

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

Виолета Стефанова Димитрова

**Изследване на сигнални пътища в
клетъчни култури, изолирани от
нормална, човешка, апикална папила.**

Дисертационен труд за присъждане на научна и
образователна степен „доктор“

4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление 4.3. Биологически науки
Докторска програма БИОХИМИЯ

Научен ръководител:

Акад. Проф. Д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

Научен консултант: Гл. Ас. Антония Руменова Исаева, дб

София, 2019 г.

Съдържание:

<u>Използвани съкращения</u>	4
I. Въведение	5
II. Литературен обзор	6
III. Цел и задачи	23
IV. Материали и Методи	24
IV.1. Материали:	24
IV. 2. Методи	26
IV. 2. 1. Ензимно-протеолитично изолиране на първични клетки от дентална човешка апикална папила от трети молар.	26
IV. 2. 2. In vitro култивиране и пасажирване на изолираните първични клетки от дентална папила.	27
IV.2. 3. Магнитно сепариране: Магнитно белязване на клетките за магнитно-активирано клетъчно разделяне (Magnetic labeling of cells for magnetic-activated cell sorting (MACS).	27
IV 2. 4. BrdU белязване на хетерогенни и фенотипно специфични (хомогенни) култури от апикална папила:	29
IV 2. 5 si RNA медирано-заглушаване на каталитичната α и некаталитичната β субединица СК2 в хетерогенни и хомогенни популации.	29
IV 2. 6 Третиране с рекомбинантен, човешки растежен фактор BMP4	30
IV 2. 7. Имунофлуоресцентно оцветяване и микроскопия на	30
IV 2. 7.1. живи P1 хетерогенни култури	30
IV 2. 7. 2. фиксирани клетки и Xylenolorangемаркирани	30
IV 2. 7.3. пермебеализирани клетки	31
IV 2. 8. Визуализиране на мултифлуоресцентните изображения	31
IV.2. 9. Обработка на мултифлуоресцентните изображения и количественият анализ чрез алгоритъм.	32
IV 2. 10. Статистически анализи.	32
V. Резултати:	32
V. 1. 1. Изследване на хетерогенния състав на P1 клетки от апикална папила за присъствието на CD44, CD117, CD105 и STRO-1 експресиращи маркери – клетки	32
V. 1.2. Изследване на вътреклетъчната локализация на цитоскелетният белтък Vimentin в клетки, експресиращи и неекспресиращи маркерите CD105 и STRO-1.	36

V. 1. 3. Определяне числеността на фенотипно специфичните субпопулации в хетерогенния състав на P1 клетки от апикална папила.	37
V. 2. 1. Изследване на инкорпорирането на BrdU в хетерогенния състав на последващи пасажни клетки от апикална папила.	39
V. 2. 2. Изследване числеността на фенотипно специфичните субпопулации в последователни пасажни.	40
V. 2. 3. Изследване на експресията и функционирането на PKC α и ERK1,2 в клетъчни култури от апикална папила.	42
V.3.1. Изследване на експресията и активността на PKC α при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица(β) в клетки от апикална папила.	47
V. 3. 2. Изследване на експресията и активността на ERK1,2 при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) и при si RNA - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица (β) в клетки от апикална папила.	51
V. 3. 3. Инкорпориране на BrdU в условия при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при si RNA-медирано заглушаване на некаталитичната (β) субединица.	54
V. 4 .1. Изследване на фенотиповете от апикална папила за клетъчно повърхностната експресия на BMPRIa и BMPRII и за вътреклетъчната експресия на транскрипционния фактор RUNX2 и OSTERIX.	56
V. 4 .2. Изследване на BMP4-индуцираният ефект върху пролиферативната активност на хетерогенния състав от апикална папила.	58
V. 4 .3. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC α и ERK1,2.	61
V. 4 .4. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и вътреклетъчната локализация на транскрипционния фактор Osterix в клетъчни култури от апикална папила.	65
V. 4. 5. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху клетъчно повърхностната експресията на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс.	68
V. 5. 1. Изследване на ролята на (α) и (β) субединици на протеин киназа CK2 за трансдуцирането на BMP4-антипролиферативен ефект.	71
V. 5. 2. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC и ERK1,2.	79

<i>V. 5. 3. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 на BMP4 индуцираният ефект върху експресията на транскрипционния фактор OSTERIX.....</i>	<i>95</i>
<i>V. 5. 4. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуарния матрикс.</i>	<i>100</i>
<i>VI. Дискусия</i>	<i>110</i>
<i>VII. Изводи</i>	<i>122</i>
<i>VIII. Приноси:</i>	<i>123</i>
<i>IX. Публикации и участия в научни форуми и проекти, свързани с дисертационния труд</i>	<i>124</i>
<i>X. Библиография</i>	<i>124</i>

Използвани съкращения:

MSCs - мезенхимни стволови клетки

SCAP – стволови клетки от апикална папила

BMP4 – Bone morphogenic proteins

BSP2 – костен – сиало протеин

(Runx2) Runt-related transcription factor 2

(Dlx5) Distal-less homeobox 5

(Osx) Osterix

(PDGF)тромбоцитен растежен фактор

(EGF) епидермален растежен фактор)

(IGF-1) инсулиноподобен растежен фактор-1

СК2 – протеин киназа 2

ERK1, 2 - the extracellular signal-regulated kinase ½

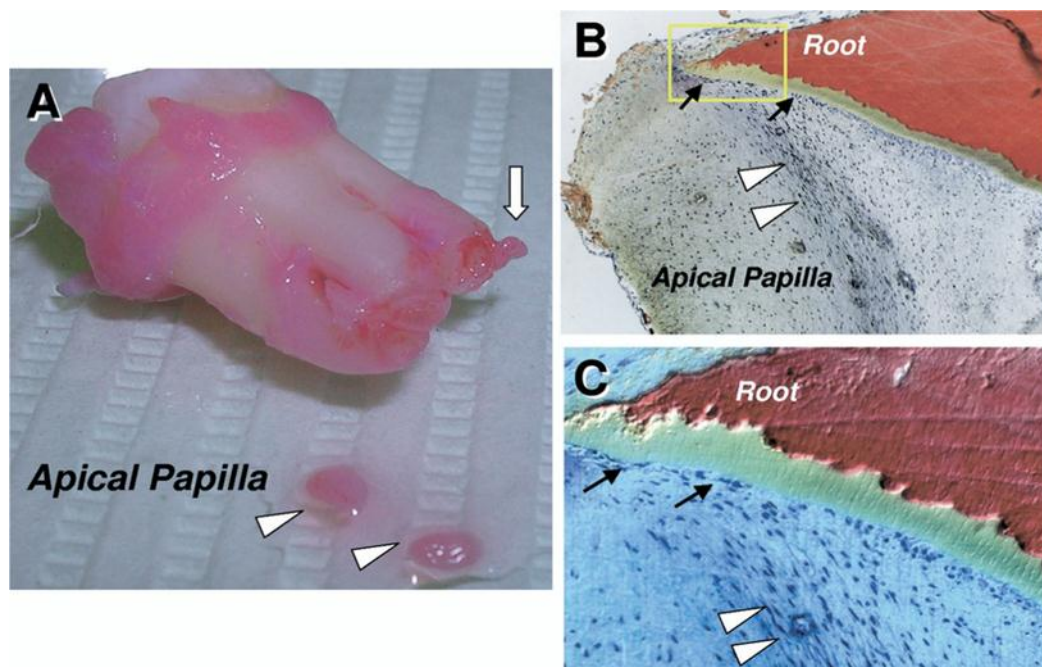
I. Въведение

Стволово-клетъчната биология се превърна във важна област в регенеративната медицина и тъканно инженерните терапии след откриването и характеризирането на възрастните мезенхимни стволови клетки (mesenchymal stem cells, MSCs). Денталните мезенхимни клетки са златен стандарт за костна реконструкция при хора и може да се използват за възстановяване на телесни дефекти в нискорискови терапевтични стратегии. Биоинженерните технологии разработени за възстановяване на зъби, значително ще допринесат за разбирането на процесите през ембриогенезата и ще насърчат бъдещите регенеративни терапии на органи, вместо сега провежданите трансплантации, в голямо разнообразие от органи, като: черен дроб, бъбрек и сърце. Концепцията за развитие на зъбното банкиране и презервацията на зъбни стволови клетки е доста обещаваща. Понататъшни изследвания в областта имат потенциала да предизвестят нова ера на ефективно лечение на множество сериозни болести и биха се оказали много полезни за човечеството. Апикалната папила е разположена на върха на развиващ се постоянен човешки зъб и граничи със зъбната пулпа чрез горна (апикална) богата на клетки зона. Независимо, че е интензивно изследвана като източник на SCAP, почти нищо не е известно за фенотипно-специфичната сигнална регулация, протичаща в различните субпопулации от хетерогенния състав на апикалната папила. По литературни данни се знае, че клетките от апикална папила (SCAP) са способни да диференцират *in vitro* в одонтобласто - подобни клетки и да произвеждат дентин. Мезенхимните стволови клетки (MSCs) произхождащи от зъбни тъкани, характерни за апикална папила са най-вероятно клетъчния източник на първичните одонтобласти за дентиновото формиране на корена *in vivo*. BMP4 е доказан одонтогенен фактор, който изпълнява ключова роля в клетъчната диференциация. Експресията на протеина BSP2, е вследствие на одонтобластна диференциация. В постнаталното развитие той повишава остеокластогенезата и следователно костната резорбция, което го прави решаващ за хомеостазата на костното ремоделиране и неговото отсъствие рефлектира върху хомеостазата на костната тъкан. Изоформите на PKC медиат вътреклетъчната сигнална трансдукция на различни остеогенни регулатори. PKC alpha е въввлечена в почти всички клетъчни физиологии. Реакциите, предизвикани от активирането ѝ или свръх експресията на PKC alpha, варират в зависимост от типовете, а понякога и от условията на клетките. Установяване участието

й в BMP4 индуцираната одонтобластна диференциация би довело до изясняване на един от многото пътища в клетъчната сигнализация.

II. Литературен обзор

Изследванията в областта на терапията със стволови клетки се развиват бързо и дават надежда за лечение на редица заболявания (1). Изолирането и диференцирането *in vitro* на мезенхимни клетки от зъбна пулпа са основателно доказателство за регенеративните възможности на пулпо-дентиновият комплекс, и значима предпоставка за създаване на методики за активирането и за диференцирането в одонтобласто/остеогеноподобни на собствените MSC от субодонтобластния слой на пулпата (2,3). Освен от зъбната пулпа, стволови клетки се изолират от периодонталния лигамент, апикална папила, а също и от резорбирани временни зъби. Последните проучвания разкриват наличието на мезенхимни стволови клетки в апикалната папила на зъби с незавършено кореново развитие. Тези клетки са наречени апикални стволови клетки /ACK, SCAP/, и са предшественици на одонтобластите, участващи във формирането на дентина на корена. Апикалната папила има мезенхимен произход, разполага се в пространството под вътрешния емайлов епител и участва в изграждането на зъбната пулпа. В най-ранните стадии на развитие на зъба се появява денталната (апикална) папила, която е хетерогенна тъкан, участваща в образуването на денталната пулпа, и намираща се свободно прикрепена към върха на развиващия се корен на постоянния човешки зъб (4, 5). Одонтогенезата се разделя на 4 стадия: стадий на инициране, стадий на пъпка, етап на шапка и камбановиден етап. При стадий пъпка ектодермалният твърд зародиш индуцира пролиферацията и кондензацията на подлежащите мезенхимни и ектомезенхимни клетки, за да образува денталната папила, чийто индуктивен капацитет е от съществено значение за по-нататъчното развитие на ектодермалната епителна пъпка. Денталната папила продължава развитието си по време на етапа „шапка“. Незрялата зъбна папила е тъкан от мезенхимен произход, обградена от емайловият орган отгоре и денталния фоликул на дъното. Горната част на зъбната папила се превръща в апикална след началото на дентиногенезата - камбановиден етап. Апикалната папила е разположена на върха на развиващ се постоянен човешки зъб и граничи със зъбната пулпа чрез горна (апикална) богата на клетки зона (5).



Фиг. 1. Апикална папила(А) екстрахиран трети молар, изобразяващ три незрели корена с две парчета от апикална папила, които са отстранени от върховете им **(В)** развиващ коренов връх с прикрепена апикална папила, култивиран *in vitro* за 3 дни. С черните стрелки са обозначени одонтобласти, а с белите стрелки богата на клетки апикална зона и апикалната папилна тъкан. **(С)** увеличен изглед на областта, посочена от жълтия правоъгълник (5).

Стволовите клетки са основните участници в процесите на тъканна регенерация, тъй като са недиференцирани клетки с различна степен на потентност и пластичност, способни да се самовъзпроизвеждат и диференцират в различни клетъчни линии (6,7). Стволовите клетки се класифицират на следните три типа: ембриологични (embryonic stem cells-ES), индуцирани плурипотентни стволови клетки (induced pluripotent stem cells-IPS), и стволови клетки на възрастен организъм (adult stem cells-ASC) (8). Два типа ASC са идентифицирани: мултипотентни хематопоеични стволови клетки (hematopoietic stem cells-HSC) и мезенхимни стволови клетки (mesenchymal stem cells-MSK). И двата типа са обект на много голям научен интерес, продиктуван от изключителният им потенциал за поширокото им приложение в молекулярната медицина, дължащ се на способността им да се диференцират до адипоцити, хондроцити и остеобласти в *in vitro* условия. Изолираните MSK са адхезивни в клетъчна култура, наподобяват фибробластни клетки, които могат да

бъдат пасажирани многократно без да се наблюдават значителни промени в тяхната морфология (8). MSC са изолирани от различни видове тъкани: костен мозък, мастна тъкан, пълна връв и зъбни структури - от пулпа на постоянни зъби, от пулпа на ексфолирани и не ексфолирани временни зъби, от периодонтални лигаменти, от апикална зъбна папила и прогениторни клетки от зъбен фоликул (9,10,11). MSC се запазват в зъбната пулпа и гингивата през целия живот, те осъществяват защитна и репаративна функция и под действието на възпалителни сигнали, растежни фактори, витамини, промяна на рН се диференцират до ендотелни или одонтобластоподобни клетки (12,13).

В хетерогенният състав на апикалната папила се намира популация от стволови/прогениторни клетки, наречени стволови клетки от апикална папила (Stem Cells from Apical Papilla - SCAP), които се характеризират с експресията на мезенхимните стволови клетъчни маркери: STRO-1, CD146, CD105, CD73, CD90, CD24, CD29, CD44 и CD49 (4, 14, 15). Стволовите клетки от апикална папила показват високи нива на пролиферация в *in vitro* условия, което предопределя ролята им в регенеративните процеси на клетъчна основа и при образуването на зъбния корен. SCAP са способни да образуват клетки, подобни на одонтобластите; да произвеждат дентин *in vivo* и са най-вероятния клетъчен източник на първичните одонтобласти, отговорни за дентиногенезата (4,5).

Важен напредък в проучванията, провеждани със стволови клетки е установяването именно на тези клетъчни повърхностни протеини – системата CD (cluster of differentiation) (16).Общопризнато е, че човешките MSC не експресират хематопоеичните и ендотелиални маркери CD133, CD45, CD34, CD14, CD11 (17,18).Те не експресират костимулиращите молекули CD80, CD86, CD40 и адхезионните молекули CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule [PECAM]-1), CD18 (leukocyte function-associated antigen- 1 [LFA-1]), CD56 (neuronal cell adhesion molecule-1).Съществуват антитела, за които е установено, че се свързват с повърхностни антигени на MSC.Такъв маркер е **STRO-1**.Той взаимодейства с антигени по клетъчната повърхност на нехематопоеични костномозъчни клетки.STRO-1 е един от най-известните мезенхимни стволови клетъчнимаркери.Той е клетъчен мембранен протеин, който се пренася от ендоплазматичния ретикулум към клетъчната мембрана в отговор на изчерпването на вътреклетъчния калций (19).STRO-1 не е универсално експресиран във всички известни

видове мезенхимни стволови клетки, неговата експресия е установена в зъбни, синовиално-мембранни мезенхимни стволови клетки и мултипотентни дермални фибробласти. STRO-1 е маркер, който разпознава трипсин-чувствителните епитопи по периваскуларните клетки и се използва за изолирането на мезенхимни стволово-клетъчни популации от човешка дентална тъкан, показващи засилен потенциал за диференциация в одонтоблати. STRO-1 е първият повърхностен мезенхимен клетъчен маркер, установен в клетки от апикална папила, което е доказателство за съществуване на стволови клетки в тази тъкан(20). Антитела срещу CD73 (membrane-bound ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin), CD166 (ALCAM), CD271, CD146 (MCAM) също взаимодействат с недиференцирани мезенхимни клетки (17, 21, 22, 23, 24). CD 105/Endoglin е хомодимерен трансмембранен гликопротеин, който е добре документиран маркер на клетъчна стволовост, и функциониращ като спомагателен рецептор за членовете на семейството на трансформиращия растежен фактор β (transforming growth factor, TGF- β), към което е и BMPs семейството (24). Доказано е, че ендоглина е включен в цитоскелетната организация, засягайки клетъчната морфология и миграция, а наскоро бе определен като индикатор за пролиферативната активност на човешки ендотелни клетки (25). Тези антигени могат да бъдат установени върху повърхността на MSC с различен произход. От друга страна, отделните MSC се различават помежду си в степента на експресия на даден повърхностен антиген. Това може да се дължи на особености на самата тъкан, от която са изолирани клетките, методът на изолиране и култивиране, или на индивидуални и видови разлики.

Схема.1. Схема показваща повърхностно експресирани клетъчно стволови маркери.

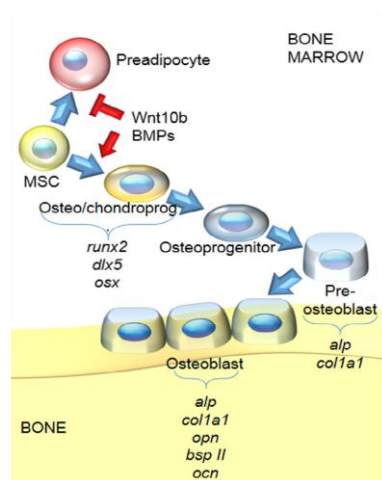
Marker	Function	Expression observed in
Stro-1	Mesenchymal precursor cell marker	BMSC, DPSC, SHED
CD146/ MUC18	Mesenchymal stem cell and endothelial cell marker	BMSC, DPSC, SHED
CD105	Vascular endothelial marker	BMSC, DPSC
CD44	Mesenchymal cell marker	BMSC, DPSC
3G5	Mesenchymal stem cell/ pericyte marker	BMSC, DPSC
c-kit (CD117)	Mesenchymal cell and hematopoietic stem cell marker	SHED
CD29	Mesenchymal cell and endothelial cell marker	BMSC, DPSC
Oct4	Embryonic stem cell marker	BMSC, DPSC, SHED
E2F2, PTTG1, and TWIST-1	Mesenchymal transcription factors	BMSC, DPSC
Nanog	Embryonic stem cell marker. Regulates embryonic development and determines stem cell fate.	BMSC, DPSC, SHED
SSEA-4	Embryonic stem cell marker	BMSC, DPSC, SHED
Sox2	Regulates embryonic development and determines stem cell fate.	DPSC, SHED
Flk1	Vascular endothelial growth factor receptor expressed by endothelial cells and neural progenitor cells	DPSC, SHED
c-myc	Proto-oncogene, stem cell differentiation	SHED
Klf4	Transcription factors expressed by embryonic stem cells and mesenchymal stem cells	SHED
EphB	Transmembrane receptor responsible for cell-cell interaction in neural tissue embryogenesis	DPSC
Nestin	Intermediate filament protein. Central nervous system progenitor cell marker	DPSC, SHED
low-affinity nerve growth factor receptor (LANGFR)	Receptor for neurotrophins responsible for neural development and survival	DPSC

DPSC = Dental pulp stem cells, SHED = Stem cells from exfoliated deciduous teeth, BMSC = Bone-marrow mesenchymal stem cells

Изследването на остеогенният потенциал на мезенхимните клетки изолирани от апикална папила би обогатило познанията за репаративните възможности и би допринесло за по-дълбоко разбиране на процесите на диференциация и туморогенеза. Изолирането на стволови клетки и напътстването на тяхната диференциация е основна тема на множество съвременни проучвания и оптимално решение за лечение на редица заболявания, с които медицината все още не се е преборила напълно. Пролиферативната активност на клетките е под стриктния и многопластов контрол, осъществяван от сигнално трансдукционните мрежи (26, 27).

В одонтогенезата множество растежни фактори „режисират” епитело-мезенхимните взаимоотношения, които регулират диференциацията и функцията на клетките отговорни за изграждането на зъбните тъкани. След цялостното изграждане на зъба, те остават включени в него и според някои автори могат да бъдат освободени и активирани отново при разграждане на дентина (кариозен процес) (28, 29). Доказано е, че някои от членовете на суперсемејството на трансформиращият растежен фактор бета (TGF- β) имат изявен остеоиндуктивен ефект *in vivo* (16,17). Те индуцират мобилизацията, миграцията и диференциацията на MSC до остеогенни - костни и костноподобни (одонтобластидентиногенеза) клетки в процеса на репарация на костите. Остеоцитите наброяват 90-95% от общата клетъчна популация в костите, докато остеобластите наброяват едва 4-6%, но

оказват решаваща роля в правилното изграждане и подържане на костната маса, което се постига чрез тясна връзка с другите костни клетки: остеокласти и остеоцити (30). Остеобластите, както други клетъчни типове на съединителната тъкан (фибробласти, хондроцити, миобласти и адипоцити), произлизат от общи плурипотентни MSC, които под контрола на про-остеогенни сигнални пътища, като костните морфогенни протеини (Bone morphogenic proteins – BMP) и Wnt, преминават през своевременни програмирани стъпки, водещи до експресията на специфичните гени: Runx2, Osx и т.н. Минималният критерий за определянето на клетка като остео/хондропрогениторна клетка е експресията на Runx-related transcription factor 2 (Runx2), Distal-less homeobox 5 (Dlx5) и Osterix (Osx) остеобластно-специфичните транскрипционни фактори. Сигнализицията, включваща BMP и Wnt е от изключителна важност в ранните етапи на остеобластогенезата, през които MSC се насочват и подтикват към остео/хондропрогениторни клетки(30, 31).



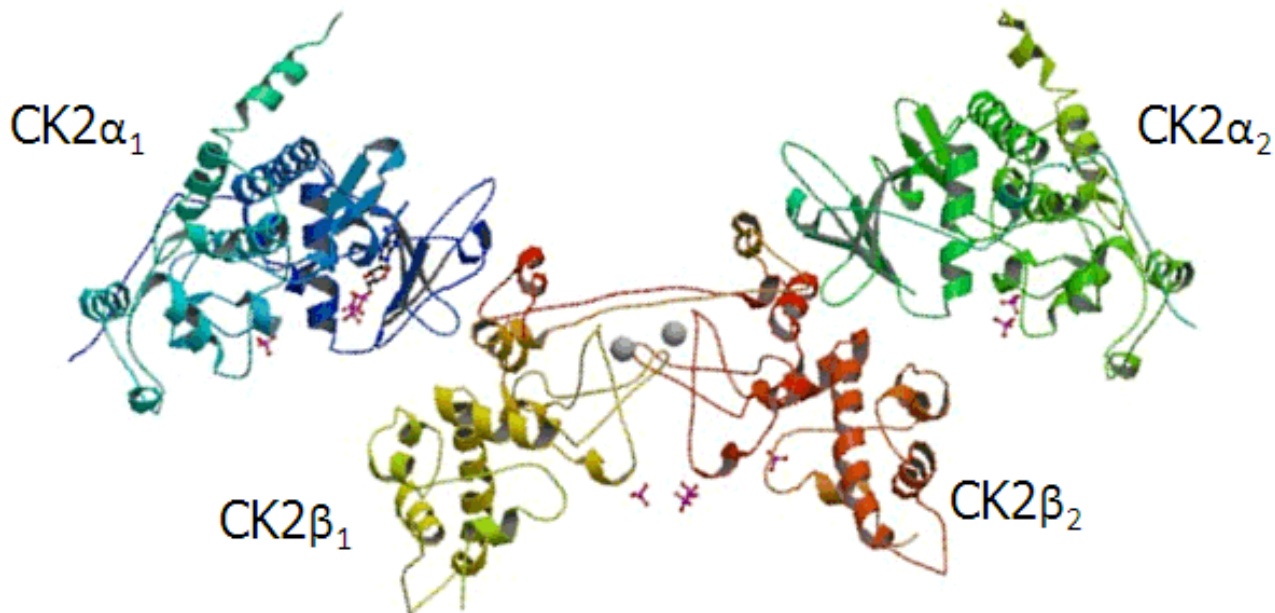
Фиг.2. Схематично представяне на многостъпалният процес на остеобластна диференциация.

Зъбната морфогенеза включва последователни и реципрочни взаимодействия между денталните епителни и мезенхимни клетки, в резултат на които протичат серия от специфични пространствено-времеви модели на цитодиференции, водещи до формирането на зрели амилобласти от пролиферативно активните епителни клетки и на зрели одонтобласти от мезенхимните клетки. Този сложен процес, зависи от редица растежни и транскрипционни фактори, и от множество сигнални пътища, осъществяващи епително-мезенхимните взаимодействия, водещи до диференцирането на амилобласти, продуциращи емайла на зъба, и на одонтобласти, продуциращи дентина. Сред основните

сигнални молекули, участващи в регулирането на зъбната морфогенеза са членовете на семейството на костния морфогенетичен протеин (bone morphogenic protein – BMPs), членовете на семейството на фибробластния растежен фактор (fibroblast growth factor – FGFs) и гликопротеините от Wnt семейството (32, 33, 34). Полипептид от BMP семейството, който участва в развитието на зъбите е костният морфогенетичен протеин 4 (bone morphogenic protein 4 - Bmp4), който индуцира експресията на транскрипционните фактори muscle segment homeobox (msx)-1 и -2 (35), играещи важна роля като сигнална молекула в ембрионалните тъкани, включително в развиващата се централна и периферна нервна система, мускулатурата и скелета, участва в развитието на костите, хрущялите, мускулите и в процеса на образуване на зъба, индуцира мезенхимната зона, подобна на тази, индуцирана от денталният епител и участва в регулирането на епително-мезенхимните взаимодействия в ранните етапи от развитието на зъба (36). BMP (в настоящият момент 20 белтъка) са членове на TGF- β суперсемейството, които се различават по аминокиселинен състав, хистологична локализация и биологичните си ефекти в постнаталното развитие и са ключови регулатори на епително-мезенхимните взаимодействия както в ранната ембриогенеза, така и в тъканната морфогенеза. Участието им в костният метаболизъм е недвусмислено доказано чрез образуването на ектопична кост, вследствие на подкожното или мускулното им инжектиране в мишки, като BMP-2, 4, 5, 6, и 7 изоформите са преки участници в про-остеогенната сигнално-трансдукционна регулация, стимулиращи експресията на транскрипционните фактори Runx2 и OSX и липсата на BMP-2 и 4 в животински моделни системи води до тежки увреждания в остеогенезата (31, 32, 37).

BMP4 е еволюционно строго консервативен протеин, който при хората се кодира от *bmp4* гена в хромозома 14q22-q23 и оказва своят биологичен ефект по паракринен и аутокринен механизъм, свързвайки се към тетрамерен рецепторен комплекс, състоящ се от специфични рецептори на клетъчната повърхност, известни като BMPRs (bone morphogenetic protein receptors)(14). Тетрамерите, състоящи се от два BMPR тип I и два BMPR тип II рецептори, функционират съвместно с т.н. помощни рецептори – каквито са CD105 и c-kit .

Несъмнено, BMP-зависимата вътреклетъчна сигнализация е един от основните остеоиндуктивни механизми, осъществяващи прехода от стволовоклетъчен към остеогенен фенотип. Регулацията на BMP-зависимата сигнализация е много слабо проучена и данните до настоящия момент демонстрират, че е съсредоточена върху инициращото свързване на BMP към BMP receptor type I (BRI) и/или type II (BRII) на повърхността на клетъчната мембрана, но механизмът и протеинитеосъществяващи я, все още не са добре изяснени. Негативен регулатор на BRIa е протеин киназа CK2, което отделяне от рецептора, иницира BMP-активираната остеобластната диференциация на миши миобластни клетки. Фармакологичното подтискане на активността на CK2 демонстрира нейното участие в регулацията на остеогенната диференциация в различни клетъчни типове (38, 39). MSCs са обещаващи терапевтични инструменти за тъканна регенерация и поправка. Изключително важно е разбирането на молекулните механизми лежащи в основата на MSCs-диференциация. През последните няколко години се оказва, че ключова роля в диференциацията играе **казеин киназа 2 (CK2)**. Протеинкиназа CK2 е силноконсервативна в хода на еволюцията, посевместно експресирана серин/треонин киназа, най-често детектирана в клетките като тетрамер, състоящ се от две каталитични субединици (α и/или α') и две регулаторни субединици (β). Конститутивната активност на свободните каталитични субединици и на хетеротетрамерния холоензим предопределят високата й плейотропност – над 300 нейни субстрати са идентифицирани до този момент. Широко спектрното й действие и конститутивната й активност въвличат CK2 в почти всички аспекти на клетъчната физиология и ключовото й участие в регулацията на генната експресия и в сигналната трансдукция са несъмнени. Участието на CK2 в сигнално-трансдукционната регулация на остеогенната диференциация на човешки MSC не е изследвано до този момент (40-46).



Фиг. 3: Молекулна структура на протеин киназа (casein kinase 2) CK2 с двете й каталитични α_1 и α_2 и двете некаталитични β_1 и β_2 субединици (47).

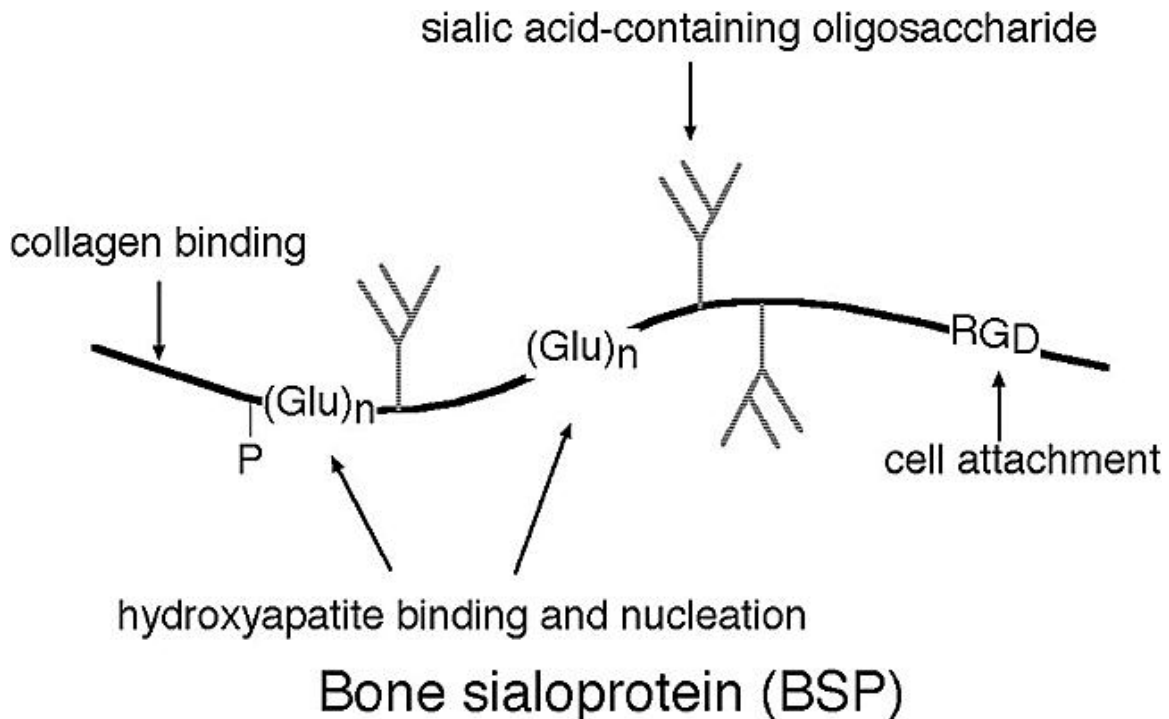
Някои специфични субстрати на холоензима се свързват към некаталитичната β -субединица, която си взаимодейства с каталитичната α -субединица, в следствие на което тя специфично ги фосфорилира (48). Механизмите, чрез които се осъществяват тези взаимодействия са слабо проучени и са предмет на интензивни изследвания в настоящия момент. Наред с участието им във функционално активния тетрамер, α - и β -субединиците изпълняват и клетъчно значими функции като свободни (извън холоензима) белтъци. Тази представа се подкрепя от наблюдението, че различни типове тъкани имат различни нива на CK2 α , CK2 α' или CK2 β експресия (49).

Runx2 е главният остеобластно-специфичен транскрипционен фактор, който позитивно регулира генната експресия на остеобластно-специфичните гени *колаген тип 1*, *алкална фосфатаза*, *остеокалцин* и *Bone SialoProtein (BSP)* в остеобластите и в не-osteoblastни клетки-фибробласти. Свърхекспресията на Runx2 в човешки MSC, изолирани от мастна тъкан, има про-osteogenic ефект, изразяващ се в увеличена активност на алкална фосфатаза и увеличена експресия на остеокалцин. Runx2-нулеви мишки са напълно лишени от остеобласти, което води до липса на костна маса и неспособност на хондроцитите от невкостенения хрущял да хипертрофират (50), докато мутации в

човешкия *Runx2* причинят CleidoCranial дисплазия, автозомно-доминантно заболяване с драматични аномалии в костообразуването (51). Един от долностоящите ефектори на *Runx2* е OSX транскрипционният фактор, който промотира транскрипционната експресия на *Special AT-rich Binding protein 2 (Satb 2)*, чието значимо участие в про-остеогенната сигнализация се демонстрира от множество изследвания, така например *Satb2* Knock Out мишки са с увредено краниофасциално развитие и неправилна остеобластна диференциация (52); хаплоидността на SATB2 причинява черепно-лицеви дефекти при хора (53); остеобласти, в които *Satb2* е подтиснат чрез Knock Out, експресират в значимо по-малка степен остеокалцин и BSP. Транскрипционния фактор Osterix (*Osx*, Sp7) е специфичен за остеобластната/одонтобластната диференциация транскрипционен фактор, съдържащ ДНК свързващ домен, състоящ се от три цинкови „пръста“ тип C2H2, които споделят висока степен на хомоложност с мотивите от Sp1, Sp3 и Sp4 транскрипционните фактори, и домен, богат на пролин и серин, отговорен за активирането на транскрипцията (54). *Osx* е от съществено значение за диференциацията на остеобластите и за развитието на ембрионалния скелет, регулирайки експресията на редица гени, индуциращи прогениторните клетки към диференциация в зрели и функционално активни остеобласти, и в остеоцити по време на образуването на костта (55-61). Когато *Osx* е в неактивно състояние или липсва се наблюдават различни промени, свързани с фенотипната диференциация, като например при новородени мишки, инактивирането на този транскрипционен фактор води до липса на новообразуващи се кости, не се наблюдава резорбция на минерализираният хрущял, който трябва да бъде заменен от специфичен за костите матрикс, и има нарушение в процеса на зреене на остеоцитите и в техните функции, тъй като остеобластно-специфичните маркерни гени не са експресирани (62). Тъй като *Osx* е основен ефектор при формирането на скелета, проучванията за неговата роля в зъбната морфогенеза са много интензивни в последните няколко години. При генетични и биохимични изследвания, правени при мишки, е установено, че както *Osx*, така и Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) участват независимо един от друг при активирането на гените, отговорни за одонтобластната диференциация (63-65) като в ранните стадии се наблюдава припокриване на двата транскрипционни фактора, в алвеоларните кости, остеобластите, амилобластите и в клетките от зъбната пулпа, докато на по-късен етап от диференциацията експресията на *Runx2* значително намалява, а

експресията на Osx остава интензивна в одонтобластите и в клетките на зъбната пулпа, което води до извода, че Osx е необходим за узряването и диференцирането на преодонтобластните клетки в одонтобласти чрез активиране на специфични, за крайните стадии на диференциация, маркерни гени (65).

BSP (Bone Sialoprotein)SIBLING (small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) семейството се състои от osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein (DMP) 1, dentin sialophosphoprotein (DSPP) и matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE). Тези протеини имат много сходни структурни характеристики и са локализирани основно в костите и дентина (66).BSP е 70-80 кДа белтък, чийто ген и структура са подробно проучени, който се експресира само в минерализирани тъкани - кости, дентин и минерализиран хрущял, от остеобласти, по-слабо от остеокласти, остеоцити и хондроцити (66)(фиг.4).



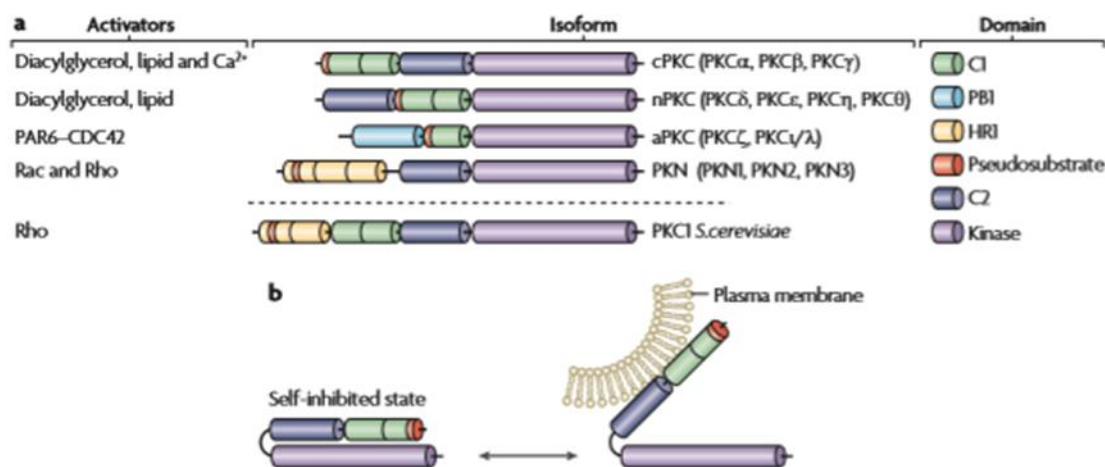
Фиг. 4. Молекулен модел на човешки BSP. BSP е киселинен гликопротеин намиращ се в костите. Има олигозахаридни вериги съдържащи сиалова киселина. В близост до С-края има RGD- интегрин-свързваща последователност. Присъстват и полиглутаминови киселинни последователности ((Glu)_n) и се смята, че представляват места за нуклеация и свързване на хидроксиапатит. В N-края са колаген-свързващите места (67).

Както другите SIBLING протеини, функцията на BSP е силно зависима от неговите посттранслационни модификации. BSP е първият от SIBLING протеините, който се експресира в началото на костообразуването през ембриогенезата, което предполага, че той участва в първоначалното формиране на хидроксиапатит. Смята се, че той е основното ядро на кристализацията на хидроксиапатита, както е и добре описано неговото свързване с хидроксиапатит, колагените и други компоненти от клетъчния екстрацелуларен матрикс. В постнаталното развитие той повишава остеокластогенезата и следователно костната резорбция, което го прави решаващ за хомеостазата на костното ремоделиране и неговото отсъствие рефлектира върху хомеостазата на костната тъкан(66).

Протеин киназа С (Protein kinase C - PKC) семейството е силно консервативно в хода на еволюцията семейство, състоящо се от 13 серин/треонин протеин кинази, експресирани в бозайници и в човека, които обхващат приблизително около 2 % от човешкия геном, а при дрожди - само от една изоформа (68). Основната белтъчна структура, характерна за всичките 13 изозима включва N-терминална регулаторна област, силно консервативен C-терминален каталитичен (киназен) домен и авто-инхибиторен псевдосубстратен домен, който блокира контактните функционални групи от структурата на активния център в отсъствието на активатори – вторични посредници и алостерични ефектори (69). Индивидуалността на отделните изоформи се определя от структурата на N-терминалната регулаторна област, въз основа на която, те се групират в четири структурно и функционално различни подсемейства: класически PKC изозими, нововъведени PKC изозими, атипични PKC изозими и подсемейството на протеин киназа N (PKN - PKC-related serine/threonine-protein kinase).

Подсемейството на класическите PKC (сPKC) ензими групира PKC α , PKC β 1, β 2 и PKC γ изоформите, които са Ca²⁺/диацилглицерол зависими. Тяхната ензимна активация се осъществява при свързването на диацилглицерол и фосфолипид към домен C1 и на Ca²⁺ към домен C2 от N-терминалната им регулаторна област. Подсемейството на нововъведените PKC (nPKC) ензими включва PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ и PKC ζ изоформите, които са диацилглицерол зависими, но Ca²⁺ независими. Тяхната N-терминална регулаторна област съдържа домен C1, към който се свързва диацилглицерола и домен C2, който е Ca²⁺-нечувствителен (70).

Подсемейството на атипичните РКС (аРКС) ензими се състои от РКС ζ и РКС ι изоформите, които са Ca²⁺/диацилглицерол независими и се активират при свързването на PAR6–CDC42 комплекса (който определя клетъчният поляритет) към PB1 домен от N-терминалната им регулаторна област (71). Подсемейството на протеин киназа N (PKN) включва три изозима PKN1, PKN2 и PKN3, чието активиране се осъществява по директен алостеричен механизъм от малките ГТФази Rho и Rac, които свързайки се към домен BOX 2 от N-терминалната регулаторна област (72) предизвикват конформационни промени в активния център, в следствие на които авто-инхибиторния псевдосубстратен домен се отдисоцира и „освобождава“ контактните групи от каталитичния домен (73) (фиг. 5).



Фиг. 5. Протеин киназа C семейството. **а.** схематично представяне на основната белтъчна структура, характерна за РКС изоформите при бозайници, респективно при човек, и за *S.cerevisiae*, като за него е характерна една единствена изоформа - РКС1 (показана най-отдолу). При бозайниците РКС семейството се разделя на 4 основни, структурно и функционално различни, спрямо тяхната N-терминална регулаторна област, подсемейства: класически РКС изозими (сРКС), нововъведени РКС изозими (нРКС), атипични РКС изозими (аРКС) и подсемейството на протеин киназа N (PKN). Регулацията им се осъществява чрез автоинхибиране на каталитичния домен от псевдосубстратния, което се подпомага от различни активатори, в зависимост от тяхната подгрупа. **б.** РКС е в неактивно състояние, при което псевдосубстратния ѝ домен е свързан към контактните групи в киназния домен. При сРКС изоформите, присъединяването на диацилглицерол, Ca²⁺ и фосфолипид към N-терминалния регулаторен домен става отдисоциране на авто-инхибиторния псевдосубстратен домен и активиране на каталитичния домен, вследствие на което изпълнява своето действие върху целевите си субстрати. За активирането на нРКС е необходимо свързване на диацилглицерол и фосфолипид, но не и на Ca²⁺. При аРКС освобождяването на активния център от псевдосубстратния домен се осъществява чрез присъединяването на PAR6–CDC42 комплекса към регулаторната област, което при

РКН става чрез директното свързване на малките ГТФази, Rho и Rac, към областта на хомоложност 1 (HR1) (73)

Наред със специфичния за всяко от подсемействата механизъм на активиране, всичките РКС изозими са подложени на стриктна и сложна регулация, осъществявана чрез посттранскрипционна ковалентна модификация - фосфорилиране и свързване на различни ефектори чрез протеин-протеин взаимодействия, които модулират субстратната специфичност на изозимите. Функционирането на членовете на РКС семейството е част от сигнално-транскрипционната регулация на глобалната клетъчна физиология, включваща регулирането на генната експресия, на клетъчната пролиферация, както и на възпалителния процес (73). Човешката РКСа изоформа е повсеместно експресирана, за разлика от други РКС изозими, чиято експресия е хистологично детерминирана (74, 75), изградена от 672 аминокиселини серин/треонин киназа, чието функциониране е част от сигнално-транскрипционния контрол на основните клетъчни функции като: пролиферация, апоптоза, диференциация и подвижност на клетката. РКСа α се активира в отговор на множество стимули, включително свързването на екстрацелуларни сигнали към рецептори по клетъчната повърхност (като, гуанин нуклеотид-свързващи протеин-свързани рецептори и тирозин киназни рецептори (72, 74, 75, 76, 77) физически стрес като хипоксия (78) и механични сигнали (79). И биологичните отговори, получени чрез функционирането на РКСа α са фенотипно-специфични т.е. специфични за клетъчния тип. Например, свръхекспресията на РКСа повишава пролиферативната активност на някои типове клетки, но инхибира клетъчния цикъл на други клетъчни типове, както и инхибира диференциацията в други клетъчни фенотипове. Тези наблюдения показват, че конкретните, специфични клетъчни отговори, индуцирани от РКСа свръхекспресията, не са присъщо свойство на изоформата, а са в резултат на модулираното ѝ функциониране чрез динамични взаимодействия със специфични за клетъчния тип фактори: субстрати, ефектори и директни свързващи се към киназата белтъци (80). Независимо, че далеч не всички фенотипно-специфични фактори, модулиращи функционирането на РКСа α са установени, механизмът, регулиращ нейното функциониране включва активирането ѝ, вътреклетъчната ѝ локализация, „закотвящите“ я белтъци и други.

РКСа α се активира в отговор на различни стимули, като сигнал (лиганд)-свързващо активиране на рецептор по клетъчната повърхност, клетъчен контакт и физически стрес.

Свързването на диацилглицерол и Ca^{2+} към N-терминалния регулаторен домен води до освобождаването на псевдосубстратния участък от активното място, паралелно с което се осъществява и фосфорилиране на два консервативни остатъка от регулаторния домен: място на активиране - Thr-497 и място на автофосфорилиране - Thr-638 и на един хидрофобен остатък от C-терминалния каталитичен домен - Ser-657 (81, 82), което води до активиране на PKC α в изоформата (83). Без да се осъществи фосфорилиране в тези места PKC α остава неактивна. В резултат на активирането си PKC α претърпява различни конформационни промени свързани както с активния център, така и с разположението ѝ в клетката. Наред с алостеричната и посттранскрипционната, чрез фосфорилиране, регулация на активността на PKC α , нейното функциониране се регулира и чрез промяна в локализацията ѝ. Активираната PKC α се намира в цитозола и в отговор на различни видове стимули, специфични за нея активатори, се транслоцира до специализирани клетъчни компартменти като ядро, областите на цепковиден клетъчен контакт, фокалните адхезии, където фосфорилира конкретните си целеви субстрати. Така например в отговор на тромбоцитния растежен фактор (PDGF), епидермалния растежен фактор (EGF) и на инсулиноподобния растежен фактор-1 (IGF-1) е установена транслокацията ѝ от цитоплазмата в ядрото (84). В структурата на PKC α не е установен ядрен локализационен сигнал, така че нейното транслоциране в ядрото се осъществява по друг, до настоящия момент, не изяснен механизъм (85). В мигриращи клетки (86) и при разпространяването им (87, 88), както и в отговор на определен механичен стимул, PKC α е локализирана във фокалните сраствания и ламелиоподите – тази локализация е много характерна и в мигриращите епителни клетки при реепитализацията като част от заздравяването на рани (89). Вътреклетъчната локализация в специализирани клетъчни компартменти се опосредства чрез взаимодействието на киназата със специфични, характерни за съответния клетъчен компартмент, белтъци, които се наричат „закотвящи“ белтъци (90). Такива са винкулина и талина, които чрез протеин-протеин взаимодействия с PKC α я „закотвят“ в областта на фокалните адхезии (91) или кавеолинът - „закотвящ“ я към кавеолите белтък (92). До настоящият момент „закотвящи“ белтъци, опосредстващи ядрената локализация на PKC α не са известни. Редица трансфекционни изследвания демонстрират, че PKC α е активен участник в регулацията, поддържаща пролиферативната активност на някои клетъчни

типове. Така например, свръхекспресията на PKC α предизвиква повишена пролиферативна активност и понижена експресия на глиалните маркери на диференциация в човешката глиомна U87 клетъчна линия (93), както и увеличена пролиферация и засилена неоплазия на човешки MCF-7 клетки при рак на гърдата (94). Същевременно, свръхекспресията ѝ води до понижена пролиферация, дължаща се на удължаване на времето за удвояване на клетките, на човешки MCF-10 епителни клетки от млечната жлеза (95), както и до инхибиране на клетъчния цикъл на човешката IEC-18 интестинална епителна клетъчна линия (96). Наред с участието ѝ в регулирането на клетъчната пролиферация, PKC α е добре изследван участник и в сигнализацията, поддържаща оцеляването на клетката (74). И крайните биологични ефекти – проапоптотичен или антиапоптотичен, обусловени от нейното функциониране, са фенотипно-специфични. Така например, потиснатата PKC α активност, както и протеолитичното разграждане на киназата са установени в няколко клетъчни линии, третирани с различни апоптотични агенти като церамид и α -топофенил сукцинат (97, 98, 99). А, потискането на гената експресия на PKC α чрез антисенс олигонуклеотиди или въвеждането на доминантно негативна PKC α предизвиква апоптоза (100-102) и/или прави клетките по-податливи на проапоптотичните стимули (103, 107). Свръхекспресията на PKC α води до блокиране на клетъчния цикъл и инхибиране на растежа при някои типове клетки. Трансфекцията на PKC α в клетъчната линия на MMP-10 епителните клетки на млечната жлеза води до по-бавен растеж с удължено време на удвояване, в сравнение с родителските клетки (109). Миши фибробластни клетъчни линии R6, BALB / C и μ 2, експресиращи PKC α растат по-бавно в сравнение с родителските клетки (104). Свръхекспресията на PKC α повишава PMA индуцираната експресия на растежни регулаторни гени *сун*, *с-тус* и *колагеназа*, докато в R6 клетките има инхибиторно действие. Активирането на PKC α в IEC-18 клетъчна линия на интестиналната крипта (110, 111) води до спиране на клетъчния цикъл. Следователно, PKC α е тясно свързана с регулирането на клетъчния цикъл.

