

**A Sox trió, Nfi és Hmgb1 faktorok szerepe a martilin-1 gén különleges  
transzkripció szabályozási mechanizmusában**

**Szénási Tibor**

**PhD értekezés tézisei**

**Témavezetők: Dr. Kiss Ibolya**

**Dr. Puskás László**



**Biokémiai Intézet és Genetikai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**Biokémia, Biofizika, Molekuláris és Sejtbiológia PhD Program  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem**

**Szeged, 2014**

## 1. Publikációk listája

### A dolgozat alapját képező közlemények

**I.** Nagy A, Kénesi E, Rentsendorj O, Molnár A, **Szénási T**, Sinko I, Zvara Á, Oommen ST, Barta E, Puskás LG, Lefebvre V, 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 activation by Sox9.

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 31:(4) pp. 686-699. (2011)

IF: 5.527

**II.** **Szénási T**, Kénesi E, Nagy A, Molnár A, Bálint BL, Zvara A, Csabai Z, Deák F, Boros Oláh B, Mátés L, Nagy L, Puskás LG, Kiss I

Hmgb1 can facilitate activation of the matrilin-1 gene promoter by Sox9 and L-Sox5/Sox6 in early steps of chondrogenesis.

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENE REGULATORY MECHANISMS 1829:(10) pp. 1075-1091. (2013)

IF: 5.456

### Egyéb közlemények

**III.** Ózsvári B, Gyuris M, Sipos P, Fábíán G, Molnár E, Marton A, Faragó N, Hackler L, Mihály J, Tóth G, Nagy LI, **Szénási T**, Diron A, Kanizsai I, Puskás LG

Nanoformulated novel curcumin analogue as a potent multi-target agent against glioblastoma.

PLOS ONE Revízió alatt (2014)

IF: 3.73

**IV.** Deák F, Mátés L, Korpos É, Zvara Á, **Szénási T**, Kiricsi M, Mandler L, Keller-Pintér A, Ózsvári B, Juhász H, Sorokin L, Dux L, Mermod N, Puskás LG, Kiss I

Extracellular matrilin-2 deposition controls the myogenic program timing during muscle regeneration.

JOURNAL OF CELL SCIENCE Revízió alatt (2014)

IF: 5.9

## 2. Bevezetés

A chondrogenesis bonyolult, több lépéses folyamat, amely a porcdifferenciálódás irányába elkötelezett mesenchymalis prekursor sejtek kondenzációjával és prechondrocytává differenciálódásával kezdődik. A prechondrocyták azután tovább differenciálódnak korai chondroblastokká, amelyek osztódnak, oszlopokba rendeződnek és megtermelik a porcra jellemző sejtközötti állományt. Majd a porcsejtek hipertróf porcsejteké differenciálódnak és ásványi anyagban gazdag extracelluláris mátrixot (ECM) termelve templátként szolgálnak a leendő csontok számára. A porcra jellemző ECM proteoglikánokból, kollagénekből és nem-kollagén szerű multiadhéziós fehérjékből épül fel. A főalkotó kollagén és proteoglikán-hialuronsav aggregátumok határozzák meg az ECM fizikai tulajdonságait, a többi komponens a felelős a növekedési zónák és a porcszövet sokszínűségéért. A porc fő ECM komponenseit kódoló géneknek a mutációja vagy hiánya súlyos és letális betegséget okoz. Ilyenek a kollagén-2 gén (*Col2a1*), aggregán gén (*Acan*) és link protein gén (*Crtll*) [1-3]. Ezzel szemben más porcfehérjék mutációja vagy hiánya, amelyek az ECM összerendezésében vagy lebontásában vesznek részt, nem okoznak drámai változásokat állatmodellekben.

A matrilinok nem-kollagén szerű fehérjék, amelyek adaptor funkciójuk révén az ECM összeszervezésében vesznek részt. Multidomén szerkezetű extracelluláris fehérjék, amelyek önmagukkal és sok más ECM komponenssel kötődnek és az ECM-ben fonalas hálózatot alkotnak. A fehérje család négy tagból áll. A matrilin-1 (*Matn1*) csak porcban, a matrilin-3 porcban és csontban fejeződik ki, míg a család többi tagja sokkal szélesebb szövetspecifitást mutat. A matrilin génekben hiányos egerek életképesek laboratóriumi körülmények között [4]. A *Matn1* upregulációját mutatták ki lazacban a gerinccsigolyák kóros fúziójakor [5]. A *MATN1* kapcsolódik osteoarthritis-hez, idiopathic scoliosis-hoz, mandibular prognatism-hoz (progéniához) [6, 7]. Az egyértelműen matrilin-1-hez kapcsolható betegség a polychondritis, ahol autoimmunogénként játszik szerepet [8, 9].

A porcfehérje gének meghatározott sorrendben aktiválódnak a chondrogenesis során. A *Col2a1* elsőként, már prechondrocytáiban termelődik, míg az *Acan*, a minor kollagén génei és a *Crtll* korai chondroblastokban kapcsol be. Ezzel szemben a matrilin-1 gén (*Matn1*) sajátossága, hogy a chondrogen csontosodás során a többi porcfehérje génnél később kapcsol be és kifejeződése a növekedési korongban csak az oszlopos proliferatív és prehipertróf zónákra korlátozódik.

A chondrogenesis folyamatát és a porcfehérje gének működését három transzkripciós faktor, a Sox9, L-Sox5 és Sox6, az úgynevezett Sox trió, együttesen irányítja. A Sox9 a chondrogenesis master transzkripciós faktora, hiányában a mesenchymális sejtek nem kondenzálódnak és a chondrogenesis nem megy végbe [10]. A Sox9 kapcsolja be L-Sox5 és Sox6 géneket és együttesen felelősek a porcfehérje gének aktiválásáért. Érdekesség, hogy a Sox9 mellett Sox5 és Sox6 is nélkülözhetetlen a *Matn1* expressziójához, ugyanis míg *Sox5<sup>-/-</sup>*; *Sox6<sup>-/-</sup>* egerekben a többi porcfehérje gén expressziója csökken, addig a *Matn1* be sem kapcsol és *Matn1* mRNS nem mutatható ki [11]. A Sox fehérjék HMG box doménjük révén specifikus szekvenciát ismernek fel a DNS kis árkában, ellentétben a DNS nagy árkában szekvencia-specifikusan kötődő klasszikus transzkripciós faktorokkal (pl. Nfi). A Sox trió tagjai közül a Sox9 transzaktivációs domént hordoz, míg az L-Sox5 és Sox6 transzaktivációs doménnel nem, de homodimerizációs doménnel rendelkeznek.

