

# **A PLC $\gamma$ 2 és a p190RhoGAP fehérjék szerepének vizsgálata az oszteoklasztok fejlődésében és a csontanyagcserében**

Doktori értekezés

**Kertész Zsuzsanna**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mócsai Attila, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy György, egyetemi adjunktus  
Dr. Szatmári István, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Gyires Klára, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Füst György, egyetemi tanár  
Prof. Dr. Buday László, egyetemi tanár

Budapest  
2011

# 1. Tartalomjegyzék

<b>1 . TARTALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>2</b>
<b>2 . RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>4</b>
<b>3 . IRODALMI HÁTTÉR .....</b>	<b>6</b>
3.1 . A csontszövet általános jellemzése .....	6
3.2 . A csontanyagcsere betegségei .....	8
3.3 . Az oszteoklasztok fejlődése és működése .....	8
3.3.1 . Az oszteoklasztok fejlődése .....	9
3.3.2 . Az oszteoklasztok reszorpciós működése .....	11
3.4 . Az oszteoklasztokban lezajló jelátviteli folyamatok .....	13
3.4.1 . M-CSF által aktivált jelátviteli folyamatok .....	14
3.4.2 . A RANKL által aktivált jelpályák .....	15
3.4.3 . Sejtadhézió szerepe oszteoklasztok jelátvitelében .....	17
3.4.4 . Az oszteoklasztok és az immunsejtek jelátvitelének közti hasonlóságok .....	17
3.5 . A csontszövetre ható külső tényezők.....	21
3.6 . A PLC $\gamma$ 2 és a p190RhoGAP fehérjék.....	23
3.6.1 . A PLC $\gamma$ 2 szerkezete és működése.....	23
3.6.2 . A p190RhoGAP fehérjék.....	25
<b>4 . CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>27</b>
<b>5 . MÓDSZEREK .....</b>	<b>28</b>
5.1 . Kísérleti állatok.....	28
5.2 . Csontvelő-kimérák létrehozása.....	29
5.3 . Egér csontvelői sejtek izolálása és tenyésztése.....	31
5.4 . A génextpresszió vizsgálata.....	32
5.5 . Biokémiai és jelátviteli folyamatok vizsgálata .....	33
5.6 . A pefészkek eltávolítása .....	34
5.7 . Micro-CT analízis és hisztomorfometria .....	34
5.8 . Statisztikai analízis .....	35
<b>6 . EREDMÉNYEK.....</b>	<b>37</b>
6.1 . A PLC $\gamma$ 2 szerepének vizsgálata oszteoklasztokban és a csontanyagcsereben ..	37
6.1.1 . PLC $\gamma$ 2 jelenléte makrofágokban és oszteoklasztokban .....	37
6.1.2 . PLC $\gamma$ 2-hiányos egerek tenyésztése és PLC $\gamma$ 2 <sup>-/-</sup> kimérák létrehozása .....	38
6.1.3 . Oszteoklasztok <i>in vitro</i> fejlődése és működése.....	39
6.1.4 . Mi okozza az oszteoklaszt-fejlődés zavarát? .....	42
6.1.5 . A PLC $\gamma$ 2 aktiválódási mechanizmusának vizsgálata.....	44
6.1.6 . Intakt PLC $\gamma$ 2 <sup>-/-</sup> egerek csontjainak vizsgálata .....	46
6.1.7 . Ovariectomia hatásának vizsgálata .....	48
6.2 . p190RhoGAP-fehérjék vizsgálata oszteoklasztokban .....	52
6.2.1 . A p190-A <sup>-/-</sup> mutáció általános jellemzése .....	52
6.2.2 . p190-A <sup>-/-</sup> és p190-B <sup>-/-</sup> csontvelő-kimérák létrehozása.....	55
6.2.3 . p190RhoGAP-fehérjék jelenlétének vizsgálata makrofágokban .....	59
6.2.4 . A p190RhoGAP-fehérjék szerepének vizsgálata oszteoklasztokban.....	59

<b>7 . MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>62</b>
7.1.1 . A PLC $\gamma$ 2-vel kapcsolatos eredmények megbeszélése .....	62
7.1.2 . A p190RhoGAP fehérjékkel kapcsolatos eredmények megbeszélése .....	65
<b>8 . KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>68</b>
<b>9 . ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>69</b>
<b>10 . SUMMARY .....</b>	<b>70</b>
<b>11 . A TÁRSSZERZŐK KÖZÖTTI MUNKAMEGOSZTÁS .....</b>	<b>71</b>
<b>12 . SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>72</b>
<b>13 . KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>73</b>
<b>14 . IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>74</b>

## 2. Rövidítések jegyzéke

AP-1: aktivátor protein 1  
ATF: aktiváló transzkripció faktor  
BMP: csont morfogenetikus fehérje  
bp: bázispár  
BV/TV: relatív csonttérfogat (csonttérfogat/teljes térfogat)  
c-Fms: macska McDonough szarkóma proto-onkogén (M-CSF receptor)  
DAG: diacil glicerol  
DAP12: DNAX- aktiváló protein 12  
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav  
ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz  
DC-STAMP: Dendritikus-sejt-specifikus transzmembrán fehérje  
FAK: fokális adhézio kináz  
FcR $\gamma$ : Fc-receptor  $\gamma$ -lánc  
c-Fos: Finkel–Biskis–Jenkins egér oszteogén szarkóma protoonkogén  
GAP: GTPáz aktiváló fehérje  
GAPDH: Glicerín-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz  
GEF: guanin-nukleotid kicserélő faktor  
GM-CSF: granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor  
GTPáz: guanidin trifoszfátáz  
HSC: hemopoetikus őssejt  
IFN: interferon  
I $\kappa$ B $\alpha$ : NF $\kappa$ B inhibitor  
IP<sub>3</sub>: inozitol-1,4,5- triszfoszfát  
ITAM: immunreceptor tirozin- alapú aktivációs motívum  
JNK: c-Jun N-terminális kináz  
MAP: mitogén aktivált protein kináz  
M-CSF: makrofág kolónia-stimuláló faktor  
 $\alpha$ -MEM: minimális esszenciális médium  $\alpha$   
mikro-CT: computeres mikro-tomográfia  
M $\Phi$ : makrofág  
MSC: mesenchymális őssejt  
Neo: neomicin-rezisztencia  
NFAT: aktivált T-sejtek nukleáris faktora

NFATc1: aktivált T-sejtek nukleáris faktor DNS- kötő transzkripció komplex  
NFκB: nukleáris faktor κB  
OB: oszteoblaszt  
OC: oszteoklaszt  
OPG: oszteoprotegerin  
OSCAR: oszteoklaszt-asszociált receptor  
PCR: polimeráz láncreakció  
PH: plekstrin homológia domén  
PI3-kináz: foszfatidilinozitol-3-kináz  
PIP2: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát  
PIR: páros immunglobulin-szerű receptor  
PLCγ2: foszfolipáz Cγ2  
PTH: parathormon  
PU.1: Purin-gazdag szekvenciát felismerő transzkripció faktor 1  
Pyk2: prolin-gazdag tirozin-kináz 2  
RANK: NFκB aktivátor receptor  
RANKL: RANK ligand (=TRANCE)  
RGD: Arginin-Glicin-Aszpartát aminosav-triplet (az integrinek ligandja)  
RT-PCT: reverz transzkriptáz PCR  
SHAM: áloperált állat  
SH2: Src homológia domén 2  
SIRP: szignál-szabályozó fehérje  
Syk: lép tirozin kináz  
TAK-1: transzformáló növekedési faktor β aktivált kináz 1  
TNF-α: tumor nekrozis faktor-α  
TRAF6: TNF-receptor-asszociált faktor 6  
TRAIL: TNF-rokon apoptózis indukáló ligand  
TRANCE: TNF-rokon aktiváció indukált citokin (=RANKL)  
TRAP: tartarát rezisztens savas foszfátáz  
TREM: mieloid sejteken expresszáldó aktiváló receptor  
VT: vad típus

### 3. Irodalmi háttér

#### 3.1. A csontszövet általános jellemzése

A csontszövet legismertebb funkciói közé tartozik a belső szervek védelme, megfelelő tartószerkezet biztosítása és (a vázizmok és ízületek rendszerével együtt) a testmozgások kivitelezése. Emellett azonban a csontok számos egyéb feladatot is ellátnak, mint a csontvelőben lezajló hematopoiesis támogatása, ásványi elemek raktározása és homeosztázisuk szabályozása, illetve a zsírraktározás.

A csontszövet fő tartószerkezetét az extracelluláris mátrix adja. A mátrix felépítésében szerves és szervetlen anyagok vesznek részt. A szerves anyag 95%-a I. típusú kollagén, kisebb részben proteoglikánok, egyéb kollagén-típusok és nem-kollagén jellegű fehérjék. A szervetlen váz elsősorban hidroxipatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) kristályok építik fel. A csont sejtjes elemei a csont felépítését végző csontépítő sejtek (oszteoblasztok), a csont lebontásáért felelős csontfaló sejtek (oszteoklasztok) és a csontmátrix közepébe beépülő oszteociták.

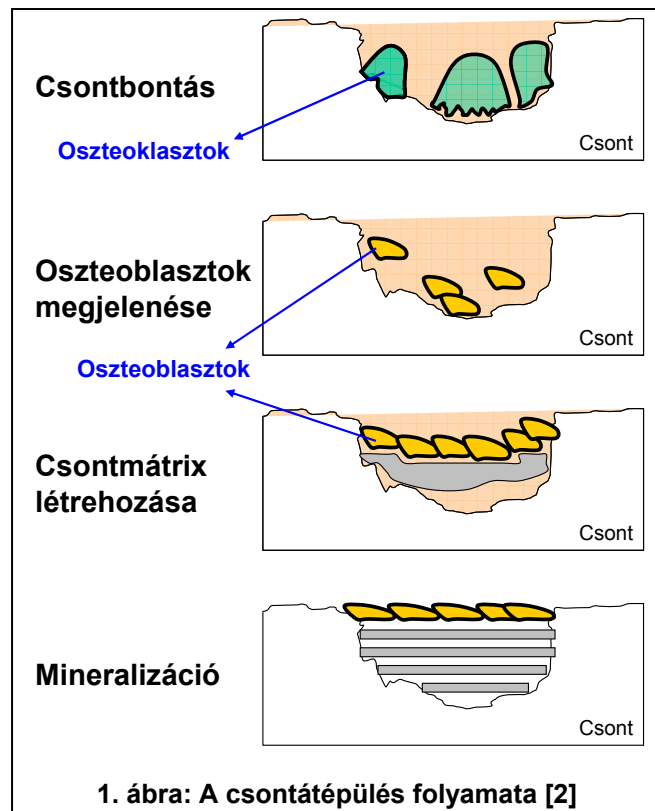
Az oszteoblasztok mesenchymalis őssejtekből alakulnak ki. Fejlődésük korai fázisában az alkalikus foszfatáz, illetve az oszteokalcin expressziója jellemzi őket [7]. Progenitor alakjukból a csont morfogenetikus fehérje (BMP) receptora, valamint Wnt receptorok segítségével alakulnak ki az érett oszteoblasztok, amelyek képesek a csont felépítésére [8, 9]. Az oszteoblasztok fő feladata a kollagénben gazdag szerves mátrix (az oszteoid) létrehozása, speciális mátrixfehérjék (alkalikus foszfatáz, oszteokalcin stb.) szecernálása és a csontszövet mineralizációjának az előkészítése szervetlen anyagok és azok átalakulását katalizáló enzimek mátrixba építésével. Az oszteoblasztok felelősek ezen kívül az oszteoklasztok működésének szabályozásáért is [10, 11]. Az oszteoblasztokat jelentős szekrécións aktivitásuk miatt kiterjedt endoplazmás retikulum és Golgi jellemzi.

A csontállomány felépítése során egyes oszteoblasztokat teljesen körülzár az extracelluláris mátrix. Ezek a sejtek oszteocitákká alakulnak és a továbbiakban mechanoreceptorként érzékelik a csontot érő mechanikai terhelést. Ezen információk fontos szerepet játszanak a csont átépülésének a szabályozásában. Az oszteoblasztokkal

szemben az oszteociták metabolikusan inaktív sejtek, ezért bennük nagyon kevés endoplazmás retikulum és Golgi található.

Az oszteoklasztok a csont felszínén található nagyméretű, sok sejtmaggal rendelkező óriássejtek, melyek a szervezetben egyedülként képesek lebontani a csontot, illetve az elmeszesedett porcszövetet. Az oszteoklasztokat csont-specifikus makrofág-jellegű sejteknek tekinthetjük, melyek hemopoetikus őssejtekből a monocita/makrofág sejtvonal irányába való korai fejlődés, majd oszteoklasztokká való differenciálódás során keletkeznek [12, 13]. Az oszteoklasztok érését elsősorban az oszteoblasztok által termelt citokinek szabályozzák. Keletkezésük jellemző lépése a mononukleáris preoszteoklasztok fúziója. A csontlebontás során az oszteoklasztok speciális citoskeletális és membránstruktúrák segítségével zárt teret hoznak létre a csontfelszínen, melybe sósavat és emésztőenzimeket szecernálnak a csontállomány lebontása érdekében.

A fenti sejtípusok jellegzetes együttműködését a csontanyagcsere egyik komplex folyamata, a csont-átépülés (bone remodeling) mutatja (1. ábra). Ennek során az elhasználódott csontállomány felszínén található oszteoblasztok az oszteoklasztok aktiválódását hozzák létre. Az oszteoklasztok ezután „kirágják” a csontállományt, majd (feltételezeten a mátrixból felszabaduló faktorok hatására) inaktiválódnak és apoptózissal elpusztulnak. A létrejött „rágási üreget” az oszteoblasztok előbb szerves állománnyal töltik ki, majd létrejön a mátrix mineralizációja és ezáltal a csont teljes újraképződése. Ez a körfolyamat a szervezetben folyamatosan működik és évente a teljes csontállomány mintegy 5-25 %-át megújítja [14].



### 3.2. A csontanyagcsere betegségei

A fent jellemzett csont-felépítő, csontbontó és csont-átépítő folyamatok elengedhetetlenek az egészséges csontszerkezet létrejöttéhez és megtartásához. Számos olyan kórállapotot ismerünk, melyekben a fenti folyamatok valamelyikének a károsodása miatt a csontszerkezet jelentős mértékben károsodik. Ezek közül a legjellemzőbben az oszteopetrózis és az oszteoporózis.

Oszteopetrózisban a normálisnál tömörebb csontállomány jön létre, ami elsősorban vázrendszeri rendelleneségekkel jár, illetve paradox módon a nagyon tömör csontok fokozott töréshajlammal rendelkeznek (porcelán-csont jelenség). A betegségnek korai és késői típusát különböztetik meg. Korai típusát legtöbbször már csecsemőkorban diagnosztizálják és kezeletlen esetben az érintett betegek kisgyermekkorban meghalnak. A korai halál oka a csontvelői hemopoetikus tér beszűkülése és az emiatt kialakuló súlyos vérszegénység és az immunvédekezés zavara. Serdülő vagy fiatal korban megjelenő formájánál az életkor előrehaladtával a csont sűrűsége növekszik, de az életkilátások lényegében normálisak. Az oszteopetrózist leggyakrabban az oszteoklasztok hiánya vagy működésük zavara okozza. Mivel az oszteoklasztok hemopoetikus eredetű sejtek, a betegség legsúlyosabb formáit csontvelő-transzplantációval lehet gyógyítani.

Az oszteoporotikus állapotra a csonttömeg csökkenése és a csont szerkezetének degenerálódása jellemző, amely szintén a csont fokozott törékenységet eredményezi. A betegség főleg idős betegekben, különösen a menopauzán túl levő nőkben jelenik meg. A posztmenopauzális oszteoporózis esetén a csontvesztést feltehetőleg az ösztrogének hiánya eredményezi. Oszteoporózis fiatal korban is kialakulhat, ekkor elsősorban endokrinológiai betegségek (hiperkortizolizmus, hiperparatiroidizmus, stb.) vagy iatrogén okok (glükokortikoid-terápia) állnak a háttérben. Az oszteoporózis minden formájára jellemző a csontátépülés egyensúlyának eltolódása, vagyis az oszteoblasztok csontfelépítő működésének a csökkenése és/vagy az oszteoklasztok csontbontó tevékenységének a károsodása.

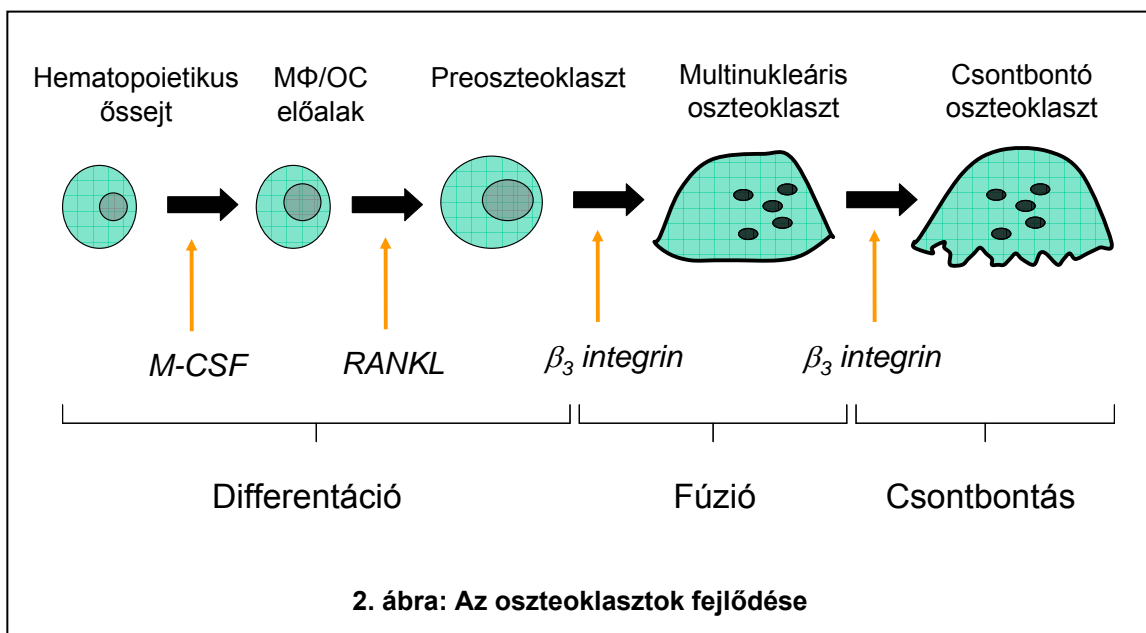
### 3.3. Az oszteoklasztok fejlődése és működése



Mivel dolgozatomban elsődleges témája az oszteoklasztok fejlődésében és működésében szerepet játszó jelátviteli folyamatok vizsgálata, a következőkben részletesebben jellemzem ezen sejtek fejlődését és működését.

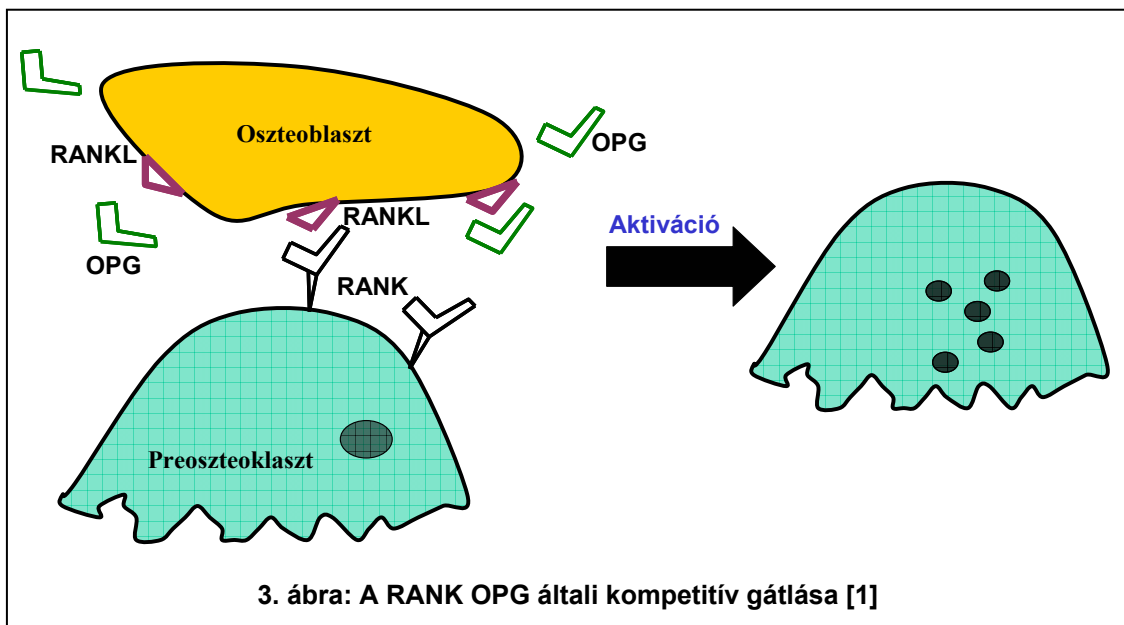
### 3.3.1. Az oszteoklasztok fejlődése

Az oszteoklasztok a monocita/makrofág sejtvonal sejtjeivel rokon sejtek, melyek a hematopoietikus őssejtekből (HSC) alakulnak ki. Az oszteoklasztok fejlődésének első lépései megegyeznek a makrofágok fejlődésének első lépéseivel. Ehhez a kezdeti éréshez elengedhetetlen az M-CSF citokin jelenléte (2. ábra), amit a M-CSF-hiányos op/op egerekben megfigyelhető súlyos oszteopetrózis (az oszteoklasztok hiánya és a következményes csonttérfogat-növekedés) is mutat [15, 16].



A csontfelszín közelében elhelyezkedő makrofág/oszteoklaszt előalakok a csontfelszínen található oszteoblasztokkal érintkezve átprogramozódnak és makrofág helyett oszteoklaszt-irányba differenciálódnak tovább. Ezt az átprogramozódást az oszteoblasztok felszínén található, a TNF-szupercsaládba tartozó RANK ligand (RANKL; másnéven TRANCE, OPGL, ODF vagy TNFSF11) citokinnek a makrofág/oszteoklaszt előalakok felszínén megtalálható RANK (másnéven TNFRSF11) receptorhoz való kapcsolódása váltja ki (2. ábra). A RANKL hatására jellegzetes

génexpressziós változások, többek között az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának drámai növekedése jön létre. Ezen gének közé tartozik számos transzkripciós faktor, köztük a c-Fos és az NFATc1 génje, az oszteoklasztokra jellemző tartarát-rezisztens savanyú foszfátot (TRAP) kódoló gén és számos további, oszteoklaszt-specifikus expressziót mutató gén. A RANK/RANKL receptor/ligand kapcsolódás jelentőségét mutatja, hogy bármelyik fehérje hiánya teljesen meggátolja az oszteoklasztok fejlődését és az *in vivo* csontbontást [17-19]. Az oszteoblasztok a RANKL kifejezése mellett szecernálnak egy szolubilis RANK-szerű molekulát, az oszteoprotegerint (OPG)-t (3. ábra). Az OPG a RANKL megkötésével megakadályozza annak makrofág/oszteoklaszt-előalakok általi felismerését és ezáltal gátolja az oszteoklasztok fejlődését és működését. Az oszteoklasztok aktiválódása tehát tulajdonképpen az oszteoblasztok által termelt RANKL és OPG arányától függ.



A RANKL hatására történő génexpressziós változások jellegzetes biokémiai változásokat eredményeznek, melynek hatására az érett oszteoklasztokhoz biokémiaileg hasonló mononukleáris sejtek, ún. preoszteoklasztok jönnek létre (2. ábra). Ezen sejtek egymással való fúziója hozza létre az oszteoklasztokra jellemző sokmagvú óriássejtes morfológiát. A preoszteoklasztok fúziójához számos fehérje, köztük egy 53 kDa tömegű transzmembrán receptor, a DC-STAMP [20, 21] szükséges, és elengedhetetlen hozzá a  $\beta_3$ -integrineken keresztüli sejtadhézió [22, 23] is.

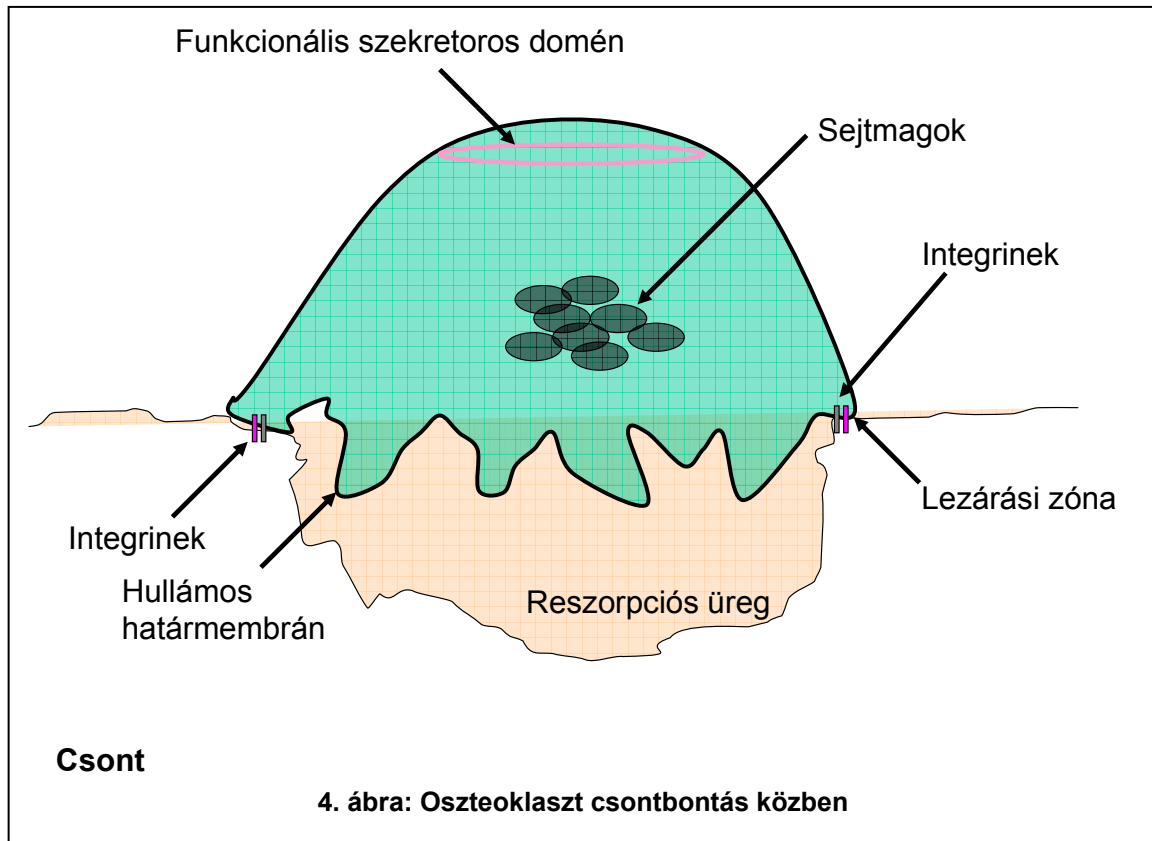
A sikeres fúzióhoz szükség van arra is, hogy a preoszteoklasztok megfelelő közelségbe kerüljenek egymáshoz. Ehhez feltételezhetően hozzájárul a sejtek kemotaktikus vándorlása, amelyet kemokinek, csontmátrix-fehérjék és a különböző metalloproteázok termékei is kiválthatnak [24-26]. A preoszteoklasztok fúziójához ezen túl feltételezhetően számos további, még nem teljesen tisztázott jelátviteli folyamat is szükséges.

A fenti ismeretek tükrében ma már lehetővé válik az oszteoklasztok hemopoetikus sejtekből (csontvelői sejtekből, monocitákból) való *in vitro* tenyésztése. Ennek legkézenfekvőbb módja az oszteoklaszt-előalakok M-CSF és RANKL citokinek jelenlétében való *in vitro* tenyésztése, melynek hatására sokmagvú TRAP-pozitív óriássejtek (oszteoklaszt-szerű sejtek) alakulnak ki. Ezen folyamathoz elengedhetetlen a  $\beta_3$ -integrineken keresztüli sejtadhézió [22, 23]. Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy az oszteoklasztok kialakulásához jelenlegi ismereteink szerint elsősorban három külső tényező, az M-CSF, a RANKL és a sejtadhéziót lehetővé tevő felszín szükséges.

### 3.3.2. Az oszteoklasztok reszorpciós működése

A fenti differenciációs és fúziós lépések révén létrejönnek a sokmagvú óriássejt oszteoklasztok, melyek a továbbiakban a csontfelszín lebontását végzik. Utóbbi folyamat a csontfelszín oszteoklasztok alatti területén, az ún. reszorpciós üregekben vagy Howship-lacunákban (4. ábra) jön létre azáltal, hogy az oszteoklasztok számos különböző, a csontmátrix lebontását eredményező kémiai ágenst és enzimet szecernálnak ebbe a térbe.

