

## A KUTATÁS EREDMÉNYEI

### 1. A kutatás célja, előrehaladása, a szerződésben vállaltaktól való eltérések okai

A jelen kutatás szerves folytatása volt annak a korábbi OTKA kísérletsorozatnak, ami extracelluláris mátrix (ECM) fehérje gének szerkezetének, működésének és regulációjának felderítésére irányult és elvezetett a matrilin család felfedezéséhez (1). E család tagjai sajátos, egymást kiegészítő szöveti eloszlásban fejeződnek ki, és az ECM-ben kollagén-függő és attól független fonalas hálózatot képeznek. Bár kísérleti adatok valószínűsítették, hogy a matrilinok multidomén szerkezetük révén résztvesznek az ECM szerveződésében (2), de tisztázatlan volt pontos szerepük a különböző szövetek sejtközötti állományában, és nem ismertük a sajátos szövet-specifikus kifejeződésüket irányító regulációs folyamatokat sem.

Ezért a jelen kutatás keretében tervezett **kísérleteink fő célja** a matrilin gének (elsősorban *Matn1* és *Matn2*) ECM szerveződésében és átrendeződésében játszott *in vivo* funkciójának és transzkripciós szabályozási folyamatainak tanulmányozása volt. A matrilinok közti funkcionális redundancia igazolására, nemzetközi együttműködés keretében terveztük több matrilin génben hiányos transzgenikus egerek létrehozását és beható vizsgálatát. Alternatív megközelítésként terveztük a matrilin-1 (*Matn1*) és/vagy matrilin-2 génben (*Matn2*) domináns negatív mutációt hordozó transzgenikus egerek létrehozását, valamint hazai együttműködés keretében a *Matn2* funkciójának vizsgálatát izomregeneráció során. Másfelől az ECM fehérje gének rokon és eltérő szabályozási folyamatainak felderítése céljából terveztük a matrilin gének szövet-specifikus transzkripcióját meghatározó DNS-elemek és regulációs mechanizmusok tanulmányozását transzgenikus egerekben és *in vitro* kísérletekben. Figyelmünket elsősorban az ECM fehérje génekben előforduló, konzervált porc-specifikus DNS-elemek, valamint a matrilin-1 gén különleges, fejlődési állapot-specifikus kifejeződését irányító DNS-elemek és transzkripciós faktorok azonosítására kívántuk koncentrálni hazai és nemzetközi együttműködés keretében.

A **megvalósított kísérleti stratégia** lényegében megfelel a tervezettnek. Attól csak annyiban tér el, amennyiben a kísérletek előrehaladása és a kutatás során felmerült kooperációs lehetőségek azt indokoltá tették. Így a több matrilin génben mutáns transzgenikus egerek vizsgálata nem mutatott fenotípusos eltérést, tehát ez a stratégia nem vezetett el a gének funkciójának megértéséhez, ezért ezeket a kísérleteket nem folytattuk tovább. Az alternatív megoldásként tervezett domináns negatív mutációt hordozó transzgenikus egerek létrehozása helyett is egy új, lényegesen hatékonyabb és gyorsabb megközelítést alkalmaztunk nemzetközi együttműködés felhasználásával: a *Matn2* gént az Sh RNS technikával csendesítettük myoblast sejtvonalban, hogy izomdifferenciálódásban játszott szerepét tanulmányozhassuk és igazoljuk. A felszabaduló kutatási kapacitást olyan előkísérletekre és a matrilin-2 szerepével kapcsolatos új kutatási irányok megkezdésére fordítottuk, melyek hazai együttműködések során észlelt, váratlan megfigyeléseken alapultak, ezért a kísérleti tervben nem szerepeltek. Így került sor a matrilinok agancsfejlődésben, valamint a matrilin-2 rákos és regenerációs (májregeneráció) folyamatokban játszott szerepének, továbbá más ECM molekulákkal közös illetve azokétól eltérő jelátviteli utakban való részvételének vizsgálatára.

A kísérletek megvalósítását nagyban elősegítette, hogy Kénesi Erzsébet a jelen pályázathoz kapcsolódó OTKA posztdoktori támogatást nyert el bérköltségeinek fedezésére. Születési szabadsága miatt kísérleteit nem tudta befejezni. Problémát jelentett és nagyban késleltette az eredmények publikálását, hogy PhD címet szerzett

hallgatóinkat és munkatársainkat (Mátés Lajos, Korpos Éva, Sinkó Ildikó és Molnár Annamária) illetve abszolutóriumot szerzett hallgatóinkat (Otgonchimeg Rentsendorj, Nagy Andrea) az OTKA bérkeret szűkös volta és a költségvetési bérkeret hiánya miatt nem tudtuk tovább alkalmazni, így a kísérletek befejezésére kezdő PhD és egyetemi hallgatókat kellett betanítani. A közlést késleltette még a szabadalmi bejelentés miatti várakozás és a témavezető kartörése is.

## 2. A kutatás során kidolgozott elméletek, módszerek, eljárások ismertetése

### 2.1. *Matrilin* gének transzkripció szabályozásának tanulmányozása

#### 2.1.1. A *matrilin-1* gén zonális porc-specifikus kifejeződését meghatározó regulációs mechanizmusok (K6, K22, K30, K38, K40)

Korábban igazoltuk, hogy a *matrilin-1* gén (*Matn1*) hosszú promotere azzal a különleges, más porcfehérje génektől eltérő tulajdonsággal rendelkezik, hogy képes a génexpressziót distalis vázelemekbe és a növekedési korong oszlopos proliferatív és prehipertróf zónába irányítani transzgenikus egerekben (3).