Апоптозата е генетично програмирана клетъчна смърт, важна за морфогенезата, развитието, отстраняването на увредени и туморни клетки. Ролята на PKC α в апоптозата зависи от клетъчните типове, като при някои има антиапоптотична функция, тъй като често се блокира по време на апоптотичните процеси, а при други клетъчни

типове играе проапоптотична роля. Ceramide, който е известен апоптотичен индуктор, причинява инактивиране на PKC α , вероятно чрез дефосфорилиране с фосфатази (112). Така например при лиганд Fas-индуцираната апоптоза в Jurkat човешки лимфобластни T-клетки (113) активността на PKC α се инхибира чрез активиране на фосфатазата PP2A. A, свръхекспресията ѝ в клетки трансфектирани с див тип PKC α ги прави резистентни на апоптозата (114). Докато от друга страна, с повишаване активността на PKC α се стимулира смъртта на човешките клетъчни ракови линии на стомаха MKN45 и MKN47 (105). Свръхекспресията на PKC α посредством вируса vaccinia индуцира апоптоза в неадхезираните MKN45 и MKN47 клетки, оставяйки прикрепените жизнеспособни клетки незасегнати, което води до извода, че интегрин-медираните сигнали инхибират апоптотичното действие на PKC α в адхезираните клетки.

Клетъчната диференциация е придружена с инхибиране прогресията на клетъчния цикъл и експресия на клетъчно специфични функции. В някои типове клетки, като хематопоеични прогениторни клетки (106, 107) епителни клетки на лещата (108) F9 клетки на ембрионалния карцином (109) и меланомни клетки (110). PKC α е тясно свързана с диференциацията, контролирайки развитието на прогениторните клетки, хематопоеичните клетки, и макрофагите, и прогресията на еритроидните прогениторни клетки. Стимулирането на хематопоеични гранулоцитни макрофаг-колониоформиращи клетки (GM-CFC) с макрофаг-колонио-стимулиращ фактор (MCSF) води до образуването на макрофаги с транслокация на PKC α към ядрото. При GM-CFC, трансфектирани с конститутивно активирана форма на PKC α , лишена от N- терминалния регулаторен домен, експресираният протеин се намира главно в ядрото. Тези трансфектирани клетки са ангажирани с развитието на макрофагите, дори при наличието на фактори, които нормално насърчават само неутрофилното развитие. Свръхекспресията на PKC α в меланомните клетки води до удължаване на времето за удвояване и увеличава производството на меланин (111). Транслокацията на PKC α към ядрото, по време на диференциация, предполага възможността тя да бъде замесена в контрола на клетъчния цикъл и/или експресията на гени, необходими за фенотипната диференциация. Съдбата на клетката също така зависи и от редица транскрипционни фактори, които в отговор на различни стимули, активират / блокират транскрипцията на дадени гени, което на свой ред може да доведе до промени в клетъчната морфология и процесите, които се изпълняват в

клетката, необходими за нейната диференциация. Като пример, при миобластите (112) адипоцитите (113) хондроцитите и остеобластите отделни транскрипционни фактори контролират отделни стъпки от тяхната диференциация.

Независимо, че апикалната папила е интензивно изследвана като източник на SCAP, почти нищо не е известно за фенотипно-специфичната сигнална регулация, протичаща в различните субпопулации от хетерогенния ѝ състав. Така например, ключовата роля на *Vmpr4* и неговите рецептори в одонтогенезата и в индукцията на диференциация на стволови клетки от зъбни структури е добре документирана (114, 124), но участието му в сигнализацията в конкретни фенотипове от хетерогения състав на апикалната папила не е било изследвано до настоящия момент. Също така няма литературни данни за влиянието на каталитичната (α) и некаталитичната (β) субединица на протеин киназа CK2 в синализацията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила; пролиферативната активност и самовъзобновяващия потенциал; за експресията, активността и локализацията на PKC α във фенотипове, от които се състои апикалната папила. И не на последно място не е изследвана експресията и локализацията на транскрипционния фактор RUNX2 и Osterix.

III. Цел и задачи

Цел: Изследване на сигнално трансдукционни пътища, поддържащи пролиферативната активност и/или прехода към остео/одонтогенна клетъчна диференциация, протичащи в различните хетерогенни фенотипове, изграждащи хетерогенния състав на апикална (дентална) папила.

III. 1. Задачи:

1. Фенотипизиране на хетерогенни култури от апикална папила въз основа на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните стволови маркери CD44, CD117, CD105, STRO-1 и вътреклетъчната експресия на цитоскелетния белтък- Vimentin.
2. Изследване на пролиферативната активност и самовъзобновяващия потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.

3. Изследване ролята на каталитичната(α) и некаталитичната(β) субединица на протеин киназа СК2 в сигнализицията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.
4. Изследване на BMP4-индуцирания остео/одонтогенен деференциационен потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.
5. Изследване ролята на каталитичната (α) и некаталитичната (β) субединици на протеин киназа СК2 в трансдуцирането на остеогенния BMP4 сигнал в клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.

IV. Материали и Методи

4.1.Материали:

30 дентално папиларни експланта, изолирани чрез рутинна екстракция на здрав трети молар на пациенти между 14 и 18 години, чиито родители са информирани и подписали информирано съгласие, в катедра по Орална и лицевочелюстна хирургия към Факултета по Дентална медицина на Медицински университет – София
колагеназа тип I(Sigma-Aldrich, USA) и диспазаза 1(LifeScan, USA)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) high glucose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)

fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA)

penicillin и streptomycin (AppliChem, GmbH, Darmstadt, Germany)

Phosphate – buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium)

trypsin/EDTA (Gibco, Germany)

75 cm² културални матраци, мулти ямкови (12, 24, 96) културални плаки (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)

BrdU (Santa Cruz Biotecnology, USA)

Човешки, рекомбинантен растежен фактор BMP4(Sigma-Aldrich, USA)

Xylenol Orange(Sigma-Aldrich, USA)-щедро предоставен от доц. И. Иванов от катедра Медицинска Химия и Биохимия, на МУ-София

DAPI (Santa Cruz Biotech, USA)

Neohchst 3342(Santa Cruz Biotech, USA)

scrambled siRNA, CK2 α siRNA, CK2 β siRNA(Santa Cruz Biotecnology, USA)

таблица.1. Първични антитела, вторични-имунофлуоресцентно-белязани антитела, вторични-магнитно белязани антитела и si RNA Reagent System

Първични антитела	Вторични-имунофлуоресцентно-белязаниантитела	Si RNA Reagent System Santa Cruz Biotecnology	Вторични-магнитно белязани антитела
BMPRIa-mouse monoclonal IgG-Santa Cruz Biotecnology	Donkey anti-goat IgG Cruz Fluor 647 Santa Cruz Biotecnology	Si RNA Transfection Medium	Anti-Mouse IgG MicroBeads MACS Miltenyi Biotec
BMPRII-goat polyclonal IgG-Santa Cruz Biotecnology	Chicken anti-rabbit IgG-FITC Santa Cruz Biotecnology	Si RNA Dilution Buffer	Anti-Rabbit IgG MicroBeads MACS Miltenyi Biotec
p-ПКCa(ser 657) goat polyclonal IgG-Santa Cruz Biotecnology	Goat anti-mouse IgG 555 Santa Cruz Biotecnology	Si RNA Transfection Reagent	
ПКCa-rabbit polyclonal IgG-Santa Cruz Biotecnology	Goat anti-mouse IgG 488 Santa Cruz Biotecnology	Si RNA diluent RNase –free H ₂ O	
BSP2- rabbit polyclonal IgG-Santa Cruz Biotecnology	Goat anti-rabbit IgG 555 Santa Cruz Biotecnology		
BrdU-mouse monoclonal IgG Santa Cruz Biotecnology			
RUNX2 mouse monoclonal IgG Santa Cruz Biotecnology			
Osterix-rabbit polyclonal IgG-Santa Cruz Biotecnology			
Endoglin(CD105) rabbit-polyclonal IgG-Santa Cruz Biotecnology			
C-kit(CD117)- mouse monoclonal IgG Santa Cruz Biotecnology			
Phospho-Thr202/Tyr204 ErK1,2-rabbit Ab Cell Signaling Technology			

ErK1,2-mouse monoclonal
Ab Cell Signaling
CD44 rabbit monoclonal
IgG Santa Cruz
Biotecnology
Stro-1 mouse monoclonal
IgG Santa Cruz
Biotecnology

IV. 2. Методи

IV. 2. 1. Ензимно-протеолитично изолиране на първични клетки от дентална човешка апикална папила от трети молар.

Дентално папиларните експлантите бяха изолирани от зъби на здрави пациенти, които са дали информирано съгласие. Всички протоколи бяха одобрени от етичната комисия на Медицински университет – София. Пациентите (30 на брой), от които беше събран биологичния материал са на възраст между 14 и 18 години. Те постъпваха в катедрата по Орална и лицево челюстна хирургия към Факултета по Дентална медицина на Медицински университет – София по повод рутинна екстракция на зъба. Всеки пациент беше прочел и подписал информирано съгласие. Веднага след екстракцията, зъбите бяха промивани обилно с физиологичен разтвор. След това се съхраняваха в стерилни пластмасови съдове с 3 – 4 мл хранителна среда с високо съдържание на глюкоза Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) high glucose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) с добавени 100 U/мл пеницилин, 100 µг/мл стрептомицин, 0,25 µг/мл амфотерицин. В рамките на 24 часа, екстрахираните зъби бяха транспортирани до лабораторията. Там те бяха промивани трикратно със солен фосфатен буферен разтвор – Phosphate – buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium). Апикална папила беше събирана от върха на кореновата повърхност на зъбите чрез внимателно остъргване. За целта бяха използвани стерилни пинсети. Събраният материал беше поставен в 1 мл разтвор на 4 мг/мл колагеназа тип I и 4 мг/мл диспазаза 1 час на температура 37°C, 5% CO₂ и 50% влажност в инкубатор. Получената суспензия беше центрофугирана за 4 минути при 3000 оборота/мин. Получената на повърхността течна фракция, наречена супернатант беше отстранена. Утаените клетки бяха ресуспендирани в 1 мл хранителна среда и пропускани през сито с размер на порите 70 µм. Целта е получаването на суспензия от отделни клетки, които самостоятелно да

адхезират към дъното на съда, в който ще бъдат засяти. Засяването се извърши в пластмасови петриеви панички с диаметър 2 см. (Greiner Bio – One, Frickenhausen, Germany) с добавени към средата 100 U/мл пеницилин, 100 µг/мл стрептомицин, 0,25 µг/мл амфотерицин и 20% фетален телешки серум (ФТС) (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA).

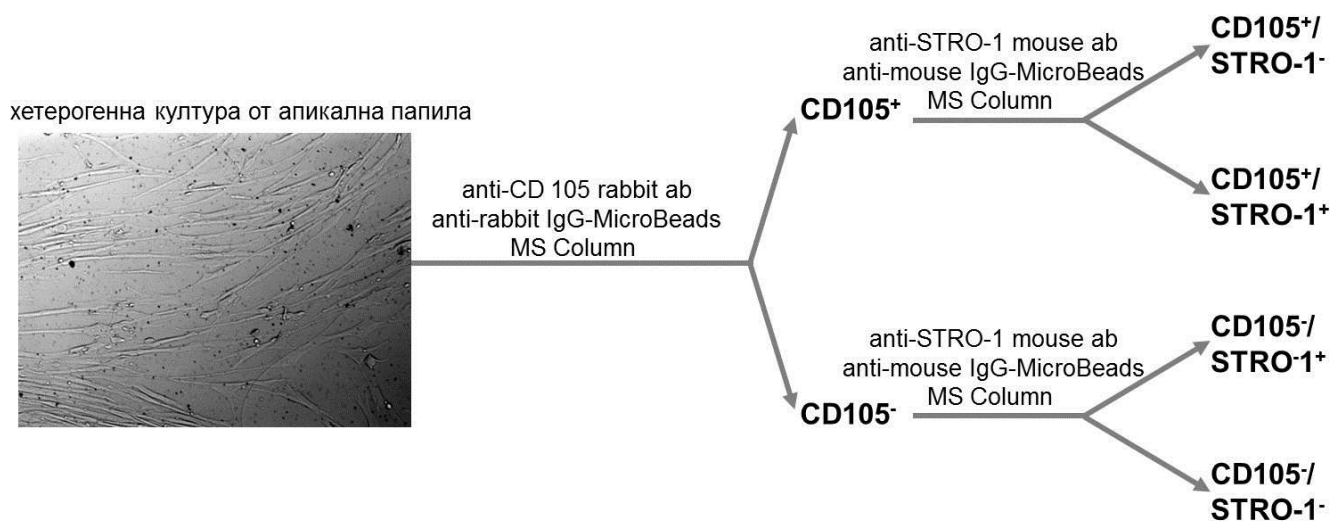
IV. 2. 2. In vitro култивиране и пасажирание на изолираните първични клетки от дентална папила.

Клетъчните култури бяха култивирани при температура 37°C, 5% CO₂ и 50% влажност в инкубатор. При достигане на около 80% конfluентност/плътност, клетките бяха отлепени от петритата и засявани в матраци (Greiner Bio – One, Frickenhausen, Germany) за клетъчно култивиране. За да бъдат отлепени клетките, първо се промиваха с PBS. След това се инкубираха за 10 мин с 0,5 – 1 мл 0,05% трипсин/ЕДТА (етилен – диамин – тетра – ацетат) (Lonza, Verviers, Belgium), който да покрие дъното на съда. След това се промиваха обилно 2 – 3 пъти с PBS, за да могат да бъдат събрани всички отлепени клетки. Получената клетъчна суспензия беше прехвърлена в 15 – милилитрови пластмасови туби (Greiner Bio – One, Frickenhausen, Germany) и се центрофугираха за 4 мин на 3000 оборота/мин. Утаените клетки се ресуспендираха в хранителната среда и се засяваха в нов съд с добавени антибиотици и 10% фетален серум. Клетки се засяваха с гъстота 5×10^3 до 1×10^4 клетки/ см².

IV.2. 3. Магнитно сепарирание: Магнитно белязване на клетките за магнитно-активирано клетъчно разделяне (Magnetic labeling of cells for magnetic-activated cell sorting (MACS)).

Експоненциално нарастващите клетки, култивирани в 75 см² фласкове бяха събрани чрез трипсинизиране и получената от центрофугирането клетъчна утайка бе ресуспендирана в охладен MACS buffer (0,5mg BSA/1ml PBS, Miltenyi Biotec, USA), клетъчният брой на получената суспензия беше определен с хемоцитометър. Клетъчната суспензия беше центрофугирана отново, супернатантата беше отстранена, а получената утайка беше ресуспендирана с anti-human CD105 ab, разреден в MACS buffer, и инкубирана за 60 мин. на 4°C при непрекъснато разбъркване на ниски обороти на ротационна клатачка (Multi Bio RS – 24, BOECO, Germany), след което следва 45-минутно инкубиране с вторично анти тяло IgG- MicroBeads ab (Miltenyi Biotec, USA) на 4°C при непрекъснато разбъркване при ниски обороти на ротационна клатачка. След изтичане на 45-минутната инкубация,

клетките бяха утаени при 2000 rpm, 4°C, за 2 мин. и ресуспендирани в MACS buffer. CD 105-магнитно белязаните клетки бяха сепарирани в MS Column (Miltenyi Biotec, USA) на CD 105-експресиращи (CD105⁺) и CD105-неекспресиращи (CD105⁻) клетки. Броят на CD 105⁺ и CD105⁻ клетки беше хемоцитометрично определен. CD105⁺ и CD105⁻ субпопулациите бяха магнитно белязани за експресията на STRO-1, при описаните по-горе условия. STRO-1 магнитно белязаните клетки бяха сепарирани на CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁻/STRO-1⁺ и CD105⁻/STRO-1⁻ в MS Column и клетъчният брой на всяка от субпопулациите бе определен с хемоцитометър (фиг.6). Получените субпопулации бяха култивирани за последващи експерименти.



Фиг. 6. Ход на работа на магнитно-активирано клетъчно разделяне

Накратко: хетерогенната клетъчна култура се добавя в сепариращата колона, поставена в магнитно поле. Под действие на гравитацията, клетките преминават през магнитното поле. Маркираните с магнитни микрочастици клетки се задържат от магнитното поле в колоната. Отрицателната фракция клетки изтичат в епруветка. След отмиване на отрицателната фракция от колоната, тя се изнася извън магнитното поле и се промива с помощта на бутало. Положително-маркираните клетки се събират в отделна епруветка.

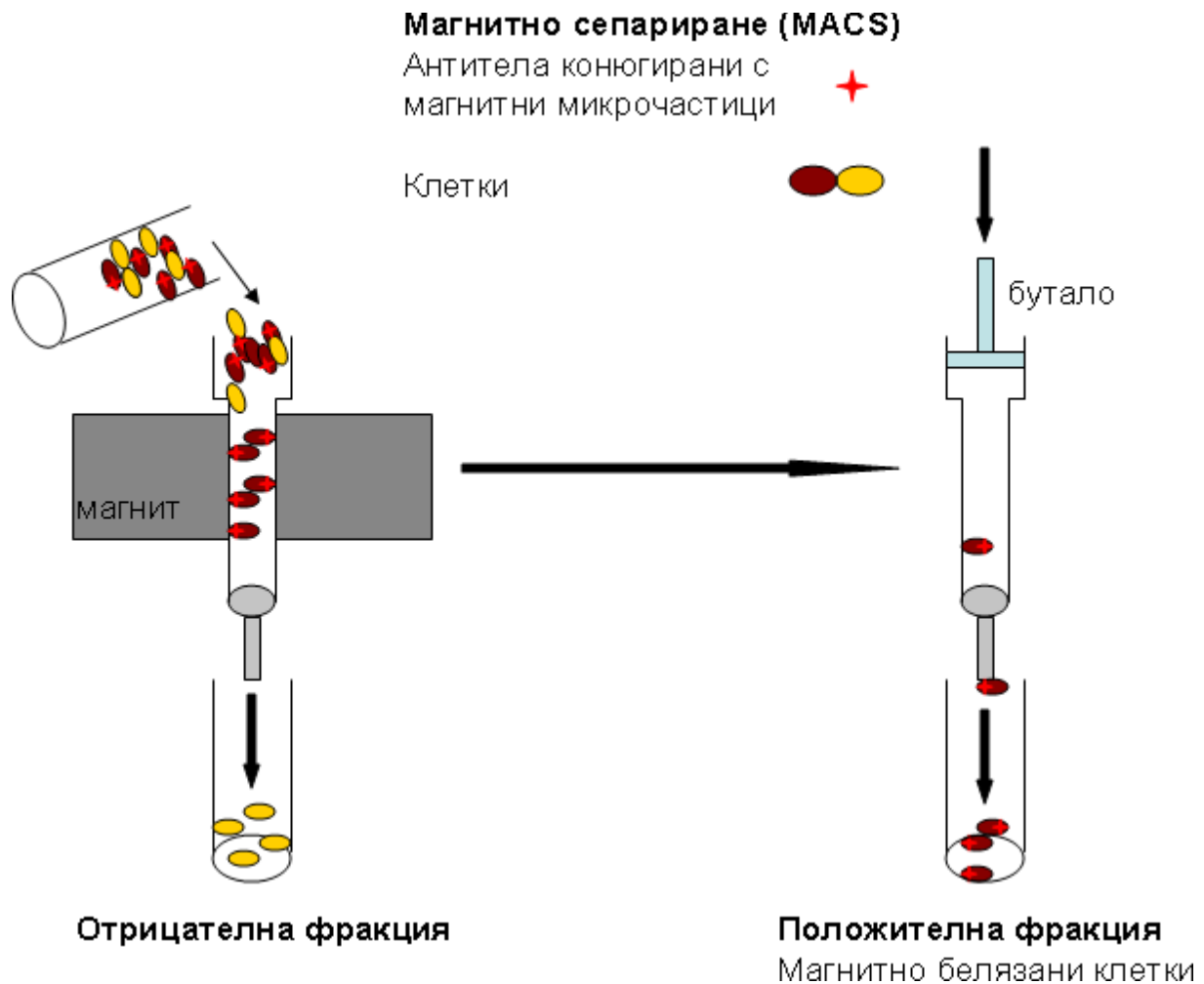


Схема.2. Схема илюстрираща магнитно сепариране.

IV2. 4. BrdU белязване на хетерогенни и фенотипно специфични (хомогенни) култури от апикална папила:

Приготвяне на 10 mM BrdU stock solution-разтваряне на 3 mg/ml BrdU в H₂O (съхраняван на тъмно, 4⁰ C), от който се приготвя стерилен 10μM BrdU в DMEM. Клетките бяха инкубирани с 100μl/ямка 10μM BrdU в DMEM за 2,50 часа на 37⁰C и 5% CO₂ в инкубатор.

IV 2. 5 si RNA медирано-заглушаване на каталитичната α и некаталитичната β субединица СК2 в хетерогенни и хомогенни популации.

При достигане на 35% конфлуентност мезенхимните клетъчни субпопулации бяха стимулирани да пролиферират автокринно чрез культивирани в DMEM с високо съдържание на глюкоза, съдържаща 0,5% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, 100 U/ml

penicillin/100 mg/ml streptomycin на 37⁰C и 5% CO₂ в инкубатор. 70% конfluентните автокринно пролифериращи фенотипове бяха трансфектирани с 20 pmol casein kinase IIa siRNA (Santa Cruz Biotech., USA), CK2β siRNA (Santa Cruz Biotechnology, USA) контролните клетки с 20 pmol Control siRNA (scrambled siRNA) чрез комплексен кит за трансфекции (siRNA Reagent System, Santa Cruz Biotech., USA) по трансфекционния протокол на производителя.

IV 2. 6 Третиране с рекомбинантен, човешки растежен фактор BMP4

Клетките от всички магнитно-активирани клетъчно сортирани субпопулации бяха засяти по 1 x 10⁴ клетки/ямка в 96 ямкови плаки (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) в DMEM с 10% серум, антибиотици и с високо съдържание на глюкоза, на 37⁰C и 5% CO₂ в инкубатор. При достигане на 35% конfluентност, концентрацията на серума бе сменена на 0,5%, при което условията бяха променени на автокринни и при достигане на 65% конfluентност, клетките бяха третирани с 10 ng/ml рекомбинантен BMP4 (Sigma-Aldrich, USA), разтворен в DMEM (0,5% FBS, 2 mmol/L glutamine, 100 U/ml penicillin/100 mg/ml streptomycin), и култивирани за 24 часа на 37⁰C и 5% CO₂.

IV. 2.7. Имунофлуоресцентно оцветяване и микроскопия на

IV 2. 7. 1. живи P1 хетерогенни култури: 60-65% конfluентните хетерогенни или хомогенни култури бяха индиректно имунофлуоресцентно маркирани чрез прилагането на anti-CD105 ab и CD117 или CD44 или anti-STRO-1 ab , прилагане на anti-STRO-1 ab и CD117 или CD44, и последваща инкубация с anti-rabbit IgG-FITC и с anti-mouse IgG 555 (всички от Santa Cruz Biotech., USA), последвана от краткотрайно фиксиране с 2% параформалдехид.

IV 2. 7. 2. фиксирани клетки и Xylenol orange маркирани. 60-65% конfluентните хетерогенни или хомогенни култури бяха фиксирани с 2% параформалдехид; 3 x 5 мин. промиване с PBS; последвано от 30 мин. блокиране с 1-2% BSA в 0,05% Tween PBS на хоризонтална клатачка на ниски обороти, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; 1ч. инкубация с първо първично ab на хоризонтална клатачка на ниски обороти, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; 45 мин. инкубация с първо вторично флуоресцентно белязано на хоризонтална клатачка на ниски обороти, на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS; 1 ч.

инкубация с второ първично аб на хоризонтална клатачка на ниски обороти на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; 45 мин. инкубация с второ вторично флуорисцентно белязано хоризонтална клатачка на ниски обороти на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; 10 мин. инкубация с 2%Neochst 3342 на хоризонтална клатачка на ниски обороти на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT;.

- Приготвяна 20 μM разтвор на Xylenol orange, с който клетките бяха инкубирани за 12 часа на 37⁰C и 5% CO₂ в инкубатор.

IV 2. 7. 3. пермеабелизирани клетки. 60-65% конфлуентните хетерогенни или хомогенни култури бяха фиксирани с 2% параформалдехид; 3 x 5 мин. промиване с PBS; последвано от 30 мин блокиране с 1-2% BSA в 0,05% Tween PBS на хоризонтална клатачка на ниски обороти, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; последвана от пермеабелизация с 0,05% TritonX-100 за 30 мин RT; 1 ч. инкубация с първо първично аб на хоризонтална клатачка на ниски обороти, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; 45 мин. инкубация с първо вторично флуорисцентно белязано на хоризонтална клатачка на ниски обороти на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS; 1 ч. инкубация с второ първично аб на хоризонтална клатачка на ниски обороти на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; 45 мин. инкубация с второ вторично флуорисцентно белязано хоризонтална клатачка на ниски обороти на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT; 10 мин. инкубация с DAPI (Santa Cruz Biotech, USA) на хоризонтална клатачка на ниски обороти, на тъмно, RT; 3 x 5 мин. промиване с PBS на хоризонтална клатачка на високи обороти, RT;.

Индиректно имунофлуоресцентно маркираните клетки бяха анализирани на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences, USA).

IV 2. 8. Визуализиране на мултифлуоресцентните изображения.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X и 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 555nm, 640nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязания протеин, IgG-CY5, IgG-CFL-647 и DAPI/Neochst 3342-белязаните ядра.

IV. 2. 9. Обработка на мултифлуоресцентните изображение и количественият анализ чрез алгоритъм.

Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия беше изчислен чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI/Neochst 3342-белязаните ядра (405 флуоресценция), спрямо 488 флуоресценция, или 640 имунофлуоресценция, или 555 имунофлуоресценция.

IV. 2. 10. Статистически анализи.

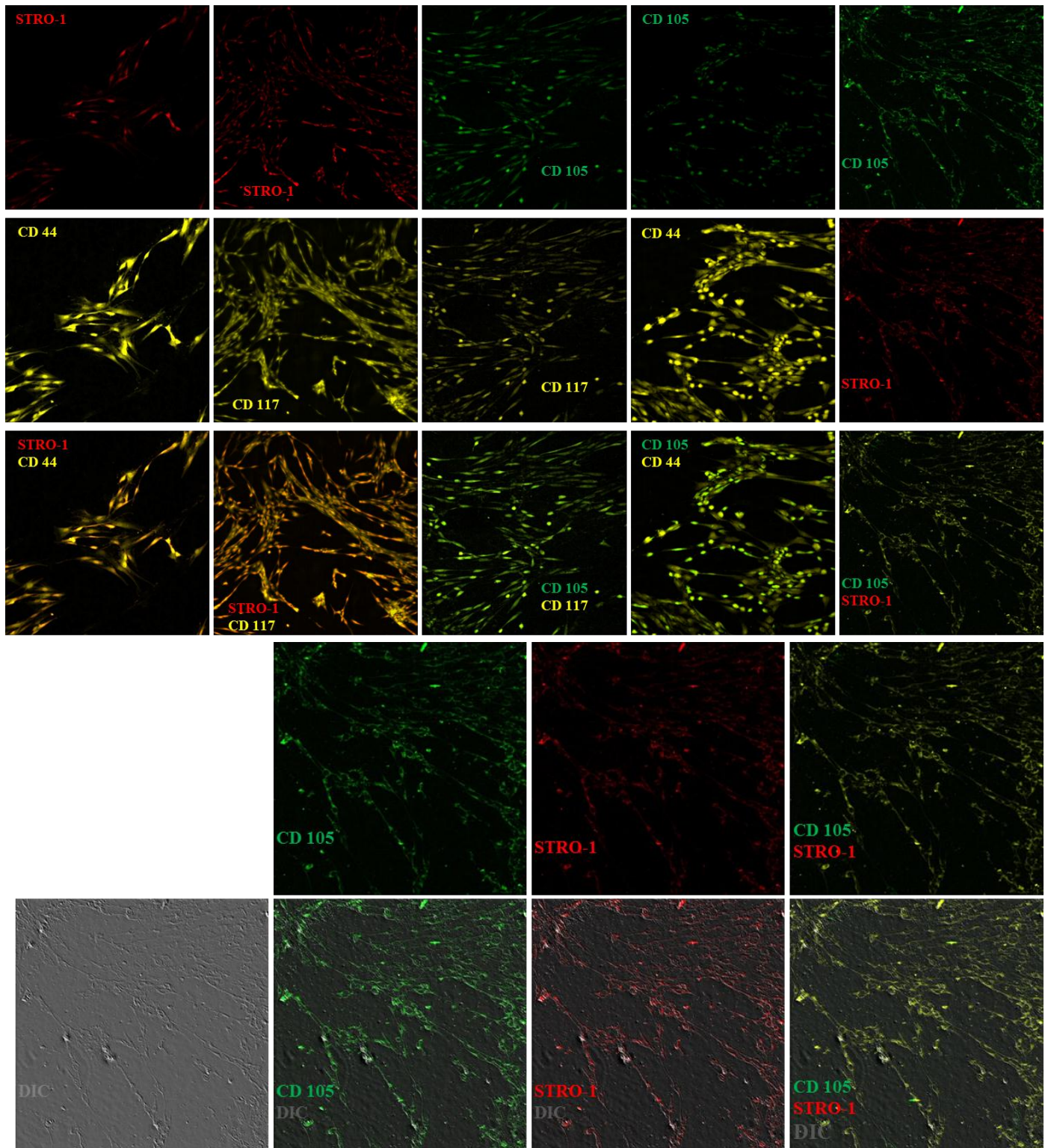
- *T-test, където стойността на P е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^* < 0.001$ SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA)*
- *Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA)*

V. Резултати:

V. 1. Фенотипизиране на хетерогенни култури от апикална папила въз основа на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните стволови маркери CD44, CD117, CD105, STRO-1 и вътреклетъчната експресия на цитоскелетния белтък-Vimentin

V. 1. 1. Изследване на хетерогенния състав на P1 клетки от апикална папила за присъствието на CD44, CD117, CD105 и STRO-1 експресиращи маркери – клетки

Експоненциално растящите в пълноценна хранителна среда клетъчни култури бяха индиректно имунофлуоресцентно маркирани срещу CD44, CD117, CD105 и STRO-1 и анализирани при подаване на CO₂ на In Cell Analyzer 6000

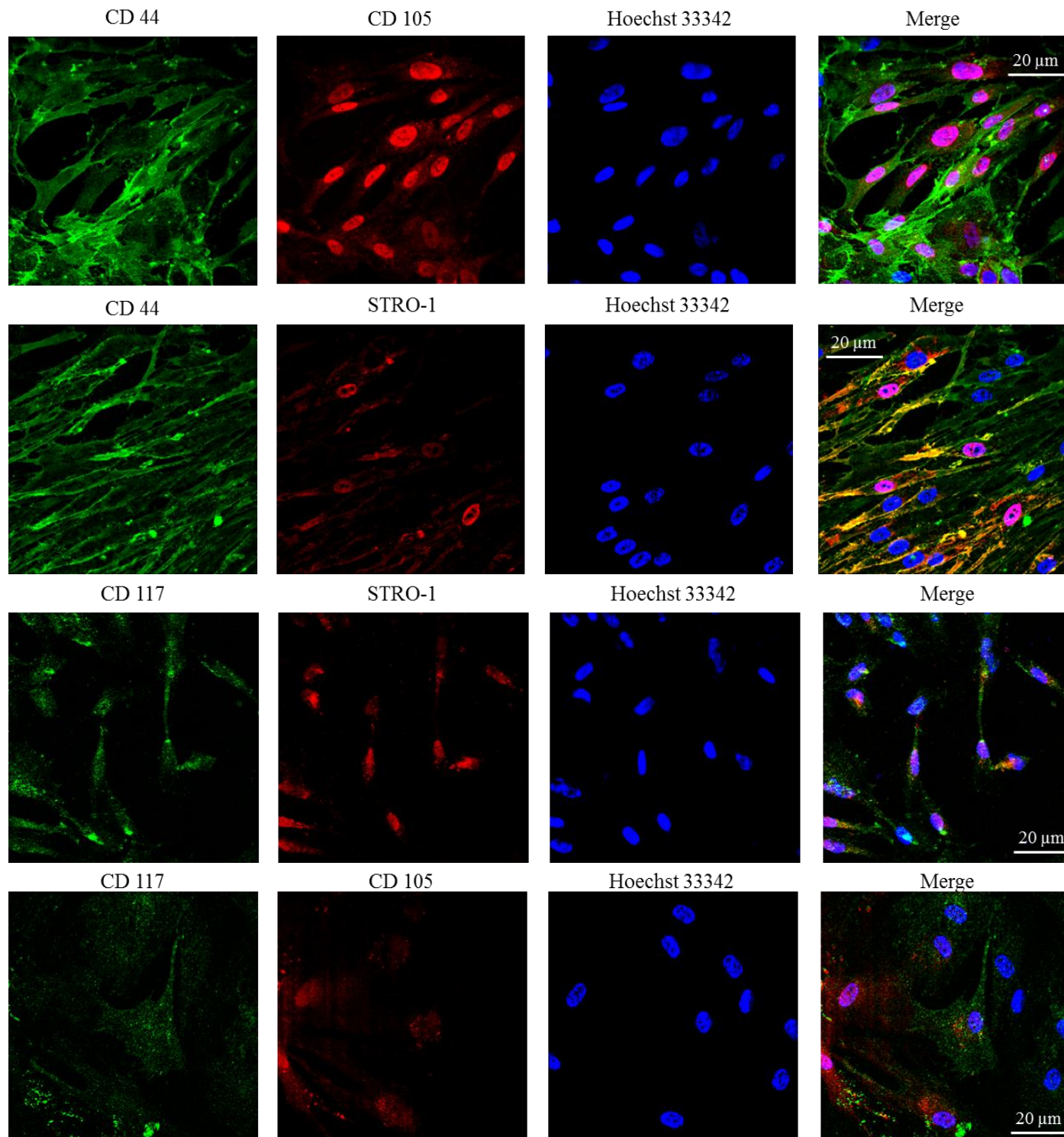


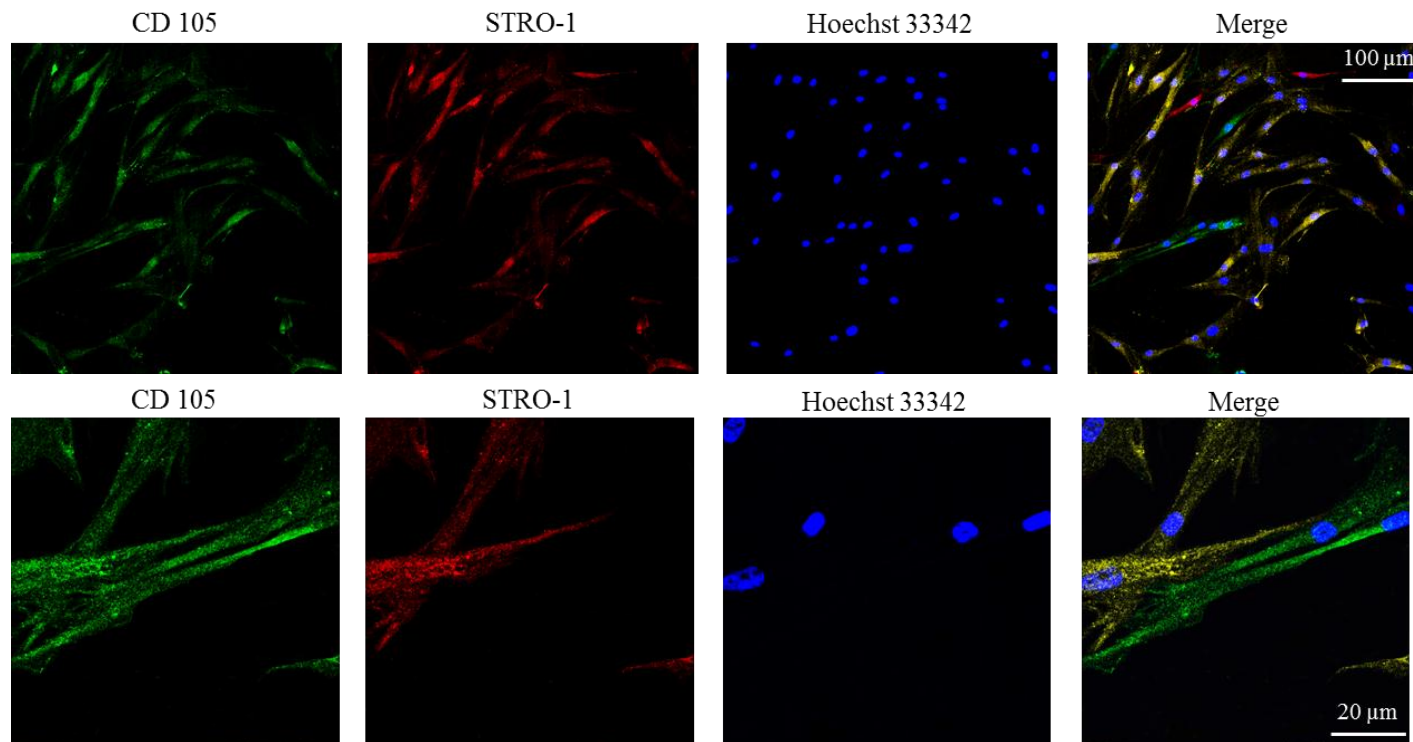
Индиректен имунофлуорисцентен и диференциален интерферентен контраст (DIC) микроскопски анализ за клетъчно повърхностна експресия на CD44, CD117, CD105 и

STRO-1 върху живи клетки, P1. Увеличение 20X и при подаване на CO₂ на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Виталното имунофлуоресцентно оцветяване показва широко разпространена експресия на CD44⁺ и сравнително голям брой от положителните CD44⁺ клетки, експресират и CD105, докато сравнително малко количество от положителните CD44⁺ клетки, експресират STRO-1. Едновременно с това всички положителни CD117⁺ клетки експресират CD105 и относително голямо количество се наблюдава при STRO-1 експресиращите. Въз основа на експресиращите маркери разделяме клетките на CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁺ и CD105⁺/STRO-1⁻. Получените данни ясно показват фенотипната хетерогенност по отношение на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните маркери - CD44, CD117, CD105 и STRO-1 на hDAP.

За да може да се определи още по прецизно и да се докаже кои клетки експресират съответните мезенхимни маркери, експоненциално растящите в пълноценна хранителна среда клетъчни култури бяха фиксирани в меки условия, за да не се наруши целостта на плазмената мембрана и бяха индиректно имунофлуоресцентно маркирани срещу клетъчно повърхностната експресия на CD44, CD117, CD105, STRO-1

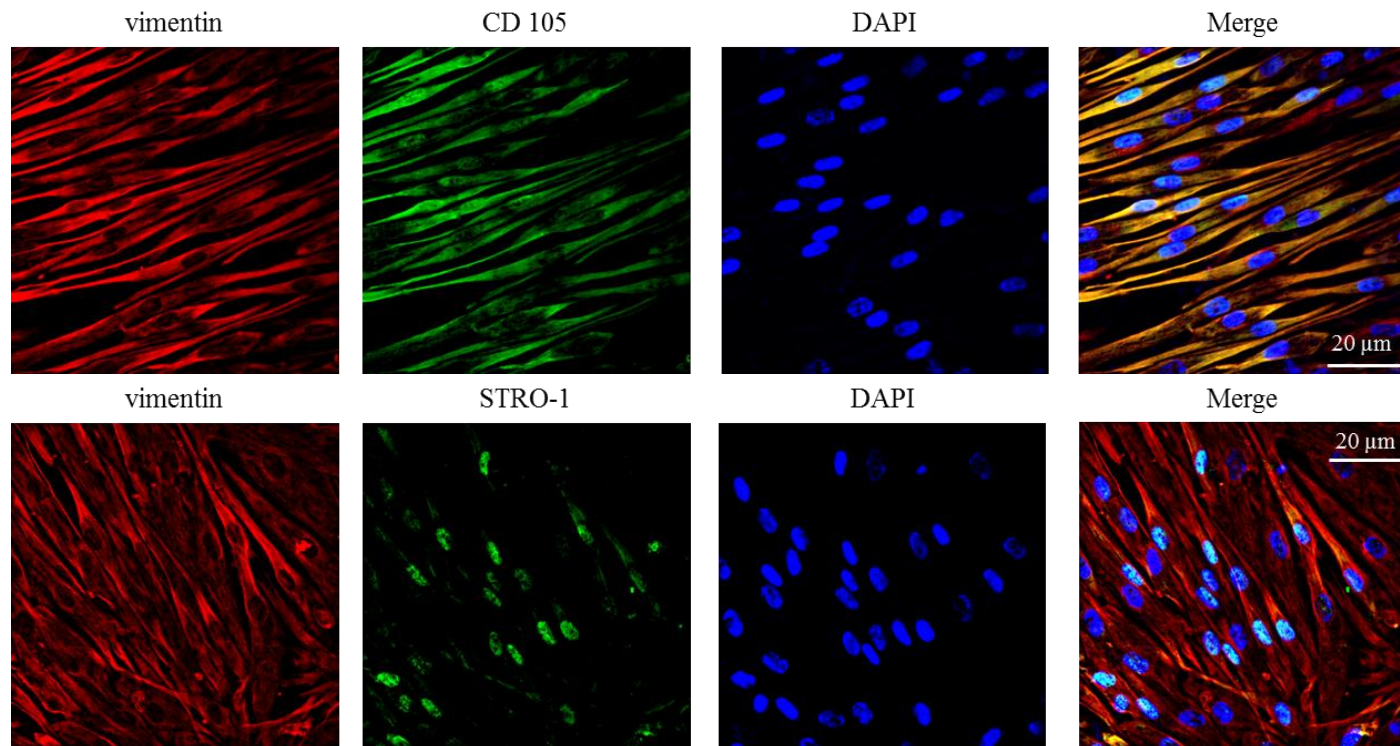




Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на повърхностната експресия на CD44, CD117, CD105 и STRO-1 в клетки, изолирани от човешка апикална папила. Увеличение 20X и 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000

V. 1.2. Изследване на вътреклетъчната локализация на цитоскелетният белтък Vimentin в клетки, експресиращи и неекспресиращи маркерите CD105 и STRO-1.

Виментинът е цитоскелетен белтък характерен за всички до този момент клетки с мезенхимен произход, и който е използван от някои екипи като маркер за потвърждаване като не променен мезенхимен тип в *in vitro* културални условия. Поради това, експоненциално растящите хетерогенни култури бяха индиректно имунофлуоресцентно белязани срещу CD105, STRO-1 и цитоскелетния белтък Vimentin.



Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на повърхностната експресия на цитоскелетния белтък- Vimentin, CD105 и STRO-1 в клетки, изолирани от човешка апикална папила. Увеличение 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000

От анализираниите имунофлуоресценции се установава, че цитоскелетния белтък Vimentin, се експресира като при CD105 експресиращите клетки, така и при STRO-1-клетките, т.е. епигенетичните фактори действащи в хода на клетъчното култивиране не са повлияли върху мезенхимния фенотип на изследваните клетки, изолирани от апикална папила. Тъй като виментинът бе установен и в клетките неекспресиращи маркерите за стволовост се налага извода, че този цитоскелетен белтък не може да се използва като маркер за стволовост в клетките от тъканта.

V. 1. 3. Определяне числеността на фенотипно специфичните субпопулации в хетерогенния състав на P1 клетки от апикална папила.

Анализ на броя на CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁻ клетки чрез количествен анализ на мултифлуоресцентното белязване, описано в т. 1.1 и

чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране (Cell Sorting-MACs) на клетки, изолирани от дентална папила.

	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / CD105 ⁺	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / CD105 ⁻	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / STRO-1 ⁺	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / STRO-1 ⁻	CD105 ⁺ / STRO-1 ⁻	CD105 ⁺ / STRO-1 ⁺	CD105 ⁻ / STRO-1 ⁺	CD105 ⁻ / STRO-1 ⁻
P ₁ , mean±SD, n=9, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	66% ± 0,0938 **	34% ± 0,0946 **	23,65% ± 0,1324 *	75,35% ± 0,1497 *	25,22% ± 0,0163 **	14,90% ± 0,0208 **	20,84% ± 0,0382 *	39,26% ± 0,0066 **

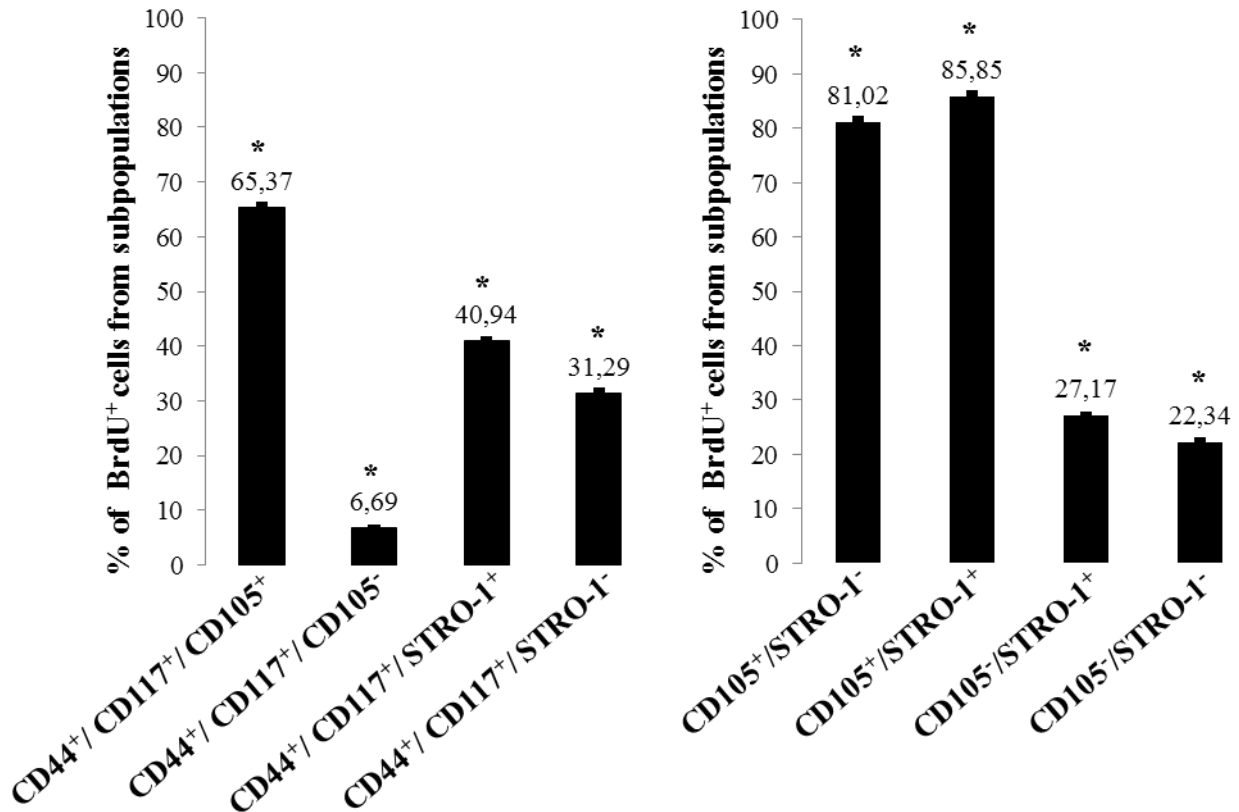
Табл. 2. Проследяване броят на CD105⁺, CD105⁻, STRO-1⁺, STRO-1⁻ и на CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁻ клетки в хода на рутинното клетъчно пасажирание чрез Cell Sorting-MACs и чрезколичествения анализ на мултифлуоресцентното белязване

Половината от получените в хода на *in vitro* клетъчното култивиранете клетки от P1 отапикална папила, бяха анализирани за броя на CD105⁺, CD105⁻, STRO-1⁺, STRO-1⁻ и CD44⁺, CD117⁺ чрез количествен анализ на индиректната мултиимунофлуоресценция, показана в т.1.1. А, другата половина бяха разделени на четири фенотипно-специфични популации CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁻ чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране(Cell Sorting-MACs). Получените мултифлуоресцентни микроскопски изображения бяха подложени на алгоритъм, при който бе установен броят на клетките експресиращи съответните маркери CD44⁺, CD117⁺, CD105 и STRO-1 - 66% от клетките положителни за CD105, експресират CD44 и CD117, 34% от клетките нямат CD105, експресират CD44 и CD117, при клетките, които са позитивни за STRO-1 едва 23,65% експресират CD44 и CD117 и 75,35% се наблюдават при популацията от клетки, които не експресират STRO-1. От проведеното количествено индиректно магнитно сепариране бе установен броят на четирите фенотипа: при CD105⁺/STRO-1⁻ се установява, че 25,22% от STRO-1 негативни, са положителни за CD105, при двойно положителните CD105⁺/STRO-1⁺, 14,90% експресират CD105 положителни, 20,84% са STRO-1 положителни във фенотипа CD105⁻/STRO-1⁺ и при двойно-негативните се установява най-голям процент 39,26%.

