

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A DNS metiláció és a cirkadián óra szabályozó mechanizmusainak vizsgálata a porcfejlődés során

Vágó Judit

Témavezető: Dr. Zákány Róza



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A porc biológiájának ismertetése	6
2.1.1. <i>A porc szövettani tulajdonságai</i>	6
2.1.2. <i>A porcdifferenciáció folyamatának áttekintése</i>	10
2.2. A DNS metiláció	17
2.2.1. <i>A DNS metiláció mechanizmusának bemutatása</i>	17
2.2.2. <i>A porc, a porcfejlődés és a DNS metiláció kapcsolata</i>	22
2.3. A cirkadián óra	26
2.3.1. <i>A molekuláris cirkadián óra általános jellemzői</i>	26
2.3.2. <i>A porc, a porcfejlődés és a cirkadián óra kapcsolata</i>	30
2.4. A DNS metiláció és a cirkadián óra kapcsolata	33
3. CÉLKITŰZÉSEK	35
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
4.1. Kísérleti modellek	36
4.1.1. <i>Egér-embrió végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrák</i>	36
4.1.2. <i>Csírkeembrió végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrák</i>	37
4.1.3. <i>C3H10T1/2+BMP-2 sejt vonal eredetű porcosodó micromass kultúrák</i>	38
4.2. <i>In situ</i> hibridizáció	38
4.3. PCR array	43
4.4. Totál RNS izolálás és reverz transzkripció	46
4.5. Kvantitatív valós-idejű PCR analízis.....	46
4.6. Kvantitatív metiláció-specifikus PCR analízis	49
4.7. A cirkadián óra szinkronizációja	50
4.8. Az <i>in vitro</i> porcfejlődés befolyásolása különböző farmakonokkal	52
4.9. Életképesség vizsgálata	53
4.10. Sejtproliferációs képesség ellenőrzése	54
4.11. Metakromáziás festési technikák alkalmazása	55
4.12. Statisztikai analízis	56
5. EREDMÉNYEK	58

5.1. A DNS metiláció génszintű szabályozásának vizsgálata <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> porcdifferenciáció során egér eredetű kondrogenikus modellekben	58
5.1.1. Epigenetikai szabályozó faktorok génexpressziójának PCR array-alapú elemzése	58
5.1.2. A <i>Dnmt3a</i> , <i>Tet1</i> és <i>Ogt</i> génexpressziós változásainak vizsgálata C3H10T1/2+BMP-2 eredetű micromass kultúrákban	59
5.1.3. A <i>Dnmt3a</i> , <i>Tet1</i> és <i>Ogt</i> génexpressziós változásainak vizsgálata egér eredetű primer micromass kultúrákban	60
5.1.4. A <i>Dnmt3a</i> , <i>Tet1</i> és <i>Ogt</i> mRNS-szintű expressziójának vizsgálata egérembrióban	61
5.2. A DNS metiláció gátlásának vizsgálata az <i>in vitro</i> porcdifferenciáció során egérembrió eredetű kondrogenikus modellben	63
5.2.1. Az 5-azaC a sejtek differenciációs szintjétől függően eltérően befolyásolja a porckultúrák mikroszkópos megjelenését	63
5.2.2. A differenciálatlan és differenciált porcsejtek különböző mértékben érzékenyek az 5-azaC kezelésre	65
5.2.3. Az 5-azaC korai vagy késői adminisztrációja a kondrogenézis során eltérő hatást fejt ki a porcspecifikus gének expressziójára	66
5.2.4. Az érett kondrociták porcmarkereinek upregulációja közvetlenül az 5-azaC kezelés eredménye	67
5.3. A molekuláris cirkadián óra működésének vizsgálata az <i>in vitro</i> porcfejlődés során csirke eredetű kondrogenikus modellben	68
5.3.1. A cirkadián óra szinkronizációja a porcfejlődés során	68
5.3.2. A szérumsokk alkalmazása serkenti a porcdifferenciációt	69
5.3.3. A cirkadián óra modulálása negatívan befolyásolta a porcfejlődést	71
5.3.4. A molekuláris óragének és a porc markergének expressziós változása szinkronizált oszcillációs mintázatot mutatott a szérumsokkot követően	75
6. MEGBESZÉLÉS	83
6.1. A DNS metiláció molekuláris résztvevőinek vizsgálata az <i>in vitro</i> porcfejlődés során	83
6.2. A cirkadián óra molekuláris résztvevőinek vizsgálata az <i>in vitro</i> porcfejlődés során	91
7. ÖSSZEFOGLALÁS	95
8. SUMMARY	96
9. IRODALOMJEGYZÉK	97
10. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	105
11. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	107
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108
13. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	109
14. FÜGGELÉKEK	111

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-azaC: 5-azacitidin	OGT: O-típusú-N-acetilglükózamin transzferáz (O-Linked N-Acetylglucosamine [GlcNAc] Transferase)
5-caC: 5-karboxicitozin	OP: oszteopontin (SPP1: secreted phosphoprotein 1)
5-fC: 5-formilcitozin	PBS: foszfátpufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
5-hmC: 5-hidroximetilcitozin	PBST: 0,1% Tween-20-szal kiegészített PBS
5-mC: 5-metilcitozin	PER: PERIOD
ACTB: béta-aktin (actin beta)	PFA: paraformaldehid
ALP: alkalikus foszfatáz (alkaline phosphatase)	PPIA: peptidilprolil-izomeráz A (peptidylprolyl isomerase A)
ARNTL/BMAL1: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like ARNTL/BMAL1	qMSP: kvantitatív metiláció-specifikus PCR (quantitative methylation-specific PCR)
BMP: csont morfogénikus fehérje (bone morphogenic protein)	REV-ERB: nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 [NR1D2/REV-ERB]
cDNS: komplementer DNS (complementary DNA)	ROR: retinsavreceptor-rokon árva receptor (retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor)
CK: kazein kináz (casein kinase)	RPLP0: riboszómális fehérje oldalsó szár P0 alegység (ribosomal protein lateral stalk subunit P0)
CLOCK: circadian locomotor output cycle kaput	RT-PCR: reverz transzkripciót követő polimeráz-lánreakció (reverse transcription polymerase chain reaction)
CMF-PBS: kalcium- és magnéziummentes foszfátpuffer (calcium and magnesium free phosphate buffered saline)	RT-qPCR: valós idejű – kvantitatív polimeráz-lánreakció (real-time quantitative polymerase chain reaction)
COL2A1: II-es típusú kollagén (collagen type II alpha 1 chain)	RUNX2: Runt-kapcsolt transzkripció faktor 2 (Runt-related transcription factor 2)
COL9A2: IX-es típusú kollagén (collagen type 9 alpha 2 chain)	SDHA: szukcinát dehidrogenáz flavoprotein A alegység (succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A)
COL10A1: X-es típusú kollagén (collagen type X alpha 1 chain)	SOX9: SRY-gént tartalmazó box 9 (SRY-box transcription factor 9)
COL11A2: XI-es típusú kollagén (collagen type 11 alpha 2 chain)	SSC: sós nátrium-citrát (saline sodium citrate)
CpG: citozin-foszfat-guanin komplex	TBP: TATA boks-kötő fehérje (TATA box binding protein)
CRY: CRYPTOCHROME	TET: ten-eleven translocation
DEPC: dietil-pirokarbonát (diethyl pyrocarbonate)	TGF: transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
DIG: digoxigenin	TTF: transzkripció-transzláció visszacsatolási hurok (transcription-translation feedback loop)
DMMK: dimetil-metilénkék	WNT: Wingless-type MMTV integration site family member
DMSO: dimetil-szulfid	YWHAZ: tirozin 3-monooxigenáz/triptofán 5-monooxigenáz aktiváló fehérje zéta polipeptid (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta)
DNMT: DNS metiltranszferáz	
ECM: extracelluláris mátrix	
FBS: főtális borjúsérum (fetal bovine serum)	
FGF: fibroblaszt eredetű növekedési faktor (fibroblast growth factor)	
GAG: glükózaminoglikán	
HD: nagy sejtsűrűségű (high density)	
HE: hematoxilin-eozin	
HG-DMEM: magas glükóztartalmú tápoldat (high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium)	
MMP13: mátrix metalloproteináz 13 (matrix metalloproteinase 13)	
MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid	
NFW: nukleáz-mentes víz (nuclease-free water)	
O-GlcNAc: O-típusú-N-acetilglükózamin (O-linked-N-acetylglucosamin)	
OA: oszteoarthritis	

1. BEVEZETÉS

A mozgási szervrendszert és a támasztószöveteket érintő megbetegedések korunk társadalmának legégetőbb egészségügyi problémái közé tartoznak. A súlyos elváltozások olyan krónikus állapotok kialakulásához vezethetnek, mint például az oszteoarthritisz (OA), amely az ízületek területén található porcszövet nagyfokú és visszafordíthatatlan degenerációja mellett gyulladás kialakulásával és erőteljes fájdalommal jár. Egy 2019-ben megjelent publikáció alapján a világ népességét tekintve nagyjából 1,7 milliárd ember szenved valamilyen mozgásszervi problémától, ebből az OA-ban szenvedők száma a 343 milliót is elérheti [1]. Magyarország tekintetében a 2014-ben elvégzett „Európai lakossági egészségfelmérés” alapján a 15 éves és annál idősebb népesség 17%-a számolt be ízületi porc kopásával járó megbetegedésről [2]. A támasztószövetek kóros elváltozása jellemzően az idősebb korosztályt érinti, azonban a degenerációs folyamatok már a középkorú felnőttekben is elkezdődhetnek. Az OA emiatt már a 40-45 éves korosztályt érintő top 20-as megbetegedések listáján is megtalálható [3]. A korból, biológiai nemből, hormonháztartásból, genetikai hajlamból, vagy autoimmun betegségekből adódó szisztémás kockázati tényezők mellett nagyon fontos megemlíteni az olyan külső befolyásoló faktorokat, mint például a mozgásszegény életmód vagy a sok üléssel, tartós egyhelyben állással járó munkavégzés. Ugyancsak jelentős kóroki tényező lehet az egészségtelen összetételű, túlzott kalória-bevitellel párosuló táplálkozás, amely a csökkent fizikai aktivitással társulva jelentős túlsúlyhoz vezethet. Ezek az életmódbeli sajátosságok a fejlett országokban egyre nagyobb számú lakost érintenek, ráadásul egyre fiatalabb korban. Mindezek mellett a lakosság korösszetételének átalakulását sem szabad figyelmen kívül hagyni: szintén a fejlett országokra jellemző a társadalom előregedése és a születéskor várható élettartam meghosszabbodása [4]. A felsorolt rizikófaktorok azt jelzik előre, hogy a jövőben az ízületi bántalmak egyre nagyobb számban fogják érinteni a világ népességét. Az ENSZ Egészségügyi Világszervezete (World Health Organization, WHO) 2017-ben meghirdette a „Rehabilitáció 2030” elnevezésű programját, amely arra irányul, hogy a betegek számára világszerte elérhetővé váljanak a rehabilitációs szolgáltatások, emellett sokkal nagyobb figyelmet kapjanak az emberek életminőségének javítását célzó eszközök [5]. Ezáltal a megbetegedések száma előreláthatóan csökkenne, a betegek pedig nagyobb eséllyel térhetnének vissza mindennapi életvitelükhöz. Az OA oki kezelésére, illetve a degenerálódott porc regenerációjának elősegítésére csupán kevés és kérdéses hatásosságú terápiás lehetőség ismert. Az OA kezelése jelenleg elsősorban a gyógyszerekkel való tüneti

csökkentésre és fájdalomenyhítésre irányul, végső esetben pedig az ízületi implantátumok műtéti alkalmazása jelenthet megoldást [6].

A sérült porcszövet újjáépítésére irányuló potenciális kezelési eljárások közül igen népszerűnek számít a mezenchimális őssejtek beültetése és porc irányú differenciáltatása [7]. Az őssejtek differenciációs mechanizmusának részletei, illetve a folyamatban részt vevő jelátviteli útvonalakkal kapcsolatos ismereteink egyelőre limitáltak, és számos megválaszolandó kérdést vetnek fel. A megfelelő gyógymódok kialakításához, illetve az ízületi porc fejlődésével kapcsolatos alapvető biológiai jellemzők megértéséhez rendkívül nagy szükség van a mezenchimális sejtek és azok kondrogenikus differenciációjának pontosabb megismerésére.

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán, az Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetben működő Jelátviteli Laboratórium fő kutatási területe a kötőszövet-biológia. Kísérleteink célja, hogy tanulmányozzuk a hialinporc fejlődését, feltárjuk a folyamatban részt vevő szabályozó molekulákat és meghatározzuk azok pontos szerepét. Bízunk benne, hogy az újonnan szerzett ismereteink hosszabb távon hozzájárulhatnak a degenerálódott porc újjáépítését elősegítő kezelések kifejlesztéséhez.

Laboratóriumunk az elmúlt évek során igazolta, hogy számos jelátviteli folyamat kulcsfontosságú szereppel bír a porcfejlődés során [8] [9] [10]. Az értekezésem alapjául szolgáló eredményeket hozó kísérleteket két új, az aktuális nemzetközi trendekhez jól igazodó kutatási irány határozta meg. Vizsgálataink során a porcdifferenciáció (különösképpen annak a korai érési szakaszára jellemző) epigenetikai módosulásait, illetve a folyamat cirkadián óraműködéssel összefüggő szabályozási mechanizmusait tanulmányoztuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A porc biológiájának ismertetése

2.1.1. A porc szövettani tulajdonságai

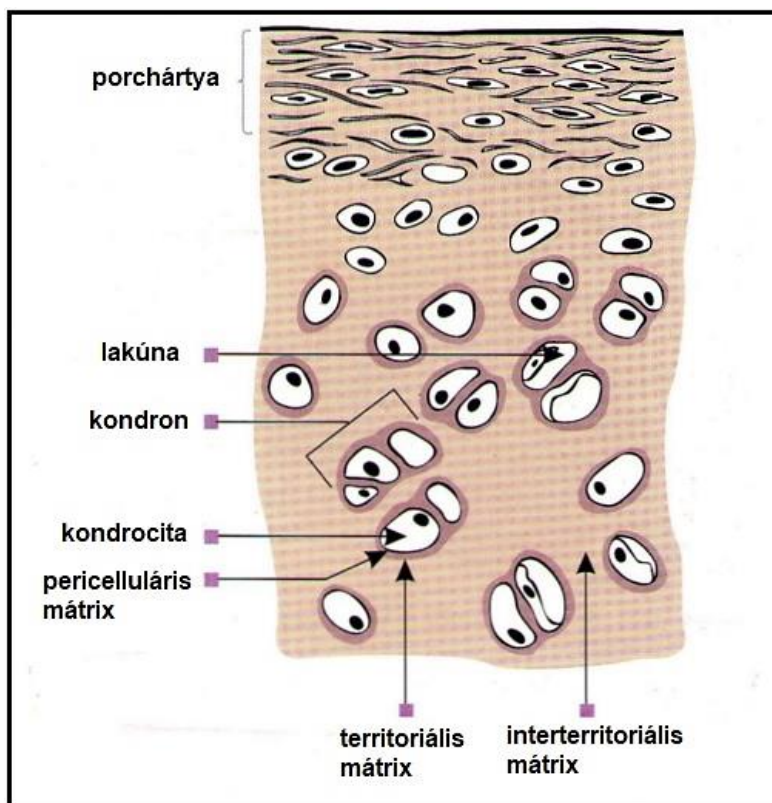
A porcszövet egy specializált kötőszöveti típus, amely az emberi testben jelentős szerkezeti és mechanikai szerepekkel bír. Ez a jellegzetes támasztószövet számos funkciót lát el mind a prenatális, mind a posztnatális időszakban. A porc többek között részt vesz a korai embrió támasztóvázának kialakításában és az encondralis csontosodási mechanizmus által létrejövő csontok előtelepeinek megalkotásában, a növekedési porckorong révén elősegíti a csontok gyors ütemű posztnatális növekedését, illetve hozzájárul az ízületi felszínek beborításához és kipárnázásához, a fej csontos elemeinek rugalmas kapcsolódásához és a törött csontok gyógyulásához is [11] [12].

Az érett szövet felépítésében alapvetően két komponens vesz részt: a porcsejtek vagy kondrociták, illetve a porcspecifikus sejtközi állomány vagy extracelluláris mátrix (ECM). A két fő alkotóelem mellett fontos még megemlíteni a rendkívül kis mennyiségben megtalálható kondroprogenitor sejteket, melyek az őssejtekre jellemző tulajdonságaikból adódóan szerepet kapnak a porc normál homeosztázisának fenntartásában, illetve a sérült porc limitált mértékű regenerációjában [13] [14]. A szervezetünkben található porcos területek szövettani eltéréseket mutathatnak attól függően, hogy az adott anatómiai elhelyezkedésük alapján milyen mechanikai igénybevételnek vannak kitéve. A szövet hajlíthatósága, rugalmassága és szakítószilárdsága változó mértéket mutat a nyomó- és nyíróerőkkel szemben, ezeket a tulajdonságokat az ECM makromolekuláris összetétele szabja meg. A sejtközi állomány felépítése alapján a porcszöveten belül három alcsoportot határozunk meg: ezek a hialinporc, a rugalmas porc illetve a rostos porc. A hialinporc mátrixa makroszkópiusan homogén megjelenésű, maga a porc rendkívül nagy ellenállóképességgel bír a nyomóerőkkel szemben, éppen ezért elengedhetetlen a mozgásokból származó ütési erők felfogásában, különös tekintettel az ízületeket borító felszíneken, ahol a jellegzetes belső rétegződésel rendelkező hialinporcot specifikusan ízületi porcként nevezzük. A rugalmas porc nagymértékű hajlékonysággal és alacsony szakítószilárdsággal jellemezhető, mátrixának fő alkotója az elasztikus vagy rugalmas rost, többek között a fülkagylóban található fülporc is rugalmas típusú. A rostos porc a nyíróerőkkel szemben mutat nagymértékű ellenállást, az ECM főleg

kollagénrostokból épül fel, jellegzetes előfordulási helye a csigolyák közötti porckorongok, vagy a térdízületben található meniszkusz [15].

A porcszövet általános tulajdonságai közé tartozik, hogy nem tartalmaz sem ereket, sem pedig idegeket. A csekély mértékű táplálás a porc közvetlen környezete felől, illetve a porcot borító porchártya irányából érkező tápanyagok által történik. A rostos porcot, illetve a hialinporc specifikus formáját, az ízületi porcot azonban nem veszi körül porchártya, ezeken a helyeken a porcszövetet körülvevő szövetek vagy a szinoviális folyadék közvetítik a gáz- és anyagcserét. A porc sejtes alkotói felnőttekben nem, vagy csak igen ritkán osztódnak, azonban rendkívül hosszú életidővel rendelkeznek. A kondrociták metabolikus aktivitása alacsony, a minimális tápanyagellátottság és az ennek okán kialakuló alacsony szöveti oxigénszint következtében a sejtek anaerob módon termelnek energiát. A porcsejtek felelősek a porcra jellemző sejtközi állomány alkotóinak termeléséért, azonban a megfelelő ECM szintén létfontosságú a porcot alkotó sejtes elemek optimális működéséhez. A felsorolt jellegzetességekből az következik, hogy a szövet regenerációs képessége rendkívül alacsony, különösen az ízületi porc esetében [15] [16].

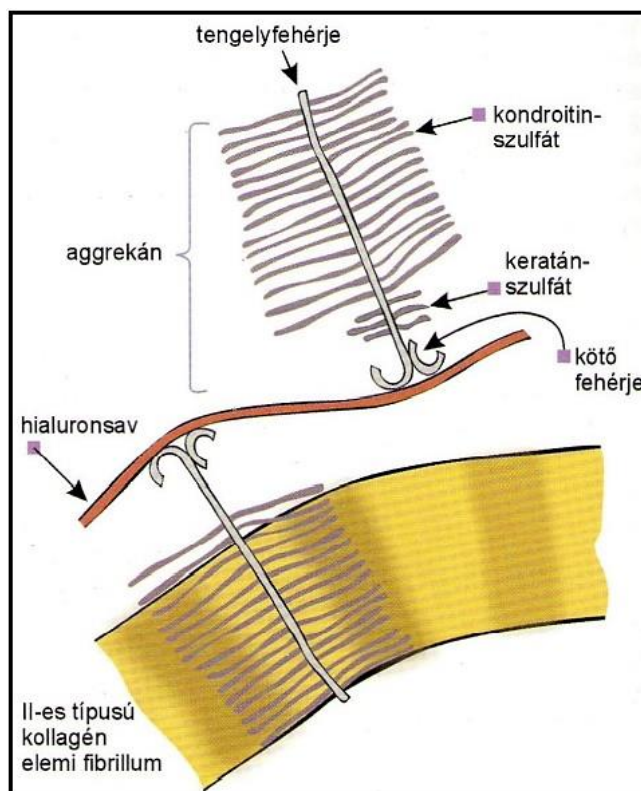
Mivel vizsgálataink középpontjában a hialinporc áll, ezért a továbbiakban ezt a porctípust mutatom be részletesebben. Az érett kondrociták és az általuk létrehozott ECM egy porcszövetre specifikus komplexet hoz létre (2.1. ábra). A szövettani szerkezet alapegysége a kondron, amely a hialinporc esetében jellemzően 2-4, de akár 8 kerekded porcsejt szoros kapcsolatából, az egyes sejtek körül található pericelluláris mátrixból, ezen felül pedig maga a sejtcsoportosulás körül létrejövő territoriális mátrixból jön létre. Az alapegységül szolgáló kondronok között található teret interterritoriális mátrixnak nevezzük. A porcsejtek által elfoglalt üregek az úgynevezett lakúnak. A légutakban található állandósult hialinporc esetében, valamint az enkondrális csontosodás templátjául szolgáló tranziens porc külső felszínén porchártyát találunk, amelynek külső rétege rostdús kötőszövetből áll, míg a belső rétege differenciálatlan sejtekben gazdag. Az éretlen sejtek osztódásra képesek, így biztosíthatják a porc növekedését illetve regenerációját. A progenitor sejtekből kondroblasztok differenciálódnak, melyek miután belépnek a porc területére, megkezdik a porcmátrix termelését és ezáltal hozzájárulnak a porc vastagodásához. A porchártyában továbbá vérereket és idegvégződéseket is találunk. Érdekesség, hogy sérülését követően a porchártya csak limitált mértékben képes részt venni a porc regenerációjában, a megújulás során a porc irányú differenciáció helyett a csontszövetre jellemző komponensek termelődése lesz jellemzőbb [15].



2.1. ábra: A hialinporc szövettani felépítésének sematikus ábrázolása. A porcot borító külső rétegben, a porchártyában főleg I-es típusú kollagénrostok és differenciálatlan sejtek találhatók. A porc belsejében az érett kondrociták úgynevezett lakúnákban foglalnak helyet. Több porcsejt összeállásával jön létre a porc alapegysége, a kondron. A porcsejtek körül található mátrix három típusát különböztetjük el: közvetlenül a porcsejt körül található a pericelluláris mátrix; a kondron körül a territoriális mátrixot találjuk; a kondronok között pedig az interterritoriális mátrix figyelhető meg. (Forrás: [15], módosítva)

A hialinporc mátrixa tipikus egynemű megjelenést mutat, ha a mintát rutin szövettani festési eljárás (például hematoxin-eozin, HE) alkalmazása mellett fénymikroszkóp segítségével vizsgáljuk. Az ECM alapvetően rostos alkotókból (többek között kollagénekből) és glükózaminoglikánokból (GAG), polianionos proteoglikánokból és multiadhezív glikoproteinekből felépülő amorf alapállományból áll, melyeknek aránya porc típusonként változó. A hialinporc mátrixának legnagyobb részarányú összetevői a kollagén makromolekulák, melyek a porc száraz tömegének nagyjából 2/3-át teszik ki [17]. Számos kollagéntípust lehet megkülönböztetni, azonban a legnagyobb (90% körüli) arányban a II-es típusú kollagén található meg a hialinporc ECM-ben [18]. Rendkívül jellegzetesek továbbá a hialuronsav láncokhoz kötőfehérjéken keresztül kapcsolódó és nagy aggregátumokat létrehozó aggregán molekulák, melyekhez szintén nagy számban többek között kondroitin-szulfát és keratán-szulfát tartalmú GAG oldalláncok kapcsolódnak (2.2. ábra). A porcsejtek, illetve az ECM proteoglikán és GAG komponensei a glikoproteineken (pl. tenascin, fibronectin)

keresztül kötődnek az ECM vázát alkotó kollagén fibrillumokhoz. Mivel az aggregán aggregátumok jelentős mennyiségben tartalmaznak polianionos, azaz negatív töltésű összetevőket, ezért egy HE-festés következtében a bázikus (pozitív töltésű) hematoxin szöveti festék domináns kék színét, vagyis bazofil festődését fogjuk látni a porc minta mikroszkópikus szintű vizsgálata során. Az úgynevezett metakromáziás festési eljárásoknál a porcspecifikus ECM szintén jellegzetes megjelenéssel írható le, ugyanis a nagy sűrűségben és mennyiségben található negatív töltésű, szulfatált GAG oldalláncokhoz jelentős mennyiségben kapcsolódik festékmolekula, melynek következtében a festék eredeti színe megváltozik – a porc ECM esetében jellegzetes magentavörös szín látható a fénymikroszkópos tanulmányozás során. Mindezek mellett fontos megjegyezni, hogy az aggregátumok nagy mennyiségű víz megkötésére képesek, amellyel hozzájárulnak a hialinporc összenyomó erőkhöz szemben mutatott jelentős ellenállásához [15] [16].



2.2. ábra: A hialinporc extracelluláris mátrixát alkotó komponensek szerkezeti viszonyát bemutató sematikus ábra. A mátrix jellegzetes egységei a nagyméretű proteoglikán aggregátumok, melyek aggregán tengelyfehérjékből, az ahhoz kapcsolódó kondroitin-szulfát és keratán-szulfát glükózaminoglikán oldalláncokból, illetve egy központi hialuronsav láncból állnak. Egy aggregátum nagyjából 20-30 aggregánmolekulából áll, melyek kötőfehérjéken keresztül kapcsolódnak a hialuronsavhoz. A glükózaminoglikán oldalláncok kapcsolódhatnak a II-es típusú kollagén molekulák által létrehozott elemi fibrillumokhoz. (Forrás: [15])

2.1.2. A porcdifferenciáció folyamatának áttekintése

Az érett porcşövet kialakulása különbözı szakaszokra osztható, az adott szakaszok alatt jellegzetes morfológiai és molekuláris események mennek végbe [19]. A porcfejlődés első lépéseként a leendő porc területén található mezenchimában a csillag vagy orsó alakú, nyúlványos mezenchimális sejtek intenzív osztódásba kezdenek. A sejtek már ebben a korai szakaszban is mutatnak egy bizonyos fokú elkötelezıdést a kondrogenikus irányú differenciáció irányába, ezért ıket porcelıfutár, vagy kondroprogenitor sejteknek is nevezzük. A gyors osztódási folyamatokkal egy idıben történik a sejtek nagy sőrőségő kondenzálódása, azaz a sejtek specifikus csoportosulásokat, sejtaggregátumokat, vagy más néven nodulusokat hoznak létre. Az aggregátumokban található sejtek a kondenzálódás elején még nem mutatnak morfológiai változást, továbbra is nyúlványos, fibroblaszt-jellegő megjelenésőek. Azonban a nodulusok formálódása során a sejteken egyre több sejt-sejt adhézıós molekula (például az N-kadherin vagy az idegi sejtadhézıós molekula [N-CAM]) fejezıdik ki [20] [21]. A tenaszcin, szindekán, vagy fibronektin sejt-mátrix adhézıós molekulák szintézise is stimulálódik [22], ezért a sejtek morfológiája a nagyszámú sejtadhézıós kapcsolódás kialakulását követıen megváltozik, a nyúlványok eltűnnek, alakjuk egyre inkább kerekded lesz [23]. A kondenzációs folyamat alatt megkezdıdik a különbözı kollagének (javarészt a II-es típusú kollagén, azaz COL2A1) génszintő expressziója is a sejtekben [24].

A lekerekedı alakkal jellemezhetı sejtek már differenciáltabb porcsejteket jelölnek: a kondroprogenitor sejtek fokozatosan alakulnak át kondroblasztokká, majd teljesen lekerekedett és érett porcsejteké vagy kondrocitákká. A kondrogenikus differenciáció következı lépéseként a porc-nodulusokban elhelyezkedı kondroblasztok vagy kondrociták porcspecifikus ECM-et kezdenek el termelni maguk köré, amely gazdag proteoglikánokban (fıleg aggregánban), glikoproteinekben, és GAG-okban. A kollagén fibrillumok szintézise is fokozottabbá válik, a II-es típusú kollagén mellett jellegzetes lesz a IX-es és a XI-es típusú kollagén, azaz COL9A2 és COL11A2 is [25]. Az aggregációt követıen, illetve az ECM termelıdésének megkezdésekor a kondroblasztok még képesek minimális mértékő osztódásra, azonban az ECM fokozódó mennyiségi növekedésének és az érett kondrociták térnyerésének következtében a sejtosztódás szinte teljesen megszűnik.

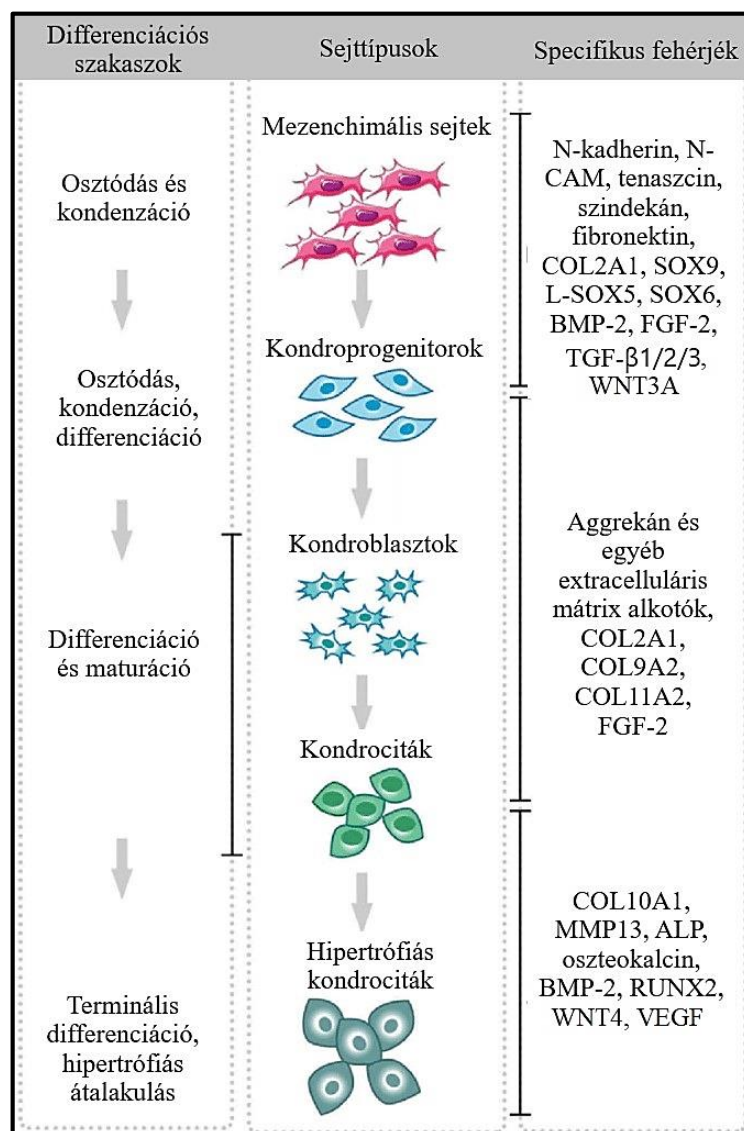
A sejtek érését követıen a kondrociták mérete idıvel megnı, úgynevezett hipertrófiás porcsejtek jelennek meg, emellett a porc mátrixába kalcium-lerakódás indul meg, ezek mind az oszteogenikus átalakulás jelei. A mineralizációs folyamatok hátterében többek között a X-es típusú kollagén (COL10A1) fokozott, és a COL2A1 extrémén lecsökkent szintézise áll [26].

Az oszteogenikus differenciáció markereként tartják számon továbbá a mátrix metalloproteináz 13-at (MMP13, a porc-ECM komponenseinek lebontásáért felel), az alkalikus foszfatázt (ALP, a csont mineralizációjának és mátrixának egyik fő szabályozója), az oszteokalcint (az oszteoblasztok által termelt kalcium-kötő mátrix fehérje, melynek plazmába bekerülő szabad formája hormonként hat), vagy az oszteopontin (OP/SPP1, a szintén az oszteoblasztok által termelt csontmineralizációt szabályozó komponens) [27].

A porcsejtek érésének folyamatát számos transzkripciós faktor befolyásolja. A SOX9 (SRY-gént tartalmazó box 9) gén fehérje termékét a kondrogenézis fő, úgynevezett mester transzkripciós faktoraként tartják számon, melynek expressziós szintje a differenciáció elején, a proliferációs és kondenzációs lépések alatt a legmagasabb. A SOX9 egy HMG-box (high mobility group box) osztályba tartozó DNS-kötő szakasszal rendelkezik, ezáltal képes befolyásolni szinte az összes porc markergén expresszióját, kiváltképp a porcra jellemző ECM fehérjéket kódoló géneket, emellett gátolja az érett porcsejtek terminális differenciációját és hipertrófiás átalakulását. A SOX9 szintén indukálja a SOX-családba tartozó L-SOX5 és SOX6 transzkripciós faktorok expresszióját, amelyek elősegítik a mezenchimális sejtek még határozottabb elköteleződését a porcsejt irányú differenciáció felé [28]. A sejtek mikro környezetében megjelenő jellegzetes szolubilis növekedési és differenciációs/szabályozó faktorok szintén fontos irányító tényezőnek számítanak a teljes differenciációs folyamat alatt. Ezeknek a komponenseknek köszönhetően alakulnak ki többek között a sejt-sejt vagy sejt-mátrix kapcsolatok a kondenzációs folyamat során. A faktorok többsége a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) szupercsaládba tartozó TGF- β 1, TGF- β 2 és TGF- β 3 [22]. A TGF- β növekedési faktorok mellett számos más szabályozó fehérje is részt vesz a porc kialakításának irányításában, többek között a csont morfogénikus fehérje (BMP) és fibroblaszt eredetű növekedési faktor (FGF) jelátviteli fehérjék, valamint a WNT/ β -catenin (WNT: Wingless-type MMTV integration site family member) szignalizációs útvonal résztvevői. A BMP-2 a kondroprogenitor sejtek aggregátum-képzését befolyásolja, illetve képes stimulálni a kondrogenézis mellett az oszteogenikus irányú differenciációt is, méghozzá koncentráció-dependens módon (alacsony koncentráció mellett a porcfejlődést, magas koncentráció mellett pedig a csontfejlődést serkenti) [29] [30] [31] [32] [33]. Az FGF-2 segít fenntartani a kondrociták kondrogenikus potenciálját [34], és indukálja a GAG komponensek akkumulációját az ECM-ben [35]. A WNT szignalizációs útvonal képes befolyásolni a β -catenin tér- és időbeli elérhetőségét, amely fontos szabályozó tényező a porc fejlődése alatt. A WNT3A pozitív hatással van a BMP-2 expresszióra a mezenchimális kondenzáció alatt, a

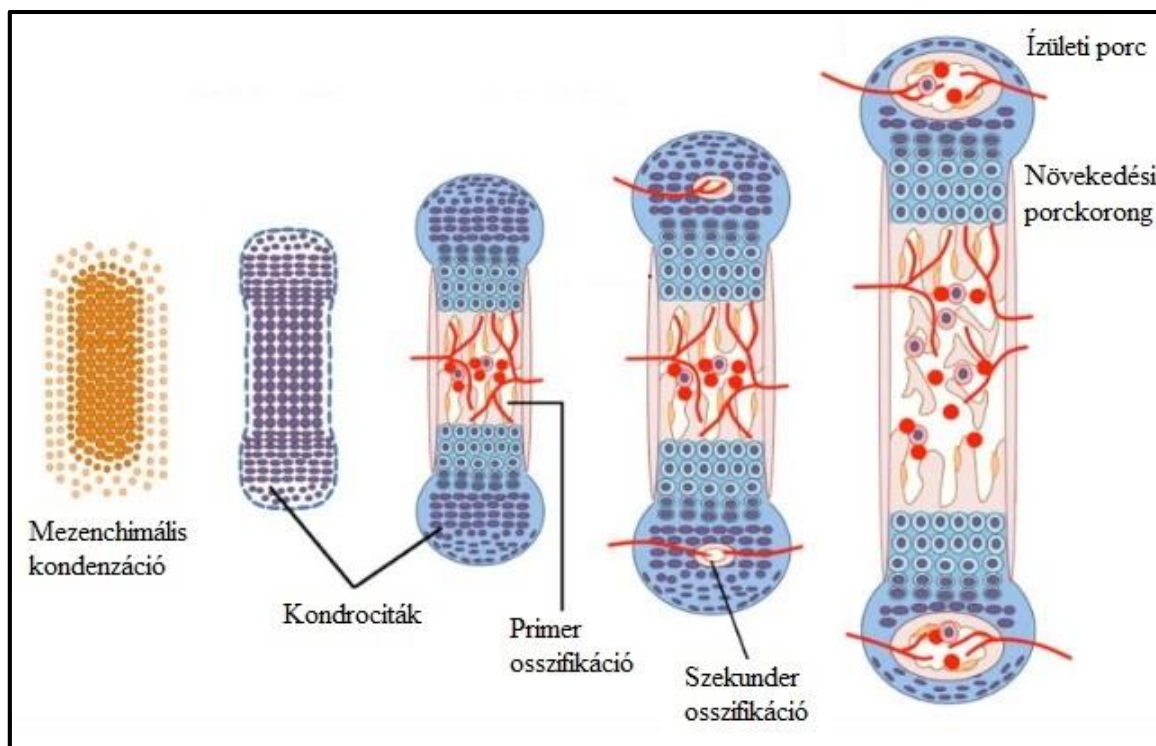
WNT7A és a BMP-2 faktorok szigorú egyensúlya szintén hozzájárul a normális porcfejlődéshez, míg a WNT4 a hipertrófiás átalakulás szabályozásában játszik szerepet [36] [37] [38]. A hipertrófiás átalakuláshoz és az osszifikációs folyamatok kialakításához elengedhetetlen a már korábban említett BMP-2 transzkripciós faktor mellett az oszteoblasztok differenciációját irányító Runt-kapcsolt transzkripciós faktor 2 (*RUNX2*) mestergén. A hipertrófiás sejtek esetében az egyik legfontosabb angiogenikus tényező, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (*VEGF*) erőteljes expressziója is jellemző [39] [40].

A 2.3. ábra bemutatja a porcdifferenciáció teljes folyamatának főbb stádiumait, illetve tartalmazza a szakaszok jellegzetes sejtípusainak és fehérjéinek összefoglalását.



2.3. ábra: A kondrogenézis sematikus folyamatábrája, rajta a fő differenciációs szakaszok, illetve az adott stádiumok jellegzetes sejtípusainak és kifejeződő fehérjéinek felsorolásával. (Forrás: [41], módosítva)

A támasztószövetek fejlődése humán vonatkozásban az embrionális fejlődés 4. hetében kezdődik meg. A gerinces élőlényekben a csontvázrendszer fejlődésének első lépéseként az ektoderma és a mezoderma csíralemezeiből származó multipotens mezenchimális sejtek a test meghatározott területeire vándorolnak, majd kondenzálódnak és elköteleződnek a támasztótípusú szöveti differenciáció irányába, ezáltal megkezdődik az első kondrociták differenciációja (2.4. ábra). A fejlődő végtagtelepek kezdetleges porctelepei az oldallemez mezoderma származékai. A 6. embrionális hétre a végtagkezdeményeken elkülönül a kézfej és lábfej telepe. Az alsó és felső végtagok porcos és csontos elemei azonos mechanizmussal alakulnak ki, azonban az alsó végtag fejlődése nagyjából 1-2 napos lemaradásban követi a felső végtagét. A 6. fejlődési héttől jelennek meg az első hialinporc-templátok a végtagok területén. A következő hetekben a porcos templátokban osszifikációs centrumok jelennek meg, majd az első trimeszter vége felé megindul az alsó és felső végtagok leendő csontos elemeiben az enkondrális osszifikáció. A csontosodás ezen típusa során a porcszövet hipertrófiás sejtjei apoptózissal fokozatosan elpusztulnak, helyükre erek törnek be, melyekkel együtt az elmeszesedett porc mátrix gerendák felszínére települő oszteoprogenitor sejtek érkeznek. Ezek a sejtek még osztódnak, miközben oszteoblasztokká differenciálódnak, melyek a meszes porcgerendák felszínére szerves csontalapállományt (oszteoid) szintetizálnak. Ez a mátrix fog aztán az oszteoblasztok aktív közreműködésével mineralizálódni. A meszes porcszigetek a csont átépülése során fognak végleg eltűnni a csontgerendákból. A születés idejére a hosszú csöves csontok teste teljes mértékben elcsontosodik. Az epifizisek csak átmenetileg őrzik meg a porcszövetet, a születés után nem sokkal ezeken a területeken is megjelennek az osszifikációs centrumok (szekunder osszifikáció). A diafizis és epifizis határán növekedési porckorong marad fent mindaddig, amíg a csont el nem éri a teljes hosszát, ezt követően a lemez eltűnik, és az epifizis összekapcsolódik a diafizissel. Jellegzetes területnek számítanak a csontok között található szinoviális ízületek, ahol a leendő ízületi porc kialakításában részt vevő progenitor sejtek a csontosodási templátként szolgáló hialinporcétól eltérő embrionális sejtpopulációból fejlődnek és a belőlük kialakuló kondrociták fiziológias körülmények között életünk végéig megőrzik porcos fenotípusukat, nem jutnak el a hipertrófiás életfázisig [42] [43].



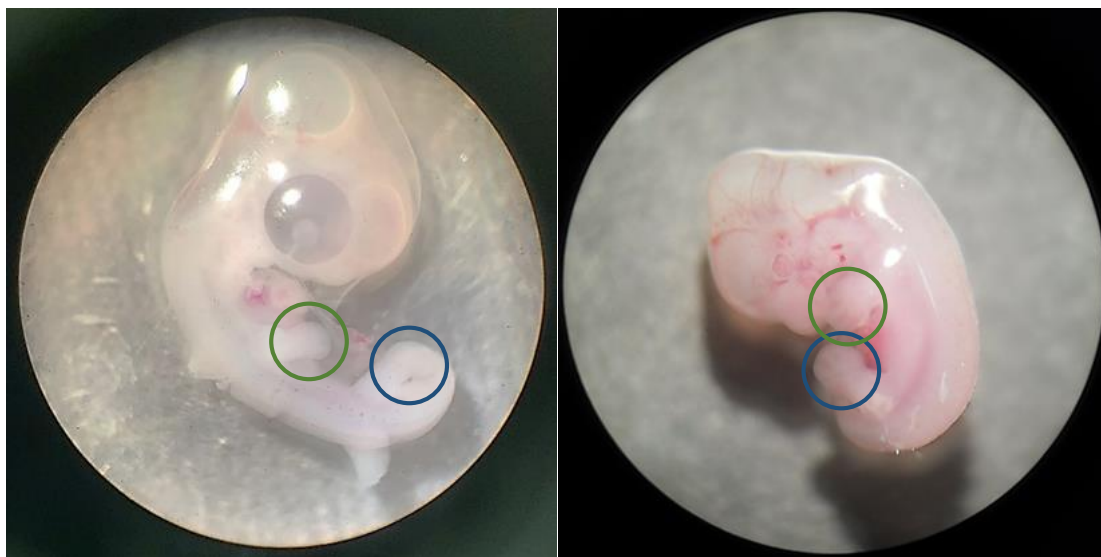
2.4. ábra: Kondrogenézis és endokondrális osszifikáció az embrionális, magzati és posztnatális fejlődés alatt.

A differenciálatlan mezenchimális sejtek meghatározott anatómiai pozíciókban nagy számban aggregálódnak, majd a sejtek kondrogenikus differenciációját követően érett kondrociták töltik ki a fejlődő porceprimordiumot. Később a porcsejtek hipertrófiás átalakulása mellett erek törnek be a porctemplátba, és létrehozzák a primer osszifikációs pontokat, ahol leendő csontsejtek kezdik átvenni a porcsejtek helyét. A magzat születését követően a fejlődő csontok epifízis régióiban is megindul a csont irányú átalakulás a szekunder osszifikációs pontok megjelenésével. A csontok hossznövekedéséért születés után a növekedési porckorong felel. A szomszédos csontok között a hialinporc egy specifikus formáját, az ízületi porcot találjuk. (Forrás: [44], módosítva)

Amint azt az előző bekezdésben olvashattuk, a kondrogenézis folyamata az embrió fejlődésének viszonylag korai szakaszára tehető, ezért az élő szervezeten belül, *in vivo* rendkívül nehéz nyomon követni a porc fejlődési mechanizmusát. Azonban a múlt század második felében a kutatók olyan *in vitro* modelleket hoztak létre, amelyekkel laboratóriumi körülmények között is tanulmányozhatóvá vált a porcdifferenciáció. A modellek nagy előnye, hogy egyszerűen szabályozhatóak, könnyen reprodukálhatóak, létrehozásuk és fenntartásuk nem komplikált, éppen ezért széles körben elfogadottak és használtak a tudományos világban [45] [46] [47].

