

**DEBRECENI EGYETEM**  
**ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**  
**ANATÓMIAI, SZÖVET- ÉS FEJLŐDÉSTANI INTÉZET**



**A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid Receptorok csirke  
primer porcosodó mezenchimális high density kultúrákban**

Tudományos Diákköri Pályamunka

**Földvári Zsófia**

VI. éves orvostanhallgató

Témavezetők:

Dr. Zákány Róza  
egyetemi docens

Somogyi Csilla  
egyetemi gyakornok

Bírálatra való beküldéséhez hozzájárulok:

.....

Dr. Antal Miklós  
intézetvezető

.....

Dr. Matta Csaba  
intézeti TDK-felelős

Debrecen, 2014

# Tartalom

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tartalom .....                                                                      | 2  |
| 1. Gyakran használt rövidítések jegyzéke .....                                      | 4  |
| 2. Összefoglalás.....                                                               | 5  |
| 3. Bevezetés és irodalmi áttekintés .....                                           | 6  |
| 3.1 A porcszövet.....                                                               | 6  |
| 3.2 A kísérleti modell.....                                                         | 7  |
| 3.3 A TRPV receptorok a TRP ioncsatornák népes, sokszínű csoportjába tartoznak..... | 9  |
| 3.4 A TRPV1 receptor szerkezete .....                                               | 11 |
| 3.5 A TRPV1 aktiválása és gátlása .....                                             | 13 |
| 3.6 Szöveti megjelenés - régi és új szerepek .....                                  | 15 |
| 3.7 A porcszövet és a TRPV-k.....                                                   | 16 |
| 4. Célkitűzés: .....                                                                | 18 |
| 5. Anyagok és módszerek.....                                                        | 19 |
| 5.1 Sejtenyésztés .....                                                             | 19 |
| 5.2 Szövetminták.....                                                               | 19 |
| 5.3 A porcképződés mértékének fénymikroszkópos detektálása .....                    | 19 |
| 5.4 A TRPV1 receptor aktiválása és gátlása kémiai ágensekkel.....                   | 20 |
| 5.5 Hőkezelés hatása a HD kultúrákra és a TRPV1 ioncsatornára .....                 | 21 |
| 5.6 RT- PCR reakciók .....                                                          | 21 |
| 5.7 Fehérjék kimutatása western blot technika segítségével.....                     | 23 |
| 5.8 A sejtek életképességének vizsgálata MTT-assay-vel .....                        | 24 |
| 5.9 A sejtproliferáció vizsgálata <sup>3</sup> H-timidin-beépülés mérésével .....   | 25 |
| 5.10 Alkalmazott statisztika .....                                                  | 25 |
| 6. Eredmények.....                                                                  | 26 |
| 6.1. A TRPV receptorok mRNS szinten történő kifejeződése .....                      | 26 |
| 6.2. A TRPV1 fehérje szintű expressziója .....                                      | 28 |
| 6.3. A TRPV1 aktiválása és gátlása farmakológiai módszerekkel.....                  | 28 |
| 6.4 A hőkezelés hatása a kondrogenezis folyamataira .....                           | 29 |
| 6.5. A hőkezelés sejtkárosító hatásának vizsgálata .....                            | 31 |
| 6.6. A hőstimulus hatása a TRPV1 mRNS expresszióra.....                             | 32 |
| 7. Eredmények áttekintése.....                                                      | 34 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 8. Köszönetnyilvánítás ..... | 39 |
| 9. Irodalomjegyzék.....      | 40 |
| 10. Függelék .....           | 47 |

# 1. Gyakran használt rövidítések jegyzéke

2-ABP: 2-aminoetoxidifenil-borát  
AEA: anandamid  
ARD: ankyrin ismétlődő szekvencia (*Ankyrin Repeat Domain*)  
ATP: adenozin- 5'- trifoszfát  
CaM: kalmodulin  
CaMKII: Kalmodulin aktivált protein-kináz II. típusa  
cDNS: komplementer DNS  
CMF PBS: Kalcium- és magnéziummentes foszfát puffer  
c-Src: celluláris „*sarc*” kináz  
CZ: kapszazepin  
DMMK: dimetil-metilénkék  
DNS: dezoxi-ribonukleinsav  
DPX: fedő médium, (*distyrene, plasticizer and xylene*)  
ECM: extracelluláris mátrix  
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav  
FBS: főtális borjúsérum  
FGF: fibroblaszt növekedési faktor  
GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz  
HD: nagy sűrűségű (*high density*)  
HOX (gén): a homeodomain fehérjéket kódoló gének  
HPETE: hidroperoxi-eikosa-tetraénsav  
IGF: inzulinszerű növekedési faktor  
Kap: kapszaicin  
mRNS: *messenger* ribonukleinsav  
MTT: 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólium-bromid  
NADA: *N*-arachidonoyl-dopamin  
OD: optikai denzitás  
OLEA: *N*-oleoil-etanolamin  
PIP2: Foszfátidil-inozitol-4,5-biszfoszfát  
PKA: protein- kináz A  
PKC: protein- kináz C  
PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid  
RIPA: radioimmun precipitációs esszé puffer (*radio immuno precipitation assay*)  
RPM: fordulatszám (*revolutions per minute*)  
RR: ruténium vörös  
RT- PCR: Reverz transzkriptiót követő polimeráz láncreakció  
RTX: reziniferatoxin  
SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis  
sDMMK: savas dimetil-metilénkék  
SERCA: szarko/endoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áz  
SHH (gén): a sonic hedgehog fehérjét kódoló gén  
TK: Toluidinkék  
TM: Transzmembrán  
TRP: Tranziens Receptor Potenciál  
TRPV: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid

## 2. Összefoglalás

A mezenchimális eredetű kondroprogenitor sejtek differenciálódását befolyásolják a külvilág mechanikai és ozmotikus ingerei. A sejtek mechanoreceptorai között fontosak a polimodális, nem szelektív Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1-6 (TRPV1-6) csatornák. A TRPV4 funkciónyeréssel járó mutációja porcdifferenciációs zavarhoz vezet, a többi TRPV receptor porcfejlődésben játszott szerepéről azonban nincsenek ismereteink. Kísérleteink során a TRPV1 receptort kívántuk differenciálódó porcsejteken kimutatni, valamint a porcképződésben betöltött funkcióját részletesebben vizsgálni.

Csirkeembriók végtagtelepeiből izolált mezenchimális eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott nagy sűrűségű (*high density*, HD) kultúrákban és különböző korú állatok ízületi porcában a TRPV ioncsatornák mRNS expresszióját RT-PCR-al (Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció) monitoroztuk. A HD kultúrákban a TRPV1 fehérje expresszióját western blot segítségével is vizsgáltuk.

A HD kultúrákban mRNS szinten TRPV1, 2, 3 és 4 csatornákat, fehérje szinten a TRPV1 csatornát detektáltuk. Vizsgáltuk a TRPV1 farmakológiai modulálásának porcképződésre gyakorolt hatásait. Az irodalmi adatokkal egybehangzóan a sejtek osztódó- és életképességében nem tapasztaltunk szignifikáns változásokat, így a továbbiakban aktiváló ágensként 30 perces hőstimulust alkalmaztunk és monitoroztuk a TRPV1 ioncsatorna mRNS expressziós változását, valamint a porcdifferenciáció alakulását. A porcképződésre kifejtett hatást a tenyésztés hatodik napján savas dimetil-metilénkék festéssel és savas toluidinkék festékvisszaoldással vizsgáltuk. A sejtek életképességét MTT *assay*-vel, az osztódóképességet <sup>3</sup>H-timidin-beépülés méréssel követtük nyomon.

Az TRPV1-et már aktiváló hőstimulus (41°C) pozitívan befolyásolta a sejtek élet- és osztódóképességét, valamint megnövelte a keletkezett porcmátrix mennyiségét, míg a magasabb hőfok károsan befolyásolta a porcosodást.

A tapasztalt változások arra utalnak, hogy a kondrogenikus sejtek által expresszált TRPV1 csatorna pozitív előjellel vesz részt a sejtek differenciációjának és alapvető életfunkcióinak szabályozásában. A TRPV1 fehérjefunkció természetének pontosabb karakterizálása a differenciálódó porcsejteken további vizsgálatokat igényel.

### 3. Bevezetés és irodalmi áttekintés

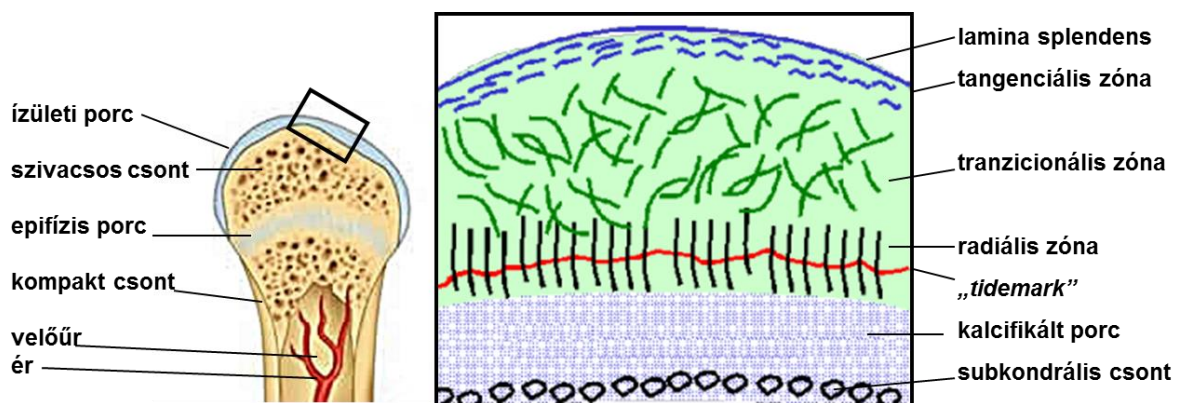
#### 3.1 A porcszövet

Vizsgálataink tárgya az ízületi porc, melynek károsodása, degeneratív betegségei öregedő társadalmunkban egyre több embert érintenek. Kiemelhetjük az osteoartritist, mely a hatvan év feletti férfiak majdnem 10%-át, a nők 18%-át érinti. A porc degenerációjával járó betegség végstádiuma nagymértékű fájdalmat és súlyos mozgáskorlátozottságot, jelentős életminőség-romlást okoz és 2020-ra várhatóan a rokkantság egyik leggyakoribb előidézője lesz (Woolf és Pfleger, 2003). Az ízületi porc csak korlátozott regenerációs képességekkel rendelkezik, s konzervatív vagy műtéti úton történő korrekciója napjainkig nem hozott kielégítő eredményeket (Oldershaw 2012, Huey és mtsai. 2012). Ugyanakkor kísérletes adatok és klinikai megfigyelések egyaránt arra utalnak, hogy az ízületi porc károsodásával járó kórképekben differenciálatlan, kondrogenikus potenciállal is rendelkező sejtek jelennek meg mind a sérült porcban, mind a szinoviális folyadékban (Williams és mtsai, 2010), így ezek a sejtek biztosíthatnak bizonyos restitúciót, amennyiben kedvező feltételeket tudunk a porcképződéshez biztosítani az ízületben. Az oki terápia kifejlesztéséhez a fentiek ismeretében szükséges a hialin porc fejlődésében szerepet játszó mechanizmusok részletesebb megfigyelése, mely segítséget nyújthat az ízületi porc regenerációját célzó, sejtes alapú gyógyító eljárásokban.

A porcszövetet a kötő- és támasztószövetek közé soroljuk. Egyetlen sejtfeleség található benne, a jellegzetesen lekerekített, nyúlvány nélküli sejt, a kondrocita. Ezek a sejtek a mátrix lakúnaiban helyezkednek el, kisebb csoportokba, kondronokba tömörülve és jelentős mennyiségű, jellegzetes összetételű extracelluláris mátrixszal (ECM) veszik körül magukat. A porcszövetnek hagyományosan három típusát különböztethetjük meg; a hialin, elasztikus és a rostos porc. Megfigyeléseinket hialinporcon végeztük, mely az állati szervezetben több helyen is megjelenik úgy, mint ízületi porc, egyes zsigerek szilárd vázát adó állandósult porc, vagy mint az encondralis csontosodás során képződő csontok vázát adó porcszövet (Röhlich Pál, Szövettan).

Az ízületi porc az ízületi réssel rendelkező ízületekben a csontok felszínét borító szövet, melynek táplálása az ízületi folyadék felől diffúzióval történik. (1. ábra) Az ízület mozgásai fontos szerepet játszanak az ízületi nedv termelődésében és áramlásában (Lee és Urban, 1997). Az ízületi porc rétegzett szerkezetű, benne az ízületi felszínnel párhuzamos, eltérő tulajdonságokkal jellemezhető zónákat különítünk el (Bobick és mtsai., 2009). (1. ábra)

A csonthoz legközelebb eső zónában az oxigén és tápanyag koncentrációja szinte nullára csökken (Otte, 1991), nem meglepő tehát, hogy a kondrociták anaerob úton, szubsztrát szintű foszforilációval képzik az ATP-t (adenozin-5'-trifoszfát), ami laktát felhalmozódásához és pH csökkenéséhez vezethet (Lee és Urban, 1997). A kondrociták nemcsak elviselik az alacsony oxigénszintet, de az protektív hatással van az ízületi porcra, segíti termelődését és gátolja destrukcióját (Thoms és mtsai., 2013). A porcszövet más típusaival ellentétben az ízületi porcot nem veszi körbe kondrogenikus őssejteket tartalmazó perikondrium, ami miatt az esetlegesen elpusztuló sejtek nem pótlódnak a periféria felől. Részben ezzel magyarázható a sérült ízületi porc korlátozott regenerációs képessége (Rölich Pál, Szövettan).



**1. ábra. Az ízületi porc sémás felépítése.** A kivágás az ízületi porc rétegeit, valamint a kollagén rostok fő lefutási irányát szemlélteti. A „tidemark” egy határvonal a kalcifikálódott és a nem kalcifikált porc között.

