

A Syk és a PI3K β fehérjék szerepe az oszteoklasztok fejlődésében, működésében és a csontanyagcserében

Doktori értekezés

Dr. Csete Dániel

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Rónai Zsolt egyetemi docens, Ph. D.

Dr. Vas Virág tudományos főmunkatárs, Ph. D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Füst Zsuzsanna, az MTA doktora, professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sipéki Szabolcs, Ph. D., egyetemi docens,

Dr. Szakács Gergely, Ph. D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	9
1.1. A csontszövet jellemzése	9
1.1.1. A csontot alkotó sejtek	11
1.1.2. A csontátépülés.....	13
1.1.3. A csontanyagcserét érintő betegségek.....	14
1.1.4. A csont- és az immunrendszer kapcsolata.....	15
1.2. A Syk és PI3K β fehérjék jellemzése.....	15
1.2.1. A Syk szerkezete és működése.....	15
1.2.2. A Syk vizsgálata.....	19
1.2.3. A PI3K β szerkezete és működése.....	23
1.2.4. A PI3K β vizsgálata.....	25
1.3. Az oszteoklasztok fejlődése és működése	26
1.3.1. M-CSF által aktivált jelátvitel	29
1.3.2. A RANKL által aktivált jelátvitel.....	30
1.3.3. Integrin mediált jelátvitel.....	31
1.3.4. Immunreceptor-szerű jelátvitel.....	32
1.3.5. A Syk szerepe az oszteoklasztokban	34
1.3.6. A PI3-kinázok szerepe az oszteoklasztokban.....	36
2. Célkitűzések	42
3. Módszerek	43

3.1.	Kísérleti állatok	43
3.1.1.	Syk-hiányos egerek	43
3.1.2.	PI3K β -hiányos egerek	44
3.1.3.	A Lifeact-EGFP rendszer	44
3.2.	Mikro-CT analízis	45
3.3.	Szövettani és immunhisztokémia vizsgálatok	46
3.4.	<i>In vitro</i> oszteoklaszt és makrofág kultúrák, oszteoklaszt reszorpciós vizsgálatok	46
3.5.	Biokémiai vizsgálatok	47
3.6.	Génexpressziós vizsgálatok	47
3.7.	DNS szekvencia analízis	48
3.8.	Genomiális PCR analízis	48
3.9.	Aktinyűrű-vizsgálatok	49
3.10.	Statisztikai analízis	49
4.	Eredmények	50
4.1.	A Syk szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és az <i>in vivo</i> csonthomeosztázisban	50
4.1.1.	Mikro-CT – oszteoklaszt-specifikus Syk törlés	50
4.1.2.	Mikro-CT – hemopoetikus Syk törlés	54
4.1.3.	Szövetten és immunhisztokémia	58
4.1.4.	<i>In vitro</i> oszteoklaszt fejlődés Syk hiányában	59
4.1.5.	<i>In vitro</i> oszteoklaszt reszorpció Syk hiányában	62
4.1.6.	Oszteoklaszt-specifikus gének expressziója	63
4.1.7.	Syk fehérjeexpresszió	65
4.1.8.	Cre génexpresszió	66
4.1.9.	Syk allélvariációk szekvenálása	67

4.1.10.	Cre mediált törlés	69
4.2.	A PI3K β szerepe az oszteoklasztok működésében	71
4.2.1.	Aktingyűrű-megtartás	71
5.	Megbeszélés	73
6.	Következtetések	77
7.	Összefoglalás.....	78
8.	Summary	79
9.	Irodalomjegyzék.....	80
10.	Saját publikációk jegyzéke	98
11.	Társszerzők közötti munkamegosztás	99
12.	Köszönetnyilvánítás	100

Rövidítések jegyzéke

AP-1	activator protein 1	aktivátor protein 1
Bcl6	B-cell lymphoma 6 protein	B-sejtes limfóma 6 fehérje
Blimp1	B lymphocyte-induced maturation protein-1	B-limfocita indukálta érési fehérje 1
BV/TV	bone volume/total volume	relatív csontmennyiség
Cdc42	cell division cycle 42	sejtosztódási ciklus 42
CtsK	cathepsin K	katepszin K
CT	computed tomography	számítógépes tomográfia
DAP12	DNAX activation protein of 12kDa	DNAX aktiváló fehérje (12 kDa)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC-STAMP	dendritic cell-specific transmembrane protein	dendritikus sejt-specifikus transzmembrán fehérje
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetil szulfoxid
ECL	enhanced chemiluminescence	erősített kemilumineszcencia
eGFP	enhanced green fluorescent protein	felerősített zöld fluoreszcens fehérje
FcR γ	Fc receptor γ chain	Fc-receptor γ -lánc
FCS	fetal calf serum	magzati borjúsérum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz
IL	interleukin	interleukin
IRF-8	interferon regulatory factor 8	interferon szabályozó faktor 8

ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif	immunreceptor tirozin-bázisú aktivációs motívum
MafB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	V-maf bőnye fibroszarkóma onkogén homológ B
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogén-aktivált protein-kináz
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor	makrofág kolónia-stimuláló faktor
MDL-1	myeloid DAP12 associated lectin 1	mieloid DAP12 kapcsolt lektin 1
MEM	minimal essential medium	minimális esszenciális médium
MΦ	macrophage	makrofág
MITF	microphthalmia-associated transcription factor	microphthalmia-asszociált transzkripció faktor
NFATc1	nuclear factor of activated T-cells 1	aktivált T-sejt nukleáris faktor 1
NF-κB	nuclear factor κB	nukleáris faktor κB
NK-sejt	natural killer cell	természetes ölósejt
OC	osteoclast	oszteoklaszt
ODF (RANKL)	osteoclast differentiation factor	oszteoklaszt differenciációs faktor
OPG	osteoprotegerin	oszteoprotegerin
OPGL (RANKL)	osteoprotegerin ligand	oszteoprotegerin ligand
OSCAR	osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor	oszteoklaszt-specifikus sejtadhéziós fehérje
PBS	phosphate buffered saline	foszfáttal pufferelt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció

PI3K	phosphatidylinositol 3-kinases	foszfatidilinozitol-3-kináz
PIR-A	paired immunoglobulin receptor A	páros immunglobulin-szerű receptor A
PLC	phospholipase C	foszfolipáz C
PtdIns	phosphoinositide	foszfoinozítid
PTH	parathormon	parathormon
qPCR	quantitative PCR	kvantitatív PCR
PU.1	purine-rich nucleic acid binding protein 1	purin-gazdag motívumot felismerő transzkripció faktor 1
RANK	receptor activator of NFκB	az NFκB receptor-aktivátora
RANKL	RANK ligand	RANK ligand
ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigéngyök
SEM	standard error of mean	átlag standard hibája
SH2 (domén)	Src Homology 2 domain	Src-homológia 2 domén
Siglec-15	sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin15	sziálsavkötő immunglobulin-szerű lektin
Sirt6	sirtuin 6	szirtuin 6
SMI	structural model index	struktúramodell index
Src (kináz)	sarcoma kinase	szarkóma kináz
Syk	spleen tyrosine kinase	lép tirozin-kináz
TNFRSF11 (RANK)	tumour necrosis factor receptor superfamily member 11	tumor nekrosis faktor receptor szupercsalád tag 11
TNFSF11a (RANKL)	tumour necrosis factor superfamily member 11a	tumor nekrosis faktor szupercsalád tag 11a
TNFSF11b (OPG)	tumour necrosis factor superfamily member 11b	tumor nekrosis faktor szupercsalád tag 11b

TNF- α	tumor necrosis factor α	tumor nekrózis faktor α
TRAF6	TNF receptor associated factor 6	TNF receptor-asszociált faktor 6
TRANCE (RANKL)	TNF-related activation-induced cytokine	TNF-kapcsolt aktiváció indukált citokin
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase	tartarát-rezisztens savanyú foszfatáz
TREM-2	triggering receptor expressed on myeloid cells	mieloid sejteken expresszáldó serkentő receptor
VPS	vacuolar protein sorting (protein)	vakuoláris fehérje osztályozó (fehérje)
ZAP70	ζ -chain associated protein of 70 kDa	ζ lánc asszociált fehérje (70 kDa)

1. Bevezetés

A csont jelentősége az emberi egészség számára mindig alapvető volt, átvitt értelemben az egész testre, magára az emberre is utalhat ez a szó (vén csont, minden csontjában érzi). A csont mint szerv szerepe az orvostudományban is egyre hangsúlyosabb, az utóbbi évtizedekben már nemcsak a nyilvánvaló funkcióival (struktúra, védelem, mozgás) kapcsolatos kutatások célpontja, hanem egyéb élettani és patológiai folyamatokban betöltött lehetséges szerepét is vizsgálják (ásványi elemek és zsír raktározása, hemopoézis, oszteoimmunológia), mely várhatóan további újdonságokat hoz a közeljövőben.

1.1. A csontszövet jellemzése

A csont alapállománya – az extracelluláris mátrix – szerves (30%) és szervetlen (70%) komponensből áll. A szerves állomány túlnyomó részt I. típusú kollagénből (90-95%), valamint egyéb típusú kollagénből, más fehérjékből (oszteokalcin, oszteopontin, csont szialoprotein) és proteoglikánokból (hialuronsav, kondroitin-szulfát) áll. A szervetlen állományt főként hidroxipatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) kristályok, egyéb kalciumsók és foszfát képezi (1).

Az emberi szervezetben megtalálható 206 csont különböző szempontok szerint sorolható kategóriákba, az alak szerinti csoportosítást az 1. táblázat részletezi. Ebből a szempontból a legjellegzetesebb típusra, a hosszú csöves csontokra jellemző a meghosszabbodott diafizis és az ízületeket alkotó, többnyire sima felszínű, lekerekített epifízis a csontvégeken. A diafizis és az epifízis közötti rész a metafízis, melynek nagy jelentősége van a csont növekedésében (1. ábra).