A primer biológiai modelleket jellemzően csirke- vagy egérembriók (2.5. ábra) végtagtelepeinek felhasználásával hozzák létre. A csirkeembriók fejlettsége a Hamburger-Hamilton-féle rendszer alapján 22-24-es stádiumú, ami nagyjából 4,5 napos embriókat jelöl, míg az egérembrióknak 11,5 napos fejlődési stádiumban kell lenniük [48] [49] [50]. Az embriók

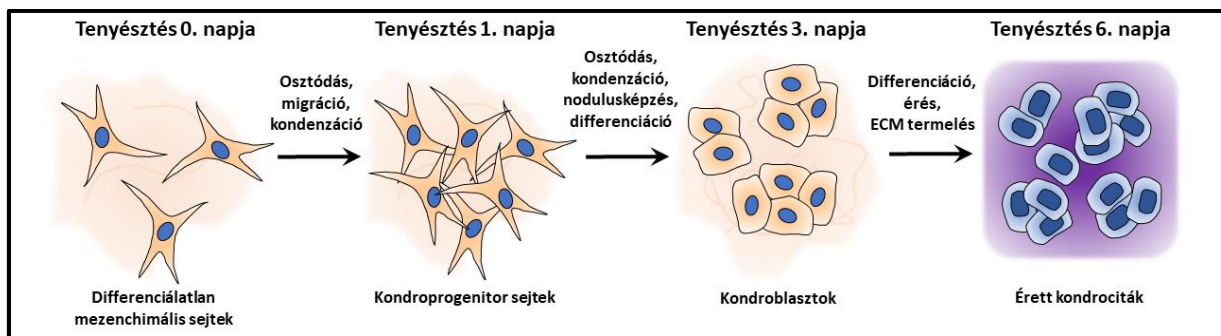
fejlettsége nagyon fontos, ugyanis csak ezeken a fejlődési napokon jár abban a szakaszban a végtagtelepek fejlődése, amikor a mezenchimális sejtek kondenzálódnak, és porcprogenitor sejtekké alakulnak. A végtagtelepekből izolált porcelófutár sejtek nagy sűrűségben való kicseppentésével úgynevezett *high density* (nagy sűrűségű, HD), más szóval *micromass* sejt kultúrákat kapunk, ahol a nagy sejtsűrűség 10-15 millió sejtet jelent milliliterenként [51] [52] [53] [54]. A sejtek kitapadását követően ugyanazok a porcsejt-differenciációs lépések fognak végbemenni, amelyeket már fentebb vázoltam. A modell egyik előnye, hogy a sejt kultúrákban már a 3. tenyésztési napra lezajlik a sejtek végleges elköteleződése a porcfejlődés irányába és innentől kezdve a 6. napig egyre több porcmátrixot termelnek maguk köré. Így viszonylag rövid idő alatt nagy mennyiségű információhoz juthatunk a porcképződés folyamatával kapcsolatban. A porcsejt-differenciáció jól meghatározott időbeli lefutása lehetővé teszi a kondrogenezis különböző differenciációs stádiumokban való manipulálását.



2.5. ábra: A bal oldalon egy 4,5 napos csirkeembrió, a jobb oldalon pedig egy 11,5 napos egérembrió fénymikroszkópos felvétele látható, a tojásból/anyaállatból való kivételt, illetve a különböző maternális és embrionális burkok és hártók eltávolítását követően. A végtagtelepek még intaktak, nem kerültek eltávolításra. A mellső végtagtelepet zöld kör, a hátsó végtagtelepet kék kör jelöli.

A sejtek izolálásának, majd tenyésztőfelületre való kitapadásának napját tekintjük a tenyésztés 0. napjának (2.6. ábra). A 0. és 2. tenyésztési napok között történik a kondroprogenitor sejtek intenzív osztódása, migrációja, és megindul az aggregálódásuk is, amelynek során kialakulnak a jellegzetes preporc-nodulusok. A 3. tenyésztési napra a sejtek alakja egyre kerekesebb formát vesz fel, ekkor már főleg kondroblasztok és kezdetleges kondrociták töltik ki a sejt kultúrát, osztódásuk már nem mutat nagy intenzitást, továbbá

megkezdődik a porcspecifikus ECM komponenseinek termelődése is. A 4. és 6. tenyésztési napok között zajlik az érett porcsejtekre jellemző differenciáció, a HD kultúra a 6. tenyésztési napra főképp érett kondrocitákat fog tartalmazni, emellett a porcsejtek az idő előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségű ECM-et termelnek maguk köré. Érdekesség, hogy a 6. tenyésztési napot követően ezekben a primer porcosodó micromass kultúrákban is megindulnak az enkondrális csontosodásra jellemző biológiai folyamatok: jellemzően a 10-15. tenyésztési napok környékére mineralizáció detektálható az ECM-ben, a porcsejtek molekuláris indikátorai pedig hipertrófiás irányú átalakulást mutatnak.



2.6. ábra: Az *in vitro* porcdifferenciáció lépéseinek sematikus ábrázolása. A sejtek izolálása és tenyésztőfelületre való kitapadása a tenyésztés 0. napján történik. A kondroprogenitor sejtek a 0. és 2. tenyésztési napok között intenzíven osztódnak, migrálnak, és megindul a kondenzáció is, amely hozzájárul a porc-nodulusok kialakulásához. A 3. tenyésztési napra a sejtek alakja kerekdeddé válik, ekkor már főleg kondroblasztokat találunk a kultúrákban, illetve megkezdődik a porcspecifikus ECM komponenseinek termelődése is. A 4. és 6. tenyésztési napok között a sejtek tovább differenciálódnak, a HD kultúra a 6. tenyésztési napra főképp érett kondrocitákat fog tartalmazni, a porcsejtek nagy mennyiségű ECM-et termelnek maguk köré. (Forrás: [55], módosítva)

A primer HD kultúrák eddig felsorolt előnyei mellé érdemes hozzátenni azt is, hogy a porcdifferenciáció létrejöttéhez nincs szükség a tápoldat külön stimuláló adalékszerekkel való kiegészítésére, ugyanis a sejtek a nagy sűrűségben való elhelyezkedés miatt spontán módon fognak átalakulni érett porcsejtekké. Mindazonáltal a primer micromass kultúrák kísérletes alkalmazásakor számolni kell néhány kevésbé előnyös tulajdonsággal is: a kicseppentett mintában a mezenchimális sejtek mellett fibroblasztok, izom vagy hám eredetű sejtek is lehetnek, amelyek bár a tenyésztési napok előrehaladtával nagy valószínűséggel elpusztulnak, először mégis inhomogenitást okoznak a sejt kultúrában. Arról sem szabad megfeledkeznünk, hogy az *in vivo* körülmények között létrejövő összetett biológiai eseményeket általában nem lehet laboratóriumi keretek között tökéletesen rekonstruálni, az *in vitro* micromass modell porcszerkezete nem mutat olyan fejlett struktúráltságot, mint a szervezeten belül fejlődő porctemplátok. További hátránynak számít, hogy a legegyszerűbben használható csirkeembriók evolúciós fejlettségüket tekintve viszonylag távol állnak a humán szervezet tulajdonságaitól,

ennek ellenére a kutatások azt bizonyítják, hogy nagy az átfedés a biológiai folyamataikban, ezáltal van relevanciája a csirkéken végzett kutatásoknak.

A HD kultúrákat különböző mezenchimális jellegű sejtvonal eredetű sejtek felhasználásával is létre lehet hozni, de azok rendszerint csak a tápoldathoz külön adagolandó és a sejtmiliót befolyásoló anyagokkal tarthatók fent, emellett számolni kell az emelkedő passzázsszámok miatt kialakuló fenotípus heterogenitásának változásaival [56]. Ezek a faktorok torzíthatják az ilyen típusú minták vizsgálatából származó kísérleti adatokat. A sejtek differenciációs spektruma szélesebb, ezért nem megfelelő stimuláció hatására akár más differenciációs útvonalat választhatnak, emellett a sejt kultúrákban zajló porcfejlődés gyengébb és lemaradottabb lehet a primer kultúrákhoz képest [52].

Az *in vitro* porcfejlődés során az embrionális végtagtelepekből izolált porcprogenitorok, majd az azokból differenciálódó érett porcsejtek, illetve a sejtek köré termelt porcmátrix tulajdonságai lényegében a hialinporc jellemzőivel mutatnak egyezést, tehát végeredményképpen hialinporcos sejt kultúrák kialakulását tanulmányozzuk. Mivel a hialinporc specifikus változata, az ízületi porc is ugyanilyen mechanizmussal alakul ki, ezért a modell kísérletes alkalmazása különösen indokolt. Általánosan elfogadott álláspont ugyanakkor, hogy a porcdifferenciáció jelátviteli útvonalainak feltárásával többet tudhatunk meg a porcdefektusok kialakulásáról, vagy a megbetegedések gyógyítására irányuló terápiás kísérletek hatékonyságáról [57]. Mindenképpen megjegyzendő, hogy ezekben a primer kultúrákban a porcsejtekben kódolt végső sors a terminális differenciáció lesz, amikor a sejtek hipertrófiás átalakuláson mennek keresztül és a porcmátrix összetételének módosításával, valamint speciális citokinek termelésével lehetővé válik az enkondrális csontosodás elindulása.

2.2. A DNS metiláció

2.2.1. A DNS metiláció mechanizmusának bemutatása

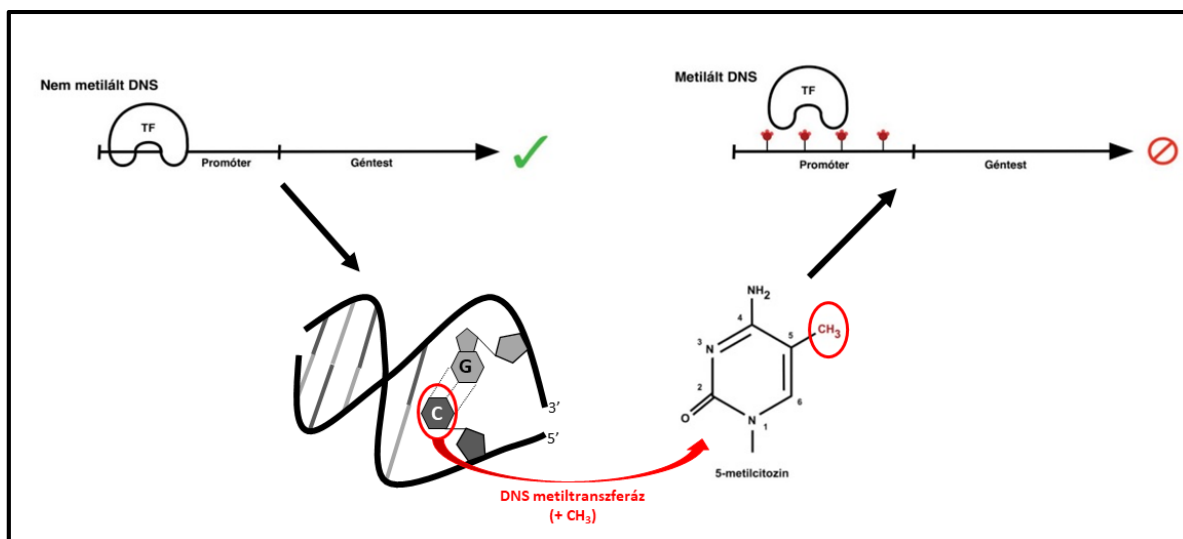
Az epigenetikai szabályozási útvonalak felderítése az utóbbi nagyjából 20 évben kapott egyre nagyobb figyelmet a tudományos világban. Elsősorban a tumorbiológia és daganatterápia terén zajlik intenzív kísérletes kutatás, mindeközben egyre nagyobb számú publikáció válik elérhetővé a fejlődésbiológiai folyamatok vagy a szövetek, szervek patológiás elváltozásainak hátterében álló epigenetikai szabályozásokról is. Mindezek ellenére a porc fejlődésének, illetve

az ízületi porc degenerációjával járó megbetegedéseknek, mint például az OA epigenetikai vonatkozásairól még viszonylag kevés irodalmi adat áll rendelkezésre.

Az epigenetika fogalma alatt olyan öröklődő és reverzibilis génexpressziós módosulásokat értünk, amelyek során nem történik változás a DNS nukleotid szekvenciájában [58]. Egy biológiai szervezet fejlődését, illetve a sejtek differenciációját nem csak a genetikai faktorok, de a környezetből érkező hatások is képesek befolyásolni, ezek az impulzusok pedig változásokat idézhetnek elő a DNS kémiai szerkezetében. Az epigenetikai szabályozó mechanizmusok elengedhetetlenek a sejt-specifikus génexpresszió kialakulásához, és ezen egyedi expressziós mintázatok leánysejtre való átörökítéséhez [59]. Számos biológiai folyamat során töltnek be fontos szerepet, legyen szó az embrió fejlődéséről, a felnőtt sejtek megújulásáról, a genomiális imprintingről, az öregedésről, vagy az X-kromoszóma inaktivációról [60]. Ezen folyamatok elsődleges célpontja a DNS-hisztón komplex, másnéven kromatin. Egy meghatározott DNS-szakasz elérhetősége a transzkripciós faktorok számára gyakran kromatin-szintű szabályozási folyamatoktól függ. Ezen folyamatok tulajdonságait tekintve három fő csoportot különíthetünk el: a DNS metilációt, a hisztón módosításokat, illetve a nem-kódoló RNS-ek csoportjába tartozó mikroRNS-ek által előidézett poszttranszkripciós módosításokat [61]. A legtöbb folyamat a génexpressziós aktivitást kovalens módosítások által változtatja meg, ennek eredményeképpen átalakul a kromatin struktúrája: létrejöhet egy tömörebb, kondenzáltabb kromatin szerkezet, ebben az esetben a promóter régiók inaktív állapotba kerülnek, a transzkripciós faktorok nem tudnak kapcsolatba kerülni kötődési helyeikkel, a génexpresszió lecsökken vagy teljesen gátolt állapotba kerül; másrésztől kialakulhat egy lazább, relaxáltabb struktúra is, ahol az adott DNS-szakaszon található promóterek hozzáférhetővé válnak a transzkripciós faktorok számára, ezáltal bizonyos gének kifejeződési szintje megemelkedik. Az epigenetikai folyamatok diszregulációja akár daganatok, autoimmun betegségek, vagy neurológiai rendellenességek kialakulásához is vezethet [62] [63].

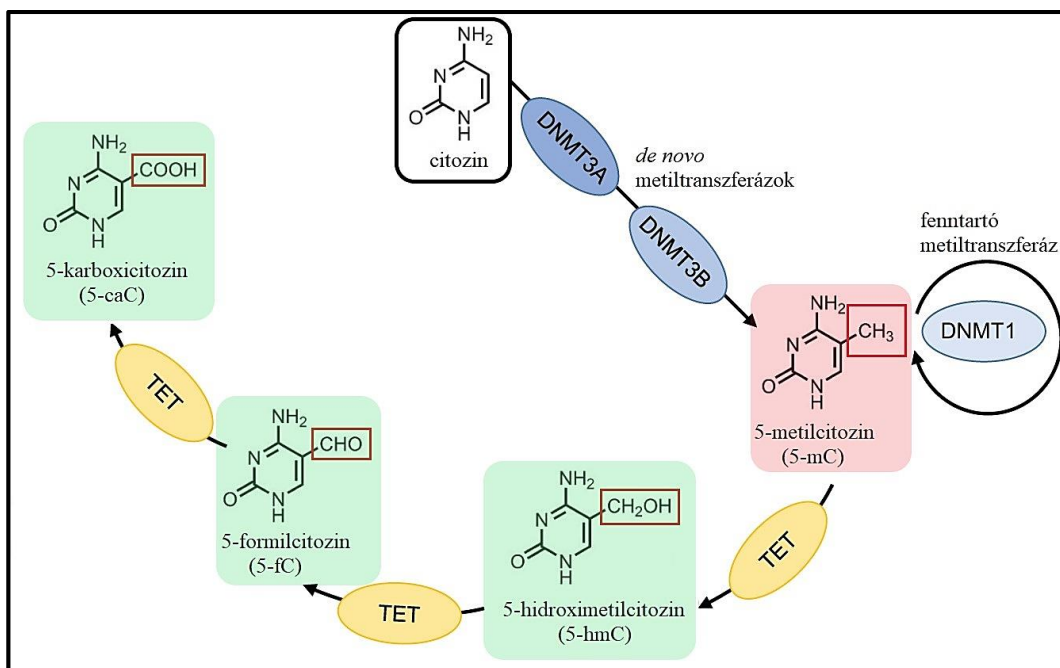
Kutatásunk során a három fő szabályozási csoport közül a DNS metiláció szerepét vizsgáltuk mélyrehatóbban. A DNS metilációjával járó epigenetikai módosító mechanizmus az esetek egy részében gátolja a transzkripciós aktivitást, azaz génrepressziót vagy géncsendesítést eredményez. Az élővilágban 3 metilált bázismódosulás fordul elő a leggyakrabban, ezek a 6-metiladenin, 4-metilcitozin, és az 5-metilcitozin. Vizsgálataink szempontjából az 5-metilcitozin módosulás számított a legrelevánsabbnak, ugyanis az eukarióta szervezetekben és főleg a gerinces élőlényekben egyedül ez az egy metilációs változat alakult ki és maradt fent az

evolúció során [64]. A DNS metilációja alkalmával az S-adenozil-metionin ubikviter donor szubsztrátról egy metil csoport helyeződik át a DNS citozin-gyűrűjében található 5-ös szénatomra, az újonnan keletkező egységet nevezzük 5-metilcitozinnak (5-mC). Ez a folyamat az adott genomi régió hipermetilációjához, és a régióban található gének transzkripció inaktivitásához vezet [65], mint ahogy azt a 2.7. ábrán láthatjuk összefoglalva. Az 5-mC kialakulását úgynevezett DNS metiltranszferázok (DNMT) katalizálják, melyeket két nagyobb csoportra oszthatunk az enzimatis aktivitásuk alapján. A DNMT3A és a DNMT3B úgynevezett *de novo* metiltranszferázok, és az ontogenezis vagy egyedfejlődés folyamata alatt az új metilációs mintázatok kialakításáért felelősek. Ezzel szemben a DNMT1 enzim szerepe az, hogy a már meglévő metilációs motívumok átörökítődjenek a DNS replikáció és sejtosztódás során a leánysejtekre, ezáltal a DNMT1 fenntartó fehérjeként van számontartva [66]. Az 5-mC módosulás leggyakrabban a gének promóter régiójában fordul elő, ugyanis ezeken a genomi területeken nagy számban fordulnak elő úgynevezett CpG-szigetek. Ezek a DNS szakaszok jellemzően CpG-dinukleotidokban gazdagok, ahol a CpG egy 5'→3' irányban elhelyezkedő citozin-foszfát-guanin komplexet jelöl. Tehát ha egy adott gén promóter régiójának CpG-szigeteiben 5-mC típusú epigenetikai átalakulás megy végbe, az megakadályozza, hogy a transzkripció faktorok kapcsolódhassanak kötődési helyeikhez, így arról a szakasról nem történik génátírás [67]. Fontos azonban megemlíteni, hogy a metiláció nem minden esetben okoz represszív módosítást: a transzkripció start ponttól való távolság, illetve a promóter régiókban található CpG-szigetek mennyisége és sűrűsége befolyásolhatja a metiláció gátló vagy serkentő hatását [68]. A DNS metiláció másik jellegzetes tulajdonsága, hogy rendkívül dinamikus folyamatot takar: mivel a módosítás reverzibilis, ezért a környezeti adottságoktól függően akár rövid időn belül eliminálódhat a transzkripció aktivitást befolyásoló metil csoport [69].



2.7. ábra: A DNS metiláció folyamatának vázlatos bemutatása. Ha egy gén promóter régiójának számító DNS szakaszon nem történik metiláció, ebben az esetben a transzkripciós faktor (TF) képes kötödni a promóterhez, a transzkripció és a gén expressziója aktív. Ha azonban a DNS metilációja során egy DNS metiltransferáz enzim közvetítésével metil csoport (CH_3) helyeződik a citozin gyűrű (C) 5-ös szénatomjához, a folyamat eredményeképpen 5-metilcitozin jön létre. Ez a hipermetilációval járó módosulás megakadályozza, hogy a transzkripciós faktor kapcsolódhasson a promóter régióban lévő kötődési helyéhez, így a transzkripció és a gén expressziója inaktív, gátolt lesz. (Forrás: [70], módosítva)

A differenciált, azaz morfológiailag és funkcionálisan specializált sejtek megőrzik az egyedi DNS metilációs tulajdonságaikat, így fenntartva a kialakult fenotípust. Azonban az egyedfejlődés során az éretlen, differenciálódó sejtek fejlődési potenciálja módosulhat a demetiláló faktorok révén [71]. A DNS demetilációs folyamatokért a TET (ten-eleven translocation) metilcitozin dioxigenáz enzimsaládba tartozó fehérjék felelnek, nevezetesen a TET1, TET2 és TET3 [72]. A TET enzimek az 5-ös szénatomon található metilcsoportot oxidálják, ezáltal 5-hidroximetilcitozin (5-hmC) jön létre, ezt pedig képesek tovább oxidálni 5-formilcitozinná (5-fC), vagy 5-karboxicitozinná (5-caC) (2.8. ábra). A demetiláló fehérjék tehát képesek megfordítani a DNMT-k hatását, eliminálják a metilációt, ezáltal hipometilációt idéznek elő [73] [74].



2.8. ábra: A DNS metiláció és demetiláció sematikus folyamatábrája. A DNS metilációját DNS metiltransferázok (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) katalizálják, melynek során a citozin-gyűrűben található 5-ös szénatomra egy metil csoport (CH₃) helyeződik, a folyamat végén 5-metilcitozin képződik (5-mC). Az 5-mC módosulás gátolja a gének aktivitását, a transzkripció gátolt, ezt piros háttérkiemelés jelzi. A DNS demetilációját a TET fehérjék idézik elő, melyek az 5-ös szénatomon található metilcsoportot oxidálják, így 5-hidroximetilcitozin (5-hmC) jön létre, majd további oxidációk által 5-formilcitozin (5-fC), és 5-karboxicitozin (5-caC) alakulhat ki. A folyamat hozzájárul a metilációs mintázat törléséhez, és a transzkripció aktiválódásához (zöld háttérkiemelés). (Forrás: [75], módosítva)

Az utóbbi évek kutatásai arra is felhívták a figyelmet, hogy a TET fehérjék közvetlen interakcióba léphetnek az O-típusú-N-acetilglükózamin (O-GlcNAc) transferázzal, azaz OGT-vel, amely az O-GlcNAc-ációs poszttranszlációs módosulás kialakulásáért felel. Az O-GlcNAc-ációs módosítást elsősorban a glükóz metabolizmusában, illetve az ezzel kapcsolatos kóros elváltozások (pl. diabétesz mellitusz) kialakulásában írták le részletesen [76] [77]. Ez a poszttranszlációs módosulás elősegíti a demetiláló faktorok fehérjeszintjének stabilizálását [78], emellett a TET-OGT komplexek hozzájárulnak a metilálatlan CpG-gazdag DNS régiók fenntartásához is [79]. Az OGT továbbá képes szabályozni a TET enzimek biológiai aktivitását. A TET1-OGT komplex jelentős szereppel bír az egyedfejlődés során: mutáns zebraembriók fejlődésének vizsgálata során kimutatták, hogy a TET1 és OGT megfelelő interakciója elengedhetetlen a vérképző őssejtek létrejöttéhez [80]. Szintén ebben a tanulmányban igazolták azt is, hogy az egér embrionális őssejtekben a TET1-OGT nem megfelelő kölcsönhatása emelkedett TET2 expressziós aktivitáshoz és csökkent 5-mC szinthez vezetett, amely számos más gén expressziós mintázatára is hatással volt.

A DNS metiltranszferázok, a demetiláló faktorok, vagy éppen az *Ogt* embrionális korban való génszintű kiütése sok esetben letális következményekkel jár: az embrió akár már a prenatális időszak alatt, vagy legkésőbb a születést követő első néhány hétben elpusztulhat [81] [82] [83] [84]. Ezek az adatok is alátámasztják a DNS metiláció és az abban részt vevő faktorok esszenciális szerepét az egyed fejlődése, illetve a szervezet megfelelő homeosztázisának fenntartása szempontjából.

2.2.2. A porc, a porcfejlődés és a DNS metiláció kapcsolata

A porc fejlődése, illetve a fiziológias szerkezetű és működésű porc fenntartása során alapvető fontossággal bírnak az epigenetikai szintű szabályozó mechanizmusok. Habár a DNS metiláció és a porc kapcsolatáról már számos publikációt találhatunk az irodalmi adatbázisokban, a kísérletes adatok túlnyomó többsége a porc degenerációjával járó megbetegedések metilációs mintázatát mutatja be. A kondrogenézis, különösképpen a porcprogenitor sejtek elköteleződése és a porcsejtek differenciációja alatt jellemző metilációs aktivitásról még kevés információ áll rendelkezésre.

Újszülött egerek bordaporcából izolált porcsejtek *in vitro* körülmények közötti sejtenyésztese és érése során már sikerült leírni a *Dnmt1*, *Dnmt3a* és *Dnmt3b* RNS szintű expresszióját [85]. A 21 napig fenntartott porcsejt-kultúrák egy részét genetikai módosításon átesett egér újszülöttekből hozták létre, ugyanis kondicionális kiütésre került a *Dnmt3b* átírásáért felelős génszakasz, méghozzá specifikusan a kondrogenikus differenciációban érintett sejtekben. A vizsgálatok során megállapították, hogy a *Dnmt3b* csendesítése, azaz a génexpressziós aktivitásának erőteljes csökkenése mellett a primer kondrocita sejt-kultúrák hipertrófiás átalakulása mérséklődött, tehát a normál *Dnmt3b* expresszió létfontosságú a porcsejtek hipertrófiás érési folyamataihoz, ezáltal az enkondrális osszifikáció létrejöttéhez. A lecsökkent DNMT expresszió eredményeként a 14,5 és 18,5 napos egérembriók teljes csontvázrendszere kisebb lett, illetve a végtagok csontváz-elemei is szignifikánsan rövidebbek voltak. Érdekes módon a porcszövet morfológiájában és a porcfejlődés proliferációs szakaszában nem tapasztaltak jelentős eltéréseket sem makroszkópikus, sem molekuláris szinten. Hasonló eredményekről számoltak be egy másik tanulmányban is, ahol szintén genetikailag módosított egereket alkalmaztak modellként, ebben az esetben is *Dnmt3b* kiütést idéztek elő a kondrogenikusan differenciálódó sejtekben [86]. A 8-10 hetes egerek tibiáját laboratóriumi körülmények között roncsolták, hogy a későbbiekben megvizsgálhassák a

csonttörés gyógyulási folyamatát a kontroll, illetve a génmódosított egerekben. Eredményeik alapján kijelentették, hogy a *Dnmt3b* funkcióvesztés következtében a csont törésének gyógyulása hosszabb időt vett igénybe, és a csontok biomechanikai jellemzői is elmaradtak a kontrollhoz viszonyítva. Összességében a szerzők ebben a tanulmányban is arra a következtetésre jutottak, hogy a *Dnmt3b* funkcionális megléte létfontosságú a megfelelő endokrinális csontosodási folyamatok megvalósulásához.

A DNS demetilációját katalizáló TET enzimek porc szövetben való specifikus expressziója szintén bizonyításra került korábbi kutatások eredményei alapján. Többek között primer humán kondrocitákban [87], ATDC5 sejtvonal eredetű kondroprogenitor sejtekben [88], vagy teljes egérembriókból készült metszeteken [89] is sikeresen kimutatták a TET1, TET2 és TET3 enzimek RNS vagy fehérje szintű kifejeződését. A porc fejlődésével kapcsolatos vizsgálatok szempontjából a TET1 enzim részletesebb analízise tűnik a legrelevánsabbnak. Bár az emlős embrionális fejlődés során mindhárom TET enzim expresszióját sikerült azonosítani, azonban az expressziós maximumok ideje mindhárom variáns esetében különbözött a differenciálódó hialinporc területén [89]. A TET2 enzim már a porc fejlődésének kezdeti lépései előtt is jelentős expressziót mutatott, ez a magas expresszió egészen az osszifikációs átalakulásig megmaradt; a TET3 ezzel szemben csupán az oszteogénikus differenciáció folyamata alatt, a csont mátrixában indikált erőteljes expressziós növekedést immunhisztokémiai vizsgálattal. A TET1 enzim volt az egyedüli, amely csak az embrionális porc fejlődése alatt mutatott szignifikáns expressziós növekedést, ez tehát arra utal, hogy a három enzim közül valószínűleg elsősorban a TET1 demetiláló funkciója állhat kapcsolatban a kondrogenézis folyamatával. Az ATDC5 alapú porcosodó kultúrákban *Tet1* géncsendesítést idéztek elő, majd megvizsgálták a porcfejlődés folyamatában jelentkező változásokat [88]. A *Tet1* downregulációját követően csökkenést tapasztaltak a porc-nodulusok kialakulásának mértékében, illetve a GAG-specifikus alciankék szövettani festődés is gyengébbnek mutatkozott a kontroll kultúrákhoz viszonyítva. Összességében tehát kijelentették, hogy a *Tet1* funkciójának csökkenése negatív hatással volt a kondrogenikus differenciációra.

Az OGT, illetve az O-GlcNAciláció porcban betöltött szerepéről egyelőre rendkívül kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Kutatócsoportunk volt az első, amely primer porcosodó micromass kultúrákban vizsgálta az *Ogt* génszintű expressziós mintázatát a porcképződés folyamata során [90]. Mások azt találták, hogy az ATDC5 sejtvonal eredetű sejtek kondrogenikus differenciációja során a hipertrófiás átalakulás alatt (ahol a *Col10a1*, az *Alp*, és a *Runx2* oszteogénikus és hipertrófiás markerek génexpressziós szintje megemelkedett)

bizonyítottan megnőtt a poszttranszlációs módosítás mértéke [91]. A tanulmányban továbbá azt is leírták, hogy az acetilált fehérjék mennyiségének megemelkedése a hipertrófiás gének szignifikáns expressziós növekedése előtt következett be. Egészséges humán térdízületi porcából származó mintákban szintén kimutatták az OGT fehérje szintű expresszióját és az acetilációs poszttranszlációs módosítás meglétét [92].

A metiláló és demetiláló faktorok expressziós mintázata mellett fontos azt is megvizsgálni, hogy a porc fejlődését és érését irányító vagy befolyásoló markergének kifejeződésére milyen hatással van az epigenetikai szabályozás, a porc különböző fejlődési szakaszaiban hogyan változik a porcspecifikus gének promóter régióinak metiláltsága. A kondrociták differenciációjának korai szakasza alatt számos transzkripciós faktor tölt be szabályozó szerepet. A SOX9 a kondrogenézis mester transzkripciós faktorának számít, többek között a porc ECM markereinek génexpresszióját is a SOX9 szabályozza [28]. Humán színóvium eredetű mezenchimális őssejtek *in vitro* kondrogenikus differenciációja során a SOX9 promóter régiójában hipometiláltságot mutattak ki mind a porcfejlődés kezdetén, mind pedig a differenciációs állapot előrehaladtával a sejtek érése során [93]. A hipometiláció tehát azt jelenti, hogy a SOX9 gén promótere nem metilált állapotú, ez pedig lehetővé teszi, hogy a porcfejlődés alatt a SOX9 fokozott génaktivitást mutasson. A RUNX2 oszteogenikus fő transzkripciós faktor, hasonlóan a SOX9-hez, szintén hipometilációt mutatott a porcdifferenciáció teljes folyamata alatt. Egy másik tanulmányban 16 napos csirkeembriókból származó mintákat vizsgáltak, ahol a porc ECM egyik jellegzetes markere, a COL2A1 promótere a szegycsontból izolált kondrocitákban hipometilációt, míg például az izolált fibroblasztokban hipermetilációt jelzett [94].

Az utóbbi évek fejlődő molekuláris biológiai módszertani repertoárja azt is lehetővé tette, hogy részletesebb és pontosabb kép alakuljon ki a porcmarkerek és a DNS metilációs markergének közvetlen kapcsolatáról. Hamburger-Hamilton 22-24-stádiumú csirkeembriók fejlődő végtagtelepeinek vizsgálatakor megállapították, hogy a bennük található mezenchimális sejtek különböző differenciációs irányokat követtek, még hozzá pozíciójuktól függően: csupán a végtagbimbó belsejében elhelyezkedő sejtek differenciálódtak kondrogenikus irányban, a periférián lévő mezenchimális sejtek nem porcsejteké fejlődtek tovább [95]. A génexpressziós szintek elemzését követően arra jutottak, hogy a SOX9 markergén csak a végtagtelep központi területén elhelyezkedő mezenchimális sejteiben aktiválódik, ugyanis ezekben a sejtekben az FGF jelátviteli útvonalán keresztül a DNMT3A által indukált promóter-metiláció gátlódik, ezáltal megindulhat a porc fejlődése. Ezzel szemben a perifériás mezenchimális sejtekben a

WNT szignalizációs útvonal irreverzibilis géncsendesítést okoz többek között a *SOX9* esetében is, méghozzá a DNMT3A metiláló hatásának stimulálásával. Egy másik tanulmányban az ATDC5 eredetű kondroprogenitor sejtek *in vitro* porcdifferenciációja során *Tet1* géncsendesítést idéztek elő, és megfigyelték, hogy a demetiláló faktor csökkent kifejeződése hogyan befolyásolja a porc fejlődését [96]. A kondrogenézis folyamata zavart szenvedett, a sejt kultúrák extracelluláris mátrixa csökkent GAG-termelődést mutatott, illetve számos markergén, többek között az ECM-specifikus *Col2a1* és *Acan* génexpressziója is mérséklődött. Érdekesség, hogy míg a transzkriptomikai analízis alapján a downregulált gének több mint fele a *SOX9* transzkripció faktor befolyása alatt állt, addig a *SOX9* expressziós szintjében nem tapasztaltak szignifikáns változást.

A differenciálódó és az érett porcsejtekben működő epigenetikai mechanizmusok pontos megismerése rendkívül fontos lehet a későbbiekben, legfőképpen a kóros elváltozások, így például a porcdefektusok gyógyítása szempontjából. OA-ban szenvedő páciensek porcmináiban a *SOX9* promóter régiója emelkedett metilációs szintet mutatott, ami hozzájárult a transzkripció faktor, illetve az annak szabályozási körébe tartozó gének (mint például a *COL2A1* vagy *ACAN*) szignifikáns mértékben lecsökkent expressziójához [97]. Az egészséges hialinporcban alacsony szinten expresszálódó mátrix metalloproteinázokat írtak le, hiszen ezek az enzimek felelnek az ECM jellegzetes fehérjéinek lebontásáért. OA következtében azonban az MMP-k promóter régióinak metiláltsága lecsökkent, így a gének upregulálódtak, és fokozott mértékben expresszálódtak, ez pedig az ECM kóros degradációjához vezetett [98]. Ugyanezt az upregulációs mechanizmust írták le az aggregán lebontásáért felelős *ADAMTS4* gén (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 4) esetében is [99]. Az OA egyik jellegzetes biológiai jellemzője, hogy a kondrociták egyfajta gyulladásos mikrokörnyezetben találhatóak, melynek kialakulásához az interleukin 1 béta (*IL1β*) gén aktiválódása és fokozott kifejeződése is hozzájárul, méghozzá a promóter régiójában kialakult demetilációnak köszönhetően [100] [101].

A DNS metiláció a jövőben ígéretes terápiás célpont lehet a porcdefektusok gyógyítása során [102]. Az epigenetikai módosítás biológiai hátterének pontos feltérképezése mellett annak befolyásolhatósága is részletes megismerést igényel. Természetes vagy mesterségesen létrehozott farmakonok alkalmazásával elérhetővé válhatna az orvosok számára, hogy a gyógykezelés szempontjából a lehető legmegfelelőbb metilációs mintázatot idézzék elő a célsejtekben és szövetekben. Számos kezelőanyagot teszteltek már az évek során, a legintenzívebb kutatás a daganatos megbetegedések gyógyításával kapcsolatban zajlik [103].

Az 5-azacitidin (5-azaC) egyike azon kémiai vegyületeknek, amely képes módosítani a DNS metilációval járó epigenetikai folyamatokat: a citidin nukleozid analójaként működve reverzibilis módon gátolja a DNMT enzimeket [104]. Kémiai felépítésére az jellemző, hogy a pirimidin gyűrű 5-ös szénatomján egy extra nitrogén atom található, ez a módosítás pedig hozzájárul a citozin metilációjának gátlásához, méghozzá a DNMT-k kovalens megkötésével [105]. Az 5-azaC egy potenciális mutagén és antitumor hatású ágens, kemoterápiás kezelőanyagként alkalmazva már ígéretes eredményeket értek el a daganatterápiás kutatások és kezelések terén [106]. Az Amerikai Egyesült Államokban 2004-ben, az Európai Unióban pedig 2007-ben került törzskönyvezésre az azacitidin, mint a mielodiszplázias szindrómák összes altípusának kezelésére alkalmas gyógyszer [107] [108]. Felnőtt egerekből izolált csontvelő eredetű mezenchimális őssejtek differenciáltatása során az 5-azaC kezelés hatására stimulálódott a sejtek oszteogenikus irányú elköteleződése és érése, tehát a szer lehetővé teheti az őssejtek differenciációjának célzott kontrollját [109]. Egy friss kutatás alapján az 5-azaC terápiás szerként szolgálhat a reumatoid arthritis kezelésében: proteoglikán-indukált artritist idéztek elő a kísérleti egerekben, majd az 5-azaC intraperitoneális úton történt beadását követően azt tapasztalták, hogy az ízületi gyulladás mértéke, illetve a betegség súlyossága és előrehaladottsága szignifikánsan lecsökkent a kezelés hatására [110]. Habár az epigenetikai folyamatok módosítása, mint terápiás lehetőség igen ígéretes az ízületi betegségek kapcsán [111] [112] [113], a kondrogenézis korai szakasza és a kondrociták differenciációja alatt jelentkező DNS metilációs mintázat megismerése még számos kérdést vet fel, melyeknek megválaszolása a jövő kutatási feladatai közé tartozik.

2.3. A cirkadián óra

2.3.1. A molekuláris cirkadián óra általános jellemzői

Az élő szervezetek egyik különleges sajátossága, hogy a bennük zajló anyagcserefolyamatok, élettani események, vagy éppen a viselkedésbeli aktivitások mind ciklikus változásokon mennek keresztül a nap folyamán. Ezt a periodikus biológiai szabályozó mechanizmust cirkadián ritmusnak nevezzük, ugyanis a változások egy nagyjából 24 órás időtartamú, azaz cirkadián oszcillációt mutatnak. A belső, vagy endogén cirkadián ritmus hozzájárul ahhoz, hogy a szervezet alkalmazkodni tudjon a napszakonként változó környezeti viszonyokhoz. A ritmus kialakításához elengedhetetlen egy speciális intrinsic időmérő egység jelenléte, amelyet biológiai vagy cirkadián órának nevezünk. A környezeti stimulusok random

módosulása káros hatással lehet a biológiai órák, és így a komplett cirkadián ritmus működésére. A cigarettázás, a túlzott alkoholfogyasztás, az alacsony fizikai aktivitás, a rossz minőségű alvás vagy az éjszakai műszakkal járó ébrenlét mind hozzájárulhat a cirkadián ritmus felborulásához és az óra széteséséhez, összességében pedig úgynevezett kronodiszrupcióhoz vezetnek [114].

Az emlősök molekuláris cirkadián órarendszerét számos oszcillátor befolyásolja. A fő irányító egység a központi idegrendszeri autonóm órában jön létre, amely a hipotalamusz szuprakiazmatikus magjában található. Ez a központi ritmusgenerátor neuronális kapcsolatban áll a retinával [115], és a kívülről érkező ingerek (másnéven zeitgeber-ek, melyek közül kiváltképp fontos a fény stimulus) feldolgozása mellett képes interakcióba lépni a szervezet perifériáján elhelyezkedő órarendszerekkel. Ezáltal a test szöveteiben elhelyezkedő sejtekhez is érkeznek jelek a ritmicitással kapcsolatban, és egyfajta szinkronizációs mechanizmus alakul ki a központi és a periférás szövetek biológiai órái között [116] [117]. Ezek az endogén, sejt-autonóm, önfenntartó, periférián elhelyezkedő órák esszenciális szereppel bírnak a humán szervezet külső ingerekre adott molekuláris szintű válaszadásának és az alkalmazkodóképességének szabályozásában, amely többek között az alvás-ébrenlét, az energia-metabolizmus, a testhőmérséklet, vagy éppen a hormonális ciklusok évszaknak megfelelő napi alakításában teljesedik ki [118]. Ezek az adatok tehát azt támasztják alá, hogy egy komplex szervezet ciklikus aktivitását a központi cirkadián ritmust szabályozó hipotalamikus neuronhálózat fogja meghatározni, azonban minden szervnek, szövetnek megvan a saját működési ritmusa, melyeknek finomhangolását a központi óra végzi. A szerveken, szöveteken belül az egyes sejteknek is van saját molekuláris órája, a szövetek fiziológias működéséhez ezeknek összehangoltan kell működniük.

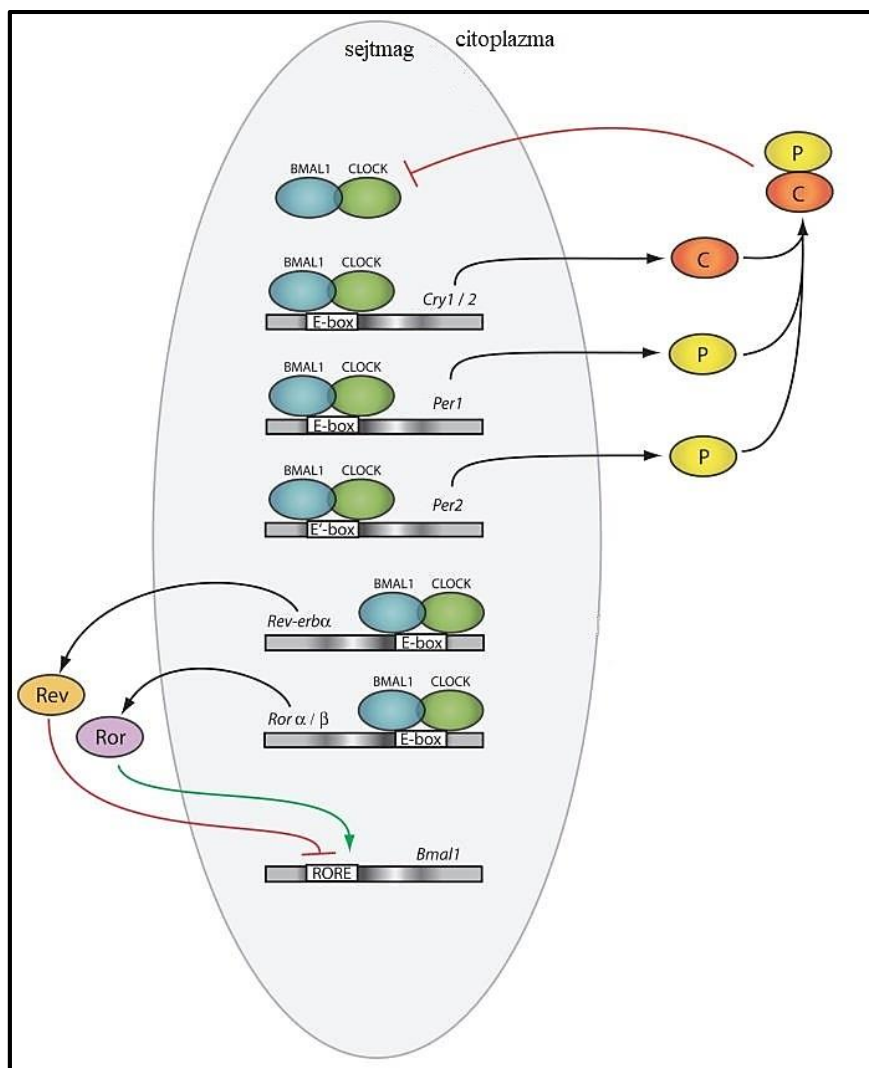
A molekuláris óra működési mechanizmusáról és szabályozó résztvevőiről ma már számos tudományos publikáció áll rendelkezésünkre, az utóbbi évek egyik legnépszerűbb kutatási témájává nőtte ki magát [119] [120] [121]. A jelenség fontosságát egyértelműen hangsúlyozza, hogy 2017-ben Michael W. Young, Michael Rosbash és Jeffrey C. Hall kutatók nyerték el az Élettani és Orvostudományi Nobel-díjat, méghozzá a cirkadián ritmust szabályozó molekuláris mechanizmus felfedezéséért [122].

A molekuláris biológiai óra központi oszcillátorát a transzkripció-transzlációs visszacsatolási hurok (TTFL) irányítja. A mechanizmus alapja az, hogy a 24 órás periódus alatt bizonyos fehérjék képesek saját termelődésükre negatívan, azaz gátlólag visszahatni, ha elérnek egy bizonyos koncentrációt a sejtben. Ennek alapján megkülönböztethetünk pozitív és negatív

visszacsatolási faktorokat, amelyek szoros együttműködési kapcsolatban állnak egymással [123].

