

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**FOSZFO-SER/THR-SPECIFIKUS FEHÉRJE FOSZFATÁZOK SZEREPE AZ IN
VITRO PORCDIFFERENCIÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Dr. Zákány Róza

Témavezető: Prof. Dr. Módis László

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ANATÓMIA, SZÖVET- ÉS FEJLŐDÉSTANI INTÉZET
2001**

1. BEVEZETÉS

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 alaposabb megismerése, illetve a végtagok csontos vázának templátjául szolgáló porctelepek létrejöttét szabályozó molekuláris mechanizmusok feltárása előremozdíthatják ezeknek a megbetegedéseknek a jövőbeni jobb gyógyíthatóságát. Vizsgálatainkkal a porcdifferenciáció szabályozásában szerepet játszó fehérje foszforilációs folyamatok megismeréséhez kívántunk új eredményekkel hozzájárulni.

A porcszövet az egyéb kötő- és támasztó szövetekhez hasonlóan mezenchimális szövetből fejlődik. A folyamat során első lépésben a kondrogenikus sejtek kis sejtcsoportokat képeznek *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Az aggregátumokban N-CAM és N-cadherin révén létrejövő sejt-sejt kapcsolatok, különböző citokinek, pl. TGF β , FGF4, valamint egyéb parakrin (PGE-2) és endokrin úton ható tényezők (retinol, parathormon, D₃-vitamin) modulálják a porcdifferenciáció folyamatát. Mindezek mellett fontos szerepet visznek a porcelőfutár sejtek fenotípusának alakításában a sejteket körülvevő extracelluláris matrix (ECM), valamint az azokat a sejtekhez kötő adhéziós molekulák expressziós mintázatában bekövetkező változások is. A kezdetben nyúlványos kondrogenikus sejteket hialuronsavban, fibronectinben és I. típusú kollagénben gazdag ECM veszi körül, a sejtek pedig elsősorban a fibronectin ligandot kötő α 5 β 1 integrint expresszálják a felszínükön. A kondrogenikus sejtek által átmenetileg szintetizált tenascin antiadhezív sajátságának köszönhetően a nyúlványos sejtek rövidesen felválnak a matrix alapzatról és lekerekednek. Eközben megváltozik a fokális adhéziós helyek ligandkötése is, tovább modulálva a sejtek citoskeletonjának szerkezetét. Az pedig jól ismert, hogy a citoskeleton szerkezeti átalakulásai a génexpresszió aktivitásának változásait vonhatják maguk után. A lekerekedő sejtek elkezdik a hialinporcra specifikus ECM-alkotók, többek között a II. típusú kollagén, valamint a nagy aggregáló proteoglikán, az aggregán szintézisét és létrehozását a fenotípus stabilizálásához szükséges mikrokörnyezetet.

A kondrogenézis korai stádiumától emelkedő intracelluláris cAMP-szint detektálható a differenciálódó sejtekben. A cAMP sejten belüli hatásainak mediálásáért a Ser/Thr-specifikus protein kinázok csoportjába tartozó cAMP-függő protein kináz (PKA) aktiválódása a felelős. 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 alegységről való leválását és aktiválódását váltja ki. Az enzim aktivitása szempontjából döntő fontosságú a katalitikus alegység Thr-197 aminosav-oldalláncának foszforiláltsága. A PKA hatásainak specifikusabbá tételében lényeges szerepet töltenek be a PKA-kötő fehérjék, amelyek különböző szubcelluláris kompartmentekhez lokalizálhatják a PKA holoenzimeket. A PKA által foszforilált és a génexpresszió szabályozásában fontos egyik transzkripciós faktor a "cAMP respond element binding" (CREB) fehérje. A CREB Ser-133 aminosav-maradékon történő foszforilálása fokozza annak génexpressziót aktiváló hatását. Újabb irodalmi adatok azt is bizonyítják, hogy a PKA foszforilálja a porcdifferenciáció irányításában karmester-génként működő Sox9 gén fehérjetermékét, a SOX9 transzkripciós faktort, amely a foszforilációt követően hatékonyabban aktiválja a kondrogenikus sejtekben a II. típusú kollagén és az aggregán tengelyfehérje géneit.