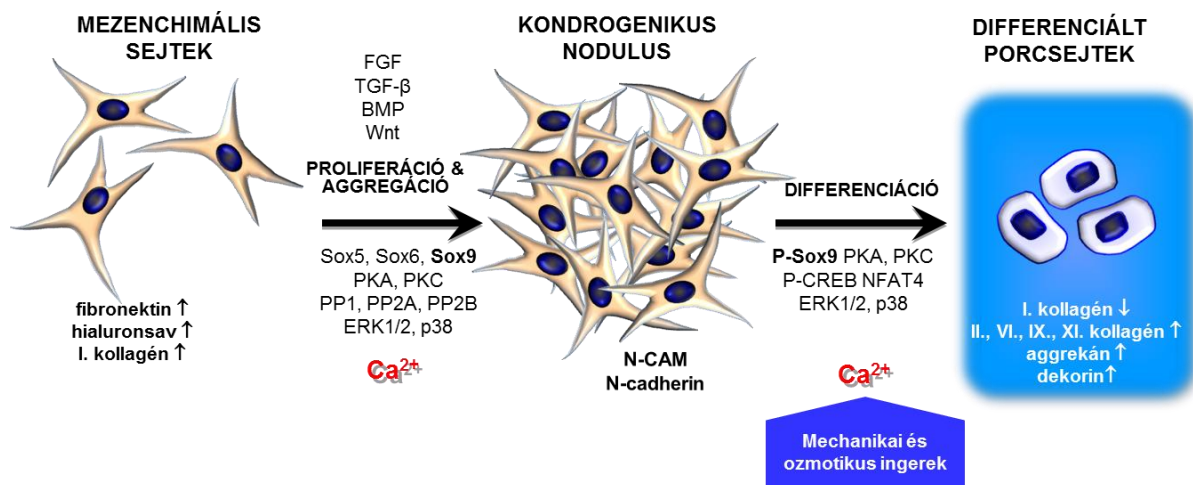
### 3.2 A kísérleti modell

A porcfejlődés vizsgálatához egy széles körben elfogadott porcdifferenciációs modellt használunk laborunkban. Ez a Hamburger- Hamilton 22-24-es fejlődési stádiumban lévő csirke embriók disztális végtagtelepéből izolált sejtekből előállított, primer, nagy sejtsűrűségű tenyészet (Hamburger és Hamilton, 1951; Hadházy és mtsai., 1982). Ezek a kultúrák főleg porcosodó mezenchimális sejtekből állnak, de viszonylag nagy számban jelen lévő fibroblasztot és kis mennyiségű mioblasztot és hámsejtet is tartalmaznak.

A modellben zajló és az *in vivo* porcképződés között a leglényegesebb különbség, hogy az *in vivo* porcképződés folyamatát számos pozicionáló tényező határozza meg, melyek az *in vitro* kultúrákból hiányoznak. Ilyen, a végtag morfológiáját kialakító faktorok, a végtagtelep disztális végén található perem (*apical ectodermal ridge*) által termelt FGF4 és FGF8, (fibroblaszt növekedési faktor) melyek a szomszédosan elhelyezkedő mezenchimából egy gyorsan osztódó, nem differenciált sejtpopulációt hoznak létre. Az FGF4 és FGF8 hatása

alól kikerülő proximálisabban elhelyezkedő sejtekre további gének termékei (HOX, SHH gének) hatnak, melyek meghatározzák a végtagok tengelyeit és elengedhetetlenek a végtag normális morfológiájának kialakulásához (Sadler, Langman Orvosi Embriológia). Ezen eltérésektől függetlenül a primer mezenchimális HD kultúrák egyszerűen létrehozhatóak, könnyen kezelhetőek és tisztán, izolált környezetben lehet vizsgálni a mezenchimális differenciációt elősegítő vagy gátló tényezőket, ami sokrétű információval szolgálhat a porcképződés egyes mozzanatairól és külső tényezőkkel való befolyásolhatóságáról.

A kondrogenikus sejtek proliferációja, valamint a porcsejt fenotípus kialakítása egy több lépéses folyamat eredménye, melyet maga a sejt (master gének és a felszíni receptormintázat-változásai), a közvetlen környezet (ECM, autokrin és parakrin faktorok), és távolabbról érkező molekulák (hormonok, citokinek) szabályoznak (Sandell és Adler, 1999). Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* porcdifferenciáció legfontosabb lépései a nyúlványos, mezenchimális sejtek kisebb csoportokba tömörülése, az aggregáció, melyet a sejtek lekerekedése, a kondrocita fenotípus megjelenése, a differenciáció követ. (2. ábra) Nem csak a sejtek morfológiája, de az ECM is átalakul. Az I. típusú kollagén, hialuronsav és fibronektin szintje csökken, míg a II., VI., IX., XI. típusú kollagén, aggregán és dekorin aránya emelkedik. Az üvegporc-specifikus makromolekulák expressziójának szabályozásában a Sox9 transzkripciós faktor alapvető fontosságú (Bobick és mtsai., 2009). (2. ábra)



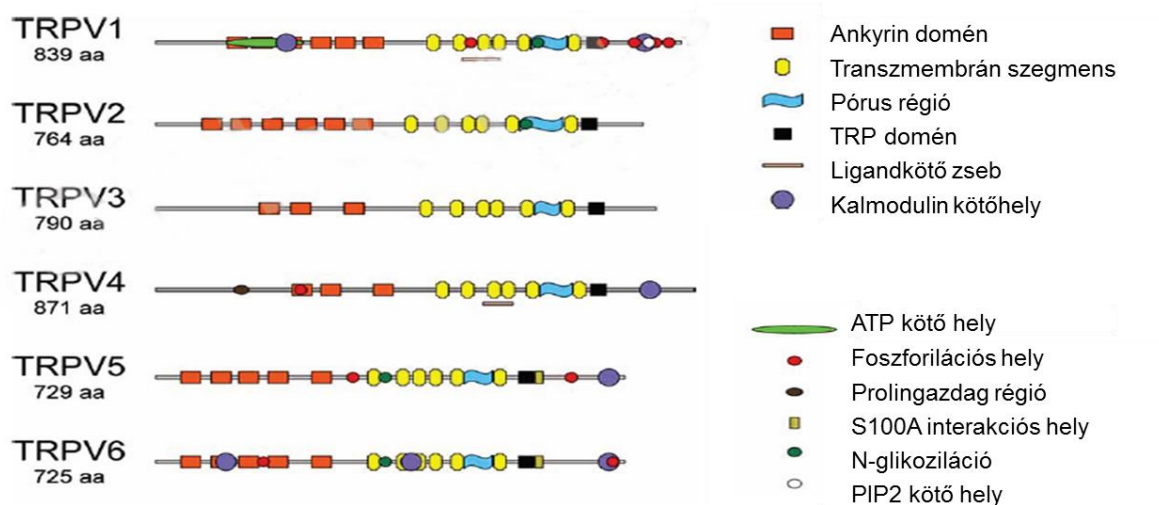
**2. ábra. A porcfejlődés legfontosabb lépései.** Az ábrán megfigyelhetjük a kondrogenikus sejtek differenciálódásának sematikus ábráját és ezzel párhuzamosan az ECM összetételének változását. (Matta és munkatársai után módosítva, Matta és mtsai., 2008)

A porcsejtek folyamatosan kapcsolatban állnak környezetükkel a dinamikus változó ECM-on keresztül, és azonnal válaszolnak az ízületi porcot a test mozgásai kapcsán érő

biomechanikai és ozmoláris stimulusokra. Ismert, hogy a sejtek környezetét kialakító ECM-ben lejátszódó ionkoncentráció-változásokat, ozmotikus változásokat, folyadék áramlás révén keltett mechanikai ingereket számos ioncsatorna közvetítheti az érett porcsejt felé (Barrett-Jolley és mtsai. 2010; Juhász és mtsai. 2014). Mivel az embrionális mozgások elengedhetetlenek a megfelelő morfológiájú ízületek kialakulásához (Nowlan és mtsai. 2010), így vélhetően a differenciálódó porcsejteken is találhatóak olyan ioncsatornák, melyek a környezetben és az ECM-ban lejátszódó változásokat közvetítik a porcsejtek irányába. Jelátviteli munkacsoportunk eddig számos kation-csatornát vizsgált (P2X<sub>4</sub>, K<sub>v</sub>, Na<sub>v</sub> és Ca<sub>v</sub> csatornák, NMDAR) *in vitro* porcosodó csirke kultúrákban és eredményeink alapján azt is tudjuk, hogy porcképződés folyamán (sejtproliferáció, sejkondenzáció, és sejt differenciáció) elengedhetetlenek az extra- és intracelluláris kalciumkoncentráció-változások (Matta és mtsai. 2008, Fodor és mtsai. 2009; Varga és mtsai. 2011). Ezek alapján, valamint a TRPV4 csatorna funkcionyeréses mutációja esetében kialakuló vázrendszeri malformációk megjelenése okán (Rock és mtsai., 2008) feltételezzük, hogy a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid ioncsatornák szerepet tölthetnek be a differenciálódó porcsejtekben a környezeti változások érzékelésében és továbbításában.

### 3.3 A TRPV receptorok a TRP ioncsatornák népes, sokszínű csoportjába tartoznak

A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornák közé szerkezeti homológia alapján 28 ioncsatornát sorolunk, melyen belül hat alcsoportot különíthetünk el. Ezek a TRPA (*ankyrin*), TRPC (*canonical*), TRPM (*melastatin*), TRPML (*mucolipin*), TRPP (*polycystin*), TRPV (*vanilloid*) csoportok (Huang, 2004) (3. ábra).



**3. ábra. A TRPV receptorok domén szerkezete.** A csatornák 6TM doménnel, az N-terminuson változó számú ankyrin doménnel, a C-terminuson TRP doménnel rendelkeznek. Vennekens után módosítva (Vennekens, 2008).

A TRPV receptorok története az 1960-as években kezdődött, amikor Jancsó Miklós leírta a kapszaicin-deszenzibilizáció jelenségét, mely során a kísérleti állatok érző idegvégződése többszöri, nagy dózisú kapszaicin adása után érzéketlenné váltak a legerősebb fájdalomkeltő kémiai ingerekkel szemben is. Később a kapszaicin érzékenységet a fájdalomérző idegvégződésekre lokalizálták, sőt felmerült egy hipotetikus kapszaicin receptor gondolata is (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975). A „kapszaicin receptor” klónozása után TRPV1 néven vált ismertté, melyet a vanilloidokon kívül a savas pH, a 43°C feletti hőmérséklet és számos, egyéb faktor is aktivál. A TRPV név onnan ered, hogy a megfigyelt receptort nem csak a kapszaicin, de egyéb vanilloid szerkezetű kémiai anyagok is aktiválták, szerkezetében pedig jelentős hasonlóságokat mutatott a már korábban muslicákban leírt TRP receptorokhoz (Caterina és mtsai., 1997).

A későbbiekben pusztán DNS szekvenciabeli hasonlóságok alapján több más, a TRPV csoportba sorolt termoszenzitív csatornát is felfedeztek: a TRPV2 52°C felett (Caterina és mtsai, 1999), a TRPV3 33°C felett (Xu és mtsai., 2002), a TRPV4 pedig 27°C-os hőmérsékleti érték felett aktiválódik (Strotmann és mtsai, 2000).

A TRPV csatornák azonban a hőérzékelésen kívül szerteágazó, eddig még kevésbé vizsgált funkciókkal is rendelkezhetnek: az endothelben, a szív és az erek miocitáiban megjelenő TRPV2 receptor potenciális mechanoszenzorként funkcionál, hiszen a membránfeszülés által aktiválódva vélhetően részt vesz a vérnyomás szabályozásában (Muraki és mtsai., 2007). Az inzulinszerű növekedési faktor (IGF) a TRPV2 membránba való transzlokációját vezérli, ami felveti a csatorna proliferációban betöltött szerepét (Kanzaki és mtsai., 1999).

A TRPV3 jelen van a bőr keratinocitáiban és a szőrtüszőkben. A mutáns TRPV3 receptorról rendelkező egerek kopaszak és dermatitiszben szenvednek (Asakawa és mtsai., 2006). A csatorna szerepet játszik a viszketés létrejöttében, ez jó terápiás célponttá teszi az ekcéma és egyéb viszketéssel járó bőrbetegségek kezelésében (Steinhoff és Bíró, 2009).

Fontos szerepet tölt be az ízületi kondrociták mechanikus ingerekre adott válaszában a TRPV4. A terhelés következtében megváltozó ozmotikus viszonyokra a sejtek az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint változtatásával reagálnak, ami vélhetően a TRPV4 aktivációjának tulajdonítható (Phan és mtsai., 2009). A csatorna kiemelten fontos a kondrogenikus differenciációban is, pozitív regulátora a porcfejlődés „mester” transzkripciós faktorának, a

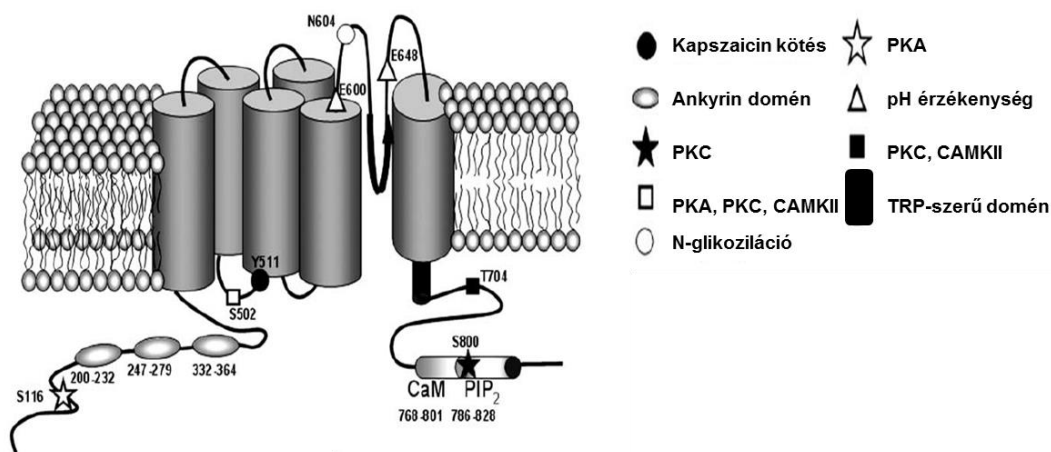
Sox9-nek (Muramatsu és mtsai., 2007). A TRPV4 funkcionyeréses mutációja súlyos, a csontvázrendszeret érintő elváltozást, a *brachyolmia* egy típusát hozza létre (Rock és mtsai., 2008).

Az előbb említett fehérjék aminosav sorrendje 40-50%-os homológiát mutat a TRPV1 ioncsatornával,  $\text{Ca}^{2+}$  ionra kis mértékben szelektívek (PCa/PNa  $\sim 3\text{-}10\text{:}1$ ) és hőérzékenyek (Huang, 2004). A vanilloid családon belül a TRPV5 és a TRPV6 kilógnak a sorból, hiszen kevesebb, mint 30%-os homológiát mutatnak a TRPV1-el, nem hőérzékenyek és nagy  $\text{Ca}^{2+}$  szelektivitású (PCa/PNa  $\sim 100\text{:}1$ ) csatornák (Peng és mtsai., 1999). Mindkét csatorna konstitutívan aktív és a szervezet számos szövetében megtalálhatóak. Tulajdonságaiknak megfelelően a  $\text{Ca}^{2+}$  abszorpcióval kapcsolatos folyamatokban vesznek részt, károsodásuk esetén hiperkalciuria, osteoporosis jön létre. A TRPV6 egyes karcinómákban (prosztata, emlő, vastagbél) fokozott mértékben expresszálódik, így vonzó diagnosztikus és terápiás célponttá válhat (Wissenbach és mtsai., 2001).