A pozitív szabályozó BMAL1 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like ARNTL/BMAL1) és CLOCK (circadian locomotor output cycle kaput) heterodimere irányítja a negatív komponens PERIOD (*PER1*, *PER2*, *PER3*) és CRYPTOCHROME (*CRY1*, *CRY2*) ritmikus transzkripcióját. A CLOCK/BMAL1 komplex kapcsolódik a *PER/CRY* gének promótereiben található E-box régióhoz, ezáltal aktiválódik a negatív komponensek génexpressziója és átírása [124]. Miután a PER és CRY fehérjék transzlációja elér egy kritikus szintet, kapcsolódnak a pozitív szabályozó faktorok komplexéhez, ennél fogva gátolják a *CLOCK/BMAL1* és így önmaguk transzkripciós aktivitását is [125]. A *BMAL1* és a *CLOCK* gének jellemzően a reggeli órákban dimerizálnak a sejtmagban, majd a negatív elemek transzkripciójának serkentését követően napközben a *PER* és *CRY* mRNS-ekről a citoplazmában történik meg a fehérjék összeszerelődése. Miután a PER/CRY fehérjék kellőképpen magas szintet érnek el, a fehérjék heterodimert formálnak, és este a sejtmagba visszajutva, illetve a *CLOCK/BMAL1* komplexhez kapcsolódva kifejtik transzkripciós szintű gátló hatásukat.

A cirkadián óra stabilizálásában és a pozitív/negatív faktorok szabályozásában fontos szereppel bírnak a REV-ERB (nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 [NR1D2/REV-ERB]) és ROR (retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor) családok sejtmagi receptorai. A CLOCK/BMAL1 komplex stimulálja a két sejtmagi receptor transzkripciós aktivitását, majd a sejtmagba visszajutó aktív REV-ERB és ROR fehérjék versengenek a *BMAL1* promóterében található RORE (retinoic-acid-related orphan receptor response element) kötőhelyéért. A REV-ERB bekötődésének esetében negatív, a ROR kapcsolódásakor pedig pozitív visszacsatolás történik a *BMAL1* kifejeződésének irányába [126] [127]. Ennek a folyamatnak a finomhangolásában vesz részt a PER2 fehérje, amely a REV-ERB α -val társulva képes szinkronizálni a TTFL pozitív és negatív faktorait [128]. A molekuláris óra eddig bemutatott komponenseinek interakcióját és működését a 2.9. ábra foglalja össze.



2.9. ábra: Sematikus ábra a cirkadián óra fő molekuláris komponenseinek működéséről. A szabályozó faktorok transzkripciós-transzlációs visszacsatolási hurkokat hoznak létre. A pozitív szabályozó BMAL1/CLOCK heterodimer kötődik a negatív szabályozógének promóterében lévő E-box szakaszához, ezzel fokozza a *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2* gének transzkripcióját majd transzlációját (P: PERIOD fehérjék, C: CRYPTOCHROME fehérjék) a citoplazmában. A fehérjék a sejtmagba visszajutva gátolják a pozitív faktorok mRNS szintézisét. A BMAL1/CLOCK komplex szintén az E-box promóter-régióin keresztül serkenti a Rev-erba és a Rora/β stabilizáló faktorok transzkripcióját, ezáltal a fehérjék szintézise is megemelkedik a citoplazmatikus térben. A sejtmagba visszajutó fehérjék interakcióba lépnek a *Bmal1* válasz régiójával (RORE), de csak az egyik fehérje kötődhet sikeresen. A Rev fehérjék kapcsolódásakor gátló, a Ror fehérjék esetében pedig serkentő visszacsatolás történik a *Bmal1* expresszió irányába. (Forrás: [129], módosítva)

A visszacsatolási hurkok résztvevőinek stabil expresszióját poszttranszlációs módosítások is segíthetik. A citoplazmában található PER/CRY fehérjék a CK1E és CK1D kazein kinázok hatására foszforilálódnak, ezt követi a fehérjék akkumulációja és transzportja a sejtmagba, ahol komplex alkotva gátolják a *BMAL1* expressziót. A kazein kinázok végső soron az óra sebességének regulálásában vesznek részt, a foszforilációs mechanizmusuk révén képesek megrövidíteni a periódusidőket. Emellett ma már az is bizonyításra került, hogy a CK1E és CK1D kinázok jelentős farmakológiai célpontok lehetnek, fontos szerepet töltenek be

az óra külső szabályozásában [130] [131]. Ha a kazein kináz I enzim aktivitása csökken, elmarad a PERIOD fehérjék foszforilációja és proteaszómális degradációja, ami a cirkadián periódusidő megnövekedését idézi elő [132]. A foszforiláció mellett más módosító folyamat (pl. acetiláció, ubikvitináció) is befolyásolhatja a fehérjék szintjét, proteaszómális degradációját, kompartmentek közötti transzportját vagy aktivitását [133].

2.3.2. A porc, a porcfejlődés és a cirkadián óra kapcsolata

A molekuláris cirkadián óra komponensei számos, úgynevezett óra-kontrollált génnek (CCG, clock-controlled genes) expressziós szabályozását befolyásolják, méghozzá a gének szabályozó szakaszaiban található E-box kötődési elemeken keresztül. Microarray módszeren alapuló vizsgálatokkal igazolták, hogy a teljes transzkriptom nagyjából 10%-a cirkadián óra-dependens expressziós mintázatot mutat [134]. Emiatt előfordulhat, hogy a periférián elhelyezkedő, szövet-specifikus órák meghatározó biológiai funkcióval rendelkezhetnek. Egyelőre még kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy az erősen konzervált molekuláris órák hogyan adaptálódnak a perifériás szövetek sejtjeiben található lokális mikroköznyezetbe.

A napi szintű ritmikus változások a porc metabolizmusa során is jelentős szabályozó szereppel bírnak. Egyes hipotézisek szerint a diurnális, azaz 24 órás ciklusok elősegítik a kondrocitákban zajló folyamatok optimalizálását, méghozzá az aktuális napszakhoz való szinkronizációval. Az epifízis porckorongban található porcsejtek proliferációja a kora reggeli órákban a legintenzívebb, ennek hatására a porckorong kiterjedése és a porc-ECM szintézise fokozódik, a növekedés dél körül éri el a maximumát [135]. Egészséges humán porcminákban már sikeresen azonosították a legfontosabb óragéneket (*BMAL1*, *CLOCK*, *PER1*, *PER2*, *CRY1*, *CRY2*) mRNS szintű expresszióját [136]. Ezen felül egerekből származó térdízületi porcminákban is kimutatták az óra-specifikus fehérjék expresszióját, emellett számos porc markergén ritmikus kifejeződését is leírták [137] [138]. A *Bmal1* porcspecifikus (*Col2a1*-hez kapcsolt) génkiütését követően a génkezelt egerek térdéből izolált ízületi porcminákban nem tudták igazolni a cirkadián óra normál ritmikus működését, továbbá az egerek 2 hónapos korától kezdődően a vizsgált porc fokozatosan degenerálódott [139]. A *Bmal1* porcszövethez kapcsolt kondicionális kiütése (*BMAL1CKO*) az egerek születésekor nem okozott morfológiai változásokat, azonban a 4 hetes egereknél csökkent a teljes test, a femur és a tibia csontok hossza. A *BMAL1CKO* egérembriókból izolált porcminákból primer kondrocita sejt kultúrákat is létrehoztak: a kultúrákban csökkent sejtproliferációt, illetve emelkedett *Mmp13* és *Runx2*

expressziós szinteket állapítottak meg [140]. 8-10 hetes BMAL1CKO egerek csípő ízületéből származó porcminthaiban a *Sox9*, *Acan* és *Col2a1* porc markergének expressziója szignifikáns csökkenést mutatott [139]. A bemutatott irodalmi adatok arra utalnak, hogy a kondrocitákban működő cirkadián óra hangsúlyos szereppel bír a normál porc- és csontfejlődési folyamatok során.

A perifériás órák működésében adódó problémák az egyes sejtek abnormális aktivitásához és metabolizmusához vezethetnek, amely végső soron a sokféle sejtből álló szervek, szövetek szintjén patológiás irányú morfológiai és funkcionális alterációkat okozhat. Többek között a diabétesz, a daganatképződés, vagy neurodegeneratív megbetegedések hátterében is sikerült már beazonosítani a cirkadián óra funkcionális zavarát [141] [142] [143]. Ezek alapján nem meglepő, hogy a hibás óraműködés hozzájárul a porc degenerációjával járó folyamatok, így például az OA kialakulásához is. A cirkadián óra fő komponenseinek expressziós szintje jelentős változást mutatott a porcsejtek OA-jellegű elváltozását követően. Az összes szabályozó faktor közül a BMAL1 expressziós szintje mutatta a legnagyobb változást, az egészséges porcminthaikhoz képest szignifikáns csökkenést tapasztaltak [136]. Normál, egészséges kondrocitákban előidézett *in vitro* BMAL1 géncsendesítést követően az ECM lebontásáért felelős enzimek expressziós szintje szignifikánsan megnőtt; ezzel összhangban a degenerálódott porcsejtekben lecsökkent az ECM degradáló fehérjék kifejeződése, miután visszaállították a BMAL1 fiziológiai expressziós szintjét [144] [145]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az optimálisan működő kondrocita fenotípus létrejöttéhez és fenntartásához elengedhetetlen a BMAL1 megfelelő transzkripciós aktivitása.

Egy korábbi kutatásban azt állapították meg, hogy a *Bmal1* expressziója szignifikánsan megnőtt a fájdalomérzékelésben részt vevő dorzális gyöki ganglion sejtekben, miután a vizsgálati modellként használt egerek térdízületében indukált OA-t idéztek elő, azaz sebési úton eltávolítottak egy porc-darabkát [146]. A pozitív szabályozó faktor emelkedése mellett a *Rev-Erba* stabilizáló faktor szignifikáns csökkenéséről is beszámoltak. Azonban egy REV-ERB-agonista kezelőanyag alkalmazása mellett a *Bmal1* redukált, míg a *Rev-Erba* fokozott génexpressziós szintet jelzett, emellett a hiperalgéziát vizsgáló kísérletek eredményei szignifikáns csökkenést mutattak az agonistával nem kezelt, de OA-ban szenvedő egerekhez képest. Az eredmények alapján azt feltételezik, hogy az óragének fokozottan érintettek az OA alatt kialakuló hiperszenzitív fájdalomérzékelésben, ugyanis részt vehetnek a perifériás érző neuronok szenzitizációjában.

Az elmúlt években arra is fény derült, hogy a PER2 fokozott kifejeződésének hatására megemelkedett az ECM-bontó ADAMTS5 és MMP13 szintje, míg a SOX9 fő kondrogenikus transzkripciós faktor expressziója csökkenést jelzett a H5 kondrocita sejtvonal eredetű sejtek tenyésztése során, tehát egyértelműen OA-ra jellemző molekuláris elváltozásokat mutattak [147]. A PER2 szignifikánsan emelkedett expresszióját OA betegekből származó porcminákban is sikerült azonosítani [136]. A BMAL1 expressziójának erőteljes mérséklődése a porcfejlődés egyik legfontosabb szabályozó mechanizmusának, a TGF- β jelátvitelnek a működését is megzavarja: a géncsendesítést követően a jelátviteli mechanizmus downstream elemeinek mennyisége nagymértékben megnőtt [148]. Ez azért is fontos észrevétel, mert a TGF- β jelátvitel nem megfelelő aktiválódását már összefüggésbe hozták az OA-jellegű elváltozások kialakulásával [149]. OA során a CRY2 transzkripciós mintázatát sem találták megfelelőnek: humán artritiszes porcminák vizsgálatakor a negatív szabályozó faktor mRNS expressziója és cirkadián fluktuációja lecsökkent, míg a Cry2 génkiütött egerekben az OA mesterséges előidézését követően sokkal súlyosabb kórképet és tüneteket állapítottak meg a vad típusú egerekhez viszonyítva [150].

Az egészséges, illetve a sérült porcszövet cirkadián ritmusának jellemzőiről évről évre egyre több információ áll rendelkezésünkre. Azonban a porcfejlődés korai szakaszáról, az érésben lévő porcsejtekben működő cirkadián óra funkcionális tulajdonságairól egyelőre még keveset tudni. A kutatási területnek igen nagy a tudományos relevanciája: a kronoterápia fogalma ma már nem ismeretlen, számos megbetegedés terápiájában felmerül a biológiai óra működésének figyelembe vétele, illetve újrarendezésének esetleges pozitív hatása [151] [152]. Az alkalmazandó gyógyszer adagolási idejének pontos megválasztásával növelhetik annak hatékonyságát, és csökkenthetik a toxicitás mértékét. A kronoterápiás kezelési stratégia bevezetését már az OA gyógyításának szempontjából is fontolgatják [153]. Habár a betegség gyógyítására eddig még nem sikerült oki terápiát kifejleszteni, az OA tüneteinek enyhítésére már több kezelési eljárást kifejlesztettek. Ezek közé tartozik a kronoterápia is, amelyet már sikeresen alkalmaztak az OA-betegek fájdalomkezelésében [154]. A továbbiakban a cél az, hogy minél pontosabb ismereteket szerezzünk az ízületek élettanának cirkadián természetéről, és meghatározzuk, hogy a potenciális gyógyszerek célpontjai mutatnak-e ritmikus expressziós mintázatot. Ugyancsak fontos lehet annak vizsgálata, hogy az ízületi szövetek belső órájának befolyásolásával elő lehet-e segíteni a szöveti regenerációt, lehet-e módosítani a porcsejtek osztódási hajlandóságát, mátrix-termelő képességét, vagy esetleg mozgósítani lehet-e az ízület-környéki szövetek szunnyadó kondrogenitor sejtjeit.

2.4. A DNS metiláció és a cirkadián óra kapcsolata

A cirkadián óra központi génjeinek transzkripciós szintű szabályozásában számos epigenetikai módosító folyamat, többek között a DNS metiláció vagy a különböző hiszton modifikációk is részt vesznek. Ezen folyamatok, válaszul az endogén és a külső környezeti hatásokra, szintén követik a központi óramű által létrehozott cirkadián ritmust [155] [156] [157].

Maga a DNS metiláció is cirkadián jellegű ritmikus változásokat mutat a nap 24 órájában. A humán genomi DNS diurnális metilációjának vizsgálatakor emelkedett szinteket figyeltek meg az éjszakai, azaz sötétséggel jellemezhető órákban [158]. A ciklikus DNS metiláció kialakulásához szükség van a fény stimulusára. A megvilágításnak kitett idő és a napi periódusidő csökkentésével megváltozott a szuprakiazmatikus magban található központi óramű génszintű működése, amely a vizsgált gének promóter régióiban bekövetkező metilációs változások miatt alakult ki [157]. A *Cry1* és *Per2* gének promóterei hipermetilációt, míg a *Clock* promótere hipometilációt mutatott. Ugyanebben a tanulmányban igazolták azt is, hogy a központi ritmusgenerátor megfelelő plaszticitást mutat, a DNS metiláció pedig reverzibilis, ugyanis a 24 órás periódusidő visszaállításával ismét normális metilációs mintázatokat figyeltek meg. Emellett szintén leírták, hogy a DNS metiláció diurnális oszcillációjának kialakulásához a normál fény-sötét stimulus mellett szükség van a DNMT enzimek megfelelő aktivitására, illetve a metildonorok elérhetőségére. A *Dnmt1* gén csendesítésének következtében rövidebb, míg a *Dnmt3a* gén csendesítését követően hosszabb periódus időket figyeltek meg [159]. A *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet2* és *Tet3* esetében is sikerült igazolni a cirkadián módon oszcilláló génexpressziós mintázatot vad típusú egerek májából származó minták vizsgálatakor [160]. A publikáció szerzői azt is megállapították, hogy a cirkadián óra génjeinek transzkripciós aktivitása ugyancsak hozzájárul a fiziológiás diurnális jellegű metilációs mintázat kialakulásához. A *Per1* és *Per2* gének kiütésével a globális DNS metiláció mértéke pozitív irányba tolódott el, azaz szignifikánsan fokozódott, ezzel párhuzamosan pedig megszűnt a metiláció ritmikus oszcillációt mutató mintázata.

A cirkadián óragének metilációs státusza közvetlen módon befolyásolja azok transzkripciós aktivitását. Ennek megfelelően az óragének promóter régiói jellegzetes módosítási pontokat jelölnek, amelyek különböző farmakonok célpontjaiként szolgálhatnak. Az 5-aza-2'-deoxicitidin (5-aza-dC vagy decitabin) az 5-azaC kezelőanyaghoz hasonlóan gátolja a DNMT aktivitást, ezáltal demetilációt okoz, ami a célgének mRNS szintjének

emelkedéséhez vezet. A humán akut limfoid leukémia-eredetű sejtvonal sejtjeiben a *BMAL1* promóter régiója bizonyítottan hipermetilált állapotban található [161]. Azonban az 5-aza-dC kezelés hatására a *BMAL1* génexpressziója szignifikánsan megemelkedett, amely azt jelezte, hogy a kezelőanyag sikeres hipometilációt idézett elő a promóter régió CpG-szigeteiben. Mindezzel párhuzamosan az alapesetben hipometilált *PER2* génexpressziója a kezelés hatására indukálódott, és szignifikáns mértékben megemelkedett. Az 5-aza-dC hatására erőteljes cirkadián oszcillációt figyeltek meg a gének expressziós mintázatában. Összességében tehát megállapították, hogy a kezelőanyag visszaállította a *BMAL1* és *PER2* ritmikus oszcillációt mutató expresszióját, ez pedig hozzájárult az endogén cirkadián ritmus helyreállításához. A bemutatott adatok alapján elmondható, hogy a DNMT aktivitást befolyásoló vegyületek a jövőben potenciális kezelőanyagként szolgálhatnak a kronoterápiák szempontjából.

Az OGT, illetve az O-GlcNAciláció szintén fontos kapcsolódási pont lehet a cirkadián óra szabályozása és az epigenetikai folyamatok között. A perifériás szervek, szövetek cirkadián ritmusa a tápanyagbevitelt érzékelő biológiai útvonalaktól és az anyagcserefolyamatok oszcilláló működésétől is függ. A glükóz feldolgozása során számos citoplazmikus és sejtmagi fehérje esetében megnő az O-GlcNAcilációs poszttranszlációs módosítás mértéke [162], melynek kialakításáért egyik részről az OGT enzime felel. Igazolták, hogy a *Drosophila*-ban a PER fehérjék O-GlcNAcilációs módosításon mentek keresztül, amely hozzájárult a cirkadián óra sebességének beállításához [163]. A ritmikus poszttranszlációs módosítás következtében szintén elmaradt a BMAL1 és CLOCK fehérjék lebontása, mivel gátolta azok ubiquitinációját [164]. A stabilizált BMAL1/CLOCK fehérjeszint hatására fokozódott a célgénjeik, így például a *Per* és *Cry* negatív faktorok transzkripciója. Az OGT overexpressziója azonban a ritmikus oszcilláló görbék amplitúdóinak növekedését idézte elő.

Számos tudományos publikációban olvashatunk a központi ritmusgenerátor irányításában közreműködő normál metilációs folyamatokról, vagy a különböző szervek patológiás elváltozásaiban szerepet játszó cirkadián működés rendellenes metilációs mintázatairól [165] [166] [167] [168]. Azonban a perifériás szövetekben, így például a porcszövetben működő cirkadián óra epigenetikai szintű irányításával kapcsolatban rendkívül csekély a rendelkezésünkre álló információ. Ez azt jelenti, hogy jövőbeli terveink között kiemelt szereppel bír a porcfejlődés, illetve az egészséges és degenerálódott porcszövet cirkadián működését befolyásoló metilációs szabályozó folyamatok feltérképezése.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk az volt, hogy az *in vitro* porcdifferenciáció során az alábbiakat vizsgáljuk:

- **Kimutatható-e, és ha igen, hogyan változik a DNS metiláció szabályozó faktorainak mRNS szintű expressziója az *in vitro* porcfejlődés során?** A porcfejlődés mely szakaszában tapasztalható a gének transzkripció maximuma? Van-e expressziós szintbeli különbség a felhasznált modellekben megfigyelt transzkripció aktivitások között?
- **Milyen morfológiai és molekuláris hatással van a DNS metiláció gátlása a porc differenciációs folyamatára?** Tapasztalható-e különbség a porcfejlődés korai vagy késői szakasza alatt előidézett metilációs gátlások között? Hogyan változik a mezenchimális sejtek metilációs mintázata a metilációs gátlást követően?
- **Kimutatható-e, és ha igen, hogyan változik a cirkadián óra szabályozó faktorainak mRNS szintű expressziója az *in vitro* porcfejlődés során?**
- **Lehetséges szinkronizálni a differenciálódó porcsejtek cirkadián óráját?** Felfedezhető-e a cirkadián óra és a porc markergénjeinek 24 órás, cirkadián ritmusra jellemző fluktuációja? Milyen a gének egymáshoz viszonyított oszcillációs mintázata? Tapasztalható-e különbség a sejtek cirkadián ritmicitásában attól függően, hogy a porcfejlődés korai vagy késői szakaszai alatt idézünk elő óraszinkronizációt?
- **Milyen morfológiai és molekuláris hatással van a cirkadián óra gátlása a porc differenciációs folyamatára?**

Egyetemi doktori értekezésem fő célja tehát az, hogy a DNS metiláció, illetve a cirkadián óra működésének a porc *in vitro* fejlődése során történő részletes elemzésével olyan új szabályozó molekulákat azonosítsak, amelyek a porcszövet differenciációja során jelentős szereppel bírhatnak, a jövőben pedig potenciális célpontként szolgálhatnak a porcdefektusok terápiás eljárásainak megtervezésekor.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti modellek

4.1.1. Egérembrió végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrák

Az *in vitro* porcdifferenciáció tanulmányozására HD kultúrákat alkalmaztunk. A HD kultúrák egy részét 11,5 napos egérembriók végtagtelepeiből izolált kondroprogenitor sejtekből hoztuk létre [51] [52]. Ehhez első lépésként az NMRI törzsbe tartozó laboratóriumi egereket időzített pároztatással egy éjszakán át pároztattuk, majd másnap a sikeres párzást az úgynevezett vaginális plug vagy nyákdugó jelenlétének ellenőrzésével állapítottuk meg; ezt a napot a vemhesség és az embrionális fejlettség 0. napjaként tartottuk számon. A plug-os nőtényeket farokszínezéssel jelöltük meg. A vemhes nőtényeket meghatározott napon feláldoztuk, betartva a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (DE MÁB) által meghatározott etikai szabályokat (Felhasználó Engedély száma: 2/2018/DEMÁB). A feláldozott nőtények méhéből kiemeltük a 11,5 napos fejlettségi stádiumú embriókat, melyeket steril kalcium- és magnéziummentes foszfátpufferbe (calcium and magnesium free phosphate buffered saline, CMF–PBS; pH 7,4; Gibco, Gaithersburg, MD, USA) helyeztünk, majd horizontális áramlású steril lamináris fülkében, sztereomikroszkóp és csipeszek segítségével eltávolítottuk a mellső és hátsó végtagtelepek disztális részeit. A lecsipentett végtagtelepeket CMF–PBS-t tartalmazó kristályosító csészében gyűjtöttük össze, ezt követően 0,25% tripszinbe helyeztük, és 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú és 90% relatív páratartalmú inkubátorban emésztettük nagyjából 20-30 percig. A tripszines emésztést 1:1 térfogat arányú főtális borjúsérum (fetal bovine serum, FBS, Gibco) hozzáadásával állítottuk le, majd a sejtsuszpenziót 10 percen át centrifugáltuk ($800 \times g$), így a sejteket elválasztottuk a felülszótól. A mezenchimális sejtek kinyeréséhez szükség volt egy 40 µm-es pórus-nagyságú szűrő egységen (Corning, Tewksbury, MA, USA) át történő filterezésre is, melyet egy újabb centrifugálási lépés követett ($800 \times g$, 10 perc). A sejt pelletet magas glükóztartalmú (4,5 g/l) tápoldatban reszuszpendáltuk (high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, HG–DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A médiumot 10% FBS-sel, 0,5 mM stabil L-glutaminnal (Sigma-Aldrich), valamint antibiotikumokkal és antimikotikummal (50 egység/ml penicillin; 50 µg/ml sztreptomicin; 1,25 µg/ml fungizon; TEVA, Debrecen, Magyarország) egészítettük ki. A szuszpenzió sejtsűrűségét automata sejtszámoló gép segítségével határoztuk meg (Luna automated cell counter, Logos Biosystems, Annandale, VA, USA), és a sejtsuszpenzió megfelelő hígításával $1,0 \times 10^7$ sejt/ml

sejtsűrűséget értünk el. Kísérleteinkhez 10, 30 vagy 100 µl-es cseppeket cseppentettünk 96-lyukú tenyésztő edényekbe (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), 35 mm átmérőjű műanyag sejttenyésztő Petri-csészékbe (Eppendorf, Hamburg, Németország) vagy kerek üveg fedőlemezre (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Németország), melyeket 24-lyukú tenyésztő edények (Eppendorf) kamráiba helyeztünk. A kicseppentett sejteket 2 órán át engedték kitapadni az edények felületére (37 °C-on, 5% CO₂ és 90% relatív páratartalmú inkubátorban). Ezt követően a sejtkultúrákat tartalmazó tenyésztő edényekbe megfelelő mennyiségű HG–DMEM tápoldatot pipettáztunk, melyet a tenyésztés során 2 naponta cseréltünk. A kicseppentés napját a sejttenyésztés 0. napjának tekintettük. A HD kultúrákat a tenyésztés 0., 1., 3., 4., 6., 10. és 15. napjáig tartottuk fent. *Az egérembrió végtagtelep eredetű HD kultúrák létrehozásában a szerző mellett Karanyicz Edina vett részt.*

4.1.2. Csirkeembrió végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrák

Az *in vitro* kondrogenézis folyamatát csirkeembrió végtagtelep eredetű primer HD kultúrák létrehozásával is vizsgáltuk [53] [8]. A csirkeembriók kísérletes felhasználásához nincs szükség külön engedély igénylésére a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságától. Kísérleteinkhez Hamburger-Hamilton 22-24-es fejlődési stádiumú (4,5 napos) csirkeembriók végtagtelepeiből izolált mezenchimális sejtekből kialakított primer HD kultúrákat alkalmaztunk. A csirkeembriók végtagtelepeinek előkészítése és azokból a kondroprogenitor sejtek kinyerése az előző pontban leírt egérembrió végtagtelep eredetű modellnél alkalmazott protokolltól csak néhány lépésben tért el. A tenyésztés napján steril körülmények között eltávolítottuk a tojásokból az embriókat, azokat CMF–PBS-be helyeztük, majd csipesz segítségével eltávolítottuk az alsó és felső végtagtelepek disztális területeit, azokat CMF–PBS tartalmú csészékbe gyűjtöttük, majd 0,25% tripszinben való emésztés következett egy órán keresztül, 37 °C-os, 5% CO₂ és 90% relatív páratartalmú sejttenyésztő inkubátorban. Az emésztést 1:1 arányban FBS-sel állítottuk le. 10 perces centrifugálást ($800 \times g$) követően a sejtpelletet Ham F12 médiumban (Euroclone, Pero, Olaszország) reszuszpendáltuk, amelyet 10% FBS-sel, 0,5 mM stabil L-glutaminnal, és 1% penicillin/sztreptomycin antibiotikumokkal egészítettünk ki. Az így kapott sejtszuspenziót egy 20 µm lyukátmérőjű szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) át szűrtük, és ismét 10 percen át centrifugáltuk ($800 \times g$), így a szuszpenziónk egy egyedi kondrogenikus mezenchimális sejtpopulációt tartalmazott. A sejtsűrűséget automata sejtszámoló gép segítségével számoltuk ki, ebben az esetben azonban $1,5 \times 10^7$ sejt/ml-es sűrűségűre hígítottuk a szuszpenziót (a szűrő pórusmérete azért kisebb, mert a csirke embrionális sejtek kisebbek az egér végtagtelepekből izolált sejteknél).

Kísérleteinkhez 100 µl-es cseppeket cseppentettünk 6-lyukú (üveglemezes vagy üveglemez nélküli) tenyésztő edényekbe (Eppendorf), a sejteket pedig két órán keresztül 37 °C-on, 5% CO₂ és 90% relatív páratartalmú inkubátorban engedték kitapadni a tenyésztő edények felszínére, végül megfelelő mennyiségű Ham F12 médiumot pipettáztunk a kultúrákra, amelyet 2 naponta cseréltünk. *A csirkeembrió végtagtelep eredetű HD kultúrák létrehozásában a szerző mellett Katona Éva, Abdulhadi M. Alagha és Matta Csaba vett részt.*

4.1.3. C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonala eredetű porcosodó micromass kultúrák

Az *in vitro* porcfejlődést sejtvonala alapú sejtek felhasználásával is vizsgáltuk [52]. A BMP-2-overexpresszáló egérembrió fibroblaszt eredetű C3H10T1/2 pluripotens sejtek az eredeti C3H10T1/2 sejtvonala egy módosított változatát alkotják, amelyet egy kollaborációs partnertől (G. Gross) kapott ajándékba a laboratóriumunk. A sejteket egy eukarióta expressziós vektorral transzfektálták, amely a humán csont morfogénikus fehérje 2 (bone morphogenic protein 2, BMP-2) átírásáért felelős cDNS szakaszt tartalmazta. A sejteket először monolayer, azaz egyrétegű sejt kultúra formájában tartottuk fent T75 flasksban (Eppendorf), 10% FBS-sel, 0,5 mM stabil L-glutaminnal, 6,6 µg/ml ampicillinnel (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml sztreptomocinnal és 5 µg/ml puomicinnal (Sigma-Aldrich) kiegészített HG–DMEM tápoldattal alkalmazásával, 37 °C-on és párásított CO₂ inkubátorban. Amikor a monolayer kultúrák nagyjából 80% konfluenciát értek el, a sejteket tripszines emésztés révén elválasztottuk a tenyésztőedény aljától, hogy HD kultúrákat hozzunk létre. Ezt követően a sejteket 10 percen át 800 × *g* fordulatszámmal lecentrifugáltuk, majd HG–DMEM-ben való reszuszenziót követően a megfelelő sejtsűrűséget ebben az esetben is automata sejtszámláló géppel határoztuk meg. A micromass kultúrák sűrűségét 1,0 × 10⁷ sejt/ml-re állítottuk be. A sejtszuszenzióból 100 µl-es cseppeket cseppentettünk 35 mm átmérőjű Petri csészékbe, majd 2 órán át hagytuk (37 °C-on), hogy a sejtek kitapadjanak a csésze felszínére. Végezetül megfelelő mennyiségű HG–DMEM tápoldattal láttuk el a kultúrákat, melyet 2 naponta cseréltünk. A micromass kultúrákat a tenyésztés 0., 5., 10., és 15. napjáig tartottuk fent. *A C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonala eredetű micromass kultúrák létrehozásában a szerző mellett Karanyicz Edina és Takács Roland vett részt.*

4.2. *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációs technikák lehetővé teszik, hogy meghatározott nukleinsav szekvenciákat detektáljunk szövetekről készült metszeteken. A nem radioaktív típusú

hibridizáció történhet direkt vagy indirekt módon, attól függően, hogy a detektálható (úgynevezett riporter) molekula közvetlenül, vagy egy próbán keresztül kapcsolódik a detektálni kívánt nukleinsavhoz.

Kísérleteink során a digoxigeninnel (DIG) való indirekt típusú jelölést alkalmaztuk [169]. Az *in situ* hibridizációs kísérletek első lépéseként elkészítettük a DIG-jelölt RNS próbákat. Ezt specifikus primerek megtervezésével kezdtük, amelyek a DNS metilációjával és demetilációjával járó szabályozó folyamatokban érintett *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* gének 3'UTR régióiban található nagyjából 1000 bázispár hosszúságú szakaszokat képesek felszaporítani. A PCR-rel felerősített régiókat egy pDrive vektorba (Qiagen, Hilden, Németország) klónoztuk és elküldtük szekvenálásra. Az antiszensz próbák létrehozásához az inszerteket T7-specifikus promóterrel látták el. A klónozott régiók szekvencia adatai a 4.1. táblázatban láthatóak. A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* próbák specifikus gén termékeit PCR segítségével szaporítottuk fel a plazmidokról. Ehhez programozható PCR készüléket (Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet Inter-215 national, Edison, NJ, USA) használtunk, az alábbi paraméterek beállításával: 95 °C 2 percen keresztül; ezt követte 33 ciklus (denaturáció: 95 °C 15 másodpercig, anelláció: 57 °C 20 másodpercig, extenzió: 72 °C 75 másodpercig); végül 72 °C 2 percen keresztül. A DIG-jelölt RNS próbák elkészítése (néhány módosítás alkalmazásával) a gyártó (Roche) javaslatai alapján történt meg. Az amplifikált PCR termékeket a gyártói instrukciók alapján a Roche High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche, Basel, Svájc) izoláltuk. A megtisztított PCR termékek DNS koncentrációját Nanodrop 1000 UV-Vis spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg. A specifikus RNS jelölés DIG – RNS jelölő mix alkalmazásával *in vitro* DNS transzkripció során történt meg. A jelölő mixhez a következő komponensekre volt szükség: 1 µl tisztított PCR termék (100-200 ng/µl-es koncentráció), 2 µl 10× DIG – RNS jelölő mix (DIG RNA Labelling Mix; Promega, Madison, WI, USA), 4 µl 5× transzkripció puffer (Promega), 2 µl 100 mM ditiotritol (Promega), 2 µl T7 RNS Polimeráz (Promega), 9 µl nukleáz-mentes víz (nuclease-free water, NFW; Promega), így a teljes reakció végtérfogata 20 µl lett. A mixet az összeállítást követően 2 órán keresztül 37 °C-on kellett inkubálni. A polimeráz reakciót 2 µl 0,2 M etilén-diamin-tetraecetsav (pH 8,0; Millipore, Billerica, MA, USA) hozzáadásával állítottuk le. A megjelölt RNS-t 2,5 µl 4 M lítium-klorid (Sigma-Aldrich) és 75 µl előhűtött 100% etanol keverékével precipitáltuk. Egy rövid vortexelést követően a precipitátumot –80 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A következő napon a mintát lecentrifugáltuk (13,000 × *g*, 15 perc, 4 °C), majd a felülúszót leöntöttük, és a pelletet 100 µl jéghideg 70 %-os etanollal

mostuk. A mintát újból lecentrifugáltuk ($13,000 \times g$, 15 perc, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), és a felülúszó eltávolítását követően szobahőn szárítottuk néhány percen keresztül. Végezetül az RNS pelletet hibridizációs pufferben oldottuk (összetevők: $20\times$ sós nátrium-citrát (saline sodium citrate, SSC), dextrán-szulfát, $50\times$ Denhardt-oldat, nátrium-dodecil-szulfát, tRNS, és 50% formamid (Sigma-Aldrich)), majd $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az *in situ* hibridizációs kísérletekhez 15 napos egész embriókról készült metszetekkel dolgoztunk. Az egérembriókat az *Egérembrió végtagtelep eredetű primer porcosodó sejtkultúrák* c. részben leírtak alapján hoztuk létre. A 15. fejlődési napon feláldoztuk a nőstényeket, RNáz-mentes körülmények biztosítása mellett kiemeltük az embriókat az anyaállat méhéből, és DEPC-PBS-es (PBS $0,1\%$ dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kiegészítve; Sigma-Aldrich) mosást alkalmaztunk. Egy éjszakán keresztül 4% paraformaldehidben (DEPC-PBS-ben oldott PFA) fixáltuk az embriókat. A következő napon DEPC-PBS-es mosás következett 2×10 percig, majd az embriókat először 15% , majd 30% cukor (szukróz) oldatba helyeztük, amíg az embriók le nem merültek a folyadék aljára. Ezt követően az embriókat Cryomount kriomediumba (Bio-Optica, Milánó, Olaszország) helyeztük, és kriosztát (CM3050 S, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) segítségével szagittális síkban $20\text{ }\mu\text{m}$ vastag metszeteket készítettünk, amelyeket Superfrost üveglemezekre (Thermo Fisher Scientific) helyeztünk. A metszeteket $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig. A fagyasztóból való kivételt követően a metszeteket először szobahőmérsékleten tartottuk 20 percen keresztül, majd egy éjszakán át $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os inkubátorban szárítottuk. A következő napon az inkubátorból kivéve ismét szobahőmérsékleten tartottuk a metszeteket 20 percen keresztül, majd 20 perces fixálás következett DEPC-PBS-ben oldott 4% PFA-ban. A mintákat 2×10 percen keresztül mostuk DEPC-PBS-sel, majd a maradék folyadék felitatását követően 20 percen át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on $100\text{ }\mu\text{l}$ Proteináz K oldattal ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$; Promega) kezeltük a metszeteket. 2×5 perc DEPC-PBS mosást követően prehibridizáció következett 4 órán keresztül $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd a mintákat 16 órán keresztül $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk az RNS próbát tartalmazó ($1\text{--}2\text{ }\mu\text{g/ml}$) hibridizációs pufferrel. A kísérleti protokoll ezen lépéséig minden felhasznált komponens RNáz mentesített volt, a kísérleti folyamatokat RNáz mentes környezetben kellett elvégezni. A következő napon a metszeteket először $1\times$ SSC oldattal mostuk 15 percen keresztül $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd újabb mosás következett $1,5\times$ SSC oldattal 15 percen keresztül $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, végül az utolsó mosási lépést $2\times$ SSC oldattal kellett elvégezni 2×20 percen keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Ezt követően a mintákat 20 percen át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on $2\times$ SSC-ben oldott RNáz A oldattal ($0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$; Promega) kezeltük. A mintákat ezután $2\times$ SSC-vel mostuk 10 percen keresztül szobahőmérsékleten, majd $0,2\times$ SSC-

ben való átöblítés következett 2×30 percen keresztül $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A következő mosási kör során 2×15 percig $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd 10 percig szobahőn PBST-vel (0,1% Tween-20-szal kiegészített PBS) kezeltük a metszeteket. A mintákat egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk az α -DIG antitestet (anti-DIG, 1:1000; Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság; kat. szám: ab420) tartalmazó 10% Blokkoló puffer oldatban (Tween-20-szal kiegészített maleinsav pufferben oldott Blokkoló puffer por; Roche). A következő napon a metszeteket 3×20 percen át mostuk PBT-vel (0,1% Triton X-100-zal [Sigma-Aldrich] és 2 mg/ml borjú szérum-albuminnal [Thermo Fisher Scientific] kiegészített PBS), majd 2×5 percig 1 M TRIS oldattal (pH 9,0, Thermo Fisher Scientific). A DIG antitest kötődésének vizualizációját TRIS-NBT/BCIP oldattal vittük véghez (20 mg/ml nitro-kék-tetrazolium és 5-bromo-4-kloro-3-indolfoszfát törzsoldat [nitro blue tetrazolium + 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, NBT/BCIP; Sigma-Aldrich], 1 M TRIS-ben oldva), amelyben szobahőn és sötét kamrában inkubáltuk 2-20 óra közötti időintervallumban (RNS mennyiségétől függően). Az inkubációs idő lejártával a mintákat 2×10 percig mostuk PBST-vel, majd a metszeteket DPX fedőragasztóval (Sigma-Aldrich) fedtük le. Az *in situ* hibridizációval vizsgált metszeteket Nikon Eclipse E800 mikroszkópra szerelt Olympus BX53 kamerával (Nikon Corporation, Tokió, Japán) digitalizáltuk, $4\times$ és $10\times$ objektívek használata mellett. A digitalizált felvételeket az ImageJ (NIH, ver. 1.46) számítógépes szoftver segítségével analizáltuk. Az *in situ* hibridizáció során szerzett digitalizált felvételek elemzésénél a bemutatott értékeket minden minta esetében 6 független normalizált mérésből számoltuk ki. A relatív optikai denzitás értékeket az egyes mintáknál kiszámolt abszolút közép szürke értékekre kalibráltuk. *Az in situ hibridizációs kísérletek kivitelezésében, az eredmények vizualizációjában illetve kvantifikálásában a szerző mellett Karanyicz Edina, Takács Roland és Ducza László vett részt.*

4.1. táblázat: Az antiszensz próba megalkotásához használt Dnmt3a, Tet1 és Ogt markergének T7 promóterrel jelölt 3'UTR régióinak szekvencia adatai. A régiókat pDrive vektorba klónoztuk majd polimeráz-láncreakcióval amplifikáltuk a digoxigenin-jelölt RNS próba elkészítéséhez.