A Ser/Thr-specifikus protein kinázok aktivitása révén foszforilált fehérjék defoszforilálását a foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok (PP) katalizálják. A Ser/Thr-specifikus PPk felosztása szubsztrát specifitásuk, illetve inhibitorok iránti érzékenységük alapján történik. A PP1 az emlős foszforiláz kináz β -alegységét defoszforilálja, inhibitor-1 (I1) és inhibitor-2 (I2) fehérjékkel gátolható. A PP1 az eukarióta szervezetekben esszenciális szerepet betöltő enzim, erre utal a katalitikus alegység nagymértékű evolúciós konzervatívizmusa. Természetes formában egy katalitikus és egy regulátor alegység alkotta

dimerként funkcionál. A PP2 család tagjai a foszforiláz kináz α -alegységét defoszforilálják és nem gátolhatók I1 és I2 fehérjékkel. A PP2 családon belül három 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. A PP2A a sejtekben valószínűleg trimer formában található. A katalitikus alegység állandó komplexet alkot az A-regulátor alegységgel és ehhez a dimerhez többféle B-alegység kapcsolódhat. A PP2A számos jelátviteli rendszer lényeges eleme. Ez a szerep nem korlátozódik a foszforilálható transzkripciós faktorok és egyéb messenger molekulák defoszforilálására, hanem számos protein kináz, köztük a PKA aktivitását is befolyásolja a PP2A.

A PP-k celluláris folyamatokban betöltött fontos szerepére utal az a tény is, hogy számos mikroorganizmus termel foszfatáz inhibitor aktivitású toxinokat. Az egyik ilyen toxint, az okadainsavat (OA) tengeri algák szintetizálják és egy velük táplálkozó fekete szivacs-féléből izolálták először Japánban. Az OA poliéter zsírsav, így könnyen áthatol a sejtmembránon és már nanomol koncentrációban is hatékonyan gátolja a PP2A-t. Az OA a PP1 aktivitását csak magasabb, 0,1 μ M feletti koncentrációkban gátolja. Más típusú enzimek, pl. kinázok aktivitását az OA közvetlenül nem befolyásolja. Így az OA kiválóan alkalmas a PP2A által katalizált defoszforilációs folyamatok tanulmányozására.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Nagy számú irodalmi adat igazolja a porcdifferenciációt reguláló proteinfoszforilációs mechanizmusok fontosságát. Számos protein kináz szerepét bizonyították a kondrogenezis szabályozásában. Emellett 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. Arról azonban nem rendelkezünk adattal, hogy a proteinfoszforilációt reverzibilissé tevő foszfatázok milyen szerepet játszanak a porckialakulás során. Ezért kísérleteink céljaul 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 kondrogenezis folyamatára;
- ❖ összefüggést keresni a porcképződésben szerepet játszó foszforilációs és defoszforilációs szabályozó mechanizmusok között közös szubsztrátmolekulák azonosításával.

3. KÍSÉRLETI MODELL ÉS AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.1. Porcosodó high density mezenchimális sejtkultúrák

A Hamburger-Hamilton szerinti 22-24-es fejlettségi stádiumú csirkeembriók végtagtelepeiből izolált porcosodó mezenchimális sejtekből előállított primer high density (HD) sejtkultúrákat több évtizede alkalmazzák a porcdifferenciáció tanulmányozására. Az eredeti leírás szerinti 20×10^6 sejt/ml sűrűségű sejtuszpenzió helyett mi 15×10^6 sejt/ml sűrűségű szuszpenziót alkalmaztunk és 10 μ l-es cseppek helyett 100 μ l-es cseppeket használtunk, így sokkal homogénebb képet mutattak a kultúrák a tenyésztés végén. A morfológiai vizsgálatokra készített kultúrákat műanyag Petri csészébe helyezett műanyag fedőlemezen tenyésztettük. Az enzimaktivitás-mérésekhez és immunoblot vizsgálatokhoz fedőlemez nélkül a Petri csészék aljára cseppentett tenyészeteket használtunk. A sejtproliferációs vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter plate-ek lyukaiba cseppentett 15 μ l-es cseppek felhasználásával végeztük. A kultúrák kicseppentésének napja a tenyésztés 0. napja. A tenyészeteket 10 % fetális borjú szérummal kiegészített Ham's F12 táptalajjal, ha a kísérlet menete másként nem diktálta, másodnaponta etettük.

