböző törésmutatójú és vastagságú komponensei különböző mértékben sötétnek (esetleg világosnak) látszanak. A fázislemez azt a célt szolgálja, hogy az aránylag kis fáziskésést szenvedett sugarak esetén is aránylag nagy legyen a fáziskülönbség és így a kontraszt [3].

4.4. Hematoxilin-eozin (HE) és Dimetil-metilénkék (DMMK) festési eljárások

A klasszikus hematoxilin-eozin festést a szövet és sejtek általános vizsgálata miatt alkalmaztam. A lefixált kultúrákat vagy az előre elkészített fagyasztott metszetek először hematoxilinban 30 másodpercig festettem, majd a felesleges festéket PBS-sel leöblítettem. Ezt

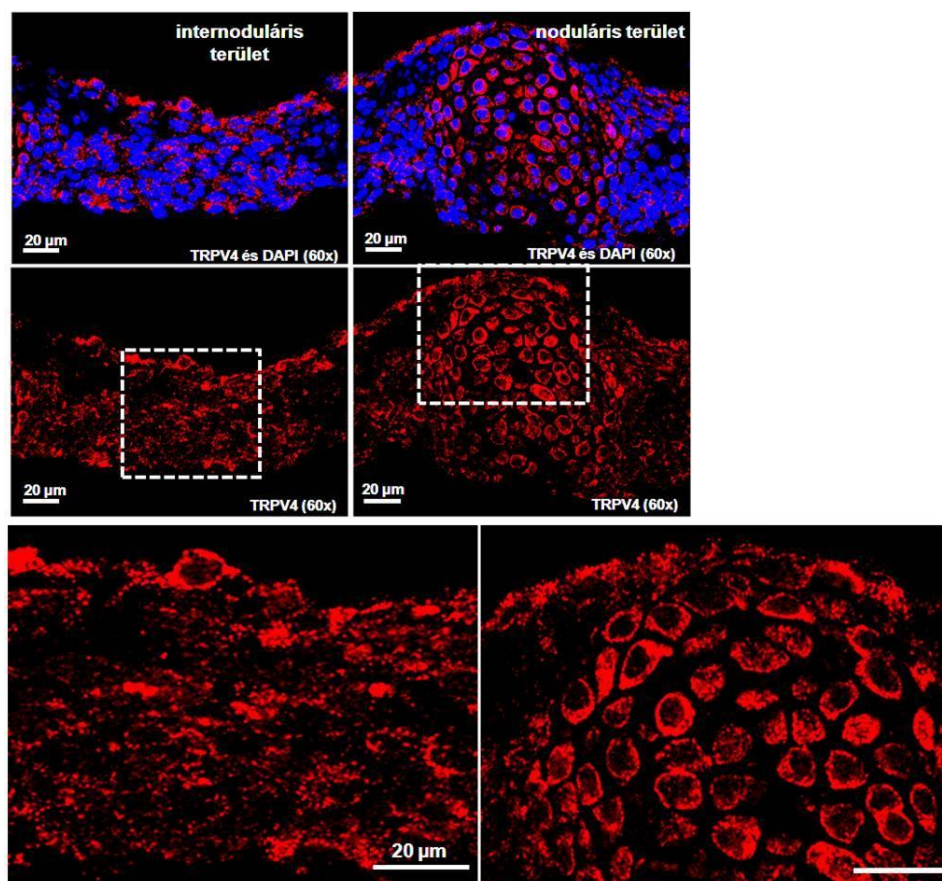
követte az eozinnal való festést, majd a dehidráló sort követően xilolba mártás és DPX-es fedőanyaggal történő lefedés követte.

Savas dimetil-metilénkék festést használtunk a chondrogenikus kultúrákon, a metakromatikusan festődő elemek kimutatására az extracelluláris mátrixban (ECM). A metakromázia jellegzetes kéktől a püspökliláig tartó színjelzése az ECM proteoglikán (PG) és glükóz-aminoglikán (GAG) tartalmat jelzi a nagy sejtsűrűségű porckultúrákban. A festést 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixált kultúrákon és a fagyasztott, lemetszett kultúrákon végeztük. A kultúrát átmostuk és 3%-os ecetsavval majd szintén 3%-os ecetsavban oldott dimetil-metilénkékkel (DMMK) 5 percen át festettük. Az idő leteltével a fölös festéket 3%-os ecetsavval eltávolítottuk desztillált vízzel öblítettük a mintákat és szárítást követően DPX-es fedőanyaggal fedtük. Mind a hematoxin-eozin, és a dimetil-metilénkék festéseket Nikon Eclipse E800 mikroszkóppal vizsgáltuk és fotóztuk. A lefotózott képekről és a pályamunkámban megjelenített képekről a jövőben Image J programmal egy kollaborátor (Pázmány Péter Katolikus Egyetem) segítségével kultúra analízist tervezünk végezni, amely elősegíti a festések és immunhisztokémiai eredmények számszerűsítését és relatív összehasonlítását.