>T7promóter-Dnmt3a (antiszensz) Klón#:D7

chr12:3,907,819-3,908,735

GCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCAGAT
TGCACGCGAGTCTGGATAAAATCCACACTCAGCTTCCCCAGGGTCCGACCACCTCAGCTGAGCCCCCTTTTGGCAGGTGAAGC
TAGGCATGGGGCAGGGGTGGGGGGTGATATGGGTCACTCCTTCAGTTTGTAAAACCCCTCCAGCTGCTCCCCCTCTCCCCATC
CTGGGCTGAAACCCCTTTGCACAGAGGGCCAGGCGGAAGCTGATGTCTTTGCTCATCTCGCTGTTTTGAAAGCACCATTATGAA
GTCGGGATGTACAGTAGTTAACAGTACCTTTTATATATATATATCTCATATCTATCATATATATAAACTGTAAACAAGAGG
TAACAGCGGCTTCTAGAACTGGTTTTCTTCAAGTTTCTGTGTGGTAGGCACCTGAAATACTGTAGAAAAGTGTCTGGTGT
GGTGTCTCTCAGCGCCCTGCTGCTAGTTGGGTTCTGTTTTGCATGACCAGGAATGGTGTCTGTTGAGACTGCTCGGGGGTGGG
AGAGGAGACTCTGCCTCCGAGGGTCTCTATTCTCTTCTGTTGTGCTCCTATCTGATCAGGCTAGAGACAACCAAGAGATA
TATAGAAAAGGAAAAAACCATAATTTTAAGTTTTTATAGAAATTTCCCTCTCTCCCTTTCTCTCCAAGGCATTCTCT
ACTTTTTGTTGTTACTGATTTTGTGCAATAACTCTCTGTTTTCAGTCACAGCAAGAAACAAAACCAACAGAAAAAC
CCCTCTGAAAAAGAGTAGAAAAACAAAAGTTCGCCTCCTAGGACCGAGGGGAAGAAGGGGAGGGGCCCTATTTTGCTTTT
ATAGGACTGAAGTTAACATTGAAACTCAGGAGATGATGTCCAACCCCTTTTGCAAGGCCAAGCCCTCCGGCGTTTTCTCTCT
CTGGGGTTTGCTTTAAATTCCTTTTCTCTCTGGGTGCTGAACCTTTCTCCGTCCTCTCGTTCTTGGGGGTTAATGGTTTT
GTTTTGTTTTTGGTTGTTTGGTTGTTTAAATTTTTTATCATCACTACTTCAGTTTGCCCCCATGTCCCTTAACCACAAATCA
CGAATTCGTCGAAAAGCTTCTCAAGCCTAGGCTAGCTTAAACCCACGTGTGGGGGGCCCAACTCCCGGCCCTTGAATCT
ATAAGGTCACCTAAAGGGCCGCACAATTCATGGGCCGCCGTTTTACAACGCCGGGACTGGAAAAACCTGGGGTTACCAAT
TT

>T7promóter-Ogt (antiszensz) Klón#:O2

chrX:101,682,485-101,683,489

CCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGAT
TCTACCAAGGCCGAATCCATAGAGTTTGAAGCTAAGTCCAGACATTCTAACACAGTCTAAAAATAAAATAACTGCCTGTATAG
AGATGCTTCTTCAGAGCGGTGAACACCATTAAAGTACTGGAGAGAAGTGAATTTACTAACCACAACTTTGAATACTTATAT
ACTTACCTGGGATTTCAATTTCTGCTGAAAGAAATGGGAAGAACAGGACTCACTTTAAAAAACAACAACTTTAGAAAGGAA
GGTAAAAATCTTATCACACTATTACTTTTGAAGCAGCATAGGAGGGGCAGTCAAGGGCTGAAACACTGGTGAACAGGTAAA
ACTTAGGCAGAAAAAACCTATATTATTATCAATAACAGTACCACAAGTGTGACCTTCATGATTAATATTCCTCCTAAGAA
TTTTCAATTTGGCACCAGATGGCATGTTCGAGAGAAACACCCTGGGATGTCTGAAAGCAGACATGGGTTGTGTAGCAGTCACAG
GAGAATTTAACGGGAGCTGGGGTGTGTAAACAGGCTGAAAAGTCTTAAGTCATCATCTAAACAAAGCACTGACAGTGCCAAAG
CATTAGGTGAGACACTAAATGACTGATATAGGCTCATGTGGTTTATAAAACCTATAAAAAGACTACACCAGCAAGGTCCTGT
TCACCTGTGTCAGAGTTCAAGACACTAAACAGGAAGCAACATTTTAGTTTAAACCTCAGAAGAATCAAGATCACTTCACATGA
GTAAAAATACCTGAAAGCAAACATTTTAAAGCTCCAAAACCAAAATATAAAGAAAAAAGGATCAGAAGACTTGATC
AATCCACGGCATCACAAAACGGCTGGTTAATCTCTATCTCCCCTCCACATTAAGCATCCCATGGAAGACCAAGGGAGACCAGA
CCTTCCAGACCTGTGCACCACCTGTTGCTGCAAACTCTAAGAGATTCCCTTGTGGAATAGCATTCTCTCTTCTGTCTCTC
CCTATCATGCAGAACTCTGAATTCGTCGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGGGCCCCAACTC
CCCGGCCGCTGTATTCCATAGGGGCCACCTAAATGGGCCGCACAATTCACTGG

>T7promóter-Tet1 (antiszensz) Klón#:T1

chr10:62,811,427-62,812,547

CCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGAT
TGGGTAAGGGTGACAATGCTAACGCAAGCATGTCCCTCAATTATCTCTATAGAATATTTCTTCTCATTTGGGAAGGACATG
TCTCTTAATTATGTATTTCTAATCTTGAAACACTGGGAACCTTTTACTGATCCCAATTTGCCTCCTTTTCTTTGAAAACAC
CTGTAATTTGGGTCAATAGTTAATTGACGAGGTGACTTCAGAAGACAATATTTTTTCTAGTTAAAGAGGGAAAAATTGATATTG
GTAGCATCTTGTATTTAAATTTTTTTTTTTAGAGACCTCTATTCTATAAGTAAAGAACAGAAGCCGTGTGTTATTTGAGTAC
AGGCTGAGGTAAACGGGATGGGACTCTACAGAGCAAGAACAATGACTTCTCTGGTATTCAAATATGCACATAATAGACAA
TAGGATTCTGCTACTATACTATTTCAAGTTACTCTTAAAAGTAGAAAAGTGCCTTTTAAAATATATACATTTATAGTTAGCGAA
CAGCTTCCAACCATCATGAGAATAGAGAACTACTTTATATAGGAGAAATGTTTTAAGAGAAAAAGCATTTCATTGGTTTACTT
CAAAGAAATGTGCAGACACGATGGCAATGATTGGAAGAGGCTTGAGCAATGGCACCAGAAAACAATCACTCAGCTCATCACTC
CGTGTGTTGATGTGGTTAAAGCACCAGGAACGTGTAGAGTTAACACTACATCTTGGTCTTTACTTCTTATTCAGGAACCTG
TTATAAACCCCTCTGAATAGTAAACAAACCCGGGGGAAAGCACCAGACTCTATGGTTCTAGCATGGCCAACACCTAACCAAGAT
GTTCCCTTTAAGTATTTAAACTATAAAAAGTTTATTTTTGCTGAAAATGTTACCTTCTACCAATTCTCAAAATGTAATCACA
GTTAAGTATTCACCTTTTCTTTTCTTTTAAATTTTACGTGGAATGAAATGGGCGAAACAAGCTTCCGTAACACAACA
AATGATTTCTTTTAAACAGCACCGGAAAAACAAAAACCAAGAAAAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCA
CCTTTAGCCAAGGGCTTACTTGGAGAAAAGCCTTTAGACCCACCGATTGGAAGGGAATCTGAATTCGTCCAAAACTTTCCC
AAGCCTAGGCTAACTCTAAAACCAACCGTGGGGGGGGCCCCAACTTCCGGGCCCTTGAATCCTTAAGGGGCACCTTAAAGG
GCCGCCCAATTTCCCGGGGCCCGCTTTTTACAAGCCCCGGGACTGGGAAAAACCTGGGGGGTTACCAAAATTAACCCCTT
GGCGAAAAATCCCCCTTTTCCCCGTGGGGCGTATAAGACAAGAGG

4.3. PCR array

A kvantitatív PCR array módszer segítségével 80 gén expressziós mintázatát vizsgáltuk meg, amelyek bizonyítottan meghatározott szereppel bírnak a porc- és csontfejlődési vagy az epigenetikai szabályozási folyamatokban. A kísérleteket C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonal eredetű sejtekből létrehozott HD kultúrák mintáin vittük véghez, melyeket az *in vitro* porcdifferenciáció meghatározott stádiumaiban, így a tenyésztés 0., 5., 10. és 15. napjain arattunk le. A teljes RNS izolálását Direct-Zol® RNA Miniprep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) felhasználásával végeztük. Az 1 µg totál RNS-t tartalmazó minták cDNS átírásához iScript RT Supermix kit-et (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) használtunk. A kísérlet során használt specifikus primerek megtervezése a PrimerQuest szoftver segítségével történt, a primereket az Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) cégtől rendeltük meg. A felhasznált primerek szekvencia adatai a 4.2. táblázatban láthatóak. Az RT-qPCR reakciók CFX RT-PCR programozható PCR készülékben (CFX Opus 96 Real-Time PCR System, Bio-Rad) történtek, SsoFastEvaGreen™ Supermix (Bio-Rad) reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció paraméterei a gyártó által javasolt protokoll alapján állítottuk be. A primerek specifikusságát a PCR reakciókat követően, az olvadási görbék ellenőrzésével állapítottuk meg. Az eredmények hőtérkép alapú ábrázolását a CFX Maestro szoftver (Bio-Rad) segítségével hoztuk létre. *A PCR array kivitelezésében Kiss Katalin és Rauch Tibor vett részt.*

4.2. táblázat: Az egérembrió eredetű HD kultúrákon végzett PCR array-hez használt specifikus primer-párok szekvencia adatai

Epigenetikai módosítás	Gén	Faj	Forward	Reverse
DNS metiláció	Dnmt1	<i>Mus musculus</i>	CAGAGGAGAGAGACCAGGATAA	GCTGTTACCTCTTCCAGTTTCT
	Dnmt3a	<i>Mus musculus</i>	CAAGGGACTTTATGAGGGTACTG	TTCTCAAAGAGCCAGAAGAAGG
	Dnmt3b	<i>Mus musculus</i>	GAACCCTGGAGCTGCTATATG	CAACTTGGGTGGCTCAAATTC
	Tet1	<i>Mus musculus</i>	CCAAGTGGGTGATCAGAAGAA	CACAGCAGGATAAGGACAACATA
	Tet2	<i>Mus musculus</i>	AGGATGCAATCCAGACAAAGA	GCTTTACCCCTTCTCTCCATACC
	Tet3	<i>Mus musculus</i>	GAACCTCATGGAGGATCGGTATG	CAGTGTGTGTCTTCGGATCA
	Ogt	<i>Mus musculus</i>	GACTGGCGACTACACAGATTA	GGGAACGGGTGGTTACAATA
Hiszton acetiláció	Atf2	<i>Mus musculus</i>	ATGGCAGTGGATTGGTTAGG	GAGAAGCCGGAGTTTCTGTAG
	Crebbp	<i>Mus musculus</i>	CAACAAACCATCCTGGGATCT	GGGTCTATGGATTGTTGGTTAC
	Ep300	<i>Mus musculus</i>	GGCAATGCTGGCAGTTTATT	TTCCCATCTTAAAGTGGTTGGG
	Hat1	<i>Mus musculus</i>	GCCTGAAGATCTTGCTGTACTA	TCATCTGCCTCCACACAATC
	Kat2a	<i>Mus musculus</i>	GCTCTTGGGAATGGTAGTAGATG	GCAAGAGCTTGAAGAGGTAGAA
	Kat2b	<i>Mus musculus</i>	GAGGAGACCTCCAGCAGATAAT	TGAGAAACGTGAGCAGCAAG
	Kat5	<i>Mus musculus</i>	TTTCCCTCAGAATGGGTCAG	CATCAGTGCCCAAGCAATTAG
	Kat6a	<i>Mus musculus</i>	CCCATCTGTAGCTTCTGTCTTG	CACGATGGATGACCGCTATT
	Kat6b	<i>Mus musculus</i>	GTGCCGATCCCATTCCAATA	ACAGGATGGGTGTCCACTA
	Kat8	<i>Mus musculus</i>	TCTATGTTCACTATGTGGGCTTTA	GCCAGCTCACTCAGGTATTT
Hiszton deacetiláció	Hdac1	<i>Mus musculus</i>	GATGCAGAGATTCAATGTTGGTG	GATGTCCGTCTGCTGCTTATTA
	Hdac2	<i>Mus musculus</i>	CCTCATAAAGCCACTGCTGAA	CCGACGTTAAATCTCTGCATCT
	Hdac3	<i>Mus musculus</i>	TGATGACTGCCAGTGTTTC	GGCCCAAGTTGATGGCAATA
	Hdac4	<i>Mus musculus</i>	CTTGAGGGCCGCTTTATCA	GGAAAGAAACACAACCAAGTCTATC
	Hdac5	<i>Mus musculus</i>	AGGAGGAGCTGGAGAAACA	GATGGCACTCTCTTTGCTCTT
	Hdac6	<i>Mus musculus</i>	CCCAATCTAGCGGAGGTAAAG	GTTCAAGATCCAGCCCTTGAA
	Hdac7	<i>Mus musculus</i>	CAGAAGCTGGCTGAAGTGAT	GCTCAAGAGTTCTGTAGGGAATAC
	Hdac8	<i>Mus musculus</i>	CCTTCCACACTGATGCCTATC	GGCAGTCATAACCTAGTCCATATT
	Hdac9	<i>Mus musculus</i>	GGAGCACATCAAGGAACCTTCTA	GCCTCTCTACTTCTGTTCTTG
	Hdac10	<i>Mus musculus</i>	AGACCCAGACCCTGGATAAA	AAAGGTGTCCGGGTGAAAG
	Hdac11	<i>Mus musculus</i>	GAGCTGAAGTGGTCCTTTGT	TCCTCTGCACAAGGAAGTTG
	Sirt1	<i>Mus musculus</i>	GGATCCTTCAGTGTCTGTT	CACCGAGGAACCTGATTAAA
	Sirt2	<i>Mus musculus</i>	CCAACCATCTGCCACTACTT	CGTGTCTATGTTCTGCGTGTA
	Sirt3	<i>Mus musculus</i>	GCCCAATGTCACTCACTACT	GATCCCAGATGCTCTCTCAAG
	Sirt4	<i>Mus musculus</i>	CGCTGCTCAAGATCCCTAAG	GGGCAGCTCTCATTTCTGTAA
	Sirt5	<i>Mus musculus</i>	GTGTCTAGTGGTGGGAACATC	GGGTGGTCTCCATGTTAAACT
	Sirt6	<i>Mus musculus</i>	CCCAAGTGTAAGACGCAGTA	CAGTCCAGAATGGTGTCTCTC
	Sirt7	<i>Mus musculus</i>	GTGGTGTCTCAGAACTGTGATG	CAGGAGGTGCAGACTTCAATATAC

Hiszton metiláció	Ash1l	<i>Mus musculus</i>	GAGAGAGGAACTTCGTGCTAAA	TGTACAGCGATGCTGAGTG
	Dot1l	<i>Mus musculus</i>	CATCACTACGGAGTGGAGAAAAG	ACCTCGTTCCAGTGTGTATTC
	Ehmt1	<i>Mus musculus</i>	GTCTGACCTGAGTTCTGAATCC	CTGCTCGGCTTCTTTCTACTT
	Ehmt2	<i>Mus musculus</i>	ACAACGCACGCCACTAAT	CATCCTCTTCCTTGCTGTAGAC
	Ezh1	<i>Mus musculus</i>	GGAGCAAAGGCTCTGTATGT	GGCTGGACACGAAGTTTCT
	Ezh2	<i>Mus musculus</i>	CATCCCGTTAAAGACCCTGAA	ACAGTTTCGTCTTCCACCATAA
	Fbxo11	<i>Mus musculus</i>	GATGGATTTGCTGCAGGTATTG	GCCTCCAAATCGGTTGTTAAAG
	Kmt2a	<i>Mus musculus</i>	CCAGACCCTCCTGTTCTTACT	CGCTGAACTCCAACACAGATAC
	Kmt2b	<i>Mus musculus</i>	GCTGGACTGGAAAGCAGAA	CTAGGTGCGAATCCTCCTTAAA
	Kmt2c	<i>Mus musculus</i>	TGTTAAGGCCTCACACCTTG	GGAGTGGACAACTGCTTACT
	Kmt2d	<i>Mus musculus</i>	GAGACATGTGACAAAGGTATCA	CATAGCCGGCATGTCTTACA
	Kmt2e	<i>Mus musculus</i>	AGCCCAGGAGTTTGGATAAAG	AGGAACTTCATCACCACCTTCA
	Prdm4	<i>Mus musculus</i>	GACACACCAATAGAGAGCAGAG	ATGGAAGGACACCAACAACA
	Prmt3	<i>Mus musculus</i>	AGACTTAAGAATCCTACGGTTGAA	GGAGTAGACACAGGCTCATAAAG
	Prmt4	<i>Mus musculus</i>	GGCGATTTGCACAGGATAGA	GGAGCCAATGAAAGCAACATC
	Prmt6	<i>Mus musculus</i>	GGTGGAACAAGATACGGACAT	CTCATGGTCTCCCACTTTGTAG
	Setdb1	<i>Mus musculus</i>	ATCAGCTCAAGATGTCCAGAAG	CCTGACCCAAGTTCCTTTAT
	Setdb2	<i>Mus musculus</i>	TCTGCCACAAATGGAGACTATG	CACTCTGAGTCACAGGTGTATG
	Smyd1	<i>Mus musculus</i>	GGAAGTGGTGAAGGAGATGATAC	GCTTCACAACCTCGTGATACA
	Smyd2	<i>Mus musculus</i>	CGGCGATATTCCTGATGTT	TCCTGTACAGCTCTGACTTCT
	Suv39h1	<i>Mus musculus</i>	CTCTGCATCTTCCGCACTAAT	CTGAGGTAATAATCTCTCCACATAC
	Suv39h2	<i>Mus musculus</i>	GTGAATCATAGTTGTGACCCAAATC	CAGCTCTTCTCCAGCGTTTAT
	Suv420h2	<i>Mus musculus</i>	CTGCTCTCAAGACCCACATTT	AAGCACGGGTAGACACAATC
Hiszton demetiláció	Jmjd1c	<i>Mus musculus</i>	GCCATGATGCCAACAAGATATG	GTACAAAGAACCTGGCAAATG
	Kdm6b	<i>Mus musculus</i>	GAGGAACCAGACAGCACTAC	CTTCCACCTCTTGGCATCA
	Jmjd4	<i>Mus musculus</i>	AAGTATGGAGACGCGGTTG	GTAAGTATATAGTCGCGGAAGG
	Jmjd6	<i>Mus musculus</i>	CCATTGCCATCACCCAGAA	GCTCCTGTTCAAGATCCTATACC
	Jmjd7	<i>Mus musculus</i>	CTTGACAAAGGACCACTATGA	TGCTGGTGTGTAGAGATTGTAAG
	Jmjd8	<i>Mus musculus</i>	GAATTGCAGGAGCTGGATCT	TGTCTTCTCAGGAGGGTAGAG
	Kdm1a	<i>Mus musculus</i>	TGGGATCAGGATGATGACTTTG	GCACTGCTGTGTTCAAGTTAAT
	Kdm1b	<i>Mus musculus</i>	GACTCAAATCTCCAGTGCAAAG	GATGGCACCTCTCTGTAGTATG
	Kdm3a	<i>Mus musculus</i>	TCATCCACAGCAAAGACAGAA	GGCCTCTTGGATGAATCAGAA
	Kdm3b	<i>Mus musculus</i>	GTGACCAAGCAGAGGATTCA	TTGCTCTTCTCCAACCTTCC
	Kdm4b	<i>Mus musculus</i>	CAGCCGGATTACACAGGAAG	TGGACTCAGCGCAGTTAAAG
	Kdm4c	<i>Mus musculus</i>	AGTTGTTATGGTGTCCCTTCTC	GAGCCCACTGATTGTTCTTAGT
	Kdm5a	<i>Mus musculus</i>	CCTGAATGAACTTGAGGCAATG	CACCACAGGGATCTTCAATGTA
Oszteogenikus és kondrogenikus markerek	Acan	<i>Mus musculus</i>	TGGAGGTCATAGTGAAAGGTATTG	ATGATGGCGCTGTTCTGTAG
	Col2a1	<i>Mus musculus</i>	TGGCTTCCACTTCAGCTATG	GGTAGGCGATGCTGTTCTT
	Prg4	<i>Mus musculus</i>	TGGAGGACTAACAGGGAAGATA	CTGAATGTTGCCACCTCTCT
	Alpl	<i>Mus musculus</i>	GCCATGACATCCCAGAAAGA	GCCAGACCAAAGATGGAGTT
	Col1a1	<i>Mus musculus</i>	ACAAGGTGACAGAGGCATAAA	ACCAGGAGAACCAGGAGAA
	Col10a1	<i>Mus musculus</i>	AACGCCACAGGCATAAA	CTCCTCTTACTGGAATCCCTTTAC
	Spp1	<i>Mus musculus</i>	CTTTCACTCCAATCGTCCCTAC	TGGCATCAGGATACTGTTTCATC
	Znf219	<i>Mus musculus</i>	CGGCCACCCAAGAAGAAA	CGCCGAGCGGAAAGATT

4.4. Totál RNS izolálás és reverz transzkripció

A tenyésztés meghatározott napjain a különböző eredetű micromass kultúrákat kétszer mostuk steril PBS-sel, majd a felhasználás napjáig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A teljes RNS izolálása korábban leírt protokollok alapján történt meg [8] [9] [10].

Csirkeembrió végtagtelep eredetű primer HD kultúrák esetében az RNS izolálás az RNeasy kit (Qiagen) segítségével történt meg, a gyártó által javasolt protokoll alapján. Az izolált RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop spektrofotométerrel állapítottuk meg. A génexpressziós analízisekhez $1\text{ }\mu\text{g}$ mennyiségű RNS-t High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával és a gyártó protokollja alapján reverz transzkripció során cDNS-sé írtunk át, amelyet $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk felhasználásig.

Az egérembrrió végtagtelep eredetű primer, illetve bizonyos C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonala eredetű HD kultúrák esetében trizol reagens alapú izolálást végeztünk. A kultúrákat először trizolban (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felszuszpendáltuk, majd 20% RNáz-mentes kloroform hozzáadását követően centrifugáltuk ($10,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 perc). A mintákat $500\text{ }\mu\text{l}$ RNáz-mentes izopropanolban inkubáltuk 1 órán át $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd az így kinyert teljes RNS-t RNáz-mentes vízben oldottuk fel, végül felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS tisztaságát és koncentrációját ebben az esetben is Nanodrop spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A reverz transzkripció reakcióit $1\text{ }\mu\text{g}$ -nyi RNS és a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit felhasználásával vittük véghez, a gyártó instrukciói alapján. Az így kapott cDNS mintákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. *Az RNS izolálás és reverz transzkripció kivitelezésében a szerző mellett Matta Csaba vett részt.*

4.5. Kvantitatív valós-idejű PCR analízis

A molekuláris óra markergének, az oszteo/kondrogenikus transzkripciós faktorok, a porcspecifikus ECM strukturális fehérjéit kódoló gének, illetve a DNS metilációjával járó szabályozó folyamatok meghatározott résztvevőinek mRNS szintű expressziós mintázatát RT-qPCR (valós idejű – kvantitatív polimeráz-láncreakció) analízis segítségével vizsgáltuk. A SYBR-GREEN fluoreszcens alapú reakció során a festék beépül az amplifikálódó DNS-be, így a mért fluoreszcencia mértéke arányos lesz a keletkezett amplikon mennyiségével, melyet maga a reakció alatt valós időben tudunk nyomon követni. A standard görbe módszeren alapuló

abszolút kvantifikáció teszi lehetővé az általunk vizsgálni kívánt gének mennyiségi változásának elemzését [170] [171].

A reakciók megkezdése előtt specifikus primer párok tervezésére volt szükség a vizsgálataink szempontjából releváns géntermékek amplifikációjához, melyhez az NCBI Primer-BLAST programját használtuk, gyártásukat az Integrated DNA Technologies cég végezte. A felhasznált primerek szekvencia adatai a 4.3. és 4.4. táblázatban találhatók.

A primerek beérkezését követően első lépésként konvencionális PCR reakciókat kellett elvégeznünk a megfelelő standard görbék létrehozásához. Ehhez a Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase kit-et (Promega) használtuk, a reakciók pontos komponensei a következők voltak (egyenként 50 µl-es összterefogatú reakcióelegynél): 1,25 egység GoTaq polimeráz; 3 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP (dezinukleotid-trifoszfát); 200 nM primer; 50 ng cDNS (csirkeembrió eredetű vizsgálatok esetében 3 vagy 6 napos kontroll, egérembrío eredetű vizsgálatok esetében 6 napos kontroll HD kultúrákból származó minták hígításából létrehozva). Az amplifikációs lépés egy programozható PCR készülékben (MultiGene 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) történt meg, a következő paraméterek beállításával: elsődleges denaturáció (95 °C, 5 perc); 40 ciklus az alábbi lépésekkel: denaturáció (95 °C, 15 másodperc), primerek bekötődése (58 °C, 20 másodperc), meghosszabbítás (74 °C, 20 másodperc); utolsó meghosszabbítás (74 °C, 5 perc). A primerek specifikus működésének ellenőrzését a PCR reakciót követően a minták 1,5%-os agaróz gélben való megfuttatásával ellenőriztük, majd az amplifikált PCR termékeket a Roche High Pure PCR Product Purification kit-tel (Roche, Basel, Svájc), a gyártó leírása szerint izoláltuk. Az így kapott tisztított DNS termék tisztaságát és koncentrációját Nanodrop készülékkel állapítottuk meg, majd a standard görbe létrehozásához az izolált PCR termékből 10× léptékű hígítási sort alkottunk (kezdő koncentráció: 1 ng/µl).

A valós idejű kvantitatív PCR során 10 µl-es végtérfogatú reakció elegyekkel dolgoztunk, az elegy komponensei a következők voltak: 5 µl GoTaq QPCR Master Mix (Promega), 1 µl forward primer és 1 µl reverse primer (hígítási arány: 1:33), 1 µl NFW, 2 µl (20 ng) cDNS. A reakciók a QuantStudio 3 Real-Time PCR System-ben (Thermo Fisher Scientific) történtek meg, a következő paraméterek beállításával: aktiváció és első denaturációs lépés (95 °C, 2 perc); 40 ciklus a következő lépésekkel: denaturáció (95 °C, 3 másodperc), annealing és extenzió (60 °C, 30 másodperc), utolsó extenzió (72 °C, 20 másodperc). A specifikus amplifikációs adatok az extenziós lépés alatt generálódtak. Az amplifikáció után következett az olvadási görbe szakasz: denaturáció (95 °C, 15 másodperc), annealing (55 °C, 1

perc), disszociáció (55 °C és 95 °C között, 0,15 °C-os emelkedési lépcsővel). A reakció során megszerzett amplifikációs értékeket a QuantStudio Design and Analysis szoftver (1.4.3-as verzió) segítségével analizáltuk, majd az exportált adatokat a Microsoft Excel programmal (15.14-es verzió) vizsgáltuk tovább. A biológiai különbségek megállapításához szükség volt egy optimális referencia gén meghatározására. Az adott vizsgálathoz leginkább megfelelő normalizáló gént a NormFinder program által meghatározott algoritmus (<https://moma.dk/normfinder-software>) segítségével választottuk ki [172]. Ezen lépés miatt több referencia gént is teszteltünk, az expressziós stabilitási értékek összehasonlításával pedig ki tudtuk választani a vizsgálataink szempontjából legmegfelelőbb normalizáló gént. A kísérleteink során vizsgált gének expressziós értékeit mindig a legstabilabbnak választott referencia gén expressziós adataihoz normalizáltuk. Az RT-qPCR reakciók kivitelezésében a szerző mellett Rauch Tibor, Matta Csaba, Katona Éva és Abdulhadi M. Alagha vett részt.

4.3. táblázat: Az egérembrió eredetű HD kultúrákkal végzett qPCR reakciókhoz használt primer párok szekvencia adatai

Gén	Azonosító kód	Primer szekvencia	Amplikon mérete (bp)
1. DNS metiláció markergének			
Dnmt3a (<i>Mus Musculus</i>)	XM_006514953.3	CTGTCCCTACGACCAAGTGC CTGATGTCAAGCCCTCGGAA	110
Tet1 (<i>Mus musculus</i>)	NM_001253857.2	CTGGGGCCATCCAAGTCAAT TGTGTGAACCTGATTTATTGTGGT	120
Ogt (<i>Mus musculus</i>)	NM_139144.4	TTCAGTATTCTGTGCCGCC TCGTTGGTTCTGTACTGTCCG	188
2. Porcfejlődés markergének			
Sox9 (<i>Mus musculus</i>)	NM_011448.4	GGAAGTCGGTGAAGAACGGA AGATTGCCAGAGTGCTCG	158
Col2a1 (<i>Mus musculus</i>)	NM_031163.3	TCATCTTGCCGCATCTGTGT TGCCCTTTGGCCCTAATTT	164
Acan (<i>Mus musculus</i>)	XM_006540566.1	ATTCCCGCCACCTACCT GCTGACTAGGTTTCGGAGCA	190
3. Referencia gének			
Actb (<i>Mus musculus</i>)	NM_007393.5	AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	174
Sdha (<i>Mus musculus</i>)	NM_023281.1	TCGACAGGGGAATGGTTTGG GGACTCCTCCGAGCTTCTG	110

4.4. táblázat: A csirkeembrió eredetű HD kultúrákkal végzett qPCR reakciókhoz használt primer párok szekvencia adatai

Gén	Azonosító kód	Primer szekvencia	Amplikon mérete (bp)
1. Molekuláris óra markergének			
BMAL1 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_001001463.2	CTGTGACAGAGGGAAGATACTGT TGGCAATGTCTTTCGGATGAAGG	119
PER2 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204262.1	CCAACCTTTGTTGTGTGCTCCTTGC CTGGAACAAACAGGTTGGTGTGTG	115
PER3 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_001289779.1	CGTTGGTACAGCCCTGTTTG ACCCAGTTTTTCAGTCGCTCAT	180
CRY1 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204245.1	GGGTCTTCTTGCAACAGTGC CGCCAACGTCTGACCATCA	143
CRY2 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204244.1	CAGGGGAGACCTCTGGATCA AAGAATGCGCTGCACGAAAG	120
2. Porc- és csontfejlődés markergének			
SOX9 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204281.1	TTTCCGAGACGTGGACATCG GTACCGCTGTAGGTGGTGAC	150
COL2A1 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204426.1	GGGACCTCAAGGCAAAGTCG TTCCAGGCTCACCATTAGCG	140
ACAN (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204955	AGCAGTAGATGCACTGGGAC GCCAGGTGATCTCACACAG	153
RUNX2 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204128	GAGTCAGATTACAGACCCCAGG AAATGGGCCCAGCTCGGAA	199
3. Referencia gének			
PPIA (<i>Gallus gallus</i>)	NM_001166326.1	GAGCTCTTCGCTGACAAGGT GCGTAAAGTCACCACCCTGA	139
YWHAZ (<i>Gallus gallus</i>)	NM_001031343	GTTCCCTTGCAAAAACGGCT GAGGCAGACGGAAGTTGGAA	199
RPLP0 (<i>Gallus gallus</i>)	NM_204987.2	GAACGTGGGCTTTGTGTTCA AGGAGGTCTTCTCAGGTCCG	158

4.6. Kvantitatív metiláció-specifikus PCR analízis

Az egérembrió végtagtelep eredetű primer HD kultúrák esetében a genomiális DNS tisztítása és azt követően a templát biszulfid konverziója az EZ DNA methylation-direct™ kit-tel (Zymo Research) történt meg, a gyártó utasításai alapján. A DNS metilációs szintjének változásait kvantitatív metiláció-specifikus PCR (qMSP) módszerrel határoztuk meg. A qMSP-hez használt primereket a MethPrimer 2.0 szoftver segítségével terveztük meg. Negatív kontrollként a TATA box-kötő fehérje (*Tbp*) promóter régióját használtuk, mivel az sosem mutat metilációt [173]. A qMSP során szerzett expressziós értékeket a nem metilálódott *Tbp* promóter-specifikus primerek értékeihez normalizáltuk. A pozitív kontrollhoz a *Prickle1* gén 3' terminális exon régiójára terveztünk primereket. A kontrollként használt gének és a

porcspecifikus markergének qMSP primer-szekvencia adatait a 4.5. táblázatban foglaltuk össze. A qMSP reakciók egy CFX96 PCR gépben (Bio-Rad) történtek meg, a reakciók során szerzett expressziós adatokat a CFX adatkezelő szoftverrel dolgoztuk fel. A qMSP reakciók kivitelezését Rauch Tibor végezte.

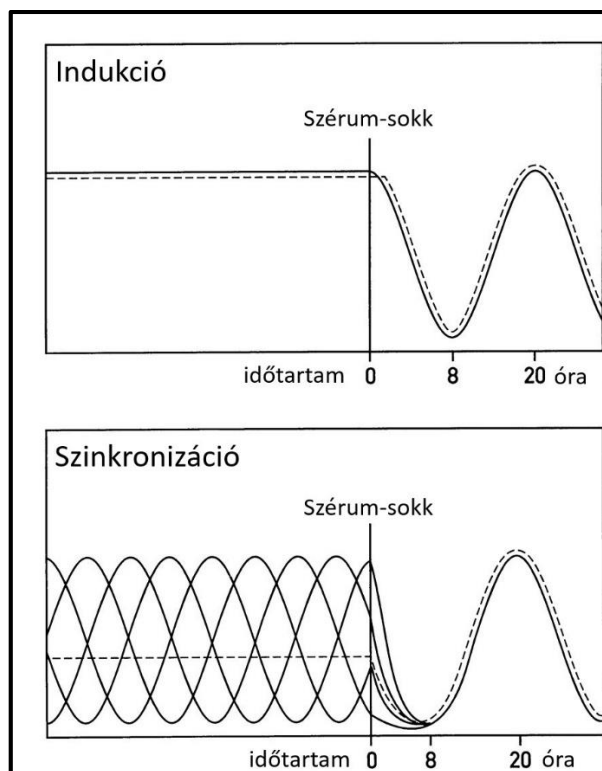
4.5. táblázat: Az egérembrió eredetű HD kultúrákkal végzett qMSP reakciókhoz használt metilált (M) és nem-metilált (UM) primer párok szekvencia adatai

Gén			Primer szekvencia
M- spec.	TBP_Foward	<i>Mus musculus</i>	GGGGATTCGTTGTAGAAGTC
	TBP_Reverse	<i>Mus musculus</i>	CGACATCAAATATACGTCAAACG
UM- spec.	TBP_Foward	<i>Mus musculus</i>	GGGGATTTGTTGTAGAAGTTG
	TBP_Reverse	<i>Mus musculus</i>	AATAACAACATCAAATATACATCAAACATT
M- spec.	PRK_Foward	<i>Mus musculus</i>	AGAAGTAGAAAGTTTCGGTTCGATA
	PRK_Reverse	<i>Mus musculus</i>	ACATAAACATACTAACTATAAAAAATTAACG
UM- spec.	PRK_Foward	<i>Mus musculus</i>	GGAGAAGTAGAAAGTTTTGGTTT
	PRK_Reverse	<i>Mus musculus</i>	CATAAACATACTAACTATAAAAAATTAACA
M- spec.	Col2a_Foward	<i>Mus musculus</i>	GGGATTGTAGATAATTTCTGGG
	Col2a_Reverse	<i>Mus musculus</i>	ACAATCCCTAACCAACGATT
UM- spec.	Col2a_Foward	<i>Mus musculus</i>	GGATTGTAGATAATTTTGGGG
	Col2a_Reverse	<i>Mus musculus</i>	CCAACAATCCCTAACCAACAAT
M- spec.	Acan_Foward	<i>Mus musculus</i>	GTTTTAGGAAGAAGAATTTTCG
	Acan_Reverse	<i>Mus musculus</i>	TACTCTATAATAAACTAATAAATACCCGC
UM- spec.	Acan_Foward	<i>Mus musculus</i>	GTTTTAGGAAGAAGAATTTTG
	Acan_Reverse	<i>Mus musculus</i>	CTCTATAATAAACTAATAAATACCCACTC
M- spec.	Sox9_Foward	<i>Mus musculus</i>	TAGATTTGTATATAGGTGGGCG
	Sox9_Reverse	<i>Mus musculus</i>	AAATTTAAATAAACACGCAACTTCG
UM- spec.	Sox9_Foward	<i>Mus musculus</i>	AGATTTGTATATAGGTGGGTG
	Sox9_Reverse	<i>Mus musculus</i>	ATTTAAATAAACACACAACCTTCAACT

4.7. A cirkadián óra szinkronizációja

A csirkeembrió végtagtelep eredetű primer HD kultúrákban található mezenchimális sejtek molekuláris cirkadián óráját a *de facto* porc fejlődésének legkorábbi szakaszában szinkronizáltuk, melyhez az úgynevezett szérum-sokk eljárást alkalmaztuk [174]. Ez a módszer lehetővé teszi a cirkadián óra jellegzetes faktorainak génexpressziós szinkronizálását, az expressziós fázis-változások kinetikájának vizsgálatával pedig megfigyelhetjük a cirkadián ritmicitás meglétét és jellemzőit. A szérum-sokk hatására kialakuló ritmikus génexpressziós mintázat hátterében két magyarázat állhat. Egyes esetekben a már működő, deszinkronizált

cirkadián transzkripciós ciklusok a kezelés hatására szinkronizálódnak, míg más feltételezések szerint a ritmikus génexpressziót nem mutató sejtekben a szérumsokk indukálja a szinkronizált oszcillációt mutató transzkripciós aktivitást (4.1. ábra). A szérumsokk során a tenyésztés első napján az általánosan használt 10% FBS-tartalmú F12 tápoldatot eltávolítottuk a kultúrákról, majd 2 órára 50% FBS-tartalmú F12 médiumot adtunk a kolóniákhoz. Az inkubációt követően eltávolítottuk a magas FBS-tartalmú tápoldatot, majd kétszeres PBS-es mosás következett, végül ismét normál, 10% FBS-tartalmú F12 médiumot adagoltunk a mintákhoz. Szintén vizsgáltuk az érett porcsejteket tartalmazó 6 napos HD kultúrák cirkadián órájának működését, ahol az 1. tenyésztési nap helyett a 6. tenyésztési napon alkalmaztunk a 2 órán át tartó szérumsokk alapú óraszinkronizációt. A szérumsokk időpontját tekintjük a kísérlet kiindulási időpontjának, azaz a 0. órának. A szinkronizációt követő 24. és 72. óra között 8 óránként történt a mintagyűjtés. A kontroll kultúrák esetében nem történt szinkronizáció: a 2 órás szérumsokk ideje alatt ezen kultúrák friss, 10% FBS-tartalmú médiummal lettek ellátva. A kontroll kolóniákat is ugyanazokban a 0. órát követő vizsgálati időpontokban arattuk le, mint a szinkronizált kultúrákat. Bizonyos szérumsokkolt, illetve kontroll kultúrákat a szinkronizációt követően a tenyésztés 3., illetve 6. napján arattunk le, ami lehetővé tette a molekuláris óra szinkronizációjának (illetve a 4.8. pontban bemutatásra kerülő kezelőanyag) porcfejlődésre kifejtett hosszabb távú hatásának vizsgálatát. A micromass kultúrákat a learatás napján kétszeres PBS-es mosást követően $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk az RNS izolálás időpontjáig. *A szérumsokk alapú szinkronizációs kísérletek kivitelezésében a szerző mellett Matta Csaba, Katona Éva és Abdulhadi M. Alagha vett részt.*



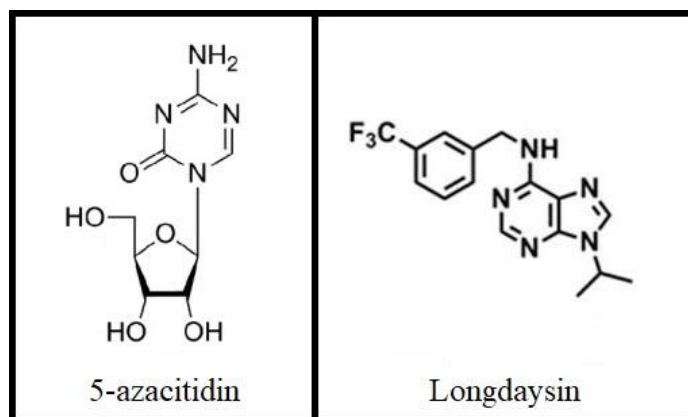
4.1. ábra: A cirkadián óra újraindításának, vagy alaphelyzetbe állításának lehetőségei. A szérum-sokk alkalmazásával egyes esetekben elérhetjük, hogy a ritmikus génexpressziót nem mutató sejtek az indukció révén szinkronizált oszcilláló transzkripció aktivitást mutassanak. Ezzel szemben bizonyos sejtekben a már meglévő, deszinkronizációt mutató cirkadián transzkripció ciklusok szinkronizációját idézheti elő a szérum-sokkal való kezelés. Az mRNA expresszió várható dinamikáját szaggatott vonal jelöli. (Forrás: [174])

4.8. Az *in vitro* porcfejlődés befolyásolása különböző farmakonokkal

A DNS metiláció *in vitro* porcfejlődés alatt betöltött szerepét az 5-azacitidin (5-azaC, Kat. szám: A2385; Sigma-Aldrich) alkalmazásával vizsgáltuk. A kezelőanyag gátolja a DNS metiltransferázok kötődését a meghatározott kötőhelyeikhez, ezáltal DNS demetilációt idéz elő, és specifikus gén régiók aktiválódásához vezet [106]. Az 5-azaC-t dimetil-szulfoxidban (DMSO; Sigma-Aldrich) oldottuk fel, 10 mM-os törzsoldatot létrehozva, majd 10 μ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk. Primer egér HD kultúrák esetében a tenyésztés 1. vagy 3. napjától adminisztráltuk 72 órán keresztül, a kultúrák fenntartását a 4. vagy a 6. napon fejeztük be.

A molekuláris óra működését longdaysin (LDS, Kat. szám: SML0127, Sigma-Aldrich) kezelőanyag alkalmazásával befolyásoltuk. Az LDS gátolja a kazein kináz I aktivitását, amely így nem képes foszforilálni a PERIOD fehérjét, ezáltal elmarad azok proteaszómális degradációja, mindezek pedig a cirkadián periódusok meghosszabbodásához, az óra

diszregulációjához vezetnek [175]. A kezelőanyag DMSO-ban lett feloldva (5 mM-os törzsoldat), és 5 μ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A primer csirke HD kultúrákat a tenyésztés első napján (egyes esetekben a szérumsokkot követően) 24 órán keresztül kezeltük, a kontroll kultúrákhoz a kezelőanyag mennyiségével megegyező DMSO-t adtunk. A kultúrákat a tenyésztés 3. vagy 6. napjáig tartottuk fent. *A kezelések kivitelezésében a szerző mellett Karanyicz Edina és Matta Csaba vett részt.*



4.2. ábra: A DNS metilációt módosító 5-azacitidin, és a cirkadián óra működését befolyásoló longdaysin farmakonok kémiai felépítésének bemutatása. (Forrás: [175], [105])

4.9. Életképesség vizsgálata

A sejtek életképességében bekövetkező változásokat MTT-teszt segítségével állapítottuk meg. A teszt alapja az, hogy az adott biológiai rendszerben megtalálható élő sejtek képesek felvenni, majd bizonyos mitokondrium-specifikus enzimek által átalakítani a teszt során alkalmazott MTT-reagens fő komponensét, a sárga színű tetrazólium-bromid sót, amely így lila színű formazán-kristályokká alakul át. A kristályok kioldását követően a kapott folyadék kolorimetriás analízisével következtethetünk az élő sejtek arányára, metabolikus aktivitásuk mértékére [176].

Mind a primer csirke, mind pedig a primer egér HD kultúrák esetében 30 μ l-es sejtuszpenzió cseppeket pipettáztunk 24-lyukú tenyésztő edényekbe. A csirke micromass kultúrák életképességét az alkalmazott kezeléseket követően, a tenyésztés 3. napján vizsgáltuk meg. Az egér micromass kultúrák metabolikus aktivitását szintén az 5-azaC kezelést követően, a tenyésztés 4. vagy 6. napján analizáltuk. A protokoll szerint az adott vizsgálati napon 25 μ l MTT reagenst (3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid, 5 mg MTT 1 ml PBS-ben feloldva; Sigma, Budapest, Magyarország) mértünk a kultúrákon található médiumhoz (a

végterfogot így 1025 µl, az MTT végkoncentrációja pedig 0,122 mg/ml lett), majd a mintákat 2 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a kultúrákról eltávolítottuk a tápoldatot, majd 500 µl MTT-szolubilizáló oldatot (10% Triton X-100 2-propanolban) adtunk a mintákhoz, és egy microplate-leolvasó készülék segítségével (Chameleon, Hidex Ltd., Turku, Finnország) 570 nm-en mértük a kioldott MTT reagenst tartalmazó folyadék optikai denzitását. A reagensvak méréséhez a szolubilizáló oldat mennyiségével megegyező NFW-t használtunk. A méréseket 3 független kísérlet sorozat alapján végeztük, egy kísérleti csoportnál 3 mintából mért értékeket vettünk alapul. A kezeléseknél kitétt kísérleti csoportok értékeit a DMSO-val kezelt oldószeres kontroll csoport értékeihez viszonyítottuk. A disszertációban bemutatott ábra egy, a biológiai trendnek megfelelő kísérleti sorból származó eredményeket mutat be. A kapott értékeket Excel táblázatban dolgoztuk fel, és a statisztikai analízist Student-féle *t*-próbával végeztük el. Az *MTT-teszt kivitelezésében a szerző mellett Matta Csaba vett részt.*

4.10. Sejtproliferációs képesség ellenőrzése

A sejtosztódási képességben bekövetkező változásokat egy radioaktív izotópot igénylő technikával vizsgáltuk. A tríciummal (³H) jelölt timidin képes beépülni a szintetizálódó DNS-be, így a mintában mérhető radioaktivitásból következtethetünk a sejtproliferáció mértékére [8].

A módszert csak az 5-azaC-vel kezelt és kontroll egérembrió végtagtelep eredetű HD kultúrák esetében alkalmaztuk, a kolóniákat 10 µl mennyiségű sejtsuszpenziók kicseppentésével hoztuk létre 96-lyukú tenyésztő edényekben. A tenyésztés 3. vagy 5. napján, 16 órával a kezelés lejárta előtt, 1 µCi/ml ³H-timidint (törzsoldat: metil-³H-timidin, 185 GBq/mM; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Egyesült Királyság) mértünk a kultúrákon található médiumhoz. Az inkubáció lejártaival PBS-sel mostuk a mintákat, majd a fehérjéket 20 percen át jéghideg 5% triklórecetsav alkalmazásával csaptuk ki, ezt pedig egy újabb PBS-es mosás követte. A mintákat egy héten keresztül szobahőn szárítottuk, végül 50 µl szcintillációs folyadékot (MaxiLight; Hidex, Finnország) mértünk a kultúrákra, és microplate-olvasó készülék alkalmazásával (Chameleon) detektáltuk a minták radioaktivitását. Az eredményeket 3 független kísérlet sorozatból nyertük, az alkalmazott mintaszám 9 volt egy kísérleti csoportban. A bemutatott ábra egy, a trendnek megfelelő kísérleti sorból származó eredményeket mutat be, ahol a szignifikáns eltéréseket Student-féle *t*-próba segítségével állapítottuk meg. *A sejtproliferációs tesztek kivitelezését a szerző végezte.*

4.11. Metakromáziás festési technikák alkalmazása

Az általánosan használt szövettani festési eljárások leírásakor beszélhetünk ortokromáziáról, amikor a felhasznált festék az eredeti színével fest meg bizonyos makromolekulákat, sejt- és szövetkomponenseket. Ezzel szemben az úgynevezett metakromázia esetében az alkalmazott festék a saját színétől eltérő színnel jelöl bizonyos struktúrákat. Kísérleteink során a kvalitatív dimetil-metilénkék (DMMK) és a szemikvantitatív toluidinkék szövettani festékek alkalmazásával figyeltük meg a fejlődő porcban termelődő porcspecifikus ECM mikroszkópikus változásait. Mindkét festék ortokromáziás színe a kék, míg metakromáziás elszíneződéskor püspöklila árnyalatot figyelhetünk meg az általunk vizsgált porc irányába differenciálódó micromass kultúrákban. A metakromáziát a termelődő porcmátrixban található nagy mennyiségű proteoglikán és glükózaminoglikán makromolekulák okozzák, ugyanis ezen komponensek erősen negatív töltéssel bírnak a hozzájuk kapcsolódó szulfát csoportok miatt. A negatív töltéssel rendelkező struktúrákhoz a jelölt festékek nagyobb mennyiségben aggregálódnak, polimerizált formában kötődnek, ezáltal a fénymikroszkópban a területen áteső fény hatására a festék az eredeti színétől eltérő árnyalatban fog megjelenni [15].