3.2. A protein foszfatáz-aktivitás gátlása okadainsavval és a PKA aktivitás gátlása H89-cel

A foszfatáz (OA) és PKA (H89) inhibitorokat a kultúrák táptalajába keverve alkalmaztuk, a behatási idő elteltével OA esetében normál táptalajra cseréltük a médiumot. Az alábbi kísérleti csoportokat alakítottuk ki:

1. 5, 10 és 20 nM OA a tenyésztés 2. és 3. napján 4-4- órára adva;
2. 50 és 100 nM OA ugyanígy alkalmazva;
3. a 0., az 1. vagy a 2. tenyésztési naptól a tenyésztés végéig folyamatosan 2, 4, 6, 8, 10 és 20 nM OA-val kezelt kultúrák;
4. 20 μ M H89 folyamatos jelenléte a médiumban a tenyésztés 1. napjától kezdve;
5. folyamatos H89 kezelés a 2. és 3. tenyésztési napokon 4-4 órára adott OA kezeléssel kombinálva.

3.3. Fénymikroszkópos hisztokémiai és ultrastruktúrális vizsgálatok, valamint képanalízis

A 6 napos tenyészetek fénymikroszkóppal látható szerkezeti változásait vizes, valamint 3 %-os ecetsavban oldott dimetilmetilénkékkel (DMMK) megfestett kultúrákon vizsgáltuk. A DMMK vörös metakromáziás színben tünteti fel a szulfatált glikozaminoglikán oldalláncokban gazdag proteoglikánokat (PG) nagy mennyiségben tartalmazó porcmatrixot. Alacsony pH-jú DMMK oldattal történő festést követően az ortokromáziás kék színeffektus egyáltalán nem látszik.

Az OA-val kezelt kultúrák aktin filamentumainak elrendeződését TRITC-falloiddinnel való jelölést követően lézer konfokális mikroszkóppal készült felvételeken vizsgáltuk.

Az OA-nak a kondrociták ultrastruktúrájára, valamint a kollagénfilamentumok megjelenésére gyakorolt hatásait 2,5 %-os glutáraldehiddel fixált és uranil-acetáttal, valamint ólom-acetáttal kontrasztosított ultravékony metszeteken tanulmányoztuk. A porcmatrix PG-jainak nagyságát, megoszlását nátrium-acetát pufferben oldott 2,5 % glutáraldehid, 0,5 % kuprolinék (CB) és 0,3 M $MgCl_2$ -tartalmú oldattal fixált és megfestett tenyészetekből készült ultravékony metszeteken analizáltuk.

A tenyészetekben kialakult porckolóniák nagyságát számítógépes képanalízissel mértük meg és hasonlítottuk össze az egyes kísérleti csoportokban. Erre a célra 6 napos, ecetsavban oldott DMMK-kel megfestett kultúrák egyforma alapterületű részleteiből készült felvételeket használtunk. Az adatok statisztikai analizisét ambiguity-próbával végeztük el.

3.5. Kollagén- és PG-molekulák biokémiai vizsgálata

A kezeletlen kontroll és az OA-kezelt tenyészetek matrixát alkotó különböző kollagének, valamint PG-ok megoszlását és mennyiségét 8 napos kultúrákból 4 M guanidin HCl-dal, illetve pepszines emésztéssel készült kivonatokban elemeztük. Az I. és II. típusú kollagéneket a pepszin-emésztett mintákból készült immunoblotok segítségével vizsgáltuk. A porcmatrix PG-molekuláit agaróz-poliakrilamid géleken, toluidinkékkel történt festést követően analizáltuk.

3.6. Enzimaktivitás mérések

Az enzimaktivitás mérések minden esetben a lízispufferben felvett kultúrák ultrahangos feltárással készült homogenizátumainak a felülúszóiból származó mintákban történtek. A kezeletlen kontroll kultúrákban mérhető PP aktivitásokat 1, 2, 3, 4 és 6 napos tenyészetekben vizsgáltuk. A későbbiekben az OA-val, valamint H89-cel kezelt kultúrákban mérhető PP aktivitásokat 2, 3 és 6 napos kezeletlen kontroll kultúrákban mért aktivitásokhoz hasonlítottuk. A kísérletek második fázisában mértük az 1, 2, 3 és 6 napos kezeletlen kontroll tenyészetekben a PKA aktivitás porcdifferenciációval összefüggő változásait. Emellett 2, 3 és 6 napos tenyészetekben a PP aktivitások változásai mellett detektáltuk a különböző kísérleti csoportokban észlelhető PKA aktivitásokat is.

