

Zárójelentés

OTKA K82009

Témavezető: Virág László

DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet

A pályázat célja mesenchimális őssejtek (MSC) differenciációs folyamatainak tanulmányozása volt, különös tekintettel a poli(ADP-riboziláció szerepére. Mivel az MSC sejtek leginkább porc-, csont-, és zsírsejt irányú differenciációra képesek, ezért a pályázati munkában is az chondrogén, osteogén és adipogén differenciáció tanulmányozása volt fókuszban, és az elért eredményeket is ebben a bontásban mutatjuk be.

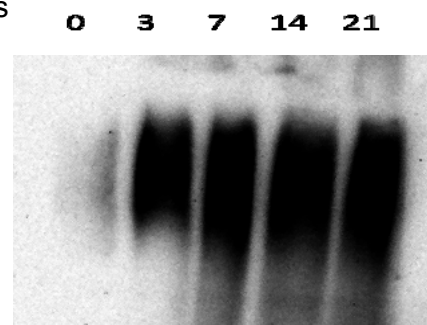
I. A poli-ADP-riboziláció szerepének vizsgálata mesenchymális őssejtek chondrogén differenciációjának szabályozásában

A placentából izolált mesenchymális őssejtek porc differenciációs modelljét beállítottuk. A sejtfelszíni markerek alapján fenotipizált sejteket TGF β indukálta differenciáció során vizsgáltuk különböző molekuláris biológiai módszerekkel 21 napig. A chondrocytákat a 3., 7., 14. és 21. napon gyűjtöttük be és a differenciálatlan kultúrához viszonyítottuk a porc specifikus markerek kifejeződését. Meta- és ortokromáziás festéssel igazoltuk a glükózaminoglikánok expresszióját a kultúrákban.



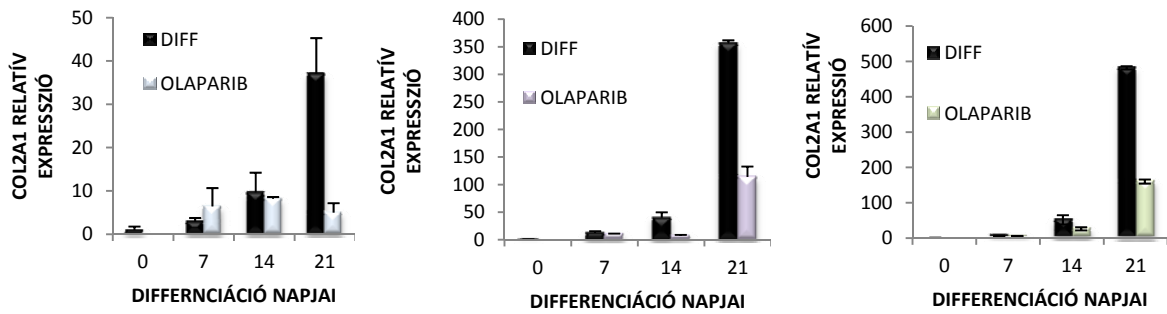
1. ábra DMMB és HSO festés fejtett porc kultúrák metszetein

A TGF β indukálta porc differenciáció alatt porcspecifikus gének aktiválódnak. A porcdifferenciáció mester regulátor transzkripciós faktora a SOX5, SOX6, SOX9. Ezek a gének felelősek az extracelluláris mátrix fehérjék expressziójáért: II-es típusú kollagén (COL2A1), aggregán (ACAN), cartilage oligomeric matrix protein (COMP). A porc-differenciáció során igazoltuk a PARP1 szabályozó szerepét. Western Blot módszerrel kimutattuk a növekvő intenzitású PAR polimert a differenciáció 3, 7., 14. és 21. napján (2. ábra). A 0. napi differenciálatlan

