

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A kalcineurin szerepe az *in vitro* porcdifferenciáció
szabályozásában és a humán mononukleáris sejtek
jelátviteli folyamataiban**

Szíjgyártó Zsolt

Témavezető: Dr. Gergely Pál



MTA SEJTBiolÓgiai ÉS JElÁtVITeLI KUtATÓCSOPORT
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
DEBRECENI EGYETEM

2007

Témavezető:

Dr. Gergely Pál, akadémikus, egyetemi tanár

A Szigorlati Bizottság elnöke:

A Szigorlati Bizottság tagjai:

A Védési Bizottság elnöke:

Opponensek:

A Védési Bizottság tagjai:

BEVEZETÉS

A kalcineurin

A kalcineurin (PP2B) foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz, egy 59 kDa Ca^{2+} /kalm modulinkötő katalitikus alegységből (kalcineurin A) és egy 19 kDa nagyságú Ca^{2+} -kötő regulátor alegységből (kalcineurin B) álló heterodimer, az aktív centrumban $[\text{Fe}^{2+}\text{-Zn}^{2+}]$ ionokat tartalmazó metalloenzim. A kalcineurin közvetlenül oly módon tudja módosítani a sejt működést, hogy fizikai kölcsönhatásba lép fontos célfehérjékkel és defoszforilálja azokat, közvetve pedig úgy, hogy olyan alapvető jelátviteli útvonalakat aktivál (pl. NFAT, NF- κ B, JNK, CREB), amelyek specifikus fehérjék expressziós szintjét vagy azok biológiai aktivitását szabályozzák.

Az NFAT (aktivált T-sejt nukleáris faktora) és a kalcineurin az immunsejtek és a mezenchimális sejt differenciáció elengedhetetlen szereplői. Eddig csak közvetett bizonyítékot szolgáltatottak a kalcineurin porcdifferenciációban betöltött pozitív szabályozó szerepére. A klasszikus mechanizmus szerint a kalcineurin aktivitását elsősorban az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változása szabályozza *in vivo*. Az intracelluláris térben megnövekedett Ca^{2+} -koncentráció a BMP (csont morfogénikus fehérje) expresszióját irányító kalcineurin/NFAT jel pályán keresztül fokozza a kondrogenézist. A kalcineurin a differenciációs folyamatok mellett részt vehet a T-sejt-receptor mediált sejtaktivációban, a sejtproliferációban és a sejtthalálban egyaránt. A foszfo-NFAT kalcineurin általi defoszforilációja után a sejtmagba transzlokálódik és számos pro-inflamatorikus citokin, sejt felszíni molekula, Fas-ligand gén transzkripcióját indukálhatja.

Munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy a kalcineurin aktivitása csökkent a szisztémás lupus erythematosusban

(SLE-ben) szenvedő betegek perifériás mononukleáris sejtjeiben (PBMC). Kimutattuk, hogy az egészséges donoroktól származó PBMC glükokortikoszteroid kezelése is csökkentette a kalcineurin aktivitását Ca-ionofor és forbolészter jelenlétében. Ez a megfigyelés a PKC izoenzimek lehetséges szerepére utalt a kalcineurin szabályozásában a T-sejtek jelátviteli folyamatában.

A porcdifferenciáció

A mezenchimális sejtek porcsejteké történő differenciációja több lépésből álló folyamat. A porcdifferenciáció első lépésében a mezenchimális progenitor sejtek megerősödnek, majd kondenzálódnak, és a kondenzált mezenchimális sejtek porcsejteké differenciálódnak. A mezenchimális sejtek kondenzációja alatt és ezt követően porcspecifikus gének aktiválódnak. Ezek a gének olyan molekulákat termelnek (pl. II, IX és XI-típusú kollagének, aggregán), amelyek a porcra jellemző extracelluláris mátrix legfőbb komponensei. A II-típusú kollagén és az aggregán expresszióját a kondrogenézis korai szakaszában kifejeződő, a porcdifferenciációt irányító Sox9 transzkripciós faktor szabályozza. A porcdifferenciációban számos Ser/Thr-specifikus protein kináz (pl. MAPK/Erk1/2/p38, PKC, PKA) és protein foszfatáz (pl. PP2A, PP2B) is szerepet játszik, amelyek különböző transzkripciós faktorok (pl. CREB, Sox9) aktivitását befolyásolják, ezáltal porcspecifikus gének (pl. aggregán, kollagén, N-kadherin, fibronektin, integrin) átírását szabályozzák. A cAMP-függő protein kináz (PKA) a Sox9 transzkripciós faktort Ser-211 aminosavmaradékon foszforilálja, fokozva az aktivitását. Munkacsoportunk írta le először a protein foszfatáz 2A (PP2A) lehetséges szerepét a PKA/CREB jelátviteli folyamat szabályozásában.

Mitogén aktivált protein kinázok

Ismeretes, hogy a kalcineurin inhibitorai, a ciklosporin A (CsA) és az FK506 egyaránt gátolja a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) jelpályáját T-limfocitákban. A MAPK enzimek nagyszámú extracelluláris jel specifikus sejtválaszokká történő átalakításáért felelősek. Szerepük van a sejtproliferációban, a differenciációban és az apoptózisban, a gyulladások és a stresszválaszok szabályozásában. A MEK/Erk1/2 kináz kaszkád a mitogenikus extracelluláris stimulus mediátora, az egyik legfontosabb citoplazmatikus jelátviteli útvonal, amely az eukarióta sejtek proliferációját és differenciációját irányítja.

Az oxidatív stressz

A reaktív oxigén gyökök (ROS) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2) számos jelátviteli útvonalat befolyásolnak, a jelátviteli kaszkádok különböző enzimeinek módosítják az aktivitását, szerepet játszanak a differenciáció és az ízületi szövetek különböző sejtfunkciójának szabályozásában is. Az utóbbi időkben több csoport vizsgálta és szolgáltatott bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy az extracelluláris oxidánsok, különösképpen a H_2O_2 , is hatással lehetnek a kalcineurin aktivitására az aktív centrumában lévő Fe^{2+} -ion redox reakcióján keresztül. Az ízületi porc gyulladásos megbetegedései során számos ROS keletkezik, amelyek a kalcineurin enzimaktivitását gátolják feltehetőleg az egymáshoz közel eső Cys oldalláncok oxidációjával.