### 3.4 A TRPV1 receptor szerkezete

A TRPV1 oligomer szerkezetű transzmembrán ioncsatorna, mely négy TRPV1 alegység összekapcsolódásával jön létre. Az alegységek olyan csoportokat tartalmaznak, melyek szinergista módon segítik összekapcsolódásukat egy működőképes ioncsatornává (Urban és mtsai., 2011). A TRPV1 legtöbbször homotetramert alkot, de alkalmanként a TRPV2-vel (Rutter és mtsai., 2005), vagy TRPV3-al (Smith és mtsai., 2002) hoz létre heterotetramert. Ez magyarázatként szolgálhat a csatorna egyes esetekben megfigyelhető, a várttól eltérő hőérzékenységre.

A humán TRPV1 a 17-es kromoszómán helyezkedik el (Hayes és mtsai., 2000). Maga a fehérje 839 aminosavból áll, melyek hat transzmembrán (TM) hélixet hoznak létre (S1-S6). A csatorna szabályozásában különösen fontos a sejten belül elhelyezkedő C-, és N-terminális domén, melyek számos fehérje-fehérje interakciós helyet tartalmaznak. (4. ábra)



**4. ábra.** A TRPV1 alegységének szerkezete. A C- és N- terminális domén intracellulárisan, a P-hurok az ötös és hatos TM régió között található. (Montiel és munkatársai után módosítva, Montiel és mtsai., 2004).

Az N- terminális régió legfontosabb alkotója 6 ankyrin ismétlődő egység (*ankyrin repeat domain*, ARD), melyek vélhetően a tetramerizációhoz szükségesek (McCleverty és mtsai, 2006). Az N- terminus ezen kívül olyan interakciós helyekkel is rendelkezik, ahol kapcsolódni képes az ATP-vel és kalm modulinnal (CaM), melyek a csatornaműködés modulációjában játszanak szerepet. E két molekula vélhetően részt vesz a TRPV1 deszenzibilizációjában, mely folyamatos vagy többszöri agonista kezelés után figyelhető meg (Vyklícky és mtsai, 2008). (4. ábra)

A TRPV1 másik jelentős szegmense a C-terminus. Itt találjuk a TRP-domént, mely az ARD-khez hasonlóan meghatározó a tetramerizációban. Delécióna esetén a TRPV1 tetramer nem jelenik meg a sejtfelszínen (García-Sanz és mtsai., 2004). A hőérzékenységért felelős struktúra is ide lokalizált, hiszen ha a hidegre érzékeny TRPM8 C-terminálisát kicseréljük a TRPV1 C-terminálissal, az így létrejött kiméra meleg hatására aktiválódik (Brauchi és mtsai., 2006). Ezen a molekularészleten történik a PIP<sub>2</sub> moduláció, illetve CaM és tubulin kötőhely jelenléte is feltételezhető (Goswami és mtsai., 2007).

A csatorna permeabilitásáért felelős pórus régiót az ötödik és hatodik TM hélix és a köztük elhelyezkedő P-hurok hozza létre. Maga a pórus nagyban hasonlít a Kv1.2-es feszültségfüggő ioncsatornához, amely hasonló alfa hélixek által határolt hidrofíli üreggel rendelkezik (Salazar és mtsai., 2009). (4. ábra)

A TRPV1 különböző intracelluláris jelátviteli utak részét képezheti, hiszen a PKA (protein-kináz A) (Rathee és mtsai., 2002), a PKC (protein-kináz C) (Premkumar és Ahern, 2000), a CaMKII (Kalm modulín aktivált protein-kináz II. típusa) (Jung és mtsai., 2004), és a c-

Src (celluláris „sarc” kináz) (Jin és mtsai., 2004) több helyen is foszforilálhatják a csatornát, módosítva annak aktivációs küszöbét. (4. ábra)

### 3.5 A TRPV1 aktiválása és gátlása

A TRPV1, polimodális kation csatorna, mely főleg  $\text{Ca}^{2+}$ -t és  $\text{Na}^{+}$ -t enged be a sejtbe és annak depolarizációját okozza. Legjobban ismert a hőstimulus hatására létrejövő aktivációja, azonban a csatorna nyitását más ingerek, többek között a pH csökkenése (<6,5) és különböző kémiai anyagok bekötődése is létrehozhatja. Összességében tehát azt mondhatjuk, hogy a TRPV1 egy, a sejtkárosító hatásokat integráló egységként, „nociceptorként” funkcionál.

A TRPV1 aktivációja irodalmi adatok szerint a 43°C és a fölötti hőkezelés hatására jön létre. Felmerült, hogy a hő általi aktiváció valójában a csatorna feszültség-függésében létrejött változás eredménye. Szobahőmérsékleten a TRPV1 +150mV körüli membránpotenciálokon aktiválódik, — ilyet pedig sosem tapasztalunk élő sejteken — a hőmérséklet növelésével azonban a küszöb fiziológiásabb feszültségek felé tolódik (Voets és mtsai., 2004). Alacsonyabb pH hatására, mely gyulladás vagy ischémia során igen könnyen létrejöhet, a csatorna aktiválási küszöbe lecsökken és már testhőmérsékleten is vezetőképessé válik. (Caterina és Julius 2001). A felhalmozódott protonok a csatorna pórus régiójának külső részén található glutamát oldalláncokkal lépnek kapcsolatba (Jordt és mtsai., 2000). Ennek a folyamatnak nagyon fontos szerepet tulajdonítanak a gyulladás során létrejövő hiperalgéziában. Minthogy az ízületi porc mélyebb rétegeiben az extracelluláris tér kémhatása fiziológiás körülmények között is pH 6,5 körüli, így a porcsejteken expresszálandó TRPV1 csatornák viselkedése egészen eltérhet az egyéb sejteken található hasonló csatornákétól.

A TRPV1-et számos kémiai anyag is aktiválhatja. Ezek közül a legismertebbek a vanilloid típusú vegyületek, melyeket, az exo- és endovanilloidokra oszthatunk aszerint, hogy előfordulnak-e a szervezetben. A külvilágból származó, jellegzetesen erős illatú és ízű természetes vanilloidok számos növényben megtalálhatóak. Legjobban ismert képviselőjük a kapszaicin, de hasonló tulajdonságokkal bír a piperin, eugenol, gingerol, allicin és a kámfor is. A kapszaicinnál tízszer hatékonyabb anyag a mesterséges olvanil (*N*-oleoylvannillamine), és akár ezerszer potensebb a reziniferatoxin (RTX, *Euphorbia resinifera*) (Szolcsányi és mtsai., 1990). Ezek a lipidoldékony vegyületek a csatorna intracelluláris részén a 3TM hélixhez közel elhelyezkedő kapszaicin kötő-régió keresztül fejtik ki hatásukat (Jordt és Julius, 2002). Ez a kötőhely hiányzik a madarak TRPV1 receptoráról, ezért ezekben az állatokban a hő és a szöveti acidózis aktiválja a csatornát, de a vanilloidok nem (Jordt és Julius, 2002).

A TRPV1 csatornának több *splice*- variánsa is ismert, melyek az eredeti fehérjétől eltérő érzékenységgel rendelkeznek (Schumacher és Eilers, 2010). A rőt vérszívó denevér (*Desmodus Rotundus*) infravörös sugárzást érzékelő szervében található neuronok egy trunkált C-terminálissal rendelkező TRPV1-et tartalmaznak, ez a csatorna kb. 30°C-n aktiválódik (Gracheva és mtsai., 2011). A rágcslók *nucleus supraopticus*-ában kifejeződő N-terminális *splice* variáns nem szenzitív kapszaicinre, ozmoszenzorként funkcionálhat (Sudbury és mtsai., 2010). A sós íz érzékelésében több emlős esetében fontosak az amilorid inszenzitív Na<sup>+</sup> csatornák, melyek a Na<sup>+</sup> ionok mellett K<sup>+</sup>-ra és Ca<sup>2+</sup>-ra is permeábilisak. A csatornák hőre és kapszaicinra érzékenyek és vélhetően a TRPV1 egy splice variánsának felelnek meg (Lyll és mtsai., 2004).

Az endovanilloidok legtöbbször a károsodott szövetekben halmozódnak fel, ami a TRPV1 szerepét hangsúlyozza a gyulladásos hiperalgémia létrehozásában. Az N-arachidonylethanolamin (AEA, anandamid), N-arachidonoyldopamin (NADA), molekuláris szerkezetükben is hasonlítanak a kapszaicinoidokra (Tognetto és mtsai., 2001). Ezek a vegyületek azonban más csatornákat, például a G-protein kapcsolt kannabinoid receptorokat (CB1, CB2) is aktiválják. Egyes lipoxigenáz metabolitok is aktiválják a TRPV1-et, (5-, 12-, és 15-hidroperoxi-eikosa-tetraénsav) (Hwang és mtsai., 2000), sőt az adenzin, ATP és a poliamin spermin, spermidin és putreszcin esetében is beszámoltak ilyen hatásról (Ahern és mtsai., 2006). (5. ábra)

A TRPV1 antagonistái között megkülönböztethetünk a pórusrégió kívül ható és pórusblokkoló szereket. A természetesen előforduló TRPV1 antagonisták száma igen alacsony és legtöbb esetben szelektivitásuk és hatáserősségük elmarad a mesterséges antagonistákétól. A thapsigargin, mely a népi gyógyászatban fájdalomcsillapításra is használt *Thapsia garganica* hatóanyaga, a TRPV1-en kívül a SERCA Ca<sup>2+</sup> pumpát (szarko/endoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup> ATP-áz) is gátolja. A TRPV1 mesterségesen létrehozott antagonistái közül a legfontosabbak a kapszazepin (CZ), mely verseng a kapszaicinnal a receptoron található kötőhelyért, valamint a ruthenium vörös (RR), mely az összes TRP csatorna pórusblokkolója. (5. ábra)

| AGONISTA     |                                                                                    |                                                                                                                    | ANTAGONISTA                                                              |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| EXOVANILLOID |                                                                                    | ENDOVANILLOD                                                                                                       |                                                                          |
| TERMÉSZETES  | <b>kapszaicin</b><br>pipierin<br>eugenol<br>kámfor<br><b>RTX</b><br>vanillotoxinok | AEA<br>NADA<br>OLEA<br>adenozin<br>ATP<br>poliaminok<br>prostaglandinok<br>leukotrién B4<br>5S-, 12S-, 15S-, HPETE |                                                                          |
| MESTERSÉGES  | olvanil<br>fenilacetilrinvanil<br>2-APB<br>lidokain                                |                                                                                                                    | thapsigargin<br>yohimbin<br>dinorfinok<br><b>CZP</b><br>5-iodo RTX<br>RR |

**5. ábra. A TRPV1 agonistái és antagonistái.** A táblázat bemutatja a leggyakrabban használt TRPV1 ioncsatornát aktiváló és gátló farmakonok listáját. Kísérleteink során a reziniferatoxint, kapszazepint és kapszaicint alkalmaztuk.

Rövidítések: RTX: reziniferatoxin, 2-ABP: 2-Aminoetoxidifenil-borát, AEA: anandamid, NADA: *N*-arachidonoyl-dopamin, OLEA: *N*-oleoil-etanolamin, ATP: adenzin-trifoszfát, HPETE: hidroperoxi-eikoza-tetraén sav, CZP: kapszazepin, RR: ruténium vörös (Vriens és munkatársai után módosítva, Vriens és mtsai., 2009).

### 3.6 Szöveti megjelenés - régi és új szerepek

1997-es leírása óta a TRPV1 receptor igen kedvelt célpontja lett a kutatói társadalomnak, melynek következtében jelentősen bővültek az expressziójáról és esetleges funkcióiról szerzett ismereteink. A csatornát, melyet legelőször neuronokon detektáltak és a fájdalomérzettel hoztak kapcsolatba, később több, nem ingerelhető sejtípuson is megfigyelték. Funkciói igen sokrétűek és a legtöbb esetben még nem teljesen ismertek.

A csatorna többek között keratinocitákban, szebocitákban, urotéliumban, a húgyhólyag simaizomzatában, endotél sejteken, sőt egyes állatok esetében lépben, vesében, májban, tüdőben és a szívizomban is detektálható (Vennekens és mtsai., 2008). Ismert, hogy a TRPV1 számos immunsejten is megjelenik, így részt vesz a proinflammatorikus citokinek felszabadításában, a T-sejtek érésében és a dendritikus sejtek antigén prezentációjában (Basu és Srivastava, 2005), fontos szereppel bír a neuronok differenciációjában (Lilja és mtsai., 200) vagy hepatocelluláris karcinóma sejtek migrációjában (Waning és mtsai., 2007).

Az erek simaizomzatán és endotéljén is kifejeződő TRPV1 szerepet játszik az érátérő szabályozásában. A simaizom TRPV1 vazokonstriktiót mediál (Kark és mtsai.,

2008), amelynek szerepe lehet a hipertónia patogenezisében. A krónikus hipoxia fokozza a TRPV1 aktivációját (Ristoiu és mtsai., 2011), ez felveti annak lehetőségét, hogy a csatorna kapcsolatban áll az isémiás szívbetegséggel. Ismert, hogy a hipoxia és a magas vércukorszint a legfontosabb tényezők a diabétesz mellitusz szövődményeinek kialakulásában. A hipoxia szenzitizálja a TRPV1-et, különösen, ha az emelkedett glükóz szinttel társul (Ristoiu és mtsai., 2011). Érdekes adalék, hogy az inzulin és az IGF fokozza a csatorna kifejeződését (Lilja és mtsai., 2007). A pankréaszt beidegző szenzoros neuronok idegvégződésein található TRPV1 receptorok a szenzoros neuropeptidek felszabadítását és így közvetve a Langerhans-szigetek funkcióját befolyásolják (Uchida és Tominaga, 2011). A TRPV1 aktiváció vélhetően jelentős lehet a kettes típusú diabetes mellitus és az obezitás patogenezisében (Zsombok, 2013).

### **3.7 A porcszövet és a TRPV-k**

Jelen dolgozat tárgya a TRPV ioncsatornák megjelenésének feltérképezése, azon belül is a TRPV1 receptor vizsgálata a kondrogenézis folyamataiban. Az érett porcsejtek felszínükön számos ioncsatornát kifejeznek, melyek fontos szerepet játszanak a sejt életfolyamatainak szabályozásában (Barrett-Jolley és mtsai., 2010). Mint már említettem, az ízületi kondrociták olyan sajátos körülmények között - alacsony oxigén szaturáció és savas pH - élnek a porcszövetben, mely környezeti tényezők befolyásolhatják a vanilloid receptorok aktivitását.

Az utóbbi években több közlemény is foglalkozott a TRPV receptor család tagjainak ízületekben történő megjelenésével. Szabó és munkatársai szerint egérben a TRPV1 szerepet játszik a krónikus artritisz kialakulásában (Szabó és mtsai., 2005). Ezzel egybehangzóan Valdes és munkatársai szerint is a pro-nociceptív TRPV1 ioncsatornának prominens szerepe lehet az oszteoartritisz lefolyásában (Valdes és mtsai., 2011). Gavenis és munkacsoportja a TRP család 12 tagját mutatta ki mRNS szinten oszteoartritiszes betegek porcsejtjeiben, köztük a TRPV1-et is (Gavenis és mtsai., 2009). Az ízületi porcsejtek membránján a TRPV4, TRPV5 és TRPV6 (Hdud és mtsai., 2012) fehérje szinten történő kifejezéséről tudunk. A  $\text{Ca}^{2+}$  permeábilis TRPV csatornák vélhetően a porcsejtek ozmotikus és mechanikus stresszre adott válaszában játszanak szerepet. A TRPV4 szerepe a porcszövetben különösen jelentős, hiszen a csatorna pozitív regulátora a porcfejlődés egyik mester-génjének, a SOX9-nek (Muramatsu és mtsai., 2007) és funkciónyeréses mutációja súlyos, a vázrendszert érintő fejlődési rendellenességhez vezet (Rock és mtsai., 2008).