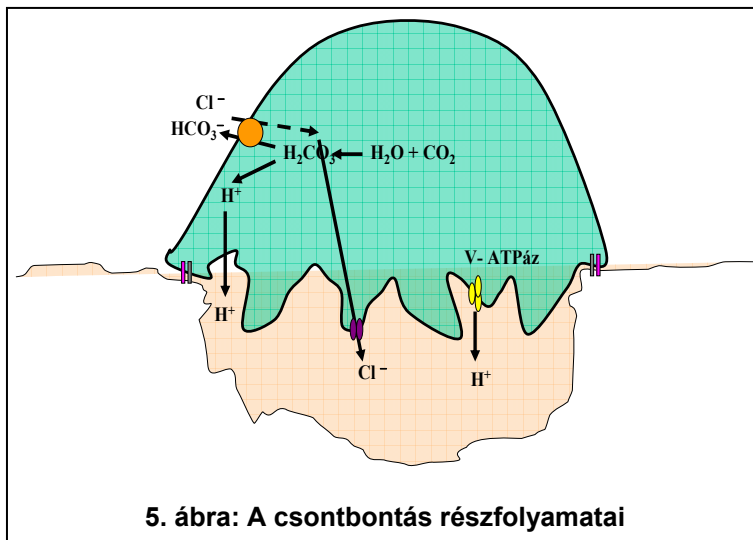
A hatékony csontbontás egyik feltétele, hogy az oszteoklaszt a reszorpciós üreg pereme mentén lezárja (szigetelje) a sejt és a csont közötti teret, különben a csontmátrix lebontását eredményező anyagok az üreg pereménél kidiffundálnának a környező extracelluláris térbe (4. ábra). A szigetelés szerkezeti alapját a sejten belüli aktin-gyűrű adja, amely számos fehérje, köztük a sejtmembránt átérő és a csontmátrixhoz kötődő  $\beta_3$ -integrinek lehorgonyzását végzi.



A hatékony reszorpció másik feltétele a sejt polarizációja, vagyis a reszorpciós üreg felé néző apikális és az intersticiális tér felőli bazolaterális membrán funkcionális szétválasztása (4. ábra). Ez egyrészt a két membrán eltérő iontranszport-funkciói, másrészt a különböző endo/exocitotikus működések (enzimek apikális exocitózisa, lebontott mátrixállomány apikálistól bazolaterális irányba történő transzcitózisa) miatt szükséges. A polarizáció további jellegzetessége az apikális membrán redőzöttségének (az ún. hullámos határnak) a kialakulása, ami feltételezhetően a megnövekedett transzportaktivitással, illetve a transzporter-fehérjéket tartalmazó szekretoros vezikulák exocitóziséval van kapcsolatban.

A reszorpciós üreg lezárását és az oszteoklaszt polarizációját az aktív csontbontás fázisa követi (5. ábra). Ennek során az apikális membránban vakuoláris típusú  $H^+$ -ATPázok jelennek meg, melyek nagy mennyiségben transzportálnak  $H^+$  ionokat a reszorpciós üregbe. A protonok transzportjához szükséges töltéskompenzációt a hullámos határmembrán ClC-7  $Cl^-$ -csatornája biztosítja [27], így az oszteoklaszt összességében sósavat ürít a reszorpciós üregbe, melynek pH-ja 4,5 körüli értékre csökken. A protonok forrása az intracelluláris szénsav-anhidráz, az ennek működése

során a citoplazmában felszaporodó  $\text{HCO}_3^-$  ionokat pedig a bazolaterális  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  antiporter távolítja el, egyben utánpótlást biztosítva az apikális  $\text{Cl}^-$  transzportoz is. A  $\text{HCl}$ -szekréción túl az oszteoklasztok proteolitikus enzimeket is szecernálnak a reszorpciós üregbe (5. ábra). Ezek közül kiemelendő a

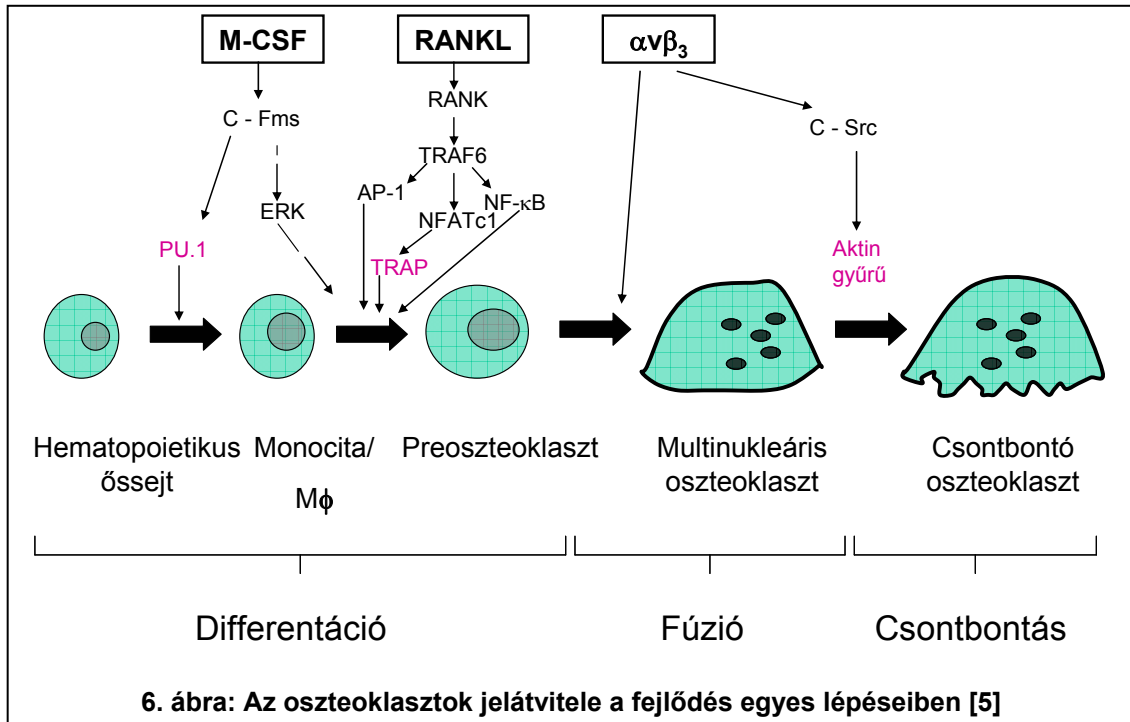


katepszin K mint a csont szerves állományának lebontásáért elsősorban felelős oszteoklaszt-eredetű enzimfehérje.

A reszorpciós üregbe ürített sósav és katepszin K együttesen sem képesek a csontállomány teljes megemésztésére, ezért a csontállomány kisebb darabjai a reszorpciós térben maradnak. Ezeket az oszteoklaszt (mint aktív fagocita-sejt) felveszi, vezikuláris transzporttal átszállítja a sejten keresztül, majd a hullámos határmembránnal átellenes oldalon exocitózissal az intersticiális térbe üríti [28]. A bazolaterális membrán exocitózisban résztvevő területét funkcionális szekretoros doménnek nevezzük (4. ábra).

### 3.4. Az oszteoklasztokban lezajló jelátviteli folyamatok

Az oszteoklasztok fejlődése és működése során számos intracelluláris jelátviteli folyamat aktiválódik. Mivel az oszteoklasztok fejlődéséhez szükséges legfontosabb három külső tényező az M-CSF, a RANKL és a sejtadhéziót lehetővé tevő felszín, a továbbiakban ezek jelátvitelét külön-külön tárgyalom. A fejezet végén kitérek egy új, a fenti három jelpályába nem egyértelműen beilleszthető szignalizációs folyamat szerepére. A jelátviteli folyamatok egy részét a 6. ábra mutatja.



### 3.4.1. M-CSF által aktivált jelátviteli folyamatok

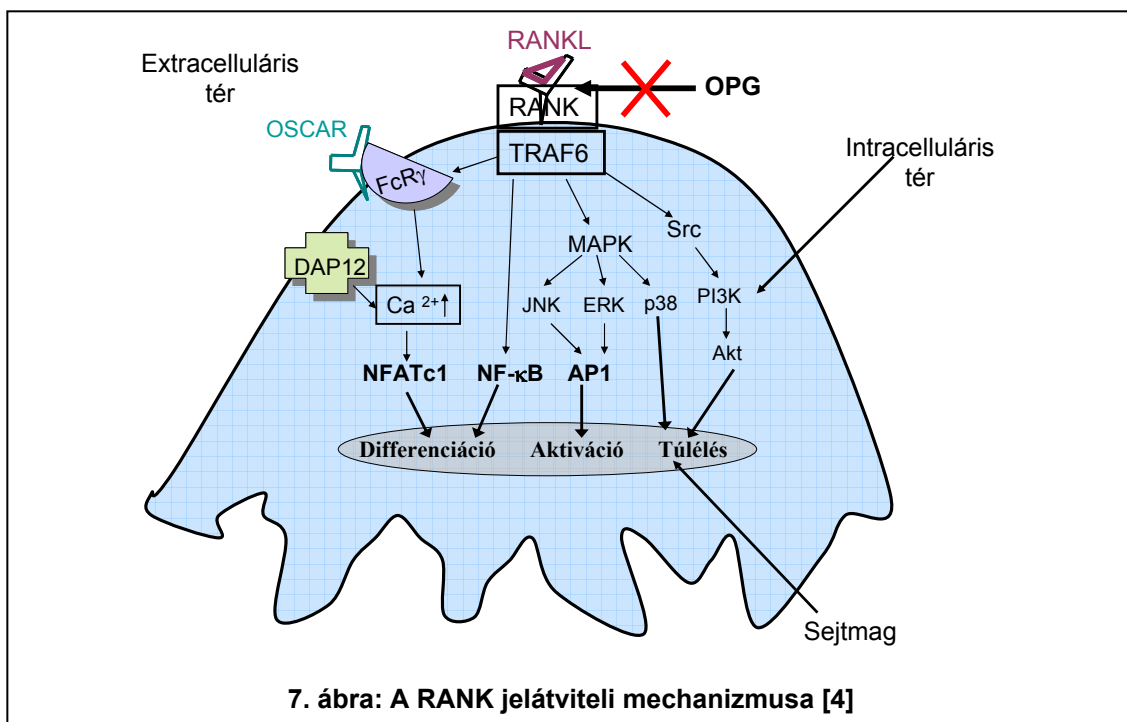
Mint már korábban említettem, az oszteoklasztok hemopoetikus őssejtekből való differenciálódásának első lépéséhez elengedhetetlen az M-CSF citokin. Az M-CSF a saját receptorán (a receptor-tirozin-kináz c-Fms-en) hatva elősegíti a makrofág/oszteoklaszt előalakok proliferációját, támogatja a sejt túlélését és serkenti a RANK expresszióját, ami nélkülözhetetlen a későbbi oszteoklaszt-irányú differenciációhoz. Ebben a fázisban különleges szerepe van a PU.1 transzkripciós faktornak, amely egyrészt fokozza a c-Fms transzkripcióját, másrészt saját maga is a c-Fms általi pozitív szabályozás alatt áll. A c-Fms aktiválása ezáltal a PU.1-en keresztül pozitív visszacsatolással tovább fokozza a receptor expresszióját [29].

Az M-CSF képes aktiválni az ERK1/2 fehérjéket is. Ez úgy jön létre, hogy a c-Fms aktiválódása aktiválja a Ras kis G-fehérjét, ezzel a membránhoz vonzza a Raf szerin/treonin-kinázt, ami egy további lépés közbeiktatásával az ERK1/2 fehérjék foszforilációját eredményezi. Az ERK1/2 fehérjék aktiválódása ezután a sejtproliferációhoz szükséges számos jelátvivő molekula (pl. ciklin-dependens kinázok) aktiválódását eredményezi [30].

### 3.4.2. A RANKL által aktivált jelpályák

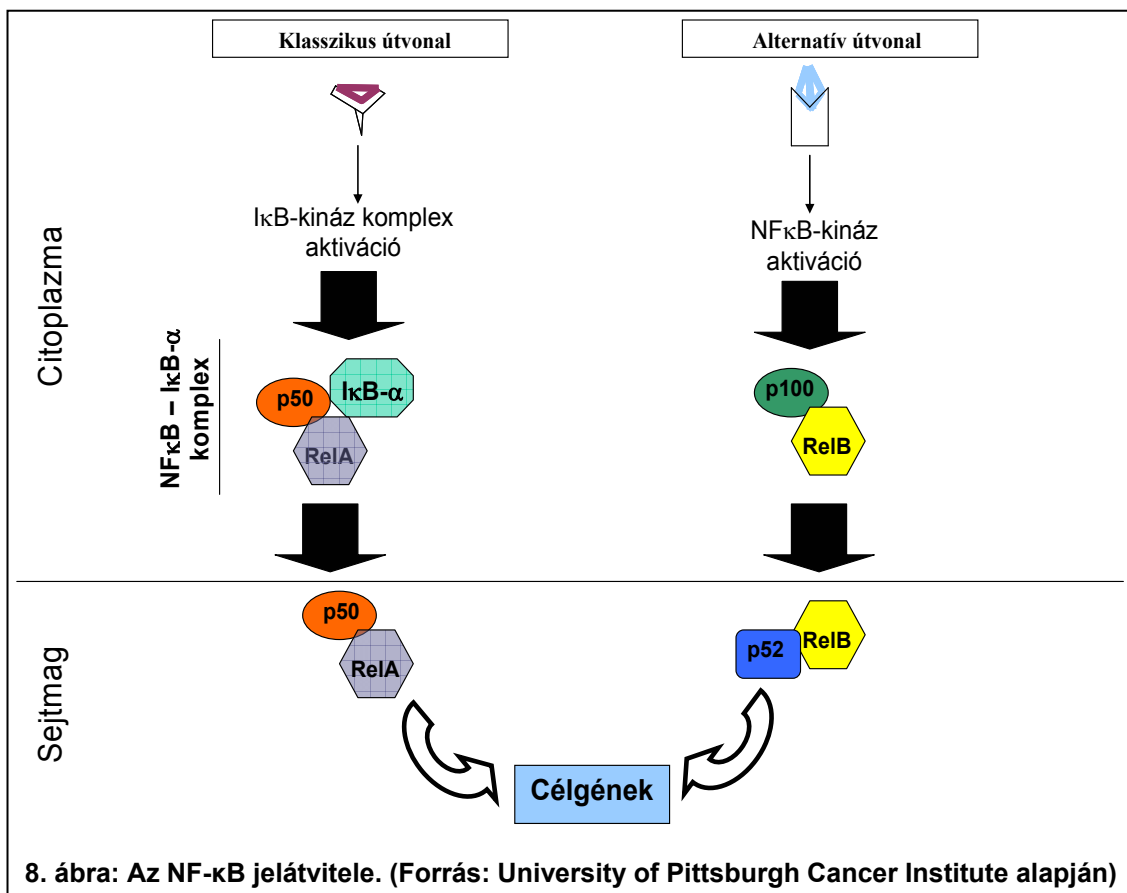
A RANKL a TNF-szupercsaládba tartozó membrán-kötött citokin-molekula, melyet elsősorban az oszteoblasztok termelnek. A RANKL receptora, a RANK már a korai makrofág/oszteoklaszt előalakokon megjelenik és aktiválódása jelentősen módosítja a sejtek differenciációs programját. Amint korábban említettem, a RANKL RANK-hoz való kötődését gátolja az OPG, amely egy szolubilis RANK-hoz hasonló fehérje és így blokkolni képes az oszteoblasztok felszínén jelen levő RANKL-t (3. ábra).

A RANK-nak nincs saját enzimaktivitása, ehelyett egy adaptor molekula, a TRAF6 segítségével szignalizál [31]. A RANK citoplazmatikus doménje három TRAF6-kötőhelyet és a TRAF-család más tagjai számára további két kötőhelyet tartalmaz. A receptor aktiválódása a TRAF6 trimerizációját hozza létre, ami további disztális jelátviteli folyamatokat, köztük számos transzkripciós faktor aktiválódását indítja el. Ezek közül legfontosabbak az NF- $\kappa$ B, az NFATc1 és az AP-1 transzkripciós faktorok (7. ábra).



7. ábra: A RANK jelátviteli mechanizmusa [4]

A RANK ligandkötés eredményeként képes aktiválni az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktort. Az NF- $\kappa$ B aktiválódásának számos mechanizmusa van (8. ábra), ezek közül a TRAF-6 a TAK-1 kináz közvetítésével a klasszikus jelátviteli utat aktiválja, amennyiben foszforilálódik az NF- $\kappa$ B komplexet (p50 és RelA) nyugalomban a citoplazmában tartó I $\kappa$ B $\alpha$  molekula, aminek hatására az I $\kappa$ B $\alpha$  ubikvitinálódik és degradálódik, az NF- $\kappa$ B pedig a sejtmagba jutva kifejtheti transzkripciós faktor hatását és a célgének (köztük az alább említendő NFATc1) aktiválását [4].



A RANK fokozza a c-Fos, Jun és ATF fehérjékből álló AP-1 komplex aktivitását is. A komplex oszteoklasztokban betöltött szerepét mutatja, hogy c-Fos hiányában oszteopetrózis alakul ki a kísérleti állatokban [32]

A RANKL RANK-hoz való kötődése TRAF6-on keresztül az NF- $\kappa$ B aktivációjához vezet. Az NF- $\kappa$ B szükséges az NFATc1 transzkripciós faktor expressziójának megkezdéséhez. Az NFATc1 aktiválódásához szükség van az intracelluláris kalcium-szint emelkedésére (oszcillációjára), ami a kalcium/kalmodulin



komplexen keresztül aktiválja a kalcineurin foszfátot, amely NFATc1 defoszforilációjával felfedi annak nukleáris lokalizációs szignálját. Az NFATc1 ezután a magba vándorol, ahol számos fehérje expresszióját szabályozza. Az NFATc1 a saját expresszióját is fokozza, ezáltal pozitív visszacsatolás jön létre, ami nagymértékben megemeli az NFATc1 szintjét. Az NFATc1 a továbbiakban az oszteoklaszt-specifikus génextpresszió egyik központi szabályozó-fehérjéjeként működik [33]. Az NFATc1 szabályozza többek között a TRAP, a kalcitonin-receptor és a katepszin K expresszióját. A fentiekén túl a RANK aktiválódása fokozza a MAP-kinázok, azok közül is elsősorban a p38 MAP-kináz aktivitását. Ez feltételezhetően szintén szerepet játszik az oszteoklaszt-specifikus gének transzkripciós szabályozásában [34].

### 3.4.3. Sejtadhézió szerepe oszteoklasztok jelátvitelében

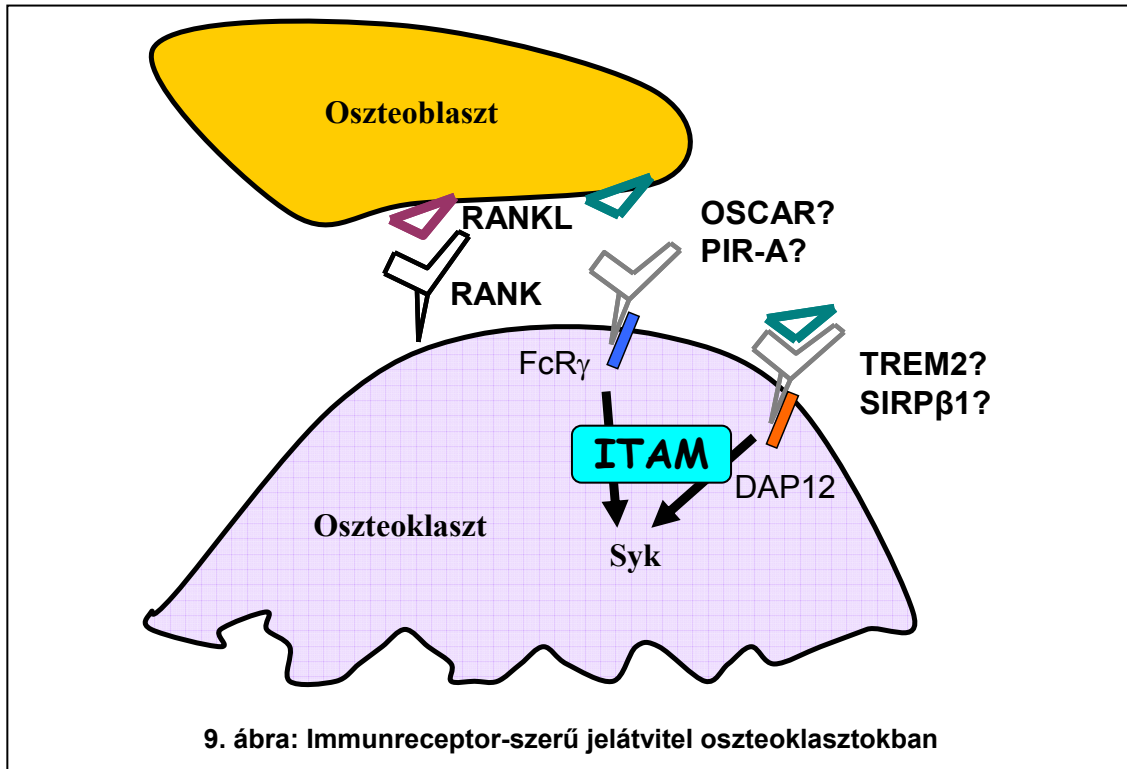
Az oszteoklasztok fejlődésében és működésében az M-CSF és RANKL citokinek mellett nagyon fontos további tényező a sejtek adhéziója. Erre utal a  $\beta_3$  integrin-hiányos egerekben megfigyelhető csontanyagcsere-zavar [22] és az, hogy sejtadhézió hiányában nem jön létre az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése [23]. A sejtadhézió feltehetőleg elsősorban az  $\alpha\beta_3$  integrinen keresztül jön létre (ami képes felismerni a csontmátrix RGD-szekvenciával rendelkező integrin-ligandjait, köztük pl. az oszteopontint), és fontos szerepe van a sejtek citoskeletális átrendeződésében, köztük a fokális adhéziós komplexek és az aktin-gyűrű kialakulásában, illetve feltételezhetőleg további intracelluláris jelpályák aktiválódásában is. Az integrinek jelátvitelére feltehetőleg legalábbis részben az Src tirozin-kinázon keresztül jön létre, illetve szerepet játszanak benne a fokális adhéziós kinázok családjába tartozó FAK és Pyk2 fehérjék is. Ezen kinázok legalábbis részben a podoszómák (aktin-citoszkeletonnal rendelkező adhéziós struktúrák) átrendeződésében játszanak szerepet [35]. Az integrinek jelátvitelében fontos szerepe van továbbá a Vav3 fehérjének, amely az M-CSF felőli aktiválódás hatására lecsökkenő PIP2-szint és az integrinek felől érkező foszforilációs szignál hatásait integrálja [36].

### 3.4.4. Az oszteoklasztok és az immunsejtek jelátvitelének közti hasonlóságok

A fentiekben az oszteoklasztok fejlődéséhez elengedhetetlen három szignál, az M-CSF, a RANKL és a sejtadhézió jelátvitelét tárgyaltam. Az elmúlt években azonban számos olyan közlemény jelent meg, amelyek az oszteoklasztok és az immunsejtek jelátvitelének hasonlóságait tárgyalja. Ezen eredmények egy új tudományág, az oszteoimmunológia alapjait fektették le. Bár ezen eredményeknek a korábban tárgyalt három jelpályához való viszonya mindmáig nem teljesen tisztázott, kutatási projektem szempontjából fontosnak tartom röviden tárgyalni ezen eredményeket.

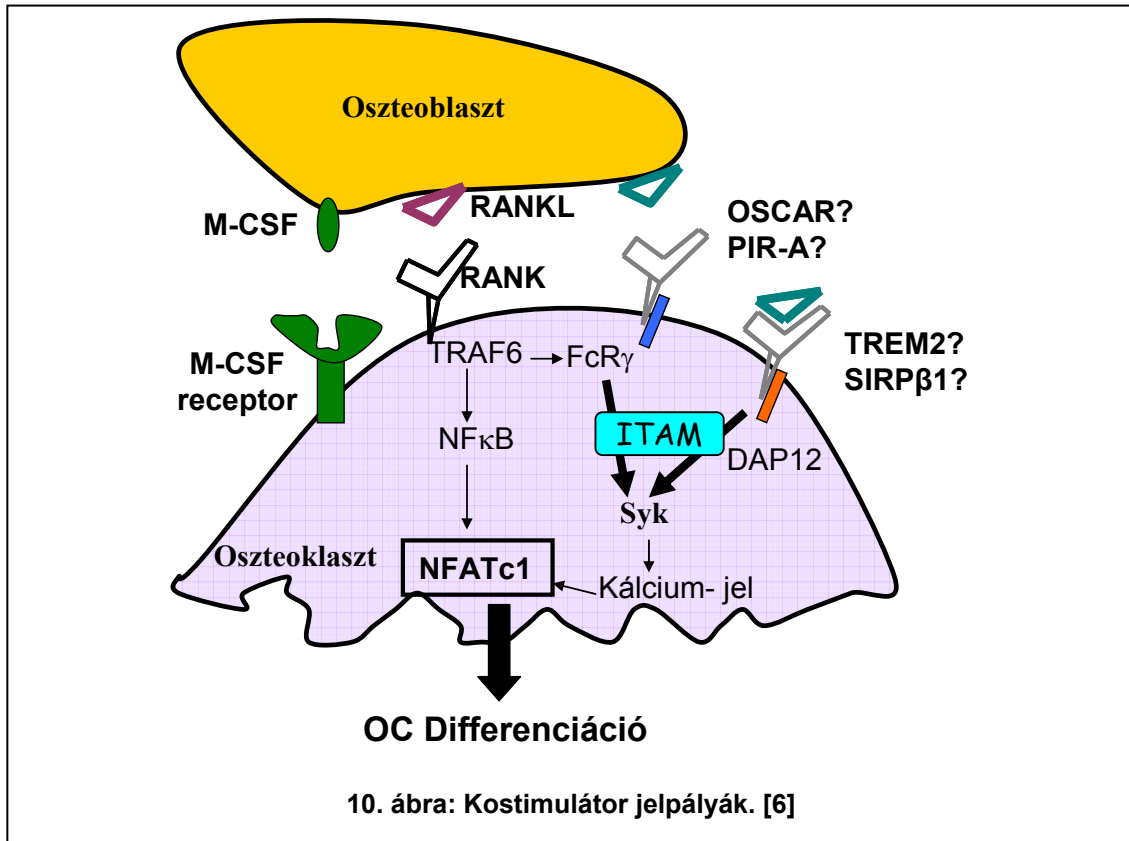
Az oszteoklasztok és az immunsejtek jelátvitelének közti hasonlóság kiterjed a hasonló aktiváló ligandok (pl. TNF-család), transzkripciós faktorok (NF- $\kappa$ B, NFATc1), vagy sejtadhéziós molekulák (pl. integrinek) alkalmazására. Az elmúlt évek egyik jelentős megfigyelése volt, hogy két munkacsoport (közülük az egyik saját munkacsoportunk volt) párhuzamosan kimutatta, hogy az oszteoklasztok fejlődéséhez és az *in vivo* csontbontáshoz elengedhetetlen egy, a limfociták antigén-receptorainak jelátviteléhez nagyon hasonló jelátviteli folyamat [37, 38]. Ennek a jelátvitelnek a során a Syk tirozin-kináznak két, ún. ITAM-ot (immunreceptor tirozin-bázisú aktivációs motívumot) tartalmazó adapter-fehérje, a DAP12 és az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ ) általi aktivációja játszik elengedhetetlen szerepet az oszteoklasztok fejlődésében és működésében (9. ábra). A DAP12 ezek közül feltételezetten egy oszteoblaszt-független, míg az FcR $\gamma$  egy oszteoblasztok által indukált jelpályában vesz részt. A két fehérje feltételezhetően az oszteoklasztok felszínén található immunreceptor-szerű receptorokhoz kapcsolódik és az immunreceptorokéhoz hasonló módon aktiválja a Syk tirozin-kinázt [39]. Az oszteoklasztokban kifejeződő DAP12- és FcR $\gamma$ -asszociált receptorok és azok funkcionális jelentősége mindmáig nem pontosan tisztázott. A DAP12-höz kapcsolódó receptorok közül leginkább a TREM2 fehérje [40] szerepe valószínű, különösen annak fényében, hogy TREM2-hiányos egér és emberi sejtekben az *in vitro* oszteoklaszt-fejlődés zavarát figyelték meg [41-43]. Az FcR $\gamma$ -hoz kapcsolódó fehérjék közül elsősorban az OSCAR elnevezésű, oszteoklasztokban kifejeződő transzmembrán receptornak [44] tulajdonítottak fontos szerepet az oszteoklasztok fejlődésében (elsősorban az oszteoklasztok és az oszteoblasztok közötti kapcsolatok kialakításában), bár ezen feltételezést mindmáig nem sikerült minden kétséget kizáróan bizonyítani. A TREM2 és az OSCAR mellett felmerült a DAP12-

asszociált SIRP $\beta$ 1, valamint az FcR $\gamma$ -asszociált PIR-A szerepe [37], bár ezek tényleges funkciójáról még az előbbieknél is kevesebbet tudunk.



A fenti immunreceptor-szerű jelpálya szerepe és az oszteoklaszt-jelátvitelben való elhelyezkedése mindmáig vita tárgya. Koga és munkatársai [37] a jelpályát a RANK által aktivált ko-stimulációs jelpályaként írták le, tehát a RANK jelpályájába helyezték a DAP12 és FcR $\gamma$  fehérjéket (10. ábra). Munkacsoportunk ezzel szemben azt javasolta, hogy az immunreceptor-szerű szignalizációs lépések inkább a sejtadhézió jelátvitelébe illeszkednek. Ezzel egybecsengenek a munkacsoportunk által neutrofil granulocitákban leírt, a  $\beta_2$  integrinek immunreceptor-szerű jelátvitelére utaló megfigyelések [45] és egy későbbi, az oszteoklasztok integrinjeinek ITAM-tartalmú adaptereken való szignalizációjára utaló közlemény [46] (részletesebben ld: [47]). Tovább bonyolítja a képet, hogy egy további közlemény a DAP12-nek az M-CSF jelpályájával való kapcsolatát is kimutatta [48]. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy bár a DAP12 és az FcR $\gamma$  bizonyosan részt vesznek az oszteoklasztok fejlődésében, az oszteoklaszt-jelátvitelben elfoglalt helyük nem teljesen tisztázott és az általános

vélekedés továbbra is az, hogy a két fehérje a RANK jelpályájában egyfajta ko-stimulációs tényezőként vesz részt (10. ábra).

