

**Beszámoló az OTKA K60620 pályázat kutatómunkájáról
(zárójelentés 2006-2009)**

Protein kináz C és kalcineurin jelátviteli pályák szerepe a kondrogenézisben

Az *in vitro* porcdifferenciáció szabályozásában több, az intracelluláris kalcium-koncentráció változására érzékeny jelátviteli molekulaként működő enzim vesz részt (pl. PKC: protein kináz C, PP2B: kalcineurin). Ezért a pályázat kutatási tervében megfogalmazottaknak megfelelően kísérleteink egyik irányvonalaként a csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer kondrogenikus mezenchimális sejttenyészetekben (high density sejt kultúra: HD) differenciálódó porcsejtek Ca^{2+} -homeosztázisának vizsgálata és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt befolyásoló tényezők feltérképezése szerepelt. Eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Megállapítottuk, hogy a differenciálódó porcsejtek citoszóljában detektálható szabad Ca^{2+} -koncentráció a differenciáció ütemével párhuzamosan jellegzetes mintázattal változik: a differenciálatlan sejtekben mérhető alacsonyabb koncentrációról (kb. 80 nM) a chondroblastok differenciációjával egybeeső időpontban, a 3. tenyésztési napon egy 140 nM-os i.c. Ca^{2+} -csúcsig emelkedik, majd a differenciált chondroblastokban kb. 100-110 nM-os szinten stabilizálódik. A változások elsődleges forrása az extracelluláris tér és nem az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak. A Ca^{2+} -koncentráció változási mintázatának módosítása pl. Ca^{2+} -ionofórokkal, extracellulárisan alkalmazott EDTA-val a porcképződés mértékét módosítja. Ha a 3. napi Ca^{2+} -csúcs elmarad, az a porcképződés erőteljes gátlásához vezet. Ezt láttuk a kalcineurin gátlószerének a ciklosporin A-nak az alkalmazása kapcsán, amely jelenség felveti a kalcineurin aktív szerepét a kondrogenikus sejtek Ca^{2+} -influxában. Eredményeinket a Cell Calcium folyóiratban megjelent közleményünk foglalja össze (Matta és mtsai, 2008).

2. Kimutattuk, hogy a differenciálódó porcsejtek kimutatható mennyiségben termelnek ATP-t és a kondrogenikus sejtek a Ca^{2+} -szint emelkedésével reagálnak az extracellulárisan adagolt ATP-re; a sejtválasz mintázata ionotrop P2X-receptor jelenlétére utalt. Ezt a választ kizárólag a 3. napon tudtuk detektálni. Ennek alapján RT-PCR, Western-blot és immunhisztokémiai technikákkal, valamint a purinoreceptorokat szelektíven gátló szerekkel kezelve azt találtuk, hogy a Ca^{2+} -influx egyik forrása a plazmamembrán purinerg receptorai közé tartozó P2X4 kalcium csatorna. Eredményeinket a Cell Calcium folyóiratban megjelent közleményünk foglalja össze (Fodor és mtsai, 2009).

3. Csirkeembriók végtagtelepeiből izolált kondrogenitor sejtekből előállított primer sejt kultúrákban kerestük azt a transzfekeciós módszert, amely nagy hatékonysággal képes idegen DNS bejuttatására anélkül, hogy számottevő citotoxikus vagy apoptotikus hatása lenne. Három lipofekciós (Lipofectamin 2000, SuperFect Transzfekeciós Reagens, DMRIE-C Reagens), egy amfipatikus reagenst használó (Saint Mix) valamint egy nukleofekciós (Amaya) módszert próbáltunk ki az optimális transzfekeciós technika beállításához. A FACS-szal végzett transzfekecióshatékonyság vizsgálat, az életképesség és az osztódási ráta detektálás segítségével megállapítottuk, hogy a chondrogenikus sejtek optimális transzfekeciójához az amfipatikus reagenst tartalmazó Saint Mix és a Lipofectamin 2000 transzfekeciós reagens a legalkalmasabbak. Ugyanakkor már az „üres” vektorokkal történő transzfekeció nyomán megvalósuló GFP overexpresszió önmagában is porcképződés csökkenést eredményez. Vizsgálatainkat kiegészítettük a kalcineurin overexpressziós vizsgálatokkal (Juhász és mtsai, 2010; CEJB, *in press*).

4. Ugyancsak HD-kultúrákban vizsgáltuk a PKCdelta szerepét a porcdifferenciáció szabályozásában. A PKCdelta specifikus inhibitorának tartott rottlerinnek a kultúrák tápfolyadékához való adagolásával a porcképződés gátlását tapasztaltuk, a gátlószer csökkentette az ERK útvonal aktivitását és a Sox9 transzkripciós faktor expresszióját, valamint foszforilációját. Ugyanakkor a PKC aktivitást a rottlerin adagolásával kezelt kultúrákban nem tudtuk kimutatni. Ezért shRNS alkalmazásával tranziens géncsendesítéssel gátoltuk a PKCdelta expresszióját, melynek nyomán a porcképződés és a Sox9 foszforiláció gyakorlatilag teljes gátlását és az ERK-útvonal aktivitásfokozódását láttuk. Ezek alapján a PKCdelta-t a porcdifferenciáció pozitív regulátorának tekintjük, a rottlerin azonban nem tartjuk alkalmasnak a PKCdelta celluláris hatásainak vizsgálatára. Eredményeinket közlésre benyújtottuk a Biochimie folyóirathoz (Matta és mtsai, 2010; submitted).

