

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés

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

**Szűgyártó Zsolt**

**Témavezető: Dr. Gergely Pál**



MTA SEJTBOLÓGIAI ÉS JELÁTVITELI KUTATÓCSOPORT  
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
DEBRECENI EGYETEM

2007

# Tartalomjegyzék

<b>1. Irodalmi áttekintés</b>	5
1.1. Bevezetés	5
1.2. A kalcineurin szerkezete és szabályozása	7
1.2.1. A kalcineurin biokémiai és szerkezeti sajátosságai	7
1.2.2. A kalcineurin szabályozása	9
1.2.3. A kalcineurin inhibitorai	11
1.3. Az NFAT transzkripciós enzimes család	12
1.3.1. Az NFAT biokémiai és szerkezeti sajátosságai	12
1.3.2. Az NFAT fehérjék foszforilációja	12
1.3.3. A kalcineurin és az NFAT	13
1.4. Sox9 transzkripciós faktor	14
1.4.1. A Sox transzkripciós faktorok biokémiai és szerkezeti sajátosságai	14
1.4.2. A Sox9 transzkripciós faktor szabályozása	14
1.4.3. A Sox9 transzkripciós faktor és a kondrogenézis	15
1.5. Mitogén aktivált protein kinázok	17
1.5.1. A MAPK szerkezeti sajátosságai és szabályozása	17
1.5.2. A MAPK és a kondrogenézis	18
1.6. A protein kináz C enzimek szerkezeti sajátosságai és szabályozásuk	19
1.7. Az oxidatív stressz és az ízületi porc	21
1.8. Szisztémás Lupus Erythematosus	23
<b>2. Célkitűzések</b>	26
<b>3. Anyagok és módszerek</b>	28
3.1. Anyagok	28
3.2. Sejtenyésztés	28
3.3. Fénymikroszkópos morfológiai vizsgálat számítógépes képanalízissel	28
3.4. A sejtproliferáció vizsgálata [ <sup>3</sup> H]-timidin beépülésével	29
3.5. A sejtek életképességének vizsgálata	29
3.6. Porcsejtek kezelése	30
3.7. Porcsejt kivonatok preparálása	30
3.8. Humán perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) preparálása és a sejtek jellemzése áramlásos citometriával	30
3.9. A PBMC kezelése és a minták előállítása	30
3.10. Kalcineurin enzimaktivitás mérése	31
3.11. A PKA enzimaktivitás mérése	31
3.12. Immunprecipitáció	32
3.13. Western blot analízis	32
3.14. RT-PCR analízis	33
3.15. Kvantitatív Real Time RT-PCR analízis	34
3.16. Statisztikai analízis	36
<b>4. Eredmények</b>	37
4.1. Jelátviteli pályák vizsgálata csirkeporc kultúrákban	37
4.1.1. A porcspecifikus markerek és a Sox9 transzkripciós faktor változása a porc-differenciáció során	37
4.1.2. Az oxidatív stressz hatása a kondrogenézisre	40

4.1.3. A calcineurin szerepe a kondrogenézisben	44
4.1.4. A calcineurin szerepe az oxidatív stressz kondrogenézis gátlásában	48
4.1.5. A MAPK/Erk1/2 jelpálya szerepe a kondrogenézisben	49
4.1.6. Az NFAT4 expressziós és a foszforilációs szintjének változása az oxidatív stressz és a CsA kezelés hatására	53
4.2. A PKC izoenzimek szerepe a calcineurin szabályozásában forbolészterrel és Ca ionoforral stimulált humán mononukleáris sejtekben	55
4.2.1. A kezelések hatása a sejtek életképességére	55
4.2.2. A különböző PKC izoenzim-specifikus inhibitorok hatása a PMA és a Ca-inofor által stimulált humán perifériás vér mononukleáris sejtek calcineurin aktivitására	56
4.2.3. A calcineurin mRNS és fehérje szintjének változása humán perifériás vér mononukleáris sejtekben	58
4.2.4. Cabin 1: lehetséges jeltovábbító molekula a PKC és a calcineurin között	60
<b>5. Megbeszélés</b>	62
<b>6. Összefoglalás</b>	69
<b>7. Summary</b>	70
<b>8. Hivatkozások</b>	71

## Rövidítésjegyzék

BMP	csont morfogénikus fehérje (bone morphogenic protein)
$[Ca^{2+}]_i$	intracelluláris $Ca^{2+}$ -koncentráció
CaM-kináz II	$Ca^{2+}$ /kalmódulin-dependens protein kináz II
CBP/p300	CREB-kötő fehérje (CREB binding protein)
CsA	ciklosporin A
CaM	kalmódulin
CNA	kalcineurin A alegység
CNB	kalcineurin B alegység
CREB	cAMP-válaszó fehérje (cAMP-response element binding protein)
CRT-LP	porckötő fehérje (cartilage link protein)
DAG	diacil-glicerol
DMMB	dimetil-metilénkék
ECM	extracelluláris mátrix
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
Erk1/2	„extracellular signal-regulated kinase 1/2”
FGF	fibroblaszt növekedési faktorok
GKS	glükokortikoszteroidok
HMG	high-mobility group
HD	nagy sűrűségű (high density)
I1	inhibitor 1
I2	inhibitor 2
JNK	Jun N-terminális kináz
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MEF-2	<i>myocyte enhancer factor-2</i>
MEK	MAPK kináz
MEKK1	MAP kináz kináz kináz
MKP	MAPK foszfatázok
MTT	3-/4,5-dimetiltiazol-2/-2,5-difeniltetrazolium-bromid
NFAT	aktivált T-sejtek nukleáris faktora (nuclear factor of activated T cell)
NK	természetes ölősejtek (natural killer)
PBS	foszfát-puffer, 20 mM $Na_2HPO_4$ , 115 mM NaCl, pH 7,4
PKA	cAMP dependens protein kináz
PKC	protein kináz C
PMA	forbolészter
PP1	protein foszfatáz 1
PP2	protein foszfatáz 2
PP2B	kalcineurin
PS	foszfatidil-szerin
PTHrP	„parathyroid hormone related peptide”
ROS	reaktív oxigén részecskék (reactive oxygen species)
RT-PCR	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SAPK	stressz-aktivált protein kináz
SD	standard deviáció
SEM	mérési átlagok standard hibája (standard error of the mean)
SLE	szisztémás lupus erythematosus
TCR	T-sejt-receptor (T cell receptor)

# 1. Irodalmi áttekintés

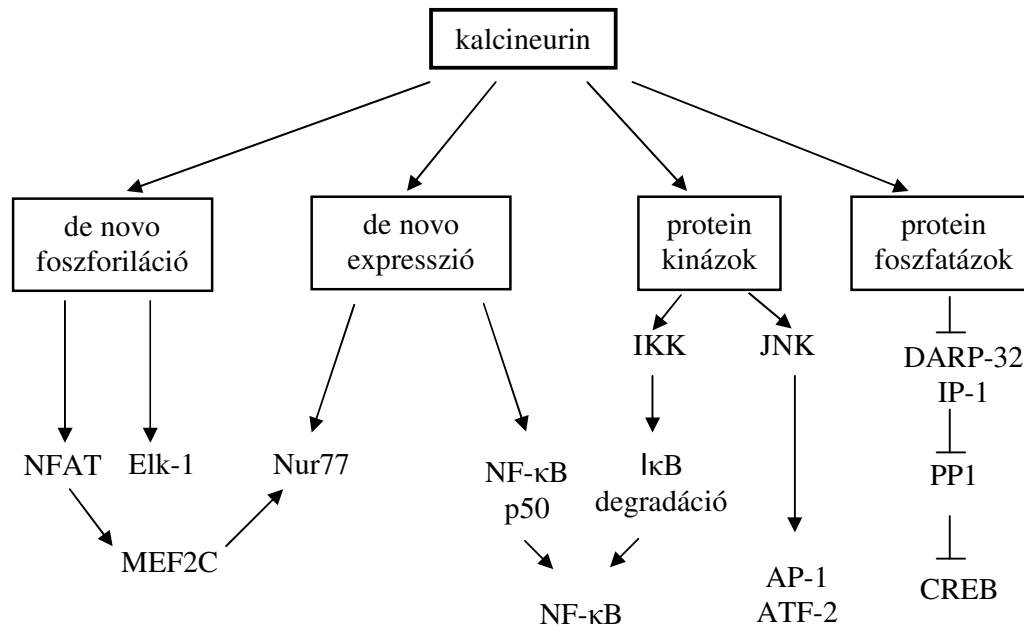
## 1.1. Bevezetés

A kalcineurint eredetileg az agy legfontosabb kalmodulinkötő fehérjéjeként azonosították [1], később kimutatták, hogy egyetlen  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-függő foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatázzról van szó, ami minden szövetben jelen van, és filogenetikailag nagymértékben konzervált. A kalcineurin szerkezetét, katalitikus mechanizmusát és szabályozását széles körben tanulmányozták [2-5]. A kalcineurin működésének megismerését nagymértékben segítette annak a két, klinikailag fontos, immunszuppresszív gyógyszernek, a ciklosporin A-nak (CsA) és az FK506-nak (tacrolimus) a felfedezése, amelyek a kalcineurin aktivitását hatékonyan és specifikusan gátolják [6-8]. Az elmúlt néhány év alatt ezeknek a gyógyszereknek az alkalmazása rámutatott arra, hogy a kalcineurin és szubsztrátjai sokféle élő szervezetben végbemenő, különböző biológiai folyamatokban játszanak szerepet.

A kalcineurin  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő képességén keresztül, illetve azáltal, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő kalmodulin az enzimet aktiválja, segíti a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelnek például a sejtmetabolizmus vagy a génexpresszió folyamataiba történő átvitelét. A kalcineurin közvetlenül oly módon módosítja a sejtműködést, hogy fizikai kölcsönhatásba lép fontos célfehérjékkel és defoszforilálja azokat, közvetve pedig úgy, hogy olyan alapvető jelátviteli útvonalakat aktivál (pl. NFAT, NF- $\kappa$ B, JNK), amelyek specifikus fehérjék expressziós szintjét vagy azok biológiai aktivitását szabályozzák [9]. Számos esetben a kalcineurin sokoldalú irányítóként viselkedve szubsztrátjainak több funkcióját is szabályozza. Így pl. az NFAT fehérjéknek a kalcineurin általi defoszforilációja nem csak azt eredményezi, hogy a citoplazmából a sejtmagba kerülnek, hanem a DNS-hez való kötődésük és transzkripciós aktivitásuk is fokozódik [9-13].

A kalcineurin aktiválására válaszoló gének száma nagy, ugyanis a kalcineurin különböző transzkripciós faktorok aktivitását módosítja, amelyek pedig nagyszámú gén expresszióját irányítják. Számos, az emlős szervezetben lévő, a kalcineurin célfehérjéjeként ismert transzkripciós faktorok közül az NFAT4-t és az Elk-1-et a kalcineurin közvetlenül defoszforilálja; az Oct2, az NFAT2, a c-Rel és a p50 NF $\kappa$ B transzkripciós faktorok a mRNS expressziós szintjén szabályozottak; az NF $\kappa$ B-t a molekula inhibitorának, az I $\kappa$ B degradációja szabályozza; a cJun és az ATF2 transzkripciós faktorokat a jelátviteli rendszerben felettük található cJun/ATF2-t

foszforiláló JNK kináz aktiválása, a CREB-et pedig a kalcineurin foszfatáz kaszkádon keresztül aktivált PP1 általi defoszforiláció irányítja. Az NFκB, a Jun/ATF2, a CREB, az Elk-1, a Nur77 és az MEF2C transzkripciós faktorok esetében a kalcineurin azon alapvető jelátviteli útvonalak aktivitását befolyásolja, amelyek a transzkripciós faktorok aktivitását, a mRNS vagy a fehérje-expressziós szintjüket szabályozza (1. ábra) [9,14].



**1. ábra. Kalcineurin által befolyásolt transzkripciós faktorok**  
(Aramburu és mtsai [9] alapján)

Az NFAT és a kalcineurin az immunsejtek és a mezenchymális sejt differenciáció elengedhetetlen szereplői. Az intracelluláris kalciumszint növelése fokozza a kondrogenézist a kalcineurin/NFAT jelátviteli útvonalon keresztül, ami a BMP expresszióját aktiválja. Kimutatták, hogy a BMP antagonistá (noggin) vagy a domináns negatív BMP receptorok blokkolják a megnövekedett kalciumszint hatását a kondrogenézisre, ami azt sugallja, hogy a kalcineurin/NFAT indukálja a BMP expresszióját. Ezzel összhangban a BMP expressziójának a fokozódását is megfigyelték kalcium-ionofor kezelés hatására, míg a kalcineurin inhibitor, a CsA visszaszorította ezt a folyamatot [15].

A kalcineurin a differenciációs folyamatok mellett részt vehet a T-sejt-receptor mediált sejtaktivációban, a sejtproliferációban és a sejthalálban egyaránt. A foszfo-NFAT kalcineurin általi defoszforilációja után a sejtmagba transzlokálódik és számos pro-inflamatorikus citokin, sejtfelszíni molekula, Fas-ligand gén transzkripcióját indukálhatja. A kalcineurin fontos szerepet játszik az SLE kezelésekor használt glükokortikoszteroidok hatásmechanizmusában is, ugyanis munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy a kalcineurin aktivitása csökkent a terápiás kezelés után SLE-s betegek mononukleáris sejtjeiben [16].

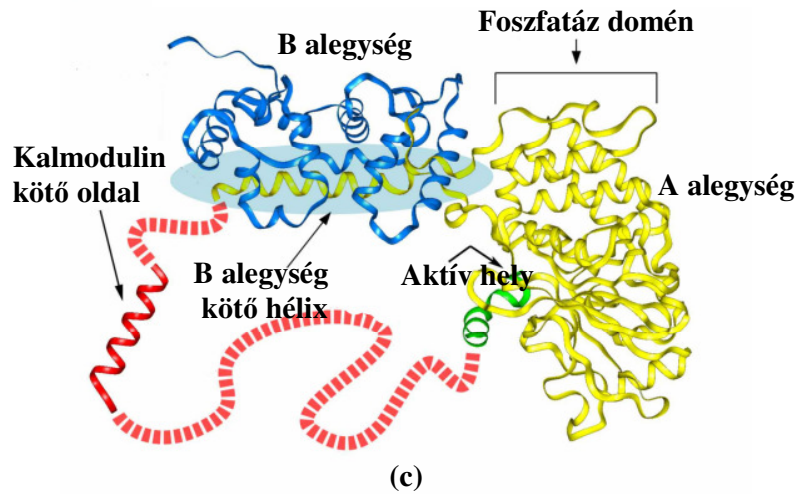
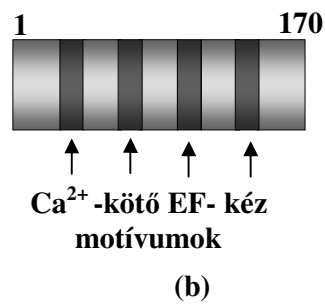
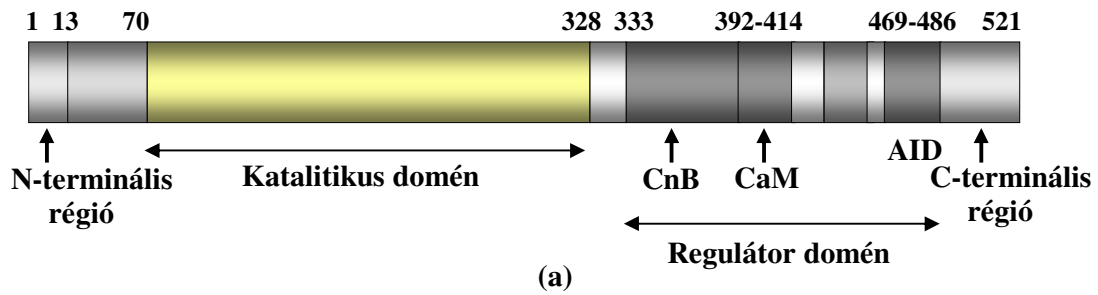
## **1.2. A kalcineurin szerkezete és szabályozása**

### **1.2.1. A kalcineurin biokémiai és szerkezeti sajátosságai**

Az 1980-as években folytatott biokémiai tanulmányok a kalcineurin sokoldalú szerepére hívták fel a figyelmet az eukarióta sejtek jelátviteli folyamataiban, pl. az adenilát-cikláz és az apoptózis szabályozásában, a kalciumjel átalakításában, a T-limfociták aktiválásában, az NFAT család transzkripciós faktorok foszforiláltsági szintjének módosításában [10,11,17].

A kalcineurin a foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok családjába tartozik, ami két nagy osztályra tagolható. Az enzimes család eredeti osztályozása Ingebritsen és Cohen nevéhez fűződik [14]. Az 1-es típusú protein foszfatázok (PP1) a foszforiláz kináz  $\beta$ -alegységét defoszforilálják és aktivitásuk I1 és I2 fehérjékkel gátolható. A 2-es típusú protein foszfatázok (PP2) a foszforiláz kináz  $\alpha$ -alegységét defoszforilálják és aktivitásukat az I1 és az I2 nem befolyásolja. A PP2 enzimek fémion igényük alapján további alosztályokba sorolhatók: PP2A, PP2B (kalcineurin) és PP2C. A PP2A aktivitásához fémiont nem igényel, míg a kalcineurin, ill. a PP2C aktivitásához  $\text{Ca}^{2+}$ /kaldmodulin, ill.  $\text{Mg}^{2+}$  szükséges. A PP1 és a PP2A katalitikus aktivitása okadánsavval gátolható, míg a kalcineurin specifikus gátlószere a CsA és az FK506 immunszuppresszív molekulák, amelyek ciklofilinhez és FK506-kötő fehérjékhez kapcsolódva fejtik ki hatásukat [7-9,14].

A kalcineurin egy 58-69 kDa kaldmodulin kötő katalitikus alegységből (CNA) és egy 16-19 kDa nagyságú  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő regulátor alegységből (CNB) álló heterodimer, az aktív centrumban  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Zn}^{2+}$  ionokat tartalmazó metalloenzim (2. ábra). Az emlős eredetű CNA-nak három izoformája ismert ( $\alpha/\alpha1$ ,  $\beta/\alpha2$  és  $\gamma/\alpha3$ ), ami alternatív „splicing” eredményeként három különböző gén terméke. A CNA $\alpha$  elsősorban az agyban, a CNA $\beta$  főleg a tímuszban, míg a  $\gamma$  izoforma túlnyomó részt a testisben található [18-20]. A CNB elsődleges szerkezete erősen konzervált.



## 2. ábra. A calcineurin szerkezete

A calcineurin katalitikus (a) és regulátor alegységének (b) doménszerkezete. A calcineurin heterodimer térszerkezete (c) (Aramburu és mtsai [9] alapján).

Az emlős eredetű CNB gén 170 aminosavból álló fehérjét kódol, ami négy  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő EF-kéz motívumot foglal magában, s így négy  $\text{Ca}^{2+}$ -ion megkötésére képes. Ezek közül egy nagy affinitással ( $K_d < 10^{-8}$ ) köt kalciumot, míg három mikromoláris tartományban [21]. Az emlősökben két CNB gén található, így a CNB regulátor alegységnek két emlős eredetű izoformája létezik: a CNB1, melynek előfordulása széleskörű, valamint a testis specifikus izoforma, a CNB2, ami C-terminális lokalizációs szignállal rendelkezik [22,23].

A kalcineurin aktív helye az CNA alegységben található. Az enzim C-terminális végén helyezkedik el a CNB-kötő domén, a kalmodulin-kötő domén és az autoinhibitor domén (2. ábra). Az autoinhibitor domén  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin hiányában  $\alpha$ -hélixet képezve a katalitikus domén szubsztrát-kötő helyéhez kapcsolódva gátolja a foszfátáz aktivitását oly módon, hogy a glutamát savmaradékok hidrogén-kötéseket hoznak létre a fémionokhoz koordinált vízmolekulákkal [24].

Az enzim működéséhez  $\text{Ca}^{2+}$  és kalmodulin aktivátorokra van szükség, azaz a kalcineurin aktivitása függ a  $\text{Ca}^{2+}$ -ion CNB regulátor alegységhez, ill. a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin komplex CNA katalitikus alegységhez való kötődéstől. A kalcineurin aktiválásához ekvivalens mennyiségű kalmodulin, a kalmodulin aktiválásához pedig legalább két kalcium kötőhely  $\text{Ca}^{2+}$ -ionnal való telítése szükséges.

A kalcineurin kalmodulin kötő doménjét a CNA regulátor doménja (Lys-392-Arg-414) tartalmazza. Kimutatták, hogy amikor a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin az enzimhez kötődik, az autoinhibitor domén által okozott gátlás megszűnik, ami feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a kötődést követő konformáció változás az aktív hely szabaddá válását eredményezi. A kalcineurin feltételezett katalitikus mechanizmusának első lépése a foszfátészter-szubsztrát asszociációja az enzimmal. Ebben a lépésben a negatív töltések semlegesítődnek, egyrészt az aktív centrumban található fémionok által, másrészt az aktív helyen található, konzervált Arg savmaradékok (Arg-122 és Arg-254), valamint a His-151 pozitív töltéseivel. Az átmeneti állapot átrendeződése után az ortofoszfát két fémionhoz kapcsolódik, ahonnan vízmolekula közreműködésével hasad ki és a kalcineurin visszanyeri eredeti állapotát [10].

### 1.2.2. A kalcineurin szabályozása

A kalcineurin aktivitását elsősorban az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció szabályozza. Nyugvó sejtekben, ahol a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$  alacsony ( $< 10^{-7}\text{M}$ ), a kalcineurin nem tud

a kalmodulinhoz kötődni, így az enzim inaktív formában van jelen. Amikor a sejtet olyan szignál éri, amelyben a  $[Ca^{2+}]_{IC}$  megemelkedik, a kalciumion a kalmodulinhoz kapcsolódva konformáció változást idéz elő, ami lehetővé teszi  $Ca^{2+}$ /kalmodulin kalcineurinhoz való kötődését, indukálva a foszfatáz aktivitást [25,26].

Egy másik lehetséges mechanizmus a kalcineurin szabályozására az aktív helyen található fémionok ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) redox reakciói. A kalcineurin redox szabályozását *in vitro* tanulmányozták, de ilyen folyamatok *in vivo* körülmények között is lejátszódhatnak. Biokémiai és spektroszkópai tanulmányok kimutatták, hogy a fémionoknak csak a  $Fe^{3+}$  és  $Zn^{2+}$  oxidációs állapotú formáit tartalmazó enzim aktív, így a  $Fe^{3+}$  redukciója az enzim gátlását eredményezi [24,27,28]. Wang és mtsai [29] ezzel ellentétes hipotézist állítottak fel, ugyanis azt feltételezték, hogy az aktív centrumban lévő  $Fe^{2+}$ - $Zn^{2+}$  oxidációja  $Fe^{3+}$ - $Zn^{2+}$  ionokká okozza az enzim gátlását. Kimutatták, hogy a szuperoxid-diszmutáz megvédi a kalcineurint az inaktiválástól, feltételezésük szerint oly módon, hogy az enzim megakadályozza az aktív helyen lévő  $Fe^{2+}$  oxidációját. Az utóbbi időkben több csoport vizsgálta ezt a hipotézist és szolgáltatott bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a teljes sejtlizátumban az extracelluláris oxidánsok, különösképpen a  $H_2O_2$ , hatással lehetnek a kalcineurin aktivitására. Számos sejttípusban (pl. NK sejtek, T-limfociták, fibroblasztok, neuroblasztoma sejtek) a kalcineurin aktivitás csökkenését a ROS koncentrációjának az emelkedésével hozták összefüggésbe. A sejtek mikromoláris koncentrációjú  $H_2O_2$ -dal történő kezelését követően az NF-AT és az NF $\kappa$ B mediált folyamatok gátlását figyelték meg, ami feltehetőleg a kalcineurin aktivitás csökkenésének a következménye. Ezt pedig az aktív centrumban lévő  $Fe^{2+}$  oxidációjával magyarázták [10,30]. Kimutatták, hogy Jurkat és humán neuroblasztoma sejtek lizátumában a kalcineurin aktivitása érzékeny mind a hidrogén-peroxidra, mind pedig a kis koncentrációjú redukálószerekre (pl. metionin), vagy nagy koncentrációban a ditiotreitrolra, ami azt sugallja, hogy a kalcineurin aktivitását az oxidáció és redukció egyaránt befolyásolja [31,32]. Bogumil és mtsai a tisztított kalcineurin aktivitásában bekövetkező gátlást a Cys savmaradékok oxidációjának tulajdonították [27].

A kalcineurin harmadik szabályozási lehetősége az enzim foszforilációja. A CaM-kináz II foszforilálja a kalcineurin 60 kDa alegységét. Ezt a reakciót a CaM-kináz II autofoszforilált formája katalizálja. A  $Ca^{2+}$ /kalmodulin kötése a kalcineurinhez gátolja a foszforilációt — valószínű, hogy a foszforilációs hely és a CaM-kötő domén kölcsönhatása miatt —, azonban  $Ca^{2+}$  szükséges a reakcióhoz, feltehetőleg a regulátor alegység kalcium

kötése miatt. A kalcineurin CaM-kináz II általi foszforilációja csökkenti a foszfatáz aktivitását. A PKC is képes foszforilálni a kalcineurint, ami nem befolyásolja a  $V_{max}$  értékét, azaz a foszfatáz enzimaktivitását. A  $Ca^{2+}$ /kaldmodulin kötése a kalcineurinhoz ebben az esetben is gátolja a foszforilációt [33]. A foszfokalcineurin defoszforilációs folyamatát a PP2A és a PP1 katalizálja [34].

### 1.2.3. A kalcineurin inhibitorai

Valamennyi kalcineurin mediált sejtfunció érzékeny a CsA és az FK506 immunszuppresszánsokra. Ezek a vegyületek intracelluláris receptor fehérjékhez (immunofilinokhoz) kötődve fejtik ki hatásukat, amelyek peptidil-prolil izomeráz és/vagy chaperon aktivitással rendelkeznek a sejtben. A CsA a CsA-kötő immunofilinhoz, a ciklofilinhez kötődve, az FK506 az FK506-kötő fehérjékhez, az FKBP-hez kapcsolódva gátolják a kalcineurin foszfatáz aktivitását [6,8].

Az elmúlt években nagyszámú endogén kalcineurin inhibitorot is azonosítottak. Ezek három fő csoportba sorolhatók. Kalcineurin inhibitorok (1): a kalcineurinhoz kötődve gátolják az enzim aktivitását. A kalcineurin kettős regulátor fehérjéi (2): gátló és aktiváló hatást is kifejthetnek az enzimre. A kalcineurin horgonyzó fehérjéi (3): más jelátviteli molekulákhoz vagy szubcelluláris struktúrákhoz kapcsolják a kalcineurint, és ezáltal gátolják az aktivitását.