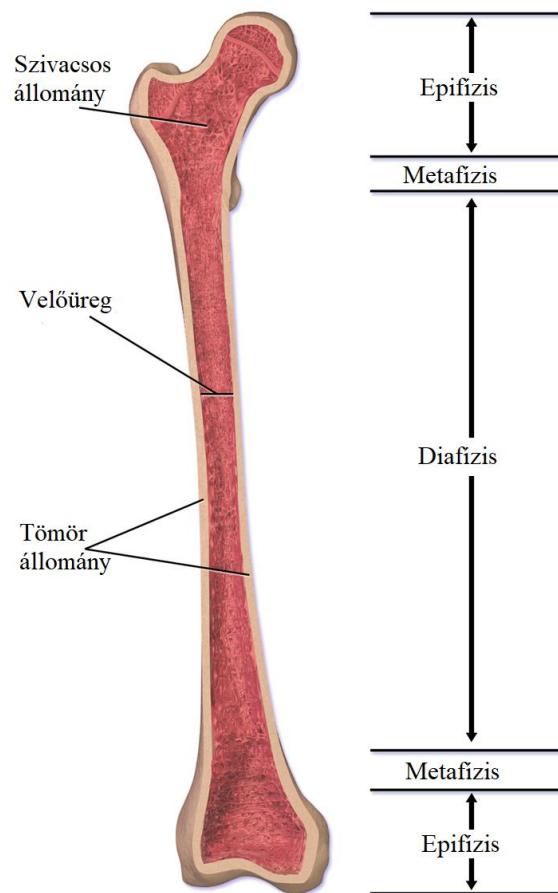
A csontnak kétféle szerkezete ismert: a kortikális (másnéven tömör vagy kompakt) csontállomány a hosszú csöves csontok diafizisének felszíni rétegeiben található meg. A trabekuláris (szivacsos) állomány pedig ezen csontok epifízisére és a csigolyák mélyebb rétegeire jellemző (2).

1. táblázat: A csontok kategorizálása alakjuk alapján

A csontok alak szerint a következő kategóriákba sorolhatók: csöves, rövid, lapos, légtartalmú, szabálytalan alakú és szezamoid csontok.

Forrás: <http://www.mananatomy.com>

Alak		Példák
Csöves csontok	Hosszú csöves csontok	combcsont, lábszárcsont, felkarcsont
	Rövid csöves csontok	kéz- és lábközépcsontok, ujjpercek
	Módosult csöves csontok	kulcscsont
Rövid csontok		kéz- és lábtőcsontok
Lapos csontok		lapocka, borda, szegycsont
Légtartalmú csontok		halántékcson, az arckoponya egyes csontjai
Szabálytalan alakú csontok		csigolyák, csípő, a koponyalap csontjai
Szezamoid csontok		térdkalács, borsócsont



1. ábra: A hosszú csöves csontok szerkezete

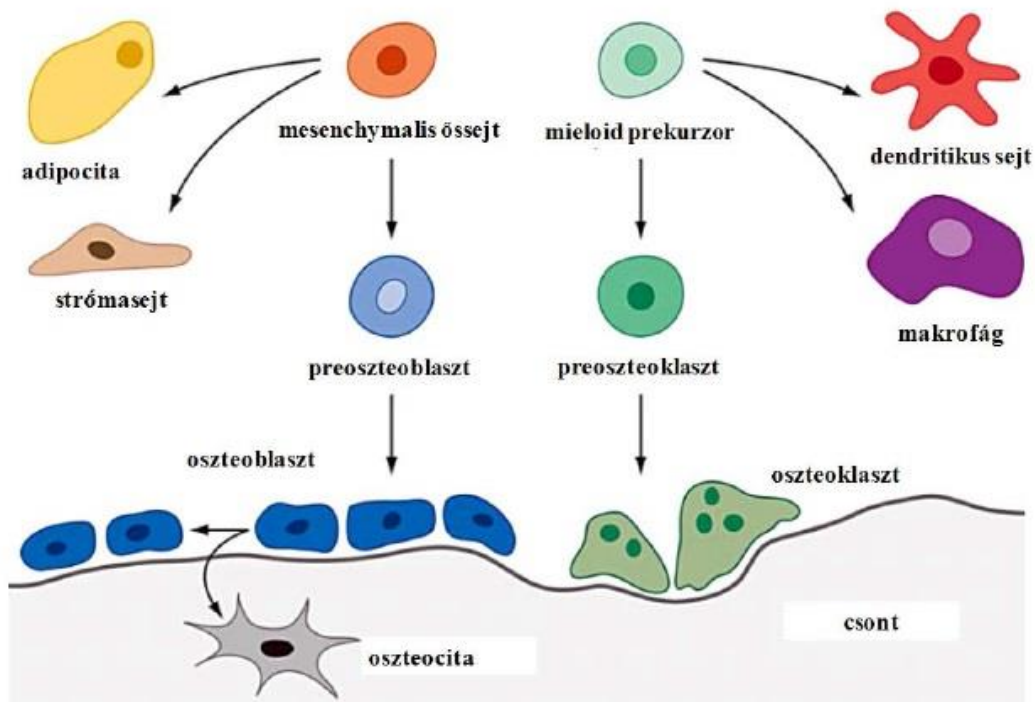
A hosszú csöves csontok epifízisből, metafízisből és diafízisből épülnek fel, velőüregből, szivacsos és tömör állományból állnak.

