

A PI3K β és a PLC γ 2 fehérjék szerepe az oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Doktori értekezés

Dr. Győri Dávid Sándor

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi docens, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Józsi Mihály tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Takács István egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:
Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Falus András egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Dr. Sármay Gabriella egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Prohászka Zoltán tudományos munkatárs, az MTA doktora

Budapest
2014

1. Tartalomjegyzék

1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
3. BEVEZETÉS.....	7
3.1. A csontot érintő betegségek	7
3.2. A csont általános jellemzése.....	8
3.3. A csontot alkotó sejtek	10
3.4. A csontátépülés folyamata.....	12
3.5. A csont és az immunrendszer kapcsolata	12
3.6. Az oszteoklasztok fejlődése	13
3.7. Az oszteoklasztok működése.....	15
3.8. Az M-CSF jelátvitel az oszteoklasztokban.....	16
3.9. A RANKL jelátvitel az oszteoklasztokban.....	17
3.10. Az $\alpha_v\beta_3$ integrinek szerepe az oszteoklasztokban.....	19
3.11. Immunreceptor-szerű jelátvitel az oszteoklasztokban.....	21
3.12. A foszfatidilinozitol 3-kinázok és az oszteoklasztok	23
3.13. A foszfolipáz C γ enzimek és az oszteoklasztok.....	25
4. CÉLKITŰZÉSEK	27
5. MÓDSZEREK.....	28
5.1. Kísérleti állatok	28
5.2. <i>In vitro</i> oszteoklaszt és makrofág kultúrák.....	29
5.3. Apoptózis vizsgálata.....	31
5.4. Fluoreszcens mikroszkópia	32
5.5. Génexpressziós vizsgálatok.....	33
5.6. Biokémiai vizsgálatok	34
5.7. Retrovirális rekonstitúció	35
5.8. Mikro-CT vizsgálatok	36
5.9. Szövetteni vizsgálatok.....	37
5.10. Petefészek eltávolítás	37
5.11. Statisztikai analízis	38

6. EREDMÉNYEK	39
6.1. A PI3K β szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és működésében	39
6.1.1. Az oszteoklaszt-fejlődés során fokozódik a PI3K β kifejeződése.....	39
6.1.2. A TGX221 gátolja az oszteoklasztok fejlődését és működését.....	40
6.1.3. A PI3K β hiányában a mineralizált csont mennyisége megnő	42
6.1.4. A PI3K β hiányában károsodik az oszteoklaszt-fejlődés és -működés	44
6.1.5. A PI3K β hiánya a korai gének kifejeződését nem befolyásolja.....	46
6.1.6. A PI3K β hiánya az oszteoklasztok túlélését nem befolyásolja	47
6.1.7. A PI3K β az aktinyűrű-képzést és a katepszin K-ürítést szabályozza.....	48
6.1.8. A PI3K β szerepe az ovariectomia-indukálta csontvesztésben	52
6.1.9. A PI3K β hiányában károsodik a PLC γ 2 aktivációja	53
6.2. A PLC γ 2 szerepe az oszteoklasztok fejlődésében.....	54
6.2.1. A PLC γ 2 szerepe a kalcium-oszcillációk kialakulásában	55
6.2.2. A RANKL adása kalcium-oszcillációkat indukál	56
6.2.3. A PLC γ 2 hiányában nem jön létre kalcium-oszcilláció	57
6.2.4. A PLC γ 2 ^{-/-} preoszteoklasztok nem mutatnak Ca ²⁺ -oszcillációkat.....	58
6.2.5. A PLC γ 2 újrakifejezése helyreállítja a kalcium-oszcillációkat.....	60
7. MEGBESZÉLÉS	63
8. KÖVETKEZTETÉSEK	69
9. ÖSSZEFOGLALÁS	70
10. SUMMARY	71
11. IRODALOMJEGYZÉK	72
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	87
13. TÁRSSZERZŐK KÖZÖTTI MUNKAMEGOSZTÁS	88
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	89

2. Rövidítések jegyzéke

7-AAD	7-aminoactinomycin D
AM	acetoximetil-észter
ANOVA	varianciaanalízis
AP-1	aktivátor protein 1
BCL-2	B-sejtes limfóma 2 fehérje
BCR	B-sejt receptor
bFGF	fibroblaszt növekedési faktor
BMP	csont morfogénikus fehérje
BV/TV	bone volume/tissue volume (relatív csonttérfogat)
CTSK	katepszin K
DAG	diacilglicerol
DAP12	DNAX-aktiváló 12 kDa méretű protein
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC-STAMP	dendritikus sejt-specifikus transzmembrán protein
DMEM	Dulbecco módosított esszenciális médium
DMSO	dimetil sulfoxid
ECL	erősített kemilumineszcencia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFP	erősített GFP
ERK-1/2	extracelluláris szignál-regulálta kináz 1/2
FAK	fokális adhézios kináz
FcR	Fc-receptor
FcR γ	Fc-receptor γ lánc
FYVE	zinc ujj domén
GAPDH	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GEF	guanin-nukleotid kicserélő faktor
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
IGF-1	inzulin-szerű növekedési faktor 1
InsP ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
IP	immunprecipitáció
IRES	belső riboszóma belépési hely
ITAM	immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum

I κ B α	nukleáris faktor κ B inhibitor α
JNK	Janus N-terminális kináz
MAPK	mitogén-aktiválta protein kináz
M-CSF	makrofág kolónia-stimuláló faktor
MEM	minimális esszenciális médium
MF	makrofág
MITF	microphthalmia-asszociált transzkripció faktor
MSCV	egér-össejt vírus
mTOR	Rapamicin target fehérje
NFATc1	aktivált T-sejt nukleáris faktor 1
NF- κ B	nukleáris faktor κ B
NK	természetes ölüsejt
OB	oszteoblaszt
OC	oszteoklaszt
ODF	oszteoklaszt differenciációs faktor
OPG	oszteoprotegerin
OPGL	oszteoprotegerin ligand
OSCAR	oszteoklaszt-asszociált receptor
OVX	ovariectomia
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PDGF	vérlemezke-eredetű növekedési faktor
PH	plekstrin homológia domén
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz
PI3K β	foszfatidilinozitol 3-kináz β
PIR-A	páros immunglobulin-szerű receptor A
PKB	protein kináz B/AKT
PLC	foszfolipáz C
PLC γ 2	foszfolipáz C γ 2
PMA	forbol-mirisztil acetát
pMIG	MSCV-IRES-GFP plazmid
PtdInsP	foszfatidilinozitol foszfát
PTH	parathormon
PU.1	purin-gazdag motívumot felismerő transzkripció faktor
PX	phox domén

PYK	prolin-gazdag tirozin kináz
qPCR	kvantitatív PCR
RANK	NF- κ B aktivátor receptor
RANKL	RANK ligand
RIPA	radioimmunprecipitációs mérés
SCF	őssejt faktor
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	átlag standard hibája
SH	Src-homológia domén
SHAM	áloperáció
SIRP- β 1	szignál-szabályozó protein β 1
SYK	lép tirozin kináz
TCR	T-sejt receptor
TGF- β	transzformáló növekedési faktor β
TNF- α	tumor nekrozis faktor α
TNFRSF11	tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád 11 tag (RANK)
TNFSF11a	tumor nekrozis faktor szupercsalád 11a tag (RANKL)
TNFSF11b	tumor nekrozis faktor szupercsalád 11b tag (OPG)
TPO	trombopoetin
TRAF6	TNF receptor-asszociált faktor 6
TRANCE	TNF-rokon aktiváció-indukált citokin
TRAP	tartarát-rezisztens savas foszfátáz
TREM-2	mieloid sejteken expresszáldó aktiváló receptor 2
TUNEL	terminális dezoxinukleotid transzferáz dUTP jelölés
WHO	Egészségügyi Világszervezet
ZAP-70	zéta lánc-asszociált 70 kDa méretű kináz

3. Bevezetés

A modern társadalmakban a populáció öregedése során a csontrendszert érintő betegségek előfordulási gyakorisága növekszik, ami szükségessé teszi e betegségek patomechanizmusának alaposabb megértését, a kialakulásukban szereplő élettani és kórélettani folyamatok vizsgálatát. Az oszteoklasztok az emberi szervezetben egyedüli sejtként képesek a csontszövet lebontására, mely lépés elengedhetetlen a csontátépülés fiziológiás folyamata során. A hemopoetikus eredetű mieloid előalakok M-CSF és RANKL citokinek hatására differenciálódnak sokmagvú óriássejttekké. Az érett oszteoklaszt működése során polarizálódik, majd az aktinyűrű struktúrák létrehozásával zárt teret alakít ki a csontfelszínen, melybe sósavat és emésztőenzimeket szekretál. A helyileg létrehozott savas környezetben a csontszövet mineralizált sói kioldódnak, az extracelluláris mátrix fehérjéi pedig az emésztőenzimek - például katepszin K - hatására lebomlanak. Az oszteoklasztok fejlődése és működése során lejátszódó folyamatok élettani alapjainak megismerése, és a csontanyagcsere molekuláris szintű szabályozásának megértése révén felvetődik a remény, hogy a csontbetegségek oki kezelése lehetővé váljon.

3.1. A csontot érintő betegségek

A látszat ellenére a csont dinamikusan változó szövet: a csontátépülés során a csontképző és a csontbontó folyamatok egyensúlyban vannak. Ha ez az egyensúly felborul, a csontszerkezet károsodik.

Az oszteopetrózis, vagy márványcsont betegség esetében az oszteoklasztok csökkent száma vagy működési zavara miatt a csont mésztartalma kóros mértékben megnő. A nagyon ritka korai kezdetű forma már csecsemőkorban halálhoz vezet, a késői kezdetű Albers-Schönberg kór pedig általában gyermekkorban jelentkezik. Gyakori tünetei a perifériás idegek bénulása, a vakság, a vérszegénység, a véralvadási zavarok és a súlyos fertőzések kialakulása, illetve - paradox módon - a nagyon tömör csontok fokozott töréshajlama (1).

A fokozott csontvesztéssel járó betegségek az oszteopetrózisnál jóval gyakrabban fordulnak elő a populációban. Leggyakoribb megnyilvánulási formáik az oszteoporózis, valamint az autoimmun ízületi gyulladást kísérő csontvesztés.

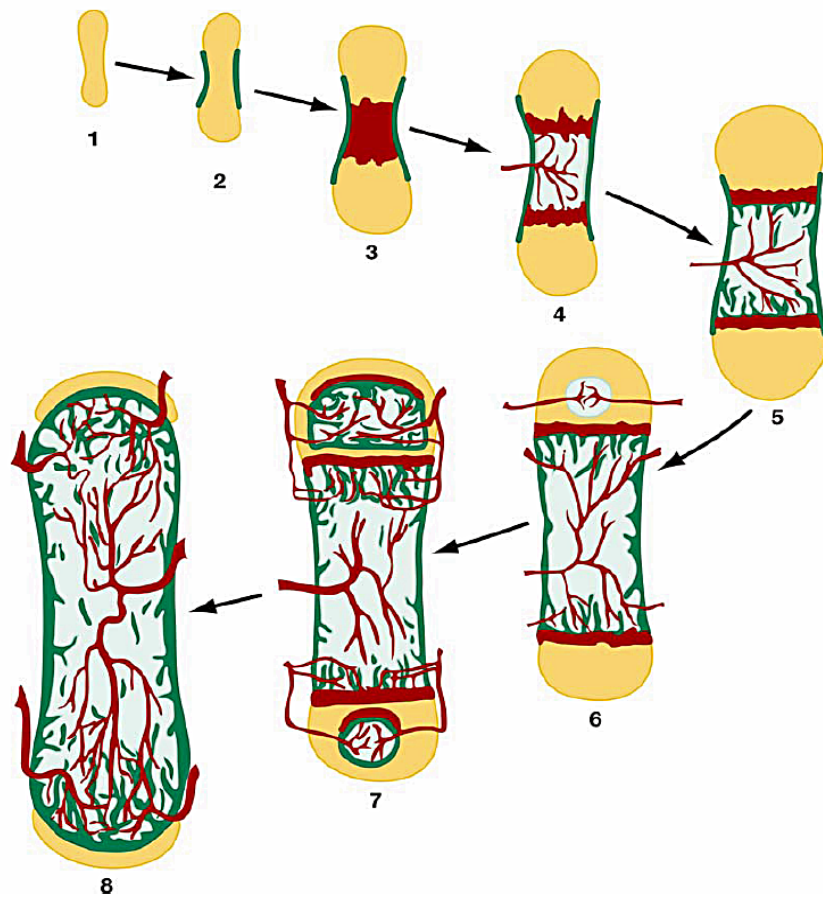
Az oszteoporózis a csontrendszer szisztémás megbetegedése, melyre jellemző a csonttömeg progresszív csökkenése, a csontszerkezet mennyiségi és minőségi károsodása. Az oszteoporotikus csontok meggyengülnek, és a korábban még elviselt terhelések hatására is eltörhetnek. A primer csonttritkulás nőknél leggyakrabban a menopauza táján, az ösztrogén hormonok csontvédő hatásának hiányában (1-es típusú vagy posztmenopauzális oszteoporózis), idősekben pedig 75 éves kor felett (2-es típusú vagy szenilis oszteoporózis) jelentkezik. A szekunder csonttritkulás hátterében leggyakrabban endokrinológiai megbetegedések (hiperkortizolizmus, hiperparatireoidizmus, hipogonadizmus) vagy iatrogén okok (glükokortikoid terápia) állnak. Az oszteoporózis jelentősen befolyásolja az egyén életminőségét, társadalmi és népegészségügyi következményei pedig messzemenőek. A WHO az új évezred első dekádját a csont és az ízület évtizedének nyilvánította, becslések szerint a csonttritkulás az Amerikai Egyesült Államok 50 év feletti lakosságának több mint a felét érinti (2), hazánkban pedig körülbelül 900 ezer (600.000 nő és 300.000 férfi) oszteoporotikus beteggel lehet számolni (3).

A csontot érintő autoimmun ízületi gyulladás krónikus lefolyású, progresszív betegség, amely fokozódó mozgáskorlátozottsággal jár. A leggyakoribb forma, a rheumatoid arthritis előfordulási gyakorisága 1% körül van a populációban (4). A betegség kezdetben jellegzetesen a kéz kisízületeit támadja meg, majd ezt követően válik sokízületi gyulladássá. A rheumatoid arthritis progrediálva, shubokban zajlik, krónikusan fennállva ízületi károsodáshoz és rokkantsághoz vezet. A kezdeti, indukciós fázisban az antigénfelismerés és a limfocitaaktiváció, a későbbi, destruktív fázisban a gyulladáshoz vezető szövetgyulladás (pannus), és a krónikus szinovitisz során kialakuló porc- és csontdestrukció a meghatározó (4).

3.2. A csont általános jellemzése

A csontszövet tartó vázát adja a szervezetnek, lehetővé teszi a helyváltoztatást, védelmet nyújt a belső szerveknek, színteret biztosít a vérképzésnek, valamint ásványi

anyagokat és zsírt raktároz (5-8). A csontrendszer az egyed fejlődése és növekedése során két eltérő úton, enchondrális vagy dezmális csontosodással a mesenchymából keletkezik. Dezmális csontosodáskor a mesenchymális őssejtek alakulnak át csontsejtekké, és kezdik termelni az alapállományt. A lapos csontok képződnek így. Enchondrális csontosodás során a mesenchymából először porc szövet keletkezik, majd a porcba benövő erek mentén áramlanak be később a differenciálódó porc- és csontsejtek (1. ábra). Így alakulnak ki a csigolyák és a hosszú csöves csontok (9).



1. ábra. Az *enchondrális csontosodás fázisai*. Az embriogenezis során a csonttelep helyének megfelelően először porc képződik (1), majd megindul a csontosodás a széli részek felől (2), és ezzel párhuzamosan a porc centruma kalcifikálódik (3). Ezt követően a kalcifikálódott porc felszívódik (4), majd erek nőnek be a majdani csontvelő helyére, és az oszteoblasztok megkezdik a mineralizált alapállomány lerakását (5). Az egyedfejlődés során a mineralizált csont mennyisége nő (6). Gyermekkorban, az epifízis fugában a növekedési porc perzisztál (7), majd a pubertás lezárultával, fiatal felnőttkorban elcsontosodik (8). Forrás: (21).

Az enchondrálisan csontosodott támasztószövet két eltérő szerkezetben jelenik meg. A kortikális csontban tömör szerkezet alakul ki, nagy ásványianyag tartalommal.

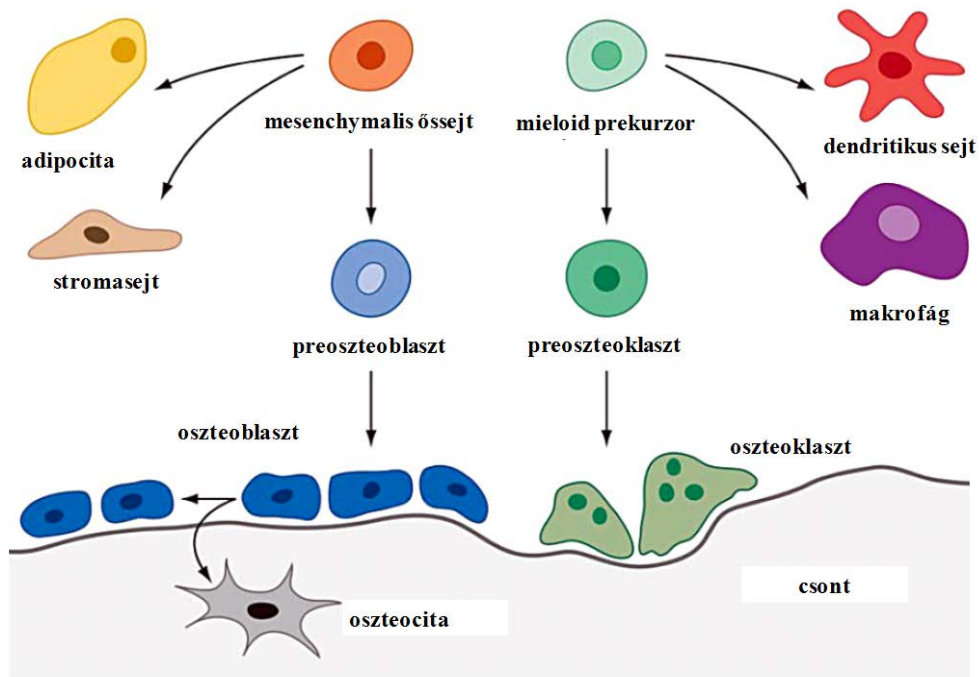
A trabekuláris csontban vékony csontlemezek találhatóak, a nagyobb felületnek megfelelően pedig a csontátépülési folyamatok élénkebbek. A kétféle szerkezet aránya az egyes csontokban eltérő; a hosszú csöves csontok diafizise főként kortikális csontból, míg például a csigolyák belseje és a combnyak döntően trabekuláris csontból épül fel (9, 10).

A csontszövet mineralizált (szervetlen) és nem mineralizált (szerves) alapállományból áll. A mineralizált mátrix elsősorban hidroxipapatitot $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ tartalmaz. A csontképzés során kalcium- és foszfátkicsapódás történik, majd az alapállományba további ionok (OH^- , CO_3^{2-}) rakódnak le, így alakulnak ki végül a jellegzetes hidroxipapatit-kristályok. A nem mineralizált mátrixot nagy mennyiségben I. típusú kollagén építi fel. A szerves mátrixot alkotó további, úgynevezett nem kollagén csontfehérjék közül az adhéziós fehérjék (fibronektin, oszteopontin, csontszialoprotein, oszteonektin), a proteoglikánok (kondroitinszulfát, heparinszulfát) és a különböző szabályozó faktorok (TGF- β , IGF-1, PDGF, bFGF) a legismertebbek (10).

3.3. A csontot alkotó sejtek

A csontszövet felépítését az oszteoblasztok végzik, melyek az adipocitákkal és a csontvelői stromasejtekkel közös multipotens előalakokból, mesenchymális őssejtekből differenciálódnak (11) (2. ábra). A prekursor sejtek oszteoblaszt irányú elköteleződését meghatározó Runx2 és Osterix transzkripciós faktorok hiányában nem alakulnak ki érett oszteoblasztok (12, 13). A csont morfogenetikus fehérje (BMP) és a Wnt receptorok által elindított jelátviteli útvonalak pedig elengedhetetlenek az előalakok adipocita és oszteoblaszt irányú fejlődésének meghatározásához (14-18). Az oszteoblasztok fő feladata a kollagénben gazdag szerves alapállomány létrehozása, a mátrixfehérjék szekretálása, és a csontmineralizáció elősegítése. Az érett oszteoblasztokra a TGF- β receptor, oszteokalcin, oszteopontin és alkalikus foszfatáz fehérjék fokozott expressziója jellemző. Az oszteoblaszt-differenciáció legfontosabb hormonális szabályozói a parathormon (PTH) és az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin. Az oszteoblasztoknak a csontot alkotó többi sejttel megvalósuló direkt és indirekt információcseréje eredményezi a csontállomány folyamatos kicserélődését.

Ahogy az oszteoblaszt által létrehozott alapállomány kalcifikálódik, a sejtek egy része maga is beépül a csontba. A csontszövet belsejében csapdába esett oszteoblasztok nyúlványos sejtekké alakulnak, melyeket oszteocitáknak nevezünk (2. ábra). Az oszteociták feladata a csontra ható erők érzékelése, valamint a többi csontsejttel való kölcsönhatásuk révén a csontátépülés helyének meghatározása (19).



2. ábra. A csontsejtek eredete. A mesenchymális őssejtből alakulnak ki a csontvelői adipociták és stromasejtek, valamint a preoszteoblasztok, melyek a csont felszínén érett oszteoblasztokká differenciálódnak. Az oszteoblasztok a csontfelszínen maradnak, vagy maguk is beépülnek a csontmátrixba, és oszteociták lesznek. A mieloid prekursor - a makrofág és a dendritikus sejtek képzése mellett - az oszteoklasztok előalakjának számító preoszteoklasztokat hozza létre. Forrás: (21).

Az oszteoklasztok terminálisan differenciálódott, sokmagvú óriássejtek, melyeknek fő feladatuk a csont lebontása (20). Az oszteoklasztok a makrofágokkal és a dendritikus sejtekkel közös, hemopoetikus eredetű mieloid előalakokból differenciálódnak (2. ábra) (20). Az oszteoklasztok fejlődéséről és működéséről részletesen a következő fejezetekben lesz szó.

3.4. A csontátépülés folyamata

Felnőttkorban évente a trabekuláris csontállomány közel 15%-a átépül. A csontreszorpció a csontátépülés (remodelling) első lépése. A csontbontás helyének kijelölésében fontos szerepük van az oszteocitáknak, amelyek – a csontra ható erőket érzékelve - serkentik az oszteoblasztok működését. Az oszteoblasztok pedig a megfelelő citokinkörnyezet létrehozásával, és direkt sejt-sejt kontaktus révén hozzájárulnak az oszteoklasztok differenciálódásához. A trabekuláris csont lemezein az oszteoklaszt néhány nap alatt reszorpciós üreget alakít ki, majd a csontbontás befejeztével apoptózissal elpusztul (8).

Az oszteoklasztok felszívódásával az oszteoblasztok elkezdi csontépítő működésüket a csont nem mineralizált mátrixának lerakásával, amely azután kalcifikálódik. Az új csont képzése során az oszteoklasztok által kialakított reszorpciós üregekbe oszteoblasztok vándorolnak, és mátrixfehérjék intenzív termelésébe kezdenek. Az oszteoblasztok legnagyobb mennyiségben az I. típusú kollagént termelik. A fehérje - sejten belül érését követően - prokollagén formájában kerül ürítésre. A kollagénmolekulák között a továbbiakban több keresztkötés alakul ki. Az oszteoblasztok által létrehozott fehérjemátrixban az érési folyamat befejeztével meg végbe a mineralizáció, azaz a hidroxipatit-kristályok keletkezése és növekedése. A folyamat során - az alkalikus foszfátáz enzim működésének következtében - alkalikus pH-n intenzív kalcium- és foszfátkicsapódás jön létre. A hidroxipatit-kristályok mellett számos fontos nyomelem (Mg, Na, Zn, F) és ion (foszfát, citrát, bikarbonát) is beépül a csontba. Az oszteoblaszt-mediálta csontképző folyamatok jóval több időt, hónapokat vesznek igénybe (21).

3.5. A csont és az immunrendszer kapcsolata

A csontszövet számos ponton érintkezik az immunrendszerrel, amit a csontvelői sejteknek a vérképzés során megvalósuló fizikai közelsége is jól mutat. A mérföldkőnek számító megfigyelést, miszerint a T limfociták direkt és indirekt módon is képesek serkenteni az oszteoklasztogenezist, az 1990-es évek végén írták le először (22). Azóta több fehérvérsejt eredetű molekuláról derült ki, hogy szabályozni képes az

oszteoklasztok fejlődését és működését, továbbá hogy a csontsejtek is hatni tudnak a szervezet egyéb sejtjeire.

Az immunrendszer és a csontsejtek között kialakuló interakciókat kiterjedten vizsgáló interdiszciplináris terület, az oszteoimmunológia önálló tudományággá válása az elmúlt évtizedben történt meg. Magát a fogalmat amerikai és japán kutatók használták először, rávilágítva az immun- és a csontrendszer sokrétű kapcsolatára autoimmun és más gyulladásos betegségekben (21, 23, 24). Az oszteoimmunológia határterületekről való leválásához nagyban hozzájárult e megbetegedések nagyszámú előfordulása a modern társadalmak lakosságának körében. Az oszteoklaszt-mediálta csontvesztés azonban nemcsak a gyulladásos betegségekre jellemző. Egyre több adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a népbetegségnek számító oszteoporózis esetében is fennáll a kapcsolat az immunrendszerrel. Az említett betegségekre együttesen jellemző, hogy a fiziológiás csontátépülésben betöltött oszteoklaszt szerep megváltozik, és a csontszerkezet károsodik. Az oszteoimmunológia kutatási eredményei segítettek megérteni a felsorolt betegségek hátterében álló molekuláris mechanizmusokat, és felvetik a reményt, hogy új, innovatív terápiák bevezetésével a fokozott csontvesztéssel járó betegségek oki kezelése lehetővé váljon.

3.6. Az oszteoklasztok fejlődése

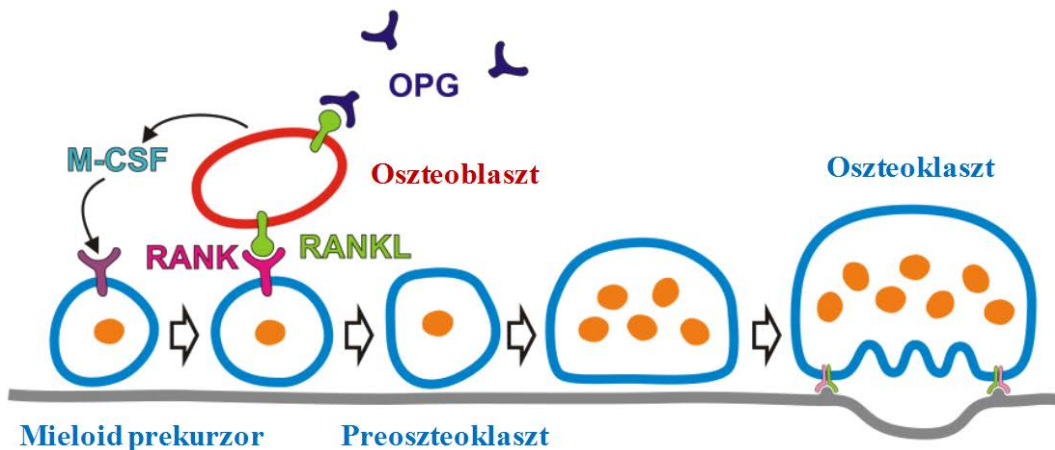
Az oszteoklasztok csontvelői eredetű mieloid prekursorokból differenciálódnak. Kialakulásukhoz szolubilis citokinek jelenlétére, sejt-sejt kontaktusra, valamint az $\alpha_v\beta_3$ integrinek által közvetített adhéziós szignálokra van szükség.