A protein kináz C enzimek

A PKC enzimesalád számos célfehérje Ser/Thr-oldalláncát foszforilálja és sokféle sejtípus különböző jelátviteli folyamatában játszik

szerepet. Az enzimes család kofaktor igényük alapján három fő csoportra osztható: klasszikus PKC izoformák (cPKC α , β_I/β_{II} , γ), új típusú PKC izoformák (nPKC δ , ϵ , η , θ) és atípusos PKC izoformák (aPKC ζ , ι/λ). Külön kell említeni a PKC μ izoenzimet, amelyik sem szerkezeti felépítésében, sem aktiválhatóságát tekintve nem tartozik egyetlen csoportba sem. Mind a klasszikus, mind az új típusú PKC izoenzimek aktiválhatók forbolészterrel. Aktiválhatóságukat tekintve a legfontosabb különbség, hogy az nPKC nem, míg cPKC izoenzimek Ca²⁺-ionra érzékenyek. Ezek az izoformák, izoforma-specifikus módon számos sejtfunkciót szabályoznak (pl. proliferációt, differenciációt, citokin expressziót, receptor mediálta jelátviteli pályákat).

A kalcineurin aktivitását foszforilációja is szabályozza. A PKC és a Ca²⁺/kalm modulín-dependes protein kináz II (CaM-kináz II) képes foszforilálni az enzim katalitikus alegységét. A PKC nem, míg a CaM-kináz II a kalcineurin 60 kDa alegységének foszforilációjával az enzim gátlását okozza. Az elmúlt években nagyszámú endogén kalcineurin-kötő fehérjét azonosítottak, amelyek szintén módosítják a kalcineurin aktivitását. Ezek lehetnek inhibitorok, kettős regulátor fehérjék, vagy horgonyzó fehérjék. A Cabin 1 a kalcineurin gátló fehérjéi közé tartozik. A Cabin 1 foszfoprotein, nem aktivált T-sejtekben foszforiláltsági szintje alacsony, PKC aktiválás hatására hiperfoszforilált lesz, ami a kalcineurinnal szembeni fokozott affinitását eredményezi.

Szisztémás Lupus Erythematosus

Az SLE a poliszisztémás autoimmun kórképek prototípusa. SLE betegek T-limfocitáiban fokozódik a pro-inflamatorikus citokinek expressziója, csökken a T-sejt receptor T-sejt antigén általi aktivációjához

szükséges ζ -láncának expressziója. A T-sejtek kóros működése befolyásolja az NF- κ B aktivitását és az NFAT1 intracelluláris eloszlását is. Kimutatták, hogy az SLE betegek monocitáiban és limfocitáiban csökken a PKC által katalizált fehérjefoszforilációs folyamatok mennyisége is. Munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy a calcineurin aktivitása csökkent mind az egészséges, mind a lupus T-sejtekben Ca-ionofor -és PMA-kezelést követően az SLE betegség aktív periódusában alkalmazott glükokortikoszteroid távollétében és jelenlétében egyaránt. Ez a megfigyelésünk a PKC enzimek lehetséges szerepére hívják fel a figyelmet a calcineurin szabályozásában T-sejtekben.

CÉLKITŰZÉSEK

A reaktív oxigén gyökök befolyásolhatják a károsodott porc megújulását. Magyarázatot kívántunk keresni arra, hogy az oxidatív stressz hogyan befolyásolja a porcképződést csirkeembriók végtagtelepeiből származó kondrogenikus sejtek nagy sűrűségű kultúráiban.

Célkitűzéseink közt szerepelt

- a kalcineurin szerepének tanulmányozása csirke porcosodó mezenchimális sejtjeiben,
- a foszforilációs és defoszforilációs folyamatok vizsgálata a porcdifferenciációban,
- az oxidatív stressz hatásainak felderítése.

A PKC izoenzimek lehetséges szerepét is tanulmányoztuk egészséges donorok forbolésztterrel és kalcium-ionoforral stimulált perifériás vér mononukleáris sejtjeiben a kalcineurin aktivitásának gátlásában. Az alábbi célkitűzéseket fogalmazzuk meg:

- PKC izoenzimek lehetséges szerepének vizsgálata a kalcineurin gátlásában forbolésztterrel és a Ca-ionoforral stimulált egészséges donoroktól származó perifériás vér mononukleáris sejtjeiben,
- PKC által regulált target molekula azonosítása, amelyik a kalcineurin enzimaktivitásának csökkenését eredményezi stimulált mononukleáris sejtekben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

Hamburger-Hamilton szerint 22-24-es stádiumában lévő csirkeembriók disztális végtagtelepeiből porcosodó mezenchimális sejteket izoláltunk, a sejtszuspenzióból $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségű primer kultúrákat hoztunk létre. A kolóniákat 10 % főtális borjúsérummal kiegészített Ham's F12 táptalajjal tápláltuk és 5 % CO₂ valamint 95 % relatív páratartalom mellett 37°C-on CO₂ inkubátorban tartottuk.

Fénymikroszkópos morfológiai vizsgálat számítógépes képanalízissel

Csirkeembriók végtagtelepeiből izolált kondrogenikus sejtek 30-30 µl-ekből (nagy sűrűségű, *high density*, HD) kultúrákat hoztunk létre, amelyeket 24 lyukú platekben, kör alakú fedőlemezek felszínén tenyésztettünk. A kezelt és kezeletlen kultúrákat a tenyésztés 6. napján abszolút etanol és 40 % formaldehid 4:1 arányú keverékével fixáltuk. A kultúrákat 3 % ecetsav oldatban oldott 0,1 % dimetil-metilénkék festékkel (DMMB) festettük, majd ecetsav oldattal mostuk. Néhány kultúrát a DMMB 0,1 %-os vizes oldatával kezeltünk. A metakromáziás porcterületek nagyságát négy független kísérlet esetén minden egyes kísérleti csoportban 10-10 kultúránál vizsgáltuk számítógépes képanalízis segítségével.

