

A PLC γ 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

Bírálok:

Dr. Szatmári István

Dr. Nagy György

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Gyires Klára

Szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Füst György

Prof. Dr. Buday László

Budapest
2011

1. Bevezetés

A csontszövetnek számos fontos funkciója ismert, ezek közé tartozik a belső szervek védelme, megfelelő tartószerkezet biztosítása és a testmozgások kivitelezése. Emellett azonban a csontok számos egyéb feladatot is ellátnak, mint a csontvelőben lezajló hematopoiezis támogatása, ásványi elemek raktározása és homeosztázisuk szabályozása, illetve a zsírraktározás. A csontszövet nem statikus állomány és az egészséges csontszerkezet megtartásához szükség van folyamatos átépülésére, valamint a szervezet szükségleteinek megfelelően alkalmazkodni a változásokhoz, így megtartva támogató és szabályzó szerepét. A csontok átépülése egy élethosszig tartó folyamat, amelyben a csontbontást egy felépítő szakasz követ. Ha a két folyamat során azonos mennyiségű csont épül fel, illetve bontódik le, akkor a folyamatok egymással egyensúlyban vannak. Az átépülés fontos a csontállomány fenntartásához, emellett fontos szerepe van a mikrosérülések kijavításában és az ásványi sók homeosztázisában. Ha az egyensúly megbomlik a folyamat oszteoporózishoz vezethet. Oszteoporózisban a csontok tömege és mésztartalma lecsökken, amely fokozott törékenységgel, a kóros és spontán törések kockázatának fokozódásával jár.

A lebontó-, és felépítő folyamatokban központi szerepet játszó sejtek az oszteoklasztok illetve az oszteoblasztok. Míg az oszteoklasztok hemopoetikus őssejtekből, addig a csontépítésben résztvevő sejtek, az oszteoblasztok mesenchymalis őssejtekből alakulnak ki. Feladatuk a csontszövet lebontása. Az oszteoblasztok fő feladata a szerves mátrix létrehozása, ezenkívül ők felelősek az oszteoklasztok működésének szabályozásáért is.

A foszfolipáz $C\gamma 2$ ($PLC\gamma 2$) elsősorban hematopoietikus eredetű sejtekben fordul elő. $PLC\gamma 2$ 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. A $PLC\gamma 2^{-/-}$ sejtekben megfigyelhető legtöbb defektus immunreceptor-szerű jelátviteli folyamatokat használó receptorok, integrinek jelátvitelének károsodásából adódik.

A p190RhoGAP fehérjéknek két izoformája, a p190-A és a p190-B ismert. A p190RhoGAP-fehérjék szerepét feltételezik az integrinek jelátvitelében, ahol $\beta 2$ integrin általi aktivációjuk jön létre neutrofil granulocitákban. Ismert, hogy a $\beta 3$ -integrinek részt vesznek az oszteoklasztok fejlődésében és működésében. A p190RhoGAP-ok hiánya egérben embrionális letalitást okoz.

2. Célkitűzések

- 2.1. Milyen szerepet játszik a PLC γ 2 fehérje az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében?
- 2.2. Milyen jelpálya működésében vesz részt a PLC γ 2 oszteoklasztokban?
- 2.3. Szerepet játszik-e a PLC γ 2 az *in vivo* csontanyagcserében egészséges és kóros körülmények között?
- 2.4. Hogyan vizsgálható az embrionális letalitást okozó p190-A és p190-B fehérjék funkciója oszteoklasztokban?
- 2.5. Van-e szerepe a p190RhoGAP fehérjének az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében?

3. Módszerek

3.1 Kísérleti állatok

A PLC γ 2 egereket C57BL/6 genetikai háttéren Dr. James N. Ihle (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA) bocsátotta rendelkezésükre. A p190-A és a p190-B mutációkat hordozó egereket Dr. Jeffrey Settleman (Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA) hozta létre és bocsátotta rendelkezésünkre. Mivel mind a p190-A, mind a p190-B hiánya késői embrionális letalitást eredményez, csontvelő-kimérákat hoztunk létre úgy, hogy a donor sejteket időzített terhességből származó magzatok májából nyertük.

