

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Juhász Tamás

**Jelátviteli fehérjék expressziójának tranziens transzfekcióval
történő módosítása és annak hatásai primer kondrogenikus
sejtkultúrában**

Témavezető: Dr. Zákány Róza



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

I. JELÁTVITELI FOLYAMATOK SEJT- ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA DOKTORI PROGRAM

ANATÓMIAI, SZÖVET- ÉS FEJLŐDÉSTANI INTÉZET

Debrecen, 2010

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. A porcszövet.....	9
2.2. A hialin porc fejlődésének modellezését szolgáló rendszerek és kísérleti módszerek.....	11
2.3. A porcdifferenciáció lépései.....	13
2.4. A porcdifferenciációt szabályozó jelátviteli folyamatok.....	14
2.4.1. A Ser/Thr protein kinázok kondrogenezisben betöltött szerepe.....	16
2.4.2. A Ser/Thr foszfatázok szerepe a porcdifferenciációban.....	19
2.5. A Ca ²⁺ -homeosztázis jelátviteli útvonalakra kifejtett hatásai a porcdifferenciációban.....	21
2.5.1. Az NMDA receptor felépítése.....	22
2.6. Transzfekciós módszerek a sejttenyésztő laboratóriumokban.....	23
2.6.1. Transzfekciós lehetőségek a "high density" kultúrákban.....	25
3. Célkitűzés.....	27
4. Anyagok és módszerek.....	29
4.1. Sejttenyésztés.....	29
4.2. A porcképződés mértékének fénymikroszkópos detektálása.....	29
4.3. A PP2B-vektorok.....	30
4.4. sh- és siRNS expressziós rendszerek.....	31
4.5. HD-kultúrák transzfekciója.....	33
4.6. A GFP-t expresszáló vektorok vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal.....	34
4.7. A PKC δ aktivitás gátlása rottlerinnel.....	34
4.8. Életképesség vizsgálata MTT- teszttel.....	35
4.9. Sejtproliferáció vizsgálata ³ H-timidin-beépülés mérésével.....	35
4.10. Apoptózis vizsgálat és a transzfekció hatékonyságának meghatározása áramlási citométerrel.....	35
4.11. Spontán Ca ²⁺ -tranziensek vizsgálata.....	36
4.12. Sejt-extraktumok előkészítése.....	37
4.13. RT-PCR analízis.....	37
4.14. Fehérjedetektálás Western blot technikával.....	38
4.15. Kalcineurin aktivitásmérés.....	39
4.16. Protein kináz C enzim-aktivitásmérés.....	40
4.17. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis.....	41

5.	Eredmények.....	42
5.1.	A HD-kultúrák tranziens transzfekciójának optimalizálása	42
5.1.1.	A transzfekció kivitelezése még a sejtek kitapadása előtt a leghatékonyabb	42
5.1.2.	A Saint Mix reagens alkalmazása elegendő hatékonysággal és kis apoptotikus hajlammal juttatja a GFP-t expresszáló vektorokat a kondrogenikus sejtekbe.	43
5.1.3.	A transzfekciós reagens és a GFP expresszió eltérő mértékben befolyásolja a sejtek életképességét és osztódási rátáját.....	45
5.1.4.	A transzfekció hatása a metakromáziásan festődő porc mennyiségére reagens és módszerfüggő	47
5.1.5.	A transzfekció nincs jelentős hatással porcképződést szabályozó faktorok mRNS expressziójára	48
5.2.	A kalcineurin túltermelésének hatásai a kondrogenézisre.....	50
5.2.1.	A kalcineurin overexpressziója porcképződés-csökkentő hatású.....	50
5.3.	A kalcineurin géncsendesítésének hatásai a porcdifferenciációra.....	55
5.3.1.	A kalcineurin géncsendesítése shRNS technológiával erősen csökkentette a porcképződést, de a sejtek proliferációs rátáját kissé megemelte	55
5.4.	A PKC δ vizsgálata a porcdifferenciáció során.....	59
5.4.1.	A PKC δ expressziója és aktivitása a porcosodó HD-kultúrákban a 2-3. tenyésztési napon csúcsterű kiemelkedést mutat	59
5.4.2.	A rottlerin idő- és koncentrációfüggő módon gátolja a porcképződést és osztódóképesség csökkenéshez is vezet	61
5.4.3.	A rottlerin csökkenti a porcspecifikus markerek expresszióját	63
5.4.4.	A farmakológiai inhibitor csökkent ERK1/2 aktivitást eredményez.....	64
5.4.5.	A rottlerin nem gátolja a PKC δ aktivitását a kondrogenikus sejtekben	64
5.4.6.	A PKC δ expressziójának shRNS-sel történő gátlása csökkenti a porcképződést.....	65
5.4.7.	A sikeres PKC δ géncsendesítés csökkenti a Sox9 fehérjeexpresszióját.....	67
5.4.8.	A PKC δ géncsendesítés szignifikánsan megemeli a foszforilált ERK1/2 jelenlétét	69
5.5.	Az NMDA receptor hiányának hatása a porcképződés mértékére és a Ca ²⁺ -oszcillációra...	69
5.5.1.	Az NR1 alegység géncsendesítése csökkenti a porcképződést és a kondrogenikus sejtek osztódási rátáját	69
5.5.2.	Az NR1 alegység géncsendesítése csökkenti az oszcilláló Ca ²⁺ -koncentráció változásokat mutató kondrogenikus sejtek számát.....	73
6.	Megbeszélés	75
6.1.	A HD-kultúrák transzfekciójának optimalizálása	75
6.2.	A PP2B overexpressziójának és géncsendesítésének hatása a porcdifferenciációra.....	78
6.3.	A PKC δ expressziója és gátlásának hatása a kondrogenikus HD-kultúrákban	80
6.4.	Az NMDA receptorok kifejeződésének gátlása siRNS-sel	83

7.	Összefoglalás.....	86
8.	Summary	87
9.	Irodalomjegyzék.....	88
10.	Közlemények listája	100
11.	Köszönetnyilvánítás	103
12.	Függelék.....	104

Rövidítések jegyzéke

ATP: adenzin-trifoszfát	FGF: fibroblaszt-eredetű növekedési faktor (fibroblast growth factor)
ADP: adenzin-difoszfát	GAG: glükózaminoglikán
BMP: csont morfogénikus fehérje (bone morphogenic protein)	GFP: zöld fluoreszkáló fehérje (green fluorescent protein)
CaMK: Ca ²⁺ /kalmodulin-dependens protein-kináz	Gly: glicin
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát	HD: nagy sűrűségű (high density) sejt kultúra
CMF-PBS: kalcium- és magnéziummentes poszfátpuffer (calcium and magnesium free phosphate buffered saline)	HMG: High Mobility Group
CMP: cartilage matrix protein	JNK: Jun N-terminális kináz
CMV: citomegalovírus	LFA: Lipofectamin 2000
CnA delta: calcineurin A delta	MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
CnAg gamma: calcineurin A gamma	MAPKK: MAPK-kináz
COMP: cartilage oligomeric matrix protein	MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid
CSA: ciklosporin-A	N-CAM: idegi sejtadhéziós molekula (neural-cell adhesion molecule)
CREB: cAMP válaszadó elemhez kapcsolódó fehérje (cAMP response element binding protein)	NFAT: aktiválódott T-limfociták sejtmagi antigénje (nuclear factor of activated T lymphocytes)
DAG: diacil-glicerol	NMDA: N-metil-D-aszpartát
DMMK: dimetilmetilénkék	OA: okadainsav (okadaic acid)
DMSO: dimetil-szulfoxid	OD: optikai denzitás
DNS: dezoxiribonukleinsav	PBS: foszfátpuffer (phosphate buffered saline)
dNTP: dezoxinukleotid-trifoszfát	PBST: PBS+0,1 % Tween-20
DTT: ditiotritol	PG: proteoglikán
ECM: extracelluláris matrix	PI: propidium-jodid (propidium-iodide)
ERK: extracelluláris jelek által szabályozott kináz (extracellular signal-regulated kinase)	PKA: protein kináz A
FACS: fluorescence associated cell sorter	PKC: protein kináz C
FBS: főtális borjúsérum (fetal bovine serum)	PMA: forbol-12 mirisztát-13 acetát (phorbol 12-myristate 13-acetate)

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid
PP: protein-foszfátáz
PP2B: protein-foszfátáz-2B (kalcineurin)
PS: foszfátidil-szerin (phosphatidylserine)
RISC: RNS indukált csendesítő komplex
(RNA induced silencing complex)
RNS: ribonukleinsav
RT-PCR: reverz transzkripciót követő
polimeráz láncreakció
SDS: nátrium-dodecil-szulfát (sodium-
dodecyl-sulphate)
Ser: Szerin
SF : SuperFect
siRNS: small interfering RNS
S M : Saint Mix
shRNS: short harpin RNS
SV40: Simian vírus 40
Thr: threonin
TGF: transzformáló növekedési faktor
(transforming growth factor)
TK: toluidinkék
TM: transzmembrán
Tyr: Tirozin

1. Bevezetés

Az egyes ízületeket borító hialinporc egyedi tulajdonságai teszik lehetővé, hogy betöltse szövettani, anatómiai és fiziológiai szerepét a fejlődés korai szakaszától az életünk végéig, mely során eltérő mértékű terhelési viszonyoknak van kitéve a valódi regeneráció lehetősége nélkül. Egy humán ízületben attól függően, hogy egy-, két- vagy többtengelyű ízületről beszélünk, a porcszövet alapvető jelentősége abban rejlik, hogy a ránehezedő terhelést, súrlódást és mechanikai stresszt az alatta elhelyezkedő csontszövetre a lehető legrugalmasabb módon vigye át. Ebből adódóan egy adott ízület degeneratív megbetegedésének előfordulása, komoly mozgásszervi korlátozottsággal és fájdalommal jár és napjaink egyik népbetegségének tekinthető elváltozás. A porcbántalmakban szenvedő betegek többségét érintheti a reumatoid arthritis, vagy az osteoarthritis, mely kórképek végső soron az ízület és az ízület körüli szöveti elemek fokozatos elhalását eredményezik [1]. E betegségek főleg az idősödő generáció tagjait érintik, azonban fiatal korban előforduló formájuk is ismert. A mai magyarországi népességadatok egyik fontos üzenete, hogy elöregedő társadalomban élünk, így ezeknek a megbetegedéseknek komoly társadalmi és gazdasági következményei is vannak. A probléma súlyosságát jelzi, hogy a 2000-től 2010-ig tartó időszakot az ENSZ Egészségügyi Világszervezete (WHO) a Csont és Ízület Évtizedének nyilvánította [2]. Emellett nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy az ízületeket érő fokozott mechanikai terhelés, vagy traumás sérülés következtében fellépő ízületi porcsérülések kezelése is igen beszükkült keretek között zajlik. Az ízületi porcregeneráció csaknem teljes hiányának ténye kevés sikeres műtéti beavatkozást tesz lehetővé. Ezen kevesek közül igen jelentős eredményeket értek el az ún. mozaikplasztikai eljárásokban [3]. A műtét során az ízületek kevésbé terhelt felszínéről ép, egészséges ízületi porcot, valamint az alatta levő spongiosát tartalmazó grafitot távolítanak el, és a sérült felszín megfelelően kiképzett csatornáiba ültetik. A donorcsatornáknál spontán képződő hegyszövet azonban nagyon gyakran rostos porc formájában jelenik meg, mely természetesen nem utánozhatja az ízületi porc funkcióját. Az orvosi beavatkozások és kezelések elsődleges célja a betegek életminőségének javítása, ezen kívül a porc degeneratív megbetegedéseinek, prevenciójának, diagnosztikájának, kezelésének javítása kiemelkedő fontosságú és ma már elérhető célnak tekinthető. Számos olyan próbálkozás indult el az utóbbi évtizedben, mely során *in vitro* kívántak előállítani ízületi porcot vagy ahhoz hasonló struktúrákat fejlesztettek ki [4,5]. E módszerek alkalmazása igen

költséges vagy még nem tökéletesen kidolgozott módszerként van jelen a klinikumban. Annak érdekében, hogy az utóbb említett kísérleti törekvéseket és esetleges terápiás lehetőségek fejlődését elősegítsük, nagyon fontos a porcdifferenciáció molekuláris biológiai lépéseinek feltérképezése és alapos megértése, hogy pontosabb képet kaphassunk a hialinporc ízületi porcra jellemző szöveti szerkezetének kialakulásáról. Egyetemi doktori értekezésemben a porcdifferenciációt irányító molekuláris mechanizmusok egy kis szeletét próbálok bemutatni. E témakörön belül egy viszonylag új technika, a géncsendesítés és fehérjetúltermeltetés alkalmazásának a beállítását tűztem ki célul egy háromdimenziós kísérleti rendszerben, ahol a teljes szövetet vizsgálva tudjuk meghatározni az egyes fehérjék, receptorok hiányának hatását a fejlődő porcszövetben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A porcszövet

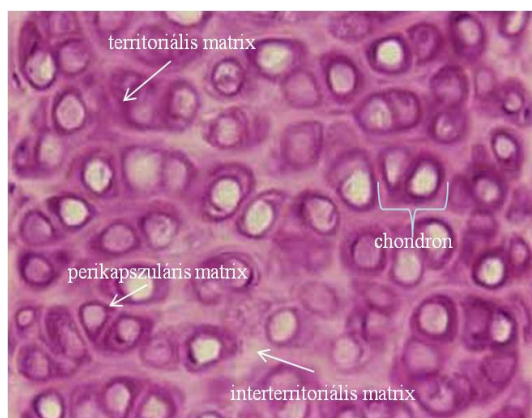
A porcszövet fejlődését tekintve több eltérő embrionális struktúrából is kialakulhat: a dúcléc (crista neuralis) sejtjeinek irányított migrációja a koponya egyes porcképződményeinek kialakításáért felelős. Az emberi test legnagyobb területén a porcszövet a mezoderma származékának tekinthető: a paraaxiális mezoderma származékából; a szklerotomból fejlődik a gerinc, míg a törzs csontjainak alapját és a végtagtelepek vázát szolgáló porctelepek az oldallemez mezoderma származékai. Molekuláris biológiai szempontból különösen fontos, hogy a porcszövet kialakulásának szabályozásában számos jelátviteli útvonal összehangolt, együttes működésére van szükség (BMP2, BMP7, Wnt), amelyek akár az egyes ízületek felépítését is meghatározhatják [6].

A porcszövet szövettanilag a kötő- és támasztószövetek csoportjába tartozó speciális szövet. A humán szervezetben előforduló porcszövetet három alapsoportba osztjuk, ezek a hialinporc, az elasztikus porc és a rostos porc. Mindhárom típusú porcnak közös jellemzője, hogy érmentes (avaszkuláris) szövetek, táplálásuk diffúzió útján történik a periféria (porchártya vagy szinoviális folyadék) felől, valamint a beidegzés teljes hiánya is megfigyelhető. A hialinporcot három, funkcionális szempontból elkülöníthető csoportba oszthatjuk; ízületi porc, az egyes zsigerek (gége, légcső, bronchusok) vázát adó állandósult porc, valamint az enkondrális csontosodással kialakuló csontok mintájául szolgáló porcképződmények [7]. Az említett porctípusok közül kiemelkedő szerepe van az epifízis porckorongnak, mely az enkondrális csontosodás folyamán alapjául szolgál a csontok hosszirányú növekedésének. A csontok felszínét borító ízületi porc kialakulása és mechanikai terhelést továbbító szerepe nélkülözhetetlen a mozgás megfelelő kialakulásához [8].

A porcszövet felépítésére csoporttól függetlenül jellemző, hogy a szövetben fiziológias körülmények között egyetlen sejtípus, a porcsejt, kondrocita fordul elő és a sejtek közötti nagy mennyiségű extracelluláris matrix (ECM) e sejtek terméke. Ez a sejt közötti alapállomány komplexitása révén biztosítja a szövet ellenálló képességét. Az ECM főleg kollagén hálózatba ágyazott proteoglikánokból (PG), hialuronsavból és vízből áll. A különböző típusú és változó mennyiségben előforduló kollagének közül a hialinporcban a következőket lehet kiemelni: II., IX., XI., és VI. típusú kollagének. A II. típusú kollagén megközelítőleg 90%-át adja az ízületi porc kollagénállományának és speciális orientációja és zónák szerinti eloszlása hozzájárul az ízületi porc nagy teherbíró képességéhez. A IX. kollagének elengedhetetlen szerepe van az egyes matrixalkotók kihorgonyzásában, a XI.

kollagén a kollagén láncok hosszának kialakításában játszik fontos szerepet, míg a VI. kollagén – melyet kondron körüli fészeknek is neveznek – a kondrociták és a matrix kapcsolatának fenntartásáért felelős. Ez utóbbi típusok csupán 1-2%-ban vannak jelen a kifejlődött ízületi porc állományában [9].

A kollagénhálózatba ágyazott másik nagy makromolekulacsalád a proteoglikánok (PG), melynek ízületi porcban egyik legfontosabb képviselője az aggregán, aminek tengelyfehérjéjéhez kondroitin-szulfát és keratán-szulfát oldalláncok kapcsolódnak. Az aggregán molekulák egy kötő fehérje segítségével hialuronsav láncokhoz asszociálódnak. Az így létrejövő aggregátum a glükózaminoglikán (GAG) molekulák polianionos tulajdonsága miatt nagyfokú vízkötő képességgel rendelkezik, mely szupramolekuláris rendezettség magyarázza a szövetre jellemző mechanikai sajátosságokat [10]. Az említett komponensek mellett fontos szerepet játszanak a porcmatrix makromolekuláinak harmadik csoportjába tartozó multiadhezív glikoproteidek. Ezek például a kondrokalcin, cartilage matrix protein; CMP (matrilin-1), kondronektin, fibronektin, és COMP (cartilage oligomeric matrix protein), melyek a porcszövet szerkezetének kialakításában, és a kondrociták közötti kapcsolatok létrehozásában nélkülözhetetlen molekulák [7].



2.1. ábra A hialinporc morfológiai felépítésének mikroszkópos képe Hematoxin-Eozin festéssel.

A differenciálódó porcsejtek fenotípusukat tekintve lekerekedett, nagy sejtmagvú eukarióta sejtek foghatók fel, melyek differenciációjuk során aktív matrix- és fehérjeszintézist folytatnak és számos olyan receptort expresszálnak, amelyek a matrix-szal való kapcsolat kialakításában nélkülözhetetlenek. Ilyen receptorok pl. egyes integrin receptorok [11] és a CD44 [12], melyek az ECM kapcsolódásán keresztül befolyásolhatják a sejtek citoskeletonjának felépítését, ezen keresztül a sejtek alakját is, valamint a differenciálódó sejtek homeosztázisára is hatással vannak. A kondroprogenitor sejtek

morfológiája egyaránt függ genomiális faktoroktól, az őket körülvevő ECM összetételétől és a sejtek felszínén adott időben megjelenő receptor- és ioncsatornamintázattól. Ezen tényezők bármelyikének elvesztése vagy akár részleges hiánya a porcsejtekre jellemző fenotípus elvesztésével jár. Ilyen módon a porcsejtek végleges alakjának és funkciójának kialakításában nem csak a sejtek saját programozott folyamatai, illetve az azokat irányító mestergének vesznek részt, hanem számos parakrin, autokrin faktor is hatással lehet a mezenchimális sejt porcirányú elkötelezettségének szabályozásában [13]. A differenciáció közben szintetizált ECM-ban lévő mezenchimális eredetű kondrociták a porc növekedésének befejeztével abbahagyják proliferációs mechanizmusukat (2.1. ábra) és nyugalmi állapotba kerülnek. Az ilyen mikrokörnyezetben lévő porcsejtek immortalizált sejtekként kezelhetők [8]. Perikondriummal rendelkező hialin porc esetében porcsejtek a belső rétegben található osztódásra képes sejtpopulációból pótlódhatnak, míg ízületi porc esetében a perikondrium hiánya miatt ez nem lehetséges, amely így a szövet csökkent regenerációját eredményezi.

2.2. A hialin porc fejlődésének modellezését szolgáló rendszerek és kísérleti módszerek

A felnőtt ízületi porc felépítésének hatékonyan meg kell birkóznia az évek során folyamatosan létrejövő mechanikai terheléssel, ideális esetben anélkül, hogy sérülést szenvedne [14]. A II. kollagén speciális orientációjának, és magas víztartalmának köszönhetően ellenáll a hidrosztatikai nyomásnak, mely alkalmassá teszi a vázrendszert érő óriási erő egyenletes áthelyezésére egyik szubkondrális csontlemezről a másikra. A nagyszámú próbálkozás ellenére a mai napig nem sikerült olyan mesterséges porcmatrix és ízületi felszín pótló anyagot létrehozni, amely versenyre kelhetne az ízületi porc tulajdonságaival. Mindemellett a hialinporc fejlődését egy igen bonyolult és összetett növekedési faktor és jelátviteli kaszkád szabályozza, mely tanulmányozása elengedhetetlen feladat az ízületi porc kialakulásának tökéletesebb megértéséhez és esetleges mesterséges létrehozásához.

A hialinporc, valamint az ízületi porc képződésének tanulmányozására alkalmas *in vivo* kísérleti modellek legnagyobb része egerek, patkányok vagy kutyák tanulmányozásán alapul. E kísérleti rendszerek azonban kevésbé alkalmasak az egyes kondroblasztokban vagy kondrocitákban lezajló jelátviteli útvonalak tanulmányozására, ezért számos olyan *in vitro* kísérleti rendszer jelent meg a sejttenyésztő laboratóriumokban, mely lehetővé teszi a

molekuláris biológiai és biokémiai vizsgálatok kiszélesítését. Az egyik ilyen modell, amikor felnőtt, érett ízületi porcából izolált kondrocitákat használnak [15,16]. Ebben a rendszerben az izolált porcsejtek az ECM jelenléte nélkül tanulmányozhatók, mely felveti annak a kérdését, hogy az ECM egyes makromolekuláinak valamint az ECM-ban fellelhető ionmilió teljes vagy részleges hiánya mennyire módosítja a kondrociták valódi élettani folyamatait. Emellett ezekben a sejtzolátumokban csak érett kondrociták találhatóak, melyek differenciációs folyamataikat befejezték. Egy másik és manapság favorizált lehetőség, felnőtt, csontvelő eredetű mezenchimális őssejtekből vagy embrionális őssejtekből differenciáltatni porcsövetet [17]. Mindkét eljárás igen költséges és sikerességüket nagyban befolyásolja az alkalmazott kísérleti protokoll.

Saját kísérleteinkben mi egy olcsó és jól reprodukálható eredményeket adó porcdifferenciációs modellt alkalmaztunk, amikor a Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumban [18] lévő csirkeembriók végtagbimbóinak disztális részéből izolált, kondroprogenitor mezenchimális sejtekből álló primer, porcosodó „high density” (HD) sejt kultúrákat hozunk létre [19,20]. Az ilyen módon nyert sejtpopuláció nagy részét kondroprogenitor sejtek alkotják. Emellett kisszámú differenciálatlan keratinocita, fibroblaszt és/vagy mioblaszt is a primer izolátum része. A hámsejtek és a mioblasztok a porcképződést favorizáló körülmények (sejtsűrűség, osztódás) között nem fejlődnek tovább és számuk elenyésző marad a porcosodó sejt kultúrában. A fibroblasztok a porctelep szélét és alapját képezik, biztosítják a kultúrák tenyésztő edény felszínéhez történő kitapadását. A high density kultúrákban a megfelelő tenyésztő médium és a főtális borjú szérum segítségével spontán porcdifferenciáció zajlik. Ennek háttérében a megfelelő fejlődési stádiumban izolált kondroprogenitor sejtek optimális sejtsűrűségben való alkalmazása áll. Így hat nap alatt a hialinporc állományának megfelelő porctelepeket kapunk, melyet jól jellemezhetünk metakromáziás festékekkel (dimetilmetilénkék, toluidinkék, alciánkék), ami a porcmatrixban nagy mennyiségben jelenlévő, erősen polianionos szulfatált GAG-ok kimutatására alkalmas. A porcmatrix szulfatált molekuláihoz kötődő festékmolekulák alacsony pH-n történő visszaoldásával akár a porcképződés relatív mennyiségére is következtethetünk. Ezen túlmenően lehetőség nyílik a porcdifferenciációt irányító faktorok, valamint porcspecifikus matrixmolekulák molekuláris biológiai monitorozására is. Ugyanakkor hozzá kell tennünk azt is, hogy a létrehozott háromdimenziós sejt kultúrák felépítése és struktúrája nem felel meg az ízületi porc minden kívánalmának, hiszen a képződő porc magas hialuronsav tartalmú sok szulfatált GAG-ot és II. típusú kollagént tartalmazó, de amorf szerkezetű hialinporcnak

tekinthető. A primer HD-kultúrák alkalmazásán alapuló porckutatást Intézetünkben Prof. Dr. Hadházy Csaba honosította meg.

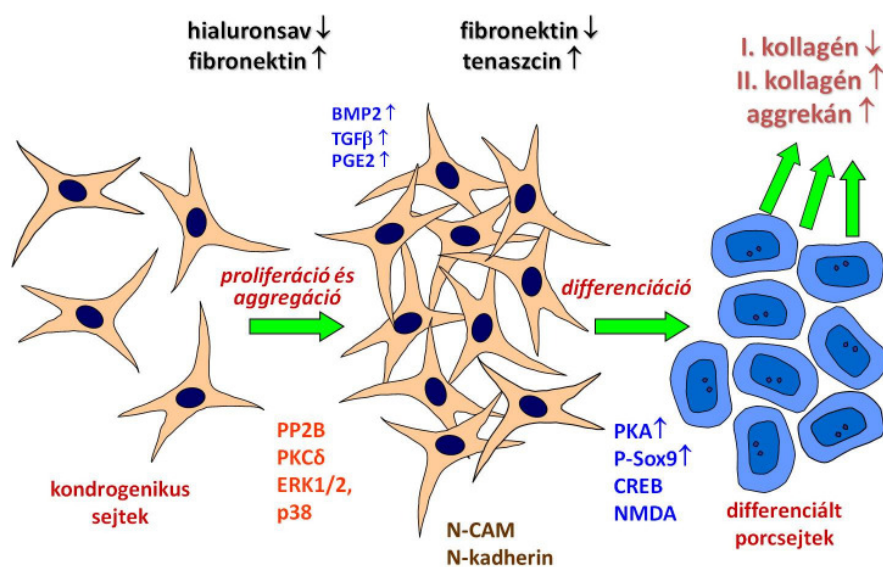
2.3. A porcdifferenciáció lépései

A mezenchimális sejtek bonyolult, többlépes folyamat során differenciálódnak kondrocitákká. Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* porcdifferenciáció fontos kezdeti lépése a kondrogenikus sejtek kisebb sejtcsoportokba való kondenzációja. A kondenzálódott sejtek morfológiailag megkülönböztethetetlenek a többi mezenchimális sejtől. Az aggregátumok kialakításában számos faktor összehangolt működése játszik szerepet, melyek között a sejt-sejt és a sejt-matrix kapcsolatok kialakulásának, egyes citokinek hatásának, valamint a citoskeleton szerkezetének átalakulásával párhuzamosan észlelhető sejtalkalakulásoknak tulajdonítunk kiemelkedő fontosságot (2.2. ábra).

A kísérleteink során használt HD mezenchimális kultúrákban a kondrogenikus sejtek kondenzációja az első tenyésztési nap folyamán zajlik, majd a második és harmadik napon a nodulusok sejtjei porcsejteké differenciálódnak [19]. A korai sejt-sejt kapcsolatok a kondrogenikus sejtek felszínén megjelenő N-CAM és N-kadherin molekulák révén valósulnak meg [21], de a szomszédos sejtek között számos gap junction is megjelenik [22]. A TGF β -családba tartozó citokinek a differenciáció több fázisában is befolyásolják a porcképződést [23,24]. A bone morphogenetic proteinek (BMP) például nagy mennyiségben vannak jelen a kolóniákban a sejtkondenzáció során, a kondrogenikus sejtek pedig ebben a fejlődési stádiumban és a kondenzációt közvetlenül követő differenciáció során nagy számban expresszálják felszínükön a BMP-k megkötéséhez szükséges receptorokat is [25]. *In vivo* az ízületi porc végleges kialakulásához fontos megemlíteni a BMP2 és BMP7 kényes egyensúlyát, melyek az egyes fejlődési napokon pozitív, de akár negatív hatással is lehetnek a porcképződésre [6].

A sejtek felszínén, valamint az intracellulárisan zajló változások mellett a differenciálódó sejteket körülvevő ECM is jelentős átalakulásokat megy keresztül. A sejtkondenzációt megelőzően és annak során a kondrogenikus sejtek nagy mennyiségű fibronectint deponálnak az ECM-ba, miközben felszínükön fibronectint kötő integrinek (elsősorban $\alpha 5\beta 1$) expresszálódnak. A sejtaggregátumok kialakulását követően mind a fibronectintermelés, mind az azt kötő integrinek expressziója erősen csökken [26]. A gerincesek végtagbimbóinak kialakulásában számos olyan faktor vesz részt, melyet *in vivo* körülmények között az

oldallemez mezoderma sejtjei szekretálnak és parakrin úton indukálják a végtagbimbók megjelenését. Ilyen növekedési faktorok közé tartozik a FGF10, valamint a WNT proteinek a közül a WNT2b a csirke szárnyának, a WNT8c a csirke lábainak megjelenésért felelős [27]. Ezen kívül számos Hox gén vállal szerepet a végtagbimbó fejlődési helyének lokalizációjában, így pl. a Hoxa13 a csirke végtagbimbóiban kialakuló nodulusok formálódásáért felelős [28]. A végtagbimbók mezenchimájának központi részében a hialuronsav-koncentráció a kondenzáció fázisa előtt csökken [29], viszont az I. típusú kollagén koncentrációja ekkor a legmagasabb, majd a porcsejtté való differenciálódás után fokozatosan visszaesik [30]. A sejtek a továbbiakban megkezdik a porcspecifikus ECM-makromolekulák szintézisét, valamint a megkötésükhöz szükséges receptorok expresszióját. A HD-kultúrákban ezzel teljesen analóg módon a harmadik tenyésztési nap második felétől lehet metakromáziás festéssel porcmatrixot detektálni. A differenciációt követően egyre nagyobb mennyiségben szintetizálódó II. típusú kollagén és aggregán teljesen körülvézi a porcsejteket. Ez az egyedi összetételű ECM nagy fontossággal bír a porcsejtek végleges fenotípusának kialakításában és fenntartásában [13].



2.2. ábra A porcdifferenciáció lépései. A HD-kultúrák sejtjei több lépésből álló, igen érzékeny és szigorúan szabályozott egymás utáni differenciációs lépések során hat nap alatt hialinporcot hoznak létre.

2.4. A porcdifferenciációt szabályozó jelátviteli folyamatok

A porcdifferenciáció egyes lépéseinek bonyolultságát jellemzi, hogy több különböző gén vagy transzkripciós faktor hiánya a differenciáció kaszkádfolyamatának felborulásához,

azaz a porcképződés leállításához vezet. A kondrogenezist irányító mestergén a *sox9*, melynek fehérjeterméke a HMG (High Mobility Group) típusú, a nemi determinációt meghatározó Sry fehérjével rokon transzkripciós faktor [31]. A Sox9 specificitását jelzi, hogy nagyon kevés szövetben fordul elő, így pl. herében, illetve melanocitákban mutatták ki expresszióját [32]. Az ízületi porc differenciációja során a Sox9 kötődése a duplaszálú DNS kis árkához, a *Col2a1*, *Col9a1*, *Col11a2* gént aktiválva, megindítja a II. típusú kollagén és aggregán tengelyfehérjéjének szintézisét [33]. A Sox9-et a kondroprogenitor sejtekben a korai differenciálódási szakaszban jelen lévő Shh, BMP és FGF által regulált jelátviteli útvonalak szabályozzák [34,35]. A Sox enzimesalád két másik tagja; a Sox5 és Sox6 is a Sox9 egyfajta kooperációs partnereként vesz részt az ízületi porc érési folyamataiban, ezért számos olyan tanulmány született, melyben a porcdifferenciáció elengedhetetlen Sox-triójának nevezik ezen transzkripciós faktorokat [34,36]. A Sox9 aktívabb, foszforilált formája is jelen van a porcdifferenciáció során, ugyanakkor a P-Sox9 jelenléte nem feltétele a kondrogenezisnek, csak annak mértékét befolyásolja [31]. A jelátviteli útvonalakban résztvevő kinázok és foszfatázok tehát ilyen módon megemelhetik a Sox9 transzkripciós aktivitását és pozitív vagy negatív hatással lehetnek a porcképződésre.

A génexpressziót szabályozó különböző fehérjék aktivitásának egyik legfontosabb mechanizmusa a reverzibilis fehérje foszforiláció [37], melynek során a foszforilációért felelős protein-kinázok, valamint a foszfátcsoportok lehasítását katalizáló protein foszfatázok működése precízen összehangolt. A foszforilálódó fehérjék nagy része (több mint 90 %-a) Ser és Thr, kisebb hányada pedig Tyr aminosav-oldalláncokon foszforilálódhat. A Ser/Thr-specifikus kinázok aktivitása révén foszforilált fehérjék defoszforilálását a foszfo-Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok (PP) katalizálják. A Ser/Thr protein kinázok és foszfatázok, valamint a protein Tyr kinázok és foszfatázok struktúrája, illetve tulajdonságaik jelentősen különböznek, melyből következik a foszforilációs és defoszforilációs mechanizmusok katalizálásának különbsége is [38]. A citoszolban, illetve a sejtmagban számos Ser/Thr-specifikus protein kinázt ismerünk, néhányuk a teljesség igénye nélkül felsorolva: cAMP-függő protein kináz (PKA), cGMP-függő protein kináz (G-kináz), protein kináz C (PKC), Ca²⁺-kalmodulin-függő protein kináz (CaM-kináz), foszforiláz kináz, mitogén aktivált protein kináz (MAP-kináz). Ezen kinázok közül számos Ca²⁺ szenzitív és aktivitásukat az extracelluláris környezetből, vagy intracelluláris raktárakból a citoszólba beáramló Ca²⁺ szabályozza.

2.4.1. A Ser/Thr protein kinázok kondrogenezisben betöltött szerepe

A Ser/Thr-specifikus protein kinázok közé tartozó cAMP-függő protein-kináz A (PKA) a kondrogenezis során foszforilálja a Sox9-et, ezzel megnövelve a porcspecifikus ECM alkotó II. kollagén és az aggregán tengelyfehérje génjeinek expresszióját, s ezáltal az azokról átíródó fehérje mennyiségét is [39]. A PKA másik lehetséges targetmolekulája a CREB (cAMP Response Element Binding Protein), melynek foszforilációja a kondrogenikus sejtekben mind cAMP, mind BMP2 hatására kimutathatóan megemelkedik és a kondrogenezis pozitív regulátoraként ismerjük [40].

A MAP kináz útvonalak kaskád rendszereket alkotnak, melyekben a MAPK aktiválódását a Thr-X-Tyr motívumon bekövetkező egyidejű Thr és Tyr foszforiláció kell, hogy megelőzze. A MAP kinázokat kettős specifitással bíró MAPK kinázok foszforilálják míg az inaktiváció a MAPK foszfatázokon keresztül történik. A MAPK szupercsalád három fő, de eltérő útvonalat alkot: ERK1/2, p38 és JNK [41], melyek közül az utóbbi kettő főleg a celluláris stressz válaszaként aktiválódik, míg az ERK1/2 elfogadottan az extracelluláris mitogenikus stimulusok fő mediátora és fontos szerepet játszik számos sejt differenciációjában is. Ismert, hogy a MAPK-nak alapvető feladata van a kondrogenikus sejtek sorsának kialakításában: a p38 útvonal stimulálja, míg az ERK1/2 gátolja a porcképződést [42]. Az ERK1/2 útvonal, részben különböző PKC-kal, illetve a kalcineurinnal [43] való kapcsolatának köszönhetően, Ca^{2+} érzékeny, és számos más Ca^{2+} érzékeny útvonal stimulálása is rajta keresztül történik.

