

**CSIRKE PORCSZÖVET-SPECIFIKUS GÉNKIFEJEZŐDÉS
DIFFERENCIÁLÓDÓ CHONDROCYTÁKBAN**

PhD értekezés tézisei

Készítette: dr. Szűts Viktória

Témavezető: Dr. Kiss Ibolya

Dr. Deák Ferenc

Készült: MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében

Szeged, 1997.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Bevezetés a chondrogenezisről	1
	A kapcsoló fehérje irodalma	3
2.	Célkitűzés	5
3.	Kísérleti rendszer és alkalmazott módszerek	5
	3.a) Sejtkultúrák	5
	3.b) Módszer fejlesztés össz RNS preparáláshoz, Northern analízis és foszfor- image értékelés	6
	3.c) Rekombináns plazmidok felépítése, tranziens expresszió, CAT assay	8
4.	Eredmények ismertetése és megvitatása	9
	I. Extracelluláris mátrix fehérje gének expressziós mintázata szérummentes porcdifferenciálódási rendszerben - Hormonok és növekedési faktorok hatása a porcspecifikus fehérje gének expresszáldására	9
	I.a) Extracelluláris mátrix fehérje gének expressziós mintázata craniális chondrocytákban	9
	I.b) Porcfehérje gének kinetikai analízise caudális chondrocytákban	18
	II. Porcfehérje gének transzkripciós szabályozása: A csirke kapcsoló fehérje gén 5' szabályozó régiójának működése - a gén átíródása két független promoterről	22
	II.a) A csirke kapcsoló fehérje gén közeli promoterének térképezése tranziens expressziós kísérletekben	22
	II.b) A reguláló régió tranziens expressziós aktivitása különböző porc- differenciálódási stádiumokban	25
	II.c) Transzkripciós starthelyek meghatározása a közeli promoter szakaszon	28
	II.d) A két promoter tranziens expressziós rendszerben mért aktivitásá- nak összevetése más kísérleti rendszerben meghatározott iniciációs gyakoriságukkal	28
5.	Összefoglaló következtetések	30
6.	Irodalom	32



SZÜLEIMNEK, akik elindítottak

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkájukkal elősegítették kísérleteim sikerét, dolgozatom megírását:

Elsősorban témavezetőimnek Dr. Kiss Ibolya tudományos tanácsadónak és Dr. Deák Ferenc tudományos főmunkatársnak, hogy felkeltették a téma iránt érdeklődésemet, munkámat nagy hozzáértéssel irányították és mindvégig tanácsaikkal segítettek szakmai és más jellegű gondjaimban egyaránt. Deák Ferencnek és Selen Muratoglunak külön köszönöm, hogy *in vivo* kísérleteiket fáradságos munkával elkészítették a dolgozatom benyújtásának idejére.

Köszönöm Intézetünk igazgatójának, Dr. Víg Lászlónak, hogy lehetővé tette az MTA SZBK Biokémiai Intézetében a disszertációm elkészítését.

Fekete Ildikó és Kovács Katalin asszisztenseknek a szövettenyészetek gyakorlati kivitelezésében, amiben mindvégig lelkiismeretesen segítettek. Simon Ferencné és Dr. Fekete Endréné asszisztenseknek akik ugyanolyan figyelemmel segítettek a laboratóriumi technikák megoldásában, pótolhatatlan segítséget nyújtottak kísérleteim gyakorlati kivitelezésében.

Köszönetet mondok Prof. Peter Brucknernek, hogy a Münsteri Orvostudományi Egyetem Patofiziológiai Intézetében biztosította a kísérleti feltételeket.

Prof. Ranieri Canceddának és Dr. Beatrice Dozinnak tartozom köszönettel, amiért odaadó segítségükkel elsajátíthattam a hipertróf kultúrák kezelését a Genovai Orvostudományi Egyetem Biotechnológiai Központjában.

Dr. Joideep Moitrának, hogy a kezdeti munkámban olyan fáradhatatlan lelkesedéssel és szakmai tudásának átadásával segítette elindulásomat a genetika tudományába, Rauch Tibornak, hogy a plazmidkészítést segített elsajátítani, Bachrati Csanádnak és Selem Muratoglunak a pEMBLCAT plazmidokért és hasznos tanácsaikért. Karcagi Ildikónak, hogy tanácsain kívül vidámságával mindig elősegítette a jó légkört. Tóth Sándornénak a művészi szinten történő ábrák megrajzolásában, Borka Andrásnak fényképábráim magas színvonalú kidolgozásában nyújtott segítségükért.

Végül nagyon köszönöm családomnak, Ildikó lányomnak, Szegletes Zsoltnak és szüleinek, ahogyan türelmükkel és figyelmességükkel igyekeztek átsegíteni a nehézségekben, hogy dolgozatom elkészülhessen.

1. BEVEZETÉS A CHONDROGENEZISRŐL

A porcszövetnek többféle létfontosságú szerepe van a fejlődés folyamán. Embriionális korban a csontszövet előfutára, később a vázrészek és ízületek alkotójaként a test alakjának meghatározásában és a helyváltoztatásban lát el nélkülözhetetlen feladatokat. Kialakulása számos faktor közreműködését igényli a chondrogenesis kezdetétől egészen a porc differenciálódás befejezéséig. A porcszövet változékonysága a sejten kívüli állomány különleges tulajdonságaiból ered, valamint a szabályozó rendszerek sokféleségéből, ami hatást gyakorol a génexpressziós mintázatra. A sejten kívüli állomány fő alkotói a proteoglikánok és az állomány egyharmadát kitevő kollagének, amelyek biztosítják a szövet integritását és funkcióját. A nem-kollagén természetű mátrix fehérjék viszonylag kisebb mennyiségben vannak jelen, de fontos szerepet játszanak a porc-differenciálódás különböző szakaszaiban a sejtközötti állomány szerveződésében, a fő komponensek közötti kapcsolat létrehozásában.

Csoportunk a porcszövet sejtközötti állományát alkotó fehérjék génjeinek szerkezetét és funkcióját tanulmányozza, valamint a működésüket szabályozó molekuláris mechanizmusokat. Kiemelve tanulmányozzuk a szövet- és fejlődési állapot-specifikus fehérje gének expresszióját és regulációját csirke porcszövetben, különös tekintettel a porc mátrix fehérje (CMP) és a kapcsoló fehérje (LP) génekre. Porcfehérje gének kifejeződésének regulációját vizsgálva Dr. Kiss Ibolya vezetésével a csoport munkatársai már korábban feltérképezték két porcspecifikus gén, a CMP [1] és az LP [2, 3, 4] gén szerkezetét és vizsgálták ezek génexpressziós mintázatának változását a porcfejlődés során. Primer sejtenyészetekben bemutatták a porcfejlődésben egymást követő állapotokat mint egy konszekutív folyamatot [5]. A CMP gén számos pozitív és negatív reguláló elemét meghatározták [5, 6, 7, 8]. Jelenleg a kapcsoló fehérje génjének regulációs mechanizmusát tanulmányozzuk.

A chondrogenesis komplex differenciációs kaszkád folyamata a mesenchymális eredetű sejtek kondenzációjával és a porcra jellemző makromolekulákat termelő chondroblastokká alakulásával kezdődik. Ezt követi a chondroblastok érése proliferálódó chondrocytákká (I. stádium). Nagymérvű morfológiai és génexpressziós változások eredményeként a porcszövet sejtközötti állománya összetételében átalakul és feldúsul.

A mátrix állományban kialakul a kollagének (II., IX., XI. típusok) fibrilláris hálózata, megnő az aggrecan-hialuronsav komplex mennyisége, és megjelennek a nem-kollagén típusú mátrix proteinek mint pl. a CMP és az aggrecan-hialuronsav komplexet stabilizáló LP [9, 10]. A chondrogenesis korai szakaszában (Ia fázis) a chondrocyták átmenetileg nagy mennyiségű VI. típusú kollagént is termelnek [11], és a porcspecifikus mRNS-ek szintje viszonylag alacsony. A kései szakaszban a VI. kollagén gén transzkripciója lecseng (Ib fázis), az LP és a CMP gén aktiválódik, és a II. típusú kollagének expressziója válik dominánssá [5, 12]. Az endochondrális csontképződés során a chondrocyták méretükben megnövekednek és metabolikus aktivitásuk is megváltozik (II. stádium). A létrejött hipertróf chondrocytákban ugrásszerűen megnő az alkalikus foszfatáz szintézise, a X. típusú kollagén termelése [13, 14], a p21 fehérje megjelenik és megkezdődik a Ca^{2+} és a hidroxipatit berakódása [12]. A hipertróf chondrocyták egy része osteoblast-szerű fenotípust vesznek fel (III fázis) [12], míg a hipertróf porcsejtek másik része apoptózis során elhal.

A porcképződés során tehát a chondrocyták jól elkülöníthető differenciálódási szakaszokon mennek keresztül, amelyekben a chondrocyták specifikus extracelluláris mátrix molekulákat szintetizálnak [10, 14, 15]. A csirke sternum craniális részét hipertróf chondrocyták építik fel már közvetlenül a megszületés előtt, ellentétben ezzel, a caudális rész végig porcós állomány marad az egyedfejlődés végéig. Ennek oka, hogy a caudális rész sejtszomszédos gátló faktorokat termelnek, ami meggátolja a sejtek hipertróf állapotba való jutását.

A chondrogenesis különböző fázisait olyan primer sejt kultúrákban vizsgáltuk, amelyek jól modellezik az egyedfejlődés során *in vivo* bekövetkező változásokat. Az *in vitro* vizsgálatokhoz általában megfelelő a hagyományos szuszpenziós sejt kultúra, ilyen sejt kultúrákat a porc szövet egyes differenciálódási szakaszaiban levő sejtek tenyésztéséhez korábban kifejlesztettek az egyes munkacsoportok. Laboratóriumunkban a porc differenciálódás különböző szakaszait modellező primer sejt kultúrákat [5, 6, 8] készítettem csirke embrióból: az Ia stádiumot képviselő nagy denzitású mesenchymális sejt kultúrát (HDM), Ib stádiumban levő 14 napos embriók mellporcából chondrocytákat (CEC), a 18 napos embrió mellporcból hipertróf sejteket, (II stádiumú sternum HC), valamint 10 napos embriókból fibroblaszt sejteket (CEF). Ranieri Cancedda laboratóriu-

mában a 22-23. fejlődési stádiumú (Hamilton-Hamburger beosztás) [16] tífiból porcsejteket preparáltunk és 4-6 hét alatt hipertróf chondrocytákká (HC) neveltük [17, 18].

A hagyományos sejt kultúrák azonban nem alkalmasak a különböző szöveti hormonok, növekedési faktorok és morfogének hatásainak vizsgálatára, mivel a tápfolyadékok szérumot tartalmaznak, ami gazdag ezekben a faktorokban. A porcdifferenciálódás vizsgálatára kétféle módon lehetséges szérummentes környezetet biztosítani. Az egyik, hogy a szérum mentes tápfolyadékot a növekedéshez legszükségesebb hormonokkal, növekedési faktorokkal kiegészítjük. Ily módon a porcdifferenciálódást sikeresen megoldotta *in vitro* sejtenyésztésben Ranieri Cancedda munkacsoportja [17, 18]. Azonban Peter Bruckner csoportja Benya és Schaffner [19] egy korábbi kísérletét módosítva agarózos kultúrában tartotta a porc sejteket, szérum és hormonok adagolása nélkül. Ezek a sejtek nem csak túlélnek ebben a közegben, de differenciálódásra is képesek [20-23]. Ez a sejt kultúra igen alkalmas arra, hogy az egyes növekedési faktorok hatását külön-külön vizsgáljuk. Az egyedfejlődés során növekedési faktorok, morfogének, hormonok szabályozzák a végtagok kifejlődését, majd differenciálódását [24-34]. A végtagfejlődés korai szakaszában a fibroblaszt növekedési faktorok a végtag kinövését, és annak proximális-disztális aszimmetriáját határozza meg, míg az anterior-posterior mintázatért a *Sonic-hedgehog* (shg) gének felelősek [35]. A növekedési faktorok közül az inzulint és az inzulin-szerű növekedési hormont a mesenchymalis szövetek termelik, ami a fejlődés korai szakaszában a végtagok kinövekedését, azok porcos csontkezdeményeinek hosszanti megnyúlását segíti elő.