Forrás: Blausen.com (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014".

1.1.1. A csontot alkotó sejtek

A csontszövet sejtjeit alapvetően három sejttypus alkotja. A csont felépítéséért felelős oszteoblasztok mezenhimális őssejt eredetűek (3). A hasonló eredetű strómasejtekkel együtt kulcsszerepük van a hemopoetikus eredetű sejtek fejlődésében, továbbá részt vesznek az oszteoklasztok fejlődésének és működésének szabályozásában is. Az oszteoblasztok kialakulásához különféle jelátviteli utak aktivációja szükséges, ezek részletezésére a jelen dolgozat nem tér ki (4-6). A csontépítés során az oszteoblasztok létrehozzák a csontszövet extracelluláris mátrixának szerves állományát (az oszteoidot)

számos strukturális fehérje, regulátorprotein és enzim szecernálásával. Ha az oszteoblasztok teljesen körbeépítették magukat, metabolikusan inaktívvá válva maguk is beépülnek a csontmátrixba és oszteocitákká differenciálódnak. Ezen nyúlványos sejtek fő funkciója a csontokat érő mechanikus hatások érzékelése és a többi csontsejttel való kommunikáció. Az oszteoklasztok a csontbontásért felelős hemopoetikus eredetű sokmagvú óriássejtek (7). A dendritikus sejtekhez és a makrofágokhoz hasonlóan mieloid prekurból differenciálódnak (2. ábra), majd egyedi biokémiai változások és fúziójuk révén kialakul érett alakjuk (8, 9). Az oszteoklasztok fejlődéséről és működéséről részletesen szó esik az 1.3. fejezetben.



2. ábra: A csontsejtek eredete

A mezenhimális őssejtből differenciálódnak az adipociták, a strómasejtek és a később oszteoblaszttá majd oszteocitává alakuló preoszteoblasztok. A mieloid prekurborból makrofágok, dendritikus sejtek és – később oszteoklasztokká differenciálódó – preoszteoklasztok alakulnak ki.

Forrás: (11)

1.1.2. A csontátépülés

Az oszteoblasztok és az oszteoklasztok működése nemcsak a csontok kialakulásához és fejlődéséhez szükséges, hanem a felnőtt szervezet csontanyagcseréjének egyensúlyban tartásához is. Egészséges felnőttben a trabekuláris csontállomány 15%-a átépül évente, ez a folyamatosan egyensúlyban lévő oszteoblaszt és oszteoklaszt működésnek, a remodellingnek köszönhető. A csontgerendák átrendeződése ezen kívül fontos még sérülések esetén vagy megváltozott terheléshez történő alkalmazkodás során is. Ebben a folyamatban a csontot alkotó sejtek összehangolt működésére van szükség: az oszteociták a mechanikus hatásokat érzékelve stimulálják az oszteoblasztokat, amelyek citokinek és sejt-sejt kapcsolatok révén aktiválják az oszteoklasztokat. A mechanizmus pontos részleteit az 1.3-as fejezetben mutatom be. A csontfelszínen az oszteoklasztok néhány napon belül úgynevezett Howship-lakúnákat, reszorpciós üregeket hoznak létre aktív csontbontó tevékenységük következtében. A folyamat végén a sejtek elpusztulnak (10). A kialakult oszteoklaszt rágásnyomokban az odavándorló oszteoblasztok megkezdik csontépítő működésüket a szerves csontállomány beépítésével. Az aktív oszteoblasztok I. típusú kollagénben gazdag alapállományt hoznak létre, amely a szekréció után stabilizálódik (pl. kollagén keresztkötések kialakulásával). Az így létrejött fehérjemátrix mineralizációja során kalcium, foszfát és hidroxipatit mellett nátrium, magnézium, cink, fluor, citrát és bikarbonát épül be a csont sejtközi állományába. Az oszteoblasztok révén létrejövő csontképzés akár hónapokig is eltarthat (11).

A fenti folyamatok egyensúlya kritikus a szervezet megfelelő csonttömegének fenntartásához, bár bizonyos körülmények között az élettani folyamatok eltolódhatnak (pl. kalciumhiány esetén kialakuló fokozott csontbontás). Az említett funkciók szabályozásában szerepet játszó hormonok közül a parathormon (PTH) és a kalcitriol (1,25-dihidroxid₃-vitamin) az oszteoblasztokon keresztül fejti ki hatását, a kevésbé tisztázott élettani jelentőséggel bíró kalcitonin közvetlenül az oszteoklasztokra hat. E mellett még az ösztrogének, androgének és a glükokortikoidok is fejtenek ki – az oszteoblasztokon keresztül – csonthomeosztázist befolyásoló hatásokat. Ezen indirekt hatások molekuláris mechanizmusát az 1.3. fejezetben részletezem.

1.1.3. A csontanyagcserét érintő betegségek

Ha az előzőekben felvázolt egyensúly megbomlik, akkor a szervezet csonthomeosztázisa megváltozhat, ami a csontszerkezet károsodásával jár.