A Ser/Thr-specifikus protein kináz C enzimek az eukarióta sejtek számos jelátviteli útvonalának, többek között a sejtosztódás, az apoptózis szabályozásának fontos tagjai, de akár stressz-szenzorként [44] is működhetnek. A PKC enzimesalád első tagjait az 1970-es évek végén Nishizuka laboratóriumában mutatták ki először [45] és több jellemző tulajdonságát írták le. A PKC-t Ca^{2+} -ionok jelenlétében intracellulárisan a foszfatidil-szerin (PS) és a diacilglicerol (DAG) aktiválja, de az enzim *in vitro* aktiválásában különböző forbol-észterek; PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) is részt vesznek. Az enzimesalád azóta már több mint 13 izoformát foglal magába [46,47], elsőként a PKC α , PKC β és a PKC γ izoformát azonosították, később számos új taggal bővült az enzimesalád, a PKC δ -, ϵ - és ζ -izoformák, majd legvégül a PKC η -, PKC θ - és PKC ι -izoformák kerültek leírásra [48-50]. A legújabb enzimeket, a PKC μ -t (PKD), – amely enzim hovatartozása azóta vita tárgyát képezi – valamint a PKC-hez hasonló kinázokat (PKC-related kinase, PRK) csak a 90-es évek közepén írták le [51,52]. A PKC-

izoenzimeket az N-terminálison elhelyezkedő regulatórikus doménszerkezetük és aktiválhatóságuk alapján alcsoportokba sorolták [53,54].

A klasszikus PKC-k (conventional PKC – cPKC) közé a PKC α , a PKC β _{I/II} és a PKC γ tartozik. A cPKC-izoenzimeket a PS Ca²⁺-dependens módon aktiválja, a DAG pedig fokozza a PS és a Ca²⁺ iránti érzékenységet, ezáltal növeli az enzim aktivitását. PMA alkalmazása esetén a cPKC-k aktiválásához kisebb Ca²⁺-koncentráció is elégséges, DAG viszont ebben az esetben akár nélkülözhetővé is válik. A klasszikus PKC-izoenzimek farmakológiai gátlószerekként a Gö6976 és a GF109203X használatos.

Az új típusú PKC-k (novel PKC – nPKC) tagjai közé sorolhatók a PKC ϵ , a PKC η , a PKC δ és a PKC θ . Aktiválódásukhoz Ca²⁺-ionok jelenléte nem szükséges, de PS jelenlétében DAG-gal és forbol-észterekkel funkciójuk stimulálható. Az új típusú PKC-k általános farmakológiai gátlószerekként a GF109203X-et tartják, ezen kívül a 2000-es évek közepéig a rottlerint is a PKC δ specifikus gátlószerekként tartották 3-6 μ M koncentrációban alkalmazva.

Az atípusos PKC-k (aPKC) közé tartozik a PKC ι , PKC λ és a PKC ζ . Az aPKC-k aktiválódásához sem szükséges Ca²⁺-ionok jelenléte, illetve forbol-észterekkel és DAG-gal sem aktiválhatók, elsősorban foszforiláció útján válnak katalitikusan aktívvá. Az atípusos PKC-kat is lehet gátolni Gö6976-tal.

Funkciójukat, aktivációs mechanizmusukat, nagy inhibitorikus és regulatórikus doménjüket tekintve további osztályba sorolható a PKC μ (PKD1) [55] és a többi PKD-izoenzim: a PKD2 és a PKD3 (vagy PKC ν).

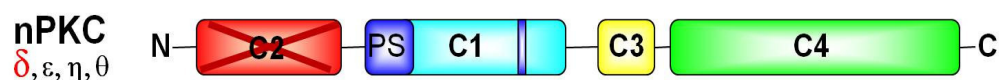
Nemcsak az említett PKC-nek van ennyire nélkülözhetetlen szerepe, laboratóriumunkban korábban már kimutattuk, hogy a PKC μ gátlása is a porcdifferenciáció csökkenéséhez vezet. A PKC aktivitás a kondrogenézis előrehaladtával folyamatosan emelkedik és nélkülözhetetlen annak megfelelő végbemeneteléséhez, ugyanis számos ECM alkotó, pl. II. kollagén, egyes PG-ok szintézisét szabályozzák. Ca²⁺-ionok hiányában egyes enzimek aktivációja elmarad vagy zavart szenved így közvetve ugyan, de csökkent porcképződést eredményeznek [56].

2.4.1.1. A PKC δ szerkezete és funkciói

A nPKC-k közé tartozó PKC δ -t a Scr kináz család tagjai Tyr oldalláncon foszforilálhatják, ebben az esetben lipid-független enzimekként is működhet [57]. Az egyes PKC-izoformák szöveti, sejtes és intracelluláris megoszlása nem azonos, egy sejtfeleség általában több

izoenzimtípust is expresszál, azonban a PKC δ -t majdnem minden szövetben kimutatták [58]. Különös ismertetőjegye, hogy számos sejtben zajló folyamat negatív regulátoraként is ismert, így pl. a proliferáció szabályozásában, vagy akár az apoptózis elindításának regulálásáért is felelőssé tehető [44,59-61]. A PKC δ funkcióját nagyon nehéz egy mondatban összefoglalni, esetenként sejt- vagy szövet-specifikus, de leginkább a proliferációs és antiproliferációs szignálok közötti kényes egyensúly fenntartásában játszik fontos szerepet.

A PKC δ aminosavszekvenciája 58%-ban megegyezik a PKC α -éval, valamint a nPKC alcsofajra jellemző módon rendelkezik egy karboxiterminális végen elhelyezkedő katalitikus doménnel, mely két konzervált régiót tartalmaz, a C3 és C4 szakaszt (2.3. ábra). Ez utóbbi két régió elengedhetetlenül fontos a katalitikus aktivitás, illetve szubsztrátkötés létrejöttéhez. Az amino terminális végen találunk egy regulatórikus domént, amelyen megjelenik az inhibitorikus pszeudoszubsztrát szekvencia is [58].



2.3. ábra A PKC-izoenzimek doménszerkezete. A C1-domén csak a cPKC-kben és az nPKC-kben található meg. A C2 domén, mely Ca²⁺ kötésért felelős a nPKC-ben nem található meg. A katalitikus alegységen elhelyezkedő C3-domén az ATP kötőhelyet, a C4-domén pedig a szubsztrátkötőhelyet és a katalitikus alegység többi részét tartalmazza.

A PKC δ specifikus farmakológiai inhibitorának tekintik a polifenolszármazék rottlerin [5,7-dihidroxi-2,2-dimetil-6-(2,4,6-trihidroxi-3-metil-5-acetilbenzil)-8-cinnamoil-1,2-chromén], amelyet egy indiai esőerdőben élő fából; a *Mallotus philippinensis*-ből izoláltak. Az inhibitor 3-6 μ M-os koncentrációban 30-40-szer erősebben gátolja a PKC δ -t, mint más PKC enzimeket [54], habár számos olyan tanulmány jelent meg, amely a gátló hatást más kinázokon sokkal hatékonyabbnak véli, így pl. PRAK, MAPKAP-2 kinázokon [62], valamint gátló hatást fejtett ki CaMK III és Akt/PKB kinázokra is [63]. Ezen kívül számos malignus elváltozásban a rottlerin a celluláris folyamatok széles tárházát befolyásolhatja pl. a tüdőrák, mellrák, leukémia és mielóma sejteinek apoptózisát, glióma sejtek osztódóképességét, valamint befolyásolhatja egyes tumorsejtek migrációs aktivitását is [58,64-66]. A közelmúltban Choi és munkatársai leírták, hogy a rottlerin PKC δ független módon, az integrin β 1 fokális adhézis komplex modulálásán keresztül befolyásolja a prekondrogenikus mezenchimális sejtek migrációját [63]. A PKC δ -nak a porcképződés további szakaszaiban betöltött szerepéről nincsenek irodalmi adatok.

2.4.2. A Ser/Thr foszfatázok szerepe a porcdifferenciációban

A PPK-nak a sejtdifferenciációs folyamatokban betöltött szerepéről meglehetősen szegényes az irodalom. Munkacsoportunk korábban már beszámolt a PP2A porcdifferenciáció szabályozásában játszott negatív szabályozó hatásairól [67], illetve a kalcineurin meghatározó szerepéről a porcsejtek oxidatív stresszre adott válaszában [68].

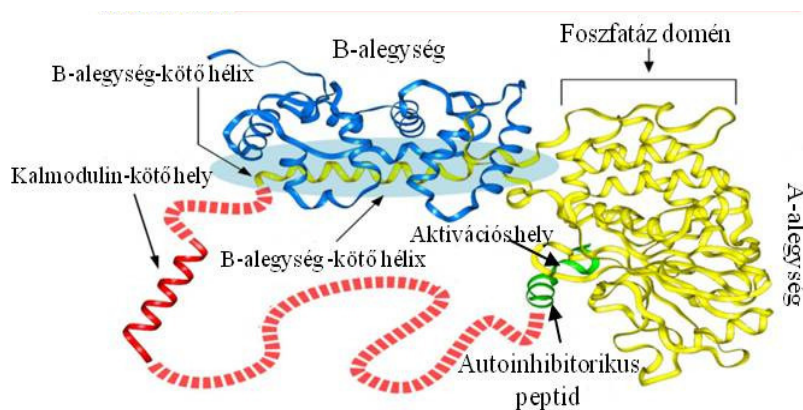
A Ser/Thr-specifikus PP enzimek családjába tartozó katalitikus alegységek felosztása szubsztrátspecificitásuk, illetve inhibitorok iránti érzékenységük alapján történik. A PP1 az emlős foszforiláz kináz β -alegységét defoszforilálja, inhibitor-1 (I1) és inhibitor-2 (I2) fehérjékkel gátolható. A PP2 tagjai az emlős foszforiláz kináz α -alegységére specifikusak és nem gátolhatók I1 és I2 fehérjékkel. A PP2 családon belül 3 alosztályt különítünk el: PP2A, PP2B és PP2C. A PP2A okadainsavval gátolható, a PP2B, vagy más néven kalcineurin Ca^{2+} -kalmodulin függő, gátlása immunszuppresszív anyagokkal történik (CSA és FK506), a PP2C pedig Mg^{2+} , ill. Mn^{2+} ion-függő [69].

2.4.2.1. A PP2B (kalcineurin) szerkezete

A kalcineurint az emlős szövetek szinte majdnem mindegyikében azonosították, legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszer területén van jelen [70], de megtalálható a zsírszövetben, az oszteoklasztokban, a szívben, a májban és a gerincvelőben is [71]. Számos transzkripció faktor aktivitását szabályozza, és kiemelkedő szerepet játszik a mezenchimális sejtek differenciációjában is [72].

A kalcineurin az eukarióta sejtekben heterodimer szerkezetű, egy katalitikus alegységből (kalcineurin A): 57-59 kDa és egy regulátor alegységből (kalcineurin B): 19 kDa áll. A kalcineurin aktív része az A alegységen lokalizált. Szinte valamennyi eukarióta szervezetben a kalcineurin A gének olyan polipeptideket kódolnak, amelyek az evolúció során annyira konzerváltak, hogy szinte teljesen megegyeznek más fajok Ser/Thr protein foszfatázainak hasonló alegységével. Az A alegység a -COOH végen három olyan regulatórikus domént tartalmaz, melyek alapján a kalcineurin elkülöníthető a PP-család más tagjaitól; ezeket kalcineurin B alegységét kötő, kalmodulin-kötő és autoinhibitorikus doméneknek nevezik (2.4. ábra). Különösen fontos az autoinhibitorikus domén, mely kalmodulin hiányában az aktív helyhez kötődik, és ezzel megakadályozza az enzim működését. Amikor a kalcium-kalmodulin komplex hozzákötődik az enzimhez, akkor egy olyan konformáció-változás történik, aminek köszönhetően szabaddá válik az aktív hely. A B alegység egy ennél sokkal egyszerűbb szerkezetű polipeptid, mely egyik legfontosabb

funkciója, hogy rajta helyezkedik el a Ca^{2+} -kötő domén. A működésének szabályozása rendkívül bonyolult, hiszen foszforilációval is aktiválható, mely foszforilációt a PKC-k, a kazein kináz I és kazein kináz II is elvégezheti [73]. A kalcineurin B alegységén azonosított kalcium kötőhelyen nagy affinitással képes 4 Ca^{2+} -iont megkötni, melyen keresztül nagyon fontos szerepet tölthet be a Ca^{2+} szignalizációs útvonalak aktivitásának szabályozásában [74].



2.4. ábra A kalcineurin szerkezete. A tisztított kalcineurin az emlős szövetekben heterodimer szerkezetű, az A alegysége (sárga) tartalmazza a globuláris szerkezetű foszfátáz domént, egy helikális szerkezetű B alegység-kötő szakaszt (sárga), a kalmodulin kötő domént (piros), az aktivációs helyet is tartalmazó foszfátáz domént (zöld), valamint az autoinhibitorikus domént (zöld). A B alegység sokkal kisebb tömegű és legfontosabb funkciója a Ca^{2+} kötőhely lokalizációja (kék). Módosítva Human genom News 2002 adatai alapján.

A kalcineurin fő targetjének a transzkripciós faktorok családjába tartozó NFAT-t (Nuclear Factor of Activated T-cell) tartják. Az NFAT foszforilált állapotban a citoplazmában van jelen, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése a kalcineurin aktivitását fokozza, azaz a kalcineurin defoszforiláló hatására, az NFAT a sejtmagba juthat és transzkripciós folyamatokat indíthat be. Kondrogenikus mezenchimális sejtekben az NFAT4 aktivációja fokozott BMP2-termeléshez, és így a differenciálódás elősegítéséhez vezet [72].

A PP2B leghatásosabb, legspecifikusabb és legismertebb inhibitorai immunosuppresszív anyagok, ilyen pl. a ciklosporin-A (CSA) és FK506 (tacrolimus), melyek a kalcineurint citoplazmatikus receptoraikkal a ciklofilinnel és FKBP-vel alkotott komplexek révén gátolják [75].

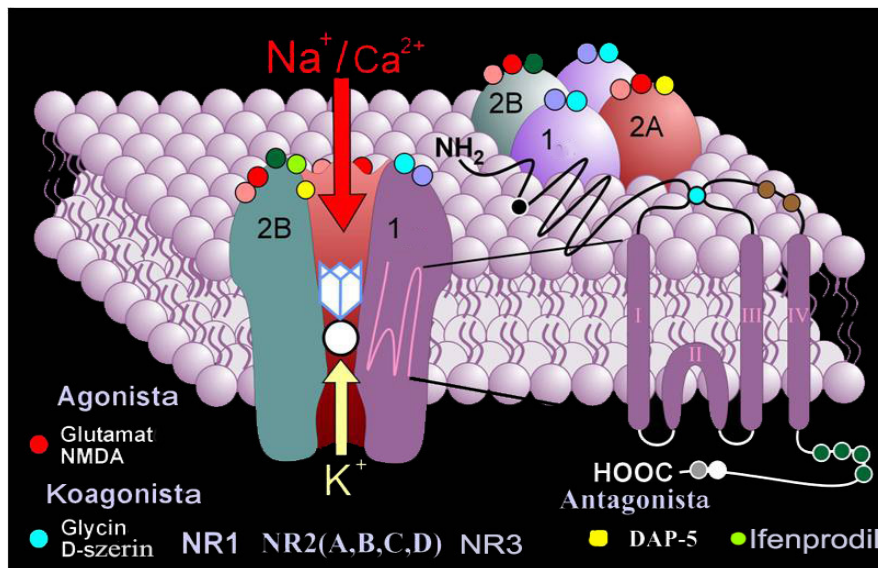
2.5. A Ca^{2+} -homeosztázis jelátviteli útvonalakra kifejtett hatásai a porcdifferenciációban

A legtöbb gerinces sejtjében az intracelluláris citoszolikus szabad Ca^{2+} koncentrációja megközelítőleg 10^{-7} M, azaz több mint 10 000-szer kisebb, mint az extracelluláris folyadék kalciumion tartalma, mely 10^{-3} M. Számos stimulus vált ki Ca^{2+} -mozgást, akár az extracelluláris közegből, akár az intracelluláris raktárakból (endoplazmatikus retikulum) a citoszól irányába. A Ca^{2+} intracelluláris koncentrációjának megemelkedése a porcdifferenciáció során számos Ca^{2+} -függő kináz, foszfatáz működését módosítja; általában véve a cPKC-ok, de különösen fontos megemlíteni a PKC α -t [76] vagy a kalcineurint [68,72]. Az *in vitro* kondrogenézis során a citoszolikus szabad Ca^{2+} -koncentráció változása összefüggést mutat a differenciáció egyes lépéseivel, valamint az extracelluláris Ca^{2+} elvonása a porcképződés csökkenésével jár. Azt is elmondhatjuk, hogy a Ca^{2+} -ionok túlzott jelenléte a kondroprogenitor sejtekben nem segíti elő a porcképződést, azaz a porcdifferenciáció során a Ca^{2+} -koncentráció szabályozása igen precízen történik [74]. Számos kísérlet bizonyítja, hogy a Ca^{2+} -ionok oszcillációja is fontos szerepet játszik a mezenchimális sejtek differenciációs folyamataiban. Saját, még eddig nem publikált eredményeink is arra utalnak, hogy a differenciáció elején igen élénk, nagy amplitúdójú és szokatlanul magas frekvenciájú Ca^{2+} -oszcillációk figyelhetők meg a kondroprogenitor sejtek differenciációja során. Ez a porcdifferenciáció egyik igen fontos momentuma lehet, hiszen a citoszolikus kalciumszint emelkedése egyes transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozása révén befolyásolja a génexpressziós változásokat.

A Ca^{2+} -ionok ilyen jellegű ki és belépését a sejtekbe számos Ca^{2+} -szenzitív csatorna, receptor szabályozhatja. Ide tartoznak pl. a feszültségvezérelt csatornák mellett a ligand- vagy receptorvezérelt kalciumcsatornák. Meglepő módon a neuronokon azonosított NMDA-receptorok (N-metil-D-aszpartát) az utóbbi néhány évben számos non-excitábilis sejten is kimutatásra kerültek, pl. oszteoblasztokon, melanocitákon, de kondrocitákon is [77-79]. Hasonlóan fontosak lehetnek az extracelluláris nukleotidok receptoraiként működő ionotrop P_2X -purinoreceptorok is, melyek fontos szabályozó szerepet töltenek be a kondrogenézis során [80]. Természetesen a differenciálódó porcsejteken a lehetséges Ca^{2+} -csatornák száma nagyon sok lehet, itt csupán a disszertáció szempontjából fontos receptorok egyikével foglalkozom részletesebben.

2.5.1. Az NMDA receptor felépítése

Az NMDA receptor az ionotrop glutamát receptorok (AMPA, Kainát, NMDA) egyike, melyek szerkezetéről és funkciójáról leginkább excitábilis sejtek tanulmányozása adott bővebb információt. Az NMDA receptor elsősorban Ca^{2+} -ionokat juttat az extracelluláris térből az intracelluláris térbe, ugyanakkor kisebb mértékben Na^+ és K^+ ionokra is permeábilis. Az NMDA receptor heterotetramer felépítésű, négy transzmembrán (TM) domén alkotja (2.5. ábra). A csatorna nyitását vagy záródását a nyugalmi membránpotenciál változás váltja ki, ez neuronok esetében -70 mV-ról történő depolarizációt jelent, ebben az esetben a csatornaképző 2. TM doménjában a Mg^{2+} blokk felszabadul és a csatorna nyitott állapotba kerül [81]. Az extracelluláris térben helyezkedik el az N-terminális régió, mely magában foglalja az 1. TM domént, ami a csatorna természetes ligandjainak kötődésért felelős, ezen a területen található a glicin-kötőhely, mely a csatorna koaktiválásában vesz részt [82].



2.5. ábra Az NMDA receptor szerkezete. Az NMDA receptor olyan heterotetramer, melyet általában két NR1 és két valamilyen NR2 alegység alkot. Nyugalmi állapotban a csatornában egy Mg^{2+} blokk van (fehér körrel jelölve), mely aktiváció hatására eltávolítódik, ami megváltoztatja a csatorna konformációját és leginkább Ca^{2+} áramlik be a sejtbe. A receptor agonistái és antagonistái általában az extracelluláris domének valamelyikéhez kötődnek. A kép módosítva Chris Parsons munkája alapján (www.chrisparsons.de/Chris/nmda.htm).

Az NMDA receptor három alegységét azonosították, az NR1-et, az NR2-t és az NR3-at, melyek közül az NR1 alegység minden esetben csatornaképző komponens, míg a másik két alegység közül rendszerint az egyik vesz részt a receptor alkotásában, de ismert triheterotetramer felépítésű NMDA csatorna is [83]. Az NR1 alegység esetleges hiánya a csatorna formálódásának gátlásához és teljes funkcióvesztéshez vezet. Az NR2 alegységnek

több alcsaládját leírták, ezek az NR2A, NR2B, NR2C és NR2D, melyek eltérő varianciában lehetnek a receptorok részei. Az NR2 alegység típusa meghatározó a csatorna fiziológiai tulajdonságait, csatorna nyitási sebességét, konduktanciáját illetően, valamint a csatorna ionszelektivitására is hatással lehet [84]. Az NR3 alegységeket két alcsaládra oszthatjuk; NR3A és NR3B. Ezek az alegységek glicint kötnek és csökkentik a csatorna Ca^{2+} konduktanciáját, de pontosabb funkciói még nem ismertek [85,86].

Az NMDA receptor számos antagonistáját és agonistáját ismerjük; agonistaként a glutamát és az NMDA (melyről a receptor a nevét kapta) említhető. Az antagonisták tárháza sokkal szélesebb területet ölel fel, vannak ún. általános NMDA antagonisták, melyek alegység összetételtől függetlenül képesek gátolni a receptor működését DAP-5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid) (2.5. ábra). Ezen kívül vannak olyan antagonisták, melyek alegység-specifikusak, ilyen pl. az ifenprodil, illetve az MK-801 melyek az NR2B alegységet tartalmazó receptorok szelektív antagonistái [83]. Az NR3 alegységek specifikus agonistája, vagy antagonistája eddig még nem ismert. Az említett molekulákon kívül egyes ionok is hatással lehetnek a csatorna működésére, pl. a Zn^{2+} non-kompetitív módon feszültségaktiválástól függetlenül gátolja a csatorna működését [87].

Az NMDA receptoron bejutó Ca^{2+} -ionok számos jelátviteli útvonalat szabályozhatnak, de akár az NMDA receptor egyes alegységeit foszforiláló kinázok és defoszforilációt végző foszfatázok aktivitására is hatással lehet. Több kísérletes bizonyíték született, mely az NR1 alegység és PKA kapcsolatát valószínűsíti, illetve különböző PKC-k is foszforilálhatják a receptor alegységeit [88]. A protein foszfatázok szerepéről még keveset tudunk, azonban vannak adatok arra vonatkozólag is, hogy a PP1, PP2A és PP2B is részt vehet az egyes alegységek defoszforilációjában [89].

Az elmúlt évtizedben az NMDA receptorok jelenléte azonosításra került kondrocitákban is [86,90], ahol megtalálása igen érdekes ténynek bizonyul, hiszen az ízületi porc beidegzés nélküli avaszkuláris szövet, amelyben így a feszültségfüggő csatornák meglétének oka és funkciója még nem teljesen tisztázott. Bizonyos adatok arra engednek következtetni, hogy az NMDA receptorok egyfajta mechanotranszduktorként működnek [77], azonban arra nézve nincsenek kísérletes eredmények, hogy milyen szerepet tölthetnek be a kondrogenikus sejtek differenciációja során.

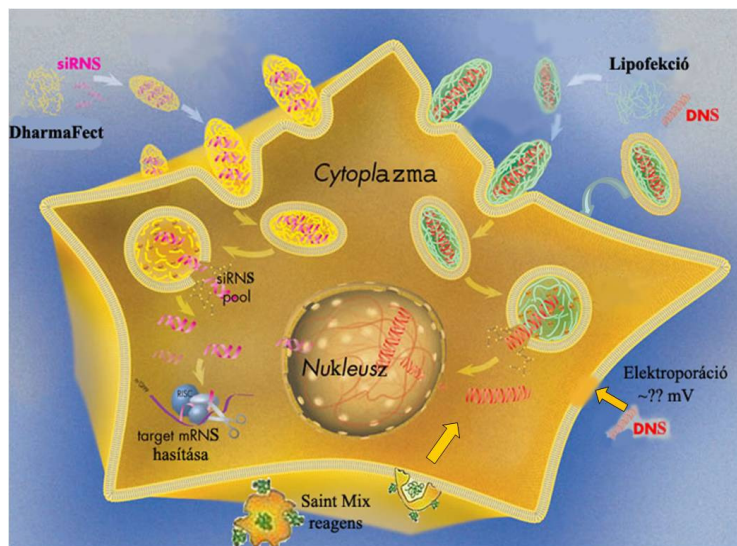
2.6. Transzfecció módszerek a sejtenyésztő laboratóriumokban

A korábban részletezett és felsorolt kinázok, foszfatázok és receptorok funkcióinak és porcdifferenciációban betöltött szerepének, vagy a kondrogenézisre gyakorolt hatásainak

vizsgálatára leginkább farmakológiai inhibitorokat használnak, azonban számos olyan tanulmány ismert, amelyek az egyes inhibitorok specificitását erősen megkérdőjelezzik [91]. A mai molekuláris biológiai technikák lehetővé teszik, hogy egyes fehérjéket túltermeltesünk bizonyos sejtekben, vagy adott esetben expressziójukat géncsendesítéssel minimálisra csökkentjük. Ezen technikák alkalmazása a legtöbb biokémiai vagy molekuláris biológiai laboratóriumban honos, így a változások jól megfigyelhetőek eltérő eredetű sejtvonalakban, akár egy sejtet kiemelve. A bonyolultabb háromdimenziós differenciálódó primer sejtenyészetek azonban igen érzékenyek az ilyen beavatkozásokra és kevés olyan módszer áll rendelkezésünkre, amely megoldaná a felmerülő problémákat. Az eukarióta sejtekbe történő plazmid, RNS és antiszensz oligonukleotidok transzfecció révén történő bejuttatása alapvető fontosságú módszer a különböző gének és enzimek funkciójának, szerkezetének és sejtben belüli elhelyezkedésének *in vivo* és *in vitro* tanulmányozásában.

A transzfecció módszerek ősenek tekinthetjük a kalcium-foszfát koprecipitációt, mely a mai technikákkal szemben már háttérbe szorult, és számos technológiai újítás egyszerűsíti a transzfecció folyamatokat, pl. az elektroporáció, vírus irányította transzfecció, mikroinjekció, lipofekció [92-96]. Az eukarióta sejtek transzfecció lehetőségeinek hatékonysága változó sikereket hozott, ui. a transzfecciót követően a bejuttatott DNS-fragmentum expresszálódik ugyan, de a transzfecció eredménye nagymértékben függ a felhasznált sejtípustól, a bejuttatott fragmentum méretétől, illetve a transzfecció közeg összetételétől is, így egy sikeres transzfecció a valódi funkciótól függetlenül fokozott citotoxicitást eredményezhet [97]. A transzfecció különösen nehéz feladat primer differenciálódó sejteken, hiszen ezek a sejtek lényegesen érzékenyebbek a külső behatásokra, és a transzfecció következtében megváltozhat differenciációs készségük is [98], ugyanakkor a primer sejtek sikeres transzfecciója fontos lehet terápiás alkalmazások vizsgálatában, vagy akár gyógyszerek fejlesztésére irányuló kísérletekben is. Ha primer sejtekkel nagy mennyiségben idegen fehérjét (például GFP-t) expresszáltatunk, mely expresszióját erős virális promoterek (CMV vagy SV40) irányítják, a sejtek normál folyamatai, vagy a sejt differenciációs lépései nagymértékben módosulhatnak [97]. Az elektroporáció sikeressége számos sejtípustban megkérdőjelezhetetlen, azonban a transzfecciót sejt populáció nagy részében az alkalmazott feszültség következtében a membránt érő mikrosérülések olyan károkat okozhatnak, mely a sejtek elhalásához vezet [99]. A leggyakrabban használt non-virális transzfecció módszer a lipofekció (2.6. ábra), amely során a bejuttatni kívánt plazmidot, RNS-t vagy oligonukleotidot egy liposzómamembrán veszi körül és a membránba olvadva bejuttatja a sejtbe [92]. Manapság számos olyan szintetikus non-liposzómális

transzfer rendszer is létezik, melyekben egy kationos piridinium csoport képes a DNS vagy más nagyméretű, negatív töltésű molekulához kötődni és átfordulva a membránon a fragmentumot a citoplazmába juttatja. Ez utóbbi technika alkalmas nagyon érzékeny sejtek *in vitro* és *in vivo* transzfekciójára is, számos sikert értek el génterápiás kísérletekben anélkül, hogy számottevő citotoxikus hatást detektáltak volna [100,101].



2.6. ábra Az eukarióta sejtek transzfekciós lehetőségei. A transzfekciós lehetőségek típusától függően képesek bejuttatni a kívánt fragmentet a citoplazmába, kis liposzómákba csomagolva, endoszómaképződéssel, apró lyukak készítésével, vagy egy molekula kötődésével majd átfordulásával. A kép módosítva a www.polyplus-transfection.com alapján.

2.6.1. Transzfekciós lehetőségek a "high density" kultúrákban

Az általunk használt primer mezenchimális sejtekből létrehozott HD-kultúrákban a kondrogenikus sejteknek nagyon nagy sűrűségűnek kell lennie (15 millió sejt milliliterenként) ahhoz, hogy spontán képesek legyenek porccá differenciálódni. Azaz több mikrométer vastagságú sejtréteget figyelhetünk meg, valamint a 6 nap alatt kialakult porctelegek szerkezete inkább tekinthető egy háromdimenziós szövetdarabkáknak, mint egyszerű sejtenyészetnek. A sejtek relatív magas koncentrációja miatt a transzfekció sokkal nehezebben valósítható meg, mint egy „monolayer” kultúrában. A transzfekció hatékonysága a HD-sejtkultúrák esetében nagymértékben függ az alkalmazott módszertől, melyek közül számosat kizárhatunk a kultúrák szerkezetéből adódóan, pl. a mikroinjektálás során ilyen nagymennyiségű sejttömeget nem lehet rövid idő alatt sikeresen transzfektálni, valamint a Ca^{2+} -foszfát koprecipitációs transzfekció a differenciálódó sejtek mikrostruktúráinak rombolásával jár. A HD-kultúrákban az első három nap igen kritikus az expressziós vektor

bejuttatását illetően, ugyanis a kondrogenikus sejtek rendkívül érzékenyek, különösen a tenyésztés kezdetén, amikor nagy mennyiségű fehérjeexpresszió folyik. Kutatócsoportunk megpróbált találni és beállítani egy olyan transzfekciós módszert, amely kis- és nagyméretű fragmentumokat is be tud juttatni a differenciálódó sejtekbe anélkül, hogy a transzfekció a differenciációs folyamatokat megzavarná és a bejuttatott plazmid megfelelő ideig tartó expressziója biztosítható általa. Kísérleteink során megvizsgáltuk egy kináz, egy foszfatáz és egy receptor alegységének géncsendesítését sh- és siRNS technológiát alkalmazva, valamint két GFP-t is expresszáló PP2B plazmid bejuttatását és ezek porcdifferenciációra gyakorolt hatásait kísértük figyelemmel.

3. Célkitűzés

Az értekezés tárgyát képező kísérletek célja a porcosodó high density kultúrák molekuláris biológiai és biokémiai vizsgálati lehetőségeinek kiszélesítése és célzottan egy-egy enzim vagy receptor pontos szerepének feltárása volt a porcdifferenciáció során. Az ilyen jellegű vizsgálatok alapjait képezik az egyes fehérjék túltermeltetése vagy specifikus géncsendesítése. Az alkalmazott „high density” (HD) kultúrákban egyetlen egy sejt vizsgálata nem ad kielégítő választ a populáció folyamatainak teljes egészéről, valamint a kiragadott sejt differenciációs folyamatai teljes egészében megváltozhatnak az azt körülvevő extracelluláris matrix hiányában. Ugyanakkor azt is figyelembe kell venni, hogy a HD-kultúrák rendkívül érzékeny primer sejtek elegendőnek tekinthetők, melyek kémiai ágensekkel történő érintkezése megzavarhatja a differenciációs folyamatok megfelelő végbemenetelét. Tehát olyan génbeviteli technikák kidolgozásának kell megtörténnie, amelyek lehetővé teszik akár egy adott enzim túltermeltetését vagy esetleges géncsendesítését a sejtek igen nagy hányadában, mindamelllett, hogy a transzfekciós technika a lehető legkevesebb hatással legyen a differenciációs folyamatokra. A felvázolt technikák tökéletesítése és a transzfekciós kísérletek hiánya manapság is úrt képeznek porcdifferenciáció kutatási palettáján. Ezen egyszerű, ugyanakkor a mai tudásunk szerint nélkülözhetetlen metódusok beállítására a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. A transzfekciós technikák alkalmazhatóságának vizsgálata és eltérő plazmidok, sh-és siRNS bejuttatására alkalmas módszerek hatékonyságának vizsgálata.
2. Az egyes technikák alkalmazásának a sejtek apoptózisára, élet- és osztódóképességére gyakorolt hatásainak regisztrálása.
3. A transzfekciós módszerek porcdifferenciációra gyakorolt hatásainak elemzése specifikus markerek (Sox9 és aggrecán) expressziójának detektálásával.
4. Az optimálisnak vélt transzfekciós módszerrel calcineurin katalitikus alegységet kódoló vektorok tranzien transzfekciójának kivitelezése és a PP2B-overexpresszió hatásainak vizsgálata.
5. PP2B shRNS-t tartalmazó indukálható promóterű vektorrendszer bejuttatásának optimalizálása és a géncsendesítés hatásainak vizsgálata.

A kondrogenézis előrehaladtával számos kináz és korábbiakban is vizsgált foszfatáz aktiválódik és pozitív vagy negatív módon befolyásolják a porcsejtek differenciációs folyamatait. A PKC-k funkciója különös tekintettel fontos a mezenchimális sejtek fejlődési folyamatainak irányításában [56], ezen belül a nPKC-k csoportjába tartozó PKC δ funkciójáról és expressziós mintázatáról keveset tudunk. A beállított transzfekciós módszerek lehetőséget adnak arra, hogy ne csak a fehérje jelenlétét igazoljuk, hanem annak porcdifferenciációra gyakorolt hatásait is alaposabban megértsük. Ezért a következőkre voltunk kíváncsiak:

1. A PKC δ expressziója és aktivitása pontosan milyen jellegű a porcdifferenciáció során.
2. Az irodalomban a PKC δ specifikus inhibitorának mondott rottlerin 5 μ M koncentrációjának hatásai a porcképződés során.
3. A PKC δ génjének csendesítése shRNS segítségével és ennek hatásai a porcdifferenciáció eseményeire.

Az irodalomból ismert tény, hogy a mezenchimális sejtek a differenciálódás egyes lépéseivel párhuzamosan változó intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt igényelnek [102]. Ezen változások lehetnek hosszútávúak és nagyon rövid ideig fennmaradó; oszcilláló jellegűek. Kérdéses azonban, hogy ezen rövid kalciumtranziensek, vajon milyen csatornákon keresztül valósulnak meg. Még nem publikált kísérletünkben kimutattuk, hogy az NMDA receptor jelen van a porcdifferenciáció során, illetve egyes alegységei a differenciáció 1. és 2. napjától kezdve lokalizálódnak jelentős mértékben a porcsejtek membránjában. Disszertációm alapjául szolgáló kísérletekben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. siRNS technikával csendesített NR1hiánya expresszió milyen hatással van a porcképződés mértékére, differenciálódó porcsejtek élet- és osztódóképességére, valamint porcdifferenciációs markerek kifejeződésére.
2. Kíváncsiak voltunk, hogy a membránban így egyáltalán nem, vagy csak nagyon kis számban jelenlévő NMDA receptorok milyen hatással vannak a differenciálódó porcsejtek Ca²⁺-oszcillációira.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejtenyésztés

A porcosodó „micromass” mezenchimális sejt kultúrák más néven „high density” (HD)-kultúrák alkalmazása a porc differenciáció tanulmányozására évtizedek óta ismert módszer. A porcosodó mezenchimális sejteket Arbor Acres, illetve Ross és Hybro fajtájú (valamennyi fehér húshibrid) csirkeembriók disztális végtagtelepeiből izoláltuk. A kísérletekhez használt embriók Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumában voltak. A protokollon [19,20], melyet az irodalomban is kisebb-nagyobb módosításokkal alkalmaznak, saját kísérleteink igényeit figyelembe véve néhány változtatást hajtottunk végre.