A kapcsoló fehérje irodalma:

A kapcsoló fehérje élettani szerepe a porcszövetben az, hogy elősegíti az aggrecan és hyaluronsav makromolekuláris aggregátumainak létrejöttét és nem-kovalens kölcsönhatások révén stabilizálja azokat [9, 15, 36]. A mechanikailag erős II. típusú kollagén rostok hálózatába ágyazódott aggrecan-LP-hyaluronsav aggregátumok nagy vízmegkötő képességük révén nagyfokú rugalmasságot és összenyomással szembeni ellenállást kölcsönöznek a porcszövetnek. A kapcsoló fehérje azonban előfordul más szövettípusban is, ahol az adott szövetre jellemző nagy aggregálódó proteoglikán (pl.

versican, neurocan) és hyaluronsav láncokat kapcsolja össze. Az LP aminosav sorrendjét legelőször patkány chondrosarcoma izolátumból közölték [37], majd a cDNS klónok szekvencia analízise alapján meghatározták csirkében [4], patkányban [37] és human szövetből is [38]. Csirkében az LP gén egyszeres kopiaszámban található, intronjaival együtt nagyobb mint 100 kb, öt exont és négy intront tartalmaz. Első exonja kizárólag nem transzlálódó szekvenciákat kódol, hossza mintegy 500 bp. Ilyen méretű 5' végi nem transzlálódó RNS szakasz olyan géneknél fordul elő, ahol e régiónak poszttranszkripció, transzlációs szabályozó szerepe van. Ezekre erősen konzervált másodlagos szerkezet is jellemző, ezt a szerkezetet fehérjefaktorok ismerik fel, sokszor nem szekvencia specifikusan [39-44]. A csirke embriókból izolálható kapcsoló fehérje messenger RNS populáció nagyfokú heterogenitást is mutat, ami a többszörös iniciációs pontról történő transzkripció és differenciális mRNS érés következménye [4].

A hosszú első exont követő négy exon a szignál peptidet és az érett fehérjét kódolja. Az érett fehérje NH₂-terminális doménje az aggrecan hasonló doménjével lép kölcsönhatásba, míg az ismétlődő C-terminális domén hyaluronsavat köt [16, 18]. Más nem-kollagén természetű porcállomány alkotókhoz hasonlóan a gén kifejeződése transzkripció és post-transzkripció szabályozás alatt áll, kifejeződése a porcszövet differenciálódása során időben is meghatározott [5]. A csirke embrionális fejlődés harmadik napján megjelenik a gerinchúrból és az összelvényekben, négy és fél nap után a szárny kezdeményekben, ami a 22-es és 25-ös Hamilton-Hamburger szerinti fejlődési állapotnak felel meg. Tehát követi a II. típusú kollagén aktiválódását (23. stádium), de megelőzi a porc-specifikus CMP expresszállódását (26. stádium). Érdekes, hogy az LP transzkriptum megjelenik a mesonephrosban is a 25. fejlődési stádiumban, ugyanakkor vele egyidőben aggrecán, II. típusú kollagén és CMP mRNS itt nem mutatható ki. Funkciója itt még nem ismert.

Csoportunk korábbi vizsgálatainak során a cDNS és genomi klónok nukleotid sorrendjének meghatározása révén ismertté vált a gén 5' végének és határoló régiójának szekvenciája. Kiderült továbbá, hogy a gén a TATA motívumtól 33-78 bázispár távolságban térképezett többszörös transzkripció starthelyekről íródik át, valamint az 500 bp nem-transzlálódó régió un. alternatív splice helyeket tartalmaz. Ezért az LP

mRNS 5' végére a nagymérvű heterogenitás jellemző csirkében [4]. Az LP gén előtti régió nukleotid sorrendje más fajokban is hasonlít a csirkéhez.

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatómunkám két fő feladat köré csoportosult:

Egyfelől a **porcállományt alkotó fehérje gének** expressziós mintázatát követtem nyomon differenciálódó chondrocytákban, valamint ezen gének **transzkripció szabályozását** tanulmányoztam hormonok és szöveti faktorok hatására. Céлом volt, hogy további betekintést nyerjek a porcdifferenciálódás és porcspecifikus génműködés alapját képező molekuláris mechanizmusokra.

Másfelől a porc-specifikus gének transzkripció szabályozásában kívántam belátást nyerni, ezek közül a még fel nem térképezett **kapcsoló fehérje gén promoterének működését** vizsgálni. Ennek érdekében a csirke LP gén 5' végi reguláló régiójának működésére kívántam fényt deríteni tranziens expressziós kísérletekben a chondrogenesis különböző fázisait modellező chondrocyta primer sejt kultúrákban.

3. KÍSÉRLETI RENDSZER ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.a) Sejt kultúrák:

Laboratóriumunkban alkalmaztuk a porc differenciálódás különböző szakaszait modellező primer sejt kultúrákat [5, 6, 7]. A sejteket "Rhode Island White" homozigóta csirke embriókból preparáltuk különböző időpontokban. A 4,5 napos embriók végtagkezdeményeiből nagy denzitású mesenchymális sejt kultúrát (HDM) készítettünk, ami nagy sűrűséggel kilemezelve *in vitro* chondrogenezisen megy át. Preparálunk 14 napos embriók mellporcából chondrocytákat (CEC), valamint 10 napos embriókból fibroblaszt sejteket (CEF). Ranieri Cancedda laboratóriumában a 22-23. fejlődési stádiumú (Hamilton-Hamburger beosztás) [16] tífiból porcsejteket preparáltunk és 4-6 hét alatt hipertróf chondrocytákká (HC) differenciálódó kultúrát készítettünk [12, 18]. A HC sejteket F12 tápfolyadékban 10% borjuszavó kiegészítéssel, a CEC, CEF és HDM sejteket

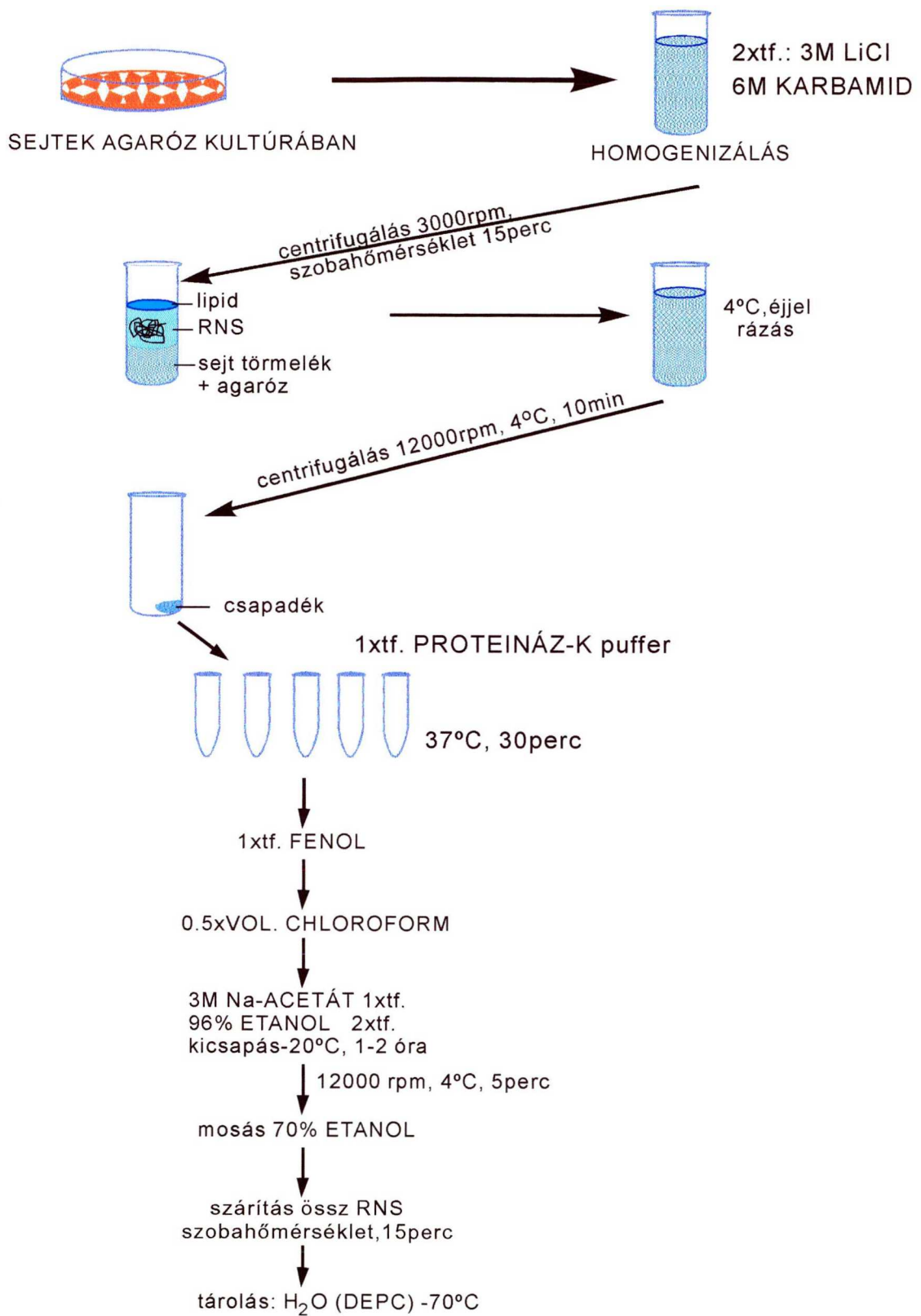
Dulbecco által módosított Eagle médiumban (DMEM) az előzőhöz hasonlóan 10 % borjúsavó kiegészítéssel tenyésztettünk.

Agarózos tenyészethez 17 napos csirke embrió mellcsont craniál és caudál részéből a sejteket elkülönítve preparáltunk, majd 1 %-os alacsony forráspontú agarózban felfuszpendáltuk [20]. A chondrocyták kezdeti sűrűsége $2,0-2,5 \times 10^6$ sejt/ml volt, amelyeket szérum nélkül DMEM tápfolyadékban, 10 cm átmérőjű petri csészéken tenyésztettünk. A párhuzamos kultúr tenyészeteket kiegészítettük 100 ng/ml inzulinnal, vagy 10 ng/ml inzulin, 10 ng/ml FGF-2 és 10 ng/ml TGF- β 2 együttes hozzáadásával. A sejteket 5 % CO₂ -ban és 37°C-on tartottuk.

3.b) *Módszer fejlesztés össz RNS preparáláshoz, Northern analízis és foszfor-image értékelés:*

Peter Bruckner munkacsoportjával együttműködve kifejlesztettünk egy hatékony módszert az össz RNS kinyeréséhez agaróz gélből. LiCl és karbamid tartalmú oldatban elválasztottuk a sejteket az agaróztól, majd proteináz K jelenlétében lizáltuk a sejteket. Centrifugálási és tisztítási lépések után, Na-acetát és etanolos kicsapással visszanyertük az RNS-t. Ennek vázlatos leírását az 1. ábrán mutatom be, a módszert a most készülő cikkünkben fogjuk részletes közölni.

Az izolált RNS mintákból azonos mennyiségeket vittünk fel 1% agaróz gélre és 6.7% formaldehid jelenlétében gélelektroforézist végeztünk, majd az RNS-t átvittük Hybond-N membránra és UV fénnel hozzákötöttük. A különböző mRNS-ek jelenlétét egymást követő hibridizálásokkal mutattuk ki, ehhez ³²P-ral jelöltük a következő cDNS próbákat: α 1 (II), α 1, α 2 és α 3 (VI) és α 1 (X) típusú kollagén [13], a kapcsoló fehérje (LP) [3], porc mátrix fehérje (CMP) [1] és a csirke rRNS. Ehhez a kollagén (VI) α 2 lánc cDNS hibridizációs próbát B. Truebtől [45], az α 1 és α 3 lánc cDNS hibridizációs próbákat A. Colombattitól [46] kaptuk ajándékba, a többiek a laboratóriumunkban Deák Ferenc készítette [1, 3]. Az egyes hibridizálások között a próbát mosással távolítottuk el a filterekről. Az autoradiogramok elkészítéséhez a röntgen filmet raktunk a hibridizált filterekre screen jelenlétében és 48 órán át -80°C-on tartottuk. A kvantitatív értékelést foszfor-image analízissel végeztük (Molecular Dynamics PhosphorImager 445 SI).



1. ábra: **Össz RNS** preparálási módszer
agarózban tenyésztett chondrocytákból

Minden kinetikai vizsgálatunk 3 független sejtenyészetből preparált RNS Northern analízissel nyert kísérleti eredményen alapul.

Az alkalikus foszfatáz aktivitását Bessey és munkatársai szerint mértük [47].

3.c) *Rekombináns plazmidok felépítése, tranziens expresszió, CAT assay:*

A pozitív reguláló hatást kifejtő *cisz*-elemek feltérképezéséhez a csirke LP gén 5' végi szabályozó régiójában elhelyezkedő különböző hosszúságú promoter szakaszokat pEMBLCAT(-) vektorba a kloramfenikol-acetil-transzferáz (CAT) riporter gén elé építettünk. A kísérletben használt konstrukciókat Bachrati Csanád készítette el. Az egyes promoter szakaszok aktivitását tranziens expressziós kísérletekben mértük, a porcfejlődés különböző stádiumában lévő fent leírt primer sejt kultúrákban [5, 6, 7].

A rekombináns plazmid DNS-eket és a kontrollként használt pTKCAT DNS-t a Ca-foszfát precipitációs módszerrel juttattuk a sejtekbe [48], majd a letapadt sejteket 16 órán át inkubáltuk a precipitátummal [6]. Ezután a sejt kultúrát friss médiumban további 30 órán át inkubáltuk, a sejteket összegyűjtöttük és CAT feltáró pufferben lizáltuk.

A sejt lizátumból meghatároztuk a CAT enzim aktivitását [49]. Az enzim reakció termékeként keletkezett radioaktív acetilált kloramfenikol mennyiségéből számoltuk a plazmidba beépített promoter szakasz relatív CAT aktivitását.