Összegezve elmondhatjuk, hogy átfogó leírás, mely a porcsejtek vanilloid receptor mintázatával foglalkozna, esetlegesen a kondrogenézisben betöltött szerepüket vizsgálná, eddig még nem készült. Ezért a pályamunkámban bemutatott kísérletek során monitoroztuk, mely vanilloid receptorok fejeződnek ki a kondrogenézis során és vizsgáltuk a TRPV1 ioncsatorna porcképződésben betöltött szerepét.

## 4. Célkitűzés:

Kísérleteinket két részre oszthatjuk: egyrészt a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid ioncsalád mRNS szinten történő expressziós mintázatát kívántuk vizsgálni, majd a kondrogenikus kultúrákban megjelenő TRPV1 ioncsatorna jellemzésével folytattuk megfigyeléseinket.

A TRPV ioncsatornák mRNS szinten történő expressziós mintázatát az alábbi csoportokban szándékoztuk megvizsgálni:

- csirke ízületi porcban (négy napos embrió végtag, egy napos frissen kikelt csirke és felnőtt állat ízületi porcában)
- nagy sűrűségű (HD) kondrogenikus kultúrákban.

A pályamunkám második felében a kísérletek a csirke HD kultúrákban mRNS szinten kifejeződő termoszenzitív TRPV1 ioncsatornára szűkültek, melynél az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Fehérje szinten is expresszálódik-e a TRPV1 membráncsatorna?
- TRPV1 agonisták és antagonisták alkalmazása hogyan befolyásolja a porcosodás folyamatát az *in vitro* porcosodó HD kultúrákon?
- Hőkezelés után (fél óra intervallum, 41 és 45 °C), a termoszenzitív TRPV1 receptor mRNS expressziója időben hogyan változik?
- A hőkezelés milyen hatással van a csirke HD kultúrák metakromatikusan festődő ECM mennyiségére?
- Ezen stimulus alkalmazásakor hogyan változik a sejtek élet- és osztódóképessége?

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 Sejttenyésztés

A HD kultúra létrehozásához használt kondroprogenitor sejteket Ross fajtájú fehér húshibrid csirkeembriók disztális végtagtelepeiből nyertük. A tojásokat négy napig keltetőgépben, 39°C hőmérsékleten 60%-os páratartalomban keltettük. A Hamburger-Hamilton 22-24 stádiumban lévő embriók disztális végtagtelepeit operáló mikroszkóp alatt eltávolítottuk, majd egy órán keresztül 0,25% tripszin-EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) oldatban (pH:7,4, Sigma, Budapest, Magyarország) 37°C-n emésztettük. A sejtek izolálása után Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot, majd  $1,5 \times 10^7$  sejt/ml sűrűségű sejtszuszpenziót hoztunk létre. Ebből a kísérlet típusától függően különböző (30-100  $\mu\text{L}$ ) térfogatú cseppeket helyeztünk műanyag Petri csészék aljára. A sejteket termosztátban 37°C-on, 5%  $\text{CO}_2$  és 80% relatív páratartalom mellett 2 órán keresztül hagytuk kitapadni, majd 10% FBS-t tartalmazó (fötális borjúsérum), antibiotikumokkal és antimikotikummal (penicillin 50 U  $\text{mL}^{-1}$ , streptomycin 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , fungizone 1.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (TEVA, Debrecen, Magyarország)) kiegészített F12 (Sigma, Budapest, Magyarország) tápoldattal tápláltuk. A táptalajt, amennyiben a kísérlet menete másképp nem diktálta, kétnaponta cseréltük. A kicseppentés napját a tenyésztés nulladik napjának tekintjük.

### 5.2 Szövetminták

A kísérletek során felhasznált szövetmintákat négy napos csirke embriókból (disztális végtagtelep), egy napos csirkéből (ízületi porc, agy) illetve felnőtt kakasból (ízületi porc, agy, vese) nyertük és cseppfolyós nitrogénben történő fagyasztás után felhasználásig -70°C-n tároltuk.

### 5.3 A porcképződés mértékének fénymikroszkópos detektálása

A differenciálódott porcszövet egyik fontos jellegzetessége, hogy a kondrocitákat nagy mennyiségű metakromatikusan festődő ECM veszi körül. Ezt a tulajdonságát felhasználhatjuk a porcosodás mértékének nyomon követésére, a dimetil-metilénkék (DMMK) és toluidinkék (TK) festéseket (Reanal, Magyarország) segítségül hívva.

Mindkét módszernek az az alapja, hogy az ECM-ben található negatívan töltött glükózaminoglikánok a festékmolekulákat oly módon kötik meg, hogy eközben a kék színű

festékmolekulák színe vörösre változik. Így szemikvantitatív információt nyerhetünk a porcsejtek által termelt mátrix mennyiségéről.

A sDMMK (savas DMMK) festés során a végtagtelepekből izolált sejtszuspenzióból 30 $\mu$ l-es cseppeket cseppentünk megfelelő tenyészedények aljába helyezett üveg fedőlemezekre, majd a sejteket a fentebb ismertetett körülmények között tenyésztjük. A tenyésztés végét jelentő hatodik napon a sejteket CMF-PBS-sel (Kalcium- és magnéziummentes foszfát puffer) mossuk, majd abszolút alkohol és 40%-os formalin 4:1 arányú keverékével 30 percen keresztül fixáljuk. Hidrált követően 3%-os ecetsavban oldott DMMK segítségével 5 percig festjük a telepeket, majd ecetsavas és desztillált vizes mosás után kristályragasztóval fedjük le őket. Egy napos állás után a végleges fedés DPX-szel (fedő médium, distyrén, plasticizer és xylén keveréke) történik. Az alacsony pH eredményeként a metakromáziásan festődő proteoglikánok vörös színben látszanak, a kék színű, ortochromatikus festődés pedig elhanyagolható. A telepeket mikroszkóp (2x objektív, skála 1mm) és digitális kamera segítségével örökítettük meg (Nikon Eclips 800, Tokió, Japán).

A TK festés során a telepeket megfestjük, majd standard mennyiségű oldószerbe visszaoldott festék abszorbanciáját megmérve kaphatunk szemikvantitatív információt a metakromatikus festődött ECM mennyiségéről. Ehhez a 30 $\mu$ l-es sejtszuspenzió-cseppeket megfelelő tenyészedényekbe cseppentjük, majd a tenyésztés hatodik napján CMF-PBS-sel lemossuk. A telepeket Kahle-féle fixálóval (28% etanol, 10% formalin, 2% jégecet, 60% desztillált víz) 15 percig fixáljuk, ez után glikokol-HCl pufferben (pH 1,8) oldott TK festékkel 15 percen keresztül festjük. A nem kötődött festéket a glikokolos-HCl pufferrel kimossuk, majd a glükózaminoglikánok negatív töltéseihez erősen kötődő festékmolekulákat standard mennyiségű HCl oldattal nyerjük vissza. Az oldat abszorbanciáját 625 nm-en mikroplate leolvasó (Chameleon, Hidex, Turku, Finnország) segítségével határozzuk meg. A méréseket négy mintával, és legalább három egymástól független alkalommal elvégeztük.

#### **5.4 A TRPV1 receptor aktiválása és gátlása kémiai ágensekkel**

Vizsgálataink során különböző kémiai anyagokkal kíséreltük meg aktiválni illetve gátolni a csirke TRPV1 receptort, hogy megfigyelhessük annak kondrogenézisben betöltött esetleges szerepét. Agonistaként kapszaicint (Kap; 10 és 100 $\mu$ M) és reziniferatoxint (RTX; 50 és 100pM, 100 nM), míg antagonistaként kapszazepint (CZ; 10 $\mu$ M) használtunk. Oldószeres kontrollként a fent említett farmakonok oldószerét, abszolút etanolt használtunk. A törzsoldatokat -20°C-n tároltuk. A kezeléseket különböző időpontban, és időtartamokig (a

tenyésztés első vagy második napján 30 percig vagy 4 óráig) vagy folyamatosan (az első tenyésztési naptól vagy a második tenyésztési naptól fogva) alkalmaztuk a különböző koncentrációjú ágensekkel. A kezelések után a tápoldatot mindig frissre cseréltük. A tenyésztés hatodik napján a telepeket DMMK-val és TK-kel festettük, hogy megvizsgálhassuk a keletkezett mátrix mennyiségét.

### 5.5 Hőkezelés hatása a HD kultúrákra és a TRPV1 ioncsatornára

Mivel a TRPV1 receptor polimodális, hőszenzitív ioncsatorna, ezért kíváncsiak voltunk, hogyan változik a TRPV1 mRNS expressziója hőkezelés hatására. Vizsgálataink során a kultúrák egy részét 41, míg egy másik részét 45°C-os inkubátorba helyeztük a tenyésztés harmadik napján harminc percre, majd a kultúrákat visszahelyeztük normál inkubálási körülmények közé (37°C, 5% CO<sub>2</sub> és 80% relatív páratartalom). A hatodik tenyésztési napon a telepeket savas DMMK-val és TK-kel festettük. A telepek egy részéből a kezelések után 30, 60, 90, 180 és 240 perccel mRNS-t izoláltunk, majd később RT PCR-t végeztünk, hogy megfigyelhessük a hőkezelés hatását néhány molekula, (Hsp47, Hsp70, Hsp90, Sox9, II. kollagén és aggregán link protein) illetve a TRPV1 mRNS szinten történő megjelenésére. Természetesen, minden esetben használtunk kontrollt, amely ebben az esetben hőkezelésnek alá nem vetett, a kezelés teljes ideje alatt 37°C-on tartott sejteket jelenti.

### 5.6 RT- PCR reakciók

Az Reverz Transzkripciót követő Polimeráz Láncreakciókat (RT-PCR) az általunk létrehozott HD kultúrákon és különböző szövetmintákon is elvégeztük.

A porcosodó kultúrákat műanyag petri csészékben tenyésztettük, majd megfelelő időpontokban a kultúrákat lefagyasztva a mintafeldolgozásig -70°C-on tartottuk. A TRPV1, 2, 3, 4 és 6 receptorok kimutatásának céljából a HD kultúrákat 0-6- tenyésztési napokon, és TRPV1 ioncsatorna vizsgálat miatt pedig közvetlenül a hőstimulusok után 30, 60, 90, 180 és 240 perccel arattuk le a mintákat.

Első lépésként a telepekből és a szövetmintáinkból totál RNS-t izoláltunk. Ehhez TRIZOL (Applied Biosystems, Amerikai Egyesült Államok) reagensbe vettük fel a mosott mintákat majd kloroformot adtunk hozzájuk. Előre hűtött 4°C-s centrifugában 15 percig 11.000 RPM-en (fordulatszám, *revolutions per minute*) centrifugáltuk a sejteket, ezt követően az RNS-t tartalmazó felső, színtelen vizes fázist leszívtuk, és izopropanolt adtunk hozzá. Ezeket a mintákat -20°C-on egy órán keresztül inkubáltuk, majd 11.000 RPM-en 20 percig

újra centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a kicsapódott RNS-t 70%-os alkoholban tisztítottuk, végül RNáz-mentes vízben oldottuk fel. Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Amerikai Egyesült Államok) készülék segítségével ellenőriztük. A kapott oldat abszorbanciáját 260 nm-en (nukleinsavak abszorpció maximuma) és 280 nm-en (fehérjék abszorpció maximuma) mértük és tisztaságát akkor tartottuk megfelelőnek, ha a 260/280 arány > 1,7. Az izolált mRNS-t felhasználásig -70°C-on tároltuk.

Az így nyert mintákat felhasználáskor egységesen 2.000 ng RNS/minta koncentrációra hígítottuk, majd reverz transzkripció kit (High Capacity RT Kit, Applied Biosystems, Amerikai Egyesült Államok) felhasználásával, oligo (dT) primerek segítségével az útmutató szerint cDNS-t (komplementer DNS) készítettünk.

Az amplifikáció során használt PCR reakció elegyek összetétele a következő volt: 5 µl 5x GoTaq zöld színű reakciós puffer, 0,5 µl dNTP (10 mM törzsoldat), 0,5 µl sense és antisense primerek (10 µM -os törzsoldat), 0,125 µl Gotaq DNA polimeráz (5u/µl), 1 µl cDNS, amit RNáz-mentes vízzel 25 µl-re egészítettünk ki (Promega, Fitchburg, Amerikai Egyesült Államok).

A kívánt DNS-szakaszok specifikus felerősítéséhez programozható termosztátot használtunk (Eppendorf Mastercycle, Németország) a következő beállításokkal: 2 perc 96°C-on a kezdeti denaturációhoz, amelyet 35 ismétlődő ciklus követett: 95°C 30 másodperc, majd primertől függő, optimális hőmérsékleten 30 másodpercen történt az annealáció, a lánchosszabbítás pedig 72°C-on fél percig történt. Az utolsó ciklus után egy végső lánchosszabbítási lépés következett 72°C-on, 5 percig.

A PCR-mintákat végül etídium-bromiddal megfestett 1,2%-os agaróz gélen futtattuk meg és gél dokumentációs rendszerrel digitalizáltuk. A denzitometrált Image J program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) segítségével végeztük.

