

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Vágó Judit okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Zákány Róza

Az értekezés bírálói:

Dr. Káldi Krisztina, az MTA doktora
Dr. Hegedűs Csaba, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Káldi Krisztina, az MTA doktora
Dr. Hegedűs Csaba, PhD
Dr. Apáti Ágota, PhD
Dr. Mádi András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Bőrgyógyászati Klinika
tanterme
2022. november 14. 13:00

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 muszkuloszkeletális problémától, ebből az OA-ban szenvedők száma a 343 milliót is elérheti. A mozgásszegény életmód, a sok üléssel, tartós egyhelyben állással járó munkavégzés, vagy a túlsúly kialakulásáért felelős csökkent fizikai aktivitás és egészségtelen összetételű táplálkozás jelentős kóroki tényezőkként szolgálnak. Ezek az életmódbeli sajátosságok a fejlett országokban egyre nagyobb számú lakost érintenek, egyre fiatalabb korban. Szintén a fejlett országokra jellemző a társadalom elöregedése és a születéskor várható élettartam meghosszabbodása. A felsorolt rizikófaktorok azt jelzik előre, hogy a jövőben az ízületi bántalmak egyre nagyobb számban fogják érinteni a világ népességét. Az OA oki kezelésére, illetve a degenerálódott porc regenerációjának elősegítésére csupán kevés és kérdéses hatásosságú terápiás lehetőség ismert, a kezelés jelenleg elsősorban a gyógyszerekkel való tüneti csökkentésre és fájdalomenyhítésre irányul, végső esetben az ízületi implantátumok műtéti alkalmazása jelenthet megoldást. A sérült porcszövet újjáépítésére irányuló potenciális kezelési eljárások közül igen népszerűnek számít a mezenchimális őssejtek beültetése és porc irányú differenciáltatása. Az őssejtek differenciációs mechanizmusának részletei, a folyamatban részt vevő jelátviteli útvonalakkal és regulációs faktorokkal kapcsolatos ismereteink egyelőre limitáltak. Ahhoz, hogy a jövőben a tudósok és az orvosok megfelelő gyógymódokat alakíthassanak ki, és megérthessük az ízületi porc fejlődésének alapvető biológiai jellemzőit, rendkívül nagy szükség van a mezenchimális sejtek és azok kondrogenikus differenciációjának alapszintű kutatására. A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán, az Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetben működő Jelátviteli Laboratórium fő kutatási területe a porc biológiája. Kísérleteink célja, hogy tanulmányozzuk a porc fejlődését, feltárjuk a folyamatban részt vevő szabályozó molekulákat és meghatározzuk azok pontos szerepét, az újonnan szerzett ismereteink hosszabb távon pedig hozzájárulhatnak a degenerálódott porc újjáépítését serkentő kezelések kifejlesztéséhez.

A laboratóriumi körülmények között zajló, azaz *in vitro* porcdifferenciáció 3 specifikus fejlődési szakasszal írható le. A kondroprogenitor sejteket általában csirke vagy egér embriók fejlődő végtagtelepeiből izoláljuk, majd műanyag szövettenyésztő edények aljára cseppentjük nagy sejtsűrűségben, így úgynevezett *high density* (HD) vagy *micromass* primer porcosodó kultúrákat hozunk létre. A 0. és 3. tenyésztési napok között az úgynevezett proliferációs és migrációs szakaszról beszélhetünk, amikor is a HD kultúrákban eleinte főleg kondroprogenitor sejtek, majd az idő előrehaladtával egyre több kondroblasztot találunk, a sejtek intenzív osztódáson esnek át, és migráció révén sejtömörüléseket hoznak létre. A 3. és 6. tenyésztési napok között zajlik a differenciációs szakasz, ekkor a kondroblasztok mellett egyre nagyobb arányban érett kondrociták alkotják a kultúrákat, a hangsúly a differenciálódott sejtek kialakulása mellett az általuk termelt nagy mennyiségű porcspecifikus extracelluláris mátrix (ECM) létrehozásán van. Végezetül a 6. tenyésztési naptól megkezdődik a hipertrófiás szakasz, amikor az érett kondrociták fokozatos hipertrófiás átalakulása mellett egyre intenzívebb kalcifikáció figyelhető meg a kultúrákban, így tehát *in vitro* körülmények között modellezhetjük a hialinporc fejlődését és az enkondrális csontosodás folyamatát. A porcfejlődés alatt számos molekuláris tényező génszintű expressziója játszik meghatározó szerepet, ilyen például a SOX9, amely a kondrogenezis mester regulátor génje, illetve a porc-ECM két jellegzetes markere, a II-es típusú kollagén vagy COL2A1 és a nagy proteoglikán aggregátumok létrehozásában részt vevő aggregán vagy ACAN. A felsorolt gének expressziós mintázatainak vizsgálatával tanulmányozhatjuk, hogy a különböző kezelési eljárások milyen hatást fejtenek ki a porcfejlődés folyamatára.

Az értekezésem alapjául szolgáló eredményeket hozó kísérleteket két új, az aktuális nemzetközi trendekhez jól igazodó kutatási irány határozta meg. Vizsgálataink során az *in vitro* porcdifferenciáció során fellépő epigenetikai módosulásokat, illetve a cirkadián óra működésével összefüggő szabályozási mechanizmusokat tanulmányoztuk.

Az epigenetika olyan öröklődő és reverzibilis génexpressziós módosulásokat jelent, amelyek során nem történik változás a DNS nukleotid szekvenciájában. A DNS metiláció egy adott genomi régió hipermetilációjához, és a régióban található gének transzkripció inaktivitásához vezet, melyet a DNS metiltranszferázok katalizálnak, azonban ez egy reverzibilis folyamat. A DNS demetilációt a TET fehérjék idézik elő, az OGT fehérjék pedig jelentős szereppel bírnak ezen enzimek biológiai aktivitásának irányításában. A *Dnmt3a* és *Tet1/Ogt* gének közötti szabályozási egyensúly meghatározza a genom aktuális metilációs mintázatát, ezáltal

befolyásolhatják többek között a porcfejlődés markergénjeinek helyhez és időhöz kötött expresszióját.