A hisztotechnikai vizsgálatokhoz a csirkeembrió végtagtelep eredetű HD kultúrák esetében 100 µl-es cseppeket pipettáztunk 30 mm átmérőjű üveglemezzel ellátott 6-lyukú tenyésztő edényekbe, míg az egérembró végtagtelep eredetű HD kultúrákat 30 µl-es cseppek kicseppentésével hoztuk létre, 10 mm átmérőjű üveglemezzel ellátott 24-lyukú tenyésztő edényekben. A csirke HD kultúrák porcmátrix-termelődését a tenyésztés első napjától a hatodik napjáig minden tenyésztési napon nyomon követtük, míg az egér HD kultúrákat csak a tenyésztés 4. és 6. napjain festettük meg. DMMK festés esetében első lépésként a kultúrákat az adott vizsgálati napon kétszer átmostuk PBS-sel, majd 30 perces fixálás következett abszolút alkohol és 40% formalin 4:1 arányú keverékével. Ezt leszálló alkoholsor alkalmazásával rehidráció követte, majd 3%-os ecetsavval mostuk át a kultúrákat. Ezután következett a festés 3% ecetsavban (pH 1,8) oldott 0,1%-os DMMK (Sigma-Aldrich) oldattal 5 percen keresztül, majd a nem kötődött festék kimosását követően a mintákat Aquatex (Sigma-Aldrich) vizes alapú ragasztó segítségével fedtük le. A DMMK-festett kultúrákról egy Nikon Eclipse E800 mikroszkópra szerelt Olympus BX53 kamerával készítettünk felvételeket 4× nagyítás alkalmazásával. Toluidinkék festéssel való vizsgálatnál a mintákat először PBS-sel mostuk, majd Kahle-féle fixálóval (28% abszolút alkohol, 4% formalin és 2% ecetsav) fixáltuk 15 percen keresztül. Ezután következett a glicin–hidrogén-klorid (HCl) pufferben (pH 1,8) oldott 0,1 %-os toluidinkékkel (Reanal, Budapest, Magyarország) való festés, újabb 15 percen át. A

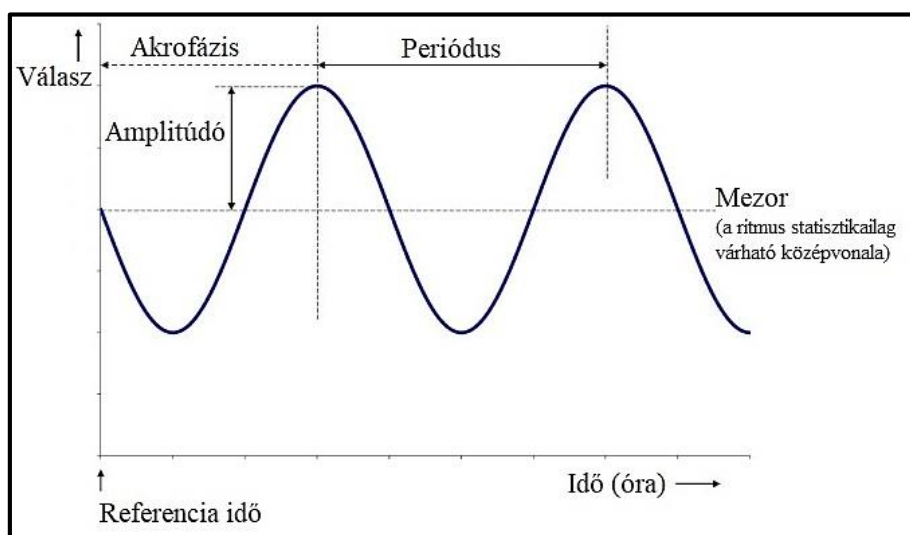
felesleges festék eltávolítását követően abszolút etanolban oldott 8% HCl felhasználásával visszaoldottuk a negatív töltésű porcmátrix makromolekulákhoz kötődött toluidinkék festéket, és mikroplate-leolvasó készülékkel (Chameleon) 625 nm-en mértük a minták optikai denzitását. 3 független biológiai kísérletsorozat történt, sorozatonként 3-3 különálló kultúra megfestésével.

Szintén DMMK festést alkalmaztunk kriosztáttal metszett 15 napos teljes egérembrío metszeteken, melyeket kontrollként használtuk az *in situ* hibridizációs kísérleteinkhez. A metszeteket az *In situ hibridizáció* c. bekezdésben leírt protokoll alapján készítettük el. A lefagyasztott metszeteket $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, majd a festés napján először 10 percen át szobahőn, majd egy órán keresztül $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on szárítottuk. 2×10 perces desztillált vizes mosást követően desztillált vízben oldott 0,1 %-os DMMK festékkel festettük meg a mintákat 5 percen keresztül, majd a nem kötődött festéket kimostuk, és a metszeteket DPX fedőragasztóval fedtük. A megfestett metszetekről a fentebb leírtak szerint készítettünk digitális felvételeket. A *metakromáziás festések kivitelezésében és a vizualizációban a szerző mellett Karanyicz Edina, Takács Roland és Matta Csaba vett részt.*

4.12. Statisztikai analízis

A disszertációban bemutatott kísérleti eredmények az ábrák többségén egy-egy reprezentatív adatsort jelenítenek meg, azonban minden esetben több (általában 3, egymástól független) parallel kísérletsort vittünk véghez. A bemutatott ábrákon egy-egy kísérleti sorozatból származó átlagolt eredmények láthatóak, a hibasávok az átlag standard hibáját (standard error of the mean, SEM) vagy a szórást (standard deviáció, SD) jelzik. A qPCR reakcióknál 3 (hasonló tendenciát mutató) parallel kísérletből egy reprezentatív adatsor került megjelenítésre. Az adatokat a béta-aktin (*Actb*; a C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonallal eredetű sejtekből létrehozott HD kultúrák esetében), a szukcinát dehidrogenáz flavoprotein A alegység (*Sdha*; az egérembrío végtagtelep eredetű HD kultúrák RT-qPCR elemzésénél), a TATA box-kötő fehérje (*Tbp*; az egérembrío végtagtelep eredetű HD kultúrák qMSP analízisének), a peptidilprolil-izomeráz A (*PPIA*), a tirozin 3-monooxygenáz/triptofán 5-monooxygenáz aktiváló fehérje zéta polipeptid (*YWHAZ*), vagy a P0 riboszómális fehérje alegység (*RPLP0*) (utóbbi három gén a csirkeembrio végtagtelep eredetű HD kultúrák esetében) referencia gének expressziós adataihoz normalizáltuk. Az egyes kísérleti modellek analíziséhez leginkább megfelelő referencia gén kiválasztása a NormFinder szoftver segítségével történt meg. A numerikus adatok analíziséhez a Microsoft Excel (15.14-es verzió) programot használtuk.

A cirkadián óra markergének ritmikusan változó mintázatát egy nem-lineáris cosinor regresszió alapuló módszerrel határoztuk meg, ahol a qPCR reakciók során kapott expressziós adatok alapján megállapítottuk a cirkadián oszcilláció meglétét és a ritmicitás jellemzőit. A cirkadián ritmusokat alapesetben négy tényező megadásával szokták jellemezni, ezek a mezor, az amplitúdó, a periódus és az akrofázis [177], egymáshoz való viszonyukat a 4.3. ábra mutatja be. A mezor a ritmushoz igazított átlagértéket jelöli, a többi változó ezen középérték körül mutat oszcillációt. Az amplitúdó a mezortól való pozitív vagy negatív irányú devianciát mutatja, amely tulajdonképpen a ciklus várható változásának félértékét adja meg. A periódus a teljes ciklus időtartamát, az akrofázis pedig azt az időtartamot jelöli, amely alatt a ciklus eléri a maximális, pozitív irányú értékét. A standard cosinor funkció paramétereit a Prism program (7.04-es verzió, GraphPad szoftver, San Diego, CA, USA) segítségével vizsgáltuk [178], ahol a periódust, az akrofázist, az amplitúdót és a mezort szabad, nem korlátozott változókként adtuk meg. A kísérletek során kapott adatok statisztikai kiértékelése és a statisztikai különbségek megállapítása a Student-féle kétmintás *t*-próba, vagy a Tukey HSD-vel és Mann-Whitney teszttel kiegészített egyszempontos ANOVA segítségével történt meg. A változásokat az adott vizsgálati csoport kontroll kultúráiban mért expressziós adataihoz viszonyítottuk, a változást $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük az ábrákon ($P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$). *A statisztikai analízisek kivitelezésében Vágó Judit, Matta Csaba, Ducza László, Abdulhadi M. Alagha, Daan van der Veen és Rauch Tibor vett részt.*



4.3. ábra: A cirkadián ritmus meglétét és a ritmicitás jellemzőit a nem-lineáris cosinor regresszió alapuló módszer segítségével állapítottuk meg. A cosinor analízis során egy görbe illeszthető a kísérlet során kapott adatokra, ha azok a cirkadián ritmicitásra jellemző változást mutatják. A görbe paramétereinek jellemzésére négy tényező használható: a mezor, az amplitúdó, a periódus és az akrofázis. (Forrás: [177], módosítva)

5. EREDMÉNYEK

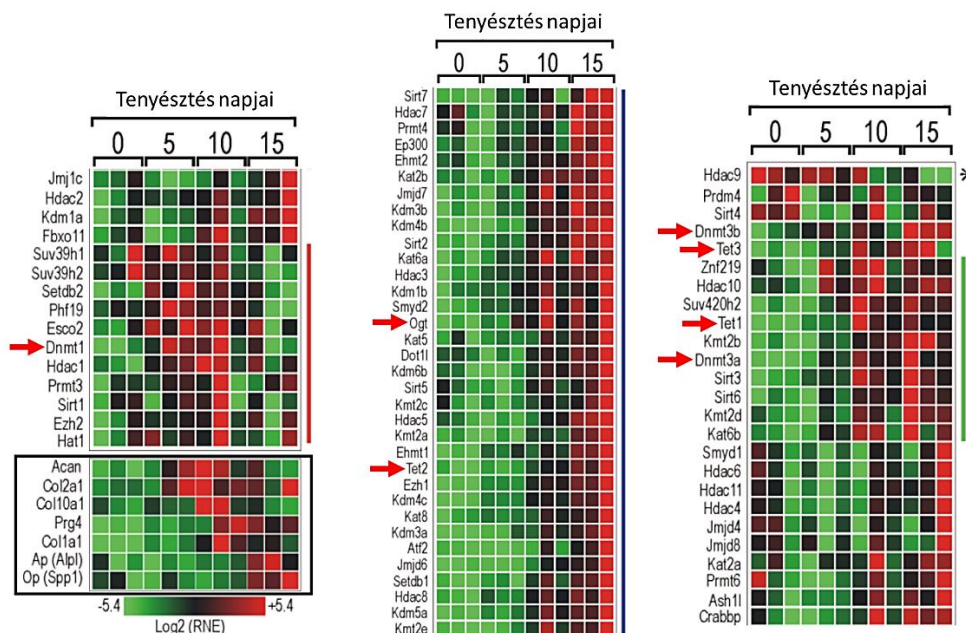
5.1. A DNS metiláció génszintű szabályozásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* porcdifferenciáció során egér eredetű kondrogenikus modellekben

5.1.1. Epigenetikai szabályozó faktorok génexpressziójának PCR array-alapú elemzése

A DNS metiláció-orientált vizsgálatok megkezdése előtt szeretnénk volna igazolni a főbb epigenetikai szabályozó útvonalak (a DNS metiláció és a hiszton módosítások) jellemző markergénjeinek expresszióját, illetve a vizsgált gének kifejeződésében bekövetkező változásokat az *in vitro* porcfejlődés során. Ehhez C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonal eredetű sejtekből porc irányába differenciálódó HD kultúrákat hoztunk létre, amelyeket a kondrogenezis meghatározott fejlődési napjain (0., 5., 10., 15. tenyésztési nap) arattunk le, majd a markergének expressziós mintázatát PCR array segítségével követtük nyomon (5.1. ábra). Sikeresen igazoltuk a vizsgálatra kiválasztott összes gén mRNS-szintű kifejeződését. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a DNS metilációval kapcsolatba hozható markergének jelentős része csak a porcdifferenciáció későbbi szakaszában (a 10. és 15. tenyésztési napok között) mutatott emelkedést expressziós szintjében (ezek a *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, *Ogt*), egyedül a *Dnmt1* gén esetében tapasztaltunk korai stádiumban (tenyésztés 5. és 10. napja között) jelentkező expressziós aktivitást. További vizsgálataink három DNS metiláció-asszociált markergén kifejeződésére összpontosítottak. A *Dnmt3a* a DNS metilációját, míg a *Tet1* és *Ogt* gének ezzel ellentétesen a DNS demetilációját idézik elő. A *Dnmt3a* és *Tet1/Ogt* gének közötti szabályozási egyensúly meghatározza a genom aktuális metilációs mintázatát (metilóm), ezáltal befolyásolhatják a különböző biológiai folyamatok (akár a porcfejlődés) markergénjeinek helyhez és időhöz kötött expresszióját. A PCR array segítségével az *in vitro* porcdifferenciáció alatt megfigyeltük, hogy a *Dnmt3a* expressziós szintje a tenyésztés 15. napján, a *Tet1* expressziós szintje a tenyésztés 10. napján, míg a *Tet1*-gyel jelátviteli interakciót mutató *Ogt* a tenyésztés 10. és 15. napja között mutatott expressziós aktivitást.

Szintén alátámasztottuk a porcfejlődés markergénjeinek kifejeződését a sejtvonal eredetű porcosodó HD kultúrákban. A porcspecifikus ECM markergénjei, a *Col2a1* és *Acan* expressziós szintjeinek megemelkedése a porcdifferenciáció korai szakaszában figyelhető meg (tenyésztés 5. és 10. napja között), míg a hipertrófiás porcsejtekre jellemző *Col10a1*, az

osteogenikus differenciáció kezdetét jelző *Col1a1*, a porcmineralizációs folyamatok és a csontosodás megindulásának markerei (*Ap*, *Op*) a porcfejlődés későbbi szakaszában (tenyésztés 10. és 15. napja között) mutatnak emelkedést expressziós szintjükben.

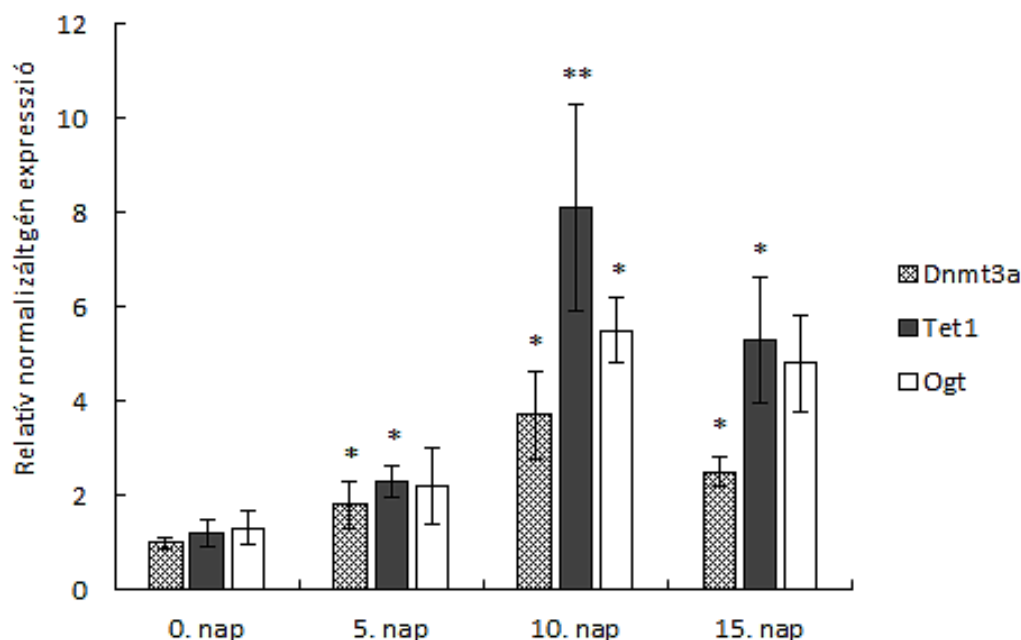


5.1. ábra: Az *in vitro* porcfejlődés specifikus napjain (0., 5., 10., 15. tenyésztési napok) learatott C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonallal eredetű porcosodó micromass kultúrákkal végzett PCR array eredményei. A különböző epigenetikai faktorok porcdifferenciációval kapcsolt génszintű expressziós változásai hő térkép formájában kerültek megjelenítésre. A piros színű négyzetek az upregulált, míg a zöld négyzetek a downregulált géneket jelzik. A piros vonal mellett elhelyezkedő gének jellemzően az 5. és 10. tenyésztési napok között upregulálódnak. A kék vonal mentén elhelyezkedő gének a 15. tenyésztési napnál mutatnak génexpressziós aktivitást. A zöld vonal mellett található gének a 10. és 15. tenyésztési napok között jeleznek upregulációt. A DNS metiláció markergénjeit piros nyilakkal jelöltük. A fekete téglalappal jelölt területen a porcdifferenciáció markergénjei láthatóak.

5.1.2. A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* génexpressziós változásainak vizsgálata C3H10T1/2+BMP-2 eredetű micromass kultúrákban

A PCR array-t követően egy érzékenyebb molekuláris biológiai módszerrel tanulmányoztuk tovább a 3 kiválasztott DNS metiláció-markergén expressziós változásait az *in vitro* porcfejlődés folyamán. A kvantitatív PCR lehetővé tette, hogy valós időben kövessük nyomon a reakció alatt mintáinkban lezajló géntermék sokszorozódást, így a porcdifferenciációs folyamatok szempontjából pontosabb eredményeket kaphattunk a gének relatív expressziós mintázatáról. A specifikus tenyésztési napokon learatott C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonallal eredetű HD kultúrák vizsgálata során a legnagyobb expressziós szintbeli emelkedést mindhárom gén esetében a 10. tenyésztési napon tapasztaltuk (*Dnmt3a*: $3,7 \pm 0,91$; *Tet1*: $8,1 \pm$

2,2; *Ogt*: $5,5 \pm 0,7$), ezek az eredmények nagy mértékben átfednek a PCR array eredményeivel (5.2. ábra). A legnagyobb mértékű változást a 3 gén közül a *Tet1*-nél figyeltük meg: már az 5. tenyésztési napon szignifikáns expressziós növekedést tapasztaltunk ($2,3 \pm 0,32$), és egészen a 15. napig megfigyelhettük a megemelkedett transzkriptum-szintet ($5,3 \pm 1,32$).

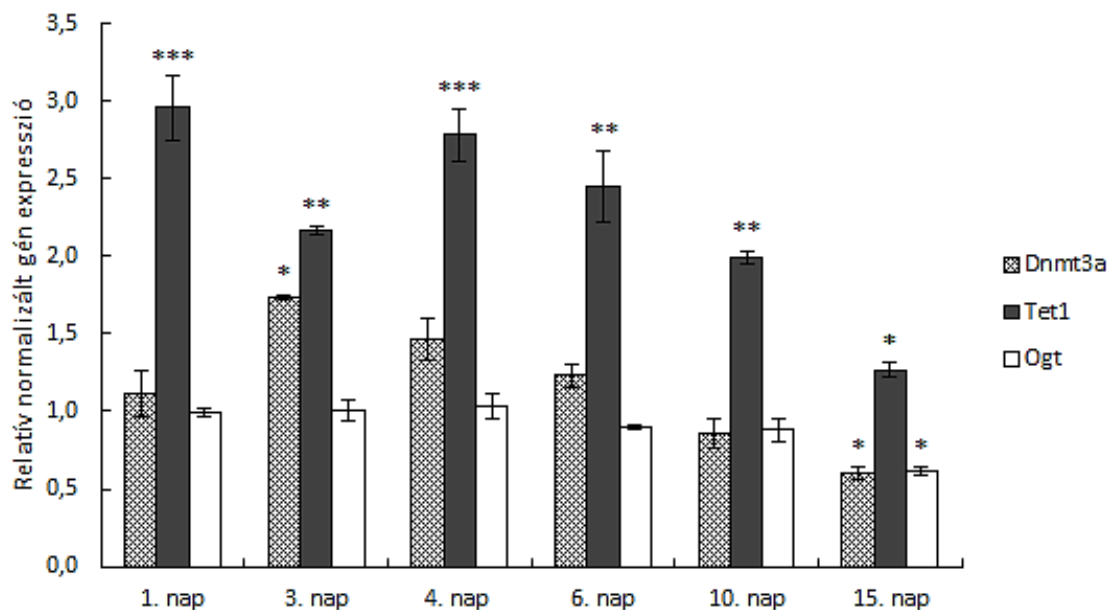


5.2. ábra: A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* gének expressziós változásainak nyomon követése RT-qPCR módszer segítségével, C3H10T1/2+BMP-2 sejtekből létrehozott porcosodó micromass kultúrákban. A mintákat a 0., 5., 10. és 15. tenyésztési napokon arattuk le. A vizsgált gének C_T értékeit az *Actb* gén esetében mért értékekhez és a 0. tenyésztési naphoz normalizáltuk. A hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik, az egymást követő tenyésztési időpontok közötti szignifikáns változást csillaggal jelöltük (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). A szignifikancia kiszámítása Tukey HSD-vel és Mann-Whitney teszttel kiegészített egyszempontos ANOVA által történt. Az ábra három (hasonló tendenciát mutató) parallel kísérletből egy reprezentatív adatsor eredményeit jeleníti meg.

5.1.3. A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* génexpressziós változásainak vizsgálata egér eredetű primer micromass kultúrákban

Az egér embrionális sejtvonal eredetű porcosodó kultúrák vizsgálatát követően egérembrió végtagtelep eredetű primer HD kultúrákból származó mintákon folytattuk tovább kutatásainkat. A kultúrákat ebben az esetben is az *in vitro* porcfejlődés meghatározott napjain arattuk le, és RT-qPCR technikával analizáltuk a három meghatározott epigenetikai markergén expressziójának időbeli alakulását (5.3. ábra). A transzkriptumokat ebben a modellben is sikerült azonosítanunk, bár expressziójuk kissé eltérő mintázatot mutatott a sejtvonal eredetű HD kultúrákhoz képest. A *Tet1* ismét a legnagyobb mértékű expressziós növekedést mutatta:

minden tenyésztési napon szignifikáns expressziós aktivitást tapasztaltunk, azonban a statisztikailag legintenzívebb upregulációt az 1. ($2,96 \pm 0,21$) és 4. ($2,78 \pm 0,17$) tenyésztési napokon figyeltük meg. A *Dnmt3a* transzkriptum szintje a 3. tenyésztési napon érte el csúcsát ($1,74 \pm 0,01$), a 15. tenyésztési napon pedig már szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott ($0,6 \pm 0,04$). Az *Ogt* esetében konstans expressziót figyeltünk meg a differenciálódó porcsejtekben, azonban a *Dnmt3a*-hoz hasonlóan ennek a génnek az expressziója is szignifikánsan lecsökkent a 15. tenyésztési napra ($0,61 \pm 0,03$).

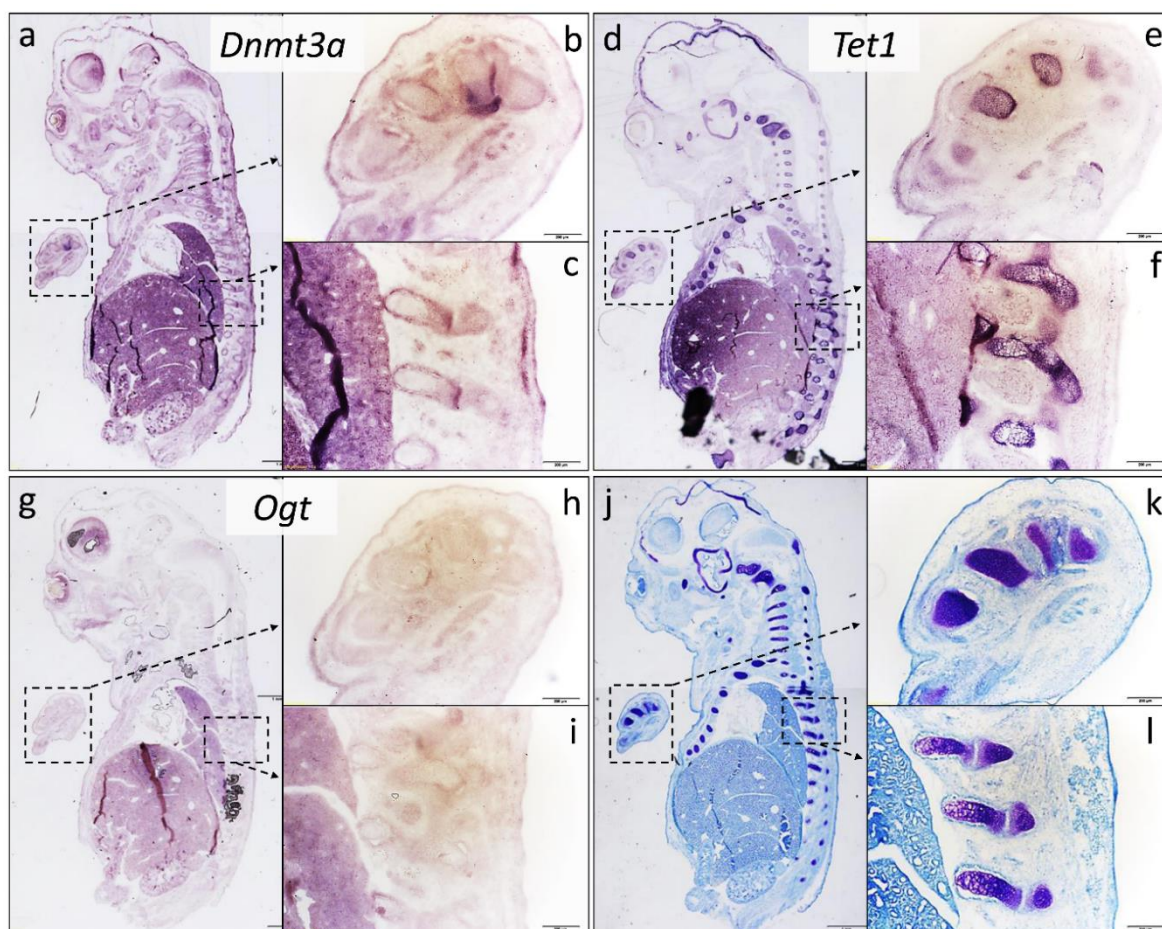


5.3. ábra: A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* gének expressziós változásainak vizsgálata RT-qPCR módszerrel, 11,5 napos egérembriók végtagtelepeiből izolált kondroprogenitor sejtekből létrehozott primer micromass kultúrákban. A mintákat a 0., 1., 3., 4., 6., 10. és 15. tenyésztési napokon arattuk le. A relatív expressziós értékeket az *Sdha* referencia génhez és a 0. tenyésztési naphoz normalizáltuk. A hibasávok a standard deviációt (SD) jelzik, az egymást követő tenyésztési időpontok közötti szignifikáns változást csillaggal jelöltük (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). A szignifikancia kiszámítását Student-féle *t*-próbával végeztük. Az ábra három (hasonló tendenciát mutató) parallel kísérletből egy reprezentatív adatsor eredményeit jeleníti meg.

5.1.4. A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* mRNS-szintű expressziójának vizsgálata egérembrióban

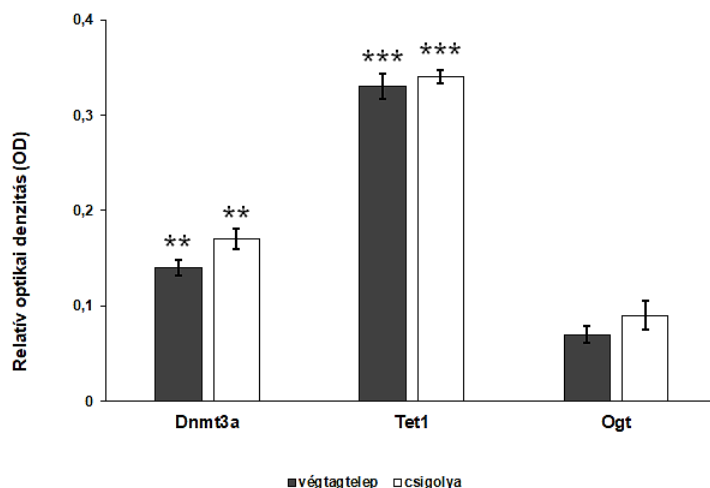
A vizsgálataink szempontjából releváns három DNS metiláció-markergén porcdifferenciációhoz kapcsolt expresszióját *in vivo* szinten is szeretnénk bizonyítani, ezért 15 napos egész egérembriókból létrehozott fagyasztott metszeteken *in situ* hibridizációs módszerrel elemeztük a *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* mRNS-szintű expresszióját. Mindhárom gén pozitív jelet adott a 15 napos egérembrió fejlődő mellső végtagjaiban, csigolyáiban és szegycsontjában található hialinporc-szigetekben. A jelek erőssége azonban különbözött: az

Ogt gyenge (5.4. ábra 'g, h, i' panelek), a *Dnmt3a* mérsékelt (5.4. ábra 'a, b, c' panelek), míg a *Tet1* erős expressziós jeleket (5.4. ábra 'd, e, f' panelek) mutatott a primitív végtagok és csigolyák területén. Ebben a fejlődési stádiumban még nem indult meg a porc csont-irányba való differenciációja, a hipertrófiás porc területeinek aránya és az osszifikáció mértéke minimális, azonban a később megjelenő csontok porcos primordiumai már jól elkülöníthető. DMMK szövettani festéssel püspöklila metakromáziás elszíneződést tapasztaltunk a fejlődő végtagtelepek, csigolyák, koponya és bordák porcos alkotóelemeiben (5.4. ábra 'j, k, l' panelek).



5.4. ábra: DNS metiláció-markergének expressziójának vizsgálata *in situ* hibridizációval, 15 napos egérembrióban. A fagyasztott embriók szagittális metszetein *Dnmt3a* ('a, b, c' panelek), *Tet1* ('d, e, f' panelek), és *Ogt*-specifikus ('g, h, i' panelek) RNS próbákat alkalmaztunk. Dimetil-metilénkék szövettani festést használtunk a porcspecifikus proteoglikánok megjelenítéséhez, ahol a metakromáziás (lila) területek a porcra jellemző polianionos glükózaminoglikánokban gazdag extracelluláris mátrixot jelölik ('j, k, l' panelek). Az egész embriókat bemutató fényképek 4× nagyítás mellett készültek ('a, d, g, j'). A szagattolt vonallal kiemelt területekről 10× nagyítás mellett is készültek felvételek ('b, c, e, f, h, i, k, j'). Figyeljük meg az egérembriók fejlődő végtagtelepeiben és csigolyáiban helyet foglaló differenciálódó porcejtek erőteljes expressziós jelintenzitását a *Dnmt3a* és *Tet1* próbák esetében. Skála: 'a, d, g, j' panelek esetében 1 mm; 'b, c, e, f, h, i, k, l' panelek esetében 200 µm.

A pozitív jelet adó területeket számítógépes képanalízissel, a relatív optikai denzitás megállapításával is összehasonlítottuk, így a jelintenzitások közötti különbségeket számszerűsíteni is tudtuk. A kvantifikálással (5.5. ábra) bizonyítottuk a *Tet1* szignifikánsan magas (végtagtelep: $0,33 \pm 0,008$; csigolya: $0,34 \pm 0,0105$), a *Dnmt3a* szignifikáns, de mérsékelt (végtagtelep: $0,14 \pm 0,013$; csigolya: $0,17 \pm 0,007$), illetve az *Ogt* gyenge expressziós mértékét (végtagtelep: $0,07 \pm 0,009$; csigolya: $0,09 \pm 0,015$).



5.5. ábra: A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt*-specifikus *in situ* hibridizáció során készült felvételek kvantifikálása a relatív optikai denzitási értékek összehasonlításával. Az értékeket az egyes mintáknál kiszámolt abszolút közép szürke értékekre kalibráltuk, a számításokat a végtagtelepek és csigolyák területein végeztük. A szignifikáns változásokat csillaggal jelöltük (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$)

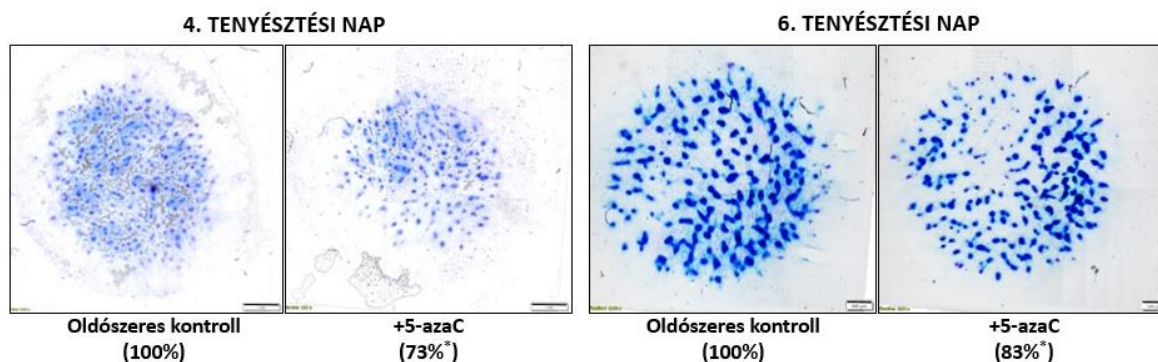
5.2. A DNS metiláció gátlásának vizsgálata az *in vitro* porcdifferenciáció során egérembríó eredetű kondrogenikus modellben

5.2.1. Az 5-azaC a sejtek differenciációs szintjétől függően eltérően befolyásolja a porckultúrák mikroszkópos megjelenését

Kutatásaink következő lépéseként szeretnénk volna tanulmányozni a DNS metilációval járó epigenetikai szabályozó útvonal jelentőségét az *in vitro* kondrogenézis során, emellett az előzőekben bemutatott három DNS metilációval asszociált enzim (*Dnmt3a*, *Tet1*, *Ogt*) funkcionális relevanciáját is szeretnénk volna tovább vizsgálni. Ennek érdekében az egérembríó végtagtelep eredetű micromass kultúrák porc irányába történő differenciációja során egy kezelőanyagot, az úgynevezett 5-azacitidint (5-azaC) alkalmaztuk. Az 5-azaC gátolja a DNS metiltranszferázok (mint például a *Dnmt3a*) működését, így módosítva bizonyos génszakaszok metilációs szintjét a demetiláció irányába eltolva azt. Ez elősegítheti, hogy aktív

transzkripcióval megindulhasson az addig gátlás alatt lévő gének átírása. A kezelőanyagot 10 μ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk. Két kezelési csoportot állítottunk fel: mindkét csoport esetében 72 órán át alkalmaztuk a kezelőanyagot, azonban a HD kultúrák egy részénél a tenyésztés 1. napján indítottuk a kezelést, és a tenyésztés 4. napján fejeztük be a kultúrák fenntartását, míg a másik részénél a tenyésztés 3. napján kezdtük meg a gátlószer használatát, és a tenyésztés 6. napján ért véget a kultúrák fenntartása. A két kezelési protokoll alapján kapott eredményekből következtetni tudtunk arra, hogy a DNS metiláció gátlása, ezáltal a demetiláció elősegítése milyen hatással van az *in vitro* porcfejlődés korai és késői szakaszára, azaz a differenciáció kezdetén lévő kondroprogenitor sejtek, illetve a már differenciálódott és érett kondrociták tulajdonságaira és jelátviteli folyamataira.

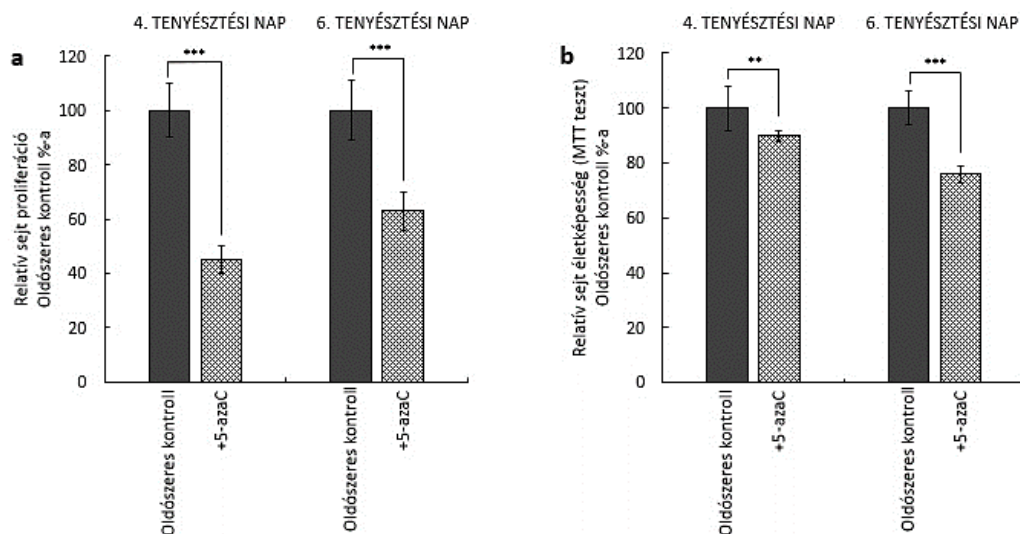
A primer micromass kultúrák porcspecifikus ECM termelődését savas DMMK szövettani festés alkalmazása mellett figyeltük meg. Mindkét kezelési típus esetében megállapítottuk, hogy a termelt metakromáziás ECM mennyisége szignifikánsan csökkent (5.6. ábra). A kondrogenézis korai szakaszában alkalmazott gátlás után a metakromáziás festődés 27%-os csökkenést mutatott az oldószeres kontroll kultúrákhoz képest, a porcosodó nodulusok száma is mérséklődött, illetve a nodulusok körül jóval nagyobb internoduláris teret figyelhettünk meg. A kondrogenézis későbbi szakaszában történt kezelést követően 17%-os csökkenést tapasztaltunk a kondrociták által termelt porcspecifikus ECM mennyiségében.



5.6. ábra: A porcspecifikus extracelluláris mátrix termelődés vizsgálata 4 és 6 napos egérembrió végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban, a DNS metilációt gátló 5-azacitidin kezelőanyag alkalmazását követően. Az oldószeres kontroll kultúrákhoz a kezelőanyag beoldásához használt dimetil-szulfoxidot adagoltunk (a kezeléshez használt 5-azaC mennyiségével megegyező mértékben). Az 5-azaC az 1. vagy a 3. tenyésztési napon került hozzáadásra a kultúrák médiumához, 72 órán át, 10 μ M-os végkoncentrációban. A metakromáziás extracelluláris mátrix mennyiségét a dimetil-metilénkék kvalitatív festési eljárással tettük láthatóvá, a metakromáziás területek arányát a MATLAB program segítségével analizáltuk (a százalékos eredmények a bemutatott fényképek alatt lettek feltüntetve, a szignifikáns változást csillaggal jelöltük [*P < 0,05]). Eredeti nagyítás: 4 $\times$, lépték: 1000 vagy 500 μ m.

5.2.2. A differenciálatlan és differenciált porcsejtek különböző mértékben érzékenyek az 5-azaC kezelésre

Feltételezéseink szerint a kevésbé érett kondroprogenitor sejtek vagy az érett kondrociták proliferációs képessége és mitokondriális aktivitása megváltozhat az 5-azaC kezelés következtében, ezek a változások pedig hozzájárulhatnak a porcspecifikus ECM mennyiségi csökkenéséhez. Ennek érdekében elemeztük a sejtek proliferációs képességének és életképességének változásait az 5-azaC különböző időpontokban történt adminisztrációját követően. A vizsgálatokat a korábban leírtak alapján végeztük, így nyomon követhettük a kondrogenézis korai vagy késői szakaszára jellemző sejtek osztódásának és mitokondriális aktivitásának a DNS metiláció-gátlás következtében kialakult jellegzetes változásait. Mindkét kezelési protokoll negatív hatással bírt a sejtek osztódási képességére (5.7. ábra, 'a' panel). Különösen erőteljes visszaesést tapasztaltunk az 1. tenyésztési naptól történt gátlás során, amikor is 55%-os ($\pm 5\%$) csökkenést figyeltünk meg a kontroll kultúrákhoz képest. Ezzel szemben a 3. tenyésztési naptól indított kezelést követően kisebb mértékű ($37 \pm 7\%$) gátlást láthattunk. Szintén vizsgáltuk az 5-azaC lehetséges citotoxikus hatását az *in vitro* porcfejlődés során (5.7. ábra, 'b' panel). A kezelést követően a 4 napos primer kultúrák sejtjei 90%-ban ($\pm 2\%$) bizonyultak életképesnek a kontrollhoz viszonyítva, amely szignifikáns csökkenésnek számított. A 6 napos primer kultúrák sejtjeinek életképessége ennél jelentősebben csökkent a kezelést követően ($24 \pm 3\%$).



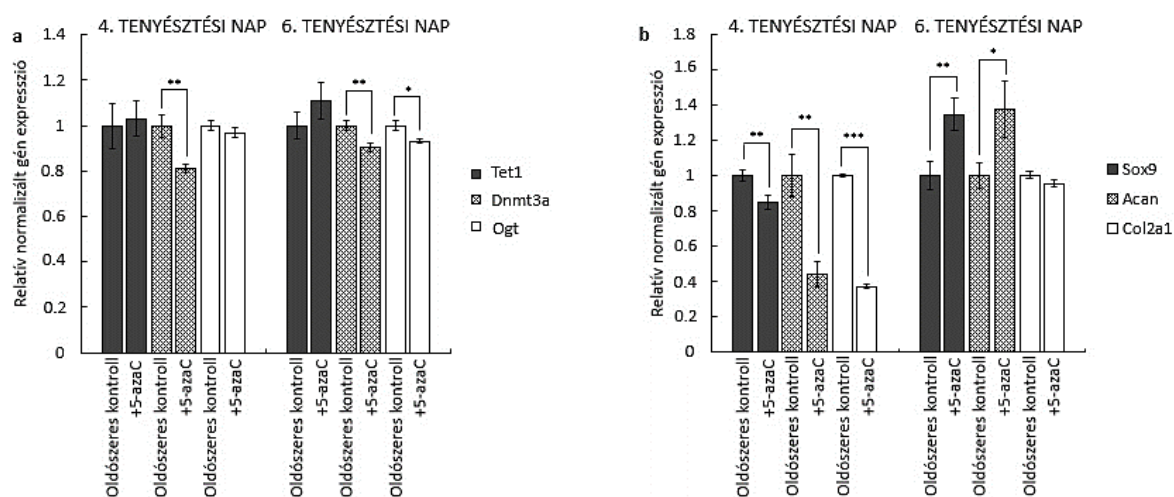
5.7. ábra: Különböző fejlettségi stádiumban lévő porcsejtek osztódó- és életképességének vizsgálata 4 és 6 napos egérembrió végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban, a DNS metilációt gátló 5-azacitidin kezelőanyag alkalmazását követően. Az oldószeres kontroll kultúrákhoz a kezelőanyag beoldásához használt dimetil-szulfoxidot adagoltunk (a kezeléshez használt 5-azaC mennyiségével megegyező mértékben), a mérések során ezen kultúrákhoz történt a viszonyítás. Az 5-azaC az 1. vagy a 3. tenyésztési napon került hozzáadásra a kultúrák médiumához, 72 órán át, 10 μ M-os végkoncentrációban. A proliferációs képességet 3 H-timidin beépülés méréseivel, ('a' panel), míg az életképesség változásait MTT teszt segítségével ellenőriztük ('b' panel). Hibásávok: $\pm$ SD. A szignifikáns változásokat csillaggal jelöltük (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). A szignifikancia kiszámítását Student-féle t -próbával végeztük. Az ábra 3 paralel kísérletből egy reprezentatív adatsor eredményeit jeleníti meg.

5.2.3 Az 5-azaC korai vagy késői adminisztrációja a kondrogenézis során eltérő hatást fejt ki a porcspecifikus gének expressziójára

Miután megállapítottuk, hogy az 5-azaC kezelőanyag különböző mértékű hatást fejt ki a korai porcprogenitor, illetve az érett porcsejtek porcspecifikus ECM termelésére, mitokondriális aktivitására és osztódási képességére, következő lépésként a gátlószerek a vizsgált génekről átíródó mRNS mennyiségére kifejtett hatását szeretnénk volna megvizsgálni. A 4 és 6 napos, 5-azaC kezelésnek kitett egérembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrákból RNS izolálást követően RT-qPCR-alapú analízissel figyeltük meg a DNS metilációval asszociált *Tet1*, *Dnmt3a* és *Ogt* gének, illetve a porcmarker *Sox9*, *Col2a1* és *Acan* gének expressziójában bekövetkezett változásokat. Bizonyítottuk, hogy a DNS metiltranszferázok gátlására képes 5-azaC a vizsgált metiláció-kapcsolt gének expressziójára is hatással volt. Az 5-azaC szignifikáns csökkenést idézett elő az általunk vizsgált *Dnmt3a* expressziós szintjében, az 1. és a 3. tenyésztési naptól indított kezelések esetében egyaránt ($0,81 \pm 0,08$ a 4. napon és $0,9 \pm 0,08$ a 6. napon) (5.8. ábra, 'a' panel). A *Tet1* gén expressziója nem

mutatott változást, míg az *Ogt* esetében kisebb mértékű, de szignifikáns expressziós csökkenést tapasztaltunk a 3. tenyésztési naptól indított kezeléskor ($0,93 \pm 0,01$).

A kondrogenikus markergének mRNS szintű változásai jellegzetes mintázatot mutattak az 5-azaC kezelést követően. Az *in vitro* porcfejlődés korai szakasza alatt szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mindhárom marker génexpressziós szintjében. A legnagyobb mértékű expressziós változást a *Col2a1* ($0,37 \pm 0,01$) és az *Acan* ($0,44 \pm 0,07$) gének esetében figyeltük meg (5.8. ábra, 'b' panel). Ezzel szemben a kondrogenezis későbbi szakaszában alkalmazott 5-azaC gátlás a *Sox9* és *Acan* génexpressziójának szignifikáns emelkedéséhez vezetett (*Sox9*: $1,35 \pm 0,09$; *Acan*: $1,37 \pm 0,16$).