V. 2. Изследване на пролиферативната активност и самовъзобновяващия потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила

V. 2. 1. Изследване на инкорпорирането на BrdU в хетерогения състав на последващи пасажни на клетки от апикална папила

Експоненциално автокринно растящите клетки от последователни пасажни, достигайки до 60-65% конfluентност бяха инкубирани с 10µM BrdU в DMEM за 2,50 часа и индиректно имунофлуоресцентно белязани срещу инкорпорираната се в новосинтезираната ДНК верига BrdU и маркерите CD105 или STRO-1. Получените мултифлуоресцентни изображения бяха подложени на алгоритъм, като за всеки експеримент се изчислява цялата ямка и се установява процентът единични положителни и двойно положителни клетки на база алгоритъм за идентифициране на ядра на база DAPI багрило, BrdU-съдържаща ДНК (за 647 флуоресценция или 488 флуоресценция) и протеинова експресия на базата на 488 флуоресценция (за STRO-1) или 555 флуоресценция (за CD105), съответно.



Фиг. 7 и 8. Проследяване на репликационна активност в хетерогенни и хомогенни субпопулации. Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0

(Systat Software, San Jose, CA, USA) , където стойността на P_e по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^* < 0.05$

Анализирането на инкорпорирането на BrdU в последователни пасажи показва постоянна фенотипно-детерминирана пролиферативна активност на изследваните популации. При $CD44^+/CD117^+/CD105^+$ субпопулация, инкорпорирането на BrdU в новосинтезирана верига на ДНК е най-силно проявено- 65.37%, най-слабо инкорпориране се наблюдава във фенотипа, в който липсва мезенхимния маркер за $CD105$, едва 6.69%. В популацията, в която клетките експресират $CD44^+/CD117^+/STRO-1$ се установява 40.94% и 31.29% в субпопулацията от клетки, която не експресира мезенхимния маркер - $CD44^+/CD117^+/STRO-1^-$. При анализирането на $CD105^+/STRO-1^-$, $CD105^+/STRO-1^+$, $CD105^-/STRO-1^+$, $CD105^-/STRO-1^-$ субпопулациите, получени чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране (Cell Sorting-MACs) бе установено, че в двойно позитивния фенотип в най-голяма степен се инкорпорира BrdU -85.85%, в популацията не експресираща STRO-1 клетки 81.02%, във фенотипа не експресиращ $CD105$ - 27.17%, и в клетките, в които не се експресират и двата мезенхимни маркера $CD105$ и $STRO-1$, 22.34%. Тези данни показват, че с най-висока пролиферативна активност са клетките, експресиращи $CD105$, последвани от фенотиповете експресиращи $STRO-1$, а слабо пролиферативно активни са $CD105^-$.

V.2. 2. Изследване числеността на фенотипно специфичните субпопулации в последователни пасажи.

След като бе установено, че изследваните клетъчни фенотипове се характеризират с постоянна фенотипно детерминирана активност бе изследван и техния самовъзобновяващ се потенциал чрез проследяване на числеността им в хода на пасажирането им.

	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / CD105 ⁺	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / CD105 ⁻	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / STRO-1 ⁺	CD44 ⁺ / CD117 ⁺ / STRO-1 ⁻	CD105 ⁺ / STRO-1 ⁻	CD105 ⁺ / STRO-1 ⁺	CD105 ⁻ / STRO-1 ⁺	CD105 ⁻ / STRO-1 ⁻
P₁ , mean±SD, n=9, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	66% ± 0,0938 **	34% ± 0,0946 **	23,65% ± 0,1324 *	75,35% ± 0,1497 *	25,22% ± 0,0163 **	14,90% ± 0,0208 **	20,84% ± 0,0382 *	39,26% ± 0,0066 **
P₂ , mean±SD, n=6, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	65% ± 0,2159 *	35% ± 0,1571 *	20,91% ± 0,0330 **	78,08% ± 0,0191 **	22,18% ± 0,0243 *	11,99% ± 0,0180 *	16,70% ± 0,0103 *	49,13% ± 0,0131 *
P₃ , mean±SD, n=6, P* $<$ 0.05, P** $<$ 0.001	64% ± 0,2916 *	36% ± 0,2921 *	18,97% ± 0,0105 **	81,03% ± 0,0375 **	19,08% ± 0,0316 **	8,84% ± 0,0670 **	13,25% ± 0,0740 **	58,83% ± 0,0306 **
P₆ , mean±SD, n=4, P* $<$ 0.05	23,08% ± 0,7309 *	76,92% ± 0,4980 *	9,93% ± 0,1904 *	90,07% ± 0,3024 *	14,42% ± 0,5042 *	3,81% ± 0,4210 *	8,20% ± 0,3507 *	73,79% ± 0,3806

Табл. 3. Cell Sorting-MACs проследяване броят на CD44, CD117, CD105⁺, CD44, CD117, CD105⁻, CD44, CD117, STRO-1⁺, CD44, CD117, STRO-1⁻ и на CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁻ клетки в хода на рутинното клетъчно пасажирание.

Епигенетичните фактори въздействащи по време на *in vitro* култивирането съвместно с фенотипно детерминираната репликационна активност определят потенциалът на самовъзобновяване на всички клетъчни фенотипове. Получените резултати показват, че само част от клетките от CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁺ фенотиповете са способни на самовъзобновяване по отношение на повърхностната експресия на CD105 и на STRO-1. И най-малък е процентът на способността за самовъзобновяване на клетките от CD105⁺/STRO-1⁺, тъй като тяхната численост най-силно се редуцира в хода на пасажиранието. Твърде е вероятно дъщерните клетки, получени от деленето на CD105⁺/STRO-1⁺ да проявяват CD105⁺/STRO-1⁻ или CD105⁻/STRO-1⁺, както и несъмнено CD105⁻/STRO-1⁻ фенотипове. Докато дъщерните клетки, получени от деленето на CD105⁺/STRO-1⁻ или на CD105⁻/STRO-1⁺ да администрират майчиния и CD105⁻/STRO-1⁻ фенотип.

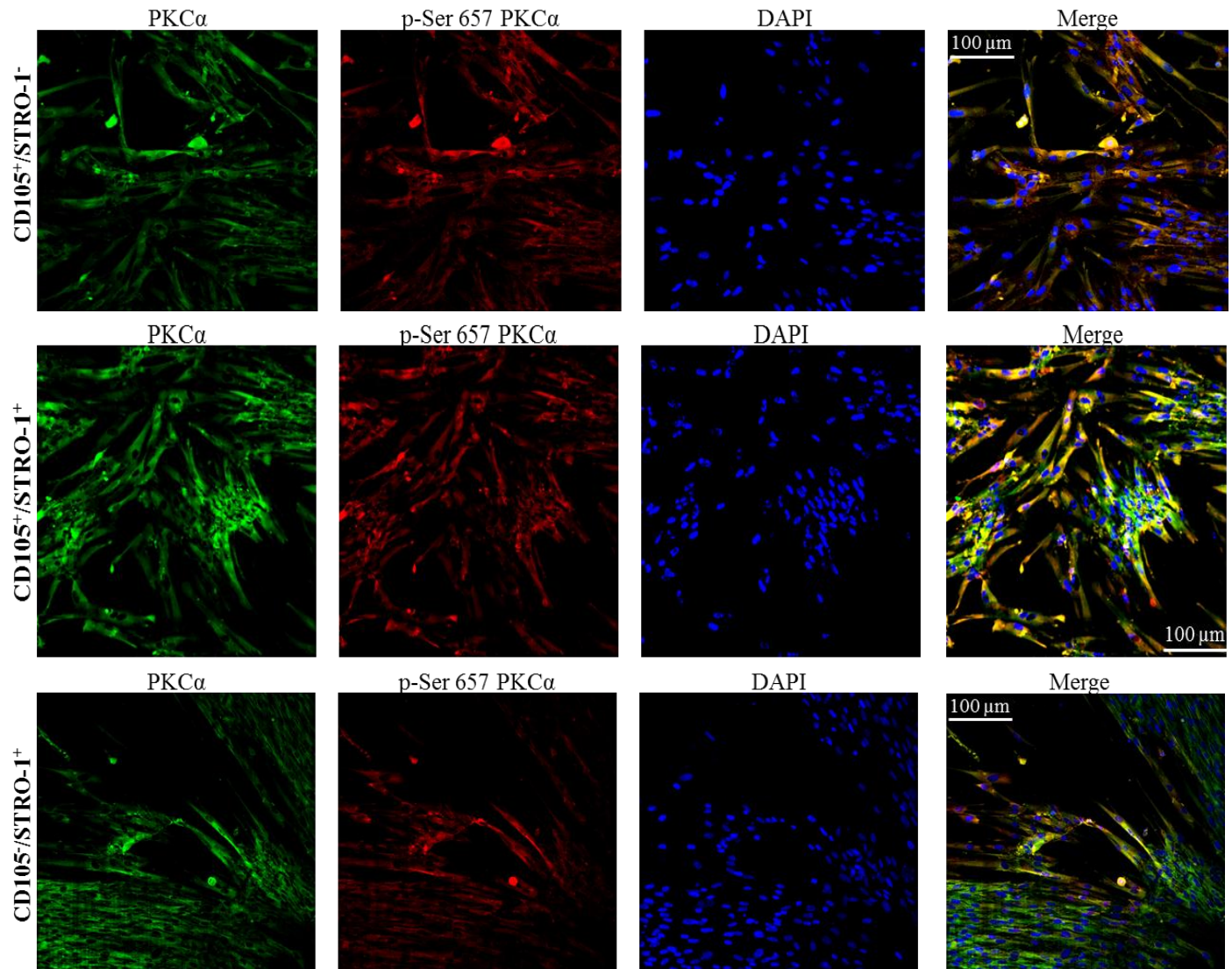
Горе описаните резултати показват, че изследваните фенотипове се характеризират с фенотипно детерминиран самовъзобновяващ потенциал: като CD105⁺/STRO-1⁻ са с най-висок потенциал за самовъзобновяване, последван от CD105⁻/STRO-1⁺, а най-слаб е на CD105⁺/STRO-1⁺ фенотипа. Въз основа на фенотипно специфичното редуциране на

числеността на изследваните субпопулации, заедно с постоянната им фенотипно детерминирана пролиферативна активност, може да се изведе извода, че в трите фенотипа протича асиметрично делене, което е най-силно изявено в $CD105^+ /STRO-1^+$. Протичането на асиметрично делене в изследваните фенотипове обяснява прогресивното нарастване, числеността на неекспресиращите $CD105^-$ и $STRO-1^-$ клетки в последователно пасажирание на изследваните култури. Поради геометрично нарастващият брой на $CD105^- /STRO-1^-$ клетките, дължащо се на най-вероятно протичащото в другите фенотипове асиметрично делене, може да се изведе извода, че в неекспресиращите $CD105^-$ и $STRO-1^-$ клетки протича соматична митоза.

V. 2.3. Изследване на експресията и функционирането на PKC alpha и ERK1,2 в клетъчни култури от апикална папила.

Поради установените разлики в пролиферативната активност на изследваните фенотипове бяха проведени и индиректни имунофлуоресцентни анализи за експресията и активността на много добре коментираните участници в регулацията, поддържаща пролиферативната клетъчна програма- ***PKC alpha*** и ***ERK1,2***

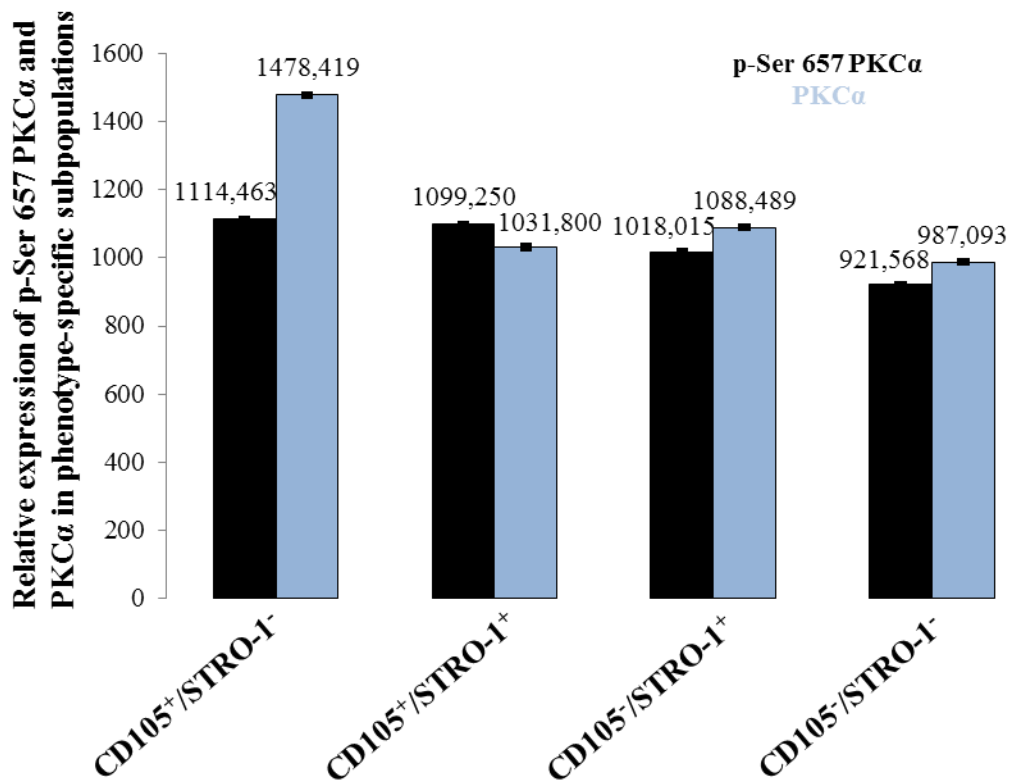
Експресия, активност и субклетъчна локализация на PKC alpha в автокринни $CD105^- /STRO-1^+$, $CD105^+ /STRO-1^+$ и $CD105^+ /STRO-1^-$ фенотипове.



Имунофлуоресцентно изследване на експресията, статуса на фосфорилиране и субклетъчната локализация на PKC α в експоненциално, автокринно растящи субпопулации CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁺/STRO-1⁻. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 640nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната PKC α , IgG-CFL-647-белязаната p-Ser-657-PKC α и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на PKC α и p-Ser-657-PKC α бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на PKC α (488

флуоресценция) и p-Ser-657-PKCalpha (640 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).

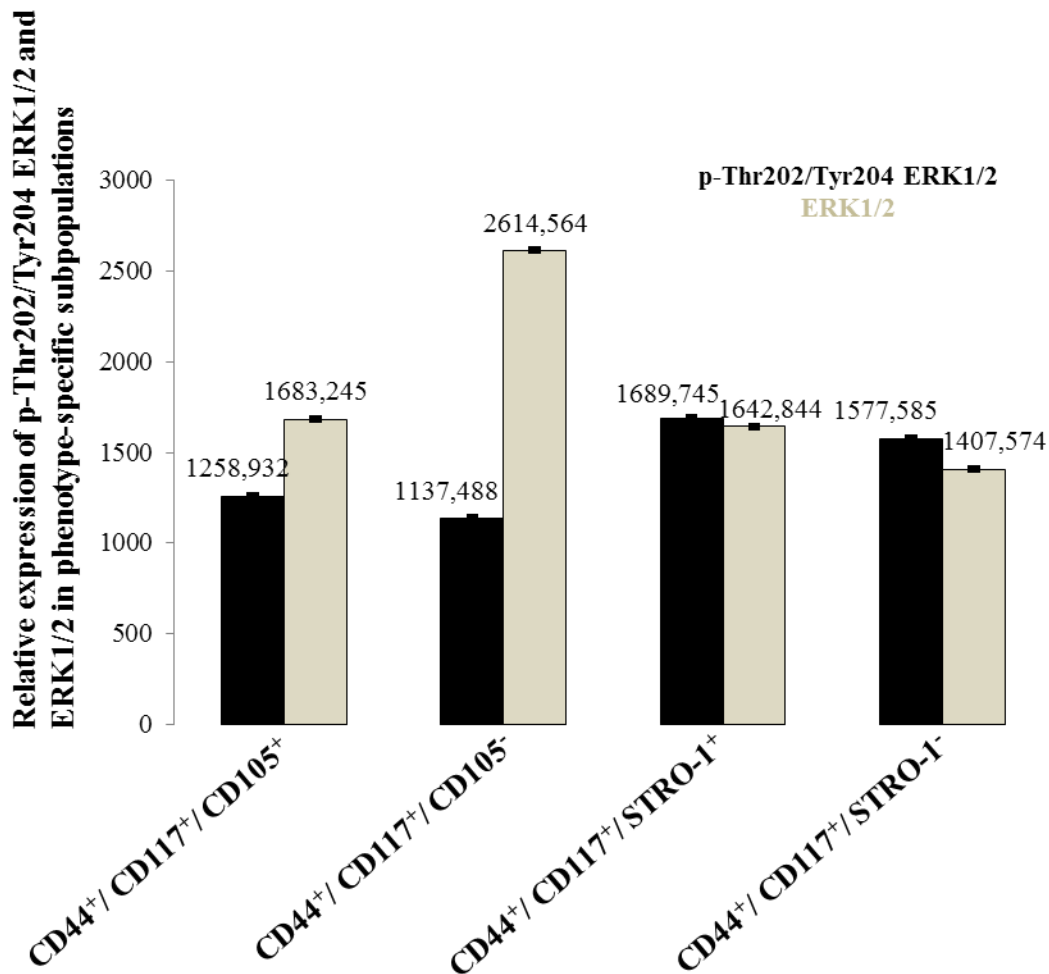


фиг.9. Определяне количествения анализ на експресията и статуса на фосфорилирането на PKC alpha и нар-Ser-657-PKCalpha.

Количественият анализ, показва че и в четирите фенотипа активността и експресията са в завишени количества, като най-голямо количество PKC alpha се експресира в субпопулацията на CD105⁺/STRO-1⁻.

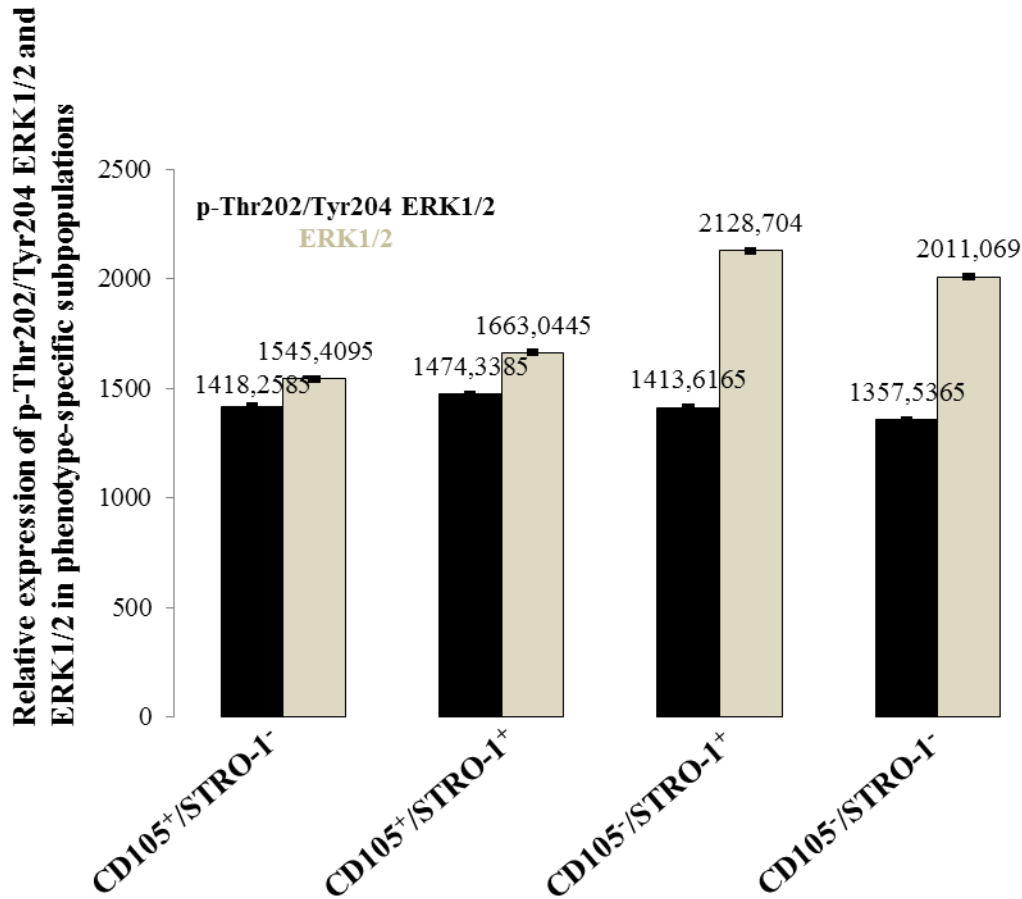
Експресия, активност и субклетъчна локализация на ERK1,2 в автокринни CD105⁻/STRO-1⁺, CD105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁺/STRO-1⁻ фенотипове.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 60X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 555 nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната *ERK1,2*, IgG-CY5-белязаната *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на *ERK1,2* и *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на *ERK1,2* (488 флуоресценция) и *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* (555 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).



Фиг.10. Определяне количествения анализ на експресия и активност на ERK1,2 в хетерогенните фенотипове.

Въз основа на получените данни, бе установено че експресията на **ERK1,2** драстично се увеличава в популацията от клетки, която не експресира мезенхимния маркер CD105, докато активността на **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2**, нараства в клетките експресиращи STRO-1⁺, така и на неекспресиращи STRO-1⁻.



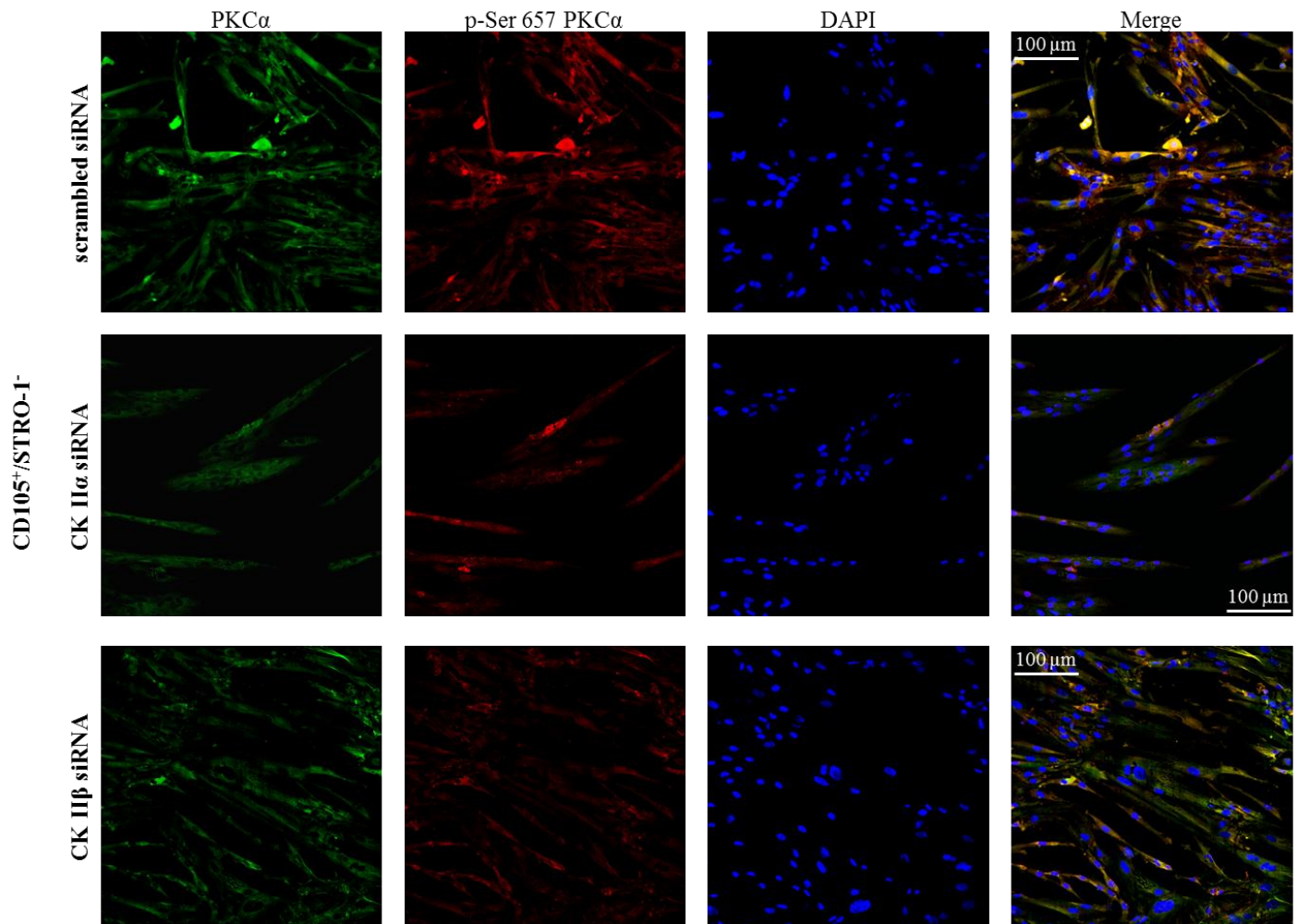
Фиг.11. Определяне количествения анализ на експресия и активност на ERK1,2 в хомогенните субпопулации.

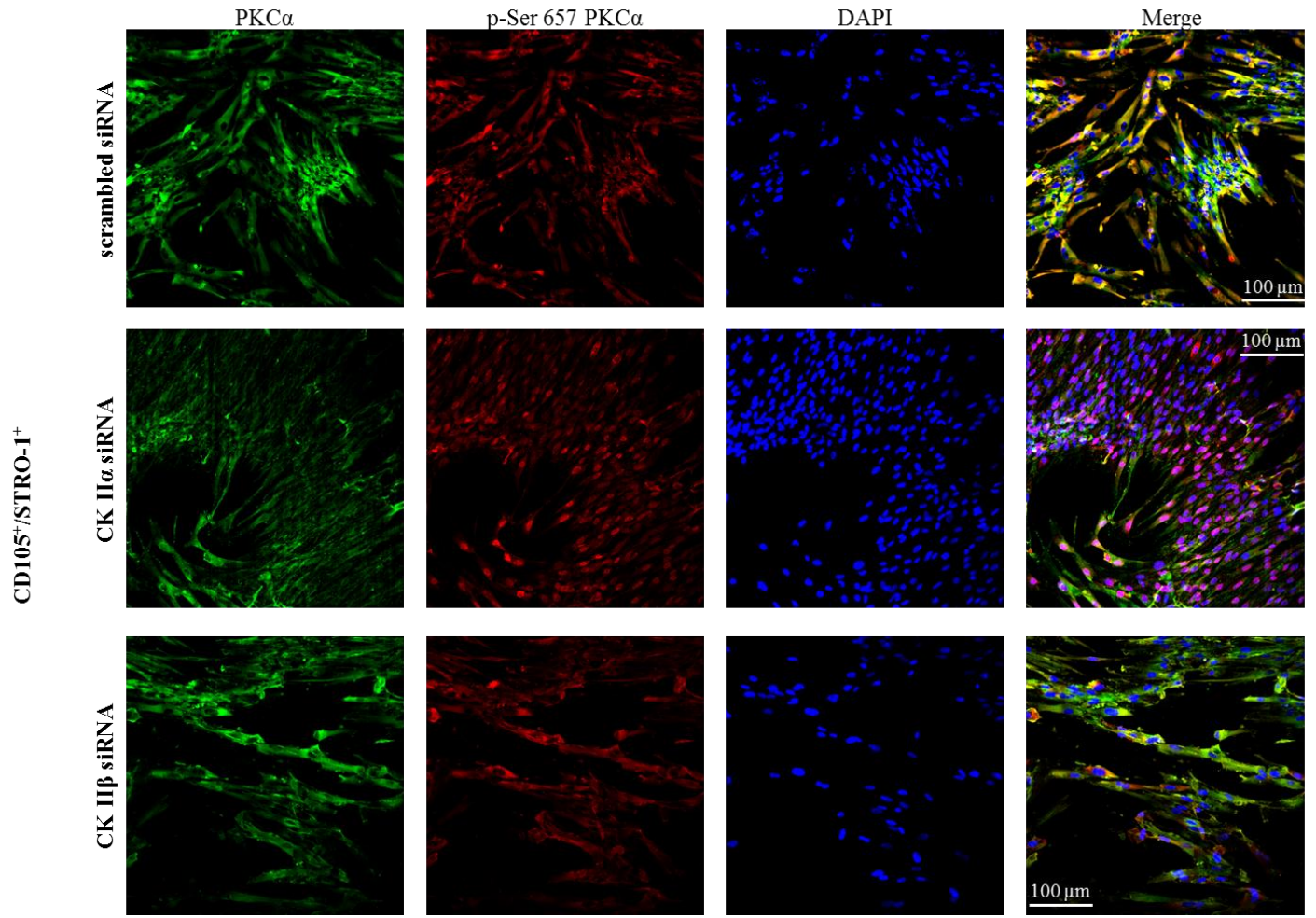
В изследваните фенотипове, получени вследствие на магнитно сепариране бе установено, че експресията на **ERK1,2** е завишена в популацията на CD105⁻/STRO⁺ и двойно негативната CD105⁻/STRO⁻, докато активността на фосфорилираната форма на **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2** се наблюдава в почти еднакви количества и в четирите субпопулации.

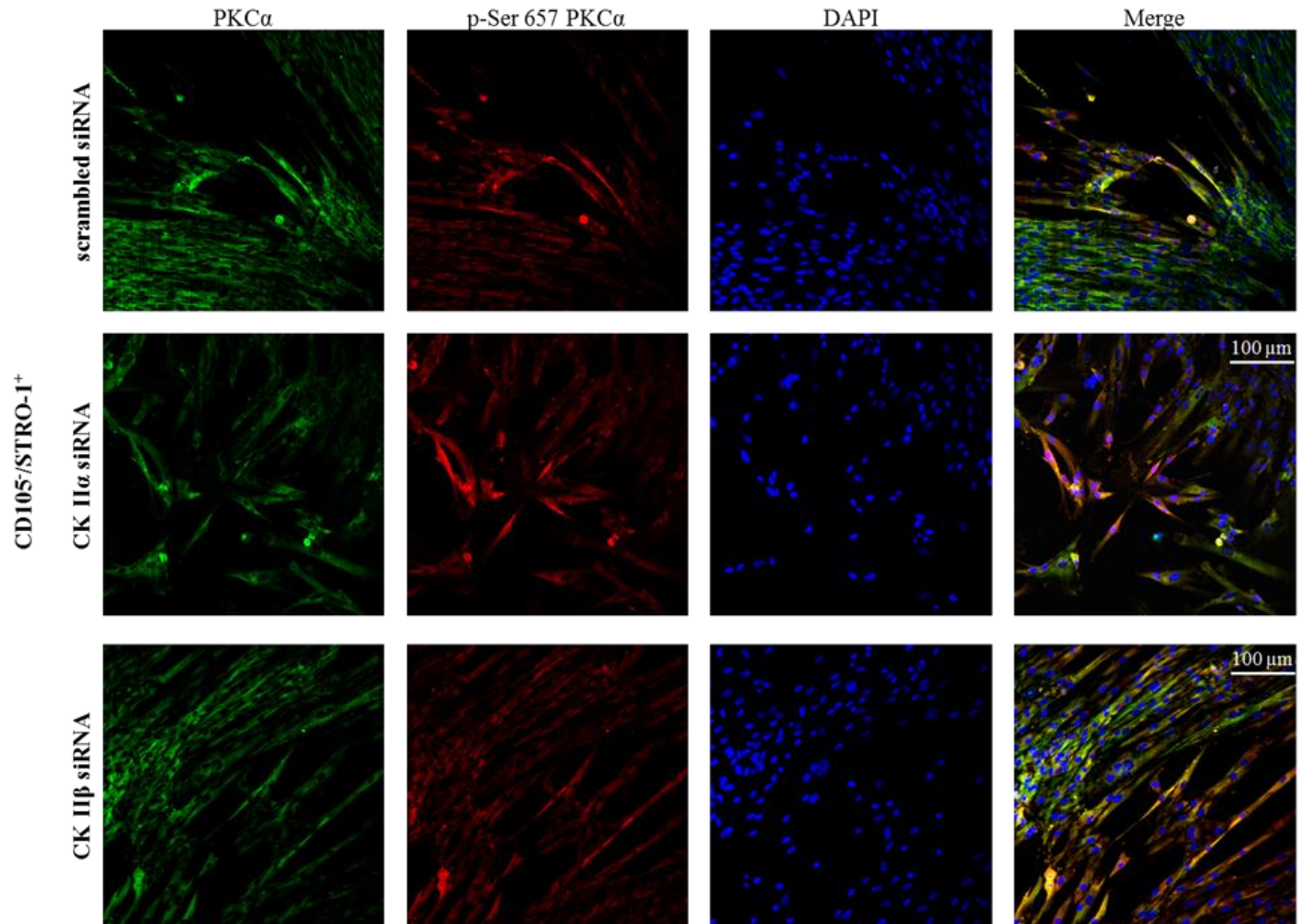
V. 3. Изследване ролята на каталитичната(α) и некаталитичната(β) субединица на протеин киназа СК2 в сигнализацията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.

V.3.1. Изследване на експресията и активността на PKC α при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при si RNA-медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица(β) в клетки от апикална папила.

Каталитичната или некаталитичната субединица на СК2 в експоненциално автокринно растящи клетки в хетерогенни култури или във фенотипно специфични хомогенни култури получени чрез MAC сепариране, беше si RNA- медирано заглушена и експресията и активността на PKC α бяха изследвани чрез индиректна имуофлуоресценция.

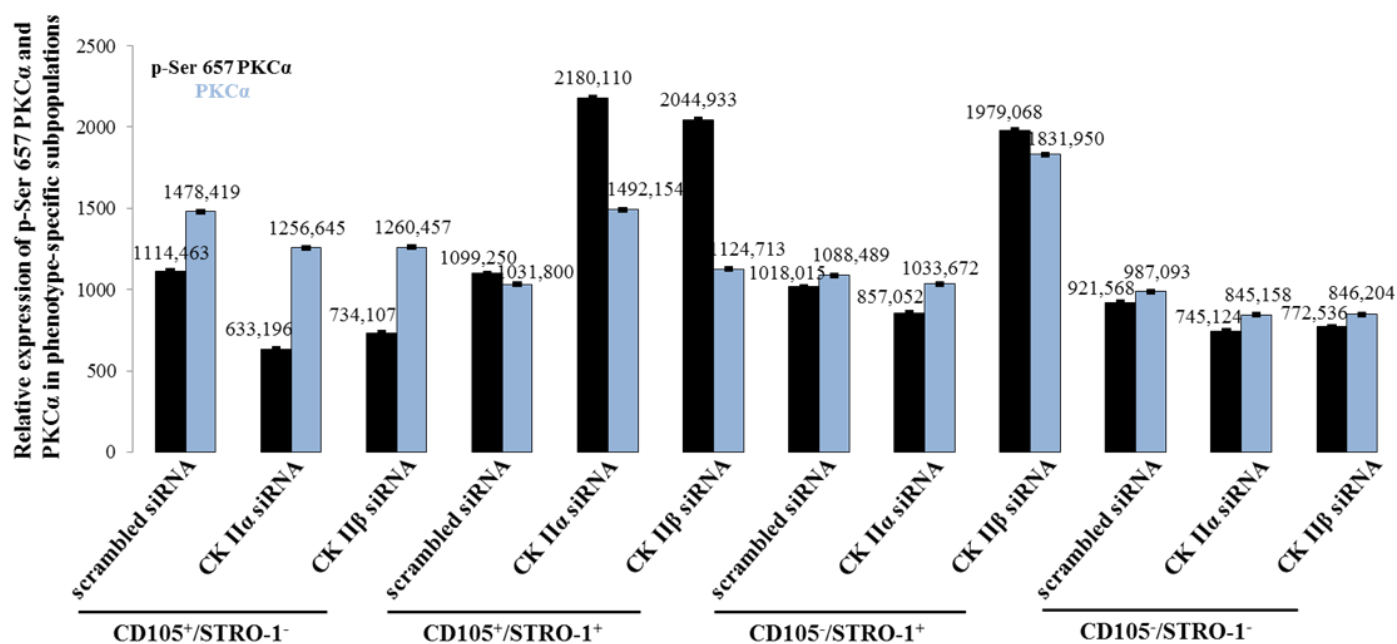






Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на РКC alpha в siRNA СКП α -трансфектирани, siRNA СКП β -трансфектирани и на посттрансфекционно BMP4-стимулирани hDAP. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 640nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната РКCalpha, IgG-CFL-647-белязаната p-Ser-657-РКCalpha и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на РКCalpha и p-Ser-657-РКCalpha бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на РКCalpha (488 флуоресценция) и p-Ser-657-РКCalpha (640 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).



Фиг.12. Определяне количествен анализ на статуса на фосфорилиране и експресия на РКC alpha в условия на *si RNA* – медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) и некаталитична (β).

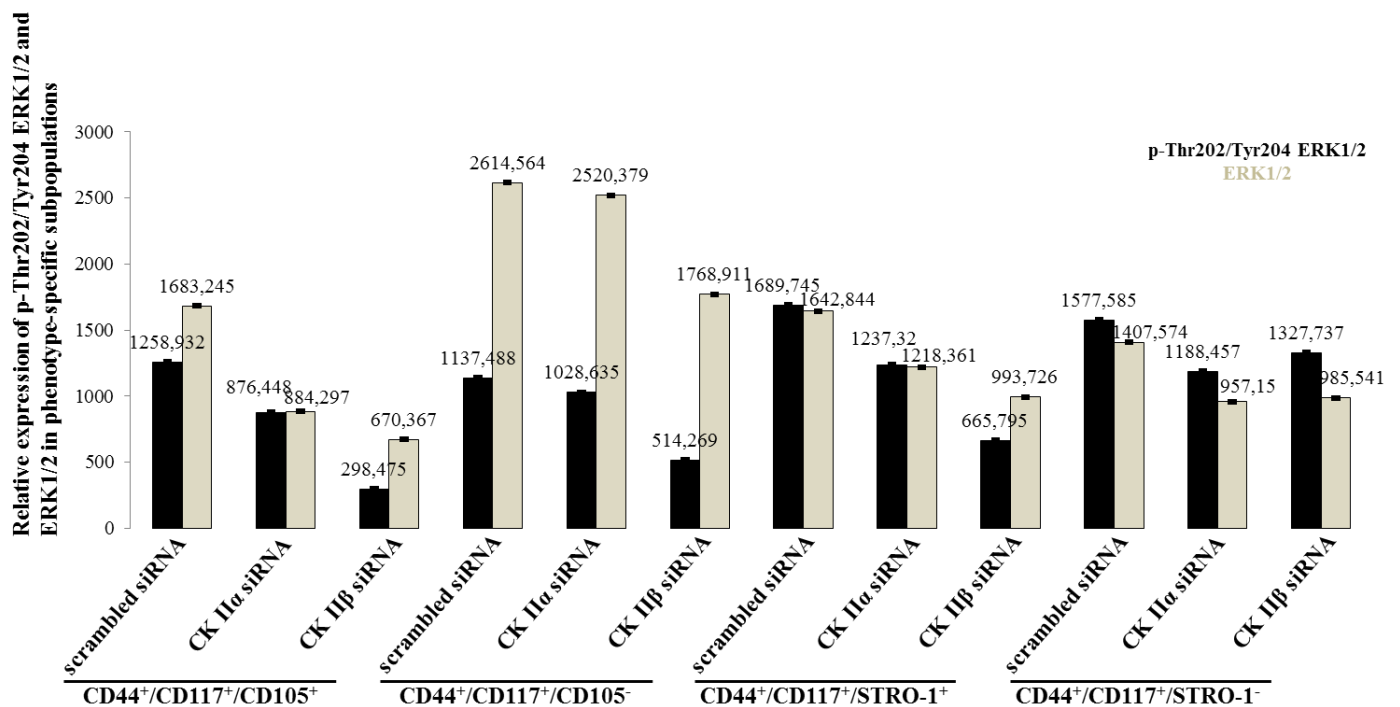
Въз основа на проведеня количествен анализ се установи, че в популацията $CD105^+/STRO-1^-$ при *si RNA* – медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) се наблюдава 4.24% инхибиране на фосфорилираната форма на p-Ser 657 PKC α , докато некаталитичната субединица (β), оказва противоположен ефект. При експресията на РКC alpha се наблюдава потискане вследствие на *si RNA* – медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) с 47.5%, както и при некаталитичната субединица (β) – 55%.

В двойно позитивния фенотип $CD105^+/STRO-1^+$ се установява стимулиращ ефект както на p-Ser 657 PKC α , така и на РКC α в резултат на *si RNA* – медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) и некаталитичната субединица (β).

В $CD105^-/STRO-1^+$ при потискане на (α) субединицата, се повлиява както p-Ser 657 PKC α (30.9% инхибиране), така и РКC α (47.9% инхибиране). При *si RNA* – медирано- заглушаване на некаталитичната субединица (β) се анализира стимулиращ ефект, както при p-Ser 657 PKC α , така и РКC α .

В двойно негативния фенотип при *si RNA*-медирано- заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) и некаталитичната субединица (β) се наблюдава потискане както на PKC α , така и на фосфорилираната ѝ форма.

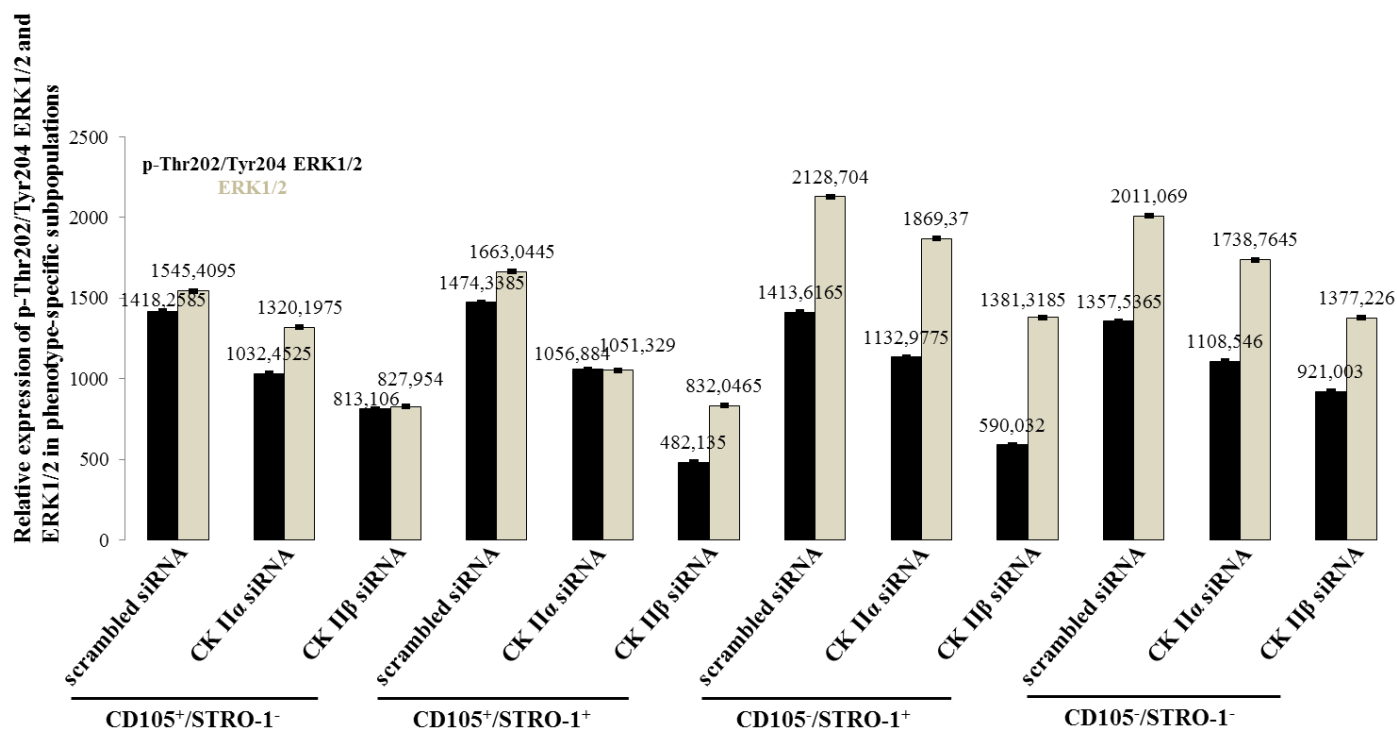
V.3.2. Изследване на експресията и активността на ERK1,2 при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при *si RNA* - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица (β) в клетки от апикална папила.



Фиг.13. Изследване на експресията и активността на ERK1,2 при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при *si RNA* - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица (β) в хетерогенни субпопулации.

Получените резултати, анализирани в хетерогенният състав на четирите популации от клетки на апикална папила, показват, че във фенотипа $CD44^+/CD117^+/CD105^-$ значително се увеличава експресията на **ERK1,2** и че каталитичната субединица на CK2 (α) не повлиява върху неговото експресиране, докато при некаталитичната субединица на CK2(β) се наблюдава слабо понижаване спрямо контролата *siRNA*, същият ефект се установява и при активността на фосфорилирана форма на **p-Thr202/Tyr204 ERK1,2**-при *si RNA* - медирано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица(β)-намалява спрямо контролата *siRNA*. В клетките експресирани и трите маркера

CD44⁺/CD117⁺/CD105⁺ при *si RNA* - медурано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица (β) се установява почти 3 пъти понижаване на фосфорилираната форма на *ERK1,2* спрямо контролата, каталитичната субединица на *CK2* (α) понижаване, както експресията, така и активността. В субпопулацията на **CD44⁺/CD117⁺/STRO-1⁺** *Thr202/Tyr204 ERK1,2* и *ERK1,2* се експресират в еднакви количества в *siRNA* контролата и каталитичната субединица на *CK2* (α), понижаване по един и същи начин както фосфорилираната форма, така и експресията на *ERK1,2*. При медурано заглушаване на некаталитична субединица (β) активността на *nap-Thr202/Tyr204 ERK1,2* намалява спрямо експресията на *ERK1,2*. В субпопулацията на **CD44⁺/CD117⁺/STRO-1⁻** каталитичната (α), и некаталитичната (β) субединица на *CK2* слабо повлияват *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и *ERK1,2*.

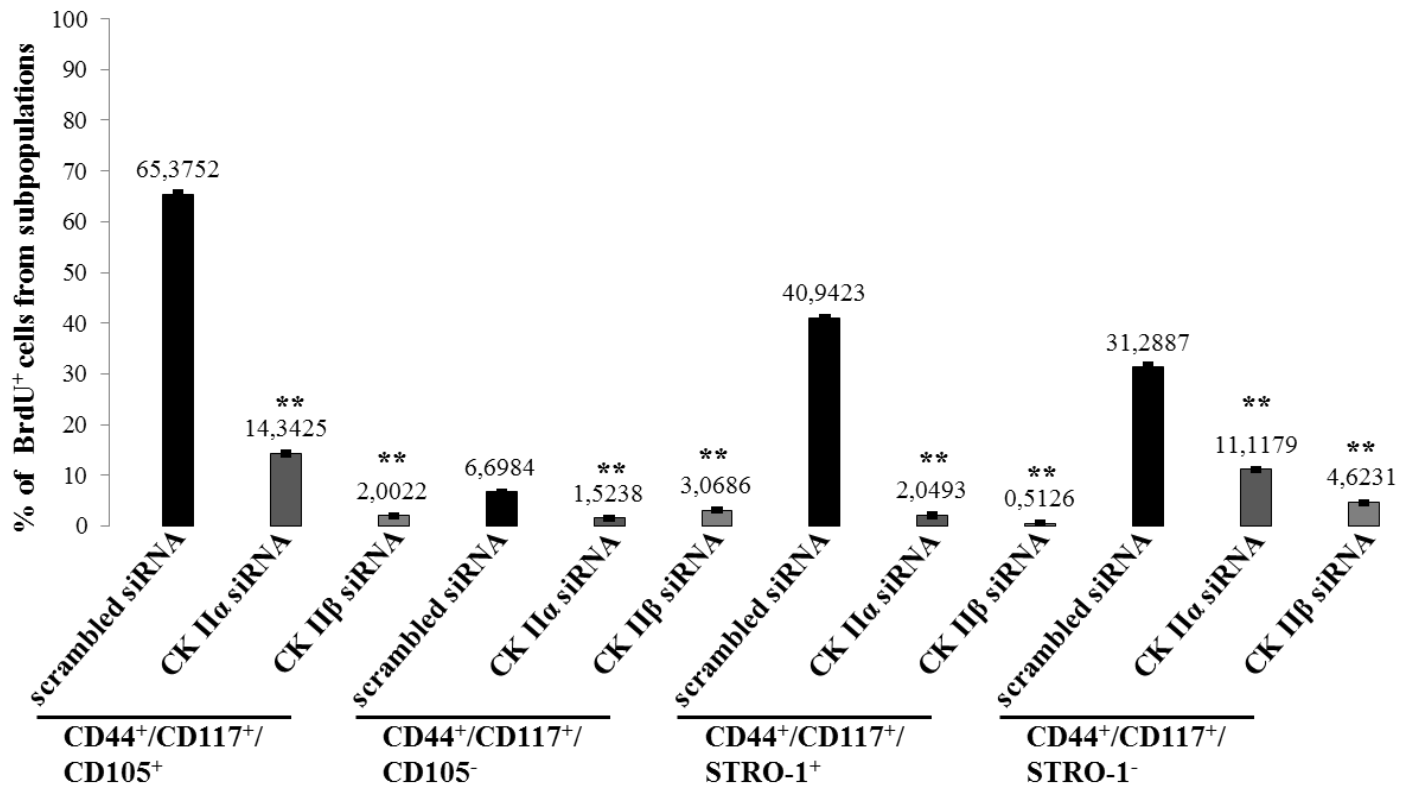


Фиг.14. Изследване на експресията и активността на *ERK1,2* при *si RNA*-медурано заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) и при *si RNA* - медурано заглушаване на ендогенната некаталитична субединица (β) в хомогенни субпопулации.