Hmgb1, a kromatin abundáns fehérjéje, szintén HMG box doménje révén, de nem szekvencia-specifikusan kötődik a DNS-hez és ezáltal fellazítja a kromatin szerkezetet. Bár a Hmgb1 sokoldalúan befolyásolja a sejtek működését, szerepét a porcdifferenciálódásban nem vizsgálták. Funkcióját a vázrendszer fejlődésében az endochondralis csontosodás késői szakaszában írták le, a hipertróf porcsejtek, mint kemoattraktáns termelik, ami elindítja az osteoclast és osteoblast sejtek invázióját [12].

Csoportunk előzetesen klónozte a csirke *Matn1* gént, amely a genomban egy kópiában található meg, 18 kb hosszúságú, nyolc exonból és hét intronból épül fel és promóterén TATA-box található [13]. A *Matn1* transzkripciós szabályozásában amniótákban konzervált DNS-elemek vesznek részt. A rövid promóter önmagában alacsony aktivitású mind transzgenikus egerekben, mind pedig tranziens expressziós kísérletekben. Magas aktivitásához szükség van távoli DNS-elemekre is. Ezek közé tartoznak a disztális (Dpe1 és Dpe2) és proximális DNS-elemek (Pe1) és az iniciátor elem (Ine), melyek porc-specifikus Sox faktorokat kötnek *in vitro* [14-16]. Így Sox9-et, a chondrogén differenciálódás fő transzkripciós faktorát, valamint L-Sox5 és Sox6 faktorokat, melyek szintén nélkülözhetetlenek a gén bekapcsolásához. A rövid promóteren található SI és SII silencer elemek Nfi fehérjékkel hatnak kölcsön [17], de előfordulnak más általános faktorok kötőhelyei is. A csoport korábbi transzgenikus kísérletei alapján a rövid promóter, együttműködve akár a homológ távoli DNS-elemekkel akár a minden porcsejtben aktív heterológ *Col2a1* enhanszer elemekkel, a transzgén expressziót disztális vázelemekbe és a növekedési korong meghatározott zónába irányítja [16, 18]. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a *Matn1* térben és időben szűkített porcspecifikus

kifejeződésének szabályozásában domináns szerepe van a rövid promóternek és a konzervált DNS-elemek különleges elrendeződésének a TATA motívum körül [16].

### 3. Célkitűzések

Más porcfehérje génektől eltérően a *Matn1* kifejeződési mintázata különleges, mivel chondrocyta fejlődési állapot-specifikus és a növekedési korong meghatározott zónáira korlátozódik. A *Matn1* transzkripciós szabályozása hasonló és különböző molekuláris folyamatokat feltételez, mint ami más porcfehérje génekre pl. *Col2a1*-re jellemző és ismert. Szeretnénk felderíteni a porcspecifikus génextpressziót irányító közös és eltérő szabályozási mechanizmusokat. Ezért célul tűztük ki a *Matn1* transzkripciós szabályozásában résztvevő DNS-elemek és transzkripciós faktorok azonosítását és szerepének vizsgálatát.

Munkánk során a következő konkrét célokat tűztük ki magunk elé:

1. Terveztük vizsgálni a Sox trió, Nfi és Hmgb1 fehérjék hozzájárulását a *Matn1* transzkripciós aktivitásához.
2. Terveztük igazolni, hogy a konzervált Dpe1 elem enhanszerként működik.
3. Terveztük vizsgálni a Hmgb1 lehetséges szerepét a porcfejlődés korai szakaszában.
4. Terveztük egy hipotetikus modell felállítását a *Matn1* transzkripciós szabályozására.

### 4. Anyagok és módszerek

#### 4.1 Sejtkultúrák

Csirke embrió fibroblaszt (CEF), csirke embrió porcsejt (CEC) és mesenchyma kultúrák készítését előzőleg leírtuk [14, 15]. A COS-7 sejtvonalat standard körülmények között tartottuk, transzfekcióhoz  $5 \times 10^5$  sejtet lemezelünk 35 mm átmérőjű Petri csészére. Az *in vitro* porccá differenciálódó HDM sejtkultúra korai proliferatív (Ia stádiumú) porcsejtekből áll, míg a CEC kultúrát késői proliferatív (Ib stádiumú) porcsejtek alkotják. Előbbire alacsony, utóbbira magas *Matn1* expresszió jellemző. Az LDM, CEF és COS-7 sejteket *Matn1*-et nem expresszáló kontrollként használtuk.

#### 4.2. Kvantitatív reverz transzkripció-PCR (QRT-PCR)

Össz-RNS-t preparáltunk CEC, CEF és differenciálódó HDM kultúrából RNS izoláló kit (Macherey-Nagel) segítségével. QRT-PCR-t génspecifikus primerekkel RotorGene 3000 készüléken a SybrGreen protokoll szerint végeztük: 15 min 95 °C, 45 ciklus 95 °C 15 s, 60 °C 25 s és 72 °C 25 s. Az egyedi  $C_T$  értékeket három belső kontrol gén (*Gapdh*, 18S rRNS, és 28S rRNS)  $C_T$  értékének átlagára normalizáltuk.