Az amplifikációhoz felhasznált primer-párok szekvenciái, annellációs hőmérsékletei és termék hosszai az alábbi táblázatban vannak összefoglalva:

| Primer név                          | Primer szekvencia            | Annellációs hőmérséklet (°C) | Termék hossz (bp) | NCBI azonosító     |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>TRPV1</b><br>sense<br>antisense  | 5' TTCGTTCACTCTTTGCTCCTC 3'  | 54                           | 511               | NM_204572.1        |
|                                     | 5' TGCTCACAGTTTCTCCCATCA 3'  |                              |                   |                    |
| <b>TRPV2</b><br>sense<br>antisense  | 5' CCCTTGGAGTCACCTTACC 3'    | 54                           | 240               | XM_00494668<br>7.1 |
|                                     | 5' CTTCCCAGTCTTTGCATCT 3'    |                              |                   |                    |
| <b>TRPV3</b><br>sense<br>antisense  | 5' CCCCTCAATTCACCTCCTGC 3'   | 57                           | 591               | XM_00123515<br>4.3 |
|                                     | 5' GGAAAGGCATTACCAACCA 3'    |                              |                   |                    |
| <b>TRPV4</b><br>sense<br>antisense  | 5'-TCGCCGAGAAGACGGGAAAC-3'   | 61                           | 693               | NM_204692.1        |
|                                     | 5'-GGCGGTTCTCAATCTTGCTGTT-3' |                              |                   |                    |
| <b>TRPV6</b><br>sense<br>antisense  | 5' CATGTAGCTGCCTTGTATGA 3'   | 54                           | 447               | XM_416530.3        |
|                                     | 5' TGATCTTGGTCCCTCTTTG 3'    |                              |                   |                    |
| <b>sox9</b> sense<br>antisense      | 5' CCCCAACGCCATCTTCAA 3'     | 56                           | 381               | NM_204281.1        |
|                                     | 5' CTGCTGATGCCGTAGGTA 3'     |                              |                   |                    |
| <b>Hsp47</b><br>sense<br>antisense  | 5' ATGGTGACCCGCTCCTACA 3'    | 60                           | 303               | NM_205291.1        |
|                                     | 5' GCCCAGATCAGCCAAGTGT 3'    |                              |                   |                    |
| <b>Hsp70</b><br>sense<br>antisense  | 5' AAGCGTAACACCACCATTCC 3'   | 58                           | 375               | NM_00100668<br>5.1 |
|                                     | 5' CTTGGCTCCCACCCTATCTC 3'   |                              |                   |                    |
| <b>Hsp 90</b><br>sense<br>antisense | 5' CATTCTCAGTTCATTGGCTAC 3'  | 54                           | 332               | NM_00110978<br>5.1 |
|                                     | 5' TGGTCCTCCCAGTCATTAG 3'    |                              |                   |                    |
| <b>GAPDH</b><br>sense<br>antisense  | 5'CTGCCCAGAACATCATCCCA3'     | 58                           | 366               | NM_204305.1        |
|                                     | 5'CACGGTTGCTGTATCCAAACTCAT3' |                              |                   |                    |

## 5.7 Fehérjék kimutatása western blot technika segítségével

A kultúrákban megjelenő TRPV1 ioncsatorna fehérje szinten történő kimutatása céljából a harmadik tenyésztési napon a mintákat 100 µl RIPA pufferben szuszpendáltuk (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% nátrium-deoxikolát, 0,1% SDS, proteáz inhibitor koktél (10 µg/ml gordox, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 5 mM benzamidin, 10 µg/ml tripszin-inhibitor, 5mM EDTA, 8mM nátrium-fluorid, 1 mM nátrium-ortovanadát) 50 mM Tris pufferben (pH 8,0)), majd nitrogénben lefagyasztottuk, és felhasználásig – 70 °C –on tároltuk. A fehérjekoncentráció meghatározása előtt a mintákat 30 másodpercen keresztül 40 Hz-en

szonikáltuk (Cole Palmer Sonifier, Danbury, Amerikai Egyesült Államok). Centrifugálás (4 °C, 50.000 g, 90 perc) után az üledéket 1 %-os Triton X-100-as lízis pufferben 1 órán át jégen trituráltuk. 4 °C-on 50.000 g-vel 55 percen keresztül megint centrifugáltuk, majd a felülúszót (membránfrakció) szeparáltuk. A fehérjekoncentrációt *BCA protein assay* (Pierce, Rockford, IL., Amerikai Egyesült Államok) segítségével határoztuk meg. Ezt követően, a mintákhoz kétszeres töménységű elektroforézis mintapuffert (0,125 M Tris–HCl, pH 6,8; 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-merkaptó-etanol, 0,004% brómfenolkék) adtunk és 10 percig 90°C-on tartottuk. A minták gélben történő szeparálása (7% SDS-PAGE) után Trans-Blot Turbo transzfer rendszer (Bio-Rad, Berkeley, Amerikai Egyesült Államok) alkalmazásával a fehérjéket átvittük nitrocellulóz membránra. A membránokat PBS-ben oldott sovány tejpor 5 %-os oldatával blokkoltuk szobahőn egy órán keresztül. A primer antitest (TRPV1, 1:500, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, és GAPDH 1:1000, Cell Signaling) hozzáadása után a membránokat egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Ezt követően, háromszor 10 perces PBST-s (0,1% Tween20-szal kiegészített PBS) mosás után a membránokat tormaperoxidázzal kapcsolt szekunder antitesttel (kecskében termeltetett nyúl-elleni másodlagos antitest, 1:1500, Bio-Rad, Berkeley, Amerikai Egyesült Államok) egy órán keresztül inkubáltuk, végül a felesleges szekunder antitestet háromszor 10 perces PBST-s mosással távolítottuk el. A jeleket kemilumineszcens módszerrel tettük láthatóvá (Pierce, Rockford, Amerikai Egyesült Államok).

## 5.8 A sejtek életképességének vizsgálata MTT-assay-vel

A módszer, mely segítségével a sejtek életképességét kvalitatívvá tudjuk tenni, azon alapul, hogy az MTT reagensben található 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazóliumbromidot az élő sejtek mitokondriális-dehidrogenázai hasítják és így a sárga színű tetrazóliumból vízben oldhatatlan, bíbor színű formazán kristályok keletkeznek. Ha ezeket savas izopropanolban feloldjuk és az oldat abszorbanciáját 570nm-en megmérjük, a kapott érték arányos lesz a sejtek életképességével. A tenyésztés kezdetén létrehozott sejtszuspenzióból 30 µl-es cseppeket négylyukú platekbe cseppentünk, és a többi sejttel azonos körülmények között tenyésztünk. A harmadik tenyésztési napon, a hőkezelések befejeztével a lyukakba 25 µl MTT oldatot (5mg/ml) pipetázunk. Két óra 37°C-n történő inkubálás után,—mely során az élő sejtek mitokondriális-dehidrogenázainak lehetőségük van elhasítani a tetrazólium gyűrűt—a felülúszót leszívjuk és MTT szolubilizáló oldatot (90% izopropanol, 10% Triton X-100) adunk a sejtekhez. 10 perces rázatás alatt a formazán

kristályok feloldódnak a szolubilizáló oldatban, majd az oldat fénylenyelését mikroplate leolvasó (Chameleon, Hidex, Turku, Finnország) segítségével 570nm-en mérjük. A méréseket 4-4 wellen, legalább három alkalommal elvégeztük.

### **5.9 A sejtprolifерáció vizsgálata $^3\text{H}$ -timidin-beépülés méréseivel**

A vizsgálat lényege, hogy a sejtek a meghatározott idő alatt létrejött osztódások számával arányos mennyiségű radioaktívan jelzett nukleotidot ( $^3\text{H}$ -timidin) építenek be és így a kísérlet befejeztével mért beütésszám arányos lesz a proliferációs rátával. A tenyésztéskor használt sejtszuspenzió 30  $\mu\text{l}$ -es cseppjeit cseppentjük négylyukú tenyészedényekbe. A harmadik tenyésztési napon, a kezeléseket követően 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$ -es koncentrációban alkalmazzuk a trícíált-timidint 16 órán keresztül (törzsoldat: metil- $^3\text{H}$ -timidin, 37 MBq, 1 mCi/ml 185 GBq; Amersham, Egyesült Királyság) CMF- PBS-es mosás után 30 percen keresztül tartó 5%-os triklór-ecetsavas inkubációval kicsapjuk a mintákat. Újabb mosást követően 0,25% -os tripszinnel 10 percig emésztjük, majd ezeket a mintákat speciális 96-lyukú tenyészedényekbe helyezzük, és hosszabb szárítás után mikroplate leolvasó (Chameleon, Hidex, Finnország) segítségével lemérjük a beütésszámot. A méréseket legalább három alkalommal elvégeztük.

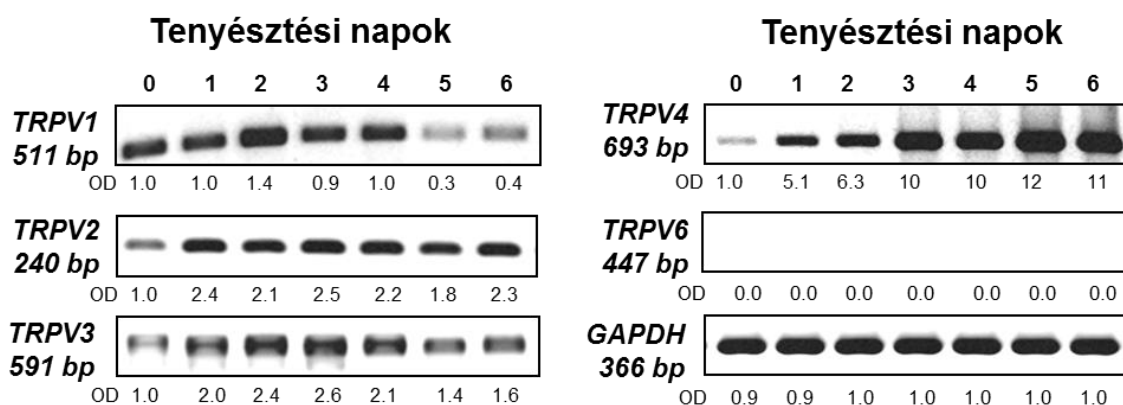
### **5.10 Alkalmazott statisztika**

Kísérleteinket minden esetben legalább háromszor ismételtük meg és a statisztikai elemzéshez kétmintás Student-féle t-próbát alkalmaztunk. A szignifikancia szintet  $p < 0.05$ -nek tekintettük.

## 6. Eredmények

### 6.1. A TRPV receptorok mRNS szinten történő kifejeződése

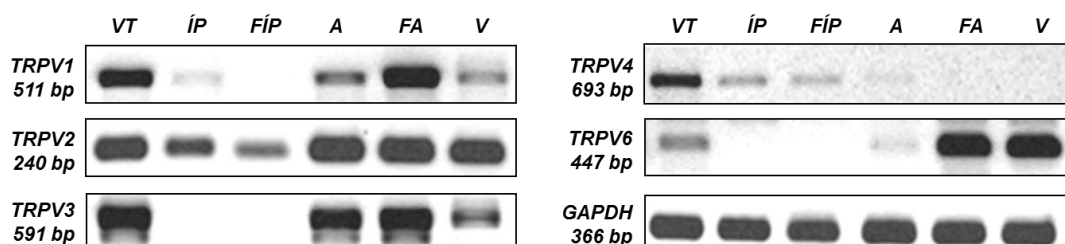
A vanilloid receptorok mRNS szinten történő megjelenését 7 tenyésztési napon keresztül követtük nyomon a primer mezenchimális HD kultúrákban. mRNS szinten TRPV1, 2, 3 és 4 receptorokat tudtuk detektálni. (6. ábra) A TRPV1 és 3 ioncsatonák mRNS mintázata hasonló, azaz a 2-4 tenyésztési napokon emelkedő majd csökkenő tendenciát mutat, mely hosszabb tenyésztési időintervallum során (9 nap) is megfigyelhető. A TRPV2 és 4 receptorok ettől, és egymástól is eltérő expressziós mintázattal jellemezhetőek, ahol a TRPV2 ioncsatorna mRNS expressziója a második tenyésztési naptól szinte konstans, míg a TRPV4 mRNS expressziója fokozatosan emelkedik. A TRPV6 ioncsatorna mRNS-ét nem tudtuk kimutatni, a TRPV5 vizsgálatához pedig a faj specifikus referencia szekvencia hiányában nem terveztünk primert. A szekvencia-összehasonlítási eljárások során tervezhető primer alkalmazását elvetettük a csirke TRPV szekvenciák változékonysága miatt. A későbbiekben azokra a vanilloid receptorokra helyeztük a hangsúlyt, melyek jelen vannak a kísérleti modellünkben, és a porcdifferenciáció szempontjából meghatározó második és harmadik tenyésztési napokon jellegzetes kifejeződési mintázatot mutatnak. Ilyen például az irodalmi adatok által alátámasztott, a kondrogenézisben fontos szerepet betöltő TRPV4, illetve az eddig porcsejtekkel kapcsolatban kevésbé vizsgált TRPV1 és a TRPV3. (6. ábra)



**6. ábra.** A TRPV receptorok mRNS expressziója csirke HD kultúrákban 7 tenyésztési napon keresztül nyomon követve. A TRPV1 és TRPV3 ioncsatorna csökkenő, míg a TRPV4 növekvő mRNS mintázatot mutat a tenyésztés során. (OD: optikai denzitás).

A receptorok mRNS kifejeződését különböző csirke szövetekben is megvizsgáltuk, melyeket úgy válogattuk össze, hogy olyan porcminákat tartalmazzon, ahol nyomon követhetjük a kérdéses ioncsatornák expressziós mintázatát. Porcosodó mintaként négy napos embrionális végtagtelepet választottunk. Mivel az újonnan kikelt állat ízületi porcára jelentős hatást gyakorolnak a legelső napokban jelen lévő mechanikai erők, ezért egy napos csirke ízületi porcát is felhasználtuk. Utolsó érettségi stádiumként egy fél éves kakas ízületi porcát izoláltuk, melyben az ízületi porcmátrix elrendeződése stabil, a kondrociták érett, lassú anyagcseréjű sejtekké differenciálódtak. A primerek ellenőrzésére idegrendszeri szövetmintákat (a megfelelő korú állatok agya) illetve a TRPV6 ioncsatorna pozitív kontrolljaként vesét alkalmaztunk. Az izolált mRNS mintákban történő egységes hígítását GAPDH primer alkalmazásával ellenőriztük. A kísérletek eredményét a 7. ábra mutatja be.

Az embrionális végtagtelep mind az öt általunk vizsgált TRPV receptort kifejezi (TRPV1-4 és TRPV6). A TRPV2 és TRPV4 ezen kívül megjelenik a fiatal állat és a felnőtt ízületi porcban is, ezzel szemben a TRPV1-et és TRPV3-at csak nagyon limitált mennyiségben tudtuk detektálni ízületi porcban. (7. ábra)

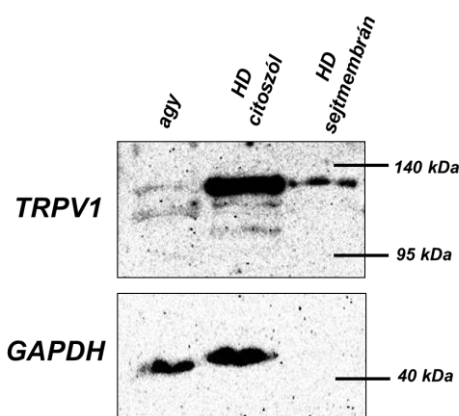


**7. ábra.** A TRPV receptorok kifejeződése szövetmintákon. A TRPV2 és TRPV4 mRNS detektálható az embrionális végtagtelepen, valamint fiatal és felnőtt állat ízületi porcán. A végtagtelep ezen kívül TRPV1, TRPV3 és TRPV6 csatornákat is kifejez, melyek azonban nem detektálhatók jelentős mennyiségben a fiatal és felnőtt ízületi porcban. Rövidítések: VT- végtagtelep, ÍP- 1 napos csibe ízületi porc, FÍP- felnőtt állat ízületi porc, A- 1 napos csibe agy, FA- felnőtt állat agy, V- vese.