3.7. A PKA α -katalitikus alegység, valamint a CREB és a P-CREB mennyiségének vizsgálata immunoblottal

A különböző kísérleti csoportokból származó, lízispufferben felvett kultúrákból készült mintákat nitrocellulóz membránra vittük át, majd a membránokat a PKA α -katalitikus alegysége, illetve a CREB vagy a P-CREB ellen termeltetett antitestekkel reagáltattuk. Második antitestként tormaperoxidázzal konjugált antitestet használtunk, majd a reakció eredményét kemilumineszcenciás módszerrel tettük láthatóvá.

3.8. A sejtproliferáció változásainak vizsgálata

A különböző kísérleti csoportokhoz tartozó tenyészeteket 96 lyukú mikrotiter plate-ekben tenyésztettük, az 1., 2., 3., 4., vagy 6. napokon 1 μ Ci/ml 3 H-timidint tartalmazó táptalajban tartottuk 16 órán át. Ezt követően a kultúrákat PBS-sel átmostuk, a fehérjéket 5 % triklórecetsavval kicsaptuk és újabb mosások után tripszinnel emésztettük. A kultúrákat félautomata sejt-harvesterrel szcintillációs papírra vittük és a radioaktivitásokat béta-számlálóval detektáltuk. Az adatok statisztikai elemzését F-próbával végeztük. A proliferáció változásait a kísérletek kezdeti szakaszában brómdeoxiuridin beépülésének fluoreszcens immunhisztokémiai kimutatásával is vizsgáltuk. Mivel a proliferáció-változás tendenciája a két módszerrel egyformának bizonyult, ezért a későbbiekben csak a radioaktív timidin beépülésének detektálásával követtük nyomon a sejtszaporodás alakulását az egyes hatóanyagok alkalmazása során.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

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 PP2A és a PKA aktivitását szelektív inhibitorok alkalmazásával blokkoltuk. Először a sejtpermeábilis foszfataz inhibitor OA porcdifferenciációra gyakorolt hatásait vizsgáltuk.

4.1. Az OA-kezelés hatásai a porcképződésre

Kísérleteinkben 20 nM OA-nak a porcdifferenciáció szempontjából kulcsfontosságú második és harmadik tenyésztési napon való adásával szignifikánsan – 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, azonban OA kezelésekre 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.

4.2. Az OA-kezelés sejtproliferációra gyakorolt hatása

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. A HD-kultúrák mezenchimális sejtjeinek elkötelezett porcosodó sejté váló differenciálódása a proliferációval és sejt kondenzációval párhuzamosan zajlik az első és második tenyésztési napon. Megfelelő sejtsűrűség esetén direkt sejt-sejt kapcsolatok és parakrin szignálok (pl. prosztaglandinok) serkentik az elkötelezett sejtek differenciálódását, melyek először kondroblasztokká, majd kondrocitákká válnak a harmadik tenyésztési napra. Az OA-kezelés hatására bekövetkező sejtproliferáció-fokozódás a megfelelő sejt denzitás és így az intenzívebb sejt-sejt kapcsolatok, valamint a kielégítő erősségű parakrin jelek révén több, erőteljesebben elkötelezett porcosodó sejt keletkezését eredményezheti. Irodalmi adatok szerint 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. Összegezve, az OA két, látszólag egymással ellentétes módon befolyásolja a sejt ciklust, azonban mindkét effektus egy irányba, a porcosodás fokozódása felé hat.

4.3. Az OA-kezelés hatása a citoszkeleton szerkezetére

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az OA-kezelés az aktin filamentumok 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.

Régóta ismert az a tény, hogy az aktin filamentumok széttöredezése serkenti a porcképződést. Azt is tudjuk, hogy a citoszkeleton szerkezetének változásai befolyásolják a génexpresszió aktivitását, s ez a moduláció akár a porcdifferenciáció szabályozásában szerepet játszó géneket is érintheti. Emellett a különböző jelátviteli folyamatokban fontos

szereppel bíró számos enzimféleség (pl. egyes PKA holoenzimek a kötőfehérjéi révén, illetve egyes PP2A holoenzimek a B-regulátor alegységei által) kötődhet a citoskeleton egyes komponenseihez, így a citoskeletonális alkotók, elsősorban az aktinfilamentumok, de a mikrotubulusok változásai is hatással lehetnek ezen enzimek aktivitására.