#### 4.3. Plazmid konstrukciók

Minden pozíciót bázispárban (bp), a TATA motívum első T nukleotidjához képest adtunk meg. A korábban leírt *FOI5Luc* és *AC8Luc* luciferáz riportereket a *Matn1* rövid, illetve hosszú promótere irányítja [16]. A Pe1M1, Pe1M4, IneM1, IneM2 és IneM3 mutációkat tartalmazó hosszú promóteres konstrukciók (pl.  $\Delta$ Pe1M1-*AC8Luc*, stb.) PCR-alapú mutagenézissel készültek (QuickChange, Stratagene), melynek templátja az *AC8Luc* plazmid volt [16]. A Pe1M1 a Pe1 elem páros Sox-kötőhelyében, a P1M4 páros Sox-kötőhely spacer nukleotidjaiban tartalmaz pontmutációt. Az  $\Delta$ IneM1-*AC8Luc* az Ine elem 5' végi, az  $\Delta$ IneM3-*AC8Luc* az Ine elem 3' végi Sox kötőhelyén hordoz pontmutációt, míg az IneM2 pontmutáció mindkét Sox-kötőhelyet elrontja. Az  $\Delta$ Pe1M1- $\Delta$ IneM2-*AC8Luc* kettős mutáns esetén mindkét elemből kiesik az összes Sox-kötő motívum [14-16]. A  $\Delta$ SI2dm mutáció az SI elem Nfi-kötőhelyét rontja el. A  $\Delta$ Dpe1(ABC)-*AC8Luc* mutánsból hiányzik az egész Dpe1 elem (-1879/-1791), míg a  $\Delta$ Dpe1(BC)-*AC8Luc* konstrukcióból az ABC régiók közül a B és C kötőhelyek hiányoznak (-1848/-1791). *8xE<sub>Col2a1</sub>-FOI5Luc* mutáns változatainál a vad típusú promótert kicseréltük annak megfelelő mutáns változatára. A *4xDpe1(+)**FOI5Luc* és a *4xDpe1(-)**FOI5Luc* plazmidok a Dpe1 elemet 4 kópiában hordozzák azonos illetve fordított irányban a *Matn1* rövid promóter által hajtott luciferáz riporter gén előtt [16] [19]. A *PCLuc* és *4xDpe1(+)**PCLuc* konstrukciókban a *Matn1* rövid promóter helyett a *Col2a1* rövid promóter (-309/+118) irányítja a luciferáz riporter gént. Minden konstrukciót és szekvenciát restriktions térképezéssel és szekvenálással is ellenőriztünk.

#### 4.4. Kotranszfekciós kísérletek

A kis sejtsűrűségű (LDM) és nagy sejtsűrűségű mesenchyma kultúrákhoz (HDM)  $1 \times 10^6$  sejtet és  $5 \times 10^6$  sejtet lemeztünk 35 mm átmérőjű Petri csészére 10% fetal borjúsavot tartalmazó DMEM

tápfolyadékban [14-16] és következő napon transzfektáltuk a Ca-foszfát precipitációs módszerrel [16]. CEF és CEC kultúra esetén ez a sejtszám  $7 \times 10^5$  volt. Az riporter plazmidból, illetve annak mutáns változataiból LDM, HDM és COS-7 sejtek esetén 5  $\mu\text{g}$ -t használtunk, míg CEF és CEC kultúráknál a riporter plazmidok mennyisége 2  $\mu\text{g}$  volt. Kotranszekciós kísérleteinkben a következő expressziós plazmidokat használtuk: pcDNA5'UT-FLAG-L-Sox5 (pFSox5), pcDNA5'UT-FLAG-Sox6 (pFSox6) és pCDNA-SOX9 (pSOX9) vagy pcDNA5'UT-FLAG-SOX9 (pFSOX9) [20] és pHmgb1 [21]. A legtöbb kísérletben 125 ng pFSox5, 125 ng pFSox6 és 250 ng pSOX9 vagy 250 ng pFSOX9 plazmidot adtunk 100 ng pHmgb1 jelenlétében, illetve anélkül. Bizonyos esetekben emelkedő mennyiségű pHmgb1 (0-500 ng) vagy pFSox5 és pFSox6 (0-250 ng) plazmidokat használtunk. Minden mérést 3-10 alkalommal, hármásával végeztünk. Az eredmények statisztikai kiértékelése KyPlot version 2.0 beta 15. programmal, egy utas varianciaanalízissel (ANOVA) és Dunett féle teszttel történt. A szignifikancia mértékét az üres vektorral transzfektált riporterekre vonatkoztatva (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) vagy a jelölt módon számoltuk (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ).

#### 4.5. *In vitro* DNS-fehérje kölcsönhatási kísérletek (EMSA)

A kétszálú oligonukleotidokkal a -1879/-1791 pozíciók közötti Dpe1 elemet három szakaszra tagoltuk: 5'-GAG TCC AGT GTT TTC GTT TTT GGA GGC CCG GGG AA-3' (Dpe1A), 5'-GGA AAA ATT ATG TTT CAT ATA TTA AAA ATA AAC A-3' (Dpe1B), 5'-AAA TAA ACA CTA CTT TTA CAG AGG TAT AAA TGC-3' (Dpe1C). A Pe1 elem szekvenciája 5'-TCT CCG AGC AAT GGA GCC ATT GTG GAG GGG-3' és az Ine elem szekvenciája 5'-ACC TCA GGG CCA AGG CTC CCG TGT GCC ATT CTG CAT CCA ACC TCC-3' [14, 16]. A Hmgb1 teljes kódoló régióját [21] pGEX expressziós vektorba klónoztuk. A GST-fúziós L-Sox5, SOX9 és Hmgb1 fehérjéket BL21 codon+RIL sejtekben termeltettük meg, majd glutation-szefaróz oszlopon tisztítottuk. A kötési kísérletek során 30 fmol jelölt DNS próbát inkubáltunk 0,6-3,2  $\mu\text{g}$  tisztított fehérjével 500 ng nem-specifikus poli-(dGdC) kompetitor jelenlétében Sox-specifikus pufferben (100 mM TrisHCl pH 7,9, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM EDTA, 11 mM DTT, 0,25% Igepal, 8% ficoll, 250 mg/ml BSA).

#### 4.6 Immunfluoreszcencia

Az immunfluoreszcenciát 10 µm-es acetone-fixált metszeteken végeztük, a nem specifikus antitest kötődést 10%-os normál kecske szérummal blokkoltuk. A mintákat 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel, a következő kombinációkban: affinitás-tisztított nyúl Matn1 antiszérum [22, 23] (1:200 hígítás) vagy SOX9 antitest (Abcam, ab3697, 1:50) és eger monoklonális anti-HMGB1 antitest (MBL, M137-3, 1:200). A megfelelő másodlagos ellenanyagot szobahőmérsékleten és sötétben 1 órán át adtuk. Alexa 488-jelölt anti-nyúl IgG antiszérumot (Molecular Probes, 1:400) és Cy3-konjugált anti-eger IgG antitestet (Jackson ImmunoResearch, 1:400) használtunk másodlagos antitestként. A mintákat Eclipse E600 mikroszkóppal vizsgáltuk és Nikon D5000 digitális fényképezőgéppel fényképeztük le. A fotózás után a fedőlemezt eltávolítva a metszeteket hematoxylinnal és eosinnal festettük meg.