A sejtproliferáció vizsgálata [³H]-timidin beépüléssel

A sejtszuspenzió 15 µl-es cseppjét 96 lyukú mikrotiter platekbe cseppentettük. Az 1 µCi/ml [³H]-timidint tartalmazó médiumot a

sejtenyésztés 2., 3. és 6. napján adtuk a sejtekhez és 16 órán át inkubáltuk. A médium eltávolítása után a kultúrákat PBS oldattal mostuk, majd jéghideg, 5 % triklórecetsav oldattal a szolubilis fehérjéket kicsaptuk és ismét PBS oldattal mostuk. Ezt követően a sejteket kalcium/magnézium mentes PBS oldatban oldott 0,25 % tripszinnel emésztettük, majd félautomata sejt-harveszterrel szüreteltük. A kolóniákat szűrőpapíron szárítottuk, a radioaktivitásukat folyadék scintilációs detektorral mértük. A méréseket négy független kísérlet esetén minden egyes kísérleti csoportban tíz kultúrával hajtottuk végre. A mérési adatok számítógépes statisztikai elemzését F-próbával végeztük.

A sejtek életképességének vizsgálata

A porcsejtek életképességének tanulmányozásakor a kultúrákat 10-10 μ l MTT (3-/4,5-dimetiltiazol-2/-2,5-difeniltetrazolium-bromid) reagenssel kezeltük. A sejteket 2 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd 100 μ l MTT szolubilizáló oldatot adtunk hozzá és 570 nm-en mértük az abszorbanciát. A mononukleáris sejtek (2×10^6 sejt/100 μ l) életképességének meghatározásakor a sejteket alamarBlue reagenssel kezeltük, majd a CO₂ termosztátban inkubáltuk 37°C-on 45 percig. Az alamarBlue fluoreszcens jelét detektáltuk (excitációs hullámhossz 530 nm, emissziós hullámhossz 590 nm). A PKC stimuláló ágensek és inhibitorok nem okoztak szignifikáns változást a mintákban mért abszolút fluoreszcens egységben (AFU).

Porcsejtek kezelése

A porcsejt-kultúrákat a tenyésztés 2. és 3. napján 0,1, 1,0 vagy 4 mM H₂O₂-vel kezeltük. A kalcineurin aktivitásának gátlására 2 µM CsA-t alkalmaztunk. A kultúrákat CsA-val a sejttenyésztés 2. és 3. napján 4-4 órán át kezeltük. Az 5 µM PD098059, Erk1/2 inhibitorral folyamatosan kezeltük a sejteket a tenyésztés 1. napjától kezdve a tenyésztés befejezéséig.

Humán perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) preparálása és a sejtek jellemzése áramlásos citometriával

Heparinnal kezelt vérből mononukleáris sejtuszpenziót állítottunk elő, melyben a limfociták átlagos aránya 88-95 %, a monocitáké 5-12 %. A sejtek különböző alosztály szerinti átlagolását áramlásos citometriával végeztük: CD3+ 69,4 %, CD19+ 11,5 %, CD56+ 0,8 %, CD14+ 8,3 %.

A PBMC kezelése és a minták előállítása

A sejteket (5x10⁶ sejt/ml) különböző sejtpermeábilis PKC inhibitorokkal (1 µM GF109203X, 0,2 µM Gö6976, 10 µM Rottlerin) inkubáltuk elő egy órán át. 5 µM Ca-ionoforral (A 23187) és/vagy 80 nM forbol-12-mirisztát-13 acetáttal (PMA) stimuláltuk külön-külön vagy egyidejűleg PKC inhibitorok távollétében és jelenlétében 4 órán át CO₂ termosztátban 37°C-on.

Porcsejt kivonatok preparálása

A porcsejt kultúrákat az oxidatív stresszt követően azonnal felszedtük és 100 µl homogenizáló pufferben szuszpendáltuk. A sejtuszpenziót -70°C-on tároltuk, a sejteket közvetlenül a kísérletek előtt ultrahanggal

feltártuk, majd a sejtízátumot centrifugáltuk és a felülúszóból azonnal kalcineurin enzimaktivitás mérést végeztünk. Western-blot kísérlethez teljes sejtízátumot használtunk. RT-PCR analízisre a porcsejt kolóniákat RNáz mentes fiziológiás sóoldattal mostuk, majd a kultúrákat felhasználásig -70°C -on tároltuk.

Kalcineurin enzimaktivitás mérése

A kalcineurin enzimaktivitását a ^{32}P -vel jelzett protein foszfatáz inhibitor-1 szubsztrátból (780 cpm/pmol) az enzim által lehasított $^{32}\text{P}_i$ radioaktivitásának mérésével határoztuk meg. A reakcióközeg (30 μl) proteáz inhibitorokat, 40 $\mu\text{g/ml}$ kalmodulint, 0,2 mM CaCl_2 -ot, 100 nM okadánsavat, 2 nM protein foszfatáz inhibitor-2-t, megfelelő mennyiségű sejt kivonatot (2-3 mg/ml fehérje) és ^{32}P -vel jelzett protein foszfatáz inhibitor-1-t (20-30000 cpm/reakcióközeg) tartalmazott. A reakcióközeget 20 percig 30°C -on inkubáltuk. A reakciót triklór-ecetsav és szérum albumin egyidejű hozzáadásával állítottuk le. Centrifugálás után 180 μl felülúszó $^{32}\text{P}_i$ mennyiségét folyadék szcintillációs detektorban határoztuk meg.

Immunprecipitáció

A mononukleáris sejtszuszpenziók feltárása után a mintákat centrifugáltuk és a felülúszót használtuk immunprecipitációs analízisre. A 200 μg fehérjét tartalmazó sejtízátumot 0,25 $\mu\text{g/ml}$ anti-nyúl IgG antitesttel és Protein A Sepharose gyantával 2 óráig 4°C -on inkubáltuk. A centrifugálás után a felülúszót 5 μl anti-Cabin 1 antitesttel kezeltük, majd 50 μl Protein A Sepharose gyantát adtunk az előtisztított antitest-fehérje komplexet tartalmazó mintákhoz és egy éjszakán át inkubáltuk 4°C -on.

Az antigén-antitest-protein A komplexet tartalmazó mintákat centrifugáltuk, a pelletet immunprecipitációs pufferrel mostuk. Az antigén-antitest-protein A komplexeket tartalmazó pellethez SDS mintapuffert adtunk és főztük.