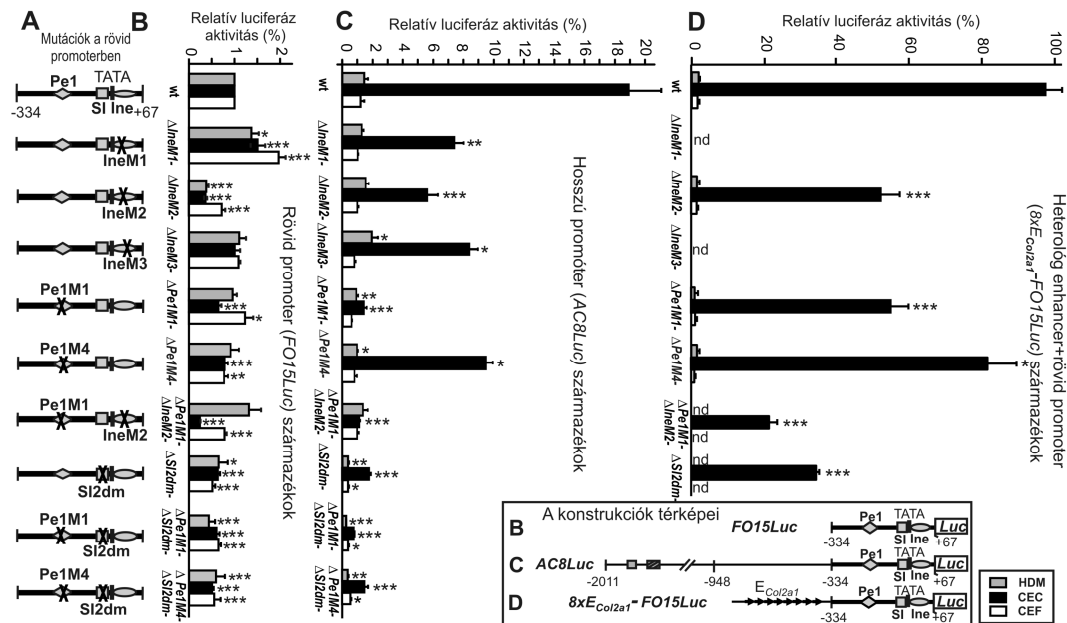
A gén regulációjának vizsgálata során a tervezett stratégiát követtük: konzervált szekvencia motívumokat kerestünk a gerincesek *matrilin-1* génjeinek reguláló régiójában, majd megvizsgáltuk, hogy azok szabályozó DNS-elemként működnek-e *in vitro* és *in vivo*. Barta Endrével (MBK, Gödöllő és DE, Debrecen) együttműködve, a DIALIGN2 program felhasználásával **amniota fajokban erősen konzervált szekvencia blokkot találtunk** a TATA motívum előtt 100-200 bp távolságban (**Pe1**), két további a távoli promoter régióban (**Dpe1 és Dpe2**), valamint egy gyengén konzerválódott motívumot a promoter és a start pontok környékén (**Ine**) (K6, K40). Ezek a motívumok nem fordulnak elő más porcfehérje gének promoterében, ami a *matrilin-1* gén eltérő, evolúciósan konvervált regulációjára utal. Ugyanakkor a Pe1 elem a Sox9 felismerőhelyhez nagyon hasonló invertált motívumot találtunk, ami valószínűsítette, hogy a szabályozás rokon vonásokat is mutathat más porcfehérje gének regulációs folyamataival (4,5). Ezt a hipotézist támasztja alá, hogy *in vitro* kísérletekben igazoltuk a porc-specifikus transzkripció faktorok, Sox9, L-Sox5 és Sox6 kötődését a csirke *Matn1* promoter Pe1 eleméhez (K6). Genomi footprint analízissel pedig azt is kimutattuk, hogy a Pe1 elem Sox motívumait, valamint a korábban azonosított SI és SII silencer elemek (6) NFI motívumait is *in vivo* kötődött transzkripció faktorok védik a DMS és UV hasítástól (K6, K40).

A Pe1 elemet magában foglaló, 400 bp-os, ún. **rövid *Matn1* promoter** aktivitása alacsony volt porcsejtekben tranziens expressziós kísérletekben és transzgenikus egerekben egyaránt (K6). A magas promoter aktivitáshoz távoli *cis* elemekre volt szükség. A Dpe1 és Dpe2 elemeket tartalmazó, növekvő hosszúságú promoter szakaszok növekvő mértékben fokozták a riportter gén aktivitást mind tranziens expressziós kísérletekben, mind pedig transzgenikus egerekben. A transzgén expressziós mintázata azonban a 2 kb hosszú promoter által irányított TR70 transzgénre jellemző zonális és proximo-distalis különbségeket mutatta (K22, K30, K38, K40). Megvizsgáltuk azonosított Sox-kötőhelyeket hordozó enhancer elemek kölcsönhatását is a rövid promoterral. A II. típusú kollagén gén minden porcsejtben specifikusan működő *Col2a1* enhancer eleme több kópiában a *Matn1* rövid promoter elé építve nagymértékben megnövelte a *LacZ* aktivitást transzgenikus egerek fejlődő porc vázelemeiben, de érdekes módon csak a distalis vázelemekben

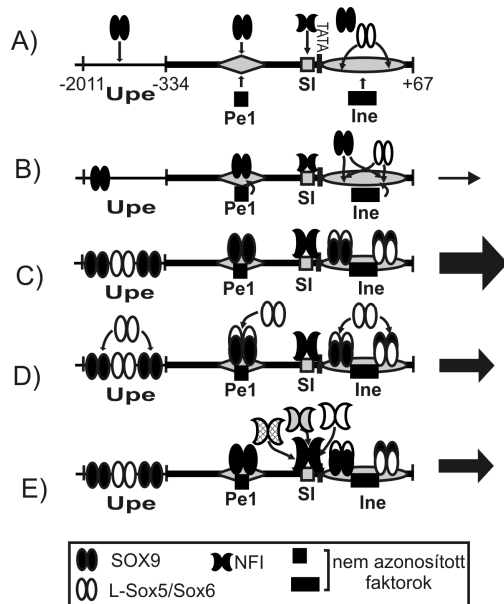
és csak az oszlopos proliferatív és prehipertróf zóna sejtjeiben. Tranziens expressziós kísérletekben a *Col2a1* enhancer csaknem 100-szorosára növelte a *Matn1* rövid promoter aktivitását, de csak a magas *Matn1* génexpressziót mutató, ún. késői proliferatív (Ib stádiumú) porcsejtokban. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a *Matn1* rövid promoter olyan új és hatékony regulációs mechanizmust működtet, ami képes leszűkíteni az erős, általános porc-specifikus *Col2a1* enhancer hatását térben, a növekedési korong bizonyos zónáiban és bizonyos fejlődési stádiumokban. Tehát a rövid promoter, alacsony aktivitása ellenére, a távoli DNS-elemekkel való kölcsönhatás révén, döntő szerepet játszik a gén szűkített porc-specifikus kifejeződésének szabályozásában.

Abból a célból, hogy megértsük a rövid promoter meglepően új működési mechanizmusát, behatóbban vizsgáltuk DNS-elemeit (Pe1, Ine és SI) és az azokhoz kötődő transzkripciós faktorokat (K40). A csirke *Matn1* és 25 emlős ortológja promoterének szekvencia analízisével (együtműködés Barta Endrével, DEOEC Debrecen) nemcsak megerősítettük a Pe1 elem szekvenciájának és pozíciójának nagyfokú konzerváltságát amniotákban, hanem potenciális **NFI-kötőhelyek konzerválódását** is kimutattuk a **TATA motívum előtt és a Pe1 elem közelében** (K40). A csirke gén rövid promoterében az SI és SII silencer elemek vizsgálata során már korábban igazoltuk, hogy e motívumok NFI faktorokat kötnek (6). Ezen kívül emlősökben nagyfokú, amniotákban kismértékű konzerváltságot észleltünk az Ine elem szekvenciájában, ami azonban csirkében és emlősökben egyaránt 2 pár potenciális Sox-kötőhelyet hordozott (K40). Mindez valószínűsíti, hogy a matriline-1 promoter amniotákban konzervált mechanizmussal működik. Elektroforetikus mobilitás-változáson alapuló kísérletekben (EMSA, supershift) igazoltuk, hogy a csirke gén Ine eleme szintén Sox faktorokat köt *in vitro*, továbbá ezeket a Sox motívumokat *in vivo* kötődött transzkripciós faktorok védik a DMS és UV módosítástól genomi footprint kísérletekben.