Az eredeti leírás szerinti 2×10^7 sejt/ml sűrűségű szuszpenziók helyett mi $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségűeket használunk és 5, egyenként 10-10 μ l csepp helyett egyetlen 100 vagy 30 μ l-es cseppet cseppentünk műanyag Petri-csészék aljára (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium). A Petri-csészéket 37°C -on, 5% CO_2 és 95% relatív páratartalom mellett termosztálva, a sejteket 2 órán át hagyjuk kitapadni, majd 10% főtális borjúsérummal (FBS) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) kiegészített, antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó Ham's F12 (Sigma, St.Louis MO, USA) táptalajjal táplálunk. A tápfolyadékot (amennyiben a kísérlet menete másképp nem diktálja) másnaponta cseréljük. A kicseppentés napját a tenyésztés nulladik napjának számítjuk. Ilyen körülmények között a mezenchimális sejtek a 2. illetve 3. tenyésztési nap során spontán differenciálódnak porcsejteké. A tenyésztés befejezését jelentő 6. tenyésztési napon nagy mennyiségű extracelluláris matrixot tartalmazó porccsomókat detektálhatunk, amelyek kevés nyúlványos sejtet is tartalmaznak a telep perifériáján.

4.2. A porcképződés mértékének fénymikroszkópos detektálása

A képződő porc mennyiség megállapítására kiváló lehetőséget nyújt a metakromázia jelensége. A mezenchimális sejtekből álló „micromass” HD-kultúrákban a tenyésztés 6. napján porccsomókat lehet detektálni, melyek savas közegben dimetilmetilénkék (DMMK) festékekkel nagyfokú vörös metakromáziát mutatnak és a festék normál, ortokromatikus kék festődése elhanyagolható. Ez a jelenség a porckultúrák nagy mennyiségben termelt, negatív töltéssel rendelkező ECM alkotóinak pl. kondroitin-szulfát, hialuronsav és proteoglikánok jelenlétének köszönhető. A festésekhez a sejtsuszpenzióból 30 μ l-es cseppet

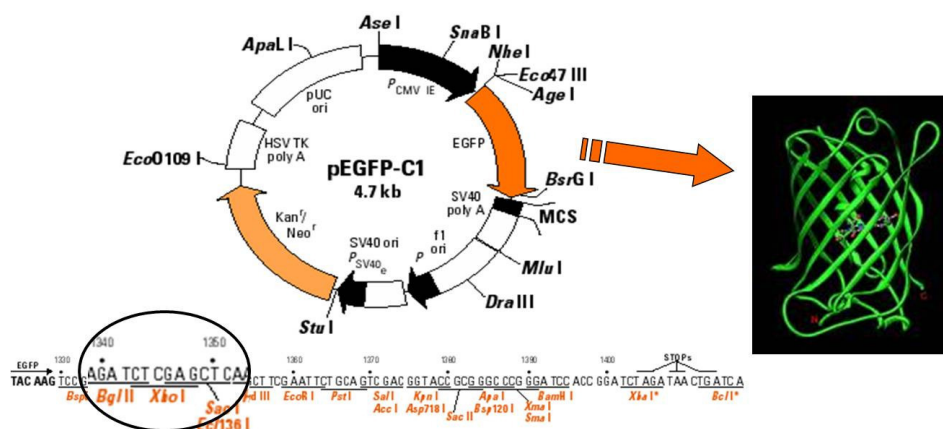
cseppentettünk 24-lyukú tenyésztőedényekbe helyezett fedőlemezekre (Menzel–Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Németország), majd a tenyésztés végén a kultúrákat CMF-PBS-sel való mosás után abszolút alkohol és 40% formalin 4:1 arányú keverékével 30 percig fixáltuk, leszálló alkoholsorban rehidráltuk, és 3% ecetsavval mostuk. Ezt követően 3% ecetsavban oldott 0,1%-os DMMK (Aldrich, Steinheim, Németország) oldattal festettük a kultúrákat 5 percig, majd ismét ecetsavas mosást végeztünk a feleslegben maradt festék eltávolítására. Ezt követően a mintákat kristályragasztóval, majd 24 óra elteltével DPX-el fedtük le. Az alacsony pH-n történt festés következtében a magasan szulfatált PG és GAG tartalom miatt vörös metakromáziával festődő porcmatrix válik láthatóvá. A mikroszkópos vizualizálást Nikon Eclipse 800 (Nikon Coporation, Tokió, Japán) fénymikroszkóppal minden esetben 4x-es objektívet használva végeztük.

A toluidinkék (TK) hasonlóan a DMMK-hez metakromáziás színnel festi az érett porc matrixát, savas közegben történt festés után festékviassaoldással pedig szemikvantitatív információt kaphatunk a metakromáziásan festődő porcmatrix mennyiségéről, azaz a visszaoldott bekötődött festék mennyisége arányos a metakromáziásan festődő porc mennyiségével. Ennek érdekében külön kísérleti csoportokként, a savas DMMK festéshez előkészített kultúrák tenyésztési körülményeivel teljesen azonos módon végeztük a kondrogenikus sejtek fenntartását. A tenyésztés befejezését jelentő hatodik napon a telepeket CMF-PBS-sel mostuk, majd Khale-fixálóval (28% etanol, 4% formalin és 2% ecetsav) 15 percen keresztül fixáltuk. Ezt követően glikokoll/glicin-HCl pufferben (pH:1,8) oldott 0,1%-os toluidinkék festékkel (Reanal, Budapest, Magyarország) 15 percen keresztül festettünk. A nem kötődött festéket glikokoll/glicin-HCl oldattal kimostuk. Az erősen szulfatált PG-hoz és GAG-hoz kötődő festéket abszolút alkoholban oldott 8%-os HCl oldattal nyertük vissza. A visszanyert toluidinkék festék abszorbanciáját 625 nm-en microplate leolvasó (Chameleon, Hidex Ltd., Turku, Finnország) segítségével határoztuk meg.

4.3. A PP2B-vektorok

A transzfekció hatékonyságának megítéléséhez a klasszikus és igen gyakran használt pEGFP-C1 vektort (4,7 kb; Invitrogen Carlsbad, CA, USA) használtuk. A vektorban található egy GFP-t (green fluorescent protein) kódoló szekvencia, mely lehetővé teszi a FACS-szal történő kvantitatív hatékonyságvizsgálatot. A vektor tartalmaz egy „multiple cloning site”-ot (MCS), ahova számos, általunk vizsgálni kívánt jelátviteli molekula szekvenciáját klónozzhatjuk be (4.1. ábra), így pl. a calcineurin eltérő formáit kódoló génszakaszokat. A CnA delta, a calcineurin trunkált formáját kódolja (772 bp), mely Ca^{2+} jelenlététől függetlenül

folyamatosan aktív [103]. A CnA gamma a kalcineurin gamma izoforma teljes cDNS szekvenciáját tartalmazza (1523 bp) [104]. A plazmidokat *E. coli* sejtekbe transzformáltuk (One Shot transzformációs kit, Invitrogen Carlsbad, CA, USA) és kanamycin tartalmú LB-agaron (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) tenyésztettük. A plazmidokat MaxiPrep kit (QIAGEN Valencia, CA, USA) segítségével izoláltuk, követve a gyári protokoll utasításait. Az izolált termékeket XhoI restriktions enzimmel linearizáltuk, és 1% gélben történő elektroforézissel, 1 kb marker mellett ellenőriztük. Az izolátumot 2 µg/µl koncentrációra hígítottuk és felhasználásig -70°C-on tároltuk.

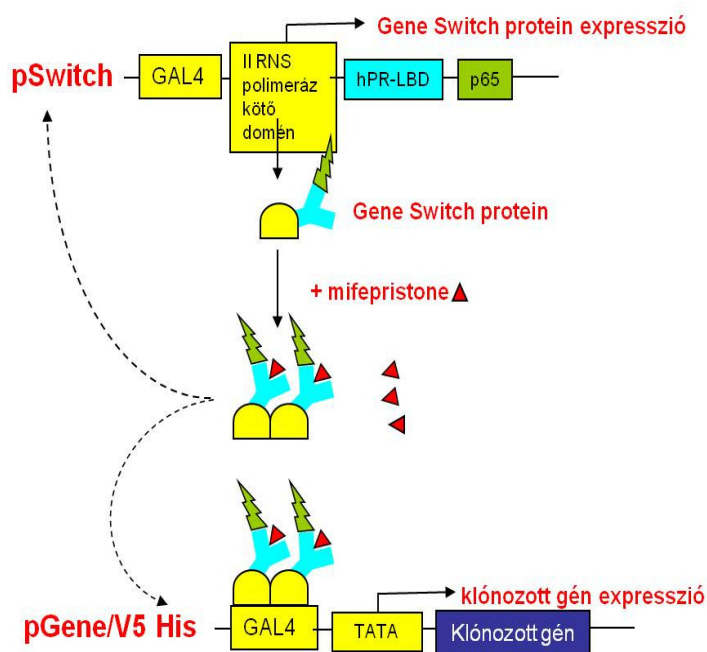


4.1. ábra A pEGFP-C1 vektor restriktions térképe és szerkezete. A vektor a „multiple cloning site” (MCS) előtt egy vad típusú GFP-t kódol, mely 488 nm-en gerjeszhető. A fehérje termelését egy CMV promóter hajtja. A vektor két rezisztencia szakaszt (neomycin és kanamycin) tartalmaz. Az ábra a www.clontech.com adatai alapján készült.

4.4. sh- és siRNS expressziós rendszerek

A PKCδ siRNS 5’-AGGAGAGTACTTTGCCATCAA- 3’ (GenScript USA Inc. Piscataway, NJ, USA) és PP2B siRNS 5’-CTGCTCGAAAGGAGGTTATAA- 3’ (GenScript USA Inc. Piscataway, NJ, USA) szekvenciákat kódoló shRNS-eket elkészítettük (GenScript USA Inc. Piscataway, NJ, USA) és GeneSwitch™ indukálható promóterű expressziós vektorba klónoztattuk (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Az expressziós rendszer két vektort tartalmaz; a pGene/V5HisA (4,6 kb) és a pSwitch (7323 bp) vektorokat. Az első vektorba lehet klónozni kis- és nagyméretű DNS szakaszokat, mely önmagában inaktív formában van jelen a sejtben, míg a pSwitch vektor egy inaktív fehérjét a GeneSwitch-et termeli. Az előző vektor expresszióját egy olyan promóter hajtja, mely csak akkor aktiválódik, ha a GeneSwitch fehérjéhez egy indukáló anyag; a mifepristone kötődik és ezen utóbbi komplex a klónozott vektor (pGene/V5HisA) promóteréhez kötődése indítja be az átíródást (4.2. ábra). A rendszer

egyik előnye, hogy a mifepristone-nak a high density kultúrákban nincs más hatása, hiszen egy antiprogeszteron származék, illetve a termeltetni kívánt DNS szakasz expressziója tetszőleges időben indítható el.



4.2. ábra A GeneSwitch System működési elve. Két vektort tartalmaz, melyek közül a pSwitch egy indifferens fehérjét termel; a GeneSwitch-et, mely tulajdonképpen ligandfüggő transzkripciósfaktorként funkcionálva indítja be az általunk a pGene/V5His A vektorba klónozott szakasz termelődését. Az ábra a www.invitrogen.com adatai alapján készült.

Az shRNS-ek kb. 62 bp-ból álló, 7-9 nukleotid hajtókanyart tartalmazó kétszálú rövid plazmid darabok, melyek vektorba klónozhatók és azokról megfelelő duplaszálú RNS darabkák szintetizálódnak, melyekből enzimatikusan hasítódik ki az egyszálú hurok, kialakítva egy siRNS-t. Működési elvük így az siRNS-ekhez nagyon hasonló, ugyanis a termelődő duplaszálú RNS darabot az ún. DICER fogja siRNS-duplexekké alakítani, ezek nukleázkomplexekhez kötődnek és kialakítják RISC-et (RNA induced silencing complex). Ezen utóbbi komplexekben létrejövő ssRNS-ek a bázispárosodás szabályainak megfelelően hozzákötődnek egy adott mRNS szakasz komplementer részéhez és annak fragmentumokra hasítását eredményezik, ezzel gátolva a proteinszintézist. A gyárilag előállított termékeket a korábban már említett módon transzformáltuk, és ampicillin vagy higromycin tartalmú LB-agar táptalajon növesztettük és az előzőhöz hasonló módon izoláltuk. A vektorokat 2 µg/µl koncentrációra hígítottuk és felhasználásig -70°C-on tároltuk. A transzfekcióhoz két vektor transzfekcióját végeztük egyszerre a tenyésztés 0.napján; az shRNS-eket kódoló inaktív

vektorokat és az indukciós vektort. A tenyésztés 2. napján az indukciót 1 μM mifepristone táptalajba juttatásával érték el.

Az NMDA receptor NR1 alegységének csendesítésére *Gallus gallus* szekvencia (accession number: AY510024) alapján gyárilag tervezett specifikus siRNS koktélt használtunk (SMARTpool siRNA kit, Dharmacon, Inc. CO, Lafayette, USA). Az siRNS-ek kb. 21-23 nukleotidból álló egyszálú RNS fragmentumok, melyek működési elve korábban már megemlítésre került. Hátránya, hogy nem klónoozható vektorba, így transzfekcióját követően a hatása kb. 24 óra múlva vizsgálható, indukcióra nincs lehetőség. A vásárolt koktél és a gyári protokoll szerint viszont a termékkel garantáltan 80-90%-os csendesítés érhető el. A gyári protokoll utasításai szerint az siRNS koktélt -20°C -on 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ koncentrációban tároltuk.

4.5. HD-kultúrák transzfekciója

Számos transzfekciós módszert és protokollt teszteltünk; Lipofectamin 2000 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), SuperFect transzfekciós reagens (QIAGEN Valencia, CA, USA), DMRIE-C reagens (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), Saint Mix reagens (Synvolux Therapeutics B.V, Groningen, Hollandia) és a nukleofekciós protokollt az Amaxától (Amaxa Biosystem, Gaithersburg, MD, USA).

Lipofectamin 2000: egy kationos lipidmolekula, liposzómaformálódáson keresztül körülveszi a bejuttatni kívánt plazmidot, és membránba olvadva transzportálja a sejtekbe. Sejtípustól függetlenül, FBS-es táptalajban is alkalmazható viszonylag nagy transzfekciós hatékonysággal.

SuperFect: egy speciálisan tervezett aktiválható dendrimer molekula, mely kompakt komplexet képez a DNS-sel. A sejtek felszínén lévő negatív töltéssel rendelkező receptorokhoz kötődve endoszóma kialakulását indukálja, amely a sejt belsejébe juttatja a plazmidot. A transzfekció sikeressége sejtípustól független és nem igényel speciális körülményeket.

DMRIE-C: egy 1:1 arányban liposzómaformáló kationos lipid (DMRIE) és koleszterol elegyét tartalmazó oldat. Működési elve hasonló a Lipofectamin 2000-hez, ugyanakkor DNS bejuttatása mellett alkalmas rövidebb RNS konstruktok transzfekciójára is. A transzfekciós reagens kifejezetten kitapadó kultúrákra készített technikai újítás.

Saint Mix: egy szintetikus non-liposzomális amfilikus molekula, mely 111 kb méretű DNS és protein bevitelére képes transzfekciós reagens. Nagyon jó hatékonysággal működik primer sejt vonalakon és *in vivo* transzfekciós rendszerekben is.

Amaxa: elektroporáción alapuló non-virális transzfekciós technológia, mely működésének alapja, hogy a sejtek membránján adott feszültség hatására keletkező mikroyukakon keresztül egy szállító oldat segítségével bejuttatja a plazmidokat a sejtekbe. Mivel a feszültség hatására a maghártyán keletkezett apró lyukakon keresztül a sejtmagba is bejut a konstrukció, ezért gyakran nukleofekciónak is nevezik. A módszer számos protokollt használ, melyek közül a C17-es program primer sejtekre optimalizált.

Minden esetben frissen izolált, $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségű sejtsuszpenzióban végeztük a transzfekciót, bizonyos esetekben a protokoll kis módosításával, mint pl. az alkalmazott transzfekciós reagens arányát 25%-kal csökkentettük. 1 ml sejtsuszpenzióhoz alkalmanként 20 μ l transzfekciós reagenst és a gyári protokolloknak megfelelően 6 μ l, 2 μ g/ μ l koncentrációjú plazmidot adtunk. A transzfekciót követően a sejtek 100 és/vagy 30 μ l-es cseppjeit Petri csészékbe vagy 24-lyukú tenyésztőedényekbe cseppentettük. Kicseppentés után 2 órával a sejteket 10% FBS-mal kiegészített, Ham's F12 tápoldattal tápláltuk, másnap a tápoldatot lecseréltük, ezzel eltávolítva a transzfekciós reagenst tartalmazó közeget a sejtekről. A nukleofekciót *Amaxa* készülékkel végeztük a 200 μ l $1,5 \times 10^7$ sejt/ml sűrűségű sejtsuszpenzióban a mezenchimális sejtekre optimalizált C17 program segítségével. Az siRNS transzfekciójára a cég által optimálisnak tartott DharmaFect transzfekciós reagenst alkalmaztuk a gyári protokoll szerint 4 μ l, 4 μ g/ μ l koncentrációjú siRNS alkalmazása mellett.

4.6. A GFP-t expresszáló vektorok vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal

A transzfekció sikerességének megítélésére módot biztosít az, hogy a GFP megfelelő hullámhosszúságú fényel gerjesztve fluoreszcens mikroszkópban fotózható, tehát a sejtkolóniában zöld fényt emittáló, sikeresen transzfektált sejtek populációját rögzíthetjük. A sejteket a transzfekciót követő napon táptalajban, normál tenyésztési körülmények között világítottuk meg 488 nm hullámhosszú fluoreszcens fénysugárral, majd 10 \times objektívet használva SPOT-RT-kamera segítségével 508 nm-en emittált fényt rögzítettük Nikon Eclipse 800 (Nikon Corporation, Tokió, Japán) mikroszkóppal.

4.7. A PKC δ aktivitás gátlása rottlerinnel

A rottlerint (Sigma, St.Louis, MO, USA) DMSO-ban oldottuk és -20°C -on tároltuk a felhasználásig. Az inhibitor 5 μ M végkoncentrációban a differenciáció eltérő napjain adagoltuk a kultúrák tenyésztő folyadékába.

4.8. Életképesség vizsgálata MTT- teszttel

A sejtek életképességét MTT kolorimetriás teszttel vizsgáltuk a tenyésztés 3. napján. Az MTT teszt alapja, hogy az élő sejtek mitokondriumaiban lévő oxidázok a sárga MTT oldatot lila színű formazánkristályokká alakítják, amelyeket megfelelő közegben feloldva az oldat fényelnyelése 570 nm-en mérhető, s a mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával és metabolikus aktivitásával. A kultúrákat 96 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük, melyekhez a 3. tenyésztési napon 10 µl MTT (3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid), Amresco Inc., Solon, Ohio, USA) oldatot pipettáztunk minden lyukba, majd 2,5 órán keresztül 120 rpm-en 37°C-on rázógépből inkubáltuk (N-biotek, Inc, GyeongGi-Do, Korea). A keletkezett lila színű formazán kristályokat MTT szolubilizáló oldattal feloldottuk, az abszorbancia mértékét 570 nm-en microplate-leolvasóval detektáltuk (Chameleon, Hidex Ltd., Turku, Finnország).

4.9. Sejtprolifерáció vizsgálata ³H-timidin-beépülés mérésével

A sejtek proliferációs képességét ³H-timidin beépüléssel vizsgáltuk, ui. a sejtosztódás során adott idő alatt DNS-be beépült ³H-timidin arányos az osztódást végző sejtek számával, melyet lágy β-sugárzóként folyadékszintillációs módszerrel könnyen detektálhatunk. A sejtek 15 µl-es cseppjeit 96 lyukú folyadékszintillációs tenyésztőedényekbe helyeztük (Wallac PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) és a kultúrákat a tenyésztés 3. napján 16 órán keresztül 1µCi/ml ³H-timidinnel (185 GBq/mM ³H-thymidine, Amersham Biosciences, Budapest, Magyarország) inkubáltuk. Az inkubációt követően PBS-sel mostunk, majd a fehérjék jéghideg 5%-os triklórecetsavval 20 perc alatt denaturáltuk, újabb PBS-sel történő mosás után foszfor-pentoxidot tartalmazó exikátorban vízmentesítettünk. A mérés előtt 50 µl szintillációs folyadékot (MaxiLight, Hidex Ltd, Turku, Finnország) adtunk a mintákhoz, és folyadékszintillációs számlálóval (Chameleon, Hidex Ltd, Turku, Finnország) mértük a radioaktivitást.

4.10. Apoptózis vizsgálat és a transzfekció hatékonyságának meghatározása áramlási citométerrel

A transzfekció hatékonyságát a GFP detektálásával, az apoptózis mértékét AnnexinV DY647 kit (Central European Biosystems Kft., Budapest, Magyarország), a nekrozist propidium-jodid (PI, Invitrogen Carlsbad, CA, USA) segítségével vizsgáltuk a tenyésztés 2. vagy 3. napján. Az annexin V egy korai apoptotikus markernek tekinthető, melynek

membránon való kifordulása az egyik első lépés a sejtek programozott sejthalála során. Ennek detektálása pontos képet adhat a visszafordíthatatlanul megindult apoptózisról. A PI a már sérült membránintegritású sejtek magjaiba képes bejutni, így ez a módszer a sejteket ért stressz következtében fellépő nekrotikus folyamatokról ad felvilágosítást. A mérésekhez kontrollként nem transzfektált, és/vagy csak üres vektorral transzfektált sejteket használtunk. A sejteket kétszer mostuk CMF-PBS-el, majd ezt követően 10 µl AnnexinV DY647 reagenst és/vagy 2 µl PI-ot adtunk a mintáinkhoz és 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten sötétkamrában. Az inkubálást követően a sejteket Annexin-binding pufferral, vagy PI esetén CMF-PBS-el mostuk, és 0,25% tripszinnel való emésztést követően sejtjeinket centrifugálással összegyűjtöttük. A sejt pelletet 500 µl FACS pufferral szuszpendáltuk (PBS puffer, 1% BSA-t és 0,05% NaN₃). A GFP-t expresszáló sejtek detektálása 508 nm-en, az AnnexinV DY647 detektálása pedig 670 nm-en, PI 430 nm-en CyFlow® space Flow Cytometer-rel (Partec GmbH, Münster, Németország) történt a DE OEC Bőrklínika Omninvest laboratóriumában. Az analízist Win MDI 2.8 freeware-rel végeztük (Joseph Trotter, <http://facs.scripps.edu>). Az eredményeinket density plot-on ábrázoltuk.

4.11. Spontán Ca²⁺-tranziensek vizsgálata

Az egyes kondroprogenitor sejtekben megfigyelhető spontán Ca²⁺-tranzienseket LSM 510 META Laser Scanning konfokális mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével regisztráltuk. A mérés előtt a sejteket 10 µM Fluo-4-AM kalciumérzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük fel, amit F12-táptalajban oldottuk és a töltést 37 °C-on, CO₂-inkubátorban végeztük 1 órán át. A tranzienseket normál Tyrode-oldatban regisztráltuk. A méréseket 63x-os vízimmerziós objektívvel végeztük. A Fluo-4-gyel töltött sejteket argonlézerekkel előállított 488 nm hullámhosszú fényvel gerjesztettük, a kibocsátott fluoreszcenciát pedig 500, illetve 570 nm-en detektáltuk. A spontán Ca²⁺-tranziensek során bekövetkező intenzitásváltozásokat x-y analízissel vizsgáltuk, mely során kétdimenziós leképezést végzünk. Ebben az esetben a pásztázó rendszer végigpásztázza a sejtet reprezentáló pixeleket és az egyes fluoreszcencia-intenzitásokat x-y koordináta rendszerben ábrázolja, azaz sejt fluoreszcencia-intenzitásának elvileg egy adott pillanatban (gyakorlatilag a „pillanat” a pásztázás időtartamával megegyező hosszúságú, az 512x512 pixel nagyságú képek esetén 500-600 ms) meglévő kétdimenziós képet kapunk. Az x-y analízis során 10 felvételt rögzítettünk 50 sec intervallum alatt és videofelvételeket készítettünk.

4.12. Sejt-extraktumok előkészítése

A 2. és 3. tenyésztési napon Western blot és aktivitás-mérésekhez a sejt-kultúrákról a tápoldatot eltávolítottuk, fiziológiás sóoldattal kétszer átmostuk, a telepeket learattuk. Az összegyűjtött sejteket 10 percig 2000 rpm-en centrifugáltuk, majd a sejt-pellethez 100 µl homogenizáló lízispuffert mértünk (50 mM Tris-HCl puffer (pH 7,0), 0,5 mM ditiotritol, 10 µg/ml Gordox, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 5 mM benzamidin, 10 µg/ml tripszin inhibitor). Az így elkészített extraktumokat -70°C -on tároltuk. A lízispufferben felvett teljes sejt-lizátumot ultrahangos szonikálással (Cole Palmer Ultrasonic distributor, Illinois, USA) tártuk fel 30 másodpercen keresztül a Western blot analízishez és az aktivitásmérésekhez. RT-PCR vizsgálathoz a porcosodó kolóniákat RNáz-mentes fiziológiás sóoldattal háromszor mostuk, majd azonnali, folyékony nitrogénben való fagyasztást követően az RNS izolálásig -70°C -on történt a tárolás.

4.13. RT-PCR analízis

A sejtekből totál RNS-t izoláltunk, mely során először TRIZOL reagensben (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) oldottuk fel a telepeket, majd 20% RNáz-mentes kloroformot adtunk hozzá és a mintákat 4°C -on 15 percig 10000 g-n centrifugáltuk. A keletkezett felülúszót eltávolítottuk és azt 500 µl RNáz-mentes izopropanolban 1 órán keresztül -20°C -on inkubáltuk majd 10000 g-n újra centrifugáltuk. A kicsapódott RNS-t RNáz-mentes vízben oldottuk és -70°C -on felhasználásig tároltuk. Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) készülék segítségével ellenőriztük. Az így nyert RNS-mintából High Capacity RT-kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A PCR primereket Primer Premier 5.0 szoftver segítségével (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) terveztük. A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált primer-párok szekvenciáit a 4.1 táblázatban adtam meg.

Az egyenként 25 µl össztérfogatú PCR-reakció elegyek a következő összetevőket tartalmazták: 2 µl forward és reverz primer (100 µM), 1 µl dNTP (200 µM), és 5 unit Promega GoTaq® DNS-polimeráz 1x pufferben. A kívánt DNS-szakaszok specifikus felerősítéséhez programozható termosztátot használtunk (PCR Express Temperature Cycling System, Hybaid, UK) a következő beállításokkal: 2 perc 95°C -on a kezdeti denaturációhoz, amelyet ismétlődő ciklusok követnek: 94°C 1 perc, majd primertől függő, optimális hőmérsékleten történt az

annelláció (30 sec), a lánchosszabbítás pedig másfél perc alatt 72°C-on ment végbe. Az utolsó, 30. ciklus után további lánchosszabbítási lépés következett 72°C-on, 10 percig. A PCR-mintákat végül 1,5%-os, etídium-bromiddal megfestett agarózgélben 90 V-on futtattuk. A képeket géldokumentációs rendszer (DNR Bio-Imaging Systems Ltd. Jeruzsálem, Izrael) segítségével készítettük.

<i>Gén (Gallus gallus)</i>	<i>Primerek</i>	<i>Nukleotidszekvencia (5'→3')</i>	<i>Annellációs hőmérséklet</i>	<i>Termék mérete(bp)</i>
Sox9	sense	CCC CAA CGC CAT CTT CAA	54 °C	380
	antisense	CTG CTG ATG CCG TAG GTA		
Aggrekán	sense	CAA TGC AGA GTA CAG AGA	54 °C	429
	antisense	TCT GTC TCA CGG ACA CCG		
Kalcineurin	sense	CTG CTC TGA TGA ACC AAC AGT	54 °C	514
	antisense	ACG GCA AGG ACC AGG TAA		
PKCδ	sense	CTG AGG TGA CCG TGG GTG T	54 °C	283
	antisense	TTG TGG ATG GCA GCG TTA		
NR1	sense	CAA TGC CAC CTC CGT CAC	56°C	313
	antisense	TTG GTC CCT GGG TCA AAC T		
ERK1/2	sense	CAC CTC AGC AAC GAC CAC	54°C	231
	antisense	AGG AGC CCT GTA CCA ACG		
GAPDH	sense	GAGAACGGGAAACTTGTCAT	54 °C	556
	antisense	AACAACGGGTCAGGACGG		

4.1. táblázat A PCR során használt primerpárok szekvenciái és a kapott termékek méretei.

4.14. Fehérjedetektálás Western blot technikával

A sejtszuspenziók fehérjekoncentrációjának pontos értékét az ultrahangos homogenizálást követően BCA próbával (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. Ezt követően a fehérjehomogenizátumokhoz elektorforézis mintapuffert adtunk (310 mM TRIS [pH 6,8], 10% SDS, β-merkaptotanol, 0,01% brómfenolkék) és 10 percig forraltuk. Majd esetenként 80 µg fehérjét tartalmazó mintát 7,5%-os gélben futtattunk 120 V feszültségen, és enyhe hűtés közben 90 percig transzferáltuk nitrocellulóz membránra 300 mA áramerősség mellett. A membránt PBS-ben oldott 5% zsírmentes tejjel 30 percig blokkoltuk, majd a primer antitesteket (4.2 táblázat) egy éjszakán keresztül 4°C-on a blokkoló oldatban hígítva alkalmaztuk. Az inkubációs idő befejezését követően a membránokat 2×15 percig PBST-ben (0,1% Tween-20-szal kiegészített PBS) mostuk. Majd 1% sovány tejporthoz tartozó PBS-ben oldott szekunder antitesteket (3.2 táblázat) adtunk a membránokhoz és 1 órán keresztül 200 rpm-en, szobahőmérsékleten rázattuk. A jelek detektálását kemilumineszcens jelerősítő technikával röntgenfilmeken a gyári protokoll szerint végeztük (Millipore, Billerica, MA, USA).

	<i>Primer antitest</i>	<i>Szekunder antitest</i>
PP2B 60 kDa	poliklonális anti-PP2B 1:600 Abcam, Cambridge, UK	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Sox9 62 kDa	poliklonális anti-Sox9 1:600 Santa Cruz Inc., CA, USA	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Sox9 56 kDa	poliklonális anti-Sox9 1:600 Abcam, Cambridge, UK	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Foszfo-Sox9 56 kDa	poliklonális anti-foszfo-Sox9 1:600 Sigma, St.Louis MO, USA	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
PKCδ 80 kDa	poliklonális anti- PKCδ 1:100 Santa Cruz Inc., CA, USA	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
ERK1/2 42 kDa	poliklonális anti-ERK1/2 1:1000 Sigma, St.Louis MO, USA	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
difoszfo-ERK1/2 42 kDa	monoklonális anti-difoszfo-ERK1/2 1:600 Sigma, St.Louis MO, USA	anti-egér IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
NR1 120 kDa	poliklonális anti- NR1 1:600 Cell Signaling, Danvers, MA, USA	anti-nyúl IgG 1:1500 Bio-Rad Laboratories, CA, USA
GAPDH 42 kDa	poliklonális anti-GAPDH 1:1000 Abcam, Cambridge, UK	anti-nyúl IgG 1:1000 Bio-Rad Laboratories, CA, USA

4.2. táblázat A fehérjedetekváláshoz használt primer és szekunder antitestek és hígításuk.

A röntgenfilmekről 8-bites szürke skálán kódolt digitális felvételeket készítettünk géldokba integrált CCD kamerával (DNR Bio-Imaging Systems Ltd. Jeruzsálem, Izrael), majd a felvételeken mértük a kapott jelek optikai denzitását (OD) Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics) képanalizáló segítségével. A program az OD-t pixeloszlopokként méri, ezért a vizsgált proteint reprezentáló specifikus csík területére vonatkoztatott integrált optikai denzitást (integrált OD) használtuk fel a kiértékelés során. A kapott értékeket a kontroll csoportokra normalizáltuk.

4.15. Kalcineurin aktivitásmérés

A PP2B aktivitását radioaktív izotóppal (^{32}P) jelölt foszforilált inhibitor-1 szubsztrát (780 cpm/pmol) segítségével határoztuk meg, az enzim által lehasított ^{32}Pi radioaktivitásának mértéke arányos a PP2B enzim aktivitásával [105]. Az ily módon elvégzett kísérlet nemcsak a

foszfatáz jelenlétéről, hanem annak aktivitásáról is információt adhat, bár azt hozzá kell tennünk, hogy ez nem teljesen egyezik meg a kondrogenikus sejt normál életciklusaiban *in vitro* mérhető aktivitással. A mintákat a lehető leggyorsabban folyékony nitrogénben fagyasztottuk és -70°C -os tárolást követően rövid időn belül felhasználtuk. Kiolvasztás után a kultúrákat szonikátorral (Branson Sonifier, Danbury, USA; pulzáló, 60 ciklus, 2 perc) tártuk fel, majd 12 000 g-n, 4°C -on, 15 percig centrifugáltuk. Az aktivitásmérésekhez a felülúszót használtuk. A munkaoldat az izotóppal jelölt szubsztráton kívül (30 μl) 50 mM tris puffert (pH 7,09 0,16 mM ditiotreitolt, 3,4 $\mu\text{g/ml}$ gordoxot, 3,4 $\mu\text{g/ml}$ leupeptint, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF), 1,6 mM benzamidint, 3,4 $\mu\text{g/ml}$ tripszin-inhibítort, 40 $\mu\text{g/ml}$ kalmodulint, 0,2 mM CaCl_2 -ot, 100 nM okadainsavat, protein foszfatáz inhibitor-2-t tartalmazott. A (^{32}P) jelölt inhibitor-1 szubsztrátot 20-30000 cpm/reakcióelegy koncentrációban alkalmaztuk 2-2,5 mg/ml sejtextraktum fehérjekoncentrációra számolva. Az így előkészített mintákat 20 percig 30°C -on inkubáltuk, majd a mérést folyadékszcintillációs számlálóval végeztük.

4.16. Protein kináz C enzim-aktivitásmérés

A sejtek *ex vivo* PKC δ aktivitásának mérésére nincs még specifikusan kidolgozott módszer, ezért kísérleteink során a sejtek össz-PKC aktivitását kívántuk megmérni, majd ebből a PKC δ specifikus inhibitorát adva a csökkenést vizsgáltuk. Ezen aktivitásbeli csökkenés nagy többségében a PKC δ aktivitásának tudható. A PKC-k foszforilációs aktivitásának mértékét radioaktív ^{32}P izotóppal jelzett ATP-ből egy adott szubsztrátba beépített foszfátcsoportok detektálásával vizsgáltuk. A kapott beütésszám arányos a PKC-k foszforilációs aktivitásával. A mérésekhez a sejtlyázatot 10000 g-n 4°C -on 10 percig centrifugáltuk és a kapott felülúszót használtuk. Az aktivitást radioaktív izotóppal; ^{32}P jelölt ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, MP Biomedicals, Solon, OH, USA) histone IIIS-ba (Sigma, St.Louis MO, USA) történő beépülésével mérhető. A 40 μl -es reakcióelegy 50 mM Tris HCl pufferben (pH 7.5), 1 mg/ml hiszton IIIS, 0,8 mM CaCl_2 , 0,5 mM DTT, 1 $\mu\text{g/ml}$ Gordox, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 0,1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, 0,5 mM benzamidin, 1 $\mu\text{g/ml}$ tripszint tartalmazott, mint proteázinhibitorokat, valamint 100 $\mu\text{g/ml}$ foszfatidilszerin, 4 $\mu\text{g/ml}$ forbol-myristát-13-acetát (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,12 mM ATP, 6 mM Mg-acetát és $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ került a munkaoldatba. A $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -t 1×10^6 cpm/reakcióelegy koncentrációban alkalmaztuk 2-2,5 mg/ml sejtextraktum fehérjekoncentrációra számolva. A PKC δ aktivitásméréshez 10 μM rottlerint adtunk a reakcióelegyhez, a totál PKC aktivitáshoz képest történő

aktivitáscsökkenést a PKC δ saját aktivitásának tekintettük. A reakciót 30°C-on végeztük. A ^{32}P hiszton III-s-be épülését 20 perc inkubációs idő alatt vizsgáltuk, majd ezután Whatman P81 (2×2 cm) papírra cseppentett 30 μl -es reakciótermékből határoztuk meg. A papírokat háromszor 0,5% foszforsavban mostuk és folyadékmentesre szárítottuk, ezután folyadékszintillációs készülékben mértük a radioaktivitást.