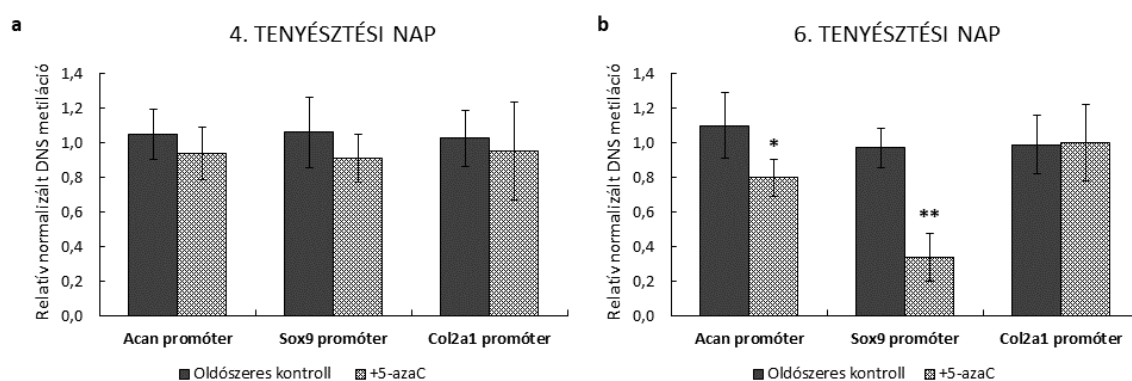


5.8. ábra: A DNS metilációval asszociált gének ('a') és a porcfejlődés jellegzetes markergénjeinek ('b') mRNS szintű expressziójának vizsgálata RT-qPCR módszerrel, 4 és 6 napos egérembrió végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban. A DNS metiláció gátlószereként használt 5-azacitidin az 1. vagy a 3. tenyésztési naptól alkalmaztuk, 72 órán keresztül, 10 μ M-os végkoncentrációban. Az oldószeres kontroll kultúrákhoz a kezelőanyag beoldásához használt dimetil-szulfoxidot adagoltunk (a kezeléshez használt 5-azaC mennyiségével megegyező mértékben), a mérések során ezen kultúrákhoz történt a viszonyítás. A relatív expressziós értékeket az *Sdha* referencia génhez és az adott vizsgálati csoport kontroll mintájához normalizáltuk. Hibasávok: $\pm$ SD. A kezeletlen és kezelt minták közötti szignifikáns változást csillaggal jelöltük (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). A szignifikancia kiszámítása Student-féle *t*-próba alkalmazásával történt. Az ábra 3 (hasonló tendenciát mutató) parallel kísérletről egy reprezentatív adatsor eredményeit jeleníti meg.

5.2.4 Az érett kondrociták porcmarkereinek upregulációja közvetlenül az 5-azaC kezelés eredménye

Az 5-azaC metilációs mintázatra kifejtett közvetlen hatását kvantitatív metiláció-specifikus qPCR módszerrel vizsgáltuk meg a 4 és 6 napos primer HD kultúrákban. Az analízis során megállapíthatóvá vált, hogy a porcfejlődés markergénjeinek expressziós változása a

kezelés hatására gátolt DNS metiláció, és ezáltal a gének promóter régiójában kialakult demetiláltság miatt alakult-e ki. A 5.9. ábrán bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy az 5-azaC kezelés nem volt hatással a korai porcfejlődési szakasz alatt expresszáldó porcmarkerek promóterjeinek metiláltságára; ugyanakkor a késői kondrogenikus differenciáció alatt szignifikáns csökkenést láttunk az *Acan* ($0,8 \pm 0,107$) és *Sox9* ($0,34 \pm 0,141$) gének promóterjeinek metiláltsági szintjében. A 6 napos HD kultúrák qMSP analízis során kapott eredményei jelentős átfedést mutattak a 5.8. ábrán bemutatott RT-qPCR eredményeivel, így kijelenthettük, hogy a *Sox9* és *Acan* markerek esetében tapasztalt génexpressziós emelkedés az 5-azaC kezelés közvetlen következményeként jött létre.



5.9. ábra: Különböző porc markergének promóter régióinak metilációs státusza kvantitatív metiláció-specifikus PCR (qMSP) technikával nyomon követve egérembrío végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban. A metilációs profilok változásait a porcfejlődés korai ('a') és késői ('b') fejlődési stádiuma alatt vizsgáltuk, az 1. vagy a 3. tenyésztési napon indított, és 72 órán át alkalmazott 5-azacitidin kezelést követően, így a korai szakasz változásait 4 napos, míg a késői szakasz módosulását 6 napos kultúrákban figyeeltük meg. A TATA box-kötő fehérje (TATA box binding protein, TBP) negatív kontrollként szolgált, a qPCR során szerzett adathalmazokat a TBP nem metilált promóter-specifikus primer adataihoz normalizáltuk. Hibaszávok: $\pm$ SEM. A metilációs szintek statisztikailag kimutatható különbségeit csillaggal jelöltük (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). A szignifikancia kiszámítása Tukey HSD-vel és Mann-Whitney teszttel kiegészített egyszempontos ANOVA által történt.

5.3. A molekuláris cirkadián óra működésének vizsgálata az *in vitro* porcfejlődés során csirke eredetű kondrogenikus modellben

5.3.1. A cirkadián óra szinkronizációja a porcfejlődés során

A napi, azaz nagyjából 24 órás időtartamú cirkadián ritmus molekuláris szintű változásainak nyomon követéséhez szükség volt az *in vitro* modell rendszerünk porcprogenitor sejtjeinek úgynevezett szinkronizációjára. A szinkronizáló stimulus hatására elérjük, hogy

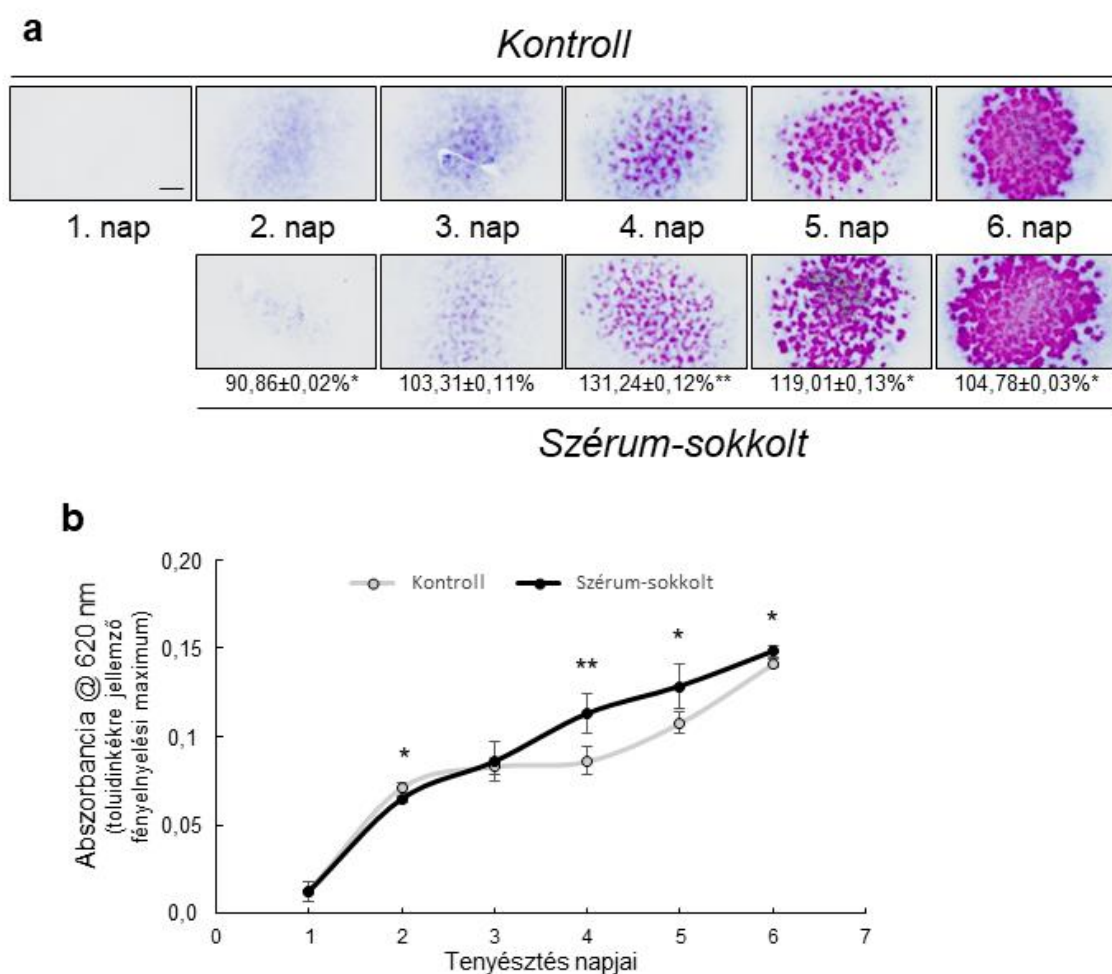
minden sejt egymással megegyező fázisba kerüljön, a biológiai órájukat úgymond lenullázzuk, így az összes sejt együttesen, egymással szinkronban fogja követni a cirkadián ritmus jelátviteli folyamatainak alakulását. Első lépésként meg kellett vizsgálnunk, hogy az *in vitro* porcdifferenciáció folyamán melyik tenyésztési napot ítéljük meg legmegfelelőbbnek a szinkronizáció szempontjából. Szövettani festések alkalmazásával megvizsgáltuk a csirkeembrió végtagtelep eredetű micromass kultúrák porcspecifikus ECM termelődésének időbeli alakulását. A differenciálódó kondroblasztok és kondrociták által termelt metakromáziás mátrix területek legelőször a 3. tenyésztési napon váltak láthatóvá a kvalitatív DMMK festés eredményei alapján (5.10. ábra, 'a' panel), ami arra utalt, hogy a legelső ECM-termelő kondroblaszt sejtek a tenyésztés 3. napján jelentek meg a kultúrákban. A szemikvantitatív toluidinkék festés során a kioldott festékmolekulák abszorbancia értékei először a tenyésztés 2. napján mutattak szignifikáns emelkedést a termelődött mátrix mennyiségében ($0,071 \pm 0,003$; $P = 0,00001$; az 1. naphoz viszonyítva), majd ismét szignifikáns növekedést figyeltünk meg az 5. ($0,108 \pm 0,006$; $P = 0,004$; a 4. naphoz viszonyítva) és a 6. ($0,141 \pm 0,002$; $P = 0,00004$; az 5. naphoz viszonyítva) tenyésztési napokon (5.10. ábra, 'b' panel).

Elsődleges célunk az volt, hogy a cirkadián óra közreműködését az *in vitro* porcfejlődés korai szakaszában vizsgáljuk, ahol a kondroblaszt-differenciáció és az ECM termelés a legintenzívebb. A szövettani festések alapján megállapítottuk, hogy a molekuláris óra szinkronizációjára az 1. tenyésztési nap, míg az első minták learatására a 2. tenyésztési nap (24 órával a szinkronizációt követően) a legalkalmasabb. A 6. tenyésztési napon szintén alkalmaztunk szérumsokk alapú szinkronizációt, ebben az esetben az első mintákat ismét 24 órával később, a 7. tenyésztési napon arattuk le, így lehetőségünk volt megfigyelni a cirkadián ritmus molekuláris résztvevőinek mRNS-szintű változásait a porcfejlődés késői szakaszában (ahol már jelentős részben érett porcsejtek alkotják a kultúrákat, és nagy mennyiségben termelődött porcspecifikus ECM). A kontroll kultúrák esetében a szinkronizációs lépésnél szintén történt médium-csere, de normál (10% FBS tartalmú) tápoldatot adtunk a kolóniákhoz, nem alkalmaztunk szérumsokkot.

5.3.2. A szérumsokk alkalmazása serkenti a porcdifferenciációt

A csirkeembrió végtagtelep eredetű HD kultúrákat a tenyésztés 1. napján 2 órán keresztül stimuláltuk 50% FBS tartalmú médium hozzáadásával. A cirkadián óra ily módon történt szinkronizációját követően DMMK és toluidinkék szövettani festésekkel vizsgáltuk meg a primer micromass kultúrák által termelt porcspecifikus ECM változásait. Megállapítottuk,

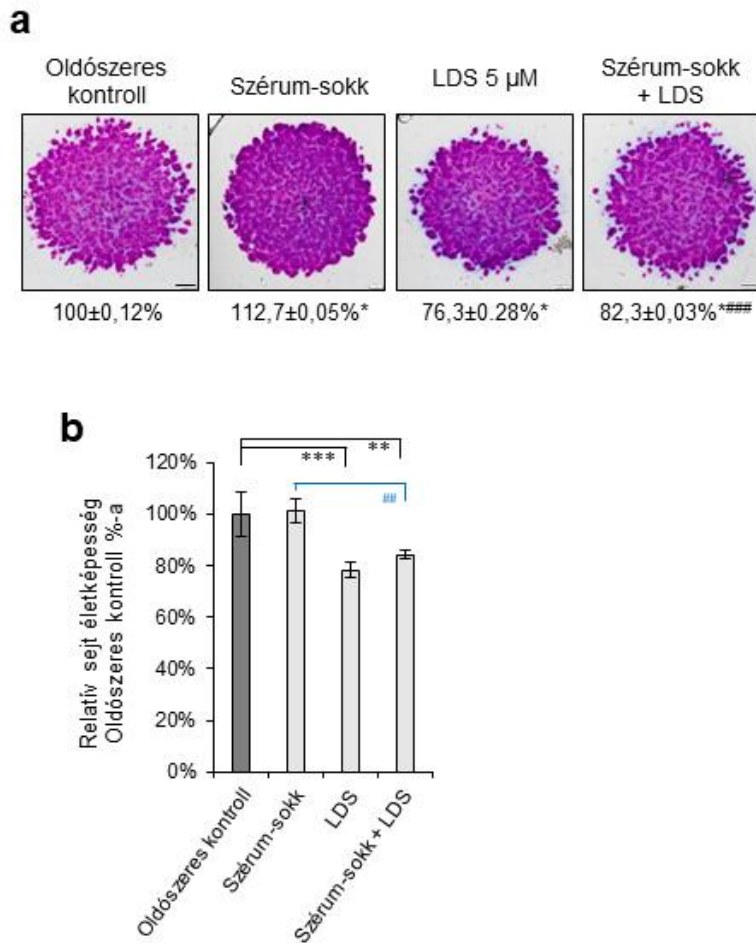
hogy a magas FBS tartalmú tápoldat alkalmazására a metakromáziás porc ECM mennyisége szignifikáns mértékben megnőtt a 3. tenyésztési naptól kezdve a kontroll kultúrákhoz viszonyítva (5.10. ábra, 'a' és 'b' panelek). A legnagyobb mértékű, 1,3-szoros emelkedést a tenyésztés 4. napján figyeltük meg (kontroll: $0,086 \pm 0,008$ vs. szérumsokkolt: $0,113 \pm 0,011$, $P = 0,026$), ezen a tenyésztési napon már jelentős mennyiségű porcspecifikus ECM termelődött a differenciálódott kondroblasztok és kondrociták által. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *in vitro* kondrogenézis korai szakaszában alkalmazott szérumsokk és cirkadián óra szinkronizációja erőteljesen serkenti a porcdifferenciációt a porcosodó micromass kultúrákban.



5.10. ábra: A szérumsokk (50% FBS tartalmú F12 médium alkalmazása az 1. tenyésztési napon 2 órán keresztül) serkentette az *in vitro* porcfejlődést és a metakromáziás mátrix termelődését a csirkeembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrákban. 'a' panel: A metakromáziás ECM akkumulációja *in vitro* porcdifferenciáció során, kontroll és szérumsokkolt kultúrák összehasonlításával, dimetil-metilénkék és toluidinkék festési eljárással vizsgálva. Nagyítás mértéke: 2×, lépték: 1 mm. A fényképek alatt látható számok a kontroll és szérumsokkolt kultúrákból kioldott toluidinkék festék optikai denzitásának (OD_{620}) arányát mutatják be. Hibasávok: $\pm$ SD. A szignifikancia jelölése: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$. Az ábra 3 független kísérletből egy reprezentatív adatsort mutat be. 'b' panel: Kioldott toluidinkék festéket tartalmazó minták optikai denzitásának (OD_{620}) időfüggésen alapuló összehasonlítása a szérumsokkolt kultúrák kontrollhoz való viszonyításával a porcdifferenciáció különböző napjain. Hibasávok: $\pm$ SD. A szignifikancia jelölése: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$.

5.3.3. A cirkadián óra modulálása negatívan befolyásolta a porcfejlődést

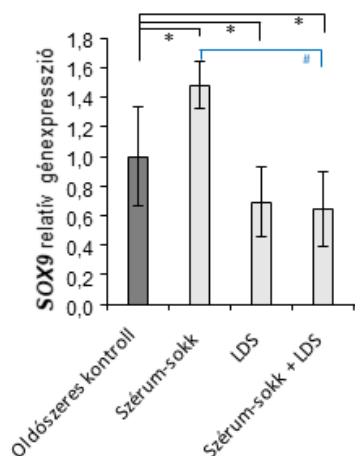
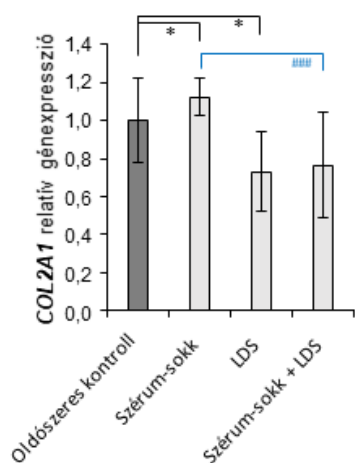
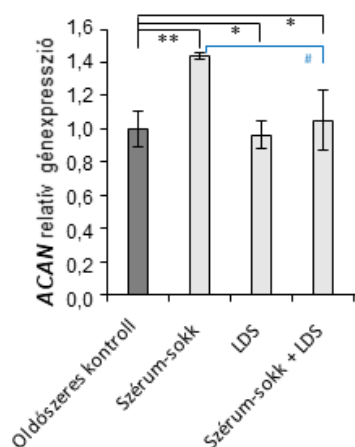
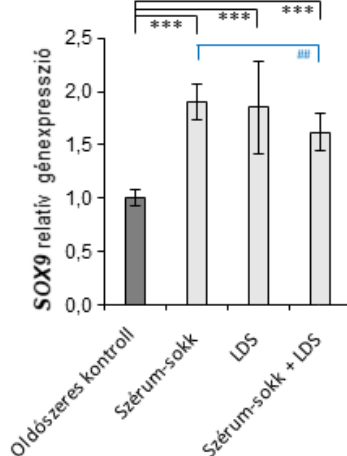
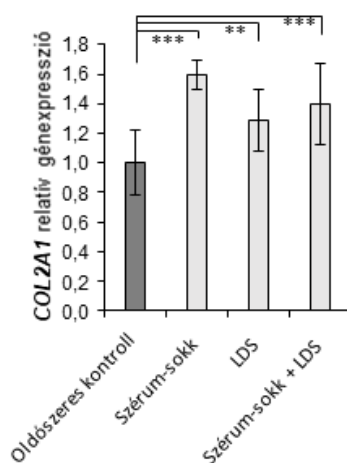
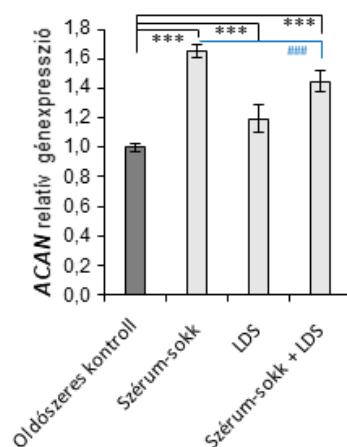
Miután megállapítottuk, hogy a szérumsokk alkalmazása stimulálta a porcspecifikus ECM termelődését a micromass kultúrákban, szeretnénk volna bizonyítani, hogy ez a jelenség valóban a szérumsokk által előidézett cirkadián óra-szinkronizáció miatt alakult ki. A longdaysin nevű kezelőanyag képes modulálni a molekuláris óra működését, illetve a szinkronizációs folyamatot. Az LDS modulátort 5 μ M végkoncentrációban alkalmaztuk a HD kultúrákban, a korai porcdifferenciációs szakasz során (a tenyésztés 1. napján, a szérumsokkot követően, 24 órán keresztül; a kontroll kultúrák esetében szérumsokk időpontjában csupán médium cserét alkalmaztunk, ezt követte a kezelés). A kémiai vegyület hatására szignifikánsan csökkent a metakromáziás mátrix mennyisége a tenyésztés 6. napjára, emellett a kezelés a szérumsokkolt HD kultúrák ECM képződését is negatívan befolyásolta (5.11. ábra, 'a' panel). Hisztotechnikai eljárások eredményei alapján bizonyítottuk, hogy nagy valószínűséggel valóban a szérumsokk által előidézett óra-szinkronizáció következménye volt a 5.3.2. pontban megállapított porcdifferenciáció fokozódás. Az MTT teszt alapján a gátlószer citotoxikusnak bizonyult, akár önmagában, akár a szérumsokkot követően alkalmaztuk azt: a porcdifferenciáció korai szakaszában történt óraműködés megzavarása a sejtek életképességének szignifikáns csökkenéséhez vezetett a tenyésztés 3. napjára (5.11. ábra, 'b' panel).



5.11. ábra: A cirkadián óra modulálására képes longdaysin hatásának vizsgálata szérum-sokk alkalmazása vagy szérum-sokk elhagyása mellett, csirkeembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrákban. A kezelőanyagot 5 µM végkoncentrációban, a tenyésztés 1. napján alkalmaztuk 24 órán keresztül. 'a' panel: Metakromáziás porc extracelluláris mátrix akkumulációja a tenyésztés 6. napjára, dimetil-metilénkék és toluidinkék festési eljárásokkal vizsgálva. Nagyítás mértéke: 2×, lépték: 500 µm. A fényképek alatt látható számok a kezelt kultúrákból kioldott toluidinkék festék optikai denzitásának (OD_{620}) az oldószeres kontroll minta értékéhez való arányát mutatja. A hibásávok $\pm$ SD alapján lettek feltüntetve. A minták közötti statisztikai szignifikanciát csillaggal (oldószeres kontrollhoz való viszonyítás esetében) vagy kettős kereszttel (szérum-sokkolt mintához való viszonyítás esetében) jelöltük: $P < 0,05 = */#$; $P < 0,01 = **/##$; $P < 0,001 = ***/###$. Az ábrán szereplő adatok 3 független kísérlet közül egy jellemző tendencia változásait mutatják. 'b' panel: Az életképesség vizsgálata micromass kultúrákban longdaysin kezelést követően. Az MTT tesztet a tenyésztés 3. napján alkalmaztuk. A hibásávokat $\pm$ SD alapján tüntettük fel. A statisztikai szignifikanciát csillaggal (oldószeres kontrollhoz való viszonyításnál) vagy kettős kereszttel (szérum-sokkolt mintához való viszonyításnál) jelöltük: $P < 0,05 = */#$; $P < 0,01 = **/##$; $P < 0,001 = ***/###$.

Az LDS porcmátrix-termelődést érintő hatása mellett azt is megvizsgáltuk, hogy a molekuláris óra modulátora befolyásolja-e a porcfejlődés molekuláris folyamatait. A szövettani festések eredményei alapján negatív irányú változásra számítottunk a porc markergének mRNS szintű expressziójában. Három kulcsfontosságú porcmarker, a *SOX9*, *COL2A1* és *ACAN* gének

expresszióját vizsgáltuk meg RT-qPCR módszerrel. A szinkronizációt (és bizonyos kísérleti csoportok esetében a kezelést) követően a tenyésztés 3. és 6. napján arattuk le a kultúrákat. Mindkét vizsgálati időpontban szignifikánsan emelkedett a porc markergének relatív expressziója a szérumsokknak kitett kolóniákból származó mintákban (5.12. ábra). Ez teljes mértékben egyezést mutatott az 5.3.2. pontban bemutatott szövettani festések eredményeivel. Ezzel szemben az LDS és a szérumsokk együttes alkalmazásakor megfigyelhettük, hogy a porcmarkerek relatív expressziós szintje szignifikánsan csökkent mind a 3., mind pedig a 6. tenyésztési napon, a csak szérumsokkolt kultúrák értékeihez viszonyítva. Ezek az eredmények szintén nagyfokú átfedést mutattak az előző bekezdésben leírt, illetve a 5.11. ábrán bemutatott DMMK és toluidinkék festések eredményeivel. Összességében megállapítottuk, hogy az LDS kezelés negatív hatással volt az *in vitro* porcfejlődésre, illetve a szérumsokk által előidézett óraszinkronizációra is: az önmagában alkalmazott kezelés szignifikáns csökkenést idézett elő mind a porcspecifikus ECM-termelődést, mind pedig a porc markergének expresszióját tekintve, míg a szérumsokk melletti LDS-kezelés jelentősen csökkentette a szinkronizáció porcdifferenciációt serkentő hatását. Az eredmények tükrében kijelenthettük, hogy a molekuláris óra megfelelő működése alapvetően befolyásolja a porcképződést. Ezek a vizsgálatok azt is alátámasztották, hogy az *in vitro* kondrogenézis során alkalmazott szérumsokk pozitív hatását jelentős mértékben csökkenti, ha farmakológiailag gátoljuk a molekuláris óra megfelelő működését a differenciálódó sejtekben.

a Tenyésztés 3. napja**b** Tenyésztés 6. napja

5.12. ábra: Porc markergének expressziójának vizsgálata RT-qPCR módszerrel, 3 ('a') és 6 ('b') napos csirkeembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrákban, a cirkadián órát szinkronizáló szérum-sokkot, illetve a cikadián óra működését befolyásoló longdaysin (5 μ M) kezelést követően. A szérum-sokkot illetve a longdaysin-nel való kezelést is a tenyésztés 1. napján alkalmaztuk. A hibásávok $\pm$ SD alapján kerültek feltüntetésre. A relatív expressziós értékeket az oldószeres kontroll minták értékeihez, illetve a *PPIA* referencia génhez normalizáltuk. A szignifikancia-különbségek jelölése csillaggal (oldószeres kontrollhoz való viszonyítás) vagy kettős kereszttel (szérum-sokkolt mintához való viszonyítás) az alábbiak alapján történt: $P < 0,05 = */#$; $P < 0,01 = **/##$; $P < 0,001 = ***/###$. Az ábra 3 független kísérletből egy reprezentatív adatsort mutat be.

5.3.4. A molekuláris óragének és a porc markergének expressziós változása szinkronizált oszcillációs mintázatot mutató a szérumsokkot követően

A továbbiakban szeretnénk volna bizonyítani, hogy a szérumsokk valóban szinkronizáló hatást fejt ki a cirkadián óra és a porcfejlődés specifikus molekuláris résztvevőinek génexpressziós mintázatára, akár a korai (tenyésztés 1. napján), akár a késői (tenyésztés 6. napján) *in vitro* porcdifferenciációs fázisban alkalmazzuk azt. A csirkeembrió végtagtelep eredetű micromass kultúrákat az 1. vagy 6. tenyésztési napon szinkronizáltuk. A kultúrákra 50% FBS tartalmú médiumot helyeztünk, melyben 2 órán keresztül tartottuk őket. Ezt követően a szokásos médiumra cseréltük a tápfolyadékot (10% FBS tartalommal). 24 órával a szérumsokk befejeztét követően learattuk az első mintákat. Ezután minden újabb 8 óra elteltével (a szinkronizációt követő 32., 40., 48., 56., 64., 72. órában) új mintákat helyeztünk a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóba, a későbbi RNS izoláláshoz. A vizsgált gének expressziós változásait és a cirkadián óra működéséhez kapcsolt oszcillációs csúcsait RT-qPCR módszerrel analizáltuk.

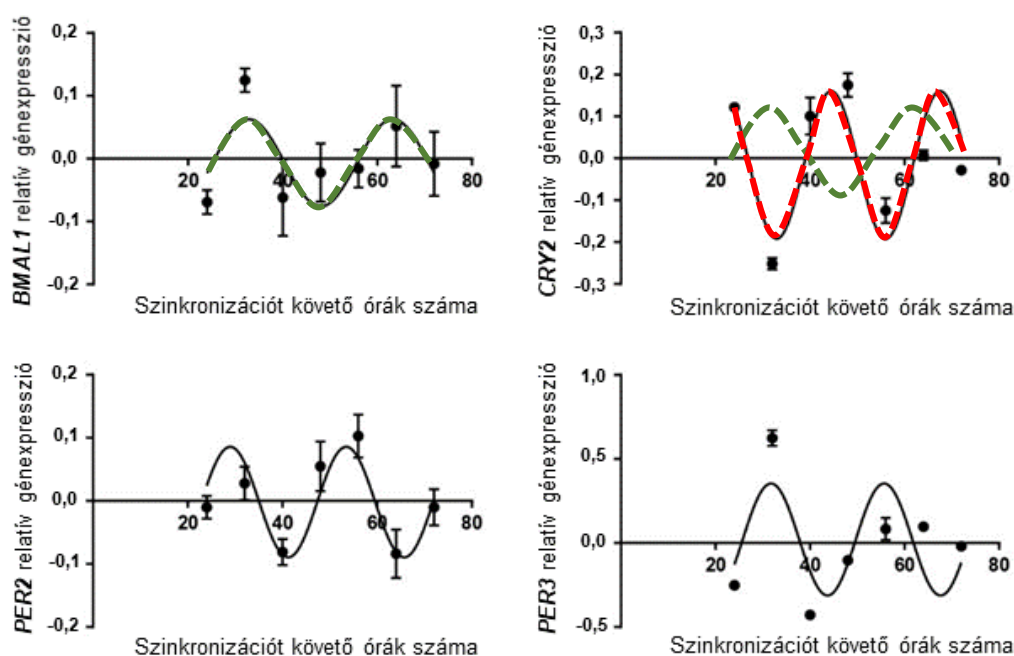
Számos óragén expresszióját bizonyítottuk a csirke kondrogenikus modellünkben, mint például a *BMAL1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1* és *CRY2*, azonban a CLOCK óragén-csoport tagjainak expresszióját nem sikerült kimutatnunk. A CLOCK géncsoport a cirkadián óra oszcillációs hullámainak pozitív irányú elmozdításáért felelős kulcsfontosságú résztvevője, azonban nem sikerült amplifikációt kimutatnunk sem az általunk (Primer Blast programon keresztül) tervezett, sem pedig a már korábban publikált szekvencia adatok által tervezett primerekkel [179] [180].

Az első tenyésztési napon történt szinkronizáció vizsgálatánál több óragén esetében is kimutattuk a szinkronizált oszcillációs mintázatot a porcfejlődés korai szakasza során. A gének ritmikusan változó mintázata egy nem-lineáris cosinor regresszió alapuló módszerrel határozható meg (a cosinor-alapú módszerrel kiszámítható a cirkadián periódusok ritmicitása). A molekuláris óra pozitív és negatív fázisai között körülbelül 8 órás fáziskülönbséget figyelhettünk meg a szinkronizációt követő 24. és 72. óra között, 8 óránként learatott mintákban. Az első napon szinkronizált kondrogenikus minták cirkadián expressziós mintázatának paraméterei az 5.1. táblázatban láthatóak. A relatív expressziós adatok alapján létrehozott cosinor-görbékből jól látható, hogy a *BMAL1* pozitív faktorként, míg a *PER2*, *PER3* és *CRY2* negatív faktorokként vett részt a cirkadián ritmus létrehozásában (5.13. ábra), az oszcilláció során a *BMAL1* expressziós mintázata antifázisban volt a *PER2/PER3/CRY2* gének expressziójához képest. A kontroll kultúrákban is sikeresen igazoltuk az óragének expresszióját, azonban a cirkadián mintázatot nem, vagy csak kis mértékben figyeltük meg.

5.1. táblázat: A molekuláris óra transzkripciók faktorok génexpressziójának cosinor analízise. A kondrogenikus kultúrákat a tenyésztés 1. napján szinkronizáltuk.

	<i>BMAL1</i>	<i>PER2</i>	<i>PER3</i>	<i>CRY2</i>
Akrofázis (órák)	63,28	53,48	55,68	56,01
Periódus (órák)	30,49	24,51	23,93	23,06
Pozitív fázis	63,28			
Negatív fázis	55,06			
Fázis különbség	8,22			

Szinkronizáció az 1. tenyésztési napon



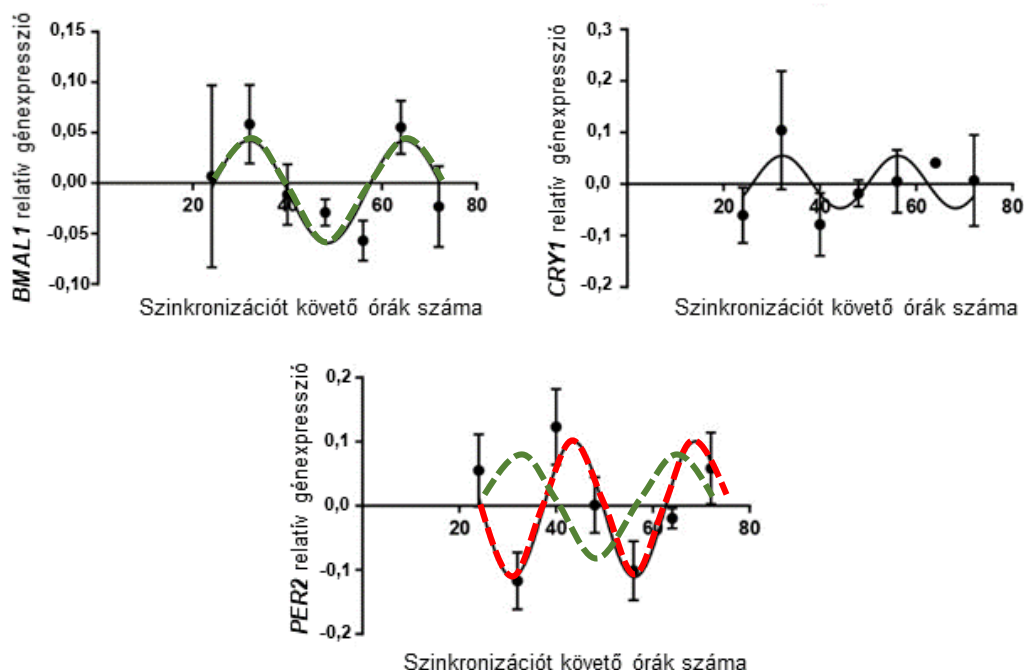
5.13. ábra: Az óragének expressziójában kialakult cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása az 1. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően. A csirkeembrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott micromass kultúrákat a tenyésztés 1. napján 2 órán keresztül 50% FBS tartalmú médiummal láttuk el, majd a szérumsokkot követő 24. és 72. órák között 8 óránként gyűjtöttük be a mintákat. A *BMAL1* (zöld szaggatott vonal), *CRY2* (piros szaggatott vonal), *PER2* és *PER3* óragének expresszióját RT-qPCR módszerrel analizáltuk, majd az expressziós értékeket cosinor-alapú számítási módszerrel szinuszoid görbére illesztettük és az idő függvényében ábrázoltuk. A hibasávok $\pm$ SD alapján kerültek feltüntetésre. A relatív expressziós értékeket abszolút kvantifikációt követően a 24. óra mintájának értékeihez, illetve az *YWHAZ* referencia génhez normalizáltuk. A görbék 3 független (és hasonló tendenciát mutató) kísérletből egy reprezentatív adatsort mutatnak be.

Hasonló génexpressziós mintázatokat figyeltünk meg, ha a porcdifferenciáció későbbi szakaszában, a tenyésztés 6. napján alkalmaztunk szinkronizációt. A minták begyűjtése az előzőekben leírtak alapján, a szinkronizációt követő 24. és 72. órák között 8 óránként történt meg. Nem minden óragén esetében volt kimutatható a cirkadián expressziós mintázat a szinkronizációt követő 72 órában. Az 5.14. ábrán láthatjuk, hogy csak a *BMAL1*, *CRY1* és *PER2* gének expresszáálódtak a cirkadián ritmus mintázatának megfelelően. A *BMAL1* és a *CRY1/PER2* gének között ebben az esetben is egy 8 óránként váltakozó, antifázis-jellegű különbséget figyelhettünk meg az expressziós mintázataikban, ami ennél a kísérleti csoportnál is a molekuláris óra mRNS-szintű meglétére és működésére utal. A hatodik napon szinkronizált micromass minták cirkadián expressziós mintázatának paraméterei az 5.2. táblázatban lettek feltüntetve. A kontroll kultúrákban ezen vizsgálati csoport esetében is igazoltuk az óragének transzkriptumainak meglétét, azonban a jellegzetes szinkronizált expressziós mintázat nem jelent meg.

5.2. táblázat: A molekuláris óra transzkripció faktorok génexpressziójának cosinor analízise. A kondrogenikus kultúrákat a tenyésztés 6. napján szinkronizáltuk.

	<i>BMAL1</i>	<i>PER2</i>	<i>CRY1</i>
Akrofázis (órák)	64,94	56,19	56,19
Periódus (órák)	33,03	25,18	23,97
Pozitív fázis	64,94		
Negatív fázis	56,19		
Fázis különbség	8,75		

Szinkronizáció a 6. tenyésztési napon



5.14. ábra: Az óragének expressziójában kialakult cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása a 6. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően. A csirkeembrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott micromass kultúrákhoz a tenyésztés 6. napján 2 órán keresztül 50% FBS tartalmú médiumot adtunk óra-szinkronizációs céllal, majd 24 órával a szérumsokkot követően megkezdtuk a minták learatását, amit 8 óránként megismételve a 72. óráig folytattunk. A *BMAL1* (zöld szaggatott vonal), *CRY1* és *PER2* (piros szaggatott vonal) óragének expresszióját RT-qPCR módszerrel elemeztük, majd az expressziós értékeket cosinor-alapú számítási módszerrel szinuszoid görbére illesztettük és az idő függvényében ábrázoltuk. A hibasávokat $\pm$ SD szerint tüntettük fel. A relatív expressziós értékeket abszolút kvantifikációt követően a 24. óra mintájának értékeihez, az *RPLP0* referencia génhez normalizáltuk. A görbék 3 független (hasonló tendenciájú) kísérletből egy reprezentatív adatsort mutatnak be.

Habár az embrionális végtagtelep eredetű micromass kultúrák az *in vitro* porcdifferenciáció széles körben elfogadott biológiai modelljeként szolgálnak, a progenitor sejtek egy heterogén populációt reprezentálnak, ahol a sejtek bizonyos körülmények között előnyben részesíthetik az oszteogenikus irányú differenciációt. Ennek érdekében RT-qPCR módszerrel megvizsgáltuk a *SOX9* kondrogenikus és a *RUNX2* oszteogenikus mester transzkripciós faktorok génexpresszióját, az előző bekezdésekben említett vizsgálati időpontokban. Az expressziós értékeket a cosinor-görbére illesztettük, így kideríthettük, hogy a vizsgált markergének mutatnak-e a cirkadián órára jellemző oszcillációs mintázatot. A transzkripciós faktorok elemzésekor kapott cirkadián expressziós mintázat paramétereit az 5.3. táblázatban tüntettük fel.

5.3. táblázat: A kondrogenikus markerek génexpressziójának cosinor analízise. A kondrogenikus kultúrákat a tenyésztés 1. és 6. napján szinkronizáltuk.

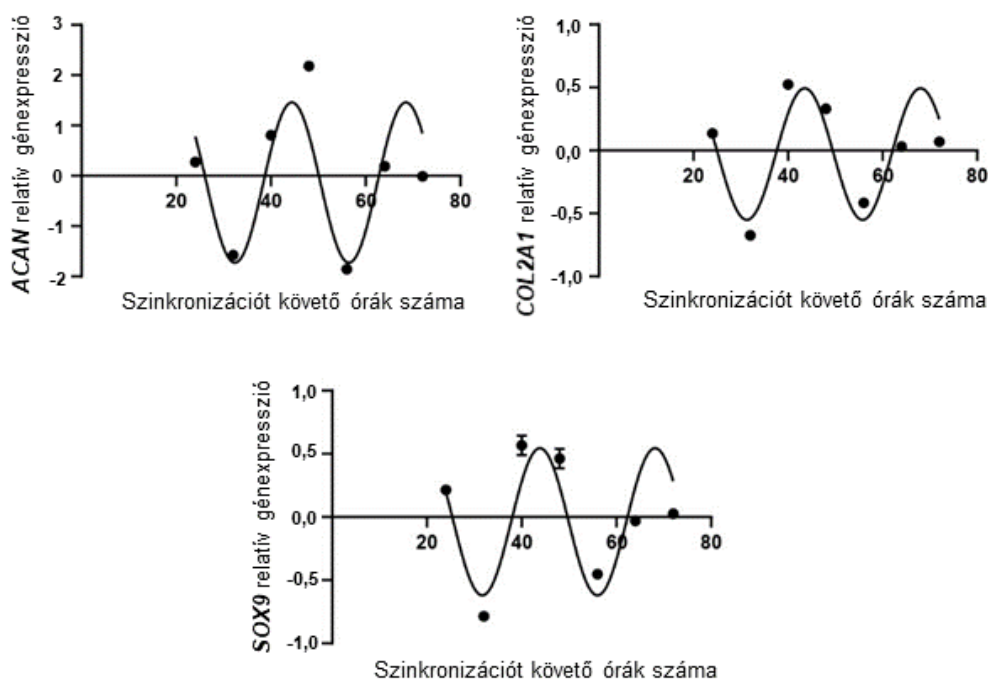
	ACAN	COL2A1	SOX9
1. nap			
Akrofázis (órák)	56,46	55,8	56,02
Periódus (órák)	24,08	24,5	24,32
6. nap			
Akrofázis (órák)	61,49	60,81	61,82
Periódus (órák)	22,46	28,01	23,12

Az 1. tenyésztési napon szinkronizált primer HD kultúrákban a SOX9 expressziós adataiból számolt cosinor-görbén (5.15. ábra) a gén akrofázisa az 56. órára esett, ami nagyjából 7 órás eltérést mutatott az 5.13. ábrán bemutatott BMAL1 gén cirkadián görbéjéhez képest. Ezzel szemben a RUNX2 transzkripció faktor esetében nem fedeztünk fel cirkadián mintázatot a gén expressziós adatainak elemzésekor (5.17. ábra). A tenyésztés 6. napján szinkronizált kolóniák elemzésekor a SOX9 transzkripció adatainak cosinor-görbére való illesztése során megállapítottuk, hogy a kondrogenikus transzkripció faktor expressziója a porcfejlődés késői szakaszában is cirkadián mintázatot jelez (5.16. ábra), és nagymértékben fázisban van az 5.14. ábrán bemutatott BMAL1 eredményeivel. A RUNX2 mRNS szintje az oszcilláló mintázat helyett inkább csökkenő tendenciát mutatott a 6 napos kultúrák vizsgálatánál. A bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a korai és késői porcfejlődési szakaszok alatt a SOX9 és RUNX2 transzkripció faktorok expresszióját különböző módon befolyásolja a molekuláris óra működése.

Az aggregátum proteoglikán központi fehérjéjét kódoló ACAN gén expressziójának cosinor-alapú analízise szintén kimutatta a cirkadián ritmus szerint változó mintázatot, méghozzá a korábban bemutatott SOX9 génre jellemző módon, mind az 1. (5.15. ábra), mind pedig a 6. (5.16. ábra) tenyésztési napon történt szinkronizáció esetében. A II-es típusú kollagén alfa láncát kódoló COL2A1 gén a SOX9-hez és az ACAN-hoz hasonló cirkadián expressziós mintázatot mutatott, akár az éretlen kondroprogenitor sejteket (5.15. ábra), akár az érett kondrocitákat (5.16. ábra) tartalmazó kultúrákat vizsgáltuk. A relatív expressziós adatok alapján elmondható, hogy a HD kultúrákban lezajló kondrogenézis folyamata alatt a cirkadián óra képes befolyásolni a porcfejlődés markergénjeinek expresszióját.

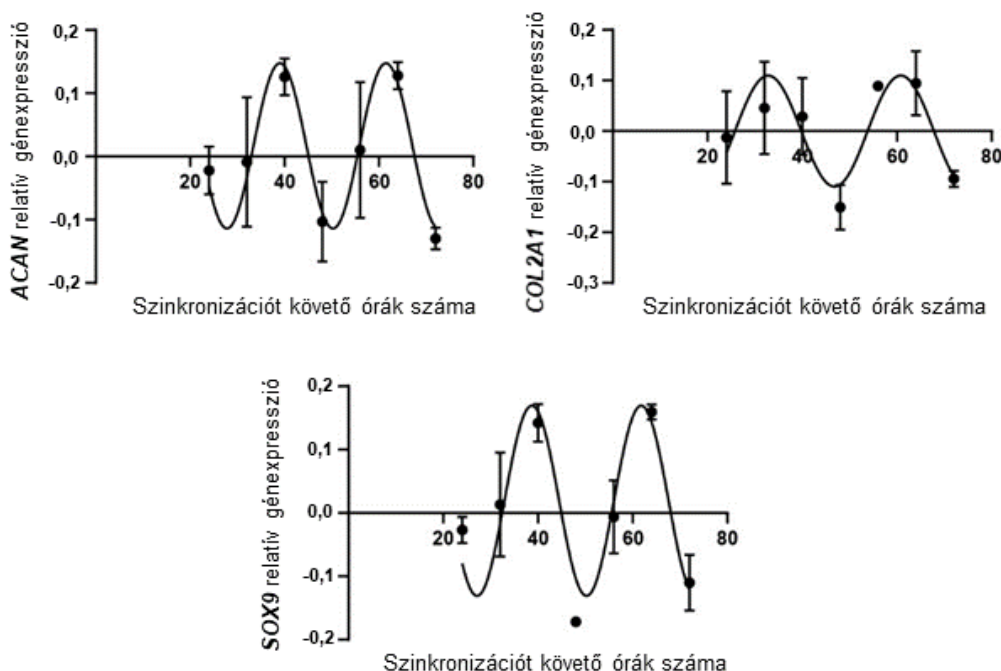
A kontroll kultúrákat az első, vagy a hatodik tenyésztési napon szérumsokkal szinkronizált mintákkal párhuzamosan hoztuk létre. A három kondrogenikus markergén konstans expressziója a szérumsokk hiánya mellett is megfigyelhető, azonban a ritmikus oszcilláció elmaradt (mint ahogy azt az óragének esetében is tapasztaltuk). Mivel minden kontroll mintában azonosítottuk a vizsgált gének expresszióját, azonban egyik esetben sem sikerült kimutatnunk azok cirkadián jellegű ritmikus oszcillációját, ezért elmondható, hogy az *in vitro* kondrogenikus sejtek esetében a szérumsokk szinkronizáló hatást fejtett ki a már meglévő, és deszinkronizáltan működő cirkadián transzkripciós ciklusokra.