3.2 Egér csontvelői sejtek izolálása és tenyésztése

In vitro sejt kultúrákhoz a csontvelői sejteket egerek comb- és lábszárcsontjainak kimosásával nyertük. A csontokból kipreparált sejteket α -MEM médiumban tenyésztettük, 10 ng/ml egér M-CSF (Peprotech) jelenlétében 2 napon keresztül tenyésztettük. Az oszteoklasztok morfológiai vizsgálatához és a génexpressziós vizsgálatokhoz 24-lyukú sejt kultúra-kezelt lemezre 5×10^5 /ml koncentrációjú sejt szuszpenziót helyeztünk és azokat 20-50 ng/ml rekombináns egér M-CSF (Peprotech) és 0-20-50 ng/ml rekombináns egér RANKL (Peprotech)

jelenlétében α -MEM médiumban tenyésztettük. A 24-lyukú lemezre való kihelyezést követő 3-5. napon a tenyészeteket tartarát-rezisztens savas foszfátáz (TRAP) kit (Sigma) segítségével megfestettük. A tenyészeteket Leica Microsystems (Wetzlar) DMI6000B inverz mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az oszteoklasztok funkcionális vizsgálatához a prekursor sejtekből 5×10^5 /ml koncentrációjú sejtuszpenziót mesterséges hidroxiapatit-felzint tartalmazó 16-lyukú lemezre (BioCoat Osteologic slides; BD Biosciences) helyeztük és rekombináns M-CSF és RANKL jelenlétében 10-14 napon keresztül α -MEM médiumban tenyésztettük. A hidroxiapatit-réteg rágásnyomait Leica DMI6000B inverz mikroszkóp segítségével rögzítettük és az ImageJ szoftver segítségével számszerűsítettük.

3.3 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 történt. Ezután megvizsgáltuk az egér *Acp5* (TRAP), *Fos* (c-Fos), *Calcr* (kalcitonin receptor), *Ctsk* (katepszin K), *Nfatc1* (NFATc1), *Oscar* (OSCAR) és *Tm7sf4* (DC-STAMP) génjeinek expresszióját. A normalizáláshoz a *Gapdh* (GAPDH) háztartási gén expresszióját is meghatároztuk. A reakciót 40 cikluson keresztül 94 °C-on 12 másodpercig és 60 °C-on 60 másodpercig végeztük. A relatív transzkript mennyiségét az endogén háztartási *Gapdh* gén mennyiségével összehasonlítva komparatív C_t módszer segítségével kaptuk meg.

3.4 Biokémiai és jelátviteli folyamatok vizsgálata

A PLC γ 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.

A különböző fehérjék foszforilációját 5-8 napig rekombináns M-CSF (CMG14-12 sejtek kondicionált médiuma) jelenlétében tenyésztett makrofágokon vizsgáltuk. A sejteket 8 percre 10 μ M PP2-vel (EMD Biosciences) kezeltük. A sejteket 50 ng/ml M-CSF vagy 50 ng/ml RANKL citokin segítségével szuszpenzióban stimuláltuk vagy 6 cm átmérőjű sejt kultúra-kezelt plate-re 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 deoxikolátot tartalmazó pufferben tártuk fel (RIPA). A minták egy részéből PLC γ 2-ellenes antitesttel (Q-20; Santa Cruz Biotechnology), majd Protein A Sepharose (Zymed) és Protein G Agarose (Invitrogen) 1:1 arányú keverékével kiprecipitáltuk a PLC γ 2 fehérjét. A sejt-lizátumokat és az immunprecipitátumokat Western blot módszerrel vizsgáltuk tovább. A vizsgálathoz a PLC γ 2 elleni foszfospecifikus (pTyr 759, Cell Signaling) vagy nem foszfospecifikus (Q-20) antitestet, foszfortirozinra specifikus (4G10; Millipore) antitestet, az ERK (#9101; Cell Signaling) és a p38 MAP-kináz (#9211; Cell Signaling) elleni foszfospecifikus antitesteket, az ERK1/2 elleni antitestkeveréket (C-16 (ERK1) és C-14 (ERK2); Santa Cruz), valamint a p38 MAP kináz (C-20; Santa Cruz), az I κ B α (#9242; Cell Signaling), a p190-A (Clone 30; BD Biosciences), a p190-B (Clone 54; BD Biosciences) és a β -aktin (AC-74; Sigma) elleni elsődleges antitesteket használtunk. Másodlagos ellenanyagként GE Healthcare reagenseket alkalmaztunk. Az immunreakciót ECL reagenssel, kemilumineszcens módszerrel hívtuk elő és röntgenfilmre exponáltuk.