Az oszteoblasztok által termelt kulcsfontosságú citokin, a makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF), amely mind a mieloid előalakok differenciációjához, mind a túléléséhez nélkülözhetetlen növekedési faktor (25) (3. ábra). Az M-CSF-hiányos op/op egerekben megfigyelhető súlyos oszteopetrózis az oszteoklasztok hiányának a következménye (26, 27).

A közvetlen sejt-sejt kapcsolat az oszteoklasztokon kifejeződő RANK (receptor activator of nuclear factor κ B, másnéven TNFRSF11), és az oszteoblasztok felszínén megjelenő RANK ligand (RANKL; másnéven TRANCE, OPGL, ODF vagy

TNFSF11a) kapcsolódása következtében jön létre (2. ábra). A RANK-RANKL kötődés szelektíven serkenti az oszteoklasztok fejlődését (28) (3. ábra).

Az oszteoblasztok a RANKL-on kívül oszteoprotegerint (OPG, TNFSF11b) is termelnek. Az OPG a RANKL-hoz kötődve megakadályozza a RANK-RANKL kapcsolódást, ezáltal közvetetten gátolja az oszteoklaszt-fejlődést. Az oszteoblasztok nyugalmi helyzetben jelentős mennyiségű OPG-t termelnek, aktiválódásuk után azonban az OPG termelődése lecsökken, a RANKL-é pedig megemelkedik. A RANKL hatásának hiányában, OPG jelenlétében, az oszteoklasztok differenciációja elmarad (29) (3. ábra). Az ösztrogének a csontbontást gátló hatásukat feltehetően az oszteoblasztok OPG termelésének fokozásával érik el.



3. ábra. Az oszteoklasztok fejlődése. A csontvelői előalakok M-CSF jelenlétében először makrofág irányba differenciálódnak, majd a RANKL hatására átprogramozódnak, és preoszteoklasztok, majd azok fúziójával érett oszteoklasztok jönnek létre belőlük (Mócsai Attila rajza).

A RANK-RANKL kötődés következtében átíródnak az oszteoklaszt fejlődés kulcsfontosságú génjei, és a sejteken megjelennek az oszteoklaszt-markerek. Ezek közé tartoznak az NF- κ B, az AP-1 és a NFATc1 transzkripciós faktorok, a tartarát-rezisztens savanyú foszfatáz (TRAP), a kalcitonin receptor, az OSCAR, az $\alpha_v\beta_3$ integrinek (24) és a preoszteoklasztok fúziójához szükséges transzmembrán receptor, a DC-STAMP (30, 31). A RANKL által kiváltott génexpressziós változások hatására a preoszteoklasztok vándorlása és egymással való fúziója során jön létre az oszteoklasztokra jellemző óriássejtes morfológia. A RANK-RANKL kapcsolódás jelentőségét mutatja, hogy mind

a receptor, mind a ligand hiánya gátolja az oszteoklasztok kialakulását, ami egérben oszteopetrózishoz vezet (20, 32).

Régóta ismert, hogy a sejtadhézió hiányában nem jön létre az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése (33). Ez a letapadási függés leginkább az integrinek működésével magyarázható, amely molekulák információt juttatnak az oszteoklaszt belsejébe a körülötte lévő csontszövet állapotáról. Az oszteoklasztokban a sejtadhézió elsősorban az $\alpha_v\beta_3$ integrinen keresztül jön létre (25). A β_3 integrin-hiányos egerekben oszteopetrózis alakul ki, és károsodik az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése (34).

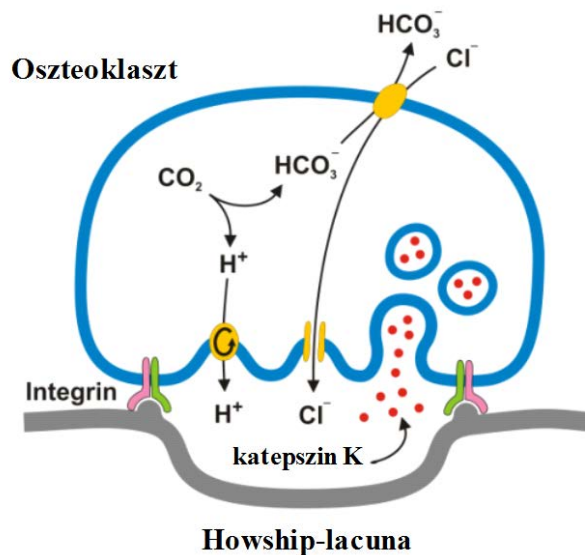
Összefoglalva: a mieloid előalakok M-CSF hatására először makrofág irányba differenciálódnak, majd az M-CSF és a RANKL együttes jelenlétének köszönhetően alakulnak ki belőlük a preoszteoklasztok, amelyek egymással fuzionálva hozzák létre az érett oszteoklasztokra jellemző óriássejtes struktúrát (35) (3. ábra). Sejtkultúra körülmények között lehetőség van csontvelői sejtekből vagy perifériás vér eredetű monocitákból oszteoklasztokat differenciáltatni rekombináns citokinek (M-CSF és RANKL) jelenlétében, $\alpha_v\beta_3$ integrin ligandot tartalmazó mesterséges felszínen.

3.7. Az oszteoklasztok működése

Az érett oszteoklaszt $\alpha_v\beta_3$ integrineken keresztül szoros kapcsolatot alakít ki a csontfelszínnel. Ezután a csonttal érintkező membránszakaszon, körben a sejt széle mentén a fibrilláris aktin feldúsul, és létrehozza az úgynevezett aktin gyűrű struktúrát, amelynek a rezorpciós üregnek a külvilágtól való elszigetelésében van fontos szerepe. Közben a sejt polarizálódik: a csontfelszín felé néző apikális membránban – ahol jelentős felületnagobbítás történik a hullámos határ kialakulásával - és az interstitialis tér felé tekintő bazolaterális oldalon eltérő transzportfehérjék lépnek működésbe (35). Az apikális sejtmembránban a V-típusú H^+ pumpa aktiválódik, a töltéskompenzálás pedig megnyíló ClC7 Cl^- -csatornákon keresztül megy végbe (36). A H^+ utánpótlását az intracelluláris térben aktiválódó 2-es típusú szénsavanhidráz biztosítja, a keletkező HCO_3^- -ok pedig a bazolaterális membránban kifejeződő HCO_3^-/Cl^- antiporter segítségével Cl^- ionokra cserélődnek ki (20) (4. ábra).

Az iontranszporttal egyidejűleg a sejt belsejében a vezikulákban tárolt bontóenzim, a katepszin K az apikális oldalon szabadul fel. Mindezen változások

eredményeképpen az oszteoklaszt alatt kialakult elhatárolt térben megindul a kalciumsók kioldódása, amit a fehérjemátrix lebontása követ. A lebontott anyagok transzcitózissal először a csont interstitialis terébe, majd onnan a keringésbe jutnak, az oszteoklaszt alatt pedig üreg, az úgynevezett Howship-lacuna képződik (20) (4. ábra).



4. ábra. Az oszteoklaszt működése. Az érett oszteoklaszt működése során polarizálódik, majd a citoskeleton átrendeződésével, és speciális membránstruktúrák létrehozásával zárt teret alakít ki a csontfelszínen, melybe sósavat és emésztőenzimeket (például katepszin K-t) szekretál (Mócsai Attila rajza).

Az oszteoklaszt-működés kulcsfehérjéi, az $\alpha_v\beta_3$ integrinek, a V-típusú H^+ pumpa, a 2-es típusú szénsavhidráz és a $ClC7 Cl^-$ csatorna hiányában egérben oszteopetrózis alakul ki (37).

3.8. Az M-CSF jelátvittele az oszteoklasztokban

Az oszteoklasztok makrofág jellegű előalakokból differenciálódnak, ezért magukon hordozzák a monocita sejtvonal fejlődési markerét, az M-CSF receptorát. Az M-CSF segíti az oszteoklaszt előalakok proliferációját, apoptózisukat pedig gátolja (38). Az M-CSF receptora, a c-Fms a tirozin kináz receptorok családjába tartozik. A c-Fms

ligandkötése után a membránhoz horgonyozza a Grb2 adapter fehérjét, ami a Ras monomer kis G-fehérjén keresztül aktiválja az ERK-1,2 fehérjéket. Az ERK-1,2 a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó ciklin-dependens kinázokat foszforilálva fokozza a sejtek proliferációját (25). Az c-Fms serkenti továbbá a PU.1 transzkripciós faktor működését, amely pozitív visszacsatolással fokozni tudja a receptor és így saját maga kifejeződését is (25).

A c-Fms által aktivált microphthalmia-asszociált transzkripciós faktor (MITF) pedig a BCL-2 (B cell lymphome 2) molekulán keresztül a túlélési jel közvetítésében fontos (39). Nem utolsósorban, a c-Fms ligandkötése elősegíti a RANK expresszióját az oszteoklaszt előalakokon.

3.9. A RANKL jelátvittele az oszteoklasztokban

Az oszteoklaszt differenciációjához szükség van az oszteoblasztal kialakított direkt sejt-sejt kontaktusra. Az oszteoblaszt-membránfehérje RANKL extracelluláris doménje TNF-homológ szekvenciákat tartalmaz, receptora, a RANK is a TNF receptorcsaládhoz tartozik. A RANKL felfedezése, amit azóta számos néven ismernek az irodalomban (TRANCE: TNF-related activation-induced cytokine, TNFSF11a: TNF superfamily member 11a), nagy szenzációnak számított. Mind a csont biológiájával foglalkozókat, mind az immunológusokat meglepte, hogy a régóta keresett oszteoklaszt-differenciációs faktor (ODF) és a T sejt eredetű TRANCE azonosak (40, 41). A TRANCE, későbbi nevén RANKL, képes az oszteoklasztogenezist *in vitro* körülmények között serkentenit, és ami még fontosabb: az oszteoblasztok hiányában is meg tudja mindezt tenni (28, 42). Az oszteoklasztogenezist fokozó IL-1, IL-6 és IL-17, mai tudásunk szerint, az oszteoblasztokon a RANKL expressziójának fokozásával fejtik ki hatásukat (35, 43). A RANKL génhiányos egér súlyos oszteopetrózisban szenved az oszteoklaszt-fejlődés zavara miatt (22). Miután az oszteoklaszt-mediálta csontbontás elengedhetetlen a fogak áttöréséhez, a RANKL^{-/-} egerek fogai hiányoznak, lépükben és májukban pedig extramedulláris hemopoezis zajlik (44).

A RANK szintén a TNF szupercsaládhoz tartozik. A RANK^{-/-} egér, a RANKL génhiányos társához hasonlóan, súlyos oszteopetrózisban szenved (32). Emberben a

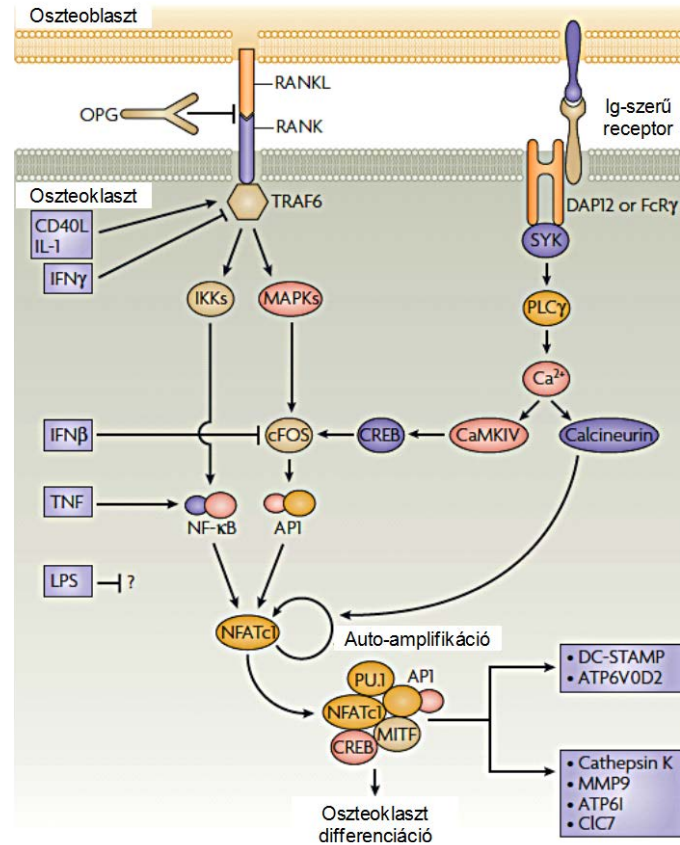
RANK gain-of-function mutációi familiáris expanzív oszteolízist és hiperfoszfatémiát okoznak (45, 46).

A RANK ligandkötésének eredményeképpen a receptor trimerizálódik, és továbbítja a jelet az intracellulárisan elhelyezkedő TRAF6 fehérjének (47). A TRAF6 disztális jelátviteli folyamatokat aktivál, amelyek végül az NF- κ B és AP-1 transzkripciós faktorokon konvergálnak (48, 49). A TRAF6, NF- κ B és AP-1 célzott deléciója egérben oszteopetrotikus fenotípust eredményez (50-52). Az AP-1 aktivációjában szereplő szignalizációs kaszkád alapvetően MAP-kináz (MAPK) mediált, ahol a MAPK-ok közül döntően a JNK-1 és a p38 MAPK aktiválódik (53-55). A p38 MAPK végül fokozza a c-Fos, Jun fehérjékből álló AP-1 komplex aktivitását (56). A c-Fos hiányában ugyancsak oszteopetrózis alakul ki a kísérleti állatokban (57).

A TRAF6 aktiválni tudja az NF- κ B transzkripciós faktort is (37). A TRAF-6 hatására foszforilálódik, majd degradálódik az NF- κ B komplexet nyugalomban a citoplazmában tartó I κ B α molekula, ezáltal az NF- κ B felszabadulva a gátlás alól, a sejtmagba tud jutni, ahol aktiválja az NFATc1 transzkripciós faktort (58, 59). Az NF- κ B és az AP-1 együttesen segítik elő az NFATc1 kifejeződését. Az intracelluláris kalcium-koncentráció emelkedése - ami kalmodulinon keresztül aktiválja a kalcineurin foszfatáz - szükséges az NFATc1 aktiválódásához. A kalcineurin foszfatáz az NFATc1 defoszforilációjával felfedi annak nukleáris lokalizációs szignálját. Az NFATc1 ezután a magba vándorol, ahol saját expresszióját is fokozza (autoamplifikáció). Végül pedig az NFATc1 az oszteoklaszt-specifikus gének átírásának serkentésével megindítja a TRAP, az $\alpha_v\beta_3$ integrinek, a kalcitonin receptor, a DC-STAMP, a V-típusú ATP-áz, a CIC7 klorid csatorna és a katepszin K kifejeződését a sejtekben (60).

Takayanagi és munkacsoportja írta le először, hogy az oszteoklasztok fejlődése során RANKL hatására az intracelluláris kalcium-koncentráció periódikus változásai, az úgynevezett kalcium-oszcillációk hozzájárulnak az NFATc1 transzkripciós faktor aktiválódásához (60). Az oszcillációk pontos élettani jelentőségével máig nem vagyunk teljesen tisztában. Feltételezések szerint a Ca²⁺-hullámokkal kivédhető a sejtre ható hosszantartó magas kalcium-koncentráció végzetes következménye. A kalcium-oszcilláció jelenségének létrejöttét számos sejtben kimutatták, például az oocitában a megtermékenyítés pillanatában, vagy az agykérgi neuronok axonnövekedésekor.

A RANKL-RANK kapcsolódás által beindított legfontosabb jelátviteli eseményeket az 5. ábra mutatja be.



5. ábra. A RANK és az immunglobulin-szerű receptorok hatására bekövetkező legfontosabb változások. A RANK-RANKL kapcsolódás a TRAF6 fehérjét serkenti, ami a MAPK kaskádán keresztül az AP-1 transzkripciós faktort, közvetetten pedig az NF- κ B-t aktiválja. Az AP-1 és az NF- κ B együttesen szükséges az NFATc1 transzkripciós faktor aktivációjához, és az oszteoklaszt-specifikus gének átíródásához. Az immunreceptor-szerű receptorok által beindított szignalizációs kaskád mind direkt, mind indirekt módon hozzájárulhat az NFATc1 aktivációjához. Forrás: (24).

3.10. Az $\alpha_v\beta_3$ integrinek szerepe az oszteoklasztokban

A csontot alkotó sejteknek a támasztószövet felépítéséhez össze kell kapcsolódniuk. Ez történhet közvetlen módon, amikor sejt-sejt kapcsolatok jönnek létre, vagy közvetve, amikor a sejtek az extracelluláris mátrixhoz kapcsolódnak. Az oszteoklasztok növekedésükhöz, osztódásukhoz, sőt túlélésükhöz is igénylik az

extracelluláris mátrix jelenlétét. Régóta ismert, hogy a sejtadhézió hiányában nem jön létre az oszteoklasztok fejlődése *in vitro* körülmények között (33). Ez a letapadási függés leginkább az integrinek működésével magyarázható, amely molekulák információt juttatnak az oszteoklaszt belsejébe a körülötte lévő csontszövet állapotáról, a sejt-mátrix adhézió erősségéről.

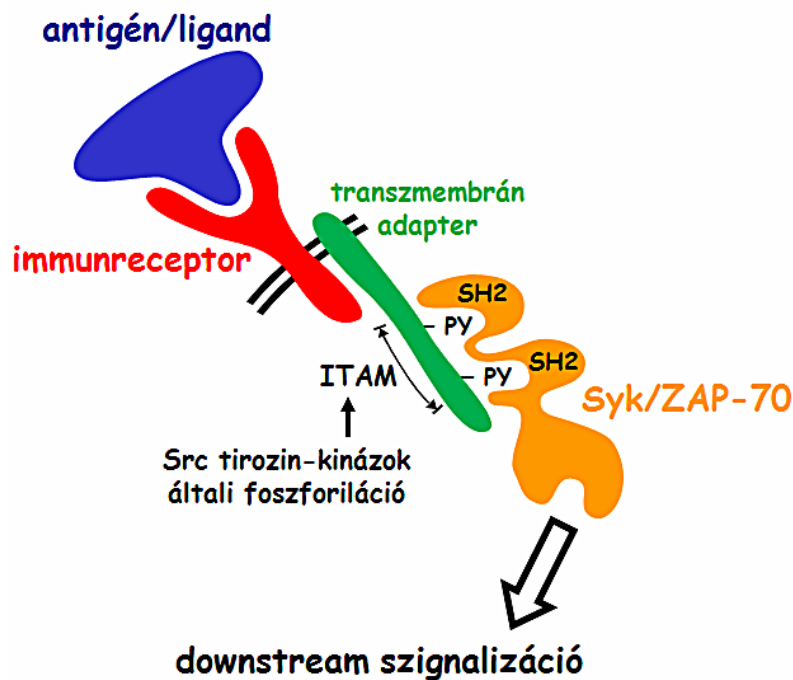
Az integrinek kovalensen nem kapcsolt α - és β -alegységből felépülő transzmembrán glikoproteinek (61). Jellemzőjük, hogy ligandjukat nyugalomban kis affinitással kötik, ezért a klasszikus receptoroknál nagyobb sűrűségben vannak jelen a sejtmembránban (61). Szerepük messze túlmutat a sejtek mátrixhoz történő rögzítésén, lehetőséget adnak a sejtnak, hogy érzékelje a környezetét azáltal, hogy kétirányú jelátvitelre képesek. A nyugalmi, alacsony affinitású állapotban lévő integrinek a sejtől érkező jelek hatására fokozzák kötési erősségüket, affinitásukat és számukat a plazmamembránban (fokozódó aviditás). Ezt nevezzük „inside-out” szignalizációnak. Az integrinek azonban nem csak adhéziós molekulák, hanem ligandjaik megkötését követően információt is tudnak továbbítani a sejt belsejébe („outside-in” szignalizáció) (62). Az integrin-mediált sejtválaszok közé a citoszkeletális átrendeződés, a migráció, a proliferáció és a túlélés tartoznak (63). A nevezéktanuk alapján elkülönítettük β_1 , β_2 és β_3 integrineket. Az oszteoklasztokban a sejtadhézió elsősorban az $\alpha_v\beta_3$ integrinen keresztül jön létre (25). A β_3 integrin-hiányos egerekben oszteopetrózis alakul ki, valamint károsodik az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése és működése (34).

Az oszteoklaszt-fejlődés és -működés során az extracelluláris környezet érzékelése úgy jön létre, hogy sok $\alpha_v\beta_3$ integrin molekula a membrán kis területén csoportosul, és a membrán citoplazmatikus oldalán egymás közelébe toborozza az úgynevezett fokális adhéziós kinázokat (például Pyk2, FAK) (64). Ezek az enzimek a citoszkeleton átrendeződéséhez, a podoszómák, majd az azokból felépülő aktingyűrűk kialakulásához szükségesek. A fokális adhéziós kinázok aktiválódása feltehetőleg az Src tirozin kinázon keresztül jön létre. A c-Src génhányos egér oszteopetrózisban szenved, oszteoklasztjaiban nem alakulnak ki aktingyűrűk (65). Az $\alpha_v\beta_3$ integrin a Rac fehérje aktivációjában is szerepet játszik, mely lépés képezi a csontbontáshoz szükséges citoszkeletális átrendeződések kiinduló mozzanatát. A Vav3, egy guanin nukleotid kicserélő faktor (GEF), amely a GDP-t egy újabb molekula GTP-re cseréli, ezáltal aktiválja a Rac-ot. A Vav3 hiányában egérben oszteopetrózis alakul ki (66).

Összefoglalva: az $\alpha_v\beta_3$ integrineknek a citoskeletális átrendeződésekben, a fokális adhézíós komplexek és az aktinyűrűk kialakulásában, illetve intracelluláris jelpályák aktiválásában van alapvető szerepük.

3.11. Immunreceptor-szerű jelátvitel az oszteoklasztokban

A klasszikus immunreceptorok a veleszületett és a szerzett immunitás nélkülözhetetlen tényezői. Ide tartozik a B-sejt receptor (BCR), a T-sejt receptor (TCR) és az Fc-receptorok (FcR). A különböző immunreceptorok jelátviteli folyamatai sok hasonlóságot mutatnak, és azonos séma alapján jellemezhetőek (67) (6. ábra).



6. ábra. Az immunreceptorok jelátvitel. A klasszikus immunreceptorok ligandkötését követően a transzmembrán adapter ITAM szekvenciájában elhelyezkedő tirozin oldalláncok foszforilálódnak, és dokkoló helyül szolgálnak a Syk és a ZAP-70 tirozin kinázok számára, amelyek aktiválódása felelős a további szignalizációért. Forrás: (67).

A klasszikus immunreceptorok ligandkötését követően az Src tirozin-kinázok foszforilálják a receptor ligandkötő láncának vagy az azzal kapcsolódó segédláncnak (I α /I β , CD3 ζ -lánc, DAP12, Fc-receptor γ -lánc) az úgynevezett immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívumaiban (ITAM) található két tirozin aminosavát (68). Az

ITAM foszforilált tirozin oldalláncaihoz az Src-homológia 2 (SH2)-doménjén keresztül kapcsolódik a Syk (BCR, FcR) vagy a ZAP-70 (TCR) nonreceptor tirozin kináz. Ezt követően további tirozin kinázok aktiválódnak, amelyek az immunreceptor jelátvitel disztális elemeihez, az NF- κ B és az NFAT transzkripciós faktorok aktiválódásához vezetnek. A közelmúltban írták le, hogy a klasszikus immunreceptorok itt bemutatott jelátvitel nemcsak az antigénelismerésben, hanem az integrin-függő sejtadhézió közvetítésében is elengedhetetlen szerepet játszik makrofágokban, neutrofilekben (69), dendritikus sejtekben (70), vérlemezkékben (71), mikrogliaokban (72) és az oszteoklasztokban (73).

Az oszteoklasztokban az immunreceptor-szerű jelpálya szerepét először témavezetőm és vele párhuzamosan egy japán munkacsoport mutatta ki (73, 74). Az újonnan leírt jelpályában aktiválódó ITAM szekvenciát tartalmazó adapter fehérjék, a DAP12 és az Fc-receptor γ -lánc (FcR γ) elengedhetetlen szerepet játszanak az oszteoklasztok fejlődésében és működésében. A két fehérje az oszteoklasztok plazmamembránjában immunreceptor-szerű receptorokhoz kapcsolódik, és aktiválja a Syk tirozin kinázt (75). A kapcsolódó receptorokról kevesebbet tudunk. A DAP12 legnagyobb valószínűséggel a TREM2 fehérjével asszociálódik (76). Emberben a DAP12 és a TREM2 mutációit írták le Nasu-Hakola szindrómában, amely betegségben a központi idegrendszer érintettsége mellett, az oszteoklasztok működésének zavara áll fenn (77, 78). Az FcR γ -hoz asszociálódó OSCAR-t pedig nemrég azonosították a csont organikus mátrixát alkotó I-es típusú kollagént felismerő receptorként (79). Felmerült továbbá a DAP12-asszociált SIRP β 1 és az FcR γ -asszociált PIR-A szerepe is, ezekről azonban még keveset tudunk (74).

Az immunreceptor-szerű jelpálya pontos elhelyezkedése az oszteoklasztok jelátvitelében a mai napig nem egyértelműen tisztázott. Koga és munkatársai a RANKL kostimulációs jelpályájájaként azonosították (74). Munkacsoportunk szerint viszont inkább a β ₃ integrinek jelátvitelébe illeszkedik a jelpálya. Ezzel egybecseng laborunk által korábban a neutrofil granulociták β ₂ integrin-függő jelátvitelében tett megfigyelés is (69).

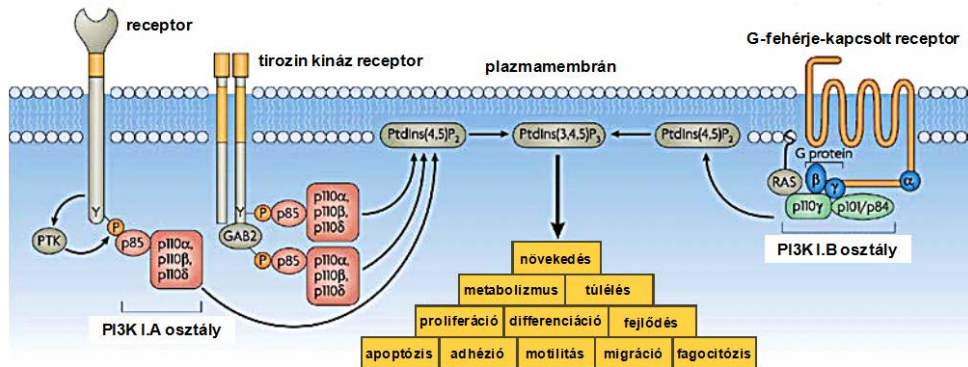
Az immunreceptor-szerű jelpálya és a RANKL jelátvitel közötti kapcsolódási pontokat az 5. ábra mutatja.