5. Eredmények

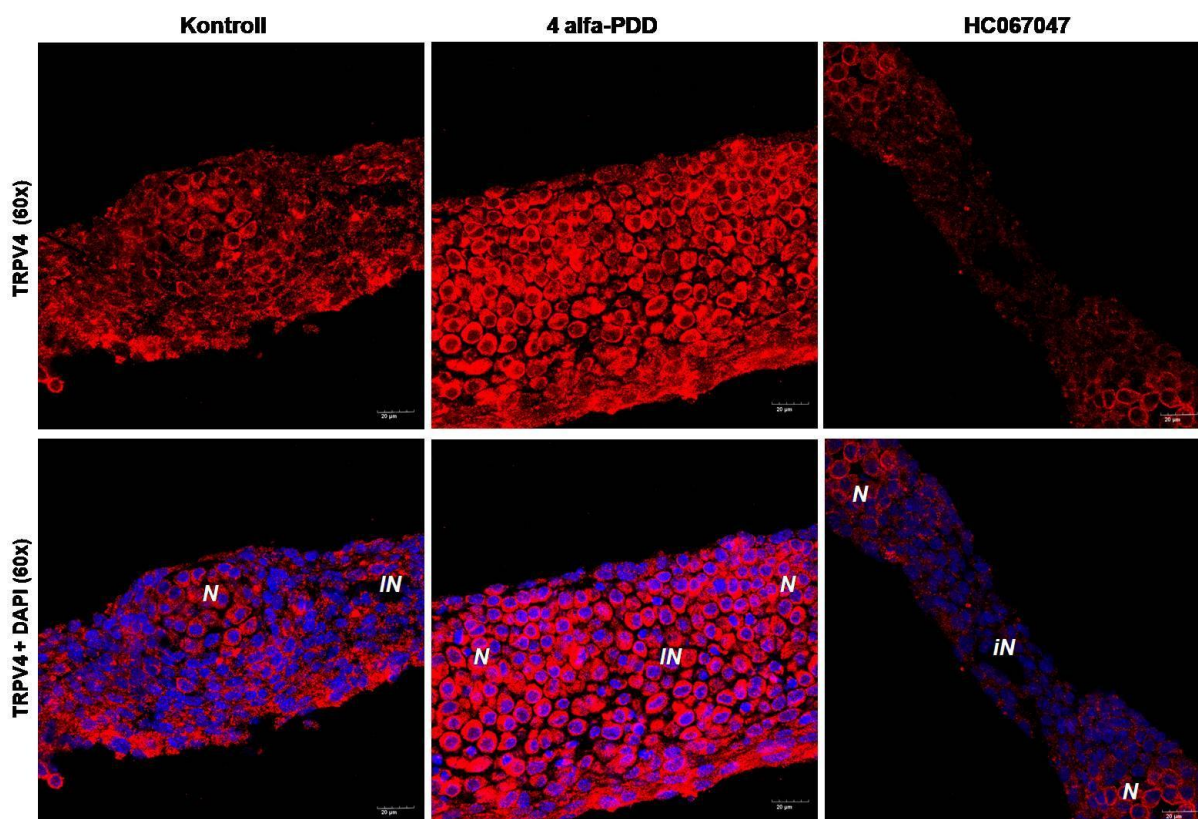
5.1. TRPV4 expressziójának vizsgálata

A TRPV4 kultúrán belüli lokalizációjának meghatározása előtt a fehérje jelenlétét ezekben a kultúrákban western blottal igazoltam. Ezek a kezeletlen kultúrák hat naposak. A szekunder antitest piros színnel jelölte a célfehérjét. A szekunder jelölés mellett DAPI magjelölést is alkalmaztunk, amely kék színnel jelölte a sejtmagvak helyzetét a kultúrán belül. Ezenél a mintáknál a kultúrákból készült metszetekkel dolgoztunk, nem a klasszikus felülnézeti képpel. Ez lehetőséget biztosít arra, hogy a kultúra mélyebb rétegeinek sejtjeit is megvizsgáljuk. A kultúrákon belül, ahogy a szöveti differenciáció halad előre, két nagyobb zóna lett különíthető el, melyet hasonló morfológiájú sejtek népesítettek be. Ezen zónák a noduláris és az internoduláris zónák. A TRPV4 össz expressziója erőteljesebb a noduláris zónában és kevesebb az internoduláris zónában. Ha alaposabban szemügyre vesszük a receptor sejteken belüli eloszlását, látható, hogy a noduláris zónában a piros szín feltételezhetőleg a sejtmembránban és a citoplazmában is jelen van, míg ez az erős citoplazmatikus jel az internoduláris zóna sejtjeiben nem látható. A noduláris zónában a sejtek kerekded alakja jól megfigyelhető, míg az internoduláris zónában a sejtek alakja nehezen kivehető, annak ellenére, hogy a jelölés inkább sejtmembrán jellegű. A DAPI festés és a TRPV4 szépen mutatja, hogy a nodulusokon belül a sejtek lekerekedettek és a sejtek közötti távolság egészen nagy szemben az internoduláris zóna sejtjeivel, ahol a sejtszám magas és a közöttük lévő távolság minimális.



2. ábra: TRPV4 jelölt konfokális mikroszkópos felvétel hatnapos egér micromass kultúráról. A TRPV4 receptor piros színnel míg a sejtmagok kék színnel fejeződnek ki. Nagyítás: 60x. Az alsó képek a szaggatott vonallal jelölt területről készültek.