Western blot analízis

Western blot kísérletekhez teljes csirkeporc és mononukleáris sejtlizátumot használtunk. A mintákat SDS elektroforézis mintapufferben főztük. Csirkeporc sejtek esetén kb. 70-80 µg, mononukleáris sejtek esetén 10-50 µg fehérjét szeparáltunk SDS-poliakrilamid gélen. A fehérjéket elektroforézissel nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat blokkoltuk, majd a megfelelő első antitesttel egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. A membránokat a második antitesttel szobahőmérsékleten egy órán át kezeltük. A jeleket kemilumineszcenciával detektáltuk.

RT-PCR analízis

A sejtekből totál RNS-t izoláltunk. A reverz transzkriptáz reakcióhoz 2 µg RNS-t használtunk. A polimeráz láncreakcióhoz használt primer párokat terveztük. A PCR-t a következő hőmérsékleti profil mellett végeztük: 94 °C, 1 perc, ezt egy 30-as ciklus követte (94 °C, 30 mp, 54 °C, 30 mp, 72 °C, 30 mp) és végül 72 °C, 5 perc. A PCR termékekhez DNS mintapuffert adtunk és gélelektroforézissel tanulmányoztuk etídium-bromidot tartalmazó 1,2 % agaróz gélben.

Kvantitatív Real Time RT-PCR analízis

TaqMan próba alapú, kétlépéses kvantitatív real time PCR-hoz a GAPDH, az aggrekán, a Sox9 és a calcineurin mRNS szintjének

tanulmányozására az ABI által előállított primereket és próbákat használtunk. A PCR reakcióközege 250 vagy 500 ng cDNS-t tartalmazott. A PCR-t a következő hőmérsékleti profil mellett végeztük: 95°C 10 perc (egy ciklus), 95°C 25 mp, 60°C 1 perc (45 ciklus). A szoftver a fluoreszcens jel adatgyűjtését az utolsó lépésnél végzi (60°C 1 perc). Belső referenciafesték a ROX és a referenciagén a GAPDH volt. A szoftver a következő algoritmust használja a mRNS szint változások meghatározásánál:

változás a kezeltlen minta vizsgált génjének mRNS szintjéhez viszonyítva = $2^{\Delta\Delta C_T}$

ahol a $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{kontroll}) - \Delta C_T (\text{kezelt})$,

$$\Delta C_T (\text{kontroll}) = \text{átlag } C_T (\text{kezeltlen minta, vizsgált gén}) - \text{átlag } C_T (\text{kezeltlen minta, GAPDH})$$

$$\Delta C_T (\text{kezelt}) = \text{átlag } C_T (\text{kezelt minta, vizsgált gén}) - \text{átlag } C_T (\text{kezelt minta, GAPDH})$$

EREDMÉNYEK

Porcspecifikus markerek és a Sox9 transzkripciós faktor változása a porcdifferenciáció során

A mezenchimális sejtek porcsejteké történő differenciációját több transzkripciós faktor mellett a Sox9 is nagymértékben szabályozza. Megfigyeltük, hogy a porcspecifikus proteoglikán, az aggregán expresszióját irányító Sox9 transzkripciós faktor kifejeződése a kondrogenézis korai szakaszában erőteljes. Mind a mRNS, mind a fehérje szintje a 2-4. napokon volt a legmagasabb. Az aggregán mRNS szintje emelkedett a porcdifferenciáció során. A mRNS szintek változását konvencionális és TaqMan alapú, relatív real time RT-PCR technikával is nyomon követtük.

Az oxidatív stressz hatása a kondrogenézisre

Csirkeembriók végtagtelepeiből származó mezenchimális sejt kultúrákban a 6. napon spontán porcképződés figyelhető meg. A porcképződés viszonylagos mértékét metakromáziás analízissel lehet megállapítani, melynek során a porcmátrixban lévő proteoglikán glikózaminoglikán oldalláncainak mennyiségét detektáljuk DMMB festékkel. Amikor a porcképződést a tenyésztés 2. és 3. napján különböző koncentrációjú hidrogén-peroxiddal indukált oxidatív stresszel zavartuk meg, a hat napos sejt kultúrákban szignifikáns és H₂O₂ koncentrációtól függő metakromázia csökkenést figyeltünk meg.

Az oxidatív stressz által okozott kondrogenézis gátlást az aggregán és a Sox9 mRNS szintjeinek RT-PCR és real time RT-PCR technikával történő detektálásával követtük nyomon. Bár a porcsejtek

proliferációjának mértéke szignifikánsan csökkent már 0,1 mM H₂O₂ hatására (kb. 25 %-kal), ennek ellenére a kondrociták 80 %-a életképes maradt a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A további kísérletekhez más kutatócsoportok által is használt, 1 mM H₂O₂ koncentrációt választottuk, mivel ebben a koncentrációban szignifikánsan gátolta a kondrogenézist, de ugyanakkor citotoxikus hatása nem volt.

A kalcineurin szerepe a kondrogenézisben

Először a kalcineurin jelenlétét és katalitikus aktivitását demonstráltuk csirkeporc kultúrákban. RT-PCR és Western-blot technikát alkalmazva kimutattuk, hogy a kalcineurin jelen van a csirkeporc sejtekben. A kalcineurin A alegységének mRNS szintje fokozatosan csökkent, fehérje szinten azonban ezek a változások kevésbé voltak karakterisztikusak. Az enzimfehérje jelenléte a sejtben (ill. a sejt kivonatban) nem jelenti szükségszerűen azt, hogy katalitikusan is aktív formában van jelen, ezért meghatároztuk a kalcineurin katalitikus aktivitását a sejttenyésztés során porcsejtek homogenizátumában. A kalcineurin legnagyobb enzimaktivitását az 1. és a 2. napon mértük, a tenyésztés 6. napjára az aktivitás jelentősen csökkent.