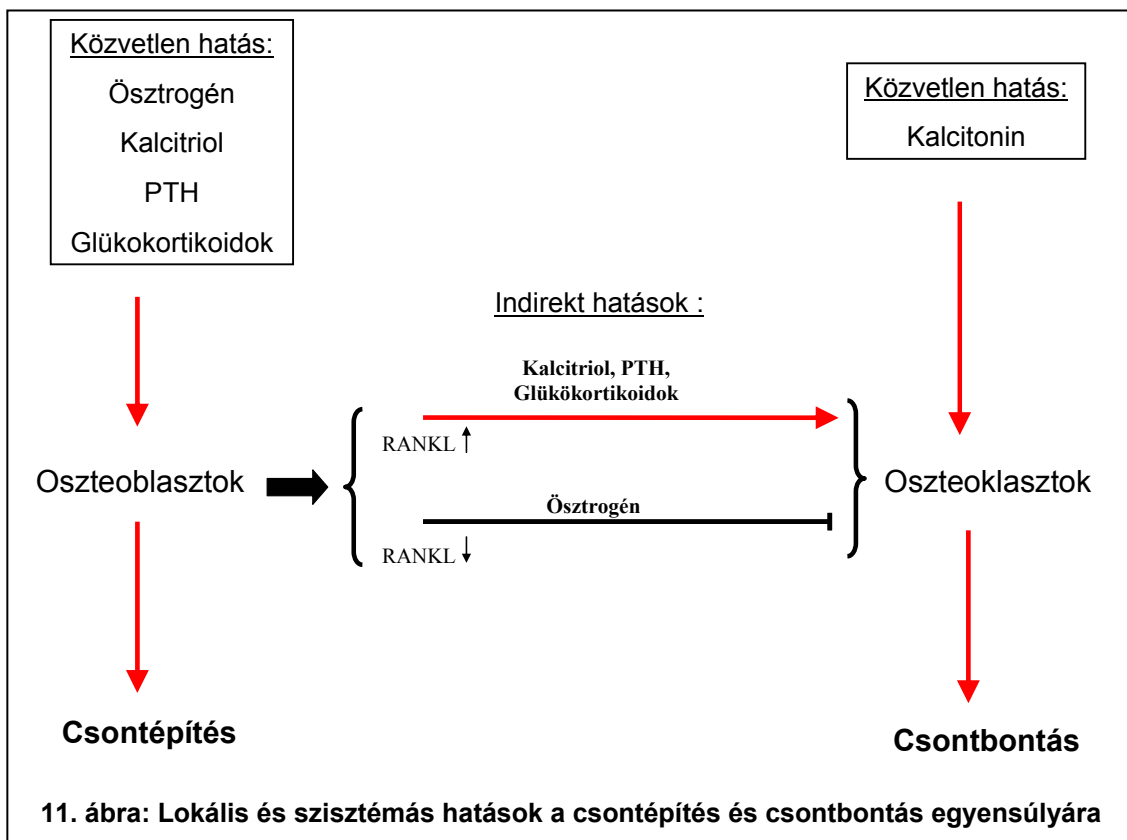


Az immunrendszer jelátviteléhez való hasonlóság további lehetséges példája a PLC $\gamma$  fehérjék szerepe az oszteoklasztok jelátvitelében. Koga és munkatársai [37] feltételezték, hogy a DAP12 és az FcR $\gamma$  a limfociták hasonló adapter-molekuláihoz hasonlóan aktiválja a PLC $\gamma$  fehérjét és ezáltal hozza létre az oszteoklasztok intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-oszcillációit. Feltételezésük szerint ez a jelpálya lett volna felelős a korábban említett, az NF- $\kappa$ B és az AP-1 transzkripciós faktorok hatására expresszálandó NFATc1 transzkripciós faktor Ca<sup>2+</sup>-függő aktiválódásáért és a további, NFATc1-függő oszteoklaszt-specifikus génexpresszió beindításáért (10. ábra). Ez magyarázatot adott volna a Ca<sup>2+</sup>-szignál és az NFATc1-aktiváció elmaradására DAP12<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> sejtekben [37]. Erre a folyamatra és a PLC $\gamma$ -izofomák oszteoklasztokban betöltött szerepére azonban kísérleteink kezdetén semmilyen közvetlen bizonyíték nem állt rendelkezésre.

### 3.5. A csontszövetre ható külső tényezők

Az eddigiekben azokat a folyamatokat írtam le, amelyek a csont nyugalmi (bazális) fel- és leépülésével, illetve a csontátépülés folyamatával kapcsolatosak. A csontanyagcserét azonban számos, a szervezet állapotától és homeosztatikus folyamataitól függő, a csontszöveten kívüli tényezők is befolyásolják. Ezek közül kiemelkedő jelentőségűek a csontszövetre ható endokrin tényezők.

A csontszövetre ható hormonok közül a parathormon (PTH) a kalcium- és foszfátanyagcsere egyik fő szabályozó molekulája. Alacsony vér kalcium-szint esetén a mellékpajzsmirigyekből PTH fog szecernálódni a vérkeringésbe. Vesére hatva a disztális tubulusokban növeli a kalcium reabszorpcióját, proximális tubulusokban pedig csökkenti a foszfát reabszorpcióját. Ezek mellett a csontban lezajló folyamatokat a csontbontás irányába tereli, így pedig a csontokból való kalcium felszabadulása révén növeli a vér kalciumszintjét. (11. ábra).



Jelentős hatást gyakorolnak a csont mineralizált vázának felépítésére a D-vitaminból keletkező hormonok is, köztük elsősorban a PTH hatására a vesében keletkező 1,25-(OH)<sub>2</sub>-kolekalciferol (kalcitriol). Bár a kalcitriol legfontosabb feladata a bélcsatorna Ca<sup>2+</sup>-felvételének a szabályozása, közvetlen hatással van a csontok működésére is. Direkt módon a kalcitriol fokozza az oszteoblasztok RANKL-expresszióját és ezáltal gyors oszteoklaszt-aktiválódást és csontlebontáson keresztüli Ca<sup>2+</sup>-mobilizációt hoz létre. Indirekt hatásként ugyanakkor a kalcitriol már kiegyensúlyozottabb hatást fejt ki a csontra, melynek következménye az oszteoblasztok működésének a serkentése és ezáltal magas ásványianyag-tartalommal rendelkező csontmátrix létrejötte (11. ábra).

A csontanyagcserét szabályozó további hormon a kalcitonin. Jelenlegi ismereteink szerint ez az egyetlen olyan hormon, amely közvetlenül az oszteoklasztokon hatva képes gátolni a csontlebontást. Ennek molekuláris alapja az oszteoklasztokon nagy mennyiségben expresszálódó kalcitonin-receptor. A kalcitonin pontos élettani szerepe mindmáig kevésbé tisztázott.

A fentiek mellett jelentős hatása van a csontanyagcserére a nemi hormonoknak (szexuáliszteroidoknak) is. Az ösztrogének legfontosabb hatása az oszteoblasztok RANKL-expressziójának csökkentése és OPG-expressziójának növelése [49]. A RANKL/OPG arány csökkentésével ezáltal indirekt módon jelentősen gátolják az oszteoklasztok kialakulását és aktiválódását. Ez a hatás elengedhetetlen a csontállomány egyensúlyához a menopauza előtt, és feltehetően ennek a hatásnak a kiesése tehető felelőssé a posztmenopauzális időszakban az oszteoklasztok általi fokozott csontlebontásért (a posztmenopauzális oszteoporózisért).

Az ösztrogének az ösztrogén-receptorhoz való kötődése a receptor dimerizációját és a sejtmagba való transzlokációját idézi elő, ahol az különböző gének transzkripciójának átírását szabályozza. Jelenleg két ösztrogén-receptort ismerünk: az ER $\alpha$  mind az oszteoblasztokban, mind az oszteoklasztokban expresszálódik, míg az ER $\beta$  epitél sejtekben, mesenchyma eredetű szövetekben és oszteoblasztokban jelenik meg (oszteoklasztokban való megjelenése vitatott). Ösztrogén receptor stimulálása oszteoblasztokon csökkenti az oszteoklasztok oszteoblasztokon keresztüli aktivitását, míg oszteoklaszt előalakokon megakadályozza az érett oszteoklasztok kialakulását,

illetve már érett oszteoklasztokon megakadályozza azok csontbontását [50, 51] és növeli azok apoptotikus hajlamát [52, 53].

Az ösztrogénekhez hasonlóan az androgén-hormonok is a csontfelépülés irányába tolják el a csontanyagcserét, amiben részben az androgénekből a csontszövetben aromatizációval keletkező ösztrogének tehetők felelőssé.

A fenti hormonokon kívül a csontanyagcserét befolyásolják még a glukokortikoid hormonok is. Ezek fokozzák az oszteoblasztok RANKL-expresszióját és csökkentik az OPG termelését, ezáltal indirekt módon fokozzák az oszteoklasztok fejlődését és működését. A tartós glukokortikoid-terápia ennek megfelelően mellékhatásként súlyos oszteoporózist eredményezhet.

### 3.6. A PLC $\gamma$ 2 és a p190RhoGAP fehérjék

PhD-munkám során a PLC $\gamma$ 2 foszfolipáz és a p190RhoGAP-izoformák szerepét vizsgáltam oszteoklasztok jelátvitelében és az *in vivo* csontanyagcserében. A következőkben e két fehérje(család) szerkezetét és más sejtekben betöltött szerepét tárgyalom.

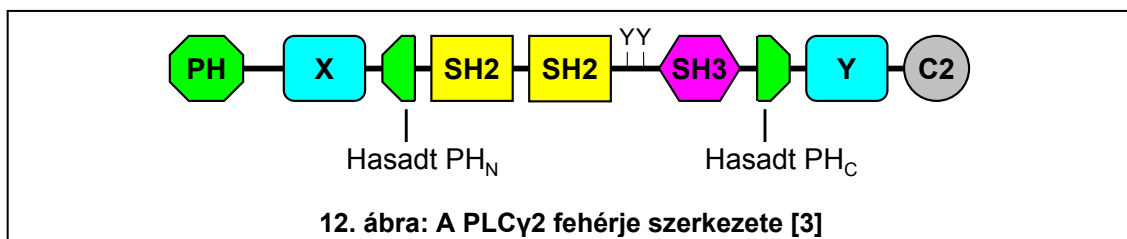
#### 3.6.1. A PLC $\gamma$ 2 szerkezete és működése

A foszfolipáz C (PLC) fehérjecsalád tagjai a sejtmembrán foszfatidilinozitol foszfolipidjeit a glicerín-váz és az inozitol-gyűrű foszfát-csoportja között hasítják, így diacil-glicerolt (DAG) és inozitol-foszfátokat hoznak létre. A PLC fehérjecsaládnak emlősökben 6 alcsoportja (PLC $\beta$ , PLC $\gamma$ , PLC $\delta$  és PLC $\epsilon$ , PLC $\zeta$ , PLC $\eta$ ) van, melyek közül legjobban a PLC $\beta$  és a PLC $\gamma$  fehérjék ismertek. Mind a PLC $\beta$ , mind a PLC $\gamma$  a plazmamembrán PIP<sub>2</sub> lipidjeit hasítja, így DAG mellett inozitol-trisz-foszfátot (IP<sub>3</sub>) hoz létre. A DAG a PKC enzimek aktiválásában, az IP<sub>3</sub> pedig az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-raktárakból való Ca<sup>2+</sup>-ürítésben vesz részt. Míg a PLC $\beta$  fehérjéket elsősorban G-fehérjekapcsolt receptorok aktiválják, a PLC $\gamma$  izoformák aktiválódását tirozin-foszforilációs jelpályák hozzák létre.

A PLC $\gamma$  alcsoportnak két izoformája ismeretes. A PLC $\gamma$ 1 szinte minden sejt típusban megtalálható, funkciója azonban kevésbé ismert, tekintve, hogy

inaktivációja az egér embrionális fejlődésének 8,5 napja körül az embriók elhalását okozza [54]. A PLC $\gamma$ 2 ezzel szemben elsősorban hematopoietikus eredetű sejtekben fordul elő és inaktiválódása a PLC $\gamma$ 1-gyel ellentétben nem okoz embrionális letalitást [55], bár a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egyedek halálozási aránya magasabb és a felnőttkort megéelő PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> hím egerekben csökkent fertilitás figyelhető meg. PLC $\gamma$ 2 hiányában csökken a B-sejtek száma, károsodik a vérlemezkék aggregációja és csökken a különböző immunsejtek (NK-sejtek, hízósejtek, makrofágok, neutrofilek) Fc-receptorokon és integrineken keresztüli aktiválódása [55, 56]. Eddigi ismereteink szerint a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> sejtekben megfigyelhető legtöbb károsodás immunreceptorok (pl. B-sejt-receptorok [55] és Fc-receptorok [56]) vagy immunreceptor-szerű jelátviteli folyamatokat használó receptorok (pl. GpVI, integrinek [38]) jelátvitelének károsodásából adódnak.

A PLC $\gamma$ 2 igen összetett doménszerkezetű molekula (12. ábra). A fehérje N-terminálisától indulva tartalmaz egy PH domént, mely lehetővé teszi a szubsztrátja közelében a sejtmembránhoz való kikötődést. Ettől C-terminális irányban a katalitikus domén N-terminális felét (X domén) találjuk. Ezt követően két SH2 és egy SH3 domént találunk, melyek a más fehérjékkel való kapcsolódást segítik elő. Ezután következik a katalitikus domén C-terminális második fele (Y domén), amely az X doménnel együtt alakítja ki a fehérje katalitikus egységét. A fehérje C-terminális végén egy C2 nevezetű domén következik, aminek a fehérje szabályozásában van szerepe. A PLC $\gamma$ 2 szerkezetében a fenti doméneken túl felismerhető egy további "hasadt" PH-domén két fele az SH2-SH2-SH3 doménblokk két oldalán. A PLC $\gamma$ 2 számos foszforilálható oldalláncot is tartalmaz, melyek közül kiemelendők a C-terminális SH2-domén és az SH3-domén között található foszforilálható tirozin oldalláncok.



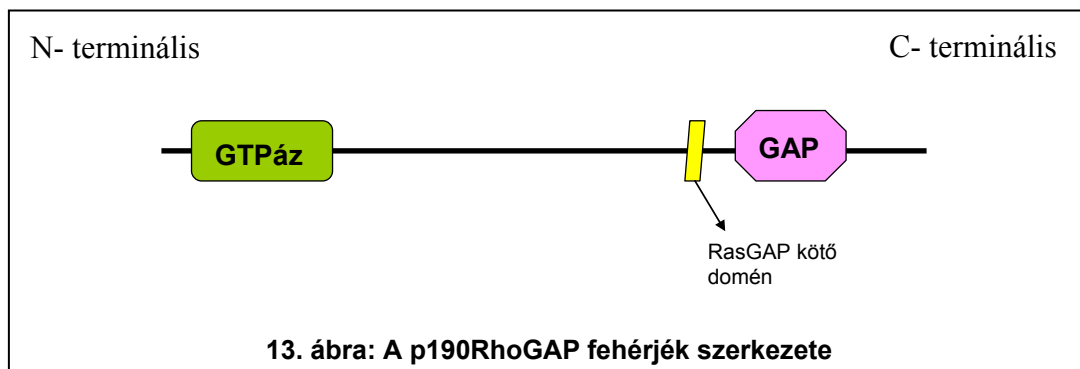
Amint azt korábban említettem, munkánk kezdetén a PLC $\gamma$ 2 immunreceptorok jelátvitelében játszott szerepe [57] és a többek között munkacsoportunk által azonosított immunreceptor-szerű oszteoklaszt-jelpálya [58, 59] együttesen felvetették a



PLC $\gamma$ 2 oszteoklasztokban betöltött esetleges szerepét. Ezt a feltételezést erősítette meg a Koga és munkatársai [37] által a DAP12-től és az FcR $\gamma$ -tól feltételezetten disztálisan elhelyezkedő, az NFATc1 Ca<sup>2+</sup> általi szabályozásáért felelős feltételezett jelpálya is. A PLC $\gamma$ 2 jelenlétét ezen túlmenően saját munkacsoportunk és mások kimutatták egyéb mieloid sejtekben is [56, 57, 60]. Mindezek együttesen arra sarkalltak minket, hogy PhD-munkám első felében megvizsgáljuk a PLC $\gamma$ 2 szerepét az oszteoklasztok fejlődésében és működésében.

### 3.6.2. A p190RhoGAP fehérjék

A p190RhoGAP fehérjék a citoplazmában található fehérjék, melyeknek két izoformája (p190-A avagy ArhGAP35, és p190-B avagy ArhGAP5) ismert. Mindkét izoforma tartalmaz egy N-terminális GTP-kötő domént, különböző fehérje-fehérje interakciós doméneket és egy C-terminális GAP-domént (13. ábra). A GAP-domén fokozza a Rho-családba tartozó Rho, Rac és Cdc42 kis G-fehérjék endogén GTPáz-aktivitását, ezáltal azok inaktíválódását, illetve újabb GTP-áz ciklus beindulását eredményezi. A p190RhoGAP fehérjéknek elsősorban az integrinek jelátvitelében tulajdonítanak fontos szerepet, amikor is a Rho inaktíválásával hozzájárulnak a citoskeleton átrendeződéséhez [61]. Felmerült továbbá a szabadgyökök termelésében fontos NADPH-oxidázok működésének p190RhoGAP általi szabályozása a Rac gátlásán keresztül [62].



Brouns és munkatársai korábban létrehoztak egy célzott mutációt a p190-A-t kódoló *Grlf1* génben egérben. Bár a mutáció célja a gén teljes inaktíválása volt, utólag

kiderült, hogy egy rejtett transzkripciós iniciációs helyről a mutáns allél is képes egy csonkolt p190-A fehérjét szintetizálni, a mutáció tehát hipomorf mutációnak bizonyult [63]. A hipomorf mutációra homozigóta egerek késői embrionális korban elpusztultak, a magzatok pedig jellegzetes idegi fejlődési zavart mutattak [63, 64]. A p190-B genetikai hiánya is késői embrionális letalitást eredményezett, a p190-B-hiányos magzatokban pedig általános növekedési zavar és a sejtméret csökkenése volt megfigyelhető [65].

A p190RhoGAP-fehérjék integrinek jelátvitelében betöltött feltételezett szerepe [61, 63, 64, 66-70] és a  $\beta_3$ -integrinek részvétele az oszteoklasztok fejlődésében és működésében [22] felvetette a lehetőségét a p190RhoGAP-fehérjék szerepének az oszteoklasztok jelátvitelében. Az idegrendszerben ráadásul a p190-A az Src kináz elsődleges szubsztrátja [64], miközben Src<sup>-/-</sup> egerekben súlyos oszteopetrózis figyelhető meg [71]. A p190RhoGAP-fehérjék jelenlétét kimutatták számos mieloid sejtben (neutrofilekben [61, 72, 73], makrofágokban [74] és oszteoklasztokban [75]) és egyes eredmények alapján feltételezhető volt a fehérjék funkcionális részvétele a mieloid sejtek jelátvitelében. Így tehát összefoglalóan elmondhatjuk, hogy p190RhoGap szerepét valószínűsítik fagocita sejtekben citoszkeletális átrendeződésében [76] szerepét mutatták ki az adhézió hatására aktiválódó integrinek jelátvitelében illetve minden olyan esetben kimutatták szerepét, mely a sejt citoszkeletális változásait idézi elő, így adhézióban, migrációban, a sejt alakjának bármilyenemű változása esetén.

A p190RhoGAP-fehérjék funkcionális szerepét azonban mindeddig senki nem vizsgálta oszteoklasztokban. Ezek az adatok arra ösztönöztek bennünket, hogy megvizsgáljuk a p190RhoGAP-izoformák szerepét oszteoklasztok fejlődésében és működésében.

## 4. Célkitűzések

Kísérleteink során a következő kérdésekre szerettünk volna választ kapni:

- 1) Milyen szerepet játszik a PLC $\gamma$ 2 fehérje az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében?
- 2) Milyen jelpálya működésében vesz részt a PLC $\gamma$ 2 oszteoklasztokban?
- 3) Szerepet játszik-e a PLC $\gamma$ 2 az *in vivo* csontanyagcserében egészséges és kóros körülmények között?
- 4) Hogyan vizsgálható az embrionális letalitást okozó p190-A és p190-B fehérjék funkciója oszteoklasztokban?
- 5) Van-e szerepe a p190RhoGAP fehérjének az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében?

## 5. Módszerek

### 5.1. Kísérleti állatok

A PLC $\gamma$ 2-t kódoló *Plcg2* gén inaktiválását eredményező *Plcg2*<sup>tm1Jni</sup> (továbbiakban: PLC $\gamma$ 2<sup>-</sup>) mutációt Dr. James N. Ihle (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA) hozta létre [55] és bocsátotta a mutációt hordozó egereket a rendelkezésünkre C57BL/6 genetikai háttéren. Az egereket heterozigóta (PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup>) formában tartottunk fent PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup>  $\times$  PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup> és/vagy PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup>  $\times$  C57BL/6 pároztatással. Az előbbi pároztatás előnye PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek nyérése volt, míg az utóbbit a mutáció rutin fenntartására és a C57BL/6 genetikai háttérre való folyamatos további visszakeresztezésre használtuk. Az utódokat allél-specifikus PCR-reakció segítségével genotipizáltuk [60].

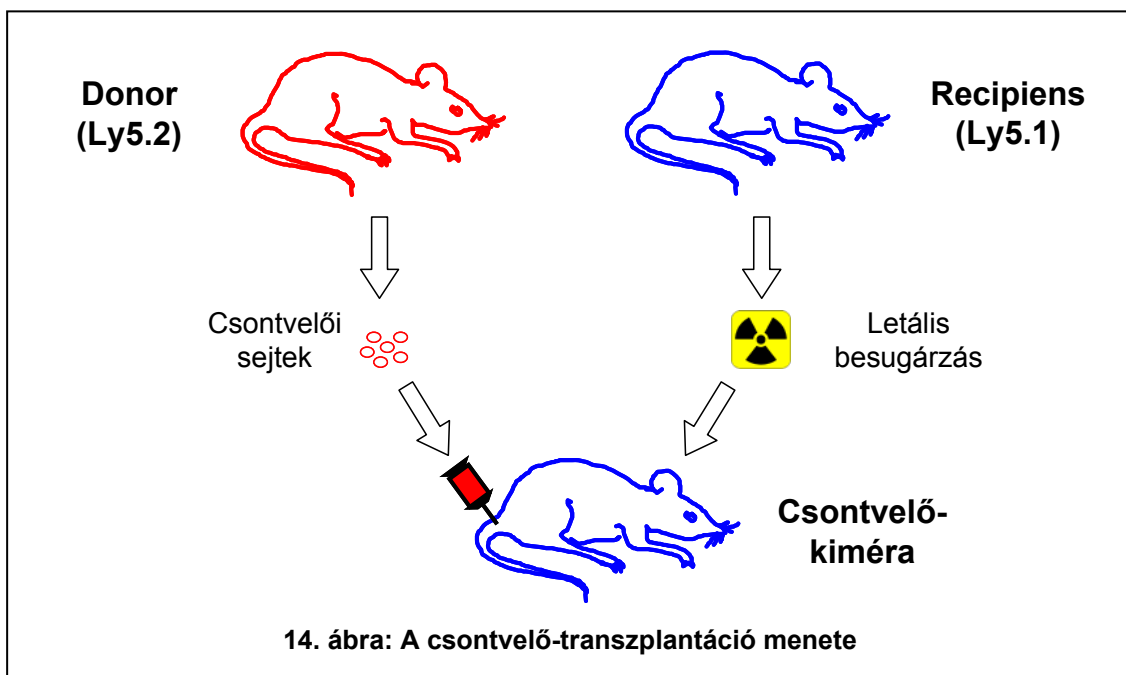
A p190-A fehérjét kódoló *Grlf1* gént inaktiváló *Grlf1*<sup>tm2Jset</sup> (továbbiakban: p190-A<sup>-</sup>) és a p190-B fehérjét kódoló *Arhgap5* gént inaktiváló *Arhgap5*<sup>tm1Jset</sup> (továbbiakban p190-B<sup>-</sup>) mutációkat Dr. Jeffrey Settleman (Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA) hozta létre és bocsátotta rendelkezésünkre az azokat hordozó egereket. Míg a p190-B<sup>-</sup> mutációt már korábban leírták [65], a p190-A<sup>-</sup> mutáció munkánk kezdetén még nem került közlésre (a p190-A fehérjét kódoló *Grlf1* génnek munkánk kezdetén csak egy hipomorf mutációja, a *Grlf1*<sup>tm1Jset</sup> (továbbiakban p190-A<sup>hypo</sup>) [63] mutáció volt ismert). Mivel mind a p190-A, mind a p190-B hiánya késői embrionális letalitást eredményez [65, 77] (ld. még lent), mindkét mutációt heterozigóta formában tartottuk fent C57BL/6 egerekkel való pároztatással. Az utódokat allél-specifikus PCR-reakció segítségével genotipizáltuk [65, 77] (további részleteket ld. az Eredmények fejezetben).

A kísérletekhez szükséges C57BL/6 egereket a budapesti Országos Onkológiai Intézettől vagy a Charles River-től (Wilmington, MA, USA) vásároltuk. A későbbiekben leírt csontvelő-transzplantációhoz szükséges, a C57BL/6 genetikai háttéren az Ly5.1 (CD45.1) allélt hordozó egereket a Jackson Laboratories-től (Bar Harbor, ME, USA) vásároltuk. Az egyes törzseket saját kolóniánkban továbbtenyésztettük. Az egereket konvencionális állatházban egyedileg szellőztetett ketrecállványban (Tecniplast, Buguggiate, Olaszország) tartottuk. A kísérleteket a

Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatvédelmi Bizottsága ajánlására a Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző Állomás engedélyezte.

## 5.2. Csontvelő-kimérák létrehozása

A dolgozatomban leírt *in vitro* kísérletek nagyszámú egér csontvelői sejtjeinek felhasználását tették szükségessé, ami mind a  $PLC\gamma 2^{-/-}$ , mind a p190-A és p190-B-hiányos egerek esetében nehézségbe ütközött. Ezt a problémát olyan csontvelői kimérák létrehozásával oldottuk meg, amelyek csak a hemopoetikus rendszerükben hordozzák az adott gén hiányát okozó mutáció(ka)t. A  $PLC\gamma 2$  esetén ezt  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerek csontvelői sejtjeinek letálisan besugárzott egyedekbe való transzplantációjával oldottuk meg (14. ábra). A donor sejteket további frakcionálás nélkül injektáltuk intravénásan a recipiens egyedekbe, akiket az injekció előtt  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -sugárforrásból 11 Gy dózissal letálisan besugaraztunk. Kontrollként vad típusú C57BL/6 egerekből származó csontvelői sejteket is injektáltunk recipiensekbe vad típusú kimérák létrehozása céljából.

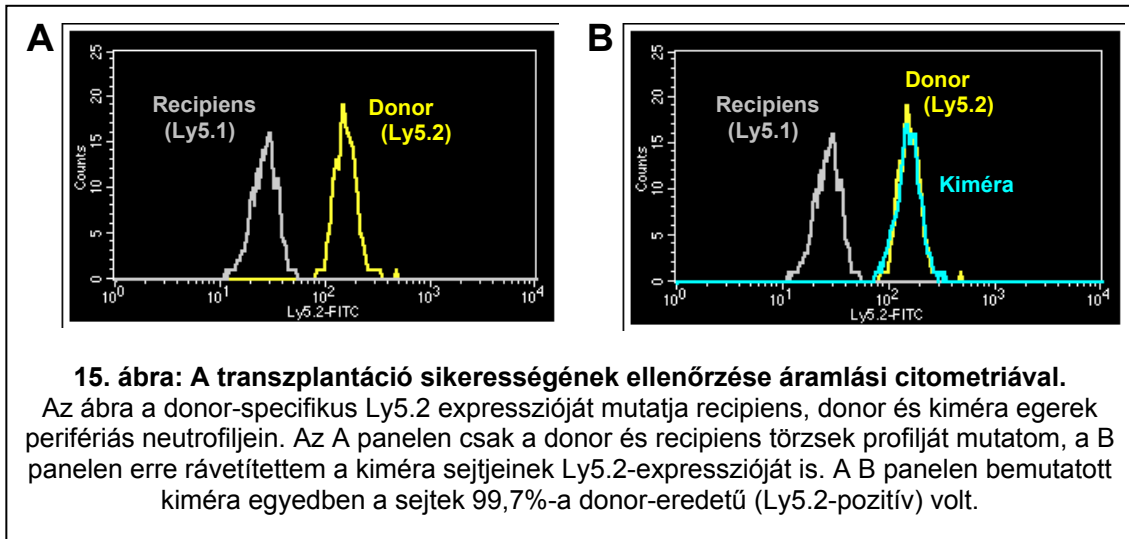


A transzplantáció során recipiens törzsként olyan egereket használtunk, amelyek a C57BL/6 genetikai háttéren homozigóta formában hordozták a Ly5.1 leukocita sejtfelszíni markert kódoló allélt (14. ábra). Mivel a donor sejtek a C57BL/6 háttérből

adódóan Ly5.2 allélt hordoztak, ilymódon lehetővé vált a transzplantáció után az egyes hemopoetikus sejtek eredetének és ezáltal a transzplantáció hatékonyságának az ellenőrzése (ld. alább).

