

***Foszfo-Ser/Thr-specifikus fehérje
foszfatázok szerepe az in vitro
porcdifferenciáció
szabályozásában***

Ph.D. (egyetemi doktori) értekezés

DR. ZÁKÁNY RÓZA

Témavezető: Dr. Módis László

**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézet**

2001

TARTALOMJEGYZÉK

A GYAKRABBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
1.1 A porcszövetről általában.....	5
1.2. Porcdifferenciációs modellek.....	7
1.3. A porcdifferenciáció lépései, a fontosabb extracelluláris szabályozó tényezők.....	8
1.4. Összehangolt intracelluláris történések irányítják a kondrogenezist.....	10
1.5. A fehérje foszforilációs folyamatokról általában.....	10
1.6. Protein kinázok.....	11
1.7. Foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok.....	14
1.8. Az okadainsavas gátlás, mint hatékony módszer a foszfatázok tanulmányozásában.....	16
1.9. Ser/Thr-specifikus foszforiláció jelentősége a porcdifferenciációban.....	17
2. CÉLKITŰZÉSEK	19
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
3.1. Sejtenyésztés.....	20
3.2. Protein foszfatáz aktivitás gátlása okadainsavval.....	20
3.3. Protein kináz A gátlása H89 inhibitorral.....	21
3.4. Fénymikroszkópos szerkezet vizsgálata és képanalízis.....	21
3.5. Aktin mikrofilamentumok jelölése TRITC-falloidinnel.....	22
3.6. Elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok.....	22
3.7. Kollagén- és proteoglikán minták preparálása.....	23
3.8. Agaróz-poliakrilamid kompozit és SDS-poliakrilamid gélek, Western blotok.....	23
3.9. Enzimaktivitás mérések.....	24
3.10. PKA α -katalitikus alegység, valamint CREB és P-CREB mennyiségének vizsgálata immunoblottal.....	24
3.11. A sejtproliferáció vizsgálata ^3H -timidin-beépülés mérésével, valamint BrdUrd-inkorporáció változásainak vizsgálatával.....	25
4. EREDMÉNYEK	27
4.1. Fénymikroszkópos morfológia az OA-kezelések után.....	27
4.2. A porcmatrix elektronmikroszkópos morfológiai és biokémiai elemzése.....	29
4.4. A H89-kezelés hatásai a porcdifferenciációra.....	36

4.5. A PKA aktivitás változásai a kontroll és a H89-kezelt kultúrákban.....	38
4.6. PKA α -katalitikus alegység (PKA-C α) mennyiségének változása.....	40
4.7. A CREB és P-CREB mennyiségének változásai a különböző életkorú kezeletlen, valamint OA- és H89-kezelt kultúrákban.....	41
4.8. A sejtosztódás változásainak vizsgálata.....	42
5. MEGBESZÉLÉS	44
6. ÖSSZEFOGLALÁS	49
7. SUMMARY	50
8. UTÓSZÓ ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	51
9. IRODALOMJEGYZÉK	53
9.1. Hivatkozott közlemények.....	53
9.2. Saját közlemények.....	60
10. FÜGGELÉK	61

A GYAKRABBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- AER:** apical ectodermal ridge
BMP: bone morphogenetic protein
cAMP: adenzin-3',5'-monofoszfát, ciklikus AMP
CB: kuprolinkék
CREB: cAMP respond element binding protein
DMMK: dimetilmetilénkék
ECM: extracelluláris matrix
FGF: fibroblast growth factor
HD-kultúrák: high density-kultúrák
HMG: high mobility group
OA: okadainsav
PG: proteoglikán
PGE: prosztaglandin E
PKA: cAMP-dependens protein kináz
PKA-C α : PKA α -katalitikus alegység
PKC: protein kináz C
PP: protein foszfátáz
PP1: protein foszfátáz 1
PP2A: protein foszfátáz 2A
Ser: szerin
TGF: transforming growth factor
Thr: treonin
Tyr: tirozin
ZPA: zone of polarizing activity

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 A porcszövevről általában

A porcszövet a kötő- és támasztószövet féleségek közé tartozó szövet. Sejtjei jelentős mennyiségű, speciális összetételű és szerkezetű extracelluláris matrixba (ECM) ágyazott, jellegzetesen kerekded kondrociták, melyeknek egyik jellemző sajátossága, hogy fenotípusuk fenntartásához a speciális ECM molekulákkal való kapcsolat megléte szükséges.

A porcszövetet hagyományosan három nagy csoportba soroljuk: hialinporc (üvegporc), elasztikus porc és rostos porc. Az elkülönítést makroszkópos és mikroszkópos morfológiai sajátságok, a porcsejtek alaki és funkcionális, valamint az ECM szerkezeti és biomechanikai eltérései indokolják. Jelen értekezés tárgya a hialinporc, mely szövet három, funkcionális szempontból alapvetően különböző megjelenési formában van jelen az állati szervezetben, úgymint ízületi porc, az egyes zsigerek (gége, légcső, bronchusok) vázát adó, úgynevezett állandósult porc, valamint az enchondralis csontosodással kialakuló csontok alakjának sablonjául szolgáló porcok, melyek egy része az egyed növekedése során, mint epifízis porc megmarad. Mindhárom megjelenési formának közös sajátossága a különböző, porcspecifikus ECM makromolekulák jelenléte. Ezen makromolekulák a II., IX., X. és XI. típusú kollagének, az aggregáló porcproteoglikán az aggregán, az aggregánt a hialuronsavhoz rögzítő kötőfehérje, a „cartilage matrix protein” (CMP), mai nevén matrilin-1, valamint a „cartilage oligomeric matrix protein” (COMP). Mellettük más, egyéb kötőszövetféleségben is előforduló matrix komponensek is fellelhetők a hialinporc alapállományában, de ezek a molekulák a hialuronsav, valamint egyes kis proteoglikánok (biglikán, dekorin, fibromodulin) kivételével az előbb említettekhez képest igen kis mennyiségben vannak jelen (Heinegård és Oldberg, 1989).

A kondrociták a porcmatrixban úgynevezett lakúnákban foglalnak helyet, a szomszédos porcsejtek néhány sejtéből álló csoportokat alkotnak. A matrix és a kondrociták kapcsolata a pericelluláris matrixban levő makromolekulák révén valósul meg. Itt igen nagy koncentrációban vannak jelen proteoglikánok, jellegzetesen erősen bazofil festődésű porctokként megjelenve a közönséges fénymikroszkópos készítményeken. A porcmatrix makromolekulái a porcsejtcsoportokhoz viszonyított helyzetüktől függően eltérő megoszlást mutatnak. A differenciált hialinporcban a kondrociták kondronnak nevezett porcsejtcsoportokat alakítanak ki. Az ezeket körülvevő, úgynevezett territoriális matrix a viszonylag nagy koncentrációban jelenlévő proteoglikánok miatt erősen bazofil festődést

mutat. Az egyes kondronok között, kollagénben gazdagabb, ezért erősebben eozinofil matrixrészletek az ún. interterritoriális matrix található.

A porcszövet jellegzetes eltérése a többi kötő- és támasztószövetektől a tápláló erek hiánya. Mivel a porc táplálása diffúzióval történik a porcot körülvevő kötőszövet, a perikondrium vagy az ízületi üreget kitöltő szinoviális folyadék felől, braditrof szövetnek tekinthető.

Mai tudásunk szerint a növekedés befejeződése után az ízületi porcban található kondrociták nem proliferálnak és fiziológias körülmények között gyakorlatilag immortalizált sejtekként foghatók fel. Az állandó porcok sejtjei a perikondrium belső rétegében található kondrogenikus őssejtekből pótlódhatnak, az ízületi porcsejtek regenerációja azonban a perikondrium hiánya miatt nem lehetséges.

A számos metabolikus sajátságban és differenciációs markerekben megnyilvánuló hasonlatosság mellett az ízületi porcban, az állandó porcokban, illetve az epifízis porcban jelenlévő kondrociták különböző módon differenciálódnak, ezért eltérő sejtpopulációkként kell kezelnünk őket (Cancedda és mtsai, 1995; DeLise és mtsai, 2000). További lényeges különbségek mutatkoznak az egyes testtájakon kialakuló porcszövetek pluripotens őssejtjeinek eredetében is, hiszen a koponya csontjainak kialakításában résztvevő porctelep, valamint a zsigeri porcok a crista neuralis kranialis részéből kivándorolt ektomezenchimális sejtekből származnak, a törzs csontjainak vázát adó porckezedmények az axiális mezenchimából kialakult szklerotomokból fejlődnek, míg a végtagtelepek porctemplátjai a laterális mezodermből kialakult mezenchimális szövet származékai (Sadler, 1990).

A kondrogenikus őssejtek proliferációja, porcsejt irányba elkötelezett sejté válása, a porcsejt fenotípus elnyerése, majd a speciális porcszövet kialakítása, egyéb sejtek differenciációjához sok tekintetben hasonló módon, egyaránt függenek genomális faktoroktól ("master" gének, kontroll gének), lokális mikrokörnyezeti tényezőktől (autokrin és parakrin faktoroktól, ECM, valamint sejtadhéziós molekuláktól) vagy akár a differenciálódó sejtek felszíni receptormintázatának (pl. integrinek, citokin receptorok stb.) alakulásától (Sandell és Adler, 1999). A porcsejtek differenciációját ilymódon számos, különböző forrásból származó faktor, távolról érkező hormonok, lokálisan termelt citokinek, stb. szabályozzák. Emellett a porcdifferenciáció során jelentős változások zajlanak a sejtek közvetlen környezetét adó ECM összetételében is. A differenciáció kezdeti szakaszában a porcsejt fenotípus még labilis, ha a fiatal sejt elveszíti a megfelelő, a

sejtdhéziót csökkentő matrixszubsztrátot és/vagy a fenotípus megőrzéséhez szükséges diffúzibilis mikrokoznyezetet, hamar dedifferenciálódik (DeLise és mtsai, 2000; Cancedda és mtsai, 2000). Felnőttben pluripotens mezenchimális őssejtek találhatóak a vörös csontvelőben, a zsírszövet kötőszöveiteiben, a perimíziumban, perioszteumban és perikondriumban (Cancedda és mtsai, 1995), ezek a sejtek kondrocitákká is differenciálódhatnak.

1.2. Porcdifferenciációs modellek

Az egyik leggyakrabban használt *in vitro* porcdifferenciációs modell a Hamburger-Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumban (Hamburger és Hamilton, 1951) lévő csirkeembriók végtagtelepeiből izolált és elsősorban porcosodó mezenchimális sejtekből álló primer high density (HD)-sejttenyészet (Ahrens és mtsai, 1977; Hadházy és mtsai, 1982), ami a viszonylag nagy számban jelenlevő és a kultúrák kitapadását biztosító mezenchimális/fibroblaszt populáció mellett kevés mioblasztot és hámsejtet is tartalmaz. Az évek során néhány, rágcsálókából származó porcosodó mezenchimális sejtvonalat is kialakítottak (C3H-10T1/2 egér sejtvonal, RCJ 3.1 és CFK2 patkány fetus calvariából), ezek a sejtvonalak a mikrokoznyezeti paraméterek változtatásával, egyes anyagoknak a médiumhoz való adásával, másoknak az elvonásával nem csupán porcsejteké, hanem akár vázizom, csont vagy zsírsejteké is differenciálódhatnak (Young és mtsai, 1993).

Az *in vivo* és *in vitro* zajló porcdifferenciációban a sok hasonló vonás mellett alapvető különbség az, hogy az embrió testében különböző lokalizációban más-más formájú és helyzetű porcszigetek képződése szükséges térben és időben meghatározott sorrendben, míg az *in vitro* sejtkultúrákban, megközelítőleg homogén eloszlással alakul ki a porcszövet. Az *in vivo* porcképződés orientációját és szekvenciáját számos különböző faktor, többek között ún. pozicionáló tényezők határozzák meg. Itt elsősorban a homeoboxot tartalmazó gének termékeire és végtagbimbók esetében az apikális ektodermális perem (AER, apical ectodermal ridge) sejteit által termelt FGF-4-re, valamint a végtagtelep proximális területében elhelyezkedő polarizáló aktivitással rendelkező mezenchimális sejtek (ZPA, zone of polarizing activity) diffúzibilis faktoraira (Hedgehog fehérjék) gondolhatunk, amelyek az embrió normális morfológiájának kialakulásához elengedhetetlen fontosságúak (Erlebacher és mtsai, 1995; Iwamoto és mtsai, 1999; Sandell és Adler, 1999; De Lise és mtsai, 2000). Ezek a faktorok az általunk is használt primer porcosodó sejtkultúrákban zajló porcdifferenciáció szabályozásában más módon vehetnek

részt, mint az *in vivo* zajló kondrogenézis esetében. Erről a tényről nem szabad elfelejtkeznünk, amikor a tapasztaltakat az élőben lejátszódó porcdifferenciáció szabályozásával kell összevetnünk. Így például az AER alatti mezenchimális sejtek által fiziológiásan termelt retinolt a primer sejt kultúrákhoz adva, az eltérő hatással lehet a porcosodó sejtekre annak függvényében, hogy a sejteket a végtagbimbó mely területéről izolálták (Underhill és Weston, 1998). Ugyanez előfordulhat a ZPA termelte Sonic hedgehog hatásaival is (Laufer és mtsai, 1994; Iwamoto és mtsai, 1999).

A primer porcsejt-tenyészetek különböző fenotípusú, a differenciáció eltérő fázisaiban lévő sejtek elegyeként foghatók fel, amely sejteket általában nem matrix alapon, hanem egyszerű műanyag felszínen növesztünk. A porcsejtekre kizárólagosan jellemző sejt felszíni markereket nem ismerünk, így a differenciáció folyamatát a porcspecifikus matrixmolekulák expressziójának monitorozásával lehet elsősorban nyomonkövetni. Emellett hasonló specificitású, de jóval gyorsabb és igen egyszerű eljárás, ha alacsony pH-n metakromáziás festékekkel (pl. dimetilmetilénkék) festjük meg a preparátumainkat, demonstrálva az erősen polianionos karakterű szulfatált glikozaminoglikánok nagy mennyiségben való jelenlétét a porc matrixban. Ha a porcosodó mezenchimális sejtekből létrehozott primer HD-sejt kultúrák sajátosságaiból fakadó korlátokat szem előtt tartjuk a kísérleti eredmények értékelésénél, akkor ez a könnyen reprodukálható kísérleti modell sokrétű információval szolgálhat a porcdifferenciáció egyes mozzanatairól, ezek szabályozásáról és exogén tényezőkkel való befolyásolhatóságáról, valamint a génexpressziós mintázat és a transzkripció porcdifferenciációval összefüggő változásairól. A porcosodó mezenchimális sejtekből létrehozott primer HD-kultúrák elfogadottságát és alkalmazásának létjogosultságát számos, az elmúlt években megjelent közlemény támasztja alá (Chang és mtsai, 1998; Healy és mtsai, 1999; Pizette és Niswander, 2000).

1.3. A porcdifferenciáció lépései, a fontosabb extracelluláris szabályozó tényezők

Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* porcdifferenciáció fontos kezdeti lépése a kondrogenikus sejtek kisebb sejt csoportokba való kondenzációja. A kondenzálódott sejtek morfológiailag megkülönböztethetetlenek a többi mezenchimális sejtől. Az aggregátumok kialakításában számos faktor összehangolt működése játszik szerepet. Ezek között kiemelkedő fontosságot tulajdonítunk a sejt-sejt, sejt-matrix kapcsolatok alakulásának,

egyes citokinek hatásának, valamint a citoszkeleton szerkezetének átalakulásával párhuzamosan észlelhető sejtalak-változásoknak.

A HD-mezenchimális kultúrákban a kondrogenikus sejtek kondenzációja az első tenyésztési nap folyamán zajlik, majd a második és harmadik napon a nodulusok sejtjei porcsejteké differenciálódnak (Ahrens és mtsai, 1977; San Antonio és Tuan, 1986). A korai sejt-sejt kapcsolatok a kondrogenikus sejtek felszínén megjelenő N-CAM és N-cadherin molekulák révén valósulnak meg (Widelitz és mtsai, 1993; Oberlender és Tuan, 1994). Emellett ebben a fejlődési stádiumban a szomszédos sejtek között számos gap junction is megjelenik (Kelley és Fallon, 1978), ami parakrin mechanizmusok jelentőségére utal: közzismert, hogy a porcdifferenciáció kezdeti fázisában a differenciálódó sejtek PGE-2-t termelnek (Smales és Biddulph, 1985).

A TGF- β családba tartozó citokinek a differenciáció több fázisában is befolyásolják a porcképződést (Kulyk és mtsai, 1989; Leonard és mtsai, 1991). Így például a bone morphogenetic proteinekről (BMP) tudjuk, hogy a sejtkondenzáció során nagy mennyiségben vannak jelen a kolóniákban, valamint, hogy ebben a fejlődési stádiumban és a kondenzációt közvetlenül követő differenciáció során a kondrogenikus sejtek nagy számban expresszálják felszínükön a BMP-k megkötéséhez szükséges receptorokat is (Pizette és Niswander, 2000).

A sejtek felszínén, valamint az intracellulárisan zajló változások mellett a differenciálódó sejteket körülvevő ECM is jelentős átalakulásokon megy keresztül. A sejtkondenzációt megelőzően és annak során a kondrogenikus sejtek nagy mennyiségű fibronektint deponálnak az ECM-ba, miközben felszínükön fibronektint kötő integrinek (elsősorban $\alpha 5\beta 1$) expresszálódnak. A sejtaggregátumok kialakulását követően mind a fibronektintermelés, mind az azt kötő integrinek expressziója erősen csökken. A fibronektinben gazdag matrix a továbbiakban gátolja a porcképződést, erős adhezív sajátága miatt valószínűleg nem engedi a kondrogenikus sejtek lekerekedését és azoknak a matrix alapról való fokozatos felválását (Tavella és mtsai, 1997). Tovább erősítheti a sejtek mobilitását és fibronektintól való elszakadási képességét a korai porctelepekben átmenetileg megjelenő tenaszcin (Mackie és mtsai, 1987), mely molekula fibronektin-kötő régiója révén meggátolja a sejtek adhézióját a pericelluláris fibronektinhez. A tenaszcin expressziója a porcdifferenciáció későbbi fázisaiban a perikondrium területére korlátozódik, ahol szerepet játszhat a belső rétegben található kondroprogenitor sejtek fenotípusának megőrzésében. A végtagbimbók mezenchimájának központi részében a

hialuronsav koncentráció csökken a kondenzáció fázisa előtt (Toole, 1972), míg az I. típusú kollagén koncentrációja ekkor a legmagasabb, majd a porcsejtté való differenciáció időpontjában fokozatosan csökken (Dessau és mtsai, 1980). A továbbiakban a sejtek megkezdik a porcspecifikus ECM makromolekulák szintézisét, valamint a megkötésükhöz szükséges receptorok expresszióját. A HD-kultúrákban a harmadik tenyésztési nap második felétől lehet metakromázias festéssel porcmatrixot detektálni. A differenciációt követően egyre nagyobb mennyiségben szintetizálódó II. típusú kollagén és aggregán teljesen körülveszi a porcsejteket. Ez az egyedi összetételű ECM nagy fontossággal bír a porcsejtek végleges fenotípusának kialakításában és fenntartásában (Cancedda és mtsai, 2000).