4.17. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

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

5. Eredmények

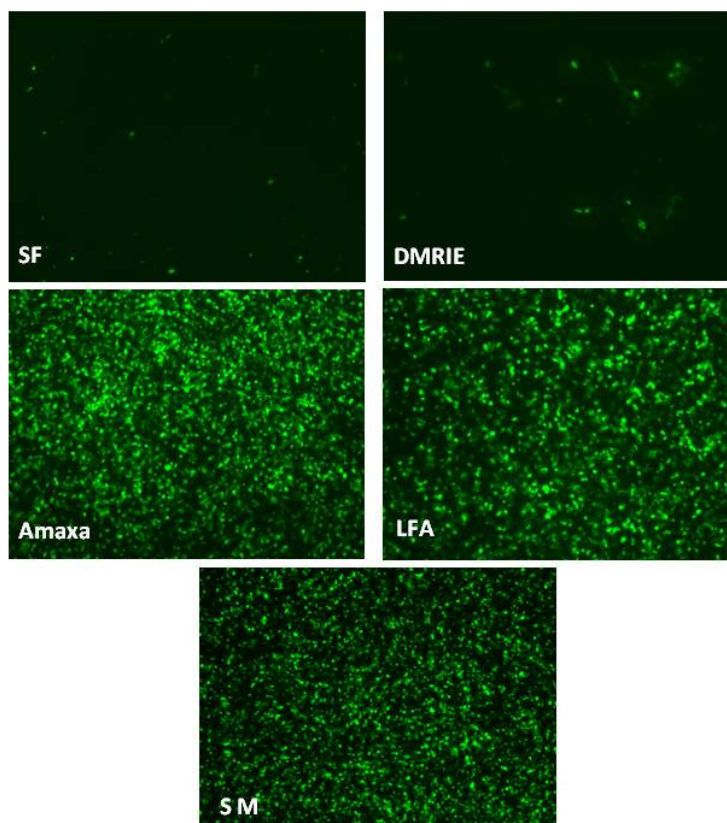
5.1. A HD-kultúrák tranziens transzfekciójának optimalizálása

5.1.1. A transzfekció kivitelezése még a sejtek kitapadása előtt a leghatékonyabb

A primer mezenchimális differenciálódó sejtek populáció szintű transzfektálása manapság sem túl egyszerű feladat, hiszen az alkalmazott módszer, vagy maga a transzfekciós reagens olyan mértékben megzavarhatja a sejtek normál életkörülményeit, hogy azok jobb esetben csak differenciációs képességüket veszítik el, rosszabb esetben azonban apoptózissal elhalhatnak. A transzfekciós reagens hatása és a transzfekció határfoka is nagyon erősen függ a transzfekció körülményeinek optimalizálásától. A HD-kultúrákban a rövid tenyésztési periódus és a spontán lezajló differenciáció miatt csak tranziensen lehet fehérjék expresszióját a megfelelő vektor bevitelével megváltoztatni. Azaz olyan optimális transzfekciós módszer bevezetésére van szükség, mely nagyon rövid idő alatt, nagy határfokkal és a lehető legkisebb sejtkárosító hatással viszi be az expresszálni kívánt szakaszt a sejtpopuláció nagy részébe. A transzfekció és a reagens optimalizálásához „üres”, csak GFP-t expresszáló vektort juttattunk be a differenciálódó porcsejtekbe. A gyári protokollok utasításait követve először a már kitapadt sejteket próbáltuk transzfektálni, igen kevés sikerrel. Akármelyik cég transzfekciós reagensét használtuk is a kondroprogenitor sejtpopuláció csupán 1-2%-a mutatott fluoreszcens mikroszkóp alatt GFP pozitivitást. Ezt követően, a gyári protokollok utasításaitól eltérően a transzfekciót a kicseppentés előtt az izolált sejtuszuspenzióban végeztük, tulajdonképpen a két órás adhezív folyamat során a reagens-plazmid koktél már a sejtekkel érintkezett. Ez a típusú kis módosítás szemmel látható eredményt hozott, a transzfektált kultúrákat mikroszkóppal vizsgálva már 16 órával a transzfekció után számos GFP pozitív sejtet detektáltunk.

Elektroporáció segítségével (Amaxa) a mezenchimális sejtekre optimalizált programmal végzett transzfekció eredménye igen biztató volt, a telepek erős fluoreszcenciáját látva (5.1. ábra). A liposzóma alapú transzfekciók változó sikert mutattak, a molekuláris biológiai laboratóriumokban általánosan használt Lipofectamin 2000 kielégítő számú sejtbe juttatott GFP-t expresszáló vektorokat, míg a DMRIE esetén csak néhány fluoreszcens sejt volt megfigyelhető. A SuperFect alkalmazása kevés sikeres transzfekciót eredményezett, már a transzfekció tényének hatására számos sejt elveszítette adhéziós képességét és a 2. tenyésztési nap végére a kultúrák felváltak a tenyésztőedény aljáról. Ugyanakkor az

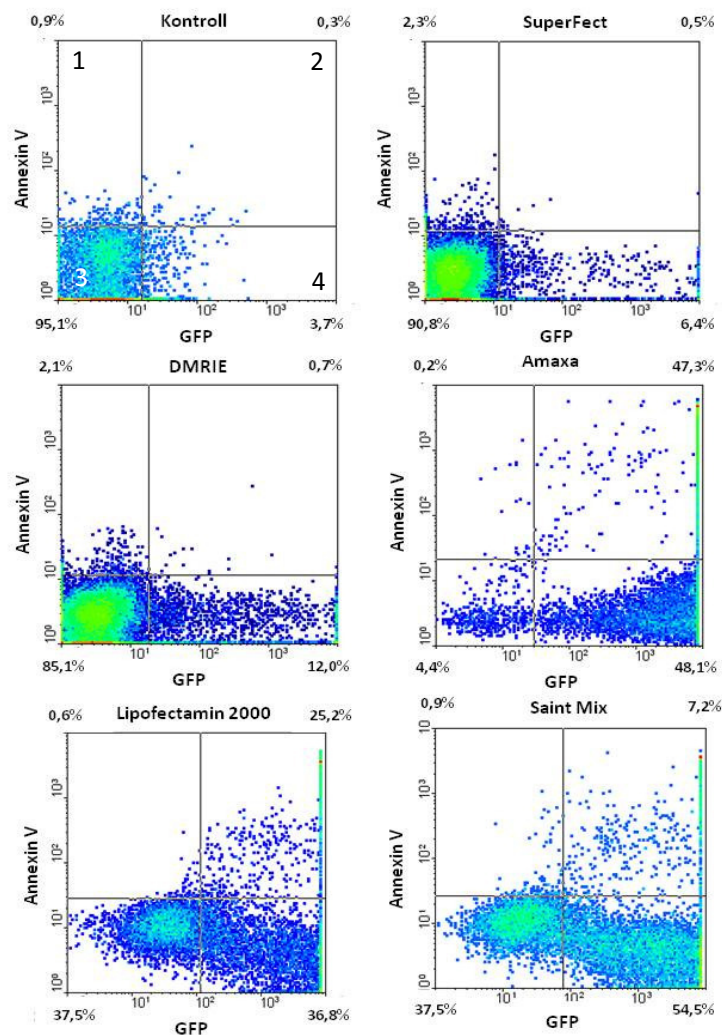
amfifilikus transzfekciós reagens a Saint Mix a Lipofectamin-nal közel megegyező GFP pozitivitást eredményezett (5.1. ábra).



5.1.ábra A transzfekció-hatékonyság vizuális megítélése. Fluoreszcens mikroszkóppal, 10× objektívvel készült képek az 1. tenyésztési nap GFP pozitív sejtjeit mutatják. A rövidítések SF: SuperFect, LFA: Lipofectamin 2000 és S M: Saint Mix. A képek 5 különböző kísérlet egy-egy jellemző eredményét prezentálják.

5.1.2. A Saint Mix reagens alkalmazása elegendő hatékonysággal és kis apoptotikus hajlammal juttatja a GFP-t expresszáló vektorokat a kondrogenikus sejtekbe.

Természetesen a tenyésztés 1. napján a porcosodó sejt kultúrák fluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálata igen látványos, azonban nem ad pontos kvantitatív adatokat arról, hogy a sejtek hány százaléka vette fel a vektorokat, illetve arról egyáltalán nem rendelkezünk információval, hogy azok hány százalékában indul esetleg el apoptotikus vagy nekrotikus folyamat a túlhajtott fehérjeszintézis következtében. Az annexin V egy olyan fehérje, mely a sejtek korai apoptotikus folyamatai során jelenik meg, ennek detektálása információval szolgálhat a transzfekció apoptózist indukáló tulajdonságait illetően. A GFP expresszióját és az apoptózis mértékének vizsgálatát FACS-analízis során elemeztük, ahol a kapott értékeket density plot-on ábrázoltuk.



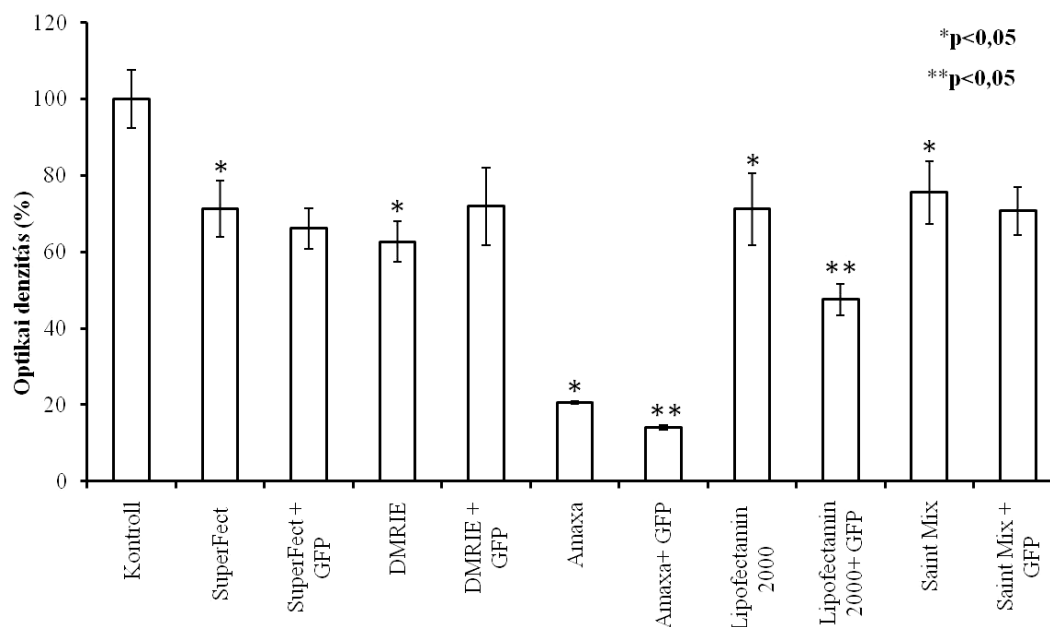
5.2.ábra A transzekciós módszerek hatékonysága és apoptotikus hatása a kondrogenikus sejtekre. A FACS mérés: 5 kísérlet 1 reprezentatív eredményei density plot-on ábrázolva. A négy kvadráns balról jobbra és felülről lefele haladva: 1. Annexin+/GFP- ; 2. Annexin+/GFP+ ; 3. Annexin-/GFP- ; 4. Annexin-/GFP+ populációt mutatja.

Az Amaxával történő elektroporáció eredményeként igen nagy transzekciós hatékonyságot detektáltunk, mely átlagosan a populáció 95,4%-át jelentette. Azonban megvizsgálva az apoptotikus marker jelenlétét, a kondrogenikus sejtek mintegy 47,3%-a a sejthalál korai jeleit mutatta (5.2.ábra). A DMRIE és SuperFect reagensekkel transzekciált sejtek apoptotikus rátája igen alacsony, átlagosan 0,5 és 0,7%-nak adódott, a transzekciós hatékonyság a DMRIE estében csak 12,7%-os, míg a SuperFect esetében átlagosan 6,9%-os volt, mely értékek messzemenőkéig kevésnek tűnnek a teljes populációt tekintve (5.2.ábra). A Lipofectamin 2000 és a Saint Mix reagens transzekciós hatékonysága kielégítőnek bizonyult, a Lipofectamin a sejtpopuláció 62%-t, míg a Saint Mix a 61,7% transzekciáltta sikeresen,

ugyanakkor az előbbi módszer 25,2%, míg az utóbbi csak 7,2% apoptózist eredményezett (5.2.ábra).

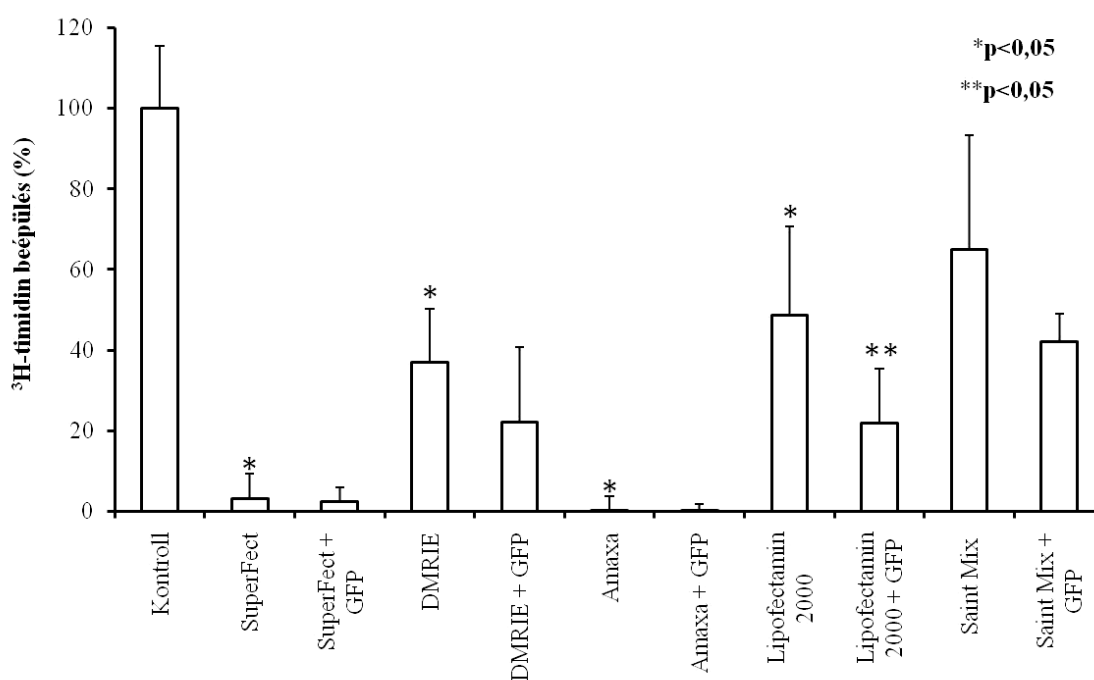
5.1.3. A transzfekciós reagensek és a GFP expresszió eltérő mértékben befolyásolja a sejtek életképességét és osztódási rátáját

A transzfekciós módszerek nemcsak sejthalálindukáló hatással lehetnek a kondrogenikus sejtekre, hanem befolyásolhatják azok mitokondriális aktivitását, ezzel együtt negatív vagy akár pozitív irányba módosíthatják a porcosodó sejtek életképességét. A transzfekciós módszerek változó mértékben voltak hatással a sejtek életképességére. Az elektroporáció következtében a sejtek mitokondriális aktivitása drasztikus mértékben visszaesett, mely további kismértékű csökkenést mutatott, ha a sejtek felvették a GFP-t expresszáló vektort is. A DMRIE és SuperFect transzfekciós reagensek önmagukban történő alkalmazása 30-40%-kal csökkenti a sejtek életképességét, míg a GFP termelése nem okoz további változásokat a mitokondriális oxidázok működésében. A Lipofectamin 2000 és a Saint Mix is okoz kb. 25-30%-os életképesség-csökkenést anélkül, hogy számottevő apoptotikus hatásuk lenne, ugyanakkora a Lipofectamin 2000 által bejuttatott vektor további mitokondriális aktivitáscsökkenést eredményez (5.3. ábra).



5.3.ábra A transzfekció és a GFP jelenlétének hatása a HD-kultúrák sejteinek mitokondriális aktivitására. A sejtek életképességét MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibasávok az egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Statisztikailag szignifikáns * $P < 0,05$ a kontrollhoz képest és a ** $P < 0,05$ transzfekciós reagenshez viszonyított változásokat jelzik.

A triciált timidinnek a 3 napos kultúrák sejteinek DNS-ébe való beépülését detektálva megfigyelhetjük, hogy az alkalmazott elektroporációs technika a sejtek osztódását szinte teljes mértékben blokkolta, így a kicseppentett sejt szám az apoptózist is figyelembe véve igen drasztikusan csökkent (5.4. ábra). Hasonlóan erős proliferációcsökkentő hatást detektáltunk SuperFect alkalmazása során is, melyhez a korábban már vázolt kitapadó-képesség elvesztése is párosult, valamint a DMRIE alkalmazása is erősen gátló hatással bírt. Ez utóbbi esetekben a GFP expresszió megjelenése, habár igen alacsony értékű volt, további timidinbeépülés csökkenést eredményezett (5.4. ábra). A Lipofectamin proliferáció csökkentő hatása nem volt olyan jelentős, mint az előbbi liposzómaképződésen alapuló transzfekciós módszereké, ugyanakkor a GFP jelenléte további már nem elhanyagolható 70% körüli osztódáscsökkenéssel párosult. A Saint Mix önmagában és GFP jelenlétében is csökkentette az osztódási rátát, de ez a populációs szintű vizsgálatokhoz még kielégítő értéknek bizonyult (5.4. ábra).

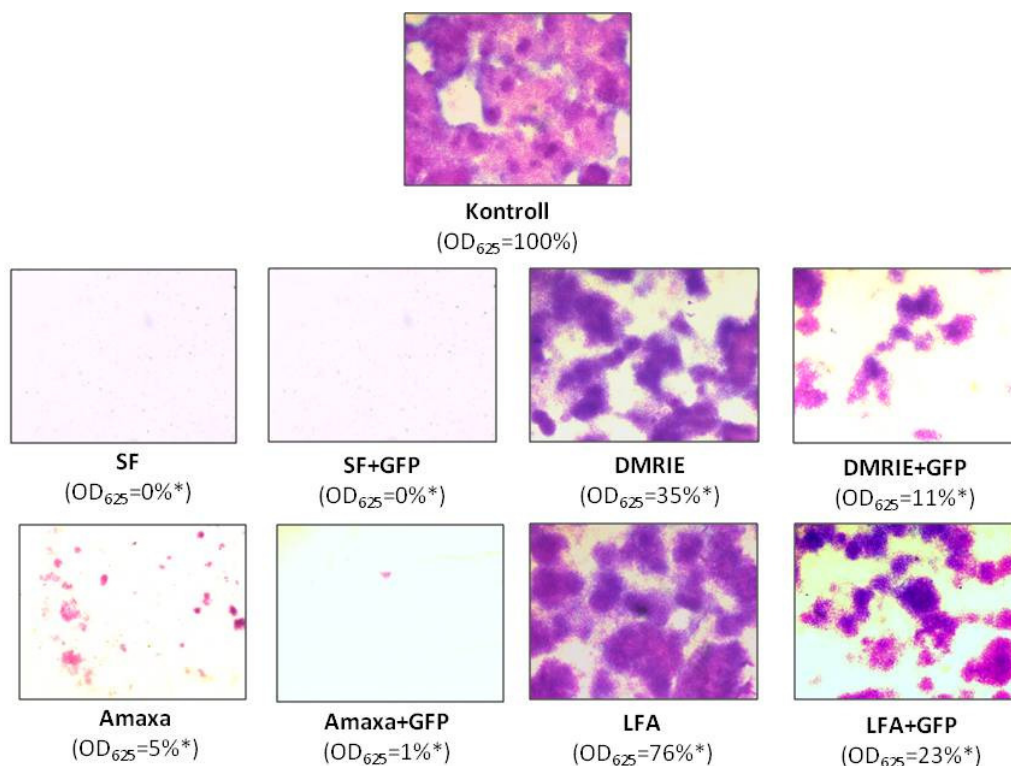


5.4

Ábra A transzfekció és a GFP expresszió hatása a porcosodó kultúrák sejtosztódására. A sejtek proliferációs rátáját ³H-timidin beépülésének vizsgálatával kísértük figyelemmel. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibásávok az egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Statisztikailag szignifikáns *P<0,05 a kontrollhoz képest és a **P<0,05 transzfekciós reagenshez viszonyított változásokat jelzik.

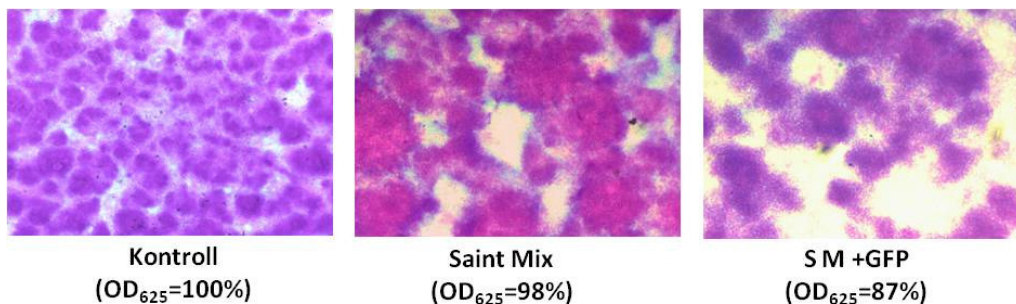
5.1.4. A transzfekció hatása a metakromáziásan festődő porc mennyiségére reagens és módszerfüggő

Eddigi vizsgálatainkkal csupán az alkalmazott reagensek sejtekre kifejtett hatását elemeztük, nem esett azonban szó arról, hogy ez hogyan befolyásolja a porcképződés mértékét, ezen belül is a savas DMMK-kel metakromáziásan festődő matrixalkotók jelenlétét a 6 napos tenyésztési időintervallumban. A savas toluidinkék hasonló festési tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a DMMK, de ez a festék megfelelő módszert választva visszaoldható a kultúrákból és a 625 nm-en mért abszorbanciaérték arányos a metakromáziásan festődő porc mennyiségével, mellyel így számszerűsíthetjük a porcképződés mértékét. Kontrollként a kezeletlen és transzfekció reagens nélküli táptalajban tenyésztett porctelepüket tekintettük, és megvizsgáltuk, hogy az egyes reagensek és a GFP expresszió jelenléte milyen hatással van a keletkezett metakromáziásan festődő porc mennyiségére.



5.5.ábra A transzfekciós módszerek és a GFP jelenlétének hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A képek 5 kísérlet reprezentatív adatainak tekinthetők. A kultúrákat erősen savas pH-n DMMK-kel festettük. A fotókat 4× objektívvel készítettük. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) értékei. A megadott értékek az egyes kísérleti csoportok kontrollra korrigált %-os különbségét jelzik. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,05) változásait csillagok (*) mutatják.

Ahogy az várható volt a sejtek életképesség-változásai alapján, az Amaxa készülékkel elektroporált sejtekből kialakult telepek alig mutattak metakromáziás jelenséget, míg az ezzel a módszerrel bejuttatott GFP jelenléte teljesen eltüntette a metakromatikus szín jelenlétét (5.5. ábra). Amint azt már korábban említettem a SuperFect reagens hatására a sejt kultúrák elvesztették adhéziós képességüket és felváltak a tenyésztő felületről, ezért festésük ily módon lehetetlenné vált, illetve ilyen körülmények között porccsomók kialakulása sem fordulhatott elő. A kifejezetten kitapadó kultúrákra kifejlesztett DMRIE reagens hatására igen erős matrixképződés visszaesést detektáltunk, a reagens a kontroll 35%-ra redukálta a detektálható proteoglikánok mennyiségét. Ezt az ugyan alacsony számban lévő, de sikeresen GFP-vel expresszált sejtek jelenléte tovább csökkentette 11%-ra (5.5. ábra). A képződött porc redukciójának mértéke Lipofectamin 2000 hozzáadása következtében még elfogadható lenne a porcdifferenciáció változásainak követéséhez, azonban az idegen fehérje expressziója és az ennek következtében fellépő megemelkedett sejthalál a kontroll 23%-ra szorította vissza a képződő porcmatrix mennyiségét (5.5. ábra). A Saint Mix reagens egyedül álló módon önmagában adagolva, illetve GFP jelenlétében sem csökkentette szignifikáns mértékben a porcdifferenciáció mértékét a savas DMMK festések tanúsága szerint (5.6. ábra).

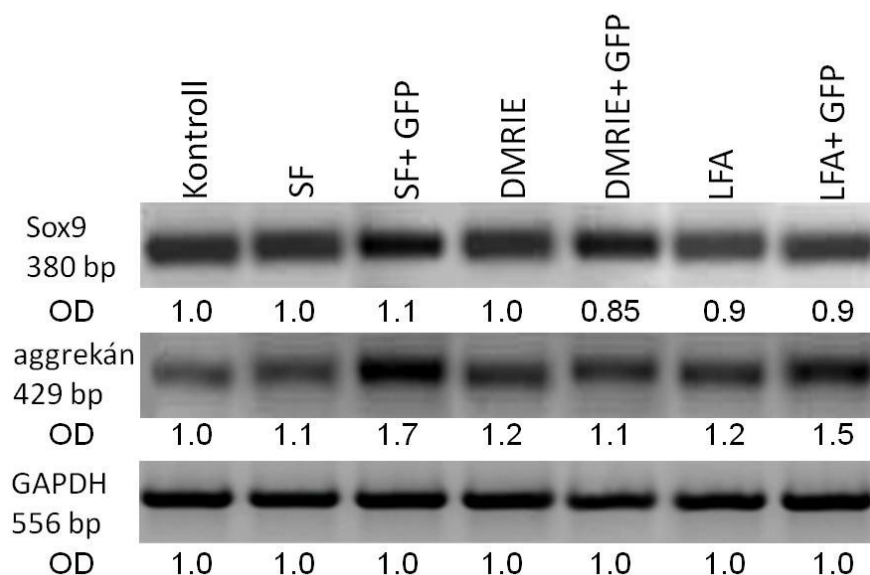


5.6.ábra A Saint Mix transzfekciós reagens és a GFP jelenlétének hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A képek 5 kísérlet reprezentatív adatainak tekinthetők. A kultúrákat erősen savas pH-n DMMK-kel festettük. A fotókat 4× objektívvel készítettük. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) értékei. A megadott értékek az egyes kísérleti csoportok kontrollra korrigált %-os különbségét jelzik.

5.1.5. A transzfekció nincs jelentős hatással porcképződést szabályozó faktorok mRNS expressziójára

A kondroprogenitor sejtek differenciációjuk során porcspecifikus extracelluláris matrixot termelnek maguk köré, ami meghatározza az érett porc szerkezetét. A porcspecifikus

ECM-ot alkotó molekulák expressziója a tenyésztés 2-3. napján kezdődik, amikor nagy mennyiségű aggregán és II. típusú kollagén halmozódik fel a porcosodó sejtek közötti állományban. E molekulák valamelyikének detektálása a porcmatrix termeléséről, azaz a porcképződés mértékéről nyújthatnak tisztább képet. A II. kollagén és az aggregán expressziójának egyik fő szabályozója a Sox9 transzkripciós faktor, így expressziójának nyomon követése az egyik legmegfelelőbb módszer a porcdifferenciáció mértékének megítélésére. E fehérjének foszforilált formája intenzívebb transzkripciós aktivitást jelez, ami nem előfeltétele ugyan a differenciációnak, de fontos a porcképződés megítélése szempontjából. Az *aggregán tengelyfehérjéjének* és a *sox9* géneinek expressziója információt adhat a differenciációt szabályozó egyes jelátviteli útvonalak módosulásáról az alkalmazott transzfekciós reagens vagy esetleg a GFP hatásainak következtében. Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb transzfekciós módszert vizsgálni tudjunk a tenyésztés 2. napján arattunk mintákat mielőtt még a SuperFect reagenssel kezelt sejtek felváltak volna a tenyésztő felületről.



5.7.ábra A transzfekció hatása a porcképződés monitorozására használt markergének expressziójára a 2. tenyésztési napon. AZ PCR során kontrollként GAPDH-t használtunk. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

Az elektroporáció következtében fellépő drasztikus osztódáscsökkenés és magas apoptotikus hajlam nem tette lehetővé, hogy elegendő mintát tudjunk termelni az adott faktorok vizsgálatához, így ettől ezen kísérletek során eltekintettünk. A többi transzfekciós módszer hatásait megvizsgálva kijelenthetjük, hogy a Sox9 mRNS expressziójában nem okoztak szignifikáns változást (5.7. ábra). Ehhez hasonló módon a bejuttatott GFP jelenléte

sem csökkentette, vagy növelte meg szignifikánsan transzkripció faktor expressziós szintjét. Az aggregán tengelyfehérje mRNA expressziója a SuperFect és a Lipofectamin 2000 GFP bejuttatása nyomán enyhén megemelkedett. A többi módszer nem volt hatással az aggregán mRNA expressziójára (5.7. ábra). A transzekciós módszerek előnyeinek és hátrányainak összefoglalása az 5.1. táblázatban látható. A Saint Mix hatásait a későbbiekben részletesebben tárgyalom (lásd 5.15.ábra).

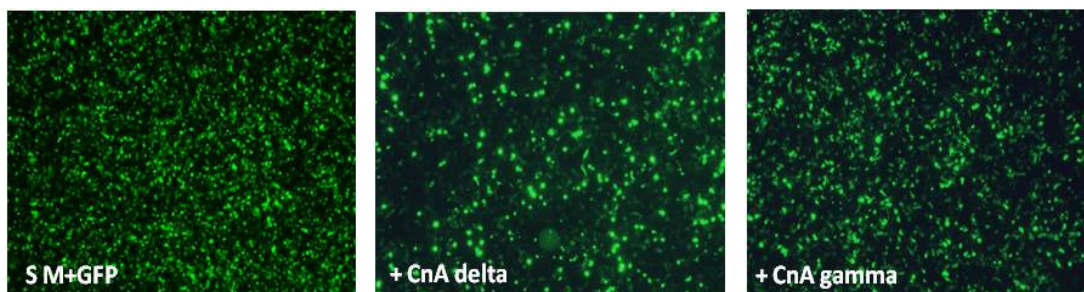
	Transzekciós hatékonyság	Apoptózis	Metakromázia	Proliferáció	Életképesség
Amaxa	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↓↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓↓
DMRIE	↑↑	↑↑↑	↓↓	↓↓↓	↓↓
SuperFect	↑	↑↑	↓↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓
Lipofectamin 2000	↑↑↑↑	↑↑	↓↓	↓↓	↓↓
Saint Mix	↑↑↑↑	↑	↓	↓↓	↓↓

5.1 táblázat A transzekciós reagensek hatékonysága és hatásai a kondrogenikus sejtekre.

5.2. A calcineurin túltermelésének hatásai a kondrogenezésre

5.2.1. A calcineurin overexpressziója porcképződés-csökkentő hatású

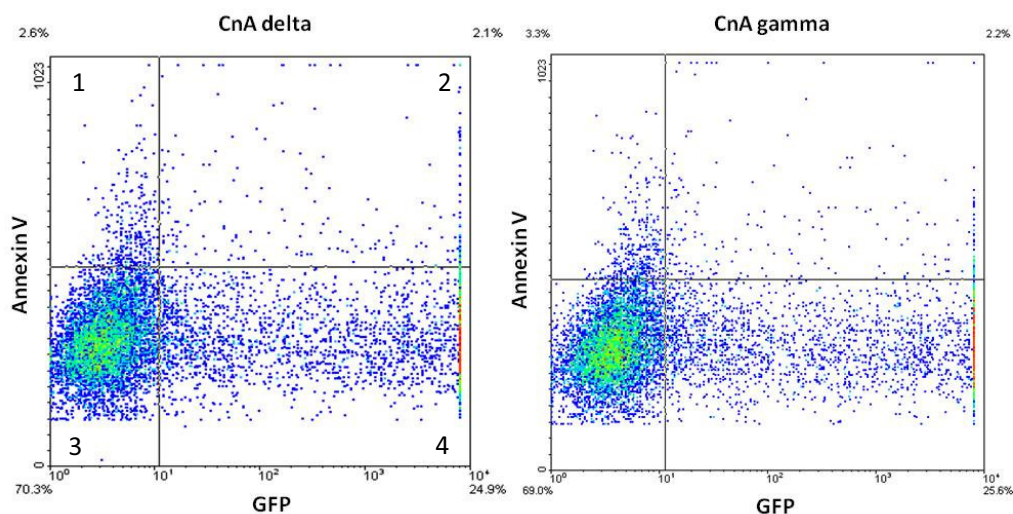
A megfigyelt jelenségek alapján a Saint Mix reagenst választottuk ki a mezenchimális sejtek transzekciójára. Első kísérleteink során viszonylag nagyméretű, a PP2B két eltérő formáját kódoló vektorokat juttattunk a differenciálódó sejtekbe. Az egyik vektorunk a konstitutíve aktív CnA delta, a másik a PP2B gamma izoformáját kódoló CnA gamma volt. A transzekció hatékonyságának fluoreszcens mikroszkópban való megítélése során kevesebb GFP pozitivitást mutató sejtet láttunk a fenti vektorok bejuttatása után, mint az üres, csupán GFP-t expresszáló vektorral történt transzekciót követően (5.8. ábra).



5.8.ábra A calcineurin transzekció-hatékonyság vizuális megítélése. Fluoreszcens mikroszkóppal, 10× objektívvel készült képek az 1. tenyésztési nap GFP pozitív sejtjeit mutatják. A képek 5 különböző kísérlet egy-egy jellemző eredményét prezentálják.

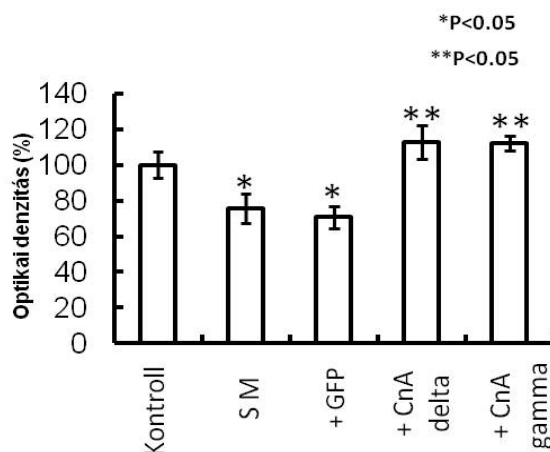
FACS-al elvégzett hatékonyságvizsgálat alátámasztani látszott ezt, hiszen a sejtek csupán 25% transzekválódott sikeresen. A két eltérő vektor kifejeződése szinte teljesen

azonos volt. Ugyanakkor az overexpresszió nem emelte meg az apoptotikus sejtek számát, csak 1%-os vagy az alatti elhanyagolható korai sejthalálra utaló jelet detektáltunk (5.9. ábra).



5.9.ábra A kalcineurin transzfekció hatékonysága és apoptotikus hatása, FACS mérés. 5 kísérlet egyik reprezentatív eredménye density plot-on ábrázolva. A négy kvadráns balról jobbra haladva: 1. Annexin+/GFP- ; 2. Annexin+/GFP+ ; 3. Annexin-/GFP- ; 4. Annexin-/GFP+ populációt mutatja.

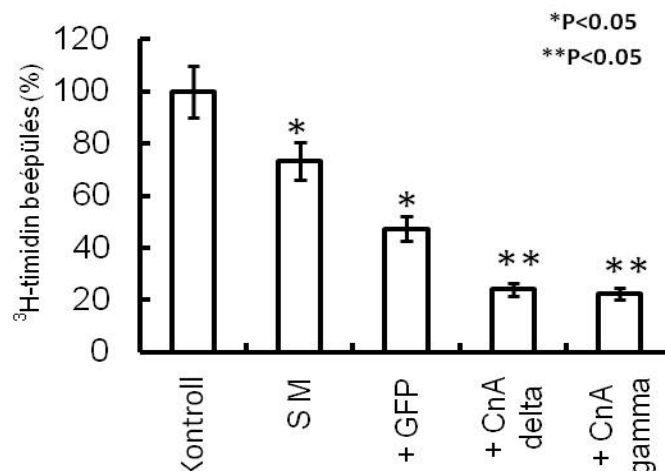
A kalcineurin túltermelődése nem csökkentette, sőt inkább növelni látszik a sejtek életképességét, de annyit minden bizonnyal elmondhatunk, hogy a porcosodó sejtek mitokondriális aktivitása a Saint Mix és a GFP csökkentő hatásával ellentétben emelkedett (5.10. ábra).



