

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Jelátviteli fehérjék expressziójának tranziens transzfekcióval történő módosítása és annak hatásai primer kondrogenikus sejt kultúrában

Juhász Tamás

Témavezető: Dr. Zákány Róza



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

I. JELÁTVITELI FOLYAMATOK SEJT- ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA DOKTORI PROGRAM

Debrecen, 2010

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Zákány Róza, Ph.D.

DOKTORI ISKOLA:

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

DOKTORI PROGRAM:

I. Jelátviteli Folyamatok Sejt- és Molekuláris Biológiája Doktori Program

A SZIGORLATI BIZOTTSÁG TAGJAI:

A bizottság elnöke: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus

Bizottsági tagok: Dr. Deák Ferenc, Ph.D.

Prof. Dr. Szondy Zsuzsa, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2011. január 25., 11 óra, DE OEC Molekuláris
Medicina Kutatóközpont Könyvtár

A VÉDÉSI BIZOTTSÁG TAGJAI:

A bizottság elnöke: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus

Opponensek: Dr. Csontos Csilla, Ph.D.

Dr. Balla András, Ph.D.

Bizottsági tagok: Dr. Deák Ferenc, Ph.D.

Prof. Dr. Szondy Zsuzsa, az MTA doktora

Az értekezés védésének helye és ideje: DE OEC Nőgyógyászati Klinika
tanterme, 2011. január 25., 13 óra

Bevezetés

Az egyes ízületeket borító hialinporc egyedi tulajdonságai teszik lehetővé, hogy betöltse szövettani, anatómiai és fiziológiai szerepét a fejlődés korai szakaszától az életünk végéig, mely során eltérő mértékű terhelési viszonyoknak van kitéve a valódi regeneráció lehetősége nélkül. Számos olyan próbálkozás indult el az utóbbi évtizedben, melyek célja *in vitro* ízületi porc előállítása volt. Annak érdekében, hogy ezeket a kísérleti törekvéseket és a terápiás lehetőségeket fejlődését elősegítsük fontos megértenünk az ízületi porc szöveti szerkezetének kialakulási mechanizmusát és a porcdifferenciáció molekuláris szabályozását.

A porcszövet szövettanilag a kötő- és támasztószövetek csoportjába tartozik, három alcsoportba osztjuk; a hialinporc, az elasztikus porc és a rostos porc. Közös jellemzőjük, hogy érmentes szövetek, táplálásuk diffúzió útján történik a periféria felől. A porcszövet felépítésére jellemző a sejtek közötti nagy mennyiségű extracelluláris matrix, mely komplexitása révén biztosítja a szövet biomechanikai sajátosságait. A vázrendszer növekedésének lezáródását követően a kondrociták fiziológias körülmények között nem osztódó, immortalizált sejtek.

Széles körben elterjedt *in vitro* porcdifferenciációs modell a Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumban lévő csirkeembriók végtagbimbóiból előállított, kondroprogenitor mezenchimális sejtekből álló primer „high density” sejt kultúra. Ezekben a sejt populációkban megfelelő tenyésztési körülmények között hat nap alatt spontán porcdifferenciáció zajlik. A tenyésztés végére a hialinporc állományának megfelelő porc telepeket kapunk, melyek metakromáziás festékekkel specifikusan kimutathatók. Ezekben a kultúrákban lehetőség nyílik a porcdifferenciációt irányító faktorok és porcspecifikus matrixmolekulák molekuláris biológiai monitorozására is.

A porcdifferenciáció lépései

A mezenchimális sejtek bonyolult, többlépéses folyamat során differenciálódnak kondrocitákká. Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* porcdifferenciáció fontos kezdeti lépése a sejtek kisebb sejtcsoportokba való kondenzációja. Az aggregátumok kialakításában számos faktor összehangolt működése játszik szerepet. A kísérleteink során használt HD-kultúrákban a kondrogenikus sejtek kondenzációja az első tenyésztési nap folyamán zajlik, majd a második és harmadik napon a nodulusok sejtjei porcsejteké differenciálódnak. A differenciációt követően egyre nagyobb mennyiségben szintetizálódó II. típusú kollagénben és aggregátumban gazdag matrix teljesen körülveszi a porcsejteket. Ez az egyedi összetételű ECM nagy fontossággal bír a porcsejtek végleges fenotípusának kialakításában és fenntartásában.

A kondrogenézist irányító mestergén a *sox9*, mely az ízületi porc differenciációja során a *Col2a1*, *Col9a1*, *Col11a2* gént aktiválva, megindítja a II. típusú kollagén és aggregátum tengelyfehérjéjének szintézisét. A Sox9 aktívabb, foszforilált formája is jelen van a porcdifferenciáció során, ugyanakkor a P-Sox9 jelenléte nem feltétele a kondrogenézisnek, csak annak mértékét befolyásolja. A Ser/Thr-specifikus protein-kinázok közé tartozó cAMP-függő PKA a kondrogenézis során foszforilálja a Sox9-et.

A MAP kináz útvonalak kaskád rendszereket alkotnak. Az ERK1/2 elfogadottan az extracelluláris mitogenikus stimulusok fő mediátora és fontos szerepet játszik számos sejt differenciációjában is, így a kondrogenézisben is. Az ERK1/2 útvonal Ca^{2+} érzékeny, mely részben a különböző PKC-kal való kapcsolatnak köszönhető és számos más Ca^{2+} érzékeny útvonal sejtosztódást stimuláló effektusa is rajta keresztül valósul meg.

A PKC izoenzimek funkciói

A Ser/Thr-specifikus protein-kináz C enzimcsalád az eukarióta sejtek számos jelátviteli útvonalának, többek között a sejtosztódás, az apoptózis szabályozásának fontos tagja. Az enzimcsalád 11 izoformát foglal magába,

melyek közül a PKC α , γ , ϵ , ζ , valamint ι , λ izotípusok expressziója bizonyított a chondrogenikus sejtek differenciációja során. Az atípusos PKC-k közé sorolható a PKC δ , mely aktivációs mechanizmusához nem kell a Ca²⁺-ionok jelenléte, de PS jelenlétében DAG-gal és forbol-észterekkel aktiválható. Különös ismertetőjegye, hogy számos sejtben zajló folyamat negatív regulátoraként is ismert, így pl. a proliferáció szabályozásában, vagy akár az apoptózis elindításának regulálásában. A PKC δ specifikus farmakológiai inhibitorának tekintik a rottlerint, ami egy polifenolszármazék. Az inhibitor 3-6 μ M-os koncentrációban 30-40-szer erősebben gátolja a PKC δ -t, mint más PKC enzimeket.

A Ser/Thr foszfatázok szerepe a porcdifferenciációban

Az Ser/Thr foszfoprotein foszfatáz (PP) enzimcsalád egyik tagja a Ca²⁺-kalmódulin függő PP2B vagy más néven calcineurin. A PP2B az eukarióta sejtekben heterodimer szerkezetű, egy katalitikus alegységből és egy regulátor alegységből áll. A működésének szabályozása rendkívül bonyolult, számos helyen foszforilálódhat, ezek egy része aktiváló hatású. A calcineurin B alegységén azonosított kalcium kötőhelyen nagy affinitással képes 4 Ca²⁺ iont megkötni, így fontos szerepet tölthet be a Ca²⁺ szignalizációs útvonalak aktivitásának szabályozásában. A calcineurin közismert farmakológiai gátlószere az immunosuppresszáns hatású ciklosporin A, az enzim egyik fő targetjének a transzkripciós faktorok családjába tartozó NFAT-t (Nuclear Factor of Activated T cells) tartják.