A Cabin 1 a kalcineurin gátló fehérjéi közé tartozik. Szinte minden sejt típusban kifejeződik és a sejtben belül a citoplazmában, ill. a sejtmagban egyaránt megtalálható. T-sejtekben kalciumjelre a sejtmagból a citoplazmába transzlokálódik. A Cabin 1 240 kDa, több mint 2200 aminosavból álló szolubilis fehérje. A kalcineurint kötő doménje kb. 40 aminosavat tartalmaz. Ezen belül található az NFAT családban is meglévő konzervált Pro-Ile-x-Ile-Thr kalcineurin-kötő szekvencia variánsa: a Pro-Glu-Ile-Thr-Val-Thr motívum. T-sejtekben a Cabin 1 és a kalcineurin kölcsönhatáshoz kalciumion és PKC aktiválás egyaránt szükséges. A Cabin 1 foszfoprotein, nem aktivált T-sejtekben foszforiláltsági szintje alacsony, PKC aktiválás hatására hiperfoszforilált lesz, ami a kalcineurinnal szembeni fokozott affinitását eredményezi. A kalcineurinhoz kötődve gátolja az enzim aktivitását, visszaszorítva az NFAT defoszforilációját és ezáltal az IL-2 expresszióját. A Cabin 1 a MEF-2 egyedülálló kalcium-dependens transzkripciós represszora is. A Cabin 1 a C-terminális végével kötődik a MEF-2 transzkripciós faktorhoz, míg az N-terminális végével közvetlenül az mSim3A korepresszorhoz kapcsolódik, ami a hiszton deacetilázokat aktiválja [35-37].

### **1.3. Az NFAT transzkripciós enzimes család**

#### **1.3.1. Az NFAT biokémiai és szerkezeti sajátosságai**

Az NFAT család transzkripciós faktorai képezik a kalcineurin legfőbb szubsztrátjait az immunrendszer sejtjeiben és számos nem immunsejt típusban is [9]. Eddig az NFAT családból öt tagot írtak le. A klasszikus NFAT család az NFAT1, NFAT2, NFAT3 és az NFAT4 tagokat foglalja magában, míg a nemrégiben azonosított NFAT5 az NFAT család sajátos tagját képviseli. Az NFAT1, NFAT2, NFAT4 és az NFAT5 az immunsejtekben és immunrendszeren kívüli különféle sejt típusokban is jelen van, míg az NFAT3 az immunrendszeren kívüli sejtekben található meg, az immunsejtekben eddig még nem mutatták ki [38-40].

Az immunsejtekben lévő NFAT célgének alatt azokat értjük, amelyek a citokineket (pl. IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ ), a kemokineket (pl. IL-8, MIP-1 $\alpha$ ), a sejt felszíni receptorokat (pl. FasL, CD40L, CTLA-4) és a transzkripciós faktorokat kódolják (pl. NFAT2, Oct2, Egr) [9]. A klasszikus NFAT fehérjék (NFAT1-NFAT4) egy mérsékelten konzervált szabályozó domént tartalmaznak, ami közvetlenül a nagymértékben konzervált, DNS-kötő domén N-terminális végén helyezkedik el. A szabályozó domén számos, szerinben és prolinban gazdag szekvencia motívumokat (SerPro) tartalmaz, amelyeknek a szekvenciája és elrendezése az NFAT1-4 alcsaládon belül állandó. A konzervált motívumok közül kiemelkedő jelentőségű a regulátor domén N-terminális végén lévő szekvencia (Pro-x-Ile-x-Ile-Thr), ami az NFAT legfontosabb kalcineurin kötőhelye. További jellemző motívumok a kiterjedt szerin-gazdag rész, a három SerPro motívum és a konzervált magi lokalizációs jel, ami a második és harmadik SerPro motívum között helyezkedik el [9,38].

#### **1.3.2. Az NFAT fehérjék foszforilációja**

Ismeretes, hogy foszforiláció szükséges ahhoz, hogy az NFAT a citoplazmában maradjon, illetve ahhoz, hogy ide visszakerüljön a sejtmagból. Az NFAT kinázok azonosítása még nem történt meg. Nyugvó sejtekben az NFAT fehérjék folyamatosan foszforilált állapotban vannak. Feltételezik, hogy a foszforilációért felelős kináz(ok) valószínűleg állandóan jelenlévő kináz(ok), vagy jelátviteli útvonalakkal indukálható kináz(ok) lehet(nek). A glikogén szintáz kináz-3, a kazein kináz 1, a MEKK1, a JNK szerepét az NFAT foszforilációjában többen tanulmányozták [41-44].

### 1.3.3. A kalcineurin és az NFAT

Az NFAT fehérjéknek szerepük van az embrió szervfejlődésétől a felnőtt szervezet adaptív válaszainak kialakulásáig terjedő legfőbb folyamatokban, beleértve az immunválaszokat, az izom-plaszticitást és a differenciációs folyamatokat [45,46]. Az öt NFAT fehérje közül négy (NFAT1-4) nagymértékben függ a kalcineurin aktivitásától, ami transzkripciós funkciójukat módosítja. Ez a defoszforilációs folyamat és az ezt követő magi transzlokáció kalcineurin által szabályozott lépésen keresztül valósul meg [45-47]. Mivel a defoszforiláció nyilvánvalóan megelőzi az NFAT sejtmagba jutását, azt feltételezik, hogy az NFAT szabályozó doménjában lévő, meghatározott oldalláncok defoszforilációja okozza a magi lokalizációs jel szabadabbá válását, ami szintén ebben a doménban található [44,48]. A legtöbb NFAT N-terminális régiójáról azt feltételezik, hogy magi export szekvenciát tartalmaz és nemcsak a kalcineurinnal, hanem a Crm1 export fehérjével is kölcsönhatásba lép, ami feltehetően az NFAT fehérjék sejtmagból a citoplazmába történő transzlokációját segíti elő [49].

Valamennyi klasszikus NFAT fehérje, az NFAT1-4, a konzervált szabályozó doménjában a kalcineurin legfontosabb kötőhelyét (Pro-x-Ile-x-Ile-Thr) tartalmazza, ami nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a kalcineurinnal történő defoszforilációjuk végbemenjen. A kalcineurin a Pro-x-Ile-x-Ile-Thr szekvenciájú peptidhez kapcsolódó helye, különbözik a kalcineurin aktív helyétől. Mind az inaktív kalcineurin, mind a kalmodulinnal aktivált kalcineurin egyaránt kötődik az NFAT transzkripciós faktorhoz a Pro-x-Ile-x-Ile-Thr irányító szekvenciával [12,50,51]. Az aktivált kalcineurin azonban sokkal erősebben kötődik, mint az inaktív kalcineurin. Ezt a kölcsönhatást a CsA/ciklofilin és az FK506/FKBP12 komplexek gátolják, ami azt sugallja, hogy a kalcineurin aktív helye elősegítheti a molekula NFAT fehérjékhez való kötődését. Ha az aktivált kalcineurin az autoinhibitor doménon keresztül önmaga kötődik az aktív helyéhez, akkor az NFAT fehérjékkel képtelen hatásos kölcsönhatásra a sejt fiziológiai körülményei között [9,52].

Limfocitákon végzett kísérletek kimutatták, hogy vagy a  $[Ca^{2+}]_{IC}$  hosszantartó növelése vagy a kalciumkoncentráció csúcsértékeinek szűk tartománya szükséges az NFAT/AP-1 függő riporter aktiválásához, feltehetően azért, mert csak ezek a körülmények elégségesek a kalcineurin, és ennek következtében az NFAT transzkripciós faktor aktivált állapotban tartásához [53].

A kalcineurin által történő defoszforiláció amellet, hogy szabályozza az NFAT sejtmagba jutását, a DNS kötő és transzkripciós aktivitását is fokozza [54,55]. Az NFAT

visszatérése a citoplazmába a molekula ismételt foszforilációjával jár együtt, ami arra utal, hogy a sejtben lévő protein kinázoknak is szerepe van ebben a folyamatban.

#### **1.4. Sox9 transzkripciós faktor**

##### **1.4.1. A Sox transzkripciós faktorok biokémiai és szerkezeti sajátosságai**

A Sox transzkripciós faktorok az embrionális fejlődésben kulcsfontosságú szerepet játszanak. A Sox fehérjék több sejttypusban expresszálódnak, így pl. a Sox9 a fejlődő kondrocitákban és a fejlődő testis sejtekben egyaránt kifejeződik. Adott sejttypusban egyszerre több Sox faktor is jelen lehet [56,57]. Az elmúlt években több bizonyíték született arra vonatkozóan, hogy a Sox fehérjék gén promotereken vagy enhancereken multi-protein komplexeket képeznek, amelyek feltehetőleg szerepet játszanak a Sox fehérjék sejt-specifikusságának meghatározásában. A Sox fehérjék több sejttypusban kifejeződnek, azonban egy bizonyos szövetben targetgénjüket specifikus fehérjepartner(ek) határozzák meg [58].

A Sox fehérjék szekvencia specifikusan kötődnek a DNS-hez HMG doménon keresztül, ami elengedhetetlen transzkripciós aktivitásukhoz. A HMG domén három hélix struktúrából L-alakot képezve a DNS kis árkába kötődik. A HMG domén erősen konzervált a Sox fehérjékben és valószínű, hogy valamennyi faktor egy hasonló kötőmotívumot ismer fel ( $^A/T^A/TCAA^A/TG$ ). A HMG doménon túl a molekulák C-terminális végén elhelyezkedő transzaktivációs domént is tartalmaznak [59].

A HMG domén azon túl, hogy DNS-hez kötődik és mediálja a transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatásokat, nukleáris import szignálokkal rendelkezik. A génexpresszió és a transzkripciós faktorok szabályozásához a Sox fehérjéknek a citoplazmából a sejtmagba kell kerülniük. A folyamatot a transzporter fehérjék egy bizonyos családja, az importinek az NLS felismerésével szabályozzák. Az NLS szekvenciákat a Sox fehérjék HMG doménjának mind az N-terminális, mind a C-terminális végén azonosították. A Sox NLS konzervált és valószínű, hogy valamennyi Sox fehérje nukleáris importját az importin  $\beta$  közvetíti [60-62].

##### **1.4.2. A Sox9 transzkripciós faktor szabályozása**

A Sox9 C-terminális végén lévő Pro-Gln-Ser domén elengedhetetlen transzkripciós aktivitásához, de a mellette található Pro-Glu-Ala domén is szükséges maximális aktivitásához [63,64]. Még nem tisztázott, hogy a C-terminális vég hogyan

eredményezi a Sox9 transzkripció aktivitását. Valószínű, hogy mindkét domén eddig még azonosítatlan fehérjékkel lép kölcsönhatásba, ami aktiválja a Sox9-t.

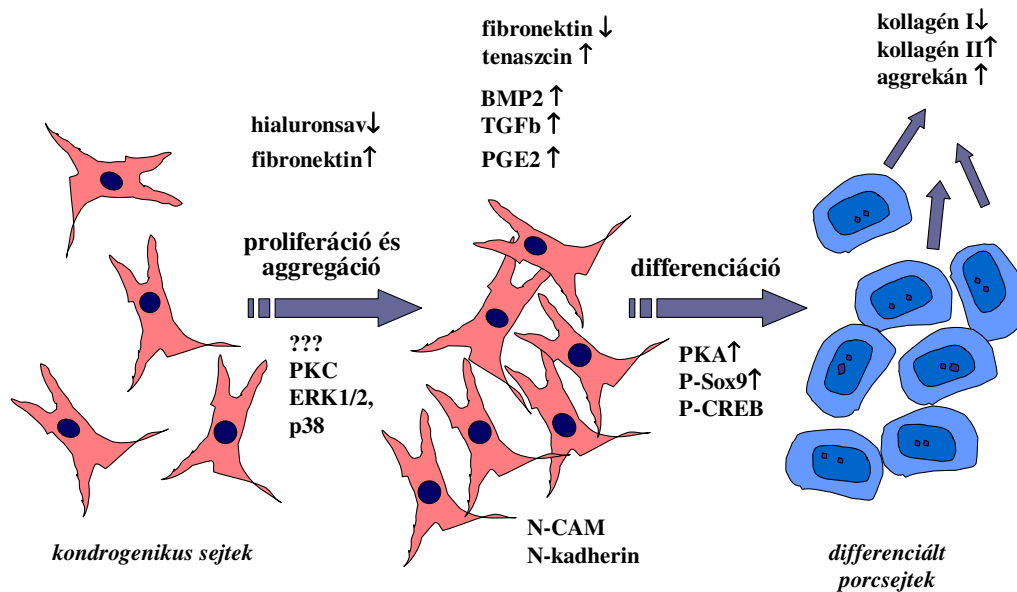
A Sox9 fehérjének számos foszforilációs helye van. A Sox9 foszforilációját a protein kináz A, a kazein kináz II, a protein kináz C és egyes tirozin kináz enzimek egyaránt katalizálják. A foszforiláció szerepet játszhat a Sox9 DNS kötésében, nukleáris importjában és transzkripció aktivitásában [65].

A egyik legjobban tanulmányozott foszforilációs folyamat a Sox9 Ser-211 savmaradékon bekövetkező PKA általi kovalens módosítás [66]. A foszforiláció fokozza a Sox9 transzkripció és DNS-kötő aktivitását. A cAMP mediálja a PTHrP hatását is, amiről ismert, hogy szerepe van a porcdifferenciáció szabályozásában *in vitro*. Mivel a PTHrP szignált a cAMP befolyásolja, feltételezik, hogy a Sox9 a PTHrP targetje *in vitro*, és mivel a PTHrP fő funkciója, hogy meggátolja a porcsejtek hipertropikus sejtekké történő differenciációját, ezért valószínűsítik, hogy a Sox9 fokozott aktivitása közvetítheti a PTHrP hatását ebben a folyamatban [66].

#### **1.4.3. A Sox9 transzkripció faktor és a kondrogenézis**

A mezenchymális sejtek porcsejtekké történő differenciációja több lépésből álló folyamat. A porcdifferenciáció első lépésében a mezenchymális progenitor sejtek megerősödnek, majd kondenzálódnak és a kondenzált mezenchymális sejtek porcsejtekké differenciálódnak (3. ábra). A mezenchymális sejtek kondenzációja alatt és ezt követően porcspecifikus gének aktiválódnak. Ezek a gének olyan molekulákat termelnek (II, IX és XI-típusú kollagének, aggregán), amelyek a porcra jellemző extracelluláris mátrix legfőbb alkotórészei. Specifikus transzkripció faktorok is szabályozhatják a mezenchymális sejtek porcsejtekké történő differenciációját, és porcspecifikus géneket aktiválhatnak. A II-típusú kollagén és az aggregán expresszióját a kondrogenézis korai szakaszában kifejeződő, a porcdifferenciációt irányító Sox9 transzkripció faktor szabályozza [67-69].

A Sox9 minden progenitor sejtben és kondrocitában kifejeződik. Nagyfokú Sox9 expresszió indul be a porcdifferenciáció előtt, a mezenchymális sejtek kondenzációjakor, ami tovább folytatódik és magas szintet ér el a differenciált porcsejtben is. A Sox9 expresszió a hipertrofikus kondrocitákban erőteljesen csökken. Kimutatták, hogy porcsejtben korreláció van a II-típusú kollagén (*Col2a1*) és a *sox9* gének expressziója között: a Sox9 közvetlen kötődése a *Col2a1* enhancer egy bizonyos szekvenciájához elengedhetetlenül fontos aktivitásához [69].



3. ábra. A porcdifferenciáció legfontosabb lépései

Két másik Sox transzkripciós faktor, a Sox5 és Sox6 is lényeges szerepet tölt be a porcdifferenciációban. A Sox5 és a Sox6 a Sox9 transzkripciós faktorról valamennyi kondroprogenitor sejtben és az összes differenciált kondrocitában koexpresszálódik. *In vitro* tanulmányok kimutatták, hogy a Sox5 és a Sox6, a Sox9 transzkripciós faktorról együttműködve aktiválja a *Col2a1* enhancert és a *Col2a1* gént [67,70]. Az extracelluláris mátrix egyik fő komponense, a CRT-LP stabilizálja az aggregán és a hialurinsav aggregátumait. A CRT-LP megfelelő szintű termelése elengedhetetlen a proteoglikán aggregátumok képződéséhez és a hipertrofikus kondrociták természetes organizációjához. A Sox9 hatékonyan indukálja a CRT-LP expresszióját humán nem-kondrogenikus, immortalizált sejtvonalakban, mezenchymális őssejtekben és felnőtt dermális fibroblasztokban is [71].

Kimutatták, hogy a Sox9 mind *in vitro*, mind *in vivo* köti a CBP/p300 fehérjét, így a CBP és a p300 a Sox9 koaktivátoraként működik a porcszövet specifikus génexpressziójában, valamint a porcdifferenciációban [72]. Munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy csirkeembriók végtagtelepéből származó mezenchymális sejt kultúrák 20 nM okadánsav, PP2A inhibitor, kezelését követően a CREB foszforiláltsági

szintje emelkedett a Ser-133 aminosavmaradékon, míg a 20  $\mu$ M H89, PKA inhibitor, csökkentette a foszfo-CREB mennyiségét a sejtekben. Az előbbi esetben fokozott porcképződés volt megfigyelhető, míg a PKA gátlása csökkentette a porclerakódás mértékét. A két enzim (PKA és PP2A) aktivitása befolyásolja a CREB foszforilációs szintjét, ezen keresztül pedig az *in vitro* kondrogenézist [73].

Az FGF fehérjék is fontos szerepet játszanak az embrionális egyedfejlődés különböző folyamataiban, beleértve a végtagtelepek fejlődését is. Az FGF1 és az FGF2 a differenciált porcsejtekben is kifejeződnek. A Sox9 expresszióját a primer kondrocitákban és a mezenchymális sejtekben az FGF felülszabályozza. Kimutatták, hogy az FGF nagymértékben fokozza a Sox9 expresszióját, amit az FGF receptorok egyik legfőbb „downstream” útvonala, a MEK-MAPK enzimrendszer közvetíti. Az FGF receptorokból kiinduló szignálok a MEK aktiválásához vezetnek, ami foszforilálja és aktiválja a MAPK/ERK-t. A MAPK ezután különböző kinázok és transzkripciós faktorok foszforilálásában, aktivitásuk szabályozásában vesz részt, így a Sox9 szintjét az Erk1/2 is szabályozza kondrogenikus sejtekben [74].

## **1.5. Mitogén aktivált protein kinázok**

### **1.5.1. A MAPK szerkezeti sajátosságai és szabályozása**

A kondrogenézist számos jelátviteli útvonal szabályozza, ilyen pl. TGF $\beta$  és BMP, PKA és PKC/MAPK útvonalak. 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 MAPK kaszkád három protein kinázból épül fel: MAP kinázból és két upstream komponensből: a MAPK kinázból (MAPKK vagy MKK) és a MAPKK kinázból (MAPKKK), amit membrán-receptorokból érkező jelek aktiválnak [75].

Először a MAPK/Erk1/2, majd a JNK/SAPK és a HOG1 élesztő homológ (p38 MAPK) kinázokat azonosították. Szekvenciájukban és az aktivációs hurok méretében eltérés figyelhető meg, és különböző stimulus hatására eltérő módon aktiválódnak. A MAPK enzimeket a katalitikus doménban lévő „Thr-x-Tyr” (ahol az x az Erk esetén Glu, JNK enzimmél Pro, a p38 kináznál Gly) aktivációs motívum Thr és Tyr oldalláncaiban bekövetkező kettős foszforiláció aktiválja, amit a kettős specifitású MAPKK katalizál. A MAPKK enzimet viszont a Ser/Thr-specifikus kináz, a MAPKKK foszforilálja [75]. Az Erk a mitogénikus extracelluláris stimulus legfőbb mediátora, és szerepet játszik számos

sejttípus differenciációjában is, míg a JNK és a p38 MAPK enzimeket különböző környezeti hatások, mint pl. UV sugárzás, ozmotikus sokk és gyulladásos citokinek stimulálják. A MAPK enzimek Ser/Thr-specifikus kinázok családjába tartoznak, amelyek több citoplazmatikus fehérjét képesek foszforilálni, illetve magi transzlokációjukat követően transzkripciós faktorok szabályozásában vehetnek részt [75-77].

A MAPK enzimek inaktiválását a kettős specificitású protein foszfatázok, a MAPK foszfatázok (MKP) katalizálják, amelyek a foszfo-Thr, foszfo-Tyr oldalláncokat képesek defoszforilálni [78]. Kimutatták, hogy az Erk foszforilációval történő aktiválását követően a sejtmagba transzlokálódik, ahol transzkripciós faktorokat (pl. Elk-1) foszforilál és különböző gének expresszióját indítja be. Az Erk aktiválása MKP génexpressziót indukálhat, és az újonnan szintetizálódott MKP-3 az Erk-t a citoplazmában defoszforilálhatja. Más MKP enzimek, amelyek a sejtmagban lokalizálódnak, mint pl. MKP-1, az aktív Erk-t a sejtmagban defoszforilálják. A PP2A szintén befolyásolhatja a citoszolban mind a MAPKK, mind az Erk foszforiláltsági szintjét [75,79]. Kimutatták, hogy patkány kardiomiocita sejttenyészetében a calcineurin aktiválása fokozza a PKC $\alpha$  és  $\theta$  izoenzimek, valamint a JNK és az Erk MAPK-k aktivitását [80] és „down regulálja” a p38 MAPK aktivitását is [81].

A MEK-Erk kináz kaszkád az egyik legfontosabb citoplazmatikus jelátviteli útvonal, amely az eukarióta sejtek proliferációját, túlélését és differenciációját irányítja. A MEK-Erk kaszkád három egymást követő protein kináza (Raf, MEK és Erk) tipikusan a növekedési faktorok és mitogének sejtfelszíni receptorai alatt működnek. A GTP-áz, a Ras aktiválja a Ser/Thr-specifikus Raf kinázokat. A Raf kinázok így a MEK1/2-re hatnak, amelyek pedig az Erk1/2-t aktiválják. Az Erk foszforilációját követően disszociál a MEK-ről, a sejtmagba transzlokálódik, ahol különböző transzkripciós faktorokat foszforilál (pl. Elk-1, Rsk, ERF, c-Myc) [82,83].

### **1.5.2. A MAPK és a kondrogenézis**

Ismert, hogy a MAPK enzimek kettős hatással bírnak a kondrogenézisre oly módon, hogy ellentétesen befolyásolják az adhéziós molekulák (pl. N-kadherin, fibronectin, integrin) expresszióját [84]. A MEK-Erk kináz kaszkád jelentősége a porcdifferenciációban nem kétséges, de a pontos szerepe még mindig vitatott. Kimutatták, hogy a p38 stimulálja, míg az Erk1/2 gátolja a porcképződést csirkeembriók végtagtelepeiből származó mezenchymális sejt kultúrákban. Ez utóbbi Ca<sup>2+</sup>-szenzitív,

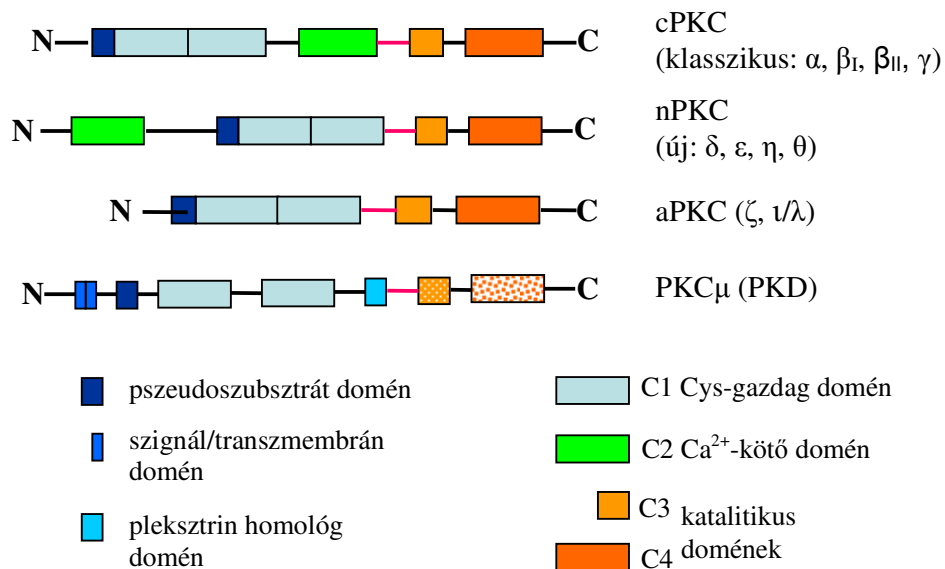
ugyanis az Erk a PKC „downstream” molekulája. Megfigyelték, hogy az exogén eredetű EGF visszaszorította a porcdifferenciációt, fokozta az Erk aktivitását, míg a p38 MAPK aktivitását gátolta [84,85]. Hasonló sejtkultúrában a II-típusú kollagén, az aggregán és a Sox9 transzkripciós faktor fokozott mRNS szintjét mutatták ki MEK inhibitorokkal (PD98059 és U0126) történő kezelés után [86]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a MEK-Erk jelátviteli pálya az embrionális porcdifferenciáció fontos negatív regulátoraként működhet. A MEK-Erk kináz kaszkád a kondrogenézis pozitív regulátora is lehet, mivel egér primer kondrociákban és C3H10T1/2 sejtekben fibroblaszt növekedési faktorról kiváltott Sox9 expressziós szintjének növekedését a sejtek Erk kináz (MEK) inhibitorral történő kezelése visszaszorította [74].

### **1.6. A protein kináz C enzimek szerkezeti sajátosságai és szabályozásuk**

A PKC enzimesalád számos célfehérje Ser/Thr-oldalláncát foszforilálja. Specifikus hormonális, neuronális és növekedési faktor stimulusra válaszoló jelátviteli folyamatokban játszanak szerepet. Az enzimesalád szerkezeti felépítés és szubsztrát-igény alapján három fő csoportra osztható: a klasszikus PKC izoformákra (cPKC  $\alpha$ ,  $\beta_I/\beta_{II}$ ,  $\gamma$ ), az új típusú PKC izoformákra (nPKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) és az atípusos PKC izoformákra (aPKC  $\zeta$ ,  $\iota/\lambda$ ). Külön kell említeni a PKC $\mu$  vagy más néven a PKD izoenzimet, amelyik mind szerkezeti felépítésében, mind aktiválhatóságát tekintve nem tartozik egyetlen csoportba sem (4. ábra) [87,88].

A cPKC izoenzimek PS-sel aktiválhatók  $Ca^{2+}$ -dependens módon. A cPKC izoenzimek DAG-t is kötnek, ami fokozza az enzimek PS és  $Ca^{2+}$  affinitását. A cPKC enzimek a forbolészter (pl. PMA) targetjei is. A PMA oly módon aktiválja az enzimet, hogy megszünteti a DAG szükségletét és csökkenti az aktiváláshoz szükséges  $Ca^{2+}$  koncentrációt. Az nPKC aktiválásához csak DAG szükséges PS kofaktor jelenlétében,  $Ca^{2+}$  ionra nem érzékenyek. A forbolészter/PS is aktiválja a kinázokat. Az aPKC izoformák aktiválásához sem  $Ca^{2+}$ -ionra, sem PMA/DAG-ra nincs szükség. A PKD nem érzékeny a DAG vagy  $Ca^{2+}$ -ionra, de aktivitásához PS kofaktor jelenléte elengedhetetlen [87,88].