A p190-A<sup>-/-</sup> és a p190-B<sup>-/-</sup> mutációk esetében hasonló csontvelő-kimérákat hoztunk létre azzal a különbséggel, hogy a donor sejteket nem intakt felnőtt egér csontvelőjéből, hanem időzített terhességéből származó magzatok májából nyertük. Kontrollként azonos terhességéből származó, az adott p190RhoGAP-fehérjét expresszáló májsejteket használtunk. A magzati májsejtek transzplantációjának menetét az Eredmények fejezetben tárgyalom.

A transzplantáció hatékonyságát, vagyis hogy milyen mértékben sikerült lecserélnünk a recipiens egerek vérképző rendszerét donor-eredetű vérképző sejtekre, a kapott kimérák perifériás vérében a neutrofil-kompartment (Gr1-pozitív sejtek) Ly5.2 festődésének vizsgálatával, áramlási citometriás módszerrel határoztuk meg (ld. alább). Ehhez a perifériás vérmintákat PE-konjugált anti-Gr-1 antitesttel (RB6-8C5 klón; BD Biosciences) illetve FITC-konjugált anti-CD45.2-vel ("104" klón; BD Biosciences) festettük meg. A 15. ábra egy ilyen ellenőrző kísérlet eredményét mutatja. A kontrollként vizsgált recipiens egerek sejtjei alacsony, a donor egerek sejtjei magas Ly5.2-festődést mutatnak. A vizsgált kiméra sejtjeinek gyakorlatilag mindegyike (99,7%-a) a donorra jellemző festődést mutatott, tehát kimondhatjuk, hogy sikerült gyakorlatilag teljesen lecserélnünk a recipiens vérképző rendszerét a donor sejtjeire. Ezt a vizsgálatot munkám során minden egyes kimérával elvégeztük. A dolgozatban bemutatott kísérletek mindig 95% feletti, általában pedig 98% feletti tisztaságú kimérákkal készültek.



### 5.3. Egér csontvelői sejtek izolálása és tenyésztése

*In vitro* sejt kultúrákhoz a csontvelői sejteket  $PLC\gamma 2^{-/-}$ ,  $p190-A^{-/-}$ ,  $p190-B^{-/-}$  és megfelelő kontroll kiméra egerek comb- és lábszárcsontjainak kimosásával nyertük. A csontokból kiperarált sejteket 10% FCS-sel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel, 0,1 mg/ml streptomocinnel és 10 mM HEPES-sel (pH 7,4) kiegészített  $\alpha$ -MEM (Invitrogen) médiumban egerenként 1-2 db 10 cm átmérőjű szövettenyésztő csészébe helyeztük és 10 ng/ml egér M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) jelenlétében 2 napon keresztül tenyésztettük. Ily módon korai makrofág/oszteoklaszt-előalakokat nyertünk, melyeket az adott vizsgálattól függő módon tenyésztettünk tovább.

Az oszteoklasztok morfológiai vizsgálatához és a génexpressziós vizsgálatokhoz 24-lyukú sejt kultúra-kezelt lemezre lyukanként 1 ml-ben  $5 \times 10^5$ /ml koncentrációjú sejtszuszpenziót helyeztünk és azokat 20-50 ng/ml rekombináns egér M-CSF (Peprotech) és 0-20-50 ng/ml rekombináns egér RANKL (Peprotech) jelenlétében  $\alpha$ -MEM médiumban tenyésztettük. A médiumot 2-3 naponta cseréltük. A 24-lyukú lemezre való kihelyezést követő 3-5. napon a tenyészeteket tartarát-rezisztens savas foszfátáz (TRAP) kit (Sigma, St. Louis, MO, USA) segítségével megfestettük. A tenyészeteket Leica Microsystems (Wetzlar, Germany) DMI6000B inverz mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az oszteoklasztok számolása manuális úton történt, ahol a minimum 3 sejtmaggal rendelkező TRAP-pozitív sejteket tekintettük érett (sokmagvú) oszteoklasztoknak.

Az oszteoklasztok funkcionális vizsgálatához a prekursor sejtekből lyukanként 300 µl  $5 \times 10^5$ /ml koncentrációjú sejtsuszpenziót mesterséges hidroxipatit-felületet tartalmazó 16-lyukú lemezekre (BD BioCoat Osteologic slides; BD Biosciences, Bedford, MA, USA) helyeztük és rekombináns M-CSF és RANKL jelenlétében 10-14 napon keresztül  $\alpha$ -MEM médiumban tenyésztettük. A médiumot 2-3 naponta cseréltük. A hidroxipatit-réteg oszteoklaszt-aktivitást jelző kirágódását Leica DMI6000B inverz mikroszkóp segítségével rögzítettük és az ImageJ szoftver (NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével számszerűsítettük.

Makrofágok kinyerése céljából a sejteket 5 millió sejtenként 10 cm átmérőjű baktérium-tenyésztő edénybe helyeztük és rekombináns egér M-CSF-et termelő CMG14-12 sejtek [78] kondicionált médiumát 10%-ban tartalmazó  $\alpha$ -MEM-ben 5-8 napig tenyésztettük tovább. A médiumot 2-3 naponta cseréltük. A makrofágok érését F4/80 antitest (AbD Serotec, Kidlington, UK) segítségével áramlási citometriával vizsgáltuk [58].

#### 5.4. A génexpresszió vizsgálata

Az oszteoklasztokra jellemző gének expresszióját kvantitatív real-time PCR módszerrel vizsgáltuk.

A makrofág/oszteoklaszt előalakokat a megadott számú napon keresztül inkubáltuk 50 ng/ml M-CSF (makrofágok) vagy 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL (oszteoklasztok) jelenlétében. Ezt követően Trizol reagens (Invitrogen) segítségével RNS-t nyertünk a sejtekből. A reverz transzkripció 100 ng RNS-t felhasználva High Capacity cDNA Archive Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 37 °C-on 2 órán keresztül történt. Ezután ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) készülékkel Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay-t használva megvizsgáltuk az egér *Acp5* (TRAP-ot kódoló gén, Taqman Mm00475698\_m1), *Fos* (c-Fos, Mm00487425\_m1), *Calcr* (kalcitonin receptor, Mm00432271\_m1), *Ctsk* (katepszin K, Mm00484039\_m1), *Nfatc1* (NFATc1; Mm00479445\_m1), *Oscar* (OSCAR; Mm00558665\_m1) és *Tm7sf4* (DC-STAMP; Mm04209235\_m1) génjeinek expresszióját. A normalizáláshoz a *Gapdh* (GAPDH; Mm99999915\_g1) háztartási gén expresszióját is meghatároztuk. A reakciót 40 cikluson keresztül 94 °C-on 12



másodpercig és 60 °C-on 60 másodpercig végeztük. Az egyes reakciókat 3 párhuzamossal végeztük. A relatív transzkript mennyiségét az endogén háztartási *Gapdh* gén mennyiségével összehasonlítva komparatív C<sub>t</sub> módszer segítségével kaptuk meg.

### 5.5. Biokémiai és jelátviteli folyamatok vizsgálata

A PLC $\gamma$ 2, p190-A és p190-B expressziójának vizsgálata céljából a makrofágokat, az oszteoklasztokat és az embrionális agymintákat proteáz- és foszfatáz-gátlószereket és 1% Triton X-100-at tartalmazó lízis pufferben tártuk fel [60]. Az egyes fehérjék jelenlétét Western Blot módszerrel vizsgáltuk.

A különböző fehérjék foszforilációját 5-8 napig rekombináns M-CSF (CMG14-12 sejtek kondicionált médiuma) jelenlétében bakteriális csészében tenyésztett makrofágokon vizsgáltuk. A sejteket 5 mM EDTA-t tartalmazó PBS oldatban felszuszpendáltuk, mostuk, majd 6 órán keresztül szérum- és citokin-mentes médiumban tartottuk. A szérum-megvonást követően szükség esetén a sejteket 8 percre 10  $\mu$ M PP2-vel (EMD Biosciences, Darmstadt, Németország) kezeltük. A sejteket 50 ng/ml M-CSF vagy 50 ng/ml RANKL citokin segítségével szuszpenzióban stimuláltuk vagy 6 cm átmérőjű sejt kultúra-kezelt műanyag csészébe helyeztük. A kontroll sejteket citokinek nélkül szuszpenzióban hagytuk. 30 perces 37 °C-on történő inkubálás után a sejteket proteáz- és foszfatáz-gátlószereket és 1% Triton-X-100-at (teljes sejt lizátumokhoz) vagy azok mellett további 0,1% SDS-t és 0,5% nátrium deoxikolatot (radioimmunoprecipitációs puffer (RIPA); immunprecipitációhoz) tartalmazó pufferben tártuk fel. A minták egy részéből PLC $\gamma$ 2-ellenes antitesttel (Q-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), majd Protein A Sepharose (Zymed, South San Francisco, CA, USA) és Protein G Agarose (Invitrogen) 1:1 arányú keverékével kiprecipitáltuk a PLC $\gamma$ 2 fehérjét.

A sejt lizátumokat és az immunprecipitátumokat Western blot módszerrel vizsgáltuk tovább. A vizsgálathoz a PLC $\gamma$ 2 elleni foszfospecifikus (pTyr 759, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) vagy nem foszfospecifikus (Q-20) antitestet, foszfortirozinra specifikus (4G10; Millipore, Billerica, MA, USA) antitestet, az ERK (#9101; Cell Signaling) és a p38 MAP-kináz (#9211; Cell Signaling) elleni

foszfoszpecifikus antitesteket, az ERK1/2 elleni antitest-keveréket (a C-16 (ERK1) és C-14 (ERK2) antitestek (mindkettő a Santa Cruz-tól) keverékét), valamint a p38 MAP kináz (C-20; Santa Cruz), az I $\kappa$ B $\alpha$  (#9242; Cell Signaling), a p190-A (Clone 30; BD Biosciences), a p190-B (Clone 54; BD Biosciences) és a  $\beta$ -aktin (AC-74; Sigma) elleni elsődleges antitesteket használtunk. Másodlagos ellenanyagként GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) reagenseket alkalmaztunk. Az immunreakciót ECL reagenssel (GE Healthcare), kemilumineszcens módszerrel hívtuk elő és röntgenfilmre exponáltuk.

Szokásos esetben az immunoblot módszer a minták előkészítésével és futtatásával legalább egy napot vett igénybe. A p190-A és p190-B mutáns magzatok azonosításakot azonban egy ennél sokkal gyorsabb immunoblot protokollt kellett használnunk. Ennek érdekében a futtatási, blokkolási, jelölési és mosási lépések idejét radikálisan csökkentettük, ami lehetővé tette a teljes immunoblot vizsgálat 4-5 órára való lerövidítését. Ehhez elengedhetetlenül szükséges volt a nagyon érzékeny és specifikus antitestek megléte.

## 5.6. A petefészkek eltávolítása

Az ösztrogén hiányában létrejövő csontvesztést a petefészkek sebészi eltávolítása (ovariectomia) segítségével vizsgáltuk. Vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egereket 8 hetes korban ketamin és medetomidin keverékével elaltattuk, majd az egerek méhét és petefészket felkerestük. Ezt követően először a petefészkeket lekötöttük, majd ezt követően azokat sebészi úton eltávolítottuk. Áloperált (SHAM) kontroll állatokon ugyanolyan sebészi feltárást végeztünk, de a petefészkek felkeresése után azokat nem távolítottuk el. 6 héttel az operációt követően az állatokat feláldoztuk és comb-, illetve lábszárcsontjaikat további vizsgálatok céljára eltávolítottuk.

## 5.7. Micro-CT analízis és hisztomorfometria

Az intakt egereken történő vizsgálatokat 8-10 hetes hímeiken végeztük. Az ovariectomia és párhuzamos áloperáció hatását 14 hetes nőtény állatokon (a 8. héten végzett műtétet követő 6. héten) vizsgáltuk. A vad típusú kontroll egyedek mindig a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egyedekkel azonos neműek és korúak voltak.

Mikro-CT vizsgálat céljára a combcsontokat 0,1% Na-azidot tartalmazó PBS oldatban tároltuk, majd fogászati gyanta segítségével 1,5 ml-es Eppendorf-csővekben immobilizáltuk. A micro-CT analízist SkyScan 1172 (SkyScan, Kontich, Belgium) készülékkel végeztük. A minták beszkenyelésére 50 kV és 200  $\mu$ A erősségű röntgensugár forrást alkalmaztunk 0,5 mm vastagságú alumínium szűrő mellett. A mintákat 0,5 fokonként forgattuk. Ezek a beállítások 4,5  $\mu$ m oldalhosszúságú izometrikus voxeleket eredményeztek. A háromdimenziós (3D) rekonstrukciót NRecon szoftver segítségével hoztuk létre, és a későbbiekben a CT-Analyser (SkyScan) szoftverrel dolgoztuk fel. A mintáknak a növekedési határtól számított 50. szelettől kezdődő 400 szeletét használtuk fel a vizsgálathoz. A csont-denzitás határértékeinek beállítása vizuális megfigyelés alapján történt. A párhuzamosan készült minták mindegyikénél ugyanazt a határértéket alkalmaztuk. Kétdimenziós csontszelet bemutatásához a növekedési határtól számított 250. szeletet, míg a háromdimenziós képi megjelenítésre a növekedési határtól számított 150. és 450. szelet közötti, 700  $\mu$ m átmérőjű tengelyirányú hengert használtuk fel.

Hisztomorfometriai analízis céljára az egerek tibiájának proximális metafízisét használtuk fel. Az egerek feláldozása után a csontokat 70%-os alkoholban tároltuk, majd egy éjszakán át 4%-os formalinban fixáltuk, amit dekalcinálás nélküli beágyazás követett metilmetakrilban. A polimerizációt követően a metafíziseket 3-4  $\mu$ m-enként lemetszettük és az így kapott mintákat Kossa és Goldner szerint festettük. A metszetekről készült digitális képeket Osteomeasure (Osteometrics, Decatur, CA, USA) szoftver segítségével nemzetközi standardok [79, 80] szerint elemeztük.

## 5.8. Statisztikai analízis

Az *in vitro* kísérletek legalább háromszor megismételtük, az *in vivo* kísérleteket pedig elvégeztük legalább három, korban és nemben megegyező egéren. A micro-CT analízis az esetek nagy részében mindkét combcsonton megtörtént és az így kapott eredmények átlagát használtuk fel a végső számoláshoz. A statisztikai hibák SEM-ben vannak megadva. A statisztikai elemzést különböző elemszámú két populációs nem-párosított t-próbával, illetve kétutas ANOVA-val végeztük. A genotípus és az elvégzett

beavatkozások közötti interakciót Tukey poszt-hok vizsgálattal határoztuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük.

## 6. Eredmények

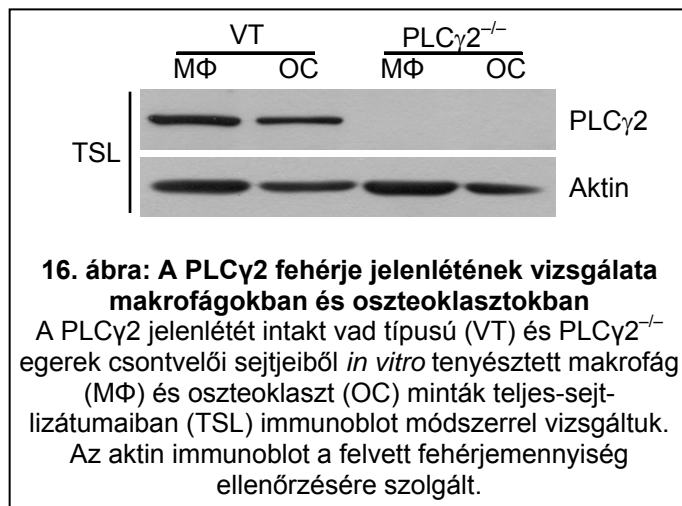
Kísérleteink során a PLC $\gamma$ 2 és a különböző p190RhoGAP fehérjék szerepét vizsgáltuk az oszteoklasztok működésében és az *in vivo* csontanyagcserében. A továbbiakban a két fehérje(család) vizsgálatát külön tárgyalom.

### 6.1. A PLC $\gamma$ 2 szerepének vizsgálata oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Ahogy azt az irodalmi áttekintés alkalmával már említettem, munkacsoportunk korábbi, részben publikált [38], részben munkám kezdetén még nem publikált [60] eredményei, valamint más munkacsoportok publikációi [37] alapján felmerült a PLC $\gamma$ 2 esetleges szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és/vagy működésében. Munkám kezdetén erről a kérdéstről lényegében semmilyen információ nem állt rendelkezésre. A kérdést PLC $\gamma$ 2-hiányos egerek vizsgálatával terveztük megközelíteni.

#### 6.1.1. PLC $\gamma$ 2 jelenléte makrofágokban és oszteoklasztokban

Kísérletes tevékenységem során először megvizsgáltuk a PLC $\gamma$ 2 jelenlétét egér csontvelői sejtekből *in vitro* differenciáltatott makrofágokban és oszteoklasztokban. Amint az a 16. ábrán látható, a PLC $\gamma$ 2 vad típusú makrofágokban és oszteoklasztokban egyaránt jelen van és a fehérje expressziója összevethető a két sejtípusban. A PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup>sejtkultúrákban ezzel szemben nem jelenik meg a PLC $\gamma$ 2 immunreaktivitás, ami az alkalmazott immunoblot módszer specificitását igazolja.



### 6.1.2. PLC $\gamma$ 2-hiányos egerek tenyésztése és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> kimérák létrehozása

További kísérleteinket vad típusú és PLC $\gamma$ 2-hiányos egerek és csontvelői eredetű sejtek vizsgálatával terveztük végrehajtani. Ehhez nagy mennyiségű PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egérre, illetve *-in vitro* kísérletek céljára– PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> csontvelői sejteket hordozó egérre volt szükségünk. A PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egereket létrehozó munkacsoporttól kapott információkkal megegyezően sajnos nem sikerült homozigóta formában fenntartanunk a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egértörzset. Ezért a PLC $\gamma$ 2<sup>-</sup> mutáció heterozigóta (PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup>) egyedekben való fenntartása mellett döntöttünk. A törzset PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup> × PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup> vagy PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup> × C57BL/6 pároztatással tartottuk fent. Az utódokat allél-specifikus PCR reakció segítségével genotipizáltuk [60]. Nagyszámú utód genotipizálása alapján azt tapasztaltuk, hogy a heterozigóta PLC $\gamma$ 2 egerek (PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup> × PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup>) kereszteződéséből származó, az elválasztást (2-3. hét) megelőző PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> utódok aránya még ilyen keresztezés mellett is csak kb. a felét éri el a mendeli öröklődés alapján várható 25%-nak (1. táblázat).

Genotípus	PLC $\gamma$ 2 <sup>+/+</sup>	PLC $\gamma$ 2 <sup>+/-</sup>	PLC $\gamma$ 2 <sup>-/-</sup>	Összesen
Várt arány	25%	50%	25%	100%
Kapott arány	32%	56%	12%	100%

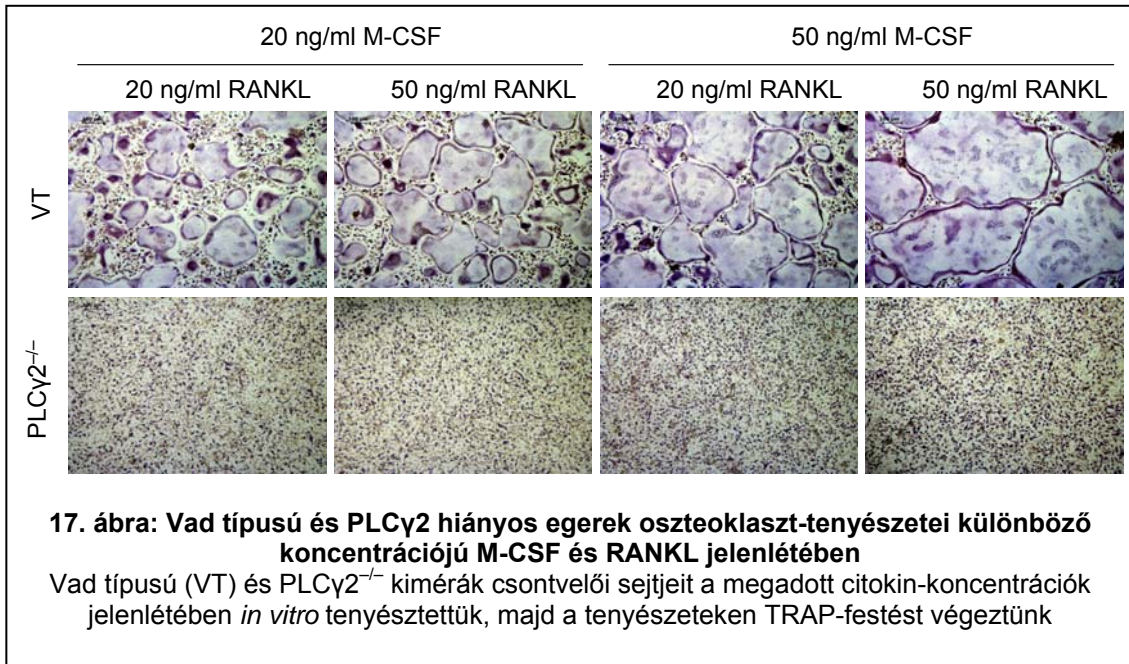
**1. táblázat: PLC $\gamma$ 2<sup>+/-</sup> állatok pároztatásából született utódok genotípusa**  
(379 utód 2-4 hetes korban történt genotipizálási eredményei alapján)

A fentiek alapján nyilvánvalóvá vált számunkra, hogy a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek csontanyagcseréjének és oszteoklasztjainak vizsgálatára nagyon nehezen tudnánk megfelelő számú intakt PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egeret kitenyészteni. Mivel az oszteoklasztok *in vitro* vizsgálatához elégséges, ha az egereknek csak a csontvelői sejtjei PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> genotípusúak, a továbbiakban úgy döntöttünk, hogy a csontvelő-transzplantáció segítségével PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> hemopoetikus rendszerrel rendelkező csontvelő-kimérákat hozunk létre. Ennek a megközelítésnek az az előnye, hogy egy PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> donor egér csontvelői sejtjeit akár 10 recipiensbe is be lehet injektálni, ilymódon meg lehet sokszorozni az *in vitro* kísérletekre rendelkezésre álló egerek számát. A transzplantációt

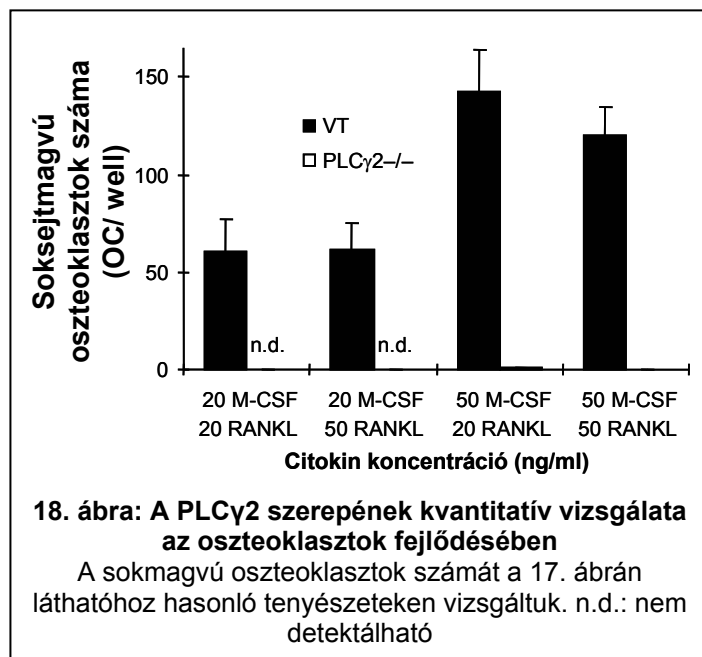
a Módszerek fejezetben leírtaknak (14. ábra) megfelelően letálisan besugarazott, Ly5.1 markert hordozó recipiens egerek felhasználásával végeztük. Donorként felnőtt vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek csontvelői sejtjeit alkalmaztuk. A transzplantáció sikerességét a 15. ábrán bemutatott módszer segítségével áramlási citometriás megközelítéssel ellenőriztük. A keringő neutrofil kompartmentben a vizsgált kimérák döntő részében a sejtek >95%-a donor eredetűnek bizonyult. További ellenőrzés céljából esetenként a 16. ábrán bemutatotthoz hasonló módon immunoblot módszerrel is megvizsgáltuk a PLC $\gamma$ 2 jelenlétét a kimérákból származó makrofágok teljes-sejt-lizátumaiban. Itt nem mutatott eredményeink alapján a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> kimérák csontvelői sejtjeiből tenyésztett makrofágokban teljes mértékben hiányzott a PLC $\gamma$ 2 fehérje, ami megerősíti, hogy ténylegesen lecseréltük a recipiens egyedek vérvépzését a donor sejtekből származóra.

### 6.1.3. Oszteoklasztok *in vitro* fejlődése és működése

A következőkben azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiánya milyen hatással van az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésére és működésére. Ennek érdekében vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> csontvelő-kimérák hosszú csöves csontjaiból a Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően különböző (20 és 50 ng/ml) M-CSF és RANKL koncentráció jelenlétében megpróbáltunk oszteoklasztokat tenyészteni. Az oszteoklasztok fejlődését a rájuk specifikus TRAP enzim citokémiai festése után a sejtek morfológiájának és a sejtmagok számának a vizsgálatával követtük. A 17. ábrán látható, hogy vad típusú csontvelői sejtekből mindegyik alkalmazott citokin-kombináció mellett kialakultak sokmagvú TRAP-pozitív óriássejtek (oszteoklasztok), illetve hogy a citokinek (különösen az M-CSF) koncentrációjának a megemelése jelentősen fokozta az oszteoklasztok számát és méretét. A PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> csontvelői sejtekből ezzel szemben egyik citokin-koncentráció mellett sem alakultak ki sokmagvú óriássejtek, bár a keletkezett mononukleáris sejtek jelentős része TRAP-pozitívnak mutatkozott (17. ábra). A PLC $\gamma$ 2 hiánya tehát drámaian csökkentette a TRAP-pozitív sokmagvú oszteoklasztok számát, de nem akadályozta meg teljesen az oszteoklasztok biokémiai érésére jellemző TRAP enzim expresszióját.



A fenti kísérletet számos alkalommal elvégeztük és megszámláltuk a 24-lyukú lemez egy lyukában található oszteoklasztok számát. Ezen kísérletek során azon sejteket tekintettük oszteoklasztoknak, melyekben legalább 3 sejtmag volt megfigyelhető és pozitívan festődtek az oszteoklaszt-marker TRAP enzimre. Eredményeink összegzését mutatja a 18. ábra. Az ábrából kitűnik, hogy vad típusú tenyészetekben már a fiziológiához közeli (20 ng/ml M-CSF és 20 ng/ml RANKL)

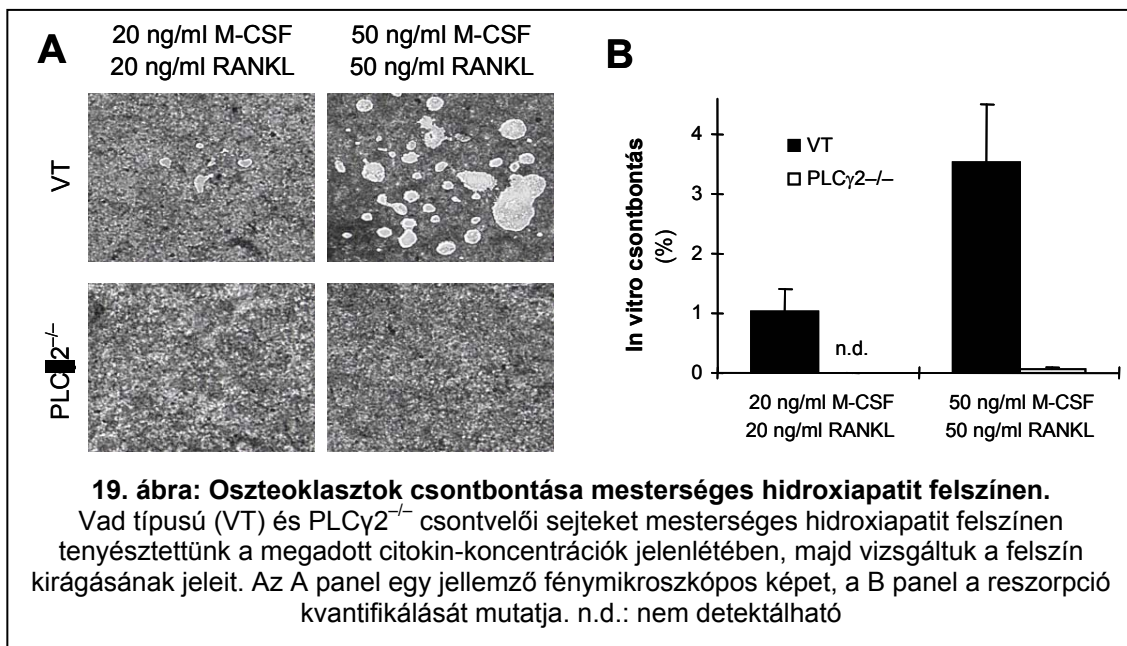


citokin-koncentrációk mellett is jól megfigyelhető az oszteoklasztok kialakulása és az oszteoklasztok száma az M-CSF koncentráció 50 ng/ml-re emelése hatására lényegében megduplázódik. PLCγ2<sup>-/-</sup> tenyészetekben ezzel szemben alacsony M-CSF-koncentráció mellett egyáltalán nem alakulnak ki oszteoklasztok és azok száma magas M-CSF-koncentráció jelenlétében is elhanyagolhatónak tűnik. Ezen kvantitatív eredményeink



megerősítik, hogy az M-CSF és RANKL hatására *in vitro* kialakuló multinukleáris oszteoklasztok fejlődéséhez elengedhetetlen a PLC $\gamma$ 2 jelenléte.