A porcdifferenciáció Ca²⁺ szabályozása

A humán szervezet legtöbb sejtjében az intracelluláris szabad Ca²⁺-koncentrációja több mint 100-szor kisebb, mint az extracelluláris folyadék kalciumion tartalma. Ez a koncentrációgradiens teremt olyan hajtóerőt, mely esetén adott Ca²⁺-ra permeabilis plazma membrán ioncsatornák megnyílása sejtbe történő Ca²⁺ beáramlást eredményez. A Ca²⁺-ionok a sejtekben eltérő

jelátviteli utakban másodlagos hírvivőként is működhetnek. Az *in vitro* kondrogenézis során a citoszólikus szabad Ca^{2+} -koncentráció változása összefüggést mutat a differenciáció egyes lépéseivel. Saját megfigyeléseink szerint, a differenciáció elején igen élénk, nagy amplitúdójú és viszonylag magas frekvenciájú (10-15/perc) Ca^{2+} -oszcillációk figyelhetők meg. A Ca^{2+} -ionok ilyen jellegű ki és belépését a sejtekbe számos kation csatorna, receptor szabályozhatja. Az NMDA receptor a három nagy glutamát receptor egyike, iontrop, nem szelektív kationcsatorna mely elsősorban Ca^{2+} -ionokra permeabilis, A heterotetramer csatorna három alegységét azonosították, az NR1-et, az NR2-t és az NR3-at, melyek közül az NR1 alegység minden esetben csatornaképző komponens. NMDA receptorok jellemzően idegsejteken találhatóak, ahol az egyik legfontosabb excitatórikus szinapszis-alkotó elem, de az elmúlt évtizedben az NMDA receptorok jelenlétét kimutatták felnőtt ízületi porcsejteken is. Bizonyos adatok arra engednek következtetni, hogy az NMDA receptorok egyfajta mechanotranszduktorként működnek, azonban arra nézve nincsenek kísérletes eredmények, hogy milyen szerepet tölthetnek be a kondrogenikus sejtek differenciációja során.

Transzfekeciós módszerek a sejtenyészti laboratóriumokban

Az eukarióta sejtekbe történő DNS, plazmid, RNS, protein és antiszensz oligonukleotidok transzfekeció révén történő bejuttatása alapvető fontosságú módszer a különböző gének és enzimek funkciójának, szerkezetének *in vivo* és *in vitro* tanulmányozásában. A transzfekeció különösen nehéz feladat primer sejteken, hiszen lényegesen érzékenyebbek a külső behatásokra, és a transzfekeció következtében megváltozhat differenciációs készségük is. Az általunk használt primer mezenchimális sejtekből létrehozott HD-kultúrákban a kondrogenikus sejtek több rétegben és igen nagy sejtsűrűség mellett képesek spontán porccá differenciálódni és ebben a rendszerben még nincs megfelelően kidolgozva a transzfekeciós technika.

Célkitűzés

Kutatómunkám céljaként e modellrendszer vizsgálatának laboratóriumunkban új molekuláris biológiai módszereként a tranziens transzfekciós technika bevezetését és a módszer optimalizálását kívántam elvégezni, majd a módszer segítségével a jelátvitelben szereplő egy-egy enzim vagy receptor porcdifferenciáció során betöltött szerepét szerettem volna világosabbá tenni. Kísérleteink során vizsgálni kívántuk:

- Többféle, plazmid, sh-és siRNS-t kódoló szekvenciák bejuttatására alkalmas (transzfekciós) módszer hatékonyságát, a sejtek élet- és osztódóképességére, valamint porcdifferenciációra gyakorolt hatásait.
- A PP2B konstitutive aktív trunkált és teljes, szabályozott aktivitású formáinak túltermeltetéssel, illetve shRNS segítségével végzett, indukálható, tranziens géncsendesítéssel módosított működésének porcképződésre gyakorolt hatásait.
- A PKC δ porcdifferenciációra gyakorolt hatásait farmakológiai inhibitor, valamint tranziens géncsendesítés segítségével.
- siRNS technikával csendesített NR1 expresszió milyen hatással van a porcképződés mértékére, a differenciálódó porcsejtek élet- és osztódóképességére, valamint porcdifferenciációs markerek kifejeződésére.
- Kíváncsiak voltunk, hogy a membránban így egyáltalán nem, vagy csak nagyon kis számban jelenlévő NMDA receptorok milyen hatással vannak a differenciálódó porcsejtek Ca²⁺-oszcillációira.

Anyagok és módszerek

Sejtenyésztés

A porcosodó „micromass” mezenchimális sejt kultúrák más néven „high density” (HD)-kultúrák alkalmazása a porcdifferenciáció tanulmányozására évtizedek óta ismert módszer. A porcosodó mezenchimális sejteket csirkeembriók disztális végtagtelepeiből izoláltuk. A kísérletekhez használt embriók Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumában voltak. $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségűeket használtunk, 100 vagy 30 μ l cseppet cseppentettünk műanyag Petri-csészék aljára. A Petri-csészéket 37°C -on, 5% CO_2 és 95% relatív páratartalom mellett termosztálva, a sejteket 2 órán át hagytuk kitapadni, majd 10% FBS-mal kiegészített, antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó Ham's F12 táptalajjal tápláltunk.

A képződött porc metakromáziás festékekkel történő detektálása

A sejtszuszpenzióból 30 μ l-es cseppeket cseppentettünk 24-lyukú tenyésztőedényekbe helyezett fedőlemezekre. Az abszolút alkohol és 40% formalin 4:1 arányú keverékével fixált, majd rehidrált kultúrákat ecetsavban oldott 0,1%-os DMMK oldattal festettük és kristályragasztóval, majd 24 óra elteltével DPX-el fedtük le.

A metakromáziásan festődő matrixalkotók mennyiségének szemikvantitatív meghatározását toluidinkék festékkinyeréses módszerrel végeztük. Ehhez a kultúrákat a tenyésztés befejezését jelentő hatodik napon Khale-fixálóval fixáltuk. Ezt követően glikokoll/glicin-HCl pufferben oldott 0,1%-os toluidinkék festékekkel festettük. A nem kötődött festéket glikokoll/glicin-HCl oldattal kimostuk, a PG-hoz és GAG-hoz kötődő festéket abszolút alkoholban oldott 8%-os HCl oldattal nyertük vissza. A visszanyert toluidinkék festék abszorbanciáját 625 nm-en mikroplate leolvasó segítségével határoztuk meg.

A PP2B-vektorok és izolálásuk

A transzfekció hatékonyságának megítéléséhez pEGFP-C1 vektort használtuk. A CnA delta, a kalcineurin trunkált formáját kódolja, mely Ca^{2+} -független módon folyamatosan aktív. A CnA gamma a kalcineurin gamma izoforma teljes cDNS szekvenciáját tartalmazza. A plazmidokat *E. coli* sejtekbe transzformáltuk és kanamycin tartalmú LB-agaron tenyésztettük, MaxiPrep kit segítségével izoláltuk, követve a gyári protokoll utasításait.

sh- és siRNS expressziós rendszerek

A PKC δ és PP2B shRNS-t kódoló szekvenciákat GeneSwitch™ indukálható promóterű expressziós vektorba klónoztattuk. A transzfekcióhoz két vektor transzfekcióját végeztük egyszerre; az shRNS-eket kódoló inaktív vektorokat és az indukciós vektort. A tenyésztés 2. napján az indukciót mifepristone tápfolyadékba juttatásával értük el. Az NMDA receptor NR1 alegységének csendesítésére *Gallus gallus* szekvencia (accession number: AY510024) alapján gyárilag tervezett specifikus siRNS koktélt használtunk.

HD-kultúrák transzfekciója

Számos transzfekciós módszer és protokollt teszteltünk; Lipofectamin 2000, SuperFect, DMRIE-C, Saint Mix reagensek és a nukleofekciós protokollt az Amaxától. Minden esetben frissen izolált, $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségű sejtszuspenzióban végeztük a kísérleteket, bizonyos esetekben a protokoll kis módosításával. A transzfekciót követően a sejteket a szokott módon cseppentettük ki a tenyésztő edényekbe. Kicseppentés után 2 órával a sejteket 10% FBS-mal kiegészített, Ham's F12 tápoldattal tápláltuk. A nuklofekciót Amaxa készülékkel végeztük a $200 \mu\text{l}$ $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségű sejtszuspenzióban a mezenchimális sejtekre optimalizált C17 program segítségével. Az siRNS transzfekciójára a cég által optimálisnak tartott DharmaFect transzfekciós reagenst alkalmaztuk a gyári protokoll szerint.

A GFP-t expresszáló vektorok vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal

A sejteket a transzfekeciót követő napon táptalajban, normál tenyésztési körülmények között világítottuk meg 488 nm hullámhosszú fluoreszcens fénysugárral, majd 10× objektívet használva SPOT-RT-kamera segítségével 508 nm-en készítettük a fotodokumentációt Nikon Eclipse 800 mikroszkópon.