4.4. A PP1 és a PP2A aktivitása a kontroll, valamint az OA-kezelt porcsejtekben

A különböző életkorú kezeletlen kontroll HD-kultúrák homogenizátumának felülúszóiban mért foszfo-Ser/Thr-specifikus PP aktivitási értékek azt mutatják, hogy a porcdifferenciáció során a PP2A aktivitása erőteljesen csökken, míg a PP1 aktivitása igen magas, de gyakorlatilag változatlan szinten marad. 20 nM OA-nak a porcdifferenciáció szempontjából kulcsfontosságú második és harmadik napon való adásával szignifikáns PP2A aktivitás csökkenést értünk el, míg ez az OA-koncentráció a PP1 aktivitást nem befolyásolta. Ezekből a tényekből arra következtetünk, hogy a PP1-nek esszenciális, de a porcdifferenciációval szoros ok-okozati összefüggésben nem lévő szerepe van a kondrogenikus sejtekben. Ezzel ellentétben, a PP2A részt vesz a kondrogenézis szabályozásában, aktivitása a porcképződést gátolja.

4.5. A PKA aktivitás gátlásának hatásai a kondrogenézisre

Az OA által kiváltott PP2A-gátlás hatásmechanizmusának kísérletes bizonyítékait a PKA-t szelektíven gátló koncentrációban (20 μ M) alkalmazott protein kináz inhibitornak, a H89-nek a kultúrák táptalajához való adásával kerestük. Ez a H89 koncentráció szignifikáns PKA aktivitás csökkenést okozott a HD-kultúrák homogenizátumának felülúszóiban detektálva. A PKA aktivitás gátlásával párhuzamosan a kondrogenézis csökkenését tapasztaltuk. A porc szinte egyáltalán nem fejlődött ki a H89-kezelt kolóniákban, a kontrollhoz viszonyítva csak mintegy 4 %-nyi nagyságú porcmatrixszal fedett alapterületet mértünk bennük. Mivel a kondrogenikus mezenchimális sejtekből kialakultak a sejtaggregátumok, de a sejtsomókban aztán nem jelent meg a porcmatrix, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a PKA-nak elsősorban a már aggregálódott és elkötelezett porcelőfutár-sejteknek az érett kondrocitákká való alakulásában visz szerepet és nem vesz részt a differenciáció kezdeti lépésének, a sejtaggregációnak a szabályozásában.

Kísérleti eredményeink szerint a PP2A gátlása OA-val jelentősen fokozta a tenyészetekben mérhető PKA-aktivitást és ugyanakkor serkentette a porcképződést. Ezért úgy gondoljuk, hogy a PP2A defoszforilálja a PKA katalitikus alegységét (PKA-C-t) és szerepet játszik a PKA jelátviteli útvonal szabályozásában a kondrogenézis során. Ezt az elképzelést alátámasztják azok az irodalmi adatok is, melyek szerint a kérdéses enzimeket tartalmazó, sejtlmentes vizsgálati rendszerekben a PP2A defoszforilálja a PKA-C Thr-197-es aminosavmaradékát és ilymódon inaktíválja a PKA-t. Úgyszintén a PP2A-nak a PKA aktivitását reguláló funkciója mellett szól az a kísérleti leletünk is, hogy a PKA-C α expressziója nem változik sem OA, sem H89 hatására.

4.6. A H89-kezelésnek a sejtproliferációra gyakorolt hatásai

Kísérleteink során a PKA-aktivitás H89-cel való gátlásával párhuzamosan csökkent sejtproliferációt detektáltunk valamennyi vizsgált napon. 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.

4.7. A PP2A és a PKA gátlások hatása a CREB expressziójára és foszforilációjára

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, 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 oldalláncon történő foszforilálása fokozza a génexpressziót aktiváló hatását. Így joggal juthatunk arra a következtetésre, hogy az OA-val történt PP2A-gátlás – legalábbis részben – a PKA-mediálta és a CREB foszforiláltsági szintjét megváltoztató jelátviteli út módosítása révén fejtheti ki a porcdifferenciációt fokozó hatását.

Irodalmi adatok szerint a CREB foszforilációja a BMP-2 és a cAMP indukált porcképződés során egyaránt bekövetkezik. A CREB család tagjai szükségesek az enkondrális csontosodással kialakuló csontok megfelelő fejlődéséhez is. A sejtípustól és kísérleti rendszertől függően, a PP2A és a PP1 egyaránt defoszforilálhatják a CREB-et, valamint a PP2A magát a PKA katalitikus alegységét is defoszforilálja. 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 hatása pedig a porcdifferenciáció serkentése lehet.