1.4. Összehangolt intracelluláris történések irányítják a kondrogenézist

A fentiek alapján egyértelműen látszik hogy a porcdifferenciáció során számos, egymással jól összehangolt folyamat zajlik párhuzamosan, így joggal feltételezhetjük egy (vagy esetleg több) ún. „master” gén szerepét. Újabb kutatási eredmények szerint ez a „master” gén a HMG (high mobility group)-box típusú DNS-kötő régióval rendelkező transzkripciós faktort kódoló Sox9 gén lenne (de Crombrughe és mtsai, 2000).

A porcosan differenciálódó sejtek jelentős mennyiségű PGE-2-t termelnek, ami az intracelluláris cAMP szintjének fokozódását váltja ki (Biddulph és mtsai, 2000). A cAMP intracelluláris hatásainak mediálásáért a Ser/Thr-specifikus protein kinázok csoportjába tartozó cAMP-függő protein kináz (PKA) aktiválódása a felelős. A porcdifferenciáció során a PKA cAMP és BMP-2 hatására egyaránt aktiválódik (Lee és Chuong, 1997). A kondrogenikus sejtekben a PKA bizonyítottan foszforilálja a Sox9-t, ezzel aktiválva a porcspecifikus ECM-t kialakító II. típusú kollagén és az aggregán core proteinjének a génjeit (Lefebvre és de Crombrughe; 1997, de Crombrughe és mtsai, 2000). A PKA másik lehetséges targetmolekulája a „cAMP Respond Element Binding Protein” (CREB), melynek foszforilációja mind cAMP, mind BMP-2 hatására fokozódik a porcosodó sejtekben (Lee és Chuong 1997).

1.5. A fehérje foszforilációs folyamatokról általában

A reverzibilis fehérje foszforiláció az eukarióta sejtek működésének szinte valamennyi folyamatában megtalálható (Barford és mtsai, 1998), így a génextpressziót

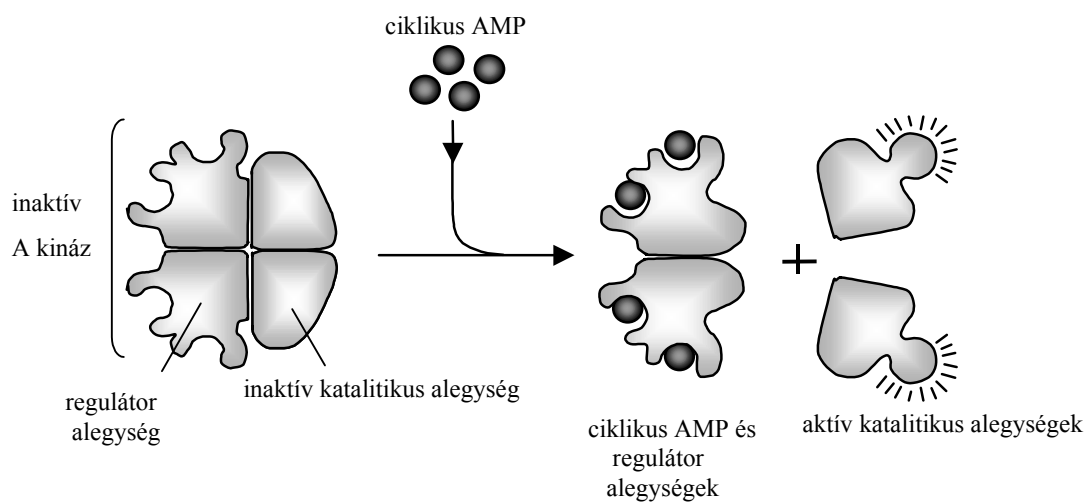
szabályozó különböző fehérjék aktivitásának befolyásolásában is ez az egyik legfontosabb mechanizmus. A reverzibilis foszforiláció révén megvalósuló szabályozásban a kulcsszerepet a foszforilációért felelős protein kinázok, valamint a foszfátcsoportok lehasítását katalizáló protein foszfatázok játsszák. A két enzim-típus celluláris koncentrációja nagyjából azonos (Hunter 1995), így akár a kináz, akár a foszfatáz-aktivitást befolyásoljuk, megváltoztatjuk egy adott szubsztrát vagy szubsztrátcsoport foszforilációs szintjét. Az ily módon módosítható fehérjék nagy része (több mint 90%-a) Ser illetve Thr, kisebb hányada pedig Tyr aminosav-oldalláncukon foszforilálódhat (Marks, 1996).

1.6. Protein kinázok

A protein kinázok egy része a sejtmembránhoz kötött receptorok intracelluláris részeként funkcionál. A receptor tirozin-specifikus kinázok különböző növekedési és differenciációs faktorok receptorai. Ilyen receptorokon keresztül fejtik ki hatásaikat az alábbi citokinek: az epidermális növekedési faktor (EGF), az inzulin-szerű növekedési faktor (IGF), az ideg növekedési faktor (NGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF), az érendothel eredetű növekedési faktor (VDGF) valamint a makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF). További kategóriát képeznek a receptorokhoz asszociált tirozin-specifikus kinázok, melyek többsége az *Src* vagy a *Janus* család tagja. Ezek a kinázok a különböző receptorok intracelluláris doménjének közelében találhatóak a sejtmembrán belső felszínéhez horgonyozva. A receptor lehet akár az előzőekben említett receptor tirozin-specifikus kináz is (Marks, 1996). A különböző kinázok által foszforilált szubsztrátok részben teljesen különbözőek, részben közösek. Ily módon különböző receptorok aktiválhatják ugyanazt a jelátviteli utat. A tirozin-specifikus kinázok mellett foszfortirozin-specifikus foszfatázok működése is elengedhetetlen a foszforiláció reverzibilitásának biztosításához. A foszfortirozin foszfatázok között is vannak receptor-szerű és nem receptor-szerű foszfatázok, többnyire a különböző jelátviteli folyamatok szabályozásában van alapvető szerepük (Marks, 1996).

A Tyr foszforiláció igen körülírt hatásaival ellentétben, sokkal szélesebb spektrumú és volumenében is sokszoros a fehérjék Ser/Thr oldalláncainak a foszforilációja. A Ser/Thr-specifikus kinázok többsége nem membránhoz kötött. Az egyetlen ismert receptor Ser/Thr-specifikus kináz csoport tagjai a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) szupercsaládba tartozó citokinek receptorai. A citoszolban, illetve a sejtmagban azonban

számos Ser/Thr-specifikus protein kinázt ismerünk, csak a legközismertebbeket felsorolva: cAMP-függő protein kináz (PKA), cGMP-függő protein kináz (G-kináz), protein kináz C (PKC), Ca^{2+} -calmodulin-függő protein kináz (CaM-kináz), foszforiláz kináz, mitogén aktivált protein kináz (MAP-kináz). Számos extracelluláris szignál molekula az intracelluláris cAMP-szint emelése révén fejti ki hatását. Ezek a molekulák a sejtmembránba integrált adenilát-cikláz enzim aktivitását G-proteinek révén modulálva változtatják meg az intracelluláris cAMP-szintet. A cAMP hidrolízisét gyorsan és effektíven végzik a különböző cAMP-foszfodiészterázok (Marks, 1996).



1.1. ábra. A PKA holoenzim szerkezete

A cAMP intracelluláris hatásainak többségét a PKA által, Ser/Thr aminosavmaradékon foszforilált proteinek aktivitásának a megváltoztatása révén fejti ki (Krauss, 2001). Az inaktív PKA holoenzim két regulátor és két katalitikus alegységből épül fel. A cAMP-nek a regulátor alegységhez való kötődése a katalitikus alegységeknek a regulátor alegységekről való leválását és aktiválódását váltja ki (1.1 ábra). A PKA családba tartozó enzimeknek négyféle regulátor alegységét (R) ismerjük, úgymint $\text{RI}\alpha$, $\text{RI}\beta$, $\text{RII}\alpha$, és $\text{RII}\beta$, melyek két különböző katalitikus alegységhez ($\text{C}\alpha$ és $\text{C}\beta$) kapcsolódhatnak (Marks, 1996). A különböző regulátor alegységek cAMP-érzékenysége eltérő és ezt a helyzetet még tovább bonyolítja, hogy a két eltérő katalitikus alegység kapcsolódása ugyanahhoz a regulátor alegységhez tovább modulálja a regulátor alegységek egyébként is

eltérő cAMP-érzékenységet. A PKA holoenzim-variánsok szubcelluláris lokalizációja különböző, az RI típusú regulátor alegységet tartalmazó PKA enzimek elsősorban a citoszolban találhatóak, míg az RII alegységgel bíró variánsok inkább a maghártyához, Golgi-apparátushoz és citoskeletális komponensekhez kötöttek (Brandon és mtsai, 1997). A PKA hatásának specifikusabbá tételében fontos szerepe van a PKA-kötő fehérjéknek (AKAPs), melyek a különböző szubcelluláris kompartmentekhez lokalizálják a PKA holoenzimeket (Zhang és mtsai, 1996). A PKA katalitikus alegység Thr-197-en való foszforilációja elengedhetetlen fontosságú az enzim aktivitása szempontjából (Cauthron és mtsai, 1998).

A PKA által foszforilált és a génexpresszió szabályozásában fontos egyik transzkripciós faktor a CREB, mely egy, különböző génekben elhelyezkedő DNS szekvenciához – „cAMP respond element” (CRE) – kötődve fejt ki hatását. A CREB Ser-133 oldalláncának foszforilációja fokozza a génexpressziót aktiváló hatását, de nem befolyásolja a molekula DNS-kötő képességét (Gonzalez és Montminy, 1989).

A cAMP mellett fontos „second messenger” a különböző extracelluláris szignálok intracelluláris hatásainak kialakulása során a kalciumion. A citoplazma Ca^{2+} -koncentrációja nyugalmi állapotban rendkívül alacsony, számos pumpa-mechanizmus aktív tevékenységének köszönhetően a sejten belüli Ca^{2+} az endoplazmás retikulumban tárolódik. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megnőhet a sejtmembránban elhelyezkedő, különböző szabályozású Ca^{2+} -ioncsatornák megnyílása révén ami elsősorban az elektromosan stimulálható sejtekre –izomsejtek, idegsejtek– jellemző. Ca^{2+} -felszabadulást eredményezhet egy másik, valamennyi eukarióta sejtre jellemző szignáltranszdukciós folyamat is, amelynek során valamely extracelluláris szignálmolekula receptorhoz való bekötődése G-proteinek aktiválódása révén fokozza a sejtmembrán belső oldalán kötött foszfolipáz C aktivitását (Krauss, 2001). A foszfolipáz C a membrán-asszociált foszfátidil-inozitol-bifoszfátból (PIP_2) inozitol-trifoszfátot (IP_3) és diacil-glicerolt (DAG) szabadít fel. Az IP_3 megnyitja az endoplazmás retikulum Ca^{2+} -csatornáit, így elárasztja a Ca^{2+} a citoplazmát. A DAG pedig aktiválja a Ser/Thr kinázok egy nagy csoportját, a számos izoenzimből álló PKC családot (Kuo, 1994; Liu és Heckman, 1998).

A PKC izoenzimek jelentős hányadának aktivitását az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése is növeli. Ebbe az ún. kalcium-függő, klasszikus PKC izoenzim-csoportba tartoznak az α , β_I , β_{II} és γ izoenzimek (cPKC vagy A típusú PKC). Nem befolyásolja az intracelluláris kalcium-ion koncentráció a δ , θ , ϵ és η , ún. új típusú

izoenzimiek aktivitását (nPKC vagy B típusú PKC). Végül egy harmadik ún. atípusos csoportot képeznek a λ és ζ (aPKC vagy C típusú PKC) izoenzimiek (Kuo, 1994; Mellor és Parker, 1998). Az egyes PKC izoformák szöveti, sejtes és intracelluláris megoszlása nem azonos. Egy sejtfeleség általában több izoenzim típust is expresszál. Az α , γ és ζ formák ubikviterek, ami ezen izoenzimiek alapvető szerepére utal (Mellor és Parker, 1998; Mochly-Rosen és Gordon, 1998). A porcdifferenciáció során egyes PKC izoenzimiek (α , γ , ε) expressziójának szintje változik, míg mások (λ és ζ) mindvégig egyformán expresszálódnak a porcosodó sejtekben (Choi és mtsai, 1995). Az A típusú PKC izoenzimiek a citoszkeleton különböző elemeihez kötődnek a sejtekben. A PKC aktiválódás az aktin filamentumok dezorganizálódásához vezet. A PKC lehetséges szubsztrátjainak száma rendkívül nagy, itt csak azt, a továbbiak szempontjából fontos ténytet emeljük ki, hogy a PKC és a PKA, egyaránt a Ser-133-on foszforilálják a CREB-et (Kuo, 1994).

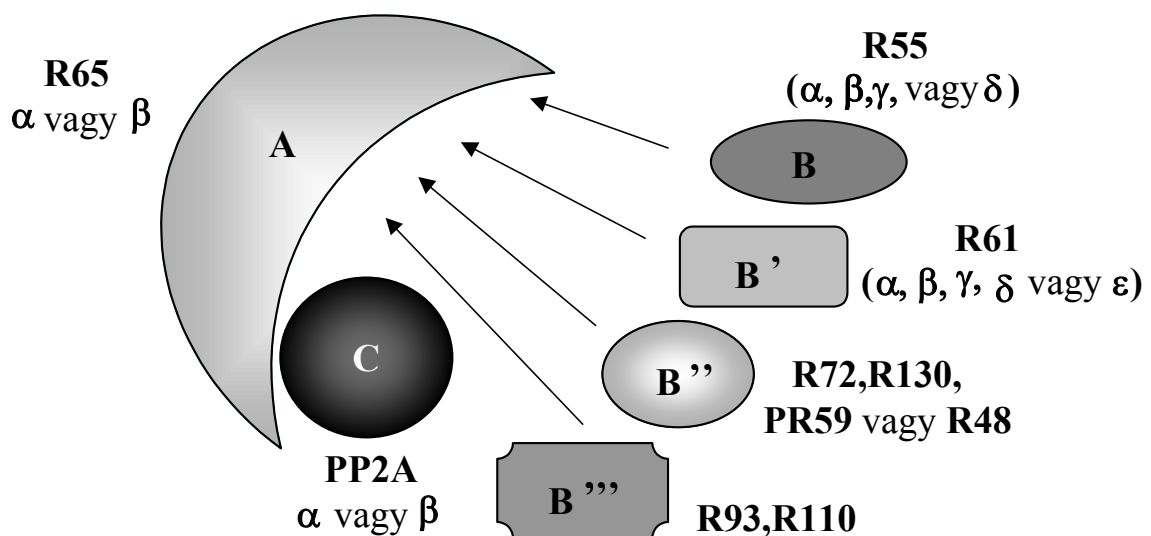
1.7. Foszfó-Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok

A Ser/Thr-specifikus kinázok aktivitása révén foszforilált fehérjék defoszforilálását a foszfó-Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok (PP) katalizálják. A Ser/Thr-specifikus PPK a családjába tartozó enzimek katalitikus egységeinek a felosztása szubsztrátspecifitásuk, illetve inhibitorok iránti érzékenységük alapján történik (Brautigan, 1997). A PP1 az emlős foszforiláz kináz β alegységét defoszforilálja, inhibitor-1 (I1) és inhibitor-2 (I2) fehérjékkel gátolható. A PP2 család tagjai az emlős foszforiláz kináz α alegységére specifikusak és nem gátolhatók I1 vagy I2 fehérjékkel. A PP2 családon belül 3 alosztályt különítünk el: PP2A, PP2B és PP2C. A PP2A okadainsavval gátolható, a PP2B Ca-kalmodulin-függő, a PP2C pedig Mg^{2+} illetve Mn^{2+} ion-függő (Wera és Hemmings 1995).

A PPK primer szerkezetének megismerésével a fenti osztályozás lényegesen bővült. A PP2A, PP2B és PP1 különböző izoenzimeinek az aminosavsorrendje hasonló, míg a PP2C izoenzimiek szekvenciája tőlük erősen eltérő. Emellett a foszfatáz kutatások során számos ún. új típusú foszfatázt találtak (pl. PP4, PP5) melyekről még viszonylag keveset tudunk (Barford és mtsai, 1995; Brautigan, 1997).

A PP1 az eukarióta sejtekben esszenciális szerepet betöltő molekula, nagymértékű evolúciós konzervativizmus jellemzi. Természetes formában egy katalitikus alegység és egy regulátor alegység alkotta dimerként funkcionál. A PP1-nek számos eltérő regulátor alegységét ismerjük (Mumby és Walter, 1993).

A PP2A holoenzim valószínűleg trimerként található a sejtekben. A katalitikus alegység, éppúgy, mint a PP1 esetében, nagyfokú evolúciós konzervativizmust mutat. A katalitikus alegység (C) állandó komplexet alkot a 65-kDa-os regulátor (A) alegységgel. A dimerhez különböző B-alegységek kapcsolódnak (1.2. ábra). A B alegységeknek számos változata ismeretes, ennek révén a holoenzim aktivitása, szubsztrát-specifitása, szubcelluláris lokalizációja rendkívül finoman szabályozott lehet (Millward és mtsai, 1999; Sim és Scott, 1999).



1.3. ábra. A PP2A holoenzim felépítése (Janssen és Goritz, 2001)

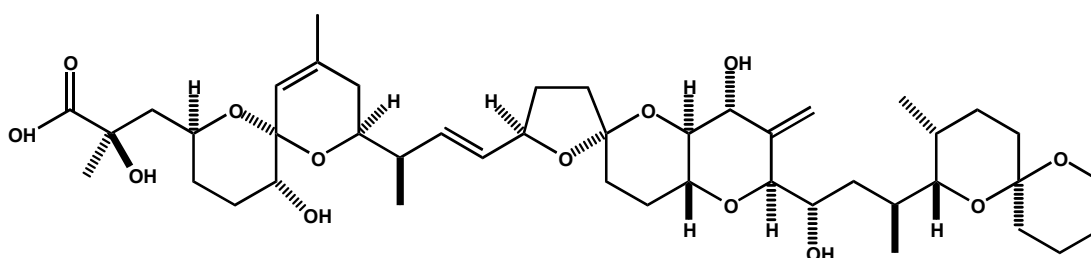
A számos kombinációra lehetőséget adó regulátor alegységvariációk biztosíthatják a PP2A sejttypusonként, illetve differenciációs lépésenként eltérő aktivitását vagy szubsztrátspecifitását. A regulátor alegységek sokfélesége mellett további lehetőség a PP2A aktivitásának szabályozására a katalitikus alegység foszforilálása, illetve metilálása. Mindkét folyamat a PP2A aktivitás azonnali modulálásra ad lehetőséget akár a sejtek jelátviteli folyamataiban, akár a sejtciklus szabályozásában (Janssens és Goris 2001).

A PP2A számos jelátviteli rendszer lényeges eleme. Ez a szerep nem csupán a foszforilálható transzkripciós faktorok vagy egyéb messenger molekulák defoszforilálására korlátozódik, hanem jelentős számú (mintegy 30) protein kináz aktivitását is képes befolyásolni a PP2A (Millward és mtsai, 1999). Az előzőekben már említett kinázok közül

mind a PKA, mind a PKC, valamint a MAP-(Mitogen Activated Protein)-kinázok közé tartozó ERK 1/2 aktivitását egyaránt gátolja a PP2A katalitikus tevékenysége.