Az élő organizmusok egyik különleges sajátossága, hogy a bennük zajló biológiai folyamatok mind ciklikus változásokon mennek keresztül a nap folyamán. Ezt a periodikus, nagyjából 24 órás időtartamú szabályozó mechanizmust cirkadián ritmusnak nevezzük. Az emlősök molekuláris cirkadián órarendszerét számos oszcillátor befolyásolja. A fő irányító rendszer a központi idegrendszeri autonóm órában jön létre, amely képes interakcióba lépni a szervezet perifériáján elhelyezkedő órarendszerekkel, ezáltal a test szöveteiben elhelyezkedő sejtekhez is érkeznek jelek a ritmicitással kapcsolatban. A molekuláris biológiai óra központi oszcillátorát a transzkripciós-transzlációs visszacsatolási hurok irányítja, ahol bizonyos fehérjék képesek saját termelődésükre gátlólag visszahatni, ha elérnek egy bizonyos koncentrációt a sejtben. Ennek alapján megkülönböztethetünk pozitív (BMAL1, CLOCK) és negatív (PERIOD, CRYPTOCHROME) visszacsatolási faktorokat, amelyek szoros együttműködési kapcsolatban állnak egymással. A molekuláris cirkadián óra komponensei számos target gén expressziós szabályozását befolyásolják, emiatt előfordulhat, hogy a periférián elhelyezkedő, szövet-specifikus órák meghatározó biológiai funkcióval rendelkezhetnek. Egyelőre még kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy a molekuláris órák hogyan adaptálódnak a jellegzetes perifériás szöveti tulajdonságokhoz, így például a porcszövetben található lokális mikrokörnyezethez.

Egyetemi doktori értekezésem fő célja tehát az volt, hogy a DNS metiláció, illetve a molekuláris óra működésének részletes elemzésével olyan új szabályozó molekulákat azonosítsak, amelyek a porcszövet differenciációja során jelentős szereppel bírhatnak, a jövőben pedig potenciális target fehérjeként szolgálhatnak a porcdefektusok terápiás eljárásainak megtervezésekor.

Célkitűzések

Célunk az volt, hogy csirke vagy egér embriók végtagtelepeiből izolált mezenchimális sejtek primer kultúrákban történő porc irányú differenciáltatása során, illetve sejtvonal eredetű porcosodó kultúrákban, továbbá teljes egér embriók fagyasztott metszetein 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 az érésben lévő porcsejtek és az érett kondrociták 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 idézzük elő óraszinkronizációt?
- **Milyen morfológiai és molekuláris hatással van a cirkadián óra gátlása a porc differenciációs folyamatára?**

Anyagok és módszerek

Kísérleti modellek

Az *in vitro* porcdifferenciáció tanulmányozására high density (HD, micromass) kultúrákat alkalmaztunk. A HD kultúrák egy részét 11,5 napos egérembriók végtagtelepeiből izolált kondroprogenitor sejtekből hoztuk létre. A vemhes nőstényeket meghatározott napon feláldoztuk, betartva a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság etikai szabályait (Felhasználó Engedély száma: 2/2018/DEMÁB). A 11,5 napos fejlettségi stádiumú embriókról eltávolítottuk a mellső és hátsó végtagtelepek disztális részeit, amelyeket 0,25% tripszinbe helyeztünk, majd az emésztést főtális borjúsérum (FBS) hozzáadásával állítottuk le. Centrifugálási és filterezési lépéseket követően a sejtsuszpenziót magas glükóztartalmú DMEM tápoldatban reszuszpendáltuk, majd a megfelelő hígítással $1,0 \times 10^7$ sejt/ml sejtsűrűséget értünk el. A micromass kultúrákat 37 °C-on, 5% CO₂ és 90% relatív páratartalmú inkubátorban tartottuk fent. A kicseppentés napját a sejtenyésztés 0. napjának tekintettük.

Az *in vitro* kondrogenezis folyamatát az egérembrió végtagtelep eredetű micromass kultúrák mellett csirkeembrió végtagtelep eredetű primer HD kultúrák létrehozásával is vizsgáltuk. 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 egérembrió végtagtelep eredetű modellnél alkalmazott protokolltól csak néhány lépésben tér el. Ebben az esetben 1.5×10^7 sejt/ml-es sűrűségűre hígítottuk a sejtsuszpenziót. A sejteket 10% FBS-sel kiegészített Ham's F12 médiumban tenyésztettük.

Az *in vitro* porcfejlődést sejtvonal alapú sejtek felhasználásával is vizsgáltuk. A BMP2-overexpresszáló egérembrió fibroblaszt eredetű C3H10T1/2 pluripotens sejtek az eredeti C3H10T1/2 sejtvonal egy módosított változatát alkotják, amelyet egy kollaborációs partnertől (G. Gross) kapott ajándékba a laboratóriumunk. A sejteket először monolayer sejt kultúra formájában tartottuk fent, majd nagyjából 80% konfluencia elérését követően a sejteket tripszines emésztés révén elválasztottuk a tenyésztőedény aljától, hogy HD kultúrákat hozzunk létre. A micromass kultúrák sűrűségét $1,0 \times 10^7$ sejt/ml-re állítottuk be.