3.5 A petefészkek eltávolítása

Vad típusú és PLC γ 2^{-/-} egereket 8 hetes korban ketamin és medetomidin keverékével elaltattuk, majd az egerek méhét és petefészkeket lekötöttük, majd ezt követően azokat sebészeti úton eltávolítottuk. Áloperált (SHAM) kontroll állatokon ugyanolyan sebészi feltárást végeztünk, de a petefészkek felkeresése után azokat nem távolítottuk el. Hat héttel az operációt követően az állatokat feláldoztuk és comb-, illetve lábszárcsontjaikat további vizsgálatok céljára eltávolítottuk.

3.6 Micro-CT analízis és hisztomorfometria

Az intakt egereken történő vizsgálatokat 8-10 hetes hímeiken végeztük. Az ovariektómia és párhuzamos áloperáció hatását 14 hetes nőstény állatokon vizsgáltuk. 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 készülékkel végeztük. A minták beszkennelésére 50 kV és 200 μ A erősségű röntgensugár forrást alkalmaztunk 0,5 mm vastagságú alumínium szűrő mellett. A mintákat 0,5 fokként forgattuk. Ezek a beállítások 4,5 μ 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 manuálisan történt, a minták mindegyikénél egyformán.

Hisztomorfometriai analízis céljára az egerek tibiájának proximális metafízisét használtuk fel. Az egerek feláldozása után a csontokat 70%-os alkoholba tettük, 4%-os formalinban fixáltuk, majd dekalcinálás nélküli beágyazás történt metilmetakrilban. A polimerizációt követően, 3-4 μm -ként történt a metszése a metafízisnek. Az így kapott mintákat Kossa és Goldner szerint festettük. A metszetekről készült digitális képeket Osteomeasure (Osteometrics) szoftver segítségével nemzetközi standardok szerint elemeztük.

3.7 Statisztikai analízis

Kísérleteinket legalább háromszor megismételtük. 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.

4. Eredmények

4.1 PLC γ 2 szerepének vizsgálata

4.1.1 PLC γ 2 az oszteoklaszt fejlődésben és működésben

Először arra voltunk kíváncsiak, hogy a PLC γ 2-nek milyen hatása van az oszteoklasztok fejlődésére és működésére. Azt tapasztaltuk, 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 γ 2^{-/-} csontvelői sejtekből ezzel szemben egyik citokin-koncentráció mellett sem alakultak ki sokmagvú óriássejtek, bár a keletkezett mononukleáris sejtek jelentős része TRAP-pozitívnak mutatkozott. A PLC γ 2 hiánya tehát drámaian csökkentette a TRAP-pozitív sokmagvú oszteoklasztok számát, de nem akadályozta meg teljesen az oszteoklasztok biokémiai érésére jellemző TRAP enzim expresszióját. Ezt követően azt szeretnénk tudni, hogy a PLC γ 2 hiánya milyen hatással van az oszteoklaszt-kultúrák funkcionális (reszorpciós) aktivitására. Ennek érdekében vad típusú és PLC γ 2^{-/-} 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. 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 $PLC\gamma 2^{-/-}$ 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 szervetlen csontmátrix oszteoklasztok általi bontása.

4.1.2 $PLC\gamma 2$ hatása a génexpresszióra

A következőkben azt szerettük volna megvizsgálni, hogy mi okozza a $PLC\gamma 2^{-/-}$ sejtek multinukleáris oszteoklaszt irányba történő a zavarát. Elsőként azt szerettük volna kizárni, hogy a $PLC\gamma 2$ hiánya a mieloid sejtek differenciációjának általános zavarát okozza. Ennek érdekében vad típusú és $PLC\gamma 2^{-/-}$ makrofág-tenyészetek sejtjeiben megvizsgáltuk a makrofágok érése során megjelenő F4/80 marker expresszióját.