#### 4.7. Western analízissel és QRT-PCR-rel kombinált kotranszfekció

A Nfib, Hmgb1 és Sox fehérjék egyidejű kimutatására előállítottuk a pNFib és pFHmgb1 FLAG-jelölt expressziós plazmidokat úgy, hogy az Nfib és Hmgb1 kódoló régióját beépítettük a pcDNA5'-UT-FLAG vektorba. COS-7 sejteket kotranszfektáltunk 10 µg AC8Luc riporterrel, első esetben állandó mennyiségű (1 µg) pFSOX9 és emelkedő mennyiségű pFSox6, pFSox5; második esetben állandó mennyiségű (1 µg) pFSOX9 és emelkedő mennyiségű pNFib; harmadik esetben állandó mennyiségű (1 µg) pFSOX9, pFSox6, pFSox5 és emelkedő mennyiségű pFHmgb1 effektor plazmidokkal. A transzfektált sejteket lizáltuk, a felülúszóból a luciferáz mérés után Western analízist végeztünk poliklonális nyúl anti-FLAG (Sigma) ellenanyaggal.

Az endogén *Matn1* indukálhatóságának tesztelésére COS-7 sejteket kotranszfektáltunk 2 µl TurboFect (ThermoScientific, R0531) reagens felhasználásával a következő plazmid mennyiségekkel: 50 ng pFSOX9, 75 ng pFSox5, 75 ng pFSox6 és 800 ng pFHmgb1 jelenlétében, illetve anélkül. A transzfekciót duplikátumban végeztük három független kísérletben. A mintákból RNS-t izoláltunk, majd cDNS-sé írtuk át és a *Matn1* mRNS szintet QRT-PCR határoztuk meg. A  $C_t$  értékeket Gapdh mRNS szintre normalizáltuk.

#### 4.8. Hmgb1 csendesítés

A csendesítési kísérletet két human (C-28/I2, SW1353) [24, 25] és egy patkány (RCS) [26] állandósult chondrogen sejtvonalon végeztük, az alábbi siRNS-ek (Bioneer Corporation, Daejeon,



Korea) felhasználásával: humán *HMGB1* 5'-caggaggauacugaacau-3'; patkány *Hmgb1* 5'-cugucaacuucagaguu-3'; humán *GAPDH* 5'-gugugaaccaugagaagua-3' és negatív kontroll siRNS 5'-ccuacgccaccauuucgu-3'.  $1,2-2,0 \times 10^5$  sejtet lemezelünk ki 6-lyukú lemezekre, majd 24 órával a kilemezelés után transzfektáltuk 100-400 pmol siRNS duplexszel X-tremeGENE siRNS transzfekciós reagens (Roche Applied Science) felhasználásával. Az RCS sejteket 30 órával, a C-28/I2 és SW1353 sejteket 42 órával a transzfekció után gyűjtöttük be. RNS-t tisztítottunk és QRT-PCR analízissel követtük a marker génextpressziót, amit az Rps18 mRNS szintjéhez viszonyítva ábrázoltunk.

## 5. Eredmények

*In vitro* DNS-fehérje kölcsönhatási, tranziens expressziós és *in vivo* technikákkal vizsgáltuk a Sox triót, az Nfi faktorok és a Hmgb1 szerepét a *Matn1* transzkripció szabályozásában, valamint ezeknek a faktoroknak a kölcsönhatását. Ezek az eredmények, megerősítve és továbbfejlesztve a csoport korábbi kutatásait, rávilágítottak a rövid promóter elemeknek és a távoli Dpe1 enhanszer elemnek a fontosságára a gén különleges, térben és időben szűkített porcspecifikus kifejeződésének irányításában. Igazolták, hogy a gén amniotákban konzervált DNS-elemeinek és az azokhoz kötődő L-Sox5/Sox6 és Sox9 faktorok dóziszfüggő kölcsönhatásának döntő jelentősége van a *Matn1* promóter aktivitásának meghatározásában, amit az Nfi faktorok és Hmgb1 szintén dóziszfüggő módon befolyásolnak. A fejlődési állapot specificitást az L-Sox5/Sox6 és Nfi faktorok a Sox9 aktivitásának modulálása révén határozzák meg. Ugyanakkor a Hmgb1 a porcdifferenciálódás kezdetén aktiváló, később pedig gátló szerepet játszik, alacsony dózisban elősegítve, magas dózisban pedig gátolva a Sox faktorok kötődését a konzervált DNS-elemekhez.

### A dolgozat legfontosabb új eredményei

1. A porcdifferenciálódás különböző stádiumait modellező kultúrákban QRT-PCR analízissel követtük a marker gének expresszióját. Kimutattuk, hogy a Sox gének expressziója nő a chondrogenesis során, a *Hmgb1* géne csökken, míg az Nfi géneké átmeneti emelkedést mutat az *in vitro* chondrogenesis kezdeti szakaszában.

**A Sox trióra vonatkozó eredmények:**

2. Munkánk során összehasonlítottuk Sox transzkripciós faktorok kötődését a *Matn1* konzervált DNS-elemeihez. Tisztított fehérjékkel végzett EMSA kísérletekben igazoltuk, hogy a Pe1, Ine és Dpe1 elemek különböző affinitással kötnek SOX9 és L-Sox5 faktorokat *in vitro*. SOX9 legerősebben a Pe1 elemhez és a Dpe1 3' végi Sox motívumához kötődik, míg Sox5 leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel.
3. A transzkripciós faktorok szerepét expressziós klónok felhasználásával kotranszfekciós kísérletekben is igazoltuk, olyan plazmidok segítségével, melyekben a luciferáz gén működését a *Matn1* promótere illetve annak mutáns változatai irányították. Eredményeim igazolják, hogy a kulcsfontosságú Pe1 elemhez kötődő SOX9 transzaktiváló hatását az Ine elemhez kötődő L-Sox5/Sox6 faktorok, más porcféherje génektől eltérően, dózisfüggő módon befolyásolják. Alacsony dózisonál (korai fejlődési stádiumban) növelik, míg magas dózisonál (késői fejlődési stádiumban) csökkentik azt.
4. Korábbi tranziens expressziós és transzgen egér kísérleteink eredményét megerősítve igazoltuk, hogy a Dpe1 iránytól függetlenül porcspecifikus enhancerként működik, ami képes homológ és heterológ promóteren Sox-mediálta aktiválásra.