Minden tranziens expressziós mérést 5-20 független kísérletben végeztünk párhuzamos mintákkal, kivéve a HC kultúrákban mért aktivitást, ami 3 mérési sorozat mérési eredményét összegezte. A relatív CAT aktivitás értékeket a pTKCAT %-ban adjuk meg és statisztikai módszerekkel, student-t teszttel értékeltük.

Az ábrákon a beépített LP gén promoter szakaszok pozíciójának elnevezésében a +1 a leghosszabb RNS lánc kezdő pontjának bázisát jelöli.

4. EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS MEGVITATÁSA

I. *EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX FEHÉRJE GÉNEK EXPRESSZIÓS MINTÁZATA SZÉRUMMENTES PORCDIFFERENCIÁLÓDÁSI RENDSZERBEN - HORMONOK ÉS NÖVEKEDÉSI FAKTOROK HATÁSA A PORCSPECIFIKUS FEHÉRJE GÉNEK EXPRESSZÁLÓDÁSÁRA*

Az előzőekben már említettem, hogy az agarózban szérum mentes körülmények között nevelt chondrocyták proliferációra képesek [20, 21, 22], továbbá spontán terminális differenciálódásra képesek a craniális chondrocyták és termelik a porcdifferenciálódás késői szakaszának marker fehérjéjét, a X. kollagént, és megnő az alkalikus foszfatáz aktivitásuk, ami a hipertrof chondrocytákra jellemzője [20, 21, 22, 23]. A késői differenciálódást elősegítette az inzulin és inzulin-szerű növekedési faktor jelenléte (IGF-1), míg gátló hatást váltott ki a TGF- β 2 és bFGF együttes jelenléte a tápfolyadékban, ekkor a sejtek nem hipertrofizálódtak [22, 23]. Mindezeket a változásokat Bruckner és munkatársai korábban fehérjék mérésével mutatták ki. Az agarózos sejtkultúra alkalmasnak ígérkezett a porcfehérje gének transzkripciók aktivitásának nyomonkövetésére. Ezért Peter Bruckner munkatársaival együttműködve kinetikai vizsgálatot végeztem, melynek során különböző porc matrix fehérjéket kódoló mRNS-ek steady-state szintjét Northern analízissel határoztam meg.

Kísérleteinkhez 17 napos chondrocytákat preparáltunk csirke embrió sternumból, majd a craniális és caudális rész sejtjeit a fent leírt körülmények között agaróz gélben tenyésztettük. Három független sejtenyészetből, az ábrákon feltüntetett időpontokban az egyes mintákból össz RNS-t preparáltunk.

I.a) *Extracelluláris mátrix fehérje gének expressziós mintázata craniális és caudális chondrocytákban:*

Szérum mentes kultúrában a craniális chondrocyták proliferációja lassú, mégis a sejtek egy része hipertroffá vált a 3 hetes tenyésztési idő végére. A porcfehérje gének relatív steady-state mRNS szintje kezdetben alacsony volt, jelentős növekedést csak a második héttől kezdődően mérhettünk, a II. típusú kollagén, és kisebb mértékben a

kapcsolófehérje és a CMP mRNS esetében (2. A, B ábra). A harmadik hét végére a X. kollagén mRNS-e is jól láthatóan detektálható, és a sejtek egy csoportja hipertóffá vált, amit bizonyít, hogy a sejtek által termelt alkalikus foszfatáz aktivitás értéke jól mérhető volt (3. ábra).

Az inzulin jelenléte a tápfolyadékban gyors osztódásra készítette a sejteket már egy hét után, és meggyorsította a terminális differenciációt, amit jelzett a nagyméretű hipertróf porcsejtek megjelenése az első hét után és túlsúlyba jutása a tenyésztési idő végére. A porcspecifikus gének transzkripciós aktivitása sokkal nagyobb volt a szérumentes kontroll sejtekhez képest, amit különösen a II. kollagén magas steady-state mRNS szint mutatott, és az LP és a CMP mRNS szintjében is jelentős emelkedés volt megfigyelhető a második héttől kezdve (3., 4. ábra). A X. kollagén génje is már a hetedik napon aktiválódott és magas mRNS szintet ért el a 3. hét végére, ami a szérumentes kultúrában elért mennyiségnek 9,8-szorosa. Ezzel összhangban az alkalikus foszfatáz aktivitás értéke is megnövekedett a nagyszámú hipertróf sejtek miatt (3. ábra).

A TGF- β 2, FGF-2 és inzulin együttes jelenlétében a sejtek proliferációja folyamatos volt, ugyanakkor alakjuk erőteljesen megváltozott és nem hipertrofizálódtak. Ezek a sejtek nagy mennyiségben termelték a II. kollagén mRNS-t, ellenben az LP mRNS szintézise folyamatos volt, de nagyon alacsony szintű (4. ábra). A X. kollagén transzkripcióját nem tudtuk kimutatni, ami a sejtek morfológiai képével összhangban jelzi, hogy a differenciálódás gátlódott, a sejtek nem léptek be a porcdifferenciálódás II stádiumába. Sőt a porc mátrix fehérje transzkriptuma is teljes mértékben hiányzott. Ugyanakkor a VI. típusú kollagén α 1 és α 3 láncának mRNS-e nagy mennyiségben termelődött a második héttől kezdve és különösen az α 3 lánc mRNS magas szintet ér el. Mindez azt jelzi, hogy ezek a sejtek megrekedtek a chondrogenézis korai proliferatív (Ia) stádiumában.

Ezek az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a TGF- β 2 és az FGF-2 szinergikusan működnek, a chondrocyta sejtek differenciálódását blokkolják inzulin jelenlétében, és meggátolják, hogy a sejtek az Ia stádiumból az Ib-be kerüljenek.

Génexpressziós vizsgálataink tehát bizonyították korábbi HDM és CEC szuszpenziós kultúrában végzett megfigyeléseinken alapuló következtetéseinket [Selen], de azon túlmenően egy olyan modell rendszert eredményeztek, mely a korábbiaknál

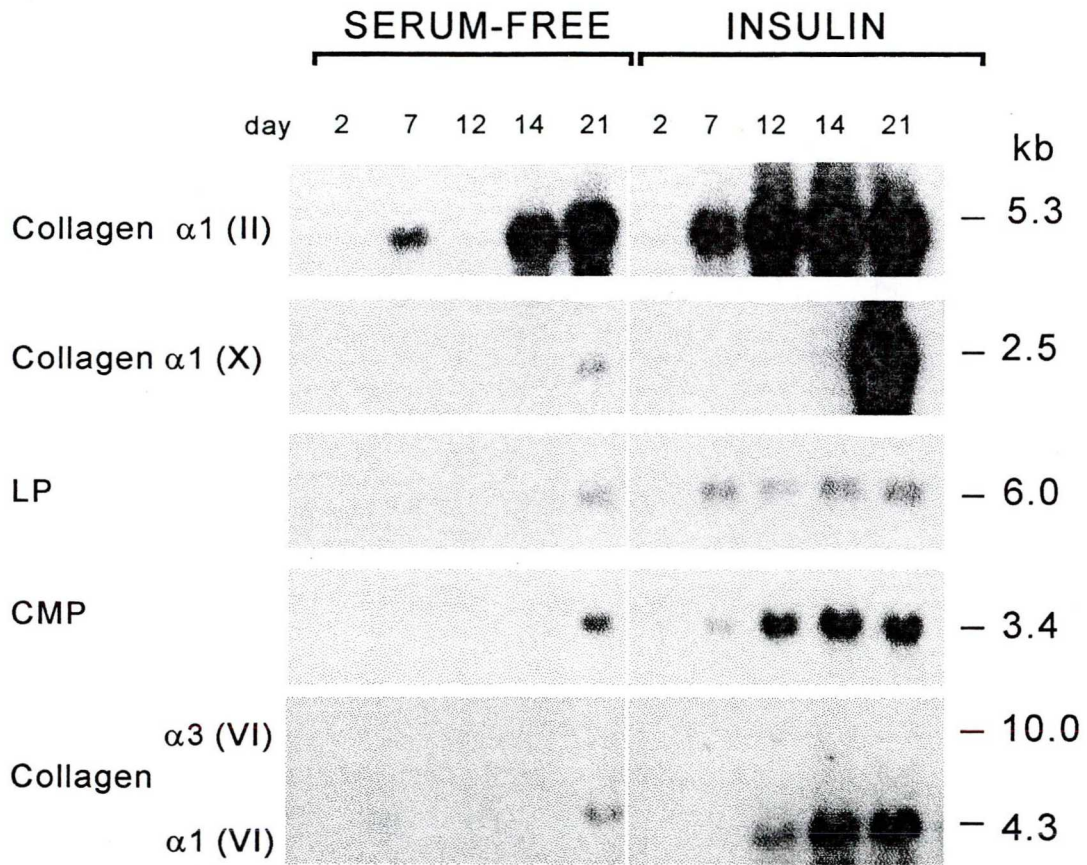
2. ábra: **Porc fehérje gének expressziója differenciálódó craniális chondrocyta sejtekben agaróz sejt kultúrában eltérő kondíciók között.**

A chondrocytákat szérumban vagy inzulin jelenlétében neveltük. Northern analízishez össz RNS-t preparáltunk a jelzett időpontokban, és minden mintából 8 µg aliquotot felvittünk 1%-os agaróz gélre, majd megfuttattuk 6,7 % formaldehid jelenlétében. A mintákat a gélről Hybond-N membránra vittük fel, és ³²P-vel jelölt cDNA próbákkal hibridizáltuk.

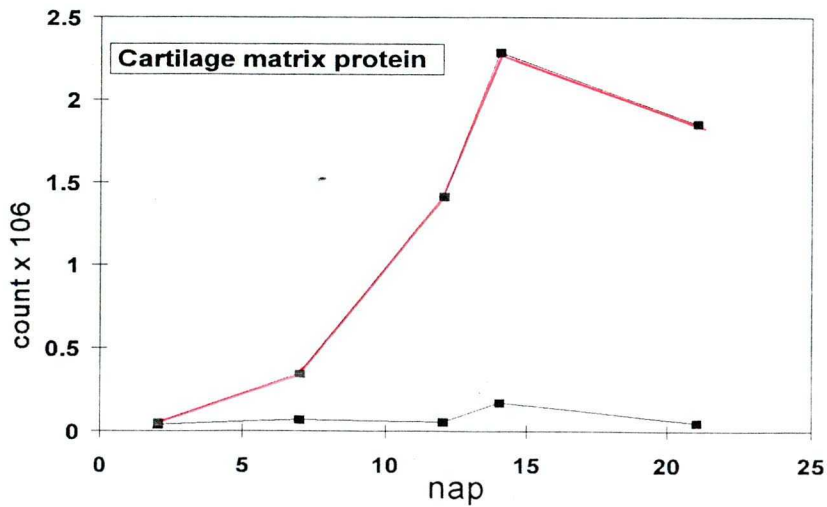
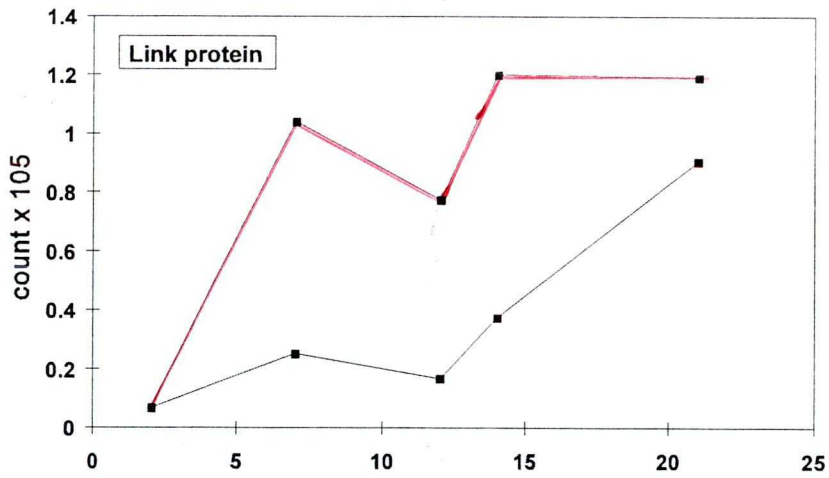
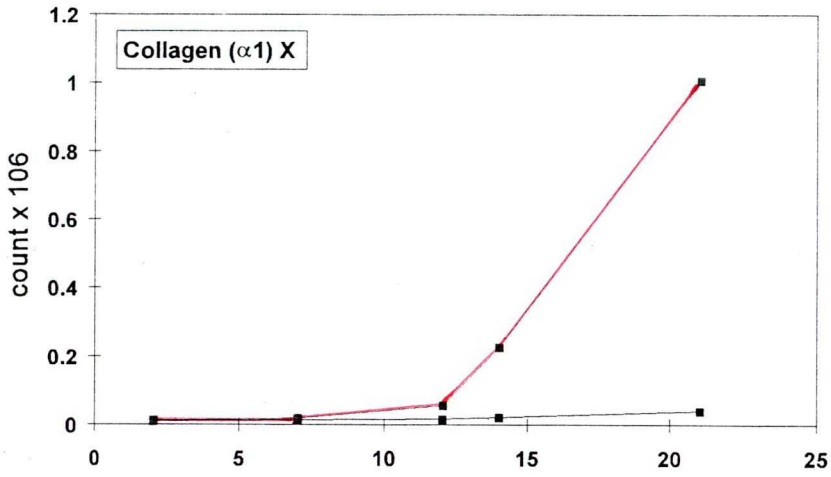
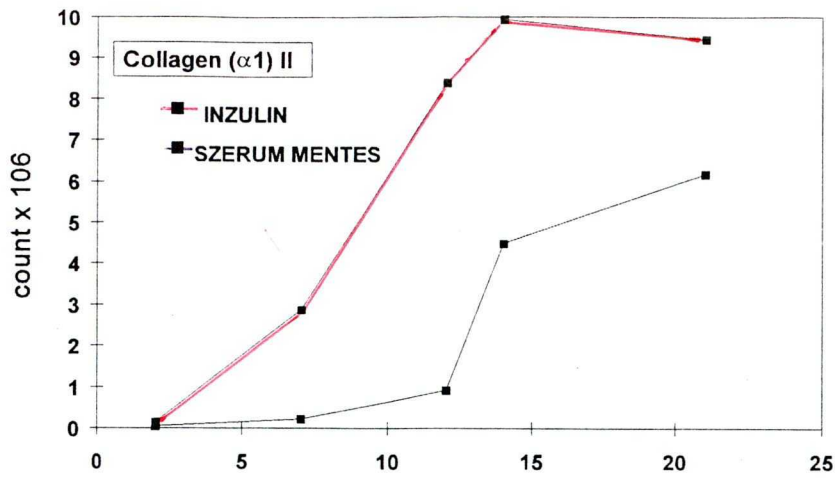
A: Az autoradiogramok mutatják a II., VI. és X. típusú kollagén, a kapcsoló fehérje (LP), a porc mátrix fehérje (CMP) mRNS szintek kinetikai változásait. Az egyes mRNS-ek méretét az ábrán feltüntettük.