In situ hibridizáció

Kísérleteink során nem radioaktív, digoxigeninnel (DIG) való indirekt típusú jelölést alkalmaztunk. Az *in situ* hibridizációs kísérletek első lépéseként elkészítettük a DIG-jelölt RNS

próbákat. Ezt specifikus primerek megtervezésével kezdtük, amelyek a *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* gének 3'UTR régióiban található nagyjából 1000 bázispár hosszúságú szakaszokat képesek felszaporítani. Az antiszensz próbák létrehozásához az inszerteket T7-specifikus promóterrel látták el. A *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* próbák specifikus gén termékeit PCR segítségével szaporítottuk fel a plazmidokról. Az amplifikált PCR termékeket a Roche High Pure PCR Product Purification Kit-tel izoláltuk. Az RNS jelölés DIG – RNS jelölő mix alkalmazásával *in vitro* DNS transzkripció során történt meg. A mintákból jelölt RNS pelletet nyertünk ki, melyet hibridizációs pufferben oldottuk. Az *in situ* hibridizációs kísérletekhez 15 napos egész embriókról készült metszetekkel dolgoztunk. A 15. fejlődési napon feláldoztuk a nőtényeket és kiemeltük az embriókat, melyeket egy éjszakán keresztül DEPC-PBS-ben oldott 4% paraformaldehidben fixáltunk, majd kriosztát segítségével szagittális síkban 20 µm vastag metszeteket készítettünk. Szárítást követően a metszeteket Proteináz K oldattal (20 µg/mL) kezeltük. Ezután prehibridizáció következett, majd a mintákat 16 órán keresztül inkubáltuk az RNS próbát tartalmazó (1-2 µg/ml) hibridizációs pufferrel. A kísérleti protokoll ezen lépéséig minden felhasznált komponens RNáz mentesített volt. Ezt követően a metszeteket többször mostuk sós nátrium-citrát oldattal, majd RNáz A oldattal (0,5 µg/ml) kezeltük. A mintákat egy éjszakán át inkubáltuk az α-DIG antitestet (1:1000) tartalmazó 10% Blokkoló puffer oldatban. A DIG antitest kötődésének detektálását TRIS-NBT/BCIP oldattal vittük véghez, amelyben szobahőn és sötét kamrában inkubáltuk 2-20 óra közötti időintervallumban. Az inkubációs idő lejártával a metszeteket DPX fedőragasztóval fedtük le, majd Nikon Eclipse E800 mikroszkópra szerelt Olympus BX53 kamerával digitalizáltuk, a felvételeket az ImageJ szoftverrel analizáltuk.

PCR array

A kvantitatív PCR array módszer segítségével 80 gén expressziós mintázatát vizsgáltuk meg, amelyek bizonyítottan specifikus 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 arattunk le. A teljes RNS izolálását Direct-Zol® RNA Miniprep kit felhasználásával végeztük. Az 1 µg totál RNS-t tartalmazó minták cDNS átírásához iScript RT Supermix kit-et használtunk. A specifikus primerek megtervezése a PrimerQuest szoftver segítségével történt. Az RT-qPCR reakciók CFX RT-PCR programozható termosztátban történtek, SsoFastEvaGreen™ Supermix reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció

paraméterei a gyártó által javasolt protokoll alapján állítottuk be. Az eredmények hőtérkép alapú ábrázolását a CFX Maestro szoftver segítségével hoztuk létre.

Totál RNS izolálás és reverz transzkripció

A tenyésztés meghatározott napjain a micromass kultúrákat kétszer mostuk steril PBS-sel, majd a felhasználás napjáig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Csirkeembrió végtagtelep eredetű primer HD kultúrák esetében az RNS izolálás az RNeasy kit segítségével történt meg, a gyártó által javasolt protokoll alapján. Az egérembró végtagtelep eredetű primer, illetve bizonyos C3H10T1/2+BMP-2 sejtvonal eredetű HD kultúrák esetében a kultúrákat először trizolban felfuszpendáltuk, majd 20% RNáz-mentes kloroform hozzáadását követően centrifugáltuk, végül a mintákat $500\text{ }\mu\text{l}$ RNáz-mentes izopropanolban inkubáltuk. Az így kinyert teljes RNS-t RNáz-mentes vízben oldottuk fel, és felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS tisztaságát és koncentrációját minden esetben 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.

Kvantitatív valós-idejű PCR analízis

Számos markergén mRNS szintű expresszióját SYBR-GREEN fluoreszcens alapú RT-qPCR analízis segítségével vizsgáltuk. A specifikus primer párok megtervezéséhez az NCBI Primer-BLAST programját használtuk. Első lépésként konvencionális PCR reakciókat kellett elvégeznünk a Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase kit felhasználásával az abszolút kvantifikációhoz szükséges standard görbék létrehozásához. Az amplifikált PCR termékeket a Roche High Pure PCR Product Purification kit-tel, a gyártó leírása szerint izoláltuk. A standard görbe létrehozásához az izolált PCR termékből $10\times$ léptékű hígítási sort alkottunk (kezdő koncentráció: $1\text{ ng}/\mu\text{l}$). A valós idejű kvantitatív PCR során $10\text{ }\mu\text{l}$ -es végtérfogatú reakció elegyekkel dolgoztunk, mintánként 10 ng cDNS felhasználásával, a reakciók a QuantStudio 3 Real-Time PCR System-ben történtek meg. A reakció során megszerzett amplifikációs értékeket a QuantStudio Design and Analysis szoftverrel és a Microsoft Excel programmal analizáltuk. A biológiai különbségek megállapításához szükség volt egy optimális referencia gén meghatározására. A megfelelő normalizáló gént a NormFinder program segítségével választottuk ki.

Kvantitatív metiláció-specifikus PCR analízis

A DNS metilációs szintjének változásait kvantitatív metiláció-specifikus PCR módszerrel határoztuk meg. A genomiális DNS tisztítása majd a templát biszulfít konverziója az EZ DNA methylation-directTM kit-tel történt meg, a gyártó utasításai alapján. A primereket a MethPrimer

2.0 szoftver segítségével terveztük meg. A qMSP során szerzett expressziós értékeket a nem metilálódott *Tbp* promóter-specifikus primerek értékeihez normalizáltuk, amelyeket negatív kontrollként használtunk. A qMSP reakciók egy CFX96 PCR gépben történtek meg, a reakciók során szerzett expressziós adatokat a CFX adatkezelő szoftverrel dolgoztuk fel.