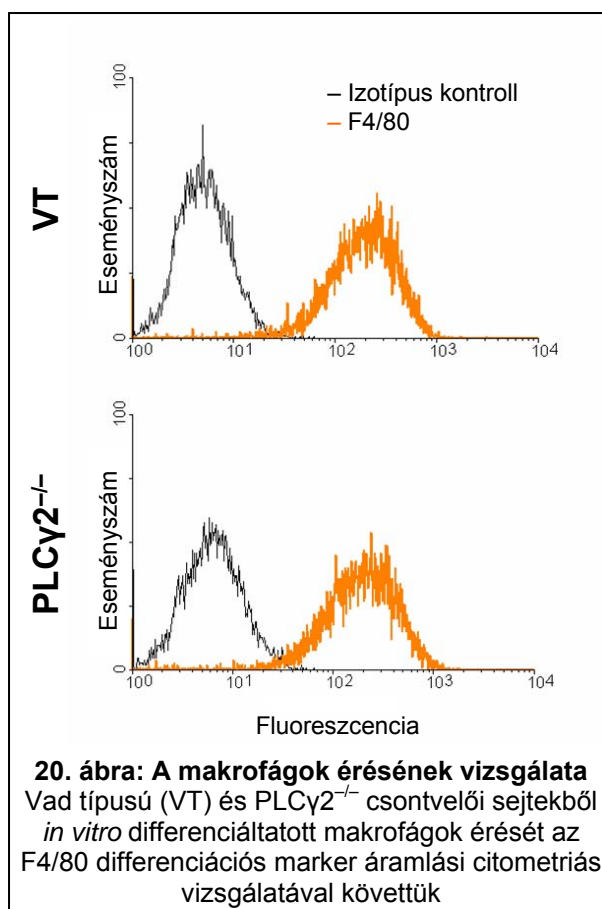
Ezt követően azt szeretnénk volna megtudni, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiánya milyen hatással van az oszteoklaszt-kultúrák funkcionális (reszorpciós) aktivitására. Ennek érdekében vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> kimérák csontvelői sejtjeit szövetkultúra-kezelt műanyag felszín helyett mesterséges hidroxipatit felszínre helyeztük és azon tenyésztettük különböző M-CSF és RANKL-koncentrációk jelenlétében. A tenyésztés végén a sejteket eltávolítottuk és a hidroxipatit-felszín morfológiáját fázis-kontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk. A 19. ábrán bemutatott eredményeink jól mutatják, hogy vad típusú kultúrák esetében már 20 ng/ml M-CSF és 20 ng/ml RANKL jelenlétében is jól kivehető bontási területek (az ábrán világosabb területek) jönnek létre és ezek mérete és száma 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében jelentősen emelkedik. Hasonlóképpen kezelt PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> sejtek tenyésztésében ugyanakkor alacsony citokin-koncentrációk mellett egyáltalán nem, magas citokin-koncentrációk mellett pedig csak elvétve jelennek meg kisebb bontási területek. Ez a megfigyelés arra utal, hogy PLC $\gamma$ 2 hiányában tényleg nem jön létre a szerves csontmátrix oszteoklasztok általi bontása, ami feltehetőleg legalábbis részben az oszteoklasztok 17-18. ábrán bemutatott fejlődési zavarának az eredménye.



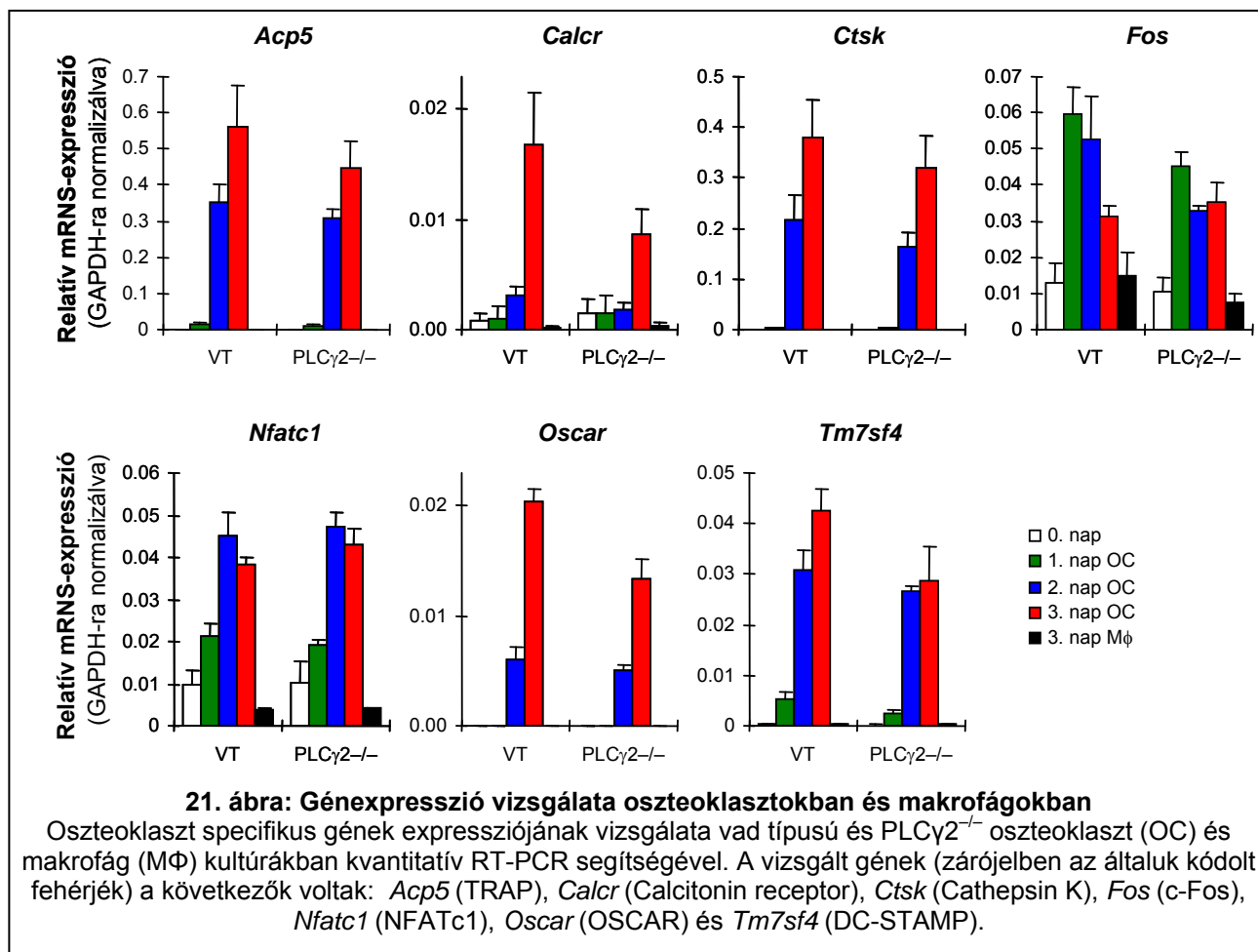
#### 6.1.4. Mi okozza az oszteoklaszt-fejlődés zavarát?

A következőkben azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy mi okozza a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> sejtek multinukleáris oszteoklaszt irányba történő differenciációnak a zavarát. Elsőként azt szeretnénk volna kizárni, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiánya a mieloid sejtek differenciációjának általános zavarát okozza. Ennek érdekében vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> makrofágotenyészetek sejtjeiben megvizsgáltuk a makrofágok érése során megjelenő F4/80 marker expresszióját. Amint azt a 20. ábra mutatja, a PLC $\gamma$ 2 hiánya nem befolyásolta a makrofágok F4/80 expresszióját. Itt nem bemutatott kísérleteinkben nem találtunk érdemi különbséget a vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> makrofágok morfológiája között sem. Ezen kívül munkacsoportunk neutrofil granulocitákon végzett kísérletei [60] is azt mutatták, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiányában nem károsodik a neutrofilek érése, a vizsgált sejt felszíni markerek expressziója és számos, csak az érett neutrofilekre jellemző sejtválasz létrejött. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiánya nem vezet a mieloid sejtek differenciációjának általános zavarához és ezáltal nem valószínű, hogy ez lenne az oka az oszteoklaszt-fejlődés PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> tenyészetekben megfigyelhető károsodásának sem.

Az oszteoklasztok fejlődése során az egyik legdrámaibb változást számos oszteoklaszt-specifikus gén expressziója mutatja. Ezek közé tartozik a TRAP-ot kódoló gén (*Acp5*), az oszteoklasztokra jellemző calcitonin-receptor (*Calcr*) és katepszin K (*Ctsk*) génje, a C-Fos (*Fos*) és NFATc1 (*Nfatc1*) transzkripciós faktorokat, valamint az oszteoklasztok sejt felszíni OSCAR (*Oscar*) és DC-STAMP (*Tm7sf4*) receptorait kódoló gének. A következőkben kvantitatív RT-PCR



reakció segítségével megvizsgáltuk ezen gének expressziójának változását az oszteoklasztok fejlődése során. A kísérletekhez vad típusú és  $PLC\gamma 2^{-/-}$  kimérák csontvelői sejtjeiből 2 napos alacsony (10 ng/ml) M-CSF kezelés hatására létrejövő makrofág/oszteoklaszt előalakokat használtunk (0. napos sejtek), melyeket a továbbiakban 1-3 napig 50 ng/ml M-CSF (makrofágok) vagy 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL (oszteoklasztok) jelenlétében tenyésztettünk. A 21. ábrán jól látható, hogy RANKL jelenlétében (oszteoklaszt minták; "OC") mindegyik vizsgált gén expressziója nagymértékben emelkedett, míg RANKL hiányában (makrofág minták; "MΦ") mindegyik gén expresszió-növekedése elmaradt. Ez azt mutatja, hogy az általunk alkalmazott módszer ténylegesen alkalmas a vizsgált gének oszteoklaszt-specifikus expressziójának a kimutatására. Érdekes módon a vizsgált gének mindegyikének expressziója RANKL-kezelt  $PLC\gamma 2^{-/-}$  tenyészetekben is megnőtt és ez a növekedés az esetek többségében a vad típusú sejteknél megfigyelthez hasonló mértékű volt. A  $PLC\gamma 2$  hiánya tehát nem okozza az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának drámai csökkenését, ezért nem valószínű, hogy ez állna a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  tenyészetekben megfigyelhető oszteoklaszt-fejlődési zavar hátterében.



Összességében elmondhatjuk, hogy a fenti kísérleti eredmények alapján sikerült kizárnunk két lehetséges mechanizmust a  $PLC\gamma 2$  oszteoklaszt-fejlődésben betöltött szerepének magyarázatára. Bár továbbra sem teljesen értjük, hogy a  $PLC\gamma 2$  hiánya miért eredményezi az oszteoklasztok fejlődésének zavarát, munkacsoportunk további, folyamatban levő kísérletei arra utalnak, hogy a  $PLC\gamma 2$  feltehetőleg a mononukleáris oszteoklaszt-előalakok fúziójában vehet részt, ami magyarázatul szolgálna a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  tenyészetekben megfigyelhető nagyszámú mononukleáris, de TRAP-pozitív (tehát biokémiaileg legalábbis részben oszteoklaszt-szerű) sejtek jelenlétére.

### 6.1.5. A $PLC\gamma 2$ aktiválódási mechanizmusának vizsgálata

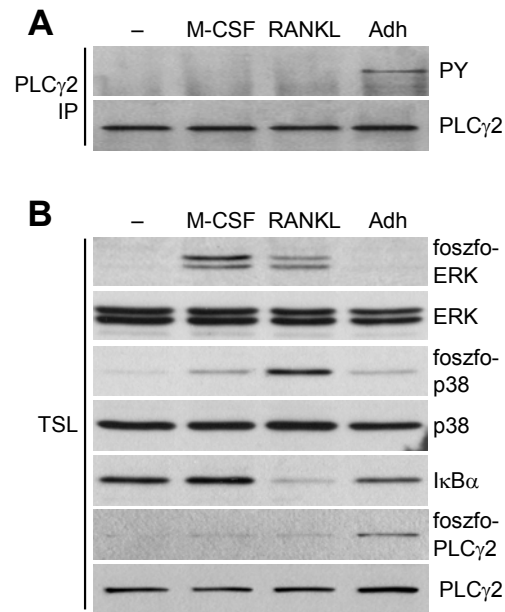
Ezt követően azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az oszteoklasztok fejlődését kiváltó különböző extracelluláris szignálok közül melyik hozza létre a  $PLC\gamma 2$

aktiválódását. Amint azt korábban említettem, az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez szükségesek az M-CSF és RANKL citokinek és elengedhetetlen a folyamathoz a sejtek

felszínhez (szövetkultúra-kezelt műanyaghoz vagy csontmátrixhoz) való adhéziója is [22]. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy e három stimulációs útvonal közül melyik hozza létre a PLC $\gamma$ 2 aktiválódását. A kísérleteket technikai okok miatt az oszteoklaszt-előalakokkal rokon makrofágokon végeztük. A sejteket szuszpenzióban stimuláltuk 50 ng/ml M-CSF vagy 50 ng/ml RANKL citokinnel, vagy szövetkultúra-kezelt műanyag

felszínre helyeztük őket. A kísérletek értelmezése szempontjából kiemelt jelentőségű, hogy az M-CSF és RANKL stimulációt nem adherens körülmények között végeztük, így kizárhatjuk egy másodlagos adherens aktiváció hatását. A PLC $\gamma$ 2 aktiválódását a fehérje foszforilációjának vizsgálatával követtük. Amint az a 22. ábrán látható, a sejtek adhéziója mind immunprecipitációt követő foszfortirozin-immunoblot módszerrel (A panel), mind foszfo-specifikus PLC $\gamma$ 2 antitestekkel vizsgálva (B panel) a PLC $\gamma$ 2 foszforilációját indukálta. Ezzel szemben sem az M-CSF, sem a RANKL nem okozott érdemi PLC $\gamma$ 2-foszforilációt annak ellenére, hogy mindkét stimulus kiváltotta a rá ismert jellemző jelpályák aktiválódását (M-CSF esetében az ERK foszforilációját, RANKL esetében pedig a p38 MAP-kináz foszforilációját és az I $\kappa$ B $\alpha$  degradációját). Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a PLC $\gamma$ 2 aktiválódása a sejtadhézió, nem pedig az M-CSF vagy a RANKL hatására jön létre.

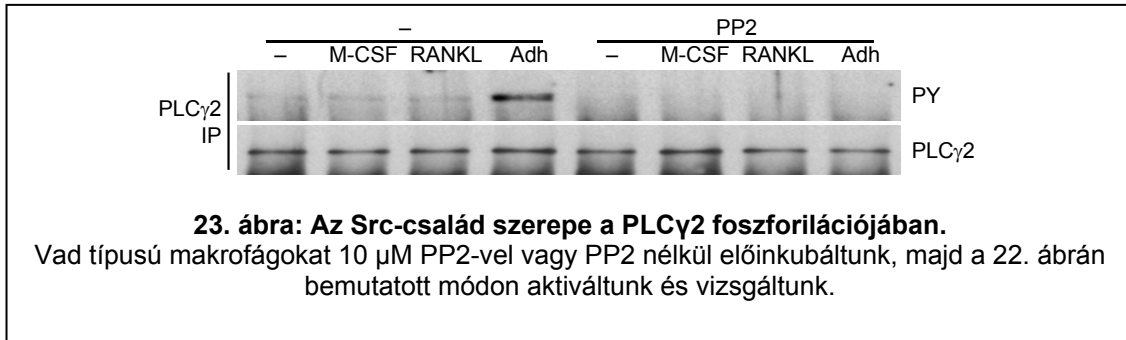
A következőkben azt szeretnénk tudni, hogy milyen folyamatok vesznek részt a PLC $\gamma$ 2 adhézió-függő aktiválásában, különös tekintettel az Src-típusú tirozin-kinázokra, melyek más sejt típusokban az integrin-függő sejtadhézió központi



**22. ábra: A PLC $\gamma$ 2 foszforilációja adhézió hatására jön létre.**

Vad típusú makrofág-tenyészeteket 50 ng/ml M-CSF-fel vagy 50 ng/ml RANKL-lel stimuláltunk szuszpenzióban, vagy szövetkultúra-lemezre helyeztük őket (Adh). A sejtek jelátvitelét immunprecipitáció (IP) és immunoblot módszerrel vizsgáltuk. PY: foszfortirozin; TSL: teljes-sejt lizátum

jelátvivő molekulái. Amint az a 23. ábrán látható, a sejtek PP2-vel, az Src-kinázok gátlószerevével való előkezelése teljes egészében megszüntette a PLC $\gamma$ 2 adhézio-függő foszforilációját. A PLC $\gamma$ 2 aktiválódása a sejtadhézió során tehát feltételezhetően az Src-típusú tirozin-kinázok részvételével jön létre.



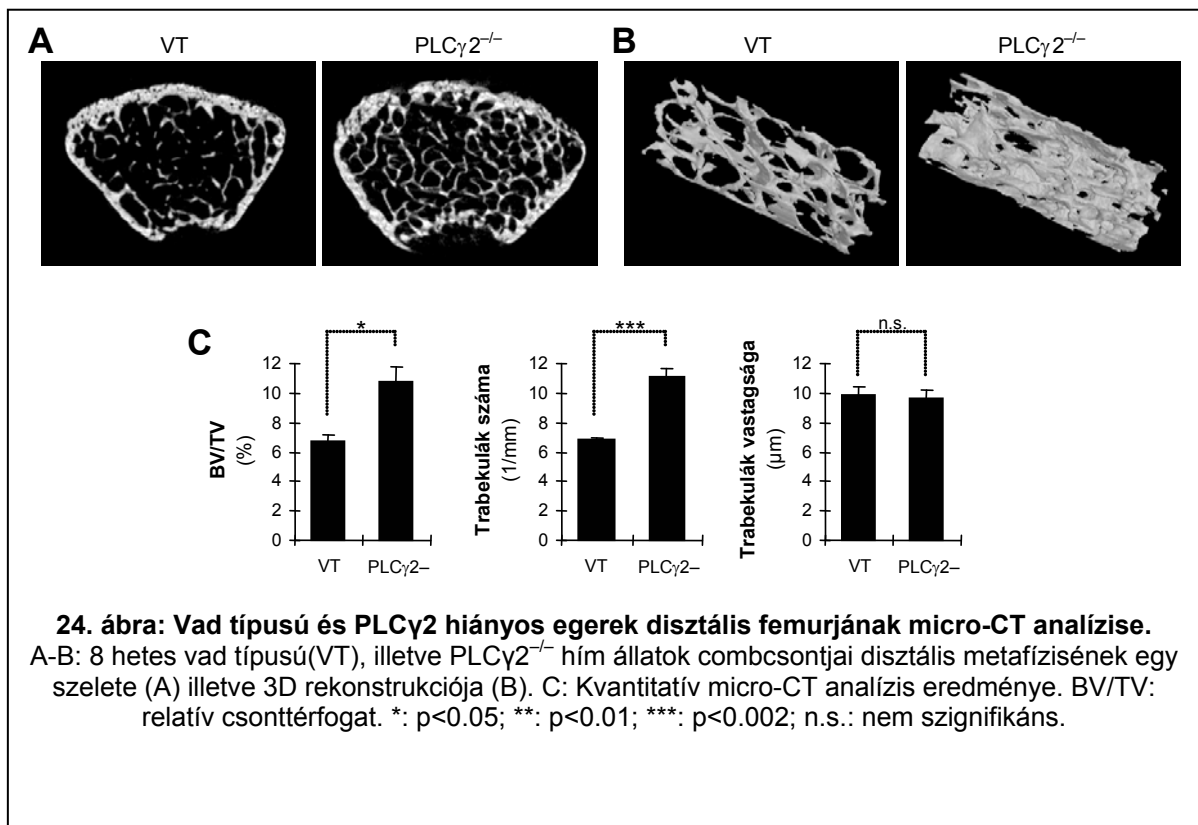
A fenti eredmények összességében arra utalnak, hogy a PLC $\gamma$ 2 az oszteoklasztok fejlődése során a sejtadhézió jelátvitelében játszik szerepet. Ennek igazolására azonban szükséges lenne kimutatni, hogy PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> sejtekben károsodtak a sejtadhézió hatására aktiválódó disztális jelátviteli lépések. Bár PhD-munkám során számos ezzel kapcsolatos előzetes kísérletet végeztünk, a kérdés megnyugtató tisztázása további kutatómunkát tesz szükségessé.

### 6.1.6. Intakt PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek csontjainak vizsgálata

Bár az oszteoklaszt-tenyészetek eddig bemutatott funkcionális és biokémiai vizsgálata igazolta a PLC $\gamma$ 2 szerepét az oszteoklasztok létrejöttében az adott *in vitro* körülmények között, ezek az eredmények önmagukban nem bizonyítják a PLC $\gamma$ 2 szerepét az *in vivo* csontanyagcsere folyamataiban. Kísérleteinket ezért intakt vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek csontjainak vizsgálatával folytattuk.

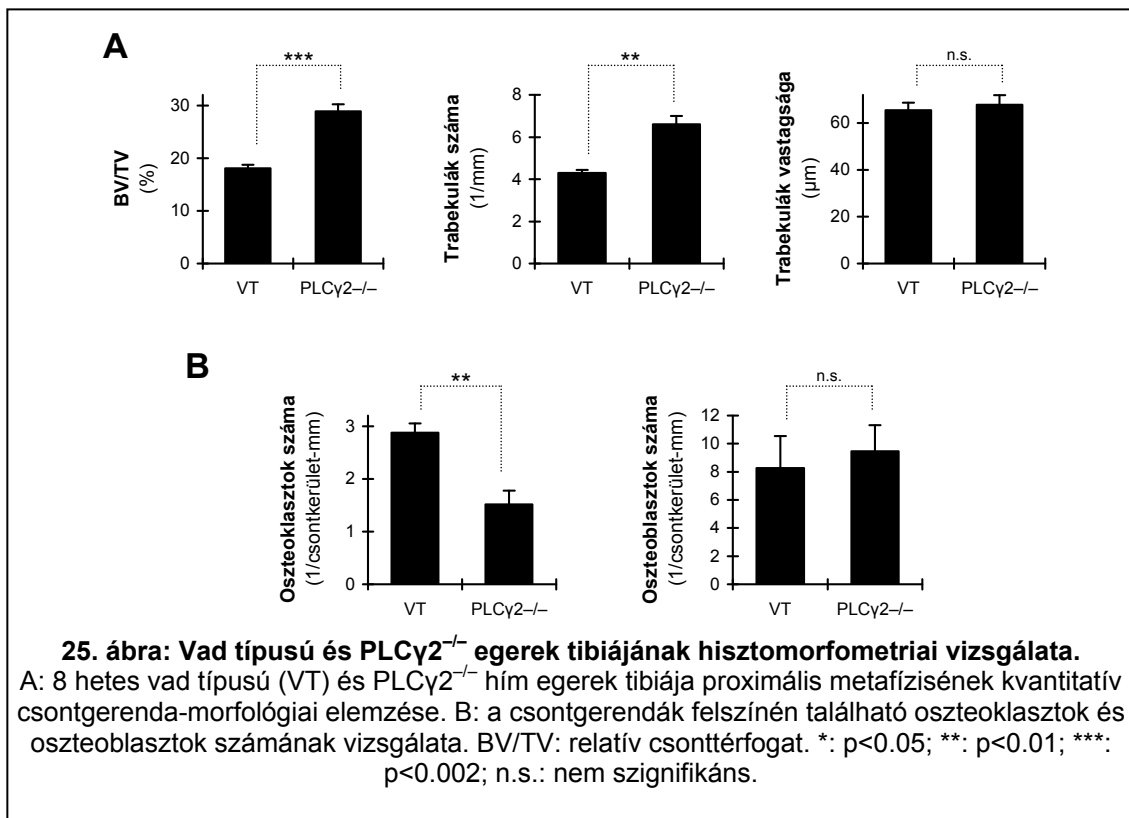
Az *in vivo* kísérletek első részében 8-10 hetes (páronként azonos korú) vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> hím egerek femurjának disztális metafízisét vizsgáltuk mikro-CT módszerrel (24. ábra). Mind az ábra A paneljén bemutatott kétdimenziós csontszelet, mind a trabekuláris állomány egy részének a B panelen látható háromdimenziós rekonstrukciója jól mutatja, hogy a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerekben jelentősen nagyobb a trabekuláris csontállomány mennyisége. A továbbiakban a háromdimenziós

rekonstitúció kvantitatív vizsgálatával megpróbáltuk számszerűsíteni a csontszerkezet változásait (24. ábra C panel). A relatív csonttérfogatra vonatkozó BV/TV (bone volume/total volume) paraméter azt mutatja, hogy a vizsgált ösztérfogat hány százaléka a ténylegesen mineralizálódott csontállomány. A BV/TV érték a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben szignifikánsan (61%-kal) magasabb volt, mint a vad típusú állatokban ( $p = 0,011$ ;  $n = 5$ ). A BV/TV emelkedésének hátterében a csontgerendák számának és/vagy azok vastagságának az emelkedése állhat. Ezt a kérdést megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben jelentősen megemelkedett az egységnyi távolságra eső csontgerendák száma, míg a csontgerendák átlagos vastagsága nem változott (24. ábra C panel). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a  $PLC\gamma 2$  hiányában a trabekulák számának a megemelkedése a mineralizálódott csontállomány arányának a megnövekedését okozza.



A fentiek megerősítése és további elemzése érdekében hisztomorfometriai vizsgálatokat is végeztünk a vad típusú és  $PLC\gamma 2$ -hiányos egerek proximális tibiájának trabekuláris hálózatán (25. ábra). Amint az az ábra A paneljén látható, a csontgerendák

hisztomorfometriai vizsgálata megerősítette a korábbi micro-CT vizsgálatok (24. ábra C panel) eredményeit, miszerint a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben a trabekulák számának megemelkedése miatt megemelkedett a mineralizálódott csontállomány relatív térfogata (BV/TV). A mikro-CT-vel szemben a hisztomorfometriai vizsgálat a csontsejtek számának a meghatározását is lehetővé teszi. Amint az a 25. ábra B paneljén látható, a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben az egységnyi csontfelszínre jutó oszteoklasztok számának a jelentős csökkenését figyeltük meg. Az oszteoblasztok aránya ezzel szemben nem mutatott eltérést a vad típusú egerekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a  $PLC\gamma 2$  hiánya *in vivo* körülmények között is gátolja az oszteoklasztok kialakulását, és hogy a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben megfigyelhető csontállomány-emelkedést feltételezhetően az oszteoklasztok zavara, nem pedig az oszteoblasztok túlműködése okozza.