5.10.ábra A kalcineurin túltermeltesének hatása HD-kultúrák sejteinek mitokondriális aktivitására. A sejtek életképességét MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük.

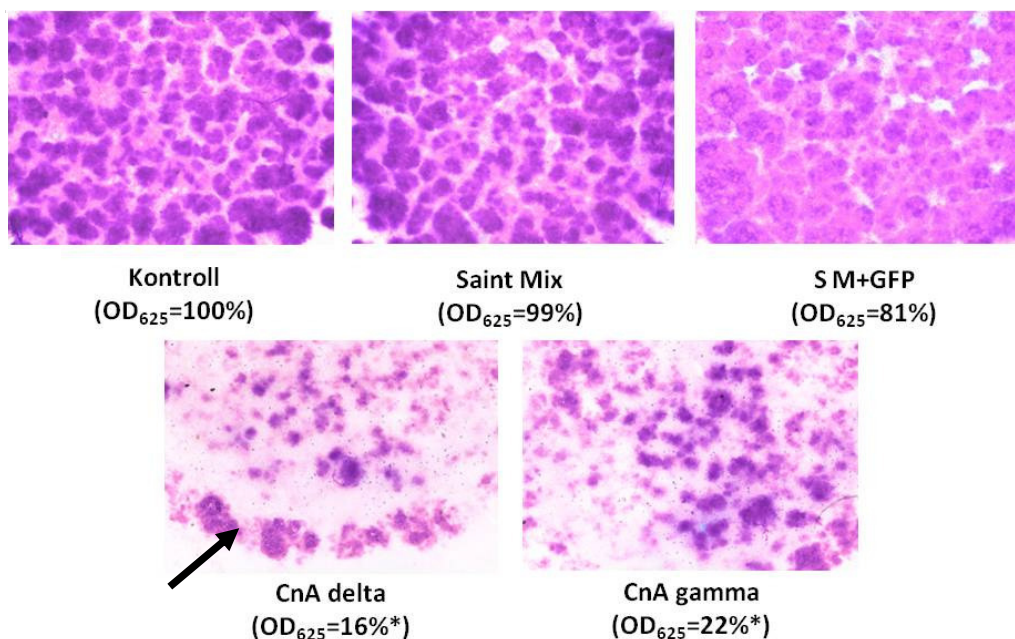
Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibaszávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Statisztikailag szignifikáns $*P<0,05$ a kontrollhoz képest és $**P<0,05$ transzfekciós reagenshez viszonyított változásokat jelzik.

Ezzel ellentétben a sejtek proliferációs képessége 20-30%-ra esett vissza. A két calcineurin expressziós forma funkciótól függetlenül közel azonos mértékben okozta ezt a hatást (5.11. ábra).



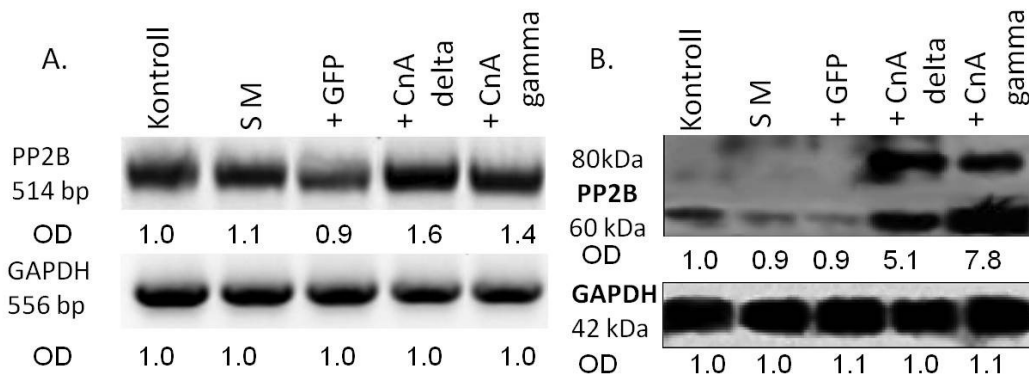
5.11.ábra A calcineurin overexpresszió hatása a porcosodó kultúrák sejtosztódására. A sejtek proliferációs rátáját ³H-timidin beépülésének vizsgálatával kísértük figyelemmel. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibasávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Statisztikailag szignifikáns *P<0,05 a kontrollhoz képest és a **P<0,05 a GFP-s vektorhoz viszonyított változásokat jelzik.

A drámai osztódóképesség visszaesés nemcsak a sejtszám csökkenését eredményezi, hanem ennek okán a detektálható porc mennyiségét is csökkenti. A 6. napon észlelhető metakromáziásan festődő ECM jelentősen visszaszorult. Az alkalmazott transzfekciós módszer és a GFP jelenléte a korábbiaknak megfelelően alig okozott számottevő változást. A két vektor jelentős különbségük ellenére is hasonló hatást okozott, mindkét esetben a kontrollként használt SM + GFP-hez képest is 60%-os csökkenést eredményezett (5.12.ábra). A CnA delta expresszió hatására minimális morfológiai különbséget figyelhettünk meg, ugyanis a telepek szélén gyűrű alakban kissé erősebb porcképződés tapasztalható, míg a CnA gamma esetében ilyen jellegű változást nem tapasztaltunk. Az erősebben festődő gyűrű egy kis részletét nyíllal jelöltük (5.12.ábra).



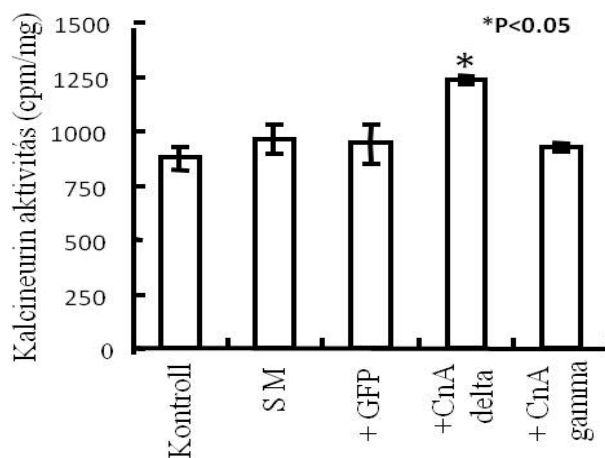
5.12.ábra A calcineurin overexpressziójának hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A képek 5 kísérlet reprezentatív adatainak tekinthetők. A kultúrákat erősen savas pH-n DMMK-kel festettük. A fotókat 4× objektívvel készítettük. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) értékei. A nyíllal bemutatott terület a telep széli részét jelöli. A megadott értékek az egyes kísérleti csoportok kontrollra korrigált %-os különbségét jelzik. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,05) változásait csillagok (*) mutatják.

A transzfekciós hatékonyság természetesen önmagában még nem feltétlenül jelenti a sikeres túltermeltetést is, ezért kísérleteink során kíváncsiak voltunk arra, hogy a bejuttatott vektorok milyen mennyiségben expresszáldottak a porcsejtekben és milyen hatással voltak a már korábban vizsgált porcspecifikus faktorok expressziójára. A folyamatosan aktív konstrukt 50-60%-os, míg a CnA gamma 30-40%-os PP2B katalitikus alegység mRNA expresszió növekedést mutatott a csak GFP-t tartalmazó üres vektorhoz képest (5.13.ábra). Az eredmények fehérjeszintű vizsgálatát Western blottal is elvégeztük, a GFP-t is expresszáló konstruktok kb. 20 kDa-nal magasabb sávban figyelhetők meg, míg a sejtek saját alap PP2B expressziója a 60 kDa-os sávnak megfelelő. Érdekes az a tény, hogy az overexpresszióval párhuzamosan a sejtek alap PP2B expressziója is megemelkedett. Az össz-calcineurin így CnA delta esetében 5×-ös, míg a CnA gamma esetében közel 8×-os emelkedést eredményezett (5.13.ábra).



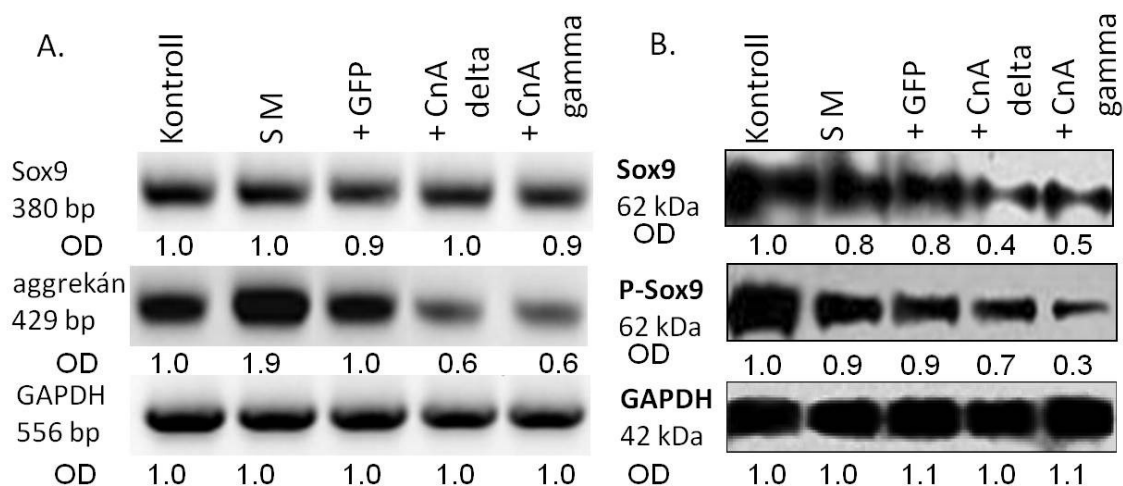
5.13.ábra A kalcineurin túltermeltetésének hatása a kalcineurin mRNS - (A) és fehérje expressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Western blot esetében a GFP-vel konjugált jelek kb. 20 kDa-nal magasabb sávban jelennek meg. Belső kontrollként az RT-PCR reakciónál és Western blot-oknál GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

Az overexpresszió mértéke nem adhat egyértelmű felvilágosítást arra, hogy az enzimként funkcionáló PP2B-nek milyen a katalitikus aktivitása, ezért enzimaktivitás méréseket is végeztünk. A Saint Mix és a GFP jelenléte önmagában nem változtatta meg a sejtek alap kalcineurin aktivitását. A CnA delta konstitutíve aktív formája, a vártan megfelelően szignifikáns módon megemelte a sejtpopuláció kalcineurin aktivitását, míg a PP2B A alegység gamma izoformáját kódoló CnA gamma aktivitása a kontrollal megegyező értéket mutatott (5.14.ábra).



5.14.ábra A kalcineurin endogén és túltermeltetett formáinak enzimaktivitása a 3. tenyésztési napon. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibasávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (* $P < 0,05$) változásait csillagokkal (*) jelöltük.

A Saint Mix transzfekciós reagens nincs hatással a Sox9 mRNS expressziójára, azonban érdekes módon az aggregán tengelyfehérje mRNS expresszióját kis mértékben megemelte. A GFP jelenléte ezt a kis emelkedést kompenzálta és a normál kontrollhoz hasonló expressziót okozott (5.15.ábra). A kalcineurin egyes formáinak túlermelődése a kondrogenizist szabályozó transzkripciós faktor Sox9 mRNS expresszióját alig detektálható módon csökkentette, ugyanakkor fehérjeexpressziója erőteljesen visszaesett. Az aktívabb foszforilált Sox9 jelenléte is mindkét konstrukt esetében csökkent, a CnA delta csak 30%-os, míg a CnA gamma közel 70%-os csökkenést eredményezett. Az ECM alkotó aggregán mRNS expressziója is mindkét PP2B vektor működése következtében 40%-kal visszaesett (5.15.ábra).



5.15.ábra A kalcineurin túlermeltetésének hatása a kondrogenikus markerek mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként mindkét esetben GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

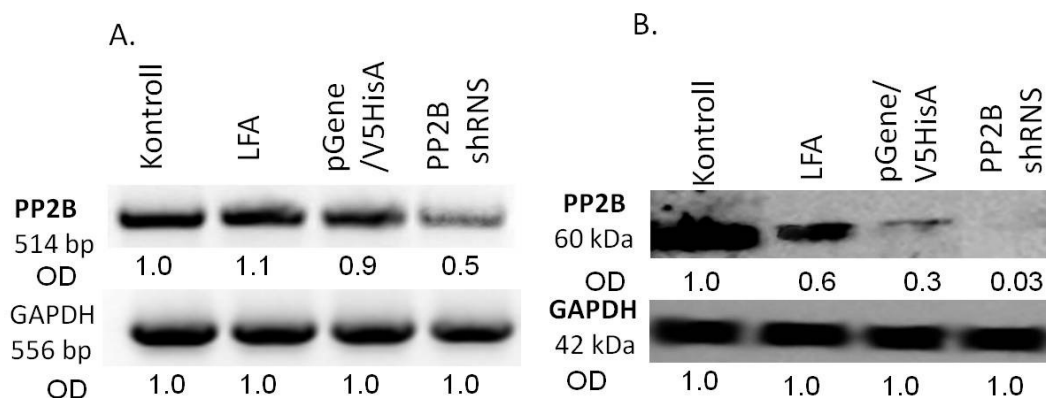
5.3. A kalcineurin géncsendesítésének hatásai a porcdifferenciációra

5.3.1. A kalcineurin géncsendesítése shRNS technológiával erősen csökkentette a porcképződést, de a sejtek proliferációs rátáját kissé megemelte

A sikeres overexpressziós vizsgálatok után kíváncsiak voltunk a PP2B fehérje esetleges hiánya, vagy annak alacsony jelenléte milyen hatással lehet a porcképződés mértékére. Korábbi adatokból már tudjuk, hogy a kalcineurin farmakológiai gátlása ciklosporin A-val csökkenti a porcdifferenciációt [68,72], arra vonatkozólag azonban nem

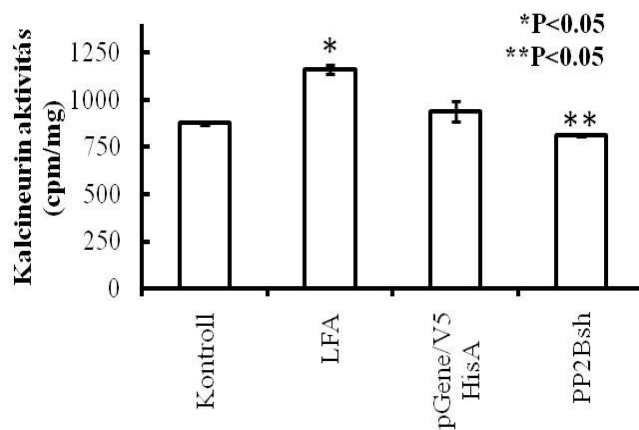
rendelkezünk adatokkal, hogy a calcineurin csendesítése milyen hatással lehet a jelátviteli útvonalakra.

Kísérleteink során PP2B shRNS-t használtunk, mely egy GFP-vel nem jelölt indukálható promóterű GeneSwitch rendszerbe volt klónozva. A már beállított Saint Mix transzfekciós rendszerrel azonban meglepő módon a géncsendesítés mértéke nem volt kielégítő. Az előzőekben kipróbált és viszonylag kevés citotoxicitással bíró Lipofectamin 2000 ezekben a kísérletekben sokkal megfelelőbbnek bizonyult. FACS-szal történő hatékonyságvizsgálatra ebben az esetben nincsen mód, azonban az mRNA expressziójának mértéke információt ad a csendesítés százalékos arányáról, ami ezen kísérletekben sokkal informatívabb. A PP2B csendesítést a 2. tenyésztési napon mifepristone-nal indukáltuk 24 órán keresztül. Kontrollként Lipofectamin 2000-rel és üres pGene/V5HisA vektorral transzfektált sejteket használtunk. A transzfekció sikerességét RT-PCR-ral ellenőriztük, ami szerint kb. 40-50% csendesítési hatékonysággal számolhattunk. Ugyanakkor a PP2B fehérjeexpresszióját detektálva megfigyeltük, hogy a csendesítés következményeképp olyan drámai módon visszaesett, hogy alkalmanként nem volt detektálható (5.16.ábra).



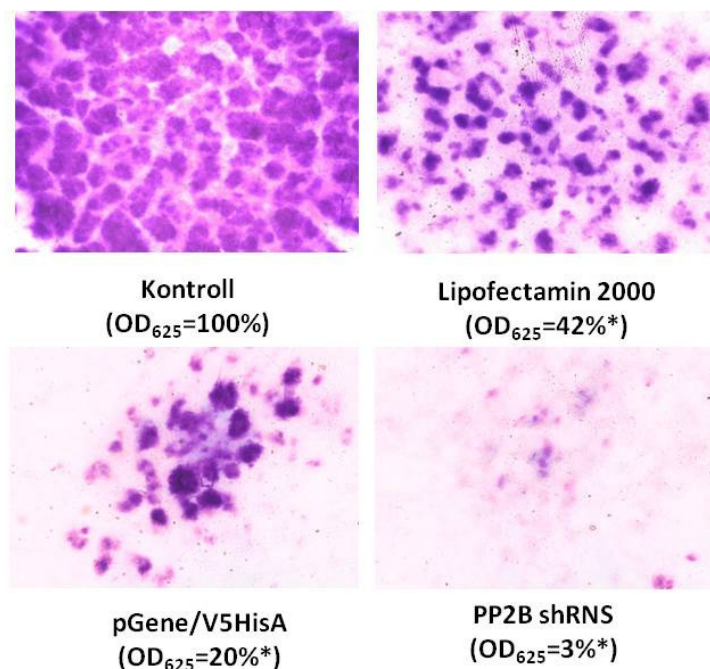
5.16.ábra A calcineurin géncsendesítésének hatása a calcineurin mRNA - (A) és fehérje expressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit mutatjuk. Belső kontrollként az RT-PCR és Western blot reakciónál GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

A géncsendesítés valódi hatásait és calcineurin funkciójának hiányát a PP2B aktivitásának mérésével lehet ellenőrizni. A calcineurin aktivitását megvizsgálva, megfigyeltük, hogy a Lipofectamin 2000 aktivitásfokozódást okozott, de ezt az „üres” vektor alkalmazása újra a kontroll szintre csökkentette. Az shRNS alkalmazása a várttól kicsit elmaradottan, de a pGene/V5HisA-hoz képest viszonylag kismértékű, de szignifikáns csökkenést eredményezett (5.17.ábra).



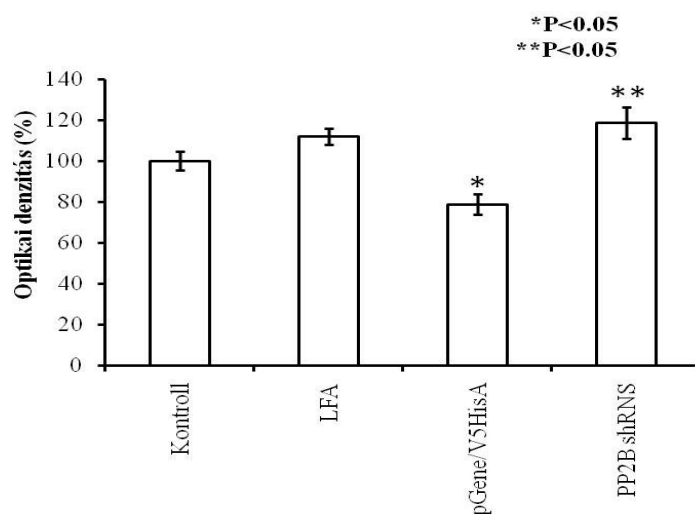
5.17.ábra A calcineurin csendesítésének hatása az aktivitására. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibasávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) mutatják. Statisztikailag szignifikáns *P<0,05 a kontrollhoz képest és a **P<0,05 transzfekeciós reagenshez viszonyított változásokat jelzik.

A keletkezett porc metakromatikus területeit megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy a pGene/V5HisA jelenléte önmagában is jelentős mértékű, mintegy 70-80%-os porcképződés-csökkenést eredményezett, azonban a PP2B shRNS alkalmazása a metakromázia szinte teljes eltűnéséhez vezetett (5.18.ábra).

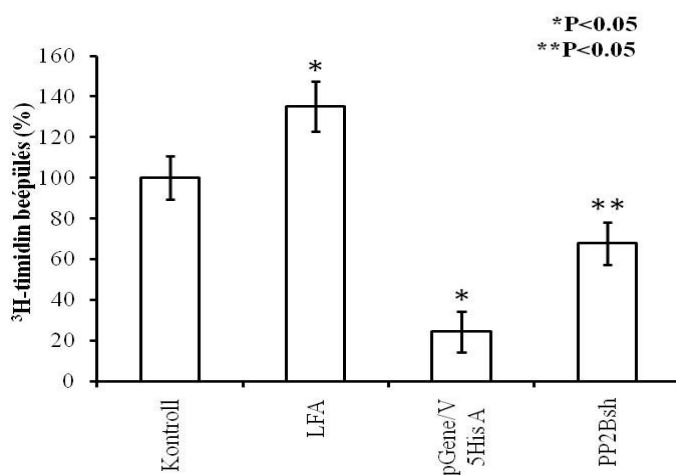


5.18.ábra A calcineurin géncsökkentésének hatása a metakromatikus festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A képek 5 kísérlet reprezentatív adatainak tekinthetők. A kultúrákat erősen savas pH-n DMMK-kel festettük. A fotókat 4× objektívvel készítettük. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) értékei. A megadott értékek az egyes kísérleti csoportok kontrollra korrigált %-os különbségét jelzik. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,05) változásait csillagok (*) mutatják.

Ennek oka lehetett az alkalmazott módszer fokozott citotoxicitása és proliferációcsökkentő hatása, ezért először MTT teszttel megvizsgáltuk a sejtek életképességeinek változását, mely alapján elmondhatjuk, hogy a pGene/V5HisA vektor önmagában erős mitokondriális aktivitáscsökkenést okozott, azonban az shRNS jelenléte a kontrollhoz képest (hasonlóan az overexpressziós kísérletekhez) kismértékű emelkedést mutatott (5.19.ábra).



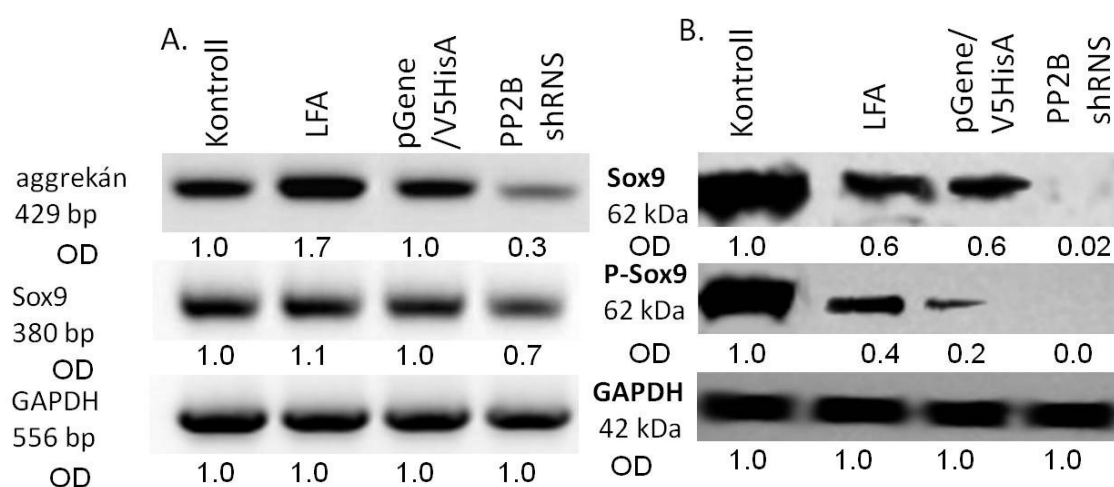
5.19.ábra A calcineurin géncsendesítésének hatása a HD-kultúrák sejteinek mitokondriális aktivitására. A sejtek életképességét MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibásávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Statisztikailag szignifikáns * $P < 0,05$ a kontrollhoz képest és a ** $P < 0,05$ a pGene/V5HisA-hoz viszonyított változásokat jelzik.



5.20.ábra A calcineurin géncsendesítés hatása a porcosodó kultúrák sejtosztódására. A sejtek proliferációs rátáját ³H-timidin beépülésének vizsgálatával kísértük figyelemmel. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibásávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Statisztikailag szignifikáns * $P < 0,05$ a kontrollhoz képest és a ** $P < 0,05$ a pGene/V5HisA-hoz viszonyított változásokat jelzik.

Csökkent porcképződés közvetlen oka lehet a megfelelő sejtdenzitás hiánya, mely a csökkent osztódóképességéből is adódhat. A sejtek osztódási rátája azonban a PP2B shRNS-sel transzfektált kultúrák esetében az üres vektorhoz képest szignifikánsan, közel 50%-kal emelkedett (5.20.ábra).

A csökkent metakromáziának részben lehet oka az egyes porcspecifikus transzkripciós faktorok és ECM alkotók expressziós redukciója. Az aggregán mRNS expressziója átlagosan 70%-kal csökkent míg a Sox9 30%-os expresszióvisszaesést mutatott. A Sox9 fehérjeexpressziója alkalmanként detektálhatatlanná vált az shRNS alkalmazásának következtében (5.21.ábra).



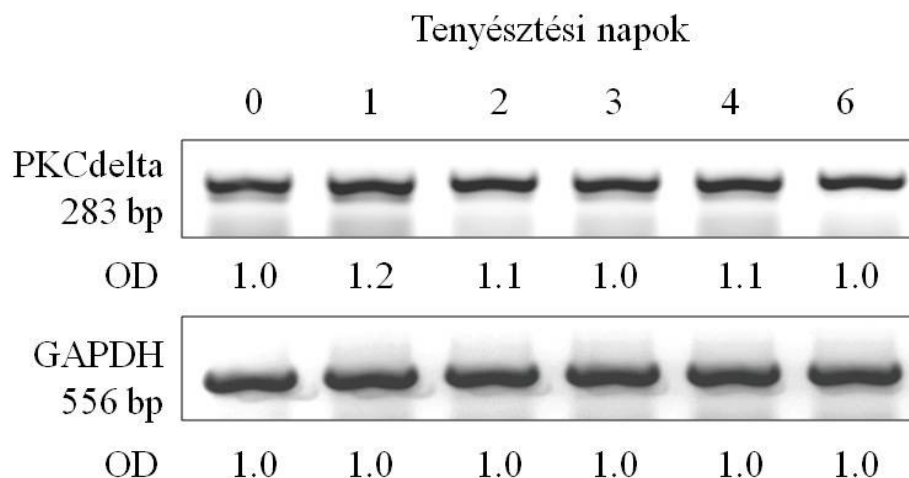
5.21.ábra A calcineurin géncsökkentésének hatása a kondrogenikus markerek mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként az RT-PCR és Western blot reakcióknál GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

5.4. A PKC δ vizsgálata a porcdifferenciáció során

5.4.1. A PKC δ expressziója és aktivitása a porcosodó HD-kultúrákban a 2-3. tenyésztési napon csúcsható kiemelkedést mutat

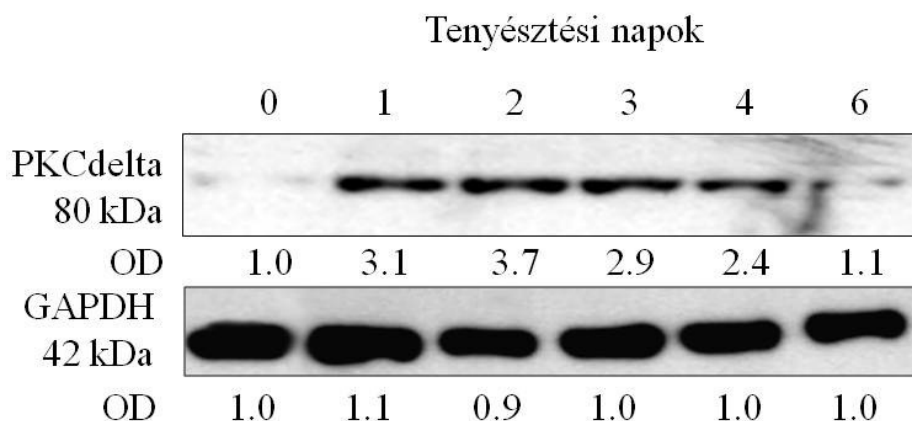
Bizonyos speciesek végtagjainak fejlődése során a PKC δ -nak kiemelkedő fontossága van a sejtek migrációjának befolyásolásában [63], azonban arról viszonylag kevés adattal rendelkezünk, hogy ezen kináz expressziója milyen mintázatot mutat a hialinporc kialakulása során, illetve annak hiánya milyen hatással van a képződő porc mennyiségére. Az enzim jelenlétét először RT-PCR technikával mRNS szinten mutattuk ki a tenyésztés egyes napjain. A PKC δ mRNS expressziója – habár az 1. és 2. tenyésztési napon enyhe emelkedést mutat –

megközelítőleg azonos és folyamatos szinten van jelen a kondroprogenitor sejtekben és a már differenciálódott porcsejtekben is (5.22.ábra).



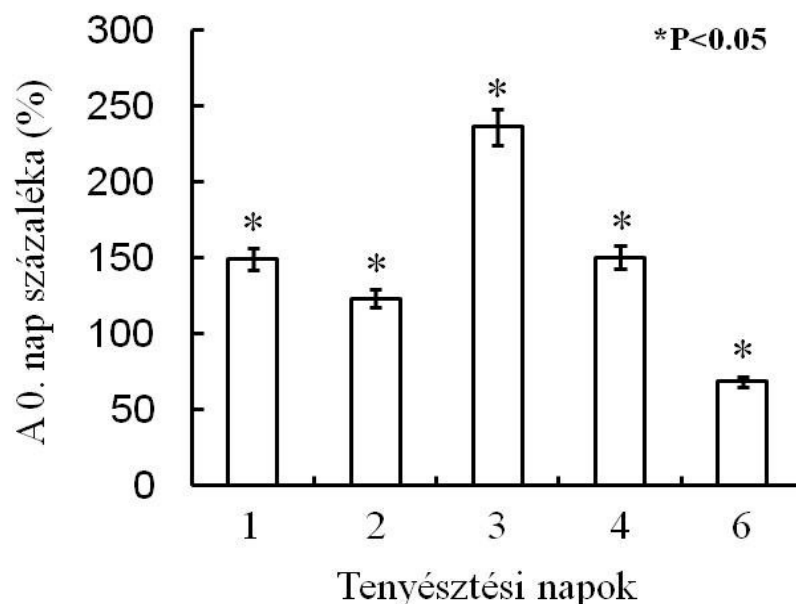
5.22.ábra A PKC δ mRNA expressziója a differenciáció egyes napjain. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a megfelelő kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

Western blottal megvizsgálva a fehérjeexpressziós profilt egy ettől kissé eltérő mintázat tárul a szemünk elé, hiszen egy elég erőteljes expressziós csúcsot figyelhetünk meg az 1., 2. és 3. tenyésztési napon, amikor a kondrogenikus sejtek porcsejteké alakulnak (5.23.ábra).



5.23. ábra A PKC δ fehérjeexpressziója a differenciáció egyes napjain. 5 kísérlet reprezentatív eredményét láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a 0.napos kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

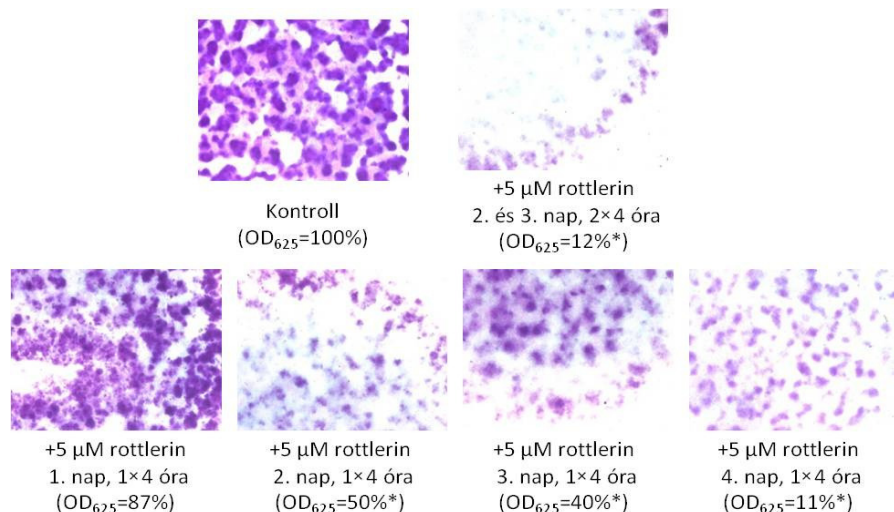
Ugyanakkor a fehérjeexpresszió ilyen jellegű emelkedése még nem feltételezi az enzim aktivitásának hasonló jellegű változásait. Kontroll körülmények között a fehérjeprofilhoz képest egy nappal eltolva, egy igen hasonló aktivitásbeli mintázatot detektáltunk, amely a 3. tenyésztési napon, a differenciáció legfontosabb napjának tekintett időpontban mutat 0. nappal összehasonlítva 2,5×-ösen emelkedett értéket (5.24.ábra).



5.24. ábra A PKC δ aktivitása a differenciáció egyes napjain. 5 kísérlet reprezentatív eredményét láthatjuk. Az egyes csoportok értékeit a 0. napon mért aktivitásra normalizáltuk. Az egyes differenciációs napok kontrollhoz (0.nap) viszonyított szignifikáns (* $P<0,05$) változásait csillagokkal (*) jelöltük.

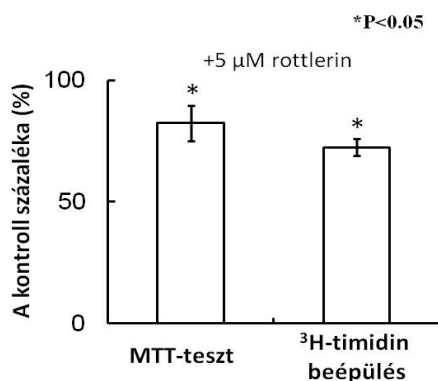
5.4.2. A rottlerin idő- és koncentrációfüggő módon gátolja a porcképződést és osztódóképesség csökkenéshez is vezet

A rottlerint olyan koncentrációban alkalmaztuk (5 μ M), amely irodalmi adatok alapján PKC δ specifikusnak tekinthető. A kezeléseket a tenyésztés eltérő napjain 4 órán keresztül alkalmaztuk, és porcképződésre gyakorolt hatásait DMMK-kel és TK-kel festett kultúrákon a 6. tenyésztési napon vizsgáltuk. A rottlerin porccsökkentő hatással volt, kiemelkedően nagymértékű porcképződés csökkenést tapasztaltunk a tenyésztés 2. és 3. napján alkalmazott farmakológiai gátlást követően. Ezekben az esetekben a 11 és 12%-ra csökkent a metakromáziásan festődő porcterületek nagysága a kontrollcsoporthoz képest (5.25.ábra).

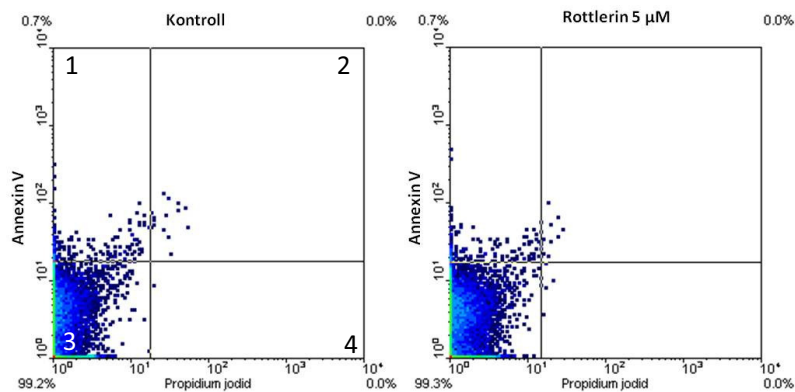


5.25.ábra A rottlerin kezelések hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A képek 5 kísérlet reprezentatív adatainak tekinthetők. A kultúrákat erősen savas pH-n DMMK-kel festettük. A fotókat 4× objektívvel készítettük. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) értékei. A megadott értékek az egyes kísérleti csoportok kontrollra korrigált %-os különbségét jelzik. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,05) változásait csillagok (*) mutatják.