5. A porcsejtekben zajló jelátviteli folyamatoknak az oxidatív stressz által kiváltott változásai fontos szerepet játszanak az ízületi porcgyulladásokat követő degenerációjában. Az ízületi porcban található érett porcsejtek posztmitotikus sejtek és gyakorlatilag nincs regenerációs képességük. Az esetleges regeneráció forrásaként szóbajövő, a környező szövetekben található mezenchimális jellegű sejtek viselkedésének tanulmányozása az oxidatív stressz nyomán ezért különös érdeklődésre tarthat számot. Vizsgáltuk, hogy porcosodó mezenchimális sejtekből előállított HD-kultúrákban milyen intracelluláris változások zajlanak, ha hidrogén-peroxiddal vagy peroxinitrittel kiváltott oxidatív stressz éri a differenciálódó sejteket. Az oxidatív stressz DNS-károsító hatása jól ismert. A keletkezett DNS hibák kijavításáért felelős enzimkomplex aktivitását a hibás DNS helyeken található fehérjéknek a poli-ADP-ribózzal (PAR) való megjelölése fokozza. A PAR szintézisét a sejtmagban elsősorban a poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) végzi. A túlzott PARP-1 aktivitás NAD^+ deplációhoz vezet és így citotoxikus hatású. Kísérleteink során vizsgáltuk a porcsejtek endogén PARP aktivitását és intracelluláris lokalizációját oxidatív stresszben (Zákány és mtsai, 2007). Vizsgáltuk a PARP-1 és PARG (poli(ADP-ribóz) glikohidroláz) szabályozó mechanizmusát is. Mindkét enzim géncsendesítése rezisztenciát okozott nagy dózisu hidrogén-peroxid kezeléssel kiváltott citotoxicitással szemben. Megfigyeltük azt is, hogy alacsonyabb, apoptózist indukáló hidrogén-peroxid kezeléssel szemben mind a PARG, mind a PARP-1 csendesített sejtek érzékenyebbek, ennek hátterében pedig azok elégtelen DNS hibajavítását igazoltuk (Erdélyi és mtsai, 2009).

A fehérjék foszforilációja és defoszforilációja a sejtfolyamatok szabályozásának fontos mechanizmusát jelentik. Ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük más sejtípusokra is.

6. Munkacsoportunk korábbi megfigyelése az volt, hogy a kalcineurin aktivitása csökkent a szisztémás lupus erythematosusban (SLE-ben) szenvedő betegek perifériás mononukleáris sejteiben (PBMC). Kimutattuk, hogy az egészséges donoroktól származó PBMC glükokortikoszteroid kezelése is csökkentette a kalcineurin aktivitását Ca-ionofor és forbolészter jelenlétében. Ez a megfigyelés a T-sejtek jelátviteli folyamatában a PKC izoenzimek lehetséges szerepére utalt a kalcineurin szabályozásában. Mind a PMA, mind az intracelluláris térben megnövekedett Ca^{2+} koncentráció hozzájárul a kalcineurin aktivitásának csökkenéséhez humán perifériás vér mononukleáris sejteiben anélkül, hogy befolyásolná a kalcineurin mRNS- és fehérjeszintjét. A cPKC α , β , γ izoenzimek játszanak szerepet a kalcineurin aktivitásának gátlásában PMA-val és Ca-ionoforral stimulált humán mononukleáris sejtekben. Ebben a folyamatban a hiperfoszforilált Cabin 1 lehet a jelátviteli molekula, ugyanis a Cabin 1 fokozott foszforilációja volt detektálható a cPKC izoenzimek enzimatisztikus aktiválását követően, ami a kalcineurin gátlását eredményezte humán PBMC-ben (Sziójyártó és mtsai, 2007).

7. Munkacsoportunk tanulmányozta a miozin foszfatáz (MP) szabályozó alegységének (MYPT1) szerepét is. Ismert, hogy a MYPT1 Thr850 oldalláncának ROK általi foszforilációja a foszfatáz gátlásához vezet. Ez a foszforiláció sokféle sejttípusban lejátszódik és megváltoztatja az MP enzim kölcsönhatását különböző jelátviteli folyamatokkal. Kimutattuk, hogy az MP defoszforilálja a retinoblasztóma fehérjét. A MYPT1 foszforilációjával gátlódik a retinoblasztóma fehérje defoszforilációja, befolyásolva a sejtciklus fázisátmeneteit, ami pl. leukémiás sejteknél a kemorezisztenciát módosíthatja (Kiss és mtsai, 2008). Vizsgálatainkat a kondrogenikus sejtek differenciálódási modelljében folytatjuk.

8. A protein foszfatázok intracelluláris lokalizációjának tanulmányozása hívta fel a figyelmünket a foszfoinozítid metabolizmus egyik enzimének a foszfatidilinozitol-4-kináz (PI4K230) nukleoláris lokalizációjára és a transzport mechanizmusára. Immunfluoreszcenciával kimutattuk a PI4K230 fehérjét a neurális és nem-neurális sejtek nukleoluszában. Igazoltuk, hogy a PI4K230 mono- és bipartit nukleoláris lokalizációs szignál szakaszai működnek közre a nukleocitoplazmatikus transzportban. A monopartit nukleoláris lokalizációs szignál által közvetített sejtmagi import az importin $\alpha 1/\beta$ és importin $\alpha 3/\beta$ dimer transzport fehérjék által vezérelt útvonalakon történik (Kakuk és mtsai, 2007).

9. A glikogén foszforiláz aktivitásának szabályozása kulcsfontosságú a szervezet vércukorszintjének megfelelő szinten tartásában. Az enzim gátlása új lehetőségeket nyit meg a 2-típusú diabetes kezelésében. Hazai és nemzetközi kutatási együttműködésekben folytattuk a glükóoanalóg inhibitorok vizsgálatát és új típusú gátlószereket ismertünk fel (Benlifa és mtsai, 2006; Cecioni és mtsai, 2009; Tóth és mtsai, 2009).