Szinkronizáció az 1. tenyésztési napon

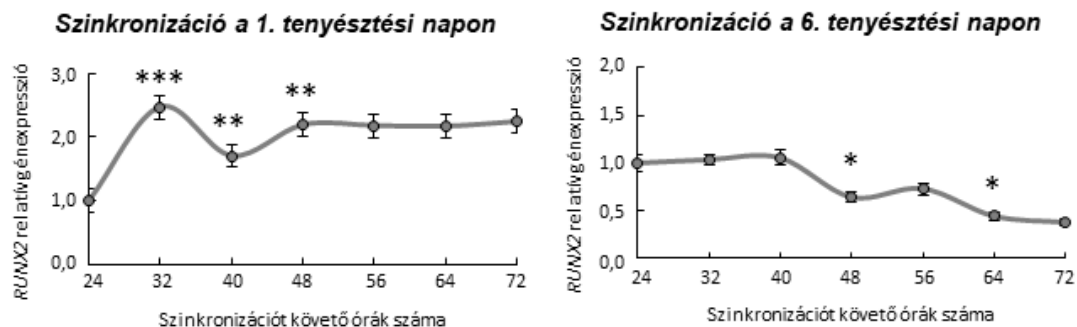


5.15. ábra: A SOX9 transzkripciós faktor és a porcspecifikus extracelluláris mátrix komponenseit kódoló COL2A1 és ACAN gének expressziójában kialakuló cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása az 1. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően. A csirkeembrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott micromass kultúrákat a tenyésztés 1. napján 2 órán keresztül 50% FBS tartalmú médiummal láttuk el, majd 24 órával a szérumsokkot követően megkezdtuk a minták learatását, amit 8 óránként megismételtünk, egészen a 72. óráig. A három porc markergén expresszióját RT-qPCR módszerrel analizáltuk, majd az expressziós értékeket cosinor-alapú számítási módszerrel szinuszoid görbére illesztettük és az idő függvényében ábrázoltuk. A hibasávok $\pm$ SD alapján kerültek feltüntetésre. A relatív expressziós értékeket abszolút kvantifikációt követően a 24. óra mintájának értékeihez, illetve az YWHAZ referencia génhez normalizáltuk. A görbék 3 független (és hasonló tendenciát mutató) kísérletből egy reprezentatív adatsort mutatnak be.

Szinkronizáció a 6. tenyésztési napon



5.16. ábra: A *SOX9* transzkripciós faktor és a porcspecifikus extracelluláris mátrix komponenseit kódoló *COL2A1* és *ACAN* gének expressziójában kialakuló cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása a 6. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően. A csirkeembrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott micromass kultúrákat a tenyésztés 6. napján 2 órán keresztül 50% FBS tartalmú médiummal láttuk el, majd 24 órával a szérum-sokkot követően megkezdtuk a minták learatását, amit 8 óránként megismételtünk, egészen a 72. óráig. A három porc markergén expresszióját RT-qPCR módszerrel analizáltuk, majd az expressziós értékeket cosinor-alapú számítási módszerrel szinuszoid görbére illesztettük és az idő függvényében ábrázoltuk. A hibasávok $\pm$ SD alapján kerültek feltüntetésre. A relatív expressziós értékeket abszolút kvantifikációt követően a 24. óra mintájának értékeihez, illetve az *RPLP0* referencia génhez normalizáltuk. A görbék 3 független (és hasonló tendenciát mutató) kísérletből egy reprezentatív adatsort mutatnak be.



5.17. ábra: A RUNX2 oszteogénikus transzkripciós faktor génexpressziójában kialakuló cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása. A csirkeembrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott high density kultúrákat a tenyésztés 1. vagy 6. napján 50% FBS tartalmú médiummal láttuk el, hogy szinkronizáljuk a sejtek cirkadián óráját, majd 24 órával a szérumsokkot követően megkezdjük a minták learatását, amit 8 óránként megismételtünk, egészen a 72. óráig. A csontdifferenciációs markergén expresszióját kvantitatív RT-PCR módszerrel analizáltuk és időfüggés mellett ábrázoltuk. A hibasávok $\pm$ SD alapján kerültek feltüntetésre. A relatív expressziós értékeket abszolút kvantifikációt követően a 24. óra mintájának értékeihez, illetve az *YWHAZ* referencia génhez normalizáltuk. A görbék 3 független (és hasonló tendenciát mutató) kísérletből egy reprezentatív adatsort mutatnak be.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A DNS metiláció molekuláris résztvevőinek vizsgálata az *in vitro* porcfejlődés során

Az epigenetikai szabályozó folyamatok közé sorolható DNS metiláció rendkívül fontos szereppel bír az ízületi porcot érintő elváltozások és betegségek kialakulásában [181]. Az elmúlt években számos tudományos publikáció jelent meg, melyek alátámasztották, hogy az egyik leggyakoribb porcdegenerációval járó megbetegedés, az OA kialakulásához hozzájárulnak a különböző porcmarkereket kódoló gének metilációs profiljában bekövetkező változások. OA-ban szenvedő betegek csípőízületéből izolált kondrociták vizsgálatakor a SOX9 gén promóter régiója fokozott metilációt mutatott [97]. Ez az eredmény megfelelő korrelációban volt a már korábban megfigyelt SOX9 génexpressziós csökkenéssel, amelyet OA betegekből származó porcsejtek molekuláris biológiai szintű vizsgálata során állapítottak meg [182]. Az OA patogenezisének tanulmányozása során szintén leírták, hogy a folyamat kezdetén a COL2A1 génszintű kifejeződése, illetve a mátrix szintézisének mértéke szignifikáns emelkedést mutatott [183] [184]. A COL2A1 génexpressziójának bioinformatikai szintű analízise során megállapították, hogy ezen porcspecifikus ECM komponens az OA során hipometilációt, ezáltal fokozott expressziós aktivitást mutatott [185]. Az előzőekben leírt metilációs mintázatokat vizsgáló kutatások tehát alátámasztják azt a feltételezést, hogy az ízületi porc degenerációjával járó bizonyos patológiás mechanizmusok háttérében fontos szerepet tölthet be a DNS metiláció, ugyanis ezen epigenetikai szabályozó folyamat képes befolyásolni a porcszövet kialakításában meghatározott szerepet betöltő gének expressziós szintjét.

A közeljövőben a DNS metiláció ígéretes terápiás célpontként szolgálhat számos ízületi rendellenesség (többek között az OA) kezelésében és megelőzésében [186] [187]. A regenerációs medicina egyik legkedveltebb és legátfogóbban kutatott módszere az őssejt-terápia, ezért természetesen az ízületi porc elváltozásával járó megbetegedések kezelésénél is nagy hangsúlyt fektetnek a mezenchimális sejtek felhasználási lehetőségeinek feltérképezésére. Az utóbbi években előtérbe került a porcfejlődés epigenetikai szintű szabályozásának megismerése, különösképpen a kondrogenezis legkorábbi fejlődési stádiumára jellemző differenciálatlan őssejtek vagy porcprogenitor sejtek DNS metilációs mintázatának tanulmányozása [188]. A metilációs szint célzott megváltoztatása adott fejlődési stádiumban akár az őssejtek terápiás célú felhasználását, vagy akár a degenerációs folyamatok

visszafordíthatóságát is eredményezheti. Kísérleteink célja az volt, hogy különböző egér eredetű kondrogenikus modellek felhasználásával feltérképezzük a DNS metiláció jellegzetes szabályozó enzimeinek mRNS-szintű expressziós mintázatát a porcfejlődés különböző stádiumai alatt, továbbá megfigyeltük a DNS metiláció gátlását előidéző 5-azaC kezelőanyag kondrogenezisre kifejtett hatását.

Vizsgálataink első lépéseként C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonal eredetű sejtekből porcosodó micromass kultúrákat hoztunk létre, majd a kultúrákat az *in vitro* porcdifferenciáció különböző fejlődési stádiumainak megfelelően meghatározott tenyésztési napokig tartottuk fent, ezt követően PCR array módszerrel elemeztük a kiválasztott gének mRNS szintű expresszióját. Először is meggyőződünk arról, hogy mintáinkban megfelelő mértékben és ütemben zajlott le a porcfejlődés, ennek okán leellenőriztük számos oszteo-kondrogenikus markergén expressziójának időfüggésen alapuló változását. A laboratóriumi körülmények között zajló porcdifferenciáció 3 jellegzetes fejlődési szakasszal írható le. A 0. és 3. tenyésztési napok között az úgynevezett proliferációs és migrációs szakaszcól beszélhetünk, amikor is a micromass kultúrákban főleg kondroprogenitor sejtek és korai kondroblasztokat találunk, a sejtek intenzív osztódáson esnek át, és migráció révén nodulusokat vagy sejtömörüléseket hoznak létre. A 3. és 6. tenyésztési napok között zajlik a differenciációs szakasz, ekkor már főleg kondroblasztok és (az idő előre haladtával egyre nagyobb számban) érett kondrociták alkotják a HD kultúrákat, a sejtek már csak minimális mértékben vagy egyáltalán nem osztódnak, a hangsúly az érett és differenciálódott sejtek kialakulása mellett az érett sejtek által termelt nagy mennyiségű porcspecifikus ECM létrehozásán van. A 6. tenyésztési naptól megkezdődik a hipertrófiás szakasz, melynek során az érett kondrociták fokozatos hipertrófiás átalakulása mellett egyre intenzívebb kalcifikáció figyelhető meg a kultúrákban, így tehát *in vitro* körülmények között modellezhetjük az enkondrális csontosodás folyamatát [47] [49]. A PCR array eredményeivel bizonyítottuk, hogy a kondrogenikus és oszteogenikus markergének expressziós mintázata nagy átfedést mutat a laboratóriumunk munkatársai által korábban publikált eredményekkel, amelyben ugyanezen markerek transzkripciós szintjeit konvencionális PCR-rel vizsgáltuk többek között C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonal eredetű micromass kultúrákban [52]. Kísérleti eredményeink alapján elmondhattuk, hogy a porcspecifikus ECM fehérje komponenseit kódoló *Col2a1* és *Acan* gének [189] a 15 napos tenyésztési időszak alatt először az 5. napig fenntartott mintákban mutattak szignifikáns expressziós emelkedést. Ez várható volt, hiszen a metakromáziát mutató, GAG-okban gazdag porc-ECM a rutin porcdifferenciációs tenyésztés során először a 3. tenyésztési naptól

kezdődően figyelhető meg a HD kultúrákban. Az oszteogenikus markerek analízisével továbbá azt is megállapítottuk, hogy a hipertrófiás szakaszra jellemző molekuláris szintű átalakulást először a 10. tenyésztési napig fenntartott mintákban sikerült meghatároznunk, ettől a naptól figyeltük meg a vizsgált markergének upregulációját, ami szintén korrelációt mutat a korábbi irodalmi adatokkal [52].

Miután génexpressziós szinten igazoltuk, hogy a sejtvonal eredetű micromass kultúrák valóban átestek az *in vitro* porcfejlődés folyamatán, a mintákat tovább elemeztük a PCR array módszerével. Számos markergén expresszióját megvizsgáltuk, melyek az epigenetikai szabályozási folyamatok fontos enzimeiként vannak számontartva. Kutatásunk középpontjába a DNS metilációt állítottuk. A metiláló, illetve demetiláló enzimek közül három került kiválasztásra részletes analízis céljából, nevezetesen a *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt*. A három megjelölt markergén kiegyensúlyozott együttműködése biztosítja a megfelelő genomi szintű metilációs státuszt. A DNS metiltranszferázok közül a DNMT3B enzimről már korábbi kutatások is megállapították, hogy fontos szereppel bír a végtagok normális fejlődése, illetve a hipertrófiás kondrociták érése során [85]. A DNMT3B szintén hozzájárul a posztnatális ízületi porc sejt szintű metabolikus folyamatainak szabályozásához [190]. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján azt vártuk, hogy a *Dnmt3a* és *Dnmt3b* markerek a kondrogenézis későbbi fejlődési szakaszaiban fognak upregulációt mutatni. A PCR array eredményei alapján készült hő térkép jól ábrázolta, hogy a két *de novo* metiltranszferáz RNS szintje a porcfejlődés érési és hipertrófiás fázisában emelkedett meg szignifikáns mértékben. A DNS metiláció egy reverzibilis folyamat, a visszafordíthatósághoz a TET enzimek járulnak hozzá. Kísérleteink során ezeknek a metilációs markergéneknek az expresszióját is megvizsgáltuk, ugyanis az utóbbi évek alatt bebizonyosodott, hogy kulcsfontosságú epigenetikai szabályozó szereppel bírhatnak a porc fejlődése során. Habár a *Tet1*-géncsendesítés csak mérsékelt elváltozásokat okozott a vizsgálatokhoz használt transzgenikus laborállatok mozgási szervrendszerében, az *in vitro* kísérletek eredményei azonban szignifikáns csökkenést jeleztek a *Col2a1* és *Acan* gének expressziós szintjében [96] [191] [192]. A TET enzimek tér- és időbeli eloszlásával kapcsolatban előzőleg már azt is leírták, hogy az enzimesaládba tartozó fehérjék közül a TET1 volt az egyedüli, amely az egérembriók fejlődő csigolyáiban a kondroprogenitor sejtekben és a hipertrófiás transzformáció jeleit mutató érett kondrocitákban is kifejeződött, azaz az embrionális kondrogenézis teljes folyamata alatt, az embrió 14,5 és 16,5 napos fejlődési stádiumai között. Annak ellenére, hogy a TET2 fehérje az összes vizsgált embrionális napon (E12.5, E14.5, E16.5, E18.5) expresszáldott, tehát a porcfejlődés által érintett napokon is, a

legmagasabb expressziót a 12,5 napos embrióról készült metszet mutatta, amikor a fejlődő porc még csak primordiális stádiumban van jelen. Ezzel szemben a TET3 enzim csupán az oszteogenezis kezdeti szakaszában, a 18,5 napos embrionális stádium alatt adott pozitív jeleket az immuncitokémiai vizsgálatok során [89]. Az általunk bemutatott PCR array eredmények és az előzőleg leírt fehérje-expresszió alapuló vizsgálati eredmények között nagyfokú átfedést fedeztünk fel, mivel a *Tet1*, *Tet2* és *Tet3* RNS-szintű expressziós aktivációját az *in vitro* kondrogenézis érési és hipertrófiás szakaszaiban figyeltük meg. A TET enzimek molekuláris partnerét kódoló OGT egy gyakori poszttranszlációs módosulás, az O-GlcNAciláció egyik molekuláris résztvevője. A fehérjék O-GlcNAcilációs szintjének krónikus diszregulációját már számos humán patológiás esetben, így az OA kialakulása során is leírták, ahol a porcspecifikus fehérjéknél mért poszttranszlációs módosulás fokozódását, ezzel párhuzamosan pedig az OGT enzim izoformáinak emelkedett expresszióját is kimutatták [92]. A prekondrogenikus ATDC5 sejtvonal eredetű sejtek porcspecifikus *in vitro* differenciációja során azt is megfigyelték, hogy az inzulin-indukált kondrocita differenciáció szoros kapcsolatban állt az OGT fokozott szintézisével és ezáltal a fehérjék O-GlcNAcilációs szintjének megemelkedésével, továbbá a módosított fehérjék akkumulációja indukálta a porcfejlődési folyamatokat, az ECM átrendeződését, és a prehipertrófiás porcsejtek megjelenését [91]. Az OGT működéséről ezen felül azt is megállapították, hogy szoros szabályozási kapcsolatban áll a TET enzimekkel, különösen a TET1 enzimmal, ugyanis képes stimulálni a TET1 katalitikus aktivitását [80]. Ezen irodalmi adatok alapján az OGT expressziós szintjének megemelkedését az *in vitro* porcfejlődés utolsó harmada, a hipertrófiás transzformáció szakasza alatt vártuk. A PCR array hőtérképén megfigyelhettük, hogy a vizsgált enzim RNS szintű upregulációja a 10. tenyésztési napon kezdődött meg, de a legnagyobb mértékű növekedést a 15. tenyésztési napon mutattuk ki. A fentebb vázoltak alapján megállapítható, hogy megfelelő egyezést találtunk az általunk vizsgált C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonal kondrogenikus differenciáltatása során látott génexpressziós mintázat és a porcosodást vizsgáló egyéb modellekben leírtak között.

A továbbiakban kvantitatív PCR segítségével részletesebb analízisnek vetettük alá a DNS metilációval asszociált három marker RNS szintű expresszióját. A sejtvonal eredetű porcosodó mintákat ennél a vizsgálati típusnál is a 0., 5., 10. és 15. tenyésztési napokig tartottuk fent. A kvantitatív expressziós mintázatok nagy átfedést mutattak a PCR array eredményeivel. A *Dnmt3a* és *Tet1* gének már az 5. tenyésztési napon szignifikáns expressziós növekedést jeleztek, azonban a legmagasabb expressziós csúcs a 10. tenyésztési napon figyelhető meg mindhárom gén esetében, míg a 15. tenyésztési napon már alacsonyabb mértékű upregulációt

láttunk, tehát a késői hipertrófiás szakaszra a vizsgált gének transzkripciós aktivitása csökkenő tendenciát mutatott.

A sejtvonal eredetű HD kultúrák elemzése során kapott eredmények validálása érdekében primer porcosodó micromass kultúrákban is megvizsgáltuk a *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* transzkriptumok mennyiségi változását az *in vitro* porcfejlődés folyamata alatt. A kultúrákat 11,5-napos egémbriók végtagtelepeiből izolált kondroprogenitor sejtek nagy sűrűségben való kicseppentésével hoztuk létre [193]. Az RT-qPCR eredményeinek analízise során a *Dnmt3a* expressziós szintje közepesen magas emelkedést mutatott a 3. tenyésztési napon, azaz a kondrogenikus sejtek porc irányú elköteleződésének időszaka alatt, majd a kondrogenezis előre haladtával fokozatos csökkenést láttunk az átírt RNS mennyiségében. Az *Ogt* konstans szinten expresszáldott, egyedül a tenyésztés 15. napján figyelhettük meg szignifikáns csökkenését. A *Tet1* expressziója az előző két markerhez képest erőteljes upregulációt jelzett a porcfejlődés teljes szakasa alatt, a legmagasabb transzkript szinteket az osztódás és az elköteleződés fázisai alatt mutattuk ki. Fontos megemlíteni, hogy a sejtvonal eredetű és a primer micromass kultúrák eltérő ütemű és dinamikájú porcfejlődést mutathatnak. A laboratóriumunk munkatársai által közölt eredmények jól tükrözik ezt a különbséget, ugyanis kimutatták, hogy a primer porcosodó kultúrákhoz képest a sejtvonal eredetű porckultúrák sok markert a tenyésztési időben lemaradva (1-2 tenyésztési napnak megfelelő különbséggel) expresszáltak, illetve a metakromáziás festéseknél is jól észrevehető volt a gyengébb és lassabban kialakuló jellegzetes ECM termelődés a primer mintákhoz viszonyítva [52]. A jelenség egyik magyarázata a differenciálódó sejtek eltérő migrációs képességében kereshető: az egémbrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtek a korai porcdifferenciáció alatti kondenzációs lépésnél együtt maradtak és ezáltal jól elkülöníthető prekondrogenikus nodulusokat hoztak létre a primer micromass kultúrában, míg a sejtvonal eredetű HD kultúrák perifériás sejtjei extrém migrációt mutattak. Megjegyzendő továbbá, hogy a primer kultúrák esetében az izolált sejtek bizonyos szinten elköteleződtek a porc irányú differenciáció felé, így azok a kicseppentés napján már kondroprogenitor sejteknek tekintendők. Ezért a primer kultúrákban gyorsabb ütemben mehet végbe az *in vitro* porcfejlődés a sejtvonal eredetű kultúrákhoz képest. Fontos még hozzátenni, hogy a primer porckultúrák egy heterogén sejtpopulációt reprezentálnak, amelyben kis számban előfordulhatnak fibroblasztok is, tehát ez a tulajdonság is hozzájárulhat a két modell közötti molekuláris különbségekhez.

Következő lépésként szeretnénk volna megvizsgálni az általunk kiválasztott három epigenetikai markergén mRNS szintű expresszióját *in situ* hibridizációs technikával. Ehhez 15

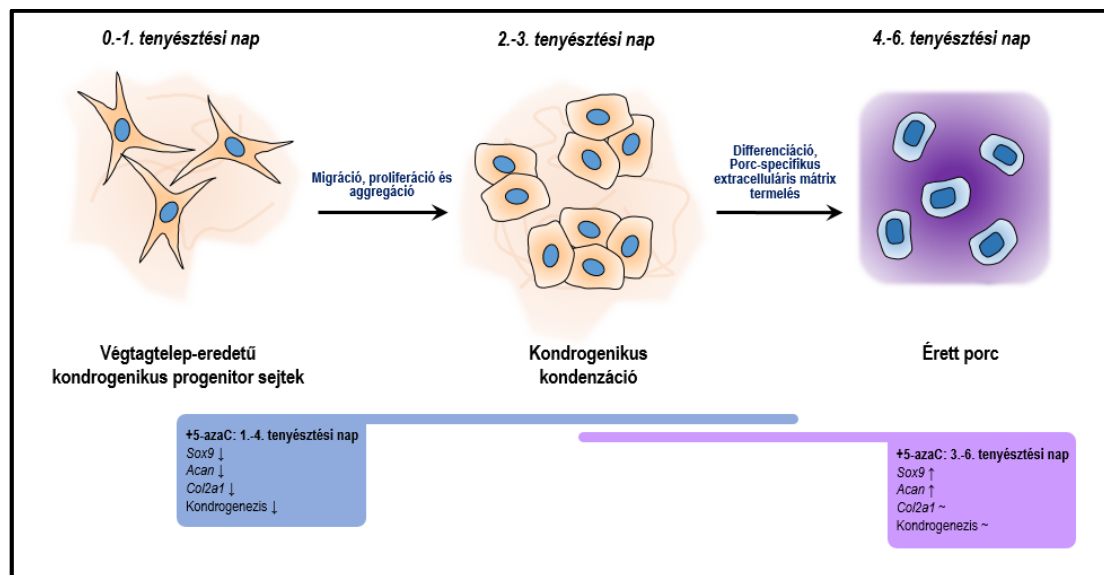
napos teljes egérembriókból kriosztátos metszési eljárás segítségével metszeteket hoztunk létre, és specifikus RNS-próbákat alkalmaztunk, hogy detektálhassuk a kiválasztott transzkriptek jelenlétét az embrió különböző szöveti területein. A vizsgálatainkhoz használt embrió korát a porc fejlődésének stádiumai alapján határoztuk meg, melyet Rafipay és munkatársai már korábban leírtak [194]. Kutatásaik során megállapították, hogy az egérembrió fejlődő végtagjainak porc és csont elemei a 12,5 és 16,5 napos embrionális fejlődési napok között alakulnak ki. Az első porc irányú differenciációt mutató területeket a 12,5 napos embrió mellső végtagjaiban mutatták ki, míg az encondralis csontképződést megelőző porcmineralizációra és a csontképződés megindulására specifikus szövettani festési eljárásaként ismert alizarin vörös csak a 15,5 napos embrióban vált először felismerhetővé. Ezen információk alapján a 15 napos embriókat választottuk ki a DNS metilációval kapcsolatos vizsgálataink szempontjából legmegfelelőbb fejlettségi szintnek. Ebben a fejlődési stádiumban az érett hialinporcot alkotó kondrociták könnyen azonosíthatóak, emellett a kondrociták közel azonos fejlettségi szintet és tulajdonságokat mutatnak a 6 napos primer porcosodó micromass kultúrákban található kondrocitákkal. Az *in situ* hibridizáció eredményei nagy átfedést mutattak az RT-qPCR eredményeivel. A legfontosabb hasonlóság a két molekuláris biológiai módszer eredményei között az volt, hogy mindkét esetben a *Tet1* mutatta a legerőteljesebb expressziót a 3 epigenetikai marker közül. A *Tet1* oszteo-kondrogenikus differenciációban betöltött szignifikáns szerepét már kísérletes eredményekkel is alátámasztották: az epigenetikai faktor specifikus génszintű kiütése negatív hatást gyakorolt a mutáns egerek csontvázának fejlődésére, a vizsgált laboratóriumi állatokban növekedési rendellenességeket okozott, vagy akár embrionális letalitáshoz is vezethetett [81]. A *Tet1* géncsendesítése az ATDC5 sejtvonal eredetű kondroprogenitor sejtekben szintén negatívan befolyásolta a sejtek kondrogenikus irányú differenciációját [88]. C3H10T1/2 sejtvonal eredetű sejtek esetében is hasonló hatásokat figyeltek meg, ugyanis a *Tet1* downregulációja következményeként számos porcmarker, így a II-es típusú kollagén expressziója is lecsökkent [191].

A DNS metilációval asszociált faktorok normál *in vitro* porcfejlődés alatt bekövetkezett expressziós változásai mellett azt is megvizsgáltuk, hogy a DNS metilációt gátló 5-azaC kezelőanyag hogyan befolyásolja a még éretlen kondroprogenitor sejtek, illetve az érett kondrociták porcdifferenciációs képességét. A korábban megjelent publikációk alapján a vegyületet 10 μ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk [195] [196] [197]. Habár az általunk választott koncentráció ötször nagyobb mértékű volt, mint a Duan és munkatársai által alkalmazott koncentráció, akik szintén az 5-azaC hatásait vizsgálták humán eredetű érett

kondrocitákon [198], ennek ellenére az egérembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrák kondrogenikus sejtjei az életképességi teszt eredményei alapján jól tolerálták a kezelést. A sejtproliferációs teszt eredményei szerint a gátlószer hatással volt az *in vitro* kondrogenezis korai proliferációs és késői differenciációs szakaszaira is, azonban az 5-azaC drasztikusabb mértékben befolyásolta a korai stádiumot, ahol a tenyésztés első három napja alatt alkalmazott kezelés extrém mértékű csökkenést idézett elő a kondroprogenitor sejtek osztódási képességében.

Az 5-azaC kezelőanyag porcfejlődésre kifejtett hatásait több kutatócsoport is vizsgálni kezdte az elmúlt években. A humán csontvelő eredetű mezenchimális őssejtek és a zsírszövet eredetű őssejtek kondrogenikus differenciációja során alkalmazott gátlószer stimulálta a porcfejlődést a kísérleti modellekben, illetve a zsírszövet eredetű őssejtek esetében a sejtproliferációs aktivitást is fokozta. [199] [200]. A humán csontvelő eredetű őssejtek multipotens jellege változó tendenciát mutatott a kezelés számának függvényében: egyszeri adagolást követően a sejtek még megőrizték multipotenciájukat, azonban a kezelőanyag ismétlődő hozzáadása következtében a sejtek differenciációs potenciálja lecsökkent, ezzel párhuzamosan pedig megnőtt az őssejtek kondrogenikus irányú elköteleződésének mértéke [201]. Egy másik tanulmányban azonban azt írták le, hogy a még differenciálatlan humán csontvelő eredetű őssejtekből létrehozott porcosodó sejt kultúrákban lecsökkent a kondrogenikus markergének expressziós szintje az 5-azaC kezelést követően, melyet 24 vagy 48 órán keresztül alkalmaztak az *in vitro* porcfejlődés alatt [102]. Az előbbieken felsorolt, egymásnak ellentmondó kísérletes adatok, illetve az általam bemutatott 5-azaC kezeléssel kapcsolatos eredmények jól érzékeltetik, hogy a DNS metilációs gátlószerrel való munka során nem csupán a kezelőanyag megfelelő koncentrációját érdemes optimalizálni, de a kezelések száma, időtartama és üteme is fontos paraméter, illetve a biológiai modellhez felhasznált sejtek differenciációs állapotával is számolni kell [202]. Az egérembrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott micromass kultúrákban az 5-azaC eltérő hatást fejtett ki attól függően, hogy a kezelőanyagot melyik porcdifferenciációs szakaszban és milyen fejlettségi szintű porcsejteknél alkalmaztuk az *in vitro* hialinporc-fejlődés során. A Sox9, Col2a1 és Acan porc markergének expressziója szignifikánsan csökkent, amikor az 5-azaC-t a kondrogenezis korai proliferációs stádiuma alatt (a tenyésztés 1. napjától, 72 órán át) használtuk; azonban a három vizsgált gén promóter régiójában nem tapasztaltunk hipermetilációt, ami azt jelenti, hogy a kezelés nem közvetlenül ezeken a célpontokon keresztül befolyásolta az expressziós mintázatok alakulását. Feltételezhetjük, hogy az 5-azaC olyan

represszor fehérjéket kódoló géneket aktivált, amelyek hozzájárulnak a három porcmarker downregulációjához. Emellett az 5-azaC korai differenciációs stádiumban észlelt jelentős proliferáció-gátló hatását is szem előtt kell tartani, amelynek genetikai/metilációs hátterét azonban nem vizsgáltuk jelen kísérleteink során. A porcfejlődés későbbi, azaz differenciációs szakasza alatt alkalmazott DNS metiláció-gátlás (a tenyésztés 3. napján indított, 72 órán át tartó 5-azaC kezelés) ellentétes hatásúnak bizonyult, ugyanis a kezelőanyag pozitívan hatott a Sox9 és Acan gének expressziójára, és fokozta azok transzkripcióját. Bizonyítottuk, hogy az RT-qPCR eredményei alapján kimutatott upreguláció a két gén promóter régiójában bekövetkezett hipometiláció miatt jött létre. Ezáltal megállapítottuk, hogy a DNS metiláció képes közvetlen módon irányítani a kondrogenézis kulcs faktorainak transzkripciós aktivitását, különösen a differenciált porcsejtek esetében. Az 6.1. ábrán összefoglaltuk az 5-azaC kezelés és az *in vitro* porcfejlődés kapcsolatát és dinamikáját leíró eredményeinket.



6.1. ábra: A csirkeembrió végtagtelep eredetű micromass kultúrák *in vitro* kondrogenikus differenciációja, illetve a DNS metilációt gátló 5-azacitidin kezelések közötti kapcsolatot bemutató kísérletes tapasztalatok összesített ábrázolása. A kondrogenikus markerek (Sox9, Acan, Col2a1) génszintű expressziós szabályozását az első naptól indított 72 órás kezelés gátolta, emellett a metakromázias szövettani festés esetében csökkent extracelluláris mátrix-termelődést láttunk, így a porcfejlődés folyamatát összességében negatívan befolyásolta a kémiai moduláció. A 3. naptól indított, 72 órán át tartó kezelés upregulálta két vizsgált gén expresszióját, azonban a micromass kultúrák szövettani festésénél nem tapasztaltunk jelentősebb változást.

Jövőbeli terveink közé tartozik, hogy a normál *in vitro* porcosodási folyamat, illetve az 5-azaC kezelés porcdifferenciációra kifejtett hatásait genom-szintű metilációs analízisek és RNS szekvenálás által tovább vizsgáljuk, a bioinformatikai adatok alapján pedig létrehozassunk egy, a kondrogenikus sejtekre specializált metilóm-szintű adatbázist. A

továbbiakban az egérembrió eredetű micromass kultúrák mellett humán eredetű minták feldolgozásából származó eredményekkel is szeretnénk alátámasztani a DNS metiláció szabályozásának fontosságát, illetve pontosítani az 5-azaC gátlószer hatásmechanizmusát.

6.2 A cirkadián óra molekuláris résztvevőinek vizsgálata az *in vitro* porcfejlődés során

A cirkadián óra fontos szereppel bír az érett porcszövet homeosztázisának fenntartásában, befolyásolja a kondrociták differenciációját, illetve a porcspecifikus ECM komponenseit létrehozó faktorok oszcilláló expressziós mintázatát is [137] [139] [203] [204]. Mindezek mellett már az is bizonyított, hogy a kondrocitákban működő perifériás cirkadián óra megzavarása oszteoarthritisre jellemző fenotípushoz vezet [136] [153].

Kísérleteink célja az volt, hogy egy jól ismert és széles körben elfogadott *in vitro* kondrogenikus modellben kimutassuk az alapvető fontosságú óragének meglétét és cirkadián oszcillációt mutató expressziós mintázatát, illetve hogy megvizsgáljuk az óraszinkronizáció *in vitro* porcfejlődés folyamatára kifejtett hatását. A perifériás óra jelenlétét és működését már részletesen jellemezték az érett porcsejtekben [205] [206], azonban az *in vitro* kondrogenézis, és kifejezetten annak korai fejlődési szakaszára jellemző kondroprogenitor sejtek szinkronizált cirkadián óra-működését eddig még sehol sem írták le. Szintén elsőként tudtuk demonstrálni három alapvető fontosságú kondrogenikus markergén (*SOX9*, *COL2A1*, *ACAN*) cirkadián expressziós mintázatát, melyet az *in vitro* porcfejlődés korai és késői szakaszai alatt egyaránt vizsgáltunk.

Széles körben ismert, hogy az *ex vivo* módon tenyésztett és fenntartott sejtek megőrzik a sejtszintű molekuláris óra működését [207]. Azonban mivel az immortalizált sejtvonalak sok esetben csökkent szövet-specifikus funkcióval és megzavart fenotípussal jellemezhetőek, kísérleteinkhez egy primer porcosodó micromass sejtkultúra-alapú modellt választottunk, amelyet csirkeembriók végtagtelepeiből izolált mezenchimális sejtekből hoztunk létre [49]. A 6 napon át tartó tenyésztési periódus alatt a kondroprogenitor sejtek porcspecifikus ECM termelésére képes kondroblasztokká és érett kondrocitákká differenciálódnak, miközben maga az ECM termelődése a 2-3. tenyésztési napokon indul meg [208]. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a molekuláris óra szinkronizált génexpressziós mintázatának jelenlétét az *in vitro* kondrogenézis korai és késői differenciációs szakaszai alatt. A cirkadián óra

szinkronizációját szérumsokkal idéztük elő, melyet a tenyésztés 1. vagy 6. napján alkalmaztunk a primer micromass kultúráknál.

Az 1. tenyésztési napon szinkronizált HD kultúrák analíziséből származó eredmények szerint a korai porcfejlődés stádiuma alatt már a kondroprogenitor sejtek és az azokból differenciálódó korai kondroblasztok is expresszálják az összes alapvető fontosságú cirkadián óra-specifikus gént, emellett mindegyik gén expressziója egy szinkronizált, ritmikus mintázatot követett. A molekuláris óra szinkronizált működése alatt egy 8-órás időtartamot mutató ritmikus oszcillációt tapasztaltunk a *BMAL1* által irányított pozitív vagy génaktivációs fázis, és a *CRY2-PER2-PER3* által irányított negatív vagy gátló visszacsatolás fázisa között. A felnőtt mezenchimális őssejtek (mint például a csontvelői vagy zsírszöveti őssejtek) szintén alkalmas modellek arra, hogy a cirkadián óra szinkronizációját hormonális vagy növekedési faktorok által előidézett szignál (például szérumsokk) által vizsgálják [209]. Habár az embrionális őssejtekben szintén igazolták a molekuláris óra markereinek expresszióját, az óra működőképességét és funkciójának meglétét nem tudták alátámasztani [120]. Az embrionális őssejtek szívizomsejteké váló differenciáltatása során azonban sikerült bizonyítani a funkcióképes molekuláris óra és ezáltal a cirkadián ritmus meglétét [120]. A primer micromass kultúrák létrehozásához felhasznált mezenchimális sejteket fiatal (4 napos) csirkeembriók végtagtelepeiből izoláltuk, ezért valószínűsíthető volt, hogy a sejtek cirkadián molekuláris órája már működésre képes, emellett az óra molekuláris jellemzői megegyeznek a felnőtt mezenchimális sejtek esetében leírt tulajdonságokkal.

Az érettebb differenciációs stádiumban lévő (6 napos) és szérumsokk segítségével szinkronizált micromass kultúrákban az előző bekezdésben leírtakhoz hasonló transzkripciós mintázatot figyelhettünk meg. A 7 vizsgált óragén közül nem sikerült mindegyiknél leírni a szinuszoid-alakú ritmikus expressziós mintázatot a 72 órán át tartó vizsgálati időtartam alatt. A pozitív szabályozó *BMAL1* és a negatív szabályozó *PER2/CRY1* expressziós mintázata azonban 8 óránként változó fázisos oszcillációt mutatott, amely egy mRNS szinten jól működő molekuláris óra jelenlétére utalt. Meglepő módon, az elsődleges pozitív szabályozó *CLOCK* gén expresszióját nem tudtuk igazolni a csirke kondrogenikus sejtekben. Hogy ennek faj vagy sejtspecifikus oka van, további vizsgálatokat igényel. A felsorolt eredmények azt igazolták, hogy az éretlen mezenchimális sejtek mellett az érettebb és elkötelezett, porcspecifikus ECM termelésére képes kondroblasztok és korai kondrociták is rendelkeznek egy jellegzetes és megfelelően funkcionáló molekuláris cirkadián óraművel, melynek meglétét egyébiránt már bizonyították *in vitro* körülmények között tenyésztett érett kondrocitákban [204].

Vizsgálatainkkal alátámasztottuk, hogy mind a korai, mind pedig a késői primer porcosodó micromass kultúrák periodikus dinamikájú cirkadián ritmusának jellemzői nagy hasonlóságot mutattak a felnőtt mezenchimális őssejtekben, illetve érett kondrocitákban leírt irodalmi adatokkal [209] [210] [211].

Kutatásunk egyik kulcsfontosságú eredményeként mutattuk be, hogy a legfontosabb kondrogenikus transzkripciós faktor (*SOX9*), illetve két porcspecifikus ECM komponens (*COL2A1* és *ACAN*) génszintű expressziója szinkronizált, ritmikus mintázatot mutatott a primer porcosodó micromass kultúrákban alkalmazott szérumsokkot követően. A porc szövet markergénjeinek ritmikusan változó kifejeződését eddig még csak a cirkadián óra legalapvetőbb kulcsingerének, a fény és sötétség ciklusos alkalmazása mellett vizsgálták. Patkányokból és egerekből izolált porc mintákban sikerült meghatározni a cirkadián óra markereinek mRNS szintű expresszióját, emellett a fény/sötét inger váltakozása által kiváltott szinkronizáció következtében többek között a *SOX9*, a *COL2A1* és az *ACAN* gének ritmikusan oszcilláló expresszióját is igazolták [137] [212]. A cirkadián óra működését a fény/sötét inger mellett számos külső faktor befolyásolhatja, egyebek között a tápanyag bevitel és mennyisége, a környezeti hőstimulusok, illetve a mechanikai ingerek. Fontos továbbá azt is megjegyezni, hogy a cirkadián óra porcfejlődésre kifejtett szabályozó mechanizmusáról még kifejezetten csekély kísérleti adat áll rendelkezésre. A laboratóriumunk által bemutatott publikáció az első olyan kísérletes tanulmány, amely leírja ezen porcmarkerek géntermékeinek ritmikus expresszióját az *in vitro* porcfejlődés folyamata alatt szérumsokkot követően, különös tekintettel a korai kondrogenézisre [213]. Az eddigi tudományos adatok alapján humán mezenchimális sejtekben egyedül a *SOX2* pluripotencia faktorról kapcsolatban írtak le oszcilláló expressziós mintázatot a szérumsokkal vagy dexametazon-kezeléssel kiváltott szinkronizációt követően [209].

Kísérleteinkkel a cirkadián génexpressziós mintázatok megállapítása mellett azt is bizonyítottuk, hogy az első tenyésztési napon alkalmazott szérumsokk következtében a primer porcosodó micromass kultúrák porcsejtjei a 6. tenyésztési napra erőteljesebb és nagyobb mennyiségű porcspecifikus extracelluláris mátrixot termeltek. Ezt a mikroszkópikus szinten kifejeződött folyamatot mRNS szinten, a *SOX9*, *COL2A1* és *ACAN* porc markergének expressziós változásainak analízise során is megfigyelhettük. A porcfejlődés korai szakasza alatt alkalmazott szérumsokk tehát stimuláló hatással bírt a kondrogenézis folyamatára. Ez a jelenség egyértelműen a szérumsokk molekuláris óra szinkronizációját előidéző hatásának volt köszönhető, mivel a longdaysin (LDS) kezelőanyag és a szérumsokk együttes alkalmazását

követően nem tapasztaltunk fokozott porcfejlődést és porcosodási hajlamot, sem a metakromáziás festési eljárással, sem pedig a génexpressziós vizsgálatokkal. Az LDS képes megnyújtani a cirkadián periódusokat, amelyet az óraműködésben részt vevő és a PER fehérjék stabilitásáért felelős kinázok (elsősorban a kazein-kináz I) gátlásával ér el [214] [215]. A korai kondrogenikus fázisban járó HD kultúrák molekuláris órájának megzavarása feltételezhetően negatív hatással bír a sejtek életképességére, mint ahogy azt az MTT teszt eredményei alapján láthattuk: a 24 órán át tartó LDS kezelést követően sejtpusztulást tapasztaltunk. Összességében elmondhattuk, hogy a szérumsokk alkalmazását követően fokozott porcdifferenciációt és porcfejlődést tapasztaltunk, azonban a jelenség pontos molekuláris hátterének feltárása további kísérleteket fog igényelni. Fontos megjegyezni, hogy a *RUNX2*-nek, az oszteogenikus differenciáció egyik markergénjének transzkripció szintjében csökkenő tendenciát tapasztaltunk, továbbá sem az első, sem pedig a hatodik tenyésztési napon indított szérumsokkot követően sem sikerült kimutatnunk a cirkadián óraműködésre jellemző ritmikusan oszcilláló génexpressziós mintázatot. A *RUNX2* génnel kapcsolatos eredmények részben magyarázatot adhatnak arra, hogy miért stimulálódhatott szignifikáns mértékben a micromass kultúrák porcosodási hajlama. Az oszteogenikus markergén expressziójának csökkenése azt jelezheti előre, hogy a szérumsokkot követően a primer HD kultúrák sejtei (mind a korai osztódási, mind pedig a késői differenciációs szakaszokban) előnyben részesíthetik a kondrogenikus irányú differenciációt. Egy korábbi közleményben már sikeresen igazoltuk a *RUNX2* mRNS szintű expresszióját egérembrío végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban [52]. Emellett humán kondrogenikus progenitor sejtek vizsgálatakor azt is kimutatták, hogy a *RUNX2* gén csendesítése hozzájárult a *SOX9*, *COL2A1* és *ACAN* porcmarkerek génexpressziójának szignifikáns megemelkedéséhez, amely így fokozta a sejtek differenciációs elköteleződését a porcszövet irányába [14]. Kutatásaink eredményeként sikerült leírunk egy szérumsokkon alapuló módszert, amely mindamellett, hogy előidézi a molekuláris cirkadián óra sejszintű szinkronizációját, szintén elősegíti a porcprogenitor sejtek kondrogenikus differenciációs vonalú elköteleződését, illetve fokozza az *in vitro* kondrogenezist. A cirkadián óraműködés szinkronizálásának fokozódásával párhuzamosan tapasztalható erőteljesebb kondrogenikus differenciációs képesség felismerésével a bemutatott eredmények hozzájárulhatnak az ízületi porc degenerációjával járó megbetegedések újszerű megközelítéséhez, és a klinikai gyakorlatban is alkalmazható óra-szinkronizáló beavatkozások kifejlesztésével fokozhatják a sejszintű porc regenerációs technikák hatékonyságát.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésemben részletezett vizsgálatok célja az volt, hogy feltérképezsem, hogyan befolyásolja a porc *in vitro* differenciációját két potenciális szabályozó mechanizmus: a DNS metiláció és a cirkadián biológiai óra. A disszertációban bemutatott legfontosabb új eredményeket az alábbiakban foglalom össze:

A DNS metilációval kapcsolatos új megállapítások:

- A *Dnmt3a*, *Tet1*, *Ogt* DNS metiláció-asszociált gének a porc fejlettségi állapotától függően eltérő erősséggel expresszáálódtak.
- Minden kísérleti modellben a *Tet1* mutatta a legmagasabb expressziós növekedést, ami a *Tet1* kiemelt szerepét jelölheti a porcdifferenciáció során, a jövőben potenciális biológiai célpontként szolgálhat a porc fejlődését befolyásoló kezelőanyagok fejlesztése szempontjából.
- Az *in vitro* porcdifferenciáció késői stádium során alkalmazott 5-azacitidin serkentőleg hatott a *Sox9* és *Acan* porcmarkerek génexpressziójára, ez a metiláció gátlásának volt köszönhető, ugyanis a két markergén promóter régiói csökkent metiláltságot jeleztek. Ezek a promóter régiók kiemelt szabályozó pontokat jelölhetnek a jövőbeli epigenetikai-szintű kezelések szempontjából. Az 5-azacitidin a megfelelő alkalmazás mellett szintén potenciális terápiás szerként szolgálhat.

A cirkadián órával kapcsolatos új megállapítások:

- A szérumsokk alapú óraszinkronizáció szignifikánsan fokozta a porcspecifikus extracelluláris mátrix termelődését, illetve a *SOX9*, *ACAN* és *COL2A1* porc markergének expresszióját, tehát a szérumsokknak kondrogenezist elősegítő hatása volt.
- A szérumsokkot követően a molekuláris cirkadián óra központi óragénjei szinkronizált expressziós mintázatot mutattak. Kimutattuk a pozitív szabályozó *BMAL1* és a negatív szabályozó *PER2/PER3/CRY1/CRY2* expressziós mintázatainak 8-óránként változó antifázisos oszcillációit.
- Igazoltuk, hogy a cirkadián óra összehangolt működésének longdaysin-nel való megzavarása negatív hatással bírt a porcképződésre. Ezzel alátámasztottuk, hogy a normál ritmikus cirkadián óraműködésnek kulcsfontosságú pozitív szabályozó szerepe van porc szöveti fejlődésében.