A katalitikus domén a molekula C-terminális végén található, míg a regulátor domén az N-terminális szakaszon (4. ábra). Mindkét domén számos konzervált régiót tartalmaz (C1-C4), köztük kisebb homológiával rendelkező, ún. variábilis doménok találhatóak.



#### 4. ábra. PKC izoenzimek doménszerkezete és csoportosítása

(Toker [88] alapján)

Valamennyi PKC izoforma az N-terminális végen tartalmaz egy pszeudoszubsztrát domént, ami az enzim szubsztrátkötő zsebéhez kapcsolódva gátolja a kináz aktivitását. PMA vagy DAG kötődése a C1 Cys gazdag doménhez, míg a Ca<sup>2+</sup>-ion kötődése a C2 kalcium-kötő doménhez, konformáció változás útján szabaddá teszi a katalitikus domént a pszeudoszubsztrát régiótól, ami az enzim aktiválásához vezet. Az nPKC és aPKC izoenzimekben nem található meg a cPKC izoenzimekre jellemző C2 domén. Feltehetőleg ez magyarázza, hogy kalciumjelre nem érzékenyek [87,88].

Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szint emelkedésével a PKC konformáció-változás közben kölcsönhat a sejtmembránnal, azonban aktivitásához és a sejtmembránba történő behatolásához a DAG jelenléte elengedhetetlen. A cPKC izoenzimek aktivitása függ a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub>-tól és a PS-től egyaránt. Nyugvó sejtekben a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub> nem elegendő aktivitásukhoz, azonban ha a sejtet olyan stimulus éri, ami elegendő mennyiségű Ca<sup>2+</sup>-t mobilizál, az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub> emelkedésével az inaktív PKC a citoszólból a plazmamembránhoz transzlokálódik, ahol kikötődik és aktiválódik [89]. Megfigyelték, hogy az emlős sejtek és

szövetek hosszan tartó kezelése forbolésztterekkel és briosztatin származékokkal deszenzitizálja az agonista és forbolészter indukált sejtválaszokat, valószínűleg azért, hogy a cPKC és az nPKC izoenzimek „down regulálódnak” [87-89].

A PKC foszforiláció útján is aktiválódik. A katalitikus doménban (C4) három foszforilációs helyet (két Thr és egy Ser) térképeztek fel. Ezek közül az egyik Thr az aktivációs árokban található és nagymértékben konzervált, nemcsak a PKC izoenzimekben, hanem más protein kinázokban is megtalálható. Ezen aminosav valamilyen upstream kináz általi foszforilációja aktiválja az enzimet. A másik két aminosav (Thr, Ser) foszforilációja autofoszforiláció útján megy végbe, ami nem befolyásolja az enzim aktivitását. Ezek a PKD kivételével valamennyi PKC izoenzimben megtalálhatók [88].

A PKC regulátor domén gátlószerei a foszfolipid és forbolészter kötőhelyet célozhatják meg, míg a katalitikus domén inhibitorai vagy a szubsztrát-kötőhely vagy az ATP-kötőhely ellen irányulnak. A Rottlerin, vagy más néven a mallotoxin egy természetes eredetű inhibitor, ami a *Mallotus philippinesis*-ből származik. A Rottlerin a PKC $\delta$  izoenzimre specifikus (IC<sub>50</sub> = 3-6  $\mu$ M), de nagyobb koncentrációban gátolja a CaM-kináz II-t és a PKA-t is. A Gö6976, indolkarbazol származék jól használható a cPKC és az nPKC izoenzimek megkülönböztetésére, ugyanis csak a cPKC izoenzimeket gátolja. A GF109203X, bisindolmaleimid származék, mind a cPKC, mind az nPKC izoenzimek gátlószere. Az említett három PKC inhibitor a katalitikus doménban elhelyezkedő ATP-kötőhelyhez kapcsolódva gátolja az enzim aktivitását [90].

### **1.7. Az oxidatív stressz és az ízületi porc**

A ROS és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> számos jelátviteli útvonalat befolyásolnak, szerepet játszanak pl. a sejtnövekedés és a differenciáció szabályozásában. Mindezen túl transzkripciós faktorok (pl. NF- $\kappa$ B, AP-1, EGR-1 stb.) aktivitását közvetlenül is regulálhatják, pl. a konzervált Cys aminosavmaradékok oxidatív módosításán keresztül. A ROS tirozin foszforilációt stimulál oly módon, hogy számos kinázt, pl. a MAPK kaszkád és a Src család enzimeit aktiválja [91,92]. Az egyik mechanizmus, amellyel a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szabályozza az intracelluláris folyamatokat, a protein tirozin foszfatázoknak az átmeneti gátlása az enzim katalitikus centrumában lévő Cys oldalláncok reverzibilis oxidációján keresztül, ami visszaszorítja a célfehérjék defoszforilációját [93]. A calcineurin egyik szabályozó mechanizmusa is hasonló redox reguláción alapul [27]. Kimutatták, hogy az intracelluláris

kalcineurin aktivitásnak érzékenysége a hidrogén-peroxidra  $IC_{50} = 30-40 \mu M$  értékkel jellemezhető [30].

A ROS az ízületi szövetek különböző sejtfunkcióját is befolyásolja [94]. Az ízületi porc legfőbb szerkezeti egységei a fibrilláris kollagén és a szolubilis aggregán (PG). A kollagén hálózat szakítószilárdságot biztosít, míg a PG az erőátvitelért és a nyomóterhelés szétesztetéséért felelős a mozgás során. Az aggregán molekulák elsősorban aggregátumok formájában vannak jelen, amelyben a monomerek nem kovalens módon egy lineáris, nagy molekulatömegű glükózaminoglikánhoz, a hialuronsavhoz kapcsolódnak. A kondrociták érmentes mátrixba ágyazott differenciált sejtek, melyeket túlnyomó részt anaerob metabolizmus jellemez. Valószínűsítik, hogy az artikuláris porc felszínén fiziológiás körülmények között az oxigén koncentráció 5-10%, míg a mélyebb rétegekben kevesebb, mint 1% [95]. Rheumatoid arthritisben a szinovia oxigén felhasználása megnő és a szinoviális folyadék oxigén koncentrációja csökken a normál viszonyokhoz képest [95]. Osteoarthritisben a szinoviális membrán kapillárisaiból az ízületi folyadék irányába történő oxigén transzfer visszaszorul [95]. Ezek az adatok jelzik, hogy fiziológiásan a kondrociták hipoxiás körülmények között élnek, ami tovább fokozódik a betegségek során. A hipoxiás körülmények a gyulladt szövetekben szabad gyököket termelnek [96,97]. Az oxigén parciális nyomásának változására, mechanikai stressz, immunmediátorok és gyulladási mediátorok hatására a kondrociták ROS koncentrációja megemelkedik. A kondrociták által termelt legfontosabb ROS a nitrogén-monoxid ( $\cdot NO$ ) és a szuperoxid-anion ( $O_2^{\cdot -}$ ), amelyek  $H_2O_2$ -t és különböző gyököket generálnak (pl. peroxinitritet:  $ONOO^{\cdot -}$ ). A szuperoxid-aniont a NADPH enzim komplex termeli, ami a molekuláris oxigén redukcióját katalizálja  $O_2^{\cdot -}$  gyökké. Az artikuláris kondrociták a NADPH oxidáz komplex sejt-specifikus formáit (pl.  $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  és  $gp97^{phox}$ ) expresszálják.  $Fe^{2+}$  és  $H_2O_2$  jelenlétében hidroxilgyök ( $\cdot OH$ ) szabadul fel, amely a membránlipidek telítetlen zsírsavaival lép reakcióba hosszabb élettartalmú lipid gyökök ( $RO^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$ ) képződését eredményezve [94].

A ROS képződésre kialakuló sejtválaszok a sejt redox állapotától függenek. A redox állapotot a ROS produkció és az intracelluláris antioxidánsok szintje között fennálló érzékeny egyensúly határozza meg. Ezt az egyensúlyt exogén eredetű faktorok (pl. a citokinek) vagy az oxigénkoncentráció változása könnyen befolyásolhatja. Ha az oxidánsok szintje nem haladja meg a sejt redukáló képességét, a ROS jelentős szerepet vállal a sejtfunkciók szabályozásában, beleértve a jelátviteli folyamatokat is. Ha a sejten

belül az antioxidánsok mennyisége elégtelen a ROS méregtelenítéséhez, oxidatív stressz lép fel, ami nem csak a sejtmembránokat és a nukleinsavakat bontja le, de az extracelluláris alkotórészeket, a proteoglikánokat és a kollagént is. A ROS különböző kémiai folyamatokon keresztül (pl. oxidáció, nitrálás stb.) módosítani képes a fehérjék szerkezetét, ami a biológiai aktivitás csökkenéséhez, a szövetekben a káros fehérjék felhalmozódásához vezet. Az oxidált molekulák, a lebontott termékek és a sejtalkotók hozzájárulnak a szinoviális gyulladás fokozásához és egy olyan káros körfolyamat kialakulásához, amit az újonnan képződő reaktív oxigéngyökök és további lebontott termékek hoznak létre.

Szuperoxid-anion, nitrogén-monoxid, valamint a szuperoxid-anionból és nitrogén-monoxidból képződő peroxinitrit indukcióját figyelték meg szarvasmarha izületi kondrocitákban citokin stimulációt követően [98]. Más munkacsoportok ezen ROS mellett fokozott  $H_2O_2$  felszabadulást mértek citokinnel stimulált nyúl izületi kondrocitákban. Több kutatócsoport alátámasztotta a  $H_2O_2$  izületi porcra kifejtett károsító hatását, ami a PG szintézis gátlásában, az apoptózisban és az Erk aktiválásában nyilvánult meg [99,100].

Reaktív oxigén részecskék (pl. a  $O_2^-$ , a  $H_2O_2$  és a  $\cdot OH$ ) az aerob légzési lánc során is képződnek a sejtekben. Kimutatták, hogy a reaktív oxigén részecskéknek fontos szerepük van a porc pusztulásában is, ami a gyulladásos izületi betegségek velejárója [101,102]. Izületi gyulladások során az izületi nedvben lévő polimorfonukleáris leukociták és makrofágok  $H_2O_2$ -t termelnek [99]. A szuperoxid-anionból képződő  $H_2O_2$  a gyulladásos izületekben jelenlévő fémionokkal (pl. vasionnal) Fenton-típusú reakcióba lépve hidroxilgyököt termel, amelyek a szinoviális folyadékban lévő legfontosabb makromolekula, a hialuronsav depolimerizációját előidézőve hozzájárul a gyulladás kialakulásához [103].

### **1.8. Szisztémás Lupus Erythematosus**

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) a poliszisztémás autoimmun kórképek prototípusa. Az SLE multifaktoriális betegség, kialakulását genetikai tényezők is befolyásolják. A humán SLE poligénes, azaz egyetlen gén nem elegendő a kórkép manifesztálódásához. Genetikailag fogékony egyéneknél alakul ki, külső és belső környezeti tényezők hatására. Az SLE-t provokáló tényezők közül legismertebbek az ultraibolya sugárzás, infekciók, valamint egyes gyógyszerek. E tényezők hatására az immunrendszer komplex zavara alakul ki, ennek legfőbb jellemzője a saját antigénnel szemben kialakult tolerancia megszűnése és patológiás antitestek megjelenése. A gyulladás

bármelyik szervet érintheti, leggyakrabban az ízületeket, bőrt, savós hártyákat, vesét és az idegrendszert. A krónikus szövődmények közül kiemelkedő jelentőségűek a szív- és érrendszeri betegségek, a tromboemboliás szövődmények, az idült veseelégtelenség és a csontritkulás [104].

A kóros sejtes immunválaszt a T-limfociták közvetítik SLE-ben. SLE betegek T-limfocitáiban fokozódik a CD4+, csökken a CD8+ sejtek előfordulása, megváltozik a Th1/Th2 arány, és károsodik a természetes ölősejtek működése. A T-sejtek kóros működése befolyásolja a B-sejtek aktivitását, az IL-2 kifejeződést, az apoptózist és a nekrozist, a DNS metilációját és a transzlációt [104-106]. Az IL-2 produkciója a CD28 molekula T-sejt-receptoron keresztül kiváltott jelátvitel mellett döntően transzkripciós szinten (AP-1, NFAT, NF- $\kappa$ B) szabályozott. Az IL-2 csökkent expressziója (pl. NF- $\kappa$ B p65 alegységének hiánya miatt) magyarázhatja a T-sejtek elégtelen proliferációját és az NK-sejtek citotoxicitását [105]. A TCR-nak a T-sejt antigén általi aktivációjához szükséges  $\zeta$ -láncának expressziója nagymértékben csökken, és ez részben felelős az aktiváció által kiváltott sejthalál elmaradásáért [106-108]. Az aktiváció után fokozott és elnyújtott az  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés, ami a calcineurinon keresztül közvetve befolyásolja a transzkripciós faktorok (pl. az NFAT) működését, ezáltal számos gén (pl. CD154, Fas-ligand, c-myc) expresszióját [106]. Kimutatták, hogy az SLE betegek monocitáiban és limfocitáiban csökkennek a PKC által katalizált fehérjefoszforilációs folyamatok is [109-111].

Glükokortikoszteroidokat (GKS) a krónikus gyulladásos betegségek (pl. asztma, rheumatoid arthritis, autoimmun betegségek) kezelésére használják. Az SLE betegek gyógyszeres kezelésében figyelembe kell venni a lupus súlyosságát és a szervi manifesztációt. Az aktív periódusban leggyakrabban kortikoszteroidokat használnak. A GKS az anti-inflamatorikus fehérjéket (pl. IL-1, IL-10) kódoló gének expresszióját fokozhatja, a gyulladásért felelős gének (pl. citokinek, enzimek, receptorok és adhéziós molekulák) átírását gátolhatja, de közvetlenül hozzájárulhat az aktivált GKS receptor és a gyulladásos gének expresszióját szabályozó aktivált transzkripciós faktorok (pl. NF- $\kappa$ B és AP-1) kölcsönhatásának gátlásához is [112]. Munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy az SLE-s betegek monocitáiban a legtöbb PKC izoforma expressziója közel a normál szintre emelkedett, míg az SLE-s betegek perifériás vér mononukleáris sejteiben mért calcineurin aktivitása csökkent a glükokortikoszteroid kezelést követően. Negatív korreláció volt a kezeléskor alkalmazott GKS dózisa és a calcineurin aktivitása között. Ez a hatás azonban nem betegség specifikus, ugyanis az egészséges donorokból származó

mononukleáris sejtekben is hasonló jelenség volt megfigyelhető [16].

Az SLE kezelésének másik alternatívája az újabb hatásmechanizmusú immunmoduláns gyógyszerek, illetve a patogenézis egyes lépéseit szelektívebben megcélzó terápia kifejlesztése [104]. Ismert például, hogy a CsA kalcineurint gátló hatása mellett, ami többek közt az IL-2 produkcióját szorítja vissza, a citoplazma foszfolipáz A<sub>2</sub>-t (cFLA<sub>2</sub>) is képes blokkolni [113,114]. A cFLA<sub>2</sub> arachidonsav termelésén keresztül fontos szerepet vállal gyulladáshoz vezető mediátorok (pl. prosztaglandinok, tromboxánok és leukotriének) expressziójának és cPKC izoenzimek aktivitásának szabályozásában [115,116]. A CsA és a GKS együttes alkalmazása, hasonlóan más kombinált kezelésekhez, hatékonyabb terápiás módszert jelenthetnek.

## 2. Célkitűzések

Számos Ser/Thr-specifikus protein kináz és foszfatáz fontos szerepet játszik a kondrogenézisben. A kondrogenikus sejtek proliferációs képességét elsősorban a mitogén aktivált protein kinázok (Erk1/2 és p38), valamint a különböző PKC izoenzimek szabályozzák, megváltoztatva a kondrogenézis szempontjából jelentős transzkripciós faktorok (pl. Sox9, CREB, NFAT) foszforilációs állapotát. Munkacsoportunk korábban a PP2A jelentőségére mutatott rá a komplex folyamat szabályozásában [73].

Vitathatatlan a protein foszfatázok jelentősége a porcdifferenciáció során, így célkitűzéseink közt szerepel:

- a kalcineurin szerepének tanulmányozása — mindenekelőtt a kalcineurin jelenlétét és aktivitását kívántuk kimutatni csirkeporc kultúrákban, mivel csak közvetett bizonyítékok voltak erre vonatkozóan [15],
- a foszforilációs-defoszforilációs folyamatok vizsgálata — összefüggést kívántunk keresni a foszforilációs és defoszforilációs folyamatok között a kalcineurint gátló CsA és az Erk1/2 MAPK-t gátló PD098059 specifikus inhibitorok alkalmazásával.

A mozgásszervi megbetegedések hátterében igen gyakran az ízületi felszíneket borító hialinporc szerkezetének megváltozása, pusztulása áll. A porc elváltozásai gyakran gyulladásos kórképek nyomán alakulnak ki (arthritisek), amikor jelentős oxidatív stressz éri az ízületek alkotó elemeit. Ebből kiindulva vizsgálni kívántuk a hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stressz hatását:

- a sejtek életképességére és a sejtproliferációra,
- a porcképződésre, illetve a porcszövet egyik legjelentősebb proteoglikánjának, az aggregán mRNS-szintjének változására,
- az aggregán expresszióját irányító Sox9 és a BMP gén expressziójában szerepet játszó NFAT transzkripciós faktorokra,
- a porcdifferenciációban fontos szerepet játszó Erk1/2 protein kinázra,
- a kalcineurin transzkripcióra, translációra és aktivitásra.

Kutatócsoportunk korábban lupus mononukleáris sejtekben vizsgálta egyes protein kinázok és foszfatázok szerepét. SLE-s betegek és egészséges donorok forbolészterrel (PMA) és kalcium-ionoforral (A23187) stimulált mononukleáris sejtjeiben a kalcineurin enzimaktivitása lecsökkent [16]. Kutatásunk a foszfatáz enzimaktivitás

csökkenésének lehetséges mechanizmusának felderítésére irányul, és az alábbi kérdésekre keressük a választ:

- A calcineurin aktivitás-csökkenés a Ca-ionofor és/vagy a PMA hatásához rendelhető-e?
- Hogyan befolyásolják a különböző PKC inhibitorok a calcineurin expresszióját és aktivitását stimulált humán mononukleáris sejtekben? Melyek azok a legfontosabb PKC izoenzimek, amelyek részt vesznek a folyamatban?
- Melyik az a target molekula, amelyik a PKC regulációja révén csökkenti a calcineurin aktivitását a forbolészterrel és a Ca-ionoforral stimulált mononukleáris sejtekben?

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Anyagok

A kísérletekhez az alábbi vegyszereket és anyagokat használtuk a megjelölt forrásból: főtális borjúsérum (Gibco, Gaithersburg, MD, USA); dimetil-metilénkék festék (Aldrich, Germany); Ham's F12 táptalaj, ciklosporin A, PD098059, A 23187, forbol-12-mirisztát-13 acetát, Protein A Sepharose gyanta (Sigma, St. Lois, MO, USA); metil-[<sup>3</sup>H]-timidin, ECL reagens (Amersham, Biosciences, Anglia); alamarBlue (BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA); GF109203X, Gö6976, Rottlerin (Calbiochem, EMD Bioscience Inc., Anglia); RNS izoláló kit (Gentra Systems Inc., Minneapolis, MN, USA); RT-PCR-hoz használt primerek (Merck, Biosciences, Németország) kvantitatív real time PCR-hoz használt primerek és próbák, kétszeres töménységű TaqMan® Universal PCR Master Mix NoAmpErase®UNG, húszszoros töménységű Assay Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); az immunprecipitációhoz és a Western blot analízishez használt antitesteket az *1. táblázat* adatai szerint. A többi alapvető laboratóriumi vegyszer *a.lt.* minőségű volt és a Spectrum 3D Kft. (Magyarország) szállította.

#### 3.2. Sejtenyésztés

Hamburger-Hamilton szerint 22-24-es stádiumában lévő csirkeembriók disztális végtagtelepeiből porcosodó mezenchymális sejteket izoláltunk, a sejtuszpenzióból  $1,5 \times 10^7$  sejt/ml sűrűségű primer kultúrákat hoztunk létre. Műanyag Petri-csészék (Nunc, Naperville, IL, USA) aljára 100-100  $\mu$ l szuszpenziót cseppentettünk, majd a sejteket 2 órán keresztül hagytuk kitapadni 5 % CO<sub>2</sub> és 95 % relatív páratartalom mellett 37°C-on CO<sub>2</sub> inkubátorban. A kolóniákat 10 % főtális borjúsérummal (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) kiegészített Ham's F12 táptalajjal (Sigma, St. Lois, MO) tápláltuk. A kicseppentés napját a tenyésztés 0. napjának tekintettük.

#### 3.3. Fénymikroszkópos morfológiai vizsgálat számítógépes képanalízissel

Csirkeembriók végtagtelepeiből izolált kondrogenikus sejtek 30  $\mu$ l-éből (nagy sűrűségű, *high density*, HD) kultúrákat hoztunk létre, amelyeket 24 lyukú platekben, kör alakú fedőlemezek felszínén (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Németország) tenyésztettünk. A kezelt és kezeletlen HD kultúrákat a tenyésztés 6. napján abszolút etanol és 40 % formaldehid 4:1 arányú keverékével fixáltuk. A kultúrákat 3 %-os ecetsav

oldatban oldott 0,1 % dimetil-metilénkék festékekkel (DMMB) festettük 5 percig, 3 %-os ecetsav oldattal mostuk, és gumiarábikummal fedtük le. Néhány kultúrát a DMMB 0,1 %-os vizes oldatával kezeltünk. A metakromáziás porcterületek nagyságát négy független kísérlet esetén minden egyes kísérleti csoportban tíz kultúránál vizsgáltuk számítógépes képanalízis segítségével, az értékeket átlagoltuk és összehasonlítottuk (Student t-próbával).

### **3.4. A sejtprolifерáció vizsgálata [<sup>3</sup>H]-timidin beépülésével**

A sejtuszpenzió 15 µl-es cseppjét 96 lyukú mikrotiter platekbe cseppentettük, és a sejteket ugyanolyan körülmények között tenyésztettük, mint a Petri csészékben lévő kultúrákat. Az 1 µCi/ml <sup>3</sup>H-timidint (törzsoldat: metil-[<sup>3</sup>H]-timidin, 37 MBq) tartalmazó médiumot a sejtenyésztés 2., 3. és 6. napján adtuk hozzá a sejtekhez és 16 órán át inkubáltuk. A médium eltávolítása után a kultúrákat PBS (foszfát-puffer, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl, pH 7,4) oldattal mostuk, majd jéghideg, 5 %-os triklórecetsav oldat 20 perces alkalmazásával a szolubilis fehérjéket kicsaptuk és ismét PBS oldattal mostuk. Ezt követően a sejteket kalcium/magnézium mentes PSB oldatban oldott 0,25 % tripszinnel emésztettük 37°C-on 10 percig, majd félautomata sejt-harveszterrel (Skatron, Norvégia) szüreteltük. A kolóniákat szcintilációs szűrőpapíron szárítottuk, és az aktivitásukat folyadék szcintilációs detektorral (Pharmacia, Uppsala, Svédország) mértük. A méréseket négy független kísérlet esetén minden egyes kísérleti csoportban tíz kultúrával hajtottuk végre. A mérési adatok számítógépes statisztikai elemzését F-próbával végeztük.

### **3.5. A sejtek életképességének vizsgálata**

A sejtek életképességének tanulmányozására a sejteket 96 lyukú mikrotiter platekben tenyésztettük, és 10 µl MTT (3-/4,5-dimetiltiazol-2/-2,5-difeniltetrazolium bromid; 25 mg MTT/5 ml PBS) reagenst adtunk minden egyes kultúrához. A sejteket 2 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd 100 µl MTT szolubilizáló oldatot adtunk hozzá, és 570 nm-en mértük az abszorbanciát. A mononukleáris sejtek kezelése után a sejtek (2 x 10<sup>6</sup> sejt/100 µl) életképességének meghatározásakor a sejteket alamarBlue reagenssel kezeltük a gyári leírás szerint (BioSource International, Inc., Camarillo, CA). A sejteket CO<sub>2</sub> termosztátban inkubáltuk 37°C-on 45 percig, majd az alamarBlue fluoreszcens jelét detektáltuk (excitációs hullámhossz 530 nm, emissziós hullámhossz 590 nm) Fluoroskan Acent FI (Thermo Labsystems, Svédország) készülék segítségével.

### **3.6. Porcsejtek kezelése**

Petri csészében növényő porcsejt-kultúrákat a tenyésztés 2. és 3. napján 0,1, 1,0 és 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal kezeltük 30 percig, amelyet 9 M (30 %) törzsoldatból a sejttenyésztéshez használt médiummal hígítottunk. A calcineurin aktivitásának gátlására 2 µM ciklosporin A-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.

### **3.7. Porcsejt kivonatok preparálása**

A porcsejt kultúrákat az oxidatív stresszt követően azonnal felszedtük, és 100 µl homogenizáló pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 10 µg/ml GordoX, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM fenilmetilszulfonil fluorit (PMSF), 5 mM benzamidin, 10 µg/ml tripszin inhibitor, 0,5 % Triton X-100) szuszpendáltuk. A sejtszuspenziót -70 °C-on tároltuk, majd a sejteket közvetlenül a kísérletek előtt jeges-vizes hűtés közben ultrahanggal tártuk fel 4x30 másodpercig 50-es ciklusszámot alkalmazva (Branson Sonifier, Danbury, USA). A sejtlizátumot 10000xg-n centrifugáltuk 10 percig +4°C-on. A felülúszóból azonnal calcineurin enzimaktivitás mérést végeztünk. Western-blot kísérlethez teljes sejtlizátumot használtunk. RT-PCR analízisre a porcsejt kolóniákat háromszor mostuk RNáz mentes fiziológiás sóoldattal, majd a kultúrákat felhasználásig -70°C-on tároltuk.

### **3.8. Humán perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) preparálása és a sejtek jellemzése áramlásos citometriával**

Hat egészséges férfi donor (életkoruk 21-36) heparinnal kezelt véreből mononukleáris sejtszuspenziót 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 % (Coulter EPICS XL áramlásos citométer, Coulter, Hialeah, FL, USA).

### **3.9. A PBMC kezelése és a minták előállítása**

A sejteket (5x10<sup>6</sup> sejt/ml) különböző PKC inhibitorokkal (a cPKC és az nPKC izoenzimek gátlására 1 µM GF109203X, a cPKC izoenzimek gátlására 200 nM Gö6976, a PKCδ izoenzim gátlására 10 µM Rottlerin) előinkubáltuk egy órán át. 5 µM Ca-ionoforral és/vagy 80 nM forbol-12-mirisztát-13 acetáttal stimuláltuk külön-külön vagy egyidejűleg

PKC inhibitorok távollétében és jelenlétében 4 órán át CO<sub>2</sub> termosztátban 37°C-on.