В хомогенните субпопулации на **CD105⁺/STRO-1⁻** некаталитичната субединица на *CK2* (β) понижаване в почти еднаква степен както активността на фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, така и експресията на *ERK1,2* спрямо *siRNA*-контролата. При *si*

RNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) активността на фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* се потиска повече, спрямо експресията на *ERK1,2* съпоставено с контролата. В двойно позитивния фенотип *CD105⁺/STRO-1⁺* каталитична субединица(α) инхибира в еднаква степен както *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, така и експресията на *ERK1,2* спрямо *siRNA*-контролата. Некаталитичната субединица на *CK2(β)* потиска почти 3 пъти активността на фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* спрямо контролата и почти 2 пъти намалява експресията на *ERK1,2*. В субпопулацията на *CD105⁺/STRO-1⁺* в контролните клетки се увеличава експресията на *ERK1,2* спрямо фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) минимално се понижава както *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2*, така и експресията на *ERK1,2*. Некаталитичната субединица на *CK2(β)* потиска почти 2 пъти фосфорилираната форма на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и слабо инхибира *ERK1,2*. В двойно негативната субпопулация *CD105⁺/STRO-1⁺* се установява стъпаловидно намаляване на *p-Thr202/Tyr204 ERK1,2* и *ERK1,2* спрямо *siRNA*-контролата вследствие на *si RNA*-медирано заглушаване на каталитична субединица(α) и некаталитичната субединица на *CK2(β)*.

V. 3.3. Инкорпориране на *BdrU* в условия при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при *si RNA*-медирано заглушаване на некаталитичната (β) субединица.

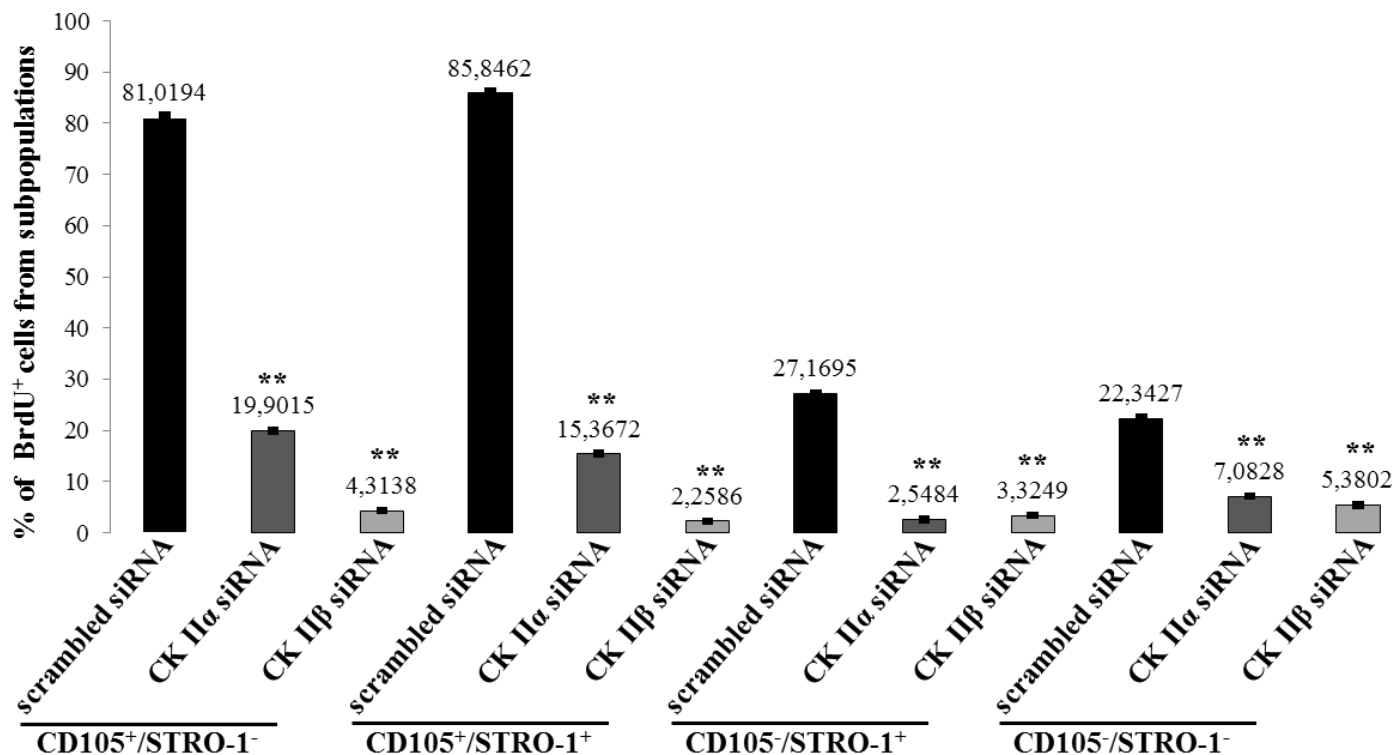


Фиг.15. Определяне процентът пролиферативна активност в условия при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при *si RNA*-медирано заглушаване на некаталитичната (β) субединица в хетерогенни субпопулации.

Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) , където стойността на *P* е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^{**}<0.001$

При изследване ролята на каталитичната α и некаталитичната β субединица на протеин киназа CK2 в сигнализацията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчните фенотипове $CD44^+/CD117^+/CD105^+$, $CD44^+/CD117^+CD105^-$, $CD44^+/CD117^+/STRO-1^+$, $CD44^+/CD117^+STRO-1^-$ бе установено, че инхибиращият ефект вследствие на *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) в $CD44^+/CD117^+/CD105^+$ е 78.1 %, при некаталитичната (β) субединица е 96.94%. При $CD44^+/CD117^+CD105^-$ субпопулация репресивния ефект вследствие на *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) е 77.58%, при некаталитичната

(β) субединица е 54.30%. В популацията на $CD44^+/CD117^+/STRO^+$ инхибирането при каталитична субединица(α) е 95.02%, докато при некаталитичната (β) субединица е 98.75%. При субпопулацията $CD44^+/CD117^+STRO-I$ инхибиращият ефект при каталитична субединица(α) е 64.47%, а при некаталитичната (β) субединица 85.23%.



Фиг. 16 . Определяне процентът пролиферативна активност в условия при *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) и при *si RNA*-медирано заглушаване на некаталитичната (β) субединица в хомогенни субпопулации.

Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) , където стойността на *Pe* по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^* < 0.001$

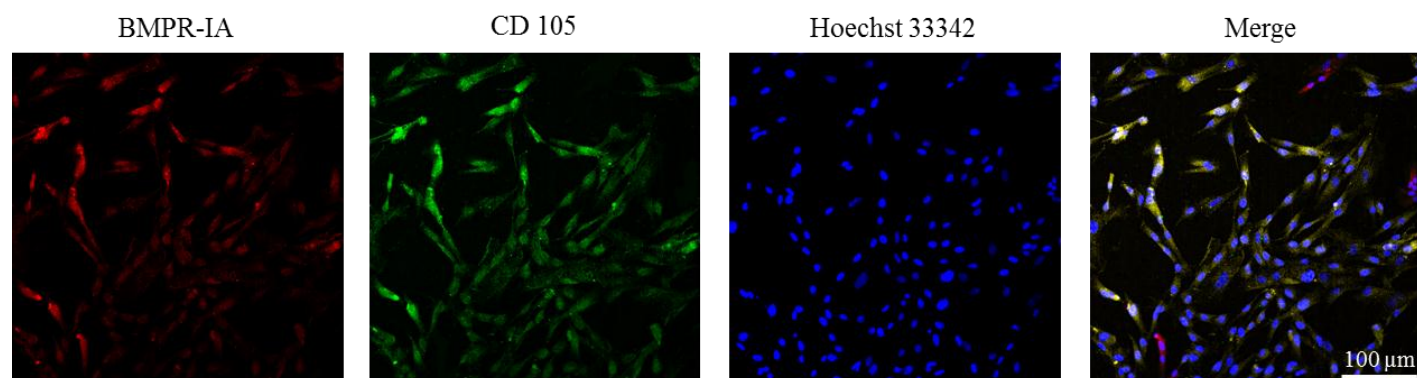
При изследване ролята на каталитичната α и некаталитичната β субединица на протеин киназа CK2 в сигнализацията, поддържаща пролиферативната активност на клетъчните фенотипове вследствие инкорпорирането на BrdU в новосинтезираната ДНК-верига на $CD105^+/STRO-I^-$, $CD105^+/STRO-I^+$, $CD105^-/STRO-I^+$, $CD105^-/STRO-I^-$ субпопулации бе установено, че инхибиращият ефект на *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) в $CD105^+/STRO-I^-$ е 75.5%, при некаталитичната (β)

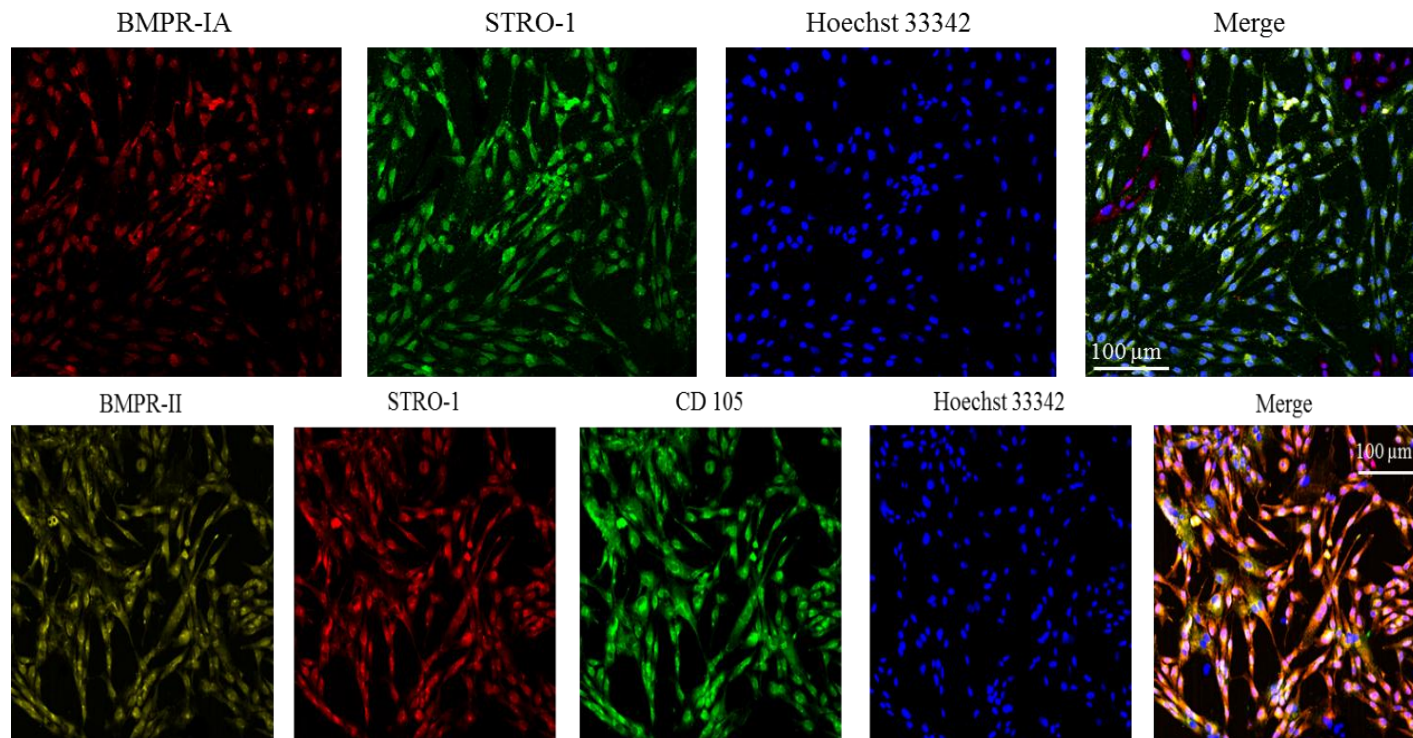
субединица е 94.7%. При двойно положителните $CD105^+/STRO-1^+$, на *si RNA*-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица(α) е 82.1%, при некаталитичната (β) субединица е 97.38%. В популацията на $CD105^+/STRO-1^+$ инхибиращият ефект при каталитична субединица(α) е 90.78%, докато при некаталитичната (β) субединица е 87.75%. При двойно негативната субпопулация $CD105^+/STRO-1^-$ инхибиторният ефект при каталитична субединица(α) е 68.3%, а при некаталитичната (β) субединица 76.01%.

V. 4. Изследване на BMP4-индуцирания остео/одонтогенен диференциационен потенциал на клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.

V.4.1. Изследване на фенотиповете от апикална папила за клетъчно повърхностната експресия на *BMPRIa* и *BMPRII* и за вътреклетъчната експресия на транскрипционния фактор *RUNX2* и *OSTERIX*.

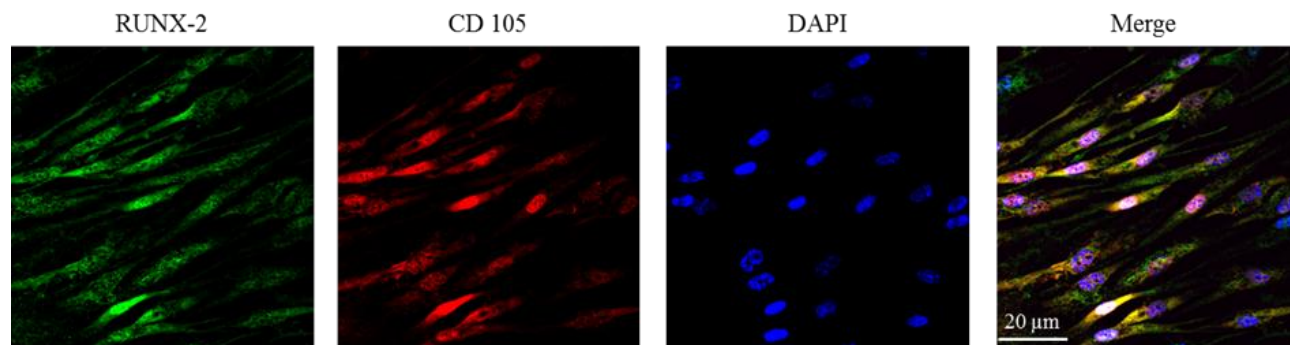
До настоящият момент не е изследвана експресията на рецепторните изоформи, отговорни за трансдуцирането на BMP4 растежния фактор, в изследваната тъкан. Заради това, експоненциално, автокринно растящите последователни пасажи от хетерогенните клетъчни култури от апикална папила бяха индиректно имунофлуоресцентно белязани срещу *BMPRIa* и стволово клетъчните маркери *CD105* или *STRO-1*, или срещу *BMPRII* и стволово клетъчните маркери.

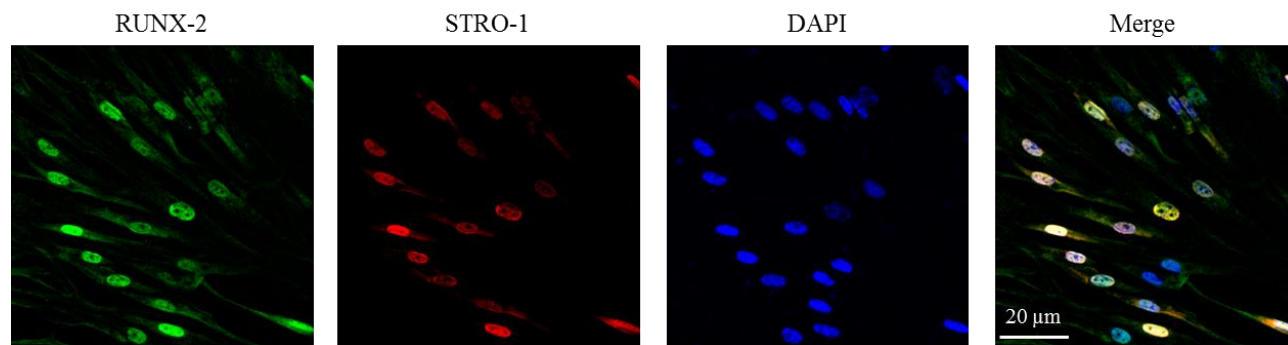




Проведените мултифлуоресцентни анализи, доказват, че изоформата на рецептор Ia и рецептор II присъстват върху клетъчната повърхност на клетките, експресиращи мезенхимните маркери CD105 и STRO-1.

Тъй като BMP сигнала регулира остеогенната диференциация на мезенхимните клетки *in vivo* чрез контролиране експресията на „мастер“ гена *RUNX2*, който е отговорен за активирането на остеобластния специфичен транскрипционен фактор *Osterix*, бе изследвана вътреклетъчната експресия и на двата транскрипционни фактора

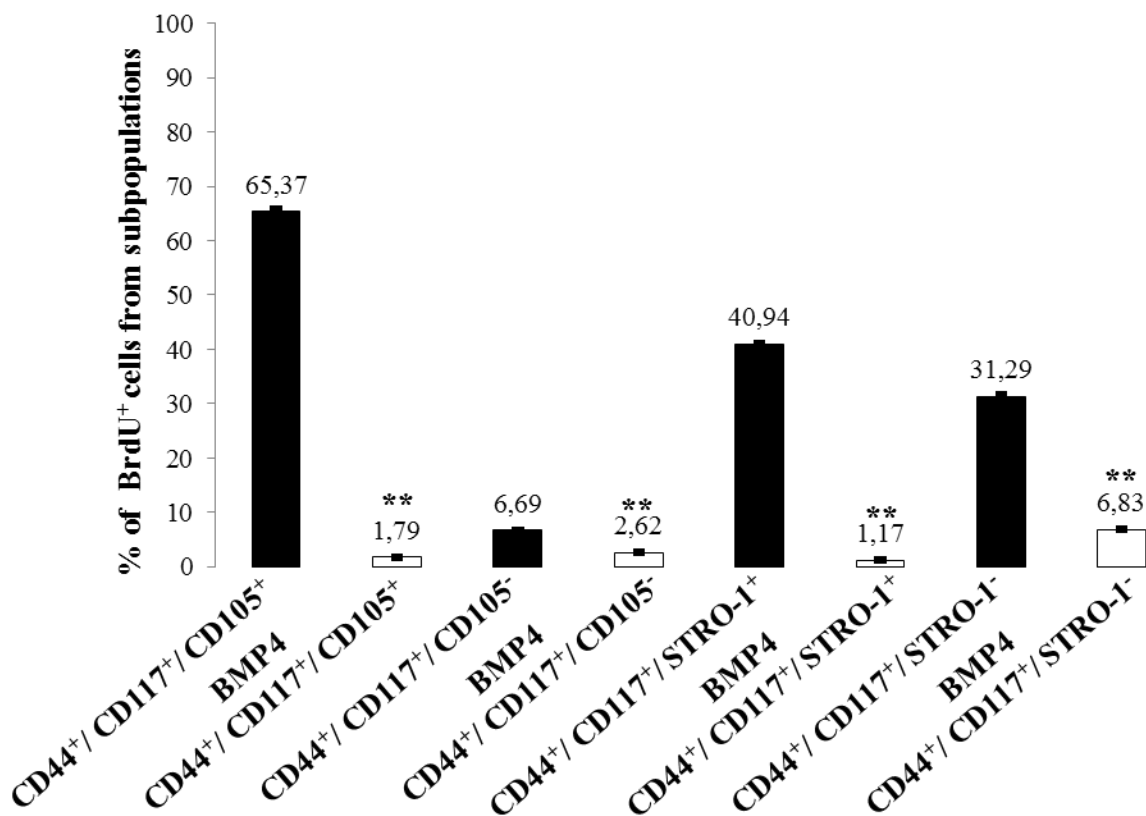




Имунофлуоресцентно оцветяване показва, че *RUNX-2* се експресира във всички клетъчни фенотипове от хетерогенния състав, независимо дали те експресират мезенхимните маркери CD105 и STRO-1, тъй като базалната експресия на транскрипционния фактор RUNX2 е характерен за всички клетки с мезенхимен произход и откриването му във всички фенотипове от хетерогенния състав на апикалната папила, показва, че епигенетичните фактори в хода на рутинното култивиране и пасажирание не променят мезенхимния фенотип.

V. 4.2. Изследване на BMP4-индуцираният ефект върху пролиферативната активност на хетерогенния състав от апикална папила.

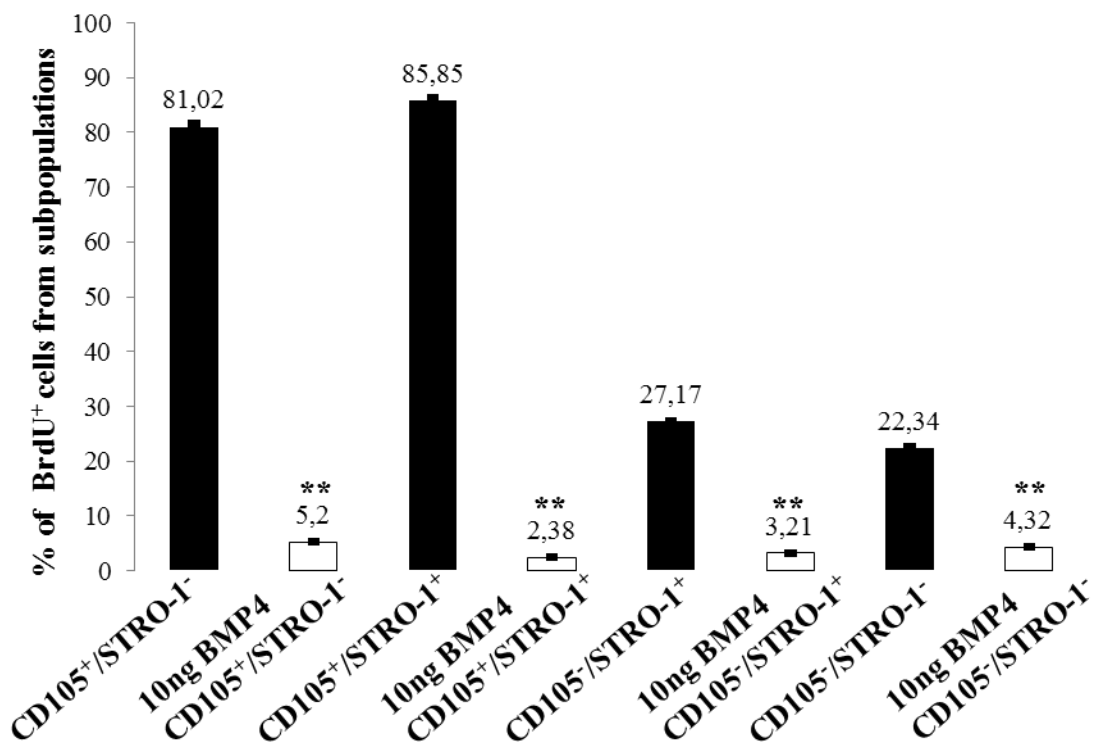
Експоненциално, автокринно растящите последователни пасажи от хетерогенните и хомогенни клетъчни култури от апикална папила, получени в резултат от двойно магнитно сепариране бяха подложени на 24 часова стимулация с 10 ng човешки рекомбинантен BMP4 растежен фактор. След изтичането на инкубационния период бе поддаден BrdU за 2,5 часа, за да може да се установи репликационна активност.



Фиг.17. Изследване на BMP4-индуцираният ефект върху пролиферативната активност на хетерогенният състав от апикална папила.

Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) , където стойността на P е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^* \leq 0.001$

В следствие на 24 часова стимулация с 10 ng човешки рекомбинантен BMP4 растежен фактор и след поддаването на BrdU за 2.5 часа, се установи, че най-висока репликационна активност се наблюдава в клетките експресиращи CD44⁺/CD117⁺/CD105⁺ - 65.37%, последвани от субпопулацията на CD44⁺/CD117⁺/STRO-1⁺ - 40.94%. В субпопулацията, която е негативна за STRO-1 – репликационната активност е 31.29%, и най-слабо проявена е в клетките неекспресиращи CD105⁻ - 6.69%. Най-силно потискане на инкорпорирането на BrdU в новосинтезираната ДНК в следствие на стимулацията с BMP4 растежен фактор се наблюдава във фенотипа на CD44⁺/CD117⁺/STRO-1⁻ - 6.83%, последвано от 2.62% - в клетките, които не експресират CD105, клетките-позитивни за CD105 - 1.79% и най-слабо инхибиране се отчита в клетките –позитивни за STRO-1 - 1,17%.



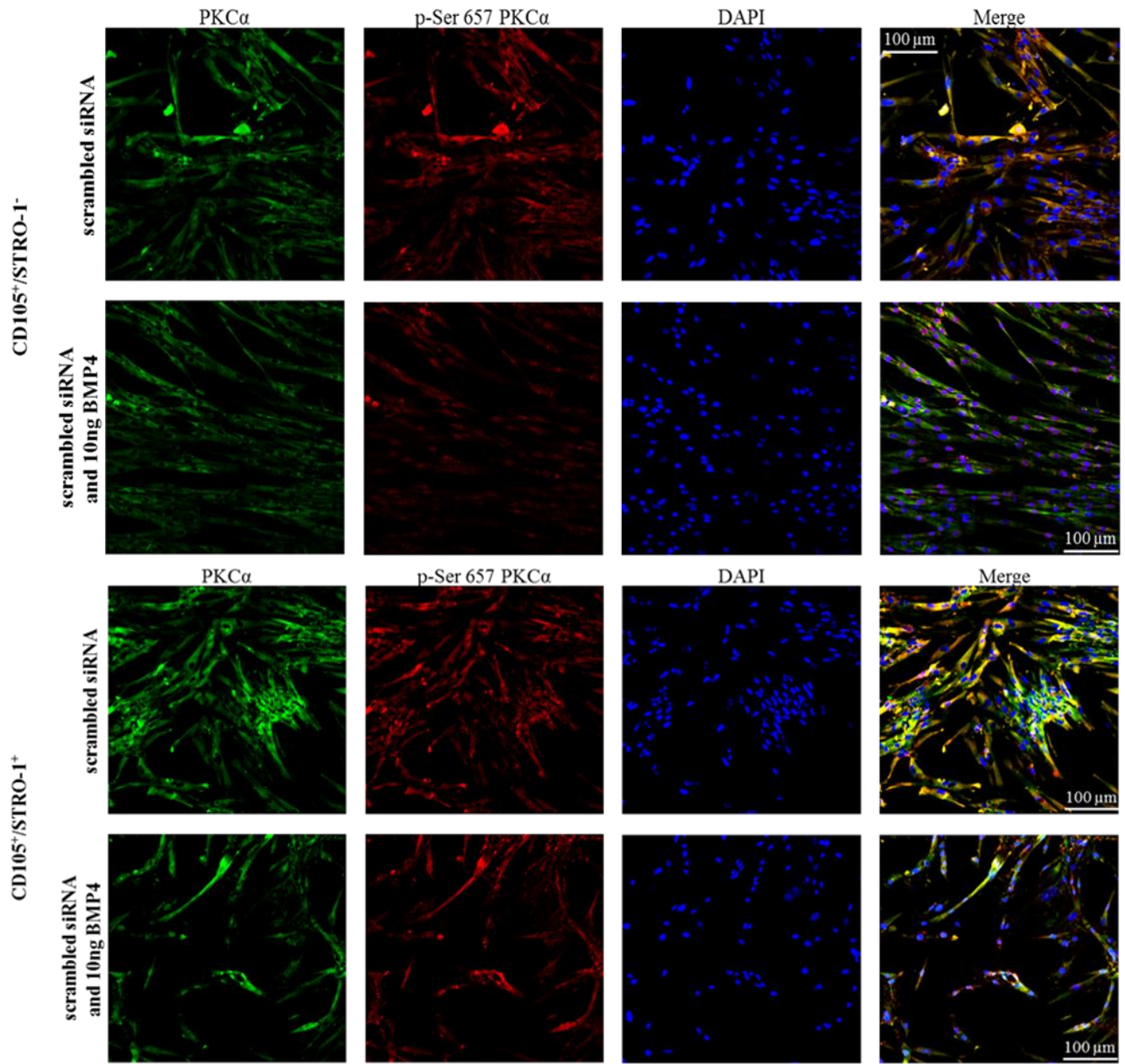
Фиг. 18.Изследване на BMP4-индуцираният ефект върху пролиферативната активност на хомогенния състав от апикална папила.

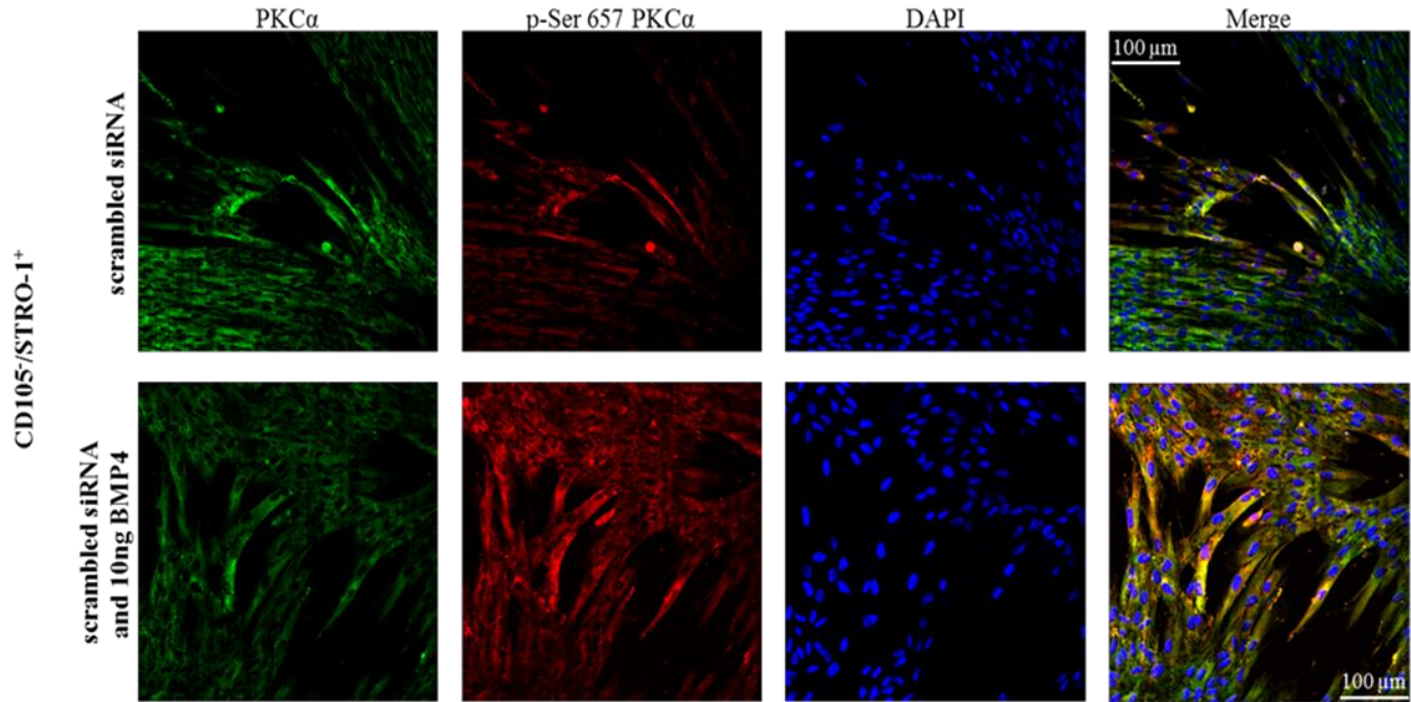
Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) , където стойността на *P* е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^* < 0.001$.

В хомогенните субпопулации, получени в следствие на магнитното сепариране се отчита, че в двойно позитивната субпопулация на CD105⁺/STRO-1⁺ инкорпорирането на BrdU в новосинтезираната верига е най-много 85,85%, в субпопулацията неекспресираща STRO-1 е 81.02%, последвани от 27.17% CD105⁻/STRO-1⁺ и при двойно негативните 22.34% CD105⁻/STRO-1⁻. Най-силно потискане на репликационната активност при поддаване на рекомбинантния човешки растежен фактор се установява при CD105⁺/STRO-1⁻ фенотипа- 5.2, при двойно негативните 4.32% CD105⁻/STRO-1⁻, следвани от 3.21%-STRO-1 позитивни и най-слаб инхибиращ ефект се наблюдава в двойно позитивната субпопулация на CD105⁺/STRO-1⁺ - 2.38%.

V. 4.3. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC alpha и ERK1,2.

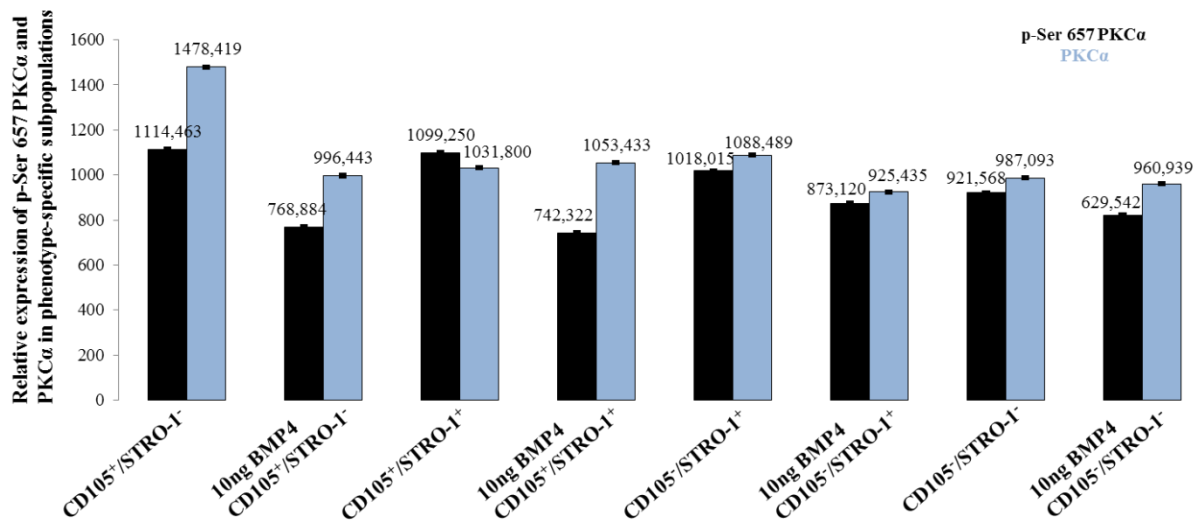
Експресия, активност и субклетъчна локализация на PKC alpha в автокринни и BMP4-третиранни CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁻/STRO-1⁺ фенотипове.





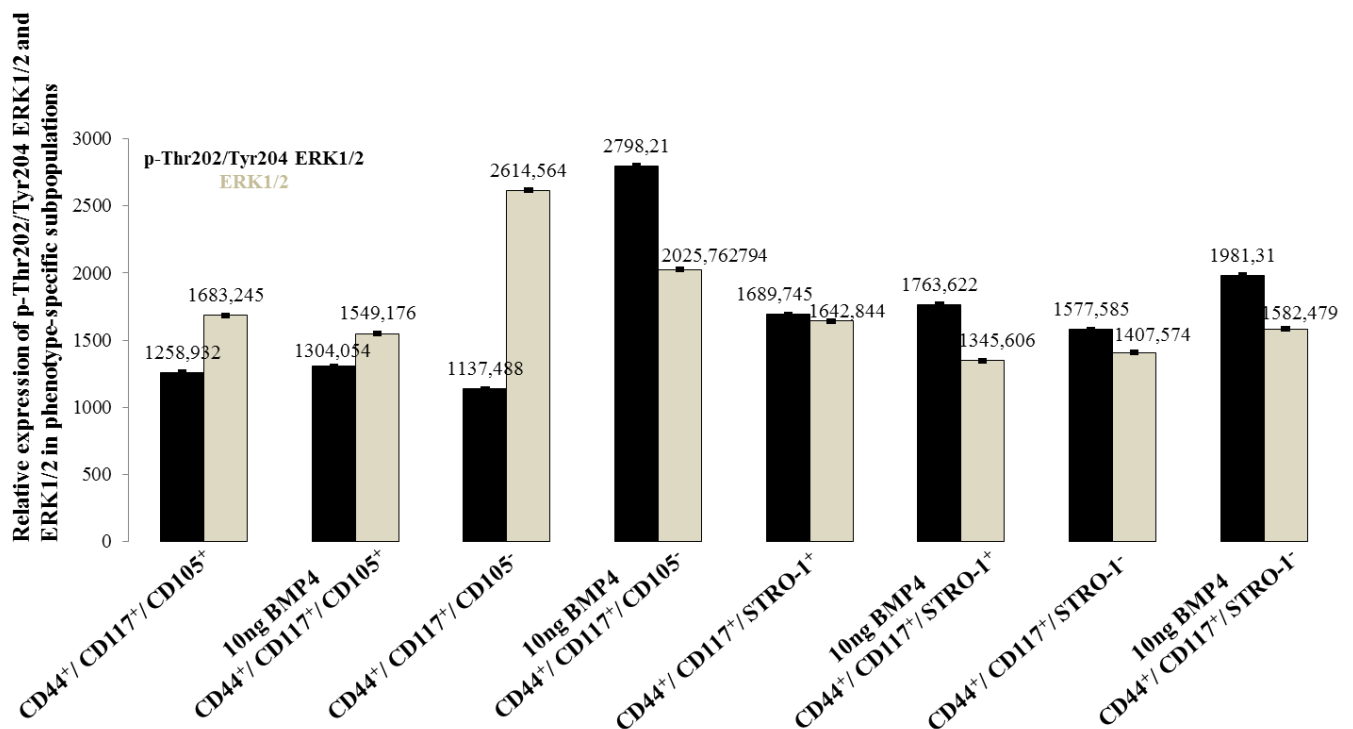
Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на PKC alpha в автокринни и на посттрансфекционно BMP4-стимулирани hDAP. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Въз основа на мултифлуоресцентните анализи, проведени чрез *IN Cell Analyzer 6000* се установява, че експресията и активността на *PKC alpha* е застъпена както в контролните клетки, така и в клетките стимулирани с BMP4.



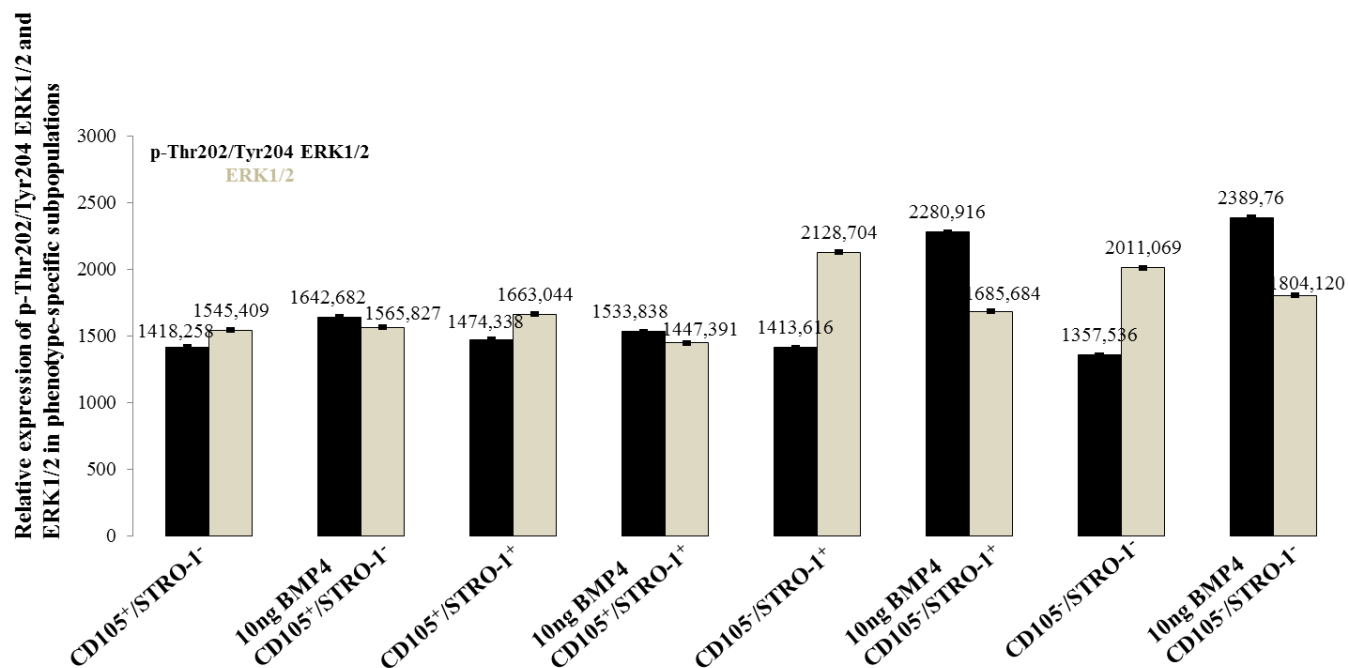
Фиг.19. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на РКС alpha в хомогенни фенотипове.

Количественият анализ показва, че BMP4 влияе както на експресията на РКСalpha , така и на фосфорилираната й форма. В CD105⁺/STRO-1⁻, стимулирането с растежния фактор води до понижаване на експресиятаи p-Ser 657РКСα. В двойно-позитивния фенотип, активността намалява, докато експресията слабо се завишава. В клетките, експресиращи STRO-1, частично намалява както p-Ser 657РКСα, така и РКСalpha. В двойно негативните се наблюдава същият ефект- потискане на експресията и активността.



Фиг.20. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1,2 в хетерогенни субпопулации.

В хетерогенният състав на четирите субпопулации експресията на ERK1,2 е най-силно застъпена в CD44⁺/CD117⁺/CD105⁻, а фосфорилираната форма най-слабо се проявява, но в следствие на индуциране с растежния фактор BMP4, активността нараства почти 2 пъти, докато експресията слабо се понижава. Повишаване на активността се установява и във фенотипа на CD44⁺/CD117⁺/STRO-1⁻ при третиране с растежния фактор BMP4.



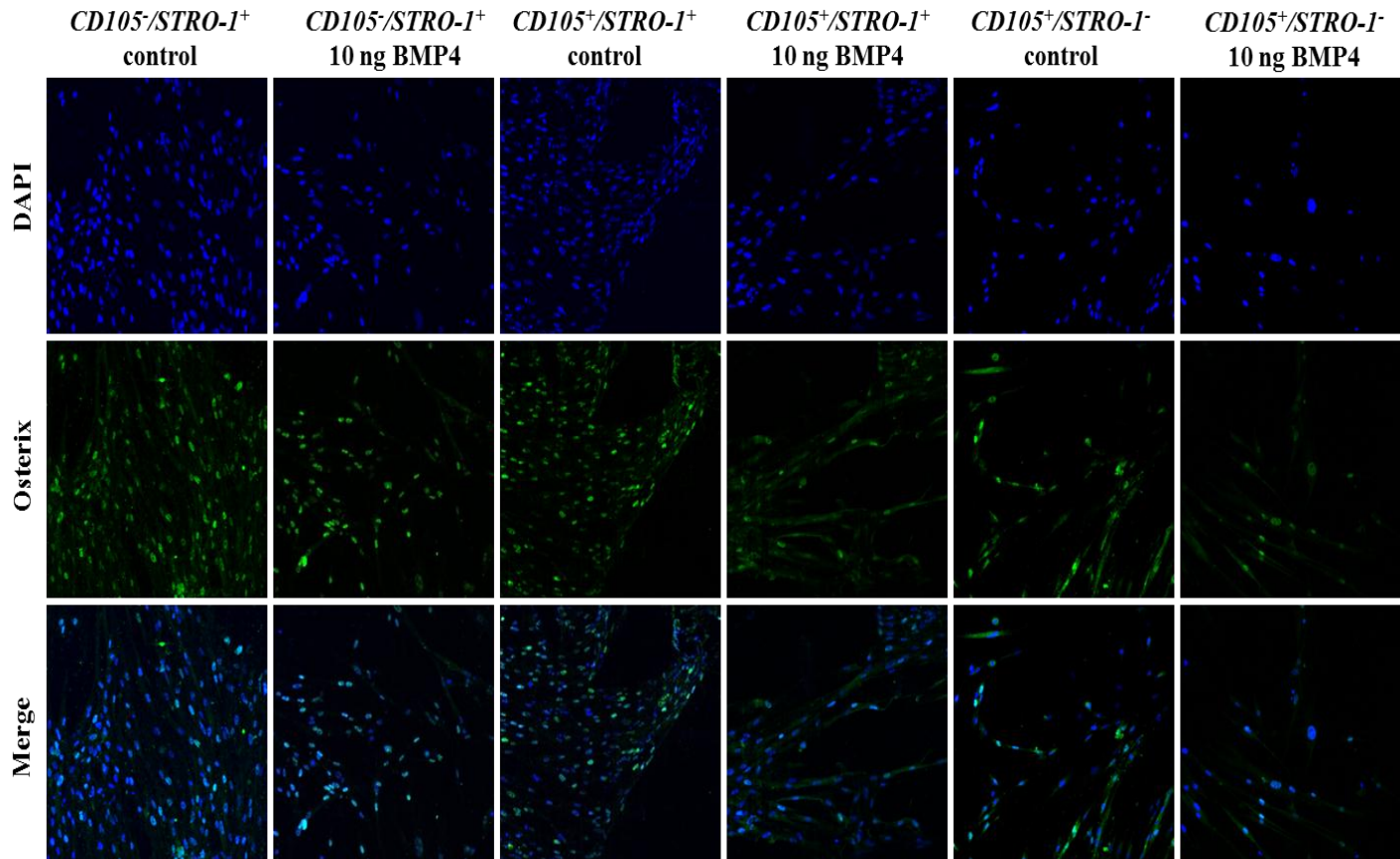
Фиг.21.Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1,2,в хомогенните фенотипове.

В хомогенните субпопулации, се установява фенотипно-специфична връзката между активността и експресията на ERK1,2. Експресията на ERK1,2е най-силно проявена в CD105⁻/STRO-1⁺, при подаване на BMP4 , активността се покачва значително. Такъв ефект се наблюдава и при двойно негативната субпопулация CD105⁻/STRO-1⁻, завишено количество на фосфорилираната форма на ERK1,2. В останалите две субпопулации CD105⁺/STRO-1⁻ и CD105⁺/STRO-1⁺ активността и експресията са почти еднакви.

V. 4.4. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху експресията и вътреклетъчната локализация на транскрипционния фактор Osterixв клетъчни култури от апикална папила.

До настоящият момент не е изследвана експресията на транскрипционния фактор *Osterix* в изследваната тъкан от дентална папила. Това е една от предпоставките за провеждането на мултифлуоресцентната микроскопия и количественият й анализ.

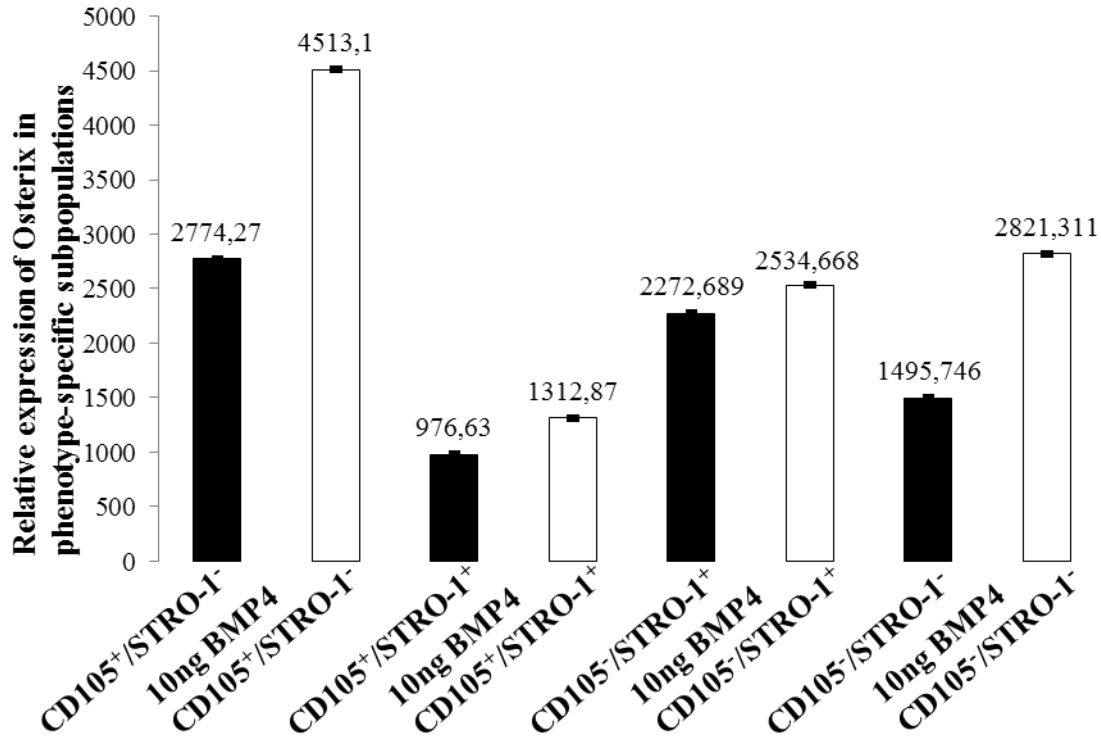
Експресия и субклетъчна локализация на Osterix в автокринни и BMP4-третиранни CD105⁻/STRO-1⁺, CD105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁺/STRO-1⁻ фенотипове.



Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в експоненциално, автокринно растящи и третирани с BMP4 субпопулации, CD105⁻/STRO-1⁺, CD105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁺/STRO-1⁻. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на Osx бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на Osx (488 флуоресценция).

Експресията и вътреклетъчната локализация на транскрипционния фактор *Osx*, който е от съществено значение за преодонтобластната морфология и за одонтобластната диференциация, в експоненциално, автокринно растящите и третираните с BMP4 субпопулации CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁻/STRO-1⁺/ CD105⁻/STRO-1⁻, получени в резултат на магнитно-активирано клетъчно разделяне, бяха имунофлуоресцентно микроскопски анализирани.



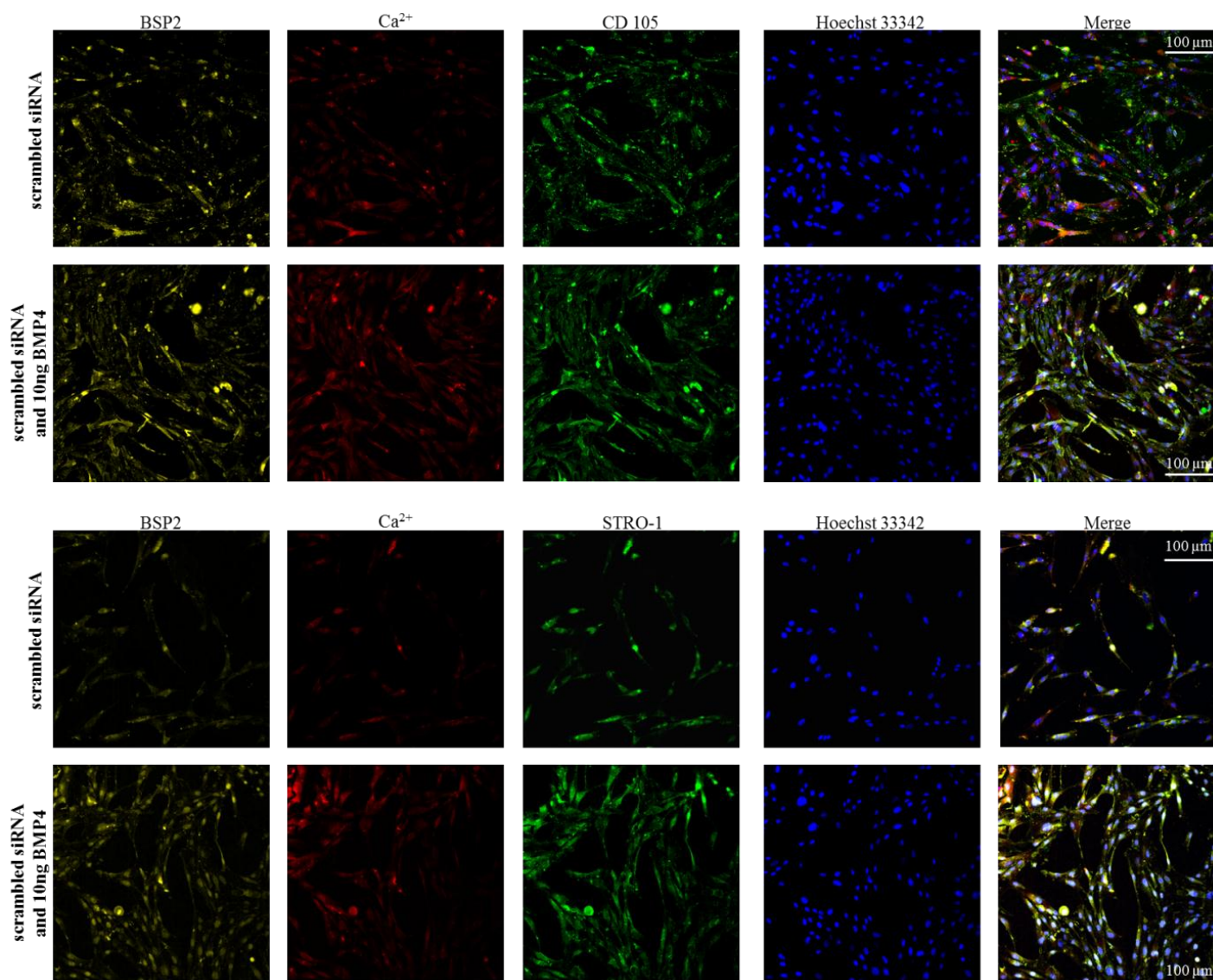
Фиг. 22. Количествен анализ за определяне базалната експресия на транскрипционния фактор *Osterix*.

Количественият анализ проведен въз основа на мултифлуоресцентната микроскопия на трите субпопулации, показва че, базалната експресия на транскрипционния фактор *Osterix* е фенотипно – специфично дедерминирана. Установява се, че най-много *Osterix* се експресира в CD105⁺/STRO-1⁻, последвано от CD105⁻/STRO-1⁺ и най-малка базална експресия на *Osterix* се установява в двойно позитивния фенотип CD105⁺/STRO-1⁺.

Въз основа на проведения количествен анализ се установи , че BMP4 растежния фактор оказва активиращ ефект върху експресията и вътреклетъчната локализация на

транскрипционния фактор *Osterix*. И в четирите изследвани субпопулации *CD105*⁺/*STRO-1*⁻, *CD105*⁺/*STRO-1*⁺, *CD105*⁻/*STRO-1*⁺ се доказва, че в контролните клетки третирани с BMP4 растежния фактор, количеството на транскрипционния фактор *Osterix* се увеличава в сравнение с контролните- не третирани клетки.

V. 4.5. Изследване на BMP4 индуцираният ефект върху клетъчно повърхностната експресията на *BSP2* и калцификацията на екстрацелуларния матрикс.

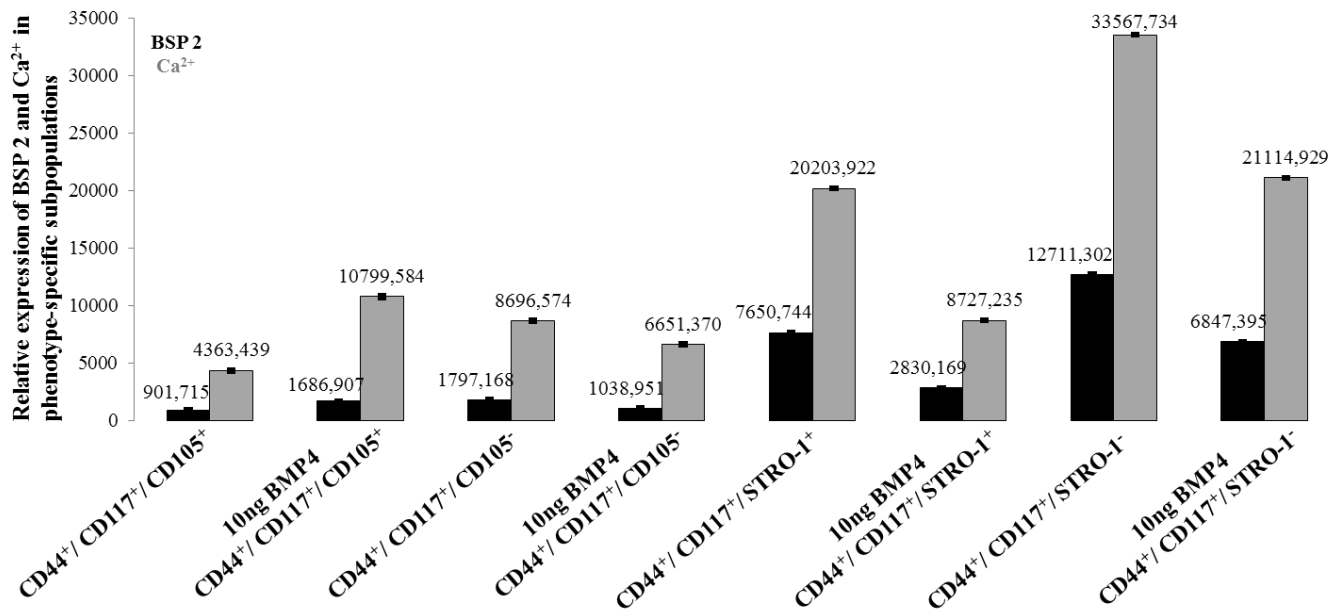


Индиректно имунофлуоресцентно микроскопско изследване на генната експресия на *BSP2* в контролни *si RNA* автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно

стимулирани с BMP4 растежен фактор, калцификацията на екстрацелуларния матрикс в CD105 експресиращи и STRO1 клетки.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 555nm 405 nm и 647 nm възбуждащи BSP-белязан с IgG-FITC, CD105 и/или STRO-1 с IgG-Cy5 и *Xylenol orange* с IgG-CFL и Neochst -белязаните ядра в четворно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на BSP2, CD105 и/или STRO1 и калциевия депозитбяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на Neochst - белязаните ядра (405 флуоресценция), протеинова експресията на BSP2 (488 флуоресценция), CD105 или STRO-1(555флуоресценция) и калции (647 флуоресценция).

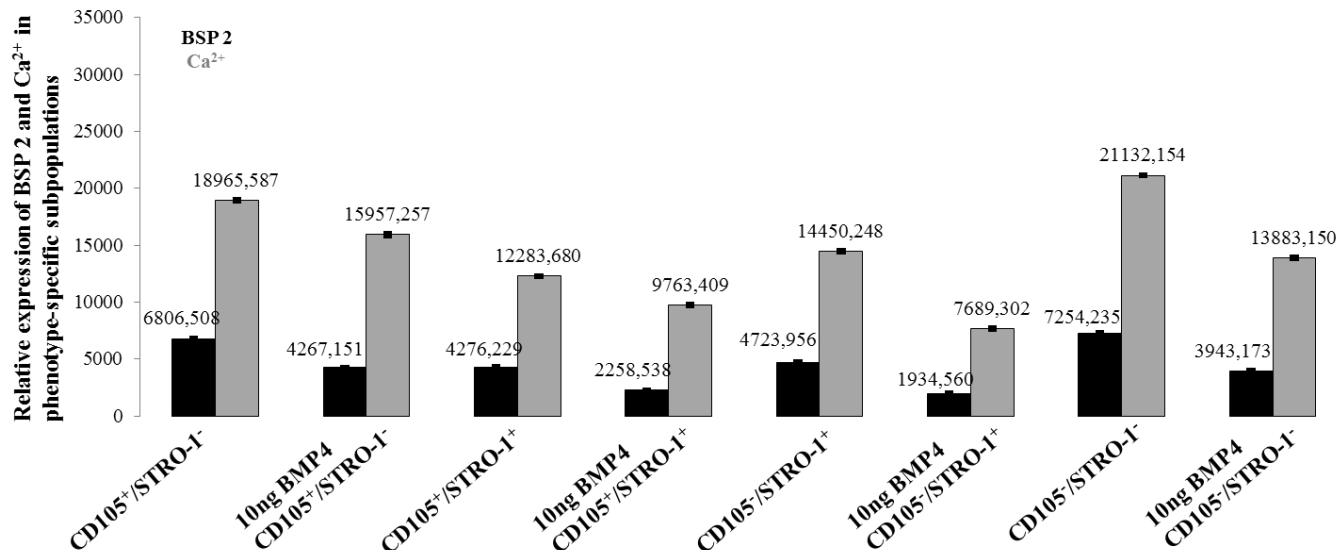
Мултифлуоресцентния анализ, детектиран чрез *IN Cell Analyzer 6000* отчита базална експресия на BSP2 в контролните клетки. Установява се, че калциевите отлагания са повече в контролата третирана с 10ng рекомбинантен човешки растежен фактор BMP4, отколкото в нетретирани клетки. Доказва се също, че клетките които експресират по своята клетъчна повърхност BSP2, експресират и мезенхимния ствол marker CD105. Мултифлуоресцентното белязване, показва че клетките, които експресират BSP2, експресират и STRO-1 и че тяхното количество е повече в контролните клетки третирани с растежния фактор BMP4.



Фиг. 23. Количествен анализ за определяне базалната експресия на костния – сиало протеин в контролни, аутокрино пролифериращи и в стимулиращи с растежен фактор в хетерогенни субпопулации.

В контролните клетки и на четирите субпопулации се установява, че базалната експресия на костният – сиало протеин варира в различни граници. Най-голямо количество BSP2 се експресира , в клетките нямащи STRO-1, последвани от клетките експресиращи STRO-1. В клетките негативни за мезенхимния ствол marker CD105, количеството на BSP2 е драстично намалено и най-слаба експресия се наблюдава във фенотипа CD44⁺/CD117⁺/CD105⁺

Количественият анализ показва, че се открива фенотипно-специфична връзка в изследваните хетерогенни субпопулации. Най-много калциеви депа са установени в CD44⁺/CD117⁺/STRO-1⁻ в следствие на което и количеството на костният – сиало протеин (BSP2) е в най-голяма степен завишено в не третирани клетки. При индуцирането с рекомбинантен човешки растежен фактор BMP4, количеството на калциевите отлагания, както и на костният – сиало протеин (BSP2) намаляват.



Фиг.24. Количествен анализ за определяне базалната експресия на костният – сиало протеин в контролни, аутокрино пролифериращи и в стимулиращи с растежен фактор в хомогенни субпопулации.

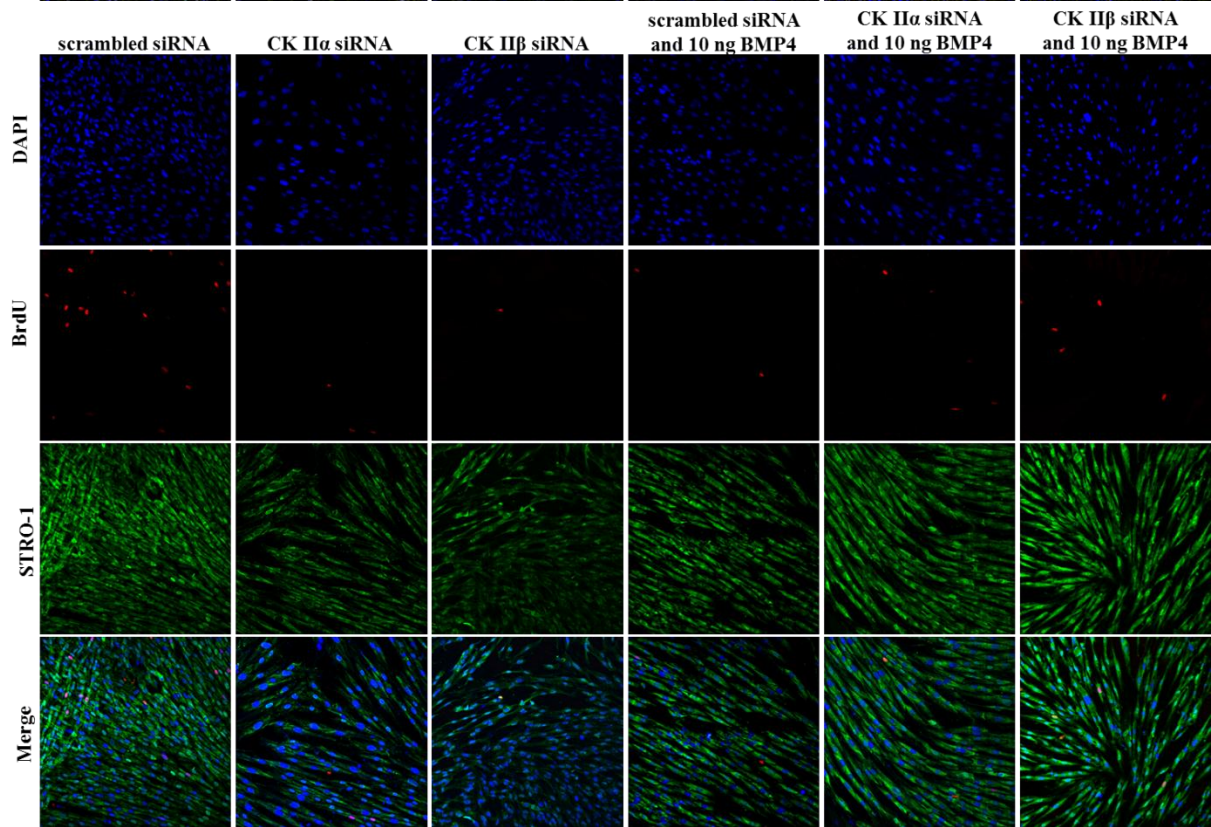
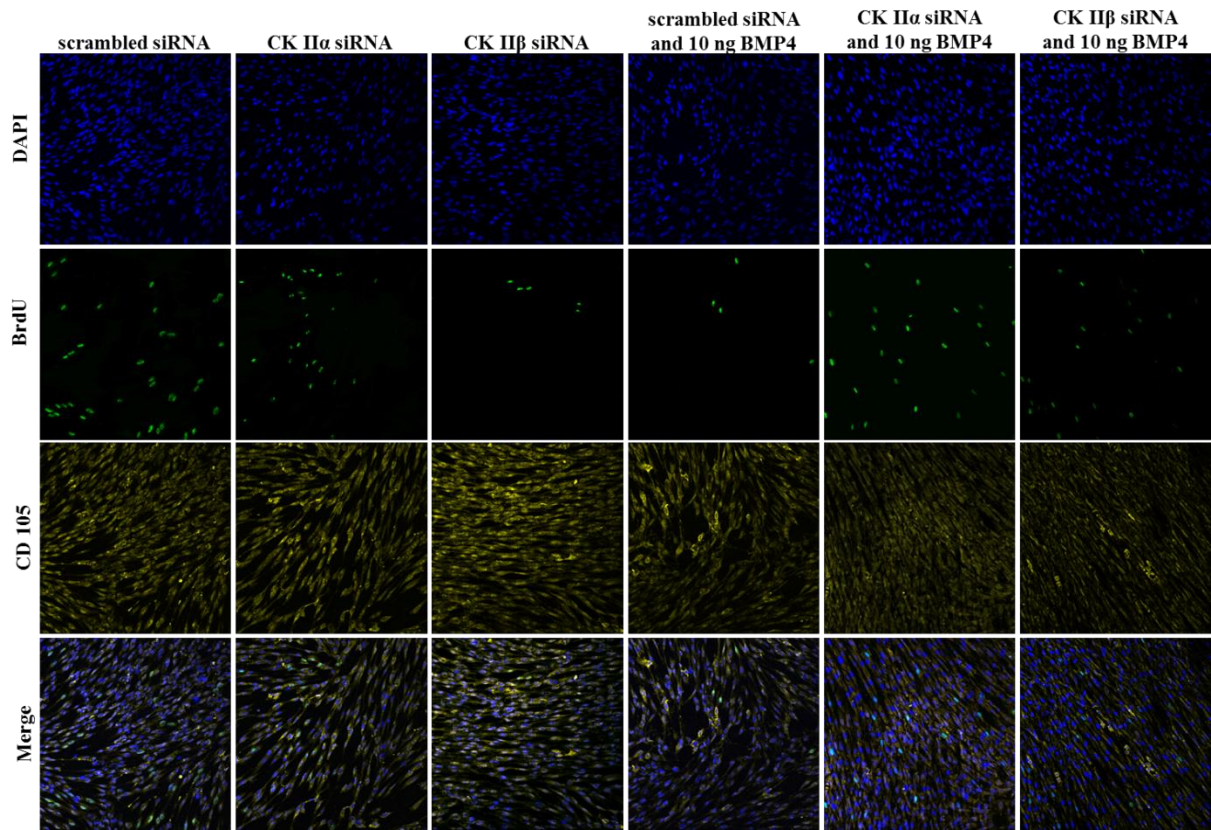
Количественият анализ за базалната експресия на костният –сиало протеин на четирите субпопулации, получени вследствие на проведеното магнитно двойно сепариране е още по-детайлно. Установява се, че най-голямо количество се експресира в двойно негативната субпопулация, последвано от субпопулацията, която не експресира STRO-1, но експресира CD105, следвана от CD105⁻/STRO-1⁺ и най-малко количество на BSP2 се установява в двойно позитивната субпопулация.

В хомогенните субпопулации се установява, че най-много калциеви отлагания се детектират в CD105⁻/STRO-1⁻, както и експресията на BSP2 се увеличава в сравнение с останалите фенотипове. При индуцирането с BMP4, количеството на калции и костният-сиало протеин намаляват.

V. 5. Изследване ролята на каталитичната (α) и некаталитичната (β) субединици на протеин киназа СК2 в трансдуцирането на остеогенния BMP4 сигнал в клетъчни фенотипове от хетерогенния състав на апикална папила.

V.5.1. Изследване на ролята на (α) и (β) субединици на протеин киназа СК2 за трансдуцирането на BMP4-антипролиферативен ефект.

Експоненциално, автокринно растящите клетъчни култури от апикална папила, в които експресията на (α) или (β) е *si RNA*-медирано заглушена бяха стимулирани за 24h с BMP4 и BrdU за 2,5 часа за да се проследи репликационната активност.



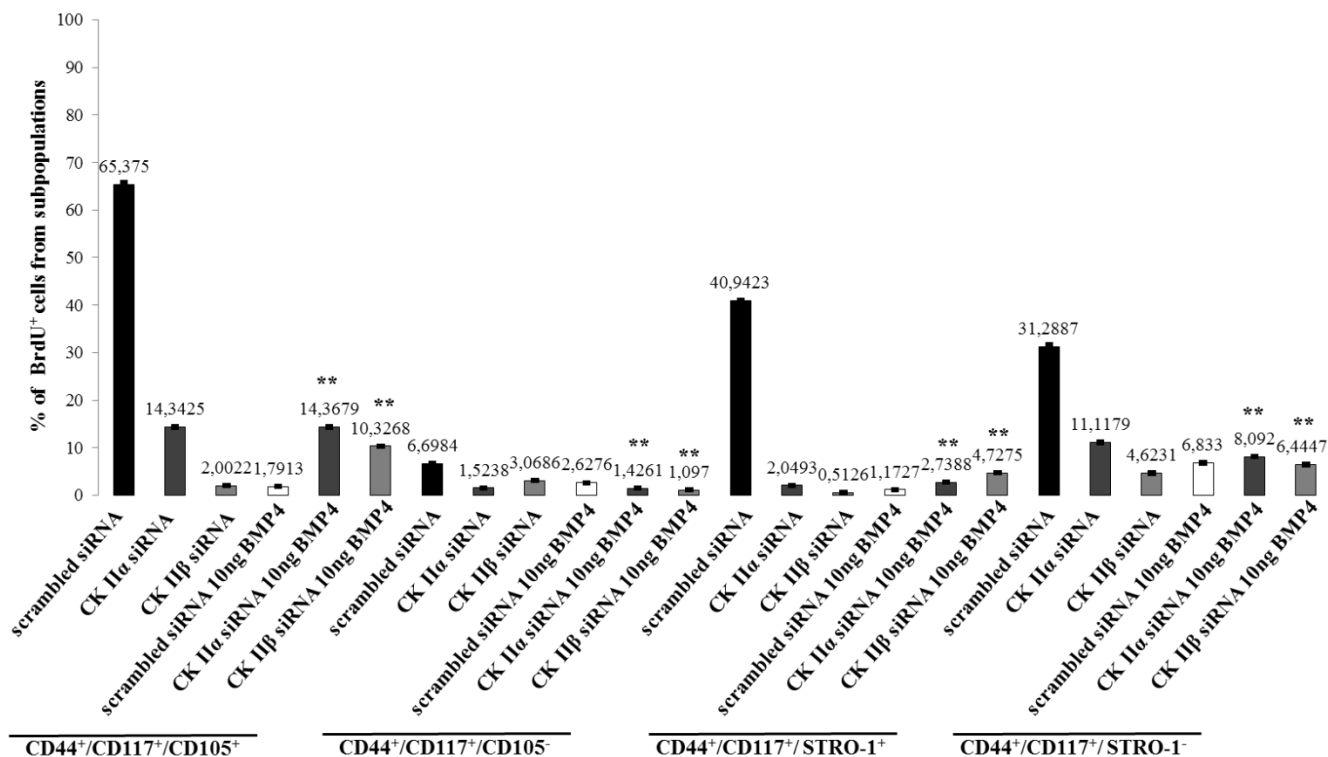
Индиректен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на BrdU инкорпурирането в CD105 и STRO-1⁺ siRNA СКII α -трансфектирани, siRNA СКII β -трансфектирани и на посттрансфекционно BMP4-стимулирани hDAP. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

За изследване на участието на СКII α и на СКII β , и на ефекта на растежния фактор BMP4 в регулацията на генната експресия на CD105 и репликационната активност на CD105⁺ клетки, на трансфектираните както и на посттрансфекционно BMP4-стимулираните клетки бе подаден BrdU и неговото включване в новосинтезираната ДНК беше установено чрез индиректна тройна имунофлуоресцентна микроскопия. Получените мултифлуоресцентни изображения бяха подложени на алгоритъм. За всеки експеримент се изчислява, цялата ямка и се установява процентът единични положителни и двойно положителни клетки на база алгоритъм за идентифициране на ядра на база DAPI багрило, BrdU-съдържаща ДНК (за 647 флуоресценция или 488 флуоресценция) и протеинова експресия на базата на 488 флуоресценция (за STRO-1) или 555 флуоресценция (за CD 105), съответно.

Трансфектирането на автокринно пролифериращи клетки с siRNA СКII α или с siRNA СКII β води до значително намаляване на броя клетки инкорпорирани BrdU т. е. се наблюдава значимо понижаване на репликационната активност, която е най-силно проявено в siRNA СКII β -трансфектираните клетки, в сравнение с репликационната активност на нетретирани клетки (scrambled siRNA). 24-часовото стимулиране с BMP4 има много ясно изразен отрицателен ефект върху ДНК синтезата. Това най-вероятно се дължи на пролиферационното действие на BMP4-индуцираната сигнализация. Репликационната активност на нестимулираните с BMP4 СКII α -трансфектирани клетки е еднаква с тази на посттрансфекционно BMP4-стимулираните, което доказва, че понижаването на белтъчната синтеза на каталитичната субединица е първичното събитие, водещо до потискане на ДНК синтезата и че BMP4-индуцираната сигнализация в тези условия не е част от регулацията на репликацията. Докато при посттрансфекционното стимулиране с BMP4 на СКII β -трансфектираните клетки се установява повишаване на пролиферативната им активност в сравнение с нестимулираните с BMP4 СКII β -трансфектирани клетки, което показва, че трансдуцирането на BMP4 сигнала от

сигналните мрежи, в които участва по-малко от нормалното СКП β има малък положителен ефект върху ДНК синтезата.

24-часовото третиране с BMP4 има силен отрицателен ефект върху репликационната активност и на двата вида клетъчни популации, който е много по-силно изразен в STRO-1⁺ клетки. Посттрансфекционното третиране с BMP4 не променя репликационната активност на STRO-1⁺СКП α -трансфектирани клетки в сравнение с тази на нестимулираните с BMP4 STRO-1⁺СКП α -трансфектирани клетки, но слабо понижава репликационната активност на STRO-1⁺СКП α -трансфектирани клетки спрямо тази на нестимулираните с BMP4 STRO-1⁻СКП α -трансфектирани клетки. Това доказва, че понижаването на белтъчната синтеза на каталитичната субединица е първичното събитие, водещо до потискане на ДНК синтезата в STRO-1⁺клетки и че BMP4-индуцираната сигнализация в тези условия не е част от регулацията на репликацията в STRO-1⁺клетки, но е част от регулацията на репликацията в STRO-1⁻. Посттрансфекционно стимулиране с BMP4 има отново негативен ефект върху репликационната активност на STRO-1⁺СКП β -трансфектирани клетки, който е по-слаб спрямо ефекта на BMP4 върху ДНК синтезата в STRO-1⁺контролни (scrambled siRNA and 10 ng BMP4) клетки. Докато репликацията в BMP4-стимулираните STRO-1⁻СКП β -трансфектирани клетки е почти равна на репликацията на BMP4-стимулираните STRO-1⁻контролни (scrambled siRNA и 10 ng BMP4) клетки. Подобно на по-горе описаните ефекти на потискането на каталитичната субединица, така и тези ефекти на потискането на некаталитичната субединица на СК2 са фенотипно-специфични по отношение на участието на BMP4-индуцираната сигнализация в регулацията на репликацията на STRO-1⁺ клетки и на STRO-1⁻ клетки.

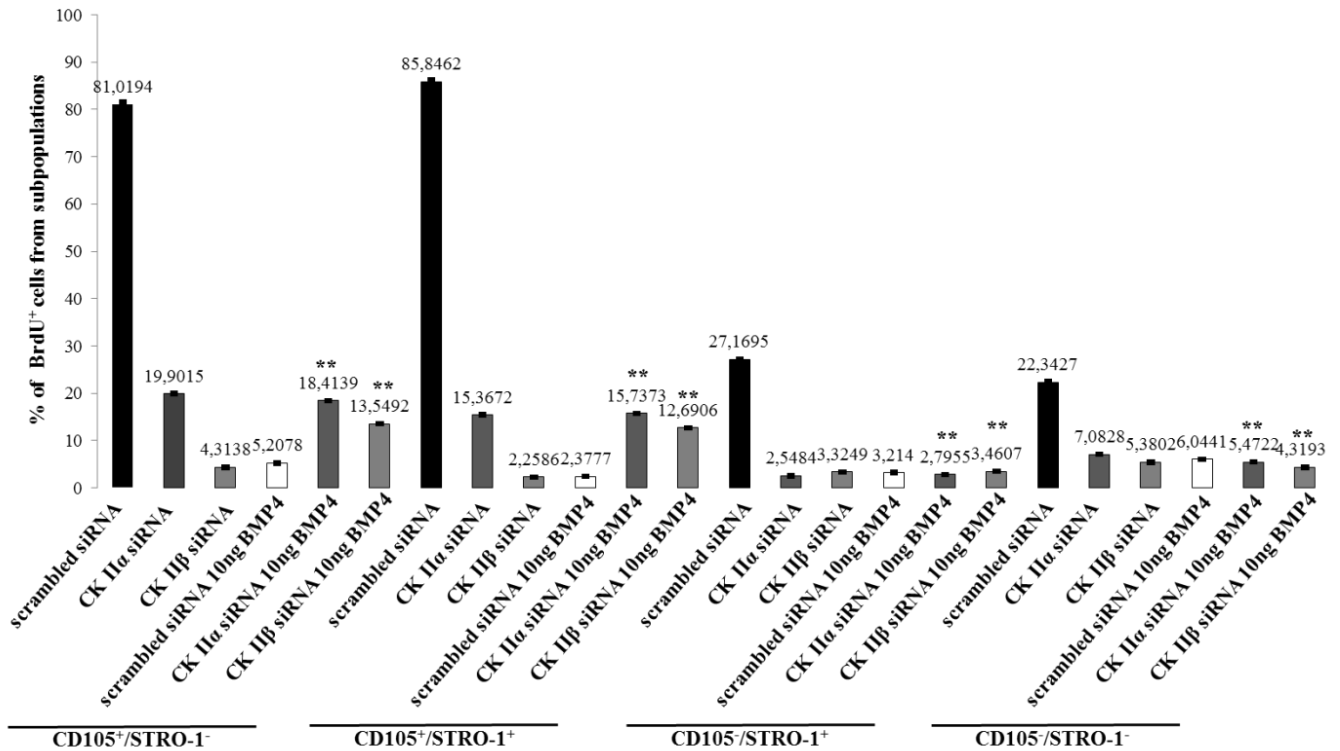


Фиг.25. Установяване на антипролиферативен ефект в хетерогенни фенотипове при условия на *si RNA* медирано заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица.

Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA), където стойността на *P* е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^* < 0.001$

При *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната α и некаталитичната β субединица в хетерогенните субпопулации и стимулирането им с BMP4 растежен фактор се стига до извода, че във фенотипа на CD44⁺/CD117⁺/CD105⁺ репликационната активност на каталитичната субединица се увеличава частично след подаване на растежния фактор, докато при некаталитичната почти 5 пъти се увеличава. В субпопулацията на клетките не експресиращи CD105 се наблюдава антипролиферативен ефект, както при α , така и при β субединицата на протеин киназа CK2. В клетките позитивни за мезенхимния маркер STRO-1 репликационната активност на каталитичната субединица се увеличава сравнително малко след стимулирането ѝ с BMP4 докато при некаталитичната почти 4 пъти. Във фенотипа на CD44⁺/CD117⁺/STRO-1⁻ при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната α субединица се наблюдава инхибиране на пролиферативната активност

вследствие на индуцирането ѝ с BMP4, докато при некаталитичната β субединица се установява слабо завишаване.



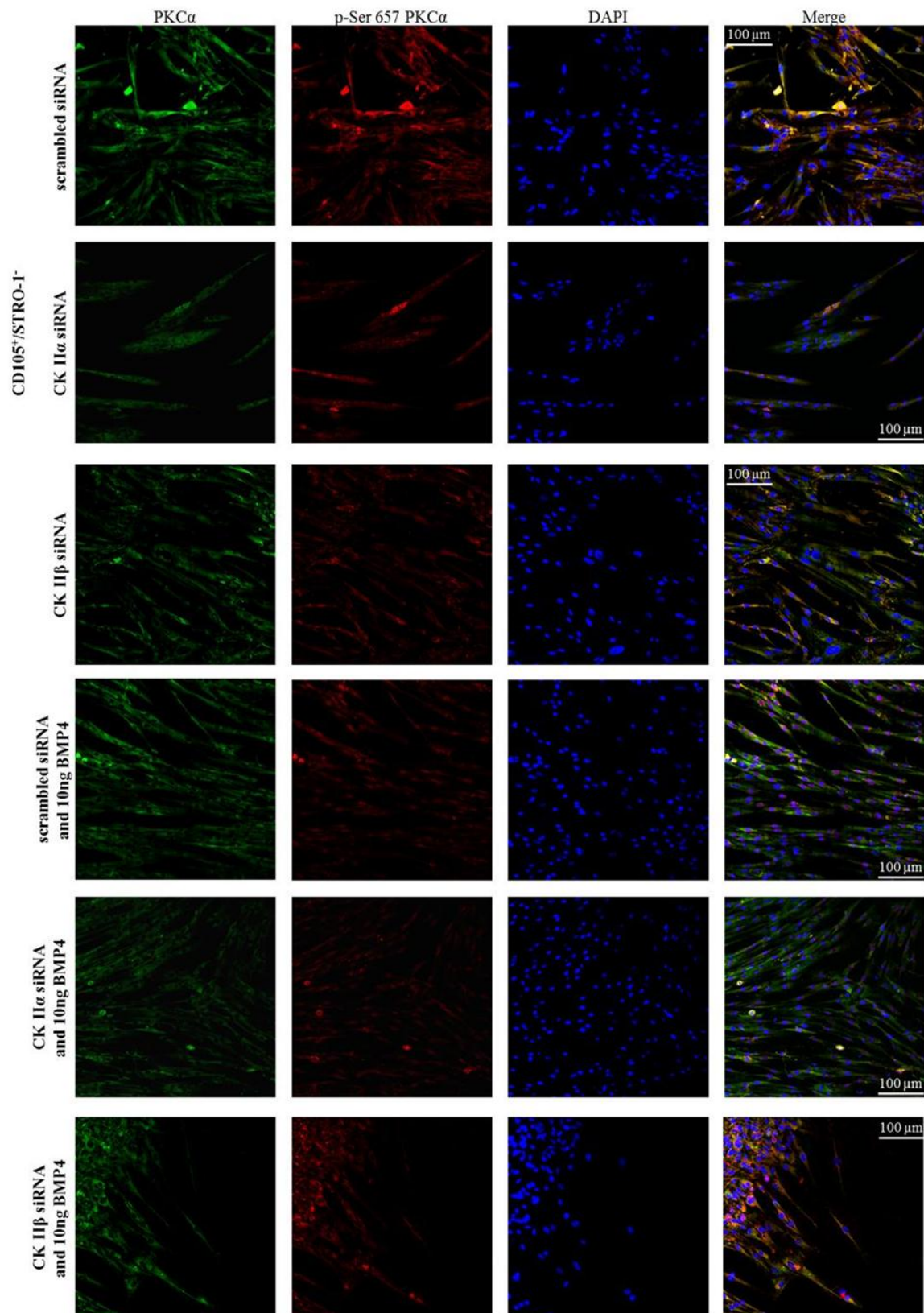
Фиг.26. Установяване на антипролиферативен ефект в хомогенни фенотипове при условия на *si RNA* медирано заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица.

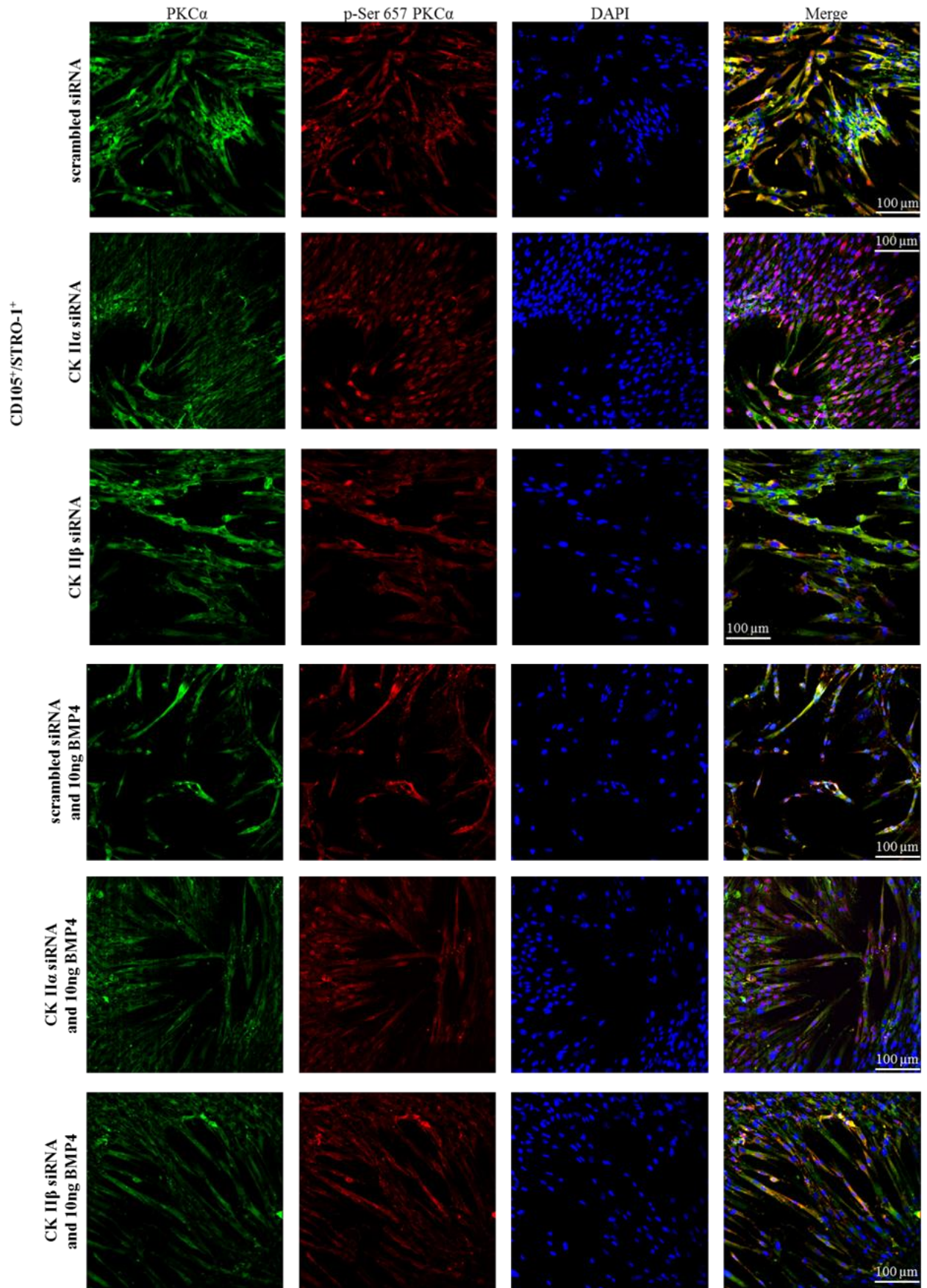
Данните са анализирани чрез one-way ANOVA, SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA), където стойността на P е по-малко или равно на 0.05-статистически достоверно: $p^{**} < 0.001$

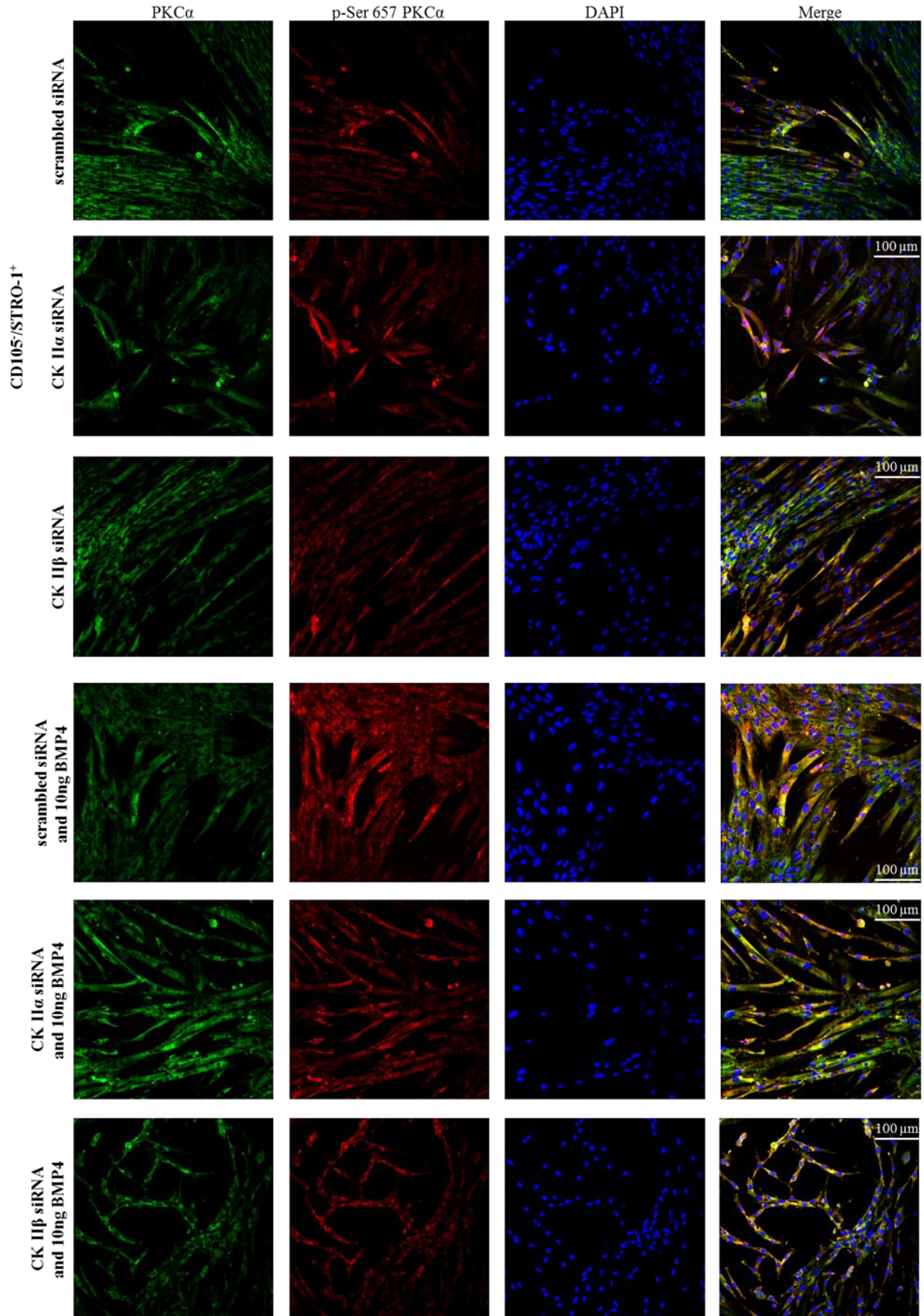
В хомогенните субпопулации установяването на пролиферативната активност при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната α и некаталитичната β субединица и трансдуцирането на BMP сигнала е още по-детайлен. В субпопулацията на CD105⁺/STRO-1⁻, пролиферативната активност намалява при заглушаването на α субединицата и индуцирането ѝ с BMP4 растежен фактор, докато при β субединицата се наблюдава трикратно увеличаване на пролиферативната активност, вследствие на заглушаването и стимулирането ѝ с BMP4. В двойно позитивната субпопулация се декрира минимално завишаване на инкорпорирането на BrdU на α субединицата и BMP4, при β субединица-

индуцирането ѝ с BMP4 води до 6 пъти увеличаване на пролиферативната активност. Във фенотипа на CD105⁻/STRO-1⁺ се наблюдава много слабо завишаване на каталитичната и некаталитичната субединица на протеин киназа CK2 при условия на стимулиране с BMP4. В двойно негативната субпопулация се наблюдава анти-пролиферативен ефект при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната α и некаталитичната β субединица вследствие на индуцирането им с BMP4.

V. 5.2. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC и ERK1,2



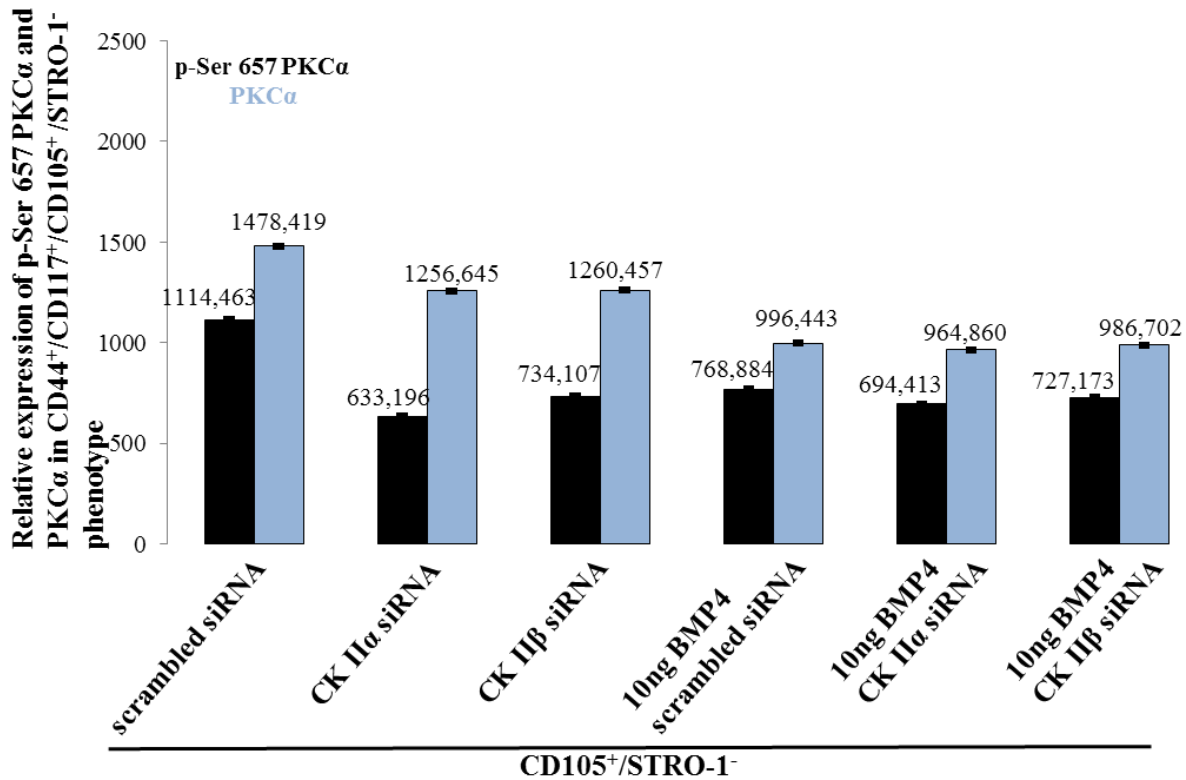




Индиректна имунофлуоресцентна микроскопия на PKC α и p-Ser 657PKC α в СКII α -трансфектирани и в СКII β -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4 в CD105⁺/STRO-1⁻; CD105⁺/STRO-1⁺;CD105⁻/STRO-1⁺ фенотипове. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000

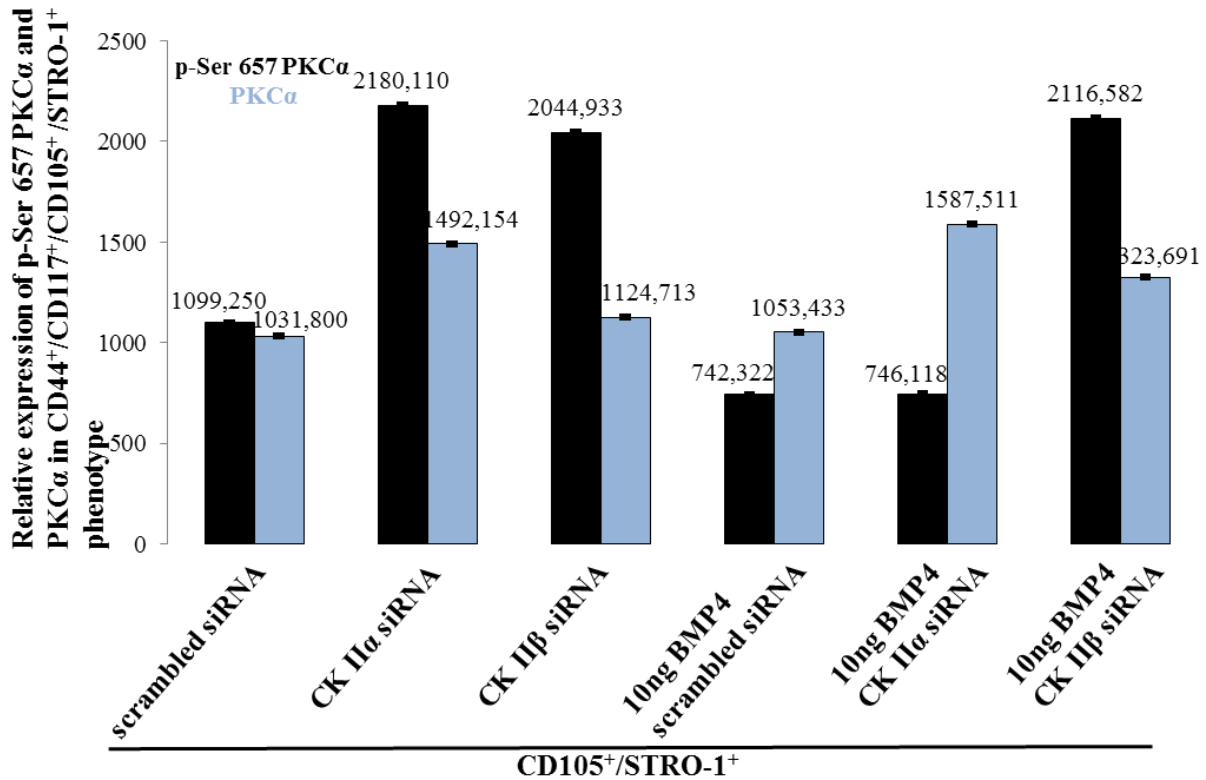
Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm, 640nm, 405 nm, необходими да възбудят съответно IgG-FITC-белязаната PKC α , IgG-CFL-647-белязаната p-Ser-657-PKC α и DAPI-белязаните ядра. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на PKC α и p-Ser-657-PKC α бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), експресията на PKC α (488 флуоресценция) и p-Ser-657-PKC α (640 имунофлуоресценция) или идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция).