A továbbiakban a kísérletek irányát szem előtt tartva magyarázatomat a TRPV1 receptorra szűkítem le. Látható, hogy a TRPV1 mRNS szinten jelen van a végtagkezdeményekben, de a felnőtt állat ízületi porcában nem tudtuk kimutatni. (7. ábra) Valószínűleg jóval alacsonyabb az expressziós szintje, illetve kimutatását a kemény porcszövet nehézkes feltárása is korlátozhatja. A primer HD kultúrában a hét tenyésztési nap folyamán expressziója íves lefutású és a porcfejlődés szempontjából meghatározó 2-3. tenyésztési napokon minimálisan ugyan, de erőteljesebb.

## 6.2. A TRPV1 fehérje szintű expressziója

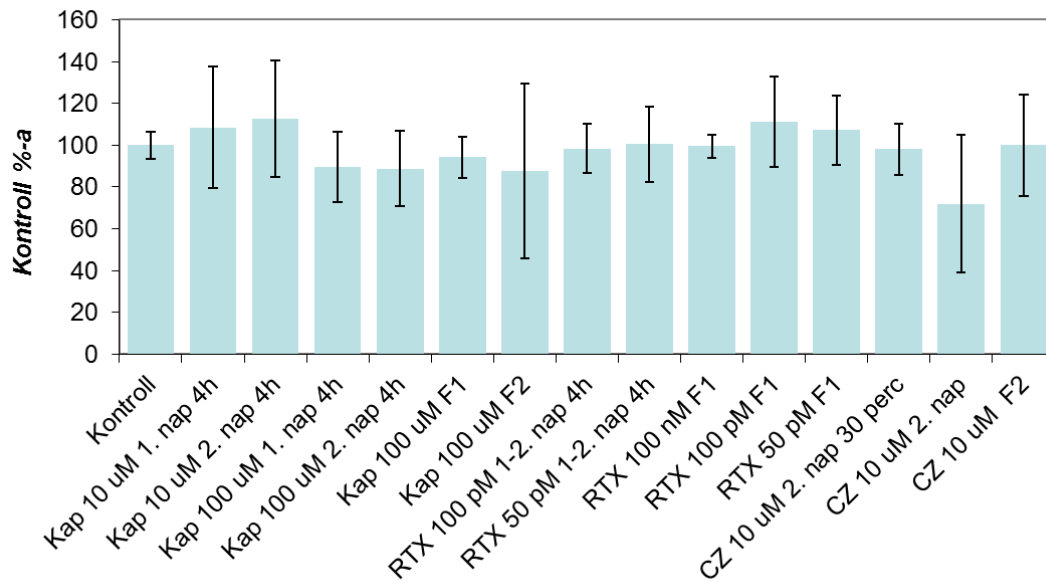
A TRPV1 fehérje expresszióját a tenyésztés harmadik napján western blot segítségével vizsgáltuk. Pozitív kontrollként csirke agyat használtunk. Látható, hogy a porcosodó sejtek citoszóljában nagy mennyiségben van jelen a TRPV1 fehérje, de a membránfrakcióban is jelen van a harmadik tenyésztési napon. Belső kontrollként GAPDH antitestet alkalmaztunk, mely nem jelent meg a membránfrakcióban, jelezve annak tisztaságát. (8. ábra)



**8. ábra.** A TRPV1 fehérje szintén történő kifejeződése high density kultúrákban a harmadik tenyésztési napon. A csirke TRPV1 a citoszólban és a sejtmembránban is detektálható. Belső kontrollként GAPDH-t alkalmaztunk.

## 6.3. A TRPV1 aktiválása és gátlása farmakológiai módszerekkel

Irodalmi adatok szerint a csirke érző neuronokban kifejeződő TRPV1 receptor nem reagál kapszaicinre és a hozzá hasonló vanilloid jellegű vegyületekre, eltérően az emlős TRPV1-től, mely az evolúció későbbi szakaszában vált érzékennyé ezekre a farmakonokra (Jordt és Julius 2002). Mivel az általunk alkalmazott modell nem idegrendszerből származik, eltérő szövet révén ezeken a kultúrákon mi is megvizsgáltuk a TRPV1 receptoron ható vanilloid - származékok hatását, különböző agonista (Kap, RTX), ill. antagonistá (CZ) reagenseket alkalmazva. A kezeléseket különböző koncentrációjú ágensekkel (10 és 100  $\mu$ M Kap, 50 és 100 pM RTX, 10  $\mu$ M CZ), különböző időpontokban és időtartamig végeztük. Hét nap tenyésztés után savas toluidinkék festék-visszaoldásával és abszorbancia mérést követően szemikvantitativ információt kaptunk a metakromázián festődő porcmátrix mennyiségéről. (9. ábra)



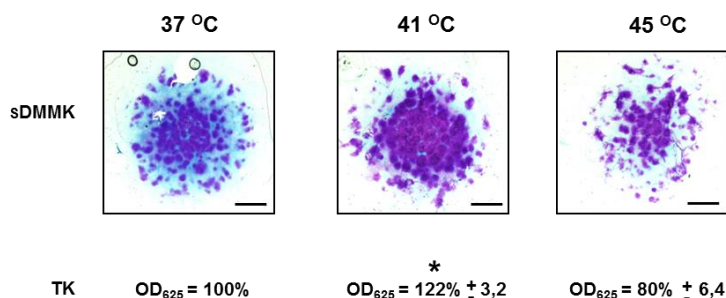
**9. ábra.** A TRPV1 farmakológiai aktiválása és gátlása. A kémiai anyagok alkalmazása nem idézett elő jelentős változást a termelt mátrix mennyiségében. 8 független kísérlet átlag eredménye. Rövidítések: Kap- kapszaicin, RTX- reziniferatoxin, CZ- kapszazepin, F1- első tenyésztési naptól folyamatos kezelés, F2- második tenyésztési naptól folyamatos kezelés.

Amint az ábrán is látható, a kísérletek nem hoztak konzekvens eredményt. Ennek oka valószínűleg az előbbieken említett evolúciós különbség a madarak és az emlősök TRPV1 receptorai között. Ezért kísérleteink folytatásához másfajta módszert voltunk kénytelenek alkalmazni a csatorna aktiválására.

#### 6.4 A hőkezelés hatása a kondrogenézis folyamataira

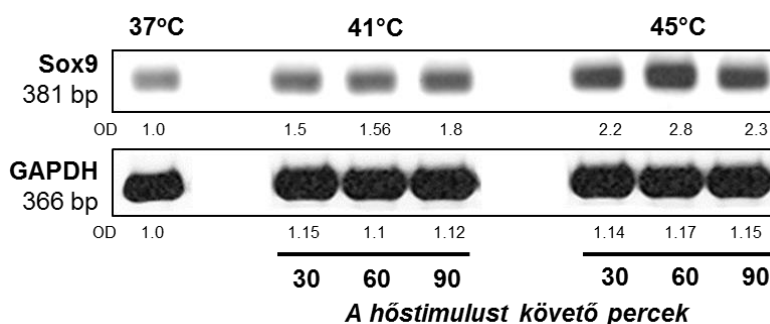
Mivel a csirke modell miatt nem tudunk megfelelő farmakológiai agonistát vagy antagonistát alkalmazni a TRPV1 receptoron, ezért aspecifikus aktivációval, hőstimulus alkalmazásával próbálkoztunk. A harmadik tenyésztési napon történő 30 perces hőstimulus után a porcmátrix detektálására a hatodik napon sDMMK festést és sTK festékvisszaoldást alkalmaztunk. Ezzel a módszerrel a kultúrákban csak a vörös metakromáziával festődő glükózaminoglikánban gazdag porcmátrix válik láthatóvá. (10. ábra) A TK festékvisszaoldás során kapott szemikvantitatív eredmények alapján a 41°C kezelés hozzávetőleg 20%-kal, szignifikánsan emelte, a 45°C-os hőstimulus pedig nem szignifikánsan ugyan, de csökkentette a metakromáziás területek mennyiségét a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A másik metakromáziás festés, a DMMK alkalmazásával is hasonló eredményeket kaptunk, a

megfestett kultúrákról készített egyazon kísérletsorozat reprezentatív fotói a 10. ábrán láthatóak.



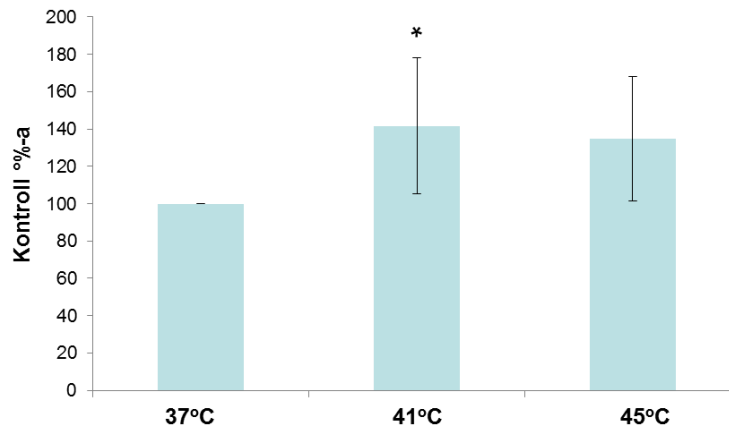
**10. ábra.** A harmadik tenyésztési napon a 30 perces hőkezelés hatását sDMMK festéssel és TK festékvisszaoldással monitorozzuk. Az ábrán látható képek egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatják be (2x). A toluidinkék festékvisszaoldással kapott százalékos érték 8 független kísérlet átlaga. Szignifikancia érték: \* $p < 0.05$ .

Ahogy a bevezetőben azt már jeleztük, a Sox9 a porcképződés egyik mestergénje, mely többek között a kondrociták által termelt mátrixalkotó fehérjék pozitív regulátora. Ezért a hőstimulusnak kitett kultúrákból a kezelést követően 30, 60 és 90 perccel RNS-t izoláltunk és RT-PCR-t végeztünk. A Sox9 mRNS expressziót a hőkezelést követően vizsgálva láthatjuk, hogy mind a 41°C-s, mind a 45°C-s kezelés fokozta azt. (11. ábra)



**11. ábra.** Sox9 mRNS expresszió. A harmadik tenyésztési napon történt 41 és 45°C-s hőkezelés után 30, 60 és 90 perccel begyűjtött mintákban megfigyelt Sox9 mRNS expresszió a 37°C-s kontrollhoz viszonyítva.

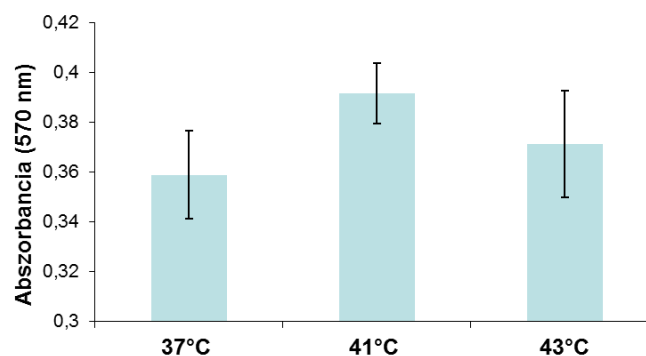
A sejtek osztódási rátáját  $^3\text{H}$ -timidin DNS-be történő beépülésének vizsgálatával figyeltük meg hőkezelés során. Ahogy a 12. ábrán is láthatjuk, az osztódóképesség a 3. tenyésztési napon alkalmazott 41°C-os hőstimulus hatására szignifikánsan nőtt, míg a 45°C-s stimulusnál nem változott szignifikánsan.



**12. ábra.** A hőkezelés hatásának vizsgálata a sejtek osztódóképességére. A 41°C-s csoportban a proliferációs képesség szignifikánsan növekszik a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az oszlopdiagram négy egymástól független kísérletsorozat átlaga. Szignifikancia szint:  $p < 0.05$ .

### 6.5. A hőkezelés sejtkárosító hatásának vizsgálata

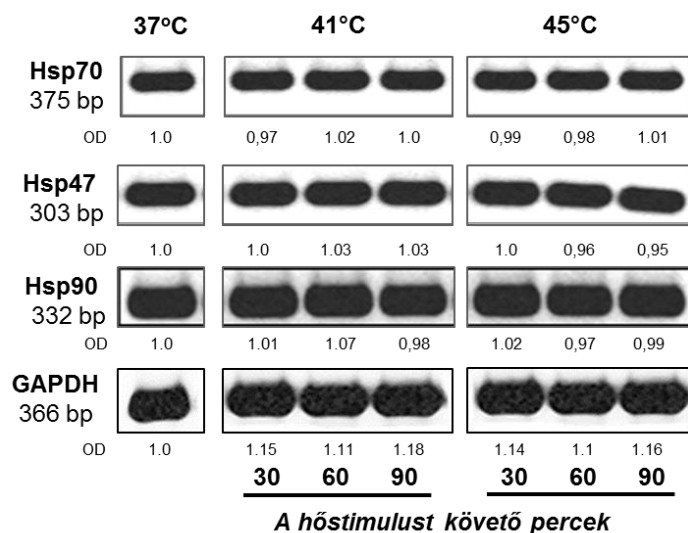
Az MTT kolorimetriás teszt felhasználható a sejtek mitokondriális aktivitásának és közvetve az életképesség vizsgálatára. Mivel felmerült, hogy az alkalmazott hőmérsékletek esetleg károsíthatják a sejteket és ennek köszönhető a 45°C-os hőkezelés után tapasztalható mátrixmennyiségben bekövetkezett csökkenés, elvégeztük az MTT tesztet az alkalmazott hőstimulusok után. A 13. ábráról leolvasható, hogy egyik hőmérsékleti tartományban sem változott meg szignifikánsan a porcosodó sejtek életképessége.



**13. ábra.** A 41 és 45°C-os hőkezelést követően a sejtek életképességének vizsgálata MTT teszt segítségével. Egyik hőmérséklet sem változtatta meg szignifikánsan a sejtek életképességét. A grafikon egy reprezentatív kísérlet eredménye.

Annak további kizárására, hogy az alkalmazott hőkezelés a sejtekre káros hatású, megvizsgáltuk az irodalom által porcsejtekben leírt, legfontosabb hősokkfehérjék, a Hsp47,

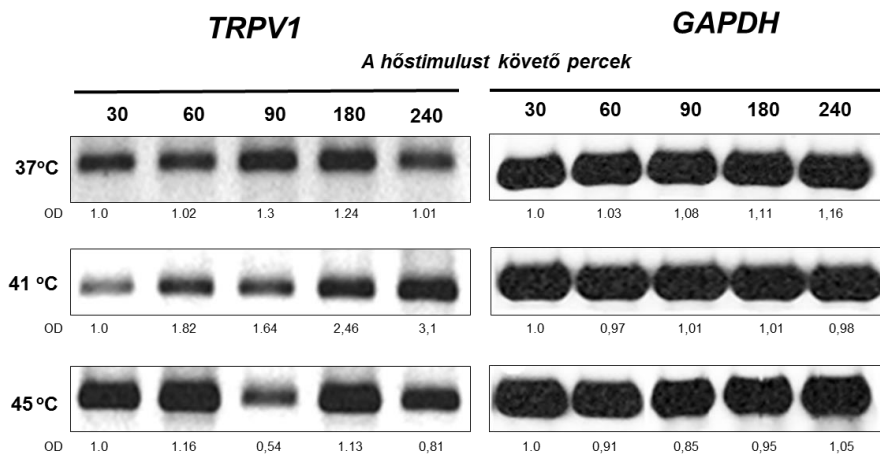
Hsp70 és Hsp90 mRNS expresszióját a hőkezelést követő 30, 60, 90 perccel. Eredményeink alapján látható, hogy egyik alkalmazott hőfok sem vonta maga után az ismertebb hősokkfehérjék mRNS szinten történő szignifikáns expresszió-változását (14. ábra).