3.12. A foszfatidilinozitol 3-kinázok és az oszteoklasztok

Az inozitol tartalmú foszfolipidek a plazmamembrán foszfolipid tartalmának mindösszesen néhány százalékát teszik ki, mégis alapvető fontosságúak a sejt életében. A foszfatidilinozitol (PtdIns) foszforilált származékai, a foszfoinozitidek, kulcsszerepet játszanak a sejt működés szabályozásában, ugyanis foszforilációjuk és defoszforilációjuk számos jelátviteli folyamat része. Másodlagos hírvivő funkciójukon túl, szabályozó szerepet is betöltenek foszfoinozitid-kötő (például PH, PX, FYVE) domént tartalmazó fehérjékkel történő kölcsönhatások kialakításával. A PtdIns inozitol gyűrűjét a különböző lipid kinázok a 3-as, a 4-es és az 5-ös pozíciókban foszforilálhatják, amely folyamatok során hét különböző foszfoinozitid termék jöhet létre a sejtben. Ezek a PtdIns(3)P, a PtdIns(4)P, a PtdIns(5)P, a PtdIns(3,4)P₂, a PtdIns(3,5)P₂, a PtdIns(4,5)P₂ és a PtdIns(3,4,5)P₃ (80).

A foszfoinozitidek bioszintézisében alapvető szerepük van a foszfatidilinozitol 3-kinázoknak (PI3K, vagy PI3-kináz), amelyek az inozitol gyűrű 3-as pozíciójában foszforilálva PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ keletkezését katalizálják (81). A PI3-kinázok szerepe szinte az összes alapvető sejt működésben ismert: szabályozzák a sejtek túlélését, proliferációját, metabolizmusát, részt vesznek a sejt vándorlás, a citoskeletális átrendeződések és a vezikuláris transzport folyamataiban (82). Az élettani működéseken túl számos patológiás állapotban leírták már a szerepüket; a daganatoktól a metabolikus betegségeken át egészen a gyulladásos kórképekig meghatározói a kórélettani folyamatnak (83-85). A PI3-kinázok szerkezeti és enzimkinetikai hasonlóságaik alapján három osztályba sorolhatók (86). A PI3K I. osztályának tagjai élettani körülmények között elsősorban PtdIns(3,4,5)P₃-ot termelnek, a II. osztály fehérjéinek fő szubsztrátja a PtdIns és a PtdIns(4)P, a PI3K III. osztálya pedig leginkább a PtdIns-t foszforilálja. A legjobban ismert PI3-kinázok a PI3K I. osztályába tartoznak, és aktiválódásuk extracelluláris ligandok kötődésének hatására jön létre a sejtben. A p110 elnevezésű katalitikus, és a különböző regulátoros alegységekből felépülő heterodimerek tovább csoportosíthatók PI3K I.A és I.B alosztályokba (7. ábra). A PI3K I.A alosztályába tartozó katalitikus alegységek (p110 α , p110 β , p110 δ) az SH2 domén tartalmú regulátoros alegységekkel (p85 fehérjék) hozzák létre a PI3K α , a PI3K β és a PI3K δ izoformákat (82, 86). A PI3K I.B alosztályába tartozó regulátoros alegységek (p84, p101) a p110 γ katalitikus alegységgel komplexet képezve építik fel a

PI3K γ izoformát. A PI3K α és a PI3K β ubikviter expressziót mutat, míg a PI3K γ és a PI3K δ elsősorban a hemopoetikus sejtekben fejeződik ki (87). A PI3K I.A fehérjék klasszikusan a tirozin kináz receptorok jelátvitelében aktiválódnak, a PI3K I.B pedig a G-fehérje-kapcsolt receptorok által elindított jelpályájában szerepel (7. ábra) (82, 86).



7. ábra. A PI3K I. osztály fehérjéit felépítő alegységek. A p110 α , a p110 β és a p110 δ katalitikus és a p85 regulátoros alegységek által alkotott PI3K α , PI3K β és PI3K δ aktivációja a tirozin kináz receptorok jelpályájában jön létre. A p110 γ katalitikus és a p84/p101 regulátoros alegységek összeállásának eredményeképpen a PI3K γ aktiválódása a G-fehérje-kapcsolt receptorok hatására történik. Forrás: (87).

A fejlesztés alatt álló kis molekulású izoforma specifikus gátlószereknek és a közelmúltban létrehozott transzgenikus egereknek köszönhetően több irodalmi adat áll rendelkezésre a PI3K α , a PI3K γ és a PI3K δ fehérjék szerepéről a sejtek jelátvitelében. Ezzel szemben nagyon keveset tudunk a PI3K β izoforma hatásairól a szervezet szintjén, ugyanis a PI3K β katalitikus alegységének teljes törlése egérben korai embrionális letalitást okoz (88). Azonban Dr. Bart Vanhaesebroeck munkacsoportja nemrég létrehozott egy katalitikusan inaktivált p110 β -át expresszáló mutáns egértörzset (89), amely elsők között tette lehetővé a PI3K β szerepének vizsgálatát különböző élettani folyamatokban. Ezeknek az egereknek a segítségével írták le, hogy a PI3K β aktiválódása létrejöhét mind a G-fehérje-kapcsolt, mind a tirozin kináz receptorok jelátvitelében (90, 91). A legújabb adatok alapján pedig a PI3K β kis molekulású inhibitorai hatásosak lehetnek a vérlemezkék integrinfüggő aktivációjának gátlásában patológias körülmények között (92-94).

A PI3-kinázok szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és működésében már régebben felvetődött. Az 1990-es években írták le először, hogy az általános PI3K inhibitor wortmannin, gátolja az oszteoklasztok *in vitro* fejlődését és működését (95-97). A pan-PI3K/mTOR inhibitor LY294002 jelenlétében nem alakultak ki érett oszteoklasztok az *in vitro* kultúrákban (98). A PI3K I.A alosztály regulátoros alegységének (p85 α) genetikai hiányában pedig egérben károsodott az *in vivo* oszteoklasztogenezis (99). Kísérleteink kezdetén azonban arról nem állt rendelkezésre adat, hogy az oszteoklaszt-fejlődésben és -működésben betöltött fontos PI3K hatás melyik izoformán keresztül jön létre. Kísérleteinkben ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a PI3K β izoforma szerepét az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében, valamint az *in vivo* csontanyagcserében nyugalmi és kóros körülmények között.

3.13. A foszfolipáz C γ enzimek és az oszteoklasztok

A foszfolipáz C (PLC) enzimes család tagjai a plazmamembránban található foszfátidilinozitol 4,5-biszfoszfátot (PtdInsP₂) hasítják inozitol 1,4,5-triszfoszfátra (InsP₃) és a diacilglicerolra (DAG) (100). Az InsP₃ kötődése receptorához kalcium-jelet hoz létre a sejtben, a DAG pedig aktiválja a protein kináz C-t (101). Az enzimes családnak emlősökben hat alosztálya ismert, ezek a PLC β , a PLC γ , a PLC δ , a PLC ϵ , a PLC ζ és a PLC η . Közülük a legtöbbet a PLC β és a PLC γ enzimekről tudunk. Míg a PLC β fehérjék elsősorban a G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében aktiválódnak, addig a PLC γ izoenzimek a tirozin kináz receptorok által elindított jelpályákban szerepelnek.

A PLC γ alosztálynak két izoformája ismert. A PLC γ 1 ubikviter módon expresszálódik, hiánya egérben embrionális letalitást okoz (102). A PLC γ 2 hemopoetikus eredetű sejtekben fordul elő, és a fehérje genetikai hiánya nem jár embrionális letalitással (103). A PLC γ 2 hiányában egérben csökken a B-sejtek száma, károsodik a vérlemezkék aggregációja, és a neutrofilekben, hízósejtekben, makrofágokban, valamint az NK sejtekben gátlódnak az FcR-függő válaszok (103, 104). Mindkét izoforma katalitikus aktivitásának megjelenéséhez meghatározott tirozin oldalláncok foszforilációjára van szükség. A fehérjék ezen kívül két SH2 és egy SH3 doménnel rendelkeznek, így adapter molekulaként is funkcionálhatnak.

Az immunsejtekkel való közös eredetük miatt az oszteoklasztok immunreceptor-szerű jelátvitelében felvetődött a PLC γ 2 szerepe. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az integrin- és az FcR-függő válaszok károsodása a PLC γ 2^{-/-} neutrofilekben az immunreceptor-szerű jelátvitel zavarának a következménye (105). Ezt a párhuzamot erősítette tovább Koga és munkatársainak a feltételezése, miszerint a PLC γ izoformák aktiválódása létrejöhet a DAP12-től és az FcR γ -tól elinduló, a NFATc1-on konvergáló jelpályában (74). Ezért Dr. Kertész Zsuzsanna munkatársammal megvizsgáltuk a PLC γ 2 szerepét az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében, valamint az *in vivo* csontanyagcserében. Ezekben a kísérletekben azt találtuk, hogy a PLC γ 2 elengedhetetlen az oszteoklasztok csontvelői sejtekből M-CSF és RANKL hatására történő *in vitro* differenciációjához és az oszteoklasztok *in vitro* reszorpciós tevékenységéhez. A PLC γ 2 genetikai hiánya egerekben megnövelte a mineralizált csontállomány mennyiségét, ami az oszteoklasztok csökkent számával volt magyarázható. Ezekről az eredményekről Kertész Zsuzsanna részletesen beszámolt doktori értekezésében. A PLC γ 2 szerepét az oszteoklasztok fejlődésében és a nyugalmi csontanyagcserében tőlünk függetlenül két másik munkacsoport is publikálta (106, 107).

Azt azonban eddig nem sikerült egyik munkacsoportnak sem egyértelműen tisztázni, hogy a PLC γ 2 milyen mechanizmussal játszik szerepet az oszteoklasztok fejlődésében és működésében. Saját kísérleteinkben a PLC γ 2 genetikai hiánya nem vezetett a mieloid prekursorok fejlődésének zavarához, és nem befolyásolta az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját. Egy munkacsoport velünk párhuzamosan felvetette a PLC γ 2 szerepét az oszteoklasztok integrin-függő jelátvitelében (108), azonban a fehérjének a korai oszteoklasztogenezisben betöltött szerepe továbbra is tisztázatlan maradt. Kísérletes munkánk második felében ezért célul tűztük ki, hogy azonosítsuk azt a mechanizmust, amivel a PLC γ 2 az oszteoklasztok fejlődését és működését szabályozza.

4. Célkitűzések

Ph.D. munkám során a PI3K β és a PLC γ 2 fehérjék oszteoklasztokban betöltött szerepének vizsgálatával foglalkoztam, és a következő kérdésekre kerestem a választ:

- 1) Szerepet játszik-e a PI3K β fehérje az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében?
- 2) Részt vesz-e a PI3K β az *in vivo* csontanyagcsere szabályozásában egészséges körülmények között?
- 3) Milyen mechanizmussal játszik szerepet a PI3K β az oszteoklasztok fejlődésében és működésében?
- 4) Részt vesz-e a PI3K β a sebészi ovariectómia-kiváltotta csontvesztés kialakulásában?
- 5) Milyen mechanizmussal szabályozza a PLC γ 2 fehérje az oszteoklasztok fejlődését?

5. Módszerek

A célkitűzésekben megfogalmazott kérdések kísérletes megválaszolásához farmakológiai és genetikai megközelítéseket alkalmaztam.

5.1. Kísérleti állatok

A PI3K β katalitikus alegységét (p110 β) kódoló *Pik3b* gén 21-22-es exonjának delécióját homozigóta formában hordozó *Pik3cb*^{tm1.1Bvan/tm1.1Bvan} egértörzset (továbbiakban: PI3K β ^{-/-}) Dr. Bart Vanhaesebroeck (Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London, Egyesült Királyság) hozta létre és bocsátotta rendelkezésünkre (89). Az egerek C57BL/6:129Sv kevert genetikai háttéren voltak, fenntartásukhoz heterozigóta formában tenyésztettük őket, és a kísérletekben felhasznált állatokat legalább négy alkalommal visszakeresztettük a C57BL/6 háttérre. A PI3K β ^{-/-} egyedek testsúlya elmaradt a vad típusú társaikéhoz képest, halálozási arányuk magasabb volt, és a PI3K β ^{-/-} hím egereket csökkent fertilitás jellemezte (89).

A PLC γ 2-t kódoló *Plcg2* gén inaktiválását eredményező *Plcg2*^{tm1Jni} mutációt homozigóta formában hordozó egértörzset (továbbiakban: PLC γ 2^{-/-}) C57BL/6 genetikai háttéren Dr. James N. Ihle (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Egyesült Államok) hozta létre és bocsátotta rendelkezésünkre (103). A kísérleteinkben felhasznált állatokat legalább négy alkalommal visszakeresztettük C57BL/6 háttérre. Mivel a PLC γ 2^{-/-} egyedek halálozási aránya magasabb volt a vad típusú társaikénál, és a felnőttkort megélő PLC γ 2^{-/-} hím egerek fertilitása csökkent, a kolóniát heterozigóta (PLC γ 2^{+/-}) formában tartottunk fent, és a homozigóta génhányos állatokat PLC γ 2^{+/-} \times PLC γ 2^{+/-} pároztatásokból nyertük. Az utódokat allél-specifikus PCR-reakció segítségével genotipizáltuk (105).

A Lifeact-EGFP (109) transzgént ubikviter módon expresszáló egértörzset Dr. Michael Sixt (Institute of Science and Technology, Klosterneuburg, Ausztria) bocsátotta rendelkezésünkre (110). A transzgént hordozó egyedeket PI3K β ^{+/-} állatokkal keresztezve olyan egereket hoztunk létre, amelyekben a Lifeact-EGFP jelen volt, míg a PI3K β katalitikus alegysége hiányzott belőlük.

A $PI3K\beta^{-/-}$ és a $PLC\gamma2^{-/-}$ egerek magasabb halálozási aránya miatt az *in vitro* vizsgálataink egy részénél csontvelő-transzplantációval biztosítottuk a kísérleteinkhez szükséges számú állatot. A csontvelő-transzplantáció során a Co^{60} sugárforrásból származó 11 Gy sugárdózissal letálisán besugárzott Ly5.1 (CD45.1)-pozitív recipiens egereknek intravénásan beadtuk az Ly5.2 (CD45.2) felszíni markert kifejező donor sejteket. A transzplantáció sikerességének ellenőrzését négy héttel a beavatkozás után végeztük áramlási citométer segítségével, a perifériás vér neutrofil granulocitáinak Ly5.2 expressziójának meghatározása alapján (111, 112). Az így kapott csontvelői-kimérák perifériás neutrofil granulocitái 99,9 vagy afeletti %-ban az Ly5.2-es markert hordozták a felszínükön a dolgozatban bemutatott minden kísérletben. A csontvelői-kimérák és a megfelelő $PLC\gamma2^{-/-}$ vagy $PI3K\beta^{-/-}$ genotípusú egerek csontvelő eredetű oszteoklaszt kultúrái között nem tapasztaltunk morfológiai és funkcionális különbséget.

A farmakológiai kísérletekhez szükséges C57BL/6 egereket a Charles River-től (Wilmington, Egyesült Államok) szereztük be. A csontvelő-transzplantációhoz az Ly5.1 allélt hordozó B6.SJL-Ptprc^a állatokat a Jackson Laboratories-től (Bar Harbor, Egyesült Államok) vásároltuk. Kísérleteinkben kontrollként ugyanolyan nemű és életkorú (a csontvelői kimérák esetében azonos időpontban transzplantált), lehetőleg egy alomból származó egyedeket használtunk. Az egereket konvencionális állatházban, egyedileg szellőztetett ketrecállványokban (Tecniplast, Buguggiate, Olaszország) tenyésztettük. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatvédelmi Bizottsága ajánlására a Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző Állomás engedélyezte.

5.2. *In vitro* oszteoklaszt és makrofág kultúrák

Az *in vitro* egér oszteoklaszt tenyészetekhez a vad típusú, a $PI3K\beta^{-/-}$ és a $PLC\gamma2^{-/-}$ egerek hosszú csöves csontjaiból (femur, tibia) nyert csontvelői sejteket kezdetben alacsony koncentrációjú (10 ng/ml) rekombináns egér M-CSF (PeproTech, Rocky Hill, Egyesült Államok) jelenlétében, α -MEM médiumban (Invitrogen, Carlsbad, Egyesült Államok), szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényeken tenyésztettük 48 órán keresztül. Ezt követően a felülúszóban lévő nonadherens sejteket (továbbiakban mieloid prekursorok) $2 \times 10^5/cm^2$ sűrűségben, 20 vagy 50 ng/ml rekombináns egér M-CSF és 20 vagy 50 ng/ml rekombináns egér RANKL (mindkettő a Peprotech-től) jelenlétében, α -

MEM médiumban tenyésztettük tovább. A kultúrákon 48 óránként cseréltünk médiumot és citokineket. A mieloid prekursorok kirakását követő 72 óra elteltével az oszteoklasztokat a kereskedelmi forgalomban kapható tartarát rezisztens savas foszfátázt (TRAP) detektáló kit-tel (Sigma, St. Louis, Egyesült Államok) megfestettük, és Leica DMI6000B (Leica Microsystems Wetzlar, Németország) mikroszkóppal vizsgáltuk. A TRAP-pozitív (püspöklilára festődő), három vagy annál több maggal rendelkező sejteket tekintettük oszteoklasztoknak, és a kultúrákban számukat manuálisan határoztuk meg. A sejtek legnagyobb átmérőjét az Image J szoftver segítségével (NIH, Bethesda, Egyesült Államok) mértük le. Az *in vitro* csontbontás vizsgálatához a sejteket $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ sűrűségben mesterséges hidroxiapatit felszín tartalmazó tenyésztőedényekre (BD BioCoat Osteologic slides; BD Biosciences, Bedford, Egyesült Államok) vagy szarvasmarha kortikális csontszeletekre (Immunodiagnostic Systems, Boldon, Egyesült Királyság) tettük, és rekombináns egér 20 vagy 50 ng/ml M-CSF és RANKL jelenlétében 11 napig tenyésztettük. A kultúrákon a médiumot és citokineket 48 óránként cseréltük. A 11. napon a sejteket nátrium-hipoklorit 5%-os vizes oldatával eltávolítottuk, majd a kultúrákat lefénnyképeztük, és a reszorpciós terület nagyságát Image J szoftverrel kiértékeltek.

Az oszteoklaszt előalakok retrovirális rekonstitúciójához a $\text{PLC}\gamma 2^{+/-} \times \text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ egerek időzített terhességéből származó, 15-18 napos magzatokat az anyaállatból eltávolítottuk, majd májukból sejtszuspenziót készítettünk, és az embiókat PCR és Western blot alapon genotipizáltuk. Az így nyert vad típusú és $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ embrionális májsejteket 100 ng/ml rekombináns egér SCF és TPO, 6 ng/ml IL-3, 20 ng/ml Flt3L és 10 ng/ml rekombináns humán IL-6 (mind a Peprotech-től) jelenlétében, StemPRO médiumban (Invitrogen) tenyésztettük 48 órán keresztül. A retrovirális rekonstitúciót követően a sejteket az előzőekben tárgyalt módon oszteoklaszt irányba differenciáltattuk.

Az egér oszteoklaszt előalakoknak oszteoblasztokkal közös kultúrában történő tenyésztéséhez 1-3 napos újszülött egerek koponyájából 0,1 % kollagenáz és 0,25 % tripszin-EDTA (Sigma) segítségével oszteoblaszt előalakokat izoláltunk, és 10^5 sejt/well sűrűségben 96-lyukú szövetkultúra kezelt tenyésztőedényekre helyeztünk. A sejteket 48 órán keresztül α -MEM médiumban, 10 nM 1,25-dihidroxi- D_3 -vitamin és 10 nM dexamethasone (Sigma) jelenlétében tenyésztettük. Ezután az oszteoblasztokra vad

típusú és PI3K $\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői sejteket helyeztünk 5×10^4 sejt/well sűrűségben, majd 10 napig tenyésztettük együtt őket. A kultúrát TRAP-festéssel állítottuk le, és az előzőekben bemutatott módokon értékeltük ki.

Az *in vitro* egér makrofág tenyészetekhez a vad típusú, a PI3K $\beta^{-/-}$ és a PLC $\gamma 2^{-/-}$ egerekből származó mieloid prekurzorokat 20 vagy 50 ng/ml rekombináns egér M-CSF jelenlétében, α -MEM médiumban, RANKL hozzáadása nélkül tenyésztettük.

Az *in vitro* humán oszteoklaszt tenyészetekhez egészséges önkéntesek perifériás véréből monocitákat izoláltunk. A dextrános ülepítést követően a sejteket Ficoll-Paque grádiensen centrifugáltuk, majd a vörösvértesteket hipotóniás lízissel távolítottuk el (113). A mononukleáris sejteket 2×10^5 sejt/cm² sűrűségben 24-lyukú szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényekre vagy BD BioCoat Osteologic Slides lemezekre tettük ki, 50 ng/ml rekombináns humán M-CSF és 50 ng/ml rekombináns humán RANKL (PeproTech) jelenlétében, α -MEM médiumban. Az oszteoklasztokat 14 napig tenyésztettük, és 2 naponta cseréltünk médiumot rajtuk. A kiértékelést az előzőekben bemutatottakhoz hasonlóan TRAP-festéssel és Image J szoftver segítségével végeztük. A humán sejteken végzett kísérleteinket a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte.

A gátlószeres kísérletekben a wortmannin (Sigma) és a TGX221 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Egyesült Államok) megjelölt koncentrációit a médium- és citokincserével együtt, 2 naponta adtuk a kultúrákhoz. A kontroll kezelt minták 0,1% DMSO-t vagy 0,1% etanolt kaptak.

5.3. Apoptózis vizsgálata

A sejthalál vizsgálatához a vad típusú és a PI3K $\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekurzorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében, α -MEM médiumban, szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényeken differenciáltattuk 48 órán át. Az így nyert preoszteoklasztokat a tenyésztőedényekről 0,25% tripszin-EDTA (Sigma) segítségével szedték fel, majd vagy rögtön analizáltuk, vagy további 12 és 18 órán keresztül α -MEM médiumban, szérum és citokinek jelenléte nélkül tenyésztettük és vizsgáltuk. A sejteket Annexin-V-PE-nel és 7-amino-actinomycin D-vel (Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen, San Jose,

Egyesült Államok) a gyártó leírása szerint megfestettük, és áramlási citométerrel (BD FACSCalibur) elemeztük.

A TUNEL reakcióhoz a csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében α -MEM médiumban, szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényeken differenciáltattuk 72 órán keresztül. A sejteket a gyártó protokollja alapján az *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Bazel, Svájc) segítségével megfestettük, majd lefényképeztük, és a TUNEL-pozitív sejteket manuálisan megszámoltuk.

5.4. Fluoreszcens mikroszkópia

Az aktingyűrűk megfestéséhez a vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében, α -MEM médiumban, szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényeken 72 órán át differenciáltattuk. Ezután a sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk, 0,1% Triton X-100 segítségével (Sigma) permeabilizáltuk, majd Alexa488-Phalloidin-nel (Invitrogen) és DAPI-val (Invitrogen) megfestettük. Az aktingyűrűket Leica DMI6000B mikroszkóppal azonos beállítások mellett fényképeztük le.

Az oszteoklaszt fejlődés során bekövetkező citoskeletális változások „real time” nyomonkövetésére a Lifeact-EGFP-t expresszáló vad típusú és $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében, α -MEM médiumban, szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényeken 72 órán át differenciáltattuk. A felvételeket az IncuCyte Zoom (Essen BioScience, Ann Arbor, Egyesült Államok) rendszerrel készítettük. A bemutatott videók és pillanatfelvételek az IncuCyte Zoom Controller 2013A szoftver használatával készültek.

A savas vezikulák megfestéséhez a vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében, α -MEM médiumban, szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényeken 72 órán át differenciáltattuk. A sejteket 20 percig LysoTracker Red

(Invitrogen) vitális festékekkel inkubáltuk, majd fixáltuk, permeabilizáltuk, végül pedig megfestettük DAPI-val, és az előzőekben bemutatottakhoz hasonlóan kiértékeljük.

A kalcium-oszcillációk méréséhez a vad típusú és a PLC γ 2^{-/-} egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében, α -MEM médiumban tenyésztettük 24, 48 vagy 72 órán keresztül. A sejteket 5 μ M Fura-2-AM (Tocris Bioscience, Missouri, Egyesült Államok) és 0,05% pluronsav (Sigma) jelenlétében 30 percig 37 °C-on inkubáltuk szérummentes DMEM médiumban (Invitrogen), majd a mosást követően 0,5 mM kalciumot tartalmazó Hank's balanced salt solution-ben (HBSS, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, Egyesült Államok) vettük fel. A fluoreszcencia változásait 340 nm és 380 nm excitációs, valamint 510 nm emissziós hullámhosszakon mértük Visitron rendszeren (Visitron Systems, Puchheim, Németország). Az excitációs hullámhosszakon mért fluoreszcencia értékek hányadosából kaptuk meg a relatív fluoreszcenciát (fluoreszcencia hányados 340/380 nm) (114). A méréseket 5 másodpercenként végeztük, a kiértékeléshez MetaFluor szoftvert (Molecular Devices, Sunnyvale, Egyesült Államok) használtunk. A kiértékelés során a region of interest-ek (ROI-k) azonos méretűek voltak, és 15 pixelből álló sugarú, 4 μ m-nek megfelelő átmérőjű köröket formáltak, amelyek a sejtek citoplazmáját jelentősen lefedték egy sejt-egy ROI mérési felállásban.

5.5. Génexpressziós vizsgálatok

Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának változását kvantitatív real-time PCR módszerrel követtük nyomon (115). A vad típusú és a PI3K β ^{-/-} egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF jelenlétében (makrofágok), vagy 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében (oszteoklasztok), α -MEM médiumban tenyésztettük 0, 24, 48 vagy 72 órán keresztül. A sejtekből TriPure reagens segítségével (Roche) az RNS-t kivontuk, majd minőségét Thermo Scientific NanoDrop spektrofotométeren ellenőriztük. A genomiális DNS eltávolításához 10 μ g RNS-t 1 μ L DNase I (Ambion, Austin, Egyesült Államok) jelenlétében 37°C-on inkubáltunk 30 percig. A reverz transzkripció 100 ng RNS-t felhasználva, Super Script II (Invitrogen) reverz

transzkriptázzal 37 °C-on 2 órán keresztül történt. Ezt követően Taqman Gene Expression Assay-ekkel (Applied Biosystems, Foster City, Egyesült Államok) ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) készüléken meghatároztuk az egér *Pik3ca* (PI3K α -át kódoló gén; Mm00435673_m1), *Pik3cb* (PI3K β ; Mm00659576_m1), *Pik3cg* (PI3K γ ; Mm00445038_m1), *Pik3cd* (PI3K δ ; Mm00435674_m1), *Acp5* (TRAP, Taqman Mm00475698_m1), *Calcr* (kalcitonin receptor, Mm00432271_m1), *Ctsk* (katepszin K, Mm00484039_m1), *Itgb3* (integrin β 3 lánc; Mm00443972_m1), *Nfatc1* (NFATc1; Mm00479445_m1) és *Tm7sf4* (DC-STAMP; Mm04209235_m1) gének expresszióját. A normalizáláshoz a *Gapdh* (GAPDH; Mm99999915_g1) háztartási gént használtuk. A reakciót 40 cikluson keresztül 94 °C-on 12 másodpercig és 60 °C-on 60 másodpercig végeztük. A relatív génextpressziókat a komparatív Ct módszer segítségével határoztuk meg.

5.6. Biokémiai vizsgálatok

A katepszin K ürítésének vizsgálatához a vad típusú és a PI3K $\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében, α -MEM médiumban tenyésztettük 72 órán keresztül. A kialakult oszteoklasztokat 50 ng/ml PMA-val stimuláltuk (Sigma) 10 percig. Ezután a kultúrákról a felülúszókat összegyűjtöttük, és belőlük a fehérjéket acetonnal kicsaptuk. A tenyésztődények alján maradt sejteket Triton X-100 alapú detergenssel lizáltuk. A felülúszókból származó fehérjéket és a teljes sejt lizátumokat poliakrilamid gélen megfuttattuk, és Western blot technikával hívtuk elő.