Мултифлуоресцентния анализ показва, че при *siRNA* медирано заглушаване, на каталитичната и некаталитичната субединица на протеин киназа СК2 и стимулирането с BMP4 растежен фактор повлияват както на експресията на PKC, така и на фосфорилираната ѝ форма.



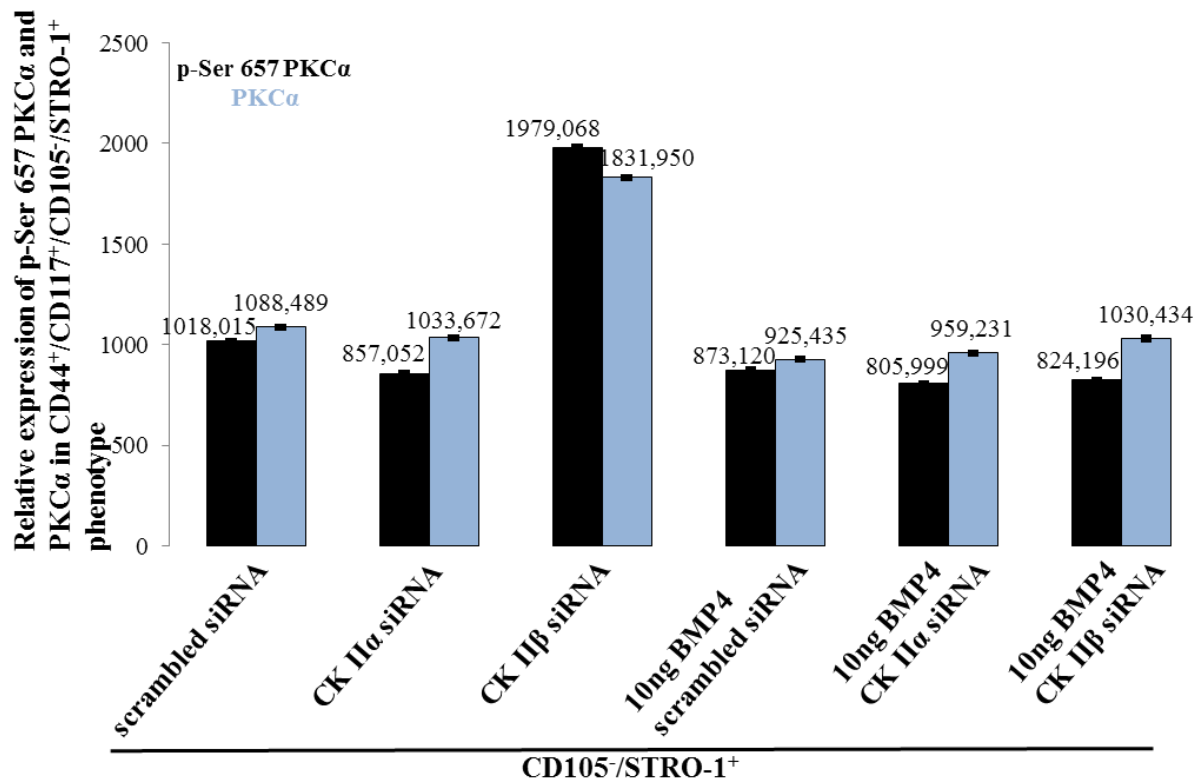
Фиг. 27. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC в CD105⁺/STRO-1⁻

Количественият анализ доказва, че при заглушаване на каталитичната субединица и подаването на BMP4 фосфорилираната форма слабо се завишава, докато експресията намалява. При β субединицата се наблюдава минимално повишаване.



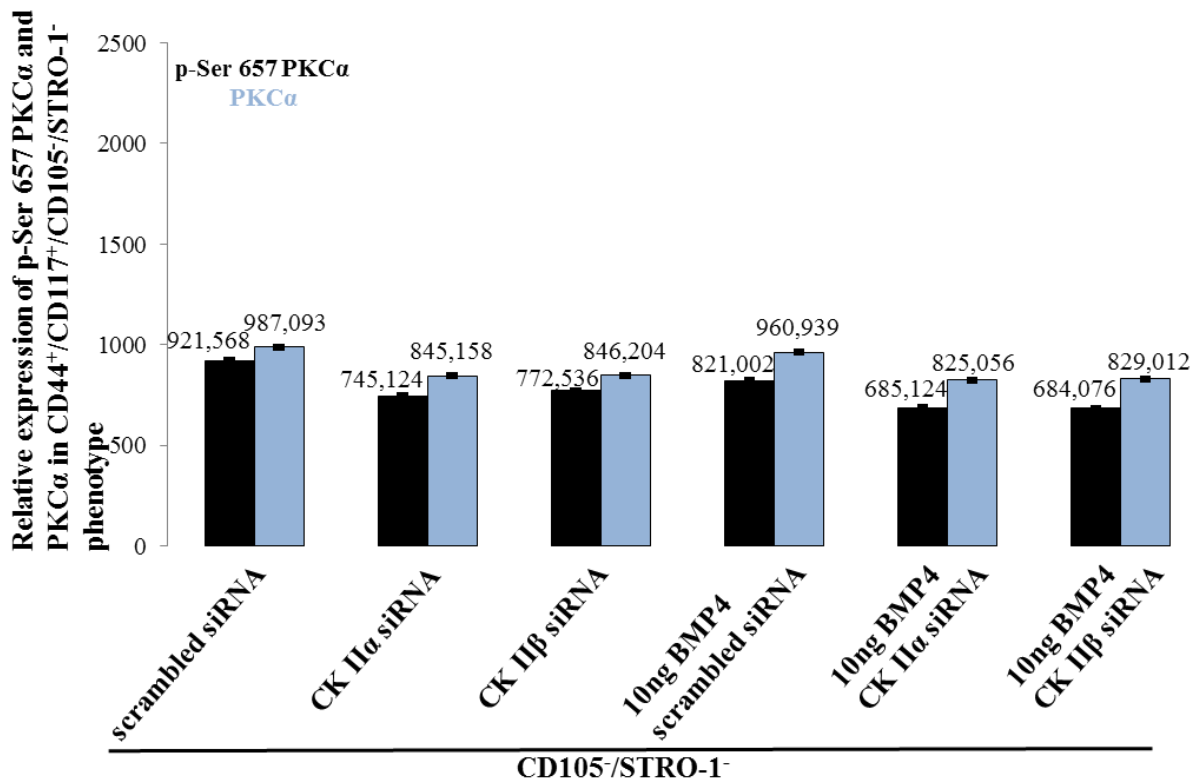
Фиг.28. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC в CD105⁺/STRO-1⁺

В двойно-позитивната субпопулация количественият анализ отчита, че фосфорилираната форма при заглушаването на каталитичната субединица и стимулирането с BMP4 почти 3 пъти намалява, докато експресията на PKC се увеличава. При β субединицата се наблюдава минимално завишаване както на PKC така и на p-Ser 657PKC α .



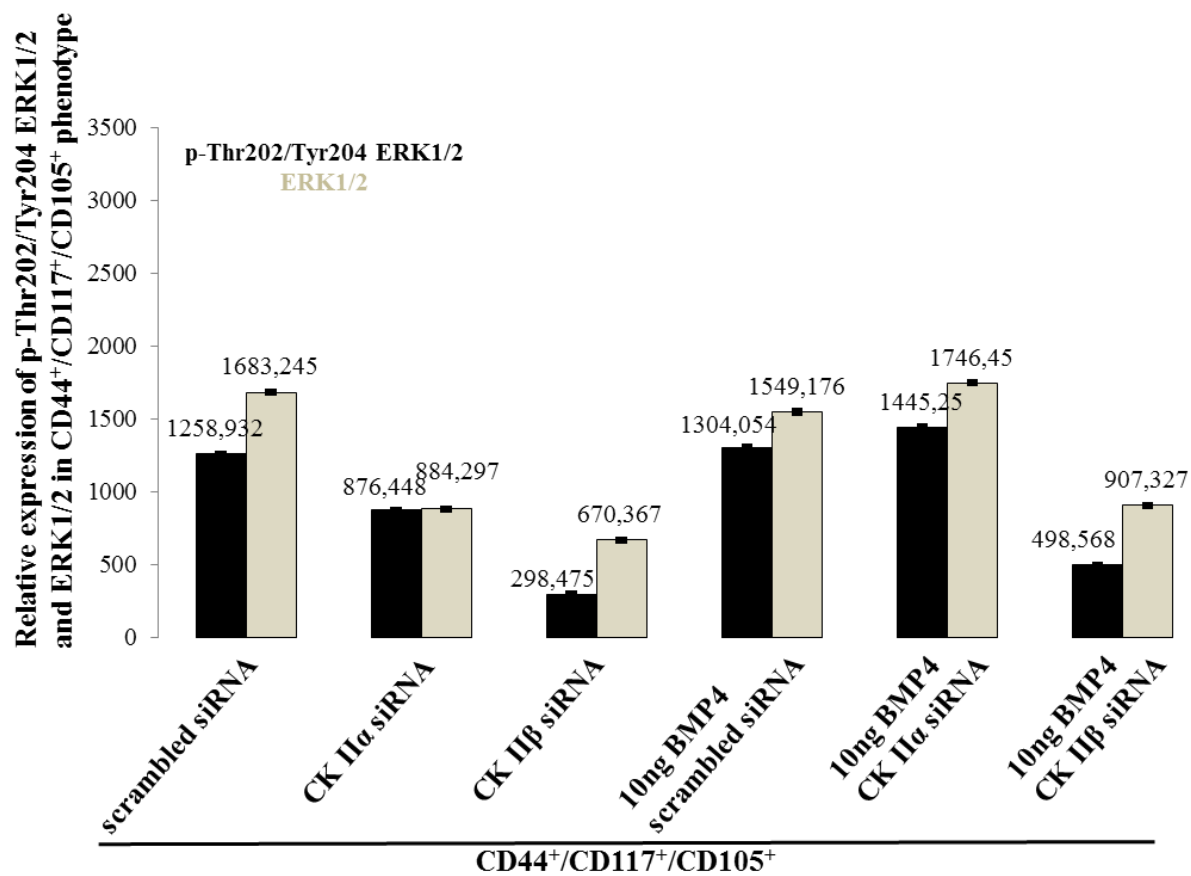
Фиг.29. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC в CD105⁻/STRO-1⁺.

Количественият анализ, установява, че в клетките експресиращи STRO-1 по своята повърхност при заглушаването на α субединицата и поддаването на BMP4, фосфорилираната форма и експресията минимално намаляват. При β субединицата почти 2 пъти намалява PKC α и p-Ser 657PKC α вследствие на стимулирането ѝ с BMP4.

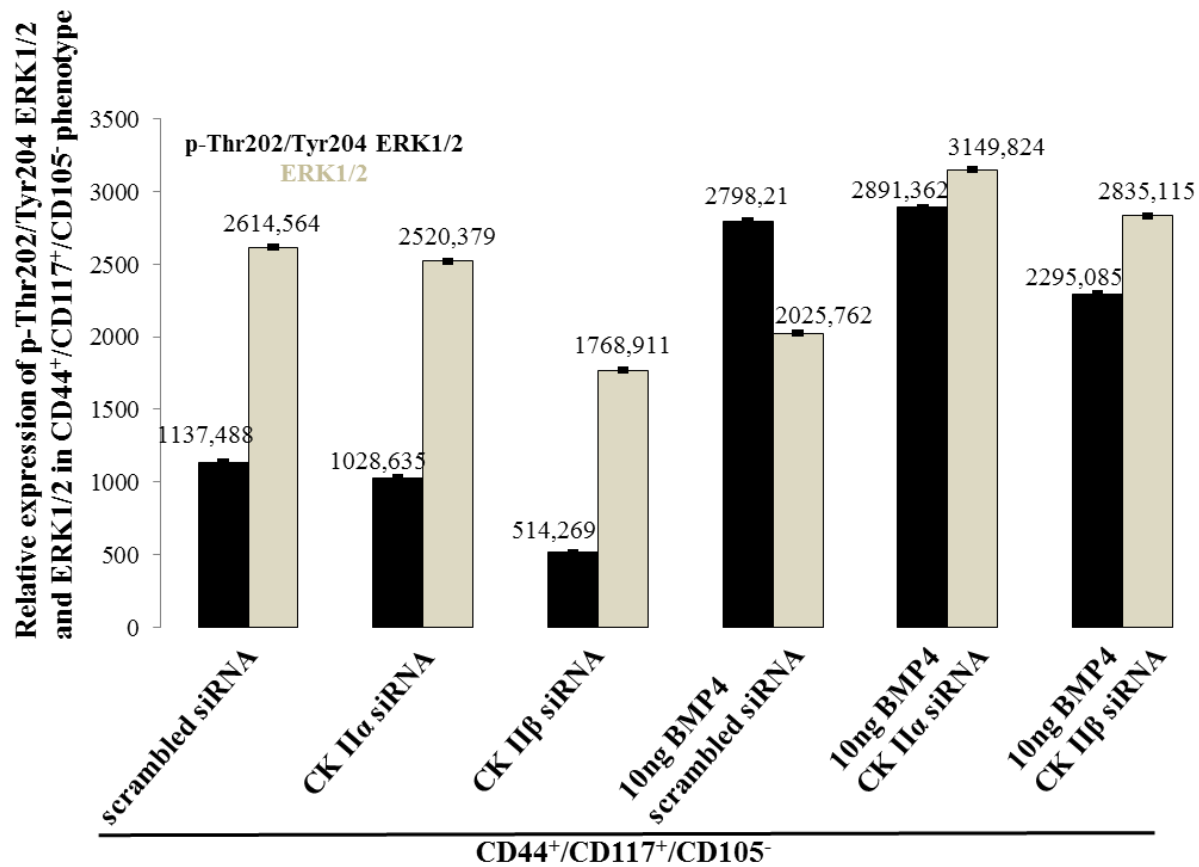


Фиг.30. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на PKC в CD105⁻/STRO-1⁻.

При двойно-негативните при заглушавана на каталитичната субединица и поддаването на BMP4 фосфорилираната форма и експресията слабо намаляват. Същият ефект се наблюдава и при β субединицата.

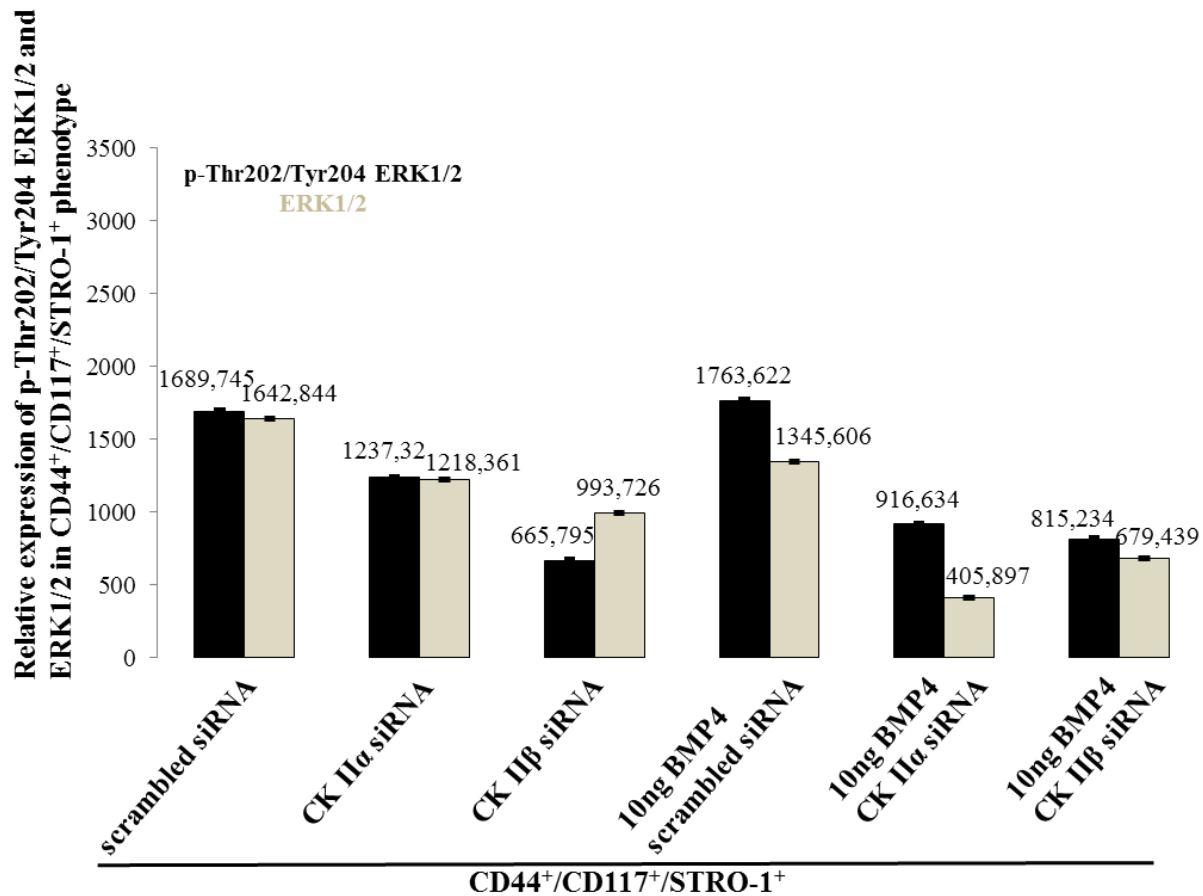


Фиг.31. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD44/CD117/CD105⁺



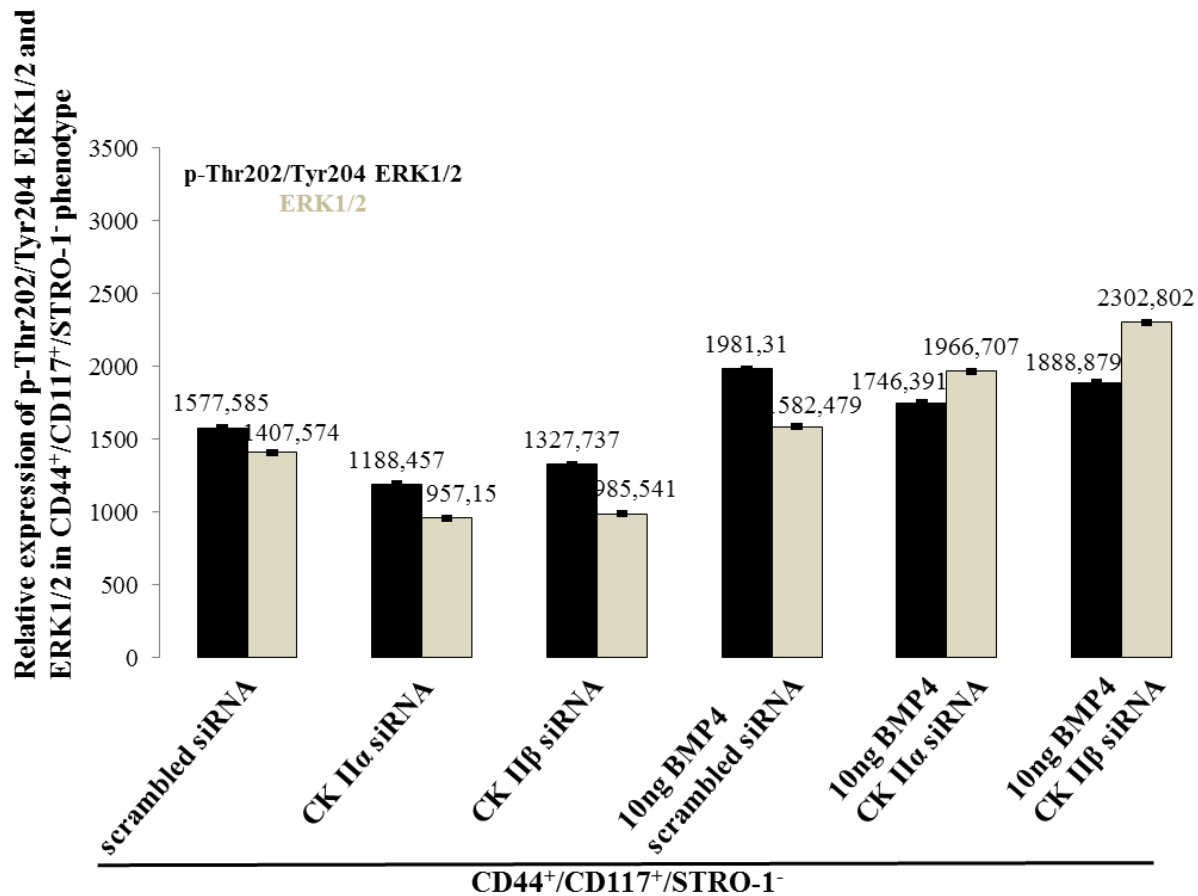
Фиг.32. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в $CD44^+/CD117^+/CD105^-$

В хетерогенният състав на фенотиповете на $CD44^+/CD117^+/CD105^+$ и $CD44^+/CD117^+/CD105^-$ при *si RNA* медираното-заглушаване както на каталитияната, така и на некаталитияната субединица и при стимулирането им с BMP4 експресията и фосфорилираната форма се увеличават.



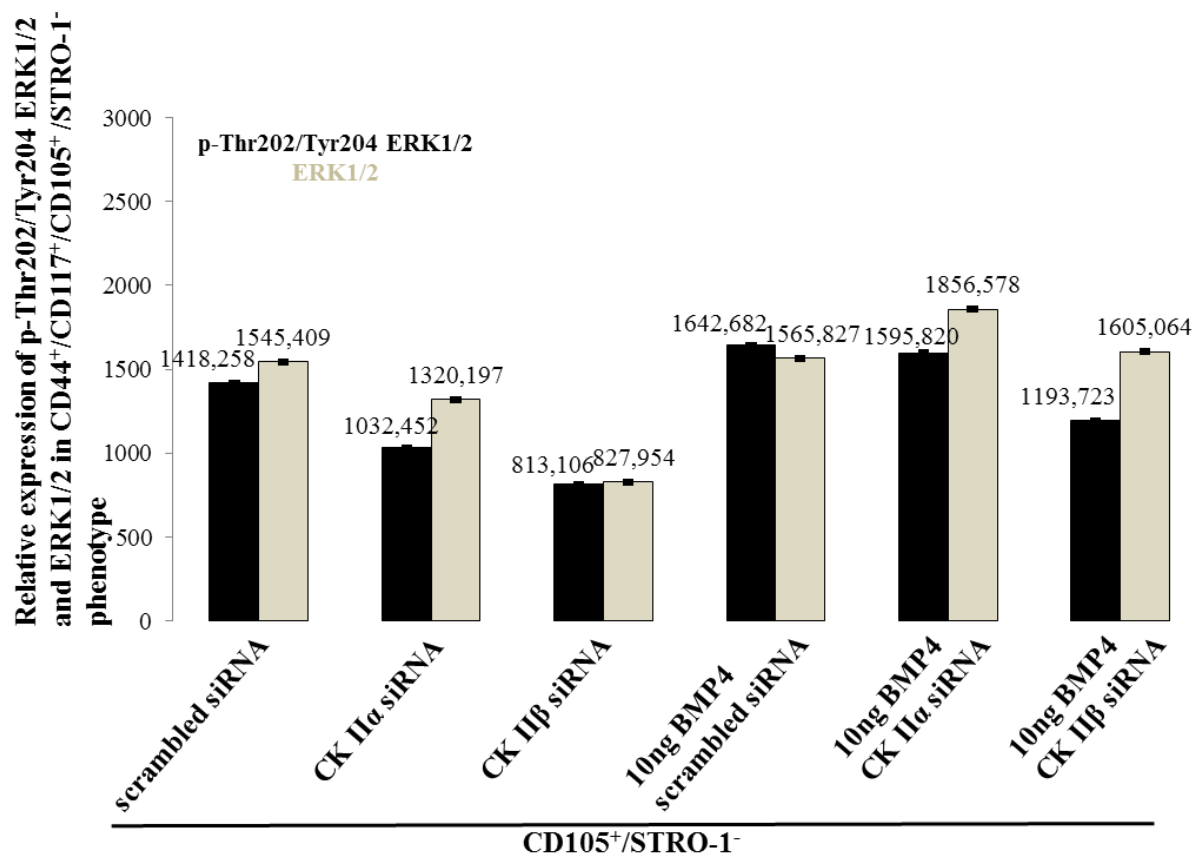
Фиг.33. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в $CD44^+/CD117^+/STRO-1^+$

В популацията на STRO-1 имащите клетки при стимулирането и заглушаването на каталитичната субединица активността на ERK1,2 намалява слабо, докато експресията почти 2 пъти намалява. При β субединицата активността се увеличава, докато експресията се понижава.

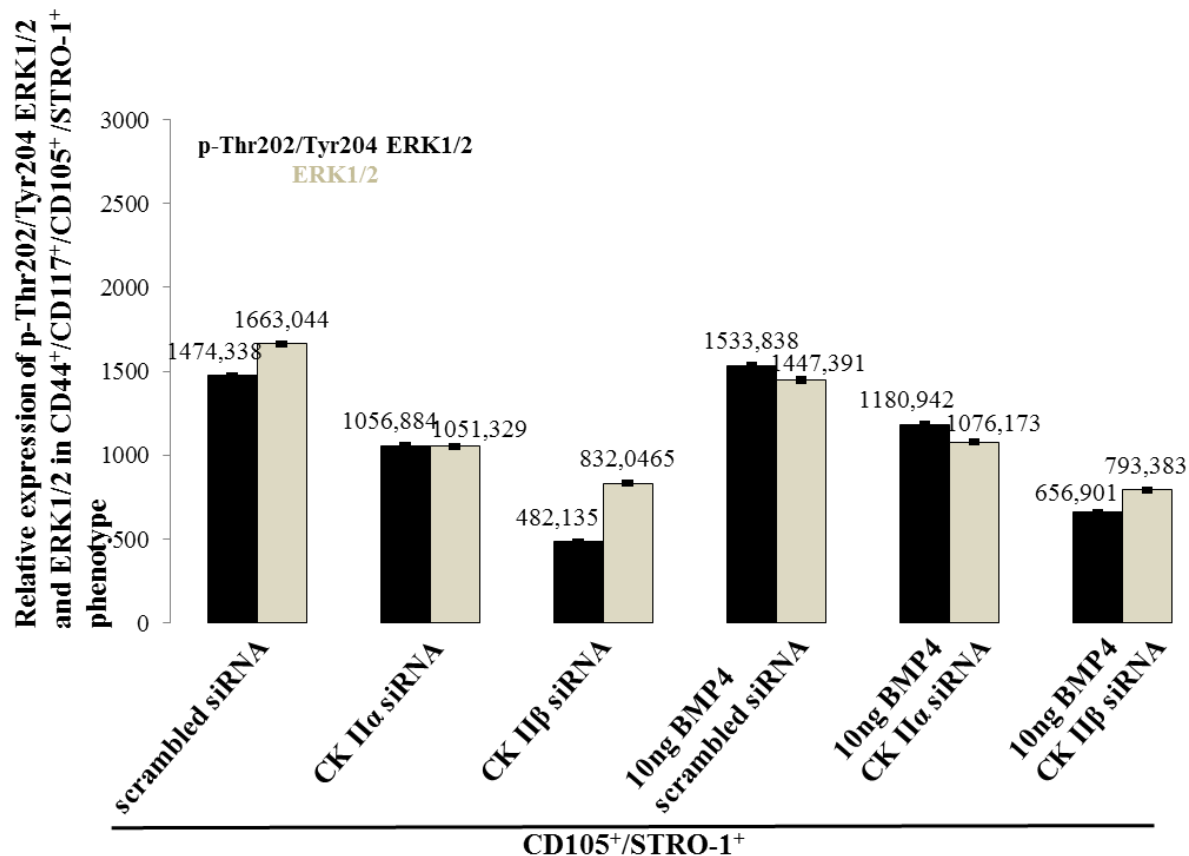


Фиг.34. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD44/CD117/STRO-1⁻.

В клетки, не експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност се установява, че при заглушаването на каталитичната субединица и стимулирането с BMP4 активността и експресията на ERK1,2 се увеличават, същият ефект се наблюдава и при некаталитичната субединица на протеин киназа CK2.

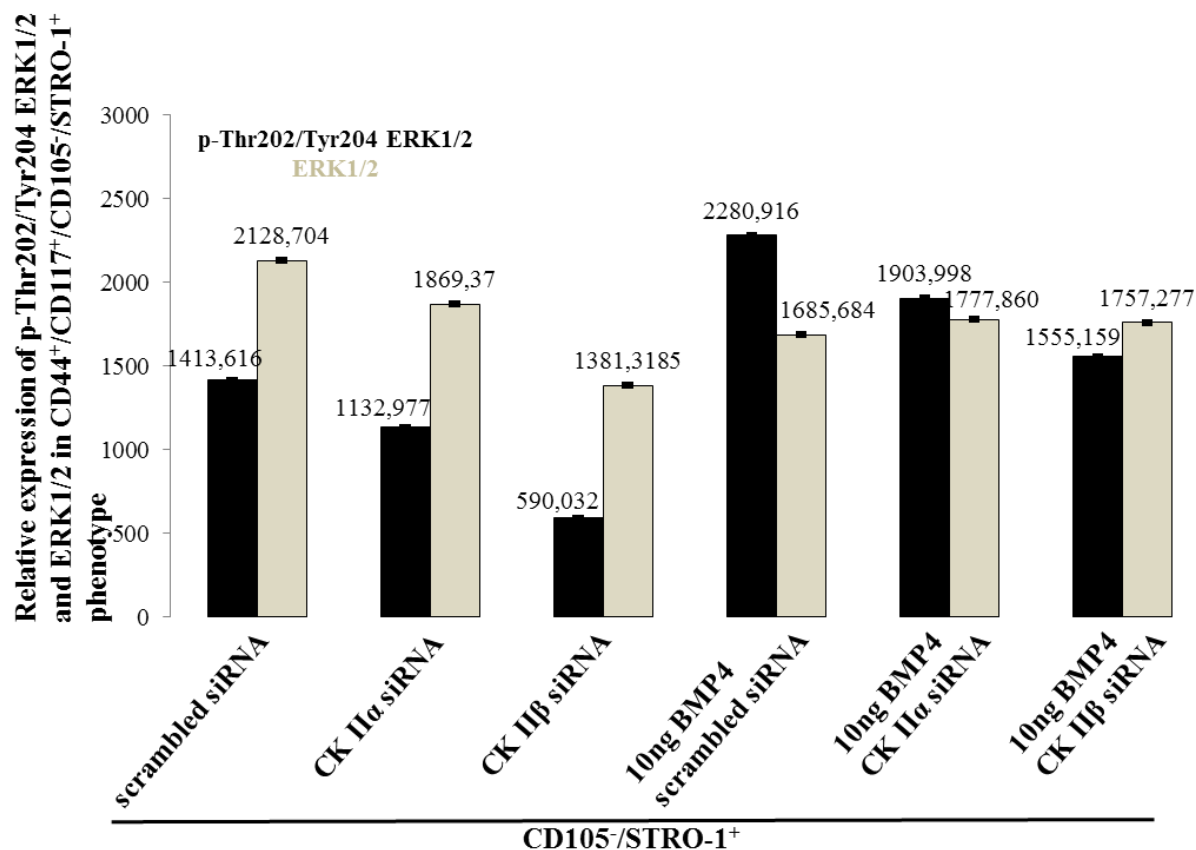


Фиг.35. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105⁺/STRO-1⁻



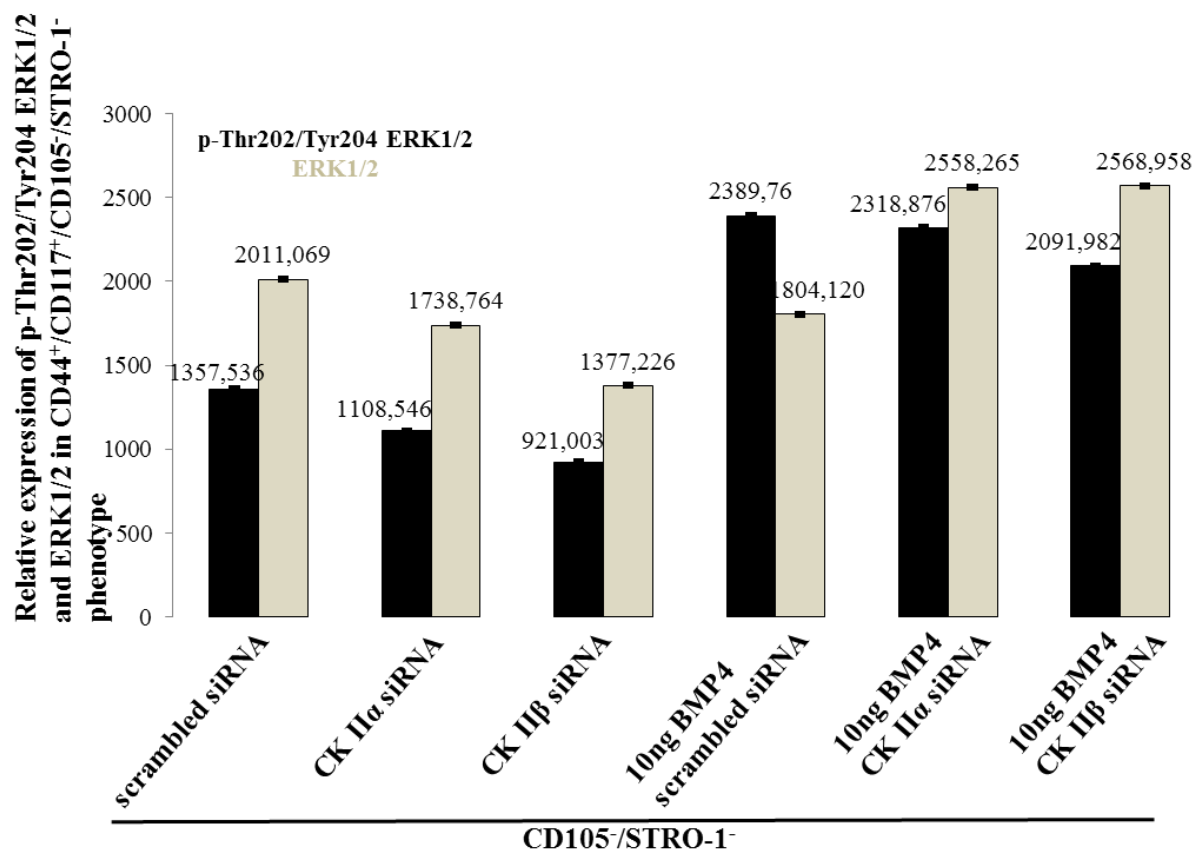
Фиг. 36.Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105/STRO-1⁺

В хомогенните субпопулации, получени вследствие на проведеното двойно магнитно сепариране се установява и че в двата фенотипа неекспресиращи и експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност активността и експресията на ERK1,2 се увеличават при *siRNA* медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и подаването на BMP4 растежния фактор.



Фиг.37. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105⁻/STRO-1⁺.

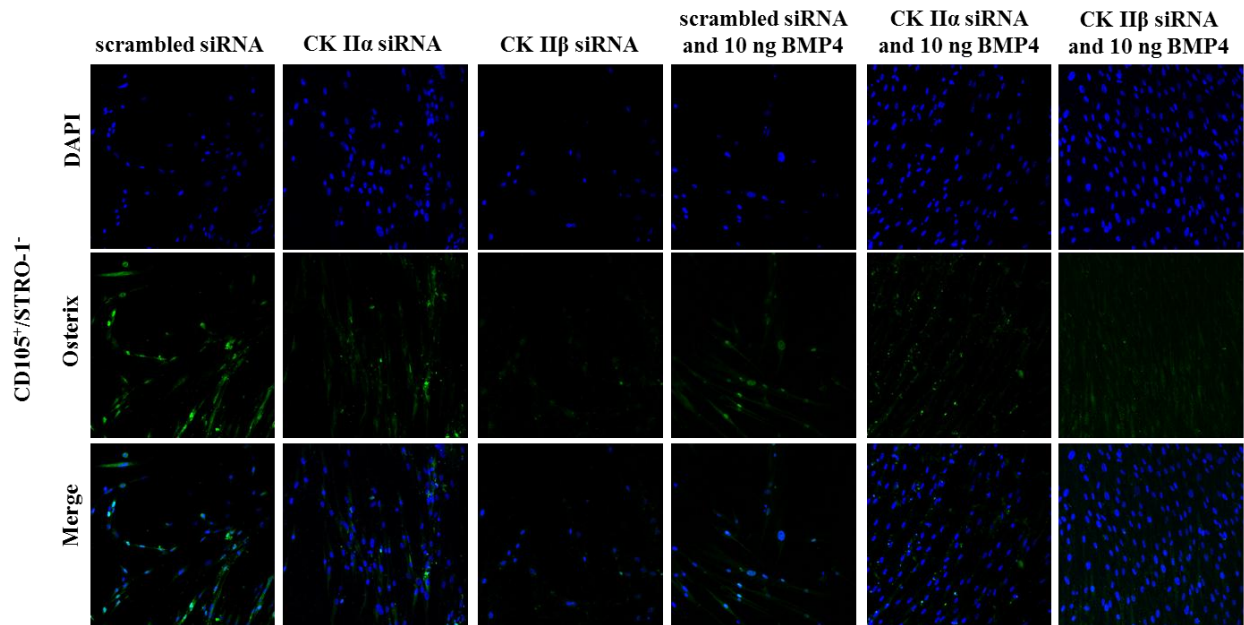
В популацията от клетки, които не експресират мезенхимния маркер CD105, но експресират STRO-1активността и експресията на ERK1,2 се увеличават при *siRNA*медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и подаването на BMP4 растежния фактор.



Фиг.38. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцираният ефект върху експресията и активността на ERK1, 2 в CD105⁻/STRO-1⁻.

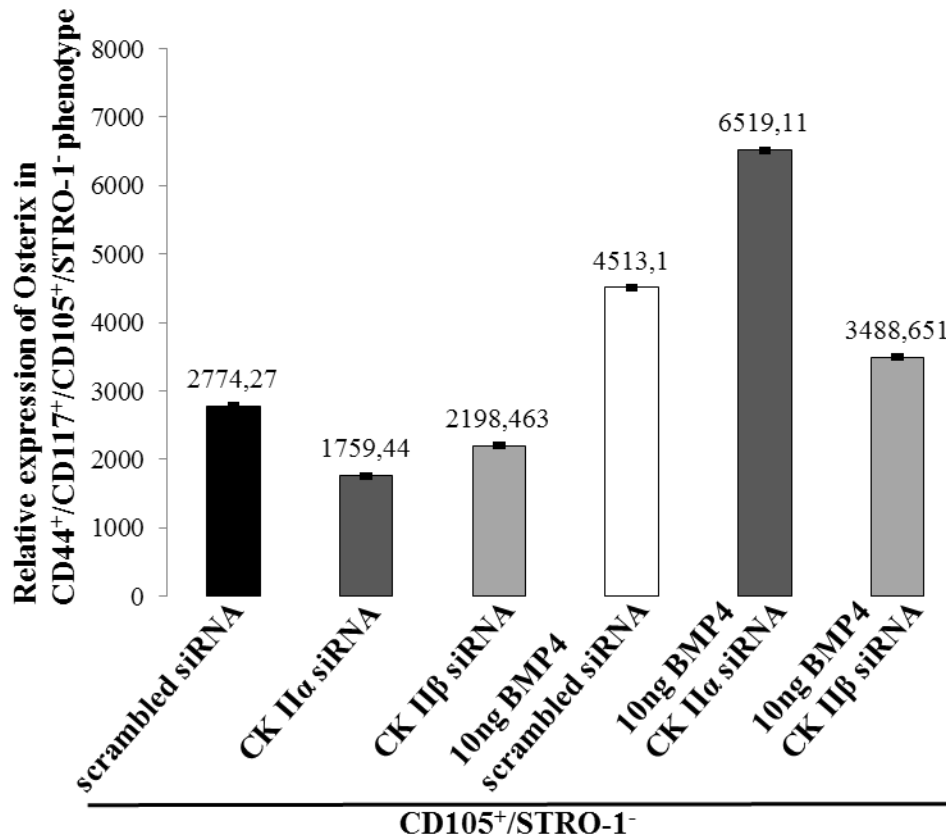
В двойно-негативната субпопулация драстично се увеличават активността и експресията на ERK1,2 при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и подаването на BMP4 растежния фактор.

V. 5.3. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 на BMP4 индуцираният ефект върху експресията на транскрипционния фактор OSTERIX



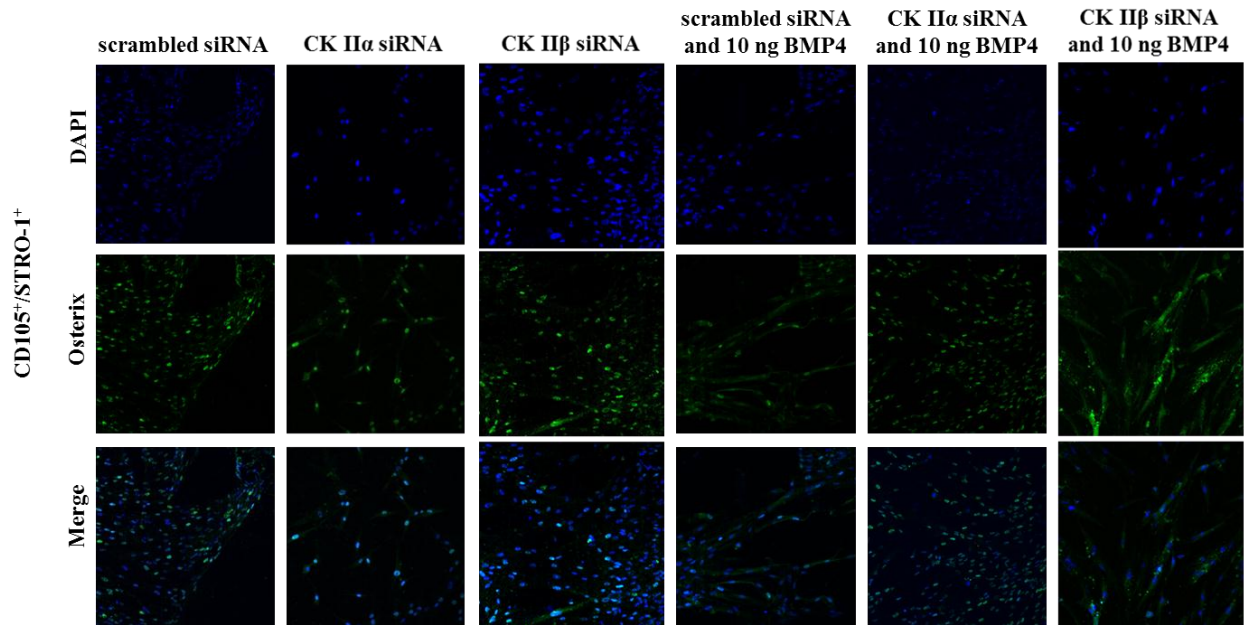
Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в СКII α -трансфектирани и в СКII β -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4, в CD105⁺/STRO-1 субпопулацията. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на Osx бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на Osx (488 флуоресценция).



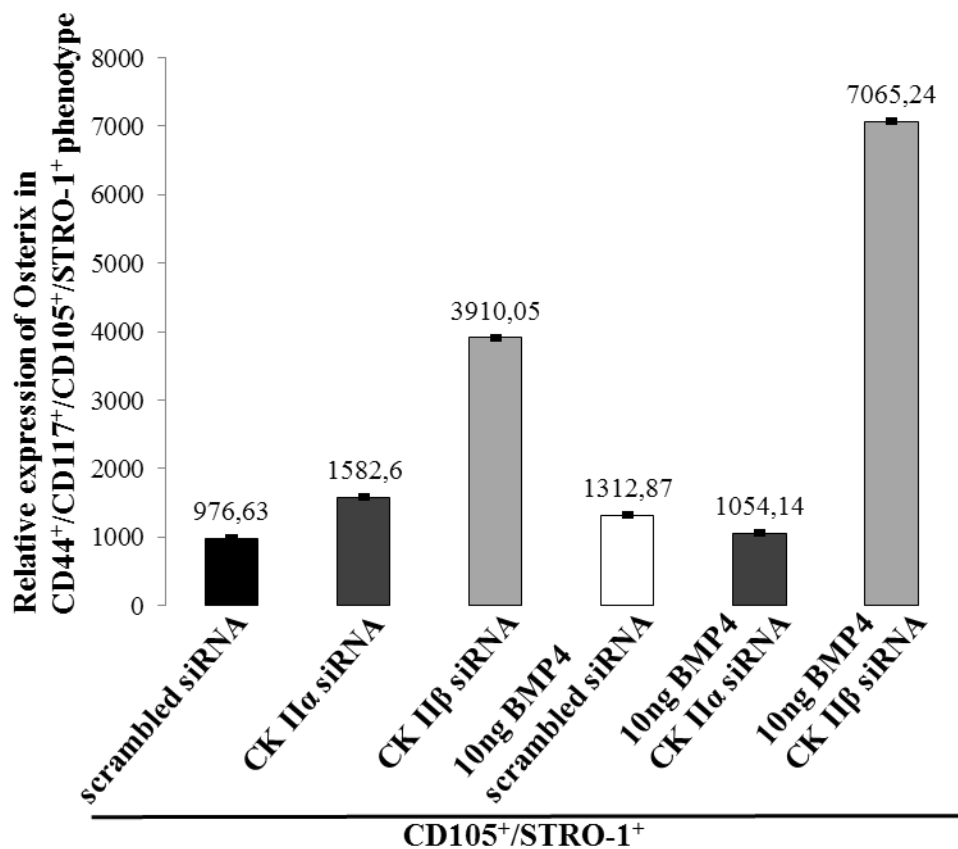
фиг. 39. Определяне белтъчната експресия на транскрипционния фактор Osterix в $CD44^+/CD117^+/CD105^+/STRO-1^-$ при условия на *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица (α) и некаталитичната субединица (β) и BMP4 индуцирания ефект.

При *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица (α) се наблюдава потискане на експресията на Osterix спрямо контролата, докато при индуцирането с растежния фактор BMP4, експресията нараства почти 3 пъти. При некаталитичната отново се наблюдава потискане спрямо контролата и завишаване на експресия на Osx вследствие на третирането с рекомбинантния растежен фактор.



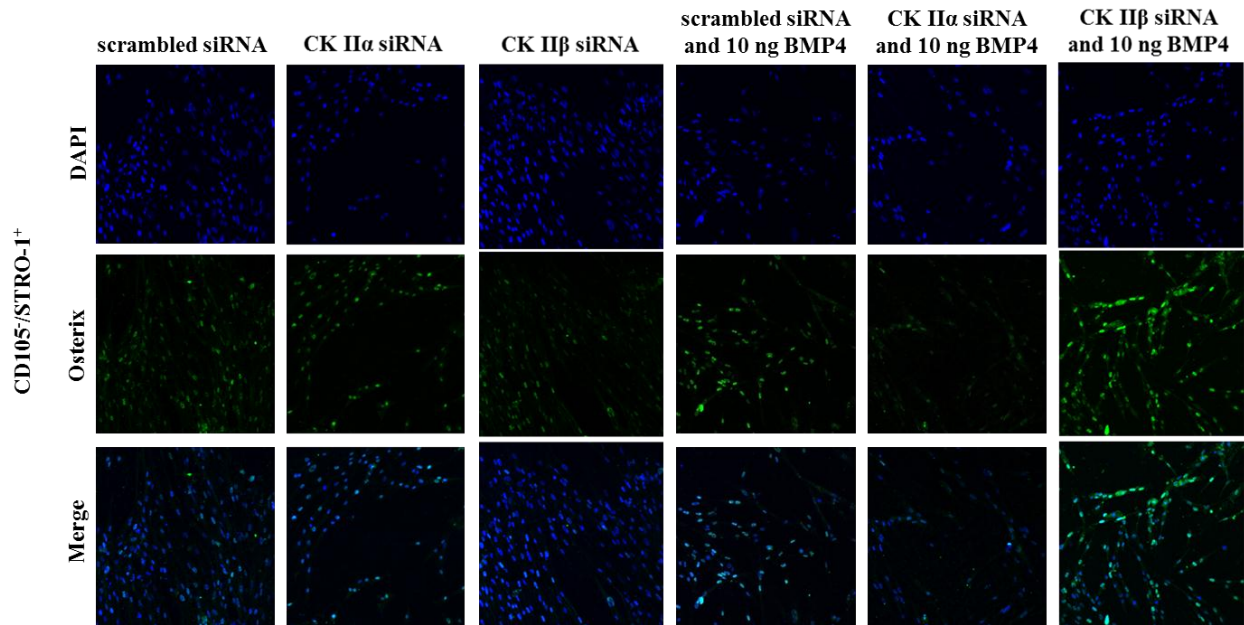
Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в СКII α -трансфектирани и в СКII β -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4, в CD105⁺/STRO-1⁺ субпопулацията. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на Osx бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на Osx (488 флуоресценция).