**14. ábra.** A hőkezelés nem változtatja meg jelentősen a Hsp70, Hsp47 és Hsp90 mRNS expresszióját.

## 6.6. A hőstimulus hatása a TRPV1 mRNS expresszióra

Mivel feltételezéseink szerint a hőkezelés során hőérzékeny csatornák is működésbe lépnek, lehetséges, hogy a metakromáziás festés során tapasztalt változásokban szerepe lehet a termoszenzitív TRPV1 ioncsatornának. Ezért RT-PCR segítségével megvizsgáltuk a receptor mRNS expressziójának változását az alkalmazott hőstimulusok során. (15. ábra) A hőstimulusnak kitett sejteket ebben az esetben a kezelés befejezését követő 30., 60., 90., 180. és 240. percben izoláltuk. Látható, hogy a 41°C-s hőstimulust követően a TRPV1 mRNS mennyisége fokozatosan emelkedik, míg a 45°C-s kezelés hatására inkább kissé csökken a TRPV1 mRNS szint.



15. ábra. A hőkezelés hatása a TRPV1 mRNS expresszióra. A 41oC-s hőstimulus növelni, a 45 oC-s stimulus pedig csökkenteni látszik a TRPV1 mRNS mennyiségét.

## 7. Eredmények áttekintése

Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy kifejeződnek-e TRPV receptorok kondrogenikus sejteken, majd részletesebben foglalkozva a TRPV1 ioncsatornával megvizsgáltuk, hogyan jelenik meg ez a csatorna fehérje szinten és az aktív csatorna hogyan befolyásolhatja a porcképződést.

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint ingadozások fontos szerepet játszanak a kondrogenikus sejtek differenciációjában és az érett porcsejtek anyagcseréjében (Matta és mtsai. 2008). Számos membránreceptor és kationcsatorna is szerepet kaphat ezeknek a  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseknek a kialakulásában (Barrett-Jolley és mtsai., 2010). Ezek a csatornák segítenek folyamatos kapcsolatot fenntartani a kondrociták intracelluláris tere és környezetük változásai között.

Ahogy a bevezetőmben említettem, a kondrociták igen specializált körülmények között, alacsony oxigén szint és savas pH mellett is képesek túlélni (Otte, 1991, Lee és Urban, 1997). Az ízületi porcban a sejtek jelentős mechanikai erőknek vannak kitéve és az ízület mozgásai következtében a szinoviális folyadék hőmérséklete akár 40°C fölé is emelkedhet (June és Fyhrrie, 2010, Tepic és mtsai. 1985). Ha összevetjük ezeket a sajátosságokat a részlegesen  $\text{Ca}^{2+}$  szelektív TRPV ioncsatornák aktivációját és szenzitizációját létrehozó tényezőkkel (hő, savas pH, ozmotikus változások stb.) olyan hasonlóságokat vehetünk észre, melyek felvetik a TRPV receptoroknak a porcsejtek életműködésében betöltött szerepét.

Korábbi kísérletek során Gavenis és munkatársai a TRP család 12 tagját mutatták ki mRNS szinten oszteoartritiszes betegek porcmináiból (Gavenis és mtsai., 2008), míg Hdud és munkacsoportja a TRPV4, TRPV5 és TRPV6 fehérje szinten történő megjelenését írták le érett porcsejteken (Hdud és mtsai., 2012). Mindezek mellett ismert a TRPV4-nek a SOX9 regulációján keresztül a porcfejlődésben betöltött szerepe (Rock és mtsai., 2008). Ezek az irodalmi leírások azonban nem adnak kielégítő leírást a TRPV-k jelenlétéről, és lehetséges szerepéről porcsejtekben.

Nem rendelkezünk részletes, átfogó képpel arról sem, hogy a porc irányba differenciálódó mezenchimális sejtek vajon kifejeznek-e TRPV receptorokat, és ha igen, akkor a molekulacsalád tagjai milyen funkcióval bírnak a porcosodás folyamán.

Vizsgálataink során először a TRPV ioncsatorna család mRNS szinten történő megjelenését vizsgáltuk eltérő életkorú csirke szövetmintákon és porcosodó HD kultúrákban. Az embrionális végtagtelepben jól detektálható a TRPV1, 2, 3, 4 és 6, míg a fiatal ízületi porcban expressziójuk kevésbé kifejezett, érett ízületi porcban pedig csak a TRPV2-t és

TRPV4-et tudtuk alacsony szinten kimutatni. A disztális végtagtelepben megjelenő TRPV receptorok nagy számára, majd későbbiekben ennek lecsökkenésére többféle magyarázat lehetséges. Egyik ezek közül, hogy az *in vivo* kondrogenikus differenciáció befejeződésével a TRPV1, TRPV3 ioncsatornák szerepe elhanyagolható (esetleg csak patológiás körülmények között expresszálódnak erőteljesebben) (Szabó és mtsai. 2005), és mint osmosensorok csak a TRPV2 és 4 receptorok szükségesek az érett porcszövetben (Liedtke, 2006, Sato és mtsai. 2013). Azonban számolnunk kell azzal a ténnyel is, hogy a szövet izolálása során egyéb szöveti törmelék (izomrostok, csont és csontvelő, inak) is bekerült a rendszerbe, valamint az a lehetőség is fennáll, hogy a kemény szövetből történő mRNS izolálás nem volt megfelelő hatékonyságú (Ruetttger és mtsai. 2010).

Az *in vitro* kondrogenikus modell alkalmazása lehetőséget nyújt az imént felvetett kérdések megválaszolására. A HD kultúrákban szintén megfigyelhető a TRPV1, 2, 3 és 4 mRNS jelenléte, a TRPV1 és TRPV3 kifejeződése a tenyésztési napok előrehaladtával csökken, szemben a TRPV2 és TRPV4 ioncsatornákkal. Ezek az eredmények megerősíthetik azt az elgondolást, mely szerint a TRPV 1 és 3 ioncsatornák szerepe lecsökken a differenciáció befejeződésével. Azonban itt is számolnunk kell a csirke HD kultúra heterogenitásával, azaz ezek a kultúrák kis mennyiségben ugyan, de tartalmazznak fibroblasztokat és mioblaszt irányba differenciálódó sejteket is. Fontos szem előtt tartanunk azt is, hogy az mRNS expressziós analíziseket reverz transzkripció PCR technikával végeztük, mely csak óvatos kvantitatív következtetésekre ad lehetőséget. Az azonban elmondható, hogy mind az *in vitro*, mind az *in vivo* differenciálódó porcszövetben mRNS szinten kifejeződik négyféle TRPV ioncsatorna, és feltételezhetőleg a TRPV1 és 3 receptorok expressziója lecsökken, a TRPV4 ioncsatornáé pedig fokozódik a kondrogenézis során.

Vizsgálataink fő tárgya, a TRPV1 íves lefutású mRNS expressziós mintázatot mutat, melynek csúcsa a 2.-3. tenyésztési napra esik. Ez azért jelentős, mert ezeken a napokon történik a kondrogenikus sejtek porc irányú differenciációja, a sejtek lekerekedése és a sejtmigráció csökkenése (Bobick és mtsai. 2009). Osteoartritiszes betegből származó ízületi porcban már leírták a TRPV1 ioncsatorna expresszióját (Gavenis és mtsai. 2009), azonban ez az első alkalom, hogy mind a citoszólban, mind a plazmamembránban kimutattuk a kérdéses fehérjét a kondrogenikus differenciáció során.

Továbbiakban a TRPV1 modulációjának hatását figyeltük a porcképződésre. A szakirodalom leírja, hogy a csirke TRPV1 ioncsatorna aktiválása kapszaicinnal és hasonló szerkezetű vegyületekkel nem hoz létre intracelluláris kalciumszint-változásokat érző

neuronokban (Jordt and Julius 2002). Érdekes azonban, hogy bizonyos szövetekben/szövetekben eltérő TRPV1 splice variánsok vannak jelen, melyek befolyásolhatják a csatorna érzékenységét és aktivitását (Tian és mtsai 2006, Schumacher és Eilers 2010). Valamint Toshio Ohta munkacsoportja az evolúciós törzsfán jóval távolabb elhelyezkedő *Xenopus tropicalis*-ből származó TRPV1 receptornak vizsgálta a hő-, sav- és kapszaicin érzékenységét, és habár extrém magas koncentrációjú kapszaicin kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció-változásokat, a csatorna szenzitivitása messze elmaradt az emlős orthológétól (Ohkita és mtsai. 2012). A szöveti eltérés miatt tehát megvizsgáltuk a porcosodó kultúrák kapszaicin érzékenységét és a kezelés hatását a kondrogenézis folyamataira. Ehhez a kondrogenézis monitorozására elfogadott metakromáziás toluidinkék festést alkalmaztunk, valamint későbbiekben intracelluláris kalciumméréseket is végeztünk (nem publikált adatok). Vizsgálataink szerint a csirke TRPV1 ioncsatorna a porcsejteken sem reagál kapszaicinre és a hozzá hasonló szerkezetű vegyületekre, ezért kísérleteink során aspecifikus módon, hőstimulussal próbáltuk aktiválni a csatornát. A harmadik tenyésztési napon alkalmazott harminc perces hőkezeléseket követően a hatodik tenyésztési napon sDMMK és sTK festések segítségével megfigyeltük, hogy a 41°C-s stimulus szignifikánsan emelte, míg a 45°C-s csökkentette a metakromatikusan festődő ECM mennyiségét. Ez a módszer közvetve tájékoztat minket a porcképződés mértékéről, hiszen az ECM alkotóelemeit kivétel nélkül porcsejtek termelik. Ezzel összhangban van azon eredményünk, hogy a hőkezelés hatására emelkedett a SOX9 kondrogenikus marker mRNS expressziója a kontrolhoz viszonyítva. Igaz, az emelkedést mind a 41°C-val, mind a 45°C-val kezelt csoportban megfigyelhettük, melynek magyarázatára további vizsgálatok folynak.

A hőkezelés esetleg a sejtszám növelésén keresztül is fokozhatja a porcképződést, melynek igazolására <sup>3</sup>H-timidin inkorporációs kísérletet végeztünk. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy a 41°C-kal kezelt csoportban szignifikánsan nőtt a sejtek osztódóképessége, míg a 45°C-s csoportban enyhe csökkenés figyelhető meg, tehát a PG tartalmú mátrix mennyiség emelkedés részben vagy teljesen lehet a fokozott sejtosztódás eredménye. Az alkalmazott hőmérsékletek nem károsították a sejteket, hiszen azok mitokondriális aktivitása nem mutatott jelentős eltérést.

Hőstimulus alkalmazása során számos hősokk fehérje expressziós szintje megemelkedik, bizonyos hősokkfehérjék pozitív hatással bírnak a kondrogenézis folyamataira (Masago és mtsai. 2012). Egy 2014-es tanulmány szerint a periodikus hősokk pozitívan befolyásolja a mezenchimális sejtek kondrogenikus irányba történő differenciációját (Chen és

mtsai. 2014, Nam és mtsai. 2014). A mi esetünkben a legfontosabb hősök fehérjék mRNS szintű expressziós mintázata azonban nem változott.

Mivel a hőstimulus egy nem specifikus inger, természetesen összetett hatást gyakorol a sejtekre, ezért is alkalmaztuk az imént említett proliferációs és életképesség vizsgálatokat. Hogy megerősítsük azon elképzelésünket, miszerint a TRPV1 ioncsatorna jelen van, aktiválható a HD kultúrákban és szerepe lehet a 41°C-os csoportnál tapasztalt sejtproliferáció fokozódásban, valamint a metakromáziás mátrix mennyiségének növekedésében, megvizsgáltuk a csatorna mRNS expressziós mintázatát a hőkezelést követően. Megfigyeléseink szerint a 41°C-s stimulust követően fokozódik a TRPV1 mRNS expresszió, míg a 45°C-kal kezelt csoportban hirtelen emelkedést követően inkább egy csökkenő tendencia jelenik meg, mely feltételezhetően kompenzatórikus lépésként van jelen, azaz a sejtek csökkentik a receptor expresszióját a „túlingerlés” elkerülésére.

Ismert tény, hogy a madarak testhőmérséklete magasabb az emlősökénél, ez az érték fejlődő csirke embrió esetében azonos a tojáshéj és a keltető hőmérsékletével, amely a mi rendszerünkben 39°C-ra van beállítva (ezt a keltetési hőmérsékletet a NAGISZ Zrt derecskei keltető telepén kapott információ alapján választottuk). Szerettük volna kizárni azt, hogy a keltetés során alkalmazott 39°C-os hőmérséklet (vagy esetlegesen a madarakra jellemző magasabb testhőmérséklet) befolyásolja eredményeinket, 39°C-n is elvégeztük a kísérleteket, azonban nem tapasztaltunk eltérést a 37°C-on tartott kontroll (sejttenyésztő inkubátorban tartott) csoporthoz viszonyítva. Több közlemény is leírja a TRPV1 receptor eltérő aktivációs tulajdonságokkal rendelkező, egyes állatfajokban megjelenő splice- variánsait (Gracheva és mtsai., 2011). Mivel nem ismert, hogy csirke porcsejtekben a TRPV1 mely aktivációs küszöbű változata fejeződik ki, ezért az emlősök esetében aktivációs küszöbnek tekintett 43°C-on is végeztünk hőkezelést. Az eredményeket vizsgálva nem találtunk lényeges eltérést a két hőmérséklet között, így későbbiekben csak a 41°C-os stimulust alkalmaztuk.

A nem szelektív kationcsatornaként funkcionáló TRPV1 csatorna aktivációja emeli az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintet, melynek következménye lehet a sejtek fokozott proliferációja, de ha ez a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás túlzott mértékű, akár káros hatással is bírhat,  $\text{Ca}^{2+}$  indukálta sejthalált létrehozva (Stock és mtsai, 2012). Ennek ellenőrzésére intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint méréseket végzünk, melyek jelenleg is folyamatban vannak.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy sikerült megfigyelnünk négy vanilloid receptor jelenlétét mRNS szinten kondrogenikus kultúrákban. Továbbá kimutattuk a TRPV1 receptort mRNS és fehérje szinten porcosodó sejteken. A 41°C-os hőkezelés során a metakromáziás

mátrix mennyiségében tapasztalt fokozódás mögött feltételezhetőleg az emelkedett osztódási ráta áll. A kultúrákban emelkedett a TRPV1 csatorna mRNS expresszió, fokozódott a glükózamino-glikánokban gazdag ECM mennyisége és megemelkedett a SOX9 mRNS expressziója. Ezek alapján felmerül, hogy a TRPV1 ioncsatorna mRNS expresszió fokozódása kapcsolatban van a proliferáció és így a porcfejlődés szabályozásával. Ezt alátámasztja az a tény, hogy a HD kultúrákban a TRPV1 mRNS expresszió a porcfejlődés szempontjából legjelentősebb 2. és 3. tenyésztési napokon a legkifejezettebb.