A H89 és az OA együttes adását követően a CREB és P-CREB szintje egyaránt a kontroll tenyészetekben detektálható 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 génjeinek az expresszióját. Emellett az is ismert, hogy a csirke HD-kultúrákban csökken a Sox9 gén expressziója a porcképződés előrehaladtával. További kísérleteink során tervezzük vizsgálni a SOX9 foszforilációjának, valamint a Sox9 aktivitásának a változásait OA és H89 hatására.

5. 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 koncentrációban adva, a PP2A aktivitás csökkenését láttuk, míg a PP1 aktivitása nem változott. Az OA-t az enzimaktivitási mérések során alkalmazva, az nem befolyásolta a PKA aktivitást.
5. Az OA fokozza a sejtproliferációt.
6. H89 adásával gátolva a PKA aktivitását, a porcképződést dóziszfüggő módon gátoltuk.
7. A H89 jelentősen csökkenti a sejtproliferációt is.
8. A tenyészeteket OA-val kezelve emelkedik a PKA aktivitása, így arra következtetünk, hogy a high density kultúrákban zajló porcdifferenciáció során a PP2A defoszforilálhatja a PKA katalitikus alegységét.
9. A PKA katalitikus alegység expressziója nem változik számottevő mértékben sem OA, sem H89 hatására.
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 kondrogenezis során.
11. A H89 csökkenti, az OA pedig fokozza 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.

6. KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK, POSZTEREK

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 and 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: 2,471

Zákány R, Szücs K, Bakó É, Felszeghy Sz, Módis L and Gergely P (2001): Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A activity and CREB phosphorylation during *in vitro* chondrogenesis.

Közlésre elküldve.

Egyéb közlemények:

Kappelmayer J, Bacskó G, Birinyi L, Zákány R, Kelemen E and 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 and 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/foszfozionin-specifikus protein foszfatázokat gátló toxinok élettani hatásai. *Nephrologia* 2000 (szerk.: Kakuk Gy. És Kárpáti I) 13-20.

Előadások és poszterek az értekezés tárgyában:

Módis L, Aydelotte MB, Hadházy Cs, Zákány R, Kocsis K and Hyttinen M: Extracellular matrix organization studied by polarization microscopy in cartilage differentiating *in vivo* and *in vitro*. Transactions of the 39. Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 1993, poster.

Zákány R, Ádány R és Módis L: Tenascin immunhisztokémia humán embrionális szöveteken. II. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Szeged, 1994, poszter.

Zákány R, Módis L and Ádány R: Expression of tenascin during the early phase of human development. Fourth European Congress of Cell Biology, Prague, 1994, poster.

Módis L, Kocsis K, Zákány R and Dobai J: Submicroscopic heterogeneity of the extracellular matrix structure and its changes during the development. Fifth International Congress of Systematic and Evolutionary Biology, Budapest, 1996, lecture.

Zákány R és Kocsis K: Porcmatrix rekonstrukciójának elektron-mikroszkópos elemzése sejt-kultúrákban. Doktoranduszok I. Országos Konferenciája, 1996, Debrecen, előadás.

Zákány R, Kocsis K, Dobai J és Módis L: Porcsejt-kultúrák matrix-rekonstrukciójának elektronmikroszkópos elemzése számítógépes képanalízis segítségével. V. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 1997, Debrecen, előadás.

Zákány R, Felszeghy Sz és Bakó É: A foszfatáz inhibitor okadaic acid fokozza az *in vitro* porcdifferenciációt. PhD-Konferencia, 1998, Debrecen, előadás.

Zákány R, Kocsis K, Bakó É, Felszeghy Sz, Gergely P és Módis L: Exogén kondroitin szulfát, valamint a foszfatáz inhibitor okadaic acid fokozzák a porcdifferenciációt high density porcosodó mesenchyma-sejt-kultúrákon. VI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 1998, Szeged, előadás.

Zákány R, Bakó É, Felszeghy Sz, Gergely P and Módis L: The serine/threonine phosphatase inhibitor okadaic acid promotes cartilage differentiation *in vitro*. XVIth FECTS Meeting, Uppsala, 1998, poster.

Zákány R, Bakó É, Felszeghy Sz, Holló K, Balázs M, Gergely P and Módis L: Inhibition of protein phosphatase 2A enhances chondrogenesis via alteration of PKA-signaling pathway. XVIIth FECTS Meeting, Patras, 2000, poster and lecture.

Zákány R, Szűcs K, Bakó É, Felszeghy Sz, Balázs M, Módis L és Gergely P: Ser/Thr protein foszforiláció szerepe a porcdifferenciáció szabályozásában. IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2001, Debrecen, előadás.