**Az Nfi faktorokra vonatkozó eredmények:**

5. Tranziens expressziós kísérletekben igazoltuk, hogy az Nfi faktorok kötődése a rövid *Matn1* promóteren található SI elemhez nélkülözhetetlen a *Matn1* promóter chondroblast fejlődési stádiumfüggő működéséhez.
6. Kotranszfekciós kísérletekben igazoltuk, hogy Nfi faktorok is dózisfüggő módon befolyásolják a SOX9 transzaktiváló hatását. Így L-Sox5/Sox6 mellett az Nfi faktorok is fontos szerepet játszanak a *Matn1* promóter fejlődési stádiumfüggő kifejeződésében a porcdifferenciálódás során.

**A Hmgb1-re vonatkozó eredmények:**

7. E12.5 és E14.5 napos egér embriókból származó metszeteken immunfluoreszcenciával vizsgáltuk a Hmgb1, Sox9 és *Matn1* szöveti eloszlását. QRT-PCR eredményekkel összhangban a Hmgb1 és Sox9 kifejeződési mintázata a *Matn1* expresszióval a

porcdifferenciálódás korai szakaszában némi átfedést, majd pedig komplementaritást mutatott.

8. Tisztított Hmgb1 fehérjével végzett EMSA kísérletekben bizonyítottuk, hogy Hmgb1 kötődik a *Matn1* konzervált DNS-elemeihez, leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel és jelenléte befolyásolja L-Sox5 és SOX9 fehérjék kötődését ezekhez a konzervált elemekhez.
9. Kotranszfekciós kísérletekben kimutattuk, hogy Hmgb1 ugyancsak dóziszfüggő módon befolyásolja a Sox trió szinergista aktiváló hatását. Alacsony dózisznál, valószínűleg a kromatin szerkezetet fellazítva, a Hmgb1 elősegíti a Sox trió kötődését és a promóter aktiválását. Magas dózisznál azonban interferálhat a Sox faktorok kötődésével. Érdekes, hogy a Hmgb1 jelenléte kompenzálni tudja a Pe1 és Ine elem bizonyos mutációit.
10. További kísérletként a *Matn1*-et nem termelő COS-7 sejteket optimális mennyiségű SOX9-, L-Sox5-, Sox6- és Hmgb1-expresszázó plazmidokkal transzfektáltuk, melynek hatására ki tudtuk mutatni a *Matn1* indukcióját és a *Matn1* mRNS expresszióját.
11. Chondrogén sejtvonalakon végzett csendesítési kísérleteinkben igazoltuk, hogy a Hmgb1 nagy dózisban gátolja a porcspecifikus génexpressziót. Humán (C-28/I2, SW1353) és patkány (RCS) sejtvonalakban siRNS-sel csökkentve a magas HMGB1/Hmgb1 mRNS szintet, a *MATN1/Matn1* és a *COL2A1/Col2a1* génexpressziója nagymértékben nőtt.

#### **Model a *Matn1* transzkripció szabályozására:**

12. Legvégül egy modellt alkottunk a *Matn1* különleges transzkripció szabályozási mechanizmusaira. Modellünk szerint a *Matn1* chondroblast fejlődési állapotspecifikus aktivációja Sox és Nfi fehérjék dóziszfüggő kölcsönhatása révén valósul meg. Hmgb1 alacsony dózisa a porcdifferenciálódás kezdetén elősegíti a Sox faktorok kötődését és a gén bekapcsolását. Hipertróf porcsejtekben vagy rákos sejtvonalakban akadályozza a Hmgb1 magas dózisa Sox faktorok kötődését és így a *Matn1* aktiválását is gátolhatja.

## **6. Diskusszió**

Ezen dolgozat eredményei összhangban állnak a *Matn1* transzkripció szabályozását leíró korábbi közleményekkel [14-16], megerősítve és továbbfejlesztve azokat a Sox trió dóziszfüggő

szinergista kölcsönhatásának és az Nfi fehérjék és SOX9 promóterre gyakorolt szintén dózisfüggő aktiváló hatásának igazolásával, továbbá a Hmgb1 korai porcdifferenciálódásban betöltött szerepének kimutatásával. Az utóbbi eredményeink ugyancsak összhangban állnak a Hmgb1 ismert széleskörű hatásával és kiszélesítik azt.

A porcdifferenciálódás különböző stádiumait modellező csirke primer kultúrákban QRT-PCR analízissel követtük a marker gének expresszióját. Kimutattuk, hogy a Sox gének expressziója nő a chondrogenesis során, a Nfi gének kifejeződési szintje HDM kultúrában átmeneti emelkedést mutat, aminek csúcsa egybeesik a *Matn1* bekapcsolódásával. Ezzel szemben a *Hmgb1* expresszió csökken, hasonlóan a chondrogenesis kezdeti szakaszában szerepet játszó *Hmgln1*-hez [27]. Ezek az eredmények valószínűsítették, a dolgozatban tárgyalt DNS-fehérje kölcsönhatási, tranzienst expressziós és *in vivo* kísérletek pedig bizonyították, hogy Sox és Nfi faktoroknak a chondrogenesisben és a *Matn1* transzkripció szabályozásában van szerepe, míg a Hmgb1 a chondrogenesis korai szakaszában játszik szerepet.

A csoport ugyanis *in vivo* footprint technikával páros Sox motívumokat az Ine és Pe1 elemeken, melyek CEC specifikus faktorokat kötöttek [14] Transzgenikus egerekben az IneM1 promóter mutáció drámai hatásából, valamint a rövid promóter és *Col2a1* enhanszer kölcsönhatásának vizsgálatából arra következtettünk, hogy döntően a rövid promóter felelős a *Matn1* időben és térben szűkített promóter aktivitásáért [16]. A dolgozatban tárgyalt mutációs és funkcionális analízis adatok megerősítik a SOX9 kötődését a Pe1 és Ine elemekhez, és ezen túlmenően bizonyítják a nagyon konzervált Pe1 elem kulcsfontosságú szerepét a SOX9 transzaktiváló hatásának és a Dpe1 elem SOX9-mediálta enhanszer hatásának közvetítésében. Ezek az adatok a korábbi kísérleteinkkel [15, 16] összhangban egy olyan transzkripció szabályozási mechanizmusra utalnak, ami eltér más porcféhrje génektől. A Sox trió szinergista kölcsönhatása jól ismert más porcféhrje gének (*Col2a1*, *Acan*) esetében [20, 28], de azoktól eltérően a *Matn1* promóteren SOX9 transzaktiváló hatását az L-Sox5/Sox6 faktorok dózisfüggő módon befolyásolják.