B: Az eredmények értékelését foszfor-image analízissel is elvégeztük.

A

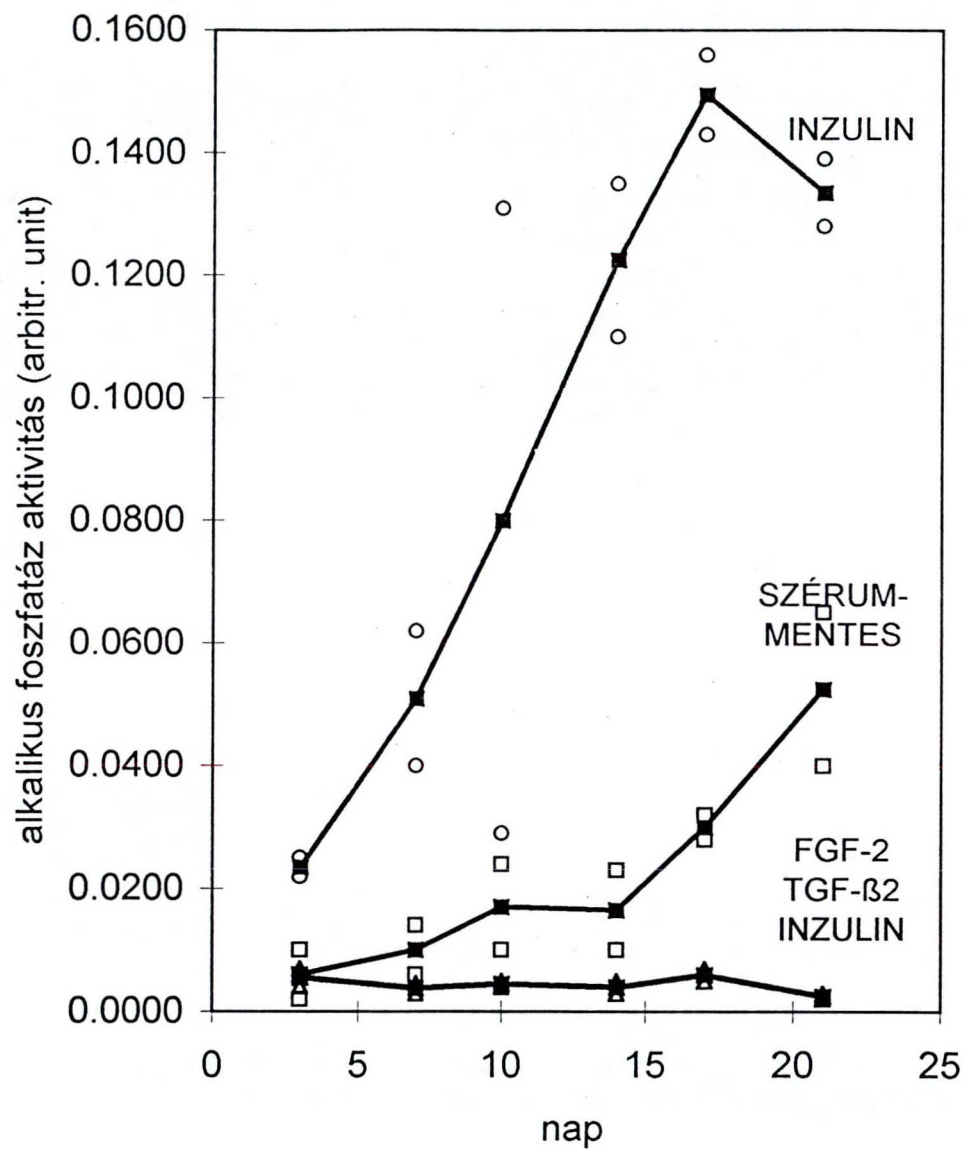


B



3. ábra: **Alkalikus foszfatáz aktivitás változása craniális chondrocyták differenciálódásakor agarózos sejt kultúrában.**

A chondrocyták kezdeti sűrűsége $2,0-2,5 \times 10^6$ sejt/ml volt.



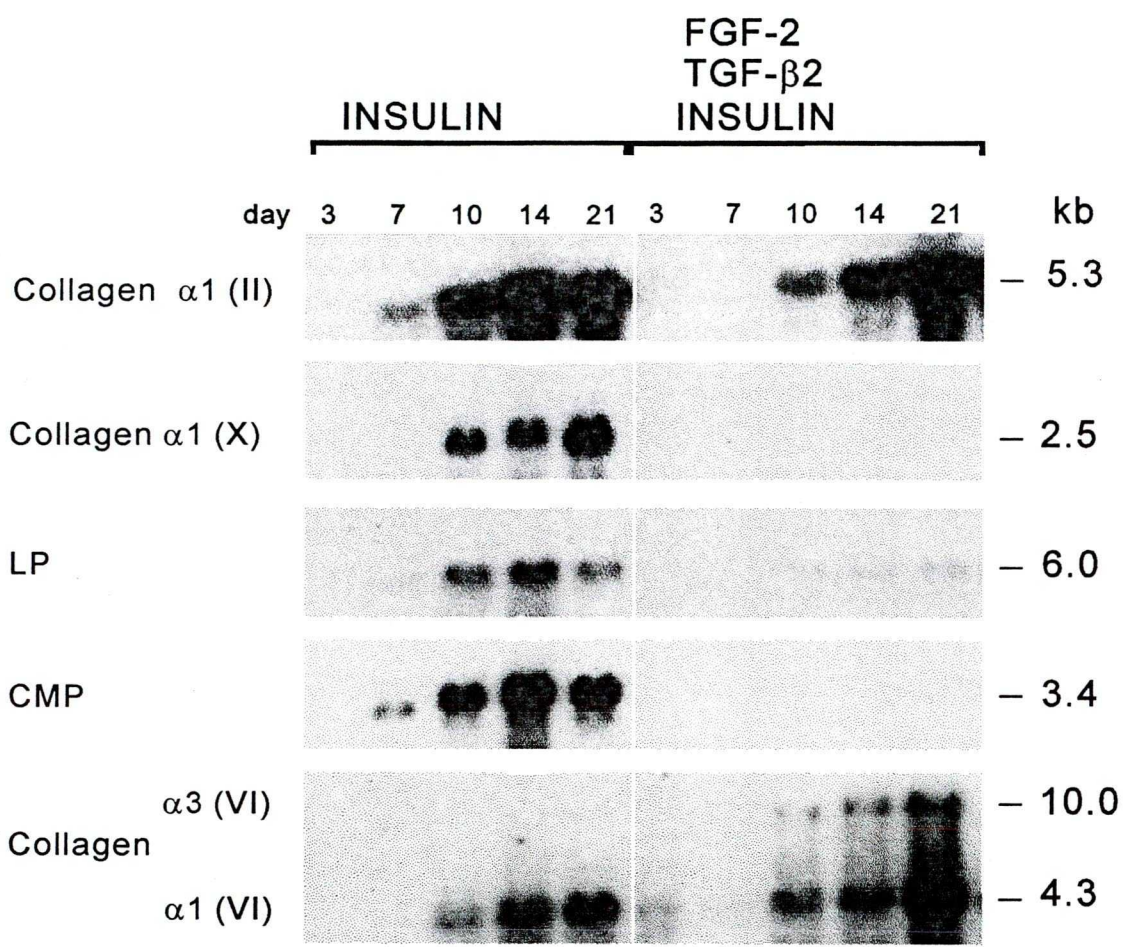
4. ábra: **Porc fehérje gének expressziója differenciálódó craniális chondrocyta sejtekben agaróz sejt kultúrában eltérő kondíciók között.**

A chondrocytákat inzulin, vagy inzulin, FGF-2 és TGF- β 2 jelenlétében neveltük. Northern analízishez össz RNS-t preparáltunk a jelzett időpontokban, és minden mintából 8 μ g aliquotot felvittünk 1%-os agaróz gélre, majd megfuttattuk 6,7 % formaldehid jelenlétében. A mintákat a gélről Hybond-N membránra vittük fel, és 32 P-vel jelölt cDNS próbákkal hibridizáltuk.

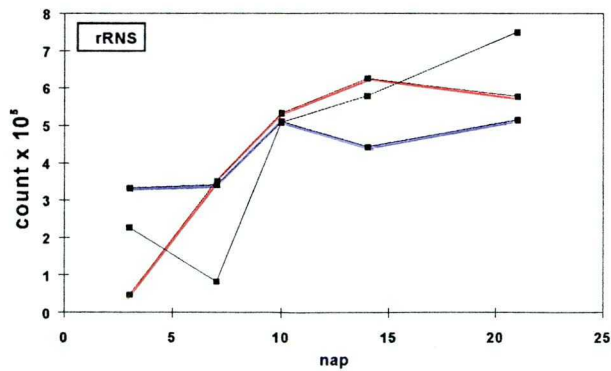
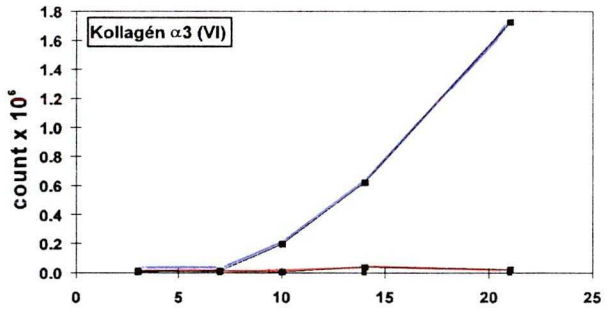
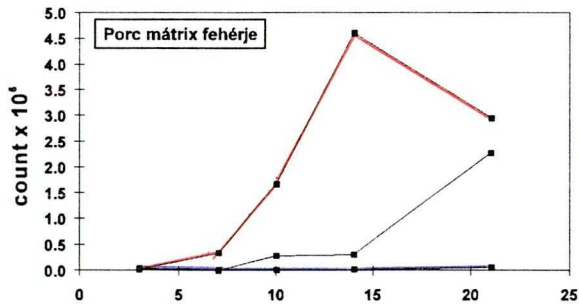
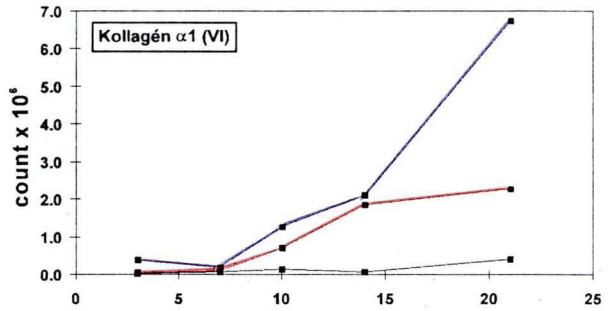
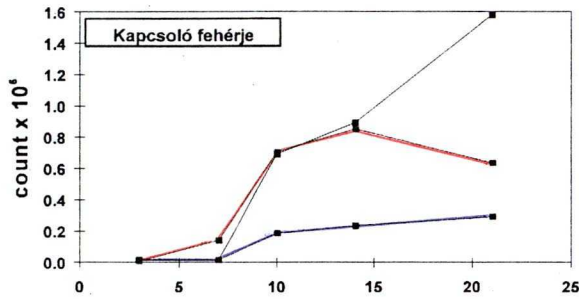
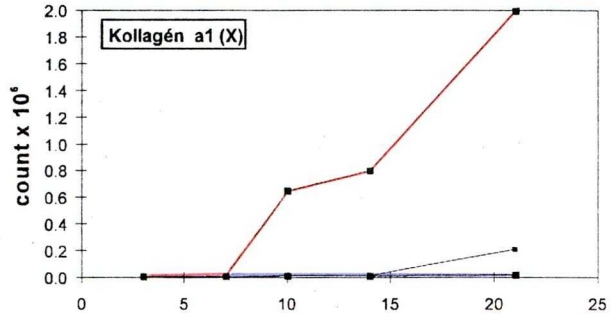
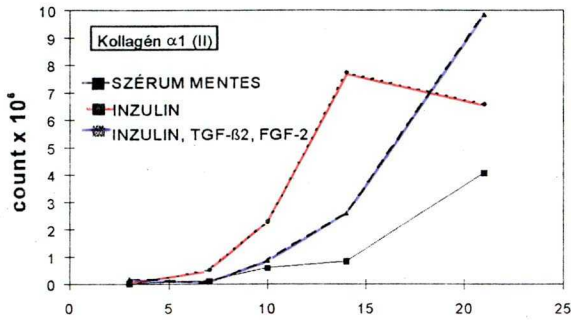
A: Az autoradiogramok mutatják a II., VI. és X. típusú kollagén, a kapcsoló fehérje (LP), a porc mátrix fehérje (CMP), a rRNS mRNS szintek kinetikai változásait. Az egyes mRNS-ek méretét az ábrán feltüntettük.