A jelátviteli vizsgálatokhoz a vad típusú, és a PI3K $\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml rekombináns M-CSF és 50 ng/ml rekombináns RANKL jelenlétében, α -MEM médiumban tenyésztettük 72 órán keresztül. Az érett oszteoklasztokat 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL citokinekkal szövetkultúra-kezelt tenyésztődényeken 10 percig, 37 °C-on stimuláltuk. A kontroll sejteket citokinek nélkül hagytuk α -MEM médiumban a tenyésztődényeken. A stimulációt jégen állítottuk le, a felülúszót leszívtuk, majd a sejteket proteáz- és foszfatázgátlókkal (aprotinin, proteáz inhibitor komplex, foszfatáz inhibitor komplex, nátrium-vanadát, PMSF) kiegészített Triton-X-100 alapú feltáró oldatban 10 percig

lizáltuk. Az immunprecipitációs vizsgálatokhoz 0,1% SDS-t és 0,5% nátrium deoxikolatot tartalmazó RIPA (radioimmunoprecipitation assay) feltáró oldatot használtunk. A lizálást követően a letapadt sejteket felkapartuk, majd a Triton-inszolubilis frakciót lecentrifugáltuk (13200 rpm, 5 perc 4 °C), és a felülúszókat négyszeres töménységű merkaptotetanolt tartalmazó redukáló mintapufferben vettük fel. Az így kapott mintákat 10 percig 96 °C-on főztük, majd poliakrilamid gélen megfuttattuk, és Western blot technikával hívtuk elő.

Az immunprecipitációs vizsgálatokban a PLC γ 2 fehérjét a teljes sejt lizátumokból PLC γ 2 ellenes antitesttel (Q-20; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Egyesült Államok), 90 perces 4 °C-os forgatás mellett történő inkubáció során, protein G-vel borított agaróz gyöngyök (Invitrogen) segítségével vontuk ki. Mosást követően a gyöngyöket másfélszeres töménységű redukáló mintapufferben vettük fel, és 10 percig 96 °C-on főztük, majd poliakrilamid gélen megfuttattuk.

A felülúszóból származó fehérjéket, a teljes sejt lizátumokat és az immunprecipitátumokat Western blot módszerrel vizsgáltuk tovább. A vizsgálathoz katepszin K elleni (E-7, Santa Cruz), PLC γ 2 elleni (Q-20, Santa Cruz), p110 β elleni (S-19, Santa Cruz) és foszfortirozinra specifikus (4G10; Millipore, Billerica, Egyesült Államok) elsődleges antitesteket használtunk, a másodlagos antitestek a GE Healthcare-től származtak. Az immunreakciót ECL reagenssel (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság), kemilumineszcens módszerrel hívtuk elő, és röntgenfilmre exponáltuk.

5.7. Retrovirális rekonstitúció

A PLC γ 2 fehérje embrionális májsejtekbe történő reexpressziójához a humán PLC γ 2-t (1265 aminosav, accession number: NP_002652) kódoló cDNS-t az egér-össejt vírus alapú (MSCV), belső riboszóma belépési helytől (IRES) disztálisan GFP-t expresszáló, bicisztronikus pMIG-R1 vektorba (116) klónoztam. A klónozás során a pcDNA3.1(+) vektorból az Xba I restriktív endonukleáz segítségével kivágott 3,8 kb méretű fragmentumot - amely a PLC γ 2 cDNS-ét is tartalmazta - a pMIG-R1 vektorba ligáltam. Az így létrehozott, és szekvenálással ellenőrzött retrovirális vektort pMIG-PLC γ 2-nek neveztem el.

A 16,8-16,8 μg pMIG-R1 és pMIG-PLC γ 2 vektorokkal $11,9 \times 10^6$ Platinum-E (Plat-E) (117) csomagolósejtet transzfektáltunk 50,4 μl Lipofectamin 2000 transzfekciós reagens (Invitrogen) és 4 ml OptiMem jelenlétében, 14 ml DMEM médiumban (Invitrogen). A Plat-E sejtek tartalmazták a víruspartikulumok összeszerelődéséhez szükséges gag-pol és env géneket. A csomagolósejtek felülúszójába ürített replikáció inkompetens vírusokat csak a rágsáló sejtek tudták felvenni a használt ekotrópikus burokfehérjének köszönhetően. A vírustiter meghatározásához a Plat-E sejtekről 48 óra elteltével összegyűjtött felülúszót lecentrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc, 37 °C), majd 0,45 μm átmérőjű szűrőn átszűrtük, és NIH3T3 fibroblasztokkal inkubáltuk. A dolgozatban bemutatott kísérletek mindegyikében a vírustiter 10^6 - 10^7 fertőzőképes partikula/ml közötti értéknek adódott. A vírusokat tartalmazó felülúszót ezután rögtön vagy -80°C -on maximum fél évig történő tárolás után adtuk a sejtekhez.

A vad típusú és a PLC γ 2^{-/-} embrionális májsejtek transzdukciója 24 órával az izolálásuk után történt 100 ng/ml rekombináns egér SCF és TPO, 6 ng/ml IL-3, 20 ng/ml Flt3L és 10 ng/ml rekombináns humán IL-6 (PeproTech) és 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Retronectin (Takara Bio Inc, Tokió, Japán) jelenlétében, StemPRO médiumban. Az azonos számú víruspartikulumot tartalmazó megfelelő térfogatú felülúszókat 24 órán keresztül inkubáltuk együtt a sejtekkel. A transzdukciót követően az embrionális májsejteket először 10 ng/ml rekombináns egér M-CSF jelenlétében tenyésztettük 48 órán keresztül, majd további 72 órán át 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében differenciáltattuk. A sejteket ezután TRAP-ra megfestettük vagy kalciummérést végeztünk rajtuk.

5.8. Mikro-CT vizsgálatok

A vad típusú és a PI3K β ^{-/-} egerekből eltávolított femurok disztális metafizisében található trabekuláris csont szerkezetét és mineralizációját mikro-CT vizsgálattal értékeltük ki. A femurokat 0,1% Na-azidot tartalmazó PBS oldatban tároltuk, majd fogászati gyanta segítségével 1,5 ml-es Eppendorf-csővekbe ágyaztuk. A csontok szkennelését 50 kV és 200 μA erősségű gyorsítófeszültséggel, 0,5 mm vastagságú alumíniumszűrő mellett, 0,5 fokkonkénti forgatással SkyScan 1172 (SkyScan, Kontich,

Belgium) készüléken végeztük. A beállításokkal 4,5 μm oldalhosszúságú izometrikus voxeleket kaptunk. A háromdimenziós rekonstrukciót NRecon, a kiértékelést pedig CT-Analyser (SkyScan) szoftverekkel hajtottuk végre. A trabekuláris csontállomány vizsgálatához a disztális növekedési zónától számított 50. szelettől (225 μm) kezdődő 400 szeletet (1,8 mm) használtuk. A csont-lágyszövet határ beállítása manuálisan történt, a párhuzamos minták mindegyikénél azonos értékeket alkalmazva. Demonstrációs célra a disztális növekedési zónától számított 250. szeletet (1,13 mm) és a 150. és 450. szelet közötti (1,35 mm), 700 μm átmérőjű tengelyirányú hengert használtuk fel. A minták kiértékelése a nemzetközi irodalomban elfogadott ajánlások figyelembevételével történt (118).

5.9. Szövetteni vizsgálatok

A hisztomorfometriai vizsgálatokat az egerek femurjának disztális metafízisén végeztük. A vad típusú és a $\text{PI3K}\beta^{-/-}$ egerekből eltávolított csontokat 6 órán át 4,5% paraformaldehidet tartalmazó PBS oldatban fixáltuk, és 70%-os etanolban tároltuk. A feldolgozás során a mintákat 14% EDTA-val 7 napig dekalcináltuk, majd paraffinba ágyasztuk be, és mikrotómmal metszettük. A szeleteket TRAP-, toluidinkék- és hematoxilinozin-festésekkel értékeltük ki. A metszetekről Zeiss Axioskop 2 mikroszkóppal (Marburg, Németország) készült képeket OsteoMeasure (OsteoMetrics, Atlanta, Egyesült Államok) szoftverrel, nemzetközi ajánlások szerint elemeztük (119).

5.10. Petefészek eltávolítás

Az ösztrogének hiányában létrejövő csontvesztést a petefészek sebészi eltávolításával (ovariectomia, OVX) vizsgáltuk. Vad típusú és $\text{PI3K}\beta^{-/-}$ nőtény egereket 8 hetes korukban izofluránnal elaltattunk, majd dorzolumbális metszésből felkerestük a petefészkeket mindkét oldalon. A bőr- és az izommetszést követően a petevezetéseket lekötöttük, az ováriumokat eltávolítottuk, majd a metszéseket varratokkal zártuk. Az áloperált (SHAM) állatokon ugyanúgy elvégeztük a petefészek felkeresését, de azokat nem kötöttük le, illetve nem távolítottuk el. Az állatokból 6

héttel a műtét után mikro-CT vizsgálatra femurt és tibiát izoláltunk, valamint az uterusok súlyának lemérésével meggyőződünk az operáció sikerességéről.

5.11. Statisztikai analízis

Az *in vitro* kísérleteket legalább háromszor megismételtük, az *in vivo* méréseket pedig elvégeztük legalább három, korban és nemben megegyező egéren. A statisztikai hibák az átlag hibájaként (SEM) vannak megadva. A statisztikai elemzést különböző elemszámú, két populációs nem-párosított t-próbával, illetve ismétléses, kétfaktoros variancia analízissel (kétutas ANOVA) végeztük Statistica 7.0 szoftver (Statsoft, Tulsa, Egyesült Államok) segítségével. A genotípus és az elvégzett beavatkozások közötti interakciót Tukey poszt-hok vizsgálatával határoztuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

6. Eredmények

Ph.D. munkám során a PI3K β és a PLC γ 2 fehérjék szerepét vizsgáltam az oszteoklasztok fejlődésében és működésében, valamint a csontanyagcserében. Irodalmi adatok alapján mindkét fehérjéről felmerült, hogy szerepet játszhatnak az oszteoklasztokban, azonban a munkánk kezdetén konkrét eredmények nem álltak rendelkezésre.

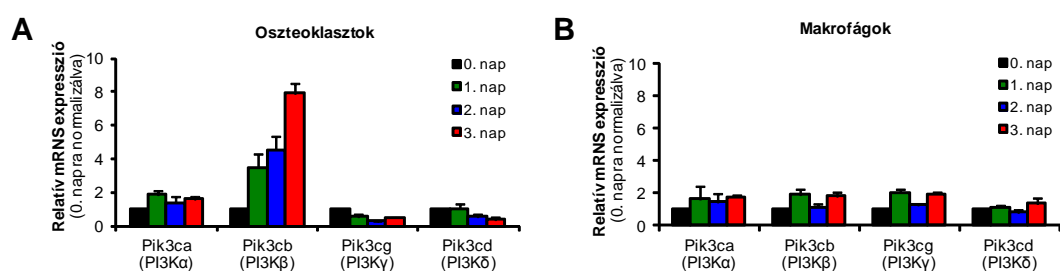
6.1. A PI3K β szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és működésében

Ahogy azt a bevezetésben említettem, régóta ismert kísérletes megfigyelés, hogy az általános foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) gátlószer wortmannin és LY294002 hatására az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése és működése károsodik (95-97). Arról azonban méréseink kezdetén nem volt adat, hogy a különböző PI3K izoformák közül melyik/melyek közvetítik ezt a hatást. Ezért kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy azonosítsuk az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében, valamint az *in vivo* csontanyagcserében domináns szerepet játszó PI3K izoformát. Kísérleteinkben genetikai és farmakológiai megközelítéseket alkalmaztunk, és az itt bemutatandó eredményeinket az *Arthritis & Rheumatology* című folyóiratban közzétettük.

6.1.1. Az oszteoklaszt-fejlődés során fokozódik a PI3K β kifejeződése

Első kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy az *in vitro* oszteoklasztogenezis során az egyes PI3K izoformák kifejeződése hogyan változik. Az egér csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml M-CSF (makrofágok), vagy 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében (oszteoklasztok) tenyésztettünk 24, 48 és 72 órán keresztül. A 8. ábra A paneljén látható, hogy a PI3K β expressziója az oszteoklaszt-fejlődés előrehaladtával jelentősen, körülbelül 8-szorosára fokozódott, míg a többi PI3K I. osztályba tartozó izoforma expressziója nem változott vagy még inkább csökkent. A párhuzamos makrofág kultúrákban a PI3K β kifejeződése nem fokozódott, a látott változások az oszteoklasztokra specifikusak voltak (8. ábra B panel).

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a PI3K β expressziója az *in vitro* oszteoklasztogenezis során, az oszteoklasztokra jellemző módon fokozódik, amely eredmények felvetik a PI3K β lehetséges szabályozó szerepét az oszteoklasztokban. Saját méréseinkkel párhuzamosan egy japán munkacsoport is hasonló megfigyelésre jutott (120).

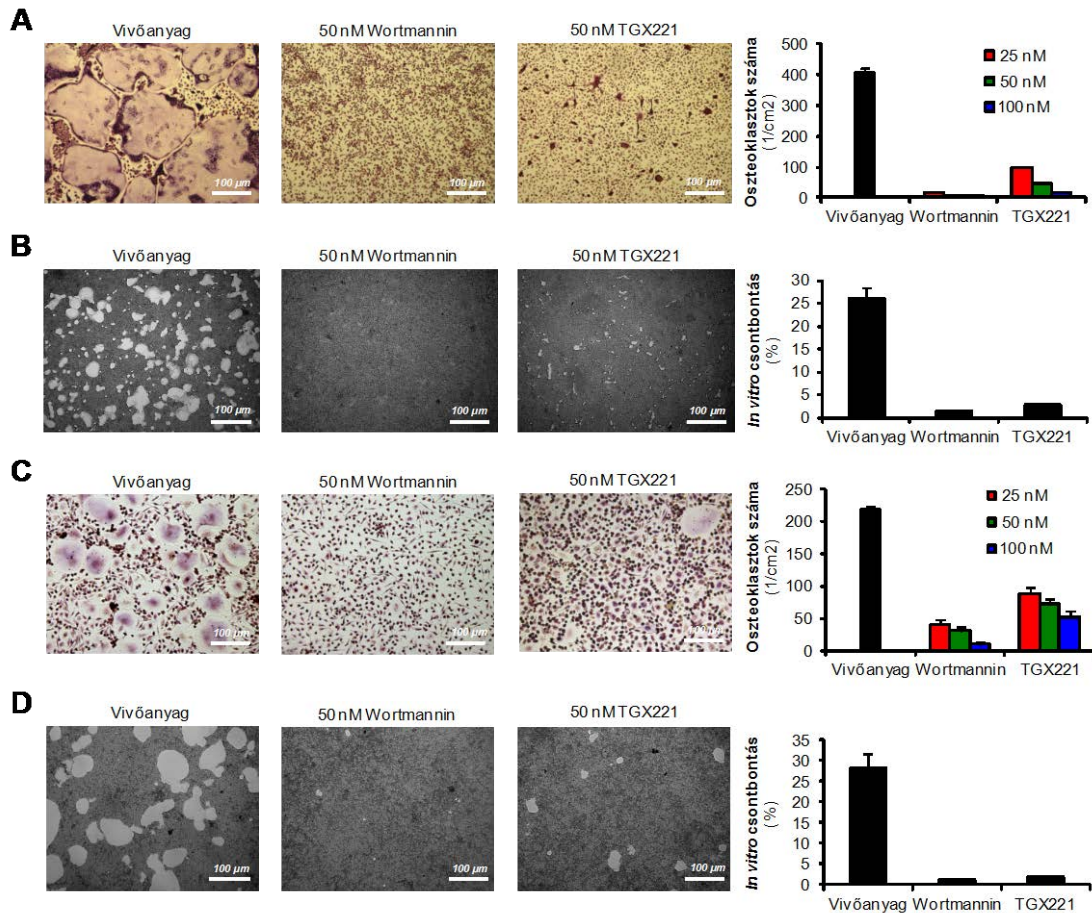


8. ábra. A PI3K β expressziója az *in vitro* oszteoklaszt differenciáció során fokozódik. **A-B)** Vad típusú egerek csontvelői eredetű sejteit 50 ng/ml M-CSF (makrofágok, B panel), vagy 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL (oszteoklasztok, A panel) jelenlétében tenyésztettük az ábrán jelölt időpontokig, majd meghatároztuk a *p110 α* , a *p110 β* , a *p110 γ* és a *p110 δ* katalitikus alegységeket kódoló *Pik3ca*, *Pik3cb*, *Pik3cg* és *Pik3cd* gének kifejeződését qPCR módszerrel. A grafikonokon az átlag és az SEM értékek láthatók; $n = 3$.

6.1.2. A TGX221 gátolja az oszteoklasztok fejlődését és működését

Ahhoz, hogy a PI3K β oszteoklasztokban betöltött szerepét jobban megérthessük, a következőkben a TGX221, egy PI3K β -szelektív gátlószernek az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésére és működésére kifejtett hatását vizsgáltuk meg. Vad típusú egerekből nyert csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében 3 napig tenyésztünk, majd TRAP-festést végeztünk a kultúrákon. A 9. ábra A paneljén látható, hogy a vivőanyaggal kezelt tenyészetekben kialakultak a TRAP-pozitív (püspöklilára festődő) sokmagvú óriássejtek, míg a non-szelektív, általános PI3K gátlószer wortmannin jelenlétében az oszteoklasztok teljesen hiányoztak a kultúrákból. Hasonlóan a wortmanninhoz, a TGX221 dóziszfüggő módon gátolta az oszteoklasztogenezist, mind az oszteoklasztok száma, mind azok átmérője jelentősen csökkent a PI3K β -szelektív gátlószerrel kezelt tenyészetekben (9. ábra A panel). Ez a gátló hatás összehasonlítható mértékű volt a wortmanninéval, körülbelül 90%-os gátlást

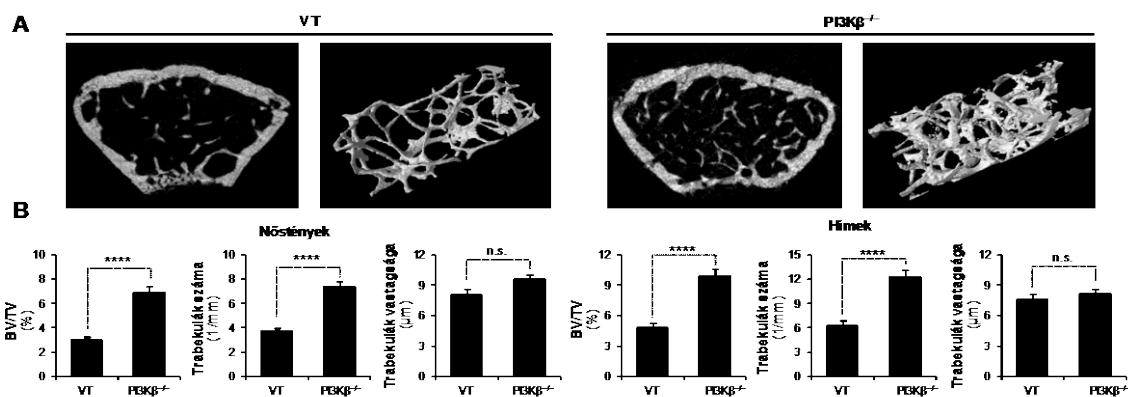
láttunk az inhibitor 50 nM-os koncentrációjánál, amely dózisban irodalmi adatok alapján a TGX221 szelektíven gátolja a PI3K β izoformát (90, 121).



9. ábra. A PI3K β farmakológiai gátlása károsodott oszteoklaszt-fejlődést és -működést eredményez. A-D) Vad típusú egerek csontvelői eredetű sejtjeit (A, B), vagy egészséges önkéntesekből izolált humán perifériás vér eredetű monocitákat (C, D) 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettünk 3 (A), 11 (B) vagy 14 (C, D) napig, majd TRAP festést (A, C), vagy mesterséges hidroxipatit felszínén funkcionális méréseket (B, D) végeztünk rajtuk. A gátlószereket 2 naponta kapták a sejtek a megjelölt koncentrációkban. A reszorpciós tevékenység világos területekként látszik. A grafikonokon az átlag+SEM értékek láthatók; n= 3.

A következőkben megvizsgáltuk a TGX221 hatását az *in vitro* csontbontásra. Az oszteoklaszt előalakokat mesterséges csontfelszínre helyeztük, és azon 11 napig tenyésztettük. Ahogy a 9. ábra B paneljén látható, a gátlószerekkel nem kezelt tenyészetben az oszteoklasztok a hidroxipatit felszínén létrehozták a jellegzetes, rágásnyom-szerű mintákat (világos területeket), míg 50 nM wortmannin a csontbontó funkciójukat teljesen megszüntette. A TGX221 50 nM-os koncentrációban a wortmanninhoz hasonló mértékben gátolta a sejtek reszorpciós tevékenységét (9. ábra B panel).

Ezután megvizsgáltuk, hogy az egér sejteken kapott gátlószeres eredmények a humán oszteoklasztokra is vonatkoztathatók-e. Egészséges önkéntesek véréből izolált monocitákat 50 ng/ml humán M-CSF és 50 ng/ml humán RANKL jelenlétében tenyésztettünk. A kultúrákban az oszteoklasztok kifejlődéséhez több időre volt szükség, mint egér esetében, és a létrejött sejtek morfológiailag minimálisan különböztek a rágcásálókban látottaktól (9. ábra A és C panelek). A gátlószereket hozzáadva a tenyészetekhez mind a wortmannin, mind a TGX221 gátolta a humán oszteoklasztok kialakulását (9. ábra C panel). A TGX221 hatását számszerűsítve, körülbelül 70%-os gátlást láttunk 50 nM-os gátlószer koncentrációnál (9. ábra C panel). Az 50 nM TGX221 továbbá hatásosan gátolta a humán oszteoklasztok csontbontó képességét a mesterséges hidroxipatit felszínen (9. ábra D panel).

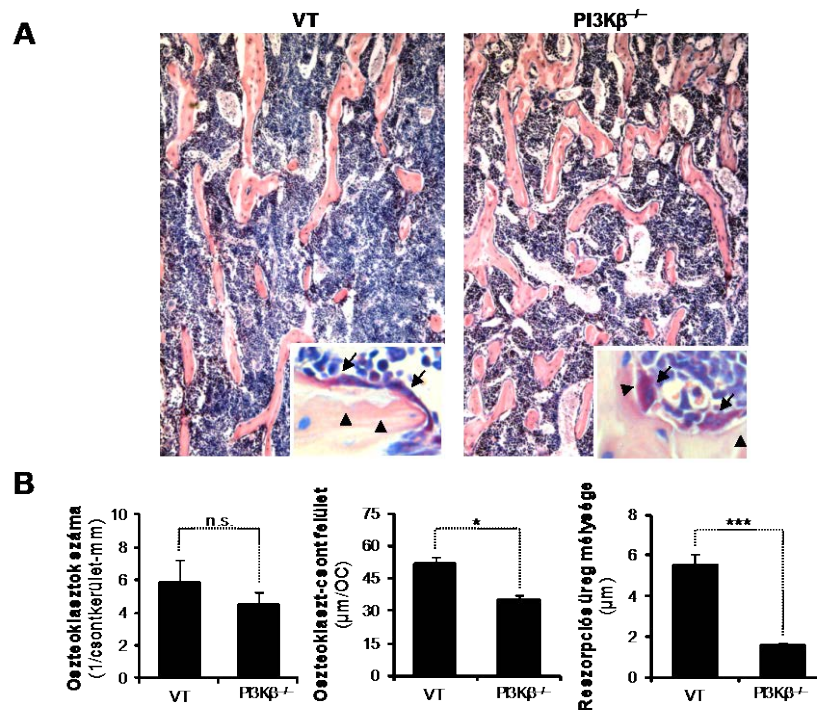


10. ábra. A $PI3K\beta$ genetikai hiányában a mineralizált csont mennyisége megnő az egerekben. **A)** A 8 hetes vad típusú (VT) és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerek femurjai disztális metafíziseinek reprezentatív keresztmetszeti képei és 3D rekonstrukciója. **B)** A kvantitatív mikro-CT vizsgálat eredményei. BV/TV: bone volume/tissue volume; a grafikonokon átlag+SEM értékek láthatók; ****, $p < 0,0004$; n.s.: nem szignifikáns; $n = 8$.

6.1.3. A $PI3K\beta$ hiányában a mineralizált csont mennyisége megnő

A $PI3K\beta$ csontanyagcserében betöltött szerepének vizsgálatához genetikai megközelítést alkalmaztunk. A $Pik3cb^{tm1.1Bvan/tm1.1Bvan}$ egértörzset (továbbiakban: $PI3K\beta^{-/-}$) Dr. Bart Vanhaesebroeck hozta létre, és bocsátotta rendelkezésünkre. A homozigóta mutáns egerekben a $PI3K\beta$ katalitikus alegysége, a p110 β kináz doménjét kódoló 21 és 22-es exonok mindkét allélon törlésre kerültek. Először a femurok disztális metafízisében található trabekuláris csontállomány szerkezetét vizsgáltuk meg az egerekben mikro-CT analízissel. A 10. ábra A paneljén a combcsontok azonos

magasságban készített reprezentatív keresztmetszeti képei és a trabekuláris csont 3D rekonstrukciója látható. A vad típusú képet, a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekben szignifikánsan több trabekulát találtunk (10. ábra A panel). A számszerűsített eredményekből jól látszik, hogy a 8-10 hetes korú hím ($p = 0,000084$; $n = 8$) és nőstény ($p = 0,000029$; $n = 8$) $PI3K\beta^{-/-}$ állatokban egyaránt szignifikánsan megnőtt a relatív csonttérfogat (BV/TV) (10. ábra B panel). A relatív csonttérfogat emelkedése a trabekulák számának a növekedésével volt magyarázható, nem pedig a megvastagodásukkal (10. ábra B panel).



11. ábra. A $PI3K\beta$ hiányában az oszteoklaszt működés károsodik *in vivo*. **A)** A 8 hetes vad típusú (VT) és $PI3K\beta^{-/-}$ egerek femurjai disztális metafíziseinek hematoxilin-eozin és TRAP (inszertek) festett szövettani képei. Az oszteoklasztokat nyilak, a reszorpció üregeket nyílhegyek mutatják. **B)** A kvantitatív szövettani vizsgálat eredményei. BV/TV: bone volume/tissue volume; a grafikonokon átlag+SEM értékek láthatók; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,002$; n.s.: nem szignifikáns; $n = 5$.

Ezt követően, bécsi munkacsoporttal együttműködve, szövettani vizsgálatot végeztünk az egerek csontjain. A hematoxilin-eozin festett metszeteken jól látszik a különbség a trabekulák számában a vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ állatok között (11. ábra A panel).

Hasonlóan a mikro-CT vizsgálatokhoz, a kvantitatív hisztomorfometriai eredmények is a BV/TV értékek ($p = 0,0059$; $n = 5$) és a trabekulák számának ($p = 0,0028$; $n = 5$) szignifikáns növekedését mutatták a génhányos egerekben.

A $PI3K\beta^{-/-}$ egerek csontjaiban közelebbről szemügyre véve a sejteket, az egységnyi felületre jutó oszteoklasztok száma 20%-kal csökkent a TRAP-festett szövettani metszeteken, azonban ez a csökkenés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p = 0,44$; $n = 5$) (11. ábra B panel). Ezzel szemben a $PI3K\beta^{-/-}$ oszteoklasztoknak kóros morfológiájuk volt: jobban lekerekedtek, valamint szignifikánsan kisebb felületen érintkeztek a csonttal ($p = 0,030$; $n = 30$ oszteoklaszt), és alattuk a reszorpciós üreg mélysége jelentősen csökkent ($p = 0,0089$; $n = 30$ oszteoklaszt) (11. ábra B panel).