### 6.1.7. Ovariektómia hatásának vizsgálata

A bazális csontátépülésben betöltött szerepük mellett az oszteoklasztoknak fontos szerepük van a kóros csontbontás, köztük a menopauzát követő oszteoporózis, a gyulladásos csontbetegségek által kiváltott csonteróziók és a csontmetasztázisok körüli

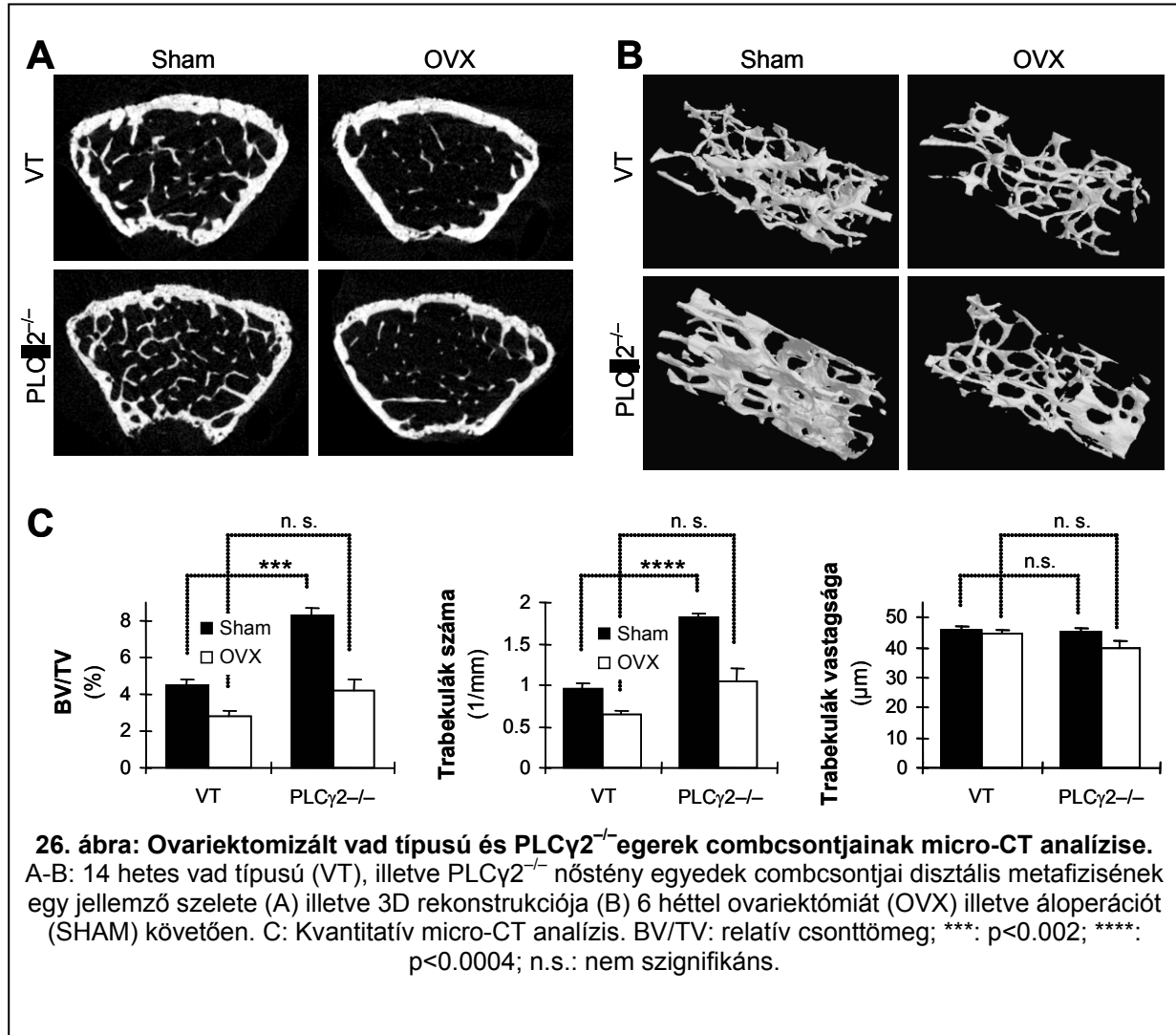


csontfelszívódás kialakulásában is. Ezek közül a továbbiakban az ovariectomia hatására létrejövő csontszerkezet-változásokat (mint a postmenopauzális oszteoporózis állatmodelljét), illetve a PLC $\gamma$ 2 ezen kórfolyamatban betöltött szerepét vizsgáltuk. Előzetes feltételezéseink alapján azt vártuk, hogy a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerekben ovariectomia hatására nem vagy csak csökkent mértékben alakul ki csontvesztés, tehát az ovariectomizált PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> állatokban a hasonlóan kezelt vad típusú egerekhez képest még nagyobb mértékű különbséget látunk, mint intakt egerekben.

Az ovariectomia (OVX) hatásának vizsgálatára vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> nőstény egerek mindkét oldali ovariumát 8 hetes korban eltávolítottuk, majd további 6 hét elteltével az állatokat leöltük és megvizsgáltuk a disztális femur és a proximális tibia trabekuláris állományának a szerkezetét. Kontrollként olyan áloperált (Sham) állatokat használtunk, amelyekben a műtéti feltárást elvégeztük, de nem távolítottuk el az ovariumokat.

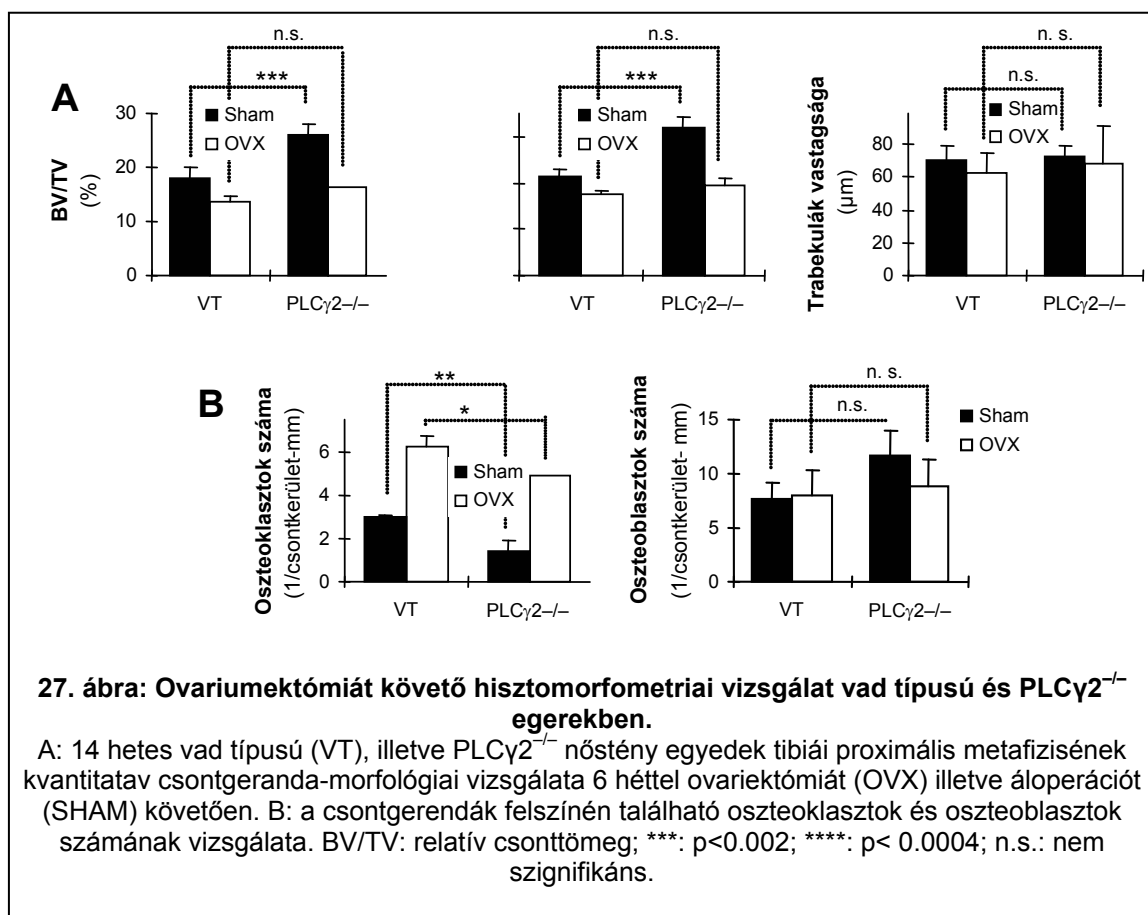
A femur disztális metafízisének mikro-CT vizsgálata (26. ábra) azt mutatta, hogy vad típusú egerekben az ovariectomia hatására jelentős mértékben csökkent a trabekuláris csontállomány mennyisége és az azt jellemző relatív csonttér fogat (BV/TV) érték. Ezt a csökkentést elsősorban a csontgerendák számának, nem pedig azok vastagságának a csökkenése okozta (26. ábra C panel). Várakozásainkkal ellentétben ugyanakkor ovariectomia hatására a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek disztális femurjában is létrejött a trabekuláris csontállomány jelentős csökkenése, amit ezekben az egerekben is a trabekulák számának a csökkenése eredményezett. A két genotípussal kapott eredmények összehasonlítása azt mutatta, hogy a létrejövő csontlebontás (a BV/TV érték csökkenése) mind abszolút értékben, mind arányában lényegesen magasabb volt a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerekben (a BV/TV 4,1 %-ponttal való, vagyis 50%-os csökkenése), mint a vad típusú egerekben (a BV/TV 1,6 %-ponttal való, vagyis 36%-os csökkenése). Ez a különbség a genotípus és a sebészi beavatkozás hatásának interakcióját vizsgáló Tukey poszt-hok tesztben is szignifikánsnak bizonyult ( $p = 0,009$ ), vagyis a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerekben szignifikánsan nagyobb csontvesztés következett be, mint a vad típusú állatokban. A jelenséget összességében legjobban talán az szemlélteti, hogy míg az áloperált vad típusú és PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek BV/TV értéke között statisztikailag igen jelentős különbség mutatkozott ( $p = 0,00031$ ;  $n = 7$  (VT) vs. 4 (PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup>)), addig a két

genotípus közti különbség ovariectomiát követően már nem volt megfigyelhető ( $p = 0,25$ ;  $n = 7$  (VT) vs. 4 ( $PLC\gamma 2^{-/-}$ )).



A fenti, várakozásainkkal ellentétes megfigyelés megerősítése céljából a következőkben hisztomorfometriai módszerrel is megvizsgáltuk a trabekuláris csontszerkezetet (27. ábra). A tibia proximális metafízisének vizsgálata megerősítette, hogy az áloperált  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben a trabekulák számának a megnövekedése miatt a vad típusú egereknél lényegesen magasabb relatív csonttér fogat (BV/TV) alakult ki. Érdekes módon ez a módszer is megerősítette azonban, hogy ovariectomia hatására a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerek is képesek voltak érdemben csökkenteni a BV/TV értékét (27. ábra A panel), sőt a BV/TV csökkenése hisztomorfometriai módszerekkel is mind abszolút értelemben, mind arányában magasabbnak bizonyult a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben (a BV/TV

9,9 %-ponttal való, vagyis 38%-os csökkenése) mint a vad típusú állatokban (a BV/TV 4,3 %-ponttal való, vagyis 24%-os csökkenése). A további statisztikai analízis itt is kimutatta, hogy a genotípus statisztikailag szignifikáns módon befolyásolta a sebészi beavatkozás hatását ( $p = 0,013$ ), vagyis a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerek csontbontása szignifikánsan nagyobb volt, mint a vad típusú állatoké. Itt is elmondhatjuk továbbá, hogy míg az áloperált csoportban a vad típusú és  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerek BV/TV értékei között statisztikailag szignifikáns különbség volt ( $p = 0,001$ ;  $n = 3$ ), ez a különbség az ovariectómián átesett egerekben már nem volt megfigyelhető ( $p = 0,24$ ;  $n = 3$ ).



A hisztomorfometriai elemzés során megvizsgáltuk az egyes csontsejttípusok jelenlétét is az egerek csontjaiban (27. ábra B panel). Az intakt egerekhez (25. ábra) hasonlóan azt találtuk, hogy az áloperált egerekben a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  mutáció szignifikánsan csökkentette az oszteoklasztok számát az áloperált vad típusú egerekhez képest. Érdekes módon azonban a petefészkek-eltávolítás hatására az oszteoklasztok száma mind a vad típusú, mind a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben jelentősen megemelkedett, ezáltal az ovariectomizált

egerekben a két genotípus közötti különbség már lényegesen kisebbnek bizonyult. A genotípus és a sebészi beavatkozás hatásának interakcióját vizsgáló Tukey poszt-hok teszt azt mutatta, hogy a genotípus nem befolyásolta szignifikánsan a sebészi beavatkozás hatását ( $p = 0,56$ ), vagyis az oszteoklasztok számának az emelkedése a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  egerekben is a vad típushoz hasonló értékeket mutatott. Ez legalábbis részben magyarázatot ad arra, hogy a  $PLC\gamma 2^{-/-}$  állatokban nem csökkent az ovariectomia-kiváltotta csontvesztés mértéke. Az oszteoblasztok számában ugyanakkor nem találtunk különbséget egyik csoport között sem (27. ábra B panel), ami arra utal, hogy a csontmennyiség különbségeit valószínűleg nem az oszteoblasztok fejlődésének és működésének az eltérése okozza.

## 6.2. p190RhoGAP-fehérjék vizsgálata oszteoklasztokban

Értekezésem következő részében a p190RhoGAP fehérjék oszteoklasztokban betöltött szerepének vizsgálatával foglalkozom. Ezen kísérleteket több tényező is jelentősen nehezítette. Egyrészt bár a p190-A fehérjét kódoló gént inaktiváló  $p190-A^{-/-}$  mutációt a velünk együttműködő Jeffrey Settleman amerikai munkacsoportja korábban létrehozta, a labor témaváltása miatt a mutációt nem publikálták és a mutációt hordozó egértörzs a kihálás szélére került. Emiatt nekünk kellett "megmenteni" a mutáns törzset és számos alapvető információt (pl. genotipizálási protokollt) visszamenőlegesen kinyerni belőlük. További nehézséget jelentett, hogy mind a  $p190-A^{-/-}$ , mind a  $p190-B^{-/-}$  mutáció késői embrionális letalitást eredményez, ezért az oszteoklasztokra kifejtett hatásukat csak magzati májsejtek transzplantációjával létrehozott csontvelő-kimérák segítségével tudtuk vizsgálni. Ehhez be kellett állítani az időzített terhességből nyert magzati máj transzplantációjának, illetve (mivel a különböző genotípusú magzatok között nem volt következetesen látható különbség) a knockout magzatok gyors és megbízható azonosításának a módszerét.

### 6.2.1. A $p190-A^{-/-}$ mutáció általános jellemzése

A p190RhoGAP-fehérjék oszteoklasztokban betöltött szerepének azonosítása céljából többek között vizsgálni szeretnénk volna a p190-A<sup>-/-</sup> csontvelői sejtekből *in vitro* differenciáltatott oszteoklasztok fejlődését és működését. Ezt azonban nagymértékben megnehezítette, hogy kísérleteink kezdetén nem állt rendelkezésre olyan publikált egértörzs, melyben teljes mértékben inaktiválták a p190-A fehérjét kódoló gént. A velünk együttműködő Jeffrey Settleman amerikai munkacsoportja korábban létrehozott és publikált egy, a p190-A-t kódoló gén célzott mutációját (p190-A<sup>hypo</sup> mutáció) hordozó egértörzset, melyben eltávolították a p190-A fehérje transzlációjának kiindulópontját [63]. A p190-A<sup>hypo</sup> mutáció vizsgálatakor kiderült azonban, hogy egy rejtett másik transzlációs kezdőpontról a mutáns allélről is kifejeződik és a teljes p190-A-hoz hasonló mennyiségben jelen van a fehérje megrövidült formája [63]. Ez a mutáció tehát egy hipomorf allélt hozott létre, amely csak korlátozottan volt alkalmas a p190-A biológiai szerepének a vizsgálatára. Jeffrey Settleman munkacsoportja ezért létrehozott egy második p190-A mutációt, melyben már ténylegesen teljesen inaktiválták a p190-A fehérjét kódoló gént (p190-A<sup>-</sup> mutáció). Az új mutációt azonban soha nem publikálták és azt hordozó egértörzs kísérleteink kezdetén majdnem kipu szult a Massachusetts General Hospital állatházában.

Kísérleteink kezdetekor létre kellett hoznunk egy, a p190-A<sup>-</sup> mutációt hordozó stabil kolóniát. Ehhez a feltételezett p190-A<sup>+/-</sup> egereket C57BL/6 egerekkel pároztattuk, és megpróbáltuk az utódok között a p190-A<sup>+/-</sup> hordozókat. A mutáció létrehozásának módjáról ekkor még nagyon bizonytalan információkkal rendelkezünk és lényegében csak azt tudtuk, hogy a p190-A-t kódoló gént a neomycin-rezisztenciát eredményező aminoglikozid foszfortranszferáz kódoló kazetta (Neo) inzerciójával inaktiválták. Ezért genotipizálási protokollként beállítottunk egy, a Neo kazetta jelenlétét kimutató allél-specifikus PCR-reakciót. Ennek segítségével azonosítani tudtuk a Neo kazettát hordozó, tehát feltételezhetően p190-A<sup>+/-</sup> genotípusú utódokat és így már fenn tudtuk tartani a mutációt. A Neo-specifikus PCR, mint a mutáció jelenlétét mutató pozitív kontroll, illetve a p190-A-t kódoló gén ismert genomiális szekvenciája alapján korrigáltuk az amerikai partnerektől kapott p190-A genotipizálási protokollt, így egy második, a p190-A<sup>-</sup> mutációra specifikus PCR-protokollt hoztunk létre (a Neo-t kimutató PCR reakció minden Neo-t hordozó mutációt kimutat, tehát nem specifikus a

p190-A<sup>-</sup> mutációra). A két genotipizálási protokoll jellemzőit és az egyes genotípusoknál várható eredményeket a 28. ábra mutatja.

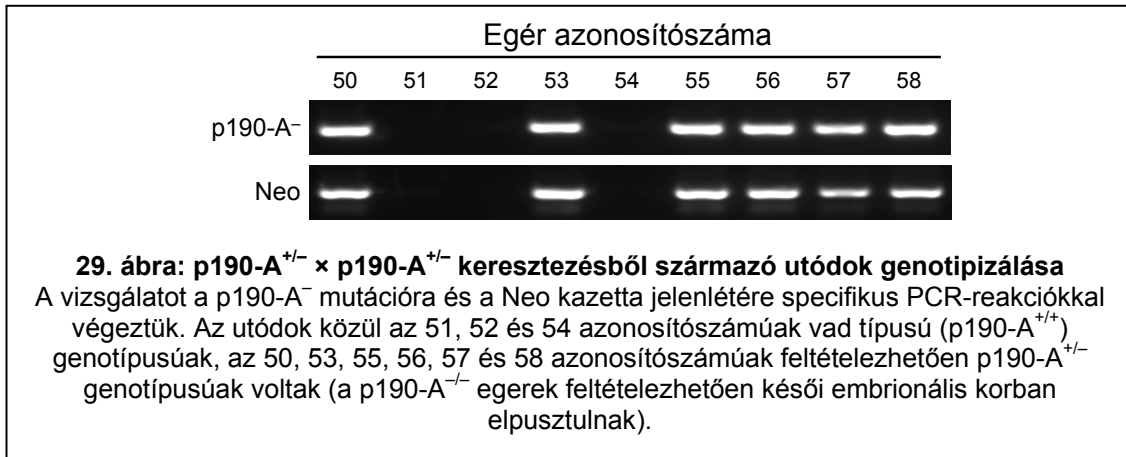
<b>Alkalmazott primerek</b>						
<b>Primer neve</b>		<b>Szekvencia (5' – 3')</b>				
p190-A <sup>+</sup> szenz		ACA GCA AAG GAC AAG TAT GAG T				
p190-A <sup>-</sup> szenz		GAG TCG AAT CAA GCT GAT C				
p190-A közös antiszenz		CCA TCA AGT CAA AGG GAA TC				
Neo szenz		GCA GCT GTG CTC GAC GTT GTC				
Neo antiszenz		CCA CCA TGA TAT TCG GCA AGC AGG				

<b>Alkalmazott PCR-reakciók</b>						
PCR neve	1. primer	2. primer	Termék mérete	Reakció, ha a genotípus...		
				p190-A <sup>+/+</sup>	p190-A <sup>+/-</sup>	p190-A <sup>-/-</sup>
p190-A <sup>+</sup>	p190-A <sup>+</sup> szenz	p190-A közös antiszenz	409 bp	✓	✓	–
p190-A <sup>-</sup>	p190-A <sup>-</sup> szenz	p190-A közös antiszenz	247 bp	–	✓	✓
Neo	Neo szenz	Neo antiszenz	364 bp	–	✓	✓

**28. ábra: A p190-A-t kódoló gén genotipizálásához használt allél-specifikus PCR-reakciók jellemzői**

A fenti két allél-specifikus PCR-reakció segítségével sikerült stabilan és következetesen azonosítani a p190-A<sup>-</sup> mutációt hordozó egereket. Egy ilyen kísérlet eredményét mutatja a 29. ábra, melyen egy p190-A<sup>+/-</sup> × p190-A<sup>+/-</sup> keresztezésből származó utód-alom genotipizálásának az eredménye látható. A kísérletben az utódok fark-mintáiból izolált genomialis DNS-en a p190-A<sup>-</sup> allélre és a Neo kazettára specifikus PCR-reakciókat futtattunk. Jól látható, hogy várakozásainknak megfelelően a p190-A<sup>-</sup> és a Neo PCR ugyanazokban az egerekben mutatott reaktivitást. A mindkét PCR-ben negatív reakciót adó egyedek vad típusú (p190-A<sup>+/+</sup>) genotípusúak voltak. A p190-A<sup>-</sup>-ra és a Neo-ra pozitív egyedekben jelen van a p190-A<sup>-</sup> allél. Bár a p190-A<sup>+/-</sup> × p190-A<sup>+/-</sup> keresztezési séma miatt nem zárhatjuk ki, hogy ezek az egyedek p190-A<sup>-/-</sup> genotípusúak voltak, a p190-A<sup>-/-</sup> mutáció által feltételezhetően kiváltott embrionális letalitás (ld. alább) miatt feltételeztük, hogy ezen egyedek mindegyike p190-A<sup>+/-</sup> genotípusú volt. Ugyanezen megfontolásból (vagyis mivel nem vártunk olyan egereket, amelyekben nincs benne a p190-A<sup>+</sup> allél) az élő utódokon rutinszerűen nem is végeztük el a p190-A<sup>+</sup> PCR-reakciót.



Ahogy korábban említettem, a p190-A-t kódoló gén hipomorf mutációja (p190-A<sup>hypo/hypo</sup>) késői embrionális letalitást okozott [63], ezért mi sem számítottunk rá, hogy az ennél súlyosabb genetikai károsodást (a p190-A teljes hiányát) okozó p190-A<sup>-/-</sup> mutációt hordozó egerek életképesek. A kérdés ellenőrzésére ennek ellenére a genotipizálási protokoll beállítása után elvégeztünk egy korlátozott elemszámú vizsgálatot, melyben p190-A<sup>+/-</sup> × p190-A<sup>+/-</sup> keresztezésből származó egerekben vizsgáltuk mind a p190-A<sup>+</sup>, mind a p190-A<sup>-</sup> allél jelenlétét. 68 utód 1 hetes korban való genotipizálása során a mendeli öröklődési szabályok szerint várható kb. 17-tel szemben egyetlen p190-A<sup>-/-</sup> utódot sem találtunk. Ez megerősítette azon eredeti feltételezésünket, hogy a p190-A<sup>-/-</sup> egerek életképtelenek. Ennek megfelelően a továbbiakban nem is törekedtünk élő p190-A<sup>-/-</sup> állatok létrehozására.

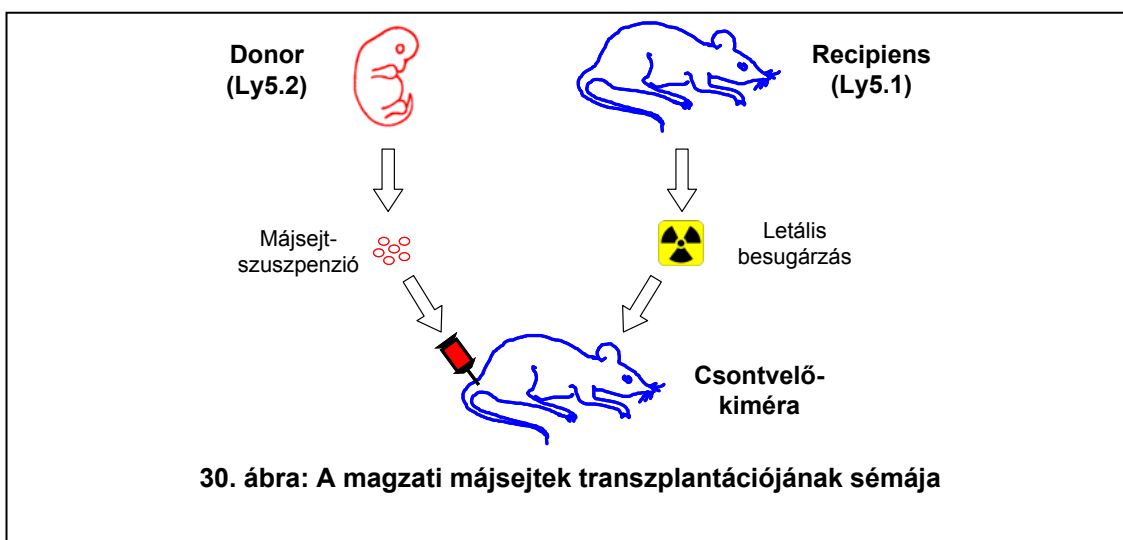
A p190-A<sup>-</sup> mutációval ellentétben a p190-B<sup>-</sup> mutációt már korábban publikálták és a genotipizálás módja is megfelelően dokumentálva volt [65]. Ebben az esetben ezért a publikált genotipizálási protokollt alkalmaztuk a mutáció fenntartására.

Mivel mind a p190-A<sup>-/-</sup>, mind a p190-B<sup>-/-</sup> mutációnál késői embrionális letalitást vártunk, mindkét mutációt heterozigóta formában tartottuk fent. Ehhez rutinszerűen heterozigóta × C57BL/6, esetenként heterozigóta × heterozigóta párosztatást alkalmaztunk.

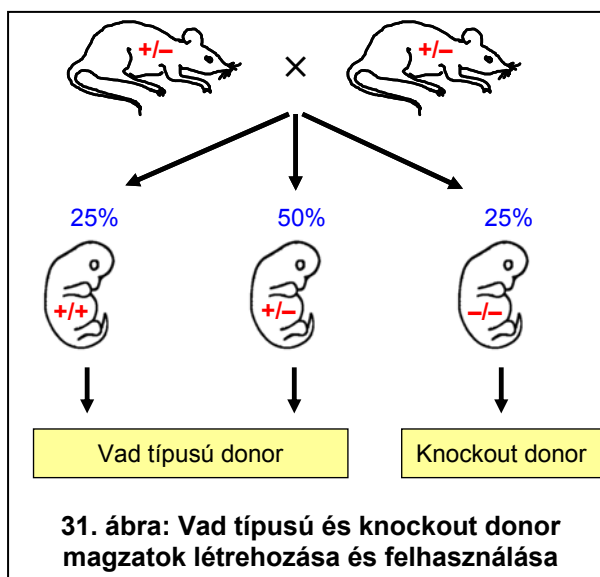
### 6.2.2. p190-A<sup>-/-</sup> és p190-B<sup>-/-</sup> csontvelő-kimérák létrehozása

A p190-A<sup>-/-</sup> és a p190-B<sup>-/-</sup> egerek feltételezett késői embrionális letalitása miatt nem volt lehetőség az egyes knockout egerek csontvelői sejtjeinek kinyerésére és *in*

*in vitro* tenyésztésére. Ezért úgy döntöttünk, hogy időzített terhességből származó magzatokból a kívánt genotípussal rendelkező magzati májsejteket nyerünk és ezeket (mint magzati korban a hemopoetikus sejtek fő forrását) letálisan besugárzott recipiensekbe transzplantálva a kívánt genotípusú hemopoetikus rendszerrel rendelkező csontvelő-kimérákat hozunk létre (30. ábra). A 14. ábrán bemutatotthoz hasonlóan ebben az esetben is úgy választottuk meg a recipiens egereket, hogy azok a donortól eltérő (Ly5.1) sejtfelszíni leukocita-antigént hordozzanak, ami a továbbiakban lehetővé tette a donor és recipiens sejtek elkülönítését.



A magzati májsejtek létrehozásához heterozigóta egyedeket pároztattunk ( $p190-A^{+/-} \times p190-A^{+/-}$  vagy  $p190-B^{+/-} \times p190-B^{+/-}$  párosztatás), az időzített terhesség harmadik trimeszterében (a 15-18. napon) a magzatokat eltávolítottuk, és azok májából májsejt-szuszpenziót hoztunk létre. A magzatok genotípusának megállapítása után kiválasztott megfelelő knockout ( $p190-A^{-/-}$  vagy  $p190-B^{-/-}$ ) magzatok májsejtjeit használtuk fel donorként knockout csontvelő-kimérák létrehozása céljából (31. ábra). Kontrollként ugyanolyan számú nem-

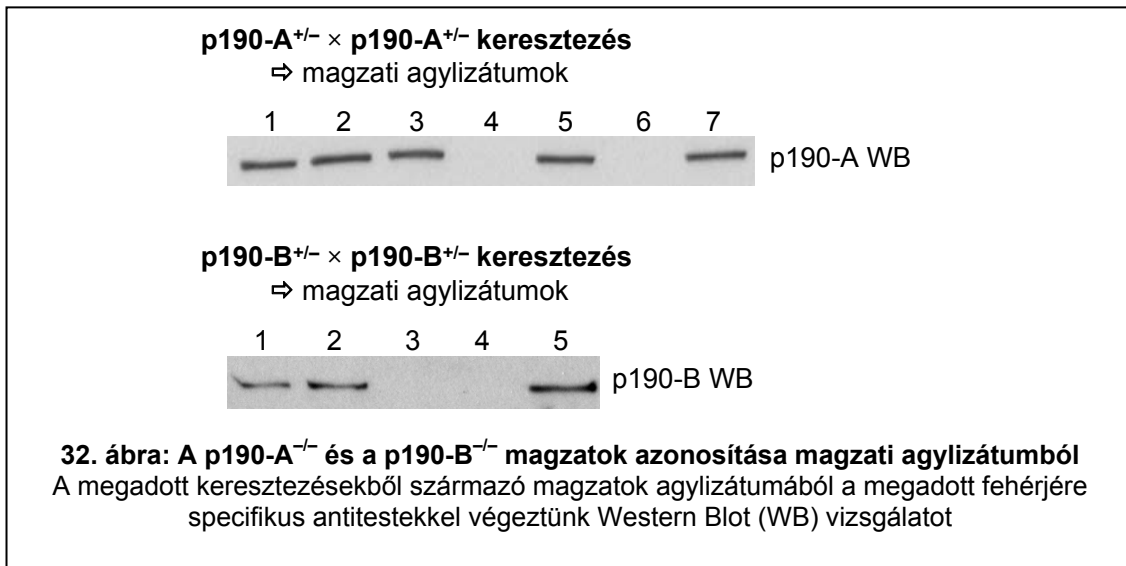




knockout (vad típusú vagy heterozigóta) magzat májsejtjeit használtuk fel donorként kontroll csontvelői kimérák létrehozására (31. ábra). A továbbiakban nem tettünk különbséget a vad típusú és a heterozigóta kontroll donorok, illetve az azok segítségével létrehozott kimérák között (a továbbiakban mindegyiket vad típusúként fogom jelölni). A transzplantáció során egy magzati máj sejtjeit átlagosan 5-8 recipiensbe injektáltuk.