B: Az eredmények értékelését foszfor-image analízissel is elvégeztük.

A



B



jobban és tisztábban tette lehetővé a differenciálódási stádiumok elkülönítését. A chondrogenézis Ia stádiumára tehát a VI. kollagén gén átmeneti aktiválódása és a CMP gén inaktív állapota jellemző, míg az Ib stádiumot a II. kollagén mRNS magas szintje és CMP gén aktiválódása jellemzi. A korábbi kísérleteinkben alkalmazott HDM kultúra főként proliferatív Ia, míg a CEC kultúra proliferatív Ib stádiumú sejtekből áll, de bennük Ib illetve Ia stádiumú sejtek is előfordulnak. Ezzel szemben az TGF- β 2, FGF-2 és inzulin kezelt agrózos kultúra vizsgálataink szerint sokkal tisztább rendszer, mely kizárólag a proliferatív Ia stádiumú sejtekből áll, ezért sokkal alkalmasabb a génreguláció és a differenciálódás molekuláris alapjainak vizsgálatára. Ezért kísérleteink további folytatását tervezzük, hogy milyen hormonok és növekedési faktorok hatására differenciálódnak tovább a TGF- β 2, FGF-2 és inzulin jelenlétében növesztett sejtek.

I.b) Porcfehérje gének kinetikai analízise caudális chondrocytáiban:

A caudális sejtek nyugalomban levő chondrocyták, amelyek felnőtt korban is porcos szöveti állapotban maradnak. Szérum mentes táptalajban a második héttől gyengén expresszálódnak az extracellularis mátrix fehérjéket kódoló mRNS-ek (5. A, B ábra), de még a 3. hét végén is igen alacsony szinten maradt a II. és VI. kollagén, az LP és a CMP mRNS-e. Ezeknek a fehérjéknek a transzkripció aktivitása többszörösére emelkedik inzulin jelenlétében, már a 10. napon viszonylag hatékonyan expresszálódnak, ami időben egybe esik a caudális sejtek proliferálódásával agaróz kultúrában. A craniális sejtektől eltérően azonban itt a X. kollagén egyáltalán nem detektálható a 3. hét után sem, jelezve, hogy a nyugvó állapotú porcsejtek nem érnek hipertróf chondrocytákká még akkor sem, ha inzulinnal egészítjük ki a tápközeget. Tehát további faktor(ok) jelenléte szükséges ennek kiváltásához, illetve a sejtek által termelt szolubilis gátló faktorok hatástalanításához. Ezek a sejtek is termelik a CMP mRNS-t, tehát képesek a porcdifferenciálódás Ib stádiumába lépni. Hasonlóan a craniális sejtekhez, a CMP mRNS szintje nagyobb mint az LP mRNS-é, és folyamatosan emelkedik a 3 hét alatt inzulin hatására, ellenben érdekes módon a CMP gén aktivitása nagyobb, mint az LP géné, ez utóbbi mRNS mennyisége a második héttől kezdve kb. felére csökken. Ezt a visszaesést magyarázhatja az LP promotor aktivitásának változása különböző differenciálódási stádiumban (lásd később).

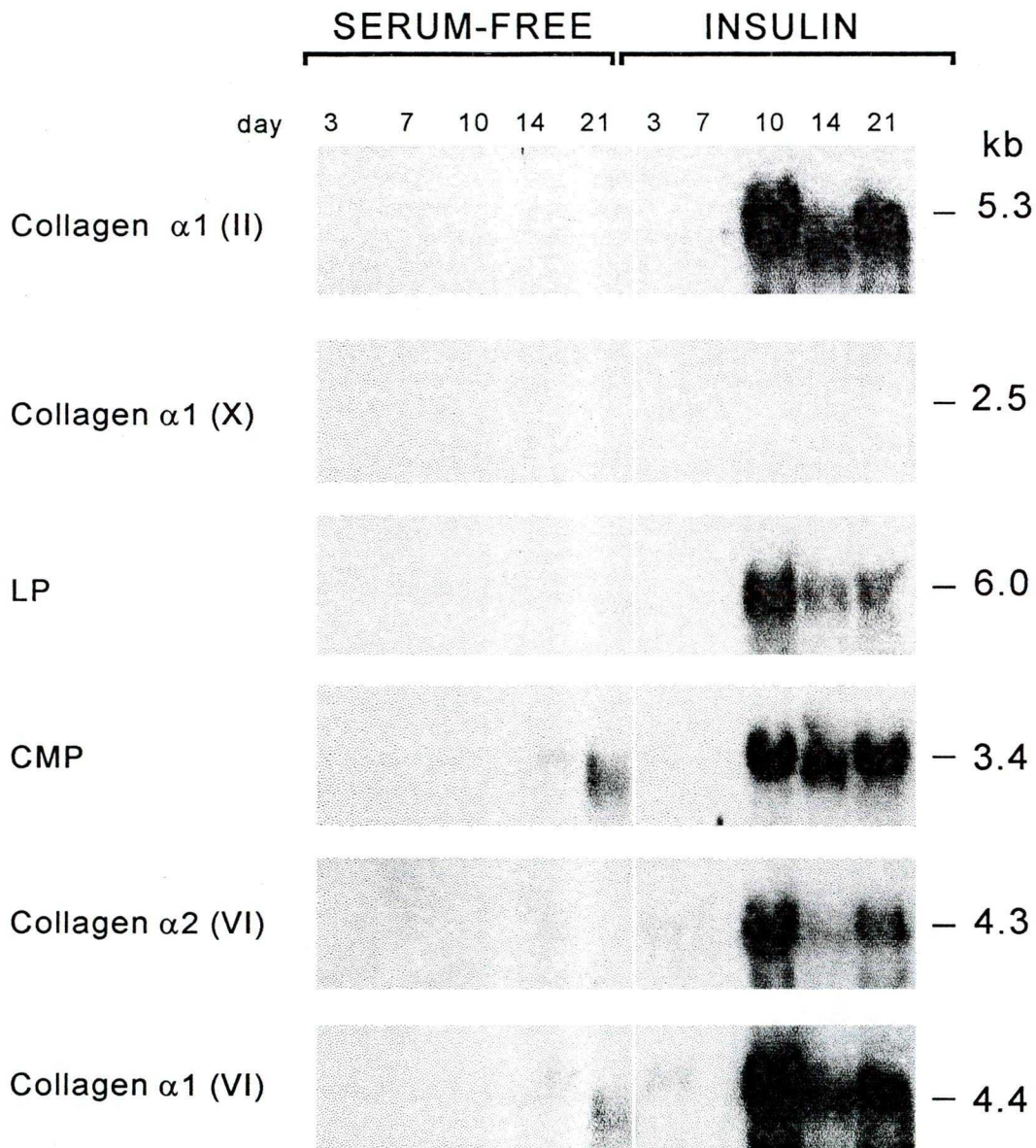
5. ábra: **Extracelluláris mátrix fehérje gének időbeli expressziója differenciálódó caudális chondrocytákban.**

A total RNS preparálás, Northern blottolás és a hibridizálás megegyezik az 2. ábrán feltüntetettel.

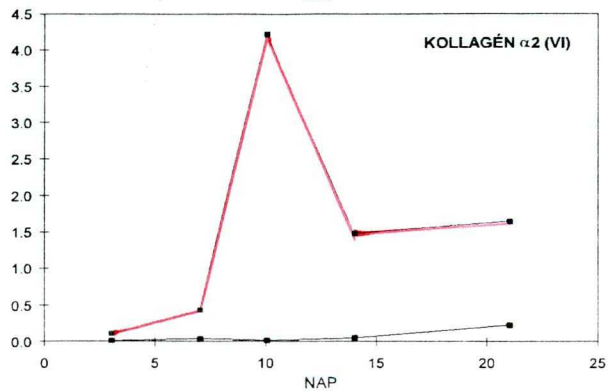
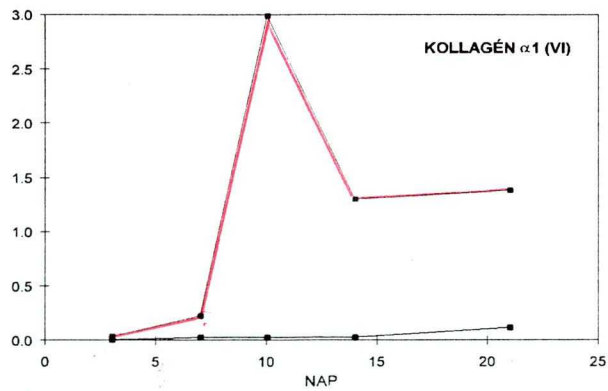
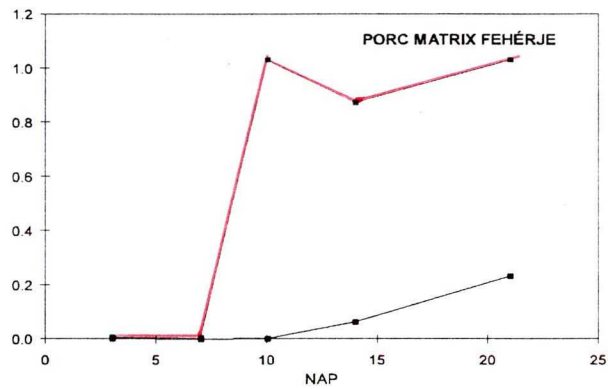
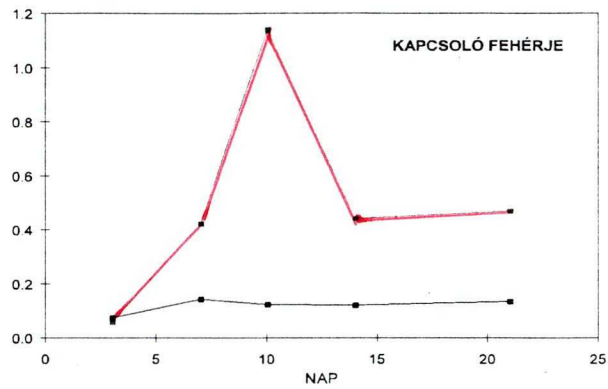
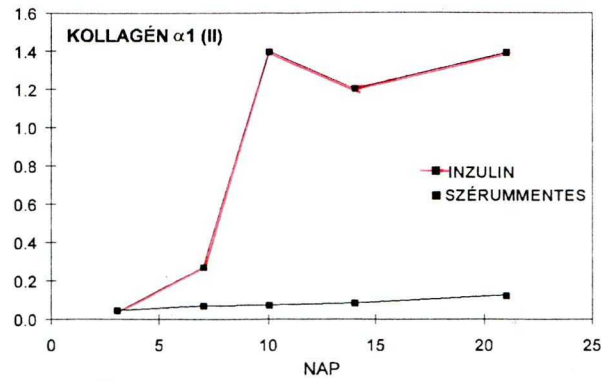
A: Northern blott analízis

B: A steady-state mRNS szintek összehasonlító kinetikai vizsgálata foszfor-image analízise.

A



B



A mellcsont craniális sejtjei inzulin hatására a differenciálódás II stádiumába lépnek, ugyanakkor azonos körülmények között, azonos hormon nem képes hipertróf állapotba juttatni a caudális sejteket. Mindez utal arra, hogy a 17 napos mellporcban a chondrocyták már véglegesen elkötelezettek a differenciálódás valamely irányába. Elképzelhető azonban, hogy a porcdifferenciálódás a mellporcban is olyan több lépcsős szabályozás alatt áll, mint ezt a növekedési korongban nemrég leírták. További kísérleteinkben tervezzük ennek a hipotézisnek a bizonyítását.