1.8. Az okadainsavas gátlás, mint hatékony módszer a foszfatázok tanulmányozásában

A proteinfoszfatázoknak a celluláris folyamatok szabályozásában vitt jelentőségére utal az a tény is, hogy egyes organizmusok a különböző foszfatázok aktivitását gátló toxinokat termelnek (Dawson és Holmes, 1999).



1.3. ábra. Az okadainsav szerkezete

Ilyen vegyület az okadainsav (OA) is, mely kémiaiailag a poliéter zsírsavak csoportjába tartozó, sejtp permeábilis anyag (1.3. ábra). Egyes tengeri dinoflagelláták termelik és a velük táplálkozó szivacsok, illetve kagylók tápcsatornájában a toxin igen nagy koncentrációban halmozódhat fel. Az OA tehető felelőssé a profúz hasmenéssel járó, tenger gyümölcsei által okozott ételmérgezés tüneteier. Ilyenkor az OA átmenetileg gátolja a bél-simaizomzat kontraktilis fehérjéinek defoszforilációs mechanizmusait és ez váltja ki a tünetcsoportot (Biajolan és Takai, 1988).

A fontosabb foszfo-Ser/Thr-specifikus PPk közül a PP1, PP2B, PP2C aktivitását az OA csak magas, 0,1 μM feletti koncentrációkban gátolja. A PP2A, valamint az új típusú PPk közé tartozó PP4 és PP5 aktivitását azonban már nanomol koncentrációjú OA gátolja, ezen enzimek félmaximális gátlásához 1-10 nM OA-ra van szükség (Scheppek és mtsai, 1997). Az OA alkalmazásával viszonylag megbízhatóan elkülöníthetjük a PP2A-hoz rendelhető defoszforilációs mechanizmusokat a többi fontosabb foszfo-Ser/Thr-specifikus foszfatáz által katalizált folyamatoktól, azonban nem tudjuk ezzel a módszerrel az új típusú PP aktivitásokat elkülöníteni a ténylegesen a PP2A által katalizált folyamatoktól. Mai

ismereteink szerint az OA közvetlenül nem gátolja más típusú enzimek (pl. protein kinázok) aktivitását (Biajolan és Takai, 1988, Davies és mtsai, 2000). Az OA sejttípustól függően módosíthatja a különböző citoskeletális elemek szerkezetét (Lin és Arndt, 1995; Maier és mtsai, 1995; Menzel és mtsai, 1995). Ugyanakkor számos közlemény hangsúlyozza az OA tumorpromoter szerepét is (Haystead és mtsai, 1989; Cohen és mtsai, 1990). Megfelelő ideig és megfelelő koncentrációban alkalmazva azonban az OA kezelést, nagyon hatékony eszköz birtokába juthatunk, melynek segítségével a PP2A celluláris folyamatokban vitt szerepét tanulmányozhatjuk.

A foszfatáz inhibitorok mellett jóval nagyobb számú a különböző kinázokat, sőt, azok izoenzimjeit specifikusan gátló kináz-inhibítort ismerünk. A foszfatázok és kinázok aktivitásának gátlása különböző specificitású inhibitorokkal új lehetőség ezen enzimek funkcióinak és egymással, illetve a szubsztrátokkal való kölcsönhatásaiknak, sejtporotabilis inhibitorok esetén pedig a különböző sejtfunkciókban való részvételüknek a megvilágítására. A kinázok és foszfatázok esszenciális szerepére utal inhibitoraik erőteljes citotoxikus hatása, óvatos és körültekintő alkalmazásuk azonban értékes eredményekkel segíti a fehérjefoszforilációs mechanizmusok jobb megértését (MacKintosh és MacKintosh, 1994). Mivel az inhibitorok alkalmazása során a gátolt enzim(ek) valamennyi szubsztrátjának változik a foszforiláltsági állapota, ezért az eredmények interpretálása, a targetszubsztrátok természetének meghatározására irányuló találgatások visszafogottságot igényelnek.

1.9. Ser/Thr-specifikus foszforiláció jelentősége a porcdifferenciációban

A fentebb említett Ser/Thr-specifikus kinázok közül több részvétele is jól ismert a porcdifferenciáció befolyásolásában, úgymint PKA (Leonard és Newman, 1987; Zhang és mtsai, 1996; Lee és Chuong, 1997), egyes PKC izoenzimek (Sonn és Solursh, 1993; Choi és mtsai, 1995), a TGF β -receptor szupercsaládba tartozó receptor Ser/Thr kinázok (Kulyk és mtsai, 1989; Leonard és mtsai, 1991), valamint a különböző MAP-kinázok (Chang és mtsai, 1998 ; Oh és mtsai, 2000).

A porcdifferenciáció korai szakaszában zajló mezenchimális kondenzáció során a TGF β szupercsalád tagjai által iniciált jelátviteli folyamatok jelentősége közismert. Aktivin, BMP-2 és TGF β egyaránt befolyásolják mind az N-CAM, mind a fibronectin, valamint a fibronectin-kötő integrin típus expresszióját (Hall és Myake, 1995). A

porcdifferenciáció során jelentős szerepe van a cAMP által mediált jelátviteli folyamatnak, melynek során PKA foszforilálhat különböző szubsztrátokat, például a CREB-család transzkripciós faktorait (CREB, CREM és ATF-1; Long és mtsai, 2001) vagy a SOX9 fehérjét (Healy és mtsai, 1999; de Crombrughe és mtsai, 2000). A CREB foszforilációjához vezető jelátviteli mechanizmus nem csupán a cAMP, hanem a BMP-2 által iniciált jelátviteli folyamat is lehet (Lee és Chuong 1997). A SOX9 foszforilálódásához vezető cAMP útvonal trigger molekulája feltehetőleg a parathormon-szerű fehérje (parathormon-related peptide; PTHrP; de Crombrughe és mtsai, 2000). A foszforilációval aktivált SOX9 transzkripciós faktor serkenti a II. típusú kollagén és az aggregán tengelyfehérje expresszióját (de Crombrughe és mtsai, 2000, Sekiya és mtsai, 2000). Az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedése által elindított és a PKC aktiválódásával járó jelátviteli folyamat targetmolekulája is lehet a CREB-család tagja (Xie és Rothstein, 1995). Az is ismert, hogy a PKC aktivitás gátlása a porcdifferenciáció gátlásához vezet (Sonn és Solursh, 1993). Arra nézve azonban nincsenek adatok, hogy a PKC foszforilálja-e a CREB-et vagy esetleg a SOX9-et a porcdifferenciáció során. Mindezek mellett fontos hangsúlyozni, hogy a PKA és PKC aktivitását jelentős mértékben befolyásolja maguknak az enzimeknek a foszforiláltsági állapota. A defoszforilált enzimek aktivitása fokozódik és mindkét foszfo-enzim szubsztrátja a PP2A-nak (Millward és mtsai, 1999).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az ízületi porc megbetegedései vagy a végtagok vázának fejlődési rendellenességei az életminőséget súlyosan rontó, gyakran fájdalmas elváltozások. Az ízületi porcot alkotó hialinporc szerkezetének és kialakulásának jobb megértése, illetve a végtagok csontos vázának templátjául szolgáló porctelepek létrejöttét szabályozó molekuláris mechanizmusok feltárása előremozdíthatják ezeknek a megbetegedéseknek a jövőbeni jobb gyógyíthatóságát.

Nagy számú irodalmi adat igazolja a porcdifferenciációt reguláló protein foszforilációs mechanizmusok fontosságát. Számos protein kináz szerepét bizonyították a kondrogenezis szabályozásában. Arról is vannak részleges információink, hogy ezek a kinázok milyen szubsztrátokon keresztül fejtik ki hatásaikat és azt is tudjuk, hogy közöttük számos transzkripciós faktor is szerepel. A fehérje foszforilációt reverzibilissé tevő protein foszfatázoknak a porckialakulás szabályozásában vitt szerepéről azonban nem rendelkezünk adattal. Ezért kísérleteink céljául tűztük ki:

- ❖ megvizsgálni a fontosabb celluláris foszfo-Ser/Thr-specifikus foszfatázok (PP1 és PP2A) aktivitásának változásait a porcdifferenciáció során;
- ❖ specifikus foszfatáz-inhibitor(ok) alkalmazásával felderíteni a porcdifferenciációval változó aktivitást mutató foszfatáz gátlásának hatását a differenciálódó sejtek egyes funkcióira, illetve a porcdifferenciáció folyamatára;
- ❖ összefüggést keresni a foszforilációs és defoszforilációs szabályozó mechanizmusok között közös szubsztrátmolekulák azonosításával.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejttenyésztés

A porcosodó „micromass” mezenchimális sejt kultúrák, más néven high density (HD)-kultúrák alkalmazása a porcdifferenciáció tanulmányozására évtizedek óta ismert módszer. A porcosodó mezenchimális sejteket Arbor Acres, illetve Ross és Hybro fajtájú (valamennyi fehér húshibrid) csirkeembriók distális végtagtelepeiből izoláltuk. Mivel a kontroll tenyészetekben különbségek nem adódtak, ezért az embriók eltérő fajtáit nem tartottuk a kísérletek egyébként standard körülményeit zavaró tényezőnek. A kísérletekhez használt embriók Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es stádiumú fejlettségűek voltak. A protokollon (Ahrens és mtsai, 1977; Hadházy és mtsai, 1982) – melyet az irodalomban is kisebb-nagyobb módosításokkal alkalmaznak – saját kísérleteink igényeit figyelembe véve néhány változtatást hajtottunk végre.

Az eredeti leírás szerinti 20×10^6 sejt/ml sűrűségű szuszpenziók helyett mi 15×10^6 sejt/ml sűrűségűeket használtunk és 5 egyenként 10-10 μ l-es csepp helyett egyetlen 100 μ l-es cseppet cseppentettünk egy műanyag fedőlemezre (Nunc, Roskilde, Dánia). A fedőlemezeket tartalmazó műanyag Petri-csészéket 37°C -on, 5 % CO_2 és 95 % relatív páratartalom mellett termosztálva, a sejteket 2 órán át hagytuk kitapadni, majd 10 % fetális borjúsérummal kiegészített, antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó Ham's F12 (Sigma, St. Louis, MO, USA) táptalajjal tápláltuk. A táptalajt (amennyiben a kísérlet menete másképp nem diktálta) másnaponta cseréltük. A kicseppentés napját a tenyésztés 0. napjának számítjuk.

3.2. Protein foszfatáz aktivitás gátlása okadainsavval

Az okadainsavat (OA) (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA) DMSO-val hígítva -20°C -on tároltuk felhasználásáig. Az OA-t a tenyésztő médiumhoz kevertük a megfelelő koncentráció eléréséhez szükséges mennyiségekben. A kultúrák OA-kezelése többféle módon történt.

1. A kultúrákhoz 5, 10 és 20 nM OA-t adtunk a tenyésztés 2. és 3. napján 4 óra időtartamig (a behatási idő leteltével normál táptalajra cseréltük a médiumot).
2. Néhány esetben 50 és 100 nM OA-t adtunk hasonló intermittáló módon.
3. Más tenyészeteket az első vagy a második tenyésztési naptól kezdve folyamatosan 2, 4, 6, 8, 10 és 20 nM OA-val kezeltünk a tenyésztés befejezését jelentő 6. napig.

A kísérletek kezdete során egyes kultúrákat a hígított OA-k oldószerének (DMSO) megfelelő koncentrációival kezeltünk. Mivel a DMSO-t kapott és a kezeletlen kontrol kultúrák között nem tapasztaltunk eltérést, ezért a későbbiek során csak kezeletlen kontrollokat alkalmaztunk.

3.3. Protein kináz A gátlása H89 inhibitorral

A PKA jelátviteli útnak a porcdifferenciáció szabályozásában játszott szerepét egy sejtporcs permeábilis kináz inhibitornak, a H89-nek a tenyésztőmédiumhoz való adásával tanulmányoztuk. A H89-et (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA) DMSO-ban feloldva, 10 mM törzsoldatként -20 °C-on tároltuk felhasználásáig. A kultúrákat a tenyésztés első napjától négy kísérleti csoport kialakításával kezeltük 20 µM H89-cel:

1. kezeletlen kontroll
2. 20 nM OA-kezelés a 2. és 3. tenyésztési napokon
3. folyamatos H89-kezelés az első naptól
4. folyamatos H89-kezelés az első naptól kombinálva 20 nM OA-kezelés a 2. és 3. tenyésztési napokon.

3.4. Fénymikroszkópos szerkezet vizsgálata és képanalízis

A kezelt és kezeletlen HD-kultúrákat a tenyésztés befejezését jelentő 6. napon 40 % formaldehid és abszolút alkohol 4:1 arányú keverékével fixáltuk. A kultúrákat dimetilmetilénkék (DMMK; Aldrich, Steinheim, Germany) 3 %-os ecetsavban oldott 0,1 %-os oldatával 5 percig festettük, 3 %-os ecetsavval mostuk, majd gumiarábikummal lefedtük (Módis, 1991). Magas PG-tartalmánál fogva a porcmatrix erős, vörös metakromatikus színben látszik az alacsony pH-n történő DMMK festést követően, míg az ortokromatikus kék festődés elhanyagolható ilyen körülmények között. A kultúrák fénymikroszkópos szerkezetét 0,1 % -os vizes DMMK festés után vizsgáltuk.

A porccsomók nagyságát kompjuteres képanalízis segítségével hasonlítottuk össze a különböző kísérleti csoportok között. A képanalízishez Hitachi HV-C20 videokamerát, Leitz Diaplan mikroszkópot és IMAN 1.4 (KFKI, Budapest, Magyarország) szoftvert használtunk. A különböző kísérleti csoportokhoz tartozó, 25-25, illetve 10-10 kultúra közepének $6,8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ -es részletében hasonlítottuk össze a porccal fedett területek átlagos nagyságát. Az adatok statisztikai analízisét ambiguity-próbával végeztük el (Bartels, 1979; Módis, 1991).

3.5. Aktin mikrofilamentumok jelölése TRITC-falloiddinnel

A kultúrákat PBS-sel kétszer mostuk, majd -20°C -ra hűtött acetonban 20 percig fixáltuk. A fixálást követően szobahőmérsékletű PBS-es mosással tártuk fel a sejteket. Az aktin filamentumokat $0,2\ \mu\text{g/ml}$ PBS-ben oldott phalloidin-TRITC (Sigma) 1 órás nedves kamrában történt alkalmazásával mutattuk ki. Ismételt PBS-es mosásokat követően a kultúrákat Mowiol 40-80-nal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) fedtük le, majd Zeiss LSM 400 lézer konfokális mikroszkóppal, x40 NA plan neofluar objektívvel, 543 nm HeNe laserrel gerjesztve, LP 570-es emissziós filtert alkalmazva vizsgáltuk. A képeket LSM 3.8 alaprogram és szoftvercsomag segítségével állítottuk elő.

3.6. Elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok

A különböző beavatkozásoknak a sejtek szerkezetére, illetve a porc extracelluláris matrixának morfológiájára gyakorolt hatásait 6 napos kezelt és kezeletlen kontroll kultúrák porcos részleteinek elektronmikroszkópos összehasonlításával elemeztük. A sejtek szerkezetének vizsgálatára $0,02\ \text{M}$ PBS-sel való mosást követő, PBS-ben oldott $2,5\ \%$ glutáraldehides fixálás (Merck, Darmstadt, Germany) 4°C -on egy éjszakán át tartó alkalmazása után került sor.

Az ECM PG-jait a következő protokoll szerint vizsgáltuk: a kultúrákat kétszer átmostuk PBS-sel, majd 10 perces $2,5\ \%$ -os glutáraldehides előfixálást követően a fedőlemezről leválasztott kultúrákon *en bloc* festést alkalmaztunk. $0,05\ \text{M}$ nátrium-acetát pufferben (pH 5,8) oldott $2,5\%$ glutáraldehid, $0,5\ \%$ kuprolinkék (CB; BDH Chemicals, Poole, England) és $0,3\ \text{M}$ MgCl_2 keverékével (módosítva van Kuppevelt és mtsai 1985-ben leírt módszerét), egy éjszakán át, $4\ ^{\circ}\text{C}$ -on festettünk. A kultúrákat PBS-sel alaposan kimosva 1 órára $0,5\ \%$ -os vizes nátrium-wolframát oldatba tettük. Ezt követően mindkét fixálási módszerrel készült minták központi, porcos részének kb. $1\ \text{mm} \times 2\ \text{mm}$ -es darabkáit dehidráltuk és Durcupan ACM-be (Fluka, Buchs, Svájc) ágyasztuk be. A vékony metszeteket slot gridekre téve, a CB nélkül fixált mintákon ólom-citrát és uranil-acetát utókontrasztot végeztünk. A metszeteket a Japán-Magyar Elektronmikroszkópos Központ JEOL transzmissziós elektronmikroszkópjával vizsgáltuk.

3.7. Kollagén- és proteoglikán minták preparálása

Nyolc napos tenyésztést követően a kezelt és kezeletlen kultúrákat a fedőlemezeiről leválasztottuk, folyékony nitrogénben homogenizáltuk és az oldódó fehérjéket 4 M guanidin-HCl-dal (Reanal, Budapest, Hungary), proteázgátlók jelenlétében +4 °C-on, 48 óráig extraháltuk (Glant és mtsai 1986). Az extrakciót követően a mintákat centrifugáltuk, a felülúszókat erőteljesen dializáltuk desztillált víz ellenében, majd fagyasztva szárítottuk. A kollagéneket kinyerendő a pelleteket 0,5 M ecetsavban mostuk és 48 órán át pepsinnel (Sigma) emésztettük. A felülúszókat tovább tisztítottuk DEAE-Sepharose CL-6B oszlopokon (Pharmacia, Uppsala, Svédország), 0,1 M ecetsavas dialízis után fagyasztva szárítottuk majd valamennyi minta fehérje és uronsav tartalmát megmértük (Cs-Szabó és mtsai, 1995).

3.8. Agaróz-poliakrilamid kompozit és SDS-poliakrilamid gélek, Western blotok

A porc kivonatokat nagy pórusméretű agaróz-poliakrilamid kompozit géleken elemeztük (Cs-Szabó és mtsai, 1995). A géleket toluidinkékkel festettük meg, hogy a PG-akat láthatóvá tegyük. A pepszin-emésztett mintákat 10 % poliakrilamid minigéleken, redukált körülmények között szeparáltuk (Laemmler, 1970). A fehérjéket elektroforetikus úton, TRIS/glicin pufferben (pH 8,6) 80 V feszültséggel 1 óra alatt nitrocellulóz membránra (Millipore, Bedford, USA) vittük át. A nitrocellulóz membránokat 5 %, 20 mM TRIS pufferben (pH 7,6) oldott BSA-nal, 137 mM NaCl jelenlétében, szobahőmérsékleten, 2 órán át kezeltük, majd csirke I., valamint II. típusú kollagén ellen termeltetett poliklonális antitestekkel (Bioscience Resource Project, Kennebuck, USA) egy éjszakán át reagáltattuk. Az antitestek az adott kollagéntípusra nagymértékben specifikusak, egymás antigénjeivel nem keresztreakálnak. A géleket erőteljesen átmostuk TWB-TWEEN-ben, majd az első antitestet tormaperoxidázzal konjugált nyúl Ig ellenes másodlagos antitest (DAKO, Glostrup, Dánia) szobahőmérsékleten 2 órán át tartó alkalmazásával mutattuk ki. A kollagénspecifikus csíkokhoz bekötődött antitest-komplexeket H₂O₂ szubsztráttal és diamino-benzidin kromogénnel tettük láthatóvá. Mivel a HD-kultúrák nem csak porcsejteket, hanem elsősorban a kolóniák periferiáján, mezenchimális sejteket és fibroblasztokat is tartalmaznak, az I. típusú kollagén jelenlétének kimutatásával arra a tényre kívántunk rámutatni, hogy az általunk végzett kísérletek nem befolyásolják károsan a kultúrákat normálisan is alkotó egyéb sejtek jellemző bioszintetikus aktivitását sem.