Annak bizonyítására, hogy a **Pe1, Ine, SI rövid promoter elemek** jelentősen hozzájárulnak a hosszú promoter transzkripciós aktivitásához, pontmutációkat juttattunk be a promoter elemekbe és vizsgáltuk azok hatását a 2 kb-os promoter tranziens expressziós aktivitására porcsejt kultúrákban (K22, K30, K38, K40). A Pe1 elem Sox-kötőhelyének mutációja drámai módon csökkentette a hosszú promoter porc-specifikus aktivitását, igazolva a Pe1 elem kulcsfontosságát a távoli szabályozó elemekkel való, Sox faktorok által közvetített kölcsönhatásban (1. ábra). Az Ine elem Sox motívumainak mutációja szintén fontos, de nem nélkülözhetetlen funkcióra utalt. A Pe1/Ine kettős mutáció azonban a távoli elemek aktiváló hatását teljesen felfüggesztette. Várakozásunkkal ellentétben az SI elem NFI-kötőhelyének mutációja jelentősen csökkentette a riportergén aktivitást minden vizsgált sejtben, jelezve, hogy Sox fehérjéken kívül az NFI transzkripciós faktorok kötődése is nélkülözhetetlen a gén működéséhez porcsejtokban. A Pe1 és Ine mutációk hatását transzgenikus egerekben és kotranszfekciós kísérletekben is igazoltuk. Kotranszfekciós kísérleteink arra a meglepő eredményre vezettek, hogy L-Sox5/Sox6 differenciálódási állapotól, illetve koncentrációtól függő módon modulálja a Pe1-kötött SOX9 transzaktiváló hatását a promoterre (K40). Korai fejlődési stádiumokban, illetve alacsony koncentrációban L-Sox5/Sox6 szinergista módon fokozza, míg késői fejlődési stádiumban és magas aránynál gátolja SOX9 aktiváló hatását. Hasonlóképpen befolyásolta SOX9 transzaktiváló hatását NFI-B is, míg a többi vizsgált NFI géntermék gátolta azt. Eredményeink alapján egy **modellt** állítottunk fel a ***Matn1* rövid promoter** különleges, evolúciósan konzervált és más porcfehérje génekétől eltérő, **regulációs mechanizmusának magyarázatára** (2. ábra). QRT-PCR és



**1. ábra: A *Matn1* rövid promóter mutációinak hatása a szövetspecifikus aktivitásra.** Pontmutációkat juttattunk be a rövid promóterbe (A), majd tranziens expressziós kísérletekben mértük azok hatását a rövid (B) és a hosszú promóter aktivitására (C), valamint a *Col2a1* enhancer és a rövid promóter együttes aktivitására (D). A nagy denzitású mesenchyma (HDM) kultúrák a *Matn1* gént alacsony, míg a csirke mellporcból készített CEC kultúrák magas szinten expresszálják. A primer fibroblast (CEF) kultúra a nem-expresszáló sejteket képviseli.



**2. ábra: Sox és NFI faktorok szerepe a *Matn1* promóter különleges, fejlődési állapot-specifikus regulációjában.** (A) A porc-differenciálódás kezdetén a promóter inaktív. (B) Majd Sox9 kötődését a Pe1 elemhez elősegíti L-Sox5/Sox6 kötődése az Ine elemhez és NFI kötődése az SI elemhez. (C) A transzkripciósi aktivitás a szinergista kölcsönhatás révén késői proliferatív chondroblastokban éri el maximumát. (D) Későbbi stádiumban a kötőhelyek telítődése miatt a transzkripciósi doménnel nem rendelkező L-Sox5/Sox6 verseng Sox9-vel Pe1 Sox-kötőhelyeiért, ezzel gátolja a távoli elemekről a Sox9 közvetítette aktiválást. (E) NFI faktorok kötődése nagy feleslegben a TATA közelében és represszor izoformák kompetíciója is gátolja a promóter transzkripciósi aktivitását.

genomi footprint analízis alapján a gén promotere korai porc-differenciálódási stádiumokban még nem működik, a kromatin szerkezet valószínűleg zárt (2A. ábra). Az aktiválódás lassan indul meg, korai proliferatív chondroblastokban még kevés SOX9 kötődik a Pe1 elemhez, amit L-Sox5/Sox6 kötődése az Ine elemhez és NFI kötődése az SI elemhez elősegít (2B. ábra). A Sox és NFI expresszió emelkedésével

egyre több faktor kötődik és a transzkripció aktivitás egyre nő. A Pe1 és Ine elemhez más faktorok is kötődnek, amelyek pl. a proximo-distalis irányultságért lehetnek felelősek. A promoter aktivitás késői proliferatív chondroblastokban éri el maximumát, mikor az SI kötőhely optimálisan telített NFI fehérjékkel, az Ine elem pedig Sox faktorokkal, ezáltal a Pe1 elemhez maximális mennyiségű Sox9 kötődik és közvetíti a távoli DNS elemek aktiváló hatását a transzkripció gépezetre (2C. ábra). Későbbi fejlődési stádiumokban, amikor L-Sox5/Sox6 mennyisége a Sox9-hez viszonyítva megnő, L-Sox5/Sox6 verseng Sox9-vel a Pe1 elem kötőhelyeiért, ami a Sox9-mediálta transzaktiváció és a promoter aktivitás csökkenéséhez vezet (2D. ábra). Ez a szabályozás, ami a TATA közelében lévő DNS elemek sajátos és amniotákban konzervált elrendeződésén alapul, bár Sox faktorok közvetítésével valósul meg, mégis alapvetően különbözik a porfehérje génekre jellemző regulációs mechanizmustól (4,5,7).

A **konzervált távoli DNS-elemek szerepét** is *in vivo* és *in vitro* módszerekkel tanulmányoztuk (K22, K30, K38). Tranziens expressziós kísérletekben kimutattuk, hogy növekvő számú **Dpe1** a rövid promoter elé építve nagyban növeli a reporter gén aktivitását. A **Dpe2** elem azonban több kópiában sem aktivált, sőt inkább gátolta a Dpe1 elemek okozta aktivációt. Ugyanakkor mindkét elem deléciója több-kevesebb mértékben csökkentette a promoter tranziens expresszió aktivitását porsejtekben. A több kópiás Dpe1 elem transzgenikus egerekben is jelentősen növelte a transzgén expressziót, de egy proximo-distalis irányban sajátosan szűkített kifejeződési mintázatot eredményezett. EMSA kísérletekben igazoltuk rekombináns SOX9 kötődését a Dpe1 elemhez. Kotranszfekciós kísérletekben a Dpe1 deléciója is interferált a SOX9 mediálta transzaktivációval, alátámasztva, hogy Dpe1 és Pe1 valószínűleg Sox9 közvetítésével vesz részt az enhanceosoma képződésben.

A rövid promoter tehát sajátos tulajdonságainál fogva képes homológ és heterológ enhancer elemekkel kölcsönhatni, így alkalmas olyan porc-specifikus vektorok kifejlesztésére, melyek a reporter gént a növekedési korong meghatározott zónáiba irányítják. Ilyen vektorok elkészítését és gyógyszerek porc-specifikus génexpresszióra gyakorolt hatásának követésére alkalmas állatmodellek kidolgozását párhuzamosan futó GVOP támogatással végeztük. OTKA kutatási eredményeink is hozzájárultak egy **szabadalmi bejelentéshez** (K22, K30, K38).

A molekuláris mechanizmus megértését elősegítette a HMGB1 szerepének vizsgálata a porcdifferenciálódás során. Supershift kísérletekben ugyanis megfigyeltük a HMGB1 fehérje kötődését a Pe1 és az Ine elemhez, majd pedig a HMGB1 fehérjét expresszáló klón kotranszfekciója aktiváló hatást mutatott korai proliferatív chondroblast kultúrában. Adataink alapján a **HMGB1 a porc-differenciálódás kezdetén jelentősen fokozza SOX9 és L-Sox5/Sox6 szinergista kölcsönhatását**. Nagy László (DEOEC Debrecen) csoportjával közösen kromatin immunoprecipitációval igazoltuk, hogy HMGB1 kötődik a gén Dpe1, Pe1 és Ine eleméhez humán fibroblastokban, valamint a Dpe1 elemhez humán chondrosarcoma sejtekben. A HMGB1 olyan kromatin komponens, ami HMGB doménje révén torzult vagy palindrom DNS szakaszokhoz tud kötődni és a zárt nucleosoma szerkezet felbontását képes elősegíteni. Ezért arra következtetünk, hogy HMGB1 kötődése a gén közeli és távoli promoter elemeihez a porc-differenciálódás kezdeti szakaszán szerepet játszhat a kromatin szerkezet felnyitásában és ezzel előkészítheti a porc-specifikus Sox faktorok bekötődését.