Kísérleteink azt is bizonyítják, hogy agaróz kultúrában nevelt chondrocyták extracelluláris mátrix szintézise és a porcdifferenciálódás marker génjeinek expressziója transzkripció kontroll alatt áll, és a növekedési faktorok hatása ezen kontroll szerint érvényesült.

A porcfehérje gének további molekuláris szabályzó mechanizmusainak felderítésére jó lehetőséget biztosít az agarózos sejt kultúra. Ismert, hogy Rhodes és Yamada a patkány LP gén promoterében egy "glucocorticoid responsive" elemet talált [50]; a CMP gén hordoz egy "dexametason responsive" elemet, ami részt vesz a transzkripció szabályozásban. Ezért tervezzük a dexametazon, a citokinek és egyes hormonok hatásainak vizsgálatát a porcfehérje gének aktivitására. Mindezek további ismeretének bővítése hozzájárulhat a chondrogenézis transzkripció szabályozásának teljesebb megismeréséhez, továbbá gyógykezelésben történő felhasználásához.

Kutatásaim eredményeiről egy előadást tartottam egy Jénai konferencián, aminek szövegét és ábráit a dolgozathoz csatoltam, közleményünket jelenleg írjuk belőle.

II. PORCFEHÉRJE GÉNEK TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSA: A CSIRKE KAPCSOLÓ FEHÉRJE GÉN 5' SZABÁLYOZÓ RÉGIÓJÁNAK MŰKÖDÉSE ÉS A GÉN ÁTÍRÓDÁSA KÉT FÜGGETLEN PROMOTERRŐL

II. a) A csirke kapcsoló fehérje gén közeli promoterének térképezése tranziens expressziós kísérletekben:

A plazmidok elkészítésének lépéseit a "Kísérleti rendszer és módszerek" c. fejezetben ismertettem. Az LP gén 5' végi szabályozó szakasz és az 1. exon darabjait építettük be a pEMBL.CAT(-) vektor génbe (a bakteriális kloramfenikol-acetiltranszferáz

riporter gén elé). A kísérleteinkhez felhasznált plazmidok szerkezetét a 6., 7. és 8. ábrán bemutatjuk. A plazmidok egy része a korábban azonosított legtávolabbi starthelytől -855 és ± 155 pozíciók között elhelyezkedő promoter fragment 5' végi rövidítésével és a CAT gén elé építésével készült. A klónok másik része az első exon hosszabb-rövidebb szakaszát tartalmazta ugyanabba a riporter génbe építve.

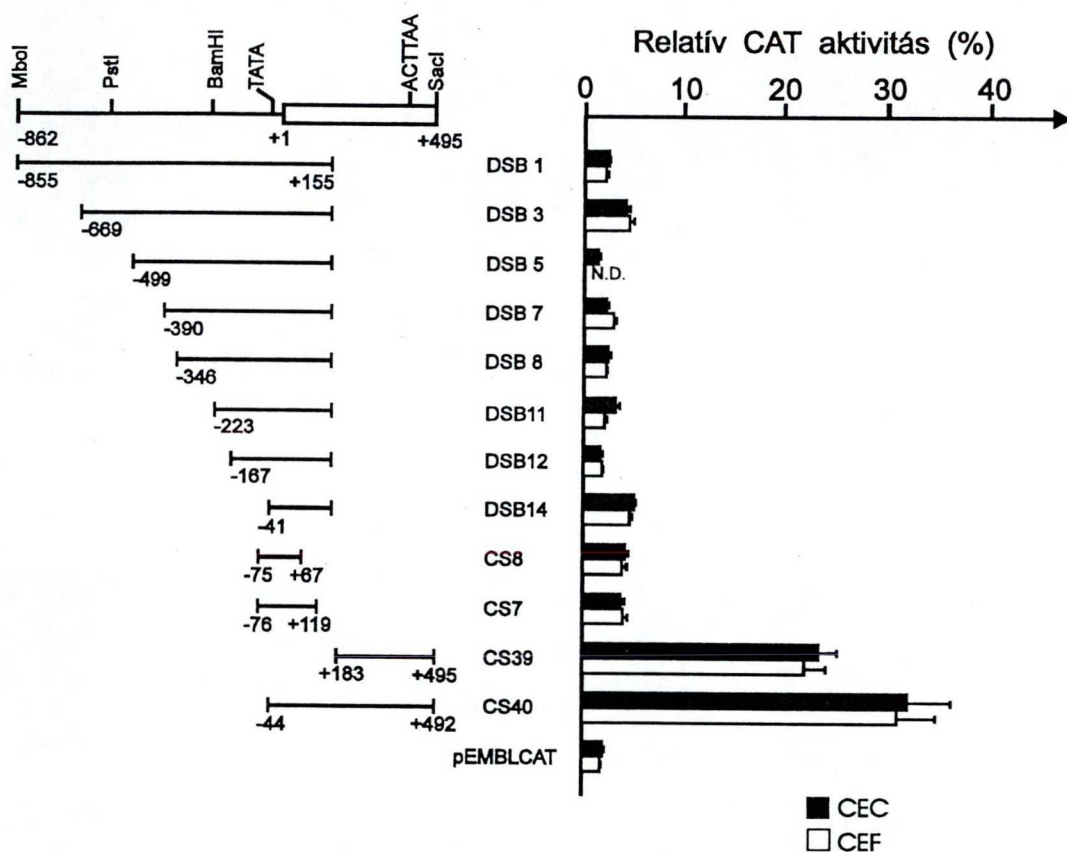
A hosszú, -855 és +155 közötti promoter szakaszt tartalmazó konstrukció alacsony aktivitású volt, hasonlóan a promoter hiányos pEMBLCAT aktivitás értékehez (6, 7., 8. ábra). Az 5' vég delíciós sorozatának tagjai igen alacsony relatív CAT aktivitást mutattak ($\leq 5\%$), így a DSB3 fragment, vagy a minimál promoter konstrukciót hordozó DSB14, a CS8 és CS7 aktivitása is mindössze csak 2.0-2.5-szerese a pEMBLCAT aktivitásának, mind a CEC mind a CEF kulturában (6. ábra). A -75 és +119 közötti minimál promoter fragmentumok, melyek a korábban azonosított többszörös iniciációs helyet tartalmazzák, csak promoter alapaktivitást mutattak. Kísérleteink tehát arra utalnak, hogy az 5' vég előtt a -855 pozícióig nem találhatók pozitív *cis*-elemek, míg negatív elemek nagy valószínűséggel előfordulnak.

Ezzel ellentétben jelentős CAT aktivitást mértünk az első exont tartalmazó konstrukciókkal (6. ábra), mégha azok nem is hordozzák az előzőleg már feltérképezett transzkripció start pontokat [4]. A CS39 konstrukció (+183 és +495 fragmentumot hordozza), amely nem tartalmazza a korábban meghatározott promotert és iniciációs pontot [4], relatív CAT aktivitása $23,4 \pm 1,4\%$ CEC-ben, illetve $22,2 \pm 1,4\%$ CEF-ben. A CS40 konstrukció relatív CAT aktivitása ugyanakkor $32,3 \pm 2,6\%$ CEC kultúrában és $31,8 \pm 2,1\%$ fibroblaszt sejtekben. A CS40 a -44-től a +492-ig terjedő szakaszt hordozza (6. ábra), tehát az exoni fragmenten kívül a gén azonosított promoterét is [4].

A CS39 konstrukcióba beépített 1 exon szakaszon komputer analízissel egy TATA-szerű motívumot találtunk, aminek a szekvenciája ACTTAA. Mindezek a tranziens expressziós eredmények egy második promoter jelenlétét bizonyítják, ami az 1. exonban helyezkedik el, és mesenchymális eredetű sejtekben működik. Kísérleteink alapján ez a génhez közelebb található promoter tranziens expressziós kísérletekben lényegesen hatékonyabban működik, mint a csak alapaktivitást mutató távoli promoter. Mivel a relatív CAT aktivitás értékek nem szignifikánsan térnek el chondrocyta és fibroblaszt sejtekben, szöveti specifitást a második promoter nem mutat.

6. ábra: **A kapcsoló fehérje promóter szakaszok transziens expressziós aktivitása chondrocyta (CEC) és fibroblaszt kultúrákban.**

Az ábra bal oldalán mutatjuk a csirke LP gén 5' végi fizikai térképét, ami az 1. exont is magába foglalja. A különböző hosszúságú promóter szakaszokat a pEMBL.CAT(-) vektorba a CAT riporter gén elé építettük be. A beépített szakaszok pozíciójának meghatározásában a +1 a leghosszabb RNS lánc kezdő pontjának bázisát jelöli. Az ábra jobb oldala mutatja a CAT aktivitás értékeket chondrocyta (CEC) és fibroblaszt (CEF) sejt kultúrákban. A relatív CAT aktivitás értékeket ($\pm$ SEM) a pTK.CAT %-ban adjuk meg 6-20 független kísérletből.



II. b) A reguláló régió tranziens expressziós aktivitása különböző porc-differenciálódási stádiumokban:

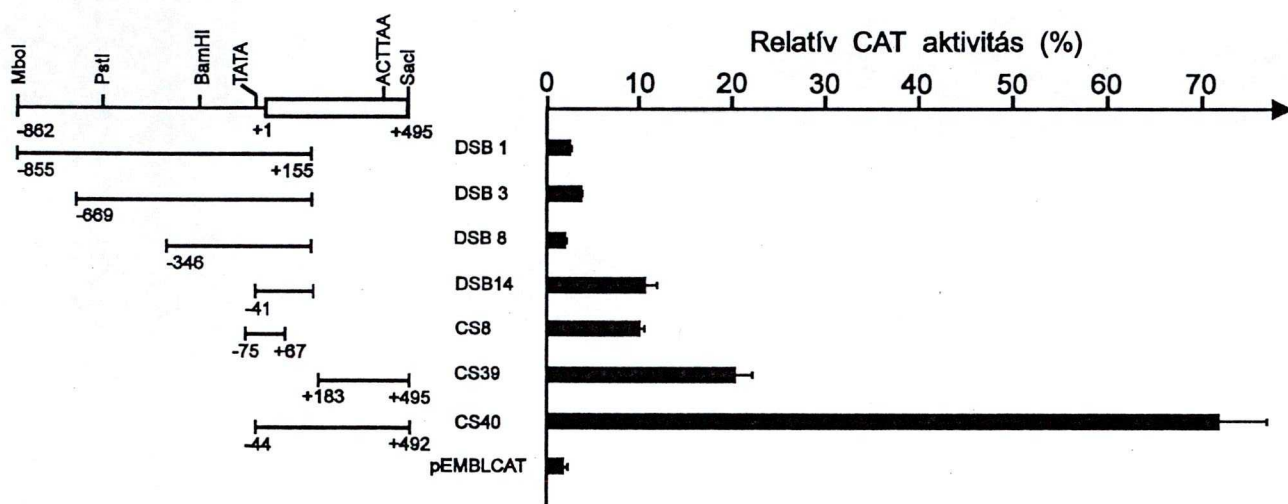
További vizsgálataink arra irányultak, hogy megnézzük, fejlődési állapot-specifikus különbségeket mutat-e a két promoter, ezért HDM és hipertróf chondrocytákkal is elvégeztük a tranziens expressziós kísérleteket (7., 8. ábra). HDM kultúrában a közeli promoter aktivitása $20,4 \pm 1,7$ % volt. Mindkét promoter együttes aktivitása $71,8 \pm 4,3$ %-ra nőtt (CS40). A közeli és a távoli promoter együttes jelenléte tehát kooperatív kölcsönhatásra utal (7. ábra).

A két konstrukció CAT aktivitás értéke még nagyobb különbséget mutat hipertróf chondrocytákban: $6,5 \pm 2,8$ % a CS39 plazmid, és $164,5 \pm 16,6$ % a CS40 CAT aktivitása (8. ábra). Mivel az említett két konstrukció aktivitása nem különbözik szignifikánsan CEC és CEF sejtenyészetben, ugyanakkor HDM és HC kultúrában 3,4-szer illetve 8-szor magasabb aktivitású a CS40 plazmid mint a CS39, ez egy pozitívan szabályozó *cis*-elem jelenlétére utal a -44 és +183 közötti régióban, ami különösen aktív az egyedfejlődés korai és késői szakaszában. Ezt az is alátámasztja, hogy a távoli promoter relatív CAT aktivitásának növekedése 10 %-ra nőtt HDM-ben és HC-ben a DSB14 és CS8 minimál promoter konstrukciókban. A közeli promotert hordozó CS39 aktivitása általában nagyobb volt minden sejt kultúrában, mint a távoli minimal promoter konstrukciók esetében (DSB sorozat tagjaiban). Azonban amíg ezeknek a konstrukcióknak a CAT aktivitás aránya 5:1 körül volt CEC és a CEF sejtenyészetben, addig HDM és HC kultúrában lecsökkent 2:1 körüli értékre (a CS39 és DSB14).