A PBMC stimulálása után a sejteket PBS oldattal alaposan átmostuk, majd 100 µl homogenizáló pufferben (ld. 3.7. rész) szuszpendáltuk. A sejt szuszpenziót az ultrahangos feltárástól (3 x 30 mp, ciklusszám 50) -70°C-on tároltuk. A szonikálást közvetlenül a kísérletek előtt végeztük. A kalcineurin enzimaktivitást centrifugálás (10000xg, 10 perc, 4°C) után a felülúszóból azonnal mértük. Western blotra TritonX-100 nélküli teljes sejtlizátumot használtunk. Az RT-PCR kísérletekhez a sejteket nukleáz-mentes fiziológiás sóoldattal háromszor átmostuk és az RNS preparálásáig -70°C-on tároltuk.

### **3.10. Kalcineurin enzimaktivitás mérése**

A kalcineurin enzimaktivitását a <sup>32</sup>P-vel jelzett inhibitor-1 szubsztrátból az enzim által lehasított <sup>32</sup>P<sub>i</sub> radioaktivitásának mérésével határoztuk meg [117]. A reakcióközeg (30 µl) 50 mM Tris puffert (pH 7,0), 3,4 µg/ml Gordoxot, 3,4 µg/ml leupeptint, 1 mM PMSF, 1,6 mM benzamidint, 3,4 µg/ml tripszin inhibitor, 40 µg/ml kalmolulint, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>-ot, 100 nM okadánsavat (OA), 2 nM protein foszfatáz inhibitor-2-t, megfelelő mennyiségű sejt-kivonatot (2-3 mg/ml fehérje) és <sup>32</sup>P-vel jelzett I1-t (20-30000 cpm/reakció közege) tartalmazott. A reakcióközeget 20 percig 30°C-on inkubáltuk. A reakciót 100 µl 20 % triklór-ecetsav és 100 µl 6 mg/ml borjú szérum albumin egyidejű hozzáadásával állítottuk le. Centrifugálás után 180 µl felülúszó <sup>32</sup>P<sub>i</sub> mennyiségét határoztuk meg Cserenkov-sugárzás detektálásával folyadék szcintillációs detektorban.

### **3.11. A PKA enzimaktivitás mérése**

A PKA enzimaktivitás méréséhez 1 mg/ml Hiszton II.A szubsztrátot használtunk. A foszforilációs reakciót 1 mg/ml H89 PKA inhibitor távollétében és jelenlétében végeztük. A reakcióközeg (40 µl) 100 mM MES puffert (morfolin-etán-szulfonsav, pH 6,8), 3,4 µg/ml Gordoxot, 3,4 µg/ml leupeptint, 1 mM PMSF, 1,6 mM benzamidint, 3,4 µg/ml tripszin inhibitor, 12 mM Mg-acetátot, 0,5 mM cAMP-t, 0,12 mM ATP-t, <sup>32</sup>P-ATP-t (1 x 10<sup>6</sup> cpm/reakcióközege), 1 mg/ml fehérjekivonatot tartalmazott. A reakciót 10 percig végeztük 30°C-on. A reakciót 30 µl reakcióelegy P-81 kromatográfiás papírra történő cseppentésével állítottuk le, majd 0,25 % foszforsav oldatban háromszor 10 percig mostuk. <sup>32</sup>P<sub>i</sub> Cserenkov-sugárzását folyadék szcintillációs detektorral határoztuk meg.

### 3.12. Immunprecipitáció

A mononukleáris sejtszuspenziók feltárása után a mintákat centrifugáltuk (13000xg, 10 perc, 4°C) és a felülúszót használtuk immunprecipitációs analízisre. Az immunprecipitációs puffer tartalma 20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 % Triton X-100, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 5 mM benzamidin és 10 µg/ml tripszin inhibitor volt. A 200 µg fehérjét tartalmazó sejtlyizátumot 0,25 µg/ml anti-nyúl IgG antitesttel és Protein A Sepharose gyantával 2 óráig 4°C-on inkubáltuk. A centrifugálás után (2000xg, 1 perc, 4°C) a felülúszót 5 µl anti-Cabin 1 antitesttel kezeltük (2 óra, 4°C), 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 komplexeket tartalmazó mintákat centrifugáltuk (1500xg, 5 perc, 4°C), a felülúszót eldobtuk és a pelletet háromszor mostuk immunprecipitációs pufferrel. A pellethez fele térfogatú, kétszeres töménységű SDS mintapuffert adtunk (124 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 40 mM DTT, 0,004 % bróm-fenolkék) és 5 percig főztük.

### 3.13. Western blot analízis

Western blot kísérlethez teljes csirkeporc sejtlyizátumot használtunk. A mintákat ötszörös töménységű elektroforézis minta pufferben (310 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % SDS, 50 % glicerol, 100 mM DTT, 0,01 % bromofenol kék) vettük fel és 10 percig főztük. Csirkeporc sejtek esetén kb. 70-80 µg, mononukleáris sejtek esetén 10-50 µg fehérjét szeparáltunk SDS alapú gélen. A kalcineurin, a (foszfo)-Sox9 és a difoszfo Erk1/2 detektálására 10 %-os gélt, az NFAT4 esetén 6 %-os, a Cabin 1 fehérje tanulmányozására pedig 5%-os gélt használtunk. A fehérjéket elektroforézissel nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat PBST-ben (0,1 % Tween 20, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl, pH 7,4) oldott 5 % sovány tejjel blokkoltuk, majd mostuk, ezt követően az első antitesttel (1. táblázat) egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. A Cabin 1 foszfo-Ser detektálásánál a membránt PBST-ben oldott 3 %-os BSA-val blokkoltuk. A membránokat az első antitest után háromszor 10 percig mostuk PBST oldattal, majd a második antitesttel (1. táblázat) inkubáltuk szobahőmérsékleten, egy órán át. A második antitesteket 1 % sovány tejjel tartalmazó PBST oldattal hígítottuk. A jeleket ECL reagenssel detektáltuk.

**1. táblázat. A Westren blot analízis során használt antitestek bemutatása**

<b>Kimutatandó fehérje</b>	<b>1. antitest</b>	<b>2. antitest</b>
kalcineurin	monoklonális anti-kalcineurin ( $\alpha$ -subunit) (Sigma, St. Lois, MO) 1:300	anti-egér IgG (Sigma, St. Lois, MO) 1:1000 (porcsejteknél) ill. 1:2000 (mononukleáris sejteknél)
Sox9	poliklonális anti-Sox9 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:50	anti-kecske IgG (Sigma, St. Lois, MO) (1:12000)
foszfo-Sox9	poliklonális anti-foszfo-Sox9 (Abcam Ltd, Cambridge, Anglia) 1:400	anti-nyúl IgG (Sigma, St. Lois, MO) 1:2000
difoszfo-Erk1/2	monoklonális anti-MAP kináz, Thr és Tyr oldalláncokon difoszforylált Erk1/2 (Sigma, St. Lois, MO) 1:50	anti-nyúl IgG (Sigma, St. Lois, MO) 1:12000
NFAT4	poliklonális anti-NFAT4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:200	anti-nyúl IgG (Sigma, St. Lois, MO) 1:2000
Cabin 1	poliklonális anti-Cabin 1 (Affinity BioReagent, Golden, CO) 1:500	anti-nyúl IgG (Sigma, St. Lois, MO) 1:2000
foszfo-Ser	monoklonális anti-foszfo-Ser (Calbiochem, EMD, Bioscience Inc., San Diego, CA) 1:50	anti-egér IgG (Sigma, St. Lois, MO) 1:2000

**3.14. RT-PCR analízis**

A sejtekből totál RNS-t izoláltunk RNS izolációs kit segítségével a gyári leírás szerint (Gentra Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). A reverz transzkriptáz (RT) reakció közege 2  $\mu$ g RNS-t, 0,112  $\mu$ M oligo(dT)-t, 0,5 mM dNTP-t és 200 U M-MLV RT-t tartalmazott egyszeres RT pufferben. A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) használt primer párokat terveztük, szekvenciáit a 2. táblázat mutatja be.

## 2. táblázat. Az RT-PCR analízishez használt primerpárok bemutatása

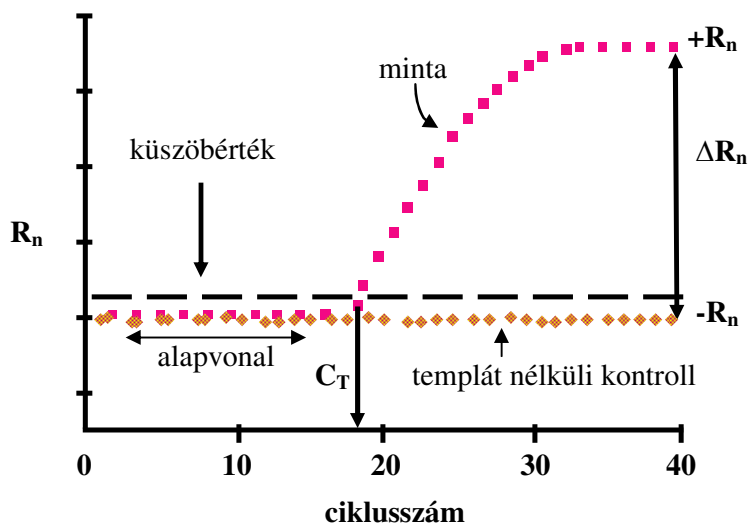
Gének	Primerek szekvenciái	
<b>csirke kalcineurin</b>	Sense	5'-CTG CTC TGA TGA ACC AAC AGT T -3'
	Antisense	5'-ACG GCA AGG ACC AGG TAA ACA-3'
<b>csirke kollagén</b>	Sense	5'-CAG TCG CTG TCC CCA TAG-3'
	Antisense	5'-ACG TGG AAA CCG CCG TTG-3'
<b>csirke aggregán</b>	Sense	5'-CAA TGC AGA GTA CAG AGA-3'
	Antisense	5'-TCT GTC TCA CGG ACA CCG-3'
<b>csirke Sox9</b>	Sense	5'-CCC CAA CGC CAT CTT CAA-3'
	Antisense	5'-CTG CTG ATG CCG TAG GTA-3'
<b>csirke GAPDH</b>	Sense	5'-GAG AAC GGG AAA CTT GTC AT-3
	Antisense	5'-GGC AGG TCA GGT CAA CAA-3'
<b>humán kalcineurin</b>	Sense	5'-TAC CCT GCA GTT TGT GAA TT-3'
	Antisense	5'-ATA TGT TGA GCA CAT TTA CCA-3'
<b>humán GAPDH</b>	Sense	5'-CCA GAA GAC TGT GGA TGG CC-3'
	Antisense	5'-CTG TAG CCA AAT TCG TTG TC-3'

A PCR-t a következő hőmérsékleti profil mellett végeztük (PCR Express Temperature Cycling System, Hybaid, Anglia): 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 ötszörös töménységű DNS mintapuffert (0,41 % bróm-fenolkék, 66,6 % szacharóz TAE pufferben: 0,4 M Tris-HCl, pH 8,5, 0,19 M ecetsav és 0,016 M EDTA) adtunk és gélelektroforézissel tanulmányoztuk etídium-bromidot tartalmazó 1,2 % agaróz gélben.

### 3.15. Kvantitatív Real Time RT-PCR analízis

A totál RNS izolálását és az RT reakciót a fentebb leírt módon végeztük. TaqMan próba alapú, kétlépéses kvantitatív real time PCR-hoz, a GAPDH, az aggregán, a Sox9 és a kalcineurin mRNS szintjének tanulmányozására az ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) által előállított primereket és próbákat használtunk. A PCR reakcióközege (20 µl) egy mintára a következő: 10 µl kétszeres töménységű TaqMan® Universal PCR Master

Mix NoAmpErase®UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 µl húszszoros töménységű Assay Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 9 µl higított cDNS (az aggregán, a kalcineurin, a GAPDH esetén 500 ng cDNS/assay, a Sox9 esetén 250 ng cDNS/assay). 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 utóbbi lépésnél (60°C 1 perc) végzi. Az ABI Q-PCR készülék szoftvere minden egyes mintára az  $R_n - C_n$  vagy a  $\lg R_n - C_n$  összefüggést ábrázolja grafikusan, ahol az  $R_n$  az  $n$ -dik ciklusszámban ( $C_n$ ) mért fluoreszcencia ( $R_n+$ ) és a háttér fluoreszcencia ( $R_n-$ ) különbsége. A küszöbértéket manuálisan úgy állítottuk be, hogy a küszöbérték minden összehasonlított mintánál az exponenciális fázisban legyen. A szoftver a küszöbértéknél magasabb fluoreszcenciát mutató, de még az exponenciális fázishoz tartozó 3-6 ciklusból számítja ki a  $C_T$ -t extrapolálást alkalmazva. Az illesztett egyenes és a küszöbérték metszéspontja adja meg a  $C_T$  értéket (4. ábra).



**4. ábra. A real time RT-PCR kvantitálásához használt paraméterek grafikus ábrázolása**

A minták összehasonlíthatósága érdekében többszörös normalizálásra van szükség. A PCR összeméréséből adódó pontatlanságokat a készülék szoftvere automatikusan korrigálja a mintában jelenlévő belső referenciafesték fluoreszcenciája alapján. Ez a referencia festék a ROX, amelyet a PCR Master Mix tartalmazta. Biológiai szempontból releváns normalizálás a GAPDH, mint belső referencia gén, mRNS

kópiaszámával történt, ugyanis a GAPDH mRNS mennyisége a kezelések hatására nem változott. A szoftver a következő algoritmust használja a mRNS szint változások meghatározásánál:

változás a kezeletlen minta vizsgált génjének mRNS szintjéhez viszonyítva =  $2^{\Delta\Delta C_T}$   
ahol a  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{kontroll}) - \Delta C_T(\text{kezelt})$ ,

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

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

### 3.16. Statisztikai analízis

A mérési átlagok standard hibáit (SEM), valamint a standard deviációkat ( $\pm$ SD) a Student t-próbával határoztuk meg. Az enzimaktivitás, ill. a mRNS- és a fehérjeszintek denzitometriás analízisének porcsejtek esetén  $\pm$ SD-t számítottunk 3-4 független kísérlet adataiból. A mononukleáris sejteknél 3-6 egészséges donor esetén kapott adatokat átlagoltuk és SEM statisztikai analízist végeztünk.

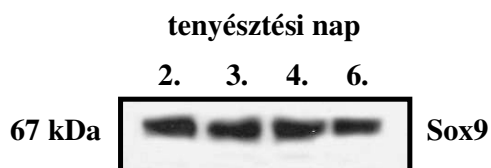
## 4. Eredmények

### 4.1. Jelátviteli pályák vizsgálata csirkeporc kultúrákban

#### 4.1.1. A porcspecifikus markerek és a Sox9 transzkripció faktor változása a porcdifferenciáció során

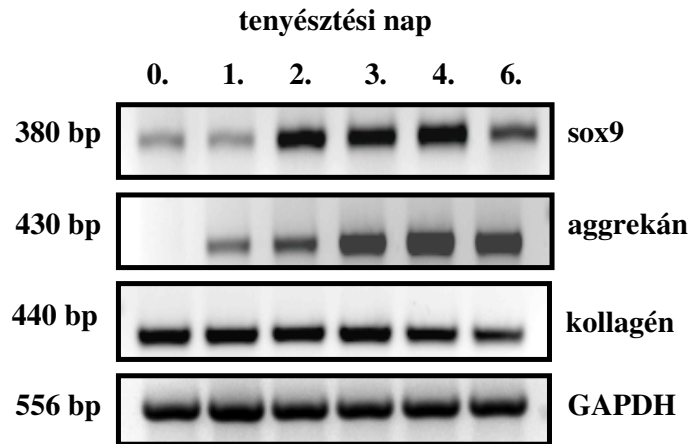
Csirkeembriók végtagtelepeiből származó mezenchymális sejt kultúrában a 6. napon spontán porcképződést figyelhetünk meg. Ez a differenciációs folyamat a kondrogenikus sejtek kondenzációjával kezdődik, amit a kezdetleges porcnodulusok érése követ. A nodulusok sejtjei sejt-sejt kontaktusokat hoznak létre, különböző parakrin és endokrin szignálok hatására érett porcsejteké differenciálódnak. A nagy sűrűségű kultúrák fiatal porcsejtjei a tenyésztés kb. 3. napján II-típusú kollagénban, aggregátumban, porcspecifikus proteoglikánban gazdag specifikus extracelluláris mátrixot kezdenek kiválasztani [9,118]. A mezenchymális sejtek porcsejteké történő differenciációját több transzkripció faktor mellett a Sox9 is nagymértékben szabályozza. A porcdifferenciáció során a Sox9 mRNS és fehérje szintjének változását RT-PCR és Western blot technikával követtük nyomon (5. és 6. ábrák).

Irodalmi adatokkal összhangban [67-69] megfigyeltük, hogy a porcspecifikus proteoglikán, az aggregátum expresszióját irányító Sox9 transzkripció faktor kifejeződése a kondrogenézis korai szakaszában erőteljes. Mind a mRNS (6. ábra), mind a fehérje szintje (5. ábra) a 2-4. napokon volt a legmagasabb.

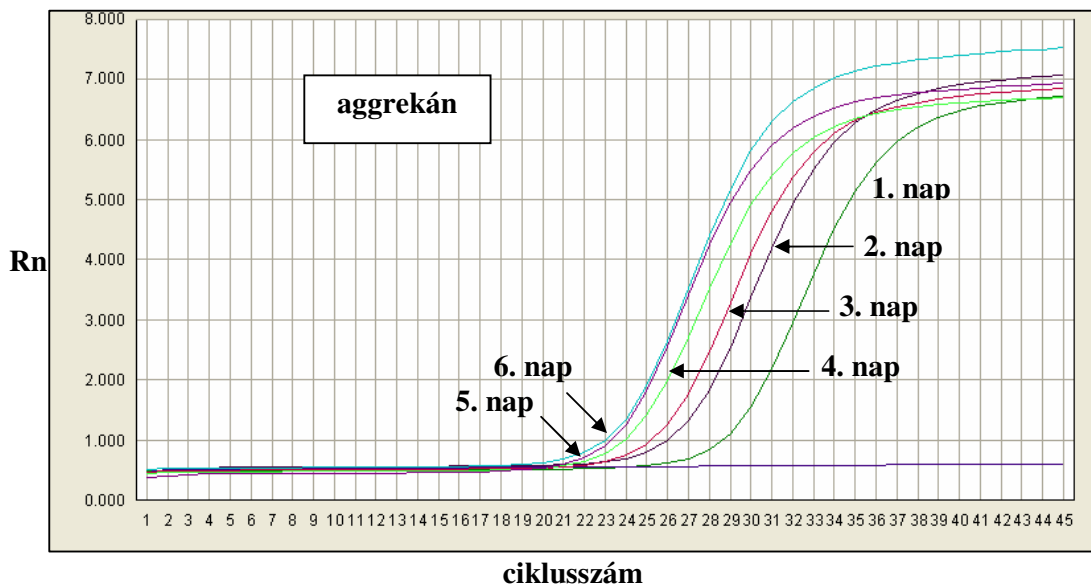


#### 5. ábra. A Sox9 fehérje szintjének változása a porcdifferenciáció során

A Sox9 fehérje Western blotja. A Western-blot 3-4 független kísérlet jellemző eredménye.



(a)



(b)

**6. ábra. A Sox9 transzkripció faktor, a porcspecifikus markerek (aggrekán, kollagén) és a GAPDH mRNS szintjének változása a porcdifferenciációban**

A mRNS szintben bekövetkező változások vizsgálata RT-PCR technikával. Endogén kontrollnak a GAPDH mRNS szintjét tekintettük. A sávok 3-4 független kísérlet jellemző eredményét reprezentálják (a). Az aggrekán mRNS szintjének mennyiségi meghatározása real time RT-PCR technikával. Az Rn - ciklusszám összefüggés változása a tenyésztési napok (1-6.) szerint (b).

Ennek megfelelően az aggregán mRNS szintje a porcdifferenciáció során fokozatosan növekedett, ami elengedhetetlen az extracelluláris mátrix kialakulásához. A porcmátrix másik fő komponensének, a kollagének a transzkripciója pedig a hatodik napon lecsökkent. Belső kontrollnak a GAPDH mRNS szintjét tekintettük, ami mindvégig állandó maradt a sejtenyésztés ideje alatt (6. ábra). Az aggregán és a Sox9 mRNS szintjének változását TaqMan alapú, relatív real time RT-PCR technikával is nyomon követtük. Belső referenciának a GAPDH-t használtuk. A  $C_T$  értékek meghatározásához a küszöbértékeket manuálisan állítottuk be, majd a  $2^{\Delta\Delta C_T}$  algoritmust használva kiszámoltuk a targetgének mennyiségi változását az első nap kontrolljának mRNS szintjéhez viszonyítva (6. ábra és 3. táblázat). A mRNS szintek kvantitatív meghatározásakor három párhuzamos mérést végeztünk minden egyes kísérleti csoport esetén. Az aggregán és a GAPDH gén vizsgálatakor kapott amplifikációs görbékből meghatározott  $C_T$  értékek átlagát a 3. táblázat szemlélteti. Kiszámítottuk az aggregán átlagolt  $C_T$  értékeinek és a GAPDH átlagolt  $C_T$  értékeinek a különbségét minden egyes minta esetén, majd az alábbi algoritmus alapján meghatároztuk a  $\Delta\Delta C_T$  értékeket, ebből pedig a vizsgált gén relatív mennyiségét az 1. nap kontrolljához viszonyítva ( $2^{\Delta\Delta C_T}$ ):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (1. \text{ nap kontroll}) - \Delta C_T (n. \text{ nap})$$

A Sox9 mRNS szintjének kvantitatív kiértékelésekor ugyanúgy jártunk el, mint az aggregán esetén. A Sox9 mRNS szintjének változását a porcdifferenciációban a 3. táblázat mutatja be.

### 3. táblázat. Az aggregán és a Sox9 mRNS szintjének változása a porcdifferenciációban

Az aggregán és a Sox9 mRNS szintjének mennyiségi meghatározása a  $2^{\Delta\Delta C_T}$  algoritmus alapján.

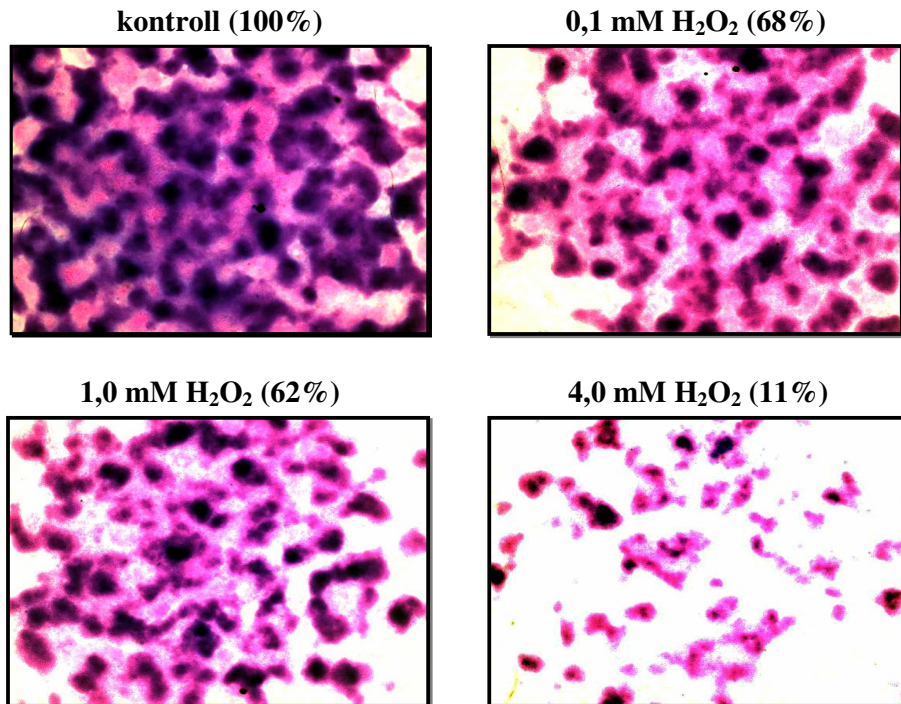
tenyésztési nap	aggregán	GAPDH	aggregán			Sox9
	Átlag $C_T$	Átlag $C_T$	$\Delta C_T$	$\Delta\Delta C_T$	$2^{\Delta\Delta C_T}$	$2^{\Delta\Delta C_T}$
1.	28,609	18,192	10,417	0,000	1	1
2.	26,219	17,054	9,165	1,252	2	22
3.	25,232	18,300	6,932	3,485	11	23
4.	24,029	18,053	5,976	4,441	21	28
5.	23,290	17,795	5,495	4,922	30	17
6.	23,223	18,431	4,792	5,625	49	11

#### 4.1.2. Az oxidatív stressz hatása a kondrogenézisre

Kimutatták, hogy a ROS termelése fokozza az ízületi megbetegedéseket, így pl. az osteoarthritis és a rheumatoid arthritis kialakulását, de az ízületi betegségek iniciációjában és progressziójában betöltött szerepük még részleteiben nem tisztázott. A ROS előidézheti a porcmátrix komponenseinek a károsodását vagy közvetlenül, vagy közvetve azáltal, hogy csökkenti a mátrix komponenseinek szintézisét, illetve azáltal, hogy apoptózist indukál, vagy látens metalloproteineket aktivál [94]. Ízületi gyulladások során az ízületi nedvben lévő polimorfonukleáris leukociták és makrofágok hidrogén-peroxidot termelnek [99]. Ezért vizsgáltuk az oxidatív stressz hatását a porcképződésre, a kondrogenézisben fontos szerepet játszó jelátviteli pályák enzimeire és transzkripciós faktoraira.

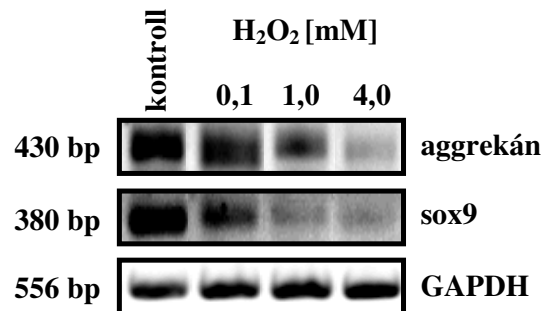
A porcképződés viszonylagos mértékét metakromáziás analízissel lehet megállapítani, melynek során a porcmátrixban lévő proteoglikán glikózaminoglikán oldalláncainak mennyiségét detektáljuk dimetil-metilénkék festékkel. Amikor a porcképződést a tenyésztés 2. és 3. napján különböző koncentrációjú hidrogén-peroxiddal indukált oxidatív stresszel zavartuk meg, a hat napos sejt kultúrákban metakromázia csökkenést figyeltünk meg. Már 0,1 mM  $H_2O_2$  jelentős csökkenést okozott a porcképződésben, nagyobb  $H_2O_2$  koncentrációknál a hatás fokozatosan emelkedett (7. *ábra*).