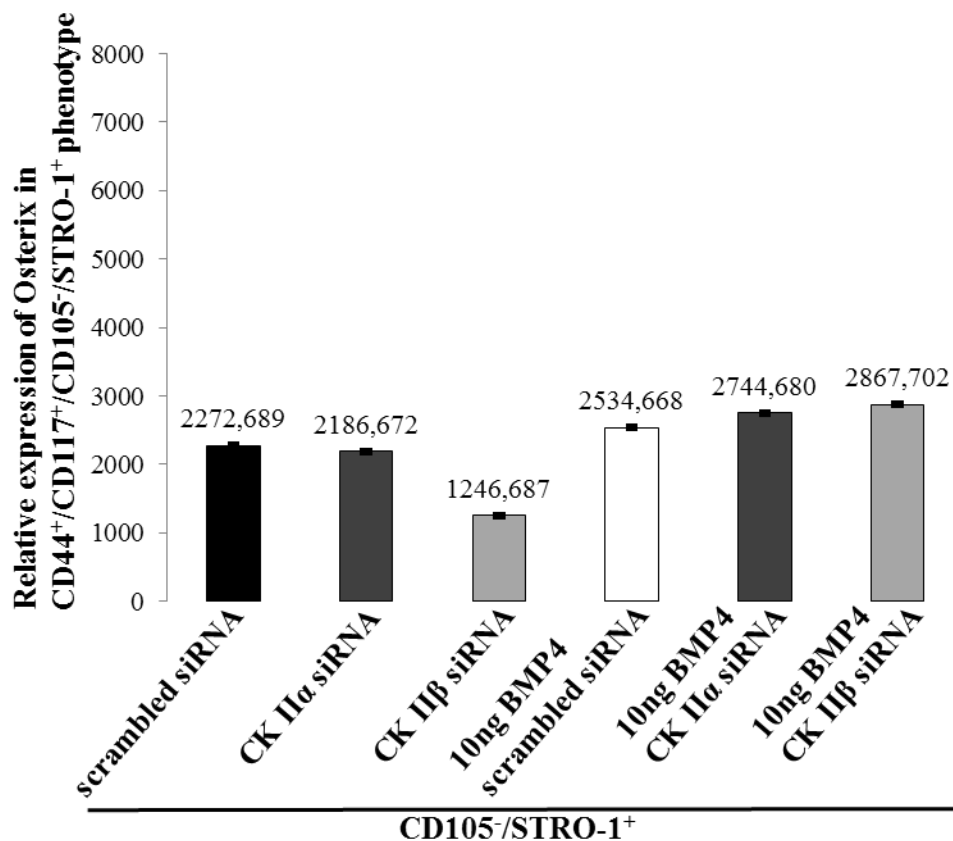
Фиг. 40. Определяне белтъчната експресия на транскрипционния фактор Osterix в $CD44^+/CD117^+/CD105^+/STRO-1^+$ при условия на *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица (α) и некаталитичната субединица (β) и BMP4 индуцирания ефект.

В двойно позитивния фенотип се установява, че експресията на Osterix при *si RNA* медурано-заглушаване на каталитичната субединица (α) се завиша спрямо контролата, и намалява вследствие на индуцирането ѝ с BMP4. При некаталитичната субединица се наблюдава увеличаване на експресия при *si RNA* медурано-заглушаване и при посттрансфекционното ѝ стимулиране с BMP4.



Имунофлуоресцентно изследване на експресията и субклетъчната локализация на Osterix в СКII α -трансфектирани и в СКII β -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4, в CD105⁻/STRO-1⁺ субпопулацията. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 405 nm, възбуждащи Osterix-белязан с IgG-FITC и DAPI-белязаните ядра в двойно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на Osx бяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на DAPI-белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на Osx (488 флуоресценция).



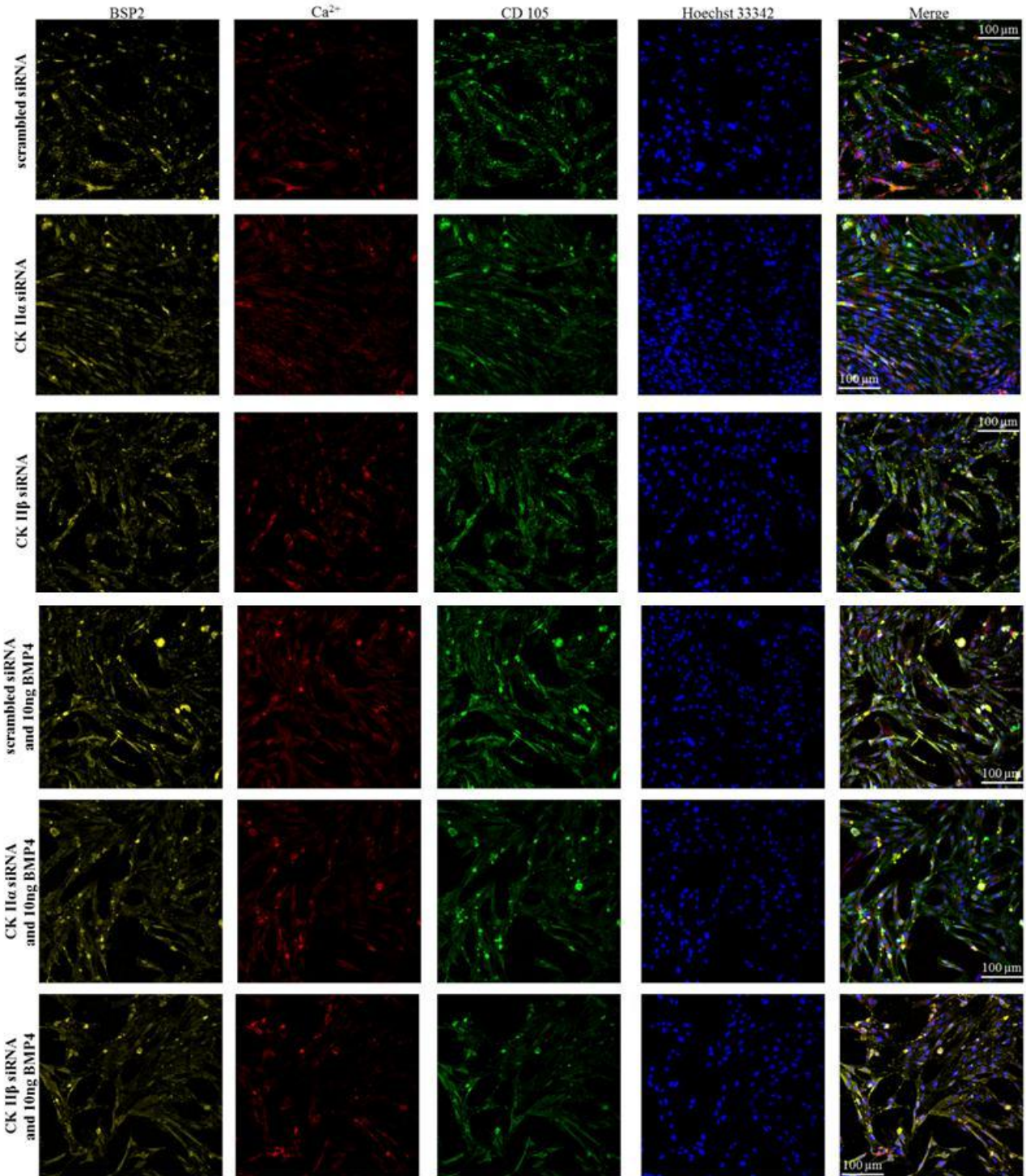
Фиг. 41. Определяне белтъчната експресия на транскрипционния фактор *Osterix* в $CD44^+/CD117^+/CD105^-/STRO-1^+$ при условия на *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната субединица (α) и некаталитичната субединица (β) и *BMP4* индуцирания ефект.

При каталитичната и некаталитичната субединица се установява намаляване на белтъчната експресия, докато при посттрансфекционното ѝ стимулиране с *BMP4* се наблюдава завишаване на експресията на *Osterix*.

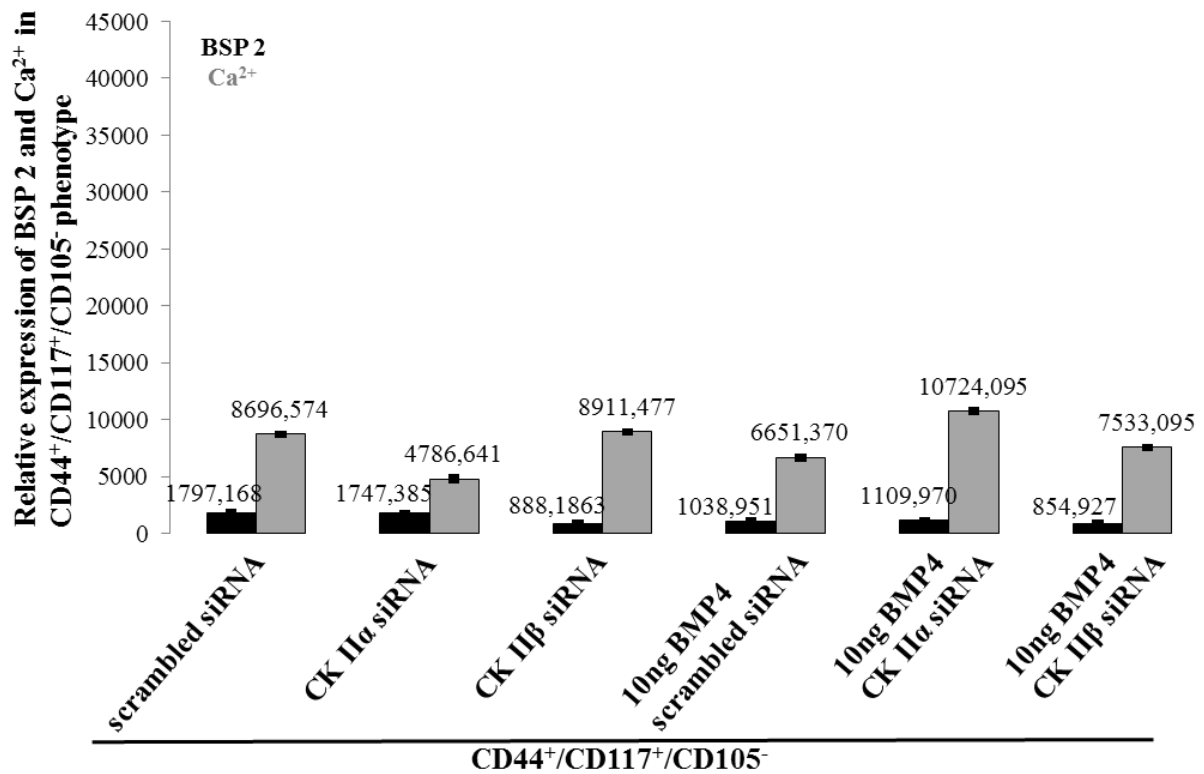
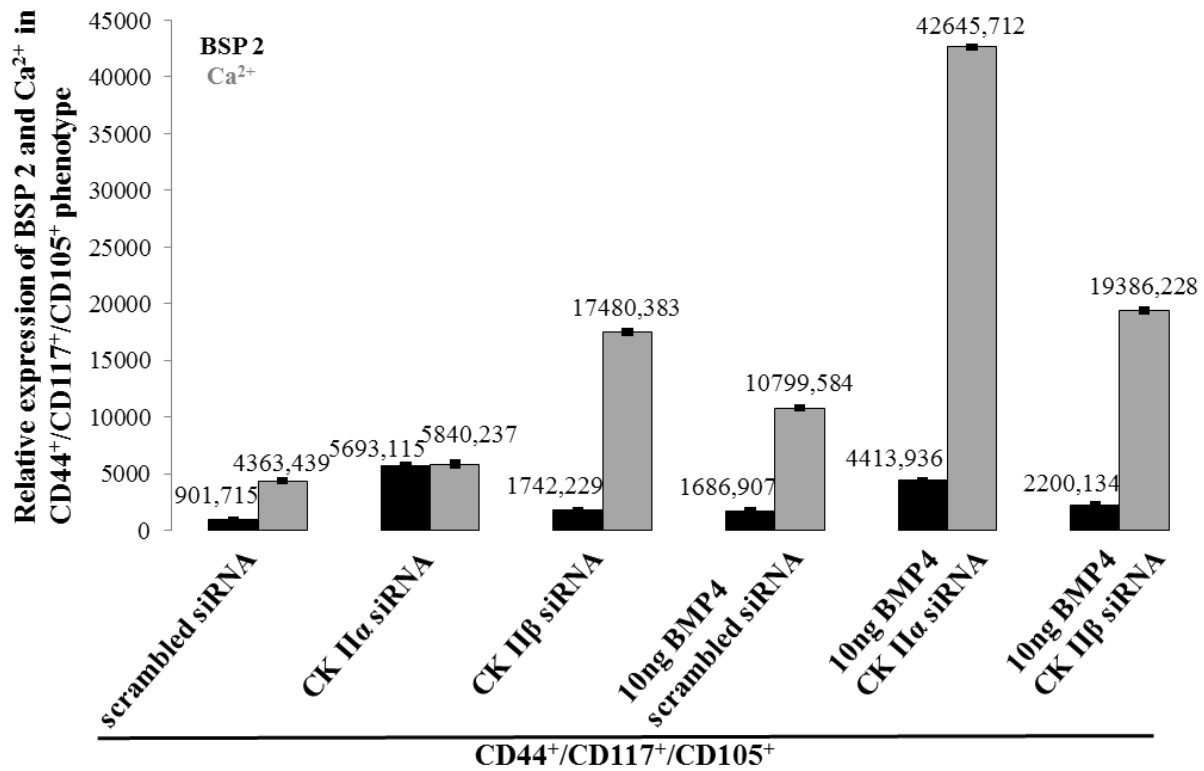
*V. 5.4. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за *BMP4* индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на *BSP2* и калцификацията на екстрацелуарния матрикс.*

За първи път се доказва връзката на костният-сиало протеин *BSP2* и калцификацията на екстрацелуарния матрикс в клетки, изолирани от дентална папила и експресиращи мезенхимните маркери *CD105* и *STRO-1* по своята клетъчна повърхност, при условия на *si RNA* медирано заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и посттрансфекционно стимулирани с *BMP4* растежен фактор.

За целта, експоненциално растящите в пълноценна хранителна среда клетъчни култури бяха фиксирани и *Xylenol orange* маркирани срещу BSP2 мезенхимните маркери CD105 и/или STRO-1.

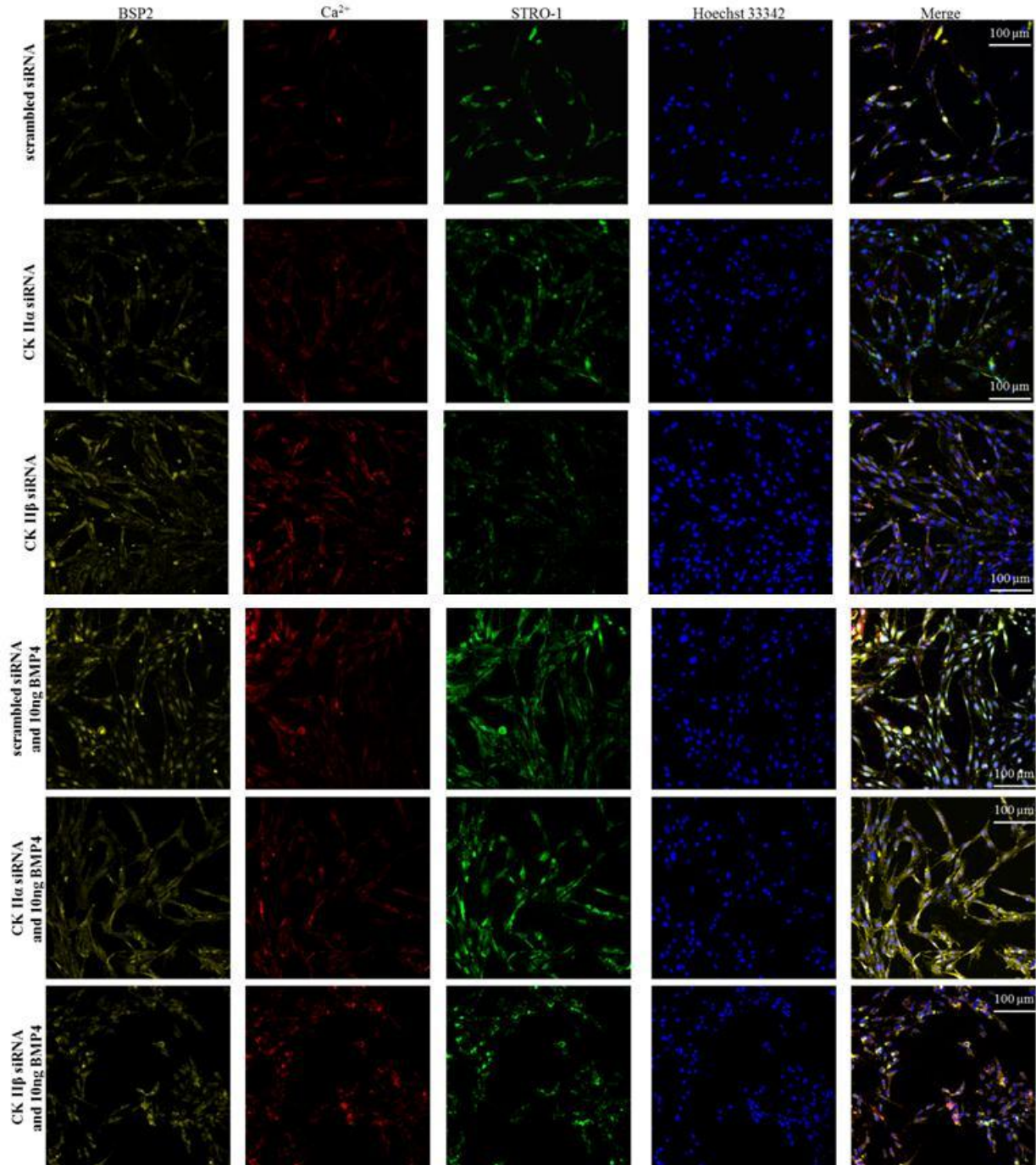


Индиректна имунофлуоресцентна микроскопия на BSP в СКIIα-трансфектирани и в СКIIβ-трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в CD105 експресиращи клетки. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000



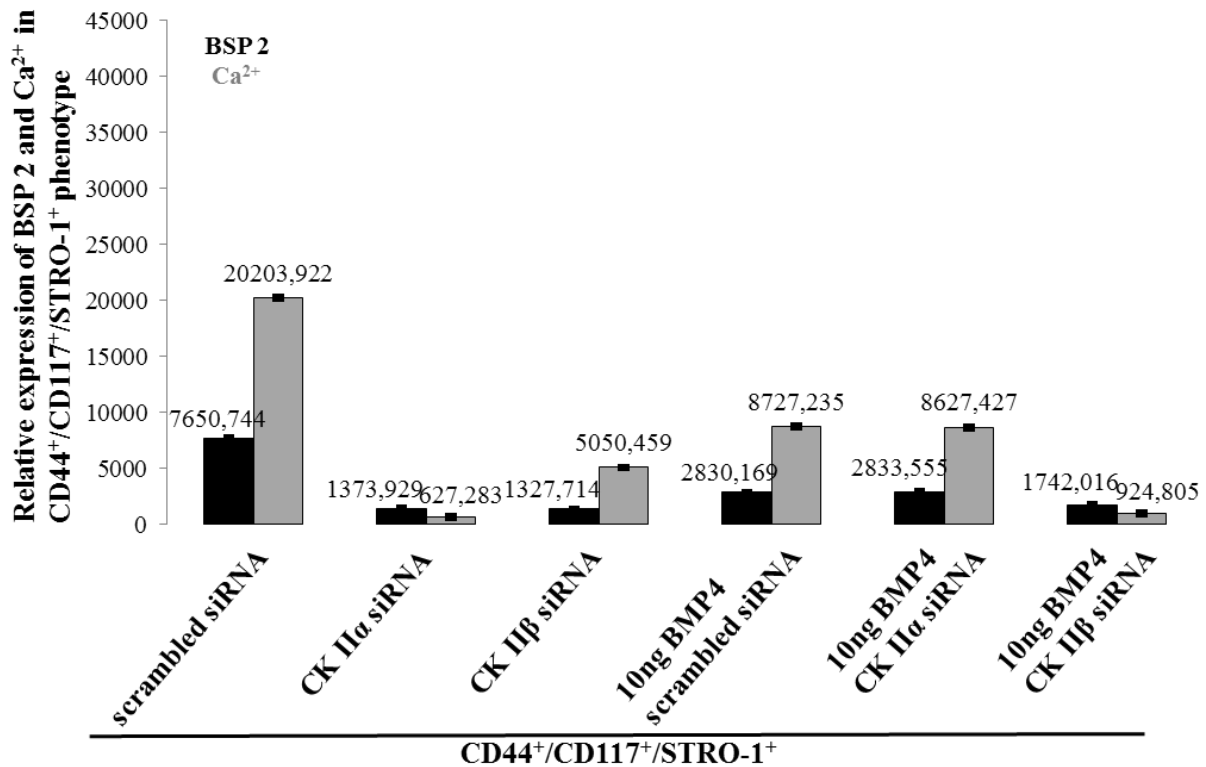
Фиг.42 и 43.Роля на α и β субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуарния матрикс в хетерогенни субпопулации.

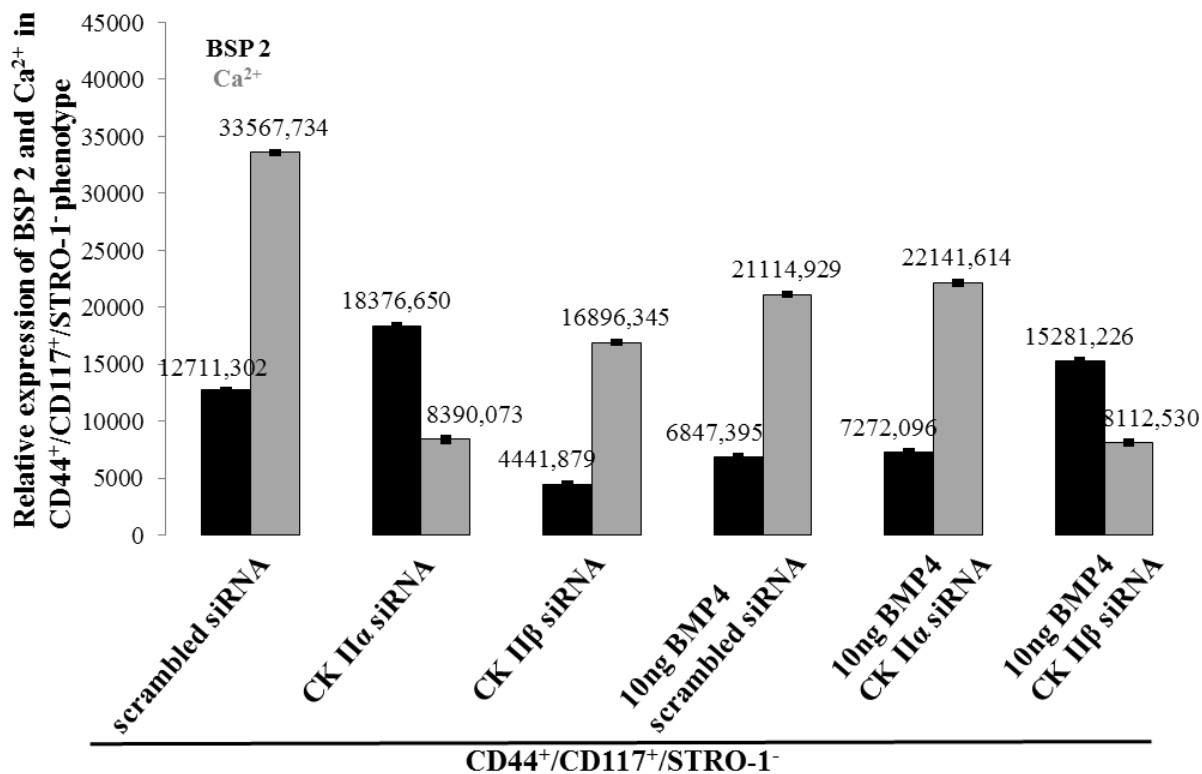
В хетерогенните субпопулации, количественият анализ унаглежда, че и в двата фенотипове, експресиращи и неекспресиращи CD105 при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната и некаталитичната субединица и поддаването на BMP4 растежния фактор калциевите депа се увеличават. Базалната експресия на костният – сиало протеин BSP2 в хетерогенната популация експресираща CD105 по своята клетъчна повърхност, нараства най-много при *si RNA* медираното заглушаване на каталитичната субединица (α) спрямо контролата *si RNA*. При посттранскрипционното стимулиране с растежния фактор BMP4, базалната експресия почти 4 пъти се завишава. При некаталитичната субединица (β) слабо се повишава базалната експресия спрямо контролата, докато при BMP4 и при условия на *si RNA* медирано заглушаване на некаталитичната субединица се увеличава BSP2. Базалната експресия на BSP2 в клетките неекспресиращи CD105 при условия на *si RNA* медираното заглушаване на каталитичната субединица (α) намалява спрямо контролата, докато при BMP4 и *si RNA* медираното заглушаване на каталитичната субединица (α) се наблюдава леко завишаване на костният- сиало протеин. При некаталитичната субединица (β) се наблюдава намаляване на BSP2 спрямо контролата, както и вследствие на стимулирането ѝ с растежния фактор BMP4.



Индиректна имунофлуоресцентна микроскопия на BSP в СКII α -трансфектирани и в СКII β -трансфектирани автокринно пролифериращи и в посттрансфекционно стимулирани с BMP4 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в STRO-1 експресиращи клетки. Увеличение 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000

Изображенията бяха получени при увеличение на обектива 20X на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 и прилагането на лазери с дължина на вълната 488 nm и 555nm 405 nm и 640 nm възбуждащи BSP-белязан с IgG-FITC, CD105 и/или STRO-1 с IgG-Cy5, *Xylenol orange* с IgG-CFL-647 и Neochst -белязаните ядра в четворно имунофлуоресцентно маркираните клетки. Цялата площ на всяка ямка беше анализирана и количествения анализ на относителната експресия на BSP2, CD105, STRO1 и калциевия депозитбяха изчислени чрез алгоритъм за идентифициране на Neochst -белязаните ядра (405 флуоресценция), и на експресията на BSP2 (488 флуоресценция), CD105 и/или STRO-1(555флуоресценция) и калции (647 флуоресценция).

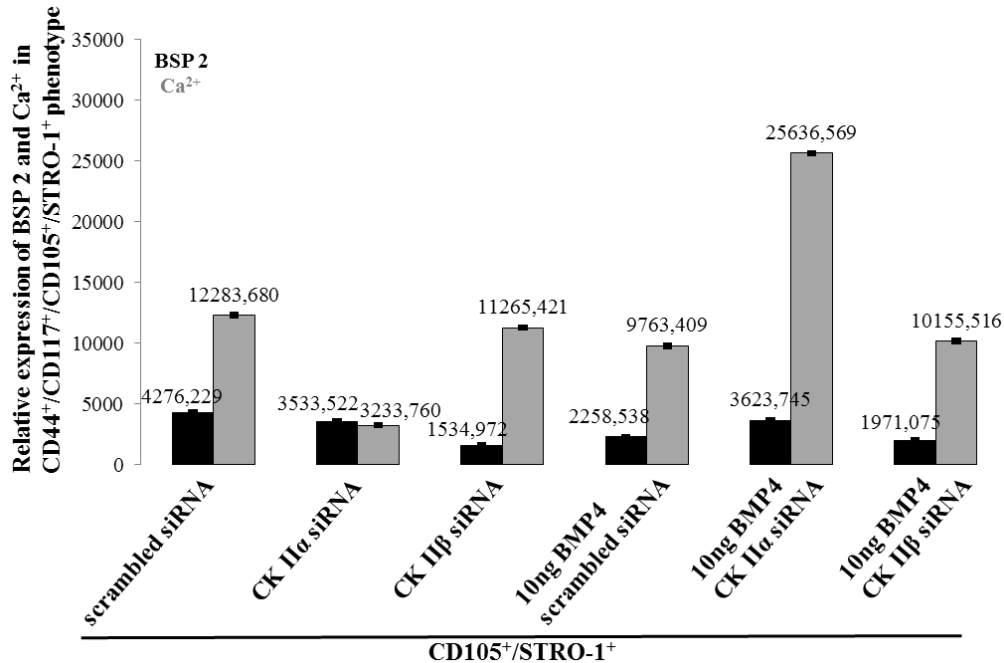
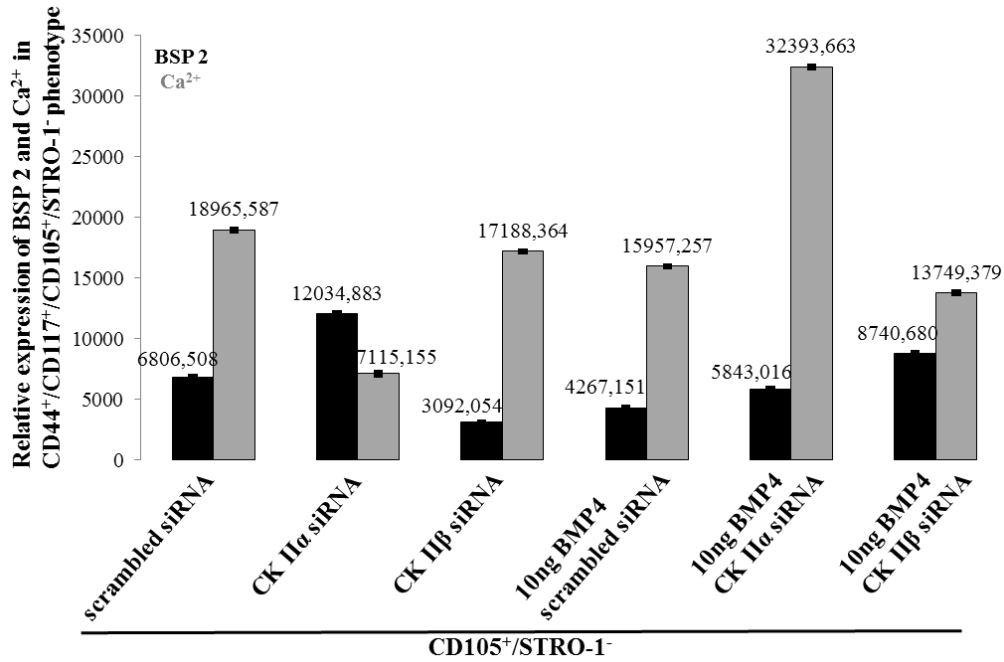




Фиг.44 и 45. Роля на α и β субединицата на протеин киназа CK2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в хетерогенни фенотипове.

В популацията на STRO-1 експресиращите и неекспресиращите клетки отново се наблюдава същият ефект, увеличаване на калциевите депа, с изключения при заглушаването на некаталитичната β субединица и в двата изследвани фенотипове- намаляване на калциевите отлагания. Базалната експресия на BSP2 от хетерогенния състав на фенотиповете, експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност отчита, че костният -сиало протеин намалява при si RNA медираното заглушаване на каталитичната субединица спрямо контролата, и че при стимулирането ѝ с BMP4 , количеството на BSP2 се завишава. При заглушаването на некаталитичната β субединица количеството на експресиращият протеин намалява , както и при подаването на растежния фактор. В субпопулацията на клетките, които не експресират мезенхимния маркер STRO-1 се наблюдава завишаване на BSP2 при si RNA медираното заглушаване на каталитичната субединица спрямо контролата, както и при стимулирането ѝ с BMP4. При некаталитичната субединица, базалната експресия намалява, докато при стимулирането ѝ

с рекомбинантния човешки растежен фактор, количеството на експресията се протеин е почти 2 пъти завишен спрямо контролата.



Фиг.46 и 47. Роля на α и β субединицата на протеин киназа СК2 за BMP4 индуцирания ефект върху клетъчно повърхностната експресия на BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс в хомогенни фенотипове.

В хомогенните субпопулации на клетките неекспресиращи и експресиращи STRO-1 по своята клетъчна повърхност, се установява от количественият анализ, че отново при *si RNA* медирано-заглушаване на некаталитичната субединица и поддаването на BMP4 растежния фактор калциевите депа намаляват, докато при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната субединица и стимулирането им с BMP4, калцият драстично се увеличава. В популацията от клетки, неекспресиращи STRO-1 се доказва, че базалната експресия на BSP2 нараства както при *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната субединица, така и при поддаването на BMP4. При некаталитичната субединица намалява, количеството на експресиращия се белтък, докато при индуциране с BMP4 се увеличава почти 2 пъти. В популацията от клетки, имащи STRO-1 базалната експресия на BSP2 намалява при условия на *si RNA* медирано-заглушаване на каталитичната субединица спрямо контролата, докато при стимулирането ѝ с BMP4 се завишава. При некаталитичната субединица и при подаването на BMP4 се наблюдава намаляване на базалната експресия на BSP2.

VI. Дискусия

Апикалната папила представлява хетерогенна тъкан, слабо прикрепена към върха на развиващия се корен на човешките постоянни зъби, в която се намира популация от стволови/прогениторни клетки, наречени стволови клетки от апикална папила (SCAP).(115). Тази популация експресира няколко мезенхимни клетъчни маркери, като STRO-1, CD146, CD105, CD73, CD90, CD24, CD29, CD44 и CD49, но няма съответна информация за степента на тяхната пролиферация, експресиращи и неекспресиращи фенотипове в тъканта. Изолирането на първични клетки от дентална човешка апикална папила чрез протеолитично ензимно разграждане и тяхното *in vitro* култивиране ни дава възможност за изследване на потенциала на самообновяване на стволови/прогениторни клетки, намиращи се в получената хетерогенна култура. До този момент няма информация за способността на възобновяване на мезенхимните маркери на стволовите клетки STRO-1 и / или CD105 експресиращи клетки. Поради тази причина ние изследвахме маркерите CD44, CD117, STRO-1 и / или CD105 експресиращи клетки в първични култури. Имунофлуоресцентната микроскопия на живи клетки показва CD44⁺/CD105⁺, CD44⁺/CD105⁻, CD44⁺/STRO-1⁻, CD117⁺/CD105⁺, CD117⁺/STRO-1⁺ и субпопулации STRO-1⁺/CD105⁺ и малък брой CD44⁺/STRO-1⁺, CD117⁺/STRO-1⁻, STRO-1⁺/CD105⁻ и STRO-1⁻/CD105⁺ клетки от хетерогенния състав на апикалната папила. Не са отчетени резултати на CD44⁻/CD105⁺, CD44⁻/STRO-1⁺, CD117⁻/CD105 експресиращи клетки. Бяха установени експресиите на CD105⁺ или CD117⁺/STRO-1⁺. Тези резултати свидетелстват за това, че CD105⁺ клетки, както и STRO-1⁺ клетки са ко-експресиращи CD44 и/или CD117. Получените данни ясно показват фенотипната хетерогенност по отношение на клетъчно повърхностната експресия на мезенхимните маркери - CD44, CD117, CD105 и STRO-1 на hDAP.

Анализирането на инкорпорирането на BrdU в последователни пасажи показва постоянна фенотипно-детерминирана пролиферативна активност на изследваните популации. Въз основа на получените чрез индиректно магнитно-активирано клетъчно сортиране (Cell Sorting-MACs) *CD105⁺/STRO-1⁻*, *CD105⁺/STRO-1⁺*, *CD105⁻/STRO-1⁺*, *CD105⁻/STRO-1⁻* субпопулации бе установено, че в двойно позитивния фенотип в най-голяма степен се инкорпорира BrdU -85.85%.

Въз основа на изследването на числеността на фенотипно специфичните субпопулации в последователни пасажи се стига до извода, че вероятно дъщерните клетки, получени от деленето на CD105⁺/STRO-1⁺ проявяват CD105⁺/STRO-1⁻ или CD105⁻/STRO-1⁺, както и несъмнено CD105⁻/STRO-1⁻ фенотипове. Докато дъщерните клетки, получени от деленето на CD105⁺/STRO-1⁻ или на CD105⁻/STRO-1⁺ администрират майчиния и CD105⁻/STRO-1⁻ фенотип. Въз основа на фенотипно специфичното редуциране на числеността на изследваните субпопулации заедно с постоянната им фенотипно детерминирана пролиферативна активност може да се изведе извода, че в трите фенотипа протича асиметрично делене, без 105⁻/STRO-1⁻, което е най-силно изявено в 105⁺/STRO-1⁺. Протичането на асиметрично делене в изследваните фенотипове обяснява прогресивното нарастване, числеността на неекспресиращите мезенхимни маркери, клетки в последователно пасажирание на изследваните култури. В литературата сеобсъждат два основни модела за делене на стволовите клетки: симетрично и асиметрично. Способността на стволовите клетки да се делят асиметрично, за да произвеждат една стволова и една нестволова дъщерна клетка, често се счита за една от определящите характеристики за стволовостта. Асиметричният модел предполага, че хомеостатичният контрол на запаса от стволови клетки се поддържа на ниво единични клетки, при което всяка стволова клетка произвежда копие от себе си плюс една диференцирана клетка. Механизмите, включени в асиметричните деления, са описани подробно в *Drosophila* и включват регулиране на клетъчната полярност и ориентация по отношение на нишата на стволови клетки. От инженерната перспектива този модел има предимството да поддържа постоянно нивото на популацията на стволови клетки. Очевиден недостатък е невъзможността му да попълни запаса от стволови клетки в случай на нараняване. Този проблем естествено се решава от симетричния модел, който поддържа хомеостатичния контрол на ниво популация, а не на индивидуално клетъчно ниво. Там стволовите клетки са способни на два вида симетрични деления: разделение на пролиферацията, което води до създаването на две стволови клетки и разделение на диференциацията, което води до създаването на две диференцирани клетки. Решенията за диференциация/пролиферация се контролират от множество сигнали, излъчващи се от околните тъкани и самите стволови клетки. Счита се, че регулирането на стволовия клетъчен цикъл е от ключово значение за оркестрирането на обновяването на стволови клетки (116). Получените в хода на пасажирание чрез MACS

данни за намаляване броя на CD105⁺/STRO-1⁻, CD105⁺/STRO-1⁺, CD105⁻/STRO-1⁺ и за увеличаване на броя на CD105⁻/STRO-1⁻ клетки са в подкрепа на доказаното при стволовите клетки асиметрично делене, при което всеки от фенотиповете произвежда една дъщерна клетка със майчиния фенотип и една клетка неекспресираща изследваните клетъчно стволони маркери.

Ние установихме, че общата пролиферативна способност на експоненциално растящите автокринни култури се поддържа главно чрез пролиферативна активност на CD105⁺ клетки, последвана от STRO-1⁺ клетки и най-малък е приносът на CD105⁻ клетките. Тази информация за първи път разкрива специфичните за фенотипа пролиферативни нива на изследваната субпопулация и значително допринася за характеризирането на човешката апикална папила. Въпреки че апикалната папила е изследвана интензивно като източник на SCAPs, малко се знае за фенотипно-специфичното регулиране на пролиферацията на субпопулациите в хетерогенния състав.

Тъй като е доказано, че BMP4 е одонтогенен както *in vitro*, така и *in vivo*, ние анализирахме неговия ефект върху специфичните за фенотипа пролиферативни активности на STRO-1⁺, STRO-1⁻, CD105⁺ и CD105⁻ субпопулации в експоненциално автокринно растящи култури. BMP4 регулира пролиферацията на всички изследвани субпопулации, но степента на антипролиферативния му ефект се проявява в зависимост от фенотипа.

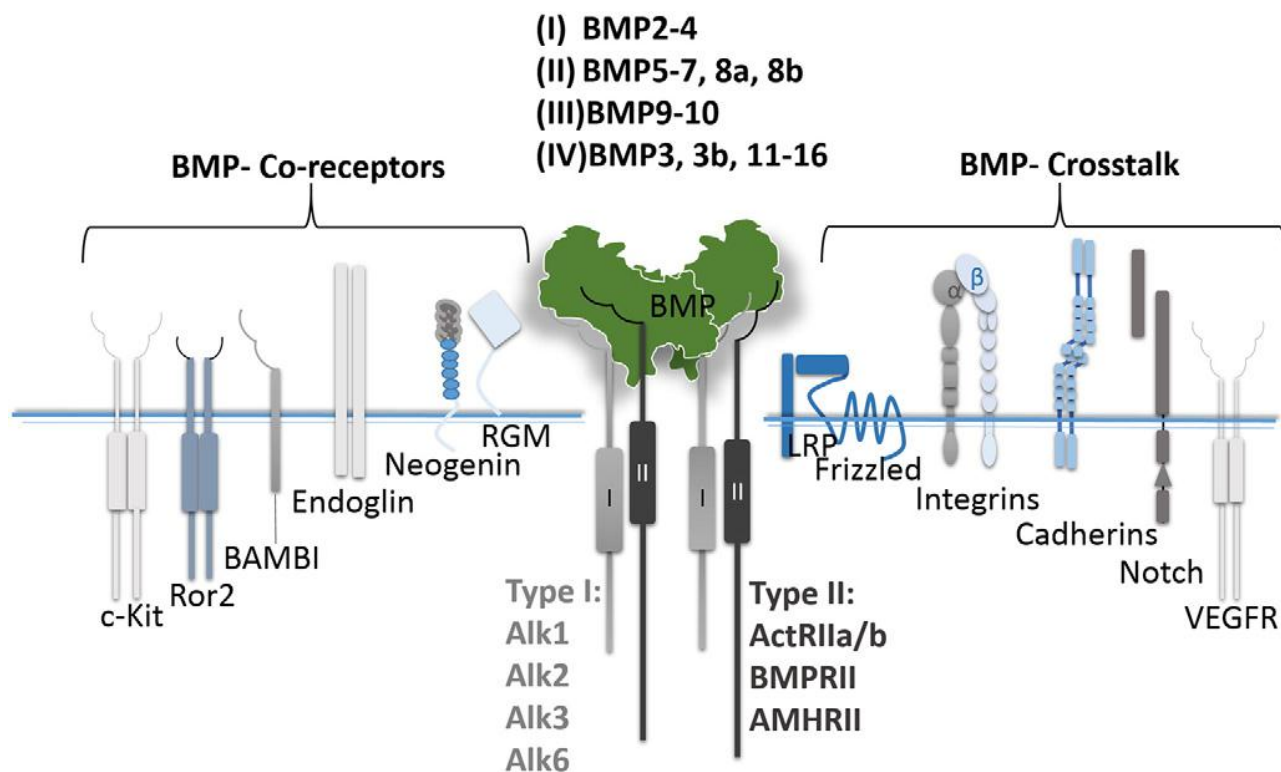
Редицата изследвания, доказващи че протеин киназа CK2 катализира фосфорилирането на множество протеини, необходими за успешното делене на клетката на две дъщерни клетки, показват нейното значение за протичането на всяка от фазите на клетъчния цикъл. Експерименти с антисенс олигонуклеотиди срещу субединиците на CK2, с инхибитори на активността ѝ, както и микроинжектирането на антитела срещу нея в клетки от бозайници, водят до инхибирането на клетъчния им цикъл, което доказва, че CK2 е необходима за G₀/G₁, G₁/S, и G₂/M преходите (117). От натрупаните до този момент данни може да се направи извода, че ролята на CK2 в G₁/S фазите на цикъла е да ги регулира (а, не да ги стимулира), тъй като тя е от една страна интегрална част от DNA damage checkpoint, отговорна за регулирането на p53 и на неговите регулатори, а от друга – си взаимодейства

и фосфорилира протеините (включително и Cdk-инхибиторните белтъци), отговорни за G1/S checkpoint (117). Представените, резултати за инкорпурирането на BrdU в условията на понижена белтъчна експресия на каталитичната и на некаталитичната субединици на SK2 ясно показват, че нормалното функциониране и на двете субединици е необходимо за репликационната активност на клетките, композиращи hDAP. Същевременно отчетените разлики в антипролиферативните ефекти, предизвикани от SKI α -трансфекциите и от SKI β -трансфекциите клетки, доказват както ефективността на проведената трансфекция, така и нееднозначното и специфично за каталитичната и съответно за некаталитичната субединица участие в регулацията на ДНК синтеза. Тези, специфични за двете функционално различни субединици, данни обогатяват информацията за тяхното специализирано участие в контрола и протичането на репликацията (118), и са солидна основа за бъдещи изследвания на конкретните молекулни механизми, осъществяващи отчетените инхибиторни ефекти. Описаните данни за репликационната активност са изцяло нова информация относно фенотипно-специфичните разлики на CD105⁺ и STRO-1⁺ клетките, композиращи хетерогенната hDAP в условията на автокринна пролиферация. Няма литературни данни за пролиферативната активност на фенотиповете, изграждащи апикалната папила и проведените експерименти за първи път дават информация за функционирането на SK2 в клетки от тази тъкан. Също така до този момент не е изследвано значението ѝ за трансдуцирането на BMP4 сигнала в изследваната тъкан. Няколко изследвания показват участието на протеин киназа SK2 в регулирането на функционирането на хетеротетрамерния рецепторен комплекс, отговорен за свързването на екстрацелуларните BMPs. Регулаторната ѝ роля се изразява в свързване (протеин-протеин взаимодействие) чрез некаталитичната субединица към рецептори тип I от тетрамерния комплекс, което се прекратява при свързването на лиганда към рецептори тип I (119; 131) и чрез фосфорилиране на рецептори тип I от каталитичната субединица, което предотвратява активирането на рецептор тип I в отсъствието на лиганд (119;132). И нарушения в регулаторните механизми, осъществявани от SK2 водят до нелигандно-индуцирани промени в клетъчната физиология (119, 120, 121). Представените, резултати от проведените трансфекции показват, че фенотиповете, съставлящи изследваната клетъчна популация най-вероятно са под този регулаторен механизъм, но отговарят на нарушенията в него по фенотипно-специфичен начин.

Генната експресия на PKC α в изследваните субпопулации е фенотипно специфична, като най-високи са белтъчните нива в CD105⁺/STRO-1⁻ субпопулацията, а най-ниски CD 105⁺/STRO-1⁺ субпопулацията. Експресираният изозим е функционално активен и в трите изследвани субпопулации и локализацията му е стриктно цитоплазмена, но активността му е фенотипно специфична, като с най-висока активност е PKC α в CD105⁺/STRO-1⁻ субпопулацията, а най-слабо активирана е в CD105⁺/STRO-1⁺ субпопулацията. Osteoиндуктивният растежен фактор BMP4 потиска активността на PKC α в CD 105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁻/STRO-1⁺ субпопулации, без да влияе на белтъчната ѝ експресия, и понижава белтъчната експресия на PKC α в CD105⁺/STRO-1⁻ субпопулацията, без да влияе на активността ѝ, което ясно демонстрира, че BMP4 се трансдуцира по фенотипно-специфични сигнални пътища в изследваните субпопулации. Наличието на фосфорилиране на Ser-657 от структурата на PKC α показва, че изозима е функционално активен и участва в регулацията на клетъчният цикъл на експоненциално автокринно растящите клетки. Като се вземе в предвид, че PKC α е добре установен и известен активен участник в сигнално-трансдукционният контрол на клетъчната пролиферация (122) от една страна, и от друга страна факта, че изследваните клетъчни култури са автокринно експоненциално растящи, може да се предположи, че и в трите, фенотипно различни субпопулации PKC α е функционално значим участник в автокринната регулация на тяхната пролиферативна активност, докато в отговор, индуциран от третирането им с BMP4 се наблюдава понижена експресията на PKC α в CD105⁺/STRO-1⁻ фенотипа, в резултат на която е и отчетената понижена степен на фосфорилирането ѝ, докато в другите два изследвани фенотипа, понижената степен на фосфорилирането ѝ се дължи на промяна в нейната регулация. Отчетеният негативен ефект върху активността на изозима, би могъл да се обясни с добре доказаната роля на BMP4 като индуктор към остеогенна/одонтогенна диференциация на мезенхимни стволово-клетъчни фенотипове от хистологичния състав на други зъбни структури (123, 134), а именно действието на BMP4 в третираните фенотипове би могло да е свързано с индуциране на прехода от пролиферация към остеогенна/одонтогенна диференциация. В полза на тази хипотеза е и факта, че PKC α потиска остеобластната диференциация, но подпомага пролиферацията на остеобластните клетки (124, 136), въз основа на което може да се предположи, че понижената активност на изозима може би е свързана с

прехода към одонтобластна диференциация. BMP4-индуцираният инхибиторен ефект се изяснява с различна сила в изследваните клетъчни субпопулации, което демонстрира, че BMP4 се трансдуцира в тях по фенотипно-специфични сигнални пътища.