Kísérleteink tehát mutatnak bizonyos differenciálódási állapot-specifikus különbségeket. Mivel a gént nem expresszáló fibroblasztban is hasonló aktivitást mértünk, valószínűnek látszik, hogy a gén enhanszerének és egyéb reguláló elemeinek hiánya miatt a konstrukciók tranziens expressziós aktivitása különbözik az *in vivo* promoter aktivitásától. Ezt támasztja alá kollégáim, Selen Muratoglu és Deák Ferenc kísérlete, melyet a tranziens expressziós vizsgálatokkal párhuzamosan végeztünk.

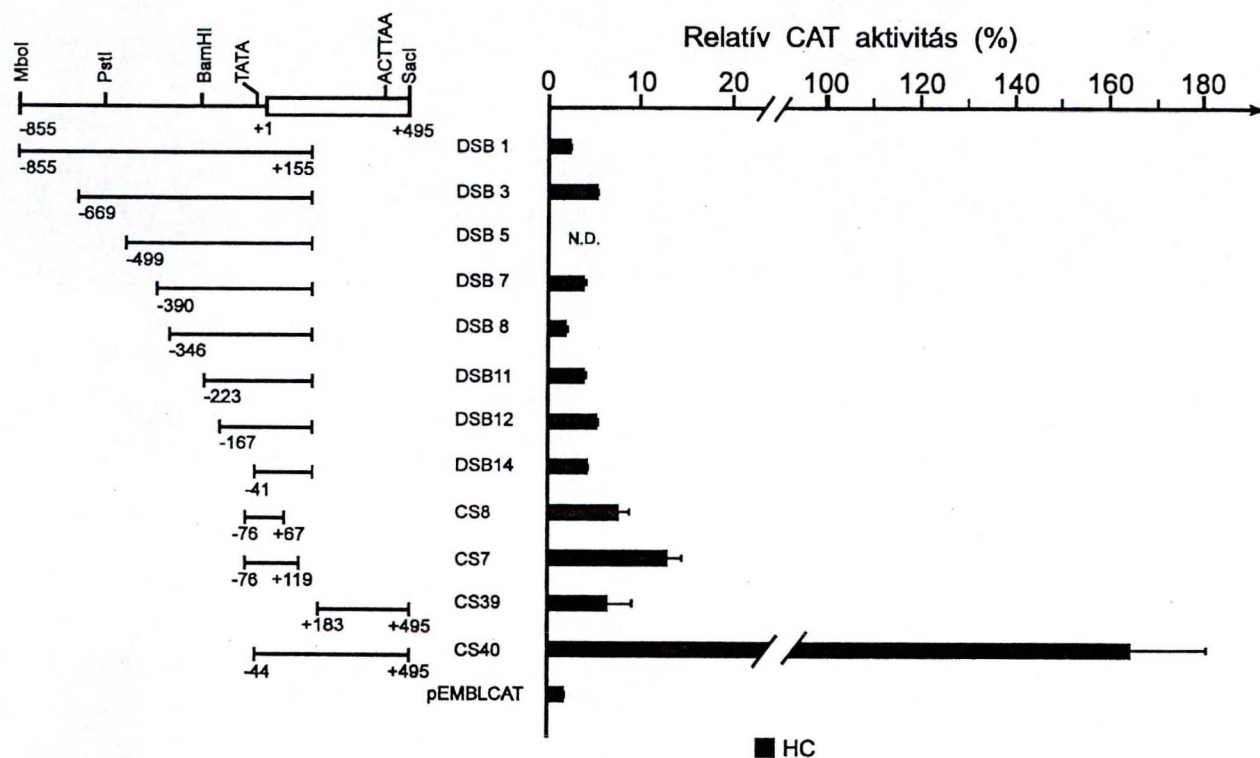
7. ábra: **A kapcsoló fehérje promóter szakaszok tranziens expressziós aktivitása nagy denzitású mesenchymális (HDM) szövetkultúrában.**

Az ábra bal oldalán mutatjuk a csirke LP gén 5' végi fizikai térképét, ami az 1. exont is magába foglalja. A különböző hosszúságú promóter szakaszokat a pEMBL.CAT(-) vektorba a CAT riporter gén elé építettük be. A beépített szakaszok pozíciójának meghatározásában a +1 a leghosszabb RNS lánc kezdő pontjának bázisát jelöli. Az ábra jobb oldala mutatja a CAT aktivitás értékeket HDM sejttenyészetben. A relatív CAT aktivitás értékeket ($\pm$ SEM) a pTK.CAT %-ban adtuk meg 5-10 független kísérletből.



8. ábra: **A kapcsoló fehérje promóter szakaszok tranziens expressziós aktivitása hipertróf chondrocytákban (HC).**

Az ábra bal oldalán mutatjuk a csirke LP gén 5' végi fizikai térképét, ami az 1. exont is magába foglalja. A különböző hosszúságú promóter szakaszokat a pEMBL.CAT(-) vektorba a CAT riporter gén elé építettük be. A beépített szakaszok pozíciójának meghatározásában a +1 a leghosszabb RNS lánc kezdő pontjának bázisát jelöli. Az ábra jobb oldala mutatja a CAT aktivitás értékeket HC sejt kultúrában. A relatív CAT aktivitás értékeket ($\pm$ SEM) a pTK.CAT %-ban adjuk meg 3 független kísérletből.



II. c) *Transzkripció starthelyek meghatározása a közeli promoter szakaszon:*

Annak bizonyítására, hogy RNS szintézis indul-e a közeli promoterről *in vivo*, primer extenziós kísérleteket végeztünk T4 DNS polimerázzal. Először csirke embrió sternum porcból nyert RNS-t használtunk. Azt kaptuk, hogy a tranziens expressziós aktivitást mutató exon régióból, a teljes hosszúságú LP génről is indul RNS szintézis. A transzkripció startpontok a CACTTC és a CAAACT motívumok környezetébe térképeződtek, amelyek hasonlóak az eukarióta RNS polimeráz II által átírt gének konszenzus transzkripció start helyeihez, ezek a CANYYY vagy YYCANT/AYY szekvenciák [51, 52]. Egy hasonló szekvenciát, a CACTCC motívumot, mint egyedüli kezdő helyet, a patkány kondrosarkóma LP génjében már leírtak [37]. Ez csaknem azonos távolságra van a transzláció kezdő ponttól ugyanúgy, mint az általunk meghatározott CACTTC motívum csirkében. Ettől 30 bázispárnyira az 5' vég felé egy TATA-szerű elemet találtunk, az ACTTAA motívumot, hasonlóan mint azt patkány LP génben Rhodes és mts.-i leírták [37]. Ezt emberben is megtalálták [38], azonban pozíciója távolabb esik, mint csirkében vagy patkányban.

Módosított T4 DNS polimeráz és primer extenziós kísérlettel a két promoter aktivitását is összehasonlítottuk. Itt a differenciálódás különböző fázisait képviselő poly (A)⁺ RNS-eket használva azt találtuk, hogy a közeli promoter hasznosítása a legalacsonyabb HDM-ben (Ia stádium) és a legmagasabb CEC-ben (Ib stádium), míg a II stádiumban lévő 18 napos sternum chondrocytáké mérsékelten magasabb a HDM-től.

II. d) *A két promoter tranziens expressziós rendszerben mért aktivitásának összevetése más kísérleti rendszerben meghatározott iniciációs gyakoriságukkal:*

Az 5' végi hosszú promoter szakasz és a minimál promoter egyaránt csak alapaktivitást mutatnak. Kísérleteink arra utalnak, hogy az 5' vég előtt a -865 pozícióig nem találhatók pozitív *cis*-elemek, míg negatív elemek nagy valószínűséggel előfordulnak. Ugyanakkor a többszörös iniciációs helyet tartalmazó CS39 és CS40 plazmidok jelentős aktivitással rendelkeznek mind CEF, mind CEC kultúrában, de nem szövetspecifikusan.

A másik promoter fizikai térképezését is elvégeztük. Primer extenziós kísérletben bizonyítottuk, hogy a második promoter az 1. exon azon szakaszán van, amit korábban

a tranziens expressziós kísérletekkel megtaláltunk, és a teljes hosszúságú génről LP mRNS szintézise indukálódik. A második promoterről átíródó mRNS start pontjai a CACTTC és a CAAACT motívumok közé esnek, és ettől 30 bp távolságra egy TATA szerű motívumot is azonosítottunk. Az elvégzett kísérleteink azt bizonyítják, hogy az intact, az összes feltételezett promoter szabályozó régiót tartalmazó génről indul mindkét promoterről LP mRNS átírás, tehát nem csak a rövid szakaszokat tartalmazó plazmid CAT aktivitás emelkedés a bizonyíték a második promoter működésére.

Tranziens expressziós vizsgálatokkal a HDM kultúrában a CS40 relatív CAT aktivitása jelentősen megemelkedett a CS39-hez képest, ellenben *in vivo* promoter hasznosítási kísérleteinkben ennek ellenkezőjét kaptuk. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a távoli és a közeli promoter működésében kooperativitás áll fenn, vagy a +155 és +183 pozíciókban előfordulnak fejlődési állapot-specifikus *cisz*-elemek. Rhodes és mts-ai a promoter aktivitását befolyásoló introni enhanszer és távoli promoter elemeket is találtak patkányban [37, 50]. Mivel a legmagasabb CAT aktivitás értékeket HC és HDM kultúrákban mértük, amelyek végtagkezdeményekből preparált kultúrák, ezért szövet-specifitás is feltételezhető a távoli és közeli promoterek működésében.

Jelenleg is folytatjuk a promoter szabályozó régiójának vizsgálatát a 3' vég irányában meghosszabbított konstrukciókkal. Tervezzük a csirke különböző szöveteiben a két promoter működésének további összehasonlítását is.

5. ÖSSZEFOGLALÓ KÖVETKEZTETÉSEK

A porcdifferenciálódás és a porc-specifikus génexpresszió molekuláris mechanizmusának tanulmányozása során az alábbi új eredményeket értem el:

I. Hormonok és növekedési faktorok szerepe a porc-specifikus génkifejeződésre:

1) Hatékony módszert dolgoztunk ki az RNS preparálására és a génexpressziós változások nyomon követésére agarózos kultúrában.

2) Megállapítottuk, hogy szérum-mentes körülmények között a porc fehérjék génexpressziós sorrendje hasonló ahhoz, amit korábban szérum tartalmú kultúrában találtunk, de a differenciálódás folyamata jóval lassabb és csak a sejtek egy része válik hipertróffá a tenyészeti idő végére. Igazoltuk, hogy a génexpresszióban a gének transzkripció szintű szabályozása játszik szerepet.

3) A porc mátrix állományt alkotó molekulák és a porc differenciálódási marker gének expressziója transzkripcionális kontroll alatt működnek.

4) Inzulin jelenléte meggyorsította a craniális chondrocyta sejtek terminális differenciálódását, és a porc fehérje gének transzkripció aktivitása is nagy mértékben megnőtt.

5) Kimutattuk, hogy a TGF- β 2, FGF-2 és inzulin együttes hatására a craniális chondrocyták nagy mennyiségű VI-os típusú kollagén mRNS-t termeltek, ugyanakkor a porc-specifikus CMP gén transzkripcionálisan inaktív. A TGF- β 2 és az FGF-2 tehát megakadályozza, hogy a sejtek a porc differenciálódás Ia stádiumából az Ib-be lépjenek.

6) A caudális sejtekben a porc fehérje gének aktivitása megemelkedik inzulin hatására, ugyanakkor nem képes hipertróf állapotba juttatni a sejteket. A sejtek végső differenciálódása tehát további faktorok szabályozása alatt áll.

7) Két olyan *in vitro* rendszert hoztunk tehát létre, amely az eddig leírt sejt kultúráknál alkalmasabb bizonyos differenciálódási stádiumok modellezésére (pl. proliferatív Ic., illetve Ib. és II. stádium közti átmenet).

II. Az LP gén promoter 5' szabályozó régiójának transzkripció szabályozására irányuló kísérleti eredményeink az alábbiak:

1) Tranziens expressziós kísérletekben a promoter régió deléciók analízisével bizonyítottuk, hogy a kapcsoló fehérje gén a korábban azonosított távoli promoter mellett egy közeli promotert is tartalmaz az első exonban.

2) Összehasonlítottuk a két LP promoter aktivitását tranziens expressziós kísérletekben. A közeli promoter 5-ször nagyobb aktivitással működött mint a távoli minimál promoter porcsejtekben és fibroblasztban. Ez az arány kisebb mint 2:1 a porcdifferenciálódás korai stádiumát képviselő HDM kultúra sejteiben és 16:1 a késői stádiumot modellező HC kultúra sejteiben. Bizonyos differenciálódási stádiumban a két promoter kooperatív működése figyelhető meg.

4) Kimutattuk, hogy az LP gén 5' végi deléciók sorozatának fragmentjei alacsony relatív CAT aktivitás értéket mutatnak chondrocyta és fibroblaszt sejtekben, ami arra utal, hogy a promoter 5' vég régiója nem hordoz pozitív *cis*-kontroll elemet, viszont nagy valószínűséggel negatív elemeket tartalmaz.