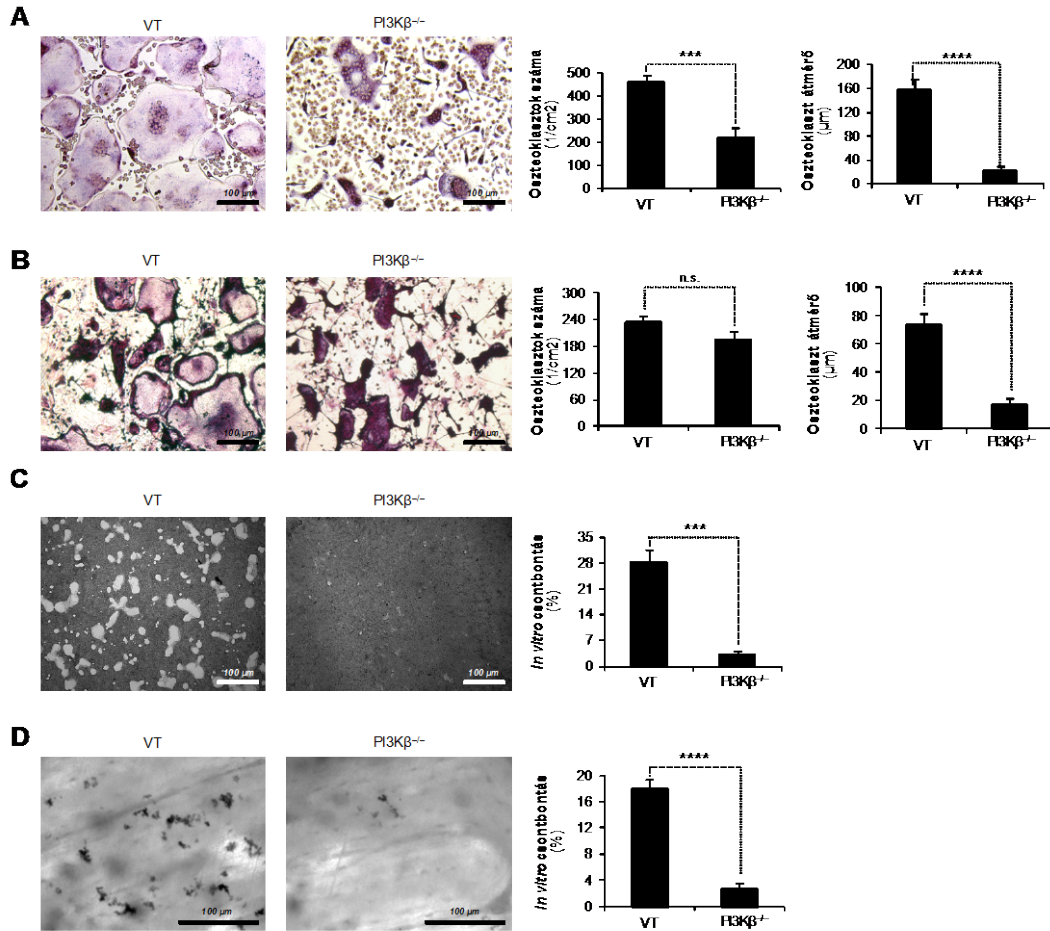
Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekben megnőtt a mineralizált csont mennyisége, ami a trabekulák számának fokozódásával volt magyarázható, az oszteoklasztok száma mérsékelten csökkent, morfológiájuk pedig kóros volt, ami feltehetően károsodott csontbontást eredményezett.

6.1.4. A $PI3K\beta$ hiányában károsodik az oszteoklaszt-fejlődés és -működés

A következőkben megvizsgáltuk a $PI3K\beta^{-/-}$ mutáció hatását az *in vitro* oszteoklaszt-fejlődésre és -működésre. Tekintve, hogy a $PI3K\beta^{+/-}$ x $PI3K\beta^{+/-}$ pároztatásokból az egerek kevesebb, mint 10%-a volt $PI3K\beta^{-/-}$ genotípusú (89), a kísérleteinkhez szükséges számú állatot csontvelő-transzplantációval állítottuk elő (111, 112). A 12. ábra A paneljén látható, hogy a $PI3K\beta$ genetikai hiánya jelentősen csökkentette a TRAP-pozitív, sokmagvú óriássejtek számát az 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL citokinekkal kezelt csontvelői eredetű oszteoklaszt tenyészetekben ($p = 0,0015$; $n = 5$). A $PI3K\beta^{-/-}$ kultúrákban az oszteoklasztok számánál csak a sejtek átmérője csökkent nagyobb mértékben ($p = 0,00083$; $n = 5$) (12. ábra A panel).

A csontvelői eredetű oszteoklasztok tenyésztését elvégeztük úgy is, hogy a citokinek adása helyett vad típusú újszülött egerek koponyájából preparált primer oszteoblasztokkal közös kultúrában differenciáltattuk őket. A 12. ábra B paneljén látható, hogy az így tenyésztett oszteoklasztok száma ugyan elmaradt a vad típusétól, de ez a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p = 0,12$; $n = 5$). Másrészt

viszont, az oszteoklasztok átmérője ebben az esetben is jelentősen csökkent a $PI3K\beta^{-/-}$ kultúrákban ($p = 0,00012$; $n = 5$) (12. ábra B panel).

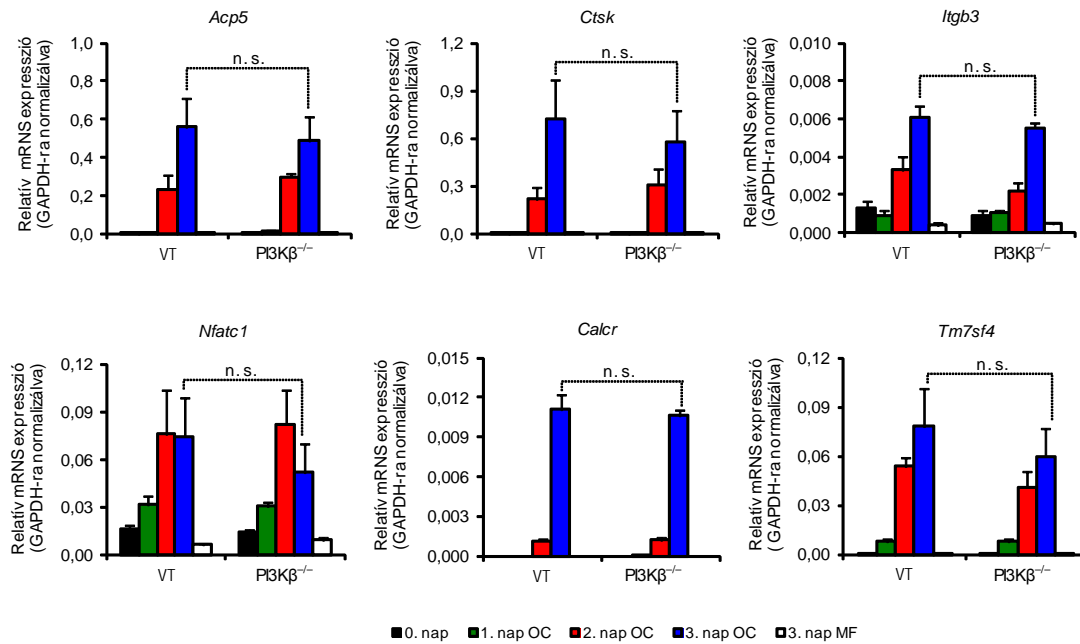


12. ábra. A $PI3K\beta$ hiányában az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése és működése károsodik. A-D) Vad típusú és $PI3K\beta^{-/-}$ egerek csontvelői eredetű mieloid prekursorait 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében (A, C, D), vagy primer oszteoblasztokkal kokultúrában (B), szövetkultúra-kezelt tenyésztőedényekben (A, B), vagy mesterséges csontfelszínen (C), vagy szarvasmarha kortikális csontszelvényeken (D) tenyésztettük 3 (A), 10 (B) vagy 11 (C, D) napig, majd a sejteken TRAP festést végeztünk (A, B) vagy eltávolítottuk őket (C, D). A reszorpciós tevékenység világos (C) vagy sötét (D) területekként látszik. A grafikonokon az átlag+SEM értékek láthatók; ***, $p < 0,002$; ****, $p < 0,0004$; $n = 5$.

A következőkben megvizsgáltuk az 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztett csontvelői eredetű oszteoklasztok csontbontó képességét. A $PI3K\beta$ genetikai hiánya jelentősen gátolta a mesterséges hidroxipatit felszín ($p = 0,00042$; $n = 5$) (12. ábra C panel) és a szarvasmarha csontszelvények ($p = 6,2 \times 10^{-6}$; $n = 5$) bontását (12. ábra D panel).

6.1.5. A PI3K β hiánya a korai gének kifejeződését nem befolyásolja

Miután kimutattuk a PI3K β szerepét az oszteoklasztok fejlődésében és működésében, arra voltunk kíváncsiak, hogy a fehérje milyen mechanizmussal szabályozza az oszteoklaszt-mediálta csontbontást.



13. ábra. A PI3K β hiánya az oszteoklaszt-specifikus gének kifejeződését nem befolyásolja. Vad típusú (VT) és PI3K β ^{-/-} egerek csontvelői sejteit 50 ng/ml M-CSF (makrofágok), vagy 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük a megjelölt időpontokig, majd kvantitatív PCR segítségével meghatároztuk az *Acp5* (TRAP), a *Ctsk* (katepszin K), az *Itgb3* (integrin β_3 lánc), az *Nfatc1* (NFATc1), a *Calcr* (calcitonin receptor) és a *Tm7sf4* (DC-STAMP) gének expresszióját. A grafikonokon átlag+SEM látható; n.s.: nem szignifikáns; n = 3.

Látva a PI3K β hiányában az *in vitro* tenyészetekben tapasztalt fejlődési zavart, megvizsgáltuk, hogy a fehérje szerepet játszik-e a korai oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának szabályozásában (13. ábra). Az egér csontvelői eredetű mieloid prekursorokat 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük 0-3 napig, majd qPCR segítségével meghatároztuk az oszteoklaszt-specifikus gének kifejeződését. Ezzel párhuzamosan, kontrollként makrofágokat tenyésztettünk 50 ng/ml M-CSF jelenlétében, RANKL adása nélkül.

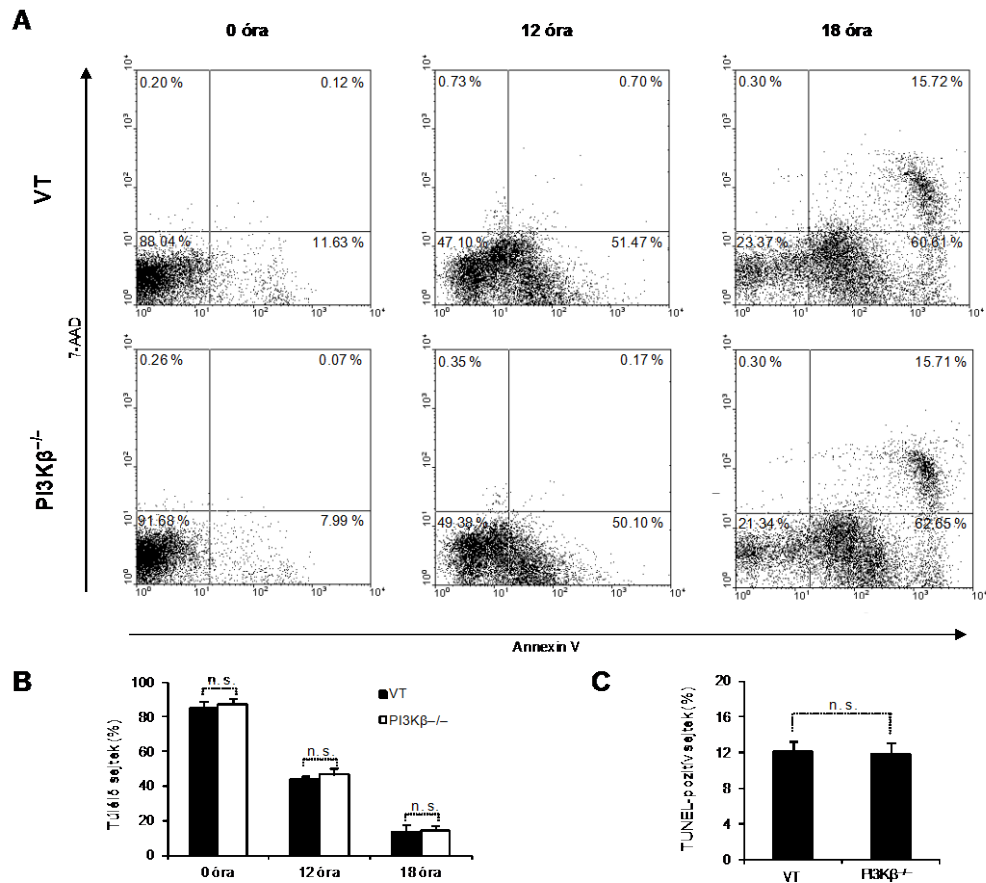
Ahogy az a 13. ábrán látható, az oszteoklaszt-specifikus TRAP (*Acp5*), katepszin K (*Ctsk*), integrin β_3 lánc (*Itgb3*), NFATc1 (*Nfatc1*), calcitonin receptor (*Calcr*) és DC-STAMP (*Tm7sf4*) fehérjéket kódoló gének expressziója jelentősen fokozódott az oszteoklaszt tenyészetek érése során, míg a makrofágokban ez nem történt meg. A $\text{PI3K}\beta^{-/-}$ oszteoklaszt tenyészetek a vad típusúakhoz hasonló mértékben tudták fokozni a vizsgált gének kifejeződését (13. ábra). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a $\text{PI3K}\beta$ nem játszik szerepet az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának szabályozásában.

6.1.6. A $\text{PI3K}\beta$ hiánya az oszteoklasztok túlélését nem befolyásolja

A PI3-kinázok közismerten fontos szerepet játszanak a túlélési jel közvetítésében, ezért a következőkben megvizsgáltuk, hogy a $\text{PI3K}\beta$ részt vesz-e az oszteoklasztok spontán és indukált apoptózisának szabályozásában. A vad típusú és a $\text{PI3K}\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettünk 2 napig. Az így differenciáltatott preoszteoklasztokat felszedtük a tenyésztőedényekről, és vagy rögtön, vagy további 12 és 18 órán keresztül szérums- és citokinmentes médiumban való inkubálást követően lemértük áramlási citométeren (14. ábra A és B panelek). A 14. ábra A és B paneljein látható, hogy a vad típusú sejtek körülbelül 90%-a a szérums- és citokinmegvonást megelőzően („0 óráss” minta) negatívnak bizonyult az Annexin V apoptózis és 7-AAD nekrozis markerekre, azaz életképes volt. A szérums- és citokinmegvonás hatására a vad típusú sejtek 50%-a 12 óra múlva apoptotizált, míg 18 óra elteltével 60%-uk apoptotizált, 15 %-uk pedig nekrotizált (14. ábra A és B panelek). A $\text{PI3K}\beta^{-/-}$ preoszteoklasztok a vizsgált összes időpontban a vad típusú sejtekhez hasonló arányban éltek túl (14. ábra A és B panelek).

Ezt követően megnéztük a 3 napig 50 ng/ml M-CSF és RANKL jelenlétében tenyésztett érett oszteoklaszt kultúrákban a DNS fragmentációját és a következményes sejthalált az úgynevezett TUNEL-reakció segítségével. A 14. ábra C paneljén látható, hogy a vad típusú és a $\text{PI3K}\beta^{-/-}$ tenyészetekben a TUNEL-pozitív sejtek aránya egyaránt megközelítőleg 12% volt.

Így elmondhatjuk, hogy a PI3K β genetikai hiánya nem befolyásolja az oszteoklasztok és azok előalakjainak a túlélését.

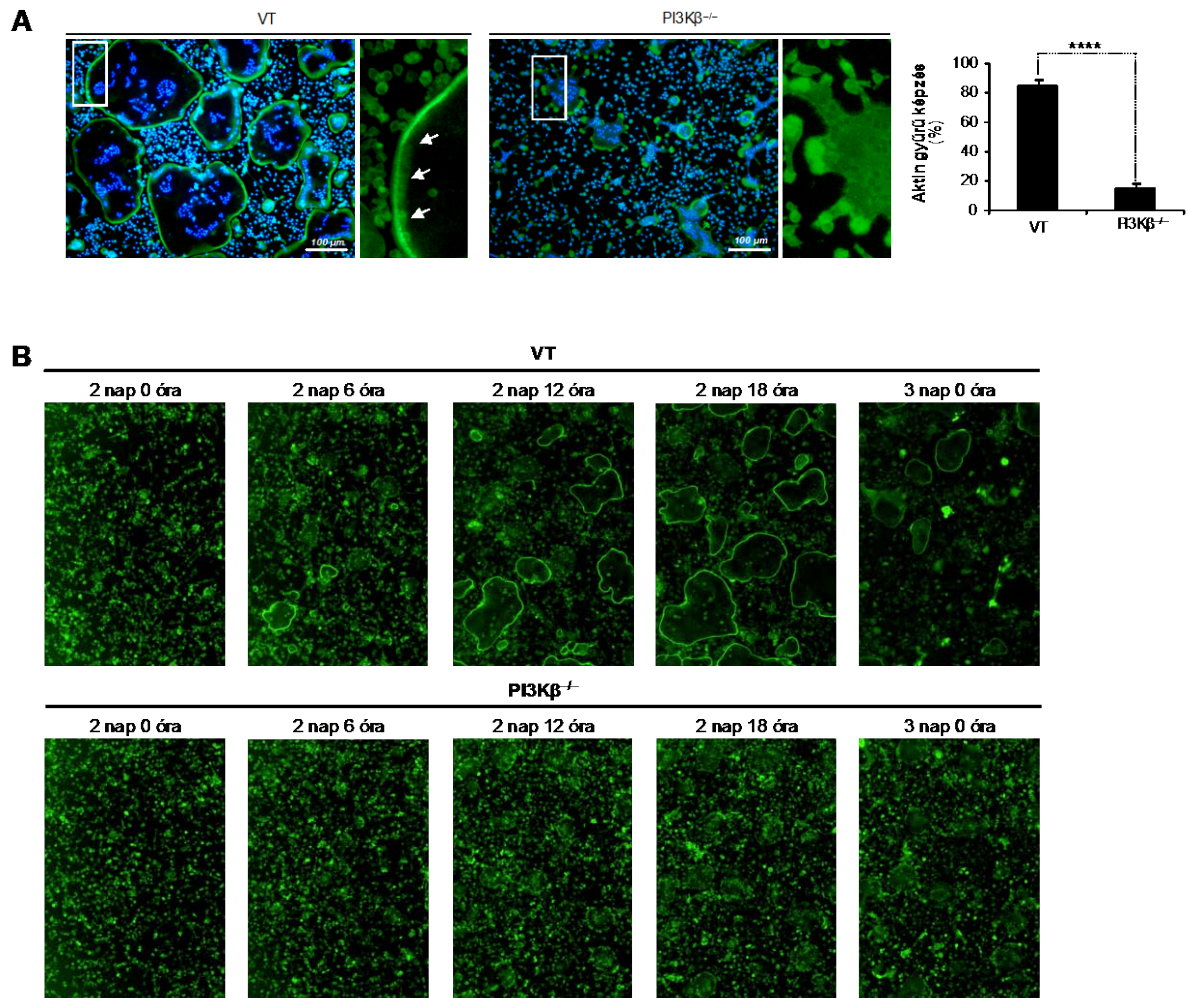


14. ábra. A PI3K β genetikai hiánya az oszteoklasztok túlélését nem befolyásolja. **A)** A vad típusú (VT) és a PI3K β ^{-/-} egerek csontvelői sejtjeit 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük 2 napig, majd 0, 12 és 18 órás citokin- és szérummegvonást követően áramlási citométeren mértük az Annexin V (apoptózis) és 7-AAD (nekrózis) markerek kötődését a sejtekhez. **B)** A túlélési vizsgálat kvantifikációja. A túlélő sejtek Annexin V-ra és 7-AAD-re negatívak voltak. **C)** A vad típusú és a PI3K β ^{-/-} csontvelői eredetű érett oszteoklaszt kultúrákban a TUNEL-pozitív sejtek százalékos aránya látható. A grafikonokon átlag+SEM látható; n.s.: nem szignifikáns; n = 6.

6.1.7. A PI3K β az aktinyűrű-képzést és a katepszin K-ürítést szabályozza

Az érett oszteoklaszt működése során szoros kapcsolatot alakít ki a csontfelszínnel, amely folyamatban kiemelt jelentősége van a citoskeletális átrendeződéseknek. A csonttal érintkező membránszakaszon, körben a sejt széle mentén a fibrilláris aktin feldúsul, és létrehozza az úgynevezett aktinyűrű struktúrát. Az aktin-

gyűrűnek a reszorpciós üregnek a külvilágtól való elszigetelésében van jelentősége. A következő kísérleteinkben megvizsgáltuk a PI3K β szerepét az aktinyűrűk kialakulásában.



15. ábra. A PI3K β genetikai hiányában károsodik az aktinyűrű-képzés. **A)** A vad típusú (VT) és a PI3K β ^{-/-} egerek csontvelői sejteit 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük 3 napig, majd megfestettük a sejteket Alexa488-falloiddinnel és DAPI-val. A nyilak az aktinyűrűt mutatják. **B)** A Lifeact-EGFP-t expresszáló vad típusú (VT) és PI3K β ^{-/-} csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük a RANKL adásától számított jelzett időpontokig, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A grafikonon átlag+SEM látható; ****, $p < 0,0004$; $n = 6$.

A vad típusú és PI3K β ^{-/-} egerekből származó csontvelői prekurzorokat 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettünk 3 napig. A 15. ábrán A paneljén látható, hogy a kialakult vad típusú oszteoklasztok nagy részében összefüggő F-aktin gyűrű futott végig a sejtek széle mentén, és a fibrilláris aktin alig volt jelen a

citoplazmában. Ezzel szemben a $PI3K\beta^{-/-}$ oszteoklaszt kultúrákban található kisebb átmérőjű multinukleáris sejtekben az aktinyűrűk kialakulása nem jött létre, az F-aktin homogéneen dúsult a citoplazmában (15. ábra A panel). Megszámolva, hogy 100 darab oszteoklasztból hány képez aktinyűrűt, szignifikáns különbséget találtunk a $PI3K\beta^{-/-}$ és a vad típusú sejtek között ($p = 7,8 \times 10^{-8}$; $n = 6$) (15. ábra A panel).

A citoskeletális átrendeződések időbeli kinetikájának nyomonkövetéséhez csontvelői sejteket izoláltunk Lifact-EGFP-t expresszáló transzgenikus egerekből, majd azokat M-CSF és RANKL citokinek jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltattuk. A Lifact-EGFP specifikusan a fibrilláris aktinhoz kötődik, így lehetőséget ad a sejtekben a citoskeletális változások dinamikájának megfigyelésére. A transzgént hordozó egyedeket $PI3K\beta^{+/-}$ állatokkal keresztezve olyan egereket hoztunk létre, amelyekben a Lifact-EGFP jelen volt, míg a $PI3K\beta$ katalitikus alegysége hiányzott belőlük.

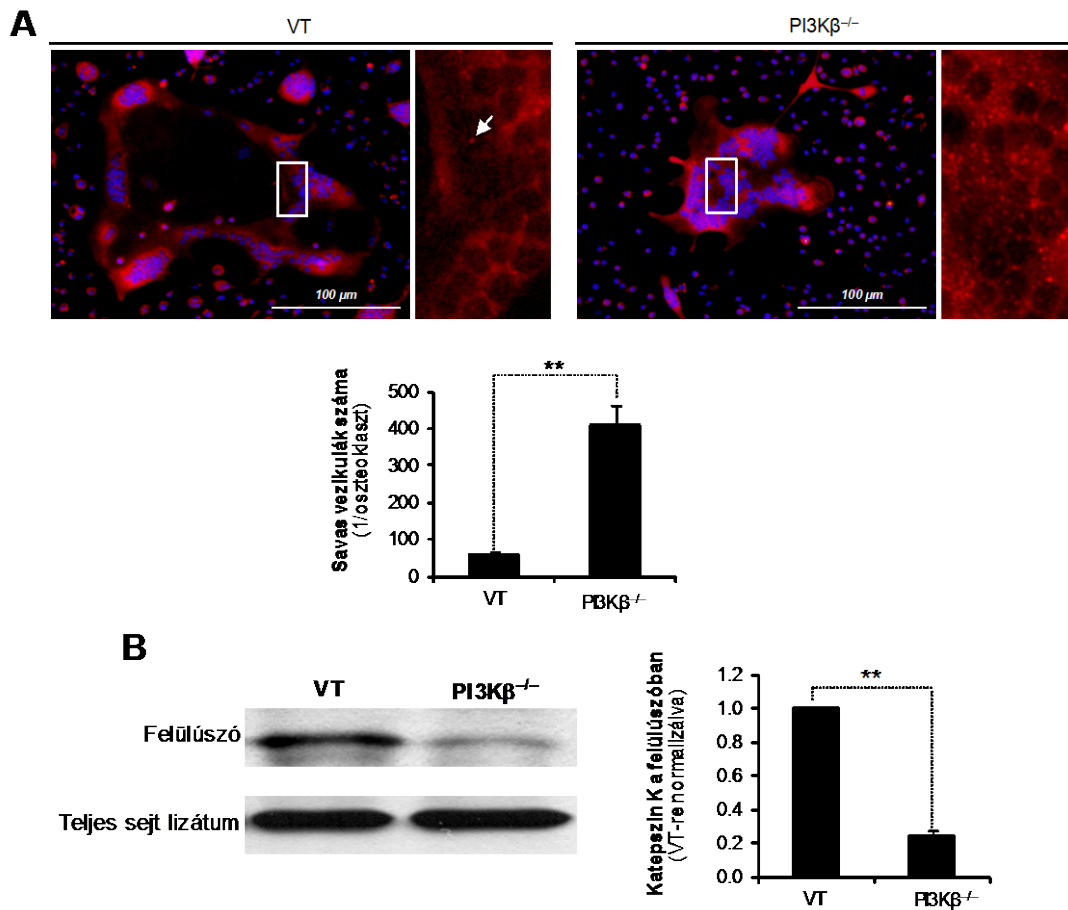
A 15. ábra B paneljének reprezentatív felvételei mutatják, hogy a Lifact-EGFP-t kifejező vad típusú csontvelői eredetű mieloid prekurzorok a RANKL kezelést követő második naptól kezdve létrehozták az aktinyűrűket, amelyek egészen az oszteoklasztok apoptózisáig fennmaradtak. Ezzel szemben a Lifact-EGFP-t kifejező $PI3K\beta^{-/-}$ csontvelői előalakok képesek voltak ugyan sokmagvú óriássejteké differenciálódni, de egyáltalán nem tudtak aktinyűrűket kialakítani (15. ábra B panel).

A csontreszorpció során az oszteoklaszt polarizálódik, majd a lizoszómális eredetű savas vezikulák ürítésre kerülnek a sejtből a hullámos határ területén (122). Irodalmi adatok alapján a PI3-kinázok szerepe felvetődött ebben a folyamatban (120, 123), ezért megvizsgáltuk a $PI3K\beta^{-/-}$ mutáció hatását a savas vezikulák ürítésére.

Vad típusú és $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettünk 3 napig, majd megfestettük őket LysoTracker Red-del. A 16. ábra A paneljén látható, hogy a vad típusú érett oszteoklasztok kevés savas vezikulát tartalmaztak, azok nagyrésze ürülni tudott a sejtekből. Ezzel ellentétben, a $PI3K\beta^{-/-}$ oszteoklasztok citoplazmája tele volt savas vezikulumokkal, ami arra utalt, hogy a $PI3K\beta^{-/-}$ sejtekben a vezikulák ürítése károsodott ($p = 0,0021$; $n = 5$) (16. ábra A panel).