A tenyésztés első napjától TRPV4 aktivitást szabályozó farmakonokkal folyamatosan kezeltük a kultúrákat. Ezeket a kultúrákat kriomikrotómmal metszettük és így oldalról vizsgálhatjuk a porcelepeket. A kutatólaboratóriumok által széles körben alkalmazott 4-alfa PDD 10 µM-os koncentrációban alkalmazva aktiválja a TRPV4 ioncsatornát míg a 10 µM-os HC067047 gátolja a csatorna működést. Azokban a kultúrákban, ahol aktiváltuk a csatornát, a kultúra vastagabb lett, és eltűntek a jellegzetes noduláris/internoduláris határok. A sejtek alakja nagyrészt kerekded, és a TRPV4 jel dominánsan citoplazmatikus. A DAPI által szépen kirajzolt sejtmagok mennyiségéből látszik, hogy a kultúrák 4-alfa PDD-vel történő kezelése megemeli a sejtszámot. Feltételezhetőleg fokozza a sejtek osztódóképességét. Azokban a kultúrákban, ahol gátoltuk a csatorna működését, a sejtek sejtmembrán határai szépen kirajzolódnak a noduláris terekben, míg az internoduláris terekben a piros jelölés nem utal diffúzabb. A noduláris terekben a sejtek kerekdedek, ezzel szemben az internoduláris térben nem egyértelmű a sejtek alakja az immunjelölt képeken. Az internoduláris terek hosszúak és a kultúra vastagsága nagymértékben lecsökkent a kezeletlen kultúrához képest.

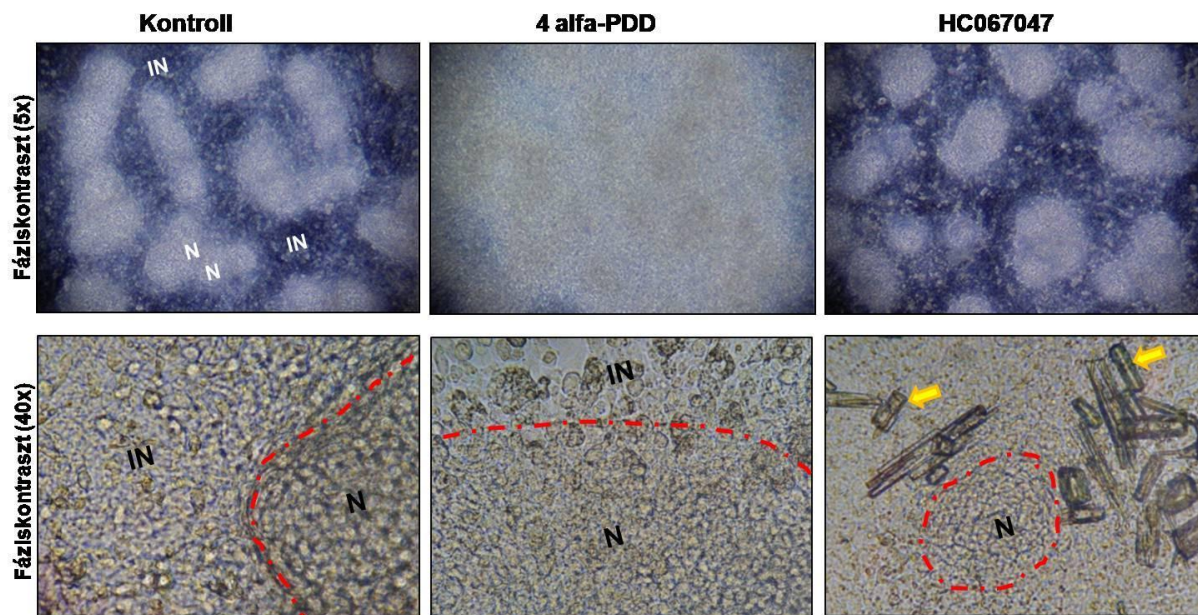


3. ábra: TRPV4 receptor immunhisztokémiai jelölés kontroll és TRPV4 aktivált (4-alfa PDD) valamint TRPV4 receptorműködés gátolt (HC067047) kultúrákban. A piros szín a TRPV4 receptor jelölés, míg a kék DAPI festés a sejtmag jelölés. Az IN az internoduláris, míg az N a noduláris zónát jelenti a hatnapos porcosodó micromass kultúrában. 60x objektívvel készült felvételek.

5.2. Klasszikus festési eljárások TRPV4 ioncsatorna modulált kultúrákon

5.2.1. Fáziskontraszt felvételek

A kultúrákat a hatodik tenyésztési napon fáziskontraszt mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A kultúrákról felülnézeti képek készültek. Ezekon a felvételeken is szépen látszik, hogy a 4-alfa PDD-vel kezelt kultúrákban, ahol a TRPV4 csatornák aktívak, ott a noduláris internoduláris határok elmosódnak, a nodulusok nagyobbak tűnnek. Azokban a kultúrákban, ahol a csatorna működést gátoltuk (HC067047 kezelt kultúrák), a nodulusok határai kifejezettebbek és a nodulusok mérete nem olyan nagy, az internoduláris tér nagyobb. Ezekben a kultúrákban kristályszerű struktúrák jelennek meg. A nagyobb nagyítású képeken jobban látszik, hogy a 4-alfa PDD-vel kezelt kultúrákban a sejtek alakja kerekded függetlenül a noduláris/internoduláris zónáktól.