A fenti megközelítés során komoly nehézséget okozott a kapott magzatok közül a knockout (p190-A<sup>-/-</sup> vagy p190-B<sup>-/-</sup>) magzatok azonosítása, különösen mivel a transzplantációra és azt megelőzően a donor magzatok kiválasztására mindössze néhány óra állt rendelkezésre. A knockout magzatok azonosítására elvileg három lehetőség lenne: 1) látható vagy más módon kimutatható fenotípus alapján való azonosítás; 2) genomiális DNS-ből való genotipizálás (pl. allél-specifikus PCR reakcióval); illetve 3) az adott fehérjék fehérje-szinten történő kimutatása. Bár a p190-A<sup>-/-</sup> magzatokban (a p190-A<sup>hypo/hypo</sup> magzatokhoz [63] hasonlóan) gyakran megfigyeltünk látható idegrendszeri fejlődési zavart [77], ez nem volt annyira következetes, hogy erre alapozhattuk volna a p190-A<sup>-/-</sup> magzatok azonosítását (a genotípus időnkénti megerősítésében viszont komoly segítségül szolgált). Hasonlóképpen a p190-B<sup>-/-</sup> magzatokban is leírtak egy fejlődési zavart, ami miatt a magzatok a vad típusú kontrolloknál kisebbek voltak [65], de ez sem bizonyult annyira következetesnek, hogy erre alapozzuk a transzplantációra kerülő p190-B<sup>-/-</sup> magzatok kiválasztását. Bár a PCR-alapú genotipizálás járható útnak tűnt, a PCR során történő sokszoros jelerősítés miatt felmerült a lehetsége az esetleges álpozitív vagy álnegatív irányba mutató eltérések felerősödésének, aminek a korrekciójára (új DNS-minta tisztítására és futtatására) a transzplantáció előtt már nem maradt volna idő, illetve ez a verzió más labortagok időbeosztását is nagymértékben korlátozta volna. Összességében ezért a harmadik verzió, az adott fehérje kimutatása tűnt a legjárhatóbb megoldásnak, különösen mivel mindkét p190RhoGAP-izoforma ellen rendelkezünk nagyon érzékeny és specifikus monoklonális ellenanyagokkal és irodalmi adatok és saját eredményeink is azt mutatták, hogy mindkét fehérje nagy mennyiségben expresszálódik a magzatok agyában. Bár további nehézséget jelentett, hogy egy szokásos Western Blot egy teljes napot is igényelhet, ezt sikerült az egyes lépések "felpörgetésével" 4-5 órára lecsökkenteni. Ily módon végül a különböző p190RhoGAP fehérjéket a magzatok agyilizátumából "hiperakut" Western Blot módszerrel mutattuk ki, ami lehetővé tette a knockout

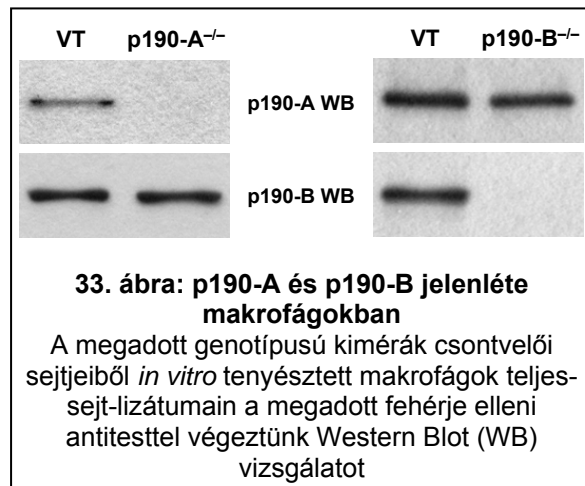
magzatok azonosítását. Egy-egy ilyen procedúra eredményét mutatja a 32. ábra, melyen jól látható, hogy teljesen egyértelműen el lehetett különíteni az adott fehérjék expresszázó és azt nem expresszázó mintákat. A továbbiakban a nem-expresszázó mintákkal azonos eredetű májsejteket használtuk knockout donorként, kontroll donorokat pedig a fennmaradó magzatok közül választottunk. Ezzel a megközelítéssel kapcsolatban hangsúlyozni szeretném, hogy mivel csak a fehérjék jelenlétét vizsgáltuk, a kontroll donorok között nem tudtunk biztosan különbséget tenni a homozigóta vad típusú és a heterozigóta egyedek között (bár a fehérje-expresszió különbségei gyakran nagy valószínűséggel ezt is lehetővé tették). Ily módon a kontroll (továbbiakban vad típusú) kimérákban közel véletlenszerűen egy vagy két példányban volt jelen az adott fehérjét kifejező allél.



A fentiekén túl a transzplantáció sikerességét a transzplantációt követő 4-6. héten a perifériás vérben keringő neutrofilek Ly5.2-festődésének vizsgálatával, áramlási citometriás módszerrel is ellenőriztük a 15. ábrán bemutatott módon. A kísérletekhez használt kimérákban a keringő neutrofilek >95%-a (általában >98%-a) donor-eredetűnek bizonyult, ami arra utalt, hogy sikeresen lecseréltük a recipiens egerek teljes hemopoetikus rendszerét.

### 6.2.3. p190RhoGAP-fehérjék jelenlétének vizsgálata makrofágokban

Következő kísérleteinkben igazolni szeretnénk volna a p190-A és p190-B fehérjék kifejeződését mieloid-eredetű sejtekben. Ennek érdekében immunoblot módszerrel megvizsgáltuk a két fehérje jelenlétét vad típusú, p190-A<sup>-/-</sup> és p190-B<sup>-/-</sup> kimérák csontvelői sejtjeiből *in vitro* differenciáltatott makrofág-sejtekben. Amint azt a 33.



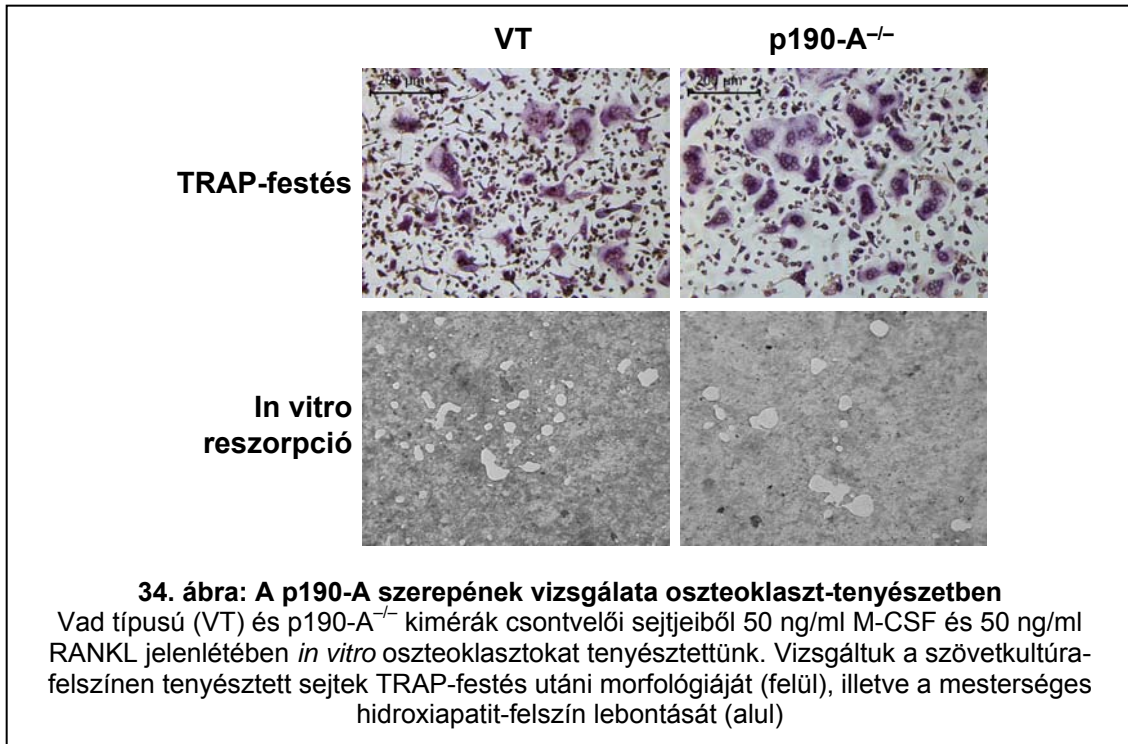
ábra mutatja, vad típusú sejtekben mind a p190-A mind a p190-B immunoblot erős reaktivitást mutatott. Várakozásainknak megfelelően a p190-A<sup>-/-</sup> sejtekben hiányzott a p190-A immunreakció, míg p190-B<sup>-/-</sup> sejtekben a p190-B fehérje nem volt megfigyelhető. Ez a kísérlet egyrészt azt mutatta, hogy makrofágokban mind a p190-A, mind a p190-B jelen van, egyben igazolta az alkalmazott immunoblot technika specificitását és a használt magzati májsejt-transzplantáció alkalmasságát p190-A- és p190-B-hiányos mieloid sejtek létrehozására.

### 6.2.4. A p190RhoGAP-fehérjék szerepének vizsgálata oszteoklasztokban

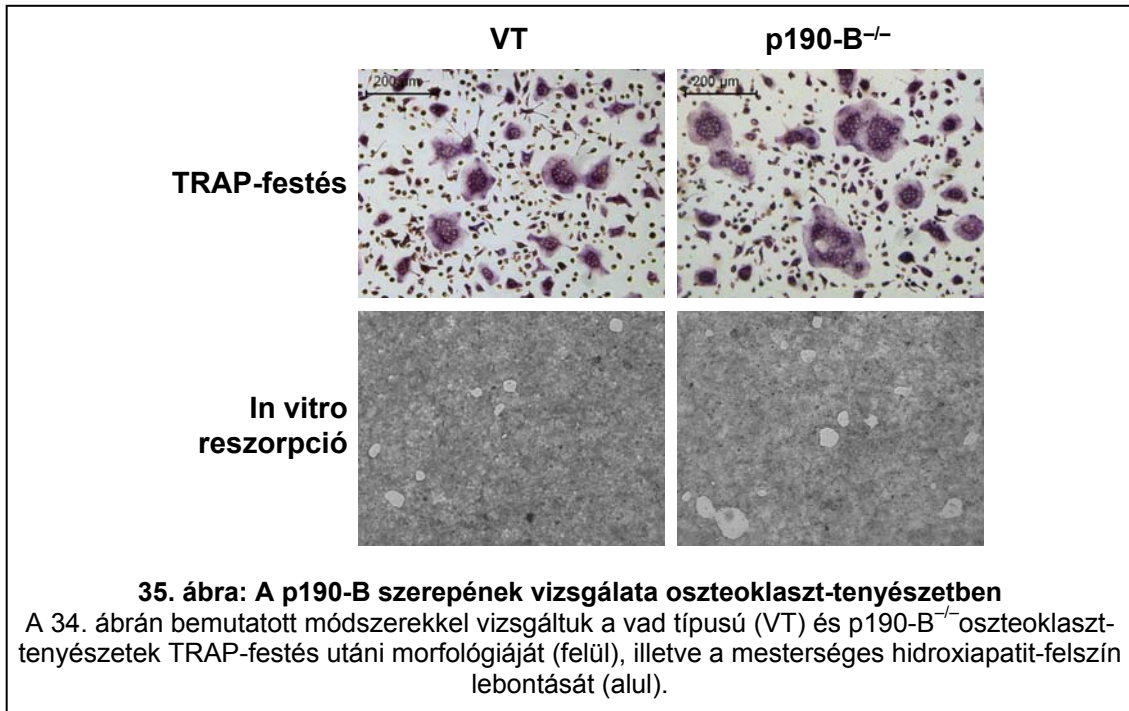
Ezen utolsó, még nem publikált kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy hogyan befolyásolja a p190-A vagy a p190-B genetikai hiánya az oszteoklasztok *in vitro* fejlődését és működését. Ennek érdekében vad típusú, p190-A<sup>-/-</sup> és p190-B<sup>-/-</sup> kimérák csontvelői sejtjeit M-CSF és RANKL citokinek jelenlétében a korábban bemutatott módon *in vitro* differenciáltattuk és vizsgáltuk a keletkező tenyészetekben a TRAP-pozitív sokmagvú sejtek (oszteoklasztok) megjelenését, illetve mesterséges hidroxipatit-felületen vizsgáltuk a tenyészetek *in vitro* reszorpciós képességét.

A p190-A vizsgálata során azt találtuk, hogy a vad típusú és p190-A<sup>-/-</sup> tenyészetekben egyaránt kialakultak sokmagvú TRAP-pozitív sejtek és ezek száma és megoszlása nem mutatott érdemi különbséget a két genotípus között (34. ábra). A tenyészetek *in vitro* reszorpciós képességének vizsgálata szintén azt mutatta, hogy nincs

jelentős különbség a kétféle genotípusú oszteoklasztok funkcionális kapacitása között (34. ábra). A p190-A tehát önmagában nem játszik elengedhetetlen szerepet az oszteoklasztok *in vitro* kialakulásában és azok funkciójában.



Ugyanezeket a kísérleteket elvégeztük p190-B<sup>-/-</sup> oszteoklaszt-tenyészeteken is. Amint az a 35. ábrán látható, a p190-B hiányában is a vad típusúhoz hasonló mértékben jöttek létre oszteoklasztok M-CSF és RANKL hatására, és ezek az oszteoklaszt-tenyészetek a vad típusúhoz hasonló mértékben bontották le a mesterséges hidroxipatit felszínt. Önmagában tehát a p190-B sem elengedhetetlen az oszteoklasztok M-CSF és RANKL hatására való létrejöttéhez és az oszteoklasztok *in vitro* reszorpciós működéséhez.

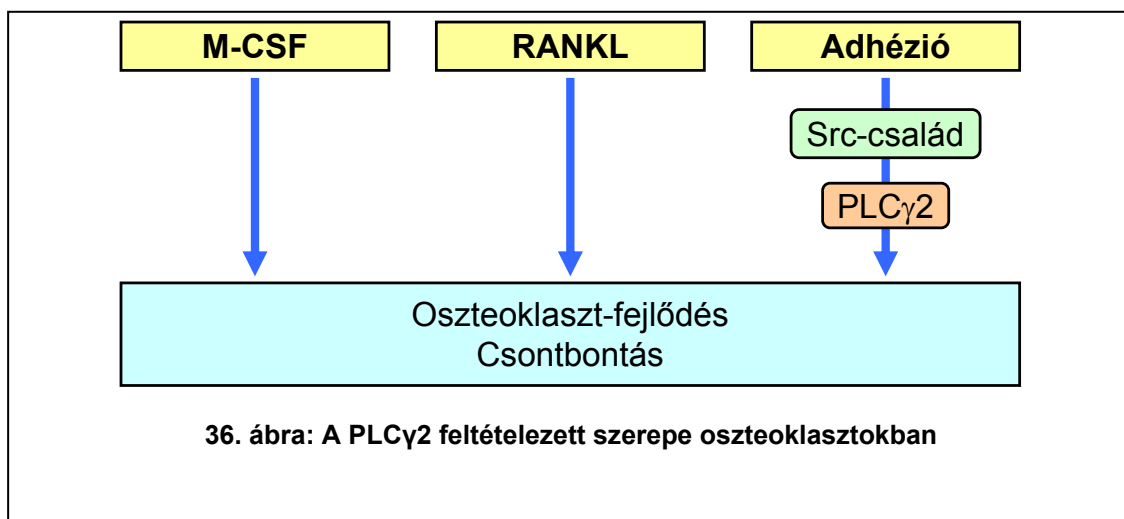


## 7. Megbeszélés

PhD-munkám során különböző fehérjék szerepét vizsgáltam az oszteoklasztok fejlődésében, működésében és intracelluláris jelátvitelében, illetve a nyugalmi (egészséges) és kóros csontanyagcserében. Munkám középpontjában a PLC $\gamma$ 2 foszfolipáz és a p190RhoGAP fehérjecsalád szerepe állt. Irodalmi adatok mindkét esetben felvetették, hogy ezen fehérjék komoly szerepet játszhatnak az oszteoklasztok jelátvitelében és a csontanyagcsere folyamataiban, konkrét eredmények azonban munkám kezdetén egyik esetben sem álltak rendelkezésre. A PLC $\gamma$ 2 esetében saját eredményeink megerősítették a fehérje fontos szerepét az oszteoklasztok jelátvitelében és a nyugalmi (bazális) csontanyagcserében, de meglepetésünkre nem támasztották alá a fehérje szerepét az ovariektómia-kiváltotta csontvesztés (a posztmenopauzális oszteoporózis állatmodellje) létrejöttében. A p190RhoGAP-fehérjék p190-A és p190-B izoformájával kapcsolatos eddigi eredményeink ezzel szemben arra utalnak, hogy önmagában egyik izoforma sem elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és működéséhez. A következőkben a munkám fókuszában álló molekulákkal kapcsolatos eredményeket külön tárgyalom.

### 7.1.1. A PLC $\gamma$ 2-vel kapcsolatos eredmények megbeszélése

A PLC $\gamma$ 2-vel kapcsolatos *in vitro* kísérleteinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a PLC $\gamma$ 2 elengedhetetlen az oszteoklasztok csontvelői sejtekből M-CSF és RANKL citokinek hatására *in vitro* történő differenciációjához (17-18. ábra) és – valószínűleg ennek következményeként– az oszteoklasztok *in vitro* reszorpciós aktivitásához (19. ábra). A PLC $\gamma$ 2 hiánya nem okozza a mieloid sejtek általános fejlődési zavarát (20. ábra) és nem befolyásolja az osteoklaszt-specifikus génexpressziót (21. ábra). A PLC $\gamma$ 2 foszforilációját a sejtek adhéziója (nem pedig az M-CSF vagy RANKL citokinek általi stimuláció) eredményezi (22. ábra), és ehhez a folyamathoz szükségesek az Src-típusú tirozin-kinázok (23. ábra). Az eredményeink alapján felállított oszteoklaszt-jelátviteli modellt a 36. ábra mutatja.



A PLC $\gamma$ 2 szerepével kapcsolatos *in vivo* eredmények azt mutatták, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiányában megnövekszik az intakt egerek trabekuláris csontállományának mennyisége (24-25. ábra), ami feltételezhetően a csökkent *in vivo* oszteoklaszt-számnak (25. ábra) köszönhető. Sebészi ovariektómiára azonban a PLC $\gamma$ 2-hiányos egerek a vad típusúaknál nagyobb mértékű csontlebontással válaszolnak, ezért ovariektómiát követően a két genotípus közötti csontállomány-különbség eltűnik (26-27. ábra). Utóbbira feltételezhetően az ad magyarázatot, hogy az oszteoklasztok száma ovariektómia hatására PLC $\gamma$ 2 hiányában is jelentősen megemelkedik (27. ábra).

A PLC $\gamma$ 2 *in vitro* szerepére és a nyugalmi csontanyagcserére vonatkozó eredményeinket tőlünk függetlenül két másik munkacsoport is publikálta [81, 82]. Bár a két másik munkacsoport eredményei korábban (2006-ban, ill. 2008-ban) jelentek meg, azonban saját kísérleteinket elsősorban saját munkacsoportunk [38] és egy japán munkacsoport [37] egy a PLC $\gamma$ 2-től feltételezetten proximális jelpálya azonosítására vonatkozó, 2004-ben lényegében egyidőben publikált eredményei, valamint munkacsoportunknak a PLC $\gamma$ 2 neutrofilekben betöltött szerepére vonatkozó, 2007-ben már absztrakt formában [83], véglegesen pedig 2009-ben [60] publikált eredményei ihlették. Nyugodtan állíthatjuk tehát, hogy saját kísérleteink a másik két munkacsoport eredményeitől függetlenül kezdődtek. Ezt támasztja alá, hogy a PLC $\gamma$ 2 oszteoklasztokban betöltött szerepével kapcsolatos eredményeinket absztrakt formában már 2007-ben publikáltuk [84]. Ezen eredményeink késői formális publikálásának oka éppen a két másik publikáció megjelenése volt, ami arra készítetett minket, hogy a témával kapcsolatos további, új aspektusokat vizsgáló (pl. a PLC $\gamma$ 2 oszteoporózis-modellben betöltött szerepére vonatkozó) kísérleteket is végezzünk.

A különböző munkacsoportoknak a PLC $\gamma$ 2 oszteoklasztokban és csontanyagcserében betöltött szerepére vonatkozó eredményeit összevetve a hasonlóságok mellett érdekes különbségekre is fény derül. A PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> tenyészetekben megfigyelhető oszteoklaszt-fejlődési és funkcionális rendellenességet Mao és munkatársai [81] valamint Chen és munkatársai [82] is a PLC $\gamma$ 2-nek az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának szabályozásában betöltött szerepével magyarázták. Saját, a másik két munkacsoport kísérleteinél [81, 82] sokkal részletesebb vizsgálataink (21. ábra) ezzel szemben azt mutatták, hogy az oszteoklaszt-specifikus gének expressziója PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> sejtekben is lényegében normális kinetikával zajlik. Ezzel egybecseng az a megfigyelésünk, hogy PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> tenyészetekben is megfigyelhető a mononukleáris sejtek TRAP-pozitivitása (17. ábra) ami szintén az oszteoklaszt-specifikus génexpresszió létrejöttére utal. Saját részletes, 7 különböző génre kiterjedő vizsgálatainkban a vizsgált gének expressziójának változása jól követhető kinetikát írt le és ez a változás nem jött létre párhuzamosan vizsgált makrofág-tenyészetekben (21. ábra). Nem valószínű tehát, hogy eredményeinket technikai problémák (pl. nem oszteoklaszt-specifikus álpozitív génexpressziós válasz) eredményezte volna. Bár a saját eredményeink és a másik két munkacsoport eredményei közötti különbség okát jelenleg nem tudjuk, saját, lényegesen részletesebb vizsgálataink arra utalnak, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiánya nem (vagy nem elsődlegesen) az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának zavarán keresztül fejt ki hatását.

További kérdéseink közé tartozott, hogy a PLC $\gamma$ 2 az oszteoklaszt-jelátvitel során milyen körülmények között képes aktiválódni. Mao és munkatársai [81] és Chen és munkatársai [82] korábbi munkáikban arról számoltak be, hogy a fehérje RANKL hatására aktiválódik. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a PLC $\gamma$ 2 feltételezhetően egy RANKL által közvetített jelátviteli folyamatban vesz részt. Mivel azonban mindkét munkacsoport adherens makrofágokon vizsgálta a PLC $\gamma$ 2 aktivációját, nem zárható ki, hogy a PLC $\gamma$ 2 nem a RANKL, hanem a sejtek letapadásához szükséges sejtadhézió jelpályájában vesz részt. Saját kísérleteinkben ezt az értelmezési nehézséget úgy hidaltuk át, hogy az M-CSF és a RANKL általi stimulását szuszpenzióban végeztük (22. ábra). Ilyen körülmények között sem az M-CSF, sem a RANKL nem hozta létre a PLC $\gamma$ 2 aktivációját, miközben a rájuk jellemző jelpályák (ERK, p38 MAPK, I $\kappa$ B $\alpha$ ) aktiválódása létrejött. A sejtek letapadása ugyanakkor jól látható PLC $\gamma$ 2-foszforilációt



eredményezett (22. ábra), ami arra utalt, hogy a PLC $\gamma$ 2 aktivációja elsősorban a sejtadhézió hatására jön létre (36. ábra). Ez a megfigyelés összhangban lenne a PLC $\gamma$ 2-nek a neutrofilek adhéziójában saját munkacsoportunk [60] és mások [57] eredményei alapján betöltött szerepével, illetve a PLC $\gamma$ 2-nek a preoszteoklasztok integrin-jelátvitelét módosító hatásával [85].

A PLC $\gamma$ 2-nek az oszteoklasztok fejlődésében és működésében való szerepét az *in vitro* kísérletek (17-19. ábra) mellett az intakt egerek micro-CT (24. ábra) és hisztomorfometriai (25. ábra) vizsgálata is megerősítette. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a PLC $\gamma$ 2 mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között fontos szerepet tölt be az oszteoklasztok fejlődésében és ezáltal az oszteoklaszt-függő csontlebontás folyamatában.

Az oszteoklaszt-tenyészeteken kapott *in vitro* eredmények és az intakt egereken végzett micro-CT vizsgálatok alapján feltételeztük, hogy a PLC $\gamma$ 2-nek a kóros csontbontásban is jelentős szerepe van. Ez az extrapoláció további eredményeink alapján azonban tévesnek bizonyult. A PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek ugyanis ovariectómia hatására a vad típusú egerekkel összevethető, sőt annál fokozottabb csontbontást mutattak (26-27. ábra), melynek eredményeként a vad típusú és a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> egerek között intakt állatokban megfigyelhető csontállomány-különbség a petefészkek eltávolítását követően lényegében megszűnt. Ez arra utal, hogy a petefészkek eltávolítását követő ösztrogén-hiány hatására kialakuló fokozott csontbontás a PLC $\gamma$ 2-től független módon jön létre, az oszteoklasztok számának ovariectómia hatására PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> állatokban megfigyelt emelkedése pedig azt mutatja, hogy a PLC $\gamma$ 2-független jelpálya PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> állatokban is képes fokozni az oszteoklasztok fejlődését. Mivel az ösztrogén-hiány hatására létrejövő csontbontáshoz nem szükséges a PLC $\gamma$ 2, a fehérje nem tekinthető a posztmenopauzális oszteoporózis gyógyszeres terápiájában alkalmazható terápiás célpontnak.

### 7.1.2. A p190RhoGAP fehérjével kapcsolatos eredmények megbeszélése

Munkánk kezdetén számos irodalmi adat utalt arra, hogy a p190RhoGAP fehérjének szerepe lehet az oszteoklasztok jelátvitelében. A p190-A több sejttípusban is részt vesz az integrinek jelátvitelében [77], miközben az oszteoklasztok fejlődéséhez és működéséhez is elengedhetetlen a  $\beta_3$ -integrinek működése [22]. A p190-A az

idegrendszerben az Src-kinázok fő szubsztrátja [64] miközben az Src<sup>-/-</sup> egerek súlyos oszteopetrózisban szenvednek [71], melynek elsődleges oka feltételezhetően az oszteoklasztok károsodása [86, 87]. A p190-A a Rho fehérjecsald szabályozásán keresztül fontos szerepet játszik számos citoskeletonális funkció szabályozásában, miközben az oszteoklasztok fejlődéséhez és működéséhez szintén folyamatos és szabályozott citoskeleton-átrendeződésre van szükség [75], mely feltételezhetően szintén a Rho-fehérjecsald közreműködésével valósul meg. Saját munkacsoportunk [77] és más kutatók [61, 72-75] korábbi eredményei azt is kimutatták, hogy a p190RhoGAP-fehérjék jelen vannak mieloid eredetű sejtekben is. Mindezen eredmények a p190RhoGAP fehérjék oszteoklasztokban betöltött szerepének a vizsgálatára ösztönöztek bennünket.

Bár Jeffrey Settleman munkacsoportja korábban már létrehozta a p190-A<sup>-</sup> mutációt hordozó egereket, a munkacsoport témaváltása miatt azokat nem publikálták és a törzs a kihalás szélére került a bostoni Massachusetts General Hospital állatházában. Ráadásul csak minimális információ állt rendelkezésre a mutáció létrehozásával és az azt hordozó egerek azonosításával kapcsolatban. A p190-A<sup>+/-</sup> egerek Budapestre szállítása után ezért az első feladat a mutációt hordozó egerek megbízható azonosítására alkalmas allél-specifikus PCR-reakció beállítása volt. Ezt a neomicin-rezisztenciát kódoló Neo kazettát kiterőítő primer-párral el is értük, majd ennek segítségével sikerült korrigálnunk az amerikai partnertől kapott genotipizálási protokollt is (28-29. ábra), ami megteremtette az alapját a p190-A<sup>-</sup> mutáció stabil fenntartásának.

A p190RhoGAP fehérjék oszteoklasztokban betöltött szerepének vizsgálatát tovább nehezítette a p190-A<sup>-/-</sup> [77] és p190-B<sup>-/-</sup> [65] egerek perinatális letalitása. Ezt a problémát időzített terhességből származó magzati májsejtek transzplantációjával (30-31. ábra) oldottuk meg, amihez a knockout magzatokat egy gyors és megbízható Western blot alapú módszer segítségével azonosítottuk (32. ábra). Az ily módon létrehozott p190-A<sup>-/-</sup> és p190-B<sup>-/-</sup> csontvelői kimérák hemopoetikus sejtjeiből *in vitro* tenyésztett makrofágokból ténylegesen hiányzott a megfelelő fehérje (33. ábra), ami igazolta az összességében elég bonyolult magzati-máj-transzplantációs megközelítés hatékonyságát.

A fent leírt módon létrehozott p190-A<sup>-/-</sup> és p190-B<sup>-/-</sup> kimérák csontvelői sejteiből *in vitro* tenyésztett oszteoklasztok vizsgálata kimutatta, hogy önmagában sem a p190-A (34. ábra), sem a p190-B (35. ábra) nem elengedhetetlen az oszteoklasztok fejlődéséhez és *in vitro* reszorpciós képességéhez. Ezen eredményeink egybecsengtek munkacsoportunk azon megfigyelésével, hogy a  $\beta_2$ -integrinek jelátvitel nem károsodott p190-A<sup>-/-</sup> neutrofilekben (a p190-B-vel kapcsolatban egyelőre nincs hasonló publikáció, bár munkacsoportunk előzetes kísérletei arra utalnak, hogy ez a fehérje sem elengedhetetlen a neutrofilek működéséhez).