Vizsgáltuk továbbá az **introni elemek szerepét** is a génműködés szabályozásában. Az introni elemek (E102, LIE1) jelenléte nem növelte jelentősen a promoter aktivitást, sőt az E102 elem csökkentette a *Col2a1* enhancer elemek aktiváló hatását. Érdekes módon a 8 kópiás LIE1 elem a rövid promoterral fuzionálva az orrporcra és az orr környékére korlátozódó transzgen expressziót eredményezett. Biotinilált oligonukleotidok és MALDI tömegspektroszkópia alkalmazásával NFI-A és NFI-C fehérjék kötődését igazoltuk a LIE1 elemhez.

Fenti eredményeinkből két további kézirat van készülóban.

### **2.1.2. A *matrilin-2* gén izom-specifikus kifejeződésében szerepet játszó regulációs mechanizmusok vizsgálata (K41)**

A *Matn2* transzkripció szabályozás tanulmányozására terveinknek megfelelően kevesebb figyelmet fordítottunk, elsősorban az izom-specifikus génműködésben szerepet játszó mechanizmusokra összpontosítva. Szemikvantitatív RT-PCR analízis alapján a távoli és a közeli *Matn2* promoterre specifikus primer párok felhasználásával kimutattuk, hogy a távoli promoter transzkripció aktivitása nem változik számottevően sem patkány soleus izom notexinnel indukált regenerációja során, sem pedig a C2/7 myoblast kultúra differenciálódása során. Ugyanakkor a **közeli promoter** alacsony **aktivitása** jelentősen **megnőtt**, majd lecsökkent mind izomregenerálódás, mind pedig izomdifferenciálódás során. Szekvencia analízis alapján a közeli promoter potenciális Prx1/2 kötőhelyeket hordoz. Ún. oligonukleotid „overlay” módszer alkalmazásával kimutattuk, hogy a promoter fragmenthez olyan fehérjék kötődnek, melyek mobilitása a Prx fehérjékéhez hasonló. Prx1 aktiváló hatását a közeli promoterre kotranszfekciós kísérletekben is igazoltuk. A **Prx1/2 reguláló szerepének** igazolására Prx1/2 felismerő helyben mutáns promoter konstrukciókat is készítettünk a tranziens expressziós és kotranszfekciós vizsgálatokhoz.

## **2.2. Matrilinok szerepe izom-differenciálódásban, más differenciálódási és regenerációs rendszerekben és tumorképződésben**

### **2.2.1. *Matrilinok* funkciójának vizsgálata több *matrilin* génben mutáns transzgenikus egerekben**

Korábbi OTKA kutatásunk során Aszódi A. (Martinsried) laboratóriumával együttműködve kiűtöttük az egér *Matn2* gént, ami szembetűnő fejlődési rendellenességeket nem okozott (8). A kisebb fenotípusos eltérések vizsgálatához fontos volt a stabil genetikai háttér kialakítása. Ezért jelen kutatás keretében a *Matn2* KO egereket hat generáción keresztül visszakeresztelve C57Bl/6 genetikai háttérre vittük át. Az így kapott egérvonalat is felhasználtuk izomregenerációs és májtumor indukciós kísérleteinkhez (lásd később). Mivel a többi *matrilin* gén egyedüli kiűtése sem adott felvilágosítást a gének fejlődésben játszott szerepéről, ezért terveinknek megfelelően Aszódi Attila csoportjával együtt tovább folytattuk a *matrilin* gének funkcionális vizsgálatát egy és több *matrilin* génben hiányos transzgenikus egerekben. A kettő, három és négy *matrilin* génben hiányos transzgenikus egerek létrehozása pedig a megfelelő keresztezésekkel Martinsriedben történt. Várakozásunkkal ellentétben azonban a **többszörös KO egerek sem mutattak lényeges fenotípusos**

**eltéréseket.** Ennek magyarázata lehet, hogy KO egerekben kompenzációs mechanizmusok működhetnek. Elképzelhető, hogy a matrilinok más ECM molekulákkal rokon funkciót látnak el vagy az ECM-sejt kölcsönhatások során párhuzamosan futó jelátviteli folyamatok pótolni tudják a kiesett funkciót. Zebradánióban végzett RNS interferenciás kísérletekben azonban a fejlődési rendellenességek a matrilinok vázfejlődésben játszott fontos szerepére utaltak (R. Wagener, személyes közlés). Ezért terveinket módosítva, a matrilin gének fejlődési folyamatokban játszott szerepének, ezen belül főként a *Matn2* funkciójának vizsgálatára más megközelítési módokat és új vizsgálati módszereket (RNS interferencia) alkalmaztunk jelen kutatás keretében, kihasználva felmerülő egyéb új kollaborációs lehetőségeket.

### **2.2.2. Matrilinok kifejeződése egy sajátos vázfejlődési rendszerben, a növekvő szarvasagancsban és további, zóna-specifikus markerek kikeresése (K2, K25, K27)**

Korábbi munkáinkban megállapítottuk, hogy a matrilinok nagyon jó markerként szolgálnak az egér vázfejlődés immunhisztokémiai vizsgálata során, során (1,3,9). Ezért nagyon érdekesnek tűnt, hogy a matrilinokat markerként használva, bekapcsolódjunk egy olyan, a pályázat benyújtásakor még nem tervezett közös kutatásba Dr. Orosz László (ELTE Genetikai Tanszék) csoportjával együttműködve, ami egy igen különleges és alig jellemzett endochondralis csontképződési folyamat, az **agancsfejlődés molekuláris mechanizmusainak** felderítését célozta. Az agancsképződés a csöves csontok fejlődésével rokon annyiban, hogy kezdetben nagyszámú, elkötelezett mesenchyma sejt differenciálódik chondroblasttá és alakítja ki a majdani csont templátját. Míg azonban a csöves csontok növekedési korongjaiban a porcsejtek differenciálódási stádiumuknak megfelelő zónákat alkotnak, addig az agancs porcos állománya oszlopokba rendeződik, amelyeket véretek választanak el egymástól, biztosítva az intenzív növekedéshez szükséges anyag- és energiaforgalmat. Az agancsfejlődés olyan gyors, hogy a porcoszlopon belül is különböző differenciálódási állapotú sejtek keverednek. Ebből az eredményes együttműködésből három publikáció született (K2, K25, K27).