3.9. Enzimaktivitás mérések

A kezeletlen kontroll sejtekben mérhető PP2A enzimaktivitásokat 1, 2, 3, 4 és 6 napos korban, a fedőlemezekről mechanikus úton (műanyag sejtkaparó lapáttal) eltávolított kultúrák homogenizátumában vizsgáltuk. Az eltávolítás előtt és után a kultúrákat fiziológias NaCl oldatban mostuk, centrifugáltuk (1200 rpm, 4°C, 5 perc), majd Eppendorf csövenként 3-4 kultúrát, 100 µl proteázgátlókat tartalmazó homogenizáló pufferbe (50 mM TRIS pH 7,5, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 50 mM β-merkaptóetanol) tettük. A mintákat felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Kiolvasztás után a kultúrákat homogenizálás és a sejtek feltárása végett szonikáltuk (Branson Sonifier, Danbury, USA; pulzáló, 60 ciklus, 2 perc), majd centrifugáltuk (10000 rpm, 4°C, 15 perc). A felülúszóból vett mintákon ³²P-jelzett foszforilázzal (10 µM) foszfatáz aktivitásméréseket végeztünk, ahol egy egység proteinfoszfatáz 1µmol P_i-t szabadít fel a foszfoszubsztrátból. Az aktivitásmérések részletes leírása Murányi és mtsai 1998-ban megjelent közleményében található.

A PKA aktivitás mérése ³²P-nak [γ -³²P]ATP-ből (Amersham Pharmacia, Biotech, UK) hiszton IIA szubsztrátba (Sigma, St. Louis, MO, USA) való beépülésének detektálásával történt (Corbin, 1974). Az aktivitásmérésekhez a mintákat ugyanúgy preparáltuk, mint a foszfatáz-assay-k esetében tettük azt.

3.10. PKA α -katalitikus alegység, valamint CREB és P-CREB mennyiségének vizsgálata immunoblottal

A 100 µl lízis-pufferben felvett mintákhoz 1/5 rész 5x-ös töménységű elektroforézis mintapuffert (310 mM TRIS pH 6,8, 10% SDS, 50 % glicerol, 100 mM DDT, 0,01% bróm-fenolkék) adtunk és 10 percig forraltuk. A minták szeparálása (10 % SDS-PAGE) után 17 órán át, 25V feszültséggel átvittük azokat nitrocellulóz membránra. A membránt PBS-ben oldott 5 % zsírmentes tejpor és 0,1 % Tween keverékével blokkoltuk, majd a PKA α -katalitikus alegység N-terminálisának 7-21 aminosavmaradéka ellen termeltetett antitestnek (Calbiochem, San Diego, CA, USA) az 1:1000 hígításával reagáltattuk. Második antitestként tormaperoxidázzal konjugált, kecskében termeltetett nyúl IgG-ellenes antitestet (1:5000) alkalmaztunk. A jeleket kemilumineszcenciás módszerrel tettük láthatóvá (Amersham Pharmacia Biotech, UK). A CREB és P-CREB

vizsgálata a fentebb leírtakkal megegyező módon előkészített mintákból, azonos módszerrel, az alábbi első antitestek felhasználásával történt: peptidszekvencia ellen termeltetett anti-CREB és anti P-CREB antitestek, 1:1000-es hígításban (Upstate, Lake Placid, NY, USA).

3.11. A sejtproliferáció vizsgálata ³H-timidin-beépülés mérésével, valamint BrdUrd-inkorporáció változásainak vizsgálatával

A tenyésztéshez használt sejtszuszpenzió 15 µl-es cseppjeit 96 lyukú mikrotiter plate-ek lyukaiba cseppentettük és ugyanolyan kísérleti körülmények között tenyésztettük, mint a Petri csészékben növekvő kultúrákat. A 2. tenyésztési napon, a második OA kezelést követően 1 µCi/ml ³H-timidint (törzsoldat: metil-³H-timidin, 37 MBq, 1 mCi/ml 185 GBq; Amersham, Little Chalfont, UK) adtuk minden egyes kultúra tápfolyadékához 16 órával. A médium eltávolítása után néhány órával normál táptalajban tartottuk a kultúrákat, hogy az esetleg aspecifikusan bekötődő radioaktív anyag kimosódjon. Ezt követően PBS-sel kétszer átmostuk a kultúrákat, majd 5 % triklórecetsav 20 perces alkalmazásával kicsaptuk a szolubilis fehérjéket, kalcium/magnézium-mentes PBS (CMF-PBS)-es öblítéseket követően a tenyésztetek sejtjeit CMF-PBS-ben oldott 0,25 % tripszinnel emésztettük (1:250, Sigma) (37°C, 10 perc), végül félautomata sejt-harvesterrel (Skatron, Lier, Norvégia) szüreteltük. A sejteket szcintillációs filterpapírra szárítottuk rá, majd a szcintillációs folyadék hozzáadása után a radioaktivitást béta-számlálóval (Pharmacia, Uppsala, Svédország) mértük. Ugyanilyen módon vizsgáltuk a sejtek proliferációjának változásait 3 és 6 napos kezelt és kezeletlen kultúrákban. A mérési adatok statisztikai elemzését F-próbával végeztük.

A proliferáció BrdUrd beépüléssel történt vizsgálatát Balázs és mtsai (1991) módszere szerint végeztük. A véletlenszerűen kiválasztott 2, 3, és 6 napos OA-kezelt és kezeletlen kontroll kultúrák médiumához 20 µM BrdUrd-t (Sigma) adtuk 1 órával, majd a kultúrákat CMF-PBS-sel mostuk. A kolóniákat 0,15 % EDTA és 0,25 % tripszin keverékével 10 percig, majd 5x10⁶ E/mg pronázzal (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 55 percig emésztettük, centrifugáltuk, CMF-PBS-sel mostuk és ismételt centrifugálás, reszuszpendálás után CMF-PBS-ben oldott, előhűtött 70 %-os etanollal fixáltuk, 4 °C-on tároltuk. A fixált sejteket Cytospin-3 centrifugával (Shandon, Astmoor, UK) szélesztettük tárgylemezre, majd levegőn kiszárítottuk. A sejteket 2,5 M HCl és 0.5 % Triton-X 100

PBS-ben oldott keverékével 10 percig denaturáltuk és permeabilizáltuk, majd monoklonális anti-BrdUrd antitesttel (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA; 1:50) 1 órán át reagáltattuk. PBS-sel való mosás után második antitestként anti-mouse IgG- FITC (Sigma; 1:500, 30 perc) jelölést alkalmaztunk, a sejtmagokat propidium-jodiddal (Vector, Burlingame, CA, USA) megfestettük és a BrdUrd pozitív sejtek arányát számoltuk a teljes sejtmag-festett sejtszámhoz viszonyítva. Mivel a sejtproliferáció változásainak tendenciái mindkét módszerrel azonosnak bizonyultak, ezért a H89-kezeléssel kombinált kísérletsorozat esetében már csak a timidinbeépülés változásait vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Fénymikroszkópos morfológia az OA-kezelések után

Ismert, hogy a HD-kultúrákban növekvő sejtek túlnyomó többsége olyan mezenchimális sejt, melyek több lépéses differenciációs folyamat során, a tenyésztés második és harmadik napján porcsejteké alakulnak. A metakromáziás porcmatrix megjelenése a harmadik tenyésztési nap végétől látható. A kolóniákban nem túl nagy számban ugyan, de mioid és epiteliális sejtek is jelen vannak, valamint a kultúrák központi, porcosodó részét mindig körülveszi egy változó kiterjedésű, nyúlványos mezenchimális/fibroblaszt típusú sejtekből álló „gallér”.

4.1. táblázat

Kísérleti csoportok <i>n</i> = 25 minden csoportban	Átlagos metakromáziás terület (μm^2)	SD	Relatív átlagos terület (%)
kontroll	1664927	382933 (23 %)	100
5 nM OA	2006462*	280904 (14 %)	120
10 nM OA	2239856**	425572 (19 %)	134
20 nM OA	3579721***	680146 (19 %)	215

*A = 0,790 (kis különbség)

**A = 0,624 (lényeges különbség)

***A = 0,08 (teljes elkülönülés)

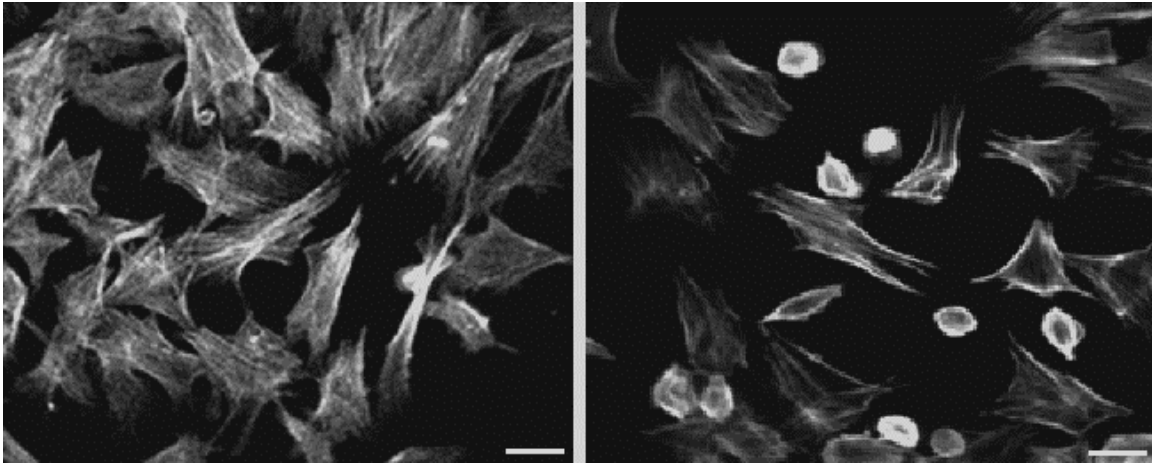
4.1. táblázat. A metakromáziás porcterületek nagyságának változásai az alkalmazott OA-koncentrációk függvényében

A metakromáziásan festődő porcmatrixszal fedett területek nagyságát 6 napos high density kultúrákban $6,8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ nagyságú központi területekben mértük savas DMMK festést követően. Az adatokat hisztogramokon ábráztuk és ambiguity próbával (Bartels, 1979; Módis, 1991) értékeltük. Ezt a próbát alkalmazva, egy ún. ambiguity értéket (A) számolunk, melynek értéke 1,0 (nincs különbség) és 0 (teljes elkülönülés) között változhat. Ha $A < 0,7$, a két adathalmaz között szignifikáns eltérés van.

A DMMK-festést követően metakromáziásan festődő, porcnak megfelelő területek nagyságának mérésével nyert eredményeink egyértelműen igazolják, hogy az OA koncentráció-függő módon serkentette a HD-kultúrákban a porcképződést. A második és harmadik tenyésztési napon alkalmazott 5 nM OA 20 %-os, nem szignifikáns porcterület-növekedést okozott. Amennyiben 10, illetve 20 nM koncentrációkban adtuk az OA-t 34, illetve 115 %-os szignifikáns mértékű porcterület-növekedést mértünk (4.1. táblázat).

Az OA kezeléseket követően a tenyésztés végére kialakuló porccsomók, valamint a kultúrák egyéb részleteinek fénymikroszkópos morfológiája, amint azt vizes DMMK festést után láttuk, megegyező volt a kezeltlen kontroll kultúrákban növekvő kolóniák felépítésével.

Az OA-kezelések időpontjának kiválasztása kritikus volt a kísérletek eredményessége szempontjából. Valamennyi sejtet elveszítettük, ha az OA adását a sejtszuspenziók kicseppentését követően, a 0. napon megkezdjük és a sejtek többsége felvált, ha az első OA-kezelést az 1. tenyésztési napon hajtottuk végre. Ha az OA adását a negyedik tenyésztési napon vagy annál később kezdtük, a porcképződés mértéke gyakorlatilag változatlan maradt. A nyúlványos mezenchimális sejtek 10 nM és 20 nM OA adását követően egyaránt nagyszámban kerekedtek le. Az OA magasabb koncentrációkban (50 és 100 nM) való alkalmazása – feltehetően a szer toxicitása miatt – a kultúrák felváltását és degenerációját okozta. Alacsonyabb OA-koncentrációk (4, 6, 8 és 10 nM) folyamatos alkalmazása mellett a kultúrák részben vagy teljesen leváltak a festési eljárás során a fedőlemezről, így ezeknek a kísérleteknek az eredményeit nem lehetett mérésekkel dokumentálni, bár a porcosodás dózis-függő, a koncentráció emelkedésével egyre erősödő serkentése nyomon követhető volt. Az OA 2 nM-os koncentrációban való adásának (ez a PP2A aktivitás félmaximális gátlásának megfelelő koncentráció!) látható hatása nem volt. Ez arra utal, hogy az OA intracelluláris koncentrációja feltehetőleg alacsonyabb, mint a tenyésztő médiumban mérhető koncentrációk, a sejtpermeabilitás nem kielégítő volta miatt.



4.1. ábra. Lézer konfokális mikroszkóppal készült mikrofotók TRITC-falloidinnel jelölt, 3 napos HD-kultúrákról

A kezeletlen kontroll kultúrákban megtartott aktinfilamentum rendszer ábrázolódik **(a)**, 20 nM OA adását követően az aktin filamentumok számos sejtben széttöredeztek és a sejtmembrán alatti nem filamentózus elrendeződésű aktin látható, az ilyen változást szenvedett sejtek lekerekedtek **(b)**. A skála 25 μm -t jelképez.

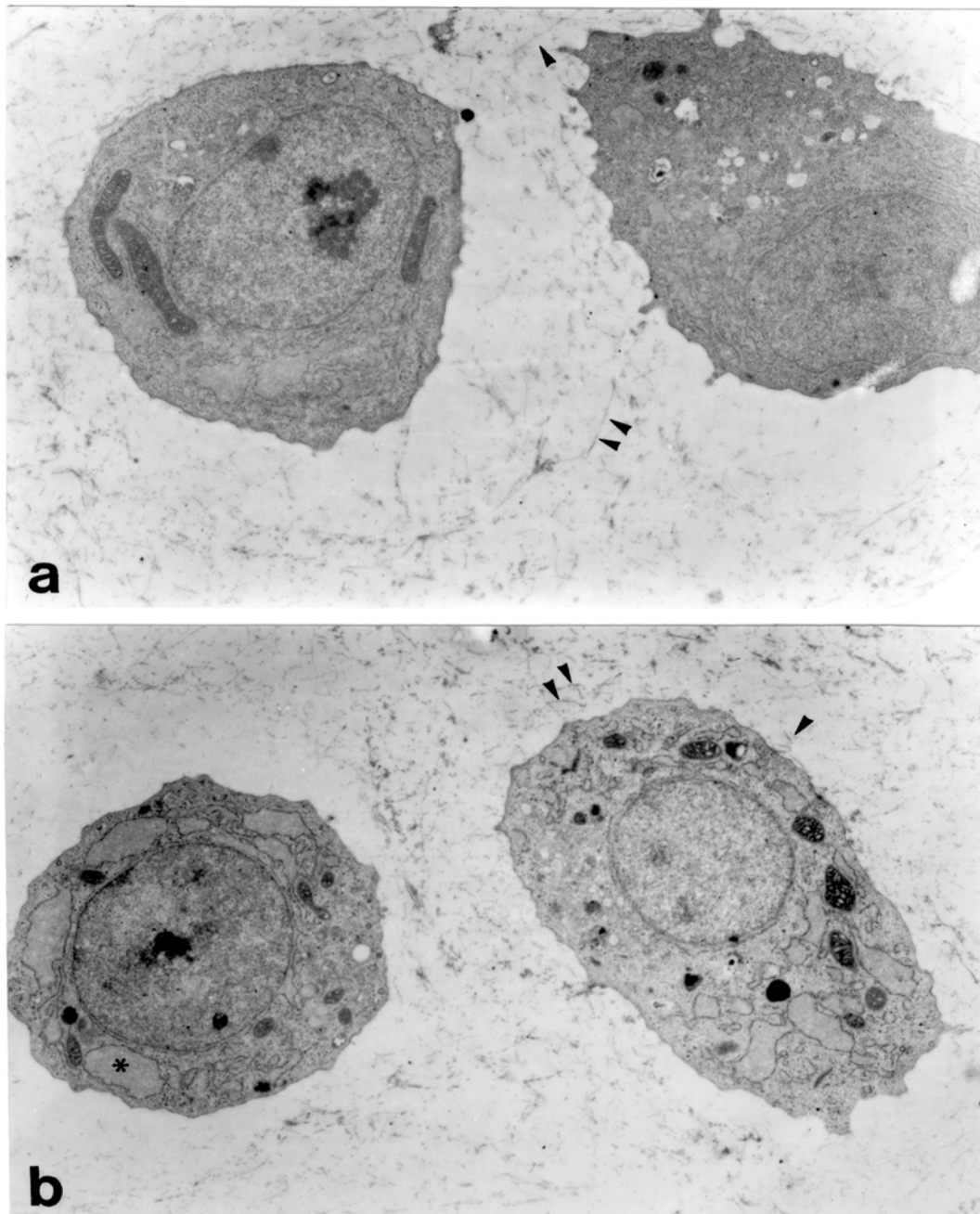
Mint azt TRITC-phalloidin jelölést követően konfokális mikroszkóppal vizsgálódva láthattuk, a sejtek lekerekedését az aktin filamentumok széttöredezése és az aktin sejtmembrán alatt való tömörülése okozta (4.1. ábra). A folyamat reverzibilisnek bizonyult, az aktin filamentózus szerveződése az OA eltávolítását követően néhány órán belül visszaállt.

Az elektronmikroszkópos felvételek tanubizonyosága szerint, az OA-kezelést követően kialakult porcsomókban a sejtek nagymértékben hasonlítanak a kezeletlen kolóniák porcsejtjeihez, az egyetlen különbség a kissé tágultabb endoplazmatikus retikulum ciszternák nagyobb számú jelenléte (4.2. ábra a és b rész).