A PKC δ aktivitás gátlása rottlerinnel

A rottlerint DMSO-ban oldottuk és -20°C -on tároltuk a felhasználásig. Az inhibitor 5 μM koncentrációban a differenciáció eltérő napján adagoltuk a kultúrák tenyésztő folyadékába.

Életképesség vizsgálata MTT- tesztel

A sejtek életképességét MTT kolorimetriás tesztel vizsgáltuk a tenyésztés 3. napján. A kultúrákat 96 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük, melyekhez a 3. tenyésztési napon 10 μl MTT (3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) oldatot pipettáztunk minden lyukba, majd 2,5 órán keresztül 120 rpm-en 37°C -on rázógépeben inkubáltuk. A keletkezett lila színű formazán kristályokat MTT szolubilizáló oldattal feloldottuk és a minták abszorpcióját 570 nm-en mértük.

Proliferációs vizsgálat ^3H -timidin-beépülés mérésével

A sejtek 15 μl -es cseppjeit 96 lyukú folyadékszintillációs tenyésztőedényekbe. A tenyésztés 3. napján 16 órán keresztül $1\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidinnel (185 GBq/mM ^3H -thymidine) inkubáltuk. Az inkubációt követően a kultúrákat PBS-sel mostuk, a fehérjéket jéghideg 5%-os triklórecetsavval 20 perc alatt denaturáltuk, majd újra PBS-sel mostuk és foszfor-pentoxidot tartalmazó exikátorban vízmentesre szárítottuk. A mérés előtt szcintillációs folyadékot adtunk a mintákhoz, és folyadékszintillációs számlálóval mértük a radioaktivitást.

Apoptózis és a transzfekció értékének meghatározása áramlási citométerrel

A transzfekció hatékonyságát a GFP detektálásával, az apoptózis mértékét AnnexinV DY647 kit, a nekrozist PI segítségével vizsgáltuk a tenyésztés 2. vagy 3. napján. A mérésekhez kontrollként nem transzfektált, és/vagy csak üres vektorral transzfektált sejteket használtunk. A sejtek jelölése a szokásos protokollnak megfelelően történt, tripszines emésztés és centrifugálás után a sejt pelletet FACS pufferrel szuszpendáltuk. A GFP-t expresszáló sejtek detektálása 508 nm-en, az AnnexinV DY647 detektálása pedig 670 nm-en, PI 430 nm-en CyFlow® space Flow Cytometer-rel történt. Az analízist Win MDI 2.8 freeware-rel végeztük. Az eredményeinket density plot-on ábráztuk.

Spontán Ca^{2+} -tranziensek vizsgálata

Az egyes kondroprogenitor sejtekben megfigyelhető spontán Ca^{2+} -tranzienseket LSM 510 META Laser Scanning konfokális mikroszkóp segítségével regisztráltuk. A mérés előtt a sejteket Fluo-4-AM kalciumérzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük fel 1 órán át. A tranzienseket normál Tyrode-oldatban regisztráltuk, a méréseket 63x-os vízimmerziós objektívvel végeztük. A Fluo-4-gyel töltött sejteket Ar-lézerrel előállított 488 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettük, a kibocsátott fluoreszcenciát pedig 500, illetve 570 nm-en detektáltuk. A spontán Ca^{2+} -tranziensek során bekövetkező intenzitásváltozásokat x-y analízissel vizsgáltuk. Az x-y analízis során 10 felvételt rögzítettünk 50 sec intervallum alatt készítettük.

Sejt-extraktumok előkészítése

A 2. és/vagy 3. tenyésztési napon Western blot és aktivitás-mérésekhez a sejt kultúrákról a tápoldatot eltávolítottuk, fiziológias sóoldattal kétszer átmostuk, a telepeket learattuk. Az összegyűjtött sejteket 10 percig 2000 rpm-en centrifugáltuk, majd a sejt pallethez 100 µl homogenizáló lízispuffert mértünk. Az így elkészített extraktumokat -70°C -on tároltuk. RT-PCR vizsgálathoz a porcosodó kolóniákat RNáz mentes fiziológias sóoldattal háromszor mostuk,

majd azonnali, folyékony nitrogénben való fagyasztást követően az RNS izolálásig -70°C -on történt a tárolás.

RT-PCR analízis

A sejtekből totál RNS-t izolálásához TRIZOL reagensben oldottuk fel a telepeket, majd 20% RNáz-mentes kloroformot adtunk hozzá és a mintákat 4°C -on 15 percig 10000 g-n centrifugáltuk. A keletkezett felülúszót eltávolítottuk és 500 μl RNáz-mentes izopropanolban 1 órán keresztül -20°C -on inkubáltuk majd 10000 g-n újra centrifugáltuk. Az így nyert RNS-mintából High Capacity RT-kit felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A megfelelően összeállított PCR-reakció elegyekhez Promega GoTaq® DNS-polimerázt használtunk. A kívánt DNS-szakaszok specifikus felerősítéséhez programozható termosztátot használtunk a primernek megfelelő beállításokkal. A PCR-mintákat végül etídium-bromiddal megfestett agarózgélben 90 V-on futtattuk. A képeket géldokumentációs rendszer segítségével készítettük.

Fehérjedetektálás Western blot technikával

A sejtszuspenziók fehérjekoncentrációjának meghatározása után 80 μg mintát 7,5%-os gélben futtattuk 120 V feszültségen, majd enyhe hűtés közben transzferáltuk nitrocellulóz membránra. A membránt PBS-ben oldott zsírintes tejjel blokkoltuk, majd a primer antitesteket egy éjszakán keresztül 4°C -on a blokkoló oldatban hígítva alkalmaztuk. A membránokat PBST-ben mostuk, majd 1% sovány tejporthoz tartalmazó PBS-ben oldott szekunder antitesteket adtunk a membránokhoz. A jelek detektálását kemilumineszcens jelerősítő technikával röntgenfilmeken a gyári protokoll szerint végeztük. A röntgenfilmekről 8-bites szürke skálán kódolt digitális felvételeket készítettünk géldokba integrált CCD kamerával, majd a felvételeken mértük a kapott jelek optikai denzitását ImageJ 1.40g képanalizáló segítségével. A kapott értékeket a kontroll csoportokra normalizáltuk.

Kalcineurin aktivitásmérés

A PP2B aktivitását radioaktív izotóppal (^{32}P) jelölt foszforilált inhibitor-1 szubsztrát (780 cpm/pmol) segítségével határoztuk meg. Kiolvasztás után a kultúrákat szonikátorral tártuk fel, majd centrifugáltuk. Az aktivitásmérésekhez a felülúszót használtuk. A munkaoldat az izotóppal jelölt szubsztráton kívül tris puffert (pH 7,09) 0,16 mM ditiotreitolt, 3,4 $\mu\text{g/ml}$ gordoxot, 3,4 $\mu\text{g/ml}$ leupeptint, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF), 1,6 mM benzamidint, 3,4 $\mu\text{g/ml}$ tripszin-inhibítort, 40 $\mu\text{g/ml}$ kalmodulint, 0,2 mM CaCl_2 -ot, 100 nM okadánsavat, protein foszfatáz inhibitor-2-t tartalmazott. Az így előkészített mintákat folyadékszintillációs számlálóval mértük.

Protein kináz C enzim-aktivitásmérés

A sejtek PKC aktivitásához a lizátumot 10,000 g-n 4°C -on 10 percig centrifugáltuk és a kapott felülúszót használtuk. Az aktivitást radioaktív izotóppal; ^{32}P jelölt ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) histone IIIS-ba történő beépülésével mértük. A PKC δ aktivitásméréshez 10 μM rottlerint adtunk a reakcióelegyhez, a totál PKC aktivitáshoz képest történő aktivitáscsökkenést a PKC δ saját aktivitásának tekintettük. A ^{32}P hiszton IIIS-be épülését 20 perc inkubációs idő alatt vizsgáltuk, majd ezután után Whatman P81 (2 \times 2 cm) papírra cseppentett 30 μl -es reakciótermékből határoztuk meg. A papírokat háromszor 0,5% foszforsavban mostuk és folyadékmentesre szárítottuk, ezután folyadékszintillációs készülékben mértük a radioaktivitást.

Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A mérési eredményeket átlagoltuk és kiszámítottuk a standard hibákat. Az adatokat Student-féle kétmintás t -próba segítségével elemeztük, és azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$.

Eredmények

A HD-kultúrák tranziens transzfekciójának optimalizálása

A HD-kultúrákban a rövid tenyésztési periódusnak köszönhetően csak tranziensen lehet fehérjéket expresszálni. A transzfekció és a reagensek optimalizálásához „üres”, csak GFP-t expresszáló vektort juttattunk be a differenciálódó porcsejtekbe. A kitapadt sejtek transzfektálása sikertelennek bizonyult, ezért a gyári protokollok utasításaitól eltérően a transzfekciót a kicseppentés előtt az izolált sejtszuspenzióban végeztük. Ez a típusú kis módosítás szemmel látható eredményt hozott, a transzfektált kultúrákat mikroszkóppal vizsgálva már 16 órával a transzfekció után számos GFP pozitív sejtet detektáltunk.

Elektroporáció segítségével a telepek egésze fluoreszkált mikroszkóp alatt vizsgálva. A liposzóma alapú transzfekciók változó sikert mutattak, a Lipofectamin 2000 kielégítő számú sejtbe juttatott GFP-t expresszáló vektorokat, míg a DMRIE esetén csak néhány fluoreszcens sejt volt megfigyelhető. A SuperFect alkalmazása során már a transzfekció tényének hatására számos sejt elveszítette adhéziós képességét és a 2. tenyésztési nap végére kultúrák felváltak a tenyésztőedény aljáról. Ugyanakkor a Saint Mix a Lipofectaminnal közel megegyező GFP pozitivitást eredményezett.

Az Amaxával történő elektroporáció eredményeként igen nagy transzfekciós hatékonyságot detektáltunk, mely átlagosan a populáció 95,4%-át jelentette. Azonban a sejtek mintegy 47,3%-a az apoptotikus sejthalál korai jeleit mutatta. Habár a DMRIE és SuperFect reagensekkel transzfektált sejtek apoptotikus rátája igen alacsony volt, ami 0,5 és 0,7%-nak adódott, a DMRIE estében csak 12,7%-os, míg a SuperFect esetében 6,9%-os transzfekciós hatékonyságot értünk el. A Lipofectamin 2000 és a Saint Mix transzfekciós hatékonysága kielégítőnek bizonyult, a Lipofectamin a sejtpopuláció 62%-t, míg a Saint Mix a

61,7% transzfektálta sikeresen, ugyanakkor az előbbi módszer 25,2% míg az utóbbi csak 7,2% apoptózist eredményezett.

Az elektroporáció következtében a sejtek mitokondriális aktivitása drasztikus mértékben visszaesett, mely további kismértékű csökkenést mutatott, ha a sejtek felvették a GFP-t expresszáló vektort is. A DMRIE és SuperFect transzfekciós reagensek önmagukban történő alkalmazása 30-40%-kal csökkent a sejtek életképességét, míg a GFP termelése nem okoz további változásokat. A Lipofectamin 2000 és a Saint Mix is okoz kb. 25-30%-os életképesség-csökkenést, ugyanakkor a Lipofectamin 2000 által bejuttatott vektor további mitokondriális aktivitáscsökkenést eredményez. A triciált timidinnek a 3 napos kultúrák sejtjeinek DNS-ébe való beépülését detektálva megfigyelhetjük, hogy az elektroporációs technika a sejtek osztódását szinte teljes mértékben blokkolta. Hasonlóan erős proliferációscsökkentő hatást detektáltunk SuperFect alkalmazása során is, valamint a DMRIE alkalmazása is erősen gátló hatással bírt. Ez utóbbi esetekben a GFP expresszió megjelenése, habár igen alacsony értékű volt, további timidinbeépülés csökkenést eredményezett. A Lipofectamin proliferációscsökkentő hatása nem volt olyan jelentős, ugyanakkor a GFP jelenléte további már nem elhanyagolható 70% körüli osztódáscsökkenéssel párosult. A Saint Mix önmagában és GFP jelenlétében is csökkentette az osztódási rátát, de ez a populációs szintű vizsgálatokhoz még kielégítő értéknek bizonyult.

A transzfekció hatása a porcképződésre

Az Amaxa készülékkel elektroporált sejtekből kialakult telepek alig mutattak metakromáziás jelenséget, míg az ezzel a módszerrel bejuttatott GFP jelenléte teljesen blokkolta a porcképződést. A SuperFect reagens hatására a sejt kultúrák elvesztették adhéziós képességüket és felváltak a tenyésztő felületről, ezért festésük ily módon lehetetlenné vált. A kifejezetten kitapadó kultúrákra kifejlesztett DMRIE reagens hatására igen erős matrixképződés visszaesést detektáltunk, ami a kontroll csupán 35%-nak felelt meg, ezt a GFP-

vel expresszált sejtek jelenléte tovább csökkentette 11%-ra. A Lipofectamin 2000 hozzáadása mellett elfogadható mértékű porcképződést láttunk, azonban a GFP expressziója a kontroll 23%-ra szorította vissza a képződő porcmatrix mennyiségét. A Saint Mix reagens egyedül álló módon önmagában adagolva, illetve GFP jelenlétében sem csökkentette szignifikánsan a porcdifferenciáció mértékét.

Az elektroporáció következtében fellépő drasztikus osztódáscsökkenés és magas apoptotikus hajlam nem tette lehetővé, hogy elegendő mintát tudjunk előállítani ezekhez a vizsgálatokhoz. A többi transzfekciós módszer hatásait megvizsgálva kijelenthetjük, hogy a Sox9 mRNS expressziójában nem okoztak szignifikáns változást. Ehhez hasonló módon a bejuttatott GFP jelenléte sem csökkentette, vagy növelte meg szignifikánsan e transzkripciós faktor expressziós szintjét. Az aggregátum tengelyfehérje mRNS expresszióját megvizsgálva azt az érdekes megfigyelést tehetjük, hogy a SuperFect és a Lipofectamin 2000 GFP bejuttatása következtében enyhén emelkedett expressziót detektálhatunk. A többi módszer nincs hatással az aggregátum mRNS expressziójára.

A calcineurin túltermelésének vagy csendesítésének hatásai

A fentiek alapján a Saint Mix reagenst választottuk ki a high density kultúrák sejtjeinek transzfekciójára. Első kísérleteink során viszonylag nagyméretű, a PP2B két eltérő formáját kódoló vektort jutattunk a differenciálódó sejtekbe. Az egyik a konstitutíve aktív CnA delta a másik a PP2B gamma izoformáját kódoló CnA gamma. FACS-al elvégzett hatékonyságvizsgálat szerint a sejtek 25%-a transzfektálódott sikeresen. Ugyanakkor az overexpresszió ténye nem emelte meg az apoptotikus sejtek számát, csak 1%-os vagy az alatti elhanyagolható korai sejthalálra utaló jelet detektáltunk. A PP2B túltermelődése nem csökkentette, sőt inkább növelni látszik a sejtek életképességét. Ezzel ellentétben a sejtek proliferációs képessége

20-30%-ra esett vissza. A 6. napon észlelhető metakromáziásan festődő ECM jelentősen visszaszorult. A két vektor jelentős különbségük ellenére is hasonló hatást okozott, 60%-os csökkenést eredményezett. A GFP-t tartalmazó üres vektorhoz képest a folyamatosan aktív konstrukt transzfektálása 50-60%-os, míg a CnA gamma bejuttatása 30-40%-os kalcineurin mRNS expresszió növekedést okozott. Érdekes az a tény, hogy a bevitt konstruktok által kódolt módosított fehérjék mellett a sejtek alap PP2B expressziója is megemelkedett. Az össz-kalcineurin, így CnA delta esetében 5x-ös míg a CnA gamma esetében közel 8x-os emelkedést eredményezett. A CnA delta konstitutíve aktív formája, a vártnak megfelelően szignifikáns módon megemelte a sejtpopuláció PP2B aktivitását, míg CnA gamma aktivitása a kontrollal megegyező értéket mutatott. A PP2B egyes formáinak túltermelődése a kondrogenezist szabályozó transzkripciós faktor Sox9 mRNS expresszióját alig detektálható módon csökkentette, ugyanakkor fehérjeexpressziója erőteljesen visszaesett. A Sox9 foszforilációjában a CnA delta 30%-os, míg a CnA gamma közel 70%-os csökkenést eredményezett. Az ECM alkotó aggregátum mRNS expressziója mindkét PP2B vektor működése következtében mintegy 40%-kal volt alacsonyabb.