A Dpe1 több kópiában nagy mértékben növelte a *Matn1* rövid promóter zónális és fejlődési állapot-specifikus aktivitását transzgenikus egerekben, valamint a késői stádiumot képviselő CEC kultúrában [16]. Ezen adatokat megerősítve bizonyítottuk, hogy a Dpe1 elem valóban porcspecifikus enhanszerként működik, ugyanis a Dpe1 elem négy kópiája irányultságtól függetlenül növelte mind a homológ, mind pedig a heterológ *Col2a1* rövid promóter aktivitását. Bizonyítottuk a Sox faktorok szerepét a Dpe1 enhanszer elem működésében COS-7 sejten végzett kotranszfekciós kísérletekben a

Dpe1 elemet négy kópiában tartalmazó konstrukciókon azáltal, hogy kimutattuk, hogy a SOX9 transzaktiváló hatását L-Sox5/Sox6 dózisfüggő módon befolyásolta hasonlóan, mint a hosszú promóteren.

Megerősítve QRT-PCR analízis eredményeit, tranziens expressziós és kotranszfekciós kísérletekben igazoltuk az Nfi faktorok szerepét a gén szabályozásában. Kotranszfekciós kísérleteink bizonyították, hogy L-Sox5/Sox6 faktorok mellett Nfi faktorok is dózisfüggő módon befolyásolják a SOX9 transzaktiváló hatását. Így Sox faktorok mellett az Nfi faktorok is fontos szerepet játszanak a *Matn1* promóter aktiválásában és fejlődési stádiumfüggő kifejeződésének szabályozásában a chondrogenesis során. Az Nfib szerepét más adatok is igazolják a porcdifferenciálódás kezdetén és a *Col2a1* működésében [29].

A csirke primer kultúrákban végzett QRT-PCR analízis eredményeit megerősítik a fejlődő egér végtagon végzett immunfluoreszcenciás vizsgálataink, melyek szerint a Hmgb1 expressziója ebben a kísérletben is ellentétes a Sox9-és Matn1 expressziójával. A Hmgb1 és Sox9 koexpressziója a Matn1-t még nem termelő prechondrocyta sejtekben pedig a gén szabályozásában betöltött szerepére utal. Tisztított Hmgb1 fehérjével végzett *in vitro* kötési kísérletekben bizonyítottuk, hogy Hmgb1 kötődik a *Matn1* konzervált DNS-elemeihez, leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel és jelenléte befolyásolja L-Sox5 és SOX9 fehérjék kötődését ezekhez az elemekhez. Igazoltuk, hogy a Pe1, Ine és Dpe1 elemek különböző affinitással kötnek SOX9, L-Sox5 és Hmgb1 faktorokat *in vitro*. SOX9 legerősebben a Pe1 elemhez és a Dpe1 3' végi Sox motívumához kötődik, míg Sox5 és Hmgb1 leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel. A Hmgb1 és Sox faktorok kötődését *in vitro* módszerek mellett alátámasztják a debreceni partnerünk által végzett CHIP kísérletek eredményei is. Kotranszfekciós kísérletekben kimutattuk, hogy Hmgb1 ugyancsak dózisfüggő módon befolyásolja a Sox trió szinergista aktiváló hatását. Mivel ismert, hogy a Hmgb1 képes a hiszton H1 leszorításával fluidizálni a kromatin szerkezetet [30], ezért feltételezzük, hogy a Hmgb1 alacsony dózisonál a kromatin szerkezetet fellazítva segíti elő a Sox trió kötődését a DNS-elemekhez és ezáltal elősegíti a promóter aktiválását. Magas dózisonál azonban interferálhat a Sox faktorok kötődésével. További kísérletként a *Matn1*-et nem termelő COS-7 sejteket optimális mennyiségű SOX9, L-Sox5, Sox6 és Hmgb1 expresszázó plazmidokkal transzfektáltuk, melynek hatására ki tudtuk mutatni a endogén *Matn1* indukcióját és a *Matn1* mRNS expresszióját.

Chondrogén sejtvonalakon végzett csendesítési kísérleteinkben igazoltuk, hogy Hmgb1 nagy dózisban gátolja a porespecifikus génexpressziót. Humán (C-28/I2, SW1353) és patkány (RCS)

sejtvonalakban siRNS-sel csökkentve a magas HMGB1/Hmgb1 mRNS szintet, a *Matn1* és a *Col2a1* génextpressziója nagy mértékben nőtt. A Hmgb1 magas expressziója más tumoros sejtekben is ismert [31].

Ezen dolgozat eredményeit és a csoport előzetes eredményeit felhasználva modellt alkottunk a *Matn1* különleges transzkripciós szabályozási mechanizmusaira [14-16]. Hipotézisünk szerint a Sox és Nfi fehérjék kötődése elősegíti a gén bekapcsolását. Mivel az Nfi fehérjék képesek a hisztonokhoz kapcsolódni [32], valószínű, hogy a nukleoszóma struktúra fellazításában is szerepet játszanak. A porcfejlődés kezdeti szakaszában még a kötőhelyek lefedettsége alacsony és Sox9 viszonylag nagy moláris feleslegben van L-Sox5/Sox6-hoz képest. L-Sox5/Sox6 kötődése az Ine elemhez elősegíti Sox9 kötődését a kulcsfontosságú Pe1 elemhez. Sox faktorok kötődése a TATA környékére meghajlítja a DNS-t, elősegítheti TBP és RNS-polimeráz II kötődését. A DNS meghajlítása elősegítheti más, nem azonosított faktorok kötődését Pe1-hez és Ine-hez. Az SI elemhez kötő Nfi fehérjék szintén modulálják a Sox9 aktiváló hatását és hozzájárulnak a promóter aktiválásához azáltal, hogy közvetlen kölcsönhatásba lépnek általános transzkripciós faktorokkal, különböző koaktivátorokkal és represszorokkal. Az Nfi jelenléte elősegítheti a transzkripciós preiniciációs komplex és az enhanszoszóma képződését. A promóter aktivitása a késői proliferatív stádiumú chondroblastokban a legmagasabb, amikor a Sox9 és más faktorok kötődése optimális a Pe1 és a Dpe1 elemhez. Későbbi stádiumokban (pl. hipertróf porcsejtekben) vagy amikor Sox trió szintje magas, L-Sox5/Sox6 vetélkedik a Sox9-cel a Pe1 Sox kötőhelyéért, ezáltal gátolhatja a Sox9 kötődését, így csökken a Sox9 transzaktiváló hatása. A Sox helyek nagy telítettsége az Ine elem interferálhat a preiniciációs komplex képződésével a TATA motívumon. Az Nfi felhalmozódása szintén csökkentheti a promóter aktivitását, kompetíció léphet fel különböző aktivátor és represszor Nfi izoformák között és ez blokkolhatja TBP kötődését a TATA-hoz.