Hisztokémiai, immunhisztokémiai módszereket és *in situ* hibridizációt használtunk a gímszarvas (*Cervus elaphus*) humerus és agancs fejlődésének összehasonlítására az előző kutatási periódusban megkezdett munkákban, aminek a publikálására a jelen kutatási szakaszban került sor (K2). Megállapítottuk, hogy az agancskezdeményben a csúcsi mesenchyma jellegében eltér az oldalsó mesenchyma rétegtől. Előbbi egy morfogén régió, gazdag hialuronsavban és porc link proteinben, míg az utóbbi a csöves csontok csonthártyájának belső sejtrétegeire hasonlít génexpressziós mintázatában. Elsősorban mesenchyma sejtekben, prechondrocytáknak és preosteoblastokban detektáltunk **magas szintű *Matn2* expressziót**. Az agancskezdemény csúcsától 4-5 cm-re, ahol a belső porcgerendák hipertrófizált sejtekből álltak, a **felszín alatt már megfigyelhető volt intramembrán csontosodás, amelyet nem előzött meg porcos templát képződés**, mivel hiányzott az alcian-kékkel festődő matrix, a porcra jellemző II. típusú kollagén beépülés, és a porcos állományt lebontani kész chondro/osteoclastok is. Viszont a von Kossa-pozitivitás hidroxilapatit lerakódást jelzett, és a csontra jellemző I. típusú kollagént is kimutattuk. Tehát a mesenchyma sejtek közvetlenül differenciálódtak osteoblastokká, amit a magas szintű *Matn2* és *Matn3* expresszió is alátámasztott. Az oldalsó mesenchyma és a porcgerendák (mineralizált porc) határát egy sajátos, hosszúkás alakú sejt típus alkotja, ami érdekes módon termeli mind a négy matrilint és I. típusú

kollagént is, ugyanakkor nem halmoz fel a környezetében hidroxilapatitot. Hasonló alakú és expressziós mintázatú sejteket láthattunk a csonthártyában (K2).

Az együttműködés keretében hozzájárultunk azokhoz a kutatásokhoz is, melyek a fent jellemzett zónákban előforduló, a fejlődő agancsra specifikus gének azonosítására irányultak. Olyan géneket kerestünk, amelyek mesenchyma markerek, vagy segítségükkel megkülönböztethetők egymástól az előporc és a differenciálódott porc, illetve részt vesznek az igen intenzív csontfejlődésben. Az **AFLP differential display** módszerrel kiválasztott cDNS fragmenseket felhasználva egy létrehozott agancs cDNS klóntárból kiválasztott klónokról *in situ* RNS hibridizációval és immunlokalizációval történt a **zóna-specifikusság** igazolása. Az  $\alpha$ -tropomiozin kizárólag a mesenchymában fejeződött ki. Az annexin II és az apolipoprotein D mRNS szint 15-ször illetve 25-ször magasabb volt a fejlődő agancs porcban, mint sternum porcban. Az annexin II nagy mennyiségű volt az előporc sejtjeiben, az apolipoprotein D maximális szintjét a differenciálódott porcban érte el (K27).

Hozzájárultunk a zóna-specifikus gének kikeresésének **folytatásához heterológ cDNS microarray hibridizációval**. Ennek eredményeként fejlődő agancs 3 rétegéből valamint magzati porcból kinyert mRNS-t felhasználva, 15 szekvenciát sikerült azonosítani, amelyek valamelyik agancs rétegre specifikusan magas szinten fejeztek ki. Ezek közé tartoznak különböző jelátviteli utak (FGF, TGF $\beta$ , Wnt) és negatív szabályozási körök részesei, valamint az agancs nagyon intenzív anyagcseréjéhez szükséges funkciók. Grsf1 és Sprouty1 gének főleg a mesenchymában fejeztek ki, Rnf2, C21orf70 és Trb2 kifejeződési maximuma az előporcban volt, BmpR2 és p311 géneké pedig a porcszövetben. Az eddig ismeretlen szerepű C21orf70 génről teljes embrió *in situ* hibridizáció igazolta, hogy eger embrió végtagkezdeményekben a porcos kondenzáció előtt éri el kifejeződése maximumát, chondrosarcoma sejtekben pedig a fehérje a sejtmagban helyezkedik el, ami szabályozó szerepre utal (K25).

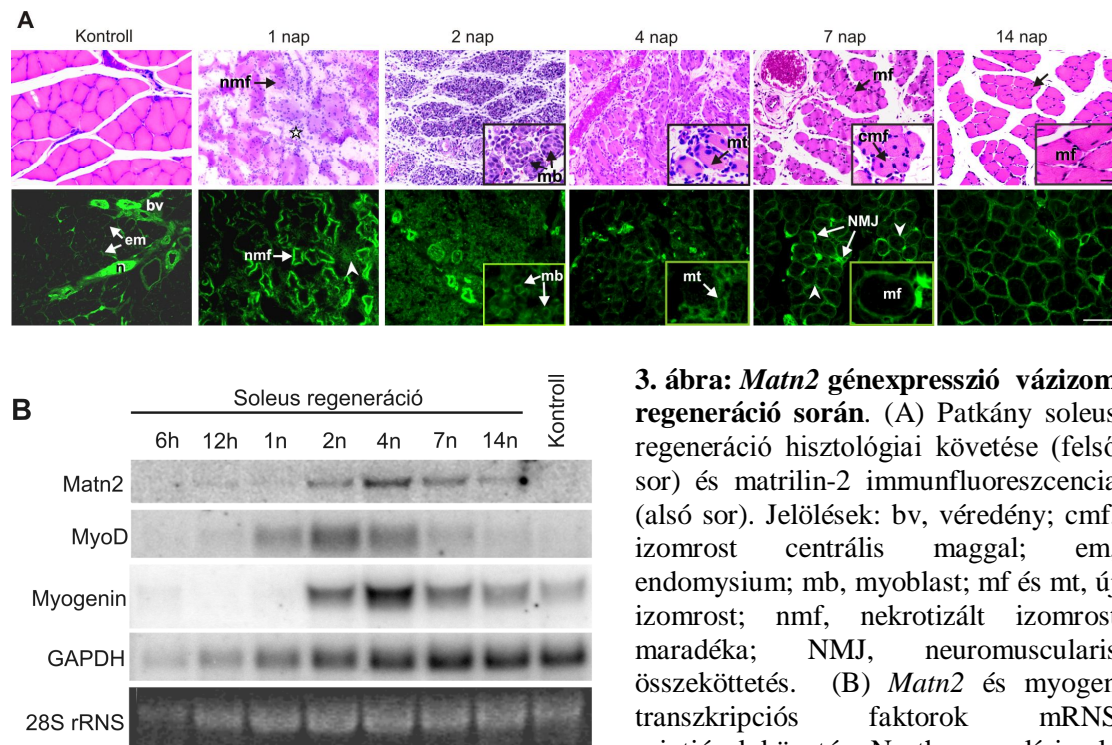
### 2.2.3. *Matrilin-2 szerepe vázizom regenerációban (K41)*

Korábbi kutatásaink során megfigyeltük matrilin-2 fehérje előfordulását a vázizmot burkoló kötőszöveti struktúrákban, az epimysiumban, a perimysiumban és az endomysiumban. Ezen felül igen koncentrált előfordulása az erek falában és az idegekben. Fiatal egerek harántcsikolt izomzatában immunfluoreszcenciával és immunblottal több matrilin-2-t tudtunk kimutatni, mint felnőtt állatokban. Ennek alapján feltételeztük, hogy a *Matn2* expresszió az egyedfejlődés során szabályozott és segíti az izomfejlődést. A hipotézist több lépésben sikerült igazolni.