Különbséget nem tapasztaltunk a vad típusú és PLC γ 2 hiányos egerek makrofágjainak F4/80 expressziója között. Ezt követően az oszteoklaszt specifikus gének expresszióját vizsgáltuk meg a fejlődés során. A kísérletek során a következő gének néztük: 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 sejtfelszíni OSCAR (*Oscar*) és DC-STAMP (*Tm7sf4*) receptorait kódoló gének. A vizsgált gének mindegyikének expressziója RANKL-kezelt vad típusú és PLC γ 2^{-/-} tenyészetekben is megnőtt és ez a növekedés a PLC γ 2 hiányos egerek sejtjeiben is a vad típusúhoz hasonló mértékű volt.

4.1.3 A PLC γ 2 aktiválódásának módja

Az oszteoklasztok fejlődését különböző extracelluláris szignálok hozzák létre. A vizsgálatokban arra kerestük a választ, hogy vajon a PLC γ 2 aktiválódását az M-CSF, RANK ligand vagy az adhézió közül melyik képes létrehozni. 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 sejtek adhéziója váltotta ki a PLC γ 2 foszforilációját, míg M-CSF vagy RANKL hatására a PLC γ 2 foszforilációja nem jött létre. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a PLC γ 2 aktiválódása a sejtadhézió, nem pedig az M-CSF vagy a RANKL hatására jön létre. Szuszpenziós körülmények között azonban létrejött a már irodalomból is jól ismert M-CSF általi ERK vagy RANK ligand hatására kialakuló p38 foszforiláció. Így ezen eredmények ismeretében arra engednek következtetni, hogy az adhézió valóban az a stimulus, amely szükséges a PLC γ 2 aktiválódásához.

A következőkben azt szerettük volna megtudni, hogy milyen folyamatok vesznek részt a PLC γ 2 adhézió-függő aktiválódásában. A sejteket PP2-vel kezelve, az Src-kinázok gátlószerével, teljes egészében megszüntette a PLC γ 2 adhézió-függő foszforilációját. A PLC γ 2 aktiválódása a sejtadhézió során tehát feltételezhetően az Src-típusú tirozin-kinázok részvételével jön létre.

4.1.4 A PLC γ 2 szerepe az *in vivo* csontanyagcserében

Bár az oszteoklaszt-tenyészetek eddig bemutatott funkcionális és biokémiai vizsgálata igazolta a PLC γ 2 szerepét az oszteoklasztok létrejöttében az adott *in vitro* körülmények

között, ezek az eredmények önmagukban nem bizonyítják a PLC γ 2 szerepét az *in vivo* csontanyagcsere folyamataiban. Kísérleteinket ezért intakt vad típusú és PLC γ 2^{-/-} egerek csontjainak vizsgálatával folytattuk. Micro-CT analízissel kapott eredmények azt mutatták, hogy a PLC γ 2 hiányában a trabekuláris csontállomány jelentősen megnövekedett, amelyet kvantitatíven is számszerűsítettünk BV/TV, trabekulák számának, illetve trabekulák vastagságának értékeinek követésével. PLC γ 2^{-/-} egerekben jelentősebb magasabb értékeket kaptunk BV/TV esetében, amelyet a kapott értékek alapján a trabekulák számának növekedésével magyarázhatunk. Ezen értékeket a hisztomorfológiás eredmények is megerősítettek.

Ezt követően az ovariektómia hatását vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a csontszerkezet alakulását a PLC γ 2 hiánya. A femur disztális metafízisének mikro-CT vizsgálata azt mutatta, hogy vad típusú egerekben az ovariektómia hatására jelentős mértékben csökkent a trabekuláris csontállomány mennyisége és az azt jellemző relatív csonttérfogat (BV/TV) érték. Ezt a csökkentést elsősorban a csontgerendák számának, nem pedig azok vastagságának a csökkenése okozta. Várakozásainkkal ellentétben ugyanakkor ovariektómia hatására a PLC γ 2^{-/-} 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 létrejövő csontlebontás (a BV/TV érték csökkenése) lényegesen magasabb volt a PLC γ 2^{-/-} egerekben, mint a vad típusú egerekben. A bazális csontbontáshoz hasonlóan ovarektómia esetében is alkalmaztunk hisztomorfológiai elemzéseket a micro-CT vizsgálatok megerősítésére és további vizsgálatok céljára. Az így kapott eredmények összecsengtek a már korábban kapott micro-CT eredményekkel. Érdekeség azonban az, hogy PLC γ 2 hiányában is jelentősen megemelkedett az oszteoklasztok száma a vad típushoz hasonlóan, míg az oszteoblasztok számában jelentős különbséget nem kaptunk.