A cirkadián óra szinkronizációja

A szérumsokk alapú szinkronizációs módszer lehetővé teszi a cirkadián óra specifikus faktorainak génexpressziós szinkronizálását. A szérumsokk során a tenyésztés első vagy hatodik napján az általánosan használt 10% FBS tartalmú F12 tápoldatot eltávolítottuk a csirkeembrió végtagtelep eredetű kultúrákról, majd 2 órára 50% FBS-tartalmú F12 médiumot adtunk a kolóniákhoz. Ezt követően eltávolítottuk a magas-FBS tartalmú tápoldatot, majd ismét normál, 10% FBS-tartalmú F12 médiumot adagoltunk a mintákhoz. A kontroll kultúrák a szérumsokk ideje alatt friss, 10% FBS-tartalmú médiummal lettek ellátva. 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. Bizonyos kultúrákat az 1. tenyésztési napon történt szinkronizációt követően a 3. vagy a 6. tenyésztési napon arattunk le, ami lehetővé tette a molekuláris óra szinkronizációjának (illetve a később bemutatásra kerülő longdaysin kezelőanyag) porcfejlődésre kifejtett hosszabb távú hatásának vizsgálatát.

Az *in vitro* porcfejlődés befolyásolása különböző farmakonokkal

Az epigenetikai szabályozás *in vitro* porcfejlődés alatt betöltött szerepét az 5-azacitidin (5-azaC) alkalmazásával vizsgáltuk. A kezelőanyag gátolja a DNS metiltranszferázok kötődését a specifikus kötőhelyeikhez, ezáltal DNS demetilációt idéz elő, és specifikus gén régiók aktiválódásához vezet. Az 5-azaC-t dimetil-szulfoxidban oldottuk fel, 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) kezelőanyag alkalmazásával befolyásoltuk. Az LDS gátolja a kazein kináz I aktivitását, amely így nem képes foszforilálni a PERIOD fehérjét, ezáltal elmarad azok proteaszómális degradációja, ez pedig az óra diszregulációjához vezetnek. A kezelőanyag dimetil-szulfoxidban lett feloldva, 5 μ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A primer csirke HD kultúrákat a tenyésztés első napján (szérumsokkot követően) 24 órán keresztül kezeltük, a kontroll kultúrákhoz a kezelőanyag mennyiségével megegyező dimetil-szulfoxidot adtunk. A kultúrákat a tenyésztés 3. vagy 6. napjáig tartottuk fent.

Mitokondriális aktivitás vizsgálata

Az adott vizsgálati napokon MTT reagenst (5 mg/ml) mértünk a kultúrákon található médiumhoz. Az inkubációt követően a kultúrákról eltávolítottuk a tápoldatot, MTT-szolubilizáló oldatot adtunk a mintákhoz, és egy microplate-leolvasó készülék segítségével 570 nm-en mértük a kioldott MTT reagenst tartalmazó folyadék optikai denzitását.

Sejtprolifерációs képesség ellenőrzése

A tenyésztés meghatározott napjain 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidint (185 GBq/mM) mértünk az egérembrió végtagtelep eredetű HD kultúrákon található médiumhoz. A 16 órás inkubáció lejártával a fehérjéket jéghideg 5% triklórecetsav alkalmazásával csaptuk ki. A mintákat egy héten keresztül szobahőn szárítottuk, végül szcintillációs folyadékot mértünk a kultúrákra, és microplate-olvasó készülék alkalmazásával detektáltuk a minták radioaktivitását.

Metakromáziás festési technikák alkalmazása

Dimetil-metilénkék (DMMK) festés esetében a kultúrákat abszolút alkohol és 40% formalin 4:1 arányú keverékével fixáltuk. Ezt leszálló alkoholsor alkalmazásával rehidráció követte, majd a festés 3% ecetsavban oldott 0,1%-os DMMK oldattal. A mintákat Aquatex ragasztóval fedtük le. Szintén DMMK festést alkalmaztunk néhány kriosztáttal metszett 15 napos teljes egérembrió metszeteken. A lefagyasztott metszeteket szárítottuk, majd desztillált vízben oldott 0,1 %-os DMMK festékekkel festettük meg, a metszeteket DPX fedőragasztóval fedtük. A festett mintákról egy Nikon Eclipse E800 mikroszkópra szerelt Olympus BX53 kamerával készítettünk felvételeket. Toluidinkék festéskor Kahle-féle fixálót használtunk, ezt követte a glicin-HCl-ban oldott 0,1 %-os toluidinkékkel való festés, majd abszolút etanolban oldott 8% HCl felhasználásával visszaoldottuk a negatív töltésű porcmátrix makromolekulákhoz kötődött toluidinkék festéket, és microplate-leolvasó készülékkel 625 nm-en mértük az abszorbanciát.

Statisztikai analízis

A bemutatott ábrákon egy-egy kísérleti sorozatból származó átlagolt eredmények láthatóak, a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) vagy a standard deviációt (SD) jelzik. A numerikus adatok analíziséhez a Microsoft Excel programot használtuk. A cirkadián óra markergének ritmicitását egy nem-lineáris cosinor regresszió alapuló módszerrel határoztuk meg. A standard cosinor funkció paramétereit a Prism program segítségével vizsgáltuk. Az eredmények statisztikai kiértékelése a Student-féle kétmintás t -próba, vagy a Tukey HSD-vel és Mann-Whitney teszttel kiegészített egyszempontos ANOVA segítségével történt meg. A specifikus különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

A DNS metiláció szabályozó mechanizmusának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* porcdifferenciáció során egér eredetű kísérleti modellekben

A DNS metiláció-orientált vizsgálatok megkezdésekor C3H10T1/2+BMP2 sejtvonal eredetű sejtekből porc irányába differenciálódó HD kultúrákat hoztunk létre, amelyeket a kondrogenezis meghatározott fejlődési napjain arattunk le, majd PCR array segítségével követtük nyomon három DNS metiláció-asszociált markergén (*Dnmt3a*, *Tet1*, *Ogt*) kifejeződését. A PCR array segítségével megfigyeltük, hogy a *Dnmt3a* a tenyésztés 15. napján, a *Tet1* a tenyésztés 10. napján, míg az *Ogt* a tenyésztés 10. és 15. napja között mutatott expressziós aktivitást. A porcspecifikus ECM markergénjei, a *Col2a1* és *Acan* expressziós szintjeinek megemelkedése a porcdifferenciáció korai szakaszában figyelhettük meg (tenyésztés 5. és 10. napja között), míg a hipertrófiás porcsejtekre jellemző *Col10a1* vagy az oszteogenikus differenciáció kezdetét jelző *Col1a1* a porcfejlődés későbbi szakaszában (tenyésztés 10. és 15. napja között) mutattak emelkedést expressziós szintjükben.