A savas vezikulák egyik legfontosabb összetevője a katepszin K mátrixbontó enzim. Ezért a következőkben megvizsgáltuk az ürített katepszin K mennyiségét a vad

típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ oszteoklaszt tenyésztetek felülűszójában. A 16. ábra B panelje mutatja, hogy az ürített katepszin K mennyisége a $PI3K\beta^{-/-}$ kultúrák felülűszójában jelentősen csökkent a vad típushoz képest ($p = 0,0064$; $n = 3$).

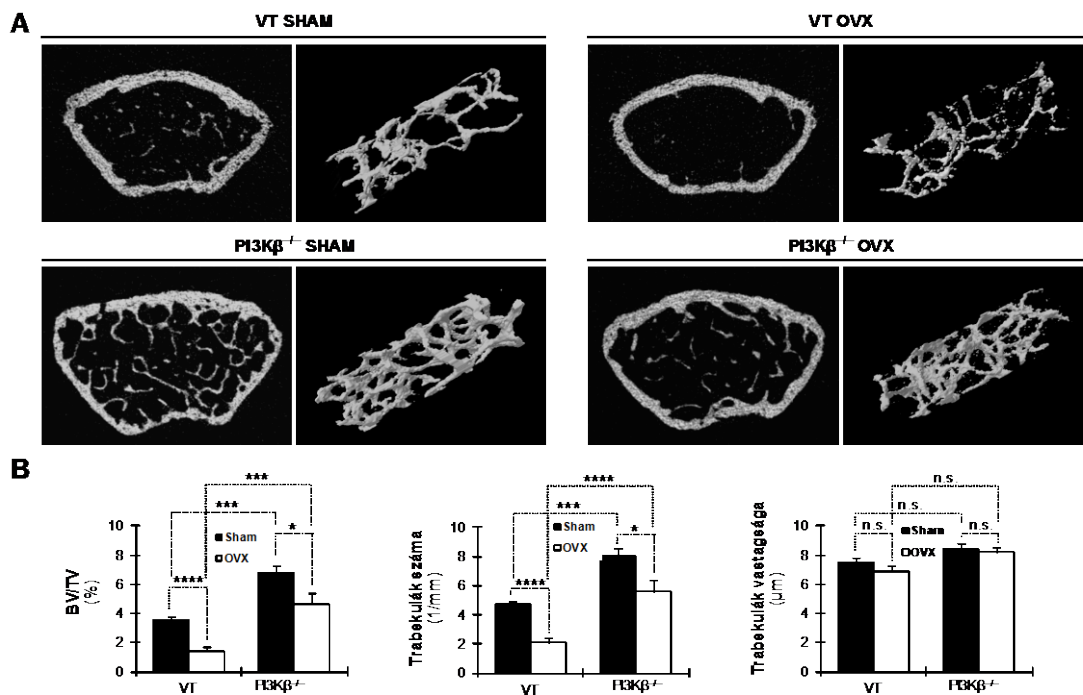


16. ábra. A $PI3K\beta$ genetikai hiányában a katepszin K-ürítése károsodik. **A)** A vad típusú (VT) és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerek csontvelői sejtjeit 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük 3 napig, majd megfestettük a sejteket LysoTracker Red-del és DAPI-val. A mikroszkópos képek alatt a savas vezikula ürítési vizsgálatok kvantifikációja látható. A nyíl egy savas vezikulát mutat. **B)** Az oszteoklasztok felülűszójából és a teljes sejt lizátumokból Western blot technikával meghatároztuk a katepszin K mennyiségét, majd a blottokat denzitometráltuk. A grafikonokon átlag+SEM látható; **, $p < 0,01$; $n = 3$.

Összefoglalva eredményeinket, a $PI3K\beta$ genetikai hiánya az oszteoklasztokban károsodott aktíngyűrű-képzést, és csökkent katepszin K-ürítést eredményezett.

6.1.8. A PI3K β szerepe az ovariektómia-indukálta csontvesztésben

A nyugalmi csontátépülés szabályozása mellett az oszteoklasztnak fontos szerepük van a kóros csontbontás (például posztmenopauzális oszteoporózis) kialakulásában is (124). Tekintve, hogy a PI3K β -t fontosnak találtuk a nyugalmi csontanyagcserében, megvizsgáltuk, hogy a fehérje hiányában hogyan alakul a patológiás csontvesztés. A posztmenopauzális oszteoporózis modellezésére sebészi ovariektómia-indukálta csontvesztést (OVX) hoztunk létre a kísérleti állatokban.



17. ábra. A PI3K β hiányában az ovariektómia-indukálta csontvesztés kialakulása gátlódik. **A**) A vad típusú (VT) és a PI3K $\beta^{-/-}$ nőstény egerek femurjai disztális metafíziseinek reprezentatív keresztmetszeti képei és 3D rekonstrukciója az ovariektómiát (OVX) vagy áloperációt (SHAM) követően 6 héttel. **B**) A kvantitatív mikro-CT vizsgálat eredményei. BV/TV: bone volume/tissue volume; a grafikonokon átlag+SEM értékek láthatók; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,002$; ****, $p < 0,0004$; n.s.: nem szignifikáns; $n = 6$.

A vad típusú és a PI3K $\beta^{-/-}$ nőstény egerek petefészkeit 8 hetes korukban eltávolítottuk, majd 6 hét elteltével mikro-CT vizsgálattal kiértékeljük az állatok disztális femurjának metafízisét. Kontrollként olyan áloperált egereket használtunk, amelyekben a műtéti feltárást elvégeztük, de nem távolítottuk el az ováriumokat (SHAM). A 17. ábra A paneljén a combcsontok azonos magasságban készített reprezentatív keresztmetszeti képei, és a trabekuláris csont 3D rekonstrukciója látható.

A PI3K $\beta^{-/-}$ áloperált egerekben a trabekuláris csontállomány jelentősen megnőtt a vad típusú SHAM műtöttekhez képest (17. ábra A és B panelek). A vad típusú egerekben az ovariectomia hatására jelentős mértékben csökkent a trabekuláris csont mennyisége és a relatív csonttérfogat (BV/TV) (17. ábra A és B panelek). A sebészi petefészekeltávolítás a PI3K $\beta^{-/-}$ egerekben is kiváltott csontvesztést, azonban a BV/TV relatív csökkenése körülbelül fele volt a vad típusban tapasztalttnak (60 % vad típus vs. 31 % PI3K $\beta^{-/-}$) (17. ábra B panel).

A BV/TV értékekkel azonos irányú változást láttunk a trabekulák számában, míg a trabekulák vastagságában nem tapasztaltunk eltérést (17. ábra B panel). Fontos megjegyezni, hogy az áloperált vad típusú és PI3K $\beta^{-/-}$ egerek BV/TV értékei közötti különbség sokkal kifejezettebbé vált az ovariectomia hatására (1,9-szeres SHAM vs. 3,3-szoros OVX különbség) (17. ábra B panel).

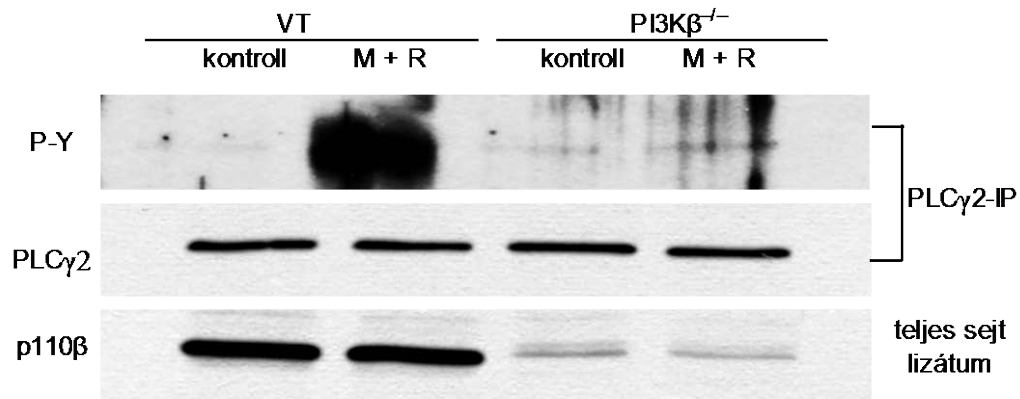
A genotípus és a sebészi beavatkozás közötti interakció (azaz a genotípus hatása az ovariectomia-indukálta csontvesztésre) a szignifikancia-szint határán volt a BV/TV értékeknél ($p = 0,051$; $n = 6$), a trabekulák számának esetében pedig statisztikailag szignifikánssá is vált ($p = 0,047$; $n = 6$).

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az ovariectomia hatására létrejött csontvesztés fele akkora volt a PI3K $\beta^{-/-}$ egerekben, mint a vad típusúakban, amely eredmény felveti a PI3K β gátlásának lehetőségét a posztmenopauzális oszteoporózis terápiájában.

6.1.9. A PI3K β hiányában károsodik a PLC γ 2 aktivációja

A PI3K β genetikai hiányában a PLC γ 2 fehérjének – amelyről korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy az oszteoklasztok fejlődésében és a nyugalmi csontanyagcserében fontos szerepet játszik - jellegzetesen károsodott az aktivációja (18. ábra). Míg a vad típusú nem stimulált oszteoklasztokban elenyésző mennyiségű foszforilált PLC γ 2-t detektáltunk, addig az M-CSF és RANKL adásának hatására az adhézióban lévő sejtekben jelentősen megnőtt a foszforilált PLC γ 2 mennyisége (18. ábra). Ez a PLC γ 2 foszforiláció fokozódás teljesen hiányzott a PI3K $\beta^{-/-}$ oszteoklasztokban (18. ábra) ($n = 3$). Az értekezésem második részében bemutatásra

kerülő kísérletekben azt vizsgáltam meg, hogy a PLC γ 2 milyen mechanizmussal szabályozza az oszteoklasztok fejlődését, és a nyugalmi csontanyagcserét.



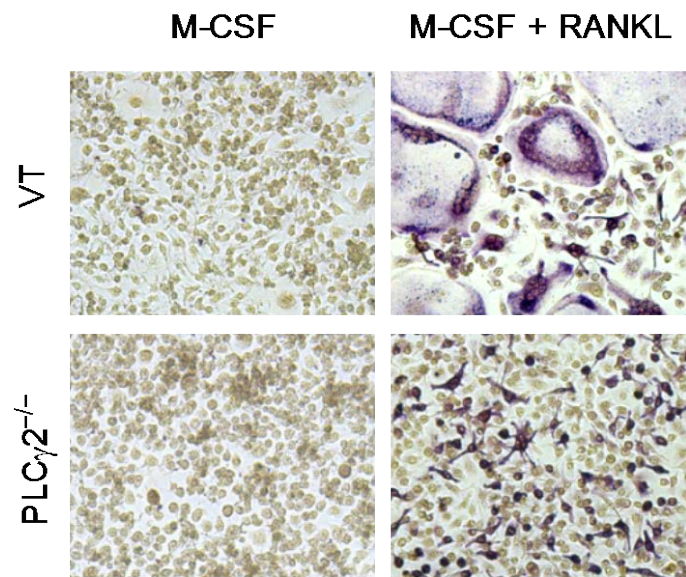
18. ábra. A PI3K β genetikai hiányában károsodik a PLC γ 2 foszforilációja. A vad típusú és a PI3K $\beta^{-/-}$ egerek csontvelői sejtjeiből érett oszteoklasztokat differenciáltattunk, majd a sejteket 10 percig 50 ng/ml M-CSF (M) és 50 ng/ml RANKL (R) jelenlétében stimuláltuk. A kultúrákból készített teljes sejt lizátumokból és PLC γ 2-immunprecipitátumokból (IP) Western blot technikával hívtuk elő a fehérjéket. Reprezentatív blot; n = 3.

6.2. A PLC γ 2 szerepe az oszteoklasztok fejlődésében

A szintén hemopoetikus eredetű neutrofil granulociták jelátvitelében tett korábbi megfigyelésünk tovább erősítette az oszteoklasztokban a PLC γ 2 lehetséges szerepét (105). Ezért Dr. Kertész Zsuzsanna kollégámmal megvizsgáltuk, hogy a PLC γ 2 részt vesz-e az oszteoklasztok jelátvitelében. Ezeket az eredményeinket a *European Journal of Clinical Investigation* című folyóiratban közzöltük. Ezekben a kísérletekben kimutattuk, hogy a foszfolipáz γ 2 (PLC γ 2) elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és az *in vivo* csontanyagcseréhez. A PLC γ 2 szerepét az oszteoklasztokban tőlünk függetlenül két másik munkacsoport is publikálta (106, 107). Azt azonban eddig egyik munkacsoportnak sem sikerült egyértelműen tisztázni, hogy a PLC γ 2 milyen mechanizmussal játszik szerepet az oszteoklasztok fejlődésében. A doktori értekezésem második részében bemutatott kísérletekben ezért a PLC γ 2 hatásmechanizmusát vizsgáltam.

Ahogy az a 19. ábrán látható, 20 ng/ml M-CSF és 20 ng/ml RANKL jelenlétében a vad típusú kultúrában létrejöttek a TRAP-pozitív (püspöklilára festődő), sokmagvú

óriássejtek, míg a $PLC\gamma 2^{-/-}$ kultúrából teljesen hiányoztak az oszteoklasztok. Amennyiben a csontvelői sejteket 20 ng/ml M-CSF jelenlétében tenyésztettük, RANKL hozzáadása nélkül, a kialakult makrofágok mononukleárisak és TRAP-negatívak voltak (19. ábra). A csak M-CSF-fel kezelt vad típusú és $PLC\gamma 2^{-/-}$ kultúrák képe morfológiailag megegyezett (19. ábra). A RANKL-dal is kezelt $PLC\gamma 2^{-/-}$ kultúra képe jellegzetesen eltért az M-CSF-et kapott (makrofág) tenyészetektől, a sejtek jelentős része püspöklilára festődött, azaz TRAP-pozitív volt (19. ábra).



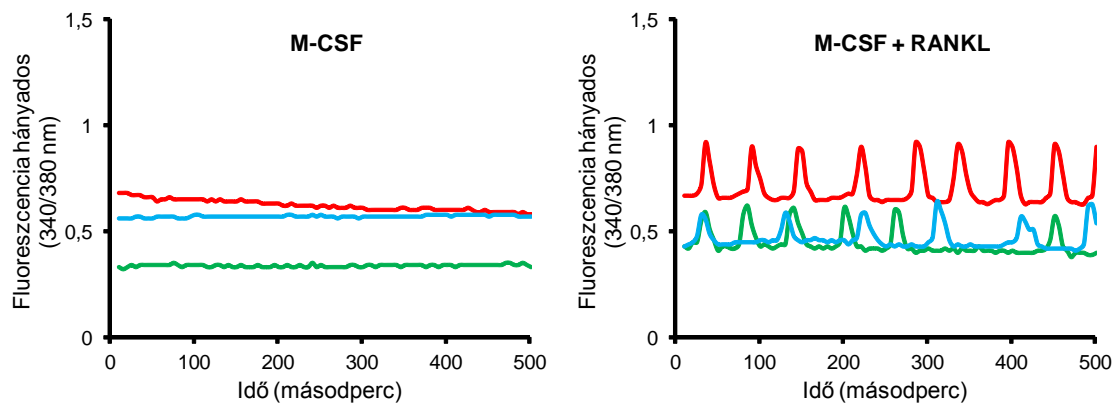
19. ábra. A $PLC\gamma 2$ hiányában az oszteoklasztok nem alakulnak ki. A vad típusú (VT) és a $PLC\gamma 2^{-/-}$ egerek csontvelői sejteit 20 ng/ml M-CSF (makrofágok), vagy 20 ng/ml M-CSF és 20 ng/ml RANKL (oszteoklasztok) jelenlétében tenyésztettük 4 napig, majd TRAP festést végeztünk a kultúrákon. A fotók reprezentatív képek; $n = 3$.

Ezek alapján elmondhatjuk, – és ezt qPCR-ral is megerősítettük – hogy a $PLC\gamma 2$ genetikai hiánya nem okozza az oszteoklaszt-specifikus gének kifejeződésének károsodását, és – szemben a két másik munkacsoport eredményeivel (106, 107) – véleményünk szerint feltehetően nem ez áll a $PLC\gamma 2^{-/-}$ kultúrákban megfigyelt oszteoklaszt- fejlődési zavar hátterében.

6.2.1. A $PLC\gamma 2$ szerepe a kalcium-oszcillációk kialakulásában

A PLC enzimek által létrehozott inozitol (1,4,5)-triszfoszfát kötődése a receptorához kalcium-jel kialakulásához vezet a sejtben. Az oszteoklaszt-fejlődés során

pedig az intracelluláris kalcium-koncentráció változásai tehetők felelőssé az NFATc1 transzkripciós faktor aktivációjáért (60). Koga és munkatársai felvetették, hogy az NFATc1 kalciumfüggő aktiválódását valamelyik PLC γ izoforma szabályozhatja (74). Ezért genetikai megközelítéssel megvizsgáltuk a PLC γ 2 szerepét a kalcium-oszcillációk kialakulásában. A következőkben bemutatandó eredményeket még nem publikáltuk.

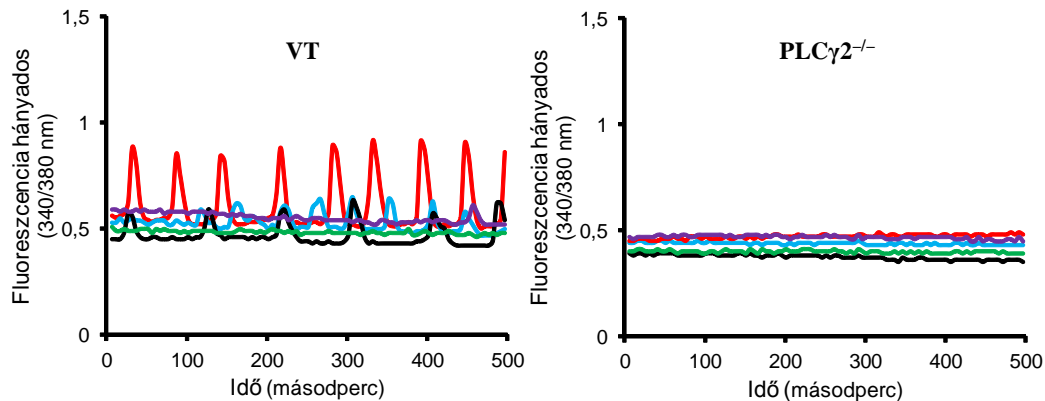


20. ábra. A RANKL adásának hatására kalcium-oszcillációk alakulnak ki a sejtekben. Vad típusú egerek csontvelői sejtjeit 50 ng/ml M-CSF (makrofágok) vagy 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében (oszteoklasztok) tenyésztettük, majd 72 óra elteltével a sejteket Fura-2-AM jelenlétében inkubáltuk, és kalcium-szintet mértünk rajtuk. A különböző színekkel ellátott vonalak különböző sejteket jelölnek. Reprezentatív grafikonok; $n = 5$.

6.2.2. A RANKL adása kalcium-oszcillációkat indukál

Az oszteoklasztogenezis során a csontvelői eredetű prekurzorokban RANKL adásának hatására jellegzetes változások jönnek létre az intracelluláris kalcium-szintekben. Amennyiben a vad típusú egerekből származó csontvelői prekurzorokat M-CSF előkezelés után 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük, a RANKL adása után a citoszól kalcium-koncentrációjában periodikus változásokat, úgynevezett kalcium-oszcillációkat figyeltünk meg (20. ábra). Az oszcillációk 24 órás RANKL kezelést követően jelentek meg először, és maximális amplitúdót mutattak 72 óránál ($n = 5$). A tenyészetekben a kalcium-oszcillációkat jellegzetesen nem a már kialakult sokmagvú óriássejtek, hanem a még feltehetően fúzió előtt álló mononukleáris

vagy maximum két sejtmaggal rendelkező preoszteoklasztok mutatták. Az érett oszteoklasztok egyáltalán nem vagy alig hoztak létre kalcium-oszcillációkat. Ha a sejteket 50 ng/ml M-CSF jelenlétében tenyésztettük, RANKL adása nélkül, a kalcium-oszcillációk nem alakultak ki (20. ábra).



21. ábra. A *PLCγ2* genetikai hiányában a kalcium-oszcillációk nem alakulnak ki. Vad típusú és *PLCγ2^{-/-}* egerek csontvelői sejteit 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük, majd 72 óra elteltével a sejteket Fura-2-vel töltöttük, és kalciummérést végeztünk rajtuk. A különböző színekkel ellátott vonalak különböző sejteket jelölnek. Reprezentatív grafikonok; $n = 8$.

6.2.3. A *PLCγ2* hiányában nem jön létre kalcium-oszcilláció

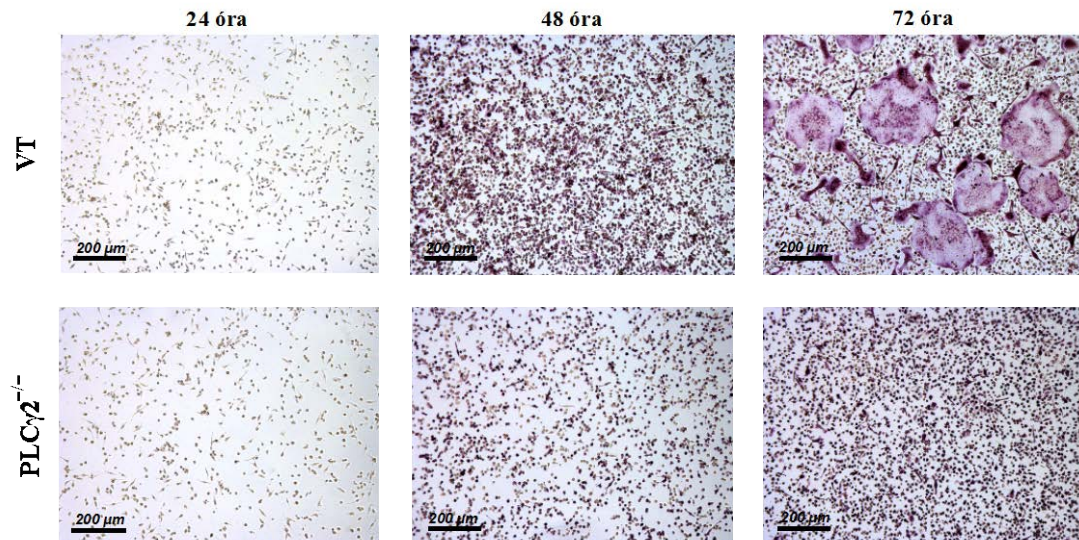
Miután a RANKL adás hatására kialakuló kalcium-oszcillációkat megbízhatóan tudtuk mérni, kíváncsiak voltunk arra, hogy az intracelluláris kalcium-koncentráció változásai hogyan alakulnak a *PLCγ2* genetikai hiányában. A vad típusú és a *PLCγ2^{-/-}* egerek hosszú csöves csontjaiból preparált csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük, majd 72 órával a RANKL kezelés után kalciummérést végeztünk rajtuk. A vad típusú sejtekben - ahogy azt az előzőekben is bemutattam - RANKL hatására létrejöttek a jellegzetes kalcium-hullámok (21. ábra). Ezzel szemben a *PLCγ2^{-/-}* egerek csontvelői eredetű sejtjei 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztve egyáltalán nem voltak képesek létrehozni a kalcium-oszcillációkat (21. ábra).

Megjegyzendő, hogy nem mindegyik vad típusú sejt mutatott Ca^{2+} -oszcillációkat, 258 darab sejtet összesen lemérve a sejtek 12% hozta létre az oszcillációkat ($n = 8$). Ezzel szemben, a $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ kultúrákban lemért 207 darab génhiányos sejtből egyet sem tudtunk találni, ami oszcillált volna ($n = 8$). Bár az egy időben vizsgált vad típusú preosteoklasztoknak csak kb. 12%-a mutatta a jellegzetes kalcium-oszcillációkat, fontos megjegyezni, hogy ez csak az 500 másodperces mérési időtartamra vonatkozott. Hosszabb távon megfigyelve a sejteket, addig nem oszcilláló sejtek is elkezdtek mutatni a kalcium-hullámokat, illetve a már oszcilláló sejtek néhány 10 perc elteltével abbahagyták azokat. Ezek alapján azt gondoljuk, hogy a vad típusú sejtek jóval nagyobb hányada mutat az oszteoklasztogenezis során valamikor kalcium-oszcillációkat. A $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ kultúrákat hosszabb távon megfigyelve sem tudtunk oszcilláló sejteket találni.

6.2.4. A $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ preosteoklasztok nem mutatnak Ca^{2+} -oszcillációkat

Kimutattuk tehát, hogy a $\text{PLC}\gamma 2$ genetikai hiányában az *in vitro* oszteoklaszt tenyészetekben károsodik a kalcium-oszcillációk kialakulása. A fehérjének a kalcium-koncentráció változásainak háttérében betöltött pontos szerepének a tisztázása azonban további vizsgálatokat igényelt. Elképzelhető lett volna ugyanis, hogy a $\text{PLC}\gamma 2$ indirekt módon szabályozza a kalcium-hullámok kialakulását, amennyiben a fehérje hiánya az oszteoklasztogenezis egy korai lépését gátolja, ezáltal nem engedi lezajlani az oszcillációk létrejöttéhez szükséges biokémiai változásokat a sejtekben. Ezt támaszthatta volna alá a vad típusú és a $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ kultúrák között a 72 órás RANKL kezelést követően megfigyelt jelentős morfológiai különbség is (22. ábra). Ahogy azt az előzőekben is bemutattam, az 50 ng/ml M-CSF és RANKL citokineket 3 napon át adva a sejteknek a vad típusú kultúrákban létrejöttek a jellegzetes, püspöklilára festődő (TRAP-pozitív) sokmagvú óriássejtek, míg az oszteoklasztok teljesen hiányoztak a $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ tenyészetekben (22. ábra). Ezt látva szükségesnek éreztük, hogy az oszteoklasztogenezis korábbi fázisaiban is megvizsgáljuk a kalcium-oszcillációk létrejöttét. Ha a csontvelői sejteket 48 órán át tenyésztettük 50 ng/ml M-CSF és RANKL jelenlétében, a látott különbségek jelentősen csökkentek a vad típusú és a $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ kultúrák között, míg 24 órás M-CSF és RANKL kezelést alkalmazva, nem

tudtuk elkülöníteni morfológiailag a vad típusú és a $PLC\gamma 2^{-/-}$ tenyészeteket, azok teljesen egyformán néztek ki (22. ábra) (n = 10).