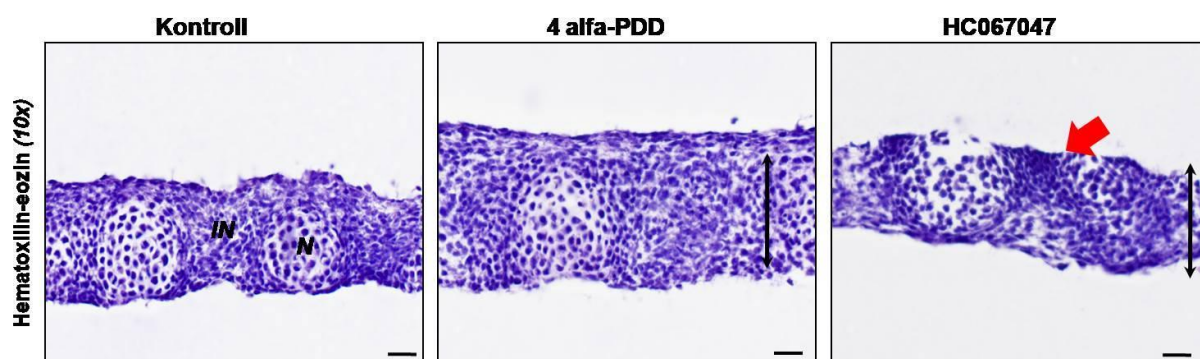


4. ábra: Fáziskontraszt mikroszkóppal készült felvételek hatnapos porcosodó kultúrákról, ahol a 4-alfa PDD aktiválja míg a HC067047 gátolja a TRPV4 csatorna működését. A szaggatott piros vonal a nodulusok relatív határát jelöli. A sárga nyilak kristályszerű képződményre hívják fel a figyelmet a micromass kultúrákban. A felvételek 5x és 40x-es objektívvel készültek. Rövidítések: noduláris zóna (N), internoduláris zóna (IN).

5.2.2. *Hematoxilin-eozin festés a micromass kultúráknál*

A hatodik tenyésztési napon a kultúrákat fixáltuk, majd kriosztáttal lemetszettük, így oldalnézetből tudjuk vizsgálni a micromass kultúrát. A kultúrákon fáziskontraszt felvételek eredményeihez hasonló jellemzőket láthatunk. Ezeken a klasszikus hematoxilin-eozin felvételeken is jól látható, hogy a 4-alfa kezelt kultúrák vastagabbak a kontroll kultúrához képest, míg csatorna gátlás során a kultúrák vékonyabbak. Az aktivált kultúrákban a nodulusokon belül a sejtek nagyobbak és távolabb helyezkednek el egymáshoz képest. Az internoduláris terek keskenyebbek ezen kultúrákban és a nodulusok nagyobbak. Az internoduláris zónában polymodális jellegű sejtek helyezkednek el, míg a noduláris zónákban kerekded jellegű sejtek helyezkednek el.

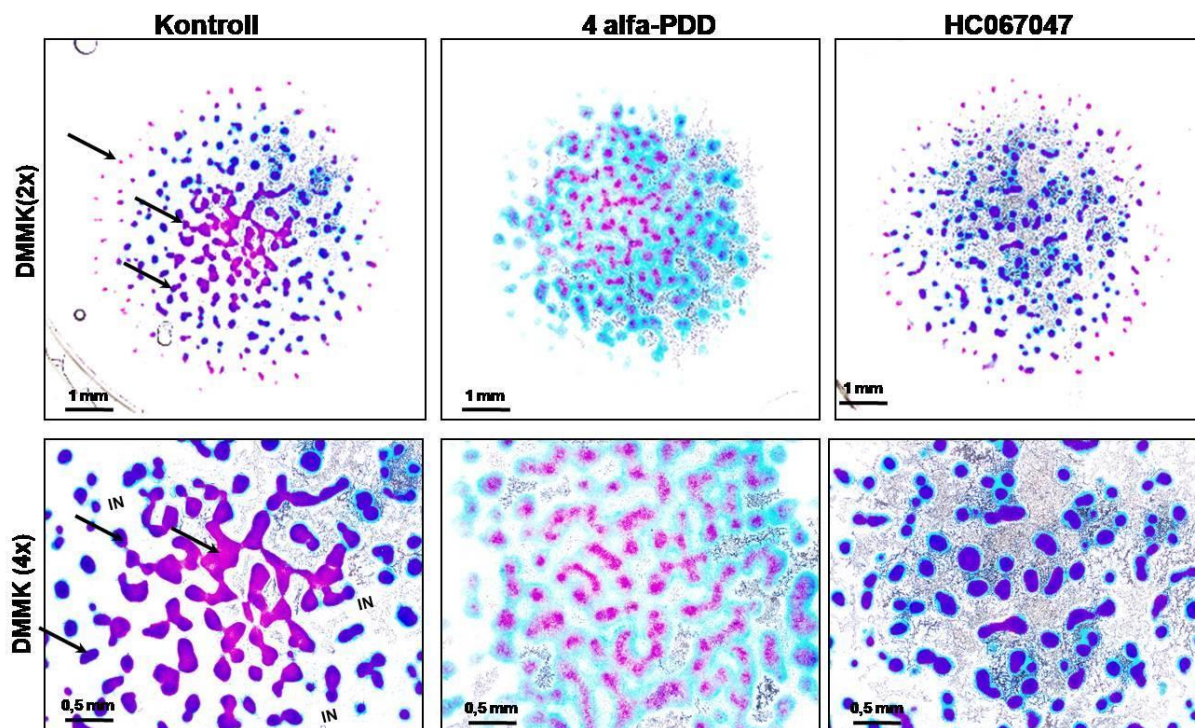
Az antagonista kezelt kultúrákban az internoduláris terek hosszabbak és a nodulusok kisebbek. A nodulusok határai erőteljesen elkülönülnek, a noduluson belül a sejtek kerekdedek, de nem tűnnek olyan nagynak, mint az aktivált kultúrákban. A kultúrák szélén perichondrális jelleggel bíró, elnyúlt morfológiával jellemezhető sejtek helyezkednek el. A kristályok a festési eljárás során mikroszkóppal ellenőrizve láttuk, hogy feloldódtak.