A Hmgb1-re vonatkozó eredmények alapján a *Matn1* különleges transzkripciós szabályozására javasolt modellünket kiegészítettük a Hmgb1 szerepével. Hmgb1 kötődik a Dpe1, Pe1 és Ine elemhez fibroblasztokban és elkötelezett mesenchyma sejtekben. A kromatin struktúra felnyitását valószínűleg a konzervált DNS-elemekhez kötődő és a hiszton H1-et leszorító Hmgb1 végzi, valójában még a Sox faktorok bekötődése előtt és ezáltal elősegítheti a porc-specifikus Sox faktorok kötődését a TATA közelében a chondrogenesis korai szakaszában. A gén transzkripciós aktivitása megnő, amikor a Hmgb1 kötődését a Sox9 kötődése váltja fel és a L-Sox5/Sox6 dózisfüggő módon növeli a Sox9 transzaktiváló hatását a késői proliferatív porcsejtekben. A magas

Hmgb1 expressziójú hipertróf porcsejtekben vagy Hmgb1 fehérjét nagy mennyiségben termelő rákos sejtekben a Hmgb1 nagy dózisa és kötődése feltételezhetően megakadályozhatja a Sox fehérjék kötődését.

A *Matn1* zónális kifejeződését irányító transzkripciós szabályozás felderítése elősegítheti a szöveti differenciáció jobb megértését és a növekedési korong fontos zónáira specifikus vektorok előállítását, ami hasznos lehet ízületi betegségek terápiás eljárásainak kidolgozásakor. Hmgb1 expresszió emelkedett szintjét mutatták ki arthritisben és fiatalkori idiopátiás arthritisben szenvedő betegekben [33-35], ami adataink szerint a porcfehérje gének aktivitásának csökkenéséhez vezethet.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Kiss Ibolyának és Dr. Puskás Lászlónak, hogy a tudományos pályán elindítottak és elősegítették tudományos kompetenciáim fejlődését elméleti és gyakorlati téren egyaránt.

Ezenkívül köszönettel tartozom Dux László professzornak, aki lehetőséget biztosított, hogy részt vegyek a Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola Biokémia, Biofizika és Molekuláris Sejtbiológia doktori programjában.

Köszönettel tartozom Dr. Deák Ferencnek, Dr. Zvara Ágnesnek, Dr. Kénesi Erzsébetnek és Dr. Nagy Andreának a segítségükért és azért, hogy fordulhattam hozzájuk tudományos és személyes problémáival egyaránt.

Nagyon köszönöm Simonné Anikó, Hegedűs Katalin, Horváth Zsoltné Emőke, Lehőcz Istvánné Gabriella és Csapóné Török Rozália rendkívül magas színvonalú technikai segítségét, valamint Tóthné Marikának az ábrák elkészítésében nyújtott hatalmas segítségét és tanácsait.

Köszönet illeti a dolgozat anyagául szolgáló cikkek minden társszerzőjét: Dr. Molnár Annamáriát, Dr. Sinkó Ildikót, Dr. Otgonchimeg Rentsendorj-t, Dr. Sajit Thottathil Oommem-t, Dr. Veronique Lefebvre-t, Csabai Zsoltot, Dr. Nagy Lászlót, Dr. Bálint L. Bálintot, Dr. Barta Endrét, Boros Oláh Beátát és Dr. Mátés Lajost a közös munkához való hozzájárulásért.

Köszönöm a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvosi Karának, hogy munkám során PhD ösztöndíjban és 10 hónapos predoktori ösztöndíjban részesülhettem.

Utoljára, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és barátnőmnek, hogy stabil háttérrel és nyugodt magánélettel biztosított nekem, amivel elősegítették céljaim elérését.