4.2. A porcmatrix elektronmikroszkópos morfológiai és biokémiai elemzése

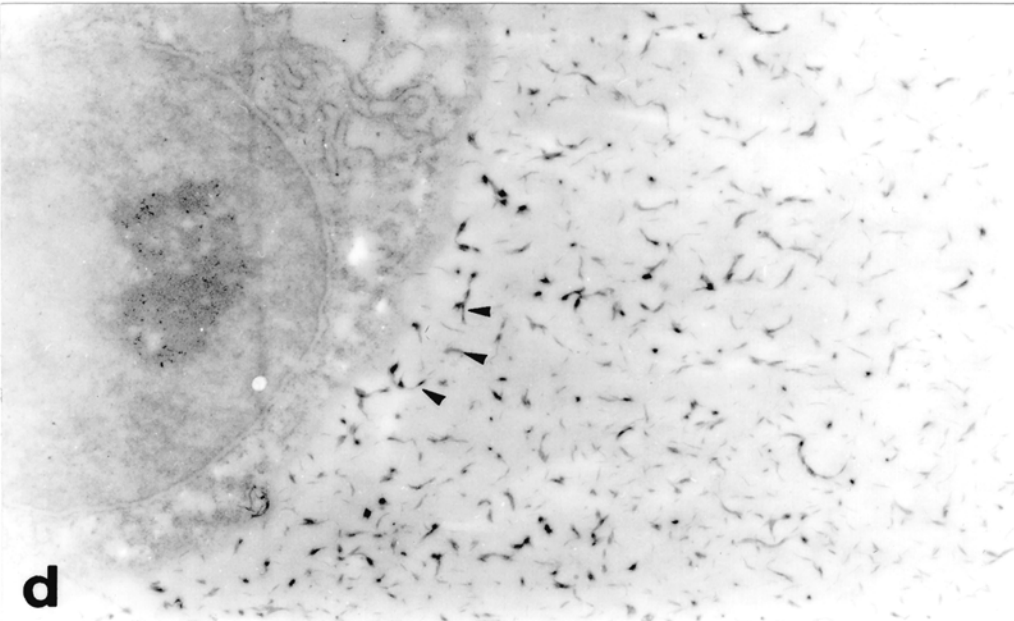
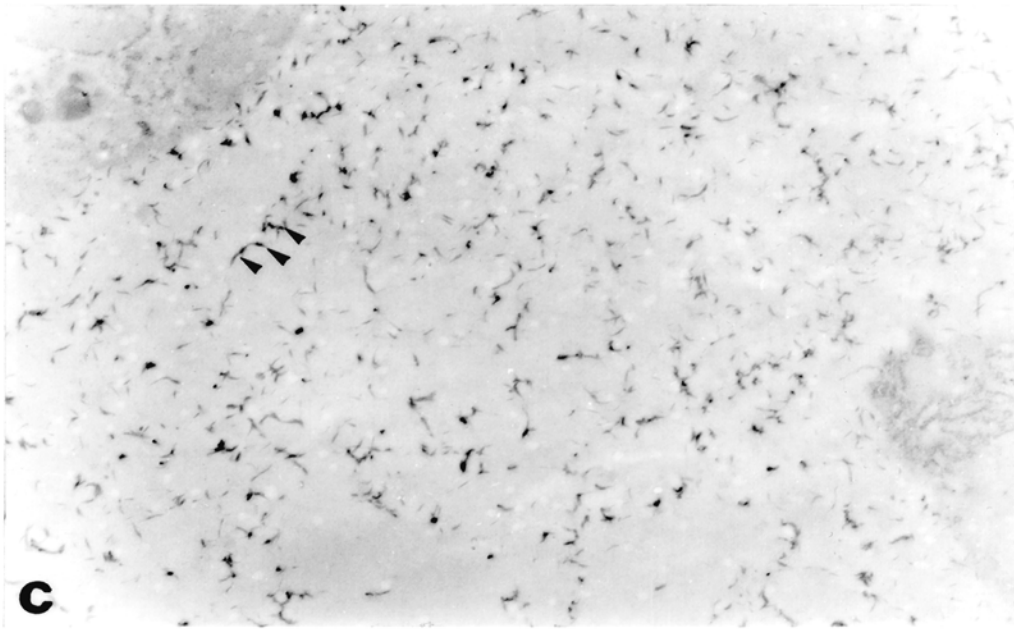
A kultúrák porcmatrixának elektronmikroszkópos elemzése során mind a kezeletlen, mind a 20 nM OA-val kezelt kolóniákban vékony kollagénfilamentumok által kialakított rosthálózat volt látható (4.2. ábra a és b rész). A PG molekulákat szelektíven kimutató körülmények között alkalmazott kuprolinkék festéssel egyértelműen látható volt, hogy a kezeletlen és az OA-kezelt kultúrák porcmatrixában a PG-k alakja, eloszlása akár a

pericelluláris, akár a sejtektől távolabbi matrix-részleteket vizsgáltuk, nem mutatott lényeges eltérést (4.2. ábra c és d rész).



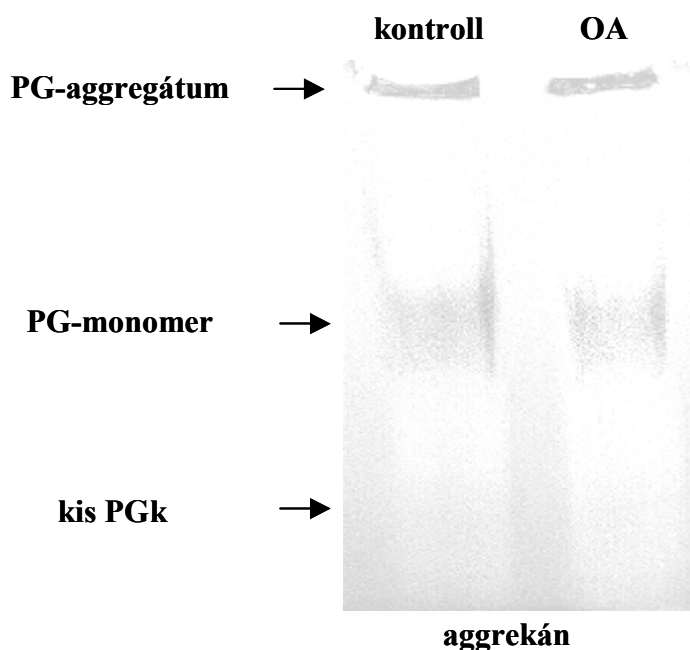
4.2. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek 6 napos HD-kultúrákról

A kezeletlen kontroll **(a)** és a 20 nM OA-val kezelt **(b)** kultúrákban található kondrociták morfológiája erőteljes hasonlóságot mutat. Mindkét kísérleti csoportban található sejtek nagyfokú bioszintetikus aktivitására utalnak a tágult endoplazmatikus ciszternák (*). Finom kollagén filamentumok (nyílhegyek) találhatóak a sejtek körüli ECM-ban.



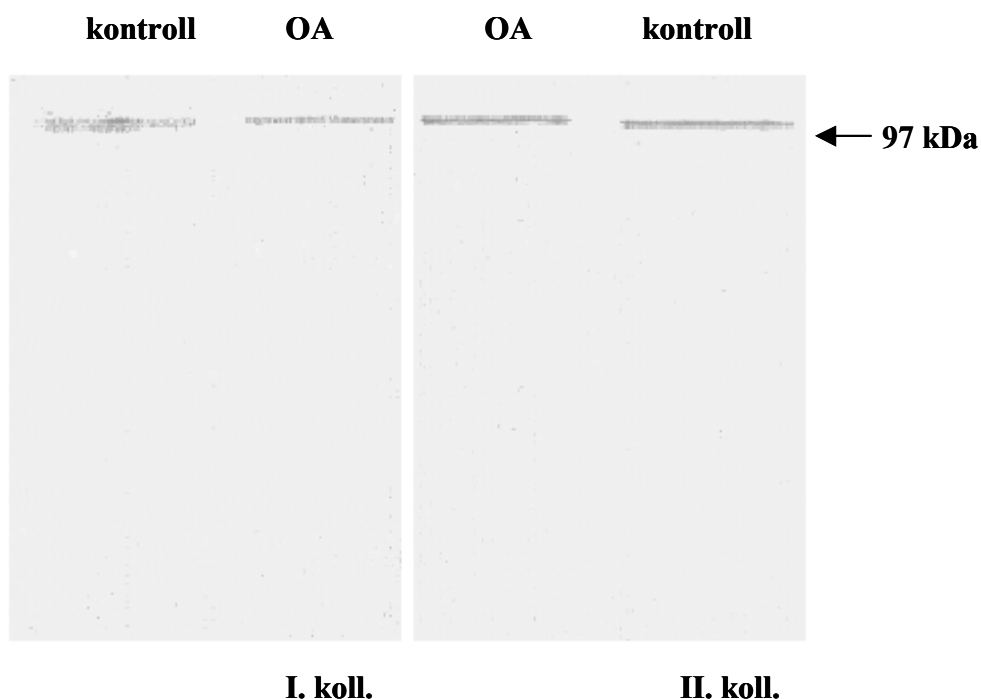
En bloc CB-festéssel mutattuk ki a kultúrák ECM-ban található PG-kat (nyílhegyek), melyeknek mérete és alakja azonos volt a kezeletlen **(c)** és a 20 nM OA-val kezelt **(d)** tenyészetek ECM-ban.

A biokémiai elemzések során azt tapasztaltuk, hogy a 20 nM OA-val kezelt kultúrák nedves súlya lényegesen nagyobb volt, mint a kezeletlen kontrolloké, de az egységnyi (1 mg) tömegű fagyasztva-száritott tenyészetekben mért fehérje- és uronsav-tartalom megközelítőleg azonos értékeket mutatott. A PG-k méretbeli megoszlása és a különböző molekulatömegű PG-k aránya ugyanolyan volt a kezeletlen és a kezelt kultúrákban, amint a kompozit gélekben látható sávok mutatják (4.3. ábra). Ezen belül, a legnagyobb mennyiségben izolált PG molekula mind a kezelt, mind a kezeletlen kultúrákban az aggregátnak megfelelő molekulatömeggel rendelkezett.



4.3. ábra. A kultúrák ECM-nak PG összetétele gélelektroforézissel vizsgálva

A 8 napos kultúrák homogenizátumát 4 M-os guanidium HCl-dal extraháltuk és poliakrilamid kompozit gélekre töltve, toluidinkék festéssel mutattuk ki a különböző molekulatömegű PG molekulákat. A kezeletlen kontroll és a 20 nM OA-val kezelt kultúrák PG összetétele teljesen hasonló mintázatot mutat, egyaránt megtalálhatók a hialuronsav-aggregán aggregátumok (felső sáv), aggregán monomerek (középső sáv), valamint a kis molekulatömegű PG-k (alsó sáv).



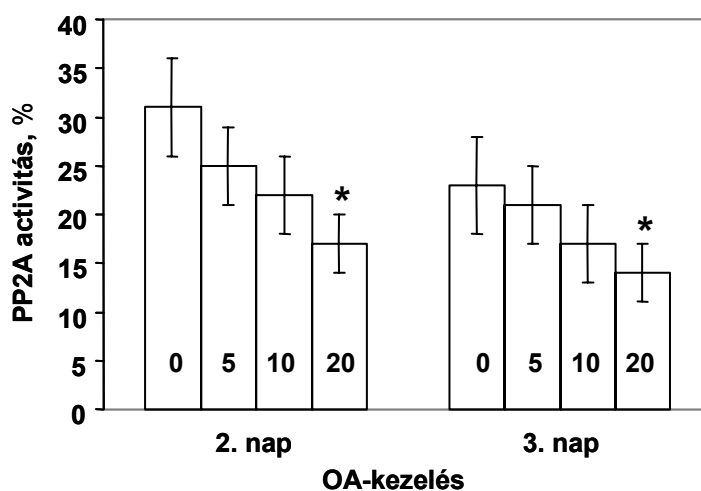
4.4. ábra. A kultúrák ECM-ban jelenlévő főbb kollagén típusok elemzése immunoblottal. A 8 napos kultúrák homogenizátumát pepsinnel emésztettük, majd az Anyag és Módszer fejezetben leírtak szerint immunoblottoltuk. A membránokon egyetlen sáv volt látható, mely megfelel az I. illetve II. típusú kollagének kb. 100 kD-os molekulatömegű α láncainak.

A kultúrák matrixában jelenlévő kollagének típusmegoszlása azonos volt mindkét kísérleti csoportban (4.4. ábra). Az OA kezelést követően csökkent mennyiségben izoláltunk I. típusú kollagént a kultúrák matrixából, ami annak a következménye, hogy az OA-kezelt kolóniák perifériáján kevesebb mezenchimális sejt található, mint a kezeletlen kontroll kultúrákban. A pepszinnel oldott mintákban csupán egy, 100 kDa molekulatömegű fehérjesáv festődik, ami az I. és II. típusú kollagének α láncának felel meg.

4.3. Protein foszfatáz aktivitásmérések a HD-kultúrák homogenizátumainak felülúszóiban

A HD-kultúrák homogenizátumainak felülúszóiban mértük a protein foszfatáz enzim-aktivitásokat. A különböző OA koncentrációk mellett detektált foszfatáz aktivitások

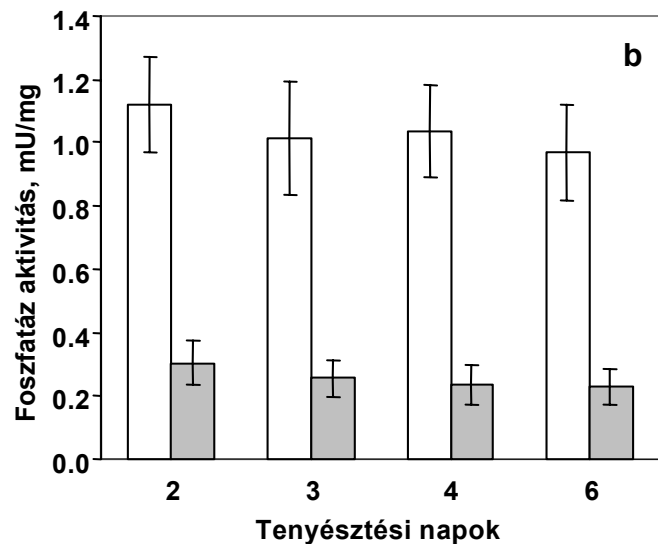
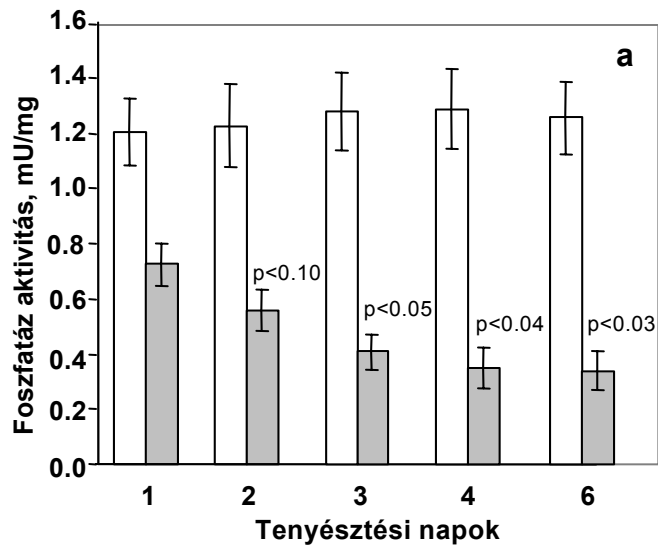
szignifikáns csökkenést mutattak már 2 nM OA jelenlététől kezdve, mely tény egyértelműen bizonyítja, hogy az így mért enzim-aktivitás PP2A katalitikus tevékenységének az eredménye. Mivel 10 μ M OA teljesen gátolta a foszfatáz aktivitást a homogenizátumokban, ezért arra következtettünk, hogy a HD-kultúrákban jelen lévő foszfatáz aktivitás a PP2A és a PP1 katalitikus működésének a következménye. A kolóniákban a PP1 aktivitását inhibitor-2 jelenlétével szelektíven gátoltuk, majd így mértük a PP2A aktivitását.



4.5. ábra. A PP2A aktivitás változása az alkalmazott OA-koncentráció függvényében

A második és harmadik tenyésztési napokon 4-4 óráig alkalmazott 5, 10 és 20 nM OA-kezelés hatására csökkent a kultúrák homogenizátumainak felülúszóiban mérhető PP2A aktivitás. A kezeletlen kontrollhoz képest (0-val jelölt oszlop) szignifikáns aktivitás-gátlást okozott a 20 nM OA (* $P < 0.05$). A két napos kezeletlen kontrollban mért teljes foszfatáz aktivitást tekintettük 100 %-nak. A tenyésztés során alkalmazott OA koncentrációfüggő módon gátolta a PP2A aktivitását.

Amint azt a 4.5. ábrán bemutatjuk, a 2. és 3. tenyésztési napokon adott 20 nM OA szignifikánsan lecsökkentette a kolóniákban mérhető PP2A katalitikus aktivitását. A további mérések során arra a kérdésre kerestünk választ, hogyan változik az egyre idősödő és így egyre differenciáltabb porcsejteket tartalmazó kolóniákban mérhető PP1 és PP2A aktivitás.



4.6. ábra. A PP1 és PP2A aktivitás változása a kezeletlen kontroll tenyészetekben (a), illetve 20 nM OA hatására (b) a kultúrák életkorának függvényében

Az enzim-aktivitásokat különböző életkorú kezeletlen kontroll kultúrák homogenizátumainak felülúszóiban mértük. A PP1 aktivitását 2 nM OA (világos oszlopok), míg a PP2A aktivitását pedig 100 nM inhibitor-2 jelenlétében (sötét oszlopok) vizsgáltuk. A PP1-aktivitások alig változnak ($P > 0.65$), a PP2A-aktivitások azonban szignifikáns csökkenést mutatnak a kultúrák differenciálódásával párhuzamosan (a). A második és harmadik tenyésztési napon adott 20 nM OA a PP1 aktivitását nem befolyásolta, azonban szignifikánsan gátolta a PP2A-t és az aktivitás mindvégig igen alacsony, de változatlan szinten maradt ($P > 0.65$) (b). A statisztikai elemzéseket Student *t*-próbával végeztük.

Azt találtuk, hogy míg a PP1 enzimaktivitás magas és gyakorlatilag változatlan szintű marad a tenyésztés során, addig a PP2A aktivitása a sejtek differenciációjával

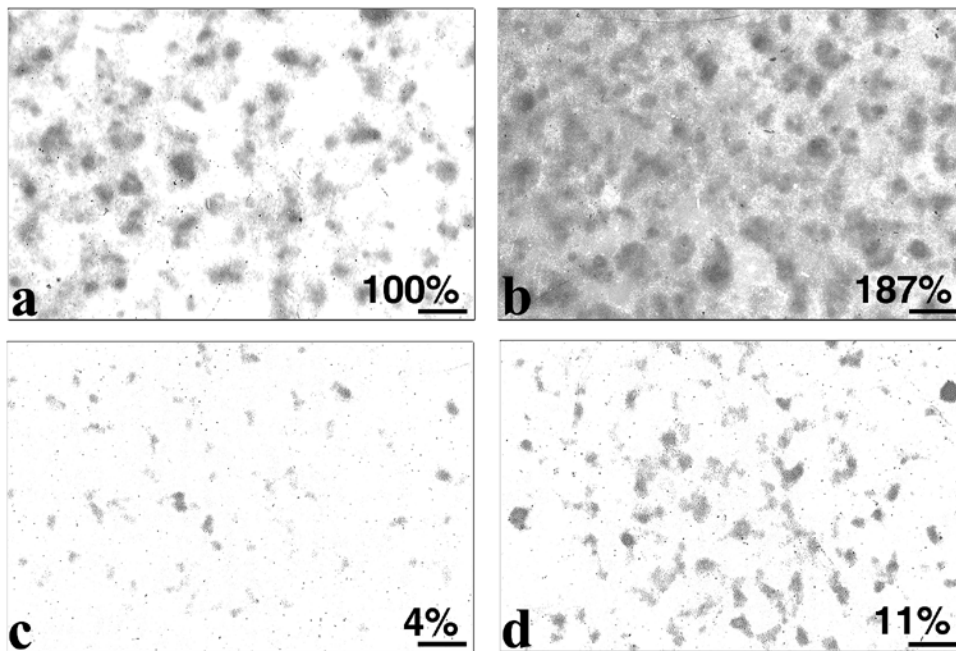
párhuzamosan egyre alacsonyabb szintre esik vissza. A legjelentősebb aktivitás-csökkenés a 2. és 3. tenyésztési napokon következik be (4.6.a ábra), amikor a HD-kultúrákban a porcsejtek differenciációja zajlik (Solursh és mtsai, 1978). Ezért úgy gondoljuk, hogy a PP2A-nak jelentősebb szerepe van a porcdifferenciáció szabályozásában, mint a PP1-nek. A tenyésztés folyamán mindvégig magas és változatlan PP1 aktivitás ezen enzim egyéb, a sejtek életében feltehetőleg nem kevésbé fontos folyamatokban vitt esszenciális szerepére utal. A 20 nM koncentrációjú OA kezeléseket követően a PP1 aktivitások változatlanok maradtak, azonban a PP2A aktivitása szignifikánsan lecsökkent a kontroll kultúrákban mérhető értékekhez képest, s a tenyésztés végéig alacsony szinten maradt (4.6. b ábra).