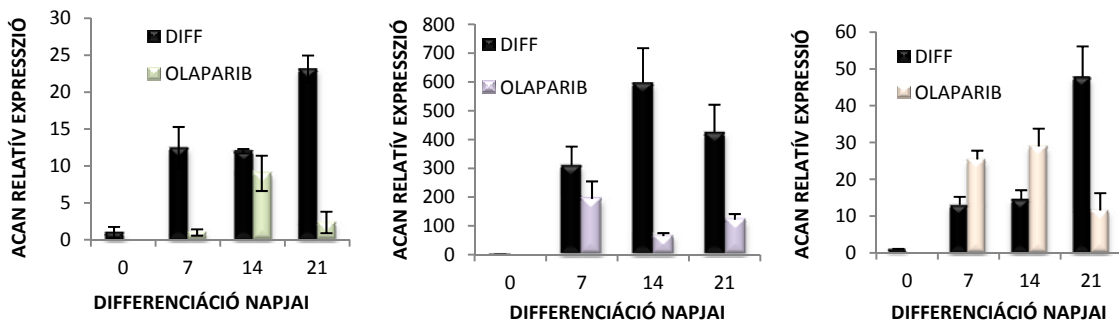


2. ábra Poli(ADP-ribóz) polimer akkumulációja a porcdiffe-renciáció során (0-21. nap)

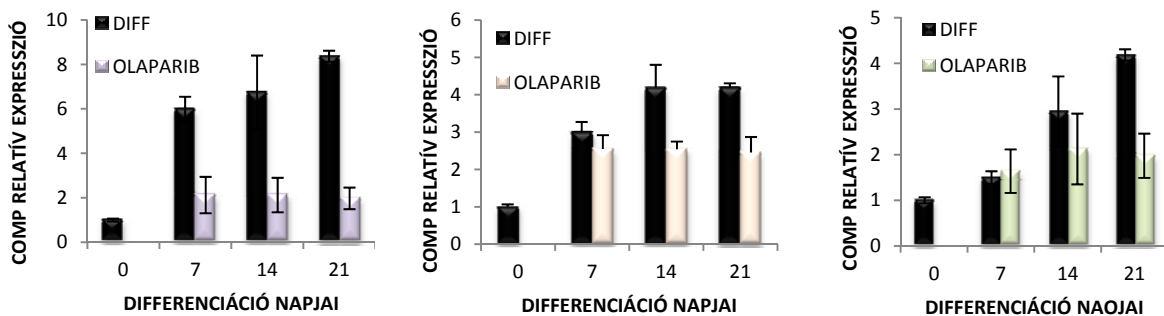
kultúrában gyenge intenzitású jelet kaptunk. Annak igazolására, hogy a porc markerek expresszióját befolyásolja-e a PARP1, a klinikai kipróbálásokban is használt PARP gátlószerekkel (olaparib és veliparib) kezeltük a kultúrákat, és vizsgáltuk a markerek kifejeződését gén és fehérje szinten 3 különböző donorból származó porc kultúrában. Előkísérletekben megállapítottuk az olaparib és veliparib MSC-ken kifejtett minimális gátló koncentrációját. Eredményeink (3-5. ábra) azt mutatják, hogy az általunk vizsgált extracelluláris porc fehérjék expressziója gén és fehérje szinten is szignifikánsan csökken a PARP gátló kultúrákban.



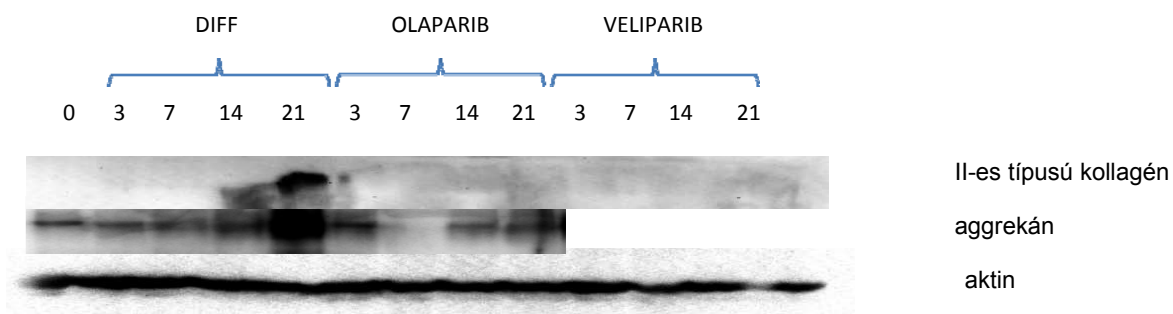
3. ábra: COL2A1 génexpresszió cMSC2, cMSC8 és cMSC9 sejtekben