Az oszteoklasztok hiányában kialakuló, megnövekedett csonttömeggel járó ritka betegség az oszteopetrózis (12). Leírója után ennek egyik, idősebb korban kialakuló változatát Albers-Schönberg kórnak is nevezik. Az öröklődő betegség tünetei az oszteoklasztok csontbontó működésének hiányában kialakult magas csontdenzitás következményei: vakság, perifériás idegek bénulása, károsodott vérképzés és – paradox módon – fokozott csonttörésre való hajlam. A fiatalabb korban kialakuló esetek még súlyosabbak, akár csecsemőkori halálozáshoz is vezethetnek.

A megnövekedett csontsűrűséggel járó betegségeknek szerzett formái is ismertek. Ilyenkor az oszteoklasztok csökkent működése okozza a magas csontdenzitást. Ezekben az esetekben oszteoszklerózisról beszélünk, amely egyéb betegségekhez társul (pl. csontmetasztázis, Paget kór, oszteomielitisz, D-hipervitaminózis, hipoparatiroidizmus).

Az oszteoklasztok fokozott működése csontvesztéssel és csökkent csonttömeggel, oszteoporotikus állapottal jár (13). A primer csonttritkulás egy gyakori betegség (14), főleg idősebbekben és menopauzán túlesett nőkben jellemző. A szekunder csonttritkulás más megbetegedések mellett jön létre (pl.: hiperparatiroidizmus, Cushing-szindróma, diabetes mellitus, hipogonadizmus) vagy gyógyszer mellékhatásként (szteroidok) jelentkezik. A csökkent csontsűrűség miatt a csontok terhelhetősége csökken, azok meggyengülnek, elvékonyodnak. Ennek következtében az oszteoporotikus betegekben gyakori a patológiás törés (a csontok normál körülmények melletti, traumás hatás nélküli vagy minimális traumára bekövetkező törése), különösen a csigolyákban (15).

A rosszindulatú tüdő-, emlő- és prosztata daganatok gyakran adnak csontáttétet. Az oszteolítikus metastázisok az oszteoklasztok túlműködését okozzák, ami a súlyos csontmennyiség-csökkenéshez és csonttörésekhez vezethet (16, 17). A tumortherápiában egyre nagyobb szerepet kapnak az ismert oszteoklaszt inhibitorok (18, 19).

A reumatoid arthritis egy, a népesség kb. 1%-át érintő autoimmun eredetű ízületi megbetegedés (20), mely szintén fokozott csontvesztést okoz (21, 22). A betegség a kéz és a láb kis ízületeinek fájdalmával és funkciósökkenésével jár, progressziójával a többi

ízület is érintetté válhat. Ezen tünetek hátterében az áll, hogy az aktivált T-limfociták képesek az oszteoklasztokat stimulálni, így az immunsejtek túlműködése indirekt módon csontteróziókhoz vezet.

1.1.4. A csont- és az immunrendszer kapcsolata

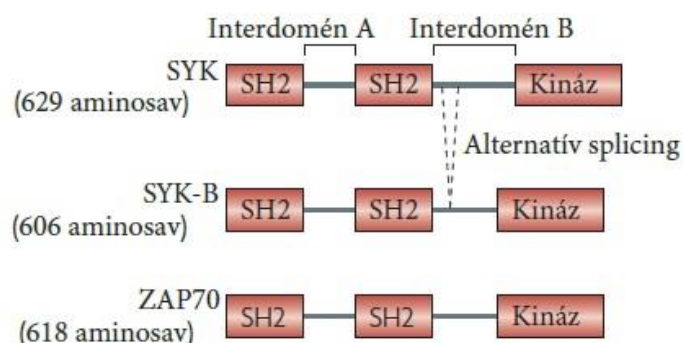
A T-limfociták és az oszteoklaszt közötti kapcsolat nem egyedülálló kommunikáció a csontszövet sejtei és az immunrendszer között, de ez a megfigyelés volt az első ezen a területen (23). További számos kísérlet erősítette meg, hogy a csontsejtek és az immunrendszer sejtei nemcsak a csontvelőben fennálló fizikai közelségük miatt vannak szoros kapcsolatban, hanem a csontvelőn kívül, parakrin jelátviteli módon is kommunikálnak egymással. Ezen eredmények hatására az oszteoimmunológia a közelmúltban már önálló tudományterületnek tekinthető (11, 24, 25). Ez az összefüggés nemcsak az egészséges szervezetben, hanem betegségek patomechanizmusában is fontos, így az oszteoimmunológia klinikai jelentősége is folyamatosan nő. A gyulladásos betegségeken túl az oszteoporózisban is megváltozik az oszteoklasztok fiziológiai működése és különböző patológiás hatásokra a csontbontás jelentősen fokozódik, komoly csontvesztést eredményezve (26, 27). Ezek a kutatások nemcsak az érintett betegségben használt gyógyszerek alkalmazási körét szélesíthetik ki, hanem segíthetnek megérteni a betegségek patomechanizmusát is. Különösen igaz ez olyan fehérjék esetén, melyek szerepe igazolt mind a csontsejtek, mind az immunsejtek jelátvitelében (pl.: a Syk és a foszfatidilinozitol-3-kinázok (PI3K-ok)).