Az oxidatív stressz által okozott kondrogenézis gátlást az aggregán és a Sox9 transzkripciós faktor mRNS szintjeinek RT-PCR és real time RT-PCR technikával követtük nyomon. A  $H_2O_2$  mindkét fehérje mRNS szintjét csökkentette koncentráció-függő módon. A metakromáziás analízissel összhangban a porcmátrix kialakulásáért felelős aggregán és ennek a transzkripcióját szabályozó Sox9 mRNS szintje lecsökkent az oxidatív stresszt követően, legnagyobb mértékben 4,0 mM  $H_2O_2$  hatására. (8. *ábra* és 4. *táblázat*).



**7. ábra. A hidrogén-peroxid hatása a porcosodó kultúrákra**

A metakromatikusan festődő porcterületek a hat napos kolóniákban a 3 % ecetsavban oldott DMMB festést követően. A százalékos értékek négy független kísérletből számolt porcterület relatív nagyságát (valamennyi kísérleti csoport esetén tíz mérés átlaga) jelzik, amit a 6. napos kultúrák sejtszámára normalizáltunk.



**8. ábra. Az oxidatív stressz hatása a porcosodó kultúrák marker fehérjéire**

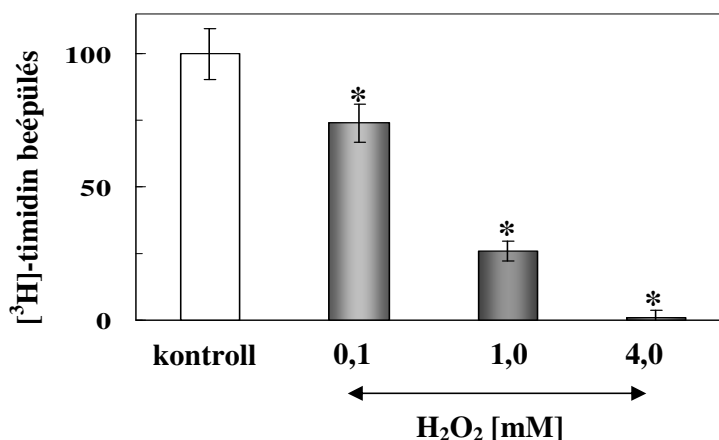
A hidrogén-peroxid kezelés hatásának tanulmányozása a porcspecifikus proteoglikán, az aggrekán és a Sox9 transzkripciós faktor mRNA szintjére a három napos porcsejt kultúrákban. Belső kontrollnak a GAPDH mRNA szintjét tekintettük. A sávok 3-4 független kísérlet jellemző eredményét mutatják.

**4. táblázat. Az aggregán és a Sox9 mRNS szintjének változása az oxidatív stresszt követően**

A mennyiségi meghatározás az amplifikációs görbe alapján a  $2^{\Delta\Delta C_T}$  algoritmus felhasználásával történt.

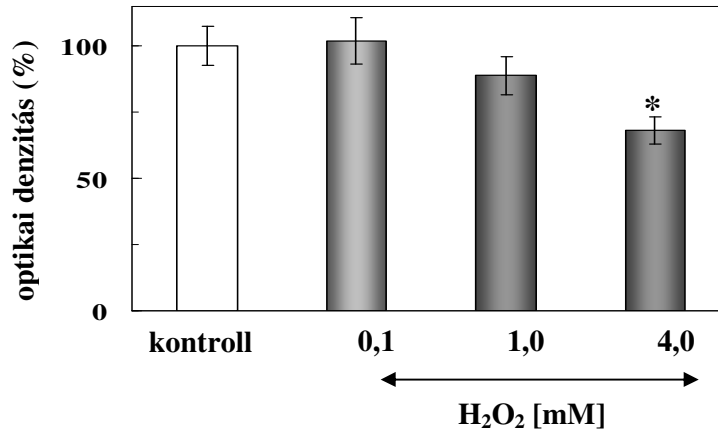
	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>			
	<b>kontroll</b>	<b>0,1 mM</b>	<b>1,0 mM</b>	<b>4,0 mM</b>
$2^{\Delta\Delta C_T}$ (aggregán)	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,098</b>	<b>0,021</b>
$2^{\Delta\Delta C_T}$ (Sox9)	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,027</b>	<b>0,023</b>

Ismeretes az oxidatív stressz citotoxikus hatása, ezért vizsgáltuk a sejtproliferáció és az életképesség változását a hidrogén-peroxiddal kezelt kultúrákban. Látható, hogy a porcsejtek proliferációjának mértéke szignifikánsan csökkent már 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására (kb. 25 %-kal) és 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében a 3. napos kultúrák sejteinek DNS-ébe való [<sup>3</sup>H]-timidin beépülés alig volt mérhető (9. ábra). Ennek ellenére a kondrociták 70-85 %-a életképes maradt még 1,0 vagy 4,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében is (10. ábra).



**9. ábra. A sejtproliferáció vizsgálata a porcsozó kultúrák hidrogén-peroxid kezelését követően**

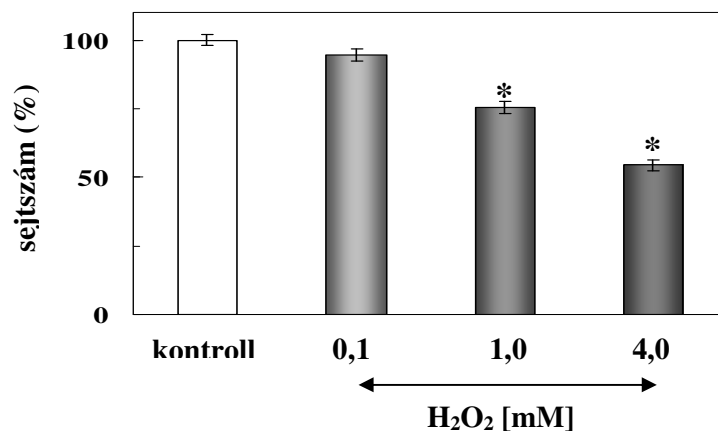
A kísérleteket a második H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelést követően a 3. napon végeztük. Az oszlopok három független kísérlet átlagát ± SD mutatják. A \* a szignifikáns változásokat jelenti a kontrollhoz képest, mely minden esetben P < 0,01.



**10. ábra. Az oxidatív stressz hatása a sejtek életképességére**

A citotoxicitás vizsgálatára MTT módszert használtunk. A mérést a második H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelést követően a 3. napon végeztük. Az oszlopokon három független kísérlet átlagát ± SD tüntetik fel. A \* szignifikáns változást (P < 0,01) jelenti a kontrollhoz képest.

A kondrogenézis mértéke függ a sejtsűrűségtől is, ezért vizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy a porcképződés csökkenése nem tulajdonítható-e az alacsony sejtszámnak? Meghatároztuk a sejtszámot a hat napos kontrollban és az oxidatív stressznek kitétt sejt kultúrákban is (11. ábra).



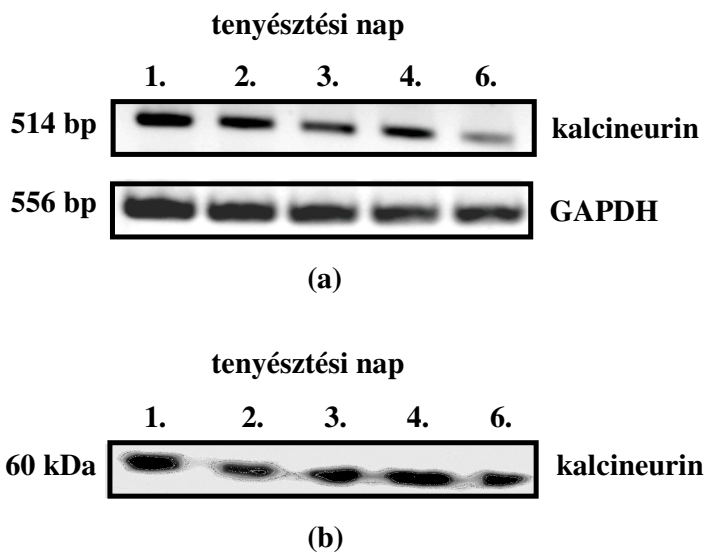
**11. ábra. A porcosodó kultúrák sejtszáma az oxidatív stresszt követően**

A sejtszámolást tripszines emésztés előzte meg a második H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelést követően a 6. napon. Az oszlopok három független kísérlet átlagát ± SD tüntetik fel. A \* szignifikáns változásokat jelenti a kontrollhoz képest, P < 0,01.

A 11. ábra adatai szerint 0,1, 1,0 és 4,0 mM hidrogén-peroxiddal kezelt kultúrákban a sejtszám a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációval arányosan 94, 75 és 54 %-ra csökkent. A további kísérletekben más kutatócsoportok [99,119] által is használt 1,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációt használtuk, mert a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ebben a koncentrációban szignifikánsan gátolta a kondrogenézist, ugyanakkor citotoxikus hatása nem volt.

#### 4.1.3. A calcineurin szerepe a kondrogenézisben

Ismert, hogy a calcineurin aktivitását az oxidatív stressz befolyásolja [27], továbbá a calcineurin az NFAT4/BMP2-n keresztül a kondrogenézis pozitív regulátora [15]. Ezért tanulmányoztuk a calcineurin szerepét az oxidatív stressz által gátolt kondrogenézisben. Tomita és mtsai a calcineurin jelenlétére csirkeporc kultúrákban CsA-val kezelt porcmátrix alción kék festéséből következtettek. Megfigyelték, hogy a kultúrák kezelése CsA-val csökkentette a porcmátrix lerakódását [15], de közvetlen bizonyítékot nem szolgáltatott a calcineurin jelenlétére a porcsejtekben. Ezért vizsgáltuk a calcineurin mRNS és fehérjeszintjét kondrogenikus sejtekben a porcdifferenciáció folyamán. RT-PCR és Western-blot technikával egyaránt kimutattuk a calcineurin jelenlétét csirkeporc kultúrákban (12. ábra).

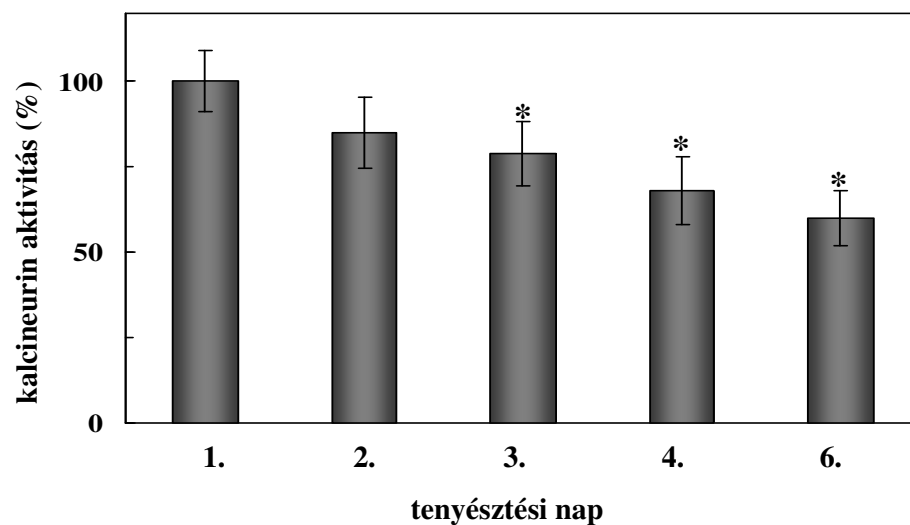


#### 12. ábra. A calcineurin mRNS és fehérje szintjének változása a kezeletlen csirkeporc kultúrákban

A calcineurin mRNS szintjének tanulmányozása RT-PCR technikával. Az alsó panel az endogén kontrollként szolgáló GAPDH expressziós szintjét mutatja (a). A calcineurin fehérje szintjének vizsgálata Western blot technikával (b).

A 12. ábra szerint a kalcineurin A (katalitikus) alegységének mRNS szintje fokozatosan csökkent a tenyésztés során, fehérje szinten ezek a változások kevésbé voltak jelentősek.

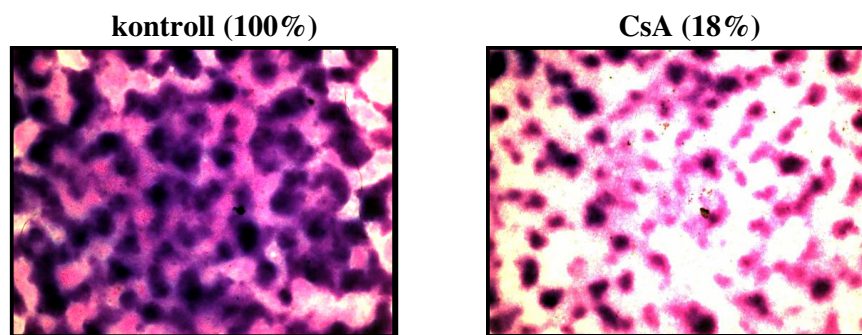
Az enzimfehérje jelenléte a sejtben (ill. a sejt kivonatban) nem jelenti szükségszerűen azt, hogy katalitikusan is aktív formában van jelen, ezért meghatároztuk a kalcineurin katalitikus aktivitását a sejttenyésztés folyamán a HD sejtek a homogenizátumában. A kalcineurin legnagyobb enzimaktivitását az 1. és a 2. napon mértük, a tenyésztés 6. napjára az aktivitás jelentősen csökkent (13. ábra).



**13. ábra. A kalcineurin aktivitás változása a sejttenyésztés során**

A kalcineurin aktivitás szignifikáns változást mutat az első naphoz viszonyítva ( $P < 0,02$ ), az első és második napon mért kalcineurin aktivitás között nincs szignifikáns különbség.

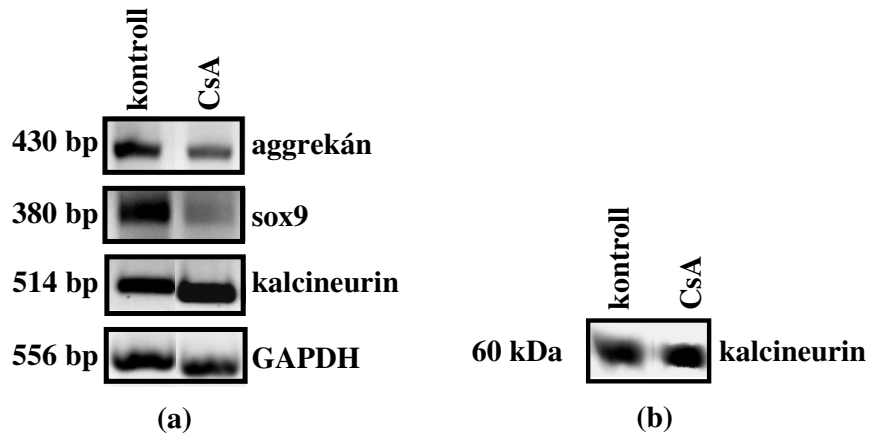
Igazolva a kalcineurin jelenlétét és aktivitását csirkeporc kultúrákban, vizsgálni kívántuk, milyen szerepet tölt be a porcdifferenciációban. Az egyik lehetséges megközelítés a kalcineurin élettani szerepének vizsgálatára az enzim aktivitásának gátlása megfelelő sejtpermeábilis inhibitorral. A kalcineurin jól ismert farmakológiai inhibitora a ciklosporin A, CsA [6,8]. Amikor a kondrogenikus sejteket a tenyésztés 2. és 3. napján 4-4 óráig 2  $\mu$ M CsA-val kezeltük, a porcképződésben jelentős mértékű csökkenést figyelhettünk meg, amit a hat napos porcsejtek metakromáziás festése igazolt (14. ábra).



#### **14. ábra. A CsA hatása a porcosodó kultúrákra**

A metakromáziásan festődő porcterületek a hat napos nagy sűrűségű kolóniákban. A kondrogenikus sejteket a tenyésztés 2. és 3. napján 4-4 óráig 2  $\mu$ M CsA-val kezeltük. A százalékos értékek négy független kísérletből számolt porcterületek relatív nagyságát (valamennyi kísérleti csoport esetén 10-10 mérés átlaga) jelzik, amit a hat napos kultúrák sejtszámára normalizáltunk. A kontroll %-ában kifejezett sejtszám  $86\pm 6\%$  volt a CsA kezelést követően.

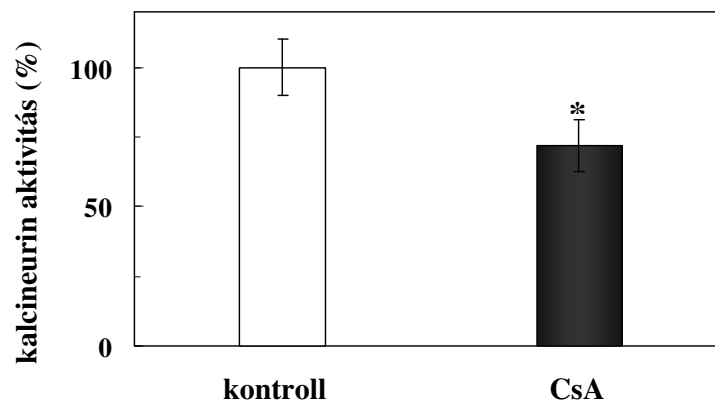
A CsA-val kezelt porctelep csökkenésének magyarázatát akartuk a továbbiakban felderíteni. A metakromáziás festéssel összhangban, a CsA csökkentette a porcspecifikus proteoglikán, az aggregán mRNS szintjét, ugyanis visszaszorította az aggregán expresszióját irányító Sox9 transzkripcióját (15. ábra). A calcineurin mRNS és fehérjeexpressziós szintje pedig emelkedett a kezelést követően, ami kompenzációs hatásként jelenhet meg a CsA kezeléssel szemben (15. ábra).



### 15. ábra. A CsA hatása porcosodó kultúrákra

A kultúrákat a tenyésztés 2. és 3. napján 4 óráig kezeltük CsA-val. Az RT-PCR (a) és a Western-blot (b) analízishez három napos sejt kultúrákat használtunk. Valamennyi RT-PCR és Western-blot 3-4 független kísérlet jellemző eredményét mutatja be.

2  $\mu$ M CsA a calcineurin enzimaktivitását mintegy 25 %-ban gátolta (16 ábra), ugyanakkor a sejtek életképességében és a sejtszámban nem okozott szignifikáns változást (a kezeletlen kontroll százalékában kifejezett sejtszám  $86 \pm 2$  %, az életképesség  $83 \pm 6$  % volt a CsA kezelést követően).

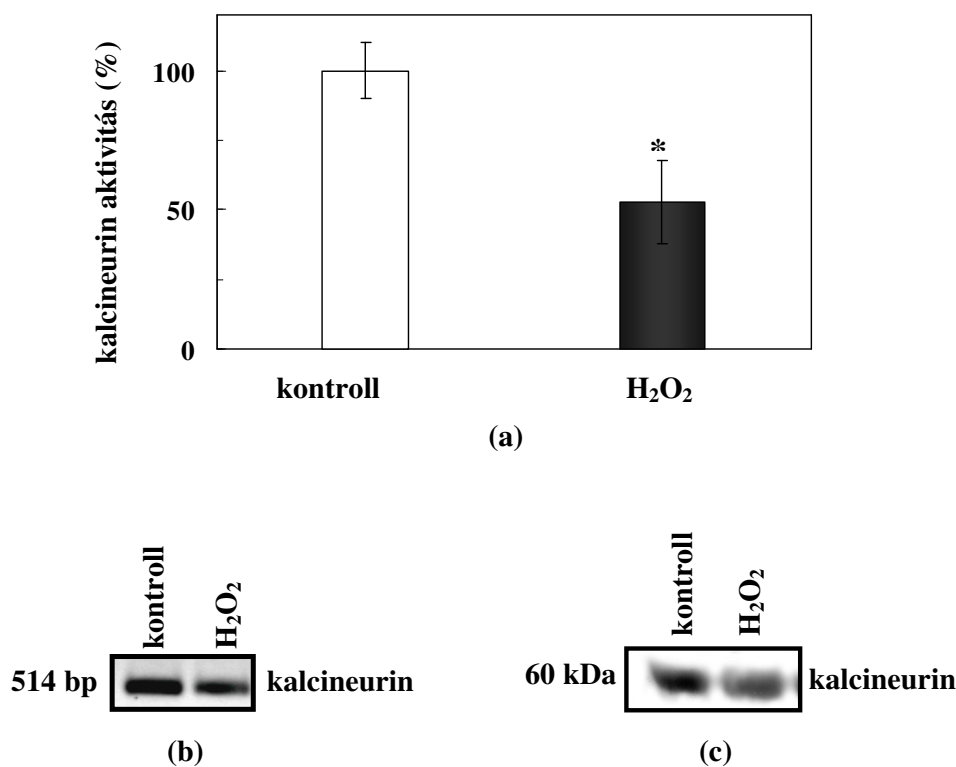


### 16. ábra. A CsA hatása a porcosodó kultúrák calcineurin aktivitására

A porcsejt kultúrák kezelését a 15. ábránál leírt módon végeztük. A három napos sejt kultúrákból mért calcineurin aktivitások négy független kísérlet átlagát  $\pm$  SD mutatják be. A CsA-val kezelt mintákban mért calcineurin aktivitás szignifikáns különbséget mutat a kontrollhoz képest (\*  $P < 0,02$ ).

#### 4.1.4. A calcineurin szerepe az oxidatív stressz kondrogenézis gátlásában

Célul tűztük ki, hogy felderítsük, vajon a calcineurinnak szerepe van-e a  $H_2O_2$  által indukált oxidatív stressz kondrogenézis gátlásában, ezért az enzim aktivitásában és expressziós szintjében bekövetkező változásokat vizsgáltuk az oxidatív stressznek kitett porcsejt kultúrákban. A nagy sűrűségű kondrogenikus sejteket 30 percig 1,0 mM  $H_2O_2$ -dal kezeltük a tenyésztés 2. és 3. napján. A 17. ábra mutatja, hogy a calcineurin enzimaktivitása kb. 50 %-kal csökkent és a  $H_2O_2$  visszaszorította a calcineurin transzkripcióját és transzlációját is.

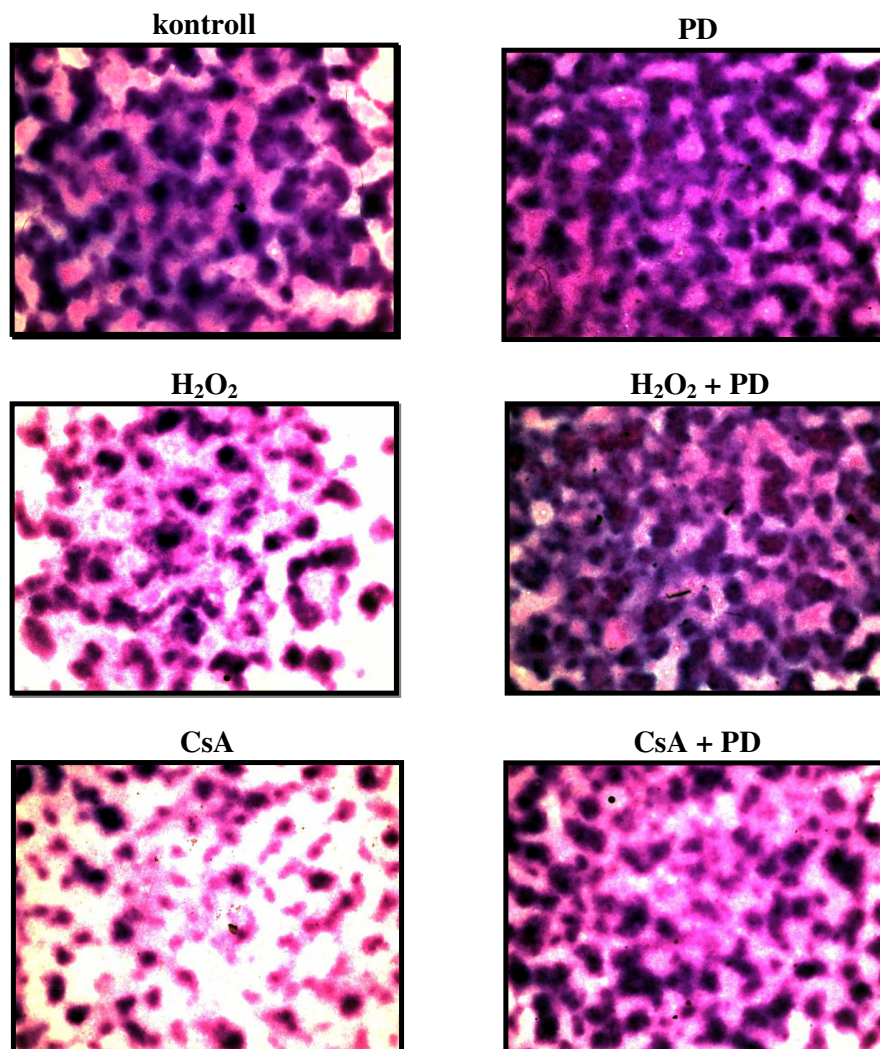


#### 17. ábra. Az oxidatív stressz hatása a calcineurin aktivitására, transzkripciójára és transzlációjára

A kultúrákat a tenyésztés 2. és 3. napján 30 percig kezeltük  $H_2O_2$ -vel. Az enzimaktivitás méréshez (a) az RT-PCR (b) és a Western-blot (c) analízishez három napos sejt kultúrákat használtunk. A három napos sejt kultúrákból mért calcineurin aktivitások négy független kísérlet átlagát  $\pm$  SD mutatják be. A  $H_2O_2$ -vel kezelt mintákban mért calcineurin aktivitás szignifikáns különbséget mutat a kontrollhoz képest (\*  $P < 0,02$ ). Valamennyi RT-PCR és Western-blot 3-4 független kísérlet jellemző eredményét mutatja be.

#### 4.1.5. A MAPK/Erk1/2 jelpálya szerepe a kondrogenézisben

Ismeretes, hogy a MAPK útvonalak egyes elemei feltételezett mediátorai lehetnek az oxidatív stressznek és az Erk1/2 negatív regulátora a kondrogenézisnek [85]. Az Erk1/2 sejtporcszűrő gátlószerének (PD098059 inhibitor) hatását tanulmányoztuk a porc képződésre (18. ábra).



**18. ábra. CsA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és PD098059 (PD) hatása porcosodó kultúrákra**

A metakromáziásan festődő porcterületek a hat napos kolóniákban. A kultúrákat a tenyésztés 2. és 3. napján 30 percig kezeltük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel, ill. 4 óráig CsA-val. A kísérleti csoportnak megfelelően a kolóniákat PD098059, Erk1/2 inhibitorral folyamatosan kezeltük a tenyésztés 1. napjától.

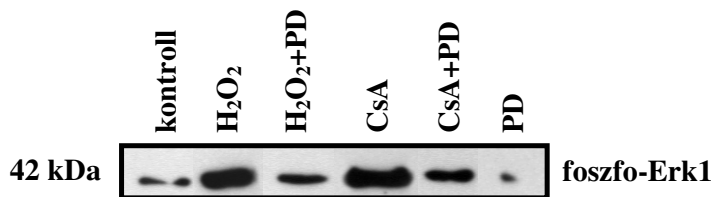
A porctelegek metakromáziás analízise alapján a porcsejtek PD098059 inhibitorral történő kezelése stimulálta a porcmátrix lerakódását és csökkentette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ill. a CsA hatására bekövetkező porcmátrix depléciót (18. ábra és 5. táblázat). A porcképződés mértéke függ a sejtszámtól, így a porcterületek relatív nagyságát a hat napos kultúrák sejtszámára normalizáltuk.