További kísérleteink során PP2B shRNS-t kódoló konstruktot használtunk, mely egy GFP-vel nem jelölt indukálható promóterű GeneSwitch rendszerbe volt klónozva. Kontrollnak Lipofectamin 2000-rel, üres pGene/V5HisA vektorral transzfektált sejteket tekintettük. A transzfekció sikerességét RT-PCR-rel ellenőriztük, ami szerint kb. 50% csendesítési hatékonysággal számolhattunk. A PP2B fehérjeexpressziója olyan mértékű csökkenést mutatott, hogy alkalmanként a fehérje egyáltalán nem volt detektálható. A PP2B enzimaktivitási assay-kben a Lipofectamin 2000-rel kezelt sejtekben aktivitásfokozódást detektáltunk, de ezt az „üres” vektor alkalmazása újra a kontroll szintre csökkentette. Az shRNS alkalmazása a pGene/V5HisA-hoz képest kismértékű, de szignifikáns enzimaktivitás csökkenést

eredményezett. A keletkezett porc metakromatikus területeit a pGene/V5HisA jelenléte önmagában is jelentős mértékben, mintegy 70-80%-kal csökkentette, a PP2B shRNS alkalmazása a metakromázia szinte teljes eltűnéséhez vezetett. A pGene/V5HisA vektor önmagában erős mitokondriális aktivitáscsökkenést okozott, azonban az shRNS jelenléte a kontrollhoz képest kismértékű emelkedést mutatott. A sejtek osztódási rátája a PP2B shRNS-sel transzfektált kultúrák esetében az üres vektorhoz képest szignifikánsan, közel 50%-kal emelkedett. Az aggregán mRNA expressziója átlagosan 70%-kal csökkent, míg a Sox9 30%-os expresszióvisszaesést mutatott. A Sox9 és pSox9 fehérjeexpressziója alkalmanként detektálhatatlan volt.

A PKC δ vizsgálata a porcdifferenciáció során

A PKC δ mRNA expressziója megközelítőleg azonos szintű volt a tenyésztés különböző napjain vizsgálva. A fehérjeexpressziós profil egy ettől kissé eltérő mintázatot mutatott: elég erőteljes expressziós csúcsot figyelhettünk meg az 1., 2. és 3. tenyésztési napokon, majd a tenyésztés vége felé csökkenő tendenciát mutat. Kontroll körülmények között a fehérjeprofilhoz képest egy nappal eltolva, egy igen hasonló enzim-aktivitási mintázatot detektáltunk.

A rottlerint 5 μ M koncentrációját irodalmi adatok PKC δ -specifikusnak tekintik, A rottlerin csökkentette a porcképződést, nagymértékű porcképződés csökkenést tapasztaltunk a tenyésztés 2. és 3. napján alkalmazott farmakológiai gátlást követően. Ezekben az esetekben 11 és 12%-ra csökkent a metakromáziásan festődő porcterületek nagysága a kontrollcsoportéhoz képest. A sejtek mitokondriális aktivitása és osztódási képessége szignifikánsan csökkent a gátlószer hatására, ugyanakkor az inhibitor alkalmazása nem járt sem nekrotikus sem apoptotikus folyamatok beindításával. Az aggregán tengelyfehérje és a Sox9 mRNA expressziója is szignifikánsan csökkent a gátlószer hatására következtében. A Sox9 fehérje expressziója azonban csak kis mértékben, míg annak foszforilált formájának jelenléte igen drámaian redukálódott.

Az ERK1/2 a MAPK rendszer egyik kondrogenezis szempontjából fontos tagja, mely nélkül a porcdifferenciációs folyamatok zavart szenvednek. mRNS és protein expressziója nem változik rottlerin kezelés hatására, viszont a kettősen foszforilált ERK1/2 jelenléte, mely az enzim aktivitásával arányos, jelentősen visszaesik az inhibitor alkalmazása során.

A rottlerinrel végzett kísérletek talán legérdekesebb eredménye a gátlószerral kezelt kultúrák PKC enzimaktivitás mérései során született. Több, egymástól független kísérletben sem sikerült konzekvens PKC δ -specifikus enzimaktivitás csökkenést detektálnunk. Ugyanakkor a rottlerin az enzimaktivitásmérések során jó PKC δ gátlószernek bizonyult.

Mivel a rottlerin alkalmazása nem adott egyértelmű magyarázatot a PKC δ porcdifferenciációban betöltött szerepére, ezért az enzim expressziójának shRNS-sel történő gátlásával kerestük a választ. A PKC δ shRNS-t kódoló konstruktot az előzőekkel megegyező rendszerben használtuk. Kontrollként Lipofectamin 2000-rel és „üres” pGene/V5HisA vektorral transzfektált sejteket alkalmaztunk. Az shRNS indukciója a tenyésztés 6. befejező napjára csupán 5%-os porc jelenlétét eredményezte. A porcosodó sejtek életképességét MTT-tesztel megvizsgálva sem az „üres” pGene/V5HisA vektor sem a PKC δ shRNS kódoló vektor transzfekciója nem befolyásolta a sejtek mitokondriális aktivitását. A farmakológiai gátlással ellentétben az shRNS-sel történő PKC δ gátlás nem vezetett proliferáció csökkenéshez. Méréseink szerint az „üres” pGene/V5HisA vektor sem apoptózist, sem nekrozist nem indukál. A PKC δ shRNS kismértékű, mintegy 2%-os apoptózist és esetenként 1%-os nekrozist eredményezett.

Az shRNS transzfekció sikerességét jelezte, hogy a PKC δ mRNS-ének expressziója a kontroll 70-80%-ra csökkent. A fehérjeexpresszió ennél jóval nagyobb mértékben, a kontroll mintegy 20-30%-ára csökkent a tenyésztés 3. napján. Az enzim aktivitása is tükrözte a fehérjeexpressziós változásokat, mely szerint a PKC δ shRNS alkalmazása a kontrollhoz képest 75%-kal csökkentette

az aktív kináz jelenlétét. Ezen aktivitáscsökkenés azonban a rottlerin gátláshoz hasonlóan ebben az esetben sem volt számottevő hatással a porcspecifikus aggregán és Sox9 mRNS expressziójára. A fehérjeexpressziós változások megegyező képet mutatnak a farmakológiai gátlás hatásaival, hiszen a Sox9 fehérjeexpressziója és foszforilált formájának jelenléte drámaian visszaesett.

Az ERK1/2 mRNS és fehérjeexpressziója hasonlóan az inhibitor hatásaihoz, nem változott a géncsendesítés alkalmazása során, ugyanakkor az ERK1/2 foszforilációs szintje a kontroll kétszeresére emelkedett.

Az NMDA receptor hiányának hatása a porcképződés mértékére

Az NR1 siRNS-t kódoló szekvenciát a Dharmacom siRNS könyvtárából rendeltük. A transzfekciós hatékonyságot az NR1 alegység mRNS-ének detektálásával végeztük, és megállapítottuk, hogy a géncsendesítés közel 80%-os mRNS csökkenést eredményezett, és az NR1 alegység fehérjeexpressziójának ellenőrzése is hasonló képet tárt szemünk elé. Az NMDA receptor hiánya a 6. tenyésztési napra 80-90%-os metakromatikus festődéscsökkenést okozott, bár a DharmaFect önmagában történő alkalmazása is 30-40%-kal csökkentette a metakromáziát adó ECM mennyiségét. Az siRNS esetleges citotoxicitását MTT teszttel vizsgáltuk és nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az egyes kísérleti csoportok sejteinek mitokondriális aktivitása között. Trícilált timidin a sejtek DNS-ébe való beépülését detektálva 30-40%-os osztódóképesség redukció figyelhető meg. A porcdifferenciáció kulcsfontosságú faktorainak vizsgálata szerint, mind az aggregán és mind a Sox9 mRNS expressziója jelentős mértékben visszaesett csakúgy, mint a Sox9 fehérjeexpresszió is, azonban az NMDA receptor hiánya nincs hatással a Sox9 foszforilációjára. Az NR1 alegység mRNS expressziójának gátlása közben a 2. tenyésztési napon megvizsgáltuk a sejteken detektálható spontán Ca^{2+} oszcillációk tulajdonságait. Az siRNS hatásának következményeképpen, a kontroll sejtekhez képest, a Ca^{2+}

oszcillációk jelenléte szinte teljesen eltűnik, csupán a populáció mindössze 10%-ban detektálható.