4.4. A H89-kezelés hatásai a porcdifferenciációra

Az első tenyésztési napot követően a tenyésztő médiumban folyamatosan jelenlevő H89 hatására, a 6 napos HD kultúrákban szinte teljesen hiányzott a porcképződés (kontroll 4 %-a), amint azt savas DMMK festést követően láttuk (4.7. ábra a és c rész).

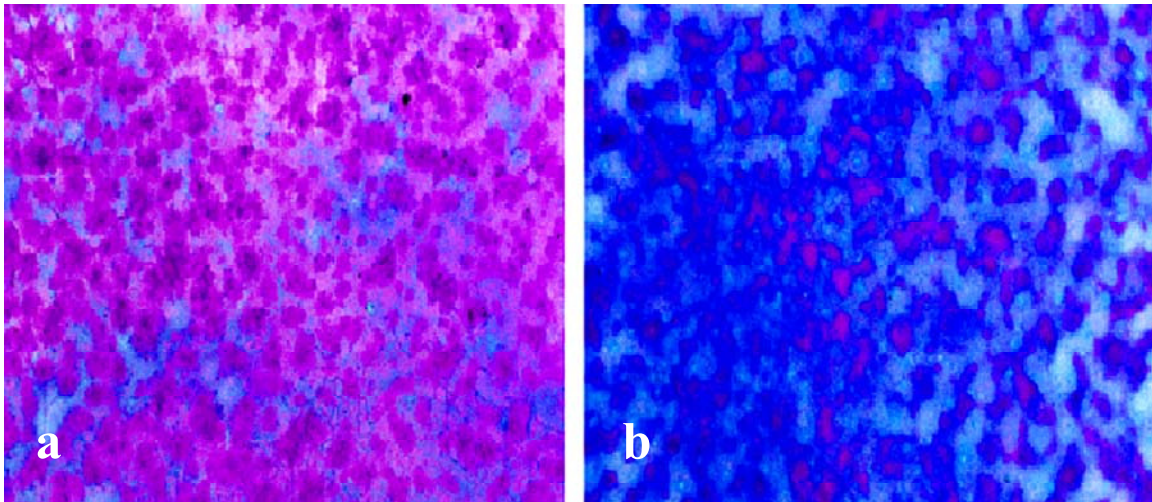
Ha a H89-cel kezelt kultúrákhoz OA-t adtunk a második és harmadik tenyésztési napon, a porcmatrixszal fedett területek nagysága háromszorosára nőtt (a kontroll 11 %-a) a 6 napos kultúrákban mérve (4.7. ábra c és d rész). Ezek mellett jól megfigyelhető a porcalapállománnyal fedett terület nagyságának jelentős (87 %-os) növekedése az OA-kezelés hatására (4.7. ábra a és b rész).

Vizes DMMK festéssel jól látható volt, hogy a H89-kezelt kondrogenikus sejtek kialakították a sejtaggregátumokat a tenyésztés kezdetén, mert számos ortokromáziásan festődő porccsomó volt látható a H89 kezelt kultúrákban. A kondenzációt követően a sejtek azonban feltehetőleg nem differenciálódtak tovább porcmatrixot termelő kondrocitákká (4.8. ábra), erre utal a kontroll kultúrákhoz képest elenyésző nagyságú metakromáziásan festődő porcmatrixszal borított részlete a H89-kezelt tenyészeteknek. Ebből a tényből arra következtettünk, hogy a PKA elsősorban a kondrogenikus sejtek differenciációjának későbbi lépését befolyásolja és kevésbé jelentős szerepet visz a sejtaggregátumok kialakulásának szabályozásában.



4.7. ábra. Metakromáziásan festődő porcterületek 6 napos high density kultúrában, 3 %-os ecetsavban oldott DMMK- kel történő festést követően

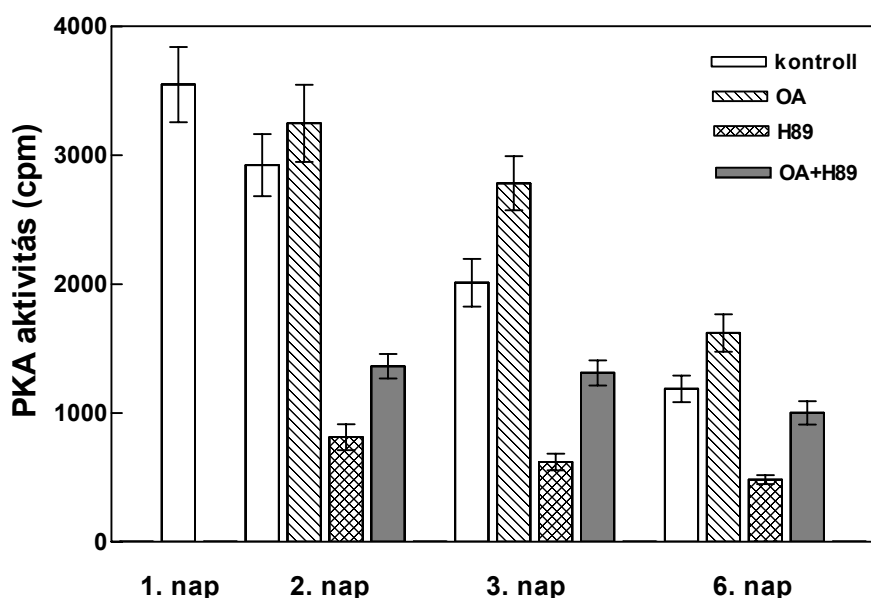
A porccal fedett területek nagyságát minden egyes kísérleti csoport esetében 10 különböző kultúra, egyenként $6,8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ nagyságú centrális területéről készült felvételekben mértük meg. Metakromáziásan festődött terület a kezeletlen kontroll csoportban **(a)**, a 2. és 3. tenyésztési napokon 20 nM OA-val kezelt **(b)**, a tenyésztés 1. napjától 20 μM H89-cel kezelt **(c)**, valamint 20 μM H89-cel és 20 nM OA-val együttesen kezelt tenyészetekben **(d)**. A metakromáziás területek kontrollhoz viszonyított százalékos nagyságát feltüntettük az egyes ábrarészleteken. A fotók több független kísérletben megfigyelték átlagát reprezentálják. Skála = 100 μm .



4.8. ábra. Kezeltelen kontroll (a) és H89-kezelt (b) 6 napos kultúrákban látható sejtkolóniák áttekintő képe vizes DMMK festést követően

A kontroll kultúrában (a) nagyszámú, metakromáziásan festődő porccsomó látható. A H89-cel kezelt kolóniák (b) metakromáziásan festődő részlete igen csekély, az ortokromáziásan festődő sejtcsoportok jelenléte azonban jól megfigyelhető.

4.5. A PKA aktivitás változásai a kontroll és a H89-kezelt kultúrákban

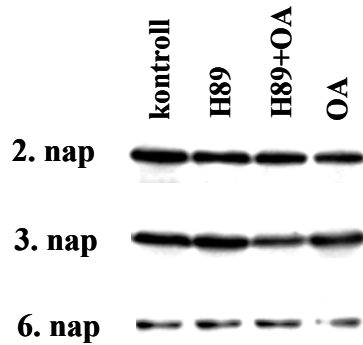


4.9. ábra. PKA aktivitások a különböző életkorú kultúrák homogenizátumainak felülúszóiban mérve

A HD-tenyészeteket 20 nM OA-t és/vagy 20 μ M H89-t tartalmazó, illetve normál táptalajjal etettük, az Anyag és Módszer fejezetben leírtaknak megfelelően. Az ábrázolt PKA aktivitási értékek 4 független kísérlet átlagértékei. A PKA aktivitás szignifikáns ($p < 0,02$) eltéréseket mutatott, kivéve a 2 napos-OA kezelt kultúrákban mért értékeket a 2 napos kontrollhoz viszonyítva, illetve a 6 napos H89+OA kezelt kultúrákat összevetve a 6 napos kezeletlen kontrollokkal (ezeket csillaggal jelöltük).

A különböző életkorú kontroll kultúrák homogenizátumainak felülúszóiban mért PKA aktivitások a porcdifferenciáció előrehaladtával párhuzamosan egyre csökkentek. A kontrollokhoz viszonyítva valamennyi vizsgált napon szignifikánsan alacsonyabb PKA aktivitásokat mértünk a 20 μ M H89-cel kezelt tenyészetekben, míg az OA-kezelés mind H89-cel párhuzamosan alkalmazva, mind anélkül jelentősen fokozta a kultúrákban mérhető PKA aktivitásokat (4. 9. ábra). Az enzimaktivitási mérések során a közegekhez adott OA nem befolyásolta a PKA aktivitásokat, csak a PP2A-t gátolta.

4.6. PKA α -katalitikus alegység (PKA-C α) mennyiségének változása

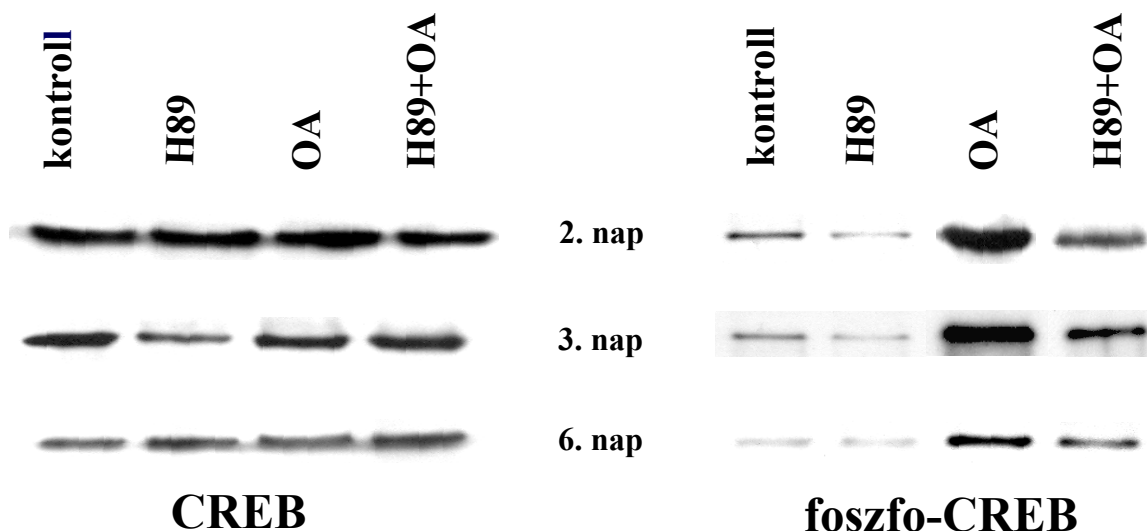


4.10. ábra. A PKA α -katalitikus alegység mennyisége Western blottal vizsgálva

A különböző életkorú kezeletlen kontroll és a különféle módokon kezelt kultúrákban a PKA α -katalitikus alegységet az N-terminális 7-21 aminosavmaradék ellen termeltetett monoklonális antitesttel mutattuk ki, az Anyag és Módszer fejezetben leírtak szerint. Az egyes futtatott oszlopoknak megfelelően mintegy 15 μ g fehérjét vittünk fel a nitrocellulóz membránra.

A PKA-C α mennyisége a porcdifferenciáció előrehaladtával fokozatosan csökkent a kontroll kultúrák lizátumában. A kontrollokhoz viszonyítva sem OA, sem H89 hatására nem változott az expresszálandó PKA-C α mennyisége egyik vizsgált kísérleti napon sem (4.10. ábra).

4.7. A CREB és P-CREB mennyiségének változásai a különböző életkorú kezeletlen, valamint OA- és H89-kezelt kultúrákban



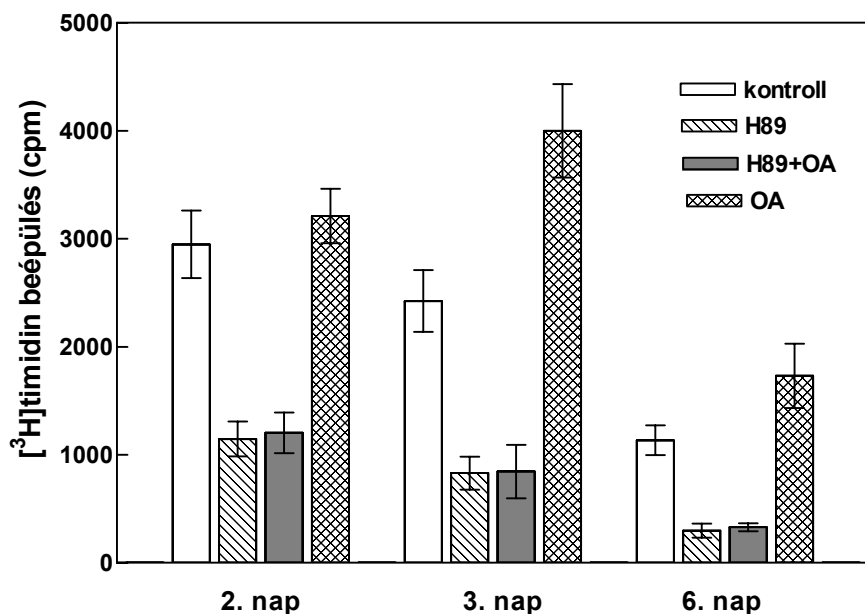
4.11. ábra. A CREB és P-CREB mennyiségének változásai Western blottal vizsgálva

A 2, 3 és 6 napos kezeletlen kontroll, OA-, H89-, valamint OA+H89-kezelt kultúrák lízispufferben felvett teljes lizátumából preparált mintákban az Anyag és Módszer fejezetben leírtak szerint mutattuk ki a CREB (a) és a P-CREB (b) mennyiségét.

A CREB és P-CREB mennyisége a porcdifferenciáció előrehaladtával nem változott jelentősen, amint azt a különböző életkorú kezeletlen kontroll tenyészetek lizátumaiban vizsgálva tapasztaltuk. OA hatására a CREB mennyisége kissé emelkedett, míg a P-CREB mennyiségének OA-kezelést követő erőteljes fokozódását tapasztaltuk valamennyi vizsgált napon. A leglátványosabb P-CREB-mennyiség-emelkedést a második tenyésztési napon alkalmazott OA-kezelést követően láttuk. A H89-kezelés kismértékben csökkentette a CREB, míg jelentős mértékben csökkentette a P-CREB mennyiségét a vizsgált kísérleti napokon. H89 és OA együttes alkalmazása után a kontrollokban talált sávok intenzitásához hasonló jeleket detektáltunk (4.11. a és b ábrák).

4.8. A sejtosztódás változásainak vizsgálata

Az egyes kísérleteken belül tapasztalt sejtproliferáció változások tendenciája ugyanaz volt, azonban a párhuzamos kísérletek mérési eredményeinek átlagolása nagy standard hibát eredményezett. Ezért a 4.12. ábrán egy reprezentatív kísérlet eredményeit mutatjuk be.



4.12. ábra. A sejtosztódás vizsgálata [³H]timidin-beépülés mértékének a mérésével

A radioaktív izotópot 16 óráig hagytuk a jelzett életkorú, különböző kísérleti csoportokhoz tartozó kolóniák táptalajában. Az adatok 4 független kísérletben tapasztalt eltérési tendenciákat ábrázolnak, egy kiválasztott kísérlet eredményei alapján. Kísérleti csoportonként 10-10 mintában mértük a radioaktivitást, a mérések SD-jét az oszlopokon feltüntettük. Az adatok statisztikai elemzését F-próbával végeztük, $p < 0,002$, az adott korú kezeletlen kontrollhoz viszonyítottnak nem szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük. Egyetlen kísérleti napon sem találtunk szignifikáns különbséget a H89-cel valamint a H89+OA-kezelt tenyészetek timidin-beépülései között.

Az idősödő és egyre differenciáltabb sejteket tartalmazó kezeletlen kontroll kolóniákban a sejtek proliferációs rátája fokozatosan csökkent, amint azt [³H] timidin beépülésének mérésével tapasztaltuk. A 20 nM OA adása fokozta a sejtek timidin-beépítését, szignifikáns proliferáció-fokozódást láttunk a 3. és 6. tenyésztési napokon. 20 μ M H89 hatására valamennyi vizsgált napon jelentősen csökkent a detektált triciált

timidin-beépülés. Meglepő módon, ha OA-t adtunk a H89-kezelt tenyészetekhez, a sejtproliferáció egyáltalán nem fokozódott. Mivel a BrdUrd beépülés analízisével nyert adatok alapján a sejtproliferáció-változás tendenciái azonosak voltak, ezért ezeket az eredményeket külön nem dokumentáljuk.

5. MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink során választ kerestünk arra a kérdésre, hogy milyen szerepet tölt be a PP2A és a PKA az *in vitro* porcképződés szabályozásában. Vizsgálataink során a PKA és a PP2A aktivitását szelektív inhibitorok alkalmazásával blokkoltuk. Először a sejtpermeábilis foszfatáz inhibitor OA porcdifferenciációra gyakorolt hatásait vizsgáltuk.

A különböző életkorú kezeletlen kontroll HD kultúrák homogenizátumában mért protein foszfatáz aktivitási értékek azt mutatják, hogy a porcdifferenciáció során a PP2A aktivitás erőteljesen csökken, míg a PP1 aktivitása szinte változatlan marad. Kísérleteinkben 20 nM OA-nak a porcdifferenciáció szempontjából kulcsfontosságú második és harmadik tenyésztési napon (Solursh és mtsai, 1978) való adásával szignifikáns PP2A-gátlást értünk el. Ily módon jelentősen, – akár 115%-kal is – növelni tudtuk a kolóniák metakromáziásan festődő porcmatrixszal bíró területrészt a tenyésztés végét jelentő hatodik tenyésztési napon mérve. Irodalmi adatok szerint az OA-nak jelentős tumor-képződést serkentő hatása van (Haystead és mtsai, 1989; Cohen és mtsai, 1990). Az OA-kezelések hatására keletkezett nagy mennyiségű porcban a normálisnak megfelelő sejt- és matrixképet találtunk mind fény-, mind elektronmikroszkópos szinten, valamint a porcmatrix biokémiai elemzésével sem találtunk lényegi eltérést a kontroll és az OA-kezelt kolóniák között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az OA hatására keletkezett nagyobb mennyiségű porc a normális porcdifferenciáció serkentése és nem tumoros átalakulás nyomán keletkezett.