A DNS metilációs markergének relatív expressziós mintázatát kvantitatív PCR vizsgálatokkal is elemeztük. A specifikus tenyésztési napokon learatott C3H10T1/2+BMP2 sejtvonal eredetű HD kultúrák vizsgálata során a legnagyobb expressziós szintbeli emelkedést mindhárom gén esetében a 10. tenyésztési napon tapasztaltuk, ezek az eredmények nagy mértékben átfednek a PCR array eredményeivel. A legnagyobb mértékű változásokat a *Tet1*-nél figyeltük meg: már az 5. tenyésztési napon szignifikáns expressziós növekedést tapasztaltunk, és egészen a 15. napig megfigyelhettük a megemelkedett transzkriptum-szintet.

A továbbiakban 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. A *Tet1* ismét a legnagyobb mértékű expressziós növekedést mutatta: minden tenyésztési napon szignifikáns expressziós aktivitást tapasztaltunk, azonban a statisztikailag legintenzívebb upregulációt az 1. és 4. tenyésztési napokon figyeltük meg. A *Dnmt3a* transzkriptum szintje a 3. tenyésztési napon érte el csúcát, a 15. napon pedig már szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott. Az *Ogt* esetében konstans expressziót figyeltünk meg a differenciálódó porcsejtekben, azonban ennek a génnek az expressziója is szignifikánsan lecsökkent a 15. tenyésztési napra.

A vizsgálataink szempontjából releváns három DNS metiláció-markergén porcdifferenciációhoz kapcsolt expresszióját *in vivo* szinten is szeretnénk volna bizonyítani, ezért

15 napos egész egémbriókból létrehozott fagyasztott metszeteken *in situ* hibridizációs módszerrel elemeztük a *Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt* mRNS-szintű expresszióját. A specifikus RNS próbák jelintenzitása különbözött: az *Ogt* gyenge, a *Dnmt3a* mérsékelt, míg a *Tet1* erős expressziós jeleket mutatott a primitív végtagok és csigolyák területén.

Szerettük volna tanulmányozni a DNS metilációjával járó szabályozó útvonalak jelentőségét az *in vitro* kondrogenézis során. Ennek érdekében az egémbrió végtagtelep eredetű micromass kultúrák porc irányába történő differenciációja során az 5-azaC-t gátlószert alkalmaztuk, 10 μ M-os végkoncentrációban. Két kezelési csoportot állítottunk fel: a HD kultúrák egy részénél a tenyésztés 1. és 4. napja között, míg a másik részénél a 3. és 6. nap között alkalmaztuk a kezelést. A 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. A termelt metakromáziás ECM mennyisége szignifikánsan csökkent mindkét kezelési típus esetében. Mindkét kezelési protokoll negatív hatással bírt a sejtek osztódási képességére is. Különösen erőteljes visszaesést tapasztaltunk az 1. tenyésztési naptól történt gátlás során, a 3. tenyésztési naptól indított kezelést követően azonban kisebb mértékű gátlást láthattunk. Szintén vizsgáltuk az 5-azaC lehetséges citotoxikus hatását: a kezelést követően a 4 napos primer kultúrák vizsgálatakor is szignifikáns csökkenést tapasztaltunk, ugyanakkor a 6 napos primer kultúrák sejteinek mitokondriális aktivitása jelentősebb csökkenést mutatott. RT-qPCR-alapú analízissel megfigyeltük a DNS metilációval asszociált *Tet1*, *Dnmt3a* és *Ogt* gének, illetve a porcmarker *Sox9*, *Col2a1* és *Acan* gének expressziójában bekövetkezett változásokat. Az 5-azaC szignifikáns csökkenést idézett elő az *Dnmt3a* expressziós szintjében, az 1. és a 3. tenyésztési naptól indított kezelések esetében egyaránt. Az *in vitro* porcfejlődés korai szakasza alatt szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mindhárom porcmarker génexpressziós szintjében. A legnagyobb mértékű expressziós változást a *Col2a1* és az *Acan* gének esetében figyeltük meg. Ezzel szemben a kondrogenézis későbbi szakaszában alkalmazott 5-azaC gátlás a *Sox9* és *Acan* génexpressziójának szignifikáns emelkedéséhez vezetett. Az 5-azaC metilációs mintázatra kifejtett közvetlen hatását kvantitatív metiláció-specifikus qPCR módszerrel vizsgáltuk meg. A kezelés nem volt hatással a korai porcfejlődési szakasz alatt expresszálódó porcmarkerek promóterjeinek metiláltságára, ugyanakkor a késői kondrogenikus differenciáció alatt szignifikáns csökkenést láttunk az *Acan* és *Sox9* gének promóterjeinek metiláltsági szintjében. Az RT-qPCR eredményeivel való jelentős átfedés alapján kijelenthettük, hogy a *Sox9* és *Acan* markerek esetében a 6 napos kultúrák mintáiban tapasztalt génexpressziós emelkedés az 5-azaC kezelés közvetlen következményeként jött létre.