5. ábra: Hematoxinilín-eozinnal festett hatnapos micromass kultúra metszetei. A kultúrákat a tenyésztés első napjától kezdve folyamatosan kezeltük TRPV4 aktiválóval (4-alfa PDD) és TRPV4 gátlóval (HC067047). A vektor a kultúrák vastagságbeli különbségére hívja fel a figyelmet. A piros nyíl az internoduláris terekben (IN) megjelenő sejttömörülésre hívja fel a figyelmet. Noduláris tér: N; internoduláris tér: IN. A kultúrák 10x-es objektívvel készültek, ahol a mérce hossza 50 μm .

5.2.3. Savas dimetil-metilénkék (sDMMK) festés a porcmátrix kimutatására

A savas dimetil-metilénkék festés egy jól bevált hisztotechnikai módszer annak érdekében, hogy kimutassuk a glükózaminoglikánban (chondroitin-szulfát) és proteoglikánban (aggrekán) gazdag porcmátrixot. A nagy mennyiségben jelenlévő negatív töltés módosítja a DMMK festék fényelnyelési hullámhosszát és kék szín helyett lila színben tünteti fel a felhalmozódott glükózaminoglikánban és proteoglikánban gazdag területet. A kultúrákról felülnézeti fotókat készítettünk. A kontroll kultúrákon jól látható, hogy a porcnodulusokban és körülötte püspöklila színnel festődik a negatív töltésben gazdag porcmátrix. Ezt a jelenséget metakromáziának nevezzük. A kék színnel festődő ortokromáziás jelenség során a sDMMK a ritkább, kevesebb negatív töltéssel rendelkező makromolekulákat (DNS, RNS) és sejtalkotókat (sejtmag, sejtmagvacska) festi. Az előző eredményekkel összefüggően ennél a festési eljárásnál is jól látható, hogy a TRPV4 aktiváció következtében a nodulusok nagyobbak és határai elmosódottabbak. Az internoduláris tér kisebb és kékes festődésű, amely a sejtek nagy mennyiségére utalhat. A nodulusok között gyakoribbak a kapcsolatok. Jól látható, hogy a kezelés fokozza a mátrixban jelenlévő porcra jellemző glükózaminoglikán és proteoglikán mennyiségét. Ahol a csatornát gátoltuk, a nodulusok kisebbek lettek és az internoduláris tér nagyobb, festetlen. Ezekben a kultúrákban a porcmátrix mennyisége kevesebb a kontroll kultúrához képest.



6. ábra: A porcszövetre jellemző mátrix kimutatása savas dimetil-metilénkék festékekkel (sDMMK). A kultúrákat folyamatosan kezeltük 4-alfa PDD-vel, mely aktiválja a TRPV4 csatornát és HC067047-tel pedig gátoltuk a TRPV4 csatorna működését. A felvételeket fénymikroszkóppal készítettük, 4x és 2x objektívet alkalmazva. A bemutatott reprezentatív kép felülnézeti kép a porcosodó kultúrákról. A nyilak a nodulusokat (N), míg az IN rövidítés az internoduláris régiót jelöli. A mérce 1 mm-es és fél mm-es hosszúságot jelöl.

6. Diszkusszió és konklúzió

Napjainkban is számos kísérlet zajlik egér micromass kultúrákon mely megfelelő modellként szolgál különböző porcosodási, csontosodási folyamatok *in vitro* vizsgálatára [8, 17, 18, 19, 20, 21, 22]. A TRPV4 jelentős szerepet tölt be a chondrogenesis folyamatában, de pontos szerepe és a csatorna defektusok következtében fellépő szkeletális diszpláziák mögött rejlő folyamatok a mai napig ismeretlenek [1, 2, 8, 23]. Előzetes eredményeink alapján ezekben a micromass kultúrákban az 1-3-6-10 tenyésztési napokon, amikor a mesenchymális sejtek chondroprogenitor, chondroblast majd chondrocyta sejtekké differenciálódnak az ioncsatorna mennyisége emelkedik, majd a hipertrófiás chondrocytákat is tartalmazó 15 napos kultúrákban lecsökken. A tanulmányomban is bemutatott eredményeink alapján a chondrogenikus kultúrák TRPV4 expressziója nemcsak időbeli, hanem térbeli változásokat is mutat *in vitro*. Immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk, ahol a receptor térbeli elhelyezkedését vizsgálva a hatodik tenyésztési napon a noduláris térben több, míg az internoduláris térben kevesebb jelet detektáltunk a kezelt kultúrákban. Az internoduláris térben elnyúlt, kevésbé kerekded, chondroprogenitor és mesenchymális sejtekre jellemző morfológia volt látható, mind immunhisztokémiai módszerrel és hematoxin-eozin festéssel is alátámasztva (2., 3., 5. ábra). A TRPV4 idő-és térbeli változása hasonló tendenciát mutat az *in vivo* mintákban, ahol a TRPV4 fehérje expressziója az idő előrehaladtával változik egér végtagcsont és növekedési porckorong különböző zónáiban [24]. Az internoduláris térben a jelölés inkább sejtmembránban jelenik meg, míg a nodulusokban jelentős mennyiségű citoplazmatikus jelet is láthatunk (2., 3. ábra). Ezen citoplazmatikus jelek, lehetnek mitokondriumhoz kötöttek, vagy Golgi lokalizáltak [25, 26, 27] de a mi esetünkben a sejtmagban nem detektáltunk immunjelet [28]. TRPV4 gátlás során azonban a nodulusok területén a TRPV4 expresszió fokozódik a sejtmembránban (3. ábra), mely fakadhat abból is, hogy a sejt a gátlást követően erőlködik és minden intracelluláris TRPV4 molekulát kipakol a plazmamembránba. Ezzel szemben a folyamatosan aktivált kultúrákban nem csak sejtmembrán, hanem erős citoplazmatikus jelölés is látható (3. ábra). Lehetséges, hogy az aktivációt követően a sejten belül felhalmozódik a TRPV4 fehérje, de a sejt citoplazmatikusan beveszi a sejtfelszíni receptorokat. A japán Masuda kutatócsoport számolt be hasonló jelenségről, ahol a funkcionyeréses mutációval bíró fog-pulpa őssejtek TRPV4 receptor aktivációt követően fokozzák a citoplazmatikus és sejtmembrán TRPV4 kifejeződést [30, 31].