1.2. A Syk és PI3K β fehérjék jellemzése

1.2.1. A Syk szerkezete és működése

A Syk fehérje neve a Spleen Tyrosine Kinase (Lép Tirozin Kináz) kifejezés rövidítéséből származik. A Syk (72 kDa) egy nem receptor tirozin kináz, mely alapvetően a hemopoetikus kompartmentben fejeződik ki (28, 29), azonban leírták más eredetű szövetekben is (emlőmirigy, szív, tüdő, csecsemőmirigy, bél (28, 30)). Emlős T-sejtekben és NK-sejtekben expresszálódik egy Syk homológ, a Syk fehérjecsalád másik tagja, a ZAP70 (31). Mindkét fehérje szerkezetében megtalálható két N-terminális SH2 domén

és egy C-terminális tirozin kináz katalitikus domén, valamint az ezeket összekötő interdomének (29). Alternatív splicing útján kialakulhat a Syk-B variáns, melyből hiányzik egy 23 aminosav hosszú, magi lokalizációs szignált tartalmazó (32) és magasabb ITAM-hez (immunreceptor tirozin-bázisú aktivációs motívumhoz) való affinitásért felelős szakasz (33) (3. ábra). Ezeket a variációkat leszámítva a Syk emlősökben konzervatívnak tekinthető, az irodalomban nem tesznek említést jelentősebb különbségekről a humán és egér Syk fehérje között, de vannak ismert eltérések muslicákban és hidraállatokban (29). Az értekezés során a Syk-re mint egér fehérjére utalok, a kísérletek is egereken, egérből származó sejteken történtek.



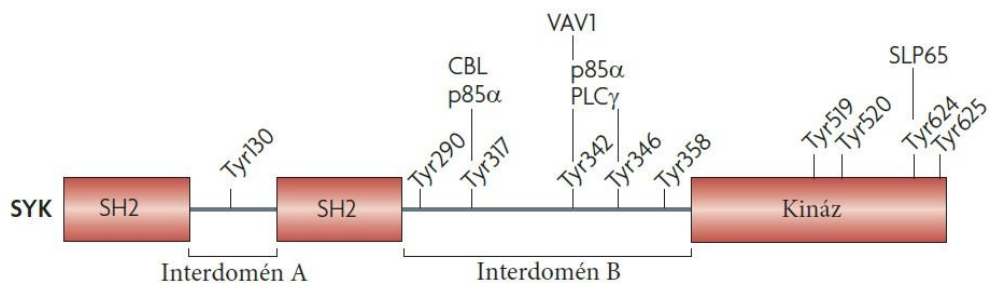
3. ábra: A Syk és homológjainak szerkezete

A Syk-ből alternatív splicing útján kialakulhat a Syk-B variáns, melyből hiányzik egy 23 aminosav hosszú szakasz. A Syk fehérjecsalád másik tagja, a ZAP70, egy T-sejtekben és NK-sejtekben expresszálandó Syk.

Forrás: (29)

Az SH2 domének alapvető fontosságúak a fehérje-fehérje interakciókban a foszforilált tirozinhoz való kapcsolódásuk miatt. A Syk SH2 doménjei különböző jelátviteli utakban szereplő ITAM szekvenciák foszfortirozinjaihoz kötődnek nagy affinitással (34). Az ITAM egy immunreceptor jelpályákban fontos konzervált szekvencia, amelynek jellegzetes aminosavsorrendje a következő: YxxL/Ix₍₆₋₈₎YxxL/I (Y: tirozin, L/I: leucin/izoleucin, x: tetszőleges aminosav.) A két négyes szekvencia között 6-8, a molekula egyéb részét képező aminosav található (35).

Az SH2 doméneket a különösen konzervatív interdomén A régió választja el, melyben egy autofoszforylációs hely található (Tyr130). Ez a B-sejt receptor aktivációjakor foszforylálódik (36) ez a Syk és ITAM disszociációját eredményezi, így feltételezhetően gátló szerepe van (37, 38). A C-terminális SH2 domént és a katalitikus domént az interdomén B régió választja el, ahol több tirozin aminosav található, ezek foszforylációja downstream jelátviteli molekulák kapcsolódására alkalmas (39-42). A katalitikus (kináz) domén szintén tartalmaz tirozinokat, melyek foszforylációja a kináz aktivitáshoz szükséges (43) (4. ábra). A katalitikus doméntól C-terminális irányban is található foszforylálható tirozinok (Tyr624, Tyr625), ezek feltehetőleg önszabályozó gátló mechanizmusokban és további downstream szignalizációban vesznek részt (44).



4. ábra: A Syk szerkezete és autofoszforylációs helyei

A Syk-en autofoszforylációs hely található az interdomén A és B régiókban, valamint a katalitikus (kináz) doménben.