Az OA-kezelt kultúrák sejtproliferációjának változása a kontrollokéhoz hasonló időbeli lefolyású volt, bár az egyes napokat külön-külön tekintve az OA-kezelés hatására fokozott sejtproliferációt tapasztaltunk. A legnagyobb eltérést a harmadik tenyésztési napon, közvetlenül a második OA-adást követően kaptuk.

A porcosodó mezenchimális sejtek proliferációja, majd kisebb sejtcsoportokba való tömörülése a porcdifferenciáció elengedhetetlen lépése (George és mtsai, 1983; Hall és Myake, 1995). A HD-kultúrák mezenchimális sejteinek elkötelezett porcosodó sejté váló differenciálódása a proliferációval és sejtkondenzációval párhuzamosan zajlik az első és második tenyésztési napon (Solursh és mtsai, 1978). Megfelelő sejtsűrűség esetén direkt sejt-sejt kapcsolatok és parakrin szignálok (pl. prosztoglandinok) serkentik az elkötelezett sejtek differenciálódását (Smales és Biddulph, 1985), melyek először kondroblasztokká, majd kondrocitákká válnak a harmadik tenyésztési napra. Az OA-kezelés hatására

bekövetkező sejtproliferáció-fokozódás a megfelelő sejtdenzitás és így az intenzívebb sejt-sejt kapcsolatok, valamint a kielégítő erősségű parakrin jelek révén több, erőteljesebben elkötelezett porcosodó sejt keletkezését eredményezheti.

Irodalmi adatok szerint (Zheng és mtsai, 1991; Lin és Arndt, 1995) az OA az osztódó sejteket az osztódási orsó kialakulásának átmeneti befolyásolása révén, reverzibilis módon feltartóztatja a mitózisban; az OA-kezelés leállítását követően a sejtek befejezik a félbeszakadt osztódást. Úgyszintén ismert, hogy a porcosodó mezenchimális sejtek rövid és átmeneti megállítása a mitózisban stimulálja a sejtek elköteleződési folyamatát (Solursh és Reiter, 1975). Összegezve, az OA két, látszólag egymással ellentétes módon befolyásolja a sejtciklust, azonban mindkét effektus egyirányba, a porcosodás fokozódása felé hat.

Az OA-kezelés hatására létrejövő foszfatáz gátlás, a sejtípustól függően módosítja a különböző citoskeletális komponensek szerkezetét (Blankson és mtsai, 1995; Maier és mtsai, 1995; Erdődi és mtsai, 1995). Régóta ismert az a tény, hogy az aktinfilamentumok széttöredezése serkenti a porcképződést (Zanetti és Solursh, 1984; Daniels és Solursh, 1991). Az aktinfilamentumok szerkezetének megváltozása feltehetőleg többféle módon is befolyásolhatja a porcképződést. Amikor a porcosodó sejtek felszínén a fibronektint kötő integrin eltűnik, a nyúlványos sejtek lekerekednek, porcsejt megjelenésűekké válnak (Daniels és Solursh, 1991). Mind az integrinek ligandkötése, mind az integrinek ligandvesztése módosítja a fokális adhézis helyek struktúráját és így az aktinfilamentumok organizációját is, ez pedig a génexpresszió változásaihoz vezet (Aplin és Juliano, 1999). Az OA-kezelés bizonyított módon befolyásolja egyes, a génexpresszió szabályozásában kulcsfontosságú fehérjék, úgymint c-fos, jun család (Schönthal és mtsai, 1991a és 1991b), ideértve az AP-1 transzkripció faktor komplex (Miller és mtsai, 1998) expresszióját is. Ezek a fehérjék valamennyien részt vesznek a porcdifferenciáció szabályozásában is (Wang és mtsai, 1992; Beier és mtsai, 1999).

Az aktinfilamentumok szerkezetének befolyásolása az OA-kezelés révén, további pontokon is kapcsolódik az eddigiekben tárgyalt szabályozó mechanizmusokhoz. Mivel a PKA II holoenzim regulátor alegysége útján kapcsolódhat az aktinfilamentumokhoz (Zhang és mtsai, 1996), ezért a mikrofilamentumok szerkezetének módosulása befolyásolhatja a cAMP jelátvitelt a mag felé (Felicciello és mtsai, 1997). Emellett az aktin citoskeleton széttöredezése a PKC-alfa jelátviteli utat is bizonyítottan befolyásolja és ennek kapcsán fokozott porcképződésről számolnak be Lim és mtsai (2000). Saját

kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az OA-kezelés az aktinfilamentumok széttöredezését és az aktin sejtmembrán alatti kondenzálódását okozta, s az egyébként nyúlványos megjelenésű porcosodó sejtek között sokkal több lekerekedő alakot figyeltünk meg a kezeletlen kontroll kultúrákban látottakhoz képest.

A különböző targetfehérjék foszforilációs-szintje a megfelelő protein kinázok és protein foszfatázok katalitikus tevékenységének arányától függ. A PP2A és/vagy PP1 gátlása OA adása révén, a reverzibilis fehérje foszforilációt a targetfehérjék foszforiláltsága irányába tolja el (Schönthal, 1998). A fontosabb Ser/Thr-specifikus kinázok, úgymint a PKA (Smales and Biddulph, 1985; Zhang és mtsai, 1996), a PKC (Chang és mtsai, 1998) és a TGF β -szupercsalád receptor kapcsolt kinázai (Kulyk és mtsai, 1989; Leonard és mtsai, 1991), valamennyien részt vesznek a porcdifferenciáció szabályozásában. Az előbbieken említett protein kinázok mindegyike szerepet játszik a cAMP mediált szignáltranszdukciós útvonal kulcsfontosságú transzkripciós faktorának a CREB-nek a foszforilálásában is (Gonzalez és Montminy, 1989; Xie és Rothstein, 1995; Potchinsky és mtsai, 1997). A CREB foszforilációja mind a BMP-2, mind a cAMP indukált porcképződés során bekövetkezik (Lee és Chuong, 1997). A CREB család tagjai szükségesek az enkondrális csontosodással kialakuló csontok megfelelő fejlődéséhez is (Long és mtsai, 2001).

A sejttípustól és kísérleti rendszertől függően, a PP2A és a PP1 egyaránt defoszforilálhatják a CREB-et (Hagiwara és mtsai, 1992; Wadzinski és mtsai, 1993; Alberts és mtsai, 1994; Wheat és mtsai, 1994), valamint a PP2A magát a PKA katalitikus alegységét is defoszforilálja (Liauw és Steinberg, 1996). Ily módon az OA-kezeléssel a CREB foszforilált állapotát két úton is megnyújthatjuk, egyrészt az OA-gátolt PP2A nem defoszforilálja a CREB-et, másrészt nem, vagy kisebb mértékben defoszforilálja a PKA katalitikus alegységét, így az erőteljesebben katalizálja a CREB foszforilációját, ennek hatására pedig a porcdifferenciáció serkentését láthatjuk.

Az OA által kiváltott PP2A gátlás fentebbi, részben hipotetikus hatásmechanizmusának kísérletes bizonyítékait a PKA-t szelektíven gátló koncentrációban alkalmazott protein kináz inhibitornak, a H89-nek a kultúrák táptalajához való adásával kerestük. Mint azt az előzőekben láttuk, ha OA adásával gátoltuk a PP2A-t, a porcdifferenciáció fokozódott (Zákány és mtsai, 2001). Ellenkező előjelű változást okozott a PKA aktivitás gátlása H89-cel: a porc szinte egyáltalán nem fejlődött ki az így kezelt kolóniákban, annak ellenére, hogy a kondrogenikus mezenchimális sejtekből kialakultak a

sejtaggregátumok. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a PKA elsősorban a már aggregálódott és erőteljesen elkötelezett porcelófutár-sejteknek az érett kondrocitákká való alakulásában visz szerepet és kevésbé lehet jelentős a differenciáció kezdeti lépésének, a sejtaggregációnak a szabályozásában.

A kérdéses enzimeket tartalmazó, sejtmentes vizsgálati rendszerekben a PP2A defoszforilálja a PKA katalitikus alegységének (PKA-C) Thr-197-es aminosavmaradékát és ily módon inaktíválja a PKA-t (Liauw és Steinberg, 1996). Kísérleti eredményeink szerint a PP2A gátlása OA-val egyaránt fokozza a tenyészetekben mérhető PKA aktivitást, valamint a porcképződést, ezért úgy gondoljuk, hogy a PP2A defoszforilálja a PKA-C-t és szerepet játszik a PKA jelátviteli útvonal szabályozásában a kondrogenézis során. Úgyszintén a PP2A-nak a PKA aktivitását reguláló funkciója mellett szól az a tény, hogy a PKA-C α expressziója nem változik sem OA, sem H89 hatására (saját kísérleti eredmény).

A PKA aktivitás H89-cel való gátlásával saját kísérleteinkben csökkent sejtproliferációt detektáltunk valamennyi vizsgált napon. Adatunk ellentétes azzal, amit más szerzők nemrégiben közöltek (Yoon és mtsai, 2000). Ők lényegesen fokozott sejtproliferációról számoltak be hasonló kísérletei rendszerben és körülmények között. Véleményünk szerint az ellentmondás oka az eltérő vizsgálati módszerben keresendő. Míg mi timidinbeépülést detektáltunk, addig ők enzimatis emésztést követő sejtszámolást végeztek hemocitométer segítségével. Saját tapasztalatunk azt mutatja, hogy a nagy mennyiségű porcmatrixot tartalmazó hat napos kultúrákból szinte lehetetlen minden sejtet izolálni és szuszpenzióba vinni, míg ott, ahol kevés matrix van – például H89-kezelést követően – viszonylag több sejtet lehet kinyerni a kolóniákból. A timidinbeépülés mérése során ez a probléma nem merül fel. Mivel a PKA gátlást követő csökkent sejtproliferációt nem emelte meg az OA-kezelés eredményeként létrejött PP2A gátlás, ezért feltételezzük, hogy a porcdifferenciáció során egyéb, a PP2A által szabályozott mechanizmusok is részt vesznek a sejtszaporodás irányításában.

A sejtproliferáció befolyásolásáról elmondottakkal ellentétben, a PP2A gátlása OA-val még a H89-cel kezelt kultúrák esetében is erőteljesen megemelte a maradék PKA aktivitást és fokozta a porcképződést. Ebből a tényből arra következtetünk, hogy a PKA foszforilálhatja azon transzkripciós faktorokat, amelyek a porcképződésben fontos irányító szereppel bírnak és szabályozzák a porcspecifikus matrixmolekulák expresszióját.

Irodalmi adatok szerint a PKA génexpressziót reguláló intracelluláris hatásainak közvetítéséért elsősorban a CREB családba tartozó transzkripciós faktorok felelősek

(Shaywitz és Greenberg, 1999), ezért kézenfekvőnek tűnt a CREB és a foszforilált CREB (P-CREB) mennyiségének változásait vizsgálni a különböző kísérleti csoportokban. A H89-cel való PKA gátlás hatására csökkent a kultúrák lizátumában detektálható CREB mennyisége és csak nyomokban volt detektálható P-CREB. Ezzel szemben az OA-kezelt kultúrákban enyhén emelkedett a CREB mennyisége, míg a P-CREB szintje igen erőteljesen fokozódott már az első OA-adás után. Ismert, hogy a CREB Ser-133 oldalláncán történő foszforilálása fokozza a génexpressziót aktiváló hatását (Gonzalez és Montminy, 1989). Így joggal juthatunk arra a következtetésre, hogy az OA-val történt PP2A gátlás – legalábbis részben –, minden valószínűség szerint valóban a PKA mediálta és a CREB foszforiláltsági szintjét megváltoztató jelátviteli út módosítása révén fejtheti ki a porcdifferenciációt fokozó hatását. Mivel a H89 és az OA együttes adását követően a CREB és P-CREB szintje egyaránt a kontroll tenyészetekben detektálhoz közeli értékeket mutatott, s egyidejűleg a kontrollhoz képest lényegesen csökkent porcképződést találtunk, ezért feltételezzük, hogy a H89 okozta PKA gátlás és/vagy az OA kiváltotta PP2A inhibíció más transzkripciós faktorok foszforilációját is modulálhatják.

Az egyik ilyen transzkripciós faktor, amely még a PKA illetve a PP2A szubsztrátjaként szerepelhet a porcdifferenciáció során, a SOX9. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a PKA foszforilálja a SOX9-et és a foszforilált transzkripciós faktor hatékonyabban aktiválja a II. típusú kollagén és az aggregán tengelyfehérje géneinek az expresszióját (Huang és mtsai, 2000; Sekiya és mtsai, 2000). Emellett az is ismert, hogy a csirke HD-kultúrákban csökken a Sox9 gén expressziója a porcképződés előrehaladtával (Kulyk és mtsai, 2000). További kísérleteink során tervezzük vizsgálni a SOX9 foszforilációjának, valamint a Sox9 aktivitásának a változásait OA és H89 hatására.

Az *in vitro* porcdifferenciáció szabályozásának tanulmányozása során szerzett új ismereteink elősegíthetik a porcképződés mechanizmusának jobb megértését és így hozzájárulhatnak a különböző degeneratív vagy traumás eredetű porcléziók pótlásához szükséges porcimplantátumok előállítására irányuló erőfeszítések eredményességéhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során a két fő celluláris foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz, a PP1 és a PP2A, valamint a cAMP dependens protein kináz (PKA) szerepét vizsgáltuk az *in vitro* porcdifferenciáció szabályozásában specifikus foszfatáz és kináz inhibitorok alkalmazásával. Munkánk eredményeit az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Elsőként alkalmaztuk a foszfatáz inhibitor okadainsavat (OA) egy normál differenciálódó sejt kultúrában és a porcképződés fokozódását tapasztaltuk.
2. A keletkezett porc morfológiai és biokémiai elemzésével bebizonyítottuk, hogy nem tumoros burjánzást indukáltunk, hanem a normál porcdifferenciációt fokozta az OA.
3. Kimutattuk, hogy a porcdifferenciáció során a PP1 aktivitása közel állandó és magas értéken van, míg a PP2A aktivitása a folyamat előrehaladtával párhuzamosan csökken.
4. Az OA-t nM-os koncentrációkban adva, a PP2A aktivitás csökkenését láttuk, míg a PP1 aktivitása nem változott. Az OA-t az enzimaktivitási mérések során alkalmazva, az semmilyen hatást nem fejtett ki a PKA aktivitásra.
5. Az OA fokozta a sejtproliferációt.
6. H89 adásával gátolva a PKA aktivitását, a porcképződést dóziszfüggő módon gátoltuk.
7. A H89 erőteljesen csökkentette a sejtproliferációt is.
8. A tenyészeteket OA-val kezelve emelkedett a PKA aktivitása, így arra következtettünk, hogy a high density kultúrákban zajló porcdifferenciáció során a PP2A defoszforilálhatja a PKA katalitikus alegységét.
9. A PKA katalitikus alegység expressziója sem OA, sem H89 hatására nem változott számottevő mértékben.
10. A H89 és OA kezelést együtt alkalmazva az alacsony szintű PKA aktivitás fokozódott. Az OA serkentette a H89-cel gátolt porcképződést, de nem emelte a H89-cel kezelt kultúrák alacsony proliferációs rátáját. Ezért feltételezzük, hogy a PKA mediálta jelátviteli út mellett egyéb PP2A által modulált folyamatok is részt vesznek a sejtproliferáció szabályozásában a kondrogenézis során.
11. A H89 csökkentette, az OA pedig fokozta a CREB foszforilációját, így bizonyítottunk látjuk, hogy az *in vitro* porcdifferenciáció során a PKA és a PP2A részt vesznek a fenti transzkripciós faktor reverzibilis foszforilációjában. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a CREB egyike azon transzkripciós faktoroknak, amelyek a porcképződést szabályozzák.

7. SUMMARY

We have investigated the role of the two major cellular phospho-Ser/Thr-specific protein phosphatases PP1 and PP2A, as well as that of cAMP dependent protein kinase (PKA) in the regulation of *in vitro* chondrogenesis with the aid of the application of specific cell-permeable protein kinase and protein phosphatase inhibitors. Our results are the following:

1. We have modified the original high density cell culturing protocol according to the requirements of our experimental system.
2. We applied the phosphatase inhibitor okadaic acid (OA) at the first time for investigation of a normal differentiation process and reported stimulation of chondrogenesis.
3. With the aid of the morphological and biochemical analysis of the resulted cartilage we gave evidences of the enhancement of the normal cartilage differentiation instead promotion of any kind of tumorigenesis by application of OA.
4. The activity of PP1 was constant and high, while the activity of PP2A decreased with the progress of chondrogenesis.
5. OA, applied in nanomolar concentrations, had no effect on the activity of PP1. OA-treatment significantly decreased the activity of PP2A which remained at this low level until the end of culturing. OA did not influence the PKA activities in the kinase assays.
6. Cell proliferation was stimulated by OA.
7. Inhibition of PKA activity with H89 resulted in almost complete blockage of cartilage formation. Application of H89 also caused significant decrease of the cell proliferation.
8. As OA-treatment increased the activity of PKA, we concluded that PP2A can dephosphorylate the catalytic subunit of PKA (PKA-C) during *in vitro* chondrogenesis.
9. Expression of PKA-C α was influenced by neither OA-, nor H89-treatments.
10. OA, when applied simultaneously with H89 increased the low PKA activity, as well as enhanced the H89 inhibited chondrogenesis, but had no effect on lowered cell proliferation. Further PP2A-modulated mechanisms in the regulation of the cell proliferation of high density cell cultures could be involved.
11. Inhibition of PKA with H89 resulted in a decrease of the amount of phosphorylated CREB, while inhibition of PP2A caused an opposite effect. Therefore, we suggest that both PKA and PP2A play role in the reversible phosphorylation of CREB during *in vitro* chondrogenesis and CREB might be one of the transcription factors, which regulates cartilage formation.

8. UTÓSZÓ ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Miközben ezt az értekezést írtam, számtalanszor végigpergett előttem az a sok-sok lépésből álló eddigi út, ami diákkörös korom naív és 'tabula rasa'-s tudós-palántáskodásától elvezetett odáig, hogy önállóan meg tudjam tervezni kísérleteimet és az ideák talaján valós eredmény-gyümölcsöket hozó kísérlet-fácaska cseperedjen.

Kísérleteink során a porcdifferenciáció szabályozásának újabb részletét ismertük meg és újat találni, mindig az igazi kutatói örömök legnagyobbika. Szeretném, ha Ön, kedves Olvasó – a remélhetőleg tárgyilagos – tudományos leírás sorai mögött megérezett volna valamit abból az örömből, amit egy-egy hosszú és fárasztó kísérletsorozat után a várvavárt eredmény okozott nekem és mindazoknak akikkel együtt dolgozva eljutottam idáig.