A TRPV4 ioncsatorna farmakonokkal történő kezelése szignifikáns morfológiai eltéréseket idéz elő a chondrogenikus kultúrákban *in vitro*, melyet egyrészt fáziskontraszt

felvételekkel és timelapse mikroszkópiával követtünk nyomon. A proteoglikánok vizualizálására savas dimetil-metilénkék festést és hagyományos hematoxin-eozin festéssel jellemeztük a kultúrákat. Az antagonistá HC067047 kezelt kultúrákban koporsófedélre hasonlító, fáziskontraszt felvételeken jól látható kristályszerű struktúrák keletkeztek. Ezek a kristályok állkőszvényes ízületi folyadékból nyert kalcium-pirofoszfát kristályhoz hasonlítanak, melyek kettősen törik a fényt [32]. A TRPV4 ioncsatorna szerepét elméletben már számtalanszor kapcsolatba hozták a kőszvénnel, de valódi kapcsolatra eddig még nem derült fény. A fáziskontraszt felvételeken úgy tűnik, hogy ezek a kristályok a sejtekben keletkeznek, és feltételezhetőleg apoptózist indukálnak. Erre utaló irodalmi adatok már megjelentek, más sejtekben [29, 33]. Ez lenne az első olyan adat, amely arról számol be, hogy a TRPV4 antagonistá HC067047 kalcium-pirofoszfát depozitumokat hoz létre chondrocytákban, azaz a TRPV4 receptor gátlása arthritis kialakulásához vezethet. Feltételezésünk szerint a TRPV4 túlműködés okozta aberráns mesenchymális, chondro- és oszteogenikus szigetek kialakulásáért a sejtek differenciáltsági állapotához kapcsolatosan időben és térben különböző expressziós mintázattal jellemezhető TRPV4 ioncsatorna a felelős, mely sejtpopulációtól függően különböző kalcium jeleket indukál. Kísérleteink folyamatban vannak, több oldalról történnek az eredmények megerősítése (osztódóképesség vizsgálatok, intracelluláris-kalcium mérés vizsgálatok). A pályamunkánkban bemutatott morfológiai felvételekről statisztikailag alátámasztott adatokat tervezünk a jövőben bemutatni.

7. Önállóan és segítséggel végzett munkák

Önállóan végeztem az alábbi munkafolyamatokat:

- A végtagbimbók eltávolítását, és a micromass kultúrák létrehozását.
- A kultúrák monitorozását és a tápoldat cseréjét.
- A fehérje immunhisztokémiai vizsgálataihoz szükséges előkészületeket és a primer, valamint a szekunder antitesttel történő jelölést.
- A hematoxin-eozin és savas dimetil-metilénkék festéseket.

A konfokális mikroszkóppal történő felvételeket Dr. Juhász Tamás munkájának köszönhetem.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Zákány Rózának és Somogyi Csillának a támogatásukért és hogy szakmai tudásomat bővíthetem azzal, amit tanítottak nekem. Külön köszönöm Dr. Juhász Tamásnak segítségéért és tanácsaiért, valamint a labor összes dolgozójának, hogy elsajátíthattam a laboratóriumi vizsgálatok egyes szakaszainak végzését. Továbbá szeretném megköszönni a leköszönt és jelenlegi intézetvezetőknek, Professzor Dr. Antal Miklósnak és Dr. Szűcs Péternek, hogy lehetőséget biztosítottak arra, hogy kutatómunkámat az intézetben végezhetem. Valamint a munkánkat a DETEP és az ÚNKP programok támogatták. Nem utolsó sorban köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak akár szakmai, akár az élet más területein történő fejlődésemben.

9. Rövidítések listája

4 α PDD: 4 α -Phorbol-12,13-didecanoát
ARD: ankrin ismétlődő domén
CAM: kadmium kötő régió
CMF PBS: kalcium és magnézium mentes PBS
DAPI: 4',6-diamino-2-fenil-indol
DMMK: 1,9-dimetil-metilénkék
DPX: disztirol, lágyító és xilol fixáló
ECM: extracelluláris mátrix
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
FBS: „Fetal Bovine Serum”
GAG: glükóz-aminoglikán
HDC: nagy sejtsűrűségű kultúra
HE: hematoxin-eozin
HIER: Hő indukálta antigén feltárás
IP3: inozitol-trifoszfát
MAP7: mikrotubulus asszociált protein 7
MSC: mesenchimális őssejt
NGS: „Normal Goat Serum”
NMRI: Naval Medical Research Institute
ON: „overnight”
PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat
PFA: paraformaldehid
PG: proteoglikán
PKC: protein kináz C
RPM: percenkénti fordulatszám
RR: ruténium-vörös
TM: Transzmembrán
TRP: Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák családja
TRPV4: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 4

10. Források és függelékek

[1] Kan HS, Chan PK, Chiu KY, Yan CH, Yeung SS, Ng YL, Shiu KW, Ho T. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis. Hong Kong Med J. 2019 Apr;25(2):127-133. doi: 10.12809/hkmj187600. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30919810.