A molekuláris cirkadián óra működésének vizsgálata az *in vitro* porcfejlődés során csirke eredetű kísérleti modellben

A napi, azaz nagyjából 24 órás időtartamú cirkadián ritmus molekuláris szintű változásainak nyomon követéséhez szükség volt az *in vitro* modell rendszerünk porcprogenitor sejteinek úgynevezett szinkronizációjára. Elsődleges célunk az volt, hogy a cirkadián óra közreműködését az *in vitro* porcfejlődés korai szakaszában vizsgáljuk, ahol a kondroblaszt-differenciáció és az ECM termelődés a legintenzívebb. A specifikus 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 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.

A csirkeembrió végtagtelep eredetű HD kultúrákat a tenyésztés 1. napján 2 órán keresztül stimuláltuk 50% FBS tartalmú médium hozzáadásával, azaz szérumsokknak tettük ki. 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 legnagyobb mértékű emelkedést a tenyésztés 4. napján figyeltük meg. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *in vitro* kondrogenézis korai szakaszában alkalmazott szérumsokk erőteljesen serkenti a porcdifferenciációt.

Szerettük volna bizonyítani, hogy a fokozott ECM termelődés valóban a szérumsokk által előidézett cirkadián óra szinkronizáció miatt alakult ki. Az LDS kezelőanyag képes befolyásolni a szinkronizációs folyamatot. Az LDS modulátort a tenyésztés 1. napján, szérumsokkot követően, 24 órán keresztül alkalmaztuk a HD kultúrákban. A kémiai vegyülettel való kezelés szignifikánsan csökkentette a tenyésztés 6. napjára termelődött metakromáziás mátrix mennyiségét, a szérumsokkolt HD kultúrák ECM képződését is negatívan befolyásolta. Tehát hisztotechnikai eljárásokkal bizonyítottuk, hogy nagy valószínűséggel valóban a szérumsokk által előidézett óra-szinkronizáció következménye volt a korábban megállapított porcdifferenciáció fokozódás. A gátlószer szintén negatív hatással volt a mitokondriális aktivitásra: a kezelés a sejtek életképességének szignifikáns csökkenéséhez vezetett a tenyésztés 3. napjára.

Megfigyeltük, hogy a cirkadián óra modulátora befolyásolja-e a porcfejlődés molekuláris folyamatait. Három porcmarker, a *SOX9*, *COL2A1* és *ACAN* gének expresszióját vizsgáltuk 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 kolóniákban. Ezzel szemben az LDS és a szérumsokk együttes alkalmazásakor megfigyelhettük, hogy a porcmarkerek expressziós szintje szignifikánsan csökkent mind a 3., mind pedig a 6. tenyésztési napon, a csak szérumsokkolt kultúrákhoz viszonyítva. Összességében megállapítottuk, hogy az LDS kezelés negatív hatással volt az *in vitro* porcfejlődésre, illetve a szérumsokk által előidézett óraszinkronizációra is. Az eredmények tükrében kijelenthettük, hogy a molekuláris óra megfelelő működése alapvetően befolyásolja a porcképződést. Ezek a vizsgálatok azt is alátámasztják, hogy az *in vitro* kondrogenézis során alkalmazott szérumsokk pozitív hatását jelentős mértékben csökkenti, ha farmakológiailag gátoljuk a molekuláris óra megfelelő működését a differenciálódó sejtekben.

Szerettük volna bizonyítani, hogy a szérumsokk valóban szinkronizáló hatást fejt ki a cirkadián óra és a porcfejlődés specifikus molekuláris résztvevőinek génexpressziós mintázatára. A csirkeembrió végtagtelep eredetű micromass kultúrákat az 1. vagy 6. tenyésztési napon szinkronizáltuk. 24 órával a szérumsokk befejeztét követően learattuk az első mintákat. Ezután minden újabb 8 óra elteltével (32., 40., 48., 56., 64., 72. órában) új mintákat gyűjtöttünk be. A vizsgált gének expressziós változásait és a cirkadián óra működéséhez kapcsolt oszcillációs csúcsaikát 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. Az első tenyésztési napon történt szinkronizáció vizsgálatánál több óragén esetében is ki tudtuk mutatni a szinkronizált oszcillációs mintázatot. Megállapítottuk, hogy a molekuláris óra pozitív és negatív fázisai között körülbelül 8 órás fáziskülönbség volt megfigyelhető a szinkronizációt követő 24. és 72. óra között learatott mintákban. A relatív expressziós adatok alapján létrehozott cosinor-görbéken jól látható, hogy a *BMAL1* pozitív faktorként, míg a *PER2*, *PER3* és *CRY2* negatív faktorokként vesznek részt a cirkadián ritmus létrehozásában. Hasonló génexpressziós mintázatokat figyeltünk meg, ha a porcdifferenciáció későbbi szakaszában, a tenyésztés 6. napján alkalmaztunk szinkronizációt. A *BMAL1* és a *CRY1/PER2* gének ebben az esetben is egy 8 óránként váltakozó, antifázis-jellegű különbséget mutattak, ami ennél a kísérleti csoportnál is a molekuláris óra mRNS-szintű meglétére utal.

Az embrionális végtagtelep eredetű micromass kultúrákban a progenitor sejtek egy heterogén populációt reprezentálnak, ahol a sejtek bizonyos körülmények között előnyben részesíthetik az oszteogenikus irányú differenciációt a kondrogenikus differenciáció helyett. Ennek tisztázása érdekében megvizsgáltuk a *SOX9* kondrogenikus és a *RUNX2* oszteogenikus mester transzkripciós faktorok génexpresszióját, az előzőekben 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 *SOX9* transzkripciós adatainak illesztése során megállapítottuk, hogy a kondrogenikus transzkripciós faktor génexpressziója a porcfejlődés korai és késői szakaszában is cirkadián mintázatot jelzett, és fázisban volt a bemutatott *BMAL1* eredményeivel. Ezzel ellentétben a *RUNX2* transzkripciós faktor esetében nem fedeztünk fel cirkadián mintázatot a gén expressziós adatainak elemzésekor. Az *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., mind pedig a 6. tenyésztési napon történt szinkronizáció esetében. A *COL2A1* gén a *SOX9*-hez és az *ACAN*-hoz hasonló cirkadián expressziós mintázatot mutatott, akár az éretlen kondroprogenitor sejteket, akár az érett kondrocitákat 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.