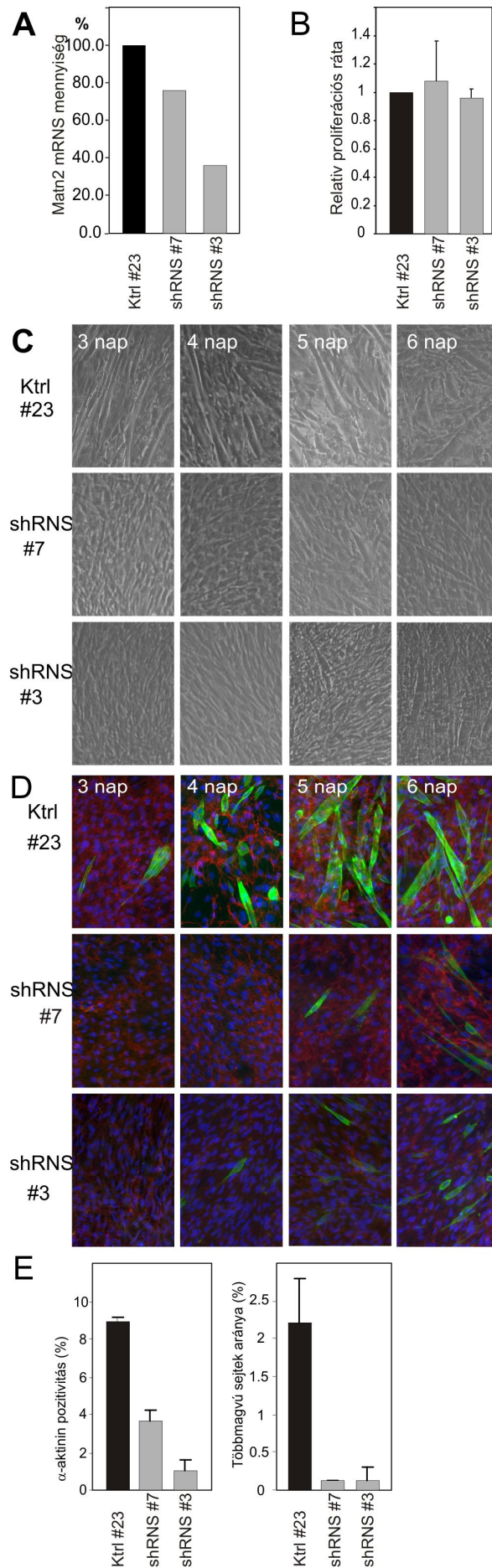
Dr. Dux László (SZTE ÁOK, Szeged) laboratóriumával közösen Wistar **patkányok soleus izmának *in vivo* regenerációját** vizsgáltuk, melynek során az izomnekrózist notexin (NTX) toxin intramuscularis injekciójával idéztük elő (K41). A módszer előnye, hogy nem sérülnek a regenerálódásért felelős szatellita sejtek, és a sérülést követő nekrosis ill. regenerálódás gyors. Northern hibridizációval kimutattunk, hogy a ***Matn2* génexpresszió átmenetileg megemelkedett** a regeneráció során (3. ábra). Az mRNS szint emelkedése már a második napon látható volt, a negyedik napon érte el maximumát és még a 14. nap után is magasabb volt, mint a kezeletlen állatok soleusában (3B. ábra). A MyoD transzkriptum szintje korábban mutatott maximumot, a myoblastoknak myotubulusokká való differenciálódását koordináló myogenin mRNS szintje a *Matn2* mRNS-sel párhuzamosan változott. QRT-PCR analízis is megerősítette eredményeinket. Vizsgálatainkat kiegészítettük a matrilin-2 fehérje szint követésével immunblot és



immunfluoreszcencia segítségével. Matrilin-2 immunjelet mutattunk ki a proliferálódó myoblastokat körülvevő mátrixban a regeneráció 2. napján, ami felerősödött a differenciálódó myoblastok ill. a myotubulusok körül a regeneráció 4. napján (3A. ábra). A regeneráció további szakaszait nagymértékben befolyásolja a beidegzés. A regeneráció 5-7. napján újraképződnek a motoros véglemezek, kialakulnak a neuromuscularis összeköttetések. Ez utóbbiakban a matrilin-2 kolokalizációját figyeltük meg az acetilkolin receptorhoz kötődő  $\alpha$ -bungarotoxinnal. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a matrilin-2 elősegíti az izom regenerációját azáltal, hogy befolyásolja a myoblastok proliferációját, differenciálódását és a myotubulusok fúzióját, továbbá szerepet játszhat a motoros idegi véglemezek újraképződésében is.



Kettős immunfluoreszcenciával igazoltuk **matrilin-2 részleges kolokalizációját fibronektinnel, dystrophinnal, sarcolemma dystroglycannal** valamint a sérült és új izomrostokat körülvevő basalis membránban **lamininnal** is, ami fontos szerepet játszik az izomregeneráció folyamatában. A sarcolemmában található dystrophin/glycoprotein komplex és az integrinek costamereket alkotva részt vesznek az izomrostok közötti laterális erőátvitelben, kapcsolódva a basalis membránon át ECM komponensekkel, a cytoskeletonon keresztül pedig az izomrostok Z korongjával. A kolokalizáció arra utal, hogy matrilin-2 közvetlenül vagy más ECM komponens (pl. fibronectin) közvetítésével kötődhet a dystrophin/glycoprotein komplex vagy az  $\alpha 5\beta 1$  integrin extracelluláris részéhez. Jelenleg az eredményeinkből készült, revízióra javasolt kézirat javításán dolgozunk (K41).



**4. ábra: A *Matn2* gén csendesítése késlelteti a C2/7 myoblast kultúra differenciálódását.** A kontrol #23 klónhoz képest az sh #3 és sh #7 klónokban kevesebb a *Matn2* mRNA (A), de a sejtosztódás sebessége azonos (B). A csendesítés hatására kevesebb megnyúlt izomrost látható fáziskontraszt mikroszkóppal (C) és alig találunk  $\alpha$ -actinin pozitív sejteket (D). 2000 sejtmagot tartalmazó sejteket átvizsgálva szignifikánsan kevesebb az egymagvú,  $\alpha$ -actinin pozitív izomrost száma, a sejtfúzió mértéke pedig még inkább csökkent a géncsendesítés hatására (E).

Dr. Dux László (SZTE ÁOK, Szeged) laboratóriumával együttműködve, a **vázizom regenerációs kísérleteket elvégeztük *Matn2* KO egereken**, valamint a C57Bl/6 genetikai háttérre átvitt *Matn2*<sup>-/-</sup> egereken és *Matn2*<sup>+/+</sup> alomtestvéreiken. Ebből a célból meghatároztuk az optimális notexin mennyiséget az egér soleus izom regenerációjának indukciójához. A metszetek immunhisztokémiai vizsgálata folyamatban van.

#### **2.2.4. Matrilin-2 szerepe izom-differenciálódásban és kölcsönhatása más ECM fehérjékkel (K39, K41)**

Matrilin-2 izom-differenciálódásban betöltött szerepét állandósult C2/7 myoblast kultúrák szérum megvonást követő differenciálódása során is vizsgáltuk (K41). Összehasonlító Northern kísérletekben a *Matn2* mRNS szintje a MyoD mRNS szinthez hasonlóan már a subconfluens kultúrákban magas volt, majd átmeneti emelkedést követően a 4. nap után jelentősen csökkent, amikor a myotubulusok megjelentek és a myogenin mRNS szint maximumot ért el. Immunfluoreszcencia jól mutatta a matrilin-2-ben gazdag ECM létét már a differenciálatlan sejtek körül, ami a 2. napon felerősödött, majd a fuzionáló myotubulusok körül lecsökkent. A sejtek által kiválasztott matrilin-2 a sejtek közötti fonalas hálózatba épült be, részlegesen kolokalizált fibronectinnel és I. típusú kollagén rostokkal.