8. SUMMARY

The aim of the scientific research studies presented in this work was to identify the potential regulatory roles of DNA methylation and circadian clockwork during *in vitro* chondrogenesis. The most important results of this thesis are listed below:

Novel findings related to DNA methylation:

- The expression patterns of the three DNA methylation-associated genes *Dnmt3a*, *Tet1* and *Ogt* altered depending on the developmental stage of cartilage formation.
- *Tet1* showed the most prominent expressional changes in all of the experimental models. *Tet1* may have a specific role during chondrogenic differentiation and it may serve as a potential target protein for therapeutic agents affecting cartilage formation.
- 5-azacytidine treatment applied during the late stage of chondrogenesis caused an upregulation in the expression of chondrogenic marker genes *Sox9* and *Acan*. This was a direct result of inhibiting DNA methylation, because the promoter regions of the two chondrogenic marker genes showed hypomethylation. These promoter regions may indicate important regulatory regions for future epigenetic-associated treatments. 5-azacytidine may also be a feasible therapeutic agent in the near future.

Novel findings related to circadian clockwork:

- Serum shock-induced clock-synchronization caused a significant increase in the production of cartilage-specific extracellular matrix and upregulated the expression of chondrogenic marker genes *SOX9*, *ACAN* and *COL2A1*. Thus we can conclude that serum shock promotes chondrogenic differentiation.
- Serum shock triggered a synchronized expression pattern of the core regulatory elements of the molecular circadian clock. We have shown the oscillating expression of the positive regulator *BMAL1* and the negative regulator *PER2/PER3/CRY1/CRY2*, indicating an antiphasic change at every 8 hours.
- Our results demonstrated that the alteration of circadian clock with longdaysin had a negative effect on cartilage formation, indicating that the proper rhythm of the circadian clockwork has a key positive role in the regulation of chondrogenesis.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Cieza, A., et al., *Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. Lancet, 2021. **396**(10267): p. 2006-2017.
2. Fekete, H., et al., *Evaluation of osteoarthritis knee and hip quality of life (OAKHQoL): adaptation and validation of the questionnaire in the Hungarian population*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2020. **12**: p. 1759720X20959570.
3. Roos, E.M. and N.K. Arden, *Strategies for the prevention of knee osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(2): p. 92-101.
4. Zhang, Y. and J.M. Jordan, *Epidemiology of osteoarthritis*. Clin Geriatr Med, 2010. **26**(3): p. 355-69.
5. Feuerstein, M., P.A. Findley, and D.P. Gross, *Reducing the Global Burden of Work Disability: A Call to Action to Support the World Health Organization's Rehabilitation 2030*. J Occup Rehabil, 2019. **29**(4): p. 669-670.
6. Kloppenburg, M. and F. Berenbaum, *Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy*. Osteoarthritis Cartilage, 2020. **28**(3): p. 242-248.
7. Kangari, P., et al., *Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects*. Stem Cell Res Ther, 2020. **11**(1): p. 492.
8. Matta, C., et al., *N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor expression and function is required for early chondrogenesis*. Cell Commun Signal, 2019. **17**(1): p. 166.
9. Matta, C., et al., *Purinergic signalling is required for calcium oscillations in migratory chondrogenic progenitor cells*. Pflugers Arch, 2015. **467**(2): p. 429-42.
10. Juhasz, T., et al., *Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures*. Cell Signal, 2014. **26**(3): p. 468-82.
11. Erlebacher, A., et al., *Toward a molecular understanding of skeletal development*. Cell, 1995. **80**(3): p. 371-8.
12. Olsen, B.R., A.M. Reginato, and W. Wang, *Bone development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 191-220.
13. Nakayama, N., et al., *Human pluripotent stem cell-derived chondroprogenitors for cartilage tissue engineering*. Cell Mol Life Sci, 2020. **77**(13): p. 2543-2563.
14. Koelling, S., et al., *Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 324-35.
15. Röhlich, P., *Szövevény Semmelweis Kiadó*, 2014. p. 1-556.
16. Ross, H.M., Pawlina, W., *A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
17. Eyre, D.R., M.A. Weis, and J.J. Wu, *Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?* Eur Cell Mater, 2006. **12**: p. 57-63.
18. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. Br Med Bull, 2008. **87**: p. 77-95.
19. DeLise, A.M., L. Fischer, and R.S. Tuan, *Cellular interactions and signaling in cartilage development*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(5): p. 309-34.
20. Delise, A.M. and R.S. Tuan, *Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro*. Dev Dyn, 2002. **225**(2): p. 195-204.
21. Haas, A.R. and R.S. Tuan, *Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function*. Differentiation, 1999. **64**(2): p. 77-89.
22. Chimal-Monroy, J. and L. Diaz de Leon, *Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilage condensations*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(1): p. 59-67.
23. Daniels, K. and M. Solursh, *Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix*. J Cell Sci, 1991. **100 (Pt 2)**: p. 249-54.
24. Archer, C.W. and P. Francis-West, *The chondrocyte*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(4): p. 401-4.
25. Han, L., A.J. Grodzinsky, and C. Ortiz, *Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix*. Annu Rev Mater Res, 2011. **41**: p. 133-168.
26. Alvarez, J., et al., *Collagen metabolism is markedly altered in the hypertrophic cartilage of growth plates from rats with growth impairment secondary to chronic renal failure*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(3): p. 511-24.

27. Burdan, F., et al., *Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(1): p. 5-16.
28. Akiyama, H., et al., *The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2813-28.
29. Tuan, R.S., *Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 137-41.
30. Rosen, V., et al., *Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(11): p. 1759-68.
31. Zehentner, B.K., C. Dony, and H. Burtscher, *The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(10): p. 1734-41.
32. Valcourt, U., et al., *Different effects of bone morphogenetic proteins 2, 4, 12, and 13 on the expression of cartilage and bone markers in the MC615 chondrocyte cell line*. Exp Cell Res, 1999. **251**(2): p. 264-74.
33. De Luca, F., et al., *Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2*. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 430-6.
34. Mandl, E.W., et al., *Fibroblast growth factor-2 in serum-free medium is a potent mitogen and reduces dedifferentiation of human ear chondrocytes in monolayer culture*. Matrix Biol, 2004. **23**(4): p. 231-41.
35. Liu, G., et al., *Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20407-15.
36. Oichi, T., et al., *Wnt signaling in chondroprogenitors during long bone development and growth*. Bone, 2020. **137**: p. 115368.
37. Lee, H.H. and R.R. Behringer, *Conditional expression of Wnt4 during chondrogenesis leads to dwarfism in mice*. PLoS One, 2007. **2**(5): p. e450.
38. Al-Qattan, M.M., *WNT pathways and upper limb anomalies*. J Hand Surg Eur Vol, 2011. **36**(1): p. 9-22.
39. Zelzer, E., et al., *Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2*. Mech Dev, 2001. **106**(1-2): p. 97-106.
40. Hattori, T., et al., *SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification*. Development, 2010. **137**(6): p. 901-11.
41. Gao, L., et al., *Effects of solid acellular type-I/III collagen biomaterials on in vitro and in vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells*. Expert Rev Med Devices, 2017. **14**(9): p. 717-732.
42. Sadler, T.W., *Langman's Medical Embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
43. Lefebvre, V. and P. Bhattaram, *Vertebrate skeletogenesis*. Curr Top Dev Biol, 2010. **90**: p. 291-317.
44. Usami, Y., et al., *Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies*. Lab Invest, 2016. **96**(2): p. 186-96.
45. Spieker, J., et al., *Endochondral Ossification Is Accelerated in Cholinesterase-Deficient Mice and in Avian Mesenchymal Micromass Cultures*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170252.
46. Nurminsky, D., et al., *Transglutaminase 2 regulates early chondrogenesis and glycosaminoglycan synthesis*. Mech Dev, 2011. **128**(3-4): p. 234-45.
47. Saha, A., et al., *Chondrogenesis of embryonic limb bud cells in micromass culture progresses rapidly to hypertrophy and is modulated by hydrostatic pressure*. Cell Tissue Res, 2017. **368**(1): p. 47-59.
48. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. 1951. Dev Dyn, 1992. **195**(4): p. 231-72.
49. Mello, M.A. and R.S. Tuan, *High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(5): p. 262-9.
50. Ahmed, Z., J.R. Archer, and R.A. Brown, *Cartilage calcification and limb bud growth in the developing tich mouse embryo*. Calcif Tissue Int, 1997. **60**(6): p. 561-6.
51. Vogel, A. and C. Tickle, *FGF-4 maintains polarizing activity of posterior limb bud cells in vivo and in vitro*. Development, 1993. **119**(1): p. 199-206.
52. Takacs, R., et al., *Comparative analysis of osteogenic/chondrogenic differentiation potential in primary limb bud-derived and C3H10T1/2 cell line-based mouse micromass cultures*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(8): p. 16141-67.
53. Ahrens, P.B., M. Solursh, and R.S. Reiter, *Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture*. Dev Biol, 1977. **60**(1): p. 69-82.
54. Hadhazy, C., M.B. Lazlo, and K.S. Kostenszky, *Cartilage differentiation in micro-mass cultures of chicken limb buds*. Acta Morphol Acad Sci Hung, 1982. **30**(1): p. 65-78.
55. Matta, C. and R. Zakany, *Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair*. Front Biosci (Schol Ed), 2013. **5**(1): p. 305-24.

56. Czekanska, E.M., et al., *In search of an osteoblast cell model for in vitro research*. Eur Cell Mater, 2012. **24**: p. 1-17.
57. Schlichting, N., et al., *Suitability of porcine chondrocyte micromass culture to model osteoarthritis in vitro*. Mol Pharm, 2014. **11**(7): p. 2092-105.
58. Furumatsu, T. and T. Ozaki, *Epigenetic regulation in chondrogenesis*. Acta Med Okayama, 2010. **64**(3): p. 155-61.
59. Glant, T.T., K. Mikecz, and T.A. Rauch, *Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. BMC Med, 2014. **12**: p. 35.
60. Tsai, H.C. and S.B. Baylin, *Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 502-17.
61. Virani, S., et al., *Cancer epigenetics: a brief review*. ILAR J, 2012. **53**(3-4): p. 359-69.
62. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
63. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
64. Sanchez-Romero, M.A., I. Cota, and J. Casadesus, *DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome*. Curr Opin Microbiol, 2015. **25**: p. 9-16.
65. Quina, A.S., M. Buschbeck, and L. Di Croce, *Chromatin structure and epigenetics*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1563-9.
66. Fitzpatrick, D.R. and C.B. Wilson, *Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system*. Clin Immunol, 2003. **109**(1): p. 37-45.
67. Robertson, K.D., *DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5361-79.
68. Hughes, T., et al., *DNA methylome in human CD4+ T cells identifies transcriptionally repressive and non-repressive methylation peaks*. Genes Immun, 2010. **11**(7): p. 554-60.
69. Brown, S.E., et al., *Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells*. Epigenetics, 2007. **2**(1): p. 54-65.
70. Szigeti, K.A., et al., *[Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer]*. Orv Hetil, 2018. **159**(1): p. 3-15.
71. Feng, S., S.E. Jacobsen, and W. Reik, *Epigenetic reprogramming in plant and animal development*. Science, 2010. **330**(6004): p. 622-7.
72. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
73. Chen, Z., et al., *Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers*. Annu Rev Biomed Eng, 2017. **19**: p. 195-219.
74. Wu, H. and Y. Zhang, *Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 45-68.
75. Zafon, C., et al., *DNA methylation in thyroid cancer*. Endocr Relat Cancer, 2019. **26**(7): p. R415-R439.
76. Ma, J. and G.W. Hart, *Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications*. Expert Rev Proteomics, 2013. **10**(4): p. 365-80.
77. Olivier-Van Stichelen, S. and J.A. Hanover, *You are what you eat: O-linked N-acetylglucosamine in disease, development and epigenetics*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015. **18**(4): p. 339-45.
78. Shi, F.T., et al., *Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(29): p. 20776-20784.
79. Vella, P., et al., *Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells*. Mol Cell, 2013. **49**(4): p. 645-56.
80. Hrit, J., et al., *OGT binds a conserved C-terminal domain of TET1 to regulate TET1 activity and function in development*. Elife, 2018. **7**.
81. Yamaguchi, S., et al., *Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 460-4.
82. Lei, H., et al., *De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells*. Development, 1996. **122**(10): p. 3195-205.
83. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
84. Shafi, R., et al., *The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5735-9.
85. Xu, T., et al., *Ablation of Dnmt3b in chondrocytes suppresses cell maturation during embryonic development*. J Cell Biochem, 2018. **119**(7): p. 5852-5863.
86. Wang, C., et al., *Loss of Dnmt3b in Chondrocytes Leads to Delayed Endochondral Ossification and Fracture Repair*. J Bone Miner Res, 2018. **33**(2): p. 283-297.

87. Haseeb, A., M.S. Makki, and T.M. Haqqi, *Modulation of ten-eleven translocation 1 (TET1), Isocitrate Dehydrogenase (IDH) expression, alpha-Ketoglutarate (alpha-KG), and DNA hydroxymethylation levels by interleukin-1beta in primary human chondrocytes*. J Biol Chem, 2014. **289**(10): p. 6877-6885.
88. Taylor, S.E., et al., *Stable 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) Acquisition Marks Gene Activation During Chondrogenic Differentiation*. J Bone Miner Res, 2016. **31**(3): p. 524-34.
89. Li, X., et al., *TET2-Mediated Spatiotemporal Changes of 5-Hydroxymethylcytosine During Organogenesis in the Late Mouse Fetus*. Anat Rec (Hoboken), 2019. **302**(6): p. 954-963.
90. Vago, J., et al., *Analysis of Gene Expression Patterns of Epigenetic Enzymes Dnmt3a, Tet1 and Ogt in Murine Chondrogenic Models*. Cells, 2021. **10**(10).
91. Andres-Bergos, J., et al., *The increase in O-linked N-acetylglucosamine protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2012. **287**(40): p. 33615-28.
92. Tardio, L., et al., *O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(2): p. 259-63.
93. Ezura, Y., et al., *Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(5): p. 1416-26.
94. Fernandez, M.P., M.F. Young, and M.E. Sobel, *Methylation of type II and type I collagen genes in differentiated and dedifferentiated chondrocytes*. J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2374-8.
95. Kumar, D. and A.B. Lassar, *Fibroblast growth factor maintains chondrogenic potential of limb bud mesenchymal cells by modulating DNMT3A recruitment*. Cell Rep, 2014. **8**(5): p. 1419-31.
96. Smeriglio, P., et al., *TET1 Directs Chondrogenic Differentiation by Regulating SOX9 Dependent Activation of Col2a1 and Acan In Vitro*. JBMR Plus, 2020. **4**(8): p. e10383.
97. Kim, K.I., Y.S. Park, and G.I. Im, *Changes in the epigenetic status of the SOX-9 promoter in human osteoarthritic cartilage*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(5): p. 1050-60.
98. Roach, H.I., et al., *Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(10): p. 3110-24.
99. Cheung, K.S., et al., *Expression of ADAMTS-4 by chondrocytes in the surface zone of human osteoarthritic cartilage is regulated by epigenetic DNA de-methylation*. Rheumatol Int, 2009. **29**(5): p. 525-34.
100. Hashimoto, K., et al., *DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(11): p. 3303-13.
101. Hashimoto, K., et al., *Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1beta (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites*. J Biol Chem, 2013. **288**(14): p. 10061-10072.
102. Nomura, Y., et al., *DNA Methylation-Based Regulation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Chondrogenic Differentiation*. Cells Tissues Organs, 2019. **207**(3-4): p. 115-126.
103. Gnyszka, A., Z. Jastrzebski, and S. Flis, *DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer*. Anticancer Res, 2013. **33**(8): p. 2989-96.
104. Brueckner, B., et al., *Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6305-11.
105. Matousova, M., et al., *2 -deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine - a less toxic alternative of 2 -deoxy-5-azacytidine: a comparative study of hypomethylating potential*. Epigenetics, 2011. **6**(6): p. 769-76.
106. Christman, J.K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5483-95.
107. Kaminskas, E., et al., *FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension*. Oncologist, 2005. **10**(3): p. 176-82.
108. Wei, A.H., et al., *Oral Azacitidine Maintenance Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission*. N Engl J Med, 2020. **383**(26): p. 2526-2537.
109. Zhou, G.S., et al., *5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation*. Cytotechnology, 2009. **60**(1-3): p. 11.
110. Toth, D.M., et al., *Amelioration of Autoimmune Arthritis in Mice Treated With the DNA Methyltransferase Inhibitor 5'-Azacytidine*. Arthritis Rheumatol, 2019. **71**(8): p. 1265-1275.
111. Fasolino, I., et al., *5-Azacytidine-mediated hMSC behavior on electrospun scaffolds for skeletal muscle regeneration*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(9): p. 2551-2561.
112. Karouzakis, E., et al., *DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(12): p. 3613-22.
113. Johnson, A.A., et al., *The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease*. Rejuvenation Res, 2012. **15**(5): p. 483-94.

114. Terzibasi-Tozzini, E., A. Martinez-Nicolas, and A. Lucas-Sanchez, *The clock is ticking. Ageing of the circadian system: From physiology to cell cycle*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **70**: p. 164-176.
115. Welsh, D.K., J.S. Takahashi, and S.A. Kay, *Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 551-77.
116. Webb, A.B. and A.C. Oates, *Timing by rhythms: Daily clocks and developmental rulers*. Dev Growth Differ, 2016. **58**(1): p. 43-58.
117. Astiz, M., I. Heyde, and H. Oster, *Mechanisms of Communication in the Mammalian Circadian Timing System*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
118. Delezie, J. and E. Challet, *Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1243**: p. 30-46.
119. Zhang, R., et al., *A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(45): p. 16219-24.
120. Dierickx, P., L.W. Van Laake, and N. Geijsen, *Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration*. EMBO Rep, 2018. **19**(1): p. 18-28.
121. Takahashi, J.S., *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(3): p. 164-179.
122. Huang, R.C., *The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine*. Biomed J, 2018. **41**(1): p. 5-8.
123. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 647-76.
124. Dierickx, P., et al., *Circadian networks in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. EMBO Rep, 2017. **18**(7): p. 1199-1212.
125. Akashi, M., et al., *A positive role for PERIOD in mammalian circadian gene expression*. Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 1056-64.
126. Preitner, N., et al., *The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator*. Cell, 2002. **110**(2): p. 251-60.
127. Akashi, M. and T. Takumi, *The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 441-8.
128. Mazzocchi, G., et al., *REV-ERB α and the clock gene machinery in mouse peripheral tissues: a possible role as a synchronizing hinge*. J Biol Regul Homeost Agents, 2012. **26**(2): p. 265-76.
129. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 3-27.
130. Badura, L., et al., *An inhibitor of casein kinase I epsilon induces phase delays in circadian rhythms under free-running and entrained conditions*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **322**(2): p. 730-8.
131. Walton, K.M., et al., *Selective inhibition of casein kinase 1 epsilon minimally alters circadian clock period*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **330**(2): p. 430-9.
132. Lee, J.W., et al., *Chemical Control of Mammalian Circadian Behavior through Dual Inhibition of Casein Kinase I α and delta*. J Med Chem, 2019. **62**(4): p. 1989-1998.
133. Ko, C.H. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the mammalian circadian clock*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 2**: p. R271-7.
134. Boyle, G., et al., *Comparative Analysis of Vertebrate Diurnal/Circadian Transcriptomes*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169923.
135. Stevenson, S., et al., *Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate?* J Orthop Res, 1990. **8**(1): p. 132-5.
136. Snelling, S.J., et al., *The chondrocyte-intrinsic circadian clock is disrupted in human osteoarthritis*. Chronobiol Int, 2016. **33**(5): p. 574-9.
137. Takarada, T., et al., *Clock genes influence gene expression in growth plate and endochondral ossification in mice*. J Biol Chem, 2012. **287**(43): p. 36081-95.
138. Hinoi, E., et al., *Up-regulation of per mRNA expression by parathyroid hormone through a protein kinase A-CREB-dependent mechanism in chondrocytes*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23632-42.
139. Dudek, M., et al., *The chondrocyte clock gene Bmal1 controls cartilage homeostasis and integrity*. J Clin Invest, 2016. **126**(1): p. 365-76.
140. Ma, Z., et al., *Deletion of clock gene Bmal1 impaired the chondrocyte function due to disruption of the HIF1 α -VEGF signaling pathway*. Cell Cycle, 2019. **18**(13): p. 1473-1489.
141. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
142. Musiek, E.S., et al., *Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration*. J Clin Invest, 2013. **123**(12): p. 5389-400.
143. Vieira, E., et al., *The clock gene Rev-erb α regulates pancreatic beta-cell function: modulation by leptin and high-fat diet*. Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 592-601.

144. Snelling, S., et al., *A gene expression study of normal and damaged cartilage in anteromedial gonarthrosis, a phenotype of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(2): p. 334-43.
145. Yang, W., et al., *Clock Gene Bmal1 Modulates Human Cartilage Gene Expression by Crosstalk With Sirt1*. Endocrinology, 2016. **157**(8): p. 3096-107.
146. Das, V., et al., *Pharmacological targeting of the mammalian clock reveals a novel analgesic for osteoarthritis-induced pain*. Gene, 2018. **655**: p. 1-12.
147. Rong, J., et al., *Altered expression of the core circadian clock component PERIOD2 contributes to osteoarthritis-like changes in chondrocyte activity*. Chronobiol Int, 2019. **36**(3): p. 319-331.
148. Akagi, R., et al., *Dysregulated circadian rhythm pathway in human osteoarthritis: NR1D1 and BMAL1 suppression alters TGF-beta signaling in chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2017. **25**(6): p. 943-951.
149. Zhen, G., et al., *Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 704-12.
150. Bekki, H., et al., *Suppression of circadian clock protein cryptochrome 2 promotes osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2020. **28**(7): p. 966-976.
151. Sancar, A. and R.N. Van Gelder, *Clocks, cancer, and chronochemotherapy*. Science, 2021. **371**(6524).
152. Sulli, G., et al., *Training the Circadian Clock, Clocking the Drugs, and Drugging the Clock to Prevent, Manage, and Treat Chronic Diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2018. **39**(9): p. 812-827.
153. Gossan, N., R. Boot-Handford, and Q.J. Meng, *Ageing and osteoarthritis: a circadian rhythm connection*. Biogerontology, 2015. **16**(2): p. 209-19.
154. Levi, F., C. Le Louarn, and A. Reinberg, *Timing optimizes sustained-release indomethacin treatment of osteoarthritis*. Clin Pharmacol Ther, 1985. **37**(1): p. 77-84.
155. Etchegaray, J.P., et al., *Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock*. Nature, 2003. **421**(6919): p. 177-82.
156. Crosio, C., et al., *Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1241-7.
157. Azzi, A., et al., *Circadian behavior is light-reprogrammed by plastic DNA methylation*. Nat Neurosci, 2014. **17**(3): p. 377-82.
158. Bonsch, D., et al., *Daily variations of homocysteine concentration may influence methylation of DNA in normal healthy individuals*. Chronobiol Int, 2007. **24**(2): p. 315-26.
159. Li, Y., et al., *Epigenetic inheritance of circadian period in clonal cells*. Elife, 2020. **9**.
160. Xia, L., et al., *Daily variation in global and local DNA methylation in mouse livers*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0118101.
161. Tomita, T., R. Kurita, and Y. Onishi, *Epigenetic regulation of the circadian clock: role of 5-aza-2'-deoxycytidine*. Biosci Rep, 2017. **37**(3).
162. Hanover, J.A., M.W. Krause, and D.C. Love, *Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(5): p. 312-21.
163. Kim, E.Y., et al., *A role for O-GlcNAcylation in setting circadian clock speed*. Genes Dev, 2012. **26**(5): p. 490-502.
164. Li, M.D., et al., *O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination*. Cell Metab, 2013. **17**(2): p. 303-10.
165. Azzi, A., et al., *Network Dynamics Mediate Circadian Clock Plasticity*. Neuron, 2017. **93**(2): p. 441-450.
166. Deibel, S.H., et al., *Epigenetic alterations in the suprachiasmatic nucleus and hippocampus contribute to age-related cognitive decline*. Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23181-203.
167. Masri, S., K. Kinouchi, and P. Sassone-Corsi, *Circadian clocks, epigenetics, and cancer*. Curr Opin Oncol, 2015. **27**(1): p. 50-6.
168. Hudec, M., et al., *Epigenetic Regulation of Circadian Rhythm and Its Possible Role in Diabetes Mellitus*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
169. Asp, J., A. Abramsson, and C. Betsholtz, *Nonradioactive in situ hybridization on frozen sections and whole mounts*. Methods Mol Biol, 2006. **326**: p. 89-102.
170. Green, M.R. and J. Sambrook, *Quantification of RNA by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Cold Spring Harb Protoc, 2018. **2018**(10).
171. Doak, S.H. and Z.M. Zair, *Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: technical considerations for gene expression analysis*. Methods Mol Biol, 2012. **817**: p. 251-70.
172. Ma, H., et al., *Validation of suitable reference genes for quantitative polymerase chain reaction analysis in rabbit bone marrow mesenchymal stem cell differentiation*. Mol Med Rep, 2015. **12**(2): p. 2961-8.
173. Harland, L., et al., *Transcriptional regulation of the human TATA binding protein gene*. Genomics, 2002. **79**(4): p. 479-82.

174. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. *Cell*, 1998. **93**(6): p. 929-37.
175. Kolarski, D., et al., *Controlling the Circadian Clock with High Temporal Resolution through Photodosing*. *J Am Chem Soc*, 2019. **141**(40): p. 15784-15791.
176. Morgan, D.M., *Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity*. *Methods Mol Biol*, 1998. **79**: p. 179-83.
177. Cornelissen, G., *Cosinor-based rhythmometry*. *Theor Biol Med Model*, 2014. **11**: p. 16.
178. Feillet, C., et al., *Sexual Dimorphism in Circadian Physiology Is Altered in LXRalpha Deficient Mice*. *PLoS One*, 2016. **11**(3): p. e0150665.
179. Ma, S., et al., *BMAL1 but not CLOCK is associated with monochromatic green light-induced circadian rhythm of melatonin in chick pinealocytes*. *Endocr Connect*, 2019. **8**(1): p. 57-68.
180. Okano, T., et al., *Chicken pineal clock genes: implication of BMAL2 as a bidirectional regulator in circadian clock oscillation*. *Genes Cells*, 2001. **6**(9): p. 825-36.
181. Gabay, O. and K.A. Clouse, *Epigenetics of cartilage diseases*. *Joint Bone Spine*, 2016. **83**(5): p. 491-4.
182. Lee, J.S. and G.I. Im, *SOX trio decrease in the articular cartilage with the advancement of osteoarthritis*. *Connect Tissue Res*, 2011. **52**(6): p. 496-502.
183. Xia, B., et al., *Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms*. *Calcif Tissue Int*, 2014. **95**(6): p. 495-505.
184. Mort, J.S. and C.J. Billington, *Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(6): p. 337-41.
185. Zheng, L., et al., *Identification of abnormally methylated-differentially expressed genes and pathways in osteoarthritis: a comprehensive bioinformatic study*. *Clin Rheumatol*, 2021. **40**(8): p. 3247-3256.
186. Roach, H.I. and T. Aigner, *DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(2): p. 128-37.
187. Miranda-Duarte, A., *DNA Methylation in Osteoarthritis: Current Status and Therapeutic Implications*. *Open Rheumatol J*, 2018. **12**: p. 37-49.
188. Li, J., J. Ohliger, and M. Pei, *Significance of epigenetic landscape in cartilage regeneration from the cartilage development and pathology perspective*. *Stem Cells Dev*, 2014. **23**(11): p. 1178-94.
189. Carballo, C.B., et al., *Basic Science of Articular Cartilage*. *Clin Sports Med*, 2017. **36**(3): p. 413-425.
190. Shen, J., et al., *DNA methyltransferase 3b regulates articular cartilage homeostasis by altering metabolism*. *JCI Insight*, 2017. **2**(12).
191. Ito, R., et al., *Hydroxylation of methylated DNA by TET1 in chondrocyte differentiation of C3H10T1/2 cells*. *Biochem Biophys Rep*, 2016. **5**: p. 134-140.
192. Smeriglio, P., et al., *Inhibition of TET1 prevents the development of osteoarthritis and reveals the 5hmC landscape that orchestrates pathogenesis*. *Sci Transl Med*, 2020. **12**(539).
193. Zimmermann, B. and D. Tsambaos, *Evaluation of the sensitive step of inhibition of chondrogenesis by retinoids in limb mesenchymal cells in vitro*. *Cell Differ*, 1985. **17**(2): p. 95-103.
194. Rafipay, A., et al., *Expression analysis of limb element markers during mouse embryonic development*. *Dev Dyn*, 2018. **247**(11): p. 1217-1226.
195. El-Serafi, A.T., R.O. Oreffo, and H.I. Roach, *Epigenetic modifiers influence lineage commitment of human bone marrow stromal cells: Differential effects of 5-aza-deoxycytidine and trichostatin A*. *Differentiation*, 2011. **81**(1): p. 35-41.
196. Muzic, V., et al., *Epigenetic drug 5-azacytidine impairs proliferation of rat limb buds in an organotypic model-system in vitro*. *Croat Med J*, 2013. **54**(5): p. 489-95.
197. Taylor, S.M. and P.A. Jones, *Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine*. *J Cell Physiol*, 1982. **111**(2): p. 187-94.
198. Duan, L., et al., *DNA Methylation Profiling in Chondrocyte Dedifferentiation In Vitro*. *J Cell Physiol*, 2017. **232**(7): p. 1708-1716.
199. Kim, H.J., et al., *Enhancement of human mesenchymal stem cell differentiation by combination treatment with 5-azacytidine and trichostatin A*. *Biotechnol Lett*, 2016. **38**(1): p. 167-74.
200. Kornicka, K., et al., *The effects of the DNA methyltransferases inhibitor 5-Azacytidine on ageing, oxidative stress and DNA methylation of adipose derived stem cells*. *J Cell Mol Med*, 2017. **21**(2): p. 387-401.
201. Rosca, A.M. and A. Burlacu, *Effect of 5-azacytidine: evidence for alteration of the multipotent ability of mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2011. **20**(7): p. 1213-21.
202. Kadekar, S., et al., *Effect of the Addition Frequency of 5-Azacytidine in Both Micro- and Macroscale Cultures*. *Cell Mol Bioeng*, 2021. **14**(1): p. 121-130.
203. Yu, S., et al., *Circadian BMAL1 regulates mandibular condyle development by hedgehog pathway*. *Cell Prolif*, 2020. **53**(1): p. e12727.

204. Gossan, N., et al., *The circadian clock in murine chondrocytes regulates genes controlling key aspects of cartilage homeostasis*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(9): p. 2334-45.
205. Dudek, M. and Q.J. Meng, *Running on time: the role of circadian clocks in the musculoskeletal system*. Biochem J, 2014. **463**(1): p. 1-8.
206. Okubo, N., et al., *Prolonged bioluminescence monitoring in mouse ex vivo bone culture revealed persistent circadian rhythms in articular cartilages and growth plates*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78306.
207. Farnell, Y.F., et al., *Immortalized cell lines for real-time analysis of circadian pacemaker and peripheral oscillator properties*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(8): p. 1533-40.
208. Solursh, M., *Extracellular matrix and cell surface as determinants of connective tissue differentiation*. Am J Med Genet, 1989. **34**(1): p. 30-4.
209. Rogers, E.H., et al., *Comparing Circadian Dynamics in Primary Derived Stem Cells from Different Sources of Human Adult Tissue*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 2057168.
210. Boucher, H., et al., *Circadian Clock Genes Modulate Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation, Migration and Cell Cycle*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146674.
211. Kanbe, K., et al., *Identification of clock as a mechanosensitive gene by large-scale DNA microarray analysis: downregulation in osteoarthritic cartilage*. Mod Rheumatol, 2006. **16**(3): p. 131-6.
212. Honda, K.K., et al., *Different circadian expression of major matrix-related genes in various types of cartilage: modulation by light-dark conditions*. J Biochem, 2013. **154**(4): p. 373-81.
213. Alagha, M.A., et al., *A Synchronized Circadian Clock Enhances Early Chondrogenesis*. Cartilage, 2021. **13**(2_suppl): p. 53S-67S.
214. Hirota, T., et al., *High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals CKIalpha as a clock regulatory kinase*. PLoS Biol, 2010. **8**(12): p. e1000559.
215. Hirota, T., et al., *Identification of small molecule activators of cryptochrome*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1094-7.

10. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/212/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vágó Judit
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10067066

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Vágó, J.**, Kiss, K., Karanyicz, E., Takács, R. Á., Matta, C., Ducza, L., Rauch, T. A., Zákány, R.:
Analysis of Gene Expression Patterns of Epigenetic Enzymes Dnmt3a, Tet1 and Ogt in
Murine Chondrogenic Models.
Cells. 10 (10), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10102678>
IF: 6.6 (2020)
2. Alagha, M. A., **Vágó, J.**, Katona, É., Takács, R. Á., Veen, D. v. d., Zákány, R., Matta, C.: A
Synchronized Circadian Clock Enhances Early Chondrogenesis.
Cartilage. 13 (2_Suppl), 53S-67S, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1947603520903425>
IF: 4.634 (2020)

További közlemények

3. Hajdú, T., Kovács, P., Zsigrai, E., Takács, R. Á., **Vágó, J.**, Cho, S., Sasi Szabó, L. A., Becsky, D.,
Keller-Pintér, A., Emri, G., Rácz, K., Reglődi, D., Zákány, R., Juhász, T.: Pituitary Adenylate
Cyclase Activating Polypeptide Has Inhibitory Effects on Melanoma Cell Proliferation and
Migration In Vitro.
Front Oncol. 11, 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.681603>
IF: 6.244 (2020)
4. Szegeczki, V., Bauer, B., Jüngling, A., Fülöp, B. D., **Vágó, J.**, Perényi, H., Tarantini, S., Tamás, A.,
Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Age-related alterations of articular cartilage in pituitary
adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice.
GeroScience. 41 (6), 775-793, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-019-00097-9>





5. Matta, C., Juhász, T., Fodor, J., Hajdú, T., Katona, É., Somogyi, C., Takács, R. Á., **Vágó, J.**, Oláh, T., Bartók, Á., Varga, Z., Panyi, G., Csernoch, L., Zákány, R.: N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor expression and function is required for early chondrogenesis.
Cell Commun Signal. 17 (1), 1-19, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-019-0487-3>
IF: 4.344

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,822

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,234**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.04.14.



11. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

Porcfejlődés, porcsejt, sejt differenciáció, in vitro, in vivo, C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonat, primer sejt kultúra, nagy sejtsűrűségű kultúra, egérembrió, csirkeembrió, epigenetika, DNS metiláció, 5-azacitidin, longdaysin, molekuláris óra, cirkadián ritmus, óraszinkronizáció, szérumsokk

Chondrogenesis, chondrocyte, cell differentiation, in vitro, in vivo, C3H10T1/2+BMP-2 cell line, primary cell culture, high density/micromass culture, mouse embryo, chicken embryo, epigenetics, DNA methylation, 5-azacytidine, longdaysin, molecular clock, circadian rhythm, clock synchronization, serum shock

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zákány Rózának, hogy 2014-ben lehetővé tette a Jelátviteli Laboratóriumhoz való csatlakozásomat, majd 2016-ban tanulmányaim folytatását PhD hallgatóként. TDK-s hallgatói koromtól kezdődően folyamatosan segítette munkámat széleskörű tudományos ismereteivel, emellett magánemberként is számos élethelyzetben mutatott irányt, személyiségem fejlődését is segítette.

Szeretném megköszönni Dr. Takács Rolandnak, hogy MSc tanulmányaim alatt elvállalta a metodikai alapok betanítását, a TDK és diplomadolgozati témámban való felkészítést, továbbá hasznos útmutatásait, melyeket az évek során kaptam.

Hálával tartozom Dr. Matta Csabának, aki nem csak a laboratóriumi munka, de a tudományos publikálás és a tudományos élet terén is megannyi hasznos tanácsot, segítséget adott.

Szeretnék köszönetet mondani kollaborációs partnerünknek, Rauch Tibornak, aki bevezetett minket az epigenetikai kutatások világába, és szakmai tanácsaival, kísérletes munkájával nagyban hozzájárult a disszertáció létrejöttéhez.

Köszönet illeti korábbi kolléganőnket, Pappné Karanyicz Edinát, akivel a PhD-s éveim elején rengeteget dolgozhattam együtt, és aki mellett mindig jó hangulatban teltek a munkaórák.

Szeretném megköszönni kollégáimnak, Dr. Juhász Tamásnak, Dr. Hajdú Tibornak, Dr. Szegeczki Vincének, Szűcs Csillának, Katona Évának, az évek során kapott temérdek szakmai segítséget és türelmet, és hogy együtt dolgozhattam velük ebben a nagy családias munkacsoportban.

Külön köszönettel tartozom Biróné Barna Krisztinának, aki tapasztalt asszisztensi munkája révén nagyban hozzájárult, hogy a disszertációban bemutatott eredmények megszülethessenek.

Köszönöm az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet vezetőjének, Dr. Szűcs Péternek, amiért lehetővé tette számomra az Intézetben való kutatómunkát.

Köszönöm továbbá az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkatársainak az elmúlt évek közös munkáját.

Végezetül pedig hálával tartozom Szüleimnek és Nővéreimnek, akik minden helyzetben biztosítottak támogatásukról, és mindig érdeklődéssel követték nyomon munkámat.

A disszertációhoz elvégzett kísérletes munkákhoz a következő pályázatok által biztosított források járultak hozzá: EFOP-3.6.1-16-2016-00022; EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009; Richter Gedeon publikációs támogatás 2020/R/20/2502; FK-134304; TKP2020-NKA-04; K131588; DE-ÁOK Bridging Fund.

13. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

ÁBRÁK

• 2.1. ábra	A hialinporc szövettani felépítésének sematikus ábrázolása.	8. oldal
• 2.2. ábra	A hialinporc extracelluláris mátrixát alkotó komponensek szerkezeti viszonyát bemutató sematikus ábra.	9. oldal
• 2.3. ábra	A kondrogenézis sematikus folyamatábrája.	12. oldal
• 2.4. ábra	Kondrogenézis és encondrális osszifikáció az embrionális, magzati és posztnatális fejlődés alatt.	14. oldal
• 2.5. ábra	Egy 4,5 napos csirkeembrió, illetve egy 11,5 napos egérembrío fénymikroszkópos felvétele.	15. oldal
• 2.6. ábra	Az <i>in vitro</i> porcdifferenciáció lépéseinek sematikus ábrázolása.	16. oldal
• 2.7. ábra	A DNS metiláció folyamatának vázlatos bemutatása.	20. oldal
• 2.8. ábra	A DNS metiláció és demetiláció sematikus folyamatábrája.	21. oldal
• 2.9. ábra	Sematikus ábra a cirkadián óra fő molekuláris komponenseinek működéséről.	29. oldal
• 4.1. ábra	A cirkadián óra újraindításának, vagy alaphelyzetbe állításának lehetőségei.	52. oldal
• 4.2. ábra	A DNS metilációt módosító 5-azacitidin, és a cirkadián óra működését befolyásoló longdaysin farmakonok kémiai felépítésének bemutatása.	53. oldal
• 4.3. ábra	A cirkadián ritmus meglétét és a ritmicitás jellemzőit a nem-lineáris cosinor regresszió alapuló módszer segítségével állapítottuk meg.	57. oldal
• 5.1. ábra	Az <i>in vitro</i> porcfejlődés specifikus napjain (0., 5., 10., 15. tenyésztési napok) leartott C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonal eredetű porcosodó micromass kultúrákkal végzett PCR array eredményei.	59. oldal
• 5.2. ábra	A <i>Dnmt3a</i> , <i>Tet1</i> és <i>Ogt</i> gének expressziós változásainak nyomon követése RT-qPCR módszer segítségével, C3H10T1/2+BMP-2 sejtekből létrehozott porcosodó micromass kultúrákban.	60. oldal
• 5.3. ábra	A <i>Dnmt3a</i> , <i>Tet1</i> és <i>Ogt</i> gének expressziós változásainak vizsgálata RT-qPCR módszerrel, 11,5 napos egérembriók végtagtelepeiből izolált kondroprogenitor sejtekből létrehozott primer micromass kultúrákban.	61. oldal
• 5.4. ábra	DNS metiláció-markergének expressziójának vizsgálata <i>in situ</i> hibridizációval, 15 napos egérembrióban.	62. oldal
• 5.5. ábra	A <i>Dnmt3a</i> , <i>Tet1</i> és <i>Ogt</i> -specifikus <i>in situ</i> hibridizáció során készült felvételek kvantifikálása a relatív optikai denzitási értékek összehasonlításával.	63. oldal
• 5.6. ábra	A porcspecifikus extracelluláris mátrix termelődés vizsgálata 4 és 6 napos egérembrío végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban, a DNS metilációt gátló 5-azacitidin kezelőanyag alkalmazását követően.	64. oldal
• 5.7. ábra	Különböző fejlettségi stádiumban lévő porcsejtek osztódó- és életképességének vizsgálata 4 és 6 napos egérembrío végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban, a DNS metilációt gátló 5-azacitidin kezelőanyag alkalmazását követően.	66. oldal
• 5.8. ábra	A DNS metilációval asszociált gének és a porcfejlődés jellegzetes markergénjeinek mRNS szintű expressziójának vizsgálata RT-qPCR módszerrel, 4 és 6 napos egérembrío végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban.	67. oldal
• 5.9. ábra	Különböző porc markergének promóter régióinak metilációs státusza kvantitatív metiláció-specifikus PCR (qMSP) technikával nyomon követve egérembrío végtagtelep eredetű primer porcosodó micromass kultúrákban.	68. oldal
• 5.10. ábra	A szérumsokk (50% FBS tartalmú F12 médium alkalmazása az 1. tenyésztési napon 2 órán keresztül) serkentette az <i>in vitro</i> porcfejlődést és a metakromázias mátrix termelődését a csirkeembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrákban.	70. oldal
• 5.11. ábra	A cirkadián óra modulálására képes longdaysin hatásának vizsgálata szérumsokk alkalmazása vagy szérumsokk elhagyása mellett, csirkeembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrákban.	72. oldal

• 5.12. ábra	Porc markergének expressziójának vizsgálata RT-qPCR módszerrel, 3 és 6 napos csirkeembrió végtagtelep eredetű primer micromass kultúrákban, a cirkadián órát szinkronizáló szérum-sokkot, illetve a cikadián óra működését befolyásoló longdaysin (5 µM) kezelést követően.	74. oldal
• 5.13. ábra	Az óragének expressziójában kialakult cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása az 1. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően.	76. oldal
• 5.14. ábra	Az óragének expressziójában kialakult cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása a 6. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően.	78. oldal
• 5.15. ábra	A SOX9 transzkripciós faktor és a porcspecifikus extracelluláris mátrix komponenseit kódoló COL2A1 és ACAN gének expressziójában kialakuló cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása az 1. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően.	80. oldal
• 5.16. ábra	A SOX9 transzkripciós faktor és a porcspecifikus extracelluláris mátrix komponenseit kódoló COL2A1 és ACAN gének expressziójában kialakuló cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása a 6. tenyésztési napon alkalmazott szinkronizációt követően.	81. oldal
• 5.17. ábra	A RUNX2 oszteogénikus transzkripciós faktor génexpressziójában kialakuló cirkadián ritmus dinamikájának ábrázolása.	82. oldal
• 6.1. ábra	A csirkeembrió végtagtelep eredetű micromass kultúrák <i>in vitro</i> kondrogenikus differenciációja, illetve a DNS metilációt gátló 5-azacitidin kezelése közötti kapcsolatot bemutató kísérletes tapasztalatok összesített ábrázolása.	90. oldal

TÁBLÁZATOK

• 4.1. táblázat	Az antiszensz próba megalkotásához használt <i>Dnmt3a</i> , <i>Tet1</i> és <i>Ogt</i> markergének T7 promóterrel jelölt 3'UTR régióinak szekvencia adatai. A régiókat pDrive vektorba klónoztuk majd polimeráz-láncreakcióval amplifikáltuk a digoxigenin-jelölt RNS próba elkészítéséhez.	42. oldal
• 4.2. táblázat	Az egérembrió eredetű HD kultúrákon végzett PCR array-hez használt specifikus primer-párok szekvencia adatai	44.-45. o.
• 4.3. táblázat	Az egérembrió eredetű HD kultúrákkal végzett qPCR reakciókhoz használt primer párok szekvencia adatai	48. oldal
• 4.4. táblázat	A csirkeembrió eredetű HD kultúrákkal végzett qPCR reakciókhoz használt primer párok szekvencia adatai	49. oldal
• 4.5. táblázat	Az egérembrió eredetű HD kultúrákkal végzett qMSP reakciókhoz használt metilált (M) és nem-metilált (UM) primer párok szekvencia adatai	50. oldal
• 5.1. táblázat	A molekuláris óra transzkripciós faktorok génexpressziójának cosinor analízise. A kondrogenikus kultúrákat a tenyésztés 1. napján szinkronizáltuk.	76. oldal
• 5.2. táblázat	A molekuláris óra transzkripciós faktorok génexpressziójának cosinor analízise. A kondrogenikus kultúrákat a tenyésztés 6. napján szinkronizáltuk.	77. oldal
• 5.3. táblázat	A kondrogenikus markerek génexpressziójának cosinor analízise. A kondrogenikus kultúrákat a tenyésztés 1. és 6. napján szinkronizáltuk.	79. oldal

14. FÜGGELÉKEK

Az értekezést megalapozó közlemények különlenyomatai.