4.2 p190RhoGAP-k szerepe oszteoklasztok fejlődésében és működésében

4.2.1 p190-A és B *in vitro* kultúrák létrehozása

Bevezetőmben említettem, hogy a p190-A^{-/-} és a p190-B^{-/-} mutációnál is késői embrionális letalitás várható, emiatt nem volt lehetőség az egyes knockout egerek csontvelői sejtjeinek kinyerésére és *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 besugarazott recipiensekbe transzplantálva a kívánt genotípusú hemopoetikus rendszerrel rendelkező csontvelő-kimérákat hozunk létre. A magzati májsejtek létrehozásához heterozigóta egyedeket pároztattunk (p190-A^{+/-} × p190-A^{+/-} vagy p190-B^{+/-} × 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. A transzplantáció sikerességét a transzplantációt követő 4-6. héten a perifériás vérben keringő neutrofilek Ly5.2-festődésének vizsgálatával, áramlási citometriás módszerrel ellenőriztük. Vad típusú csontvelői sejtjeiből *in vitro* differenciáltatott makrofágsejtekben p190-A és p190-B fehérjék jelen vannak, míg a p190-A^{-/-} sejtekben hiányzott a p190-A immunreakció, és p190-B^{-/-} sejtekben a p190-B fehérje nem volt megfigyelhető. Sikertelt tehát kimutatni, hogy makrofágokban jelen van a p190RhoGAP mindkét izoformája illetve, hogy az általunk

használt magzati májsejt-transzplantációval képesek vagyunk p190-A- és p190-B-hiányos mieloid sejtek létrehozására.

4.2.2 p190RhoGAPok szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és működésében

Ezt követően ezen két fehérje szerepét vizsgáltuk az oszteoklasztok fejlődésében és működésében. A p190-A vizsgálata során azt találtuk, hogy a vad típusú és p190-A^{-/-} tenyészetekben egyaránt kialakultak sokmagvú TRAP-pozitív sejtek és ezek száma nem mutatott érdemi különbséget a két genotípus között. A tenyészetek *in vitro* reszorpciós képességének vizsgálata szintén azt mutatta, hogy nincs jelentős különbség a kétféle genotípusú oszteoklasztok funkcionális kapacitása között.

Ugyanezeket a kísérleteket elvégeztük p190-B^{-/-} oszteoklaszt-tenyészeteken is. 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 típushoz hasonló mértékben bontották le a mesterséges hidoxiapatit felszint.

A p190-A és a p190-B önmagukban tehát nem játszanak elengedhetetlen szerepet az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és funkciójában.

5. Következtetések

Munkám során a PLC γ 2, p190-A és p190-B fehérjék az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és funkciójában betöltött szerepét és a PLC γ 2 fehérje szerepét az *in vivo* csontanyagcserében vizsgáltam.

Eredményeinkből az alábbi következtetések vonhatók le:

- 5.1. A PLC γ 2 fehérje elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és működéséhez.
- 5.2. A PLC γ 2 nem szükséges az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának fokozódásához.
- 5.3. A PLC γ 2 a sejtadhézió, nem pedig az M-CSF vagy RANKL citokinek hatására aktiválódik.
- 5.4. A PLC γ 2 szükséges a bazális csontbontás folyamatához.
- 5.5. A PLC γ 2 nem szükséges az ovariektómia-kiváltotta csontlebontáshoz.
- 5.6. A bazális és ovariektómia-indukált csontlebontás különböző folyamatokon keresztül jön létre.
- 5.7. Magzati májsejtek transzplantációjával lehetséges letális mutációt hordozó oszteoklasztok tenyésztése és vizsgálata.
- 5.8. Önmagában sem a p190-A, sem a p190-B nem elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és működéséhez.

6. Saját publikációs jegyzék

- 6.1. Zsuzsanna Kertész**, Dávid Győri, Szandra Körmendi, Tünde Fekete, Katalin Kis-Tóth, Zoltán Jakus, Georg Schett, Éva Rajnavölgyi, Csaba Dobó-Nagy és Attila Mócsai: *Phospholipase Cy2 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
- 6.2. 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
- 6.3. 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: 1,8