Matrilin-2 izom-differenciálódásban játszott szerepét **RNS interferencia kísérleteink** igazolták. A *Matn2* vWFA doménjét kódoló szakaszra tervezett sh RNS-t, ami a *Matn2* mRNS degradációját katalizálja, az Ivics Zoltán (Berlin) laboratóriumában kifejlesztett transzpozon alapú pFP/neo-H1 vektorba (10) építettük. Majd az Sh RNS-t expresszáló és a vektort hordozó C2/7 stabil transzfektánsokból Neo rezisztens, egyedi *Matn2*-csendesített és kontrol C2/7 myoblast klónokat hoztunk létre. Szérum-megvonással izom-differenciálódást indukálva, a csendesített *Matn2* klónokban a kontrol klónokhoz képest a myogen differenciálódás több napos késleltetését figyeltük meg (4. ábra). Csökkent a *Matn2* mRNS szintje (4A. ábra), sokkal kevesebb megnyúlt, többmagvú izomrostot figyeltünk meg, kevesebb volt az  $\alpha$ -aktinin differenciációs markert mutató egy- és többmagvú izomrostok száma (4C-E. ábra). Tehát **matrilin-2 hiányában késett a myoblastok fúziója, a myotubulusok és izomrostok megjelenése**. Ugyanakkor a csendesített klónok proliferációja nem tért el jelentősen a kontroltól (4B. ábra). Csökkent a sejt-kivonatban egy másik differenciációs marker, a dezmin mennyisége is. QRT-PCR analízis is megerősítette a myogen marker génextpresszió és a p21 mRNS szint csökkenését a csendesítés hatására, ami arra utal, hogy a matrilin-2 is részt vesz az izom-differenciálódáshoz kapcsolódó jelátviteli utakban. Eredményeinkből egy további kézirat befejezésén dolgozunk.

A matrilin-2 izom és más szövetek differenciálódásában betöltött szerepének megértéséhez fontos **más ECM molekulákkal való kölcsönhatásának** és jelátviteli utakban való részvételének felderítése is. Ezért kerestük azokat a jelátviteli utakat, amelyek révén a környezetükben megtermelődő matrilin-2 hat a sejtekre. Sejtadhéziós kísérleteinkben a myoblastok gyengén kötődtek matrilin-2-vel bevont aljzathoz és a matrilin-2 koncentráció emelése sem vezetett az adhézió telítéséhez. Ennek hátterében, korábbi vizsgálatunk alapján, az áll, hogy a matrilin-2 interaktív doménje(i) önasszociációra képes(ek) (11). Viszont matrilin-2 csökkentette a sejtek

kötődését a **fibronektinnel** bevont felszínhez. A myoblastok kétféle módon kötődhetnek fibronektinhez: 1) főként  $\alpha 5\beta 1$ , kisebb mértékben  $\alpha \nu\beta 3$  integrinek révén; 2) sejtfelszíni heparán-szulfát proteoglikánok közvetítésével. A kétféle kötés együttesen vezet komplex fokális adhézciók kialakulásához. Felmerült annak a lehetősége, hogy matrilin-2 is a **syndecan-4** és fibronektin közötti kapcsolat gyengítése révén hat a sejtadhézióra, hasonlóan a tenascin-C és fibulin-1 sejtadhéziót gátló szerepéhez (12). Ezt valószínűsíti, hogy az izomdifferenciálódás kezdetén megnő a syndecan-4 génexpresszió. Ezért elkezdtük a matrilin-2 és a syndecan-4, egy minden sejt felszínén megtalálható transzmembrán proteoglikán funkcionális kölcsönhatásának vizsgálatát. Szilák László laboratóriumával kooperációban részt vettünk a syndecan-4 protein gerinc egyetlen citoplazmás Ser aminosavának nem foszforilálható, illetve permanensen foszforilált hatású mutánsait hordozó syndecan-4 változatokat termelő sejtek vizsgálatában is (K39). A Ser179 foszforilációja kulcsszerepűnek bizonyult a sejtek mozgáskészsége szempontjából. A sejtek leválását a fibronektinnel bevont aljzatról megelőzte a syndecan-4 Ser179 foszforilálása, majd a syndecan-4 ektodomén proteolitikus lehasadása, a vedlés. A Ser179 foszforilálása sejtciklus-függő módon történt meg. A foszfomimetikus Ser179Glu mutáns syndecan-4-et hordozó sejtek nem képeztek vinculint is hordozó érett fokális adhézciókat.

#### **2.2.5. Matrilin-2 szerepe májregenerációban (K29)**

Dr. Schaff Zsuzsa (Simmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai Intézet) munkatársaival együtt kimutattuk, hogy 2-acetilamino-fluorén mérgezést és részleges hepatektómiát követően az ovális sejtek, amelyekből a hepatocyták regenerálódnak, matrilin-2 tartalmú matrixot választanak ki maguk köré, ami normális körülmények között nem található meg az érett hepatocyták körül. Az indirekt immunfluoreszcencia adatokat RT-PCR és immunblot is megerősítette. Tehát **a matrilin-2-nek szerepe lehet a májszövet normális és esetleg patológiás differenciálódásában** (K29).

A matrilin-2 myoblast és hepatocytá differenciálódásban mutatott viselkedése alapján megfogalmaztuk azt a **hipotézist**, hogy a matrilin-2 bizonyos differenciálódó mesenchyma (és esetleg epithel) sejtek egyik legkorábbi markere, és egy átmeneti primer matrix része, amely szükséges a sejtípusok további fejlődéséhez. Emellett különböző fajta laza- és tömötrostos kötőszövetbe beépülve szerkezetfenntartó szereppel is rendelkezik.

#### **2.2.6. Matrilin-2 szerepe tumorképződéshez vezető, kóros sejt-differenciálódásban (K20, K33)**

A Washington Egyetem (St. Louis, MO, USA) Neurológiai és Patológiai Intézeteinek munkatársaival kooperációban vizsgáltuk a *MATN2* expresszióját az egyik leggyakoribb **gyerekkori agytumor, a pilocitikus astrocytoma (PA)** jóindulatú, neurofibromatosis-1-hez kötött és rosszindulatú, sporadikus változataiban (K20). Azt találtuk, hogy PA tumorokban a *MATN2* mRNS szintje hétszer olyan magas volt, mint a tumor által nem érintett agyi fehérállományban. A sporadikus esetek 70 %-ában magas volt a matrilin-2 fehérje szint is, a neurofibromatosis-1 asszociált 10 tumor közül csak egyben láttunk emelt fehérjeszintet, ráadásul az egy többszörösen kiújuló látóideg tumor volt. Az eredmények alapján **a magas MATN2 szint összefügg a klinikailag agresszívebb tumor kialakulásával.** A *MATN2*

overexpresszió jelenti az első leírt molekuláris elváltozást sporadikus PA esetekben, és az **első prognosztikus markert** erre a tumortípusra.

A **matrilin-2 jelentőségét humán hepatocelluláris karcinómák képződésében** is vizsgáltuk Dr. Schaff Zsuzsa munkatársaival együttműködve (K33). Ennek során 35 sebészetileg eltávolított tumort és a környezetükből származó májszövetet, valamint 10 normális mintát immunhisztokémiai, RT-PCR és immunblot analízisnek vetettünk alá. A tumorok közül 15 fejlődött ki cirrhotikus környezetben. Normál májban matrilin-2 a portális erekben, kisebb mértékben az epecsatornában volt megfigyelhető, a máj sinusoidok negatívak voltak. A hepatocelluláris carcinoma cirrhotikus környezete viszont intenzív immunfestődést adott a sinusoidokban. A tumor neovasculatura még erősebb pozitivitást mutatott. QRT-PCR adatokkal kiegészítve azt a következtetést vontuk le, hogy a matrilin-2 egy bazális membrán-asszociált fehérje, amely termelődik sinusoid "kapillarizáció" során cirrhosis és tumorigenezis esetén.