4. ábra: ACAN génexpresszió cMSC2, cMSC8 és cMSC9 sejtekben

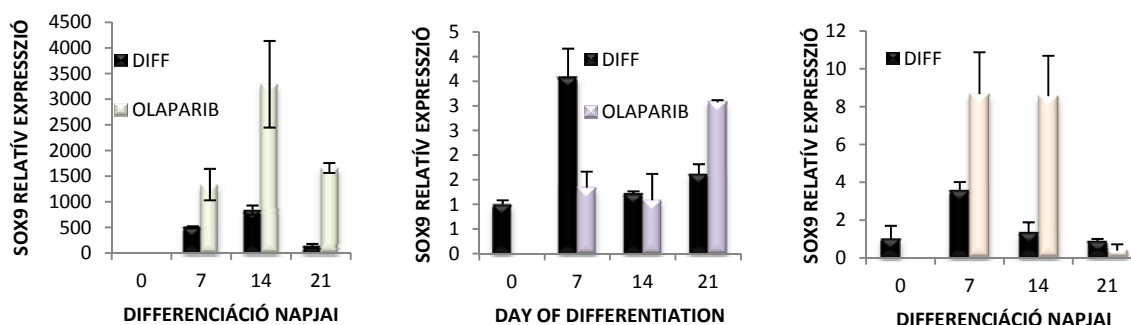


5. ábra: COMP génexpresszió cMSC2, cMSC8 és cMSC9 sejtekben



6. ábra: II-es típusú kollagén és aggregán kimutatása Western blottal

Vizsgáltuk a SOX9 transzkripciós faktor expresszióját is, de eddigi kísérleteinkben az expresszió dinamikája és a PARP gátlás hatása MSC izolátumonként eltérő volt (7. ábra), így a SOX9 expresszió PARilációs szabályozásának feltárása további kísérleteket igényel.



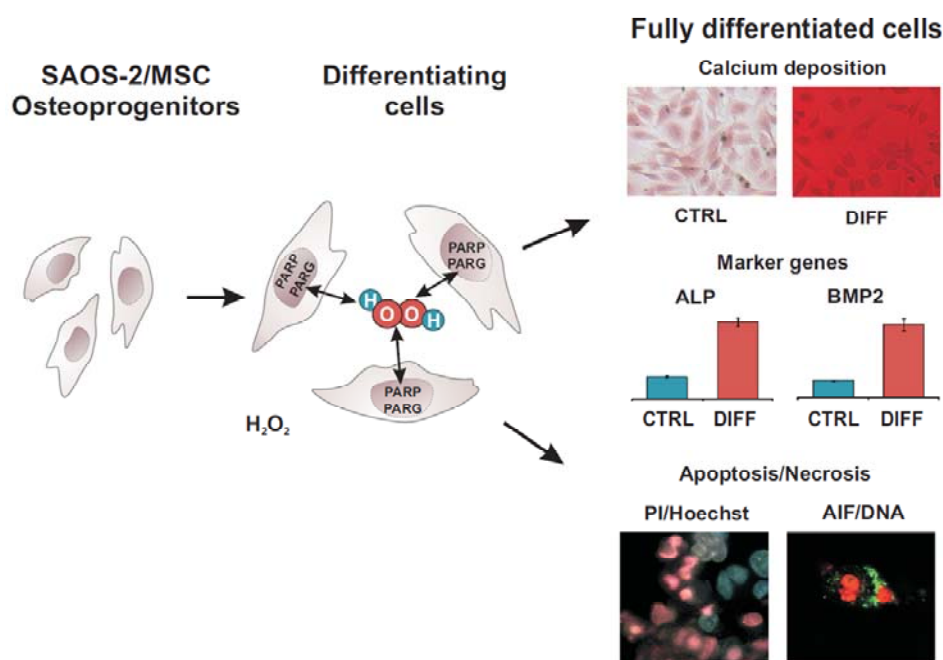
7. ábra: SOX9 génexpresszió cMSC2, cMSC8 és cMSC9 sejtekben

A kondrogenezis PARilációs szabályozásával kapcsolatos munka összefoglalása:

Sikerült beállítanunk az MSC izolálás és fenotipizálás módszereit. Megállapítottuk, hogy a PARP1 enzimnek esszenciális szerepe van a porc mátrix komponenseinek kifejeződésében, és ez a szabályozás, valószínűleg, a SOX9-től függetlenül megy végbe. Több transzkripciós faktor porcban való kifejeződésének vizsgálata után azt találtuk, hogy az Nkx-3 transzkripciós faktor aktivációja PARilációs szabályozás alatt áll, és irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy közvetlen enhanszere a II-es típusú kollagén és aggregán géneknek. A munka befejezéséhez, erre az útvonalra fókuszálva végzünk további kísérleteket.