Igazolva a kalcineurin jelenlétét és aktivitását csirkeporc kultúrákban, vizsgálni kívántuk, milyen szerepet tölt be a porcdifferenciációban. Amikor a kondrogenikus sejteket a tenyésztés 2. és 3. napján 4-4 óráig 2 μM CsA-val, a kalcineurin inhibitorával kezeltük, a porcképződésben jelentős mértékű csökkenést figyelhettünk meg, amit a hat napos porcsejtek metakromáziás festése igazolt. A metakromáziás festéssel összhangban, CsA csökkentette az aggregán mRNS szintjét és visszaszorította a Sox9 transzkripcióját is. A kalcineurin mRNS és fehérje

szintje emelkedett a kezelést követően, ami kompenzációs hatásként jelenhet meg a CsA kezeléssel szemben. A CsA a kalcineurin enzimaktivitását mintegy 30 %-ban gátolta a sejtlizátumban.

A nagy sűrűségű kondrogenikus sejteket 30 perces 1 mM H₂O₂ kezelésnek tettük ki a tenyésztés 2. és 3. napján, ami a kalcineurin aktivitásában kb. 50 %-os csökkenést eredményezett. A H₂O₂ visszaszorította a kalcineurin transzkripcióját és translációját is, amit az RT-PCR és Western blot analízissel igazoltunk.

A MAPK/Erk1/2 jelpálya szerepe a kondrogenézisben

Ismeretes, hogy a MAPK útvonal egyes elemei feltételezett mediátorai lehetnek az oxidatív stressznek és az Erk1/2 negatív regulátora a kondrogenézisnek. Az Erk1/2 sejtporotranszmembrán gátlószerének (PD098059 inhibítornak) hatását tanulmányoztuk a porcokképződésre. A porcoktelepek metakromázias analízise alapján a porcoksejtek PD098059 inhibítorral történő kezelése stimulálta a porcokmátrix lerakódását és csökkentette a H₂O₂, ill. a CsA hatására bekövetkező porcokmátrix deplécióját.

Tanulmányoztuk, az Erk1/2 aktivitásának változását H₂O₂-vel kezelt kultúrákban is. Mivel az Erk1/2 aktivitását foszforilációja szabályozza, így foszforilációs szintjének változását difoszforilált Erk1/2 ellen termeltetett antitesttel vizsgáltuk. Három napos porcoksejtek H₂O₂ kezelését követően a fehérje Thr és Tyr foszforilációja volt detektálható. Megfigyeltük, hogy a kalcineurin gátlása CsA-val szintén fokozta a kettősen foszforilált Erk1/2 mennyiségét.

A PD098059 a CsA- és a H₂O₂-kezelést követően csökkentette az Erk1/2 aktivitását és részben megakadályozta mind a Sox9, mind az aggregátum mRNS szintjének csökkenését is a kezeléseket követően. A

Sox9 foszforilációs szintjének emelkedése volt detektálható oxidatív stresszben és a CsA-kezelés hatására, amit az Erk1/2 aktivitásának gátlása PD098059 inhibitorral nagymértékben visszaszorított. A PD098059 inhibitor a kezeletlen kultúrákban is csökkentette a Sox9 foszforilációját és fehérjemennyiségét.

A porcsejtek PD098059 inhibitorral történő kezelése fokozta a kalcineurin transzkripcióját, de a fehérjemennyiségét nem befolyásolta. PD098059 az oxidatív stressznek kitett porcsejtekben is fokozta a kalcineurin mRNS és fehérje szintjét, a CsA hatását nem módosította. Megfigyeltük, hogy a PD098059 kezelés szignifikánsan fokozta a kalcineurin aktivitását a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Nem volt számottevő változás a CsA-nak, ill. az oxidatív stressznek kitett sejtek enzimaktivitásában PD098059 kezeléssel.

Az NFAT család transzkripciós faktorai a kalcineurin aktiválás intracelluláris hatásainak fő mediátorai. Kísérleti rendszerünkben, az NFAT4 foszforilációját figyeltük meg valamennyi kezelést követően, de nem találtunk különbséget a foszforilációs szintek között.

A PKC izoenzimek szerepe a kalcineurin szabályozásában forbolészterrel és Ca-ionoforral stimulált humán mononukleáris sejtekben

Sejtpermeábilis, specifikus PKC inhibitorok (1 μ M GF109203X, a klasszikus és az új típusú, 0,2 μ M Gö6976, a klasszikus és 10 μ M Rottlerin, a δ PKC izoenzimek gátlószere) alkalmazásával vizsgáltuk, hogy mely PKC izoenzimek vehetnek részt a kalcineurin szabályozásában. A nem-stimulált perifériás mononukleáris sejtek PKC inhibitorokkal való kezelése nem okozott szignifikáns változást a kalcineurin aktivitásában. A sejtek PMA kezelése után mért kalcineurin

aktivitás mintegy 30 %-kal csökkent a nem-stimulált kontrollhoz képest, melynek aktivitását 100 %-nak tekintettük. A Ca-ionofor jelentősebb csökkenést (40-50 %) eredményezett a kalcineurin aktivitásában a kezelést követően. PMA és Ca-ionofor együttes alkalmazása nem okozott további kalcineurin aktivitás csökkenést.

A PKC inhibitorok, a GF109203X, ill. a Gö6976, kb. azonos mértékben fokozták a kalcineurin aktivitását stimulált sejtekben (PMA jelenlétében: 68 %-ról 85 %-ra, ill. 88 %-ra, Ca-ionofor jelenlétében: 58 %-ról 87 %-ra ill. 79 %-ra, Ca-ionofor és PMA jelenlétében: 47 %-ról 92 %-ra, ill. 90 %-ra), míg a Rottlerin PKC δ gátlószernek nem volt észrevehető hatása. A GF109203X a PKC izoenzimek kevésbé szelektív inhibitora, mint a Gö6976, mivel a klasszikus és az új típusú PKC izoenzimeket egyaránt gátolja. A Gö6976, a cPKC izoenzimek inhibitora, egyedül is képes volt kivédeni a kalcineurin aktivitásában bekövetkező gátlást, így feltételezhetjük, hogy elsősorban a cPKC α , β , γ izoenzimek játszanak szerepet a PMA és/vagy a Ca-ionofor indukálta változásokban.

Megfigyeltük, hogy sem a PMA, sem a Ca-ionofor nem befolyásolja a kalcineurin mRNS-, ill. fehérjeszintjét. Ezek rámutattak arra, hogy a PMA-val és a Ca-ionoforral stimulált humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben mért kalcineurin enzimaktivitásának csökkenése nem a kalcineurin transzkripciójában vagy transzlációjában bekövetkező gátlás következménye.