**5.táblázat. CsA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és PD098059 hatása porcosodó kultúrákra**

A számok négy független kísérletből számolt porcterület relatív nagyságát (valamennyi kísérleti csoport esetén tíz mérés átlaga) jelzik, amit a hat napos kultúrák sejtszámára normalizáltunk.

	kontroll	PD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PD+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CsA	PD+CsA
<b>porcterület nagysága (%)</b>	100	125	62	186	18	94

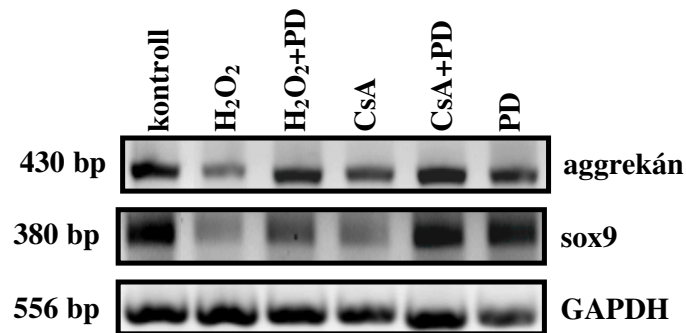
Megfigyeltük, hogy az Erk1/2 gátlása fokozta a porc képződését és visszaszorította az oxidatív stressz, ill. a CsA porcképződésre kifejtett gátló hatását. Tanulmányozni kívántuk az Erk1/2 aktivitásának változását H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezelt kultúrákban is. Mivel az Erk1/2 aktivitását foszforilációja szabályozza, így foszforilációs szintjének változását difoszforilált Erk1/2 ellen termeltetett antitesttel vizsgáltuk. Három napos porcsejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelését követően jelentősen fokozódott az Erk1 Thr és Tyr foszforilációja. Az oxidatív stressz megemelte a kináz foszforilációs szintjét. Megfigyeltük azt is, hogy a kalcineurin gátlása CsA-val szintén fokozta a kettősen foszforilált Erk1 mennyiségét (19. ábra).



**19. ábra. A CsA és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása porcosodó kultúrák Erk1/2 MAPK aktivitására PD098059 távollétében és jelenlétében**

A foszfo-Erk1 Western blotja. A mintákat három napos sejt kultúrákból állítottuk elő. A blot 3-4 független kísérlet jellemző eredményét reprezentálja.

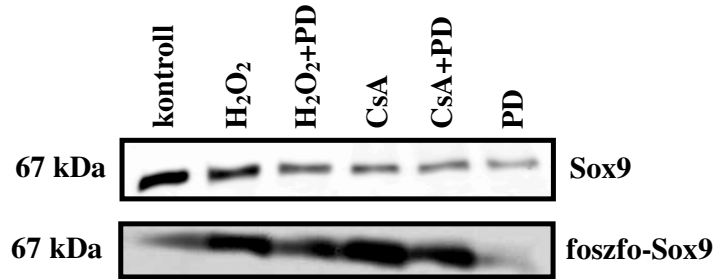
A PD098059 MEK inhibitor visszaszorította az Erk1 foszforilációját. A PD098059 kezelés a CsA- és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelést követően is csökkentette az Erk1 foszforilációját. Vizsgáltuk, hogyan befolyásolta az Erk1/2 gátlószer a porcdifferenciációban kulcsszerepet játszó Sox9 transzkripciós faktor mRNS-szintjét, valamint a porc mátrix egyik fő komponensének, az aggregánnak a transzkripcióját oxidatív stressz és CsA kezelést követően is. Megfigyeltük, hogy a PD098059 részben megakadályozta mind a Sox9 transzkripciós faktor, mind az aggregán mRNS szintjének csökkenését. (20. ábra).



**20. ábra. Az Erk1/2 gátlásának hatása a CsA-val és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezelt porcsejtek fő markereinek mRNS szintjére**

A calcineurin, az aggregán és a Sox9 mRNS szintjének RT-PCR analízise a három napos porcsejt kultúrákban. A porcsejtek kezelését a 18. ábránál leírt módon végeztük. Valamennyi RT-PCR 3-4 független kísérlet jellemző eredményét mutatja be.

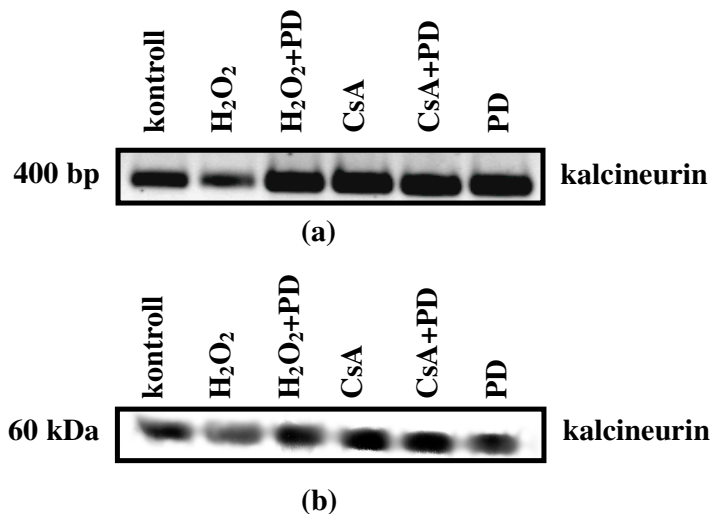
Ismeretes, hogy a Sox9 mRNS- és fehérjeszintjét a kondrogenézis markerének tekintik [67,68,120], továbbá a Sox9 transzkripciós aktivitását foszforilációja fokozza [66]. Kimutattuk, hogy az oxidatív stressz és a CsA kezelés csökkentette a Sox9 mRNS szintjét (8. és 15. ábrák). A Sox9 fehérje mennyiségében hasonló változást figyeltünk meg a kezeléseket követően (21. ábra). Ugyanakkor a Sox9 foszforilációs szintjének emelkedése volt detektálható mind az oxidatív stressz, mind a CsA-kezelés hatására a három napos csirkeporc kultúrákban. Az Erk1/2 aktivitásának gátlása PD098059 inhibitorral nagymértékben csökkentette a Sox9 foszforilációját és fehérjemennyiségét is. A PD098059 visszaszorította a Sox9 foszforilációs szintjét a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel és a CsA-val kezelt kultúrákban is (21. ábra).



**21. ábra. A CsA és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása a Sox9 translációjára és aktivitására PD098059 távollétében és jelenlétében**

A Sox9 és a foszfo-Sox9 Western-blotja három napos porcsejt kultúrákból. A porcsejtek kezelését a 18. ábránál leírt módon végeztük. A Western-blot 3-4 független kísérlet jellemző eredményét mutatja be.

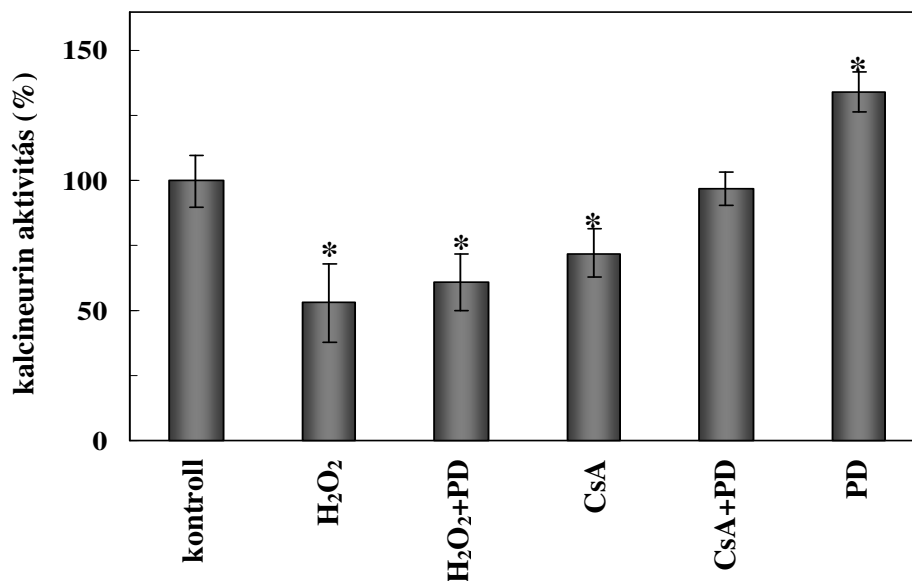
A porcsejtek MEK inhibitorral történő kezelése fokozta a kalcineurin transzkripcióját, de a fehérjemennyiséget nem befolyásolta a három napos sejt kultúrákban. PD098059 az oxidatív stressznek kitett porcsejtekben fokozta a kalcineurin mRNS- és fehérjeszintjét, a CsA hatását nem módosította (22. ábra).



**22. ábra. A PD098059 hatása a kalcineurin transzkripciójára és translációjára**

A Sox9 (a) és a foszfo-Sox9 (b) Western-blotja három napos porcsejt kultúrákból. A porcsejtek kezelését a 18. ábránál leírt módon végeztük. A Western-blot 3-4 független kísérlet jellemző eredményét mutatja be.

Vizsgáltuk a MEK/Erk1/2 jelpálya gátlását a kalcineurin aktivitására is. Megfigyeltük, hogy a PD098059 kezelés szignifikánsan fokozta az enzim aktivitását a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Nem volt számottevő különbség a CsA-nak, ill. az oxidatív stressznek kitett sejtek enzimaktivitásában PD098059 kezeléssel (23. ábra).



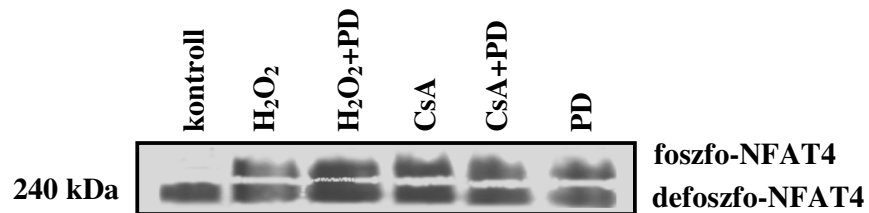
**23. ábra. A PD098059 hatása a CsA-val és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása porcosodó kultúrák kalcineurin aktivitására távollétében és jelenlétében**

A porcsejt kultúrák kezelését a 18. ábránál leírt módon végeztük. A három napos sejt kultúrákból mért kalcineurin aktivitások négy független kísérlet átlagát  $\pm$  SD mutatják be. A kalcineurin aktivitások szignifikáns különbséget mutatnak a kontrollhoz képest (\*  $P < 0,02$ ) valamennyi kísérleti csoportban, kivétel a CsA+PD kezelés.

#### **4.1.6. Az NFAT4 expressziós és a foszforilációs szintjének változása az oxidatív stressz és a CsA kezelés hatására**

Az NFAT család transzkripciós faktorai a kalcineurin aktiválás intracelluláris hatásainak fő mediátorai. Az NFAT3 és NFAT4 transzkripciós faktorokról ismert, hogy a korai differenciációs folyamatokban fontos szerepet játszanak [121]. Az NFAT4-ről azt feltételezik, hogy a BMP2-n keresztül stimulálja a kondrogenézist [15]. Kísérleti

rendszerünkben, az NFAT4 foszforilációját figyeltük meg valamennyi kezelést követően (24. ábra), de nem találtunk különbséget a foszforilációs szintek között. Ismert, hogy a transzkripciós faktor nyugvó sejtekben alap foszforilációs szinttel rendelkezik [9], ennek ellenére a kezeletlen kontrollban nem detektáltuk az NFAT4 foszforilált formáját.



**24. ábra. CsA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és PD098059 hatása az NFAT4 transzkripciós faktor foszfo és defoszfo formáira**

Az NFAT4 Western blotja. A három napos porcsejt kultúrák kezelését a 18. ábránál leírt módon végeztük. A blot 3-4 független kísérlet jellemző eredményét mutatja be.

## 4.2. A PKC izoenzimek szerepe a kalcineurin szabályozásában forbol-észterrel és Ca-ionoforral stimulált humán mononukleáris sejtekben

Munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy mind az egészséges donoroktól, mind a SLE-s betegektől származó perifériás mononukleáris sejtekben mért kalcineurin aktivitás csökkent az 5  $\mu\text{M}$  Ca-ionofor és 80 nM PMA együttes kezelés hatására [55]. Vizsgálni kívántuk, hogy a kalcineurin aktivitás csökkenés a Ca-ionofor és/vagy a PMA kezelés következménye-e? Ismert, hogy a PMA a klasszikus és az új típusú PKC izoenzimeket aktiválja, míg a  $\text{Ca}^{2+}$  csak a klasszikus izoenzimek aktivitását indukálja [46,47]. Ezeket figyelembe véve sejtpemeábilis, specifikus PKC inhibitorok alkalmazásával tanulmányoztuk a kalcineurin szabályozásában résztvevő PKC izoenzimeket.

### 4.2.1. A kezelések hatása a sejtek életképességére

Vizsgáltuk a kezelések (5  $\mu\text{M}$  Ca-ionofor és/vagy 80 nM PMA, valamint PKC inhibitorok: 1  $\mu\text{M}$  GF109203X, 0,2  $\mu\text{M}$  Gö6976 és 10  $\mu\text{M}$  Rottlerin) hatását a sejtek életképességére. A PKC stimuláló szereknek nem volt szignifikáns hatása a kezelt mintákban mért abszolút fluoreszcens egység (AFU) értékekre a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (6. táblázat).

#### 6. táblázat. Mononukleáris sejtek életképességének vizsgálata a kezeléseket követően

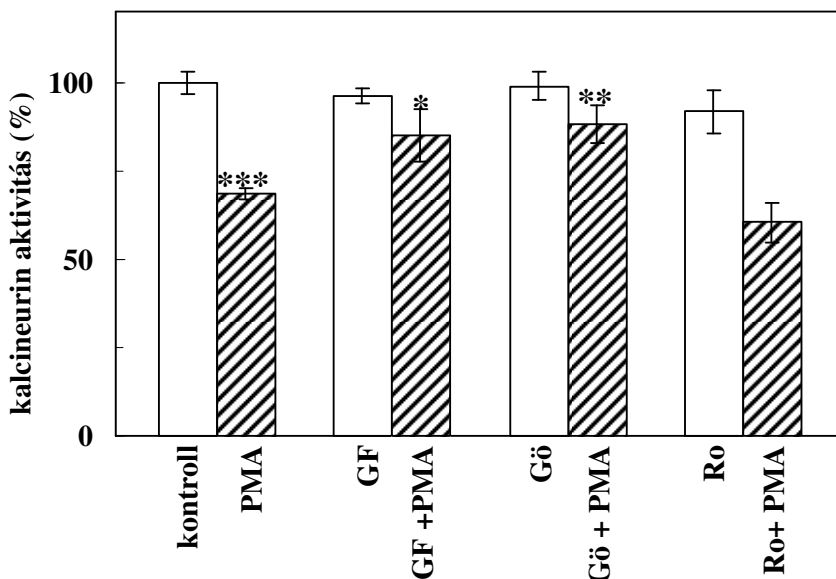
A 3-4 független kísérlet eredményéből átlagolt AFU értékek  $\pm$  SD.

kezelés	kontroll	5 $\mu\text{M}$ Ca-ionofor	80 nM PMA	80 nM PMA + 5 $\mu\text{M}$ Ca-ionofor
AFU $\pm$ SD	3434 $\pm$ 321	3250 $\pm$ 414	3688 $\pm$ 395	3512 $\pm$ 219

A PKC izoenzimeket gátló inhibitoroknak (1  $\mu\text{M}$  GF109203X: GF, 0,2  $\mu\text{M}$  Gö6976: Gö, 10  $\mu\text{M}$  Rottlerin: Ro) nem volt hatása a sejtek életképességére a PKC aktiváló szerek távollétében és jelenlétében sem (nem dokumentáltuk). Mivel a PKC aktiváló és gátlószerek esetén alkalmazott koncentrációk nem voltak citotoxikusak, így a további kísérleteinkben ezeket a koncentrációkat alkalmaztuk.

#### 4.2.2. A különböző PKC izoenzim-specifikus inhibitorok hatása a PMA és a Ca-inofor által stimulált humán perifériás vér mononukleáris sejtek kalcineurin aktivitására

A nem stimulált perifériás mononukleáris sejteket különböző sejtpemeabilis és specifikus PKC inhibitorokkal (1  $\mu\text{M}$  GF109203X, a klasszikus és az új típusú, 0,2  $\mu\text{M}$  Gö6976, a klasszikus és 10  $\mu\text{M}$  Rottlerin, a  $\delta$  PKC izoenzimek gátlószerével) kezeltük 5 órán át. Megfigyeltük, hogy egyik PKC inhibitornak sem volt szignifikáns hatása a kalcineurin alap foszfatáz aktivitására. A PMA hatásának tanulmányozására a sejteket 4 órán keresztül stimuláltuk 80 nM koncentrációt használva. A sejtek kezelése után mért kalcineurin aktivitása mintegy 30%-kal csökkent a nem stimulált kontrollhoz viszonyítva, melynek aktivitását 100%-nak tekintettük (25. ábra).

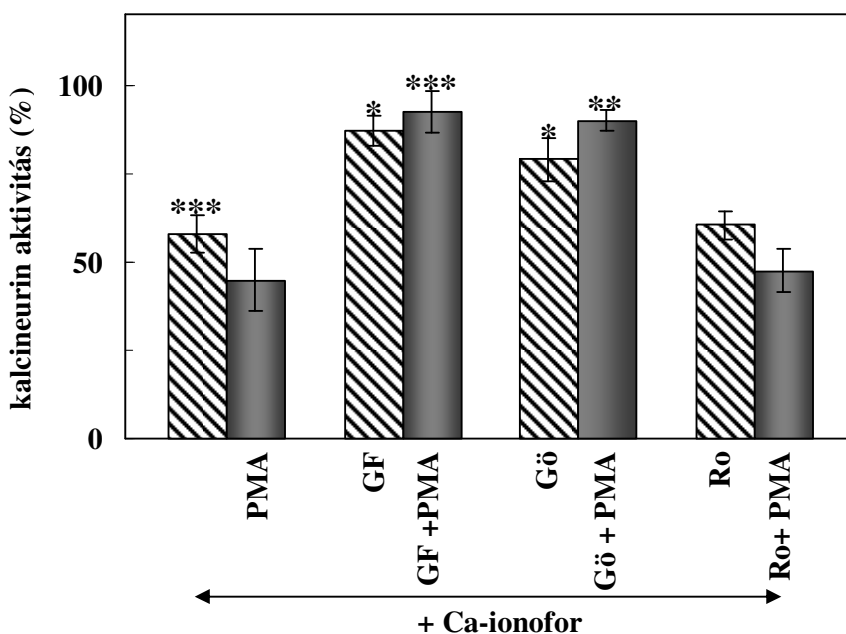


25. ábra. Kalcineurin aktivitása humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben PKC aktiválószeres és inhibitorok jelenlétében

PKC inhibitorok hatása (1  $\mu\text{M}$  GF, 0,2  $\mu\text{M}$  Gö, 10  $\mu\text{M}$  Ro) a kalcineurin aktivitására 80 nM PMA távollétében (üres oszlopok) és jelenlétében (rovátkázott oszlopok). A PMA-val stimulált humán perifériás vér mononukleáris sejtekben mért kalcineurin aktivitást a nem stimulált kontrollhoz viszonyítottuk, míg a PKC inhibitorok hatását a foszfatáz aktivitására a nem stimulált és a PMA-val kezelt sejtek kalcineurin aktivitásához viszonyítva értékeltük. Az adatok 4-6 független kísérlet átlagát  $\pm$  SEM mutatják be. A \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), és \*\*\* ( $P < 0,001$ ) a szignifikáns változásokat jelentik.

Mind a klasszikus és az új típusú PKC izoenzimeket gátló GF109203X, mind a klasszikus PKC izoenzimek inhibitora, a Gö6976 kis mértékben visszaszorította a kalcineurin enzimaktivitásának csökkenését (68 %-ról 85 %-ra ill. 88 %-ra), ugyanakkor Rottlerin jelenlétében az aktivitás-csökkenés változatlan maradt a stimulált sejtekben (25. ábra). Ezek az adatok azt sugallják, hogy egyes PKC izoenzimeknek szerepük lehet a kalcineurin enzimaktivitásának gátlásában stimulált perifériás vér mononukleáris sejtekben.

A Ca-ionofor jelentősebb csökkenést (56 %) eredményezett (26. ábra) a kalcineurin aktivitásában a kezelést követően és a gátlás nagyobb mértékű, mint a PMA által okozott gátlás (ld. 25. ábra).



**26. ábra. Kalcineurin aktivitása humán perifériás vér mononukleáris sejtekben PKC aktiválószer és inhibitorok jelenlétében**

A sejteket 5  $\mu$ M Ca-ionoforral kezeltük 80 nM PMA távollétében (rovátkázott oszlopok) és jelenlétében (szürke oszlopok). A PKC inhibitorokat a 25. ábránál leírt koncentrációban használtuk. A Ca-ionoforral stimulált sejtekben mért kalcineurin aktivitást a nem stimulált kontrollhoz viszonyítottuk, míg a Ca-ionoforral és a PMA-val kezelt sejtek kalcineurin aktivitását a Ca-ionoforral stimulált sejtek enzim aktivitásához. A PKC inhibitorok hatását a foszfatáz aktivitására a Ca-ionoforral kezelt sejtek kalcineurin aktivitásához viszonyítva értékeltük PMA távollétében és jelenlétében. Az adatok 4-6 független kísérlet átlagát  $\pm$  SEM mutatják be.

Ez arra utal, hogy az intracelluláris térben megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$ -ion koncentráció is felelős lehet a kalcineurin aktivitásának csökkenéséért. Korábbi megfigyelésünkkel összhangban [55], a PKC aktiváló szerek egyidejű alkalmazásakor a foszfatáz aktivitása mintegy 60 %-kal csökkent a nem stimulált kontroll kalcineurin aktivitásához viszonyítva, azonban nem volt szignifikáns különbség a Ca-ionoforral kezelt sejtek enzimaktivitásához viszonyítva (26. ábra).

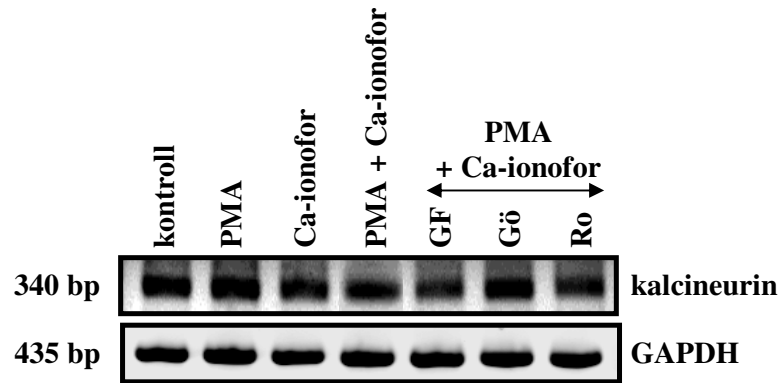
A PKC inhibitorok, a GF109203X ill. a Gö6976, kb. azonos mértékben fokozták a foszfatáz aktivitását a stimulált sejtekben (Ca-ionofor jelenlétében: 58 %-ról 87 %-ra ill. 79 %-ra, Ca-ionofor és PMA jelenlétében: 47 %-ról 92 %-ra ill. 90 %-ra). A PKC $\delta$  specifikus gátlószerének, a Rottlerinnek ebben a rendszerben sem volt észrevehető hatása (26. ábra).

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 enzimaktivitásában bekövetkező gátlást, így feltételezhetjük, hogy elsősorban a cPKC  $\alpha$ ,  $\beta$  vagy  $\gamma$  izoenzimek játszanak szerepet a PMA és/vagy a Ca-ionofor indukálta változásokban.

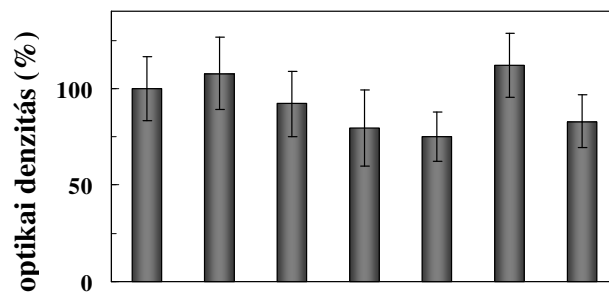
#### **4.2.3. A kalcineurin mRNS és fehérje szintjének változása humán perifériás vér mononukleáris sejtekben**

RT-PCR és Western-blot kísérleteket végezve arra kerestük a választ, hogy a kalcineurin mRNS-, ill. fehérjeszintjének változása hozzájárul-e a kalcineurin aktivitásának csökkenéséhez kezelt mononukleáris sejtekben. A kalcineurin enzimaktivitás méréseivel ellentétben azt figyeltük meg, hogy sem a PMA, sem a Ca-ionofor nem befolyásolja a kalcineurin mRNS-, ill. fehérjeszintjét (27. és 28. ábrák). PMA és Ca-ionofor együttes alkalmazásakor a kalcineurin A alegység mRNS-szintje kis mértékben csökkent (20 %) a nem stimulált kontroll kalcineurin mRNS szintjéhez viszonyítva, amit 100 %-nak tekintettünk. Ez a csökkenés nem volt szignifikáns és nem volt észrevehető hatása az enzim fehérje mennyiségére sem. Vizsgálva a három PKC inhibitor hatását PMA és Ca-ionofor jelenlétében, megfigyelhetjük, hogy a Gö6976, a cPKC izoenzimek inhibitora, kismértékben fokozta a kalcineurin mRNS szintjét a nem stimulált sejtekéhez viszonyítva, bár a statisztikai analízis nem mutatott szignifikáns különbséget (27. ábra). Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a PMA-val és a Ca-ionoforral stimulált humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben mért kalcineurin enzimaktivitásának csökkenése

nem a calcineurin transzkripciójában vagy translációjában bekövetkező gátlás következménye.