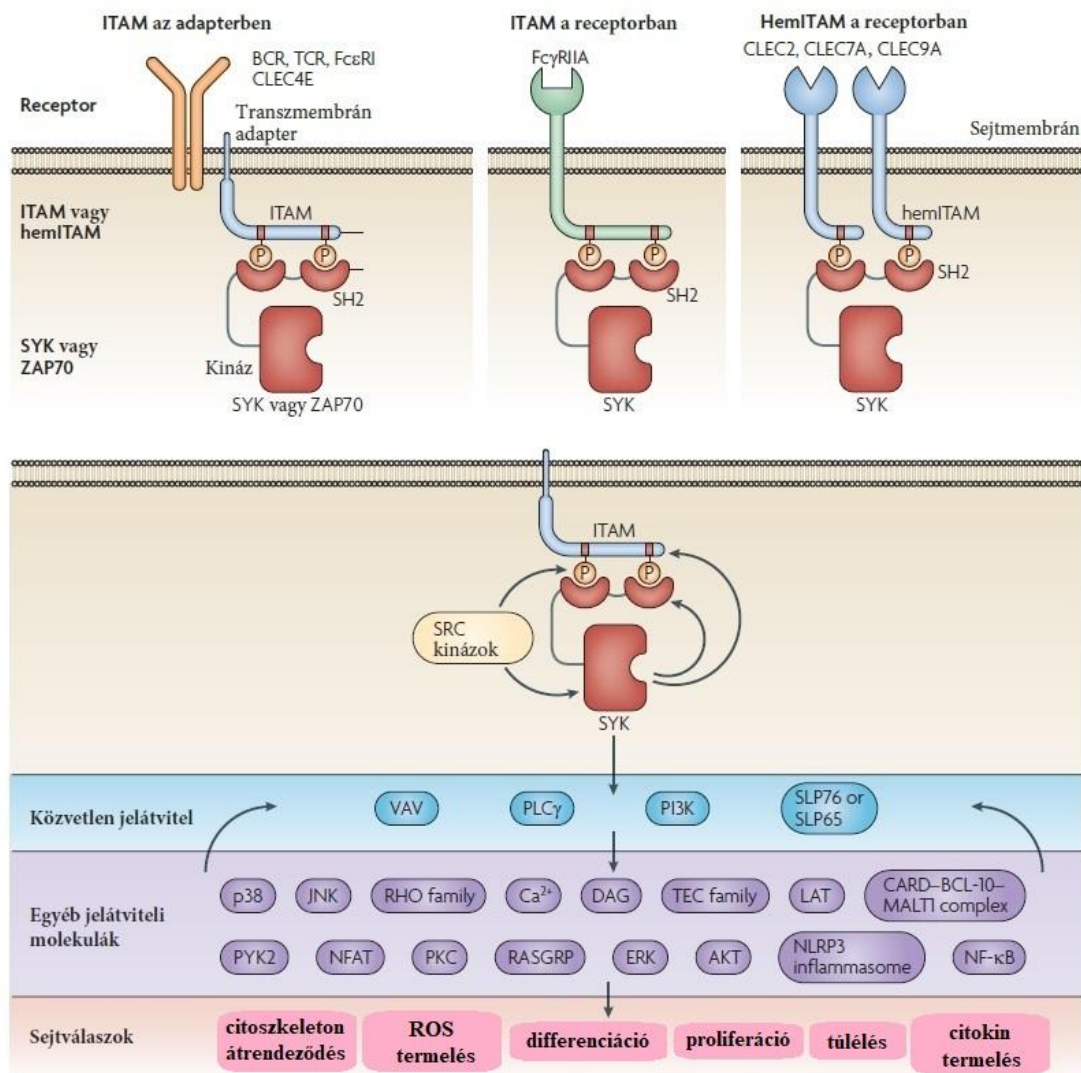
Forrás: (29)

A Syk-en keresztüli szignalizációt korábban kizárólag az adaptív immunrendszer leukocitáihoz kapcsolták, azonban mára már ismertek a Syk egyéb, nem immun funkciói is. Kimutatták jelentőségét trombocitákban (45, 46), hízósejtekben (47), nyirokér- (48) és oszteoklaszt fejlődésben (49), de adaptív immunrendszerrel nem rendelkező ecdmuslicák gliasejtjeiben is (50). A Syk kulcsszerepet játszik klasszikus immunreceptorok (Fc-receptor, B-sejt-receptor, T-sejt-receptor) downstream szignalizációjában. Az említett receptorok ligandkötése után a receptorhoz asszociált Src-kinázok aktiválódnak (51, 52), majd autofoszforyláció útján tovább fokozódik aktivitásuk (53), ez pedig a receptorokban vagy az azokhoz kapcsolódó transzmembrán adapter fehérjékben található ITAM szekvenciák tirozinjainak foszforylációjához vezet (54). Ezekkel a

foszfotirozinokkal lép kapcsolatba a Syk két SH2 doménje révén (55), melynek hatására a Syk-ben bekövetkezik egy kináz aktivitást fokozó konformációváltozás (56). A Syk autofoszforilációja tovább fokozza aktivitását és lehetővé teszi a downstream szignalizációt (34). Ez megvalósulhat SH2 domén tartalmú adapter fehérjékkel való interakció révén vagy jelátviteli molekulák (pl. Vav, PI3K, PLC γ 2) foszforilációjával, ami különféle sejtfunkciók aktiválódásához vezet (pl.: a citoskeleton átrendeződése, ROS termelés, sejt differenciáció és -proliferáció, túlélés, citokintermelés) (29) (5. ábra).