Cabin 1: lehetséges jeltovábbító molekula a PKC és a kalcineurin között

Ismeretes, hogy a kalcineurin PKC általi foszforilációja nem befolyásolja az enzim aktivitását, ezért feltételeztük, hogy olyan upstream

jelátviteli molekula játszhat szerepet a kalcineurin aktivitásának gátlásában, amelyet a PKC foszforilál. Ismeretes, hogy PKC aktiválásra a Cabin 1 hiperfoszforilálódik, ami fokozza a kalcineurinnal szembeni érzékenységet. A hiperfoszforilált Cabin 1 a kalcineurinhoz kötődve gátolja a foszfatáz aktivitását.

A Cabin 1 lehetséges jeltovábbító szerepének felderítésére vizsgáltuk a fehérje foszforilációs szintjének változását a kezelések hatására. A Cabin 1 fehérjét immunprecipitáltuk poliklonális Cabin 1 antitest segítségével. Az immunprecipitáció után a Cabin 1 foszfo-Ser oldalláncát foszfo-Ser antitesttel mutattuk ki immunoblottal. A Cabin 1 foszforilációs szintje jelentősen megemelkedett a PKC aktiváló szerek hatására külön-külön, ill. együttes alkalmazásakor, amit a PKC inhibitorok (GF109203X és Gö6976) nagymértékben visszaszorítottak. A Rottlerin nem befolyásolta a Cabin 1 foszfo-Ser tartalmát a kezelt sejtekben a stimulált mintákhoz viszonyítva.

DISZKUSSZIÓ

A protein foszfatázok ugyanolyan fontos szerepet töltenek be a sejt- és szövettudifferenciációt reguláló különböző fehérje foszforilációs-defoszforilációs folyamatainak szabályozásában, mint a protein kinázok. Az oxidatív stressz az egyik olyan faktor, ami a gyulladásos megbetegedések során porckárosodást idéz elő és reaktív oxigén gyökök termelésén keresztül befolyásolja a kalcineurin aktivitását.

Kimutattuk a kalcineurin jelenlétét és katalitikus aktivitását csirkeporc sejtekben. A kalcineurin pozitív szerepét feltételezzük csirkeporc sejtek *in vitro* kondrogenézis szabályozásában, mivel azt tapasztaltuk, hogy a kalcineurin inhibitor, a CsA gátolta a HD sejtek porcképződését valamint csökkentette az aggrecán és a Sox9 mRNS szintjét. Megfigyeltük, hogy az oxidatív stressz gátolta a kalcineurin enzimaktivitását és csökkentette a porcképződést, ami szintén a kalcineurin pozitív szerepét támasztja alá a porcdifferenciációban. A kalcineurin által szabályozott NFAT4 transzkripció faktor alap foszforilációs szintjét nem sikerült detektálni a kezeletlen kontrollban, de a hidrogén-peroxid és a CsA kezelések az NFAT4 foszforilált formájának a megjelenését idézték elő. Mivel a foszforilált NFAT4 szintje azonos volt a kezelt kolóniákban, felmerült annak a lehetősége, hogy a kalcineurinnak más target molekulái és/vagy az oxidatív stressz is részt vállal a kísérleti rendszerünkben.

A metakromáziás analízis után fokozott porcképződést figyeltünk meg a PD098059 MEK/Erk1/2 inhibitor jelenlétében, míg a Sox9 mRNS és fehérje szintjében kismértékű csökkenést tapasztaltunk. Mivel a foszfo-Sox9 iniciálja és stimulálja a porcspecifikus makromolekulák (pl. II-

típusú kollagén, aggkrekán) génjeinek transzkripció aktivitását, azt feltételezzük, hogy az Erk1/2 gátlása a PD098059 inhibítorral, ami fokozta a porcképződés mértékét, olyan downstream target molekulákra is kihathat, amelyek a porcképződést segítik elő. Eredményeink alapján nem vetjük el annak a lehetőségét sem, hogy az Erk1/2 foszforilálja a Sox9 transzkripció faktort. A Sox9 foszforilációs szintje megemelkedett a kalcineurin aktivitását gátló oxidatív stressz és CsA-kezelés hatására, ugyanakkor mindkét kezelés csökkentette a porcképződést. A H₂O₂-vel és CsA-val kezelt sejtekben az Erk1/2 aktivitása megemelkedett. Az Erk1/2 gátlása PD098059 inhibítorral részben kivédte mind a H₂O₂, mind a CsA indukált porckárosodást. A Sox9 foszforilációs szintje magasabb volt a PD098059 inhibítor jelenlétében, a H₂O₂-vel és a CsA-val kezelt mintákban a kontroll kultúrákhoz viszonyítva. Ezek az eredmények tovább erősítik azt a feltételezésünket, hogy a fokozott Erk1/2 aktivitás lehet az oka a csökkent porcképződésnek az oxidatív stresszt követően, továbbá a kalcineurin negatív hatást fejthet ki az Erk1/2 és/vagy a Sox9 foszforilációs folyamataira a kondrogenézis során.

Azt az ellentmondást, hogy a Sox9 foszforilációja fokozódott és ezzel egyidejűleg a porcképződés visszaszorult mind az oxidatív stressz, mind a CsA-kezelést követően, azzal magyarázzuk, hogy a cAMP-dependes protein kináz (PKA) aktivitása megemelkedett mindkét kezelést követően. Ismeretes, hogy a PKA a kondrogenézis pozitív regulátora fokozva a Sox9 transzkripció aktivitását. A kalcineurinnak és a PKA-nak van egy közös horgony fehérjéje (AKAP79), amely a megfelelő szubcelluláris kompartmentekbe irányítja a partnereket, a két fehérje szoros együttműködésére utalva a különböző intracelluláris folyamatokban.

A calcineurin szerepét PMA-val és Ca-ionoforral stimulált egészséges humán donoroktól származó perifériás vér mononukleáris sejteiben is vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy mind a PMA, mind az intracelluláris térben megnövekedett Ca^{2+} -ion koncentráció hozzájárul a calcineurin aktivitásának csökkenéséhez anélkül, hogy befolyásolná a calcineurin mRNS- és fehérjeszintjét. Megfigyeltük, hogy az enzimaktivitás-csökkenés érzékenyebb volt a Ca-ionofor hatására, mint a PMA kezelésre, mert nagyobb mértékben csökkentette az enzim aktivitását.