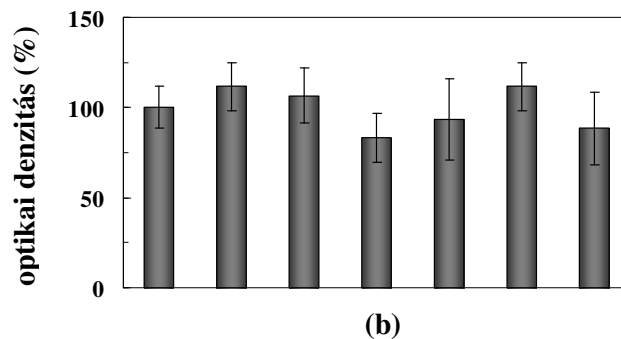
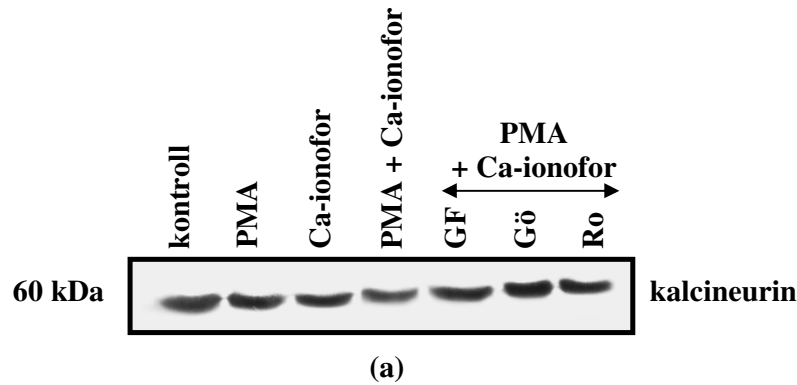
(a)



(b)

**27. ábra. A calcineurin és a GAPDH mRNS szintjének vizsgálata egészséges donorok perifériás vér mononukleáris sejtjeiben RT-PCR technikával**

A calcineurin és a GAPDH RT-PCR analízise PMA-val, Ca-ionoforral és PKC inhibitorral kezelt mononukleáris sejtjeiben (a). A koncentrációk ugyanazok, mint amit a 25. és 26. ábránál adtunk meg. A calcineurin mRNS szintjének optikai denzitása, ami 3-4 független kísérlet átlagát  $\pm$  SEM mutatja be (b). A mérési adatok a kontrollhoz képest nem mutattak szignifikáns különbséget ( $P > 0,05$ ).



**28. ábra. A calcineurin fehérjeszintjének tanulmányozása egészséges donorok perifériás vér mononukleáris sejtjeiben Western-blot technikával**

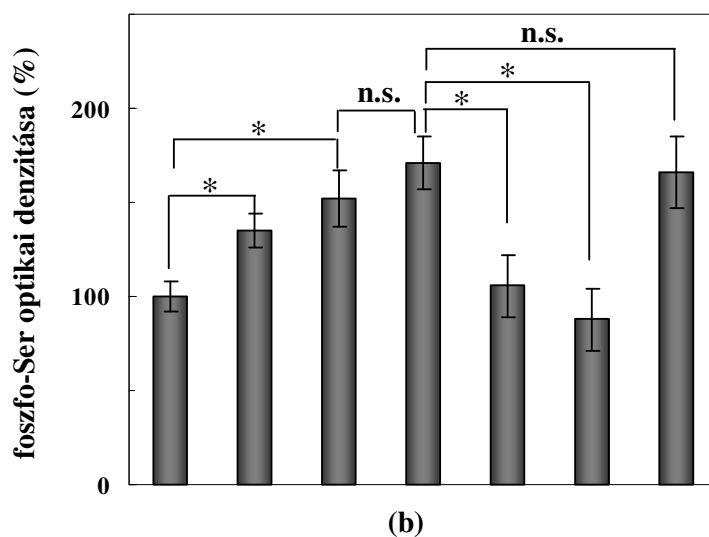
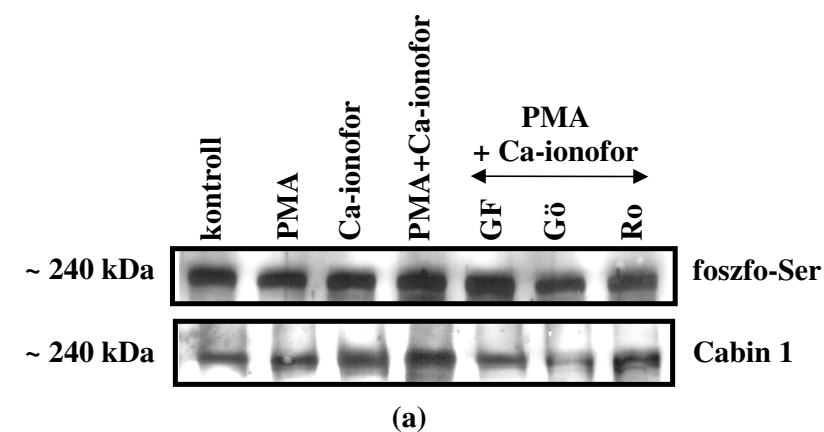
A calcineurin immunoblotja különböző effektorok jelenlétében. A kísérleti körülmények ugyanazok, mint a 20-23. ábra esetén leírtak (a). A calcineurin fehérjeszintjének optikai densitása, ami három független kísérlet átlagos eredményét reprezentálja  $\pm$  SEM értékekkel (b). A mérési adatok a kontrollhoz képest nem mutattak szignifikáns különbséget ( $P > 0,05$ )

**4.2.4. Cabin 1: lehetséges jeltovábbító molekula a PKC és a calcineurin között**

Ismeretes, hogy a calcineurin PKC általi foszforilációja nem befolyásolja az enzim aktivitását [33], ezért feltételeztük, hogy olyan upstream jelátviteli molekula játszhat szerepet a calcineurin aktivitásának gátlásában, amelyet a PKC foszforilál. Korábban kimutatták, hogy a PKC enzim hatására a Cabin 1 hiperfoszforilálódik, ami fokozza calcineurinnal szembeni érzékenységét. A hiperfoszforilált Cabin 1 a calcineurinhoz kötődve gátolja annak foszfatáz aktivitását [36,37].

A Cabin 1 lehetséges jeltovábbító szerepének felderítésére vizsgálni kívántuk foszforilációs szintjének változását a kezelések hatására. Mivel foszfo-Cabin 1 antitest nem

állt rendelkezésre (sem kereskedelmi fogalomban nem kapható, sem közlemények nem utalnak ilyen antitestre), ezért először a Cabin 1-et immunprecipitáltuk poliklonális a-Cabin 1 antitest segítségével. Az immunprecipitáció után a Cabin 1 foszfo-Ser oldalláncát foszfo-Ser antitesttel mutattuk ki. A Cabin 1 foszforilációs szintje jelentősen megemelkedett a PKC aktiváló szerek hatására, amit a PKC inhibitorok (GF109203X és Gö6976) nagymértékben visszaszorítottak. A Rottlerin nem befolyásolta a Cabin 1 foszfo-Ser tartalmát a kezelt sejtekben (29. ábra).



**29. ábra. A Cabin 1 és foszforilációs szintjének Western blot analízise a Cabin 1 immunprecipitációja után**

A Cabin 1 immunoblotja és foszfo-Ser detektálása nem stimulált és stimulált mononukleáris sejtekben PKC inhibitorok távollétében és jelenlétében. Az effektorok koncentrációi azonosak a 25. és 26. ábránál megadott értékekkel (a). A Cabin 1 foszfo-Ser optikai denzitása, ami 3-4 független kísérlet átlagát  $\pm$  SEM reprezentálja. Szignifikáns különbségeket a \* ( $P < 0,05$ ) mutatja (b).

## 5. Megbeszélés

A protein foszfatázok ugyanolyan fontos szerepet töltenek be a sejt és szövet differenciációt reguláló különböző jelátviteli útvonalak fehérjefoszforilációs folyamatainak szabályozásában, mint a protein kinázok. Elengedhetetlenül fontos, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a protein foszfatázok porcképződésben betöltött szerepébe, ami nagymértékben segítheti a kondrogenikus fenotípus fenntartásának és a káros porc újraképződés intracelluláris hátterének megértését. Az oxidatív stressz az egyik olyan faktor, ami a gyulladásos megbetegedések során porckárosodást idéz elő [94,95,99]. Ismeretes, hogy a kalcineurin aktivitását a reaktív oxigéngyökök befolyásolják [31]. A kalcineurin számos emlős szervezetben végbemenő jelátviteli útvonalban játszik szerepet, pl. a T-limfociták aktiválásában [122], a kardiomiociták apoptózisában [80], az érképződés szabályozásában, a miogenezisben [123].

A kalcineurin fehérje jelenlétét és aktivitását igazoltuk csirkeporc kultúrákban. Az enzim pozitív szerepét feltételezzük az *in vitro* kondrogenézis szabályozásában, mivel megfigyeltük, hogy a kalcineurin inhibitor CsA gátolta a porc képződését. Eredményeink összhangban vannak Tomita és mtsai megfigyelésével [15]: a CsA gátolta a porcképződést embrionális egér végtagtelepekből izolált kondrogenikus sejtekben. Igazoltuk, hogy az oxidatív stressz a kalcineurint gátolva csökkentette a porcképződést. Feltételezik, hogy a kalcineurin az NFAT4/BMP útvonalon keresztül szabályozhatja a kondrogenézist [15]. Kísérleteinkben a hidrogén-peroxid és a CsA kezeléseket követően kimutattuk az NFAT4 foszforilált formáját, kezeletlen sejtekben foszforilált NFAT4-t nem detektáltunk. A kalcineurin aktivitását módosító kezelések (CsA és hidrogén-peroxid) alátámasztják az NFAT4 foszforiláció szabályozó szerepét csirkeporc kultúrákban. Mivel a foszforilált NFAT4 szintje azonos volt a kezelt kolóniákban, felmerült annak a lehetősége, hogy a kalcineurin más targetmolekulái is részt vállalnak a hatások közvetítésében. Több adat utal arra, hogy a kalcineurin szerepet játszhat MAP kinázok aktivitásának szabályozásában is [80,81]. A MAP kinázok különböző celluláris funkciókat, köztük a differenciációs folyamatokat is regulálják [75]. Ismeretes, hogy az Erk1/2 a kondrogenézis negatív regulátora [85] és a MAP kinázok részt vesznek a hidrogén-peroxiddal kiváltott oszteoblasztos differenciáció gátlásában [124].

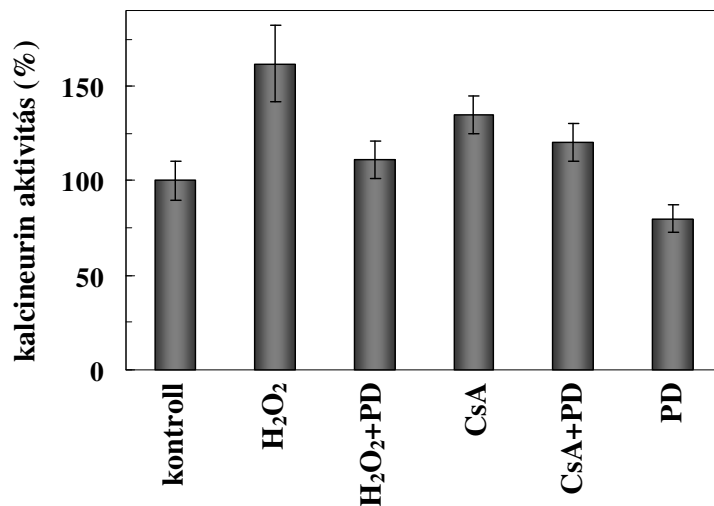
A Sox9 kondrogenikus transzkripciós faktor iniciálja és stimulálja a porcmátrix-specifikus makromolekulák, pl. a II-típusú kollagén és az aggregán gének fokozott

expresszióját [68,69]. A Sox9 aktivitása és transzkripció hatásfoka foszforilációval fokozódik [66]. Kísérleti rendszerünkben fokozott porcképződést figyeltünk meg a PD098059 MEK/Erk1/2 inhibitor jelenlétében, ezzel párhuzamosan a Sox9 mRNS és fehérje mennyiségében kismértékű csökkenést tapasztaltunk. A Sox9 foszforilált formájának relatív mennyisége is csökkent a kezelések hatására. Feltételezzük, hogy az Erk1/2 gátlása a kondrogenézist fokozó PD098059 inhibitorral, olyan downstream target molekulákra is kihat, amelyek elősegítik a porcképződést. Ezt a feltételezést több olyan adat támasztja alá, amelyek az Erk szerepére utalnak a Sox9 regulációjában. Bobick és Kulyk [86] csirkeporc kultúrákban kimutatták, hogy az Erk1/2 MAP kináz a kondrogenézis és a Sox9 negatív regulátora. Murakami és mtsai [74] a Sox9 Erk1/2-mediált FGF általi up-regulációt írták le C3H10T egér embrionális mezenchymális sejtvonalban.

Eredményeink alapján nem vetjük el annak a lehetőségét sem, hogy az Erk1/2 közvetlenül foszforilálja a Sox9 transzkripció faktort. Érdekes megfigyelésünk volt, hogy a Sox9 foszforilációja megemelkedett mind a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mind a CsA kezelést követően, ami a kalcineurin lehetséges szerepére utal a Sox9 defoszforilációjában. Kimutattuk azt is, hogy a defoszforilált Sox9 mRNS- és fehérjeszintje csökkent az oxidatív stressz és a CsA kezelés után, s ezzel összhangban a porcképződés mértéke visszaszorult. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel és CsA-val kezelt csirkeporc sejtekben a foszfo-Erk1/2 aktivitása megemelkedett, és az Erk1/2 gátlása PD098059 inhibitorral részben kivédte a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vagy CsA által okozott porckárosodást. A Sox9 foszforilációs szintje magasabb volt a PD098059 inhibitor jelenlétében, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel és a CsA-val kezelt mintákhoz vagy a kontroll kultúrákhoz viszonyítva.

Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy a fokozott Erk1 aktivitás az oka a csökkent porcképződésnek az oxidatív stresszt követően, továbbá a kalcineurin negatív hatást fejt ki az Erk1 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 kezelés után (30. ábra).

Ismeretes, hogy a PKA a kondrogenézis pozitív regulátora csirkeporc sejtekben [73,125], valamint a PKA fokozza a Sox9 transzkripció aktivitását [66]. A kalcineurinnak és a PKA-nak van egy közös horgony fehérjéje (AKAP79), amely a megfelelő

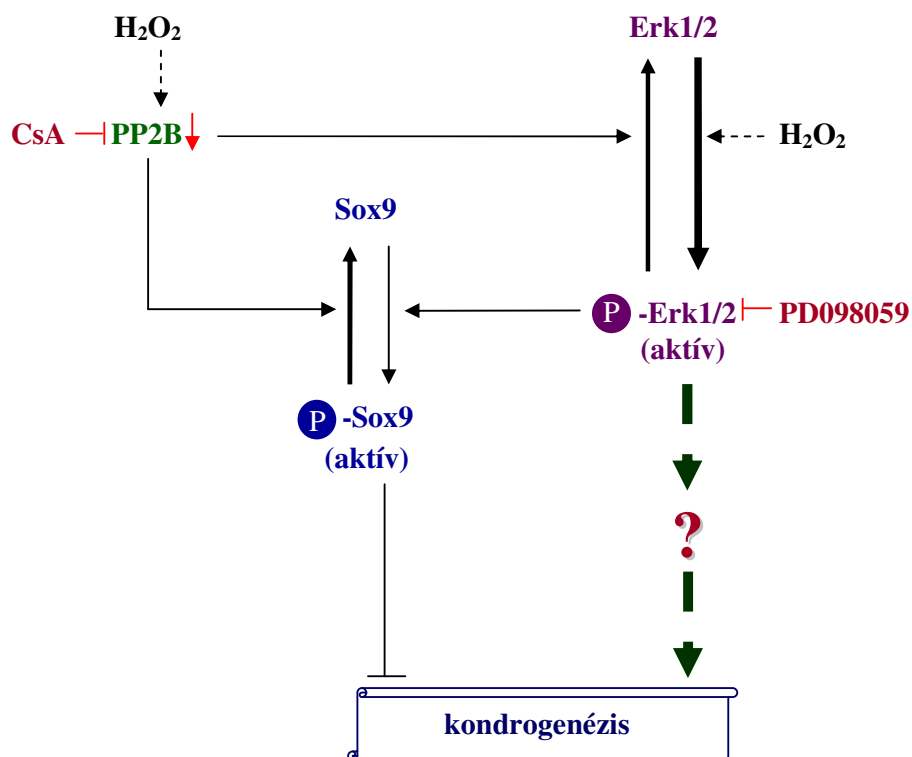


**30. ábra. A CsA és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása a porcosodó kultúrák PKA aktivitására PD098059 távollétében és jelenlétében**

A porcsejt kultúrák kezelését a 18. ábránál leírt módon végeztük.

szubcelluláris kompartmentekbe irányítja a partnereket [126], a két enzim szoros együttműködésére utalva a különböző intracelluláris folyamatokban. Felmerült a két enzim egymásra kifejtett regulációs hatásának a lehetősége is, ugyanis mindkét enzimet foszforiláció szabályozza [33,127].

Az eredményeink a calcineurin pozitív szerepét sugallják csirkeporc sejtek kondrogenézisében. Feltételezzük, hogy az oxidatív stressz során a csökkent aktivitású calcineurin és a fokozott aktivitású Erk1/2 az oxidatív stressz kondrogenézist gátló hatásának a mediátorai. A calcineurinnak negatív regulátor szerepet is javasolunk az Erk1/2 útvonalban és/vagy a Sox9 foszforilációjában. Adataink az Erk1/2 útvonal pozitív szerepét is alátámasztják a Sox9 foszforilációjában, de az oxidatív stressz során más Erk1/2 aktivált faktor(ok) a Sox9 ezen pozitív hatása ellen hatnak a kondrogenézisben (31. ábra).



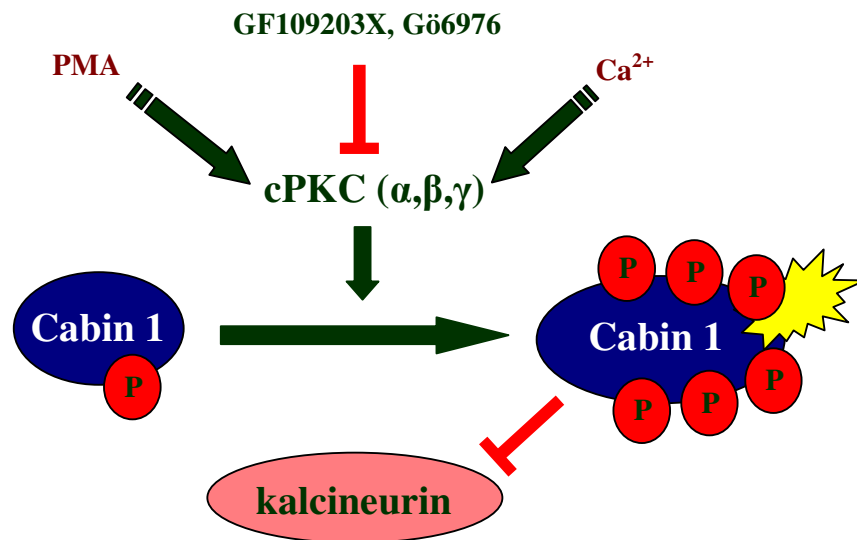
**31. ábra. Feltételezett mechanizmus az oxidatív stressznek kitett kondrogenikus sejtek jelátviteli folyamatában**

Másik kísérleti rendszerünkben kimutattuk, hogy mind a PMA, mind az intracelluláris térben megnövekedett Ca<sup>2+</sup>-koncentráció hozzájárul a kalcineurin aktivitásának csökkenéséhez humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben anélkül, hogy befolyásolná a kalcineurin mRNS- és fehérjeszintjét. Megfigyeltük, hogy az enzimaktivitás-csökkenés érzékenyebb volt a Ca-ionofor jelenlétében, mint a PMA kezelésre. Specifikus, sejtpermeábilis PKC inhibitorok alkalmazásával vizsgáltuk a PKC izoenzimek lehetséges szerepét. Eredményeink szerint a PKC izoenzimek fontos szerepet játszanak a kalcineurin aktivitásában bekövetkező gátlás kialakulásában a PMA és Ca-ionofor kezelésekkkel stimulált mononukleáris sejtekben. A cPKC és az nPKC izoenzimeket gátló GF109203X, valamint a cPKC izoenzimeket gátló Gö6976 közel azonos mértékben fokozta a kalcineurin aktivitását, amikor a sejteket a PKC aktiváló szerekkel, PMA-val és Ca-ionoforral külön-külön vagy együtt kezeltük. Mivel Gö6976

egyedül is képes volt a gátló hatást kivédeni, feltételezzük, hogy elsősorban a cPKC (PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) izoenzimek felelősek a kalcineurin enzimaktivitásában bekövetkező csökkenésért.

Meg kell jegyeznünk, hogy a kalcineurin aktivitása csökkent a Ca-ionofor által kiváltott intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció emelkedésére, ami azért érdekes, mert a kalcineurin maga is a kalciumjel egyik átalakító molekulája [1,2,66-68]. Ez azzal magyarázható, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között a  $\text{Ca}^{2+}$ -ra érzékeny cPKC izoenzimek is részt vesznek a kalciumjel továbbításában, ami a foszfatáz aktivitásának gátlásához vezet. A Ca-ionofor kezelés hatására a cPKC izoenzimek jelátvitelére dominánsabb, mint a kalciumjel kalcineurin foszfatáz aktivitására kifejtett hatása.

A Gö6976 egyedül is csökkentette a kalcineurin enzimaktivitásában bekövetkező gátlást a PKC izoenzimek stimulálása után, ezért felmerült, hogy a cPKC izoenzimek közvetlenül a kalcineurin foszforilációjával gátolhatják a foszfatáz aktivitást. Korábban azonban kimutatták, hogy a kalcineurin PKC általi foszforilációja nem befolyásolja a foszfatáz aktivitását *in vitro* [5,6]. Ezért feltételeztük, hogy a kalcineurin olyan upstream jelátviteli molekulája játszhat szerepet az aktiváló szerek által kiváltott gátlás kialakításában, amelyet a PKC aktivál. A kalcineurin néhány endogén eredetű inhibitora közül a Cabin 1 hiperfoszforilálódik PKC aktiválásra, ami fokozza a kalcineurinnal szembeni érzékenységét, az enzimhez kötődve pedig gátolja annak aktivitását. A hiperfoszforilált Cabin 1 továbbíthatja a  $\text{Ca}^{2+}$ /PKC jelet a kalcineurin felé, ami a foszfatáz aktivitásának csökkenését eredményezheti a T-sejt aktiváció folyamán [7-9]. Eredményeink szerint a Cabin 1 lehet az egyik olyan jelátviteli molekula, amelyik a PKC jelet a kalcineurin irányába továbbítja, mivel a Cabin 1 fokozott foszforilációját igazoltuk PKC aktiváló szerek hatására. A Cabin 1 foszforilációs szintjének emelkedése GF109203X és Gö6976 (cPKC és nPKC inhibitorok) jelenlétében jelentős mértékben visszaszorult (32. ábra).



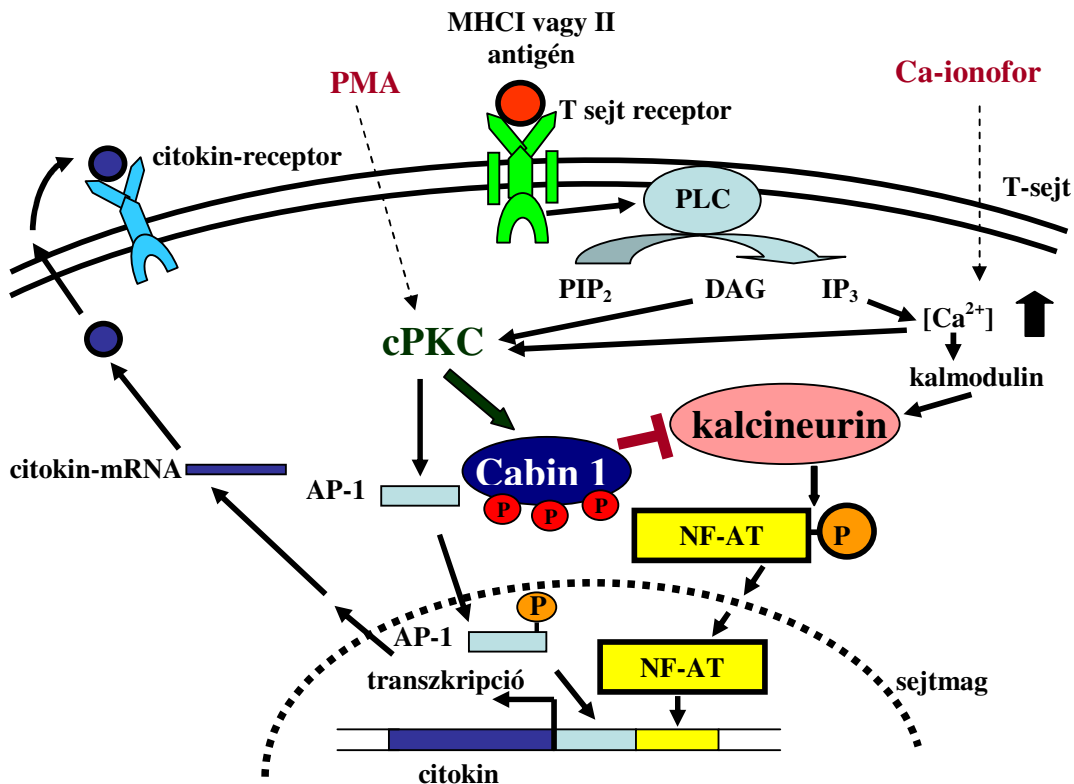
**32. ábra.** A calcineurin aktivitásának lehetséges szabályozása a Cabin 1 foszforilációs szintjének módosításával (PKC aktiváló és gátló szerek hatása)

Kimutatták, hogy a Cabin 1 és a calcineurin kölcsönhatásához a kalciumjel és a PKC aktiválás egyaránt szükséges. Jurkat sejtek PMA kezelése a Cabin 1 hiperfoszforilációjához vezet, míg az ionomicin nem befolyásolja ezen fehérje foszforilációs szintjét [36,37]. Ezzel szemben mi nem tapasztaltuk a calcineurin enzimaktivitásának csökkenését PMA-val és Ca-ionoforral stimulált Jurkat sejtekből előállított kivonatban (nem bemutatott eredményünk). Az ellentmondás egyik lehetséges magyarázata az, hogy a sejt kivonat szükségszerű hígítása az aktivitásmérésben felszámolta a Cabin 1 és calcineurin közötti asszociációt.

Felmerülhet a CaM-kináz II szerepe a calcineurin aktivitásának gátlásában, mivel Hashimoto és mtsai kimutatták, hogy PKC aktiválásra a kalciummentes, autofoszforilált CaM-kináz II a calcineurin Ser-197 és Ser-203 oldalláncainak foszforilációját katalizálja, gátolva az enzim aktivitását *in vitro* [5,6]. Ez a foszforiláció magas Ca<sup>2+</sup>-koncentráció mellett nem játszódik le [69], ezért az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a CaM-kináz II esetleges gátló hatása a calcineurin aktivitására kizárható.

Az SLE T-sejtekben számos jelátviteli molekula (pl. az elf1 transzkripciós faktor, a gyulladásban fontos szerepet játszó jelátvivő NF- $\kappa$ B és PKC $\theta$ ) rendellenes működését írták le. Kimutatták, hogy a glükokortikoszteroiddal kezelt egészséges és lupus T-sejtekben a calcineurin aktivitása csökkent és a legtöbb PKC izoenzim expressziós szintje közel normál szintre emelkedett a kezelést követően [128].