Mivel a porc képződés csökkenés oka lehet a sejtek apoptotikus, avagy nekrotikus elhalása, életképességük csökkenése, valamint az osztódóképesség-csökkenés következményeként fellépő denzitáscsökkenés is, ezért megvizsgáltuk ezen paraméterek változásait a rottlerin kezeléseket követően. A sejtek mitokondriális aktivitása és osztódási rátája szignifikánsan csökkent az alkalmazott gátlószer hatására (5.26.ábra), ugyanakkor az inhibitor alkalmazása nem járt sem nekrotikus, sem apoptotikus folyamatok beindításával (5.27.ábra).



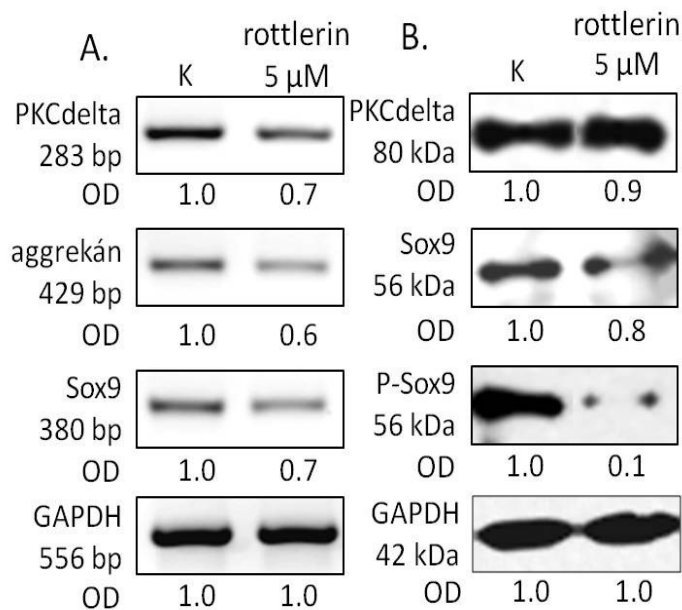
5.26.ábra A rottlerin kezelés hatása a porcosodó kultúrák életképességére és sejtosztódására. A sejtek életképességét MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A sejtek proliferációs rátáját ³H-timidin beépülésének vizsgálatával kísértük figyelemmel. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibaszávok a kiválasztott kísérlet átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Statisztikailag szignifikáns *P<0,05 a 3 napos kontrollhoz képest viszonyított változásokat jelzik.



5.27.ábra A rottlerin hatása a sejtek apoptotikus és nekrotikus folyamataira a 3. tenyésztési napon. A FACS mérés 5 kísérlet 1 reprezentatív eredménye density plot-on ábrázolva. A négy kvadráns balról jobbra haladva: 1. Annexin+/PI- ; 2. Annexin+/PI+ ; 3. Annexin-/PI- ; 4. Annexin-/PI+ populációt mutatja.

5.4.3. A rottlerin csökkenti a porcspecifikus markerek expresszióját

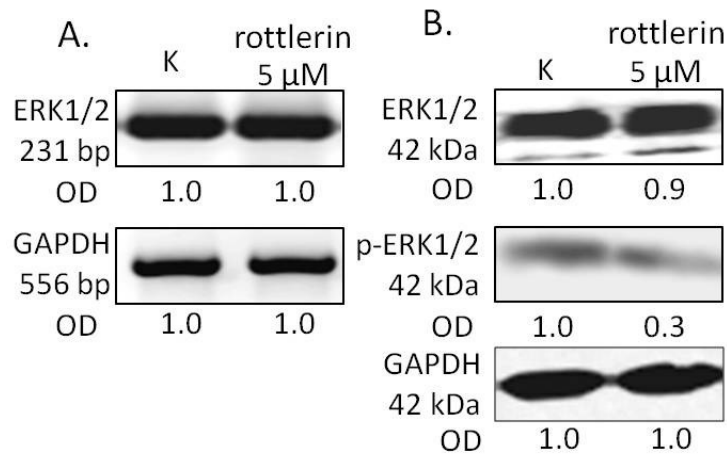
A PKC δ mRNS expressziója csökkent az 5 μ M rottlerin expozíciónak köszönhetően, ugyanakkor ebben a koncentrációban az inhibitor nem volt számottevő hatással az enzim proteinexpressziójára. Az aggregán tengelyfehérje és a Sox9 mRNS expressziója szignifikánsan csökkent a gátlószer hatásának következtében. A Sox9 fehérjeexpresszióját és foszforiláltsági szintjét megvizsgálva elmondhatjuk, hogy a Sox9 expresszió csak kis mértékben, míg annak foszforilált formájának jelenléte igen drámaian redukálódott (5.28.ábra).



5.28.ábra A rottlerin gátló hatása a kondrogenikus markerek mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

5.4.4. A farmakológiai inhibitor csökkent ERK1/2 aktivitást eredményez

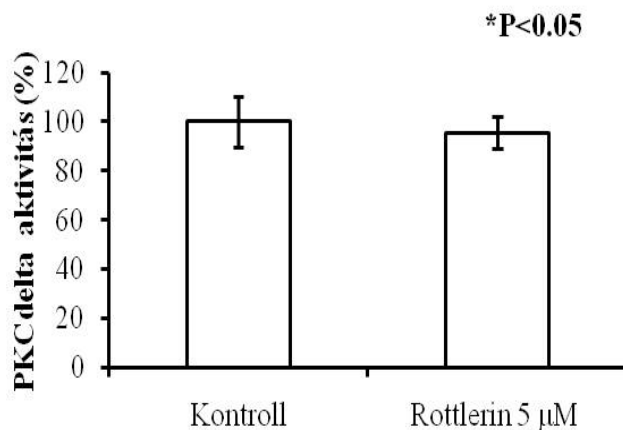
Az *in vitro* kondrogenézis egy másik kulcsfontosságú jelátviteli kaszkádja a MAPK kaszkád, mely a differenciáció és a sejtosztódás kényes egyensúlyát hivatott fenntartani a mezenchimális sejtek fejlődése során. A kísérleteink során tapasztalt osztódáscsökkenés kapcsán felmerült az a kérdés, hogy a PKC δ milyen kapcsolatban állhat a MAPK rendszerrel és gátlása proliferációcsökkenést eredményez-e? Az ERK1/2 a MAPK rendszer egyik kondrogenézis szempontjából kiemelkedő tagja, mely nélkül a porcdifferenciációs folyamatok zavart szenvednek. Az ERK1/2 mRNS és protein expressziója nem változik rottlerin kezelés hatására, viszont a kettősen foszforilált ERK1/2 jelenléte jelentősen visszaesik az inhibitor alkalmazása során (5.29.ábra).



5.29.ábra A rottlerin gátló hatása az ERK1/2 mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

5.4.5. A rottlerin nem gátolja a PKC δ aktivitását a kondrogenikus sejtekben

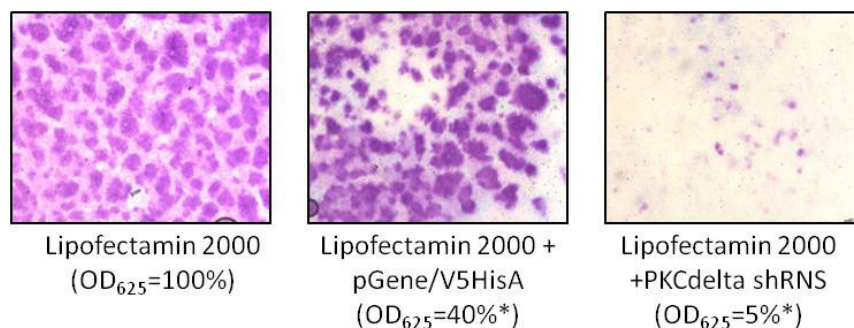
Megvizsgáltuk, hogy az 5 μ M koncentrációban alkalmazott rottlerin milyen hatással van a PKC δ aktivitására, melynek esetleg köszönhetjük az ERK1/2 foszforiláltsági szintjének változását. Meglepetésünkre azonban több kísérlet elvégzése után is csak igen kismértékű, de nem szignifikáns és kísérletenként teljesen eltérő előjelű változásokat detektáltunk (5.30.ábra).



5.30. ábra A rottlerin hatása a PKC δ aktivitására. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A kísérletet a 3. tenyésztési napon végeztük. A PKC δ kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,05) változásait csillagokkal (*) jelöltük.

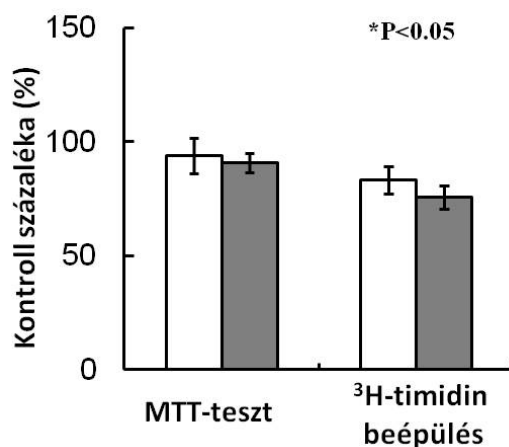
5.4.6. A PKC δ expressziójának shRNS-sel történő gátlása csökkenti a porcképződést

A kapott eredmények tükrében egy sokkal specifikusabb gátlás; a PKC δ shRNS kidolgozásán munkálkodtunk. Ha ezt a kisméretű RNS-t indukálható promóterű vektorba klónozzuk, akkor megfelelően időzítve és specifikusan vizsgálhatjuk a PKC δ gátlásának a kondrogenézisre gyakorolt hatásait. Az így nyert adatokat összehasonlíthatjuk a farmakológiai gátlás eredményeivel. A PKC δ shRNS sejtekbe történő bejuttatását a már korábban is shRNS-ekre alkalmazott Lipofectamin 2000-rel értük el, az indukciót 1 μ M mifepristone hozzáadásával a 2. tenyésztési napon 24 órán keresztül végeztük. A gyári adatoknak megfelelően az indukciót követően 24 órán belül várható a géncsendesítés hatása. Kontrollként Lipofectamin 2000-rel és „üres” pGene/V5HisA vektorral transzfektált sejteket használtunk. A metakromáziásan festődő porc mennyisége a korábbi adatoknak megfelelően már az üres vektor alkalmazása során is jelentősen csökkent a kontroll kb. 40%-ára. Az shRNS indukciója azonban a tenyésztés 6. befejező napjára csupán 5%-os porc jelenlétét eredményezte a savas DMMK és TK festés tanúsága szerint (5.31. ábra).



5.31.ábra A PKC δ géncsendesítés hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A képek 5 kísérlet reprezentatív adatainak tekinthetők. A kultúrákat erősen savas pH-n DMMK-kel festettük. A fotókat 4 \times objektívvel készítettük. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD_{625}) értékei. A megadott értékek az egyes kísérleti csoportok Lipofectamin 2000 kontrollra korrigált %-os különbségét jelzik. Az egyes kísérleti csoportok Lipofectamin 2000 kontrollhoz viszonyított szignifikáns (* $P < 0,05$) változásait csillagok (*) mutatják.

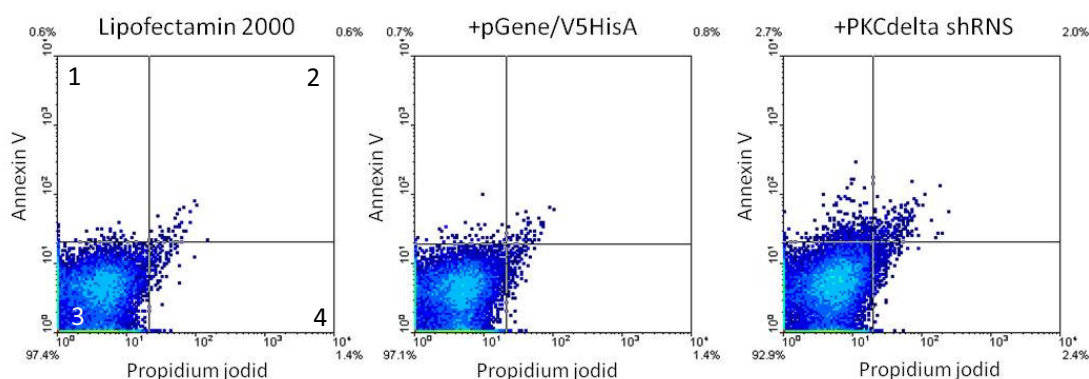
A porcosodó sejtek életképességét MTT-tesztel megvizsgálva azonban láthatjuk, hogy sem az „üres” pGene/V5HisA vektor, sem a PKC δ shRNS tartalmazó vektor nem befolyásolta a sejtek mitokondriális aktivitását (5.32.ábra). A farmakológiai gátlással ellentétben az shRNS-sel történő PKC δ gátlás nem vezetett proliferáció csökkenéshez (5.32.ábra).



5.32.ábra A PKC δ géncsendesítés hatása a porcosodó kultúrák életképességére és sejtosztódására. A sejtek életképességét MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A sejtek proliferációs rátáját ³H-timidin beépülésének vizsgálatával kísértük figyelemmel. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibaszávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Statisztikailag szignifikáns (* $P < 0,05$) a Lipofectamin 2000 kontrollhoz képest viszonyított változásokat jelzik. Az üres oszlopok a pGene/V5HisA vektor, a szürke oszlopok a PKC δ shRNS változásait reprezentálják.

Az shRNS ugyan nem változtatta meg a sejtek mitokondriális aktivitását, de esetleg beindíthatott olyan folyamatokat melyek a differenciálódó sejtek apoptózisát és esetleges

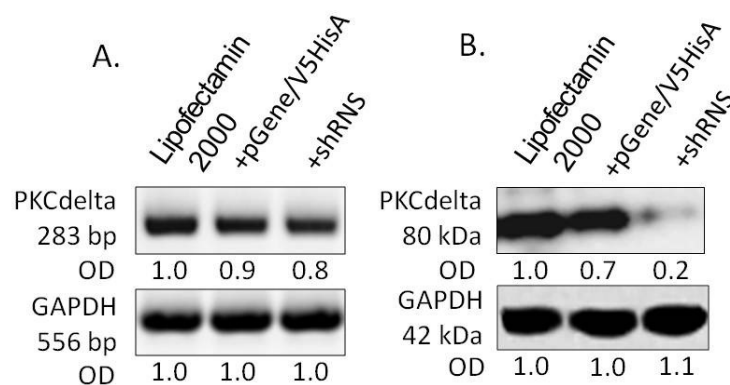
nekrotikus folyamatait indukálhatják. Méréseink szerint azonban az „üres” pGene/V5HisA vektor nincs hatással a sejtek programozott sejthalálára, valamint nekrozist sem indukál. A PKC δ shRNS is csupán egy igen kismértékű, mintegy 2%-os apoptózist és esetenként 1%-os nekrozist eredményezett (5.33.ábra). Ezek a vizsgálatok megerősítik azt a feltevésünket, hogy az shRNS alkalmazása kizárólag a PKC δ funkciókiesése miatt okozta a porcképződés csökkenését.



5.33.ábra A PKC δ géncsendesítés hatása a sejtek apoptotikus és nekrotikus folyamataira a 3. tenyésztési napon. A FACS mérés 5 kísérlet 1 reprezentatív eredményei density plot-on ábrázolva. A négy kvadráns balról jobbra haladva: 1. Annexin+/PI- ; 2. Annexin+/PI+ ; 3. Annexin-/PI- ; 4. Annexin-/PI+ populációt mutatja.

5.4.7. A sikeres PKC δ géncsendesítés csökkenti a Sox9 fehérjeexpresszióját

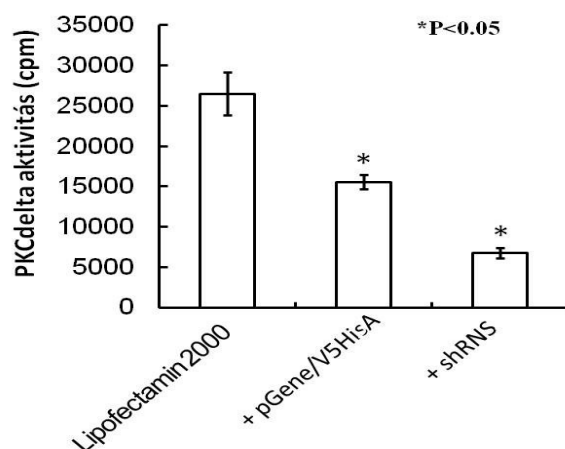
Az shRNS transzfekeció sikerességét a PKC δ mRNS-ének vizsgálatával ítéltük meg, mely során a kontrollhoz képest a shRNS 20-30%-kal csökkentette a kináz mRNS expresszióját. A PKC δ fehérjeexpressziója azonban sokkal drámaibb mértékben a kontroll mintegy 20-30%-ára csökkent a tenyésztés 3. napján (5.34.ábra).



5.34.ábra A PKC δ géncsendesítés hatása a PKC δ mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

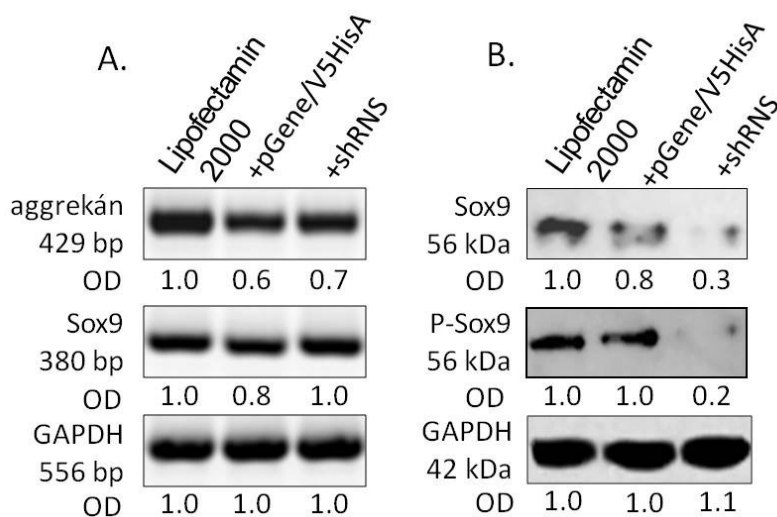
Az enzim aktivitása is tükrözte a fehérjeexpressziós változásokat, mely szerint a PKC δ shRNS alkalmazása a kontrollhoz képest 75%-kal csökkentette az aktív kináz jelenlétét, bár

azt is meg kell említenünk, hogy az „üres” pGene/V5HisA vektor jelenléte is aktivitáscsökkenést vont maga után (5.35.ábra).



5.35. ábra A PKC δ géncsendesítés hatása a PKC δ aktivitására a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményét láthatjuk. A kísérletet a 3. tenyésztési napon végeztük. A mérésekben az *ex vivo* alkalmazott rottlerin összPKC aktivitáshoz viszonyított csökkenését a PKC δ saját aktivitásának tekintettük. A PKC δ aktivitásának Lipofectamin 2000 kontrollhoz viszonyított szignifikáns (* $P < 0,05$) változásait csillagokkal (*) jelöltük.

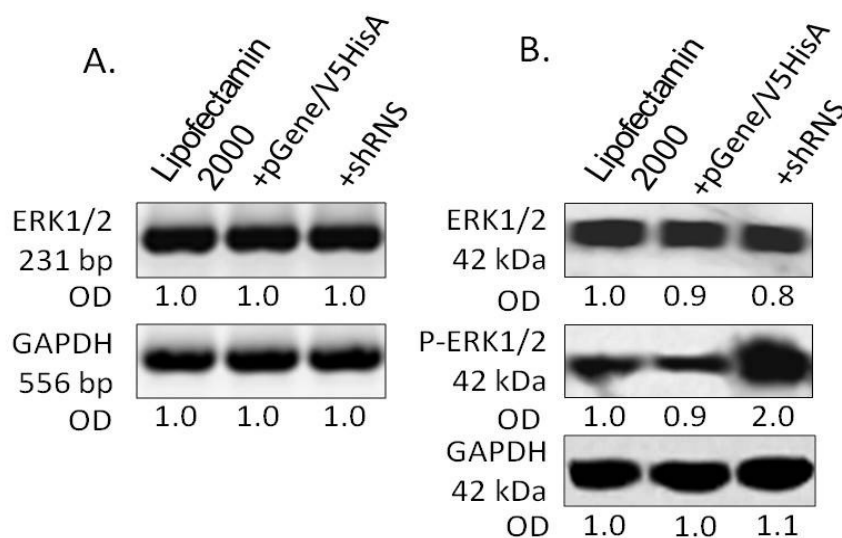
Ezen aktivitáscsökkenés azonban a rottlerin gátláshoz hasonlóan ebben az esetben sem volt számottevő hatással a porcspecifikus aggregán és Sox9 mRNA expressziójára. A fehérjeexpressziós változások is megegyező képet mutatnak a farmakológiai gátlás hatásaival, hiszen a Sox9 fehérjeexpressziója és foszforilált formájának jelenléte drámaian visszaesett (5.36.ábra).



5.36. ábra A PKC δ géncsendesítés hatása a porcspecifikus markerek mRNA- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

5.4.8. A PKC δ géncsendesítés szignifikánsan megemeli a foszforilált ERK1/2 jelenlétét

Az ERK útvonal shRNS okozta befolyásoltságát is összehasonlítottuk a rottlerin hatásaival, hiszen kíváncsiak voltunk a változás PKC δ érintettségére. Az ERK1/2 mRNS és fehérjeexpressziója hasonlóan az inhibitor hatásaihoz, nem változott a géncsendesítés alkalmazása során, ugyanakkor az ERK1/2 foszforilációs szintje a kontroll kétszeresére emelkedett (5.37.ábra). Ez az eredmény teljesen ellentétes a rottlerin gátlás következményeivel, és egyértelművé teszik azt a felvetést, hogy a rottlerin valószínűleg nem a PKC δ közvetlen gátlásán keresztül befolyásolja a porcképződést, hanem egyéb mechanizmus révén változtatja meg az ERK1/2 kaskád egyes lépéseit. Ugyanakkor az is nyilvánvaló, hogy a PKC δ és az ERK között valamilyen kapcsolat feltételezhető, melyet az shRNS alkalmazásának következtében fellépő foszforilációs-szint emelkedés támaszt alá.



5.37.ábra A PKC δ géncsendesítés hatása az ERK1/2 mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

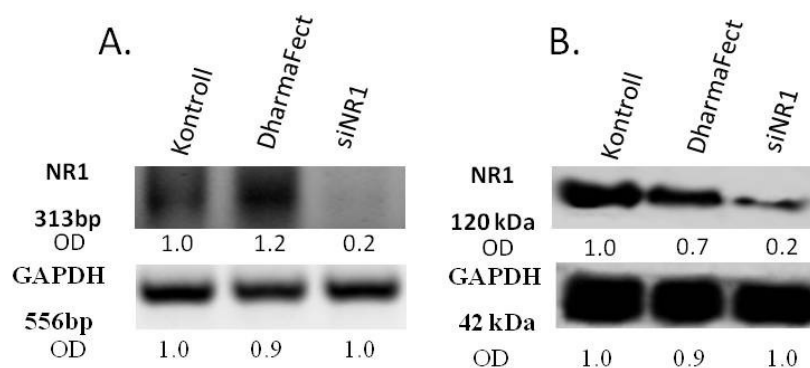
5.5. AZ NMDA receptor hiányának hatása a porcképződés mértékére és a Ca²⁺-oszcillációra.

5.5.1. Az NR1 alegység géncsendesítése csökkenti a porcképződést és a kondrogenikus sejtek osztódási rátáját

Az NMDA receptor funkcionalitása nagymértékben függ a receptor összetételétől. A működőképes receptor 4 alegységből áll, amely közül kettő NR1. Az NR1 alegység hiánya a receptor funkcióvesztésével jár. A különböző alegységekből felépülő receptor

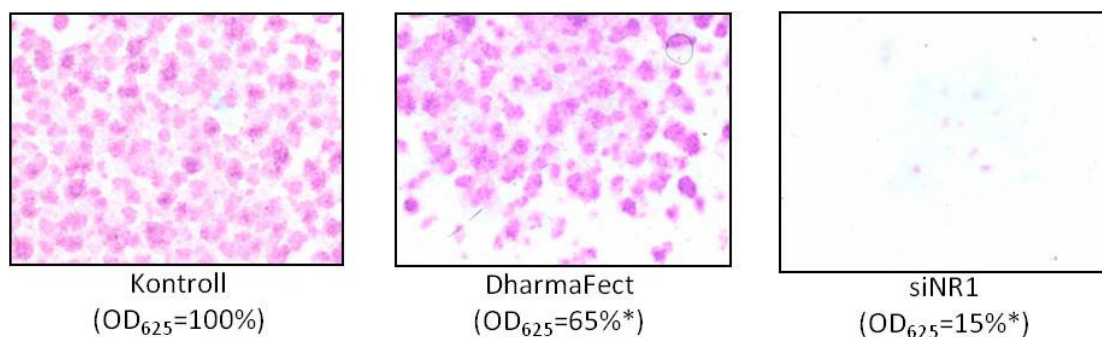
összeszerelődése a Golgiban történik és csak a szerkezetileg tökéletesen kialakult receptor horgonyzódik ki, majd integrálódik a membránba. Tehát ha a receptor nélkülözhetetlen alegységének szintézisét a minimálisra csökkentjük, a receptor membránban való megjelenését gátoljuk. Saját, még nem publikált eredményeink szerint az NMDA receptor egyes alegységei a 1. és 2. differenciációs napon jelennek meg a porcsejtek membránjában, és elektrofiziológiai méréseink tanúsága szerint a 2. naptól funkcionális csatornát képeznek. Ezért kísérleteink során az NMDA receptor alegységének összeszerelődését a tenyésztés 0. napjától gátolni szerettük volna. Erre legalkalmasabb technológia a géncsendesítés módszere. E kísérletek során nem volt fontos az indukálható vektor használata, mivel a tenyésztés kezdetétől kívántuk gátolni az alegység expresszióját, következésképpen elkerülhettük a GeneSwitch rendszer porccsökkentő hatását. Az siRNS igen rövid RNS szakasz, mely transzfekciója speciális technikát és reagenst igényel. Az NR1 siRNS-t a Dharmacom cég siRNS könyvtárából rendeltük. Olyan géncsendesítő koktélt alkalmaztunk, amely 4 eltérő helyen tapadó siRNS-t tartalmaz, melyek közül valamelyik biztosan akár a 100%-os csendesítésre is képes. A cég ennél sokkal óvatosabban garantált 80%-os csendesítést ígér, de a transzfekció optimalizálása a kondrogenikus HD-kultúrákban még nem történt meg. Az siRNS transzfekciót a Dharmacom cég saját, erre a célra kifejlesztett DharmaFect siRNS transzfekciós reagensével végeztük. A gyári protokolltól eltérően a transzfekciót a kitapadási időintervallum alatt végeztük, a transzfekciós reagens és a siRNS arányainak megváltoztatása nélkül.

A transzfekciós hatékonyságot az NR1 alegység mRNA-ének detektálásával végeztük, és megállapítottuk, hogy a géncsendesítés közel 80%-os mRNA csökkenést eredményezett. Az NR1 alegység fehérjeexpressziójának ellenőrzése is hasonló eredményt mutatott (5.38.ábra).



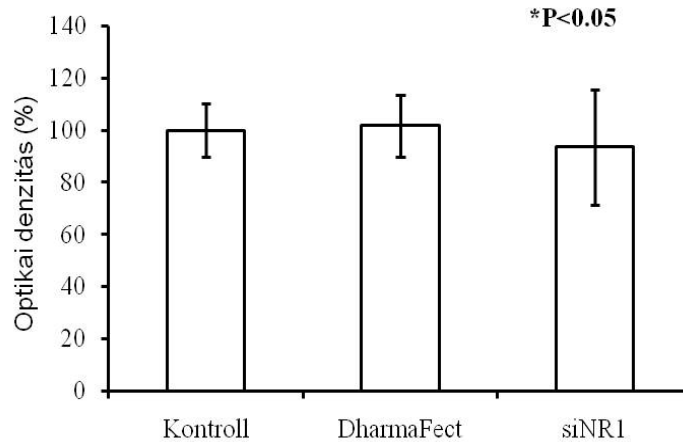
5.38.ábra Az NR1 géncsendesítés hatása az NR1 alegység mRNA- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

Kíváncsiak voltunk természetesen arra is, hogy a receptor hiánya milyen hatással van a metakromáziásan festődő porcterületek kialakulására. Korábbi kísérleteink eredményei azt sugallják, hogy a differenciálódó porcsejtek Ca^{2+} -homeosztázisa igen precízen szabályozott, és a citoszól szabad Ca^{2+} -koncentrációja szűk keretek között változva teszi csak lehetővé a differenciációs program megfelelő ütemű lezajlását [74]. Így feltételeztük, hogy egy valóban működő Ca^{2+} -ra permeábilis csatorna elvesztése csökkenti a porcképződés mértékét. Az NMDA receptor hiánya a 6. tenyésztési napra 80-90%-os metakromatikus festődéscsökkenést okozott, bár a DharmaFect önmagában történő alkalmazása is 30-40%-kal csökkentette a vörösen festődő ECM mennyiségét (5.39.ábra).

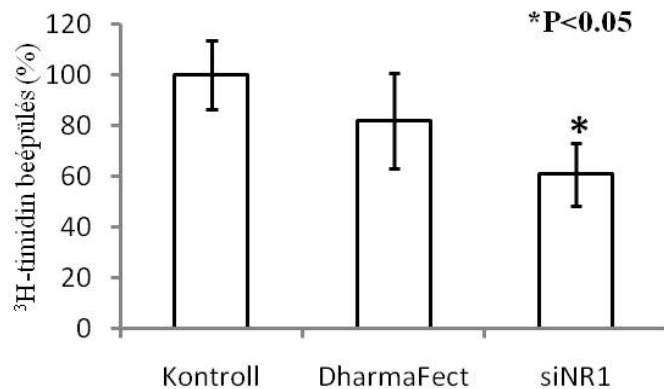


5.39.ábra Az NR1 géncsendesítés hatása a metakromáziás festéssel kimutatható porcmatrix-termelésre. A képek 3 kísérlet reprezentatív adatainak tekinthetők. A kultúrákat erősen savas pH-n DMMK-kel festettük. A fotókat 4× objektívvel készítettük. A zárójelben szereplő adatok az erősen szulfatált GAG-okhoz kötődött, majd visszaoldott TK-t tartalmazó minták 625 nm-en mért optikai denzitásának (OD₆₂₅) értékei. A megadott értékek az egyes kísérleti csoportok kontrollra korrigált %-os különbségét jelzik. Az egyes kísérleti csoportok kontrollhoz viszonyított szignifikáns (*P<0,05) változásait csillagok (*) mutatják.

Az alkalmazott siRNS természetesen a korábbi feltételezéseinkhez hasonlóan okozhatta a sejtek életképességének, vagy osztódóképességének csökkenését, mely mindkét esetben a csökkent metakromáziás jelenséget eredményez. Az siRNS esetleges citotoxicitását MTT teszttel vizsgáltuk és nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az egyes kísérleti csoportok sejtjeinek mitokondriális aktivitása között (5.40.ábra). Tríciált timidin a sejtek DNS-ébe való beépülését detektálva azonban 30-40%-os osztódóképesség redukció figyelhető meg az NR1 géncsendesítésnek köszönhetően (5.41.ábra).

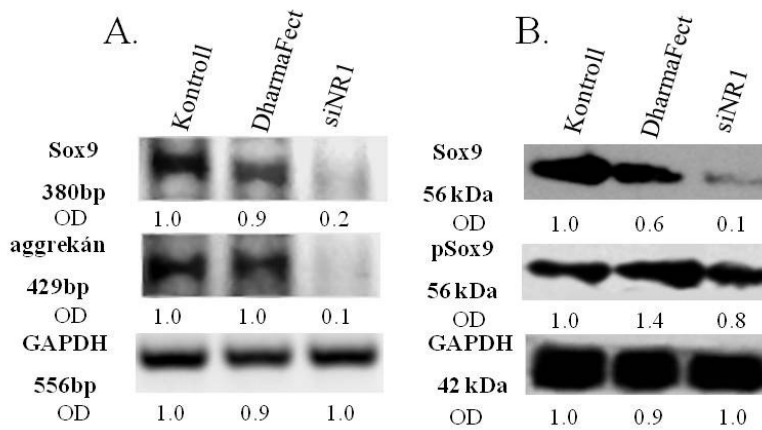


5.40.ábra Az NR1 géncsendesítésének hatása a HD-kultúrák sejtjeinek mitokondriális aktivitására. A sejtek életképességét MTT kolorimetriás teszt segítségével vizsgáltuk. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibaszávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Statisztikailag szignifikáns *P<0,05 a DharmaFect-hez képest viszonyított változásokat jelzik.



5.41.ábra Az NR1 géncsendesítés hatása a porcosodó kultúrák sejtosztódására. A sejtek proliferációs rátáját ³H-timidin beépülésének vizsgálatával kísértük figyelemmel. A méréseket a 3. tenyésztési napon végeztük. Az ábrán szereplő értékek 5 független kísérlet közül egy, a jellemző változásokat jól demonstráló kísérlet eredményeit mutatják. A hibaszávok egy kísérlet átlag standard hibáját (SEM) jelzik. Statisztikailag szignifikáns *P<0,05 a DharmaFect-hez képest viszonyított változásokat jelzik.

A porcdifferenciáció kulcsfontosságú faktorainak vizsgálata szerint mind az aggregán és mind a Sox9 mRNS expressziója jelentős mértékben visszaesett csakúgy, mint a Sox9 fehérjeexpresszió is, azonban az NMDA receptor hiánya nincs hatással a Sox9 foszforilációjára (5.42.ábra).



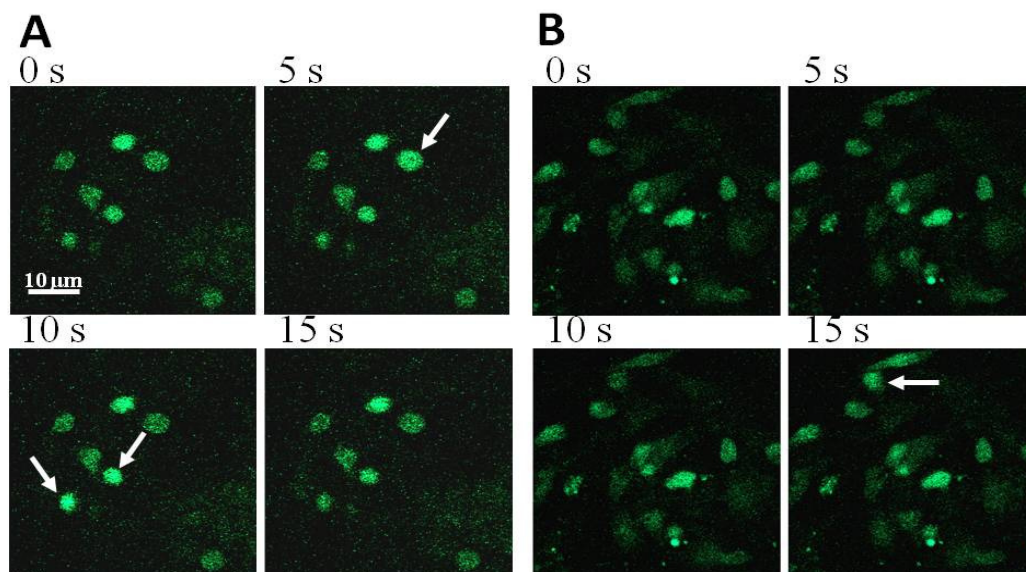
5.42.ábra Az NR1 géncsendesítés hatása a porcdifferenciációs markerek mRNS- (A) és fehérjeexpressziójára (B) a 3. tenyésztési napon. 5 kísérlet reprezentatív eredményeit láthatjuk. Belső kontrollként az RT-PCR reakciónál GAPDH-t használtunk. Az optikai denzitás (OD) értékeit a kontroll kultúrák értékeire (1,0) normalizáltuk.