MEGBESZÉLÉS

A DNS metiláció szerepéről az *in vitro* porcfejlődés során

Az ízületi porc degenerációjával járó bizonyos mechanizmusok hátterében fontos szerepet töltenek be a DNS metilációt szabályozó folyamatok. A regenerációs medicina egyik legátfogóbban kutatott módszere az őssejt-terápia, 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. A metilációs szint célzott megváltoztatása adott fejlődési stádiumban akár az őssejtek terápiás célú felhasználását is eredményezheti. Kísérleteink célja az volt, hogy különböző egér eredetű kondrogenikus modellek felhasználásával feltérképezzük a DNS metiláció specifikus regulátor enzimeinek mRNS-szintű expressziós mintázatát a porcfejlődés különböző stádiumai alatt, továbbá megfigyeltük a DNS metiláció gátlását előidéző 5-azaC kezelőanyag kondrogenezisre kifejtett hatását.

PCR array módszer segítségével megfigyeltük három DNS metilációval asszociált markergén (*Dnmt3a*, *Tet1* és *Ogt*) expressziós mintázatát egér sejtvonal eredetű sejtek porcosodó micromass kultúráiban. A DNS metiltranszferázok közül a DNMT3B enzimről már megállapították, hogy rendkívül fontos szereppel bír a végtagok normális fejlődése során. A PCR array eredményei jól ábrázolták, hogy a *Dnmt3a* és *Dnmt3b* metiltranszferázok RNS szintje a porcfejlődés érési és hipertrófiás fázisában emelkedett meg szignifikáns mértékben. Az utóbbi évek alatt bebizonyosodott, hogy a demetilációért felelős TET enzimek kulcsfontosságú epigenetikai szabályozó szereppel bírhatnak a porc fejlődése során. A *Tet1* géncsendesítésével járó *in vitro* kísérletek eredményei szignifikáns csökkenést jeleztek a porcmátrix-specifikus *Col2a1* és *Acan* gének expressziós szintjében. A TET enzimek tér- és időbeli eloszlásának szempontjából azt is leírták, hogy a TET1 volt az egyedüli, amely az egérembriók csigolyáinak fejlődése során a kondrogenézis teljes folyamata alatt kifejeződött. A *Tet1* RNS-szintű expressziós aktivációját az *in vitro* kondrogenézis érési és hipertrófiás szakaszaiban figyeltük meg. Az OGT szoros szabályozási kapcsolatban áll a TET enzimekkel, különösen a TET1 katalitikus aktivitását képes stimulálni. Prekondrogenikus sejtvonal eredetű sejtek porcspecifikus *in vitro* differenciációja során továbbá azt is megfigyelték, hogy az OGT által poszttranszlációs módosításon átesett fehérjék akkumulációja indukálta a porcfejlődési folyamatokat, az ECM átrendeződését, és a prehipertrófiás porcsejtek megjelenését. Ezen irodalmi adatok alapján az OGT expressziós szintjének megemelkedését a hipertrófiás

transzformáció szakasza alatt vártuk. A PCR array alapján megfigyelhettük, hogy az enzim RNS szintű upregulációja a 10. tenyésztési napon kezdődött meg, de a legnagyobb mértékű növekedést a 15. tenyésztési napon mutattuk ki. A *Dnmt3a* és *Tet1* gének a sejtvonal eredetű HD kultúrák RT-qPCR-ral való vizsgálata során 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 transzkripció aktivitása csökkenő tendenciát mutatott. Egérembrió végtagtelep-eredetű primer HD kultúrákban is megvizsgáltuk a három markergén expressziós változását az *in vitro* porcfejlődés folyamata alatt. 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 kondrogenézis előre haladtával fokozatos csökkenést láttunk. 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 szakasza alatt, a legmagasabb transzkript szinteket az osztódás és az elköteleződés fázisai alatt mutattuk ki. Fontos megemlíteni, hogy a sejtvonal eredetű és a primer HD kultúrák eltérő dinamikájú porcfejlődést mutathatnak, a jelenség egyik magyarázata a differenciálódó sejtek eltérő migrációs képességében kereshető. Szintén vizsgáltuk a kiválasztott három gén expresszióját *in situ* hibridizációs technika alkalmazásával, 15 napos egérembriókban. Ebben az esetben is a *Tet1* mutatta a legerőteljesebb expressziót a három 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. C3H10T1/2 sejtvonal eredetű sejtek esetében a *Tet1* downregulációja következményeként számos porcmarker, így a II-es típusú kollagén expressziója is lecsökkent. Szintén tanulmányoztuk, hogy a DNS metilációt gátló 5-azaC hogyan befolyásolja a még éretlen kondroprogenitor sejtek, illetve az érett kondrociták porcdifferenciációs képességét. Korábbi kutatások leírták, hogy a humán csontvelő eredetű mezenchimális őssejtek multipotens jellege változó tendenciát mutatott: egyszeri adagolást követően a sejtek megőrizték multipotenciájukat, azonban a kezelőanyag ismétlődő hozzáadása következtében a differenciációs potenciál lecsökkent, ezzel párhuzamosan pedig megnőtt az őssejtek kondrogenikus irányú elköteleződésének mértéke. Egy másik tanulmányban azonban azt írták le, hogy a humán csontvelő eredetű őssejtekből létrehozott porcosodó sejt kultúrákban

lecsökkent a kondrogenikus markergének expressziós szintje a kezelést követően. Az egymásnak ellentmondó kísérletes adatok jól érzékeltetik, hogy a DNS metilációs gátlószerezrel való munka során a koncentráció mellett a kezelések száma, időtartama és ütemezése is fontos paraméter. Az egérembrió végtagtelep eredetű kondroprogenitor sejtekből létrehozott micromass kultúrákban az 5-azaC eltérő hatást fejtett ki attól függően, hogy a kezelőanyagot melyik porcdifferenciációs szakaszban alkalmaztuk. A *Sox9*, *Col2a1* és *Acan* porc markergének expressziója szignifikáns csökkenést mutatott, ha az 5-azaC-t a kondrogenézis korai proliferációs stádiuma alatt használtuk, azonban a három vizsgált gén promóter régiójában nem tapasztaltunk hipermetilációt. A porcfejlődés későbbi, differenciációs szakasza alatt alkalmazott DNS metiláció-gátlás pozitívan hatott a *Sox9* és *Acan* gének expressziójára. Bizonyítottuk, hogy a 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.