4) Bár a tranziens expressziós kísérletekben fejlődési állapot-specifikus különbségeket találtunk, mind a távoli mind a közeli promoter aktivitásában, mindkét promoter működött az LP gént nem expresszáló fibroblasztokban is. Ez a szövet-specifikus enhanszer elemek hiányával magyarázható. Az LP gén második promotere az 1. exonon lokalizálható, ami a mesenchymális eredetű sejtekben működik. Ennek a hasznosítási aránya legnagyobb sternum chondrocytákban, míg alacsony egyéb, általunk vizsgált mesenchimális sejtekben.

5) A promoterek relatív aktivitását pontosabban tükrözik a T4 polimeráz primer extenziós kísérletek, melyek a távoli promoter kedvezményezett működésére utalnak sternum chondrocytákban és a differenciálódás korai stádiumát képviselő szövetkultúrákban. A közeli promoter aktivitása azonban megnőtt hipertróf porcsejtekben.

6. IRODALOM

1. Kiss, I., Deák, F., Holloway, R. G., Jr., Delius, H., Mebust, K. A., Frimberger, E., Argraves, W. S., Tsonis, P. A. Winterbottom, N. and Goetinck, P. F. (1989): Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **264**: 8126-8134.
2. Kiss, I., Deák, F., Mestric, S., Delius, H., Soós, J., Dékány, K., Argraves, W. S., Sparks, K. J. and Goetinck, P. F. (1987): Structure of the chicken link protein gene: Exons correlate with the protein domains. *PNAS* **84**: 6399-6403.
3. Deák, F., Kiss, I., Sparks, K. J., Argraves, W. S. Hampikian, G. and Goetinck, P. F. (1986): Complete amino acid sequence of chicken cartilage link protein deduced from cDNA clones. *PNAS* **83**: 3766-3770.
4. Deák, F., Barta, E., Mestric, S., Biesold, M. and Kiss, I. (1991): Complex pattern of alternative splicing generates unusual diversity in the leader sequence of the chicken link protein mRNA. *NAR* **19**: 4983-4990.
5. Muratoglu, S., Bachráti, Cs., Malpeli, M., Szabó, P., Neri, M., Dozin, B., Deák, F., Cancedda, R. and Kiss, I. (1995): Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur. J. Cell Biol.* **68**: 411-418.
6. Szabó, P., Moitra, J., Rencendori, 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(17)**: 10212-10221.
7. Kiss, I., Bősze, Zs., Szabó, P., Altanchimeg, A., Barta, E. and Deák F. (1990): Identification of positive and negative regulatory regions controlling expression of the cartilage matrix protein gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2432-2436.
8. Aszódi, A., Módis, L., Páldi, A., Rencendorj, A., Kiss, I. and Bősze Zs. (1994): The zonal expression of chicken cartilage matrix protein gene in the developing skeleton of transgenic mice. *Matrix Biol.* **14**: 181-190.
9. Heinegard D. and Oldberg A. (1989): Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous proteins. *FASEB J.* **3**:2042-2051.

10. Mundlos, S. and Zabel B. (1994): Developmental expression of human cartilage matrix protein. *Dev. Dyn.* **199**: 241-252.
11. Quarto, R., Dozin, B., Bonaldo, P., Cancedda, R. and Colombatti, A. (1993): Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation. *Development* **117**:245-251.
12. Cancedda D., Gentili C., Manduca P. and Cancedda R. (1992): Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J. Cell Biol.* **117**: 427-435.
13. Castagnola, P., Moro, G., Cancedda F.D. and Cancedda R. (1986): Type X collagen synthesis during in vitro development of chick embryo tibial chondrocytes. *J. Cell. Biol.* **102**:2310-2317.
14. Lu Valle P., Iwamoto, M., Fanning, P., Pacifici, M., Olsen, B.R. (1993): multiple negative elements in a gene that codes for an extracellular matrix protein, collagen X, restrict expression to hypertrophic chondrocytes. *J. Cell. Biol.* **121**: 1173-1179.
15. Dudhia, J., Bayliss, M. T. and Hardingham, T. E. (1994) Human link protein gene: structure and transcription pattern in chondrocytes. *Biochem. J.* **303**, 329-333.
16. Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**: 49-92.
17. Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R., and Dozin, B. (1989): Thyroid hormone, insulin and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: A serum-free analysis. *J. Cell Biol.* **119**: 989-995.
18. Castagnola, P., Dozin, B., Moro, G. and Cancedda, R. (1988): Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* **106**:461-467.
19. Benay D. and Shaffer J. D. (1982): Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gel. *Cell* **30**: 215-224.

20. Bruckner, P., Hörler, I., Mender, M., Houze, Y., Winterhalter, K. H., Eich-Bender, S. G. and Spycher, M. A. (1989): Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J. Cell Biol.* **109**: 2537-2545.
21. Tschan, T., Hörler, I., Houze, Y., Winterhalter, K. H., Richter, C. and Bruckner, P. (1990): Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. *J. Cell Biol.* **111**: 257-260.
22. Böhme, K., Coscience-Egli, M., Tschan, T., Winterhalter, K. H. and Bruckner, P. (1992): Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: The role of insulin-like growth factor-1, insulin, or thyroxine. *J. Cell Biol.* **116**: 1035-1042.
23. Böhme, K., Winterhalter, K. H. and Bruckner, P. (1995): Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor- β 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp. Cell Res.* **216**: 191-198.
24. Pockwinse, S. M., Stein, J. L., Lian, J. B. and Stein, G. S. (1995): Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: Interrelationship of morphology and gene expression by in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* **216**: 244-260.
25. Whitfield, J. F. and Morley, P. (1995): Small bone-building fragments of parathyroid hormone: new therapic agents for osteoporosis. *TIPS* **16**: 382-386.
26. Beato, M. (1991): Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell* **83**: 851-857.
27. Pockwinse S. M., Stein J. L., Lian J. B. and Stein G. S. (1995): Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: Interrelationship of morphology and gene expression by *in situ* hybridization. *Exp. Cell Res.* **216**: 244-260.
28. Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A. and Martin G. R. (1996): Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**: 127-136.

29. Beato M. (1991): Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell* **83**:851-857.
30. Whitfield J.F. and Morley P. (1995): Small bone-building fragments of parathyroid hormone: new therapeutic agents for osteoporosis. *TIPS* **16**:382-386.
31. Wrana J.L. et al. (1991): Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblast by transforming growth factor. *Eur.J. Bioch.* **230**:183-192.
32. Ogata Y. et al. (1995): Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression. *Eur.J. Biochem.* **230**:183-192.
33. Noda M. and Vogel R. (1989): Fibroblast growth-factor enhances type β 1 transforming growth factor gene expression in osteoblast-like cells. *J. Cell Biol.* **109**:2529-2535.
34. Rossi P., Roberts A.B., Roce N.S., Karsenty G., Sporn M.B. and deCrombrughe B. (1988): A nuclear factor-1 binding site mediates transcriptional activation of a type I. collagen promoter by transforming growth factor β . *Cell* **52**:405-414.
35. Morgan, B. A. and Tabin, C. (1994): Hox genes and growth: early and late roles in limb bud morphogenesis. *Dev. Suppl.* **18**: 1-6.
36. Goetinck, P. F., Kiss, I., Deák, F. and Stirpe, N. S. (1990): Macromolecular organization of the extracellular matrix of cartilage. *Cell Lineages in Development* **599**: 29-38.
37. Rhodes, C., Savagner, P., Line, S., Sasaki, M., Chirigos, M., Doege, K. and Yamada, Y. (1991): *NAR* **19**:1933-1939.
38. Osborne-Lawrence, S. L., Sinclair, A. K., Hicks, R. C., Lacey, S. W., Eddy, R. L. Jr., Byers, M. G., Shows, T. B. and Duby, A. D. (1990): Complete amino acid sequence of human cartilage link protein (CRTL1) deduced from sDNA clones and chromosomal assignment of the gene. *Genomics* **8**: 562-567.
39. Doege, K., Hassel, J.R., Caterson, B. and Yamada, Y. (1986): Link protein cDNA sequence reveals a tandemly repeated protein structure. *PNAS* **83**: 3761-3765.
40. Hardingham, T. E. and Fosang, A. J. (1992): *FASEB J.* **6**: 861-870.
41. Neame, P. J. and Barry, F. P. (1993): The link proteins. *Experientia* **49**: 393-402.

42. Neame, P. J., Christner, J. E. and Baker, J. R. (1986): The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J. Biol. Chem.* **261**: 3519-3535.
43. Perkins, S. J., Nealis, A. S., Dudhia, J. and Hardingam, T. E. (1989): Immunglobulin fold and tandem repeat structures in prteoglycan N-terminal domains and link protein. *J. Mol. Biol.* **206**: 737-753.
44. Hauser, N. and Paulsson, M. (1994): Native cartilage matrix protein (CMP). *J.Biol. Chem.* **269**: 25747-25753.
45. Koller, E., Winterhalter, K. H. and Trueb, B. (1989): The globular domains of type VI collagen are related to the collagen-binding domains of cartilage matrix protein and Willebrand factor. *EMBO J.* **8**: 1073-1077.
46. Colombatti, A., Bonaldo, P.(1991): The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: One theme common to components of extracellular matrix, homeostasis, cellular adhesion and defense mechanism. *Blood* **77**:2305-2315.
47. Bessey, A. O., Lowry, O. H. and Brock, M. J. (1946): *J. Biol. Chem.* **164**: 321-329.
48. Gorman, C. (1990): High efficiency gene transfer into mammalian cells. 143-164.
49. Gorman, C. M., Moffat, L. F. and Howard, B. H. (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1044-1051.
50. Rhodes, C. and Yamada, Y. (1995): Characterization of a glucocorticoid responsive element and identification of an AT-rich element that regulate the link protein gene. *NAR.* **23**: 2305-2313.
51. Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Keding, C. and Chambon, P. (1980) *Science* **209**:1496-1414.
52. Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) *Genes & Dev.* **10**: 2657-2683.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

- Szűts, V.H.**, Souk, B., Polyák, B., Boross, L. (1984) Behaviour of some steroids in OPTLC. In: Proceedings of the International Symposium on TLC with Special Emphasis on Overpressured Thin Layer Chromatography, pp. 359-363, Szeged.
- Lázár, G., Husztik, E., Lázár, G., Jr., Ribárszki, Zs., **Szűts, V.** (1986) Reticuloendothelial activity and shock sensitivity. In: Lysosomes - Biology, Pathology, Biotechnology. (Krustev, L. ed.), pp. 1-12, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia.
- Szűts, V.H.**, Sárosi, P., Polyák, B. (1988) Influence of adaptation on the fermentation speed of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* V30. -Acta Microbiol. Hung. 35:132-133.
- Lázár, G., Husztik, E., **Szűts, V.** (1988) Investigation of relations of chemical structure and biological activity of basic polyglutamic acid derivatives. In: Peptides (Penke, B., Török, A. eds.), pp. 329-332, Walter de Gruyter and Co., Berlin.
- László, A., Sohár, I., Falkay, G., Kovács, A., **Halmos, V.**, Szabó, J. (1990) Physiological values of cysteine and metalloproteinase activities in chorionic villi. - Acta Obstet. Gynecol. Scand. 69:397-398.
- Szűcs, M., Öktem, H.A., **Szűts, V.**, Lengyel, I., Tóth, G., Coscia, J.C., Wollemann, M. (1990) Molecular structure, regulation and subcellular distribution of μ opioid receptors during postnatal development. In: New Leads in Opioid Research (van Ree, J.M., Mulder, A.H., Wiegant, V.M., van Wimersma-Griedanus, T.B. eds.), pp. 250-252, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Fritzer, M., Barabás, K., **Szűts, V.**, Bérczi, A., Faulk, W.P., Goldenberg, H. (1992) Cytotoxicity of a transferrin-Adriamycin conjugate to anthracycline-resistant cells. - Int. J. Cancer 52:619-623.
- Bérczi, A., Ruthner, M., **Szűts, V.**, Fritzer, M., Schweinzer, E., Goldenberg, H. (1993) Influence of conjugation of doxorubicin to transferrin on the iron uptake by K562 cells via receptor-mediated endocytosis. - Eur. J. Biochem. 213:427-436.
- Szűts, V.**, Bérczi, A., Schweinzer, E., Goldenberg, H. (1993) Binding of doxorubicin-

conjugated transferrin to U967 cells. - J. Receptor Res. 13:1041-1054.

Szűcs, M., **Szűts, V.**, Coscia, C.J. (1994) Opioid receptors in subcellular fractions of developing rat brain. Eur. J. Neurosci. S7.20.11.

Fritzer, M., Szekeres, T., **Szűts, V.**, Jarayam, H.N., Goldenberg, H. (1996) Cytotoxic effects of a doxorubicin-transferrin conjugate in multidrug-resistant KB cells. Biochem. Pharmacol., 51 (4):489-493.

Deák, F., **Szűts, V.**, Muratoglu, S., Bachrati, Cs. and Kiss, I. (1997): The chicken limb protein gene is transcribed from two distinct promoters. (Submitted)

Szűts, V., Möllers, U., Bittner, K., Schürmann, G., Kiss, I., Deák, F., and Bruckner, P. (1997): Kinetic analysis of cartilage-specific gene expression during chondrocyte differentiation in agarose-culture. (in preparation)

Publikáció magyar nyelven:

Szűts, V., Bérczi, A. (1992) Cancer therapy. Life and science, Vol. 123/9, 426-429.