**Matn2-hiányos transzgenikus egerekben fokozott májtumor képződést** figyeltünk meg Dr. Kovalszky Ilona (Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai Intézet) laboratóriumával közösen végzett tumorindukciós kísérleteinkben. A KO egerekben mind a tumorok száma, mind a májtömeg/testtömeg index jelentősen megnőtt. A jelenség hátterének és mechanizmusának felderítésén jelenleg is dolgozunk. A kidolgozott állatmodellt felhasználjuk tumorelles vegyületek tesztelésére is egy új alkalmazott kutatás keretében.

### 3. Irodalomjegyzék

1. Deák, F., Wagener, R., Kiss, I. and Paulsson, M. (1999) The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* **18**, 55-64
2. Wagener, R., Ehlen, H. W. A., Ko, Y., Kobbe, B., Mann, H. H., Sengle, G. and Paulsson, M. 2005. The matrilins- adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett.* **579**, 3323-3329.
3. Karcagi, I., Rauch, T., Hiripi, L., Rentsendorj, O., Nagy, A., Bősze, Z. and Kiss, I. (2004) Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene in transgenic mice reveals modular arrangement of tissue-specific control elements. *Matrix Biol.* **22**, 605-618
4. Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B. (1998) A long new form of Sox5(L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively active the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**, 5718-5733
5. Lefebvre, V. and Smits, P. (2005) Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **75**, 200-212
6. Szabó, P., Moitra, J., Rencendorj, A., Rákhely, G., Rauch, T. and Kiss, I. (1995) Identification of a nuclear factor-I family protein-binding site in the silencer region of the cartilage matrix protein gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 10212-10221

7. Han, Y., and Lefebvre, V., (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4999-5013
8. Mátés, L., Mörgelin, M., Deák, F., Kiss, I. and Aszódi, A. (2004) Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. *Matrix Biol.*, **23**, 195-204
9. Segat, D., Frie, C., Nitsche, P.D., Klatt, A.R., Piecha, D., Korpos, E., Deák, F., Wagener, R., Paulsson, M., Smyth, N. (2000) Expression of matrilin-1, -2 and -3 in developing mouse limbs and heart. *Matrix Biol.* **19**, 649-655
10. Kaufman, C., Izsvak, Z., Katzer, A., Ivics, Z. (2005) Frog Prince transposon-based RNAi vectors mediate efficient gene knockdown in human cells, *Journal of RNAi and Gene Silencing* **1**, 97-104
11. Piecha, D., Wiberg, C., Mörgelin, M., Reinhardt, D. P., Deák, F., Maurer, P. and Paulsson, M. (2002) Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins. *Biochem. J.* **367**, 715-721
12. Williams, S.A., Schwarzbauer, J.E. (2009) A shared mechanism of adhesion modulation for tenascin-C and fibulin-1. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1141-1149

### Hivatkozás a közleményjegyzékben feltüntetett fontosabb publikációkra

- K2:** Korpos, É., Molnár, A., Papp, P., Kiss, I., Orosz, L., Deák, F. (2005) Expression pattern of matrilins and other extracellular matrix proteins characterize distinct stages of cell differentiation during antler development. *Matrix Biol.* **24**, 124-135. IF: 4.469
- K6:** Rentsendorj, O., Nagy, A., Sinkó, I., Daraba, A., Barta, E., Kiss, I. (2005) Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *Biochem J.* **389**, 705-716 IF: 4.224
- K20:** Sharma, M.K., Watson, M.A., Lyman, M., Perry, A., Aldape, K.D., Deák, F., Gutmann, D.H. (2006) Matrilin-2 expression distinguishes clinically relevant subsets of pilocytic astrocytoma. *Neurology* **66**, 127-130 IF: 5.690
- K25:** Gyurján, I., Jr., Molnár, A., Borsy, A., Stéger, V., Hackler, L., Jr., Zomborszky, Z., Papp, P., Duda, E., Deák, F., Lakatos, P., Puskás, L.G., Orosz, L. (2007): Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Mol. Genet. Genomics* **277**, 221-235 IF: 2.978
- K27:** Molnár, A., Gyurján, I., Korpos, É., Borsy, A., Stéger, V., Buzás, Z., Kiss, I., Zomborszky, Z., Papp, P., Deák, F., Orosz, L. (2007) Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Mol. Genet. Genomics* **277**, 237-248 IF: 2.978
- K29:** Szabó, E., Lódi, C., Korpos, É., Batmunkh, E., Rottenberger, Z., Deák, F., Kiss, I., Tőkés, A-M., Lotz, G., László, V., Kiss, A., Schaff, Z., Nagy, P. (2007) Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol.* **26**, 554-560. IF: 3.687

**K33:** Szabó, E., Korpos, É., Batmunkh, E., Lotz, G., Holczbauer, A., Kovalszky, I., Deák, F., Kiss, I., Schaff, Z., Kiss, A. (2008) Expression of matrilin-2 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res.* **14**, 15-22 IF: 1.260

**K39:** Keller-Pinter A, Bottka S, Timar J, Kulka J, Katona R, Dux L, Deak F, Szilak L. (2010) Syndecan-4 promotes cytokinesis in a phosphorylation-dependent manner. *Cell Mol Life Sci. In press*, Mar 14. [Epub ahead of print] PMID: 20229236 IF(2008): 5.511

**K40:** Kénesi, E., Nagy, A., Rentsendorj, O., Molnár, A., Sinkó, I., Oommen, S. T., Szénási, T., Barta, E., Puskás, L. G. and Kiss, I.: Evolutionarily conserved, growth plate zone-specific regulation of the matrilin-1 promoter: L-Sox5/Sox6 and NFI factors bound near TATA finely tune the activation by SOX9. *Mol. Cell. Biol.* Kézirat revízió alatt

**K41:** Korpos, É., Mátés, L., Kiricsi, M., Mandler, L., Deák, F., Rottenberger, Zs., Feltóti, Zs., Zvara A., Puskás, L. G., Dux L., and Kiss, I.: Transient up-regulation of matrilin-2 gene expression controlled by Prx factors suggests a role in early steps of skeletal muscle regeneration. *BBA Mol. Cell Res.*, Kézirat revízió alatt

**K22: Magyar szabadalmi bejelentés:**

Címe: „Porcspecifikus vektorok és porcspecifikus génműködés követésére alkalmas transzgenikus állatmodellek kidolgozása”

Bejelentés alapszáma: P0700457

Bejelentés időpontja: 2007. július 3. a Magyar Szabadalmi Hivatalnál

Bejelentő: MTA Szegedi Biológiai Központ

Feltalálók: Dr. Kiss Ibolya, Dr. Molnár Annamária, Nagy Andrea, Dr. Kénesi Erzsébet

**K30: Nemzetközi fázis elindítása a pozitív nemzetközi bírálólat alapján**

Címe: Cartilage-specific expression

Bejelentés száma: PCT/IB2008/052638

Bejelentés időpontja: 2008. 07. 01. az International Bureau of the World Intellectual Property Organization-nél

Bejelentő: MTA Szegedi Biológiai Központ

Feltalálók: Dr. Kiss Ibolya, Dr. Molnár Annamária, Nagy Andrea, Dr. Kénesi Erzsébet

**K38: Európai nemzeti szakasz elindítása**

Címe: Cartilage-specific expression

Bejelentés száma: 08763428.3

Bejelentés időpontja: 2010. 02. 02-án European Patent Office-nál

Bejelentő: MTA Szegedi Biológiai Központ

Feltalálók: Dr. Kiss Ibolya, Dr. Molnár Annamária, Nagy Andrea, Dr. Kénesi Erzsébet