A sejtp permeábilis PKC inhibitorok alkalmazása rámutatott arra, hogy a cPKC α , β , és γ izoenzimeknek van szerepe a PMA-val és/vagy a Ca-ionoforral stimulált PBMC-ben mért calcineurin aktivitásának gátlásában, mivel a Gö6976, a cPKC izoenzimek szelektív inhibitora, egyedül is képes volt a stimulus hatását kivédeni. Mivel a calcineurin PKC általi foszforilációja nem befolyásolja a foszfatáz aktivitását, ezért a Cabin 1 jeltovábbító szerepét feltételeztük a PKC és a calcineurin jelpályák összekapcsolásában. Megfigyeltük, hogy a Cabin 1 foszforilációs szintje megemelkedett a PKC aktiváló szerek hatására, ami a GF109203X és a Gö6976 inhibitorok jelenlétében jelentős mértékben visszaszorult. Ez megerősítette azt az elképzelésünket, hogy a Cabin 1 szerepet játszhat a PKC jel továbbításában, a calcineurin enzim aktivitásának gátlásában mononukleáris sejtekben.

KONKLÚZIÓK

- ✓ Eredményeink a kalcineurin pozitív szerepét sugallják a csirkeporc sejtek kondrogenézisében, mivel a CsA csökkentette a porc mennyiségét és az aggregátum valamint a kondrogenikus Sox9 transzkripciós faktor mRNS szintjét.
- ✓ A H₂O₂ gátolta a porcképződést koncentráció-függő módon anélkül, hogy számottevően befolyásolta volna a sejtek életképességét és a sejtszámot. A Sox9 mRNS szintje és a defoszforilált fehérje mennyisége csökkent a H₂O₂- vagy a CsA-kezelést követően, míg a foszforilációja fokozódott mindkét kezelés hatására.
- ✓ Az oxidatív stressz csökkentette a kalcineurin aktivitását. A H₂O₂- vagy a CsA-kezelés pedig erőteljesen fokozta a MAPK/Erk1/2 foszforilációját.
- ✓ Az Erk1/2 gátlása PD098059 inhibítorral csökkentette a porcmátrix deplécióját, valamint a Sox9 expresszióját és foszforilációját H₂O₂- vagy CsA-kezelt kultúrákban.
- ✓ A H₂O₂ kondrogenézis gátló hatását részben a kalcineurin gátlása, részben az Erk1/2 MAPK aktiválása közvetíti.
- ✓ Mind a PMA, mind az intracelluláris térben megnövekedett Ca²⁺-koncentráció hozzájárul a kalcineurin aktivitásának csökkenéséhez humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben anélkül, hogy befolyásolná a kalcineurin mRNS- és fehérjeszintjét.
- ✓ A cPKC α , β , γ izoenzimek játszanak szerepet a kalcineurin aktivitásának gátlásában PMA-val és Ca-ionoforral stimulált humán mononukleáris sejtekben.

✓ Ebben a folyamatban a hiperfoszforilált Cabin 1 lehet a jelátviteli molekula, ugyanis a Cabin 1 fokozott foszforilációja volt detektálható a cPKC izoenzimek enzimatis aktiválását követően, ami a calcineurin gátlását eredményezte humán PBMC-ben.

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

R. Zákány*, **Z. Sziogyártó***, C. Matta, T. Juhász, C. Csontos, K. Szűcs, G. Czifra, T. Bíró, L. Módis and P. Gergely: Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of Erk1/2 and Sox9 pathways. *Exp. Cell Res.* 305, 190-199 (2005) IF = 4.148

* Megosztott első szerzők.

Z. Sziogyártó, K. Szűcs, I. Kovács, R. Zákány, S. Sipka and P. Gergely: The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of calcineurin activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Int. J. Mol. Med.* 20, 359-364 (2007) IF = 1.854

R. Zákány, E. Bakondi, T. Juhász, C. Matta, **Z. Sziogyártó**, K. Erdélyi, É. Szabó, L. Módis, L. Virág and P. Gergely: Oxidative stress-induced poly(ADP-ribosyl)ation in chick limb bud-derived chondrocytes. *Int. J. Mol. Med.* 19, 597-605 (2007) IF = 1.854

Egyéb publikációk

C. Matta, J. Fodor, **Z. Sziogyártó**, T. Juhász, P. Gergely, L. Csernoch and R. Zákány: Cytosolic free Ca²⁺ concentration exhibits a characteristic temporal pattern during *in vitro* cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. (*közlésre benyújtva*)

Előadások és poszterek az értekezés témájában

Előadások

Pál Gergely, **Zsolt Szíjgyártó**, Ildikó Kovács, Sándor Sipka: The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of calcineurin activity in human peripheral blood mononuclear cells [*PKC izoenzimek szerepe a calcineurin szabályozásában humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben*], 12 th World Congress Advances in Oncology and 10 th International Symposium on Molecular and Medicine, Crete, Greece, 2007

Szíjgyártó Zs., Szücs K., Bíró T., Sipka S., Gergely P.: *PKC izoenzimek szerepe a calcineurin aktivitásának, és expressziójának gátlásában forbolészterrel és Ca-ionoforral stimulált humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Pécs, 2006

Zákány R., Matta Cs., Juhász T., Fodor J., **Szíjgyártó Zs.**, Csernoch L., Módis L., Gergely P.: *Kalciurinérzékeny jelátviteli útvonalak az in vitro porcképződés szabályozásában*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Pécs, 2006

Gergely P., **Szíjgyártó Zs.**, Bakó Éva, Juhász T., Matta Cs., Módis L., Zákány R.: *Protein kinázok és foszfatázok szerepe a kondrogenézisben*, 36. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2006

Zákány R., **Szíjgyártó Zs.**, Juhász T., Matta Cs., Szücs K., Czifra G., Bíró T., Módis L., Gerely P. : *A porcdifferenciációt szabályozó jelátviteli pályák változásai az oxidatív stressz során*, XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004

Szíjgyártó Zs., *Protein kinázok és foszfatázok szerepe az oxidatív stressznek kitett kondrogenikus sejtek jelátviteli folyamataiban in vitro*, Tudományos Ph.D. Konferencia, Debrecen, 2004