Megbeszélés

A HD-kultúrák transzfekeciójának optimalizálása

A primer porcosodó sejttenyészetek minimális beavatkozásra is igen érzékenyen válaszolnak, ezért nehéz feladat a sejtek nagy százalékát célzottan transzfekektálni olyan módon, hogy a lehető legkisebb citotoxicitást okozzuk és a transzfekeció elég hatékony legyen ahhoz, hogy a túltermeltetett fehérje hatását populációs szinten vizsgálhassuk. Kimutattuk, hogy a széles körben használt elektroporációs technika ugyan a legmagasabb transzfekeciós hatékonyságot éri el, azonban a feszültség hatására a membránon valószínűleg kialakuló mikrosérülések olyan mértékű apoptózist, életképességcsökkenést eredményeztek, hogy a kicseppentett kondrogenikus sejtek sűrűsége a porcképződéshez szükséges kritikus küszöbérték alá csökkent. A HD-kultúrák differenciációja során három eltérő lipofekciós eljárást teszteltünk; Lipofectamin 2000, DMRIE és SuperFect reagenseket. A SuperFect esetében a kitapadt kultúrák két nap alatt felúsztak a tenyésztő médiumba. A DMRIE transzfekeciós reagens hatékonysága elmaradt a populáció szintű vizsgálatok értékelhetőségéhez képest. A Lipofectamin 2000 viszonylag jó transzfekeciós hatékonysággal és alacsony apoptotikus hatással működött, valamint a porcspecifikus markerek expresszióját sem mRNS sem fehérje szinten nem változtatta meg. Eredményeink azt mutatják, hogy ezen módszer alkalmas transzfekeciós eljárás lehet a mezenchimális sejteken, ugyanakkor a nagyobb méretű plazmidok bejuttatása és egy egyszerű GFP expresszió már porccsökkentő hatású lehet. A Saint Mix-szel HD-kultúrák esetében a populáció mintegy 50%-át sikeresen transzfekektáltuk anélkül, hogy lényeges mennyiségű apoptózis detektáltunk volna. A porcdifferenciációs marker mRNS és fehérjeexpressziója szinte teljes mértékben változatlan maradt. Munkánk során

igazoltuk, hogy a legtöbb transzfekciós módszer káros hatással van a porcdifferenciációra. Eredményeink arra utalnak, hogy a populáció szintű vizsgálatok eléréshez elegendő a kondrogenikus sejtek 50%-nak sikeres transzfekciója, valamint a GFP, mint jelentős mennyiségben termelt idegen fehérje, valószínűleg megbontja a differenciálódó sejtek metabolikus egyensúlyát, így rontja a differenciáció hatékonyságát. Az itt felsorolt adatok alapján kísérleti rendszerünkben a Saint Mix és a Lipofectamin 2000 tűnt a legalkalmasabb módszernek és ezeket választottuk a későbbi kísérleteinkhez.

A PP2B túltermelésének és géncsendesítésének hatása a porcdifferenciációra

Két eltérő vektor bejuttatásával kívántuk vizsgálni a PP2B pontos feladatát. A CnA delta és gamma expressziója érdekes eredményeket tárt elénk, hiszen a RT-PCR és Western blot eredményeink alapján is a nagy kópiaszámban jelenlévő enzim megemelte a PP2B bazális expresszióját. Méréseink szerint, csak a CnA delta bevitele járt aktivitásemelkedéssel, míg a CnA gamma-t expresszáló sejtcsoportok enzimaktivitása nem változott a kontroll csoportokhoz képest. A PP2B overexpressziója nagymértékben porcképződés csökkentő hatású volt. Ennek egyik oka lehet, hogy a sejtosztódás erőteljesen visszaesett, valamint a Sox9 és P-Sox9 expressziója is nagymértékben csökkent. Érdekes kérdés lehet, hogy vajon a PP2B ilyen magas fokú jelenléte miért indukálja e folyamatokat. Más kísérleti rendszerben már igazolták, hogy a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció fokozott PP2B aktivitást eredményez, a mi rendszerünkben a nagymértékű kalcineurin aktivitás megváltoztathatta más Ca^{2+} - és kalcineurin-regulált jelátviteli útvonalak aktivitását, amely a differenciációt negatív irányba toltta el. Ugyanakkor a PP2B a sejtek katabolikus és anabolikus egyensúlyát is fenntartja, így a PP2B túltermeltetés eredményeként ennek felborulása is hozzájárulhat a porcképződés hatékonyságának csökkenéséhez. Minthogy a GFP termelés önmagában is megzavarta a porcképződést, így a PP2B nagy mennyiségben történő bioszintézise (függetlenül az enzim jelátviteli szerepétől),

járhat olyan energiadeplációval, amely szintén szerepet játszhat a porcképződés csökkenésében.

A PP2B sh-RNS-sel történő géncsendesítésének hatása az RT-PCR vizsgálatokkal megállapított közel 50%-os mRNS csökkenés és a fehérjexpressziós szinten teljesen eltűnő PP2B-nek köszönhetően populáció szinten is vizsgálhatóvá vált. Az shRNS alkalmazásának hatására a porcképződés detektálása alkalmanként lehetetlenné vált, ugyanakkor a PP2B alapaktivitása csak kis mértékben csökkent. A proliferációs vizsgálatok arra utalnak, hogy a PP2B aktivitásának emelkedése a porcosodó HD-kultúrában az osztódás csökkenéséhez, míg a PP2B gátlás a proliferációs ráta emelkedéséhez vezetett. Tehát a PP2B-nek mindenképpen szabályozó szerepe lehet a sejtosztódás befolyásolásában, akár pl. a MAPK útvonal egyes tagjainak defoszforilálásán keresztül. Eredményeink azt tükrözik, hogy a porcdifferenciáció folyamataiban a PP2B szerepe igen sokrétű és fokozott aktivitása, illetve hiánya egyaránt megzavarhatja a differenciációs lépéseket. Fontos megemlíteni, hogy további bizonyítékokkal szolgáltunk arra nézve, hogy a kalcineurin negatívan befolyásolja a kondrogenikus sejtek osztódási képességeit, és a mitokondriális aktivitásra is hatással lehet.

A PKC δ expressziója és gátlásának hatása a kondrogenikus kultúrákban

Az már régóta ismert tény, hogy az egyes PKC izoenzimek fontos szerepet játszanak az ízületi porc megfelelő kialakulásában, szerepüket az általunk is használt HD-kultúrákban többen is tanulmányozták. Mai tudásunk szerint a PKC δ -nak nélkülözhetetlen szerepe van a prekondrogenikus nodulus formálódásában. Saját kísérleteinkben kimutattuk a PKC δ jelenlétét a tenyésztés valamennyi napján, sőt expressziójának és aktivitásának a differenciációval összefüggő mintázatát láttuk. Az enzim expressziója ugyanis a differenciáció napjain magas csúcst mutatott, míg a differenciáció vége felé csökkenő tendenciával volt jelen, valamint a legmagasabb aktivitással a 2. és 3. tenyésztési

napon detektálható az enzim. Ez utóbbi két eredmény arra utal, hogy a PKC δ jelenléte és aktivitása elsősorban a HD-kultúrák differenciációs folyamatainak irányításában vesz részt.