[2] McNulty AL, Leddy HA, Liedtke W, Guilak F. TRPV4 as a therapeutic target for joint diseases. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2015 Apr;388(4):437-50. doi: 10.1007/s00210-014-1078-x. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25519495; PMCID: PMC4361386.

[3] Röhlich Pál, Szövetan, 2014, Semmelweis Kiadó

[4] Kanczler JM, Smith EL, Roberts CA, Oreffo RO. A novel approach for studying the temporal modulation of embryonic skeletal development using organotypic bone cultures and microcomputed tomography. Tissue Eng Part C Methods. 2012 Oct;18(10):747-60. doi: 10.1089/ten.TEC.2012.0033. Epub 2012 May 21. PMID: 22472170; PMCID: PMC3460619.

[5] Lv M, Zhou Y, Chen X, Han L, Wang L, Lu XL. Calcium signaling of in situ chondrocytes in articular cartilage under compressive loading: Roles of calcium sources and cell membrane ion channels. J Orthop Res. 2018 Feb;36(2):730-738. doi: 10.1002/jor.23768. Epub 2017 Nov 3. PMID: 28980722; PMCID: PMC5839963.

[6] Wu S, Zhou H, Ling H, Sun Y, Luo Z, Ngo T, Fu Y, Wang W, Kong Y. LIPUS regulates the progression of knee osteoarthritis in mice through primary cilia-mediated TRPV4 channels. Apoptosis. 2024 Jun;29(5-6):785-798. doi: 10.1007/s10495-024-01950-9. Epub 2024 Mar 22. PMID: 38517601; PMCID: PMC11055729.

[7] Heller S, O'Neil RG. Molecular Mechanisms of TRPV4 Gating. In: Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5255/>

[8] Somogyi, C.S.; Matta, C.; Foldvari, Z.; Juhász, T.; Katona, É.; Takács, Á.R.; Hajdú, T.; Dobrosi, N.; Gergely, P.; Zákány, R. Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) Ion Channels in Chondrogenic Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18412-18438. <https://doi.org/10.3390/ijms160818412>

[9] Tureckova J, Hermanova Z, Marchetti V, Anderova M. Astrocytic TRPV4 Channels and Their Role in Brain Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 12;24(8):7101. doi: 10.3390/ijms24087101. PMID: 37108263; PMCID: PMC10138480.

[10] Urel-Demir G., Simsek-Kiper P.O., Oncel I., Utine G.E., Haliloglu G., Boduroglu K. Natural history of TRPV4-Related disorders: From skeletal dysplasia to neuromuscular phenotype. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2021;32:46–55. doi: 10.1016/j.ejpn.2021.03.011.

[11] Toft-Bertelsen TL, MacAulay N. TRPing on Cell Swelling - TRPV4 Senses It. *Front Immunol.* 2021 Sep 20;12:730982. doi: 10.3389/fimmu.2021.730982. PMID: 34616399; PMCID: PMC8488219.

[12] Camacho N, Krakow D, Johnykutty S, Katzman PJ, Pepkowitz S, Vriens J, Nilius B, Boyce BF, Cohn DH. Dominant TRPV4 mutations in nonlethal and lethal metatropic dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2010 May;152A(5):1169-77. doi: 10.1002/ajmg.a.33392. PMID: 20425821; PMCID: PMC4169191.

[13] Lamandé SR, Yuan Y, Gresshoff IL, Rowley L, Belluoccio D, Kaluarachchi K, Little CB, Botzenhart E, Zerres K, Amor DJ, Cole WG, Savarirayan R, McIntyre P, Bateman JF. Mutations in TRPV4 cause an inherited arthropathy of hands and feet. *Nat Genet.* 2011 Oct 2;43(11):1142-6. doi: 10.1038/ng.945. PMID: 21964574.

[14] Takács R, Matta C, Somogyi C, Juhász T, Zákány R. Comparative analysis of osteogenic/chondrogenic differentiation potential in primary limb bud-derived and C3H10T1/2 cell line-based mouse micromass cultures. *Int J Mol Sci.* 2013 Aug 5;14(8):16141-67. doi: 10.3390/ijms140816141. PMID: 23921684; PMCID: PMC3759904.

[15] Spieker J, Mudersbach T, Vogel-Höpker A, Layer PG. Endochondral Ossification Is Accelerated in Cholinesterase-Deficient Mice and in Avian Mesenchymal Micromass Cultures. *PLoS One*. 2017 Jan 24;12(1):e0170252. doi: 10.1371/journal.pone.0170252. PMID: 28118357; PMCID: PMC5261733.

[16] Rock MJ, Prenen J, Funari VA, Funari TL, Merriman B, Nelson SF, Lachman RS, Wilcox WR, Reyno S, Quadrelli R, Vaglio A, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Ikegawa S, Nagai T, Rimoin DL, Nilius B, Cohn DH. Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat Genet*. 2008 Aug;40(8):999-1003. doi: 10.1038/ng.166. Epub 2008 Jun 29. PMID: 18587396; PMCID: PMC3525077.

[17] Vágó J, Somogyi C, Takács R, Barna KB, Jin EJ, Zákány R, Matta C. Isolation and Culturing of Primary Murine Chondroprogenitor Cells: A Mammalian Model of Chondrogenesis. *Curr Protoc*. 2024 Mar;4(3):e1005. doi: 10.1002/cpz1.1005. PMID: 38465381.