5.5.2. Az NR1 alegység géncsendesítése csökkenti az oszcilláló Ca^{2+} -koncentráció változásokat mutató kondrogenikus sejtek számát

A porcdifferenciáció során a HD-kultúrák sejtjeinek többségében a citoszólban spontán Ca^{2+} -oszcillációk is megfigyelhetők. Ezen Ca^{2+} -tranziensek az excitábilis sejtekhez képest viszonylag alacsony frekvenciájúak, és magas amplitúdóval jelennek meg a differenciáció első napjain, majd a tenyésztés vége felé haladva e paraméterek alacsonyabb értékeket mutatnak (saját, nem közölt eredményeink). Ezek a rövid Ca^{2+} -influxok sok kalciumdependens enzim aktivitását modulálhatják, így pl. a korábban már bemutatott PP2B, MAPK vagy akár a PKC-k funkcióját is. Az oszcillációk háttérében számos Ca^{2+} -permeábilis plazma membrán csatorna lehet, de ezek közül kinetikájukat tekintve elsősorban a feszültségérzékeny csatornák jöhetnek szóba. Az NMDA receptor például lehet az egyik olyan jelölt, amely részben legalábbis, ezen tranziensek kialakulásáért felelőssé tehető.

Az NR1 alegység mRNS expressziójának gátlása közben a 2. tenyésztési napon megvizsgáltuk a sejteken detektálható spontán Ca^{2+} -oszcillációk tulajdonságait. Az siRNS hatásának következményeképpen, a kontroll sejtekhez képest, a Ca^{2+} -oszcillációk jelenléte szinte teljesen eltűnik, csupán a populáció mindössze 10%-ban volt detektálható. A bemutatott ábrán egy-egy sejtet 50 másodpercig kísértünk figyelemmel kontroll körülmények között és siRNS alkalmazása alatt (5.43.ábra). A nyilakkal jelölt sejteken jól látszik, hogy a fluoreszcencia intenzitás az idő előrehaladtával változik, illetve az A panelen megfigyelhető, hogy egy látótérben akár több sejt is egyszerre oszcillál. A B panelen egy hasonló méretű látóteret figyelhetünk meg, ahol csak egy sejt gyenge oszcillációja figyelhető meg

(5.43.ábra). Az NR1 funkcionális kiütése tehát lehetővé tette, hogy a porcdifferenciáció Ca^{2+} -háztartásának egyik alapvető tulajdonságát befolyásoló receptor valódi, porcdifferenciációban betöltött funkciójáról pontosabb képet kapjunk.



5.43.ábra Spontán Ca^{2+} -tranziensek 2. napos HD-kultúrákban. A méréseket Fluo-4-gyel feltöltött sejteken végeztük. Az A panel kontroll sejtekről, a B panel az siRNS-sel kezelt sejtekről készült felvételeket mutatja. A fluoreszcencia-intenzitás változásait 50 sec intervallumon keresztül rögzítettük, melyekről egy adott pillanatban készült reprezentatív felvételt mutatunk be. A nyíllal jelölt sejtek az éppen oszcilláló sejteket jelentik. A reprezentatív ábra egy sejtről készült x–y analízis eredményeit mutatja.

6. Megbeszélés

6.1. A HD-kultúrák transzfecciójának optimalizálása

A porcosodó mezenchimális eredetű primer HD-kultúrák, viszonylag széles körben használt modellnek minősülnek a porcdifferenciáció egyes lépéseinek feltárását megcélzó tanulmányok során. A modellrendszer egyik sajátossága, hogy a differenciálatlan mezenchimális sejteket igen nagy sűrűségben kicseppentve 6 nap alatt spontán porcképződést figyelhetünk meg. Ennek háttérében a kicseppentés után történő igen nagymértékű osztódás és az egyes sejtek kapcsolatainak speciális kialakulása állhat, mely következtében egy többretegű egymással szoros kapcsolatban lévő sejtpopuláció jelenik meg. A kondroprogenitor sejtek ekkor még hosszú nyúlványos sejtekként vannak jelen, majd a 2. tenyésztési napon beindul a porcképződésre jellemző transzkripciós faktorok expressziója. A 3. tenyésztési naptól a kultúrákban a hialinporcra specifikus ECM megjelenése is detektálható [20,68]. Az említett folyamatok egymásutánisága olyannyira esszenciálisnak tekinthető a differenciáció során, hogy bármelyik kihagyása, vagy valamilyen úton történő megzavarása a porcdifferenciáció teljes vagy részleges elmaradásához vezethet. A HD-kultúrák differenciálódó, vagy esetleg már differenciálódott sejteinek ezen környezetből való kiemelése moduláló hatással van a sejtek viselkedésére. A sejtek elveszítve az ECM-szal való kapcsolatukat, dedifferenciálódhatnak és egy adott idő után életképességüket is elveszíthetik. A kondrogenezis lépéseinek pontos ismerete igényli, hogy az egyes jelátviteli molekulák funkcióját aprólékosan feltérképezzük. A lehetőségek széles tárháza közül egyszerűnek tűnő és alapvető technikának minősül bizonyos fehérjéket kódoló génszakaszok sejtbe való juttatása és azok kifejeződése is. A primer sejtenyészetek azonban igen érzékenyen válaszolnak minimális beavatkozásra is, hiszen az előbb vázolt eseménysorozatnál egy lényegesen összetettebb kaszkádfolyamat megzavarását idézhetjük elő. Különösen nehéz feladat az olyan technika beállítása, mely a sejtek nagy százalékát célzott transzfeccióval olyan módon, hogy a lehető legkisebb citotoxicitást érje el és a túltermeltetett fehérje hatását populáció szinten vizsgálja. Az általunk alkalmazott high density sejt kultúrákban a sejtekből egy adott klón kiválasztása és stabilan transzfeccióval sejt vonal létrehozása lehetetlen, mivel a kultúrátípus sejteinek legalapvetőbb sajátossága az elköteleződés irányának megfelelő spontán differenciációs program végrehajtása. Ebből kifolyólag a HD-kultúrákban csak tranziens transzfecció lehetőségéről beszélhetünk. Ugyanakkor a nagy sejtdenzitást igénylő

porcdifferenciáció befolyásolásához olyan transzfekciós technika szükséges, amely magas transzfekciós hatékonyságú és így kellő számú sejt expressziós mintázatát képes módosítani ahhoz, hogy populációs szinten látható hatásokat detektálhassunk.

Az elektroporációs módszer mezenchimális sejtekre használt protokollja nagy hatásokkal képes bejuttatni a plazmidokat bizonyos primer sejt vonalakba [106,107]. Kísérleteink során kétségbevonhatatlanul a legmagasabb transzfekciós hatékonyságot értük el ezzel a technikával, azonban az alkalmazott feszültség hatására a membránon vagy akár a sejtmembránban valószínűleg mikrosérülések keletkeztek és olyan mértékű apoptózist, életképességsökkenést kaptunk, hogy a kicseppentett kondrogenikus sejtek sűrűsége azon kritikus küszöbérték alá csökkent, amely jelenléte még elengedhetetlenül szükséges a porcképződéshez (kb. 5 millió sejt/ml, saját nem közölt eredményeink). Az elektroporációt követően a kondrogenikus sejtek proliferációs rátája is erősen visszaesett.

Kevésbé drasztikus eljárás és nem jár mikrosérülésekkel a liposzómaképződésen alapuló transzfekciós módszer, amely ugyan számos sikeres kísérletben használt metódus [92], azonban működése leginkább sejt típus függő. A HD-kultúrák differenciációja során három eltérő lipofekciós eljárást teszteltünk: Lipofectamin 2000, DMRIE és SuperFect reagenseket. Választásunk egyik oka pl. az volt, hogy a SuperFect reagenst már egyes primer sejt vonalak, mint pl. hepatociták transzfekciója során sikereket eredményezett [108]. A kondrogenikus sejtek esetében azonban igen kis hatékonyságot detektáltunk és a differenciációs, proliferációs folyamatok is erőteljesen lecsökkentek, a kitapadt kultúrák két nap alatt felüsztek a tenyésztő médiumba. Valószínű, hogy a kialakuló dendrimer vagy dendrimer-plazmid komplex extrém nagy mérete megakadályozta az egyes sejtek egymáshoz és a tenyésztő edényhez történő adhézióját. A DMRIE transzfekciós reagenst korábban már sikeresen használták izolált, „monolayer”-ben nevelt kondrociták és más primer kitapadó sejtek transzfekciójára is [109,110], azonban a HD-kultúrák transzfekciójára nem bizonyult megfelelőnek, ugyanis hatékonysága messze elmaradt attól, hogy azt populáció szinten is értékelni tudjuk. Mindemelllett csökkentette a sejtek osztódási képességét, bár a sejtek életképességét és a Sox9, valamint az aggregán mRNS expressziójának redukcióját nem okozta. Összességében azonban csökkent porcképződést detektáltunk, amely valószínűleg annak a következménye, hogy a reagens önmagában is valamilyen úton sejtosztódáscsökkentő hatású, ezen oknál fogva azon sejt denzitás küszöbértéke alá estünk, amely a porcképződéshez elengedhetetlen. A Lipofectamin 2000 az egyik legelterjedtebben használt transzfekciós reagens, mellyel nagyon eltérő eredetű és differenciáltsági fokú sejteken is jó eredményeket értek el [92,111,112]. Ez a transzfekciós reagens viszonylag megfelelő hatékonysággal és

csekély apoptotizáló hatással bírt a csak GFP-t kódoló, „üres” vektor bejuttatása során, valamint a porcspecifikus markerek expresszióját sem mRNA sem fehérje szinten nem módosította. Azonban az idegen fehérje bejuttatása és folyamatos expressziója ezzel a reagenssel meglepő eredményeket hozott, hiszen mind a sejtek élet- és osztódóképessége lecsökkent, valamint az apoptózis is felerősödött. Az eredményeink azt mutatják, hogy ez a módszer alkalmas transzfekciós eljárás lehet a mezenchimális sejteken, ugyanakkor a nagyobb méretű plazmidok bejuttatása és egy egyszerű GFP expresszió már porcképződést csökkentő hatású lehet. Ennek hátterében az állhat, hogy a nagyméretű plazmidot egy viszonylag nagyméretű liposzóma képes körbevenni, mely membránba olvadása számos membránban elhelyezkedő receptort távolíthat el egymástól, illetve az egyes kaszkádfolyamatok következő tagjaitól. Ha nem történik más változás a sejtek nagy része ezt gyorsan képes kompenzálni és hamar regenerálódik, azonban egy idegen fehérje megjelenése és folyamatos expressziója vélhetőleg sok energiát elvon a sejtektől, illetve nem ad elegendő időt a regenerációra és a sejtek bizonyos folyamatai lényegesen lelassulnak, vagy megváltoznak, amely ebben a rendszerben már a differenciáció mértékét jelentősen csökkenti.

A Saint Mix egy non-liposzomális kisméretű amfifilikus transzfekciós reagens. Számos normál, vagy akár tumor sejtvonalon is sikeresen használják, és említésre méltó eredményeket hozott szöveti szintű *in vivo* transzfekciós kísérletekben is [100,101,113]. A HD-kultúrák esetében a populáció mintegy 50%-át sikeresen transzfektáltuk anélkül, hogy lényeges mértékű apoptózist detektáltunk volna. Habár az élet- és osztódóképesség csökkenése a korábban már bemutatott lipofekciós módszerek értékeihez közelített, azonban a GFP jelenléte sokkal kisebb változásokat okozott. Ezen túlmenően a porcdifferenciációs marker mRNA és fehérjeexpressziója szinte teljes mértékben változatlan maradt. Az ok a transzfekciós reagens tulajdonságaiból adódik: ez a reagens vélhetőleg nem befolyásolta lényegesen a sejtek membránintegritását és a sejtek normál folyamatait alig érte károsodás. Ugyanakkor a GFP jelenlétének és fokozott termelődésének enyhe sejtkárosító hatása van, melyet korábban már más modellrendszerekben is kimutattak [97].

Munkánk során tehát igazoltuk, hogy a legtöbb transzfekciós módszer káros hatással van a porcdifferenciációra. A populáció szintű vizsgálatok eléréséhez elegendő a kondrogenikus sejtek 50%-nak sikeres transzfekciója. Valamint a GFP jelenlétével mint káros tényezővel kell számolnunk. Az itt felsorolt adatok alapján a Saint Mix és a Lipofectamin 2000 tűnt a legalkalmasabb módszernek és ezeket választottuk a későbbi kísérleteinkhez.

6.2. A PP2B overexpressziójának és géncsendesítésének hatása a porcdifferenciációra

A PP2B vagy más néven kalcineurin egy Ca^{2+} - kalmodulin függő Ser/Thr specifikus protein foszfatáz [73], mely a porcdifferenciáció egyik pozitív regulátoraként ismert. Közvetlen targetmolekulája lehet az NFAT, mely a PP2B defoszforiláló hatására a nukleuszba transzlokálódik és számos a differenciáció szempontjából fontos gén expressziójának beindításáért felelős [72]. Kutatócsoportunk korábbi kísérletei során már bebizonyította, hogy a PP2B CSA-val történő gátlása porcképződés csökkentő hatású, valamint azt, hogy oxidatív stressz során a PP2B működése kapcsolatban lehet az ERK1/2 és a Sox9 defoszforilációjával is [68]. A PP2B nagyon sokrétű funkciót tölthet be a különböző sejtekben, így pl. az apoptózis aktiválásában is szerepet játszhat [114], valamint bizonyos esetekben az aktin filamentumok átrendeződésén keresztül a citoskeleton átalakulását is modulálhatja [115,116]. Ezen kívül számos sejtfeleségben az osztódás közben a kalcineurin megemelkedett expressziója és aktivitása detektálható [117]. A kalcineurin a porcdifferenciáció egyik pozitív regulátora ugyan, azonban túltermelésnek hatásairól nem rendelkezünk megfelelő tudással. Két eltérő vektor bejuttatásával kívántuk vizsgálni a PP2B szerepét a kondrogenézis kapcsán. A CnA delta Ca^{2+} és kalmodulin független, konstitutive aktív formáját kódolja a PP2B-nek [103]. A CnA gamma a PP2B gamma izoformáját kódolja [104]. Mindkét vektort a már korábban beállított Saint Mix transzfekciós rendszerrel juttattuk a kondrogenikus sejtekbe. A transzfekciós hatékonyság alacsonyabb volt az üres vektorral elérhető képest, amit vélhetőleg a sokkal nagyobb méretű plazmid okozott, azonban még ez is elegendőnek bizonyult a populáció egészének vizsgálatához. A CnA delta és gamma túltermelése érdekes expressziós változásokat eredményezett, hiszen a Western blot eredményeink alapján a nagy kópiaszámban jelenlévő foszfatáz megemelte az endogén PP2B bazális expresszióját. Az aktivitásméréseink a vártnak megfelelő eredményt hozták: csak a CnA delta bevitel járta aktivitásemelkedéssel, míg a CnA gamma túltermelése esetén a sejtekben detektálható PP2B aktivitás nem változott a kontroll csoportokhoz képest. Meglepő módon azonban a kalcineurin overexpressziója nagymértékben porcképződés csökkentő hatású volt. Erőteljesen visszaesett a sejtosztódás, valamint a Sox9 és P-Sox9 expressziója is nagymértékben csökkent. Érdekes kérdés lehet, hogy vajon a kalcineurin ilyen magas fokú jelenléte miért indukálja e folyamatokat, hiszen épp ezzel ellenétes hatást feltételeztünk. Az intracelluláris kalciumkoncentráció és a porcképződés kapcsolatának vizsgálata során bebizonyosodott [74], hogy a differenciálódó sejtek egy viszonylag szűk tartományon belül (80-250 nM) tolerálják

az intracelluláris Ca^{2+} -szint tartós megváltozását, de a megfelelő differenciálódáshoz ennél szűkebb tartomány és sajátos koncentrációváltozási mintázat szükséges. Ez alapján az is feltételezhető, hogy a Ca^{2+} -érzékeny jelátviteli molekulák aktivitásának szabályozása is precíz. Így vélelmezhető, hogy a kalcineurin endogén gátló molekulái működésbe léphetnek a konstitutíve aktív forma overexpressziója kapcsán is. Más kísérleti rendszerben már igazolták, hogy a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció fokozott PP2B aktivitást eredményez [118], a mi rendszerünkben a nagymértékű kalcineurin aktivitás megváltoztathatta más Ca^{2+} - és kalcineurin-regulált jelátviteli útvonalak aktivitását, amely a differenciációt negatív irányba toltta el. Ugyanakkor arra vonatkozólag is rendelkezünk adatokkal, hogy a PP2B a sejtek katabolikus és anabolikus egyensúlyát tartja fenn izolált kondrocitákban [119], ezen folyamatok túltermelés eredményeként való felborulása is eredményezheti a porcképződés csökkenését a HD-kultúrák differenciációja során. A CnA delta overexpresszált telepek kis morfológiai különbsége arra utalhat, hogy a magas PP2B-aktivitás a citoszkeletális elemek átrendezésén keresztül módosíthatta a sejtek migrációs képességeit is [116].

Ezek alapján érdekes kérdéssé vált a PP2B gátlásának vizsgálata is, hiszen a már korábban specifikus PP2B inhibitornak mondott CSA porccsökkentő hatását, ha összehasonlítjuk az enzim mRNS-sének specifikus csendesítésével vajon ugyanolyan válaszreakciókat kapunk-e. Azonban ezen kísérlet kivitelezéséhez egy újabb transzfekeciós módszer és rendszer beállítása vált szükségessé. A kalcineurin funkciójának gátlását főleg a differenciáció két kulcsfontosságú napjain szerettük volna kivitelezni, ezért egy indukálható promóterű vektorrendszerbe klónoztattuk a csirkespecifikus PP2B shRNS-t. A transzfekeciós nehézsége, hogy egyszerre két vektort kell a sejtekbe juttatni. A transzfekeciót először a már beállított Saint Mix-szel elvégezve minimális géncsendesítési eredményt kaptunk, míg a Lipofectamin 2000-rel végzett kísérletek kielégítő eredménnyel szolgáltak. Kísérleti eredményeink azt sugallják, hogy a Saint Mix reagens főleg a nagyobb plazmidok bejuttatását végzi el optimálisan, míg a Lipofectamin 2000 a kisebb, mint pl. shRNS-t kódoló vektor bejuttatására alkalmasabb [120]. Azt azonban nem szabad elfelejteni, hogy a lipofekció erősen porccsökkentő hatású, és az indukálható promóterű vektorrendszer önmagában is erőteljes kondrogenezis visszaesést okozott, ezért a géncsendesítés kontrolljaként a pGene/V5HisA és Lipofectamin 2000-t egyszerre kapott kultúrákat használtuk. Az RT-PCR vizsgálatokkal megállapított közel 50%-os géncsendesítésnek és a szinte teljesen eltűnő PP2B fehérjexpresszióknak köszönhetően a géncsendesítés populáció szinten is vizsgálhatóvá vált. Az shRNS alkalmazása a porcképződést minimálisra csökkentette, ugyanakkor a kalcineurin alapaktivitása alig csökkent. A proliferációs vizsgálatok arra utalnak, hogy a PP2B

aktivitásának emelkedése a porcosodó HD-kultúrákban az osztódás csökkenéséhez, míg a PP2B gátlás a proliferációs ráta emelkedéséhez vezetett. Tehát a kalcineurinnak mindenképpen szabályozó szerepe lehet a sejtosztódás befolyásolásában, pl. a MAPK útvonal egyes tagjainak defoszforilálásán keresztül [121]. A sejtek mitokondriális aktivitása a túltermelés és a csendesítés következtében egyaránt emelkedett, melynek háttérében az állhat, hogy a Ser/Thr foszfatázok, így a PP2B befolyásolhatja a Bcl2 útvonalon keresztül a sejtek aktivitását [122]. A Sox9 és az aggregán mRNA expressziója ugyan nem változott erőteljesen, de a Sox9 fehérje és annak foszforilált formájának jelenléte igen erőteljesen csökkent. Tehát már a korábban az osztódási folyamatok irányába eltolt rendszer hatására a differenciációs folyamatok háttérbe szorultak és a porcspecifikus markerek fehérjeszinten lévő kifejeződése szinte teljesen eltűnt, így a detektálható porc mennyisége a minimumra szorítkozik. Eredményeink azt tükrözik, hogy a porcdifferenciáció folyamataiban a kalcineurin szerepe igen sokrétű és akár fokozott aktivitása akár teljes hiánya megzavarhatja a differenciációs lépéseket. Fontos megemlíteni, hogy további bizonyítékokkal szolgáltunk arra nézve, hogy a kalcineurin negatívan befolyásolja a kondrogenikus sejtek osztódási képességeit, és ezt talán, a munkacsoportunk által már korábban leírt, feltételezett ERK1/2 defoszforiláláción keresztül teszi [68].

6.3. A PKC δ expressziója és gátlásának hatása a kondrogenikus HD-kultúrákban

Az már régóta ismert tény, hogy az egyes PKC izoenzimek fontos szerepet játszanak az ízületi porc megfelelő kialakulásában. Az általunk is használt HD-kultúrákban a cPKC-k jelenléte és aktivitása speciális mintázatot mutat a differenciáció során, és PMA-val történő aktiválásuk csökkenti a porcképződést, ezen belül is az egyes ECM alkotók termelődését [123]. Choi és munkatársai már 1995-ben leírták, hogy a cPKC közül a PKC α és γ , a nPKC közé tartozó PKC ϵ és az atipikusak közé sorolható PKC ζ , ι , λ enzimek expressziója nélkülözhetetlen a kondrogenikus sejtek differenciációja során. Míg a klasszikus PKC-k expressziós profilja változó képet mutat a differenciáció során, addig a nPKC jelenléte inkább a kezdeti időszakban fontos [56]. Ez a kutatócsoport a PKC δ azonosítását a megfelelő antitest hiányában még nem tudta elvégezni. A HD-kultúrákban a PKC δ jelenléte sokkal később, csak 2002-ben került azonosításra immuncitokémiai módszerek segítségével [124]. Choi és mtsai szerint a PKC δ -nak nélkülözhetetlen szerepe van a prekondrogenikus nodulus formálódásában [63]. A HD kultúrákban ez a differenciációs lépés az 1. tenyésztési napon zajlik. Saját kísérleteinkben a PKC δ expressziója és aktivitása a differenciáció kritikus napjain

(a 2. és 3. tenyésztési napon) volt a legmagasabb és a differenciáció vége felé csökkent. Ez arra utal, hogy a PKC δ jelenléte és aktivitása nem csak a porcképződés korai szakaszában, hanem annak későbbi lépéseiben is fontos tényező.

A PKC δ negatív vagy pozitív szerepének vizsgálatára a HD-kultúrákban, az irodalomban még manapság is az enzim specifikus farmakológiai inhibitoraként ismert rottlerin alkalmaztuk [125-127]. A gátlószer alkalmazása időfüggő módon csökkentette a porc ECM termelését, melyet akár az 1. és 2. napos adagolása után is megfigyelhettünk, amikor a nodulusok kialakulása zajlik. Ez az eredmény tökéletesen párhuzamba állítható Choi és munkatársai által végzett kísérletek következtetéseivel: a rottlerin PKC δ -gátló hatása az Akt és integrin β 1 jelátviteli útvonal modulálásán keresztül negatívan befolyásolja a HD-kultúrák kondroprogenitor sejtjeinek migrációs képességét, így csökkentve a kialakuló porccsomók számát [63]. A PKC δ migrációban betöltött szerepére más kísérleti rendszerben is van experimentális bizonyíték, pl. az epidermiszben a keratinociták motilitását E-kadherinen keresztül szabályozza [128]. Mivel a rottlerin okozta csökkent metakromáziát, az alkalmazott farmakon életképességsökkentő és/vagy proliferációcsökkentő hatása egyaránt okozhatja MTT teszttel a sejtek mitokondriális aktivitását, trícíált timidin beépülésével a proliferációs rátát vizsgáltuk meg. Míg a sejtek életképessége ugyan csak kismértékben, de szignifikánsan csökkent, addig az osztódóképesség drámai módon visszaesett. Ez utóbbi megfigyelések egyik oka lehet, hogy a rottlerinnek bizonyítottan antiproliferatív hatásai is vannak [128]. A rottlerin alkalmazása azonban semmilyen koncentrációban sem okozott apoptózist vagy nekrozist a differenciálódó porcsejtek esetében, holott a PKC δ -t, mint a mitokondriumokból kiinduló apoptózis egyik regulátorát is leírták. Sőt a rottlerin egyéb emlős kísérleti rendszerekben, mint mitokondriumok szétkapcsolását végző farmakont tarják számon [129,130]. Saját kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a csirke kondrogenikus sejtek mitokondriumai kevésbé érzékenyek az inhibitor alkalmazására, vagy a PKC δ ezen szerepe ebben a rendszerben elhanyagolható.

Rottlerin hatására a kondrogenézis markerének tekintett Sox9 mRNS és protein expressziója is csökkent, de a foszforilált Sox9 jelenléte sokkal erőteljesebben visszaesett. Ez utóbbi megfigyelés lehet, legalábbis részben, a csökkent porcképződés egyik magyarázata. Az ERK útvonal jól ismert proliferáció-, differenciáció-szabályozó és sejt túlélést is reguláló szereppel bír az eukarióta sejtek életfolyamataiban. Ezen nélkülözhetetlen szignáltranszdukciós kaszkád feladata és pontos funkciója a kondrogenézis szabályozásában eléggé ellentmondásos, leginkább a kísérleti módszertől függ. Vannak olyan kísérleti eredmények, melyek arra utalnak, hogy a HD-kultúrákban zajló differenciáció negatív

regulátorának tekinthető [43,68]. Más hasonló porcdifferenciációs rendszerben is van arra vonatkozó adat, hogy negatív hatással van a kondrogenezisre, pl. C3H10T egér embrionális mezenchimális sejtekből differenciáltatott HD-kultúrákban is porcképződés csökkentő hatása van [131]. A két említett kísérletben és általunk korábban végzett kísérletekben is az ERK1/2 funkciójának tisztázásához farmakológiai inhibitoroként PD098059-t és U0126-t használtak, és mindkét esetben porcképződés felerősödése tapasztalható [68]. A mi kísérleti rendszerünkben rottlerin hatására sem az mRNS, sem a protein expressziója nem változott az ERK1/2-nek, de a gátlószer hatására az ERK1/2 kettősen foszforilált formája erősen csökkent. Nagyon hasonló eredményeket kaptak Tapia és munkatársai, akiknek hasnyálmirigy acinus sejtjein végzett kísérleteiben, a rottlerin gátolta a MAPK aktivációt [132]. A PKC δ siRNS-sel történő gátlása oszteoblasztokban az ERK1/2 aktivitásának és foszforilációjának gátlásához vezetett, amely így a sejtek differenciációjának redukálását is eredményezte [133]. A teljesség igénye nélkül azt is megemlíthetjük, hogy a PKC δ gátlása keratinocitákban is csökkentette az ERK1/2 aktivitását [134]. Azaz több irodalmi adat is alátámasztja a rottlerin specifikusságát és a PKC δ az ERK1/2 foszforilálásában betöltött szerepére hívja fel a figyelmet.

Azonban több közlemény is beszámol arról, hogy a rottlerin hatása nem egészen tekinthető enzim specifikusnak, hisz eltérő szövetekben és kísérleti rendszerekben mind PKC δ -függő és független módon is gátló hatást fejt ki [129,133]. Számos irodalmi adattal ellentétben a rottlerin nem teljesen specifikus inhibitora a PKC δ -nak, sokkal inkább valamilyen más kináz gátlásán keresztül hat, pl. p38 szabályozott kináz, MAPK-aktivált protein kináz 2, PKA, CaMK III és más PKC izoformák, melyeken gátlása hasonló módon okozhat mitokondriális változásokat is [130,132]. Ezért kísérleteink során szerettük volna összehasonlítani a rottlerin és a specifikusan PKC δ -ra készített shRNS gátló hatását a porcdifferenciációra. Ennek érdekében a korábban már bemutatásra került GeneSwitch rendszerbe klónozott specifikus PKC δ shRNS bejuttatását végeztük el a már korábban alkalmazott Lipofectamin 2000-rel. A kísérletek során a már korábban felsorolt indokok miatt itt is a Lipofectamin 2000-rel és az „üres” pGene/V5HisA vektorral kezelt kultúrákat vettük kontrollnak. A PKC δ shRNS-sel történő transzfekciója és a specifikus géncsendesítés majdnem teljes mértékben blokkolta az *in vivo* porcképződést. Ugyanakkor nem indukált apoptózist és/vagy nekrozist a PKC δ hiánya, valamint a kondrogenikus sejtek életképessége és proliferációja sem változott szignifikáns mértékben. Meg kell említenünk, hogy eredményeinkkel ellentétben más kísérleti rendszerekben pl. glioma sejteken és keratinocitákban a PKC δ -t, mint a proliferáció egy negatív szabályozó faktoraként írták le [135,136]. Ez a különbség adódhat abból ez egyszerű tényből, hogy a malignusan

dedifferenciálódott és az érett normál sejtek eltérő jelátviteli pályákon keresztül szabályozhatják a proliferációs folyamatokat. Kíváncsiak voltunk, hogy a PKC δ aktivitás visszaesés okozta csökkent porcképződés hátterében melyik porcdifferenciációs marker expressziójának redukciója áll. RT-PCR vizsgálatinkban megfigyelhetjük, hogy a Sox9 mRNS expressziója szinte egyáltalán nem csökken, míg fehérjeexpressziója és foszforilált formájának megjelenése is nagymértékben visszaesik az shRNS alkalmazását követően. Ez a rottlerin alkalmazásához hasonlóan, másodlagosan ugyan, de közvetlen oka lehet a porcképződés drámai visszaesésének.

A farmakológiai gátláshoz hasonlóan az ERK1/2-nek sem az mRNS, sem a fehérjeexpressziója nem változik a géncsendesítést követően, azonban a kettősen foszforilált forma jelenléte kétszeres emelkedést mutat a PKC δ hiányában. Az ERK1/2 fokozott aktivitás egy másik olyan tényező lehet, amely a PKC δ shRNS hatására bekövetkező majdnem teljes porcképződésgátláshoz vezetett. Az irodalomban számos adat van arról, hogy különböző differenciációs rendszerekben a PKC δ shRNS alkalmazása eltérő hatással lehet a MEK-ERK1/2 útvonalra [133,137,138], ugyanakkor általánosságban véve a PKC δ -t, mint az MEK-ERK1/2 útvonal negatív regulátorát említik [139]. Mivel a rottlerin alkalmazása során ezzel teljesen ellentétes adatokat kaptunk, azaz az ERK1/2 foszforilációja csökkent, ezért azt feltételezzük, hogy a rottlerin a HD kultúrákban nem tekinthető PKC δ specifikus inhibitornak. Ezt a feltevésünket alátámasztja az is, hogy a rottlerinrel kezelt kultúrákban nem tudtunk konzekvens és szignifikáns PKC δ aktivitásváltozást detektálni. Ugyanakkor érdemes megemlíteni azt is, hogy a HD-kultúrák egészében ugyan nem hatásos inhibitor a rottlerin, addig az *ex vivo* PKC δ aktivitásmérések kivitelezésénél jó blokkolószernek bizonyult.

Eredményeink jelentőségét összefoglalva elmondhatjuk, hogy a PKC δ az *in vitro* kondrogenezis egyik pozitív regulátorának tekinthető, mely nem közvetlenül, de hatással lehet a Sox9 expressziójára és aktivitására, ezen keresztül a porcképződés ECM termelésére. A géncsendesítés kapcsán bizonyítást nyert, hogy a PKC δ a HD kultúrák sejtjeiben az ERK1/2 útvonal egyik negatív szabályozója.

6.4. Az NMDA receptorok kifejeződésének gátlása siRNS-sel

Mai tudásunk szerint a sejtek normális életfolyamataihoz a Ca²⁺-ionok jelenléte nélkülözhetetlen, hiszen a Ca²⁺-ion az egyik legalapvetőbb és legelterjedtebb másodlagos hírvivő. A mezenchimális sejtek egyes differenciációs lépéseinek szabályozásában is számos kalciumdependens szignáltranszdukciós útvonal játszik alapvető szerepet [102,140].

Laboratóriumunk eredményei szerint a HD-kultúrák sejtjei differenciációjuk során specifikus intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozásokat mutatnak, amelyek meghatározó szerepet játszanak a porcdifferenciációban és dominánsan az extracelluláris térből bejutó Ca^{2+} okozza azokat [74]. A külső térből származó Ca^{2+} -ionok a plazmamembrán kation csatornáin keresztül kerülnek a sejtek belső terébe. A sejtek nagy számú, igen változatos sajátosságokkal rendelkező Ca^{2+} -ra permeábilis csatornát használnak. Ezek közül laboratóriumunkban korábban már azonosítottunk ATP ligandot kötő P_2X_4 receptorokat a differenciálódó porcsejteken, melyek funkcionalitását is bizonyítottuk [80]. Az utóbbi néhány évben került azonosításra az NMDA receptorok jelenléte porcsejteken is, azonban funkciójuk még nem egészen tisztázott [86,90]. Az NMDA receptorok főleg Ca^{2+} -ra permeábilis csatornáknak tekinthetők, és összetételétől függően eltérő kinetikával képesek az ionok átengedésére. Az NR2B alegységgel rendelkező receptor CaMK II-vel lehet közvetlen kapcsolatban, mely utóbbi funkciójának érdekessége, hogy főleg a Ca^{2+} -oszcillációkból származó jelek dekódolásáért felelős és szerepet játszik a kalcineurin, vagy akár a MAPK aktiválásában [141]. A disszertáció tárgyát nem képző, még publikálás alatt lévő kísérleti eredményeink szerint az NMDA receptorok jelen vannak a porcdifferenciáció során, és alegységei közül, az NR1, NR2B és NR3A kerülnek ki a membránba a differenciáció 1-2. napjától.

Az NMDA receptor összeszerelődése még a citoplazmában megtörténik, a membránba a kész heterotetramerek transzlokálódnak. Mai tudásunk szerint az NR1 alegység jelenléte elengedhetetlen az NMDA receptor összeszerelődéséhez és működéséhez [83,142]. Kísérleteink során az NR1 alegység géncsendesítéssel történő gátlásával kívántunk az NMDA receptornak a porcképződésben játszott szerepéről képet kapni. Az NR1 siRNS alkalmazását már a 0. tenyésztési naptól alkalmaztuk így az 1. tenyésztési napon már nem jelenhet meg az NMDA receptor. Ebből adódóan nem szükséges indukálható promóterű vektorrendszerrel dolgozni, ezáltal a bejuttatott idegen RNS mérete sokkal kisebbé vált. A transzfekció hatékonyságát NR1-re specifikus RT-PCR-ral és Western blot-tal ítéltük meg, miszerint az siRNS 80-90%-os géncsendesítést ért el.

A funkcióképes NMDA receptorok hiánya teljesen blokkolta a kondrogenikus sejtek porcsejtté alakulását. Ez részben vélhetőleg a HD-kultúrák spontán Ca^{2+} oszcillációinak megszűnésével magyarázható [143]. Az ismétlődő Ca^{2+} -jelek hiánya a porcdifferenciáció szinte teljes megszűnéséhez vezetett anélkül, hogy a sejtek életképességét jelentősen befolyásolta volna. A differenciálódó porcsejtek osztódóképessége azonban nagymértékben visszaesett az NR1 géncsendesítés következtében. A porcképződés markereinek tekintett

Sox9 és aggrekán mRNS expressziója és a Sox9 protein expressziója is drámaian visszaesik, ugyanakkor a foszfo-Sox9 jelenléte nem változik erőteljesen.

Kísérleteinkkel tehát igazoltuk, hogy az NMDA receptorok jelenléte nélkülözhetetlen eleme a porcsejtek differenciációs folyamatainak, hiszen a porcsejtekben detektálható Ca^{2+} -oszillációkért legalábbis részben ezen csatornák tehetők felelőssé. Azt még nem sikerült tisztáznunk, hogy a csatornák aktiválódását normál körülmények között mi indukálja. Erre vonatkozó saját előzetes adataink szerint a differenciálódó kondrocitákban detektálható NMDA receptorok valószínűleg mechanotranszduktorként működnek, amit alátámasztanak differenciált porcsejteken nyert kísérleti eredmények is [77], ezen kívül saját eddig még nem közölt adataink arra engednek következtetni, hogy a receptorok membránban való lokalizációja erőteljesen függ a mechanikai inger irányától.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy vektorok tranzeins transzfekciójával módosítva bizonyos jelátviteli fehérjék expressziós szintjét és mintázatát, fontos adatokat nyerhetünk a porcdifferenciáció szabályozásának időbeli lefutásáról, amely ismeretek jól hasznosíthatóak lehetnek a pluripotens őssejtek porcos differenciáltatásának módszertanában.