## 6. Irodalom

- [1] A. Aszodi, A. Pfeifer, M. Wendel, L. Hiripi, R. Fassler, Mouse models for extracellular matrix diseases, *J Mol Med (Berl)*, 76 (1998) 238-252.
- [2] J.F. Bateman, R.P. Boot-Handford, S.R. Lamande, Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations, *Nat Rev Genet*, 10 (2009) 173-183.
- [3] H. Watanabe, Y. Yamada, Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities, *Nat Genet*, 21 (1999) 225-229.
- [4] A.R. Klatt, A.K. Becker, C.D. Neacsu, M. Paulsson, R. Wagener, The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly, *Int J Biochem Cell Biol*, 43 (2011) 320-330.
- [5] M.E. Pedersen, H. Takle, E. Ytteborg, E. Veiseth-Kent, G. Enersen, E. Faergestad, G. Baeverfjord, K.O. Hannesson, Matrilin-1 expression is increased in the vertebral column of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) individuals displaying spinal fusions, *Fish Physiol Biochem*, 37 (2011) 821-831.
- [6] H. Zhang, S. Zhao, Z. Zhao, L. Tang, Q. Guo, S. Liu, L. Chen, The association of rs1149048 polymorphism in Matrilin-1(MATN1) gene with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility: a meta-analysis, *Mol Biol Rep*, (2014).
- [7] J.Y. Jang, E.K. Park, H.M. Ryoo, H.I. Shin, T.H. Kim, J.S. Jang, H.S. Park, J.Y. Choi, T.G. Kwon, Polymorphisms in the Matrilin-1 gene and risk of mandibular prognathism in Koreans, *J Dent Res*, 89 (2010) 1203-1207.
- [8] A.S. Hansson, D. Heinegard, R. Holmdahl, A new animal model for relapsing polychondritis, induced by cartilage matrix protein (matrilin-1), *J Clin Invest*, 104 (1999) 589-598.
- [9] A.S. Hansson, M. Johannesson, L. Svensson, K.S. Nandakumar, D. Heinegard, R. Holmdahl, Relapsing polychondritis, induced in mice with matrilin 1, is an antibody- and complement-dependent disease, *Am J Pathol*, 164 (2004) 959-966.
- [10] B. de Crombrughe, V. Lefebvre, R.R. Behringer, W. Bi, S. Murakami, W. Huang, Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation, *Matrix Biol*, 19 (2000) 389-394.
- [11] P. Smits, P. Li, J. Mandel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. de Crombrughe, V. Lefebvre, The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation, *Dev Cell*, 1 (2001) 277-290.
- [12] N. Taniguchi, K. Yoshida, T. Ito, M. Tsuda, Y. Mishima, T. Furumatsu, L. Ronfani, K. Abeyama, K. Kawahara, S. Komiya, I. Maruyama, M. Lotz, M.E. Bianchi, H. Asahara, Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification, *Mol Cell Biol*, 27 (2007) 5650-5663.
- [13] I. Kiss, F. Deak, R.G. Holloway, Jr., H. Delius, K.A. Mebust, E. Frimberger, W.S. Argraves, P.A. Tsonis, N. Winterbottom, P.F. Goetinck, Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix. Exon/intron organization, unusual splice sites, and relation to alpha chains of beta 2 integrins, von Willebrand factor, complement factors B and C2, and epidermal growth factor, *J Biol Chem*, 264 (1989) 8126-8134.
- [14] O. Rentsendorj, Transcriptional regulation of the matrilin-1 gene, in, szte, 2006.
- [15] O. Rentsendorj, A. Nagy, I. Sinko, A. Daraba, E. Barta, I. Kiss, 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 (2005) 705-716.
- [16] A. Nagy, A matrilin-1 gén transzkripció szabályozásának vizsgálata transzgenikus egerekben, in, szte, 2011.
- [17] P. Szabo, J. Moitra, A. Rencendorj, G. Rakhely, T. Rauch, I. Kiss, Identification of a nuclear factor-1 family protein-binding site in the silencer region of the cartilage matrix protein gene, *J Biol Chem*, 270 (1995) 10212-10221.
- [18] I. Karcagi, T. Rauch, L. Hiripi, O. Rentsendorj, A. Nagy, Z. Bosze, I. Kiss, 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 (2004) 605-618.
- [19] Z. Csabai, A távoli DNS elem szerepe a matrilin-1 gén transzkripció szabályozásában, in, Szte, 2011.



- [20] V. Lefebvre, P. Li, B. de Crombrughe, A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene, *EMBO J*, 17 (1998) 5718-5733.
- [21] W. Doppler, M. Windegger, C. Soratroi, J. Tomasi, J. Lechner, S. Rusconi, A.C. Cato, T. Almlöf, J. Liden, S. Okret, J.A. Gustafsson, H. Richard-Foy, D.B. Starr, H. Klocker, D. Edwards, S. Geymayer, Expression level-dependent contribution of glucocorticoid receptor domains for functional interaction with STAT5, *Mol Cell Biol*, 21 (2001) 3266-3279.
- [22] N. Hauser, M. Paulsson, D. Heinegard, M. Morgelin, Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan - Increased covalent cross-linking with tissue maturation, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (1996) 32247-32252.
- [23] D. Segat, C. Frie, P.D. Nitsche, A.R. Klatt, D. Piecha, E. Korpos, F. Deak, R. Wagener, M. Paulsson, N. Smyth, Expression of matrilin-1, -2 and -3 in developing mouse limbs and heart, *Matrix Biol*, 19 (2000) 649-655.
- [24] M.B. Goldring, J.R. Birkhead, L.F. Suen, R. Yamin, S. Mizuno, J. Glowacki, J.L. Arbiser, J.F. Apperley, Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes, *J Clin Invest*, 94 (1994) 2307-2316.
- [25] M. Gebauer, J. Saas, F. Sohler, J. Haag, S. Soder, M. Pieper, E. Bartnik, J. Beninga, R. Zimmer, T. Aigner, Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1beta, *Osteoarthritis Cartilage*, 13 (2005) 697-708.
- [26] K. Mukhopadhyay, V. Lefebvre, G. Zhou, S. Garofalo, J.H. Kimura, B. de Crombrughe, Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro-alpha 1(II) collagen gene, *J Biol Chem*, 270 (1995) 27711-27719.
- [27] T. Furusawa, J.H. Lim, F. Catez, Y. Birger, S. Mackem, M. Bustin, Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes, *Mol Cell Biol*, 26 (2006) 592-604.
- [28] Y. Han, V. Lefebvre, 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 (2008) 4999-5013.
- [29] T. Uchihashi, M. Kimata, K. Tachikawa, T. Koshimizu, T. Okada, M. Ihara-Watanabe, N. Sakai, M. Kogo, K. Ozono, T. Michigami, Involvement of nuclear factor I transcription/replication factor in the early stage of chondrocytic differentiation, *Bone*, 41 (2007) 1025-1035.
- [30] A. Agresti, M.E. Bianchi, HMGB proteins and gene expression, *Curr Opin Genet Dev*, 13 (2003) 170-178.
- [31] R. Hock, T. Furusawa, T. Ueda, M. Bustin, HMG chromosomal proteins in development and disease, *Trends Cell Biol*, 17 (2007) 72-79.
- [32] A. Alevizopoulos, Y. Dusserre, M. Tsai-Pflugfelder, T. von der Weid, W. Wahli, N. Mermod, A proline-rich TGF-beta-responsive transcriptional activator interacts with histone H3, *Genes Dev*, 9 (1995) 3051-3066.
- [33] Y. Shi, S. Sandoghchian Shotorbani, Z. Su, Y. Liu, J. Tong, D. Zheng, J. Chen, Y. Xu, Z. Jiao, S. Wang, L. Lu, X. Huang, H. Xu, Enhanced HMGB1 expression may contribute to Th17 cells activation in rheumatoid arthritis, *Clin Dev Immunol*, 2012 (2012) 295081.
- [34] D.S. Pisetsky, H. Erlandsson-Harris, U. Andersson, High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease, *Arthritis Research & Therapy*, 10 (2008).
- [35] H. Schierbeck, R. Pullerits, C. Pruunsild, M. Fischer, D. Holzinger, A. Laestadius, E. Sundberg, H.E. Harris, HMGB1 levels are increased in patients with juvenile idiopathic arthritis, correlate with early onset of disease, and are independent of disease duration, *J Rheumatol*, 40 (2013) 1604-1613.