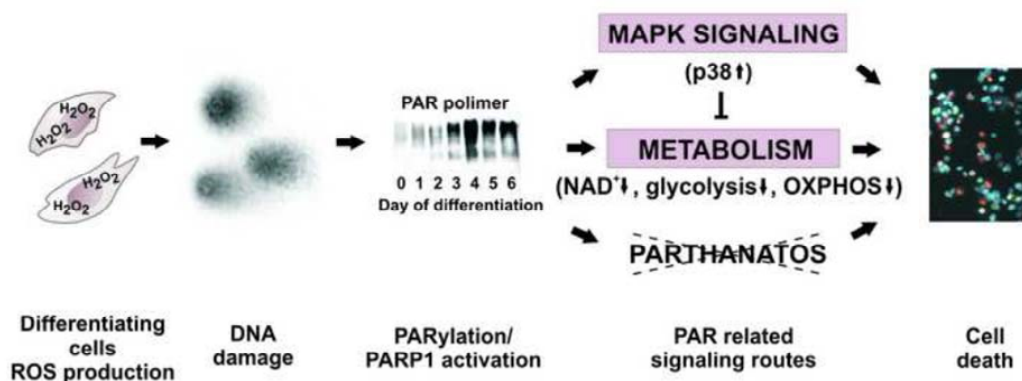
II. A poli-ADP-riboziláció szerepének vizsgálata az osteogén differenciációk szabályozásában

A legsikeresebb, két közleményt is eredményező kutatási irányunk az osteogén differenciáció tanulmányozásához kötődik. Először igazoltuk a PARP-1 szerepét az osteogén differenciáció folyamatában (mineralizáció, alkalikus foszfatáz aktivitás, marker gének expressziója), és igazoltuk, hogy az osteogén differenciáció irányába indult sejtek H₂O₂-t termelnek, ami a PARP-1 aktivátora ebben a modellben. Az osteogén differenciáció jelentős sejtpusztulással jár, és a PARP-1 szerepét igazoltuk ebben a differenciációval kapcsolt sejthalálútvonalban is. Az ebből a munkánkból megjelent FRBM cikk grafikus absztraktja (lent) foglalja össze a munka lényegét.



8. ábra. A H₂O₂-PARP aktiváció-sejthalál útvonal osteogén differenciáció során

A továbbiakban az FRBM cikkben leírt H₂O₂-PARP aktiváció-sejthalál útvonal további eseményeit és szereplőit azonosítottuk. Igazoltuk, hogy a H₂O₂ DNS törést okoz, s ez lehet a PARP-1 aktiváció közvetlen stimulátora. Megvizsgáltuk a MAP kinázok lehetséges szerepét is az osteogén differenciációval kapcsolt sejthalálban, és azonosítottuk a p38 MAP kinázt, mint az útvonal „downstream” mediátorát. A PARP-1 és a p38 fizikai kapcsolatát és kolokalizációjukat is sikerült igazolnunk. A munka e második szakaszáról készült közlemény (revideált formája benyújtva az FRBM-nek) grafikus absztraktja (lent) foglalja össze a munka lényegét.



9. ábra. A H₂O₂-DNS törés-PARP aktiváció-p38 aktiváció-sejthalál útvonal osteogén differenciáció során

Az osteogén differenciáció PARilációs szabályozásával kapcsolatos munka összefoglalása:

Az osteogén differenciációban azonosítottunk egy új szabályozó útvonalat, melyet az alábbi folyamatként képzelünk el:

NOX expresszió-H₂O₂ termelődés-DNS törés-PARP aktiváció-p38 aktiváció-sejthalál

Saját eredményeink, és irodalmi adatok is azt mutatják, hogy az osteogén differenciáció és a sejthalál egymással szorosan kapcsolva szabályozódik, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy az elhalt sejtekre szükség van a csontmátrix kialakulásához.

III. A PARiláció szerepe az adipogén differenciációban

Az adipogén differenciációban meghatároztuk a PARilációs profilt és a PPAR γ expressziós profilt, valamint a farmakológiai PARP gátlás hatásának vizsgálatát. Kezdeti eredményeink azt mutatták, hogy a PARiláció szerepet játszik az adipogén differenciációban is, de ez a hatás nem volt jelentős. Mindezek alapján az adipogén differenciáció vizsgálatát nem találtuk perspektivikusnak, és ezért inkább az osteogén vonalra fókuszáltunk.