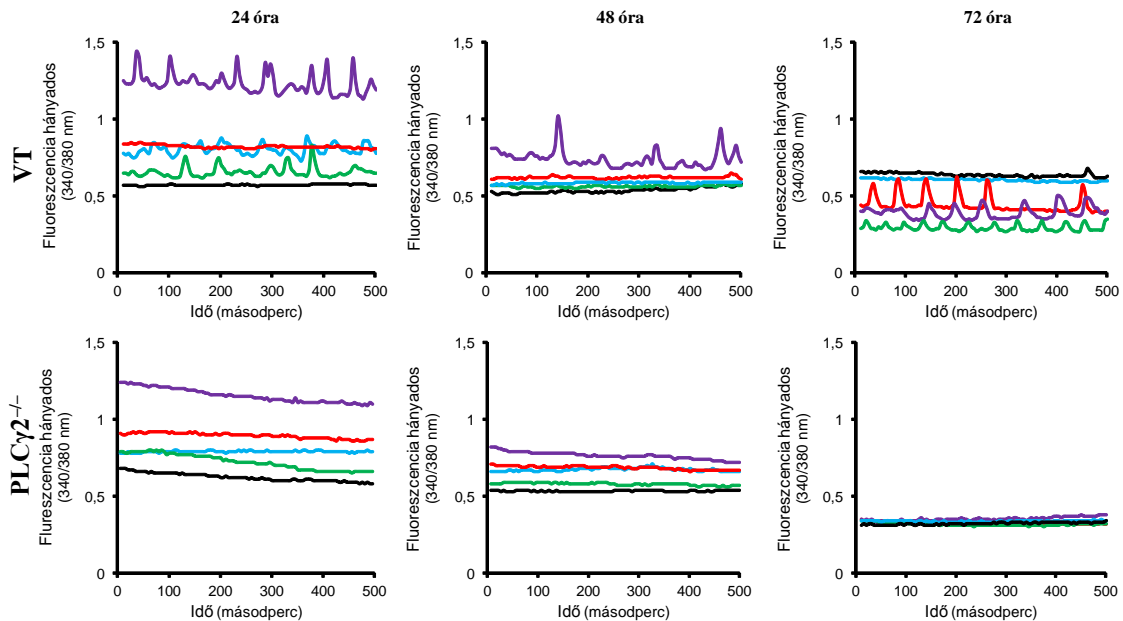


22. ábra. A vad típusú és a $PLC\gamma 2^{-/-}$ oszteoklaszt tenyészetek morfológiai vizsgálata. A vad típusú és a $PLC\gamma 2^{-/-}$ egerek csontvelői sejteit 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük 24, 48 és 72 órán át, majd a sejteket fixáltuk, és TRAP-festést végeztünk rajtuk. Az ábrák reprezentatív képek; n = 10.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy hogyan alakulnak a kalcium szintek a 24 és a 48 órán át RANKL-dal kezelt vad típusú és $PLC\gamma 2^{-/-}$ preoszteoklasztokban. Amennyiben a vad típusú csontvelői sejteket 48 órán át 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük, és elvégeztük a kalciummérést, a tipikus kalcium-oszcillációk ugyanúgy kialakultak a sejtekben, mint 72 óránál (23. ábra). Ha a RANKL kezelés időtartamát tovább csökkentettük egészen 24 órára, a kalcium-oszcillációk továbbra is megtartottak voltak a vad típusú kultúrákban (23. ábra). A 24 és a 48 órás vad típusú mintákban a kalcium-oszcillációt mutató sejtek aránya kismértékben elmaradt a 72 órás RANKL kezelést követően megfigyelt 12%-hoz képest, és körülbelül 10%-nak adódott. Ezzel szemben, a $PLC\gamma 2^{-/-}$ egerek csontvelői sejtjei sem 48, sem 24 órás RANKL kezelésnél nem mutattak Ca^{2+} -oszcillációkat (23. ábra) (n = 3).

Tehát, a $PLC\gamma 2$ genetikai hiányában a csontvelői oszteoklaszt előalakok egyáltalán nem voltak képesek kalcium-oszcillációkat létrehozni az oszteoklasztogenezis egyik vizsgált időpontjában sem.

Szerettük volna azonban még direkter módon a fehérjéhez kötni a hatást. Ehhez módszerül a PLC γ 2-nek a retrovírus-alapú újrakifejlesztését választottuk a génihiányos kultúrákba, majd ennek a Ca²⁺-oszcillációkra kifejtett hatását vizsgáltuk meg.

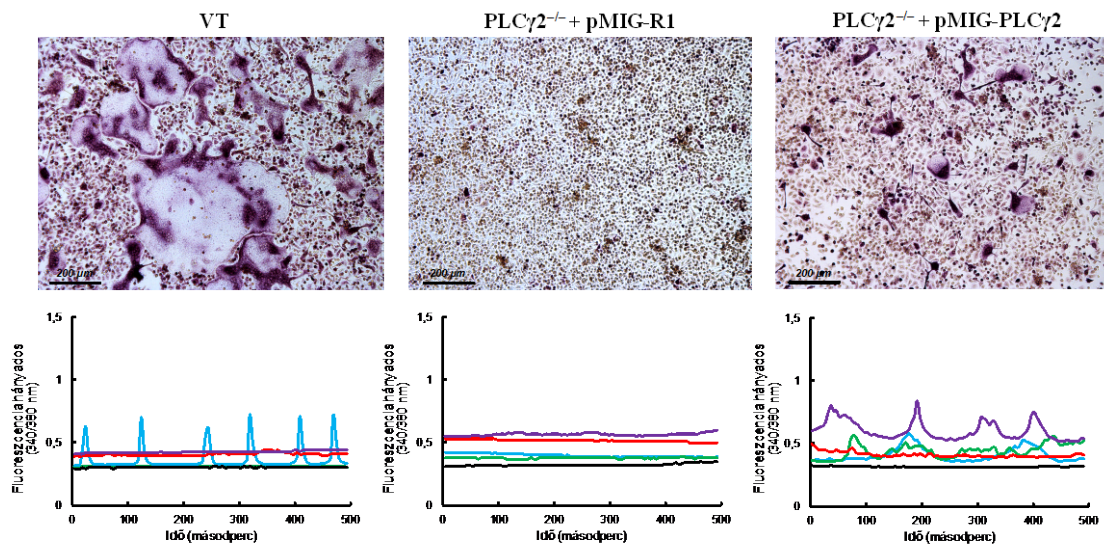


23. ábra. A PLC γ 2 hiányában a kalcium-oszcillációk az oszteoklaszt fejlődés során egyáltalán nem jönnek létre. A vad típusú és a PLC γ 2^{-/-} egerek csontvelői sejtjeit 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük 24, 48 és 72 óráig, majd a sejteket Fura-2-vel töltöttük, és kalciummérést végeztünk rajtuk. A különböző színekkel ellátott vonalak különböző sejteket jelölnek. Reprezentatív grafikonok; n = 3.

6.2.5. A PLC γ 2 újrakifejlesztése helyreállítja a kalcium-oszcillációkat

A PLC γ 2 fehérje reexpressziójához bicisztronikus, egér-össejt vírus-alapú (MSCV), a belső riboszóma belépési helytől (IRES) disztálisan GFP-t is kifejező retrovirális vektort használtunk (pMIG-R1). A PLC γ 2 cDNS-ét a pMIG-R1-ba klónoztam, és az így létrehozott retrovirális vektorral (pMIG-PLC γ 2) PLC γ 2^{-/-} embrionális májsejteket transzdukáltunk. Kontrollként üres vektorral (pMIG-R1) infektált PLC γ 2^{-/-} és nem fertőzött vad típusú májsejteket használtunk. Tekintve, hogy egér esetében az intrauterin életben a vérképzés egyik fő helye a máj, az innen származó őssejtek a megfelelő citokinkörnyezet hatására oszteoklaszttá differenciálthatóak.

A májsejtek használatára azért volt szükség a kísérletekben, mert a retrovirális vektoraink a hemopoetikus őssejtekben tudták csak biztosítani az exogén fehérjék optimális expresszióját. A májsejteket a transzdukció után M-CSF és RANKL jelenlétében tenyésztettük, majd TRAP-festést és kalciummérést végeztünk a kultúrákon (24. ábra).



24. ábra. A PLCγ2 újrakifejezése helyreállítja a PLCγ2^{-/-} sejtek kalcium-oszcillációit. A vad típusú nem transzdukált, az üres vektorral (MigR1) infektált és a MigPLCγ2 vektorral fertőzött PLCγ2^{-/-} embrionális májsejtjeiket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztettük 72 óráig, majd TRAP festést és kalciummérést végeztünk. A különböző színekkel ellátott vonalak különböző sejteket jelölnek. Reprezentatív képek és grafikonok; n = 3.

A vad típusú embrionális májsejtek 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében tenyésztve, 72 óra elteltével létrehozták a jellegzetesen püspöklilára festődő, sokmagvú óriássejteket a TRAP-festett kultúrákban, valamint kalcium-oszcillációkat mutattak (24. ábra). Ezzel szemben a hasonló körülmények között tenyésztett, és üres vektorral (pMIG-R1) transzdukált PLCγ2^{-/-} embrionális májsejtek nem tudtak oszteoklaszttá differenciálódni, és az intracelluláris kalcium-szintjeik meglehetősen stabilnak mutatkoztak (24. ábra). Amennyiben a PLCγ2-t kifejező pMIG-PLCγ2 retrovirális vektorral fertőztük a PLCγ2^{-/-} embrionális májsejteket, kialakultak a kultúrában a TRAP-pozitív sokmagvú sejtek, amelyek újra képessé váltak a Ca²⁺-

oszcillációk létrehozására (24. ábra). A PLC γ 2 reexpressziója után a PLC γ 2 génhiányos sejtek 3-4%-a mutatott kalcium-oszcillációkat, az oszteoklasztok száma és mérete pedig elmaradt a vad típusban megfigyeltektől. Ezeket a különbségeket az endogén PLC γ 2-höz képest alacsonyabb exogén fehérje szintek és a körülbelül 50%-os transzdukciós hatékonyság magyarázhatták (n = 3).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a PLC γ 2 hatásmechanizmusának vizsgálatával kapcsolatban sikerült kimutatnunk, hogy a PLC γ 2 fehérje elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése során a kalcium-oszcillációk kialakulásához. A PLC γ 2^{-/-} preoszteoklasztok egyáltalán nem tudtak oszcillációkat létrehozni, míg a PLC γ 2 retrovirális rekonstitúciója a PLC γ 2^{-/-} embrionális májsejtekbe helyreállította a kalcium-hullámokat, és az oszteoklaszt-differenciációt.

7. Megbeszélés

Ph.D. munkám során az oszteoklasztok fejlődésében és működésében szerepet játszó intracelluláris jelátviteli folyamatokat vizsgáltam génhiányos egerek segítségével. Az eredmények részben bemutatott kísérleteimet két fő témakör köré csoportosítottam. Értekezésem első felében megvizsgáltam a PI3K β fehérje szerepét az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében, valamint az *in vivo* csontanyagcserében nyugalmi és kóros körülmények között. Vizsgáltam továbbá a PI3K β szerepét az oszteoklasztok túlélésében, aktinyűrü-képzésében, katepszin K-ürítésében, és az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának szabályozásában. Megvizsgáltam továbbá a PI3K β farmakológiai gátlásának hatását az egerek hosszú csöves csontjából származó csontvelői eredetű mieloid előalakokból, valamint egészséges önkéntesek véréből izolált monocitákból differenciáltatott oszteoklaszt kultúrákon. Az ezekkel kapcsolatos eredményeimről az *Arthritis & Rheumatology* című folyóiratban megjelent elsőszerzős közleményemben számoltam be. Dolgozatom második felében a PLC γ 2 fehérje szerepét vizsgáltam az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében, valamint a fehérje hiányának hatását tanulmányoztam az oszteoklasztok kalcium-oszcillációinak kialakulásában. Az ezekkel kapcsolatos eredményekről egyrészt a *European Journal of Clinical Investigation* című folyóiratban megjelent társszerzős közleményemben számoltam be, másik részét az eredményeknek még nem publikáltuk.

Régóta ismert kísérletes megfigyelés volt, hogy az általános PI3K gátlószer, a wortmannin és az LY294002 hatására az oszteoklasztok *in vitro* fejlődése és működése súlyosan károsodik (95-97). Arról azonban kísérleteink kezdetén nem volt adat, hogy a különböző PI3K izoformák közül melyik/melyek közvetítik ezt a hatást. A PI3K β szerepe az oszteoklasztokban akkor merült fel, amikor génexpressziós méréseinkben azt találtuk, hogy az *in vitro* oszteoklasztogenezis során a vizsgált izoformák közül a PI3K β katalitikus alegységét kódoló gén expressziója fokozódott a legnagyobb mértékben (8. ábra). Saját kísérleteinkkel párhuzamosan egy japán munkacsoport is hasonló megfigyelésre jutott (120). Ezek alapján részletesen megvizsgáltuk, hogy a PI3K β szükséges-e az *in vitro* oszteoklaszt fejlődéshez és működéshez. A PI3K β farmakológiai gátlása (9. ábra) és genetikai hiánya (12. ábra) jelentősen csökkentette az oszteoklasztok számát és azok csontbontó képességét mind a humán, mind az egér kultúrákban.

Érdekes módon az oszteoklasztok száma eltérő mértékben csökkent a különböző kísérletekben (9. ábra A és C panelek, 12. ábra A panel), és csak mérsékelten változott az oszteoblaszt-oszteoklaszt kokultúrák esetében (12. ábra B panel). A PI3K β hiányában azonban az igazán súlyos károsodást az oszteoklasztok működésében találtuk (9. és 11-12. ábrák).

A PI3K β ^{-/-} egerek szignifikánsan nagyobb csonttömeggel rendelkeztek vad típusú társaikhoz képest, az oszteoklasztjaik pedig kisebb felületen érintkeztek a csontfelszínnel, és alattuk a reszorpciós üregek mélysége jelentősen csökkent (10. és 11. ábra). Ezek alapján felmerült a PI3K β szerepe az oszteoklaszt-mediálta csontbontás kialakulásában. Érdeemes összevetni a PI3K β és a PLC γ 2 genetikai hiányában kapott eredményeinket. Míg a PI3K β ^{-/-} és a PLC γ 2^{-/-} egerekben hasonló mértékben fokozódott a mineralizált csontállomány mennyisége, addig az *in vitro* tenyészetekben a PLC γ 2 hiányában egyáltalán nem jöttek létre oszteoklasztok, a PI3K β hiányában pedig csökkent számban ugyan, de kialakultak a sokmagvú sejtek. Ennek függvényében valószínűsíthető, hogy a PLC γ 2 inkább az oszteoklasztok fejlődését szabályozza, a PI3K β jelenléte pedig a megfelelő működésükhöz szükséges.

A PI3K β hatásmechanizmusának vizsgálata során azt találtuk, hogy a fehérje hiánya az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját (13. ábra) és a sejtek túlélését (14. ábra) nem befolyásolja. Ezzel szemben a PI3K β ^{-/-} oszteoklasztok aktinyűrű-képzése (15. ábra), lizoszóma-eredetű savas vezikula-leadása és katepszin K-ürítése súlyosan károsodott (16. ábra), ami megmagyarázza az oszteoklasztok *in vitro* működésének megfigyelt zavarát.

A nyugalmi csontanyagcserében betöltött szerepe mellett, a PI3K β fontosnak bizonyult a kóros csontbontás kialakulásában is. A PI3K β ^{-/-} egerek részlegesen védettek voltak a sebészi ovariectomia-indukálta csontvesztéstől (17. ábra). Mindkét genotípusban létrejött a csontvesztés a petefészek-eltávolítást követően, azonban a PI3K β ^{-/-} egerekben ennek mértéke körülbelül fele volt a vad típusban tapasztaltnak, aminek következtében a BV/TV értékekben látott kezdeti különbség tovább fokozódott az ovariectomia hatására (17. ábra B panel). Ezzel éles ellentétben vannak a PLC γ 2^{-/-} egereken Dr. Kertész Zsuzsanna kollégám által tett megfigyelések. Míg a PLC γ 2^{-/-} mutáció hasonló mértékű trabekuláris csontállomány növekedést okozott, mint a PI3K β genetikai hiánya, addig a sebészi ovariectomia hatására a PLC γ 2^{-/-} egerek

oszteoklasztjai a vad típust meghaladó mértékben bontották a csontot. A PLC γ 2 és a PI3K β hiányos egerek ovariektómia-indukálta csontvesztése között talált különbség pontos okai számunkra sem ismertek. Egy amerikai munkacsoport a DAP12 és FcR γ lánc kettős génhianyos állatokban - a PLC γ 2 hiányában látottakhoz hasonlóan - a vad típust jelentősen meghaladó mértékű ovariektómia-kiváltotta csontvesztést írt le (125). Véleményük szerint a hosszú csöves csontokban (femur, tibia) az ösztrogénhiány-indukálta trabekuláris csontállomány vesztés ITAM adapter-független módon jöhet létre. Tekintve, hogy a PLC γ 2 aktiválódása a saját laborunk és más munkacsoportok eredményei alapján az ITAM-függő jelpályában történik meg, ez magyarázatot adhat a PLC γ 2 hiányában megfigyelt jelenségre. A PI3K β , ezzel szemben, az oszteoklasztok működésében központosabb szerepet betöltő molekula lehet, és aktiválódása több jelpályában is létrejöhet. Erre utalnak saját munkacsoportunk megfigyelései, miszerint a PI3K β egyik fontos effektora, az AKT 473-as szerinen történő foszforilációja létrejön mind az M-CSF, mind az integrin-ligand függő jelpályában a vad típusú oszteoklasztokban, míg ez a PKB aktiváció teljesen hiányzik a PI3K $\beta^{-/-}$ sejtekben.

Fontos megemlíteni, hogy kísérleteink kezdetén nem állt rendelkezésre adat az egyes PI3K izoformák szerepéről az oszteoklasztokban, azonban vizsgálatainkkal párhuzamosan más munkacsoportok is felvetették a különböző PI3K izoformák szerepét a sejtekben (120, 126, 127). Ezek a munkák azonban nem tudtak egyértelműen meghatározni egy, az oszteoklasztokban domináns szereppel bíró PI3K izoformát. Grey és munkacsoportja farmakológiai eredményekre alapozva írta le a PI3K α szerepét az oszteoklasztok fejlődésében és működésében (126). Kang és munkatársai kimutatták, hogy a PI3K γ genetikai hiányában kis mértékben megnő az egerekben a mineralizált csont mennyisége, és részlegesen károsodik az oszteoklaszt-fejlődés (127). A közelmúltban pedig Shinohara és munkacsoportja írta le, hogy a p85 α és p85 β genetikai hiányában a mineralizált csont mennyiségének növekedése jön létre az egerekben, aminek hátterében az oszteoklasztok károsodott működése áll (120). Ez utóbbi munka azonban nem tudta egyértelműen a PI3K β szerepéhez kötni a megfigyelt oszteoklaszt-működési zavart, tekintve, hogy a p85 regulátoros alegységek a p110 α , a p110 β és a p110 δ katalitikus alegységek bármelyikével képezhetnek heterodimert. Azt, hogy a Class I.A PI3K izoformák (PI3K α , PI3K β és PI3K δ) melyikének hiánya lehet önmagában felelős a közleményben bemutatott fenotípusért, azt ezekből a kísérletekből

nem tudhatjuk meg. Mi úgy gondoljuk, hogy a részletes *in vitro* és *in vivo* vizsgálataink, a humán és egér minták használata, a kombinált farmakológiai és genetikai megközelítés, valamint a PI3K β kifejeződésének az oszteoklasztogenezis során tapasztalt erőteljes fokozódása együttesen kétséget kizáróan azonosítják a PI3K β fehérjét, mint domináns és az oszteoklasztok fejlődéséhez és működéséhez elengedhetetlen PI3K izoformát.

Az irodalmi adatok tükrében feltételezhetjük, hogy mind a négy Class I. PI3K izoforma szerepet játszhat az oszteoklasztogenezis szabályozásában. A negyedik izoforma, a PI3K δ lehetséges szerepét felveti Shinohara és munkatársainak közleménye, illetve saját, nem publikált, a PI3K δ kinase dead mutáns egereken kapott eredményeink. Ennek függvényében könnyen elképzelhető, hogy a különböző Class I. PI3K fehérjék különböző izoforma-specifikus hatásokkal rendelkeznek: például míg a PI3K β az oszteoklasztok citoskeletális átrendeződését és katepszin K-ürítését szabályozza, addig az egyéb izoformák a sejtek fejlődését vagy egyéb funkcióit befolyásolják.

Az egyes sejtípusokban expresszáldó PI3K izoformák azonosítása klinikai szempontból kiemelt jelentőségű, hozzájárulhatnak ugyanis a fejlesztés alatt álló PI3K izoforma-szelektív inhibitorok hatásspektrumának bővítéséhez (82, 128). A gyógyszergyárak részéről tapasztalt érdeklődés a PI3K izoforma-szelektív inhibitorok alkalmazásához vezethet különböző humán megbetegedésekben (81, 83, 84, 129). A PI3K β fehérjének a vérlemezkék aktivációjában leírt fontos szerepe miatt (93, 130-133), az AZD6482 PI3K β -szelektív gátlószer már a klinikai kipróbálás fázisába került (134).

Értekezésem második felében a PLC γ 2 fehérje szerepét vizsgáltam az oszteoklasztok jelátvitelében, és a kalcium-oszcillációk kialakulásában. Az itt bemutatott eredményeket megelőzően Dr. Kertész Zsuzsanna kollégámmal közösen vizsgáltuk és publikáltuk a PLC γ 2 szerepét az oszteoklasztok fejlődésében és működésében, valamint a nyugalmi csontanyagcserében. A PLC γ 2 fehérjével kapcsolatos eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy sikerült kimutatnunk, hogy a PLC γ 2 genetikai hiányában megnövekszik az egerek trabekuláris csontállományának mennyisége, ami feltételezhetően az oszteoklasztok számának a csökkenésével magyarázható. Igazoltuk, hogy a PLC γ 2 elengedhetetlen az oszteoklasztok csontvelői eredetű mieloid prekursorokból M-CSF és RANKL hatására történő *in vitro* differenciációjához, és hogy a fehérje hiánya nem befolyásolja az

oszteoklaszt-specifikus gének kifejeződését. Ezekről az eredményekről Kertész Zsuzsanna részletesen beszámolt a doktori értekezésében.

A PLC γ 2 szerepét az *in vivo* csontanyagcserében és az oszteoklasztok *in vitro* differenciációjában tőlünk függetlenül két másik munkacsoport is publikálta (106, 107). A különböző munkacsoportoknak a PLC γ 2 oszteoklasztokban betöltött szerepére vonatkozó eredményeit összevetve a hasonlóságok mellett különbségekre is fény derült. A PLC γ 2^{-/-} tenyészetekben megfigyelhető oszteoklaszt-fejlődési zavart a másik két munkacsoport a PLC γ 2-nek az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának szabályozásában betöltött szerepével magyarázta. Saját méréseink ezzel szemben azt mutatták, hogy az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának fokozódása a PLC γ 2^{-/-} sejtekben is megtörténik. Ezt támasztott alá az a későbbi megfigyelés is, hogy PLC γ 2^{-/-} oszteoklaszt kultúrákban a mononukleáris sejtek TRAP-pozitívak voltak (19. ábra), ami az oszteoklaszt-specifikus korai gének kifejeződésére utal.

Tekintve, hogy nem sikerült egyértelműen tisztázni, hogy a PLC γ 2 milyen mechanizmussal játszik szerepet az oszteoklasztok fejlődésében és működésében, további kísérleteinkben megvizsgáltuk a PLC γ 2 részvételét egyéb folyamatokban. Takayanagi és munkacsoportja írta le először, hogy az oszteoklasztok fejlődése során az intracelluláris kalcium-koncentráció periódikus változásai, az úgynevezett kalcium-oszcillációk tehetők felelőssé az NFATc1 transzkripciós faktor aktiválódásáért (60). A PLC enzimekről pedig jól ismert, hogy az általuk létrehozott inozitol (1,4,5)-triszfoszfát kötődése a receptorához kalcium-jel kialakulásához vezet a sejtben. Ezért a következő kísérleteinkben megvizsgáltuk a PLC γ 2 szerepét a kalcium-oszcillációk szabályozásában. A kalcium-hullámok létrejöttéhez az irodalmi adatokkal összhangban (60), a saját kísérleteinkben is a RANKL jelenlétére volt szükség, azokat az M-CSF önmagában kiváltani nem tudta (20. ábra). További kísérleteinkben igazoltuk, hogy a PLC γ 2 fehérje elengedhetetlen a Ca²⁺-oszcillációk kialakulásához az oszteoklasztok fejlődése során. A PLC γ 2^{-/-} egerek csontvelői eredetű mieloid prekursorai M-CSF és RANKL jelenlétében tenyésztve egyáltalán nem tudtak kalcium-oszcillációkat létrehozni (21. ábra), míg a PLC γ 2 retrovirális rekonstitúciója a PLC γ 2^{-/-} oszteoklaszt előalakokban helyreállította az oszcillációkat, és az oszteoklasztogenezist (24. ábra). Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a PLC γ 2 az *in vivo* csontanyagcserében és az *in vitro*

oszteoklaszt-fejlődésben betöltött szerepét a kalcium-oszcillációk szabályozásán keresztül fejtheti ki.

Felvetődik, hogy a PLC γ 2 által szabályozott kalcium-hullámok a preoszteoklasztok fúziójához nélkülözhetetlen lépések megtörténtéhez szükségesek, erre utalnak azok a kísérletes megfigyeléseink, amelyekben az oszteoklasztok mellett más sokmagvú sejtekben a PLC γ 2 genetikai hiányában ugyancsak nem alakultak ki az óriássejtek és a kalcium-hullámok. Tőlünk függetlenül egy másik munkacsoport is vizsgálta a PLC γ izoenzimek szerepét az oszteoklasztok kalcium-oszcillációiban, azonban a mi eredményeinktől eltérően ők a PLC γ 1 fehérje szerepének tulajdonították a hatást (135). Az eltérés oka az lehet, hogy Kim és munkatársai a legtöbb kísérletüket az U73122 gátlószerre alapozták, amely egyformán gátolja a PLC γ 1 és a PLC γ 2 izoformákat. Mindazonáltal nem zárható ki, hogy a PLC γ 2 mellett a PLC γ 1 is szerepet játszik az oszteoklasztok kalcium-oszcillációinak szabályozásában.

Az értekezésemben bemutatott eredmények felvetik a PI3K β fehérje farmakológiai gátlásának lehetőségét a kóros csontvesztéssel járó betegségek, mint például a posztmenopauzális oszteoporózis és a rheumatoid arthritisz kezelésében. A PI3K β oszteoklasztok fejlődésében és működésében betöltött szerepének tükrében bővíthet a bevezetés előtt álló izoforma-szelektív PI3K β gátlószeres indikációs köre, vagy új, nem várt mellékhatásokra derülhet fény.

8. Következtetések

A célkitűzéseknek megfelelően a következtetéseimet is öt pontban foglaltam össze.

- 1) Kimutattam, hogy a PI3K β fehérje szükséges az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és működéséhez. A PI3K β farmakológiai gátlása, és/vagy genetikai hiánya jelentősen csökkentette az oszteoklasztok számát és csontbontó képességét mind a humán, mind az egér tenyészetekben.
- 2) Igazoltam, hogy a PI3K β szerepet játszik az *in vivo* csontanyagcserében egészséges körülmények között. A PI3K $\beta^{-/-}$ egerek szignifikánsan nagyobb csonttömeggel rendelkeztek vad típusú társaikhoz képest, és oszteoklasztjaik kóros morfológiát mutattak a szövettani metszeteken.
- 3) Kimutattam, hogy a PI3K $\beta^{-/-}$ oszteoklasztok aktinyűrű-képzése, lizoszómális-eredetű savas vezikula-leadása és katepszin K-ürítése súlyosan károsodott, ami megmagyarázza az oszteoklasztok fejlődésének és működésének *in vitro* és *in vivo* megfigyelt zavarát.
- 4) Igazoltam, hogy a PI3K β szerepet játszik az *in vivo* csontanyagcserében kóros körülmények között. A PI3K $\beta^{-/-}$ egerek részlegesen védettek voltak a sebészi ovariektómia-indukálta csontvesztéstől.
- 5) Kimutattam, hogy a PLC γ 2 fehérje nélkülözhetetlen a kalcium-oszcillációk kialakulásához oszteoklasztokban. A PLC γ 2 $^{-/-}$ preoszteoklasztok egyáltalán nem tudtak Ca²⁺-oszcillációkat létrehozni, míg a PLC γ 2 retrovirális rekonstitúciója a PLC γ 2 $^{-/-}$ előalakokba helyreállította az oszcillációkat és az oszteoklaszt-fejlődést.