Bár a fenti eredmények arra utalnak, hogy sem a p190-A, sem a p190-B nem tölt be jelentős nem-redundáns funkciót oszteoklasztokban, kísérleteink nem zárják ki a p190RhoGAP-fehérjék szerepét az oszteoklasztok jelátvitelében. Egyrészt ugyanis jelenleg nem tudjuk kizárni, hogy a két fehérje valamelyike szerepet játszik valamilyen olyan oszteoklaszt-funkcióban, amit a jelen projekt keretében még nem vizsgáltunk. A p190-A<sup>-/-</sup> és p190-B<sup>-/-</sup> egerek letalitása miatt azt sem tudtuk vizsgálni, hogy a két fehérje szerepet játszik-e az *in vivo* csontanyagcserében. Az is elképzelhető továbbá, hogy a két fehérje egymást átfedő funkcióval rendelkezik, és jelentős oszteoklaszt-fejlődési vagy -működési zavar csak a két fehérje együttes kiütése után (p190-A<sup>-/-</sup>p190-B<sup>-/-</sup> kettős knockout sejtekben) jön létre. Ezen kérdésekre munkacsoportunk a jövőben próbálja megtalálni a választ.

## 8. Következtetések

PhD dolgozatomban a PLC $\gamma$ 2, p190-A és p190-B fehérjék oszteoklasztok jelátvitelében betöltött szerepével és a PLC $\gamma$ 2-hiányos egerek *in vivo* csontanyagcseréjének vizsgálatával kapcsolatos eredményeimet ismertettem. Munkám eredményeiből az alábbi következtetések vonhatók le:

1) A PLC $\gamma$ 2 fehérje elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és az oszteoklasztok által közvetített *in vitro* reszorpciós tevékenységhez.

2) A PLC $\gamma$ 2 nem szükséges az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójához.

3) A PLC $\gamma$ 2 a sejtadhézió, nem pedig az M-CSF vagy RANKL citokinek hatására aktiválódik.

4) A PLC $\gamma$ 2 szükséges a nyugalmi (bazális) csontbontás folyamatához.

5) A PLC $\gamma$ 2 nem szükséges az ovariektómia-kiváltotta csontlebontáshoz.

6) A bazális és ovariektómia-indukált csontlebontás különböző folyamatokon keresztül jön létre.

7) Magzati májsejtek transzplantációjával lehetséges letális mutációt hordozó oszteoklasztok tenyésztése és vizsgálata.

8) Önmagában sem a p190-A, sem a p190-B nem elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* differenciációjához és reszorpciós működéséhez.

## 9. Összefoglalás

Az oszteoklasztok sokmagvú óriássejtek, melyek hemopoetikus őssejtekből M-CSF és RANKL citokinek hatására, adherens körülmények között alakulnak ki. Az oszteoklasztok egyedülként képesek a csontszövet lebontására és ezáltal részt vesznek mind a nyugalmi csontanyagcsere, mind a kóros csontlebontás folyamatában.

Kísérleteinkben génhányos egerek segítségével vizsgáltuk a PLC $\gamma$ 2 foszfolipáz és a p190RhoGAP-izoformák szerepét az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében, valamint az *in vivo* csontanyagcserében nyugalmi körülmények között és a posztmenopauzális oszteoporózist modellező sebési ovariektómiát követően.

PLC $\gamma$ 2-vel kapcsolatos *in vitro* kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PLC $\gamma$ 2 hiányában jelentősen károsodik az oszteoklasztoknak az egerek csontvelői sejtjeiből M-CSF és RANKL hatására történő *in vitro* differenciációja, illetve az oszteoklaszt-tenyészetek *in vitro* reszorpciós képessége. A jelenség magyarázatának vizsgálata során kimutattuk, hogy a PLC $\gamma$ 2 sem a mieloid sejtek általános fejlődéséhez, sem az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójához nem szükséges. Kimutattuk továbbá, hogy a PLC $\gamma$ 2 a sejtek adhéziója, nem pedig az M-CSF vagy a RANKL hatására aktiválódik és hogy ehhez az aktivációhoz szükségesek az Src-típusú tirozin-kinázok.

A PLC $\gamma$ 2-vel kapcsolatos *in vivo* kísérletekben kimutattuk, hogy PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> állatokban megnő a trabekuláris csontállomány mennyisége, ami az oszteoklasztok számának csökkenésével magyarázható. Ugyanakkor azt találtuk, hogy ovariektómia hatására a PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> állatokban a vad típusú egerekkel összemérhető, sőt annál nagyobb mértékű csontlebontás jött létre. A PLC $\gamma$ 2 tehát részt vesz a nyugalmi körülmények között történő csontlebontásban, de nem szükséges az ösztrogén-hiány által kiváltott csontvesztéshez.

A p190RhoGAP-fehérjéknek két izoformája (p190-A és p190-B) van, melyek bármelyikének hiánya késői embrionális letalitást eredményez. A p190RhoGAP-izoformák vizsgálata során ezért először beállítottunk egy magzati májsejtek transzplantációjára épülő kísérletes megközelítést, amely lehetővé tette a letális mutációt hordozó hemopoetikus eredetű sejtek vizsgálatát. Ezzel a megközelítéssel kimutattuk, hogy sem a p190-A, sem a p190-B nem szükséges az oszteoklasztok *in vitro* differenciálódásához és az oszteoklasztok *in vitro* reszorpciós tevékenységéhez.

## 10. Summary

Osteoclasts are multinucleated phagocyte cells that are formed from haematopoietic stem cells. Development of mature osteoclasts is directed by M-CSF and RANKL cytokines and adhesive signals. Previous studies suggested that PLC $\gamma$ 2 and p190RhoGAP proteins may have a role in osteoclastogenesis which was tested by using mice genetically deficient of PLC $\gamma$ 2 and p190RhoGAP isoforms.

During our experiments, bone marrow cells lacking PLC $\gamma$ 2, p190-A or p190-B were cultured under osteoclastogenic conditions and the development and resorptive function of osteoclasts was tested. We also tested the role of PLC $\gamma$ 2 in basal and ovariectomy-induced bone resorption by micro-CT and histomorphometric analyses of the trabecular architecture of long bone metaphyses. Postmenopausal osteoporosis was modeled by surgical ovariectomy.

*In vitro* cultures of PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> bone marrow cells revealed that PLC $\gamma$ 2 was required for the development of multinucleated osteoclasts and for the resorption of artificial bone surface. PLC $\gamma$ 2 was activated upon adhesion of the cells but not by stimulation with M-CSF or RANKL in suspension. PLC $\gamma$ 2 was phosphorylated in a Src-family-dependent manner upon adhesion but not upon stimulation by M-CSF or RANKL. These results indicate that PLC $\gamma$ 2 plays a critical role in the development and function of osteoclasts and PLC $\gamma$ 2 likely participates in adhesion-receptor signaling.

PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> mice had significantly higher trabecular bone mass under basal conditions than wild type mice. Surprisingly, ovariectomy-induced bone resorption in PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> mice was similar to, or even more robust than, that in wild type animals. Taken together, PLC $\gamma$ 2 is required for bone resorption under basal conditions but it does not play a major role in ovariectomy-induced bone loss. These results suggest that basal and estrogen deficiency-induced bone resorption utilizes different signaling pathways.

Using bone marrow cells lacking the p190-A or the p190-B isoform of p190RhoGAPs, we were able to show that neither isoform alone is dispensable for osteoclast differentiation and function.

Taken together, these results indicate that the p190-A and p190-B proteins do not have any non-redundant functions in osteoclasts.

## 11. A társszerzők közötti munkamegosztás

A dolgozatomban bemutatott projektek mindegyike több kutató együttes munkájának volt az eredménye. A közös publikációkban az egyes szerzők az alábbiak szerint vettek részt (különös tekintettel más PhD-hallgatók részvételére):

### A PLC $\gamma$ 2 szerepe oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Kertész et al., *Eur J Clin Invest* 2011 (nyomdában)

Ezért a projektért elsősorban én voltam felelős. Az *in vitro* differenciációs és funkcionális mérések, valamint a biokémiai vizsgálatok nagy részét én, kisebb részét Győri Dávid végezte. A génexpressziós vizsgálatokhoz a minták előkészítését én és Győri Dávid, a qPCR méréseket Rajnavölgyi Éva felügyeletével Kis-Tóth Kata és Fekete Tünde végezte. Az ovariektomiára az egereket én és Győri Dávid készítettük elő, az operációt Körmendi Szandra végezte. A mikro-CT és hisztomorfometriai vizsgálatokra a mintákat én és Győri Dávid készítettük elő. A micro-CT-minták szkennelését és elemzését én, Győri Dávid, Körmendi Szandra és Dobó-Nagy Csaba végeztük. A hisztomorfometria vizsgálatokat Georg Schett végezte. Jakus Zoltán szakmai tanácsokat adott. A projektet Mócsai Attila irányította és felügyelte.

### A p190-A vizsgálatának módszertana

Németh et al., *J Immunol* 2010

Ezért a projektért elsősorban Németh Tamás volt felelős. Én a p190-A kolónia megalapításában, a genotipizálási módszerek beállításában, a magzatok azonosításának kidolgozásában és a csontvelő-kimérák létrehozásának és ellenőrzésének beállításában vettem részt. Az általam beállított módszereket Németh Tamás részben később továbbfejlesztette. A projekt további részeiben (a p190-A<sup>-/-</sup> mutáció részletes jellemzése, neutrofil-vizsgálatok, *in vivo* arthritis-es kísérletek) nem vettem részt.

### A p190-A<sup>-/-</sup> és p190-B<sup>-/-</sup> oszteoklasztok vizsgálata

Ez a projekt eddig kizárólag az én felelősségem és feladatomból volt, abban más PhD-hallgató eddig nem vett részt.

## 12. Saját publikációk jegyzéke

### AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

- 1) **Zsuzsanna Kertész**, Dávid Györi, Szandra Körmendi, Tünde Fekete, Katalin Kis-Tóth, Zoltán Jakus, Georg Schett, Éva Rajnavölgyi, Csaba Dobó-Nagy és Attila Mócsai: *Phospholipase C $\gamma$ 2 is required for basal but not oestrogen deficiency-induced bone resorption*. (DOI: 10.1111/j.1365-2362.2011.02556.x)  
*European Journal of Clinical Investigation* 2011 (nyomdában)  
IF: 2,643

- 2) Tamás Németh, Krisztina Futosi, Csilla Hably, Madelaine R. Brouns, Sascha M. Jakob, Miklós Kovács, **Zsuzsanna Kertész**, Barbara Walzog, Jeffrey Settleman és Attila Mócsai: *Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: generation and analysis of a novel null mutation in mice*.  
*Journal of Immunology* 2010, **185**: 3064-3075.  
IF: 5,646

### EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

- 3) **Zsuzsanna Kertész**, Virág Vas, Judit Kiss, Veronika S. Urbán, Éva Pozsonyi, András Kozma, Katalin Pálóczi és Ferenc Uher: *In vitro expansion of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the presence of immobilized Jagged-1 and early acting cytokines*.  
*Cell Biology International* 2006, **30**: 401-405.  
IF: 1,800



### **13. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani doktori ösztöndíjas hallgatói munkám során nyújtott segítségéért Dr. Mócsai Attilának, témavezetőmnek, akinek irányítása mellett rengeteget tanulhattam. Témavezetőm mindvégig önzetlenül segítette szakmai fejlődésemet és mérhetetlen hálával és köszönettel tartozom értékes tanácsaiért, a rengeteg idejéért, amit rám szánt és azért, hogy megosztotta kutatói tapasztalátát.

Külön köszönet illeti Dr. Hunyady Lászlót, az Élettani Intézet vezetőjét, aki lehetővé tette az intézetben való munkámat és támogatta tudományos tevékenységemet.

Köszönettel és hálával tartozom Dr. Győri Dávidnak, tudományos diákköri hallgatónak majd kollégámnak, aki jelentős részt vállalt a PLC $\gamma$ 2-vel kapcsolatos kísérletekben, illetve két további TDK-hallgatónak, Dr. Krasznai Zsuzsának és Csete Dánielnek.

Laboratóriumi munka során nyújtott pótolhatatlan segítségét köszönöm Simon Edinának és Makara Krisztinának, akik segítségükkel és lelkiismeretes asszisztensi munkájukkal megkönnyítették munkámat. Köszönetet mondok Horváthné Seres Erzsébetnek, Sütő Krisztinának és Fedina Editnek a kísérletekkel kapcsolatos feladatok elvégzéséért.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Jakus Zoltánnak, Dr. Kovács Miklósnak, Dr. Németh Tamásnak, Csépanyi-Kömi Rolandnak, Dr. Sirokmány Gábornak, Dr. Lévy Magdolnának, akik segítő jelenléte nélkül nehezebben ment volna az évek során a kutatói munka. Természetesen köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Élettani Intézet valamennyi munkatársának.

Legvégül pedig szeretném megköszönni azt a végtelen segítséget és szeretetet, amit családomtól kaptam, akik mindig mellettem álltak és bátorítottak az évek során. Köszönettel tartozom barátaimnak is, akik mindig készen álltak, hogy megoszthassam velük a kutatói munka során szerzett sikereimet vagy éppen nehézségeimet.

## 14. Irodalomjegyzék

1. Younes, A. and M.E. Kadin, Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(18): p. 3526-34.
2. Mundy, G.R., Calcium homeostasis : hypercalcemia and hypocalcemia. 2nd ed. 1990, London: M. Dunitz.
3. Rhee, S.G., Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 281-312.
4. Rauner, M., W. Sipos, and P. Pietschmann, Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007. **143**(1): p. 31-48.
5. Wagner, E.F. and K. Matsuo, Signalling in osteoclasts and the role of Fos/AP1 proteins. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii83-5.
6. Asagiri, M. and H. Takayanagi, The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, 2007. **40**(2): p. 251-64.
7. Marom R, S.I., Solomon R, Benayahu D., Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 2005. **202**: p. 41–48.
8. Lories RJ, D.I., Luyten FP. , Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest*, 2005. **115**: p. 1571–1579.
9. Yamaguchi A, K.T., Suda T. , Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, 2000. **21**: p. 393–411.
10. Noble BS, P.N., Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE, Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *AmJ Physiol* 2003. **284**: p. C934–C944.
11. Marroti G, C.V., Palazzini S, Lalumbo C, Structure function relationships in the osteocyte. *Miner Electrolyte Metab* 1990. **4**: p. 93–106.
12. Udagawa N, T.N., Akatsu T, Tanaka, H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, and S. T., Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are

- capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990. **87**: p. 7260–7264.
13. Kurihara N, C.C., Miller M, Civin C, Roodman GD, Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology*, 1990. **126**: p. 2733–2741.
  14. AM, P., Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994. **55**: p. 273–286.
  15. Felix, R., M.G. Cecchini, W. Hofstetter, P.R. Elford, A. Stutzer, and H. Fleisch, Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J Bone Miner Res*, 1990. **5**(7): p. 781-9.
  16. Wiktor-Jedrzejczak, W., A. Bartocci, A.W. Ferrante, Jr., A. Ahmed-Ansari, K.W. Sell, J.W. Pollard, and E.R. Stanley, Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12): p. 4828-32.
  17. Dougall, W.C., M. Glaccum, K. Charrier, K. Rohrbach, K. Brasel, T. De Smedt, E. Daro, J. Smith, M.E. Tometsko, C.R. Maliszewski, A. Armstrong, V. Shen, S. Bain, D. Cosman, D. Anderson, P.J. Morrissey, J.J. Peschon, and J. Schuh, RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*, 1999. **13**(18): p. 2412-24.
  18. Kong, Y.Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H.L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A.J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.W. Mak, W.J. Boyle, and J.M. Penninger, OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999. **397**(6717): p. 315-23.
  19. Kim, N., P.R. Odgren, D.K. Kim, S.C. Marks, Jr., and Y. Choi, Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(20): p. 10905-10.

20. Kukita, T., N. Wada, A. Kukita, T. Kakimoto, F. Sandra, K. Toh, K. Nagata, T. Iijima, M. Horiuchi, H. Matsusaki, K. Hieshima, O. Yoshie, and H. Nomiyama, RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med*, 2004. **200**(7): p. 941-6.
21. Yagi, M., T. Miyamoto, Y. Sawatani, K. Iwamoto, N. Hosogane, N. Fujita, K. Morita, K. Ninomiya, T. Suzuki, K. Miyamoto, Y. Oike, M. Takeya, Y. Toyama, and T. Suda, DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med*, 2005. **202**(3): p. 345-51.
22. McHugh, K.P., K. Hodivala-Dilke, M.H. Zheng, N. Namba, J. Lam, D. Novack, X. Feng, F.P. Ross, R.O. Hynes, and S.L. Teitelbaum, Mice lacking  $\beta_3$  integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest*, 2000. **105**(4): p. 433-40.
23. Miyamoto, T., F. Arai, O. Ohneda, K. Takagi, D.M. Anderson, and T. Suda, An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand. *Blood*, 2000. **96**(13): p. 4335-43.
24. Kyriakides, T.R.e.a., The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participate in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *Am. J. Pathol*, 2004. **165**: p. 2157- 2166.
25. Yu, X.e.a., SDF-1 increases recruitment of osteoclast precursors by upregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. *Connect Tissue*, 2003. **44**.
26. Delaisse, J.M., T.L. Andersen, M.T. Engsig, K. Henriksen, T. Troen, and L. Blavier, Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 2003. **61**: p. 504-513.
27. Kornak, U., D. Kasper, M.R. Bosl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, and T.J. Jentsch, Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 2001. **104**(2): p. 205-15.
28. Harri, P., M. Mika, and H.K. Vaananen, Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *Journal of Cell Science* 1997. **110**: p. 1767-1780.

29. Tondravi MM, M.S., Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL., Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. . Nature., 1997. **386**(6620): p. 81-4. .
30. Ross FP, T.S., alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 88-105.
31. Blair HC, R.L., Zaidi M. , Osteoclast signalling pathways. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(3): p. 728-38.
32. Ikeda F, N.R., Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T., Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 475-84. .
33. Takayanagi, H., S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E.F. Wagner, T.W. Mak, T. Kodama, and T. Taniguchi, Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. Dev Cell, 2002. **3**(6): p. 889-901.
34. Teitelbaum SL, R.F., Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet, 2003. **4**(8638-49).
35. Sanjay A, H.A., Neff L, DiDomenico E, Bardelay C, Antoine E, Levy J, Gailit J, Bowtell D, Horne WC, Baron R. , Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. . J Cell Biol. , 2001. **152**(1): p. 181-95.
36. Faccio, R., S.L. Teitelbaum, K. Fujikawa, J. Chappel, A. Zallone, V.L. Tybulewicz, F.P. Ross, and W. Swat, Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 284-90.
37. Koga, T., M. Inui, K. Inoue, S. Kim, A. Suematsu, E. Kobayashi, T. Iwata, H. Ohnishi, T. Matozaki, T. Kodama, T. Taniguchi, H. Takayanagi, and T. Takai, Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. Nature, 2004. **428**(6984): p. 758-63.
38. Mócsai, A., M.B. Humphrey, J.A. Van Ziffle, Y. Hu, A. Burghardt, S.C. Spusta, S. Majumdar, L.L. Lanier, C.A. Lowell, and M.C. Nakamura, The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor  $\gamma$ -chain (FcR $\gamma$ )

- regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004. **101**(16): p. 6158-63.
39. Mócsai, A., J. Ruland, and V.L. Tybulewicz, The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(6): p. 387-402.
  40. Colonna, M., TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(6): p. 445-53.
  41. Cella, M., C. Buonsanti, C. Strader, T. Kondo, A. Salmaggi, and M. Colonna, Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med*, 2003. **198**(4): p. 645-51.
  42. Paloneva, J., J. Mandelin, A. Kiiialainen, T. Bohling, J. Prudlo, P. Hakola, M. Haltia, Y.T. Konttinen, and L. Peltonen, DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med*, 2003. **198**(4): p. 669-75.
  43. Humphrey, M.B., M.R. Daws, S.C. Spusta, E.C. Niemi, J.A. Torchia, L.L. Lanier, W.E. Seaman, and M.C. Nakamura, TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(2): p. 237-45.
  44. Kim, N., M. Takami, J. Rho, R. Josien, and Y. Choi, A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med*, 2002. **195**(2): p. 201-9.
  45. Mócsai, A., C.L. Abram, Z. Jakus, Y. Hu, L.L. Lanier, and C.A. Lowell, Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol*, 2006. **7**(12): p. 1326-1333.
  46. Zou, W., H. Kitaura, J. Reeve, F. Long, V.L. Tybulewicz, S.J. Shattil, M.H. Ginsberg, F.P. Ross, and S.L. Teitelbaum, Syk, c-*Src*, the  $\alpha_v\beta_3$  integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol*, 2007. **176**(6): p. 877-88.
  47. Jakus, Z., S. Fodor, C.L. Abram, C.A. Lowell, and A. Mócsai, Immunoreceptor-like signaling by  $\beta_2$  and  $\beta_3$  integrins. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(10): p. 493-501.

48. Zou, W., J.L. Reeve, Y. Liu, S.L. Teitelbaum, and F.P. Ross, DAP12 Couples c-Fms Activation to the Osteoclast Cytoskeleton by Recruitment of Syk. *Mol Cell*, 2008. **31**(3): p. 422-431.
49. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, and R. BL, Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1999. **140**: p. 4367-4370.
50. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, and S. TC, Avian osteoclasts as estrogen target cells. . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. **88**: p. 6613- 6617.
51. Taranta A, B.M., Teti A, De Luca V, Scandurra R, Spera G, et al., The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. *Bone*, 2002. **30**: p. 368-376.
52. Hughes, D.E., A. Dai, J.C. Tiffée, H.H. Li, G.R. Mundy, and B.F. Boyce, Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*, 1996. **2**(10): p. 1132-6.
53. Chen, J.R., L.I. Plotkin, J.I. Aguirre, L. Han, R.L. Jilka, S. Kousteni, T. Bellido, and S.C. Manolagas, Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4632-8.
54. Ji, Q.S., G.E. Winnier, K.D. Niswender, D. Horstman, R. Wisdom, M.A. Magnuson, and G. Carpenter, Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- $\gamma$ 1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 2999-3003.
55. Wang, D., J. Feng, R. Wen, J.C. Marine, M.Y. Sangster, E. Parganas, A. Hoffmeyer, C.W. Jackson, J.L. Cleveland, P.J. Murray, and J.N. Ihle, Phospholipase C $\gamma$ 2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity*, 2000. **13**(1): p. 25-35.
56. Wen, R., S.T. Jou, Y. Chen, A. Hoffmeyer, and D. Wang, Phospholipase C $\gamma$ 2 is essential for specific functions of Fc $\epsilon$ R and Fc $\gamma$ R. *J Immunol*, 2002. **169**(12): p. 6743-52.
57. Graham, D.B., C.M. Robertson, J. Bautista, F. Mascarenhas, M.J. Diacovo, V. Montgrain, S.K. Lam, V. Cremasco, W.M. Dunne, R. Faccio, C.M. Coopersmith, and W. Swat, Neutrophil-mediated oxidative burst and host

- defense are controlled by a Vav-PLC $\gamma$ 2 signaling axis in mice. *J Clin Invest*, 2007. **117**(11): p. 3445-52.
58. Jakus, Z., E. Simon, B. Balázs, and A. Mócsai, Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(7): p. 1899-910.
59. Jakus, Z., T. Németh, J.S. Verbeek, and A. Mócsai, Critical but overlapping role of Fc $\gamma$ RIII and Fc $\gamma$ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol*, 2008. **180**(1): p. 618-29.
60. Jakus, Z., E. Simon, D. Frommhold, M. Sperandio, and A. Mócsai, Critical role of phospholipase C $\gamma$ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 2009. **206**(3): p. 577-93.
61. Dib, K., F. Melander, and T. Andersson, Role of p190RhoGAP in  $\beta$ <sub>2</sub> integrin regulation of RhoA in human neutrophils. *J Immunol*, 2001. **166**(10): p. 6311-22.
62. Heyworth, P.G., U.G. Knaus, J. Settleman, J.T. Curnutte, and G.M. Bokoch, Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(11): p. 1217-23.
63. Brouns, M.R., S.F. Matheson, K.Q. Hu, I. Delalle, V.S. Caviness, J. Silver, R.T. Bronson, and J. Settleman, The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development*, 2000. **127**(22): p. 4891-903.
64. Brouns, M.R., S.F. Matheson, and J. Settleman, p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(4): p. 361-7.
65. Sordella, R., M. Classon, K.Q. Hu, S.F. Matheson, M.R. Brouns, B. Fine, L. Zhang, H. Takami, Y. Yamada, and J. Settleman, Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Dev Cell*, 2002. **2**(5): p. 553-65.
66. Arthur, W.T. and K. Burridge, RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(9): p. 2711-20.



67. Liang, X., N.A. Draghi, and M.D. Resh, Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci*, 2004. **24**(32): p. 7140-9.
68. McGlade, J., B. Brunkhorst, D. Anderson, G. Mbamalu, J. Settleman, S. Dedhar, M. Rozakis-Adcock, L.B. Chen, and T. Pawson, The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J*, 1993. **12**(8): p. 3073-81.
69. Nakahara, H., S.C. Mueller, M. Nomizu, Y. Yamada, Y. Yeh, and W.T. Chen, Activation of  $\beta_1$  integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem*, 1998. **273**(1): p. 9-12.
70. Jiang, W., M. Betson, R. Mulloy, R. Foster, M. Levay, E. Ligeti, and J. Settleman, p190A RhoGAP is a glycogen synthase kinase-3- $\beta$  substrate required for polarized cell migration. *J Biol Chem*, 2008. **283**(30): p. 20978-88.
71. Soriano, P., C. Montgomery, R. Geske, and A. Bradley, Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*, 1991. **64**(4): p. 693-702.
72. Dusi, S., M. Donini, F. Wientjes, and F. Rossi, Translocation of p190rho guanosine triphosphatase-activating protein from cytosol to the membrane in human neutrophils stimulated with different agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **219**(3): p. 859-62.
73. Geiszt, M., M.C. Dagher, G. Molnar, A. Havasi, J. Faure, M.H. Paclet, F. Morel, and E. Ligeti, Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J*, 2001. **355**(Pt 3): p. 851-8.
74. Continolo, S., A. Baruzzi, M. Majeed, E. Cavegion, L. Fumagalli, C.A. Lowell, and G. Berton, The proto-oncogene Fgr regulates cell migration and this requires its plasma membrane localization. *Exp Cell Res*, 2005. **302**(2): p. 253-69.
75. Saltel, F., A. Chabadel, E. Bonnelye, and P. Jurdic, Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur J Cell Biol*, 2008. **87**(8-9): p. 459-68.

76. Baruzzi, A., E. Cavegion, and G. Berton, Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(14): p. 2175-90.
77. Németh, T., K. Futosi, C. Hably, M.R. Brouns, S.M. Jakob, M. Kovács, Z. Kertész, B. Walzog, J. Settleman, and A. Mócsai, Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol*, 2010. **185**(5): p. 3064-75.
78. Takeshita, S., K. Kaji, and A. Kudo, Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 2000. **15**(8): p. 1477-88.
79. Parfitt, A.M., M.K. Drezner, F.H. Glorieux, J.A. Kanis, H. Malluche, P.J. Meunier, S.M. Ott, and R.R. Recker, Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 1987. **2**(6): p. 595-610.
80. Zaiss, M.M., K. Sarter, A. Hess, K. Engelke, C. Bohm, F. Nimmerjahn, R. Voll, G. Schett, and J.P. David, Increased bone density and resistance to ovariectomy-induced bone loss in FoxP3-transgenic mice based on impaired osteoclast differentiation. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(8): p. 2328-38.
81. Mao, D., H. Epple, B. Uthgenannt, D.V. Novack, and R. Faccio, PLC $\gamma$ 2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *J Clin Invest*, 2006. **116**(11): p. 2869-79.
82. Chen, Y., X. Wang, L. Di, G. Fu, L. Bai, J. Liu, X. Feng, J.M. McDonald, S. Michalek, Y. He, M. Yu, Y.X. Fu, R. Wen, H. Wu, and D. Wang, Phospholipase C $\gamma$ 2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 2008. **283**(43): p. 29593-601.
83. Jakus, Z., T. Nemeth, C. Hably, and A. Mocsai, Critical role of phospholipase C gamma 2 in neutrophils. *European Journal of Clinical Investigation*, 2007. **37**: p. 23-23.
84. Kertész, Z., D. Györi, Z. Krasznai, Z. Jakus, and A. Mócsai, Role of PLC $\gamma$ 2 in osteoclasts differentiation and function. *Calcif Tissue Int*, 2007. **80**: p. S91.
85. Epple, H., V. Cremasco, K. Zhang, D. Mao, G.D. Longmore, and R. Faccio, Phospholipase C $\gamma$ 2 modulates integrin signaling in the osteoclast by affecting

- the localization and activation of Src kinase. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(11): p. 3610-22.
86. Boyce, B.F., T. Yoneda, C. Lowe, P. Soriano, and G. Mundy, Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J Clin Invest.* , 1992. **90** ((4)): p. 1622-7.
87. Lowe, C., T. Yoneda, B.F. Boyce, H. Chen, G.R. Mundy, and P. Soriano, Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(10): p. 4485-9.