Изследваните фенотипове бяха селектирани въз основа на клетъчно повърхностната експресия на два добре описани маркера за клетъчна стволовост – CD105 и STRO-1, поради което бяха проведени изследвания за ефектът на растежния фактор BMP4, считан за един от проостеогенните стимули, върху генната експресия на BSP. BMP активностите се медиатират от тетрамери, състоящи се от два тип I и два тип II серин/треонин киназни рецептори, които функционират съвместно с т.н. помощни рецептори – каквито са CD105 и c-kit (фиг.48)(125, 126).



Фигура 48: BMP лиганди, рецептори, ко-рецептори и взаимодействащи рецептори. BMP сигналната трансдукция въвлича набор от лиганди, тип I и тип II серин/треонин киназни рецептори и ко-рецептори, които регулират активирането на интрацелуларните медиатори през взаимодействия с екстрацелуларни стимули. BMP са класифицирани в 4 различни (I-IV) субфамилии в последователна хомология. I-III BMP фамилията притежават остеогенни характеристики, докато IV-не. BMP сигнализирането, вътреклетъчно действа и с клетъчни каскади, инициирани от разнообразни мембранни

рецептори, резултат от крос-взаимодействие, осигуряващо „фина настройка”. LRP - lipoprotein receptor-related protein; Ror - receptor tyrosine kinase-like orphan receptor; VEGFR - vascular endothelial growth factor receptor (126).

Третирането с BMP4 предизвиква фенотипно-специфични ефекти върху експресия на BSP в трите изследвани фенотипа. BSP експресията беше непроменена в CD105⁺/STRO-1⁻ фенотипа, което би могло да се тълкува като липса на проостеогенна стимулация, но е спекулативно да се твърди, че приложената концентрация/продължителностна третиране с BMP4 не е проостеогенна, защото не са изследвани другите белтъци-маркери на диференциация, чиято експресия характеризира прехода към ранна диференциация.

Генната експресия на транскрипционния фактор Osterix е фенотипно специфична за изследваните фенотипове, като с най-ниски белтъчни нива е CD105⁻/STRO-1⁺ субпопулацията, а със значимо по-голяма и съпоставима белтъчна експресия са CD105⁺/STRO-1⁺ и CD105⁺/STRO-1⁻ субпопулациите. Osterix е локализиран както в цитоплазмата, така и в ядрото и в трите фенотипа. Osteoиндуктивният растежен фактор BMP4 стимулира генната експресия на Osterix и в трите фенотипа, но в различна степен – най-силно е повишена експресия на Osterix в CD105⁻/STRO-1⁺ субпопулацията, където транскрипционния фактор е разположен в ядрото, а най-слабо в CD105⁺/STRO-1⁺ субпопулацията, където няма промяна в локализацията му, което ясно демонстрира, че BMP4 се трансдуцира по фенотипно-специфични сигнални пътища в изследваните субпопулации. Предизвиканата от BMP4 силно увеличена генна експресия на Osterix от една страна и локализирането му в ядрото – от друга, в CD105⁻/STRO-1⁺ субпопулацията, показва, че този фенотип е най-вероятно със значително по-висок одонтогенен потенциал в сравнение с другите, два изследвани фенотипа, в които растежния фактор активира (но, в ниска степен) експресията на транскрипционния фактор, но той продължава да бъде с цитоплазмено-ядрена локализация т.е само част от него е способен да изпълни функцията си на регулатор на генната експресия. Проведеното имунофлуоресцентно изследване установи, че Osterix се експресира и в трите фенотипно различни субпопулации, а количествения анализ на получените имунофлуоресцентни изображения разкри, че относителната експресия на транскрипционния фактор е фенотипно-специфична - като най-слабо се експресира в CD105⁻/STRO-1⁺ фенотипа, а в другите два фенотипа стойностите на експресия на транскрипционният фактор са приблизително пет пъти по-високи. При

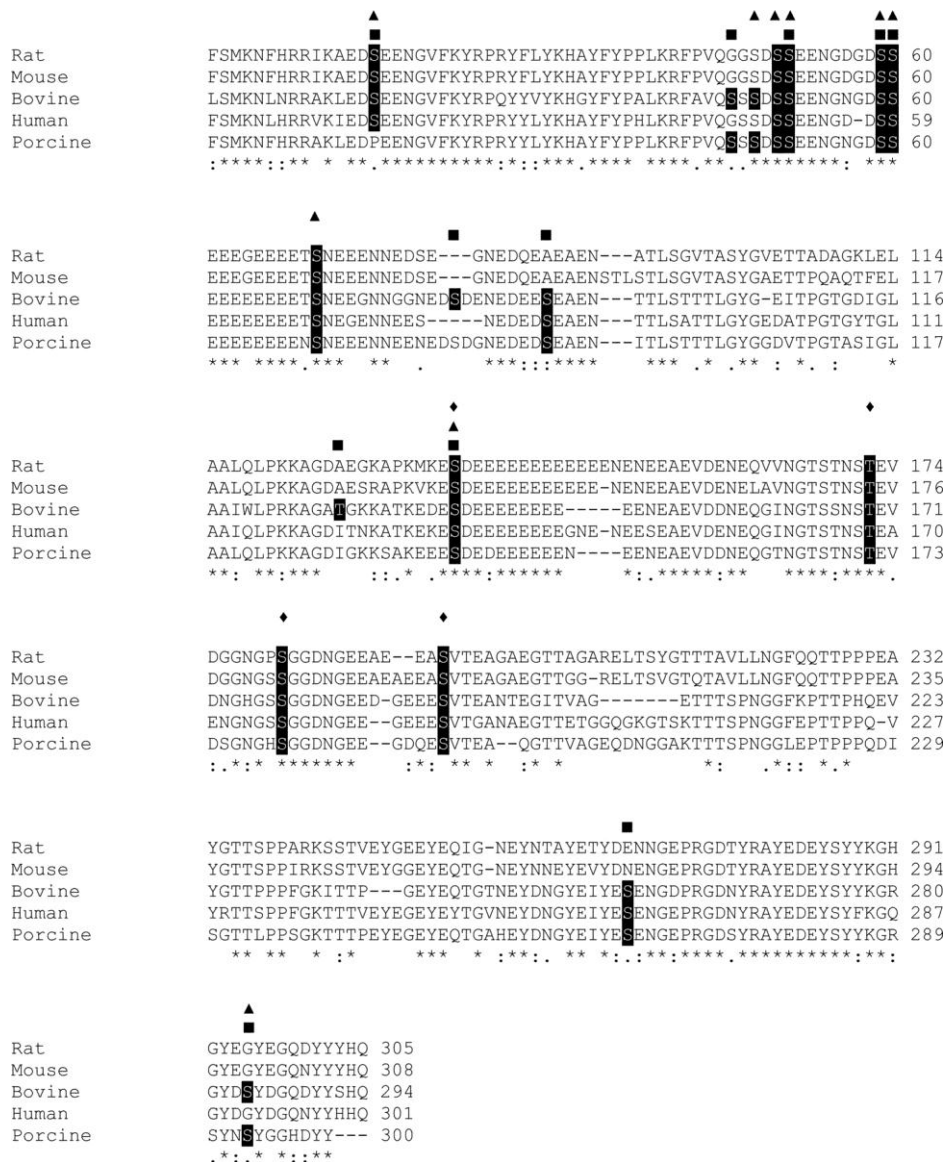
третирането с BMP4 се наблюдава повишаване на експресията на Osterix и в трите, фенотипно различни субпопулации, като активиращият ефект е най-силно изразен в CD 105⁻/STRO-1⁺ субпопулацията, където бяха отчетени над петкратно по-високи стойности на експресия на Osterix в сравнение с нетретираните клетки. При CD105⁺/STRO-1⁺ и CD 105⁺/STRO-1⁻ субпопулациите ефекта на BMP4 е по-слабо изразен - относителната експресия на Osterix слабо се увеличава, като нарастването ѝ е по-значимо в CD 105⁺/STRO-1⁻ клетките.

Отчетената повишена експресия на Osterix би могла да бъде в отговор на одонтогенно индуциращото действие на BMP4. Същевременно, разликите в степента на изявяване на този стимулиращ генната експресия ефект в трите различни субпопулации разкрива, че одонтогенно индуциращото действие на BMP4 се опосредства от функционирането на фенотипно-специфична сигнализация т.е. трите фенотипа са с различен одонтогенен потенциал. Субклетъчната локализация на Osterix в трите изследвани фенотипа е както цитоплазмена, така и ядрена. Няма данни в литературата за предходно изследване на експресията и локализацията на Osterix в клетки от човешки зъбни структури, но е изследвана неговата локализация в миши одонтобласто-подобни MO6-G3 клетки, в които транскрипционния фактор е открит както в цитоплазмата, така и в ядрата (127). Също така е доказана експресията на Osterix в обезсмъртени mDPC6T мезенхимни стволови клетки от ембрионална миша дентална папила подложени на одонтобластна стимулация .

Ключови регулатори на епително-мезенхимните взаимодействия както в ранната ембриогеназа, така и в тъканната морфогенеза са участниците на TGF- β суперсемејството. Участието им в костният метаболизъм е недвусмислено доказано чрез образуването на ектопична кост, вследствие на подкожното или мускулното им инжектиране в мишки, като BMP-2, 4, 5, 6, и 7 изоформите са преки участници в про-остеогенната сигнално-трансдукционна регулация, стимулиращи експресията на транскрипционните фактори Runx2 и OSX и липсата на BMP-2 и 4 в животински моделни системи води до тежки увреждания в остеогенезата (32, 33, 39). Свръхекспресията на Runx2 в човешки MSC, изолирани от мастна тъкан, има про-остеогенен ефект, изразяващ се в увеличена активност на алкална фосфатаза и увеличена експресия на остеокалцин. Мутации в човешкия *Runx2* причинят CleidoCranial дисплазия, автозомно-доминантно заболяване с

драматични аномалии в костообразуването (54). За първи път се установява чрез имунофлуоресцентно оцветяване, че базалната експресия на транскрипционния фактор RUNX2 е характерен за всички клетки с мезенхимен произход и откриването му във всички фенотипове от хетерогенния състав на апикалната папила, показва, че епигенетичните фактори във входа на рутинното култивиране и пасажирание не променят мезенхимния фенотип.

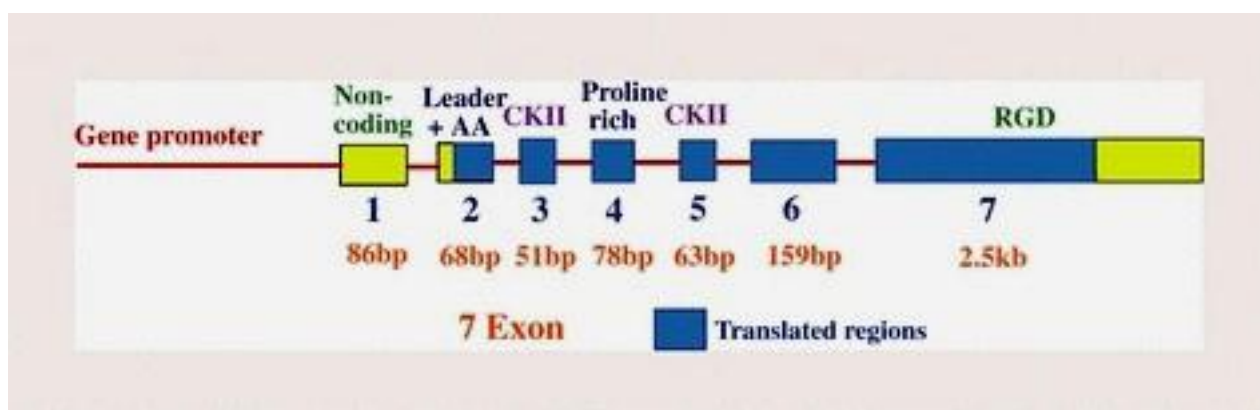
BSP е много силно консервативен в хода на еволюцията белтък, чиято аминокиселинна последователност е много високо хомоложна между различните животински видове. Зрелият човешки BSP има 301 аминокиселини и включва обширни и разнообразни посттранслационни модификации, които представляват приблизително 1/3 от молекулната му маса (32). Множеството установени посттранслационни модификации допринасят за функционирането на BSP, но конкретните физиологични роли на тези специфични модификации, все още не са напълно изяснени. Чрез мас-спектрометричен анализ е установено, че силно консервативни в хода на еволюцията аминокиселинни последователности, съдържащи серин и треонин в структурата на BSP, са фосфорилирани от протеин киназа CK2 (128, 129, 130).



Фигура 49. Консервативните аминокиселинни последователности, съдържащи СК2-специфични фосфоакцепторни места са показани в черно (130).

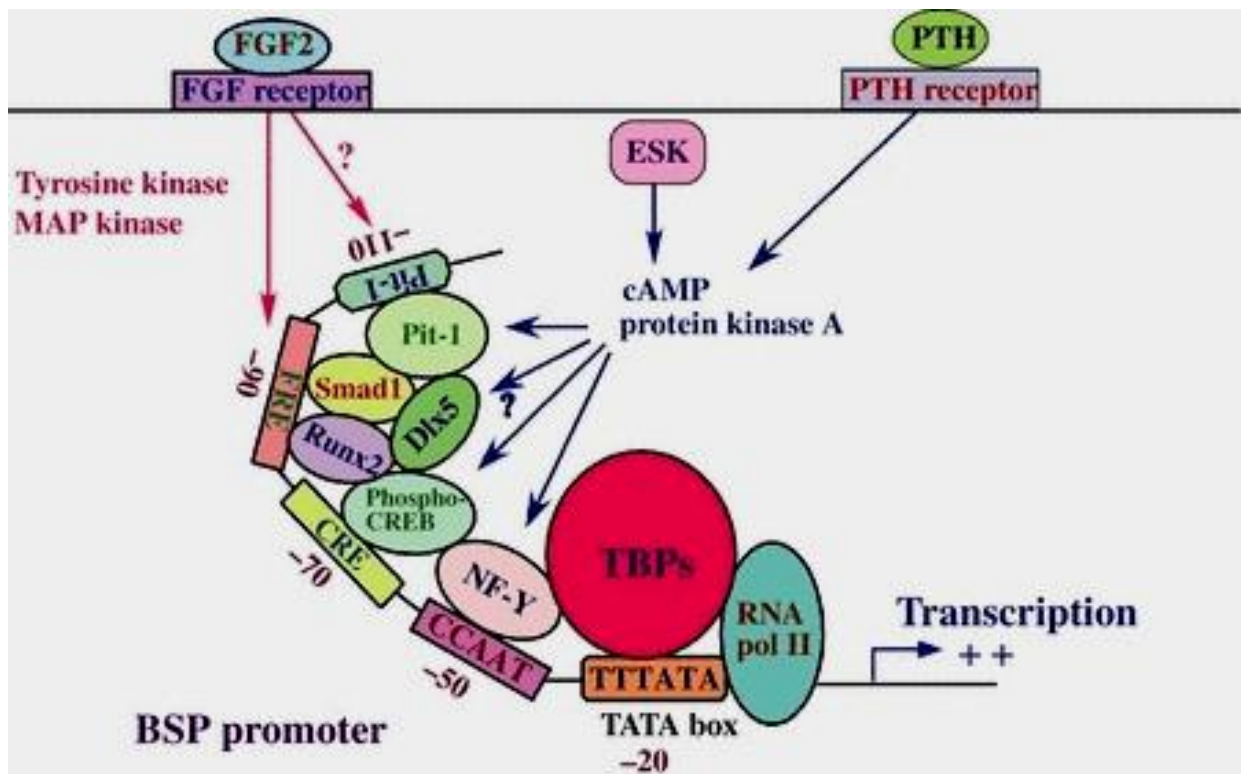
Фосфорилирането на серинов/треонинов аминокиселинен остатък в структурата на BSP е ключова модификация, отговорна за неговото функциониране като протеинът, създаващ „зародиш“ с хидроксиапатита и от там за минерализацията на тъканите. Формирането на „зародиш“ с хидроксиапатита е детерминирано от първичната структура на полипептидната верига на BSP, но СК2-медираното фосфорилиране функционално иницира формирането на „зародиш“, както е доказано при изследвания с рекомбинантния BSP и при дефосфорилиране от фосфатази (130, 131). Анализи на СК2-

специфичните фосфоакцепторни места в BSP (130) и аминокиселинно-насочени мутагенни анализи демонстрират (132), че CK2-специфичното фосфорилиране на серин 136 е критичната модификация, отговорна за способността на BSP да формира „зародиш“ с хидроксиапатита. Физиологично-функционалното значение на CK2-специфичното фосфорилиране на BSP е доказано чрез изследвания на корелацията между статуса на фосфорилиране на сериновите аминокиселинни остатъци в BSP и нивото на калциево-фосфатни минерални депозити в краищата на рана при регенериране на кост (133), и при намаляване нивата на минерализация в следствие на инхибирането на CK2 в *in vitro* клетъчни култури (134). Същевременно регулацията на генната експресия на BSP е обект на интензивни изследвания (фиг. 50) и



Фигура 50: Структура на *bsp* гена. Екзоните са представени като кутии, а интроните като свързващи линии. Екзон 1 е некодираща, водеща последователност и първите две аминокиселини са представени в екзон 2, екзони 3 и 5 са казеин киназни фосфорилиращи последователности, екзон 4 е богат на пролин и често основен и екзон 7 е интегрин-свързваща RGD (Arg-Gly-Asp) последователност. AA (amino acid); CK II (casein kinase) (135).

един от моделите (фиг. 51.), предложен за най-пълното описване на иницирането на транскрипцията на *bsp* гена включва транскрипционните фактори Pit-1, CREB, Dlx5, които са добре изследвани субстрати на CK2 (136) и чиято транскрипционна активност е под нейния контрол.



Фигура 51 Модел на BSP промотираща регулация в остеобласти чрез фибробластния растежен фактор 2 (FGF2) и cAMP. FGF2 и форсколин синергично регулират генната експресия на BSP подпомагани от протеин-ДНК взаимодействията в обрнатите ССААТ кутия, cAMP отговорния елемент, FGF2 отговорния елемент и хипофизно-специфичния транскрипционен фактор-1. CRE; cAMP отговорния елемент; FGF₂ FRE-отговорния елемент за фибробластния растежен фактор 2; FSK-форсколин; MAP киназа-митоген-активна протеин киназа; NF- γ -ядрен фактор- γ ; Pit-1-хипофизно-специфичен транскрипционен фактор-1; PTH-паратироиден хормон; TBP-TATA свързващ протеин (135).

24-часовото присъствие на 10 ng BMP4 в автокринно пролифериращите клетки, предизвиква фенотипно-специфични ефекти върху BSP експресията и калция. Отчетените разлики в ефектът на растежния фактор върху генната експресия на BSP, в условията на увеличена белтъчната синтеза на каталитичната субединица, е отново стриктно фенотипно специфичен и разкрива, че от една страна - СК IIa е участник в регулацията на BMP4-трансдуциращата сигнализация и в трите изследвани фенотипа, а от друга, че BMP4-трансдуциращата сигнализация води до фенотипно-специфична регулация на *bsp* гена.

Стимулирането с BMP4 на СКПβ-трансфектираните клетки и от трите фенотипа води до значими промени в експресията на BSP, а от там и на калциевите отлагания съпоставена с експресията му в нестимулираните с BMP4 СКПβ-трансфектирани клетки. Но, съпоставяйки белтъчните нива на BSP в тези условия с нивата му в BMP4-стимулираните контролни (scrambled si RNA and 10 ng BMP4) клетки от трите фенотипа, се наблюдава, че ефектът от трансфекцията с СК Пβ siRNA е същия, но по-силно изразен, като предизвикания от трансфекцията с СК П α siRNA. Тези данни взети заедно доказват, че протеин киназа СК2 – нейните субединици като част от холоензима и/или като свободни (извън холоензима) белтъци са от ключово значение за вътреклетъчното предаване на BMP4 сигнала и в трите изследвани фенотипа, както и че BMP4 оказва фенотипно-специфичен регулаторен ефект върху BSP експресията и калцификацията.

VII. Изводи

- В хетерогенния състав на тъканта се съдържат фенотиповете $CD44^+ / CD117^+ / CD105^+ / STRO-1^-$; $CD44^+ / CD117^+ / CD105^+ / STRO-1^+$; $CD44^+ / CD117^+ / CD105^- / STRO-1^+$; $CD44^+ / CD117^+ / CD105^- / STRO-1^-$ които се характеризират със стриктно фенотипно детерминирана пролиферативна активност (обуславяща се от фенотипно детерминирана експресия на *PKC alpha*; *ERK1,2* и тяхното функциониране), самовъзобновяващ се потенциал (асиметрично делене) и численост.
- От физиологична гледна точка протеин киназа *CK2*, участва в регулацията на пролиферацията на всички изследвани фенотипове, но ролите на каталитичната (α) и некаталитичната (β) субединици са фенотипно детерминирани.
- Остеогенния индуктор *BMP4*, повлиява физиологията (експресия на *PKC alpha*; *ERK1,2*, тяхното функциониране, репликационна активност, експресия на *Osterix*; изнасяне на *BSP2* екстрацелуарно и калцифициране на екстрацелуарния матрикс) на всички фенотипове, но по стриктно фенотипно - детерминиран начин и каталитичната (α) и некаталитичната (β) субединица на протеин киназа *CK2* са участници във вътреклетъчната сигнализацията, по която той се трансдуцира.

VIII. Приноси:

- За първи път е доказано присъствието на фенотиповете $CD44^+ / CD117^+ / CD105^+ / STRO-1^-$; $CD44^+ / CD117^+ / CD105^- / STRO-1^-$; $CD44^+ / CD117^+ / CD105^- / STRO-1^+$; $CD44^+ / CD117^+ / CD105^- / STRO-1^-$ в хетерогенния състав на апикална папила и е установена тяхната пролиферативна активност, самовъзобновяващ се потенциал и численост.
- За първи път е изследвано участието на протеин киназа CK2 в клетъчните фенотипове, изграждащи хетерогенния състав на апикалната папила и са установени ролите на каталитичната и некаталитичната й субединици за сигнализацията, поддържаща пролиферативния капацитет и сигнализацията трансдуцираща BMP4.
- За първи път са изследвани фенотипно детерминирани нива на Osterix, BSP2 и калцификацията на екстрацелуларния матрикс на изследваните фенотипове и ефектът на остеоиндуктора BMP4 върху тях

IX. Публикации и участия в научни форуми и проекти, свързани с дисертационния труд

Ishkitiev, N., Mitev, V., Rashkova, M., Tsikandelova, R., Mihaylova, Z., **Dimitrova, V.**, Mitova, N. Phenotypic characterization of deciduous teeth pulp stem cell populations. Problems of dental medicine (2016) 42 (1): 31-38.

V. Dimitrova, V. Mitev, A. Isaeva The α and β subunits of CK2 are individually and phenotype-specifically involved in autocrine and BMP4-triggered regulation of proliferation of STRO-1⁺, STRO-1⁻, CD 105⁺ and CD 105⁻ cells within human apical papilla. "Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences" IF 0,27 accepted 2018 подпечат

V. Dimitrova, V. Mitev, A. Isaeva The effect of passage on STRO-1⁺/CD 105⁻, STRO-1⁺/CD 105⁺ and STRO-1⁻/CD 105⁺ phenotypes during short-term cultivation (up to 6 passages) of primary culture of apical papilla, isolated from single donor. "Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences" IF 0,27 accepted 2018 подпечат

Nikolay Ishkitiev, **Violeta Dimitrova**, Rozaliya Tsikandelova, Zornitsa Mihaylova, Vanyo Mitev, Maria Dragneva, BMP4 And FGF8 Affect DTPSC Proliferation And Differentiation, W 1096, Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 14-17 June 2017, Boston USA

Договор №ФНИ Б02/15 МОМН

Договор №18/2015г, СМН при МУ- София

Договор №10/2016г, СМНИ при МУ- София

Договор №132/2018г, СМНИ при МУ- София

X. Библиография.

1. Chaudhary R, Shah A, Shah A, Bansal SK. Stem Cells: A Revolution in Dentistry. *Int J Dent Med Res* 2014;1(3):105-109.
2. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z et al, Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*, 2010;89:603-608.
3. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z et al, SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium, *J Dent Res* 2010;89:791-796.
4. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al., (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*, 34:166-171. G T-J Huang, (2008)
5. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* (6), 645-51
6. FF Demarco et al, Dental pulp tissue engineering, *Braz Dent J*, (2011) 22(1): 3-14. Nedel F, Andre Dde A, de Oliveira et al.
7. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. *J Contemp Dent Pract* 2009;10:90-96.
8. Review Immunobiology of mesenchymal stem cells S Ma¹, N Xie¹, W Li, B Yuan, Y Shi, and Y Wang, *Cell Death and Differentiation* (2014) 21, 216–225)
9. Huang, G. J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9), 792-806 .
10. Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Tanaka, T., Nakahara, T., Ishikawa, H., & Haapasalo, M. (2012). Highpurity Hepatic Lineage Differentiated from Dental Pulp Stem Cells in Serum-free Medium. *Journal of Endodontics*, 38(4), 475-480.
11. M. Peneva, Vanyo Mitev, Nikolay Ishkitiev, Isolation of Mesenchymal Stem Cells From the Pulp of Deciduous Teeth, *Journal of IAMB Annual Proceeding Scientific Papers*, book 2, 2008.
12. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z et al.. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod* 2010;36:1805-1811.
13. Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Cells in Explant Cultures M.-L. Couble, J.-C. Farges, F. Bleicher, B. Perrat-Mabillon, M. Boudeulle, H. Magloire *Calcif Tissue Int* (2000) 66:129–138)
14. Beth Bragdon, Oleksandra Moseychuk, Sven Saldanha , Daniel King, Joanne Julian, Anja Nohe, (2011) Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cellular Signaling* 23 (4):609-20.
15. Gonzalo Sanchez-Duffhues, Christian Hiepen, Petra Knaus, Peter ten Dijke, (2015) Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone* 80:43-59.
16. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B et al. CD molecules 2005: Human cell differentiation molecules. *Blood* 2005; 106: 3123–3126
17. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 215-230.
18. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: 2739-2749)
19. Feng-Juan Lv, Rocky S. Tuan, Kenneth M.C. Cheung, Victor Y.L. Leung, (2014) Concise review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells; *Stem cells* 32 (6):1408-19.

20. A.Bakopoulou, G.Leyhausen, J.Volk, P.Koidis, W. Geurtsen (2013) “Comparative characterization of STRO-1 neg /CD146 pos and STRO-1 pos /CD146 pos apical papilla stem cells enriched with flow cytometry”; *Sci verse science direct*)
21. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-584.
22. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by antinerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002; 30: 783-791.)
23. Schieker M, Pautke C, Haasters F, *et al.* Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat* 2007; 210: 592-599.
24. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22: 2903 -2911)
25. F. Nassiri, MD. Cusimano, BW. Scheithauer, F. Rotondo, A. Fazio, GM. Yousef, LV. Syro, K. Kovacs, RV. Lloyd (2011) “Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy”; *Anticancer Research*, 31 (6): 2283-2290
26. SunYoung Park, Terri A. DiMaio, Wei Liu, Shoujian Wang, Christine M. Sorenson, Nader Sheibani J; (2013) “Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways”; *Cell Sci*, 126(6): 1392–1405)).
27. Dental Pulp Tissue Engineering Flávio Fernando DEMARCO, Marcus Cristian Muniz CONDE, Bruno Neves, CAVALCANTI, Luciano CASAGRANDE, Pelotas, RS, Brazil *Braz Dent J* (2011) 22(1): 3-14.
28. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ* 2003;67:678-689.
29. Plikus, M. V., Zeichner-David, M., Mayer, J. A., Reyna, J., Bringas, P., Thewissen, J. G. M., & Chuong, C. M. (2005). Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evolution & development*, 7(5), 440-457
30. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39:51-68
31. The osteocyte lineage Brendon S. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2008) 106–111
32. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers Mattia Capulli, Riccardo Paone, Nadia Rucci *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 561, 1 November 2014, Pages 3-12
33. Jernvall J., Thesleff I., (2000), Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* 92, 19–29. Tucker A., Sharpe P., (2004)
34. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat. Rev. Genet.* 5, 499–508. Zhang Y. D., Chen Z., Song Y. Q., Liu C., Chen Y. P., (2005)
35. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 15, 301–316.
36. Rungarun Kriangkrai, Sachiko Iseki, Kazuhiro Eto, Suonta Chareonvit, (2006), Dual odontogenic origins develop at the early stage of rat maxillary incisor development *Anatomy and Embryology* 211 (2) 101-108,
37. Fugui Zhang, Jinlin Song, Hongmei Zhang, Enyi Huang, Dongzhe Song, Viktor Tollemar, Jing Wang, Jinhua Wang, Maryam Mohammed, Qiang Wei, Jiaming Fan, Junyi Liao, Yulong Zou, Feng Liu, Xue Hu, Xiangyang Qu, Liqun Chen, Xinyi Yu, Hue H. Luu, Michael J. Lee, Tong-Chuan He, Ping Ji, (2016), Wnt and BMP signaling crosstalk in regulation dental stem cells: Implications in dental tissue engineering., *Genes & Diseases*, 3 (4) 263-276)

- 38.** Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors Ji-Hyun Leea, Dong-Seol Leea, Han-Wool Chounga, Won-Jun Shonb, Byoung-Moo Seoc, Eun-Hyang Leed, Je-Yoel Chod, Joo-Cheol Parka, Department of Oral Histology-Developmental Biology & Dental Research Institute, BK21 Project, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongun-dong, Chongro-gu, Seoul 110-749, Republic of Korea.
- 39.** The protein kinase 2 inhibitor CX-4945 regulates osteoclast and osteoblast differentiation In vitro You Hwa Son, Seong Hee Moon, Jiyeon Kim *Molecules and Cells*, 2013, Volume 36, pp 417- 423 .
- 40.** Induction of alkaline phosphatase activity by l-ascorbic acid in human osteoblastic cells: a potential role for CK2 and Ikaros Eunwha Son, Hang Do, B.S, Hae-Mi Joo, B.S., Suhkneung Pyo. Volume 23, 2007, Pages 745–753
- 41.** Casein Kinase 2 β -Subunit Is a Regulator of Bone Morphogenetic Protein 2 Signaling Beth Bragdon, Shayamala Thinakaran, Oleksandra Moseychuk, Daniel King, Kira Young, Volume 99, 4 2010, Pages 897–Biophysical Journal 904 Volume 99, Issue 3, 4 August 2010, Pages 897–904.
- 42.** Elevation of protein kinase $\text{C}\alpha$ stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the TAT-mediated protein transduction system Wei-Kai Hua,a Ya-Huei Shiau,a Oscar K. Lee,b Wey-Jinq Lina *Biochemistry and Cell Biology*, 2013, 91(6): 443-448, 10.1139/bcb-2013-0035.
- 43.** The protein kinase 2 inhibitor CX-4945 regulates osteoclast and osteoblast differentiation In vitro You Hwa Son, Seong Hee Moon, Jiyeon Kim *Molecules and Cells* November 2013, Volume 36, Issue 5, pp 417-423 *Mol Cells*. Nov 30, 2013; 36(5): 417–423.
- 44.** PKC α suppresses osteoblastic differentiation Akio Nakura, Chikahisa Higuchi Kiyoshi Yoshida, Hideki Yoshikawa *Bone* 2011 Vol: 48. DOI: 10.1016/j.bone.2010.09.238. Beth Bragdon, Oleksandra Moseychuk, Sven Saldanha , Daniel King, Joanne Julian, Anja Nohe, (2011) *Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. Cellular Signaling* 23 (4):609-20.
- 45.** Isaeva AR, Mitev VI. (2011) The protein kinase CK2 inhibitor TBB mediates up-regulation of MEK3/6 and p38 δ activities, down-regulation of ERK1/2 activity and induction of G1/S arrest in normal human epidermal autocrine proliferating keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 63 (2), pp. 124-126. Isaeva AR, Mitev VI. (2009)
- 46.** Inhibition of protein kinase CK2 induces E2F1 nuclear export, formation of p21/E2F1 complexes and suppression of DNA synthesis in normal human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 55 (2), 134-136.
- 47.** http://individual.utoronto.ca/frappierlab/projects_CK2kinase.html
- 48.** Identification of a Novel Protein Interaction Motif in the Regulatory Subunit of Casein Kinase 2. Jennifer Yinuo Cao, Kathy Shire, Cameron Landry, Gerald D. Gish, Tony Pawson, and Lori Frappier, *Mol Cell Biol* (2014).
- 49.** Inhibition of Protein Kinase CK2 Prevents Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Like C3H/10T1/2 Cells. Lisa Schwind, Sarah Schetting and Mathias Montenarh, *pharmaceuticals* (2017)
- 50.** P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A.I. Ridall, G. Karsenty, *Cell* 89 (1997) 747–754.)
- 51.** B. Lee, K. Thirunavukkarasu, L. Zhou, L. Pastore, A. Baldini, J. Hecht, V. Geoffroy, P. Ducy, G. Karsenty, *Nat. Genet.* 16 (1997) 307–310.)
- 52.** G. Dobрева, M. Chahrour, M. Dautzenberg, L. Chirivella, B. Kanzler, I. Faricas, G. Karsenty, R. Grosschedl, *Cell* 125 (2006) 971–986
- 53.** O. Britanova, M.J. Depew, M. Schwark, B.L. Thomas, I. Miletich, P. Sharpe, V. Tarabykin, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 668–678)

- 54.** Philipsen, S., and Suske, G. (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* - 27, 2991–3000.
- 55.** Karsenty G., (2011) Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation, *PubMed*, 142:2731–3. Nakashima K, de Crombrughe B. (2003) 59.)
- 56.** Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.*, *PubMed*, 19:458–66. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B., (2002)
- 57.** The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation., *PubMed*, 108:17–29.
- 58.** Nishio Y, Dong Y, Paris M, O’Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H., (2006) Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene.*, *PubMed*, 372:62–70. Yang X, Karsenty G., (2002)
- 59.** Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med.*, 8:340–5. Zhou, X., Zhang, Z., Feng, J. Q., Dusevich, V. M., Sinha, K., Zhang, H. de Crombrughe, B. (2010).
- 60.** Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 12919–12924. Zhu J, Shimizu E, Zhang X, Partridge NC, Qin L., (2011)
- 61.** EGFR signaling suppresses osteoblast differentiation and inhibits expression of master osteoblastic transcription factors Runx2 and Osterix. *J Cell Biochem.*, 112:1749–60.
- 62.** Krishna M. Sinha and Xin Zhou, (2013), Genetic and molecular control of Osterix in skeletal formation, *J Cell Biochem*, 114 (5):975-84.
- 63.** Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, Yuan GH, Dong J, Gay I, MacDougall M. (2009) Runx2, Osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res.*, 88:904–9. Hirata A, Sugahara T, Nakamura H. (2009)
- 64.** Localization of runx2, osterix, and osteopontin in tooth root formation in rat molars. *J Histochem Cytochem*, 57:397–403. Zhao C, Hosoya A, Kurita H, Hu T, Hiraga T, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Kurashina K, Ozawa H, Nakamura H. (2007)
- 65.** Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. *Arch Oral Biol.*, 52:945–53
- 66.** The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodeling. Katherine A Staines, Vicky E MacRae and Colin Farquharson, *Journal of Endocrinology* (2012)].
- 67.** Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. Ryuichi Fujisawa, Masato Tamura, *Frontiers in Bioscience*, *Frontiers in Bioscience* (2012).
- 68.** Mellor, h. & Parker, P. J., (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332, 281–292.
- 69.** Pears, C. J., Kour, G., house, C., Kemp, B. E. & Parker, P. J., (1990) Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur. J. Biochem.* 194, 89–94
- 70.** Suzuki, A. et al., (2001) Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J. Cell Biol.* 152, 1183–1196
- 71.** Flynn, P., Mellor, h., Palmer, R., Panayotou, G. & Parker, P. J., (1998) Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the hr1 repeat motif. *J. Biol. Chem.* 273, 2698–2705

- 72.** Nishizuka, Y., (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614
- 73.** Carine Rosse, Mark Linch, Stéphanie Kermorgant, Angus J. M. Cameron, Katrina Boeckeler и Peter J. Parker, (2010) PKC and the control of localized signal dynamics, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 103
- 74.** Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., and Messing, R.O., (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol.* 279, L429-L438
- 75.** Newton, A.C., (1995) Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *J Biol. Chem.* 270,28495-28498
- 76.** Nishizuka, Y., (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9, 484-496.
- 77.** Parekh, D.B., Ziegler, W., and Parker, P.J. (2000) Multiple path ways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 19,496-503
- 78.** Lo, L-W., Cheng, J-J., Ciu, J-J., Wung, B-S., Liu, Y-C., and Wang, D.L., (2001) Endothelial exposure to hypoxia induces Rge-1 expression involveing PKCa-mediated Ras/Raf-1/ERK1/2 pathway. *J. Cell. Physiol.*, 188,304-312.
- 79.** Cheng, J-J., Wung, B-S., Chao, Y-J., and Wang, D.L. (2001) Sequential activation of protein kinase C (PKC)- α and PKC- β contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. *J. Biol. Chem.*, 276, 31368-31375.
- 80.** Shigeru Nakashima, (2002) Protein Kinase C α (PKC α): Regulation and Biological Function, *J Biochem*, 132(5): 669- 75
- 81.** Bornancin, F. and Parker, P.J., (1997) Phosphorylation of protein kinase C- α on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol. Chem.* 272, 3544-3549.
- 82.** Hansra, G., Garcia-Paramio, P., Prevostel, C., Whelan, R.D.H., Bornancin, F., and Parker, P.J., (1999) Multiple dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. *Biochem. J.* 342, 337-344.
- 83.** Dutil, E.M. and Newton, A.C., (2000) Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 275, 10697-10701
- 84.** Buchner, K., (1995) Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur J. Biochem.* 228, 211-221.
- 85.** Schmalz, D., hucho, E, and Buchner, K., (1998) Nuclear import of protein kinase C occurs by a mechanism distinct from the mechanism used by proteins with classical nuclear localization signal. *J. Cell Sci.* 111, 1823-1830.
- 86.** Ng, T., Parsons, M., Hughes, W.E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P.J., Bastiaens, P.I.H., and Parker, P.J., (2001) Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J.* 20, 2723-27411.
- 87.** Haller, H., Lindschau, C., Maasch, C., Olthoff, H., Kurscheid, D., and Luft, F.C., (1998) Integrin-induced protein kinase C α and C β translocation to focal adhesion mediates vascular smooth muscle spreading. *Circ. Res.* 82, 157-165.
- 88.** Vallentin, A., Prevostel, C., Fauquier, T., Bonnefont, X., and Joubert, D., (2000) Membrane targeting and cytoplasmic sequestration in the spatiotemporal localization of human protein kinase C α . *J Biol. Chem.* 275, 6014-6021

- 89.** Wallis, S., Lloyd, S., Wise, I., Ireland, G., Fleming, T.P., and Garrod, D., (2000) The α isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 1077-1092
- 90.** Mochly-Rosen, D., (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: A theme in signal transduction. *Science* 268, 247-251
- 91.** Hyatt, S.L., Liao, L., Chapline, C., and Jaken, S., (1994) Identification and characterization of α -protein kinase C binding proteins in normal and transformed REF52 cells. *Biochemistry* 33, 1223-1228
- 92.** Oka, N., Yamamoto, M., Schwencke, C., Kawabe, J., Ebina, T., Ohno, S., Couet, J., Lisanti, M.P., and Ishikawa, Y., (1997) Caveolin interaction with protein kinase C. *J Biol. Chem.* 272, 33416-33421
- 93.** Mandil, R., Ashkenazi, E., Blass, M., Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Rosenthal, G., Umansky, F., Lorenzo, P.S., Blumberg, P.M., and Brodie, C., (2001) Protein kinase C α and protein kinase C δ play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res.* 61, 4612-4619
- 94.** Ways, D.K., Kukoly, C.A., de Vente, J., Hooker, J.L., Bryant, W.O., Posekany, K.J., Fletcher, D.J., Cook, P.P., and Parker, P.J., (1995) MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C- α exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J. Clin. Invest.* 95, 1906-1915
- 95.** Sun, X. and Rotenberg, S.A., (1999) Overexpression of Protein kinase C α in MCF-10 human breast cancer cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility. *Cell Growth Differ* 10, 343-352
- 96.** Frey, M.R., Clark, J.A., Leontieva, O., Uronis, J.M., Black, A.R., and Black, J.D. (2000) Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J Cell Biol.* 151, 763-777
- 97.** Lee, J.Y., Hannum, Y.A., and Obeid, L.M., (1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase C- α . *J Biol. Chem.* 271, 13169 – 13174
- 98.** Chen, C-Y. and Faller, D.V., (1999) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by Fas ligation. *J. Biol. Chem.* 274, 15320 – 15328
- 99.** Neuzil, J., Weber, T., Schroder, A., Lu M., Ostermann, G., Gellert, N., Mayne, G.C., Olejnicka, B., Negre-Salvayre, A., Sticha, M., Coffey, R.J., and Weber, C., (2001) Induction of cancer cell apoptosis by α -tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J* 15, 403-415
- 100.** Whelan, R.D. and Parker, P.J., (1998) Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene* 16, 1939 – 1944
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., and Messing, R.O., (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol.* 279, L429-L438
- 101.** Shen, L., Dean, N.M., and Glazer, R.I., (1999) Induction of p53 dependent, insulin-like growth factor-binding protein-3-mediated apoptosis in glioblastoma multiforme cells by a protein kinase C α antisense oligonucleotide. *Mol. Pharmacol.* 55, 396 – 402
- 102.** Ruvolo, P.P., Deng, X., Carr, B.K., and May, S., A, (1998) functional role for mitochondrial protein kinase C α in Bcl 2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol. Chem.* 273, 25436 – 25442

- 103.**Jao, H.-C., Yang, R.-C., Hsu, H.-K., and Hsu, C. , (2001) The decrease of PKC α is associated with hepatic apoptosis at early and late phases of polymicrobial sepsis. *Shock* 15, 130-134
- 104.**Borner, C., Filipuzzi, I., Weinstein, LB., and Imber, R., (1991) Failure of wild-type or mutant form of protein kinase C- α to transform fibroblasts. *Nature*, 353, 78-80
- 105.**Okuda, H., Adachi, M., Miyazawa, M., Hinoda, Y., and Imai, K., (1999) Protein kinase Ca promotes apoptotic cell death in gastric cancer cells depending upon loss of anchorage. *Oncogene* 18, 5604-5609
- 106.**Haslauer, M., Baltensperger, K., and Porzig H., (1999) Erythropoietin and stem cell factor-induced DNA synthesis in normal human erythroid progenitor cells requires activation of protein kinase C α and is strongly inhibited by thrombin . *Blood* 94, 114-126
- 107.**Pierce, A., Heyworth, C.M., Nicholls, S.E., Spooncer, E., Dexter, T.M., Lord, J.M., Owen-Lynch, P.J., Wark, G., and Whetton, A.D., (1998) An activated protein kinase Ca gives a differentiation signal for hematopoietic progenitor cells and mimics macrophage colony-stimulating factor-stimulated signal events . *J Cell Biol.* 140, 1511-1518
- 108.** Wagner, L.M. and Takemoto, D.J., (2001) Protein kinase C α and γ in N/N 1003A rabbit lens epithelial cell differentiation *Mol. Vs.* 7, 57-62
- 109.** Cho, Y., Klein, M.G., and Talmage, D.A., (1998) Distinct functions of protein kinase C α and protein kinase C β during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Cell Growth Differ* 9, 147-154
- 110.** Zhao, X., Murata, T., Ohno, S., Day, N., Song, J., Nomura, N., Nakahata, T., and Yokoyama, K.K., (2001) Protein kinase C α plays a critical role in mannosylerythritol lipid-induced differentiation of melanoma B16 cells. *J Biol. Chem.* 276, 39903- 39910
- Neuzil, J., Weber, T., Schroder, A., Lu M., Ostermann, G., Gellert, N., Mayne, G.C., Olejnicka, B., Negre-Salvayre, A., Sticha, M., Coffey, R.J., and Weber, (2001) C.Induction of cancer cell apoptosis by α -tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J* 15, 403-415
- 111.** Gruber, J.R., Ohno, S., and Niles, R.M., (1992) Increased expression of protein kinase C α play a key role in retinoic acid induced melanoma differentiation. *J Biol. Chem.* 267, 13356-13360
- 112.** B.L. Black, E.N. Olson, (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14 pp. 167-196
- 113.** E.D. Rosen, B.M. Spiegelman, (2000) Molecular regulation of adipogenesis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16, pp. 145-171
- 114.** Fugui Zhang, Jinlin Song, Hongmei Zhang, Enyi Huang, Dongzhe Song, Viktor Tollemar, Jing Wang, Jinhua Wang, Maryam Mohammed, Qiang Wei, Jiaming Fan, Junyi Liao, Yulong Zou, Feng Liu, Xue Hu, Xiangyang Qu, Liqun Chen, Xinyi Yu, Hue H. Luu, Michael J. Lee, Tong-Chuan He, Ping Ji, (2016), Wnt and BMP signaling crosstalk in regulation dental stem cells: Implications in dental tissue engineering., *Genes & Diseases*, 3 (4) 263-276
- 115.** Niefind, J Raaf and O-G Issinger. Protein kinase CK2: From structures to insights. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 1800–1816) K Niefind, J Raaf and O-G Issinger. Protein kinase CK2: From structures to insights. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 1800–1816
- 116.** Leili Shahriyari, 2013
- 117.** N A St-Denis and D W Litchfield, From birth to death: The role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 2009; 1817 – 1829

- 118.** C W Yde, B B Olsen, D Meek, N Watanabe and B Guerra. The regulatory β -subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the onset of mitosis. *Oncogene* 27, 2008:4986–4997
- 119.** Bragdon B, Thinakaran S, Moseychuk O, et al. Casein Kinase 2 β -Subunit Is a Regulator of Bone Morphogenetic Protein 2 Signaling. *Biophysical Journal*. 2010; 99:897-904
- 120.** B Bragdon, S Thinakaran, O Moseychuk, L Gurski, J Bonor, C Price, L Wang, W G Beamer, A Nohe, Casein kinase 2 regulates in vivo bone formation through its interaction with bone morphogenetic protein receptor type Ia. *Bone*, 2011;5: 944-954
- 121.** O.M 2012
- 122.** Shigeru Nakashima, (2002) Protein Kinase C α (PKC α): Regulation and Biological Function, *J Biochem*, 132(5): 669- 75
- 123.** Fugui Zhang, Jinlin Song, Hongmei Zhang, Enyi Huang, Dongzhe Song, Viktor Tollemar, Jing Wang, Jinhua Wang, Maryam Mohammed, Qiang Wei, Jiaming Fan, Junyi Liao, Yulong Zou, Feng Liu, Xue Hu, Xiangyang Qu, Liqun Chen, Xinyi Yu, Hue H. Luu, Michael J. Lee, Tong-Chuan He, Ping Ji, (2016), Wnt and BMP signaling crosstalk in regulation dental stem cells: Implications in dental tissue engineering., *Genes & Diseases*, 3 (4) 263-276)
- 124.** Nakura A., Higuchi C., Yoshida K., Yoshikawa H. (2011) PKC α suppresses osteoblastic differentiation. *Bone* 48, 476–484)
- 125.** Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. Beth Bragdon, Oleksandra Moseychuk, Sven Saldanha , Daniel King, Joanne Julian, Anja Nohe, *Cellular Signaling* (2011)
- 126.** Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. Gonzalo Sanchez-Duffhues, Christian Hiepen, Petra Knaus, Peter ten Dijke, *Bone* (2015)
- 127.** Chen, S., Gluhak-Heinrich, J., Wang, Y. H., Wu, Y. M., Chuang, H. H., Chen, L., MacDougall, M. (2009). Runx2, Osx, and Dsp in Tooth Development. *Journal of Dental Research*, 88(10): 904–909.)
- 128.** A structural and functional model for human bone sialoprotein. Kevin Vincent, Marcus C. Durrant, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*(2012)
- 129.** Posttranslation modifications to human bone sialoprotein determined by mass spectrometry. Zaia J, Boynton R, Heinegard D, *Biochem* (2001)
- 130.** Complete topographical distribution of both the in vivo and in vitro phosphorylation sites of bone sialoprotein and their biological implications. Salih E, Fluckiger R, *J Biol Chem* (2004)
- 131.** Phosphorylation of Ser136 is critical for potent bone sialoprotein-mediated nucleation of hydroxyapatite crystals. Baht GS, O’Young J, Borovina A, *Biochem J* (2010)
- 132.** Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain. Stubbs J. T. 3rd., Mintz K. P., Eanes E. D., Torchia D. A., Fisher L. W., *J. Bone Miner* (1997).
- 133.** Natural variation in the extent of phosphorylation of bone phosphoproteins as a function of in vivo new bone formation induced by demineralized bone matrix in soft tissue and bony environments. Salih E, Wang J, Mah J, *Biochem, J* (2002)
- 134.** Modulation of extracellular matrix protein phosphorylation alters mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micromass cultures. Adele L. Boskey, Stephen B. Doty, Valery Kudryashov, Philipp Mayer-Kuckuk, Rani Roy, Itzhak Binderman. *Bone*. (2008) Jun
- 135.** Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. Y Ogata, *J Periodontal Res, Journal of Periodontal Research* (2008)

136. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2 FLAVIO MEGGIO AND LORENZO A. PINNA. The FASEB Journal (2003)