A cirkadián óra szerepe az *in vitro* porcfejlődés során

A cirkadián óra fontos szereppel bír a normál porcszövet homeosztázisának fenntartásában illetve befolyásolja a kondrociták differenciációját is. Mindezek mellett már az is bizonyított, hogy a kondrocitákban működő perifériás cirkadián óra megzavarása OA-ra jellemző fenotípushoz vezet. Széles körben ismert, hogy az *ex vivo* módon tenyésztett és fenntartott sejtek megőrzik a sejtszintű molekuláris óra működését. Mivel az immortalizált sejtvonalak sok esetben csökkent szövet-specifikus funkcióval jellemezhetőek, kísérleteinkhez egy primer porcosodó micromass sejt-kultúra-alapú modellt választottunk, amelyet csirkeembriók végtagtelepeiből izolált mezenchimális sejtekből hoztunk létre. A 6 napon át tartó tenyésztési periódus alatt a kondroprogenitor sejtek porcspecifikus ECM termelésére képesek kondroblasztokká és érett kondrocitákká differenciálódni, miközben maga az ECM termelődése a 2-3. tenyésztési napokon indul meg. 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. Az 1. tenyésztési napon szinkronizált HD kultúrák analizéséből származó eredmények szerint a korai porcfejlődés stádiuma alatt már a kondroprogenitor mezenchimális 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. Az érettebb differenciációs stádiumban lévő (6 napos), szérum-sokk által szinkronizált micromass kultúrákban az 1. napon történt szinkronizációhoz hasonló transzkripciós mintázatot figyelhettünk meg. A *BMAL1* és *PER2/CRY1* expressziós mintázata ismét 8 óránként változó fázisos oszcillációt mutatott, amely egy mRNS szinten jól működő molekuláris óra jelenlétére utalt. Ezen eredmények azt igazolták, hogy az éretlen mezenchimális sejtek mellett a már érettebb és elkötelezett, porcspecifikus ECM termelésére képes kondroblasztok és korai kondrociták is rendelkeznek megfelelően funkcionáló molekuláris cirkadián óraművel, melynek meglétét egyébiránt már bizonyították *in vitro* körülmények között tenyésztett érett kondrocitákban. 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. A kulcs kondrogenikus transzkripciós faktor (*SOX9*), illetve két porcspecifikus ECM komponens (*COL2A1* és *ACAN*) génexpressziója szintén szinkronizált, ritmikus mintázatot mutatott a szérum-sokkot követően. Rágcsálókból izolált porcminiókban sikerült azonosítani a cirkadián óra markereinek mRNS szintű expresszióját, illetve a fény/sötét inger váltakozása által kiváltott szinkronizáció következtében a *Sox9*, a *Col2a1* és az *Acan* gének ritmikus oszcilláló expresszióját is. Azonban a cirkadián óra működésére a fény/sötét inger mellett számos egyéb regulációs faktor, például a bevitt tápanyag mennyisége is hatással van. Bizonyítottuk, hogy a vizsgált porcmarkerek géntermékei ritmikus expressziós mintázatot jeleztek, akár az első, akár a hatodik tenyésztési napon alkalmaztuk a szérum-sokkal való szinkronizációt. Bemutattuk azt is, hogy az első tenyésztési napon alkalmazott szérum-sokk következtében a primer porcosodó micromass kultúrák porcsejtjei a 6. tenyésztési napra erőteljesebb és nagyobb mennyiségű porcspecifikus extracelluláris mátrixot termeltek. Ezt a pozitív hatást a *SOX9*, *COL2A1* és *ACAN* markergének expressziós változásainak analízise során is megfigyelhettük. A porcfejlődés korai szakasza alatt alkalmazott szérum-sokk tehát stimuláló hatással bírt a kondrogenézis folyamatára. Ez a jelenség egyértelműen a szérum-sokk molekuláris óra szinkronizációját előidéző hatásának volt köszönhető, mivel az LDS kezelőanyag és a szérum-sokk együttes alkalmazását követően nem tapasztaltunk fokozott porcfejlődést. A korai kondrogenikus fázisban járó HD kultúrák molekuláris órájának megzavarása negatív hatással bírt a sejtek proliferációs képességére, az LDS kezelést követően a sejtek életképessége szignifikánsan lecsökkent. A *RUNX2*, az oszteogenikus differenciáció

kulcs markergénjének transzkripciós szintjében csökkenő tendenciát tapasztaltunk, továbbá sem az első, sem pedig a hatodik tenyésztési napon indított szérumsokkot követően sem sikerült kimutatnunk az oszcilláló génexpressziós mintázatot. Az oszteogenikus markergén negatív irányú regulációja azt jelezheti előre, hogy a szérumsokkot követően a primer HD kultúrák sejtei előnyben részesíthetik a kondrogenikus irányú differenciációt. Kutatásaink eredményeként sikerült leírunk egy szérumsokkon alapuló módszert, amely mindamellett, hogy előidézi a molekuláris cirkadián óra sejt szintű szinkronizációját, szintén elősegíti a porcprogenitor sejtek kondrogenikus differenciációs irányú elköteleződését, illetve fokozza az *in vitro* kondrogenézist.

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 stádiuma 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.

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.