7. Összefoglalás

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

Kimutattuk:

- hogy a HD-kultúrák tranziens transzfekcióját leghatékonyabban a frissen izolált sejtek szuszpenzióján lehet elvégezni.
- a transzfekciós hatékonyság függ a transzfekciós reagens hatásmechanizmusától, és a bejuttatni kívánt konstruktok méretétől.
- nagyméretű plazmidok bejuttatására a Saint Mix reagens a legalkalmasabb, míg a kisebb méretű shRNS bejuttatására a Lipofectamin 2000 a legmegfelelőbb. Az siRNS transzfekciójára speciális DharmaFect szükséges.
- a kalcineurin fehérjeszintjének overexpresszióval történő megemelése, illetve indukálható promóterű vektorba klónozott shRNS-sel történő specifikus gátlása is jelentős mértékben porcképződés csökkentő hatású, azaz precízen meghatározott kalcineurin aktivitás szükséges a megfelelő porcdifferenciációhoz.
- a kalcineurin kísérleteink tanúsága szerint a kondrogenikus sejtek osztódásának negatív regulátora.
- a rottlerin nem a PKC δ gátlószere a high density kultúrák sejtjeiben.
- a PKC δ szabályozza az ERK1/2 foszforilációját a kondrogenikus sejtekben.
- az NMDA receptor NR1 alegységének géncsendesítése csökkenti a Ca²⁺-oszcillációt mutató kondrogenikus sejtek számát, ami a receptor Ca²⁺-homeosztázisban betöltött elengedhetetlen szerepét feltételezi.

Tárgyszavak: *in vitro* porcdifferenciáció, HD-kultúra, tranziens transzfekció, kalcineurin, rottlerin, PKC δ , NMDA

8. Summary

We studied the transient transfection possibilities of chondrifying mesenchymal cultures and after optimization we aimed to transfect three different types of constructs and investigated their effect on chondrogenesis.

- We demonstrated that transient transfection of HDC is highly depending on the transfection method and on the size of the delivered vector. Saint Mix is suitable for transfection of bigger vectors, while Lipofectamin 2000 is better applicable for delivering smaller shRNAs.
- For transfection of siRNA the specific DharmaFect delivery system is needed.
- Manipulation of the PP2B activity either with overexpression or with gene silencing by inducible shRNA vectors diminishes cartilage formation, which suggests a very precisely set calcineurin activity during proper chondrogenesis.
- We proved that rottlerin is not a PKC δ -specific inhibitor in chondrogenic cells.
- Application of a PKC δ -specific shRNA inhibited chondrogenesis probably via increasing activity of ERK1/2.
- The gene silencing of NR1 subunits of NMDA receptor with an siRNA decreased the number of Ca²⁺ oscillating chondrogenic cells and completely blocked cartilage formation, which suggest a crucial role of this receptor in Ca²⁺ homeostasis and chondrogenesis of HDC.

Keywords: *in vitro* cartilage differentiation, HD-cultures, transient transfection, calcineurin, rottlerin, PKC δ , NMDA

9. Irodalomjegyzék

1. P.S.Burrage, K.S.Mix, C.E.Brinckerhoff (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.* **11**, 529-543.
2. M.Y.Yeung, D.K.Smith, M.S.Chan, C.M.Li, B.C.Wong, K.M.Cheung, K.D.Luk, K.S.Cheah, P.Sham, D.Chan, Y.Q.Song (2007). iCartiGD: the Integrated Cartilage Gene Database. *BMC.Genet.* **8**, 4.
3. L.Hangody, G.Vasarhelyi, L.R.Hangody, Z.Sukosd, G.Tibay, L.Bartha, G.Bodo (2008). Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury* **39 Suppl 1**, S32-S39.
4. D.Magne, C.Vinatier, M.Julien, P.Weiss, J.Guicheux (2005). Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol.Med.* **11**, 519-526.
5. M.B.Pabbruwe, E.Esfandiari, W.Kafienah, J.F.Tarltan, A.P.Hollander (2009). Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials* **30**, 4277-4286.
6. R.Merino, J.Rodriguez-Leon, D.Macias, Y.Ganan, A.N.Economides, J.M.Hurle (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**, 5515-5522.
7. A.M.Bhosale, J.B.Richardson (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br.Med.Bull.* **87**, 77-95.
8. L.Shum, G.Nuckolls (2002). The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res.* **4**, 94-106.
9. D.R.Eyre, M.A.Weis, J.J.Wu (2006). Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur.Cell Mater.* **12**, 57-63.
10. D.Heinegard, A.Oldberg (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* **3**, 2042-2051.
11. M.Shakibaei, C.Csaki, A.Mobasheri (2008). Diverse roles of integrin receptors in articular cartilage. *Adv.Anat.Embryol.Cell Biol.* **197**, 1-60.
12. W.Knudson, R.F.Loesser (2002). CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol.Life Sci.* **59**, 36-44.
13. R.Cancedda, C.F.Descalzi, P.Castagnola (1995). Chondrocyte differentiation. *Int.Rev.Cytol.* **159**, 265-358.

14. A.J.Freemont, J.A.Hoyland (2007). Morphology, mechanisms and pathology of musculoskeletal ageing. *J.Pathol.* **211**, 252-259.
15. R.White, J.S.Gibson (2010). The effect of oxygen tension on calcium homeostasis in bovine articular chondrocytes. *J.Orthop.Surg.Res.* **5**, 27.
16. Y.Shimomura, F.Suzuki (1984). Cultured growth cartilage cells. *Clin.Orthop.Relat Res.* 93-105.
17. K.Pelttari, E.Steck, W.Richter (2008). The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury* **39 Suppl 1**, S58-S65.
18. V.Hamburger, H.L.Hamilton (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev.Dyn.* **195**, 231-272.
19. P.B.Ahrens, M.Solursh, R.S.Reiter (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev.Biol.* **60**, 69-82.
20. C.Hadhazy, M.B.Lazlo, K.S.Kostenszky (1982). Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds. *Acta Morphol.Acad.Sci.Hung.* **30**, 65-78.
21. R.B.Widelitz, T.X.Jiang, B.A.Murray, C.M.Chuong (1993). Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J.Cell Physiol* **156**, 399-411.
22. R.O.Kelley, J.F.Fallon (1978). Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **46**, 99-110.
23. W.M.Kulyk, B.J.Rodgers, K.Greer, R.A.Kosher (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev.Biol.* **135**, 424-430.
24. C.M.Leonard, H.M.Fuld, D.A.Frenz, S.A.Downie, J.Massague, S.A.Newman (1991). Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev.Biol.* **145**, 99-109.
25. S.Pizette, L.Niswander (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev.Biol.* **219**, 237-249.
26. S.Tavella, G.Bellese, P.Castagnola, I.Martin, D.Piccini, R.Doliana, A.Colombatti, R.Cancedda, C.Tacchetti (1997). Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J.Cell Sci.* **110 (Pt 18)**, 2261-2270.

27. Y.Kawakami, J.Capdevila, D.Buscher, T.Itoh, E.C.Rodriguez, J.C.Izpisua Belmonte (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* **104**, 891-900.
28. S.A.Newman (1996). Sticky fingers: Hox genes and cell adhesion in vertebrate limb development. *Bioessays* **18**, 171-174.
29. B.P.Toole (1972). Hyaluronate turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Dev.Biol.* **29**, 321-329.
30. W.Dessau, M.H.von der, M.K.von der, S.Fischer (1980). Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **57**, 51-60.
31. C.B.de, V.Lefebvre, R.R.Behringer, W.Bi, S.Murakami, W.Huang (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* **19**, 389-394.
32. T.Passeron, J.C.Valencia, C.Bertolotto, T.Hoashi, P.E.Le, K.Takahashi, R.Ballotti, V.J.Hearing (2007). SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 13984-13989.
33. V.Lefebvre, R.R.Behringer, C.B.de (2001). L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis.Cartilage.* **9 Suppl A**, S69-S75.
34. B.K.Zehentner, C.Dony, H.Burtscher (1999). The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J.Bone Miner.Res.* **14**, 1734-1741.
35. L.Panman, R.Zeller (2003). Patterning the limb before and after SHH signalling. *J.Anat.* **202**, 3-12.
36. T.Ikeda, S.Kamekura, A.Mabuchi, I.Kou, S.Seki, T.Takato, K.Nakamura, H.Kawaguchi, S.Ikegawa, U.I.Chung (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* **50**, 3561-3573.
37. 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.
38. Z.Jia (1997). Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem.Cell Biol.* **75**, 17-26.
39. 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.

40. 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.
41. K.J.Cowan, K.B.Storey (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J.Exp.Biol.* **206**, 1107-1115.
42. 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.
43. 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.
44. M.E.Barnett, D.K.Madgwick, D.J.Takemoto (2007). Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal.* **19**, 1820-1829.
45. Y.Takai, A.Kishimoto, Y.Iwasa, Y.Kawahara, T.Mori, Y.Nishizuka (1979). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J.Biol.Chem.* **254**, 3692-3695.
46. A.C.Newton (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 161-167.
47. S.F.Steinberg (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* **88**, 1341-1378.
48. U.Kikkawa, K.Ogita, Y.Ono, Y.Asaoka, M.S.Shearman, T.Fujii, K.Ase, K.Sekiguchi, K.Igarashi, Y.Nishizuka (1987). The common structure and activities of four subspecies of rat brain protein kinase C family. *FEBS Lett.* **223**, 212-216.
49. S.Osada, K.Mizuno, T.C.Saido, Y.Akita, K.Suzuki, T.Kuroki, S.Ohno (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J.Biol.Chem.* **265**, 22434-22440.
50. S.Osada, K.Mizuno, T.C.Saido, K.Suzuki, T.Kuroki, S.Ohno (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol.Cell Biol.* **12**, 3930-3938.
51. H.Mukai, Y.Ono (1994). A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **199**, 897-904.
52. R.H.Palmer, J.Ridden, P.J.Parker (1995). Cloning and expression patterns of two members of a novel protein-kinase-C-related kinase family. *Eur.J.Biochem.* **227**, 344-351.

53. H.Mellor, P.J.Parker (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* **332** (Pt 2), 281-292.
54. G.X.Shen (2003). Selective protein kinase C inhibitors and their applications. *Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.* **3**, 301-307.
55. J.V.Lint, A.Ryckx, T.Vantus, J.R.Vandenhede (2002). Getting to know protein kinase D. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **34**, 577-581.
56. B.Choi, J.S.Chun, Y.S.Lee, J.K.Sonn, S.S.Kang (1995). Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **216**, 1034-1040.
57. S.F.Steinberg (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem.J.* **384**, 449-459.
58. M.Gschwendt (1999). Protein kinase C delta. *Eur.J.Biochem.* **259**, 555-564.
59. G.Gorelik, J.Y.Fang, A.Wu, A.H.Sawalha, B.Richardson (2007). Impaired T cell protein kinase C delta activation decreases ERK pathway signaling in idiopathic and hydralazine-induced lupus. *J.Immunol.* **179**, 5553-5563.
60. M.E.Reyland (2007). Protein kinase Cdelta and apoptosis. *Biochem.Soc.Trans.* **35**, 1001-1004.
61. D.N.Jackson, D.A.Foster (2004). The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J.* **18**, 627-636.
62. S.P.Davies, H.Reddy, M.Caivano, P.Cohen (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem.J.* **351**, 95-105.
63. Y.A.Choi, D.K.Kim, S.S.Kang, J.K.Sonn, E.J.Jin (2009). Integrin signaling and cell spreading alterations by rottlerin treatment of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochimie* **91**, 624-631.
64. U.Kikkawa, H.Matsuzaki, T.Yamamoto (2002). Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J.Biochem.* **132**, 831-839.
65. J.A.Tapia, R.T.Jensen, L.J.Garcia-Marin (2006). Rottlerin inhibits stimulated enzymatic secretion and several intracellular signaling transduction pathways in pancreatic acinar cells by a non-PKC-delta-dependent mechanism. *Biochim.Biophys.Acta* **1763**, 25-38.
66. K.Masur, K.Lang, B.Niggemann, K.S.Zanker, F.Entschladen (2001). High PKC alpha and low E-cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells. *Mol.Biol.Cell* **12**, 1973-1982.

67. 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.
68. R.Zakany, Z.Szijgyarto, C.Matta, T.Juhasz, C.Csortos, K.Szucs, G.Czifra, T.Biro, L.Modis, P.Gergely (2005). Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways. *Exp.Cell Res.* **305**, 190-199.
69. S.Wera, B.A.Hemmings (1995). Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem.J.* **311 (Pt 1)**, 17-29.
70. H.Jiang, F.Xiong, S.Kong, T.Ogawa, M.Kobayashi, J.O.Liu (1997). Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol.Immunol.* **34**, 663-669.
71. S.Strack, B.E.Wadzinski, F.F.Ebner (1996). Localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the hindbrain and spinal cord of the rat. *J.Comp Neurol.* **375**, 66-76.
72. M.Tomita, M.I.Reinhold, J.D.Molkentin, M.C.Naski (2002). Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J.Biol.Chem.* **277**, 42214-42218.
73. F.Rusnak, P.Mertz (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* **80**, 1483-1521.
74. C.Matta, J.Fodor, Z.Szijgyarto, T.Juhasz, P.Gergely, L.Csernoch, R.Zakany (2008). Cytosolic free Ca²⁺ concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium* **44**, 310-323.
75. S.Matsuda, S.Koyasu (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* **47**, 119-125.
76. Y.S.Han, O.S.Bang, E.J.Jin, J.H.Park, J.K.Sonn, S.S.Kang (2004). High dose of glucose promotes chondrogenesis via PKC α and MAPK signaling pathways in chick mesenchymal cells. *Cell Tissue Res.* **318**, 571-578.
77. D.M.Salter, M.O.Wright, S.J.Millward-Sadler (2004). NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* **41**, 273-281.
78. G.J.Spencer, C.J.McGrath, P.G.Genever (2007). Current perspectives on NMDA-type glutamate signalling in bone. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **39**, 1089-1104.
79. M.J.Hoogduijn, I.S.Hitchcock, N.P.Smit, J.M.Gillbro, K.U.Schallreuter, P.G.Genever (2006). Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF. *Pigment Cell Res.* **19**, 58-67.

80. J.Fodor, C.Matta, T.Juhasz, T.Olah, M.Gonczi, Z.Szijgyarto, P.Gergely, L.Csernoch, R.Zakany (2009). Ionotropic purinergic receptor P2X4 is involved in the regulation of chondrogenesis in chicken micromass cell cultures. *Cell Calcium* **45**, 421-430.
81. G.Popescu, A.Auerbach (2004). The NMDA receptor gating machine: lessons from single channels. *Neuroscientist*. **10**, 192-198.
82. G.A.Herin, E.Aizenman (2004). Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur.J.Pharmacol.* **500**, 101-111.
83. P.Paoletti, J.Neyton (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr.Opin.Pharmacol.* **7**, 39-47.
84. R.Raveendran, P.S.vi Suma, M.Mayadevi, M.Steephan, T.R.Santhoshkumar, J.Chериyan, R.Sanalkumar, K.K.Pradeep, J.James, R.V.Omkumar (2009). Phosphorylation status of the NR2B subunit of NMDA receptor regulates its interaction with calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J.Neurochem.* **110**, 92-105.
85. C.M.Low, K.S.Wee (2010). New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol.Pharmacol.* **78**, 1-11.
86. T.Takarada, Y.Takahata, M.Iemata, E.Hinoi, K.Uno, T.Hirai, T.Yamamoto, Y.Yoneda (2009). Interference with cellular differentiation by D-serine through antagonism at N-methyl-D-aspartate receptors composed of NR1 and NR3A subunits in chondrocytes. *J.Cell Physiol* **220**, 756-764.
87. Y.Liu, J.Zhang (2000). Recent development in NMDA receptors. *Chin Med.J.(Engl.)* **113**, 948-956.
88. R.Anwyl (2009). Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology* **56**, 735-740.
89. S.Dai, D.D.Hall, J.W.Hell (2009). Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev.* **89**, 411-452.
90. Y.Takahata, T.Takarada, M.Osawa, E.Hinoi, Y.Nakamura, Y.Yoneda (2008). Differential regulation of cellular maturation in chondrocytes and osteoblasts by glycine. *Cell Tissue Res.* **333**, 91-103.
91. S.J.Slater, J.L.Seiz, A.C.Cook, B.A.Stagliano, C.J.Buzas (2003). Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochim.Biophys.Acta* **1637**, 59-69.
92. P.L.Felgner, T.R.Gadek, M.Holm, R.Roman, H.W.Chan, M.Wenz, J.P.Northrop, G.M.Ringold, M.Danielsen (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 7413-7417.

93. R.M.Blaese, C.A.Mullen, W.J.Ramsey (1993). Strategies for gene therapy. *Pathol.Biol.(Paris)* **41**, 672-676.
94. B.Dalby, S.Cates, A.Harris, E.C.Ohki, M.L.Tilkins, P.J.Price, V.C.Ciccarone (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **33**, 95-103.
95. S.J.Eastman, C.Siegel, J.Tousignant, A.E.Smith, S.H.Cheng, R.K.Scheule (1997). Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. *Biochim.Biophys.Acta* **1325**, 41-62.
96. J.Miyazaki, H.Aihara (2002). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Methods Mol.Med.* **69**, 49-62.
97. H.S.Liu, M.S.Jan, C.K.Chou, P.H.Chen, N.J.Ke (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **260**, 712-717.
98. O.Gresch, F.B.Engel, D.Nesic, T.T.Tran, H.M.England, E.S.Hickman, I.Korner, L.Gan, S.Chen, S.Castro-Obregon, R.Hammermann, J.Wolf, H.Muller-Hartmann, M.Nix, G.Siebenkotten, G.Kraus, K.Lun (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* **33**, 151-163.
99. N.Matsuki, T.Ishikawa, Y.Imai, T.Yamaguchi (2008). Low voltage pulses can induce apoptosis. *Cancer Lett.* **269**, 93-100.
100. S.Audouy, D.Hoekstra (2001). Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review). *Mol.Membr.Biol.* **18**, 129-143.
101. S.Audouy, G.Molema, L.L.de, D.Hoekstra (2000). Serum as a modulator of lipoplex-mediated gene transfection: dependence of amphiphile, cell type and complex stability. *J.Gene Med.* **2**, 465-476.
102. S.Kawano, S.Shoji, S.Ichinose, K.Yamagata, M.Tagami, M.Hiraoka (2002). Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **32**, 165-174.
103. S.J.O'Keefe, J.Tamura, R.L.Kincaid, M.J.Tocci, E.A.O'Neill (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**, 692-694.
104. B.Kolozsvari, Z.Szijgyarto, P.Bai, P.Gergely, A.Verin, J.G.Garcia, E.Bako (2009). Role of calcineurin in thrombin-mediated endothelial cell contraction. *Cytometry A* **75**, 405-411.
105. S.D.Yang, E.A.Tallant, W.Y.Cheung (1982). Calcineurin is a calmodulin-dependent protein phosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **106**, 1419-1425.

106. L.E.Zaragosi, N.Billon, G.Ailhaud, C.Dani (2007). Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* **25**, 790-797.
107. Y.Isakari, Y.Harada, D.Ishikawa, K.Matsumura-Takeda, S.Sogo, T.Ishida, T.Taki, H.Kiwada (2007). Efficient gene expression in megakaryocytic cell line using nucleofection. *Int.J.Pharm.* **338**, 157-164.
108. M.Edwards, S.C.Wong, R.Chotpadiwetkul, D.Smirlis, R.Phillips, E.A.Shephard (2006). Transfection of primary cultures of rat hepatocytes. *Methods Mol.Biol.* **320**, 273-282.
109. H.Madry, S.B.Trippel (2000). Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther.* **7**, 286-291.
110. J.A.Campaign, A.A.Matassa, P.L.Felgner, K.M.Barnhart, D.T.Curiel, G.S.Harrison (1998). Lipid- and adenoviral-mediated gene transfer into AIDS-Kaposi's sarcoma cell lines. *Cancer Gene Ther.* **5**, 131-43.
111. K.bul-Hassan, R.Walmsley, M.Boulton (2000). Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr.Eye Res.* **20**, 361-366.
112. J.Y.Legendre, A.Trzeciak, B.Bohrmann, U.Deuschle, E.Kitas, A.Supersaxo (1997). Dioleoylmelittin as a novel serum-insensitive reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Bioconjug Chem.* **8**, 57-63.
113. Zanten.J.van, M.B.Doornbos-Van der, S.Audouy, R.J.Kok, L.L.de (2004). A nonviral carrier for targeted gene delivery to tumor cells. *Cancer Gene Ther.* **11**, 156-64.
114. S.Manicassamy, D.Yin, Z.Zhang, L.L.Moliner, M.L.Alegre, Z.Sun (2008). A critical role for protein kinase C-theta-mediated T cell survival in cardiac allograft rejection. *J.Immunol.* **181**, 513-520.
115. S.Halpain, A.Hipolito, L.Saffer (1998). Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J.Neurosci.* **18**, 9835-9844.
116. T.Juhasz, C.Matta, G.Veress, G.Nagy, Z.Szijgyarto, Z.Molnar, J.Fodor, R.Zakany, P.Gergely (2009). Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35. *Int.J.Oncol.* **34**, 995-1003.
117. S.Mochida, T.Hunt (2007). Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature* **449**, 336-340.
118. M.Nieves-Cintron, G.C.Amberg, M.F.Navedo, J.D.Molkentin, L.F.Santana (2008). The control of Ca²⁺ influx and NFATc3 signaling in arterial smooth muscle during hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 15623-15628.

119. S.A.Yoo, B.H.Park, H.J.Yoon, J.Y.Lee, J.H.Song, H.A.Kim, C.S.Cho, W.U.Kim (2007). Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 2299-2311.
120. T.S.Wang, Q.Q.Ding, R.H.Guo, H.Shen, J.Sun, K.H.Lu, S.H.You, H.M.Ge, Y.Q.Shu, P.Liu (2010). Expression of livin in gastric cancer and induction of apoptosis in SGC-7901 cells by shRNA-mediated silencing of livin gene. *Biomed.Pharmacother.* **64**, 333-338.
121. B.Zhou, Z.X.Wang, Y.Zhao, D.L.Brautigan, Z.Y.Zhang (2002). The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *J.Biol.Chem.* **277**, 31818-31825.
122. S.Klumpp, J.Kriegelstein (2002). Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Curr.Opin.Pharmacol.* **2**, 458-462.
123. J.K.Sonn, M.Solursh (1993). Activity of protein kinase C during the differentiation of chick limb bud mesenchymal cells. *Differentiation* **53**, 155-162.
124. V.Grill, M.A.Sandrucci, M.Basa, V.Nicolin, P.Narducci, R.Bareggi, A.M.Martelli (2002). Immunochemical and immunocytochemical expression of protein kinase c isoenzymes alpha, delta, epsilon and zeta in primary adherent cultures of chick chondrocytes. *Ital.J.Anat.Embryol.* **107**, 73-84.
125. Y.Fan, Y.Q.Zhang, D.J.Sun, Y.N.Zhang, X.W.Wu, J.Li (2009). Rottlerin protected dopaminergic cell line from cytotoxicity of 6-hydroxydopamine by inhibiting PKCdelta phosphorylation. *Neurosci.Bull.* **25**, 187-195.
126. S.Kim, J.Hwang, W.H.Lee, D.Y.Hwang, K.Suk (2008). Role of protein kinase Cdelta in paraquat-induced glial cell death. *J.Neurosci.Res.* **86**, 2062-2070.
127. J.R.Klinger, J.D.Murray, B.Casserly, D.F.Alvarez, J.A.King, S.S.An, G.Choudhary, A.N.Owusu-Sarfo, R.Warburton, E.O.Harrington (2007). Rottlerin causes pulmonary edema in vivo: a possible role for PKCdelta. *J.Appl.Physiol* **103**, 2084-2094.
128. G.Valacchi, A.Pecorelli, M.Mencarelli, P.Carbotti, V.Fortino, M.Muscettola, E.Maioli (2009). Rottlerin: a multifaced regulator of keratinocyte cell cycle. *Exp.Dermatol.* **18**, 516-521.
129. T.Kurosu, K.Tsuji, A.Kida, T.Koyama, M.Yamamoto, O.Miura (2007). Rottlerin synergistically enhances imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells through its mitochondrial uncoupling effect independent of protein kinase C-delta. *Oncogene* **26**, 2975-2987.
130. S.P.Soltoff (2007). Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends Pharmacol.Sci.* **28**, 453-458.

131. M.R.Seghatoleslami, J.A.Roman-Blas, A.M.Rainville, R.Modaressi, K.G.Danielson, R.S.Tuan (2003). Progression of chondrogenesis in C3H10T1/2 cells is associated with prolonged and tight regulation of ERK1/2. *J.Cell Biochem.* **88**, 1129-1144.
132. J.A.Tapia, R.T.Jensen, L.J.Garcia-Marin (2006). Rottlerin inhibits stimulated enzymatic secretion and several intracellular signaling transduction pathways in pancreatic acinar cells by a non-PKC-delta-dependent mechanism. *Biochim.Biophys.Acta* **1763**, 25-38.
133. Y.L.Hsu, P.L.Kuo (2008). Diosmetin induces human osteoblastic differentiation through the protein kinase C/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J.Bone Miner.Res.* **23**, 949-960.
134. T.Efimova, A.M.Broome, R.L.Eckert (2004). Protein kinase Cdelta regulates keratinocyte death and survival by regulating activity and subcellular localization of a p38delta-extracellular signal-regulated kinase 1/2 complex. *Mol.Cell Biol.* **24**, 8167-8183.
135. R.Mandil, E.Ashkenazi, M.Blass, I.Kronfeld, G.Kazimirsky, G.Rosenthal, F.Umansky, P.S.Lorenzo, P.M.Blumberg, C.Brodie (2001). Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res.* **61**, 4612-4619.
136. L.Li, P.S.Lorenzo, K.Bogi, P.M.Blumberg, S.H.Yuspa (1999). Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol.Cell Biol.* **19**, 8547-8558.
137. B.Liu, E.J.Ryer, R.Kundi, K.Kamiya, H.Itoh, P.L.Faries, K.Sakakibara, K.C.Kent (2007). Protein kinase C-delta regulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells through the extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J.Vasc.Surg.* **45**, 160-168.
138. Y.M.Lee, W.H.Li, Y.K.Kim, K.H.Kim, J.H.Chung (2008). Heat-induced MMP-1 expression is mediated by TRPV1 through PKCalpha signaling in HaCaT cells. *Exp.Dermatol.* **17**, 864-870.
139. G.K.Lonne, K.C.Masoumi, J.Lennartsson, C.Larsson (2009). Protein kinase Cdelta supports survival of MDA-MB-231 breast cancer cells by suppressing the ERK1/2 pathway. *J.Biol.Chem.* **284**, 33456-33465.
140. E.Szabo, Y.Qiu, S.Baksh, M.Michalak, M.Opas (2008). Calreticulin inhibits commitment to adipocyte differentiation. *J.Cell Biol.* **182**, 103-116.
141. G.Dupont, G.Houart, K.P.De (2003). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations: a simple model. *Cell Calcium* **34**, 485-497.

142. R.A.McIlhinney, E.Philipps, B.B.Le, S.Grimwood, K.Wafford, S.Sandhu, P.Whiting (2003). Assembly of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem.Soc.Trans.* **31**, 865-868.
143. T.Hayashi, A.Kagaya, M.Takebayashi, T.Oyamada, M.Inagaki, Y.Tawara, N.Yokota, J.Horiguchi, T.P.Su, S.Yamawaki (1997). Effect of dantrolene on KCl- or NMDA-induced intracellular Ca²⁺ changes and spontaneous Ca²⁺ oscillation in cultured rat frontal cortical neurons. *J.Neural Transm.* **104**, 811-824.

10. Közlemények listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

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

Csaba Matta*, Tamás Juhász*, Zsolt Szíjgyártó, Bernadett Kolozsvári, Georgina Nagy, Pál Gergely and Róza Zákány (2010). PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures *Biochimie* [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.biochi.2010.09.005.
IF: 3,897 (2009-es adat)
*: megosztott elsőszervezők

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

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

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

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

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

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

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

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások:

Juhász Tamás, Matta Csaba, Mészár Zoltán, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *A porcosodó high density mezenchimális kultúrák transzferenciós lehetőségei XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, (2005)*

Zákány Róza, Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál: *Kalcium-érzékeny jelátviteli útvonalak az in vitro porcképződés szabályozásában A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, (2006)*

Matta Csaba, Juhász Tamás, Fodor János, Deli Tamás, Csernoch László, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az intracelluláris Ca-koncentráció változásai az in vitro porcdifferenciáció során A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, (2006)*

Juhász Tamás, Matta Csaba, Mészár Zoltán, Nagy Georgina, Hajas György, Szíjgyártó Zsolt, Dobrosi Nóra, Czifra Gabriella, Karácsonyi Zoltán, Bíró Tamás, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Primer porcosodó sejt kultúrák tranziens transzferenciójának optimalizálása A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, (2006)*

Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az in vitro porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris Az in vitro porcdifferenciálódást kísérő intracelluláris Ca²⁺-koncentráció-változások 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, (2008)*

Juhász Tamás, Szentesiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Fodor János, Pál Balázs, Kőszegi Áron, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az NMDA receptorok szerepe a differenciálódó porcsejtek Ca²⁺ háztartásában Magyar Anatómus Társaság XV. Kongresszusa, Budapest, (2009)*

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek:

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

Matta Csaba, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Szűcs Kornélia, Czifra Gabriella, Zákány Róza, Módis László, Gergely Pál: *A PKC-izoenzimek szerepe az in vitro porcdifferenciálódás szabályozásában A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály IX. Munkaértekezlete, Sopron, (2004)*

Juhász Tamás, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Szűcs Kornélia, Czifra Gabriella, Zákány Róza, Módis László, Gergely Pál: *A PP2B szerepe az oxidatív stressz porcképződést gátló hatásának kialakulásában A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály IX. Munkaértekezlete, Sopron, (2004)*

Szíjgyártó Zsolt, Szűcs Kornélia, Csontos Csilla, Bakó Éva, Czifra Gabriella, Bíró Tamás, Zákány Róza, Matta Csaba, Juhász Tamás, Módis László, Gergely Pál: *Protein-kinázok és foszfatázok szerepe az in vitro porcdifferenciációban A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály IX. Munkaértekezlete, Sopron, (2004)*

- Juhász Tamás, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Czifra Gabriella, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *A calcineurin befolyásolja az ERK1/2 foszforilációs állapotát az in vitro porcképződés során* MAT XIII. Kongresszusa, Pécs, (2005)
- Juhász Tamás, Matta Csaba, Mészár Zoltán, Szíjgyártó Zsolt, Dobrosi Nóra, Czifra Gabriella, Bíró Tamás, Módis László, Gergely Pál, Zákány Róza: *A tranziens transzfecció hatása a high density mezenchimális sejt kultúrákban zajló porcdifferenciációra* Sejtanalitikai Konferencia Budapest, (2006)
- Juhász Tamás, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Gergely Pál és Zákány Róza: *A PKC delta szerepe az in vitro porcdifferenciációban* XIV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, (2007)
- Sebe Attila, Panyi György, Zákány Róza, Juhász Tamás, Matta Csaba, Varga Zoltán: *Ioncsatornák szerepe differenciálódó porcsejteken* 38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, (2008)
- Juhász Tamás, Szentesiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Szíjgyártó Zsolt, Fodor János, Karácsonyi Zoltán, Csernoch László, Zákány Róza: *NMDA-receptorok a differenciálódó porcsejteken* A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen, (2008)
- Matta Csaba, Fodor János, Juhász Tamás, Szíjgyártó Zsolt, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásainak vizsgálata az in vitro porcdifferenciáció során* A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen (2008)
- Juhász Tamás, Szentesiné Holló Krisztina, Matta Csaba, Fodor János, Pál Balázs, Kőszegi Áron, Csernoch László, Gergely Pál, Zákány Róza: *NMDA receptorok jelenléte a porcdifferenciáció során* 39. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, (2009)
- Csaba Matta, Tamás Juhász, Zsolt Szíjgyártó, Gabriella Czifra, Tamás Bíró, Róza Zákány, László Módis and Pál Gergely: *The role of protein kinase C isoenzymes in chondrogenesis of micromass cell cultures* 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, (2005)
- Tamás Juhász, Zsolt Szíjgyártó, Csaba Matta, Gabriella Czifra, Tamás Bíró, Róza Zákány, László Módis and Pál Gergely: *Calcineurin regulates chondrogenesis via the modulation of ERK1/2 activity* 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, (2005)
- Csaba Matta, János Fodor, Tamás Juhász, László Csernoch, Pál Gergely, Róza Zákány: *Insights into the Ca²⁺ homeostasis of chicken high density mesenchymal cell cultures* Cartilage Biology and Pathology – Gordon Research Conference, Les Diablerets, Svájc, (2009)
- Csaba Matta, János Fodor, Tamás Juhász, László Csernoch, Pál Gergely and Róza Zákány: *Plasmamembrane cation channels and cytosolic Ca²⁺ homeostasis of differentiating chicken chondrocytes* . XXIInd Meeting of FECTS, Davos, Svájc (2010)

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zákány Rózának azt a rengeteg segítséget, amit már TDK-s korom óta nyújtott a kutatási munkám során. Köszönet illeti hasznos tanácsait és szárnyaló elméleti segítségét, amivel laborunk tudományos értékét emelni tudtuk. Külön szeretném megköszönni, hogy rengeteg szabad kezet kaptam mind a kísérletes munka, mind az elméleti munka elvégzésében, és mindazt a támogatást, amivel legvalószínűtlenebb ötleteimet is felkarolta. A kutatási munka elvégzésén kívül lehetőséget adott, mint társ-témavezetőként való működésre, így rengeteg tanáccsal látott el és számos oktatási tapasztalattal is gazdagodhattam.

Nagyon fontos szerepet játszottak és kutatási téren ösztönzőleg hatottak rám közvetlen munkatársaim. Különösen hálás vagyok Matta Csabának, akire nemcsak barátként tekinthetek, de akire a munkában is magánéletben is példaképként gondolhatok. Nélküle a disszertáció nagy része nem születhetett volna meg. Nagy köszönettel tartozom kollaborációs partnereinknek és egyben barátaimnak is, így pl. Fodor Jánosnak, aki hihetetlen munkabíráásával és türelmével vezetett be minket a Ca^{2+} -homeosztázis rejtelseibe. Nagy Georginának, aki nélkül a FACS mérések és elemzések nem születhettek volna meg. Molnár Zsanettnek, aki lankadatlan lelkesedéssel vett részt a PCR munkák kivitelezésében.

Külön köszönöm Bárány Sándornénak, hogy pótanyaként szeretett minket és azt a rengeteg türelmet és segítséget, mellyel bevezetett a tenyésztői és a labormunka rejtelseibe. Szavakban nem kifejezhető hálával tartozom Bíróné Barna Krisztinának. Az ő segítő kezei nélkül, ilyen oktatási terhelés mellett a kísérletek nagy része elvégezhetetlen lett volna.

Köszönettel tartozom Gergely Pál professzor úrnak azért a rengeteg jó tanácsért és azért a sok konferenciatámogatásért, mellyel előadókészségem fejlődhetett és nem utolsó sorban, hogy anyagi támogatással lehetővé tette laborunk fejlődését.

Hálával tartozom Módis László professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy porckutatóként dolgozhassak és hogy egyszerű „Heré”-ből oltalmazó kezei alatt továbbfejlődhessék „Dolgozó Méhhé”. Hálámat fejezem ki Antal Miklós professzor úrnak, amiért lehetővé tette, hogy az intézet összes facilitását használhassam kísérleteim elvégzéséhez.

Természetesen nem feledkezhetem meg a laboratóriumunkban dolgozó fiatal TDK-s titánokról sem, akik egy része már a laboratóriumunk ifjú PhD-sai közé tartoznak, és akik nagyon sokat segítettek a kísérletek elvégzésében és rengeteg vidám órát töltöttem társaságukban.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek és fiamnak, hogy munkám során támogattak és megértő hozzáállásukról biztosítottak.

12. Függelék

Az értekezést megalapozó közlemények különnyomatai.