A PKC δ negatív vagy pozitív szerepének vizsgálatára a HD-kultúrákban, az irodalomban még manapság is specifikus farmakológiai inhibitorként ismert, rottlerin alkalmazták. A gátlószer alkalmazása idő és koncentrációfüggő módon csökkentette a porc ECM termelésének mennyiségét. Ez az eredmény tökéletesen párhuzamba állítható Choi és munkatársai által végzett kísérletek következtetéseivel. A rottlerin hatására a sejtek életképessége és osztódóképessége szignifikánsan csökkent. Ez utóbbi megfigyelések egyik oka lehet, hogy a rottlerinnek bizonyítottan antiproliferatív hatásai is vannak. A rottlerin alkalmazása azonban semmilyen koncentrációban sem okozott apoptózist vagy nekrozist a differenciálódó porcsejtek esetében, holott a PKC δ -t, mint a mitokondriumokból kiinduló apoptózis egyik regulátorának tekintik. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a csirke kondrogenikus sejtek mitokondriumai kevésbé érzékenyek az inhibitor alkalmazására, vagy a PKC δ ezen szerepe ebben a rendszerben elhanyagolható. Az ERK útvonal jól ismert proliferáció-, differenciáció-szabályozó szereppel bír az eukarióta sejtek életfolyamataiban. A mi kísérleti rendszerünkben rottlerin hatására sem az mRNS, sem a protein expressziója nem változott az ERK1/2-nek, de a gátlószer hatására az ERK1/2 kettősen foszforilált formája erőteljesen csökkent. Mivel a rottlerinrel kezelt HD-kultúrákból készült mintákban végzett PKC enzimaktivitás mérések nem támasztották alá a rottlerin PKC δ -gátló hatását, így más kísérleti rendszerekben nyert irodalmi adatok által is megerősítve úgy gondoljuk, hogy a rottlerin más úton, pl. az ERK1/2 foszforilációjának módosításával (véltetően aktiválásával) fejt ki porcképződést csökkentő hatását.

Mivel a rottlerin hatása nem tűnt PKC δ -specifikusnak, ezért a PKC δ shRNS-sel történő géncsendesítést alkalmaztunk a PKC δ porcdifferenciációban

betöltött szerepének tisztázására. A PKC δ shRNS majdnem teljes mértékben blokkolta az *in vivo* porcképződést. Ugyanakkor nem indukált apoptózist és/vagy nekrozist, valamint a kondrogenikus sejtek életképessége és proliferációja sem változott. A farmakológiai gátláshoz hasonlóan sem az mRNS és sem a fehérjeexpressziója nem változik az ERK1/2-nek, azonban a kettősen foszforilált forma jelenléte kétszeres emelkedést mutat a PKC δ hiányában. Az ERK1/2 fokozott aktivitás azonban egy másik olyan tényező lehet, amely a PKC δ shRNS hatására bekövetkező majdnem teljes porcképződésgátláshoz vezetett. Az irodalomban számos adat van arról, hogy különböző differenciációs rendszerekben a PKC δ gátlása eltérő hatással lehet a MEK-ERK1/2 útvonalra, ugyanakkor általánosságban véve a PKC δ -t, mint negatív regulátorát említik.

Az NMDA receptorok hiánya a Ca²⁺-oszillációk nagyfokú redukciójához vezet

Mai tudásunk szerint a sejtek normális életfolyamataihoz a Ca²⁺-ionok jelenléte nélkülözhetetlen, hiszen a Ca²⁺-ion egyike a legalapvetőbb és legelterjedtebb másodlagos hírvivőknek, és a sejtek szinte valamennyi jelátviteli folyamatának induktoraként tekinthető. A külső téréből származó Ca²⁺-ionok különböző kationcsatornákon kerülhetnek a sejtek belső terébe. Az utóbbi néhány évben került azonosításra az NMDA receptorok jelenléte porcsejteken is, azonban funkciójuk még nem egészen tisztázott. Kísérleteink során az NR1 alegység géncsendesítéssel történő gátlását valósítottuk meg, ezáltal a teljes receptor összeszerelődését gátoltuk. A transzfekció hatékonyságát NR1 RT-PCR-rel és Western blot-tal ítéltük meg, miszerint az siRNS 80-90%-os géncsendesítést ért el. Az NMDA receptorok az idegsejtekben fontos szerepet játszanak Ca²⁺-tranziensek kialakulásában. A differenciálódó porcsejtekben az NR1 alegység igen alacsony szintű expressziója a HD-kultúrák sejtjeiben normálisan megfigyelt nagy frekvenciájú spontán Ca²⁺-oszillációk szinte teljes eltűnéséhez vezetett. Egyúttal a porcdifferenciáció szinte teljes hiányát tapasztaltuk anélkül, hogy a sejtek életképessége jelentősen változott volna, azonban a sejtek osztódóképessége nagymértékben visszaesett az NR1

géncsendesítés következtében. A jelenség hátterének feltárása további kísérleteket igényel. Mindemellett megfigyeltük, hogy a porcképződés markereinek tekintett Sox9 és aggregán mRNA expressziója és a Sox9 protein expressziója is szignifikánsan visszaesett, ugyanakkor a Sox9 foszforilációja alig változott. A Sox9 foszforilációjáért irodalmi adatok szerint a PKA felelős, mely aktivációjához Ca^{2+} -ionok jelenléte is szükséges. Laboratóriumunk korábbi kísérleti eredményei szerint a PKA aktivitása elengedhetetlen a megfelelő porcdifferenciációhoz, ugyanakkor arra nincsenek adatok, hogy a Sox9 foszforilációja kapcsolódik-e kalciumdependens útvonalakhoz.

Eredményeink azt sugallják, hogy az NMDA receptorok jelenléte nélkülözhetetlen eleme a porcsejtek differenciációs folyamatainak és a porcsejtekben detektálható Ca^{2+} -oszcillációkért legalábbis részben ezen csatornák a felelősek.

Összefoglalás

A doktori értekezésben bemutatott munka során a porcosodó mezenchimális kultúrák tranziens transzfekciós lehetőségeit tanulmányoztuk, majd az optimalizálást követően három eltérő konstrukt bevitelét tűztük ki célul és a porcdifferenciációban betöltött szerepeit vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a HD- kultúrák tranziens transzfekciójának eredményessége függ a transzfekciós reagens hatásmechanizmusától, és a bejuttatni kívánt konstruktok méretétől. A nagyméretű plazmidok bejuttatására a Saint Mix reagens a legalkalmasabb, míg a kisebb méretű shRNS bejuttatására a Lipofectamin 2000 a legmegfelelőbb. Az siRNS transzfekciójára speciális DharmaFect szükséges.

A kalcineurin aktivitásának overexpresszión keresztül történő megemlése jelentős mértékben porcképződés csökkentő hatású, mely többek között a jelentős osztódóképesség csökkenésnek köszönhető. A PP2B indukálható promóterű vektorba klónozott shRNS-sel történő specifikus gátlása is a metakromáziás porcterületek csökkenéséhez vezetett, de a sejtek

osztódóképességét megemelte, tehát a calcineurin a kondrogenikus sejtek osztódásának negatív regulátora.

További kísérleteinkben igazoltuk, hogy a PKC δ rottlerinnel történő gátlása, csökkent porcképződéshez vezet, valamint a PKC δ shRNS-al történő gátlása is a porcképződés redukálását eredményezi. Ugyanakkor az inhibitor HD-kultúrákban történő adagolása valószínűleg nem specifikusan a PKC δ gátlásán keresztül fejt ki hatását, mivel a rottlerin az ERK foszforilációját csökkenti, míg ezzel ellentétesen a specifikus géncsendesítés a foszforilációs szint emelkedését okozza. Eredményeink alapján a PKC δ a porcképződést pozitívan befolyásolja, valószínűleg az ERK1/2 aktivitás csökkentése révén.

Az NMDA receptor NR1 alegységének géncsendesítése blokkolta a porcképződést és csökkentette a Ca²⁺-oszcillációt mutató sejtek számát, ami a receptor Ca²⁺-homeosztázisban betöltött elengedhetetlen szerepét feltételezi. Hiánya valószínűleg megzavarja a kalciumszenzitív jelátviteli folyamatokat és ez, legalábbis részben vezethet a csökkent porcképződéshez.