Kísérleteink során bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a hiperfoszforilált Cabin 1 fehérjének jeltovábbító szerepe van a PKC aktivitás emelkedése és a calcineurin aktivitásának csökkenése között egészséges donoroktól származó perifériás vér mononukleáris sejtjeiben is. Ismert, hogy T-sejtekben a calcineurin/NFAT jelátviteli pályáknak fontos szerepe van a proinflammatorikus citokinek (pl. IL2, IL4, IL5, IL8, IL10) indukciójában és a lupus T-sejtekben ezek a citokinek túlermelődnek. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a calcineurin/NFAT útvonal, azaz a proinflammatorikus citokinek overexpressziója a cPKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  izoenzimek által hiperfoszforilált Cabin 1 aktiválásán keresztül visszazsírozható (33. ábra).



33. ábra. cPKC/Cabin 1/kalcineurin/NFAT jelpályák lehetséges összefüggései T-sejtekben

## 6. Összefoglalás

A protein foszfatázok ugyanolyan fontos szerepet töltenek be a differenciációt reguláló különböző fehérje foszforilációs-defoszforilációs folyamatok szabályozásában, mint a protein kinázok. Kimutattuk, hogy a calcineurin jelen van a nagy sűrűségű csirkeporc kultúrákban és megfigyeltük, hogy mRNS szintje és enzimaktivitása fokozatosan csökkent a porcdifferenciáció során. Eredményeink a calcineurin pozitív szerepét sugallják a csirkeporc sejtek kondrogenézisében. Feltételezzük, hogy az oxidatív stressz során a csökkent aktivitású calcineurin és a fokozott aktivitású Erk1/2 az oxidatív stressz kondrogenézist gátló hatásának mediátorai. A calcineurinnak negatív regulátor szerepet javasolunk az Erk1/2 útvonalban és/vagy a Sox9 foszforilációjában. Adataink az Erk1/2 útvonal pozitív szerepét is alátámasztják a Sox9 foszforilációjában, de az oxidatív stressz alatt más Erk1/2 aktivált faktor(ok) a Sox9 ezen pozitív hatása ellen hathat(nak) a kondrogenézis folyamán.

Kimutattuk, hogy mind a PMA, mind az intracelluláris térben megnövekedett  $Ca^{2+}$ -koncentráció hozzájárul a calcineurin aktivitásának csökkenéséhez humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben 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. Mivel Gö6976 egyedül is képes volt a PMA/Ca-ionofor hatását kivédeni, feltételezzük, hogy elsősorban a cPKC (PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) izoenzimek felelősek a calcineurin enzimaktivitásában bekövetkező csökkenésért.

A calcineurin aktivitása csökkent a Ca-ionofor által kiváltott intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció emelkedésére, ami arra utal, hogy a Ca-ionofor kezelés hatására a cPKC izoenzimek jelátvittele sokkal dominánsabb, mint a kalciumjel calcineurin foszfatáz aktivitására kifejtett hatása. Mivel a calcineurin PKC általi foszforilációja nem befolyásolja a foszfatáz aktivitását, ezért a Cabin 1 jeltovábbító szerepét feltételezzük a PKC és a calcineurin jelpályák összekapcsolásában. Kísérleteink során bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a PKC által hiperfoszforilált és aktivált Cabin 1 fehérje részt vesz a cPKC és a calcineurin jelpályák összekapcsolásában egészséges donoroktól származó perifériás vér mononukleáris sejtjeiben.

## 7. Summary

Protein phosphatases play equally important role as protein kinases in the regulation of protein phosphorylation processes of different signal transduction pathways controlling cell and tissue differentiation. We have shown the presence and the active function of calcineurin in micromass cultures and we observed that the mRNA level and the activity of the enzyme gradually decreased during the cartilage differentiation. Our results suggest a positive role of calcineurin in the regulation of *in vitro* chondrogenesis of chicken micromass cultures. We suppose that the reduced activity of calcineurin and the elevated activity of Erk1/2 during oxidative stress are likely mediators of the chondrogenesis inhibiting effect of oxidative stress. We also propose a negative regulatory role of calcineurin either in Erk1/2 pathway and/or in Sox9 phosphorylation. Our data support a positive role of Erk1/2 pathway in Sox9 phosphorylation, but under oxidative stress other Erk-activated factor(s) can oppose this positive effect of Sox9 on chondrogenesis.

We have shown that both PMA- and  $\text{Ca}^{2+}$ -treatments contribute to the decrease of calcineurin activity of T-cell enriched peripheral blood mononuclear cells without modulating the mRNA and protein levels of calcineurin. The calcineurin activity was more sensitive to Ca-ionophore than to the PMA-treatment as the inhibition of the activity was higher for Ca-ionophore. Since Gö6976 was able to reverse the inhibitory effect of PMA and Ca-ionophore applied alone or in combination on the calcineurin activity we suppose that the cPKC (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) isoenzymes can be involved in the inhibition of the enzyme.

The increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced by Ca-ionophore significantly decreased the calcineurin activity. It seems that the reduced activity of calcineurin is more likely related to the activity of cPKC by calcium signal than the direct effect of calcium on calcineurin. Since the phosphorylation of calcineurin by PKC does not influence the phosphatase activity we assume the transducing role of Cabin 1 in the linking of PKC and calcineurin pathways. We provided evidence that the Cabin 1 hyperphosphorylated and activated by PKC takes part in the linking of cPKC and calcineurin pathways in peripheral mononuclear cells from healthy donors.

## 8. Hivatkozások

1. C.B. Klee, T.H. Crouch, M.H. Krinks (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **76**, 6270-6273.
2. M.M. King, C.Y. Huang, P.B. Chock, A.C. Nairn, H.C. Hemmings, Jr., K.F. Chan, P. Greengard (1984). Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *J.Biol.Chem.* **259**, 8080-8083.
3. D. Barford, A.K. Das, M.P. Egloff (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133-164.
4. D. Guerini (1997). Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **235**, 271-275.
5. C.S. Hemenway, J. Heitman (1999). Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem.Biophys.* **30**, 115-151.
6. J. Liu, J.D. Farmer, Jr., W.S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S.L. Schreiber (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.
7. N.A. Clipstone, D.F. Fiorentino, G.R. Crabtree (1994). Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J.Biol.Chem.* **269**, 26431-26437.
8. M.T. Ivery (1999). A proposed molecular model for the interaction of calcineurin with the cyclosporin A-cyclophilin A complex. *Bioorg.Med.Chem.* **7**, 1389-1402.
9. J. Aramburu, A. Rao, C.B. Klee (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr.Top.Cell Regul.* **36**, 237-295.
10. F. Rusnak, P. Mertz (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* **80**, 1483-1521.
11. C.B. Klee, H. Ren, X. Wang (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J.Biol.Chem.* **273**, 13367-13370.
12. P.G. Hogan, L. Chen, J. Nardone, A. Rao (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205-2232.
13. S. Feske, H. Okamura, P.G. Hogan, A. Rao (2003). Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **311**, 1117-1132.
14. T.S. Ingebritsen, P. Cohen (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science.* **221**, 331-338.
15. M. Tomita, M.I. Reinhold, J.D. Molkenin, M.C. Naski (2002). Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J.Biol.Chem.* **277**, 42214-42218.

16. S. Sipka, K. Szucs, S. Szanto, I. Kovacs, G. Lakos, E. Kiss, P. Antal-Szalmas, G. Szegedi, P. Gergely (2001). Glucocorticosteroid dependent decrease in the activity of calcineurin in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann.Rheum.Dis.* **60**, 380-384.
17. P. Cohen, P.T. Cohen (1989). Protein phosphatases come of age. *J.Biol.Chem.* **264**, 21435-21438.
18. D. Guerini, C.B. Klee (1989). Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 9183-9187.
19. A.E. McPartlin, H.M. Barker, P.T. Cohen (1991). Identification of a third alternatively spliced cDNA encoding the catalytic subunit of protein phosphatase 2B beta. *Biochim.Biophys.Acta.* **1088**, 308-310.
20. T. Muramatsu, P.R. Giri, S. Higuchi, R.L. Kincaid (1992). Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **89**, 529-533.
21. L.T. Kakalis, M. Kennedy, R. Sikkink, F. Rusnak, I.M. Armitage (1995). Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *Febs Lett.* **362**, 55-58.
22. K. Ueki, T. Muramatsu, R.L. Kincaid (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **187**, 537-543.
23. C.D. Chang, H. Mukai, T. Kuno, C. Tanaka (1994). cDNA cloning of an alternatively spliced isoform of the regulatory subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin B alpha 2). *Biochim.Biophys.Acta.* **1217**, 174-180.
24. C.R. Kissinger, H.E. Parge, D.R. Knighton, C.T. Lewis, L.A. Pelletier, A. Tempczyk, V.J. Kalish, K.D. Tucker, R.E. Showalter, E.W. Moomaw (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature.* **378**, 641-644.
25. C.B. Klee, G.F. Draetta, M.J. Hubbard (1988). Calcineurin. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* **61**, 149-200.
26. A. Crivici, M. Ikura (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **24**, 85-116.
27. R. Bogumil, D. Namgaladze, D. Schaarschmidt, T. Schmachtel, S. Hellstern, R. Mutzel, V. Ullrich (2000). Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. *Eur.J.Biochem.* **267**, 1407-1415.
28. L. Yu, J. Golbeck, J. Yao, F. Rusnak (1997). Spectroscopic and enzymatic characterization of the active site dinuclear metal center of calcineurin: implications for a mechanistic role. *Biochemistry.* **36**, 10727-10734.

29. X. Wang, V.C. Culotta, C.B. Klee (1996). Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* **383**, 434-437.
30. T.A. Reiter, F. Rusnak (2002). Is calcineurin a peroxide-specific sensor in T-lymphocytes? *J.Biol.Inorg.Chem.* **7**, 823-834.
31. T.A. Reiter, R.T. Abraham, M. Choi, F. Rusnak (1999). Redox regulation of calcineurin in T-lymphocytes. *J.Biol.Inorg.Chem.* **4**, 632-644.
32. A. Ferri, R. Gabbianelli, A. Casciati, E. Paolucci, G. Rotilio, M.T. Carri (2000). Calcineurin activity is regulated both by redox compounds and by mutant familial amyotrophic lateral sclerosis-superoxide dismutase. *J.Neurochem.* **75**, 606-613.
33. Y. Hashimoto, T.R. Soderling (1989). Regulation of calcineurin by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C. *J.Biol.Chem.* **264**, 16524-16529.
34. Y. Hashimoto, M.M. King, T.R. Soderling (1988). Regulatory interactions of calmodulin-binding proteins: phosphorylation of calcineurin by autophosphorylated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 7001-7005.
35. M.M. Lai, P.E. Burnett, H. Wolosker, S. Blackshaw, S.H. Snyder (1998). Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J.Biol.Chem.* **273**, 18325-18331.
36. J.O. Liu (2003). Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **311**, 1103-1109.
37. L. Sun, H.D. Youn, C. Loh, M. Stolow, W. He, J.O. Liu (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*. **8**, 703-711.
38. A. Rao, C. Luo, P.G. Hogan (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 707-747.
39. C. Lopez-Rodriguez, J. Aramburu, A.S. Rakean, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, S. Thomas, C. Disteché, N.A. Jenkins, A. Rao (1999). NF-AT5: the NF-AT family of transcription factors expands in a new direction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 517-526.
40. G.R. Crabtree (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J.Biol.Chem.* **276**, 2313-2316.
41. C.R. Beals, N.A. Clipstone, S.N. Ho, G.R. Crabtree (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.* **11**, 824-834.
42. C.R. Beals, C.M. Sheridan, C.W. Turck, P. Gardner, G.R. Crabtree (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*. **275**, 1930-1934.

43. R.J. Davis (1994). MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem.Sci.* **19**, 470-473.
44. J. Zhu, F. Shibasaki, R. Price, J.C. Guillemot, T. Yano, V. Dotsch, G. Wagner, P. Ferrara, F. McKeon (1998). Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell.* **93**, 851-861.
45. S.J. Swoap, R.B. Hunter, E.J. Stevenson, H.M. Felton, N.V. Kansagra, J.M. Lang, K.A. Esser, S.C. Kandarian (2000). The calcineurin-NFAT pathway and muscle fiber-type gene expression. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **279**, 915-924.
46. B.J. Wilkins, Y.S. Dai, O.F. Bueno, S.A. Parsons, J. Xu, D.M. Plank, F. Jones, T.R. Kimball, J.D. Molkentin (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ.Res.* **94**, 110-118.
47. L. Lyakh, P. Ghosh, N.R. Rice (1997). Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2475-2484.
48. C. Luo, K.T. Shaw, A. Raghavan, J. Aramburu, F. Garcia-Cozar, B.A. Perrino, P.G. Hogan, A. Rao (1996). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 8907-8912.
49. J. Zhu, F. McKeon (1999). NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature.* **398**, 256-260.
50. F.J. Garcia-Cozar, H. Okamura, J.F. Aramburu, K.T. Shaw, L. Pelletier, R. Showalter, E. Villafranca, A. Rao (1998). Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. *J.Biol.Chem.* **273**, 23877-23883.
51. H. Okamura, J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J.P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P.G. Hogan, A. Rao (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol.Cell.* **6**, 539 -550.
52. J. Aramburu, F. Garcia-Cozar, A. Raghavan, H. Okamura, A. Rao, P.G. Hogan (1998). Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol.Cell.* **1**, 627-637.
53. R.E. Dolmetsch, K. Xu, R.S. Lewis (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature.* **392**, 933-936.
54. K.T. Shaw, A.M. Ho, A. Raghavan, J. Kim, J. Jain, J. Park, S. Sharma, A. Rao, P.G. Hogan (1995). Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 11205-11209.
55. C. Loh, K.T. Shaw, J. Carew, J.P. Viola, C. Luo, B.A. Perrino, A. Rao (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J.Biol.Chem.* **271**, 10884-10891.

56. E. Wright, M.R. Hargrave, J. Christiansen, L. Cooper, J. Kun, T. Evans, U. Gangadharan, A. Greenfield, P. Koopman (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat.Genet.* **9**, 15-20.
57. S.S. Morais da, A. Hacker, V. Harley, P. Goodfellow, A. Swain, R. Lovell-Badge (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat.Genet.* **14**, 62-68.
58. Y. Kamachi, M. Uchikawa, H. Kondoh (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* **16**, 182-187.
59. J. Bowles, G. Schepers, P. Koopman (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev.Biol.* **227**, 239-255.
60. M. Wilson, P. Koopman (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **12**, 441-446.
61. P. Sudbeck, G. Scherer (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J.Biol.Chem.* **272**, 27848-27852.
62. F. Poulat, F. Girard, M.P. Chevron, C. Goze, X. Rebillard, B. Calas, N. Lamb, P. Berta (1995). Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J.Cell Biol.* **128**, 737-748.
63. P. Sudbeck, M.L. Schmitz, P.A. Baeuerle, G. Scherer (1996). Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat.Genet.* **13**, 230-232.
64. S. McDowall, A. Argentaro, S. Ranganathan, P. Weller, S. Mertin, S. Mansour, J. Tolmie, V. Harley (1999). Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J.Biol.Chem.* **274**, 24023-24030.
65. V.R. Harley, M.J. Clarkson, A. Argentaro (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr.Rev.* **24**, 466-487.
66. W. Huang, X. Zhou, V. Lefebvre, B.de Crombrughe (2000). Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol.Cell Biol.* **20**, 4149-4158.
67. H. Akiyama, M.C. Chaboissier, J.F. Martin, A. Schedl, B.de Crombrughe (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813-2828.
68. W.M. Kulyk, J.L. Franklin, L.M. Hoffman (2000). Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. *Exp.Cell Res.* **255**, 327-332.

69. V. Lefebvre, W. Huang, V.R. Harley, P.N. Goodfellow, B.de Crombrughe (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2336-2346.
70. V. Lefebvre, P. Li, B.de Crombrughe (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**, 5718-5733.
71. I. Kou, S. Ikegawa (2004). SOX9-dependent and -independent transcriptional regulation of human cartilage link protein. *J.Biol.Chem.* **279**, 50942-50948.
72. M. Tsuda, S. Takahashi, Y. Takahashi, H. Asahara (2003). Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J.Biol.Chem.* **278**, 27224-27229.
73. R. Zakany, K. Szucs, E. Bako, S. Felszeghy, G. Czifra, T. Biro, L. Modis, P. Gergely (2002). Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during in vitro chondrogenesis. *Exp.Cell Res.* **275**, 1-8.
74. S. Murakami, M. Kan, W.L. McKeehan, B.de Crombrughe (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 1113-1118.
75. Z. Chen, T.B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, M.H. Cobb (2001). MAP kinases. *Chem.Rev.* **101**, 2449-2476.
76. S. Kumar, J. Boehm, J.C. Lee (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.* **2**, 717-726.
77. C. Hagemann, J.L. Blank (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal.* **13**, 863-875.
78. K.L. Guan (1994). The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal.* **6**, 581-589.
79. M. Haneda, T. Sugimoto, R. Kikkawa (1999). Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur.J.Pharmacol.* **365**, 1-7.
80. L.J. De Windt, H.W. Lim, S. Haq, T. Force, J.D. Molkentin (2000). Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **275**, 13571-13579.
81. H.W. Lim, L. New, J. Han, J.D. Molkentin (2001). Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* **276**, 15913-15919.
82. M. Adachi, M. Fukuda, E. Nishida (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J.* **18**, 5347-5358.

83. C.R. Weinstein-Oppenheim, W.L. Blalock, L.S. Steelman, F. Chang, J.A. McCubrey (2000). The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. *Pharmacol.Ther.* **88**, 229-279.
84. Y.M. Yoon, C.D. Oh, D.Y. Kim, Y.S. Lee, J.W. Park, T.L. Huh, S.S. Kang, J.S. Chun (2000). Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C-alpha, Erk-1, and p38 MAPK signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **275**, 12353-12359.
85. C.D. Oh, S.H. Chang, Y.M. Yoon, S.J. Lee, Y.S. Lee, S.S. Kang, J.S. Chun (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.
86. B.E. Bobick, W.M. Kulyk (2004). The MEK-ERK signaling pathway is a negative regulator of cartilage-specific gene expression in embryonic limb mesenchyme. *J.Biol.Chem.* **279**, 4588-4595.
87. H. Mellor, P.J. Parker (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* **332**, 281-292.
88. A. Toker (1998). Signaling through protein kinase C. *Front Biosci.* **3**, 1134-1147.
89. B.L.J. Webb. (2000). Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *British Journal of Pharmacology* **130**, 1433-1452.
90. K.J.Way, E. Chou, G.L. King. (2000). Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *TiPS* **21**, 181-186.
91. J.A. Rosado, P.C. Redondo, G.M. Salido, E. Gomez-Arteta, S.O. Sage, J.A. Pariente (2004). Hydrogen peroxide generation induces pp60src activation in human platelets: evidence for the involvement of this pathway in store-mediated calcium entry. *J.Biol.Chem.* **279**, 1665-1675.
92. R.T. Waldron, E. Rozengurt (2000). Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C. *J.Biol.Chem.* **275**, 17114-17121.
93. A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, T.C. Meng, J.A. Hinks, N.K. Tonks, D. Barford (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**, 769-773.
94. Y.E. Henrotin, P. Bruckner, J.P. Pujol (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis.Cartilage.* **11**, 747-755.
95. T. Matsushita, K. Fukuda, K. Yamazaki, N. Yamamoto, S. Asada, K. Yoshida, H. Munakata, C. Hamanishi (2004). Hypoxia-induced nitric oxide protects chondrocytes from damage by hydrogen peroxide. *Inflamm.Res.* **53**, 344-350.
96. R.E. Allen, D.R. Blake, N.B. Nazhat, P. Jones (1989). Superoxide radical generation by inflamed human synovium after hypoxia. *Lancet* **2**, 282-283.

97. P.I. Mapp, M.C. Grootveld, D.R. Blake (1995). Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br.Med.Bull.* **51**, 419-436.
98. K. Fukuda, M. Takayama, M. Ueno, M. Oh, S. Asada, F. Kumano, S. Tanaka (1997). Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-induced superoxide anion in bovine chondrocytes. *Inflamm.Res.* **46**, 114-117.
99. S. Asada, K. Fukuda, M. Oh, C. Hamanishi, S. Tanaka (1999). Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. *Inflamm.Res.* **48**, 399-403.
100. S. Asada, K. Fukuda, F. Nishisaka, M. Matsukawa, C. Hamanishi (2001). Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm.Res.* **50**, 19-23.
101. B. Borsiczky, Z. Szabo, M.T. Jaberansari, P.P. Mack, E. Roth (2003). Activated PMNs lead to oxidative stress on chondrocytes: a study of swine knees. *Acta Orthop.Scand.* **74**, 190-195.
102. I. Mazzetti, B. Grigolo, L. Pulsatelli, P. Dolzani, T. Silvestri, L. Roseti, R. Meliconi, A. Facchini (2001). Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin.Sci.* **101**, 593-599.
103. K. Yamazaki, K. Fukuda, M. Matsukawa, F. Hara, K. Yoshida, M. Akagi, H. Munakata, C. Hamanishi (2003). Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: involvement of the hydroxyl radical. *Pathophysiology.* **9**, 215-220.
104. E. Kiss (2005). Újabb ismeretek a szisztémás lupus erythematosusról. *Klinikai Immunológia* **15**, 280-288.
105. J. cocer-Varela, D. arcon-Segovia (1982). Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J.Clin.Invest.* **69**, 1388-1392.
106. G.M. Kammer, A. Perl, B.C. Richardson, G.C. Tsokos (2002). Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **46**, 1139-1354.
107. V. Brundula, L.J. Rivas, A.M. Blasini, M. Paris, S. Salazar, I.L. Stekman, M.A. Rodriguez (1999). Diminished levels of T cell receptor zeta chains in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **42**, 1908-1916.
108. T. Takeuchi, K. Tsuzaka, T. Abe, K. Yoshimoto, K. Shiraishi, H. Kameda, K. Amano (2005). T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **38**, 339-346.
109. E.E. Solomou, Y.T. Juang, M.F. Gourley, G.M. Kammer, G.C. Tsokos (2001). Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* **166**, 4216-4222.

110. Y. Tada, K. Nagasawa, Y. Yamauchi, H. Tsukamoto, Y. Niho (1991). A defect in the protein kinase C system in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **60**, 220-231.
111. T. Takeuchi, K. Tsuzaka, T. Abe, K. Yoshimoto, K. Shiraishi, H. Kameda, K. Amano (2005). T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* **38**, 339-346.
112. P.J. Barnes (1998). Anti-inflammatory action of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* **94**, 557-572.
113. B. Gabryel, M. Chalimoniuk, A. Stolecka, K. Waniek, J. Langfort, A. Malecki (2006). Inhibition of arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 is involved in the antiapoptotic effect of FK506 and cyclosporin A on astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro. *J.Pharmacol.Sci.* **102**, 77-87.
114. S. Sipka (1998). Új közös biokémiai utak a glükokortikoszteroidok és a ciklosporin A immunszuppresszív hatásaiban. *Magyar Belorvosi Archivum* **51**, 295-299.
115. E.A. Dennis (1997). The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 1-2.
116. C.C. Leslie (1997). Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* **272**, 16709-16712.
117. S.D. Yang, E.A. Tallant, W.Y. Cheung (1982). Calcineurin is a calmodulin-dependent protein phosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **106**, 1419-1425.
118. M. Solursh, P.B. Ahrens, R.S. Reiter (1978). A tissue culture analysis of the steps in limb chondrogenesis. *In Vitro* **14**, 51-61.
119. B. Kurz, J. Steinhagen, M. Schunke (1999). Articular chondrocytes and synoviocytes in a co-culture system: influence on reactive oxygen species-induced cytotoxicity and lipid peroxidation. *Cell Tissue Res.* **296**, 555-563.
120. B.de Crombrughe, V. Lefebvre, R.R. Behringer, W. Bi, S. Murakami, W. Huang (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* **19**, 389-394.
121. I.A. Graef, F. Chen, L. Chen, A. Kuo, G.R. Crabtree (2001). Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* **105**, 863-875.
122. S. Baksh, S.J. Burakoff (2000). The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin.Immunol.* **12**, 405-415.
123. R.A. Schulz, K.E. Yutzey (2004). Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev.Biol.* **266**, 1-16.
124. X.C. Bai, D. Lu, J. Bai, H. Zheng, Z.Y. Ke, X.M. Li, S.Q. Luo (2004). Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **314**, 197-207.

125. Y.S. Lee, C.M. Chuong (1997). Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J.Cell Physiol* **170**, 153-165.
126. V.M. Coghlan, B.A. Perrino, M. Howard, L.K. Langeberg, J.B. Hicks, W.M. Gallatin, J.D. Scott (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*. **267**, 108-111.
127. R.D. Cauthron, K.B. Carter, S. Liauw, R.A. Steinberg (1998). Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase. *Mol.Cell Biol.* **18**, 1416-1423.
128. T. Biro, Z. Griger, E. Kiss, H. Papp, M. Aleksza, I. Kovacs, M. Zeher, E. Bodolay, T. Csepany, K. Szucs, P. Gergely, L. Kovacs, G. Szegedi, S. Sipka (2004). Abnormal cell-specific expressions of certain protein kinase C isoenzymes in peripheral mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: effect of corticosteroid application. *Scand.J.Immunol.* **60**, 421-428.

## Köszönetnyilvánítás

Elsősorban Gergely Pál professzor úrnak tartozom köszönettel, aki mind témavezetőként, mind intézetigazgatóként ösztönözte munkámat és gondoskodott a megfelelő kutatási feltételekről, illetve hasznos tanácsokkal és útmutatásokkal irányította szakmai tevékenységemet.

Az Orvosi Vegytani Intézetben számos munkatársam segítette mindennapi munkámat, akiket szintén köszönet illet. Módszertani szempontból feltétlenül ki kell emelnem közülük Dr. Csontos Csillát, Dr. Szűcs Kornéliát és Dr. Bakó Évát. Az egyes kutatói feladatok megvalósításában kiváló asszisztensek működtek közre: Hunyadi Kálmánné Julianna, Rónai Tamásné Ilona, Dembrovszkiné Kovács Ella, Molnár Zsanett.

A kutatások során kollaborációs partnereink részéről Sipka Sándor professzor úr és Dr. Zákány Róza iránymutatásai segítettek. Virág László professzor úrnak, Kovács Ildikó laboratóriumi analitikusnak, Juhász Tamás és Matta Csaba Ph.D. hallgatóknak is köszönöm a kutatási projectekben végzett munkájukat.

Fiatal pályatársaim és barátaim is – többek közt Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Kakuk Annamária, Czikora István, Erdélyi Katalin, Lontay Beáta, Kókai Endre – sokat tettek azért, hogy vidám légkörben és hasznosan teltek az elmúlt évek.

Természetesen nem feledkezem meg a szüleimről és azokról a „civil” barátaimról, különösképpen Fodor Lászlóról sem, akik a sokszor nehéz hétköznapiakban és a kételyeim között is mindvégig mellettem álltak.