Eredményeink természetesen további kísérletek elvégzését indokolják. Tervezzük a TRPV receptorcsalád tagjainak tömegspektrometriás kimutatását valamint a már említett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint mérések elvégzését. Reményeink szerint a további mérésekkel a TRPV csatornák jelenlétét, működését és funkcióját sokkal direkter módon tudjuk majd igazolni.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek *Dr. Zákány Rózának* és *Somogyi Csillának* a vizsgálatok során nyújtott segítségért, a hasznos tanácsokért. Szeretném megköszönni *laborunk minden tagjának* a számtalan elméleti-gyakorlati segítséget, melyet munkám során kaptam. Külön köszönöm *Bíróné Barna Krisztának* azt a rengeteg türelmet biztatást és jókedvet, mellyel bevezetett a labormunka rejtelmeibe. Köszönetet mondok *Dr. Antal Miklósnak*, intézetünk vezetőjének, aki hozzájárulását adta ahhoz, hogy az Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézetben dolgozzak. Végezetül szeretném megköszönni *családomnak* szeretetüket és támogatásukat, mellyel mindig átsegítették a nehezebb pillanatokon.

A kutatás a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Ahern GP, Wang X, Miyares RL (2006) Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem.* 281(13):8991-5.
2. Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, Hikita I, Suzuki M, Oshima I, Tsukahara K, Arimura A, Horikawa T, Hirasawa T, Sakata T (2006) Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol.* 126(12):2664-72.
3. Barrett-Jolley R, Lewis R, Fallman R, Mobasher A. (2010) The emerging chondrocyte channelome. *Front Physiol.*;1:135.
4. Basu S, Srivastava P (2005) Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *PNAS* vol. 102 no. 14 5120–5125.
5. Bobick BE, Chen FH, Le AM, Tuan RS (2009) Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 87(4):351-71.
6. Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R. (2006) A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels. *The Journal of Neuroscience*, 26(18):4835– 4840.
7. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 23;389(6653):816-24.
8. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 1;398(6726):436-41.
9. Caterina MJ, Julius D (2001) The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annu. Rev. Neurosci* 24:487–517.
10. Chen J, Li C, Wang S. (2014) Periodic heat shock accelerated the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *PLoS One.* 14;9(3):e91561.
11. Ferrer-Montiel A, García-Martínez C, Morenilla-Palao C, García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Planells-Cases R. (2004) Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 71(10):1820-6
12. Fodor J., Matta C, Juhász T, Oláh T, Gönczi M, Szigyártó Z, Gergely P, Csernoch L, Zákány R. (2009) Ionotropic purinergic receptor P2X4 is involved in the regulation of chondrogenesis in chicken micromass cell cultures. *Cell Calcium.* 45(5):421-30.
13. García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sánchez E, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci.* 9;24(23):5307-14.

14. Gavenis K, Schumacher C, Schneider U, Eisfeld J, Mollenhauer J, Schmidt-Rohlfing B (2009) Expression of ion channels of the TRP family in articular chondrocytes from osteoarthritic patients: changes between native and in vitro propagated chondrocytes. *Mol Cell Biochem* 321:135–143.
15. Gracheva EO, Cordero-Morales JF, González-Carcacia JA, Ingolia NT, Manno C, Aranguren CI, Weissman JS, Julius D (2011) Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats. *Nature*. 3;476(7358):88-91.
16. Goswami C, Hucho TB, Hucho F. (2007) Identification and characterisation of novel tubulin-binding motifs located within the C-terminus of TRPV1. *Journal of Neurochemistry* 101, 250–262.
17. Hadházy C, Lázló MB, Kostenszky KS. (1982) Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds. *Acta Morphol Acad Sci Hung.* ;30(1):65-78.
18. Hamburger V, Hamilton HL, (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88(1):49-92.
19. Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB. (2000) Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*. 88(2):205-15.
20. Hdud IM, El-Shafei AA, Loughna P, Barrett-Jolley R, Mobasheri A. (2012) Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) Channels in Different Passages of Articular Chondrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4433-4445.
21. Huang CL. (2004) The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol*. 15(7):1690-9.
22. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. (2012) Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*. 16;338(6109):917-21.
23. Hwang SW<sup>1</sup>, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):6155-60.
24. Jin X, Morsy N, Winston J, Pasricha PJ, Garrett K, Akbarali HI. (2004) Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C558–C563.
25. Jordt SE, Tominaga M, Julius D (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *PNAS* vol. 97 no. 14 8134–8139.
26. Jordt SE, Julius D (2002) Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to “Hot” Chili Peppers. *Cell*, Vol. 108, 421–430.

27. 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. (2014) Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal*. 26(3):468-82.
28. June RK1, Fyhrie DP. (2010) Temperature effects in articular cartilage biomechanics. *J Exp Biol*. 213(Pt 22):3934-40
29. Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U (2004) Phosphorylation of Vanilloid Receptor 1 by  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin dependent Kinase II Regulates Its Vanilloid Binding. *J Biol Chem*. 279(8):7048-54.
30. Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I. (1999) Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol*. 1(3):165-70.
31. Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pásztor ET, Erdei N, Czikora A, Papp Z, Edes I, Pórszász R, Tóth A. (2008) Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol*. 73(5):1405-12.
32. Lee RB, Urban JP. (1997) Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J*. 1;321 ( Pt 1):95-102.
33. Liedtke W. (2006) Transient receptor potential vanilloid channels functioning in transduction of osmotic stimuli. *J Endocrinol* 191(3):515-23.
34. Lilja J, Laulund F, Forsby A (2007) Insulin and insulin-like growth factor type-I up-regulate the vanilloid receptor-1 (TRPV1) in stably TRPV1-expressing SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*. 15;85(7):1413-9.
35. Lilja J, Lundqvist J, Forsby A. (2009) TRPV1 expression and activity during retinoic acid-induced neuronal differentiation. *Neurochem Int*. 55(8):768-74.
36. Lyall V, Heck GL, Vinnikova AK, Ghosh S, Phan TH, Alam RI, Russell OF, Malik SA, Bigbee JW, DeSimone JA. (2004) The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J Physiol*. 558(Pt 1): 147–159.
37. Masago Y, Hosoya A, Kawasaki K, Kawano S, Nasu A, Toguchida J, Fujita K, Nakamura H, Kondoh G, Nagata K. (2012) The molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J Cell Sci*. 1;125(Pt 5):1118-28.
38. Matta C, Fodor J, Szígyártó Z, Juhász T, Gergely P, Csernoch L, Zákány R. (2008) Cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium*. 44(3):310-23.

39. McCleverty CJ, Koesema E, Patapoutian A, Lesley SA, Kreusch A. (2006) Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain. *Protein Sci.* 15(9):2201-6.
40. Muraki K, Shigekawa M, Imaizumi Y. (2007) A New Insight into the Function of TRPV2 in Circulatory Organs. In: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 28.
41. 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. (2007) Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *J Biol Chem.* 282(44):32158-67.
42. Nam KW, Seo DY, Kim MH. (2014) Pulsed and Continuous Ultrasound Increase Chondrogenesis through the Increase of Heat Shock Protein 70 Expression in Rat Articular Cartilage. *J Phys Ther Sci.* 26(5):647-50.
43. Nowlan NC, Sharpe J, Roddy KA, Prendergast PJ, Murphy P., (2010) Mechanobiology of embryonic skeletal development: Insights from animal models. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90(3):203-13.
44. Ohkita M, Saito S, Imagawa T, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. (2012) Molecular cloning and functional characterization of *Xenopus tropicalis* frog transient receptor potential vanilloid 1 reveal its functional evolution for heat, acid, and capsaicin sensitivities in terrestrial vertebrates. *J Biol Chem.* 287(4):2388-97.
45. Oldershaw RA. (2012) Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *Int J Exp Pathol.* 93(6):389-400.
46. Otte P. (1991) Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol.* Sep-Oct;50(5):304-12.
47. Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. (1999) Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem.* 274(32):22739-46.
48. Phan MN, Leddy HA, Votta BJ, Kumar S, Levy DS, Lipshutz DB, Lee SH, Liedtke W, Guilak F. (2009) Functional characterization of TRPV4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 60(10):3028-37.
49. Premkumar LS, Ahern (2000) Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *GP Nature.* 28;408(6815):985-90.
50. Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M (2002) PKA/AKAP/VR-1 Module: A Common Link of Gs-Mediated Signaling to Thermal Hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 22(11):4740–4745.
51. Ristoiu V, Shibasaki K, Uchida K, Zhou Y, Ton BH, Flonta ML, Tominaga M. (2011) Hypoxia-induced sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 involves activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and PKC. *Pain* 152(4):936-45.

52. 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 (2008) Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat Genet.* 40(8):999-1003.
53. Röhlich P. (2006): Szövektan Semmelweis Kiadó.
54. Ruettger A, Neumann S, Wiederanders B, Huber R. (2010) Comparison of different methods for preparation and characterization of total RNA from cartilage samples to uncover osteoarthritis in vivo. *BMC Res Notes* 18;3:7.
55. Rutter AR, Ma QP, Leveridge M, Bonnert TP. (2005) Heteromerization and colocalization of TrpV1 and TrpV2 in mammalian cell lines and rat dorsal root ganglia. *Neuroreport* 7;16(16):1735-9.
56. Sadler, T. W. (2008) Langman Orvosi Embriológia. 10. kiadás.
57. Salazar H, Jara-Oseguera A, Hernández-García E, Llorente I, Arias-Olguín II, Soriano-García M, Islas LD, Rosenbaum T. (2009) Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nat Struct Mol Biol*16(7):704-10.
58. Sandell LJ, Adler P. (1999) Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci.* 15;4:D731-42.
59. Sato M, Sobhan U, Tsumura M, Kuroda H, Soya M, Masamura A, Nishiyama A, Katakura A, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y. (2013) Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates transient receptor potential vanilloid channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. *J Endod*, 39(6):779-87.
60. Schumacher MA, Eilers H, (2010) TRPV1 splice variants: structure and function. *Front Biosci* 1;15:872-82.
61. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature.* 11;418(6894):186-90.
62. Steinhoff M, Bíró T. (2009) A TR(I)P to pruritus research: role of TRPV3 in inflammation and itch. *J Invest Dermatol.* 129(3):531-5.
63. Stock K, Kumar J, Synowitz M, Petrosino S, Imperatore R, Smith ES, Wend P, Purfürst B, Nuber UA, Gurok U, Matyash V, Wälzlein JH, Chirasani SR, Dittmar G, Cravatt BF, Momma S, Lewin GR, Ligresti A, De Petrocellis L, Cristino L, Di Marzo V, Kettenmann H, Glass R. (2012) Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nat Med.* 18(8):1232-8

64. Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol.* 2(10):695-702.
65. Sudbury JR, Ciura S, Sharif-Naeini R, Bourque CW. (2010) Osmotic and thermal control of magnocellular neurosecretory neurons – role of an N-terminal variant of trpv1. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 32, pp. 2022–2030.
66. Szabó A, Helyes Z, Sándor K, Bite A, Pintér E, Németh J, Bánvölgyi A, Bölskei K, Elekes K, Szolcsányi J (2005) Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 314(1):111-9.
67. Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A, JOO F. (1975) Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* ;287(2):157-69.
68. Szolcsanyi J, Szallasi A, Szallasi Z, Joo F, Blumberg PM. (1990) Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 255(2):923-8.
69. Tepic S, Macirowski T, Mann RW. (1985) Experimental temperature rise in human hip joint in vitro in simulated walking. *J Orthop Res.* 3(4):516-20.
70. Thoms BL, Dudek KA, Lafont JE, Murphy CL. (2013) Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 65(5):1302-12.
71. Tian W, Fu Y, Wang DH, Cohen DM. (2006) Regulation of TRPV1 by a novel renally expressed rat TRPV1 splice variant. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290(1):F117-26.
72. Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M, Matera M, Geppetti P, Bianchi A (2001) Anandamide Excites Central Terminals of Dorsal Root Ganglion Neurons via Vanilloid Receptor-1 Activation. *J Neurosci.* 21(4):1104-9.
73. Uchida K és Tominaga M (2011) The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocrine Journal*, 58 (12), 1021-1028.
74. Urban L, White JP, Nagy I. (2011) Molecular structure of transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel (TRPV1). *Curr Pharm Biotechnol* 1;12(1):115-21.
75. Valdes AM, De Wilde G, Doherty SA, Lories RJ, Vaughn FL, Laslett LL, Maciewicz RA, Soni A, Hart DJ, Zhang W, Muir KR, Dennison EM, Wheeler M, Leaverton P, Cooper C, Spector TD, Cicuttini FM, Chapman V, Jones G, Arden NK, Doherty M. (2011) The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 70(9):1556-61.
76. Varga Z., Juhász T, Matta C, Fodor J, Katona É, Bartok A, Oláh T, Sebe A, Csernoch L, Panyi G, Zákány R. (2011) Switch of voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in the

plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ -oscillations and cartilage formation. *PLoS One.* ;6(11):e27957.

77. Vennekens R, Owsianik G, Nilius B. (2008) Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr Pharm Des.* 14(1):18-31
78. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature.* 430(7001):748-54.
79. Vriens J, Appendino G, Nilius B. (2009) Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 5(6):1262-79
80. Vyklický L, Nováková-Tousová K, Benedikt J, Samad A, Touska F, Vlachová V. (2008) Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res.* 57 Suppl 3:S59-68.
81. Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stüwe L, Mally S, Fabian A, Frippiat C, Nilius B, Schwab A. (2007) A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium.* 42(1):17-25.
82. Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, Analbelsi T, Singhrao SK, Dowthwaite GP, Jones RE, Baird DM, Lewis H, Roberts S, Shaw HM, Dudhia J, Fairclough J, Briggs T, Archer CW. (2010) Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One* 14;5(10):e13246.
83. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V. (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem.* 1;276(22):19461-8.
84. Woolf AD, Pfleger B. (2003) Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 81(9):646-56.
85. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE. (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature.* 11;418(6894):181-6. Epub 2002 Jun 23.
86. Zsombok A. (2013) Vanilloid receptors--do they have a role in whole body metabolism? Evidence from TRPV1. *J Diabetes Complications.* (3):287-92.

## 10. Függelék

### Önállóan végzett munkák

- primer HD kultúrák tenyésztése
- kultúrák kezelése (Kap, RTX, CZ)
- savas dimetil-metilénkék festés
- savas toluidinkék festékvisszaoldás
- RT-PCR
- mitokondriális aktivitásmérések
- RNS koncentráció meghatározása
- fénymikroszkópos vizsgálatok és dokumentálás
- RNS izolálás

### Felügyelet mellett végzett munkák:

- osztódóképesség vizsgálata
- Western blot