Közlemények listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Tamás Juhász, Csaba Matta, Zoltán Mészár, Georgina Nagy, Zsolt Szíjgyártó, Zsanett Molnár, Bernadett Kolozsvári, Éva Bakó and Róza Zákány (2010). Optimized transient transfection of chondrogenic primary cell cultures CEJB 5:572-584.
IF: 0,915 (2009-es adat)

Csaba Matta*, Tamás Juhász*, Zsolt Szíjgyártó, Bernadett Kolozsvári, Georgina Nagy, Pál Gergely and Róza Zákány (2010). PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures Biochimie [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.biochi.2010.09.005.

IF: 3,897 (2009-es adat)

*: megosztott elsőszervezők

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

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

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

Matta C*, Fodor J*, Szíjgyártó Zs, Juhász T, Gergely P, Csernoch L, Zákány R: Cytosolic free Ca²⁺ concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium* 2008, 44(3):310–23.

Juhász T, Matta C, Veress G, Nagy G, Szíjgyártó Z, Molnár Z, Fodor J, Zákány R, Gergely P: Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35. *Int J Onc* 2009 Apr; 34(4):995-1003.

Fodor J*, Matta C*, Juhász T, Oláh T, Gönczi M, Sziógyártó Z, Gergely P, Csernoch L, Zákány R: Ionotropic Purinergic Receptor P2X₄ is Involved in the Regulation of Chondrogenesis in Chicken Micromass Cell Cultures. *Cell Calcium* 2009 May;45(5):421-30.

Trencsényi Gy, Juhász T, Bako F, Marian T, Pócsi I, Kertai P, Hunyadi J, Bánfalvi G: Comparison of the tumorigenic potential of liver and kidney tumors induced by N-nitrosodimethylamine. *Histol Histopathol.* 2010 Mar;25(3):309-20.

Tudományos mutatók:

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 4,812

Kumulatív impakt faktor: 24,42

Független citációk száma: 9

Idézhető kongresszusi absztrakt:

T Juhász, Cs Matta, Z Sziógyártó, K Szűcs, G Czifra, L Módis, P Gergely and R Zákány: *The Role of Calcineurin in the Inhibitory Effect of Oxidative Stress on Cartilage Formation* Tissue Antigens vol. 64 (2004) 435-436

Cs Matta, T Juhász, Z Sziógyártó, K Szűcs, G Czifra, L Módis, P Gergely and R Zákány: *Protein Kinase C Isoenzymes Regulate Chondrogenesis of Mesenchymes* Tissue Antigens vol.64 (2004) 435

Cs Matta, T Juhász, Z Sziógyártó, G Czifra, T Bíró, R Zákány, L Módis and P Gergely: *The role of protein kinase C isoenzymes in chondrogenesis of micromass cell cultures* 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, (2005) 272: 310.

T Juhász, Z Sziógyártó, C Matta, G Czifra, T Bíró, R Zákány, L Módis and P Gergely: *Calcineurin regulates chondrogenesis via the modulation of ERK1/2 activity* 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, (2005) 272: 310.

T Juhász, Cs Matta, R Sütő, K Körmendi, Cs Somogyi, Zs Molnár, P Gergely, R Zákány: *Hyaluronic acid synthesis and hyaluronic acid guided migration of HT168 and WM35 human melanoma cell lines are modified by ERK1/2 and calcineurin* Pigment Cell and Melanoma Research vol.22 (2009) 688

R Zákány, T Juhász, Cs Matta, J Fodor, L Csernoch, P Gergely: *Nuclear envelop associated NMDA receptors in HT168 human melanoma cell line* Pigment Cell and Melanoma Research vol.22 (2009) 687

A Sebe, Gy Panyi, R Zakany, T Juhasz, Cs Matta, Z Varga: *The Role of Ion Channels in Differentiating Chondrocytes*. Biophysical Journal, (February 2009), Volume 96, Issue 3, Supplement 1, Page 670, 3458-Pos

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások:

- Juhász Tamás, Matta Csaba, Mészár Zoltán, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *A porcosodó high density mezenchimális kultúrák transzfekciós lehetőségei XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, (2005)*
- Zákány Róza, Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál: *Kalcium-érzékeny jelátviteli útvonalak az in vitro porcképződés szabályozásában A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, (2006)*
- Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Deli Tamás, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az intracelluláris Ca-koncentráció változásai az in vitro porcdifferenciáció során A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, (2006)*
- Juhász Tamás, Matta Csaba, Mészár Zoltán, Nagy Georgina, Hajas György, Szíjgyártó Zsolt, Dobrosi Nóra, Czifra Gabriella, Karácsonyi Zoltán, Bíró Tamás, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Primer porcosodó sejt-kultúrák tranziens transzfekciójának optimalizálása A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, (2006)*
- Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az in vitro porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris Az in vitro porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris Ca²⁺-koncentráció-változások 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, (2008)*
- Juhász Tamás, Szentesiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Fodor János, Pál Balázs, Kőszegi Áron, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az NMDA receptorok szerepe a differenciálódó porcsejtek Ca²⁺ háztartásában Magyar Anatómus Társaság XV. Kongresszusa, Budapest, (2009)*

Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek:

- Matta Csaba, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Zákány Róza, Módis László, Gergely Pál: *A PKC μ szerepe a kondrogenézis szabályozásában XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, (2004)*

- Matta Csaba, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Szűcs Kornélia, Czifra Gabriella, Zákány Róza, Módis László, Gergely Pál: *A PKC-izoenzimek szerepe az in vitro porcdifferenciálódás szabályozásában* A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály IX. Munkaértekezlete, Sopron, (2004)
- Juhász Tamás, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Szűcs Kornélia, Czifra Gabriella, Zákány Róza, Módis László, Gergely Pál: *A PP2B szerepe az oxidatív stressz porcképződést gátló hatásának kialakulásában* A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály IX. Munkaértekezlete, Sopron, (2004)
- Szíjgyártó Zsolt, Szűcs Kornélia, Csontos Csilla, Bakó Éva, Czifra Gabriella, Bíró Tamás, Zákány Róza, Matta Csaba, Juhász Tamás, Módis László, Gergely Pál: *Protein-kinázok és foszfatázok szerepe az in vitro porcdifferenciációban* A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály IX. Munkaértekezlete, Sopron, (2004)
- Juhász Tamás, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *A calcineurin befolyásolja az ERK1/2 foszforilációs állapotát az in vitro porcképződés során* MAT XIII. Kongresszusa, Pécs, (2005)
- Juhász Tamás, Matta Csaba, Mészár Zoltán, Szíjgyártó Zsolt, Dobrosi Nóra, Czifra Gabriella, Bíró Tamás, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *A tranziens transzfekeció hatása a high density mezenchimális sejt kultúrákban zajló porcdifferenciációra* Sejtanalitikai Konferencia Budapest, (2006)
- Juhász Tamás, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Gergely Pál és Zákány Róza: *A PKC delta szerepe az in vitro porcdifferenciációban* XIV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, (2007)
- Sebe Attila, Panyi György, Zákány Róza, Juhász Tamás, Matta Csaba, Varga Zoltán: *Ioncsatornák szerepe differenciálódó porcsejteken* 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, (2008)
- Juhász Tamás, Szentesiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Fodor János, Karácsonyi Zoltán, Csernoch László, Zákány Róza: *NMDA-receptorok a differenciálódó porcsejteken* A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen, (2008)
- Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásainak vizsgálata az in vitro porcdifferenciáció során* A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen (2008)

- Juhász Tamás, Szentesiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Fodor János, Pál Balázs, Kőszegi Áron, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *NMDA receptorok jelenléte a porcdifferenciáció során* 39. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, (2009)
- Csaba Matta, János Fodor, Tamás Juhász, László Csernoch, Pál Gergely, Róza Zákány: Insights into the Ca²⁺ homeostasis of chicken high density mesenchymal cell cultures Cartilage Biology and Pathology – Gordon Research Conference, Les Diablerets, Switzerland, (2009)
- Csaba Matta, János Fodor, Tamás Juhász, László Csernoch, Pál Gergely and Róza Zákány: Plasmamembrane cation channels and cytosolic Ca²⁺-homeostasis of differentiating chicken chondrocytes XXIIInd FECTS Meeting, Davos, Switzerland, (2010)