Zákány R., **Szíjgyártó Zs.**, Szücs K., Czifra G., Módis L., Gerely P. : *Az oxidatív stressz hatásai az in vitro porcdifferenciációra*, Magyar Biokémiai Egyesület II. Jelátviteli Konferencia, Hógyész, Hungary, 2003

Szjgyártó Zs., *Kalcineurin aktivitás vizsgálata humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben*, Tudományos Ph.D. Konferencia, Debrecen, 2003

Poszterek

Róza Zákány, Tamás Juhász, Csaba Matta, Gabriella Czifra, **Zsolt Szjgyártó**, László Módis, Pál Gergely: Protein phosphatase 2A is a negative, while calcineurin a positive regulator of chondrogenesis [A protein foszfatáz 2A negatív, míg a kalcineurin pozitív szabályozója akondrogenézisnek], XX.th FECTS & ISMB Meeting, Oulu, Finland, 2006

Szjgyártó Zs., Matta Cs., Juhász T., Szűcs K., Csontos Cs., Czifra G., Bíró T., Módis L., Zákány R., Gergely P.: A kalcineurin szerepe az *in vitro* porcdifferenciáció szabályozásában oxidatív stressznek kitett primer csirkeporc kultúrákban, 36. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2006

T. Juhász, C. Matta, **Z. Szjgyártó**, G. Czifra, T. Bíró, P. Gergely, L. Módis and R. Zákány: Calcineurin regulates chondrogenesis via the modulation of ERK1/2 activity [A kalcineurin az Erk1/2 aktivitásának modulálásán keresztül szabályozza a kondrogenézist], 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, 2005

Szjgyártó Zs., Szűcs K., Csontos Cs., Bakó É., Czifra G., Bíró T., Zákány R., Matta Cs., Juhász T., Módis L., Gergely P. : *Protein kinázok és foszfatázok szerepe az in vitro porcdifferenciációban*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Sopron, 2004

Juhász T., **Szjgyártó Zs.**, Matta Cs., Szűcs K., Czifra G., Zákány R., Módis L., Gergely P. : *A PP2B szerepe az oxidatív stressz porcképződést gátló hatásának kialakulásában*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Sopron, 2004

Juhász T., Matta Cs., **Szjgyártó Zs.**, Czifra G., Zákány R., Módis L., Gergely P. : *Protein foszfatázok szerepe az oxidatív stressz során az in vitro porcdifferenciáció szabályozásában*, XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004

Szjgyártó Zs., Szűcs K., Bakó É., Czifra G., Zákány R., Módis L., Gerely P. : *Fehérje foszforilációs folyamatok jelentősége az oxidatív stressz in vitro porcdifferenciációt gátló hatásában*, Magyar Biokémiai Egyesület II. Jelátviteli Konferencia, Hőgyész, 2003

Szjgyártó Zs., Szűcs K., Bíró T., Spka S., Gergely P.: *Kalcineurin aktivitás vizsgálata humán perifériás mononukleáris sejtekben*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Tihany, 2003

Zákány R., Bakondi E., **Szjgyártó Zs.**, Bakó É., Szűcs K., Czifra G., Bíró T., Módis L., Gergely P. : *Az oxidatív stressz hatása az in vitro porcdifferenciáció szabályozásában szerepet játszó jelátviteli pályák működésére*, Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály Munkaértekezlete, Tihany, 2003

Egyéb előadások és poszterek

Szjgyártó Zs., Juhász T., Matta Cs., Zákány R.: *A protein kináz C δ a porcdifferenciáció egyik szabályozó eleme*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Debrecen, 2007

Matta Cs., Fodor J., Juhász T., **Szjgyártó Zs.**, Csernoch L., Zákány R.: *Ionotróp purinerg receptorok a differenciálódó kondrocitákon*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Debrecen, 2007

Juhász T., Matta Cs., **Szjgyártó Zs.**, Zákány R.: *Kalcineurin vizsgálata humán melanóma sejtvonalakban*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Debrecen, 2007

Juhász T., Matta Cs., **Szjgyártó Zs.**, Gergely P., Zákány R.: *A PKC δ szerepe a porcdifferenciációban*, VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007

Matta Cs., Juhász T., Fodor J., Csernoch L., **Szjgyártó Zs.**, Gergely P., Zákány R.: *Ionotrop purinoreceptorok szerepe a porcképződésben*, VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007

Juhász T., Matta Cs., Mészár Z., Nagy G., Hajas Gy., **Szíjgyártó Zs.**, Dobrosi N., Czifra G., Karácsonyi Z., Bíró T., Módis L., Gergely P. Zákány R.: *Primer pocosodó sejt kultúrák tranziens transzfekeciójának optimalizálása*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Pécs, 2006 (előadás)

C. Matta, T. Juhász, **Z. Szíjgyártó**, G. Czifra, T. Bíró, P. Gergely, L. Módis and R. Zákány: The role of protein kinase C isoenzymes in the chondrogenesis of micro-mass cell cultures [*A protein kináz C izoenzimek szerepe a micromass sejt kultúrák kondrogenézisében*], 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, 2005

Matta Cs., Juhász T., Bakondi E., **Szíjgyártó Zs.**, Czifra G., Módis L., Gergely P., Zákány R., Virág L.: *A poli(ADP-ribozil)áció változása oxidatív stressz hatására kondrogenikus primer sejt kultúrákban*, VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005 (előadás)

Juhász T., Matta Cs., Mészár Z., **Szíjgyártó Zs.**, Czifra G., Módis L., Gergely P., Zákány R.: *A porcosodó high density mezenchimális kultúrák transzfekeciós lehetőségei*, VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005 (előadás)

Matta Cs., Juhász T., **Szíjgyártó Zs.**, Szűcs K., Czifra G., Zákány R., Módis L., Gergely P. : *PKC izoenzimek szerepe az in vitro porcdifferenciáció szabályozásában*, Magyar Biokémiai Egyesület Konferenciája, Sopron, 2004

Matta Cs., Juhász T., **Szíjgyártó Zs.**, Czifra G., Zákány R., Módis L., Gergely P. : *A PKCmu szerepe a kondrogenézis szabályozásában*, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004