9. Összefoglalás

Az oszteoklasztok csontvelői eredetű mieloid előalakokból fejlődnek, és a szervezetben egyedüli sejtként képesek a csontszövet lebontására mind fiziológiás, mind kóros körülmények között. Kialakulásukhoz M-CSF és RANKL citokinek jelenlétére, $\alpha_v\beta_3$ integrinek által közvetített adhéziós szignálokra és immunreceptor-szerű jelátviteli folyamatokra van szükség. A foszfatidilinozitol 3-kinázok (PI3K) kulcsfontosságúak a sejtek működéshez, azonban vizsgálataink kezdetén nem volt arról adat, hogy az oszteoklasztokban melyik izoformájuk közvetíti ezt a hatást. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a foszfolipáz $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) elengedhetetlen az oszteoklasztok fejlődéséhez, azonban e hatás pontos mechanizmusa nem ismert. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a PI3K β részt vesz-e az oszteoklaszt-mediálta csontbontásban, és hogy a PLC $\gamma 2$ milyen mechanizmussal szabályozza az oszteoklasztogenezist.

Az *in vitro* vizsgálatokhoz vad típusú, PI3K $\beta^{-/-}$ és PLC $\gamma 2^{-/-}$ egerekből nyert csontvelői sejteket, és egészséges önkéntesek véréből izolált, TGX221 gátlószerrel kezelt monocitákat M-CSF és RANKL jelenlétében tenyésztettünk. A trabekuláris csontállomány vizsgálatához mikro-CT és szövettani analízist végeztünk. A posztmenopauzális oszteoporózis modellezésére ovariektómiát hajtottunk végre az állatokon.

A PI3K β farmakológiai gátlása és/vagy genetikai hiánya jelentősen csökkentette az oszteoklasztok számát és csontbontó képességét mind a humán, mind az egér tenyészetekben. A PI3K $\beta^{-/-}$ oszteoklasztok aktingyűrű-képzése, lizoszóma-eredetű savas vezikula-leadása és katepszin K-ürítése súlyosan károsodott. A PI3K $\beta^{-/-}$ egerek jelentősen nagyobb csonttömeggel rendelkeztek vad típusú társaikhoz képest, és részlegesen védettek voltak a sebészi ovariektómia-indukálta csontvesztéstől. A PLC $\gamma 2$ foszforilációja csökkent a PI3K $\beta^{-/-}$ oszteoklasztokban, és a PLC $\gamma 2$ genetikai hiányában nem jöttek létre a kalcium-oszcillációk a sejtekben.

Kimutattuk, hogy a PI3K β fehérje szükséges az *in vitro* oszteoklaszt-fejlődéshez és -működéshez, valamint az *in vivo* csontanyagcseréhez. A PI3K β ezt a szerepét feltehetően az oszteoklasztok aktingyűrű-képzésének, lizoszóma-leadásának és katepszin K-ürítésének szabályozásán keresztül feje ki. A PLC $\gamma 2$ fehérje a PI3K β -tól disztálisan helyezkedik el a jelpályában, és nélkülözhetetlen az oszteoklasztok kalcium-oszcillációinak kialakulásában.

10. Summary

Osteoclasts are highly specialized bone-resorbing cells of hematopoietic origin and are responsible for basal bone resorption, as well as for pathological bone loss. Their development is directed primarily by M-CSF and RANKL cytokines, β_3 integrin-mediated adhesive interactions and immunoreceptor-like activation signals. Though phosphoinositide 3-kinases (PI3K) are involved in nearly all biological functions, it is still unclear which isoform mediates their effect in osteoclasts. We have previously shown that phospholipase $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) is required for osteoclast development, however the mechanism how PLC $\gamma 2$ regulates osteoclastogenesis has not yet been identified. Here we tested the role of PI3K β in osteoclast development and function as well as the role of PLC $\gamma 2$ in the development of calcium-oscillations.

The role of PI3K β and PLC $\gamma 2$ in primary human and murine osteoclast cultures was tested by the PI3K β isoform-selective inhibitor TGX221, or by using PI3K $\beta^{-/-}$ and PLC $\gamma 2^{-/-}$ mice. The trabecular bone architecture of wild type and PI3K $\beta^{-/-}$ mice was evaluated by micro-CT and histomorphometric analyses. To test the role of PI3K β in estrogen-deficiency induced bone loss, PI3K $\beta^{-/-}$ female mice were subjected to surgical ovariectomy.

In vitro development of osteoclasts from human or murine progenitors and their resorption capacity was strongly reduced by the PI3K β inhibitor TGX221, or by the genetic deficiency of PI3K β . Multinucleated PI3K $\beta^{-/-}$ cells failed to form actin rings and retained acidic vesicles and cathepsin K. PI3K $\beta^{-/-}$ mice had significantly increased trabecular bone volume compared to wild type mice, and were partially protected from ovariectomy-induced bone loss. The phosphorylation of PLC $\gamma 2$ was abrogated in PI3K $\beta^{-/-}$ osteoclasts, and PLC $\gamma 2^{-/-}$ cells failed to show calcium-oscillations.

Taken together, PI3K β plays an important role in osteoclast development and function, as well as in basal bone homeostasis. PI3K β is likely required for the regulation of actin ring formation, vesicle discharge and release of cathepsin K. PLC $\gamma 2$ is activated downstream of PI3K β , and it is critically involved in the development of calcium-oscillations during osteoclastogenesis.

11. Irodalomjegyzék

1. Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ. (2004) Osteopetrosis. *N Engl J Med* 351:2839-2849.
2. National Osteoporosis Foundation. (2002) America's Bone Health: The State of Osteoporosis and Low Bone Mass in Our Nation. (Washington DC).
3. Poór G, Kiss Cs, Lányi É. (1998) Prevalence of osteoporosis in older Hungarian females and males. *Osteoporos Int* 8:S21.
4. Firestein G. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356-361.
5. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425:836–841.
6. Calvi L, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841–846.
7. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118:149–161.
8. Aguila H, Rowe DW. (2005) Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunol Rev* 208:7–18.
9. Ross M, Kaye GI, Pawlina W. (2003) *Histology: A Text and Atlas* (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia) 180–213.
10. Raisz L, Kream BE, Lorenzo JA. (2002) *Williams Textbook of Endocrinology* (WB Saunders, Philadelphia) 1373–1410.
11. Aubin J. (2001) Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2:81–94.
12. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747–754.

13. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. (2002) The novel zinc finger containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17–29.
14. Celeste A, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. (1990) Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9843–9847.
15. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513–523.
16. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. (2002) Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157:303–314.
17. Boyden L, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346:1513–2112.
18. Bennett C, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. (2005) Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3324–3329.

19. Knothe Tate M, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. (2004) The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1–8.
20. Teitelbaum S. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289:1504–1508.
21. Walsh M, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. (2006) Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 24:33-63.
22. Kong Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315-323.
23. Arron J, Choi Y. (2000) Bone versus immune system. *Nature* 408:535–536.
24. Takayanagi H. (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7:292-304.
25. Ross F, Teitelbaum SL. (2005) $\alpha\beta 3$ and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunology Reviews* 208:88-105.
26. Felix R, Cecchini MG, Hofstetter W, Elford PR, Stutzer A, Fleisch H. (1990) Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J Bone Miner Res* 5:781-789.
27. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4828-4832.
28. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. (1998) TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188:997–1001.
29. Simonet W, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby

- P, Lee R, Boyle WJ. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319.
30. Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, Nagata K, Iijima T, Horiuchi M, Matsusaki H, Hieshima K, Yoshie O, Nomiyama H. (2004) RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med* 200:941-946.
 31. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T. (2005) DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 202:345-351.
 32. Dougall W, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 18:2412-2424.
 33. Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T. (2000) An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor κ B ligand. *Blood* 96:4335-4343.
 34. McHugh K, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL. (2000) Mice lacking β 3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* 105:433-440.
 35. Boyle W, Simonet WS, Lacey DL. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.
 36. Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. (2001) Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104:205-215.
 37. Teitelbaum S, Ross, FP. (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Rev Genet* 4:638–649.
 38. Faccio R, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL. (2003) c-Fms and the α v β 3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 111:749–758.
 39. McGill G, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ,

- Golub TR, Fisher DE. (2002) Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109:707–718.
40. Anderson D, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Temetsko ME, Roux ER, Teepe MC, Dubose RF, Cosman D, Galibert L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175–179.
41. Lacey D, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165–178.
42. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3597–3602.
43. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345–357.
44. Kim N, Odgren PR, Kim DK, Marks SC Jr, Choi Y. (2000) 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 USA* 97:10905–10910.
45. Hughes A, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. (2000) Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 24:45–48.
46. Whyte M, Hughes AE. (2002) Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res* 17:26–29.

47. Armstrong A, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC. (2002) A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem* 277:44347–44355.
48. Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, Inoue J. (2001) Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J* 20:1271–1280.
49. Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Vologodskaya M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y, Wu H. (2002) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418:443–447.
50. Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Yamamoto T, Inoue J. (1999) Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4:353–362.
51. Lomaga M, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 13:1015–1024.
52. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. (1997) Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nat Med* 3:1285–1289.
53. Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N. (2003) p38 mitogen-activated protein kinase is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis, or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology* 144:4999–5005.
54. Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M. (2000) Involvement of p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). *J Biol Chem* 275:31155–31161.

55. David J, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF. (2002) JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* 115::4317–4325.
56. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266:443-448.
57. Ikeda F, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. (2004) Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 114:475-484.
58. Chaisson M, Branstetter DG, Derry JM, Armstrong AP, Tometsko ME, Takeda K, Akira S, Dougall WC. (2004) Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of κ B kinase α . *J Biol Chem* 279:54841–54848.
59. Ruocco M, Maeda S, Park JM, Lawrence T, Hsu LC, Cao Y, Schett G, Wagner EF, Karin M. (2005) I κ B kinase (IKK) β , but not IKK α , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 201:1677–1687.
60. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3:889-901.
61. Hynes R. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.
62. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. (2004) Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* 2:169.
63. Ffrench-Constant C, Colognato H. (2004) Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* 14:678-686.
64. Sanjay A, Houghton A, Neff L, DiDomenico E, Bardelay C, Antoine E, Levy J, Gailit J, Bowtell D, Horne WC, Baron R. (2001) Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, α β 3 integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol* 152:181-195.

65. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64:693–702.
66. Faccio R, Teitelbaum SL, Fujikawa K, Chappel J, Zallone A, Tybulewicz VL, Ross FP, Swat W. (2005) Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat Med* 11:284-290.
67. Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA, Mócsai A. (2007) Immunoreceptor-like signaling by β 2 and β 3 integrins. *Trends Cell Biol* 17:493-501.
68. Grande S, Bannish G, Fuentes-Panana EM, Katz E, Monroe JG. (2007) Tonic B-cell and viral ITAM signaling: context is everything. *Immunol Rev* 218:214-234.
69. Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA. (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 7:1326-1333.
70. Graham D, Stephenson LM, Lam SK, Brim K, Lee HM, Bautista J, Gilfillan S, Akilesh S, Fujikawa K, Swat W. (2007) An ITAM-signaling pathway controls crosspresentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J Exp Med* 204:2889-2897.
71. Abtahian F, Bezman N, Clemens R, Sebzda E, Cheng L, Shattil SJ, Kahn ML, Koretzky GA. (2006) Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 26:6936-6949.
72. Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. (2008) Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 28:8138-8143.
73. Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. (2004) The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (FcR γ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6158-6163.
74. Koga T, Inui K, Inoue S, Kim A, Suematsu E, Kobayashi T, Iwata H, Ohnishi T, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi H, Takayanagi T, Takai. (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428:758-763.

75. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. (2010) The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10:387-402.
76. Humphrey M, Daws MR, Spusta SC, Niemi EC, Torchia JA, Lanier LL, Seaman WE, Nakamura MC. (2006) TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res* 21:237-245.
77. Paloneva J, Mandelin J, Kiialainen A, Bohling T, Prudlo J, Hakola P, Haltia M, Konttinen YT, Peltonen L. (2003) DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med* 198:669-675.
78. Cella M, Buonsanti C, Strader C, Kondo T, Salmaggi A, Colonna M. (2003) Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 198:645-651.
79. Barrow A, Raynal N, Andersen TL, Slatter DA, Bihan D, Pugh N, Cella M, Kim T, Rho J, Negishi-Koga T, Delaisse JM, Takayanagi H, Lorenzo J, Colonna M, Farndale RW, Choi Y, Trowsdale J. (2011) OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J Clin Invest* 121:3505-3516. .
80. Balla T. (2001) Pharmacology of phosphoinositides, regulators of multiple cellular functions. *Curr Pharm Des* 7:475-507.
81. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:195-203.
82. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:329-341.
83. Engelman J. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9:550-562.
84. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. (2013) Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 10:143-153.
85. Okkenhaug K. (2013) Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol.* 31:675-704.

86. Hawkins P, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34:647-662.
87. Rommel C, Camps M, Ji H. (2007) Class I PI3Ks: linking cell-surface receptors to signalling networks and cell functions. *Nat Rev Immunol* 7:191-201.
88. Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL. (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 β catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome* 13:169-172.
89. Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. (2008) The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8292-8297.
90. Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson KE, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa TA, Ramadani F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis GE, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mócsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens LR, Hawkins PT. (2011) PI3K β plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal* 4:ra23.
91. Dbouk H, Vadas O, Shymanets A, Burke JE, Salamon RS, Khalil BD, Barrett MO, Waldo GL, Surve C, Hsueh C, Perisic O, Harteneck C, Shepherd PR, Harden TK, Smrcka AV, Taussig R, Bresnick AR, Nurnberg B, Williams RL, Backer JM. (2012) G protein-coupled receptor-mediated activation of p110 β by G $\beta\gamma$ is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci Signal* 5:ra89.
92. Ni J, Liu Q, Xie S, Carlson C, Von T, Vogel K, Riddle S, Benes C, Eck M, Roberts T, Gray N, Zhao J. (2012) Functional characterization of an isoform-selective inhibitor of PI3K-p110 β as a potential anticancer agent. *Cancer Discov* 2:425-433.
93. Canobbio I, Stefanini L, Cipolla L, Ciruolo E, Gruppi C, Balduini C, Hirsch E, Torti M. (2012) Genetic evidence for a predominant role of PI3K β catalytic activity in ITAM- and integrin-mediated signaling in platelets. *Blood* 114:2193-2196. .
94. Consonni A, Cipolla L, Guidetti G, Canobbio I, Ciruolo E, Hirsch E, Falasca M, Okigaki M, Balduini C, Torti M. (2012) Role and regulation of

- phosphatidylinositol 3-kinase β in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ signaling. *Blood* 119:847-856.
95. Hall T, Jeker H, Schaublin M. (1995) Wortmannin, a potent inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int* 56:336-338.
 96. Nakamura I, Takahashi N, Sasaki T, Tanaka S, Udagawa N, Murakami H, Kimura K, Kabuyama Y, Kurokawa T, Suda T. (1995) Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. *FEBS Lett* 361:79-84.
 97. Sato M, Bryant HU, Dodge JA, Davis H, Matter WF, Vlahos CJ. (1996) Effects of wortmannin analogs on bone in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 277:543-550.
 98. Lee S, Woo KM, Kim SY, Kim HM, Kwack K, Lee ZH, Kim HH. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* 30:71-77.
 99. Munugalavada V, Vemula S, Sims EC, Krishnan S, Chen S, Yan J, Li H, Niziolek PJ, Takemoto C, Robling AG, Yang FC, Kapur R. (2008) The p85 α subunit of class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates the expression of multiple genes involved in osteoclast maturation and migration. *Mol Cell Biol* 28:7182-7198.
 100. Patterson R, van Rossum DB, Nikolaidis N, Gill DL, Snyder SH. (2005) Phospholipase C γ : diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci* 30:688-697.
 101. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. (1983) Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67-68.
 102. Ji Q, Winnier GE, Niswender KD, Horstman D, Wisdom R, Magnuson MA, Carpenter G. (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- $\gamma 1$ in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2999-3003.

103. Wang D, Feng J, Wen R, Marine JC, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson CW, Cleveland JL, Murray PJ, Ihle JN. (2000) Phospholipase C γ 2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* 13:25-35.
104. Wen R, Jou ST, Chen Y, Hoffmeyer A, Wang D. (2002) Phospholipase C γ 2 is essential for specific functions of Fc ϵ R and Fc γ R. *J Immunol* 169:6743-6752.
105. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A. (2009) Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med* 206:577-593.
106. Mao D, Epple H, Uthgenannt B, Novack DV, Faccio R. (2006) PLC γ 2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *J Clin Invest* 116:2869-2879.
107. Chen Y, Wang X, Di L, Fu G, Bai L, Liu J, Feng X, McDonald JM, Michalek S, He Y, Yu M, Fu YX, Wen R, Wu H, Wang D. (2008) Phospholipase C γ 2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 283:29593-29601.
108. Epple H, Cremasco V, Zhang K, Mao D, Longmore GD, Faccio R. (2008) Phospholipase C γ 2 modulates integrin signaling in the osteoclast by affecting the localization and activation of Src kinase. *Mol Cell Biol* 28:3610-3622.
109. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Söldner R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5:605-607.
110. Riedl J, Flynn KC, Raducanu A, Gärtner F, Beck G, Bösl M, Bradke F, Massberg S, Aszodi A, Sixt M, Wedlich-Söldner R. (2010) Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat Methods* 7:168-169.
111. Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 16:547-558.
112. Jakus Z, Simon E, Balázs B, Mócsai A. (2010) Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 62:1899-1910.
113. Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E. (2000) Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: The role of

- p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol* 164:4321-4331.
114. Rebres R, Green JM, Reinhold MI, Ticchioni M, Brown EJ. (2001) Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells. *J Biol Chem* 276:7672-7680.
 115. Benkő S, Magalhaes JG, Philpott DJ, Girardin SE. (2010) NLR5 limits the activation of inflammatory pathways. *J Immunol* 185:1681-1691.
 116. Pui J, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS. (1999) Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination. *Immunity* 11:299-308.
 117. Morita S, Kojima T, Kitamura T. (2000) Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7:1063-1066.
 118. Bouxsein M, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25:1468-1486.
 119. Parfitt A, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610.
 120. Shinohara M, Nakamura M, Masuda H, Hirose J, Kadono Y, Iwasawa M, Nagase Y, Ueki K, Kadowaki T, Sasaki T, Kato S, Nakamura H, Tanaka S, Takayanagi H. (2012) Class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates osteoclastic bone resorption through protein kinase B-mediated vesicle transport. *J Bone Miner Res* 27:2464-2475.
 121. Condliffe A, Davidson K, Anderson KE, Ellson CD, Crabbe T, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Turner M, Webb L, Wymann MP, Hirsch E, Ruckle T, Camps M, Rommel C, Jackson SP, Chilvers ER, Stephens LR, Hawkins PT. (2005) Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* 106:1432-1440.

122. Coxon FP, Taylor, A. (2008) Vesicular trafficking in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 19:424-433.
123. Nakamura I, Sasaki T, Tanaka S, Takahashi N, Jimi E, Kurokawa T, Kita Y, Ihara S, Suda T, Fukui Y. (1997) Phosphatidylinositol-3 kinase is involved in ruffled border formation in osteoclasts. *J Cell Physiol* 172:230-239.
124. Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, Kersch-Schindl K, Patsch J. (2009) Pathophysiology of osteoporosis. *Wien Med Wochenschr* 159:230-234.
125. Wu Y, Torchia J, Yao W, Lane NE, Lanier LL, Nakamura MC, Humphrey MB. (2007) Bone microenvironment specific roles of ITAM adapter signaling during bone remodeling induced by acute estrogen-deficiency. *PLoS One* 2:586.
126. Grey A, Chaussade C, Empson V, Lin JM, Watson M, O'Sullivan S, Rewcastle G, Naot D, Cornish J, Shepherd P. (2010) Evidence for a role for the p110- α isoform of PI3K in skeletal function. *Biochem Biophys Res Commun* 391:564-569.
127. Kang H, Chang W, Hurley M, Vignery A, Wu D. (2010) Important roles of PI3K γ in osteoclastogenesis and bone homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:12901-12906.
128. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8:627-644.
129. Shuttleworth S, Silva FA, Cecil AR, Tomassi CD, Hill TJ, Raynaud FI, Clarke PA, Workman P. (2011) Progress in the preclinical discovery and clinical development of class I and dual class I/IV phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitors. *Curr Med Chem* 18:2686-2714.
130. Jackson S, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, Kenche V, Anderson KE, Dopheide SM, Yuan Y, Sturgeon SA, Prabakaran H, Thompson PE, Smith GD, Shepherd PR, Daniele N, Kulkarni S, Abbott B, Saylik D, Jones C, Lu L, Giuliano S, Hughan SC, Angus JA, Robertson AD, Salem HH. (2005) PI 3-kinase p110 β : a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med* 11:507-514.
131. Kim S, Mangin P, Dangelmaier C, Lillian R, Jackson SP, Daniel JL, Kunapuli SP. (2009) Role of phosphoinositide 3-kinase β in glycoprotein VI-mediated Akt activation in platelets. *J Biol Chem* 284:33763-33772.

132. Garcia A, Kim S, Bhavaraju K, Schoenwaelder SM, Kunapuli SP. (2010) Role of phosphoinositide 3-kinase β in platelet aggregation and thromboxane A₂ generation mediated by Gi signalling pathways. *Biochem J* 429:369-377.
133. Martin V, Guillermet-Guibert J, Chicanne G, Cabou C, Jandrot-Perrus M, Plantavid M, Vanhaesebroeck B, Payrastre B, Gratacap MP. (2010) Deletion of the p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood* 115:2008-2013.
134. Nylander S, Kull B, Bjorkman JA, Ulvinge JC, Oakes N, Emanuelsson BM, Andersson M, Skarby T, Inghardt T, Fjellstrom O, Gustafsson D. (2012) Human target validation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) β : effects on platelets and insulin sensitivity, using AZD6482 a novel PI3K β inhibitor. *J Thromb Haemost* 10:2127-2136.
135. Kim M, Yang YM, Son A, Tian YS, Lee SI, Kang SW, Muallem S, Shin DM. (2010) RANKL-mediated reactive oxygen species pathway that induces long lasting Ca²⁺ oscillations essential for osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 285:6913-6921.

12. Saját publikációk jegyzéke

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

- 1) **Győri D**, Csete D, Benkő S, Kulkarni S, Mandl P, Dobó-Nagy C, Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins PT, Mócsai A. (2014) The Phosphoinositide 3-Kinase Isoform PI3K β Regulates Osteoclast-Mediated Bone Resorption in Humans and Mice. *Arthritis & Rheumatology*, 66 (8): 2210-2221.

IF: 7.477

- 2) Kertész Z, **Győri D**, Körmendi S, Fekete T, Kis-Tóth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavölgyi É, Dobó-Nagy C, Mócsai A. (2012) Phospholipase C γ 2 is required for basal but not oestrogen deficiency-induced bone resorption. *European Journal of Clinical Investigation*, 42:49-60.

IF: 3.365

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK:

- 3) Boyle KB, **Győri D**, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Taylor PR, Mócsai A, Stephens LR, Hawkins PT. (2011) Class IA Phosphoinositide 3-Kinase β and δ Regulate Neutrophil Oxidase Activation in Response to *Aspergillus fumigatus* Hyphae. *The Journal of Immunology*, 186: 2978–2989.

IF: 5.788

13. Társszerzők közötti munkamegosztás

A doktori értekezésemben bemutatott kísérletek elvégzésében több kutatótársam is a segítségemre volt. A közös munkában az egyes szerzők az alábbiak szerint vettek részt (különös tekintettel más Ph.D. hallgatók részvételére):

PI3K β szerepének vizsgálata az oszteoklasztok működésében és a csontanyagcserében:

Györi et al. Arthritis & Rheumatology 2014 66 (8): 2210-2221.

Ezért a projektért elsősorban én voltam a felelős. Az *in vitro* differenciációs és funkcionális méréseket elsődlegesen én, kisebb részben Dr. Csete Dániel kollégám végezte. Az aktinyűrü-képzéses vizsgálatok során a videókat én és Csete Dániel együtt készítettük. A génexpressziós vizsgálatokat én és Dr. Benkő Szilvia végeztük. A szövettani méréseket Dr. Mandl Péter végezte. A mikro-CT vizsgálatok során a szkennelést Dr. Szabó Bence és Dr. Dobó-Nagy Csaba készítették. Dr. Suhasini Kulkarni, Dr. Len Stephens, Dr. Phillip T. Hawkins és Dr. Bart Vanhaesebroeck szakmai tanácsokat, és kísérleti reagenseket adtak. A projektet Dr. Mócsai Attila irányította és felügyelte.

PLC γ 2 szerepének vizsgálata az oszteoklasztok fejlődésében és kalcium-oszcillációiban:

Kertész et al. European Journal of Clinical Investigation 2012 42:49-60.

Ezért a projektért elsősorban Dr. Kertész Zsuzsanna volt felelős, azonban a dolgozatomban bemutatott eredmények a saját méréseimből származnak. Az *in vitro* oszteoklaszt differenciációs kísérleteket én és Kertész Zsuzsanna közösen végeztük. A PLC γ 2 szerepének vizsgálata a kalcium-oszcillációk kialakulásában az én feladatomban volt, abban más Ph.D. hallgató nem vett részt. A projektet Dr. Mócsai Attila irányította és felügyelte.

Az értekezésem eredmény fejezetében bemutatott ábrák és szöveg nem szerepelnek más Ph.D. dolgozatban.

14. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Mócsai Attilának, aki először gyakorlatvezetőként, majd tudományos diákkörös témavezetőként megszeretette velem az élettant, és felkeltette érdeklődésemet a tudomány iránt. Hálával tartozom értékes tanácsaiért, és hogy Ph.D. témavezetőként megosztotta velem kutatói tapasztalatát. Köszönöm Dr. Spät Andrásnak és Dr. Hunyady Lászlónak, hogy intézetvezetőként lehetővé tették és támogatták a tudományos munkámat. Külön köszönöm Dr. Ligeti Erzsébetnek, hogy Ph.D. programvezetőként végig figyelemmel kísérte tudományos tevékenységemet.

Köszönettel tartozom egykori és jelenlegi tudományos diákkörös hallgatóimnak: Dr. Csete Dánielnek, Gölle Lászlónak és Farkas Jánosnak, akikkel megoszthattam a kísérletezés örömét. Köszönöm a laboratóriumi háttérmunka során nyújtott pótolhatatlan segítségét Simon Edinának, Tóth Annának és Makara Krisztinának. Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, laborunk és a Semmelweis Egyetem Élettani Intézete valamennyi munkatársának, akik segítő jelenléte nélkül nehezebben ment volna a kutatás. Köszönöm Dr. Benkő Szilviának a génexpressziós mérésekben, és Dr. Mandl Péternek a szövettani vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Hálával tartozom Dr. Phillip T. Hawkins-nak és Dr. Len Stephens-nek, valamint a cambridge-i Babraham Institute Signalling munkacsoport összes munkatársának, hogy bevezettek a foszfatidilinozitol 3-kinázok kutatásának világába, és formálták tudományos szemléletemet. Külön köszönöm Dr. Tamara Chessa-nak és Dr. Suhasini Kulkarni-nak, hogy megtanították az értekezésemben bemutatott molekuláris biológiai módszereket. Hálás vagyok továbbá a European Molecular Biology Organization-nak, hogy lehetővé tette az angliai tanulmányutamat.

Végül pedig szeretném megköszönni Családomnak: Gyermekeimnek, Feleségemnek, Édesanyámnak, Édesapámnak, Testvéremnek, Nagymamámnak és Zsuzsának azt a határtalan türelmet és szeretetet, amit kaptam Tőlük az évek során. Az Ő bátorító támogatásuk és segítségük nélkül sokkal nehezebben ment volna a kutatói munka.