[18] Juhász T, Matta C, Somogyi C, Katona É, Takács R, Soha RF, Szabó IA, Cserhádi C, Szódy R, Karácsonyi Z, Bakó E, Gergely P, Zákány R. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal*. 2014 Mar;26(3):468-82. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.12.001. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24333667.

[19] Underhill TM, Dranse HJ, Hoffman LM. Analysis of chondrogenesis using micromass cultures of limb mesenchyme. *Methods Mol Biol*. 2014;1130:251-265. doi: 10.1007/978-1-62703-989-5_19. PMID: 24482179.

[20] Saha A, Rolfe R, Carroll S, Kelly DJ, Murphy P. Chondrogenesis of embryonic limb bud cells in micromass culture progresses rapidly to hypertrophy and is modulated by hydrostatic pressure. *Cell Tissue Res*. 2017 Apr;368(1):47-59. doi: 10.1007/s00441-016-2512-9. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27770257.

[21] Arostegui M, Underhill TM. Murine Limb Bud Organ Cultures for Studying Musculoskeletal Development. *Methods Mol Biol*. 2021;2230:115-137. doi: 10.1007/978-1-0716-1028-2_8. PMID: 33197012.

[22] Takács R, Juhász T, Katona É, Somogyi C, Vágó J, Hajdú T, Barna KB, Nagy P, Zákány R, Matta C. Isolation and Micromass Culturing of Primary Chicken Chondroprogenitor Cells for Cartilage Regeneration. *Curr Protoc*. 2023 Jul;3(7):e835. doi: 10.1002/cpz1.835. PMID: 37427867.

[23] Muramatsu S, Wakabayashi M, Ohno T, Amano K, Ooishi R, Sugahara T, Shiojiri S, Tashiro K, Suzuki Y, Nishimura R, Kuhara S, Sugano S, Yoneda T, Matsuda A. Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *J Biol Chem*. 2007 Nov 2;282(44):32158-67. doi: 10.1074/jbc.M706158200. Epub 2007 Sep 5. PMID: 17804410.

[24] Khatib NS, Monsen J, Ahmed S, Huang Y, Hoey DA, Nowlan NC. Mechanoregulatory role of TRPV4 in prenatal skeletal development. *Sci Adv*. 2023 Jan 25;9(4):eade2155. doi: 10.1126/sciadv.ade2155. Epub 2023 Jan 25. PMID: 36696489; PMCID: PMC9876556.

[25] Arniges M, Fernández-Fernández JM, Albrecht N, Schaefer M, Valverde MA. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem*. 2006 Jan 20;281(3):1580-6. doi: 10.1074/jbc.M511456200. Epub 2005 Nov 16. Erratum in: *J Biol Chem*. 2006 Mar 31;281(13):8996. PMID: 16293632.

[26] Kanta Acharya T, Kumar A, Kumar Majhi R, Kumar S, Chakraborty R, Tiwari A, Smalla KH, Liu X, Chang YT, Gundelfinger ED, Goswami C. TRPV4 acts as a mitochondrial Ca^{2+} -importer and regulates mitochondrial temperature and metabolism. *Mitochondrion*. 2022 Nov;67:38-58. doi: 10.1016/j.mito.2022.10.001. Epub 2022 Oct 17. PMID: 36261119.

[27] Zhang X, Lee MD, Buckley C, Wilson C, McCarron JG. Mitochondria regulate TRPV4-mediated release of ATP. *Br J Pharmacol*. 2022 Mar;179(5):1017-1032. doi: 10.1111/bph.15687. Epub 2021 Nov 2. PMID: 34605007.

[28] Zhao Y, Huang H, Jiang Y, Wei H, Liu P, Wang W, Niu W. Unusual localization and translocation of TRPV4 protein in cultured ventricular myocytes of the neonatal rat. *Eur J Histochem*. 2012 Jul 24;56(3):e32. doi: 10.4081/ejh.2012.e32. PMID: 23027348; PMCID: PMC3493978.

[29] Zhao Y, Wang J, Liu X. TRPV4 induces apoptosis via p38 MAPK in human lung cancer cells. *Braz J Med Biol Res*. 2021 Oct 18;54(12):e10867. doi: 10.1590/1414-431X2021e10867. PMID: 34669779; PMCID: PMC8521542.

[30] Masuda K, Han X, Kato H, Sato H, Zhang Y, Sun X, Hirofuji Y, Yamaza H, Yamada A, Fukumoto S. Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Modeling Genetic Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 25;22(5):2269. doi: 10.3390/ijms22052269. PMID: 33668763; PMCID: PMC7956585.

[31] Han X, Kato H, Sato H, Hirofuji Y, Fukumoto S, Masuda K. Accelerated osteoblastic differentiation in patient-derived dental pulp stem cells carrying a gain-of-function mutation of TRPV4 associated with metatropic dysplasia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Mar 19;523(4):841-846. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.123. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31954514.

[32] Ann K. Rosenthal, M.D., and Lawrence M. Ryan, M.D. Calcium Pyrophosphate Deposition Disease. *N Engl J Med* 2016;374:2575-2584. doi: 10.1056/NEJMra1511117

[33] Ma Q, Wu J, Li H, Ma X, Yin R, Bai L, Tang H, Liu N. The role of TRPV4 in programmed cell deaths. *Mol Biol Rep*. 2024 Feb 1;51(1):248. doi: 10.1007/s11033-023-09199-2. PMID: 38300413.