*Ezúton is köszönetet mondok témavezetőmnek, **Dr. Módis Lászlónak**, aki eddigi, eléggé göröngyös kutatói utamon mindvégig megtisztelt felém irányuló bizalmával, bevezetett a porckutatás alapvető rejtelseibe és el-elkalandozó gondolataimat, szertelenségemet korlátok közé terelve a mai napig a célirányos és igényes tudományos munkára tanít.*

*Szeretném megköszönni **Dr. Gergely Pál** szakmai és emberi támogatását, amely nélkül a számomra kezdetben ismeretlen fehérje foszforilációs világban elvesztem volna, s melynek híján ez az értekezés sem készülhetett volna el.*

*Megköszönöm **Dr. Antal Miklós** intézetvezetőnek a folyamatos előrehaladáshoz szükséges biztatást, valamint hasznos tanácsait, amelyekkel mindig készségesen segített a publikációim logikus megszerkesztésében.*

*Ehelyen is szeretném megköszönni az értekezés alapjául szolgáló közleményekben leírt eredmények eléréséhez nyújtott segítségét a társszerző kollegáknak, **Dr. Bakó Évának, Dr. Balázs Margitnak, Dr.***

Bárdos Helgának, Dr. Felszeghy Szabolcsnak, Dr. Holló Krisztinának, Dr. Kocsis Katalinnak és Dr. Szűcs Kornéliának.

*Külön köszönet illeti a kísérletek kivitelezésében nyújtott felbecsülhetetlen értékű segítségéért **Bárány Sándornét, Bakk Erzsébetet, Szanitter Bélánét, Hunyadi Kálmánnét és Rónai Tamásnét**, a precíz fototechnikai munkákért **Miklósne Durkó Ágnest** és az Anatómia Intézet azon munkatársait, akik hasznos tanácsaikkal segítségemre voltak.*

*Végül hálás vagyok családom valamennyi tagjának a biztatásért és támogatásért, különösképpen gyermekeimnek, **Noéminek, Franciskának és Márknak**, hogy elnézték nekem a sok kísérletezéssel töltött órát amit nélkülem kellett tölteniük és köszönöm megértésüket, amellyel lehetővé tették számomra a nyugodt munkát.*

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1. Hivatkozott közlemények

Ahrens PB, Solursh M and Reiter RS (1977): Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* 60: 69-82.

Alberts AS, Montminy M, Shenolikar S and Feramisco JR (1994): Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4398-4407.

Aplin AE and Juliano RL (1999): Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J. Cell Sci.* 112: 695-706.

Balázs M, Mayall BH and Waldman FM (1991): Simultaneous analysis of chromosomal aneusomy and 5-bromodeoxyuridine incorporation in MCF-7 breast tumor cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 57: 93-102.

Barford D, Das AK and Egloff M-P (1998): The structure and mechanism of protein phosphatases. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 27: 133-164.

Bartels PH (1991): Numerical evaluation of cytologic data. III. Selection of features for discrimination. *Anal Quant Cytol* 1: 153-159.

Beier F, Leask TA, Haque S, Chow C, Taylor AC, Lee RJ, Pestell RG, Ballock RT and LuValle P (1999): Cell cycle genes in chondrocyte proliferation and differentiation. *Matrix Biol.* 18: 109-120.

Biajolan C and Takai A (1988): Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* 256: 283-290.

Biddulph DM, Dozier MM and Capehart AA (2000): Inhibition of prostaglandin synthesis reduces cyclic AMP levels and inhibits chondrogenesis in cultured chick limb mesenchyme. *Methods Cell. Sci.* 2000 22: 9-16.

Blankson H, Holen I and Seglen PO (1995): Disruption of the cytokeratin cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Exp. Cell Res.* 218: 522-530.

Brandon EP, Idzerda RL and McKnight GS (1997): PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 397-403.

Brautigam DL (1997): Phosphatases as partners in signalling networks. In: Corbin J and Francis S (eds) *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 31: 113-124.

Cancedda R, Descalzi Cancedda F and Castagnola P (1995): Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 159: 265-358.

Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B and Quarto R (2000): Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 707-714.

- Cauthron RD, Carter KB, Liauw S and Steinberg RA (1998): Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1416-1423.
- Chang S-H, Oh Ch-D, Yang M-S, Kang S-S, Lee Y-S, Sonn J-K and Chun J-S (1998): Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signalling. *J. Biol. Chem.* 273: 19213-19219.
- Choi B, Chun J-S, Lee Y-S, Sonn J-K, Kang S-S (1995): Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216: 1034-1040.
- Cohen P, Klump S and Schelling DL (1989): An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett.* 250: 596-600.
- Cohen P, Holmes CFB and Tsukitani Y (1990): Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *TIBS* 15: 98-102.
- Corbin JD and Reimann EM (1974): Assay of cyclic AMP-dependent protein kinases. *Meth. Enzymol.* 38c: 287-290.
- Cs-Szabó G, Roughley PJ, Plaas AHK and Glant TT (1995): Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 38: 660-668.
- Daniels K and Solursh M (1991): Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J. Cell Sci.* 100: 249-254.
- Dawson JF and Holmes CF (1999): Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Front. Biosci.* 4: D646-658.
- Dessau W, von der Mark H, von der Mark K and Fischer S (1980): Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57: 51-60.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351: 95-105.
- de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S and Huang W (2000): Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 19: 389-394.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS (2000): Cellular interactions and signalling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 5: 309-334.
- Erlebacher A, Filvaroff E, Gitelman SE and Derynck R (1995): Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80: 371-378.
- Feliciello A, Li Y, Avvedimento EV, Gottesman ME and Rubin CS (1997): A-kinase anchor protein 75 increases the rate and magnitude of cAMP signaling to the nucleus. *Curr. Biol.* 7: 1011-1014.
- George M, Chepenik KP and Schneiderman MH (1983): Proliferation of cells undergoing chondrogenesis in vitro. *Differentiation* 24: 245-249.

- Glant TT, Mikecz K and Poole AR (1986): Monoclonal antibodies to different protein-related epitopes of human articular cartilage proteoglycans. *Biochem. J.* 234: 31-41.
- Gonzalez GA and Montminy MR (1989): Cyclic AMP stimulates stomatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at Ser-133. *Cell* 59: 675-680.
- Hadházy Cs, László MB and Kostenszky KS (1982): Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 30: 65-78.
- Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S and Montminy M (1992): Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1 mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70: 105-113.
- Hall BK and Miyake T (1995): Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 881-893.
- Hamburger V and Hamilton HL (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.
- Haystead TAJ, Sim ATR, Carling D, Honner RC, Tsukitani Y, Cohen P and Hardie DG (1989): Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337: 78-81.
- Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT (1999): Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev. Dyn.* 215: 69-78.
- Heinegård D, Oldberg Å (1989): Structure and biology of cartilage and bone noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 3: 2042-2051.
- Huang K-P and Huang FL (1991): Purification and analysis of protein kinase C isoenzymes. *Meth. Enzymol.* 200: 241-252.
- Huang W, Zhou X, Lefebvre V and de Crombrughe B (2000): Phosphorylation of SOX9 by cAMP-dependent protein kinase A enhances SOX 9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4149-4158.
- Hunter T (1995): Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236.
- Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Kurisu K (1999): Actions of hedgehog proteins on skeletal elements. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 10: 477-486.
- Janssens V and Goris J (2001): Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 353: 417-439.
- Kelley RO and Fallon JF (1978): Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of developing chick limb bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 46: 99-110.
- Krauss G (2001): *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation* 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

- Kulyk WM, Rodgers BJ, Greer K and Kosher RA (1989): Promotion of embryonic chick limb bud cartilage differentiation by transforming growth factor- β . *Dev. Biol.* 135: 424-430.
- Kulyk W, Franklin J and Hoffman LM (2000): Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. *Exp. Cell Res.* 255: 327-332.
- Kuo JF (ed) (1994): Protein kinase C. Oxford University Press, New York.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laufer E, Nelson CE, Johnsson RL, Morgan BA, Tabin C (1994): Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79: 993-1003.
- Lee YS and Chuong CM (1997): Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J. Cell. Physiol.* 170:153-65
- Lefebvre V and de Crombrughe B (1998): Toward understanding Sox9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 16: 529-540.
- Leonard CM and Newman SA (1987): Nuclear events during early chondrogenesis: phosphorylation of the precartilag 35.5 kD domain-specific chromatin protein and its regulation by cyclic AMP. *Dev. Biol.* 120: 92-100.
- Leonard C, Fuld HM, Frenz DA, Downie SA, Massague J and Newman SA (1991): Role of transforming growth factor β in chondrogenic pattern formation in the embryonic chick limb. *Dev. Biol.* 145: 99-109.
- Liau S and Steinberg RA (1996): Dephosphorylation of catalytic subunit of cAMP-dependent protein-kinase at Thr-197 by a cellular protein phosphatase and by purified protein phosphatase-2A. *J. Biol. Chem.* 271: 258-263.
- Lim YB, Kang SS, Park TK, Lee YS, Chun JS and Sonn JK (2000) Disruption of actin cytoskeleton induces chondrogenesis of mesenchymal cells activating protein kinase C- α signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 609-613.
- Lin FC and Arndt KT (1995): The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. *EMBO J.* 14: 2745-2759.
- Liu WS and Heckman CA (1998): The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* 10: 529-542.
- Long F, Schipani E, Asahara H, Kronenberg H and Montminy M (2001): The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development* 128: 541-550.
- Mackie EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R (1987): Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell. Biol.* 105: 2569-2579.

- MacKintosh C and MacKintosh RW (1994): Inhibitors of protein kinases and phosphatases. Trends Biochem. Sci. 11: 444-448.
- Maier GD, Wright MV, Lozano Y, Djordjevic A, Matthews JP and Young MR (1995): Regulation of cytoskeletal organization in tumor cells by protein phosphatases-1 and -2A. Int. J. Cancer 61: 54-61.
- Marks F (ed) (1996): Protein Phosphorylation. VCH, Weinheim, Germany
- Mellor H and Parker PJ (1998): The extended protein kinase C family. Biochem. J. 332: 281-292.
- Menzel D, Vugrek O, Frank S and Elsner-Menzel C (1995): Protein phosphatase 2A, a potential regulator of actin dynamics and actin-based organelle motility in green alga *Acetabularia*. Eur. J. Cell. Biol. 67: 179-187.
- Miller C, Zhang M, He Y, Zhao J, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J and Di Battista JA (1998): Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 gene by okadaic acid inhibition of phosphatase activity in human chondrocytes: co-stimulation of AP-1 and CRE nuclear binding proteins. J. Cell. Biochem. 69: 392-413.
- Millward TA, Zolnierowicz S and Hemmings BA (1999): Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. TIBS 24: 186-191.
- Mochly-Rosen D and Gordon AS (1998): Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. FASEB J. 12: 35-42.
- Módis L (1991): Organization of the Extracellular Matrix. A Polarization Microscopic Approach. CRC, Boca Raton.
- Mumby MC and Walter G (1993): Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation and functions in cell growth. Physiol. Rev. 73: 673-699.
- Murányi A, Erdődi F, Ito M, Gergely P and Hartshorne DJ (1998): Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets. Biochem. J. 330: 225-231.
- Oberlender SA and Tuan RS (1994): Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. Development 120: 177-187.
- Oh CD, Chang SH, Yoon YM, Lee SJ, Lee YS, Kang SS and Chun JS (2000): Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, Erk 1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. J. Biol. Chem. 275: 5613-5619.
- Pizette S and Niswander L (2000): BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. Dev. Biol. 219: 237-249.
- Potchinsky MB, Weston WM, Lloyd MR and Greene RM (1997): TGF-beta signaling in murine embryonic palate cells involves phosphorylation of the CREB transcription factor. Exp. Cell Res. 231: 96-103.
- San Antonio J D and Tuan R S (1986): Chondrogenesis of limb bud mesenchyme *in vitro*: stimulation by cations. Dev. Biol. 115: 313-324.

- Sadler TW (1990): Medical Embryology 6th ed, Williams and Wilkins, Baltimore
- Sandell L J and Adler P (1999): Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci.* 4, d731-742.
- Scheppeck JE 2nd, Gauss CM and Chamberlin AR (1997): Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A naturally occurring toxins. *Bioorg. Med. Chem.* 5: 1739-1750
- Schonthal A, Tsukitani Y and Feramisco JR (1991a): Transcriptional and post-translational regulation of c-fos expression by the tumor promoter okadaic acid. *Oncogene* 6: 423-430.
- Schonthal A, Alberts AS, Frost JA and Feramisco JR (1991b): Differential regulation of jun family gene expression by the tumor promoter okadaic acid. *New Biol.* 3: 977-986.
- Schönthal AH (1998): Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. *Front. Biosci.* 3: d1262-1273.
- Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A and Noda M (2000): SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6-. *J. Biol. Chem.* 275: 10738-10744.
- Shaywitz AJ and Greenberg ME (1999): CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 821-861.
- Sim AT and Scott JD (1999): Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell. Calcium.* 26: 209-217.
- Smales WP and Biddulph DM (1985): Limb development in chick embryos: cyclic AMP-dependent protein kinase activity, cyclic AMP, and prostaglandin concentrations during cytodifferentiation and morphogenesis. *J. Cell. Physiol.* 122: 259-265.
- Solursh M and Reiter R (1975): Determination of limb bud chondrocytes during a transient block of the cell cycle. *Cell Differ.* 4: 131-137.
- Solursh M, Ahrens PB and Reiter RS (1978): A tissue culture analysis of the steps in limb chondrogenesis. *In Vitro* 14: 51-61.
- Sonn JK and Solursh M (1993): Activity of protein kinase C during the differentiation of chick limb bud mesenchymal cells. *Differentiation* 53: 155-162.
- Tavella S, Bellese G, Castagnola P, Martin I, Piccini D, Doliana R, Colombatti A, Cancedda R, Tacchetti C (1997): Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 110: 2261-2270.
- Toole BP (1972): Hyaluronate turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Dev. Biol.* 29: 321-329.
- Underhill TM, Weston AD (1998): Retinoids and their receptors in skeletal development. *Microsc. Res. Tech.* 43: 191-204.
- van Kuppevelt THMS, Cremers FPM, Domen JGW, van Beuningen HM, van den Brule AJC and Kuyper CMA (1985): Ultrastructural localization and characterization of proteoglycans in human lung alveoli. *Eur. J. Cell. Biol.* 36: 74-80.

- Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S, Peruski LF Jr, Lickteig RL, Johnson GL and Klemm DJ (1993): Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2822-2834.
- Wang Z-Q, Ovitt C, Grigoriadis AE, Moehle-Steinlein U, Ruether U and Wagner EF (1992): Bone and haemopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360: 741-745.
- Wera S and Hemmings BA (1995): Serine/threonine phosphatases. *Biochem. J.* 311: 17-29.
- Wheat WH, Roesler WJ and Klemm DJ (1994): Simian virus 40 small tumor antigen inhibits dephosphorylation of protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5881-5890.
- Widelitz RB, Jiang TX, Murray BA, Chuong CM (1993): Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J. Cell. Physiol.* 156: 399-411.
- Xie H and Rothstein TL (1995): Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J. Immunol.* 154: 1717-1723.
- Yoon YM, Oh CD, Kang SS and Chun J S (2000): Protein kinase A regulates chondrogenesis of mesenchymal cells at the post-precartilage condensation stage via protein kinase C- α signaling. *J. Bone Mineral Res.* 15: 2197-2205.
- Young HE, Ceballos EM, Smith JC, Mancini ML, Wright RP, Ragan BL, Bushell I, Lucas PA (1993): Pluripotent mesenchymal cells reside within avian connective tissue matrices. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 723-736.
- Zákány R, Bakó É, Felszeghy Sz, Holló K, Balázs M, Bárdos H, Gergely P and Módis L (2001): Okadaic acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A enhances chondrogenesis in chicken limb bud micromass cell cultures. *Anat. Embryol.* 203: 23-34.
- Zanetti NC and Solursh M (1984): Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* 99: 115-123.
- Zhang Q, Carr DW, Lerea KM, Scott JD and Newman SA (1996): Nuclear localization of type II cAMP-dependent protein kinase during limb cartilage differentiation is associated with a novel developmentally regulated A-kinase anchoring protein. *Dev. Biol.* 76: 51-61.
- Zheng B, Woo CF and Kuo JF (1991): Mitotic arrest and enhanced nuclear protein phosphorylation in human leukemia K562 cells by okadaic acid, a potent protein phosphatase inhibitor and tumor promoter. *J. Biol. Chem.* 266: 10031-10034.

9.2. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Zákány R, Bakó É, Felszeghy Sz, Holló K, Balázs M, Bárdos H, Gergely P and Módis L (2001): Okadaic acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A enhances chondrogenesis in chicken limb bud micromass cell cultures. *Anat. Embryol.* 203: 23-34.
IF: 1,511

Módis L, Aydelotte MB, Hadházy C, Zákány R, Kocsis K, Hyttinen M (1993): Extracellular matrix organization studied by polarization microscopy in cartilage differentiating *in vivo* and *in vitro*. *Orthop. Transact. J. Bone Joint Surg.* 17: 839.
IF: 2,19

Zákány R, Szűcs K, Bakó É, Felszeghy Sz, Módis L and Gergely P (2001): Protein phosphatase 2A is involved in regulation both of Protein kinase A activity and CREB phosphorylation during *in vitro* chondrogenesis. A védés időpontjában közlésre elküldve, azóta megjelent a közlemény: *Exp. Cell. Res.* 275, 1-8 (2002)
IF: 5,096

Egyéb közlemények:

Kappelmayer J, Bacskó G, Birinyi L, Zákány R, Kelemen E, Ádány R (1995): Consecutive appearance of coagulation factor XIII subunit A in macrophages, megakaryocytes and liver cells in early human development. *Blood* 86: 2191-2197
IF: 8,782

Muratoglu S, Krysan K, Balázs M, Sheng H, Zákány R, Módis L, Kiss I, Deák F (2000): Primary structure of human matrilin-2, chromosome location of the *MATN2* gene and conservation of an AT-AC intron in matrilin genes. *Cytogenet. Cell Genet.* 90: 323-327.
IF: 1,604

Referált folyóiratban megjelent absztrakt:

Zákány R, Módis L and Ádány R (1994): Expression of tenascin during the early phase of human development. *Cell. Biol. Internat.* 18: 553.
IF: 0.731

Könyvrészlet:

Gergely P, Murányi A, Tóth B, Zákány R, Módis L és Erdődi F (2000): A foszfoszerin/foszfortreonin-specifikus protein foszfatázokat gátló toxinok élettani hatásai. *Nephrologia 2000* (szerk.: Kakuk Gy. És Kárpáti I) 13-20.

10. FÜGGELÉK

Az kísérletek során a szerző *saját munkái* a következők voltak:

1. a kísérletek megtervezése, a sejtenyésztés módszerének adaptálása
2. a sejt kultúrák, valamint a nem morfológiai vizsgálatokhoz szükséges különféle minták előállítása
3. fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok
4. sejtproliferációs vizsgálatok

A porc matrix biokémiai elemzését *Dr. Holló Krisztina*, a porc képződés kvantitatív képanalízisét *Dr. Felszeghy Szabolcs* a DEOEC Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének munkatársai készítették el.

A PP2A aktivitásméréseket és a PKA-C α , valamint CREB és P-CREB immunoblottokat *Dr. Bakó Éva* végezte, a PKA aktivitásokat *Dr. Szűcs Kornélia* mérte meg, mindketten a DEOEC Orvosi Vegytani Intézetének munkatársai.

A BrdUrd beépülés kimutatásában *Dr. Balázs Margit*, a lézer konfokális mikroszkóppal készült felvételek elkészítésében *Dr. Bárdos Helga*, a DEOEC Megelőző Orvostani Intézetének munkatársai voltak segítségemre.