A klasszikus, ITAM-mal rendelkező immunreceptorokhoz kapcsolt jelátviteli folyamatokon kívül a Syk részt vesz egyéb szignalizációkban is, például az integrinek (57), C-típusú lektinek (58) és kemokin receptorok (59) esetén. Neutrofil granulocitákban, makrofágokban és oszteoklasztokban a β_2 -integrin jelátvitelében történő Syk aktivációhoz szükséges két ITAM-tartalmú transzmembrán adapter fehérjét azonosítottak: a DNAX aktiváló fehérje (DAP12) és az Fc-receptor γ -lánc (FcR γ) (49, 60). Az FcR γ hasonló szerepét bazofil granulociták IL-3 receptor jelpályájában is kimutatták (59). A Syk szerepét igazolták autoantitest-indukált artritiszben (61-64), C-típusú lektinek által mediált jelátvitelben patogének felismerésében (65-67) és nekrosis esetén (68) is. A Syk féléletidejéről különböző hemopoetikus sejtekben áll rendelkezésre irodalmi adat, ez a fehérje esetében 10-12 óra közé tehető, az mRNS esetén kb. 3,5 óra (69, 70).

Látható tehát, hogy a Syk számos sejtben, különböző jelátviteli pályákon változatos funkciókat tölt be, így várható a jövőben további, eddig ismeretlen szerepeinek a megismerése.



5. ábra: A Syk-mediált jelátvitel általános mechanizmusai

A Syk SH2 doménjei révén különböző receptorokban vagy azokhoz tartozó adapter fehérjékben lévő vagy ITAM vagy hemITAM szekvenciák foszfortirozinjaihoz kapcsolódik majd szerteágazó jelátviteli utakat indít be.

Forrás: (29)

1.2.2. A Syk vizsgálata

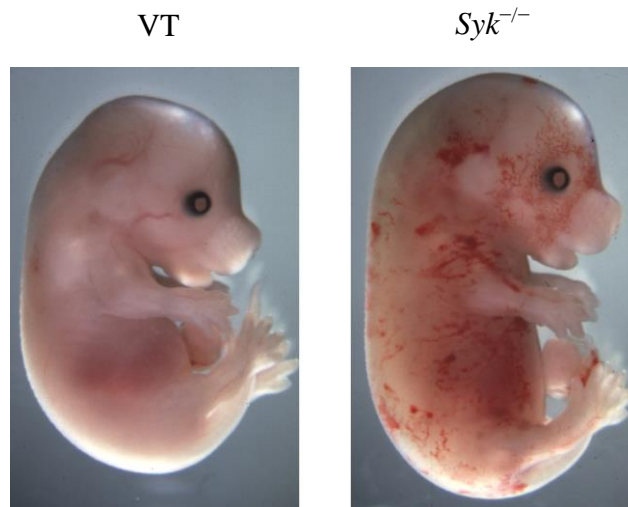
A Syk-et a '90-es évek elején már kimutatták sertéslép homogenizátumból (71), de vizsgálatát több tényező is korlátozta. A gátlószerek nem megfelelő specificitása és metabolizmusa, valamint a KO egerek csökkent túlélése mind problémát jelentettek.

Már a Syk felfedezése előtt voltak *in vitro* eredmények a piceatannol (3',4',3,5-tetrahidrox-transz-sztilbén, Astringinin; $C_{14}H_{12}O_4$) kinázgátló hatásáról (72), néhány évvel később pedig kimutatták, hogy viszonylag alacsony (a Lyn-hez képest 10-szer kisebb) IC_{50} értéke van a Syk-re (73). A piceatannolnak azonban gyors glükuronidációja miatt nem ideálisak a farmakokinetikai tulajdonságai (74).

A fostamatinib (R788; $C_{23}H_{26}FN_6O_9P$) ennél lényegesen jobb farmakokinetikai tulajdonságokat mutat, nem véletlen, hogy az utóbbi időkben a klinikai használatra legesélyesebb Syk gátlószer lett. A fostamatinib egy orálisan alkalmazott molekula, amely beadást követően R406-tá metabolizálódik a bélrendszer nyálkahártyájában, és ebben az aktív formájában a Syk gátlószereként működik (75), bár néhány degranulációs és oxidatív burst sejtmentes assayekben kapott adat szerint a fostamatinib a Lyn és a Syk gátlásában hasonló IC_{50} értéket mutatott (76). Kimutatták a fostamatinib protektív hatását kollagén-indukált artritiszben (77), az R406-ét pedig autoantitest-indukált artritiszes egérmodellben (78). Mindemellett a gátlószerek a Syk-en kívül más kinázokat is gátolnak (78, 79), ami korlátozza használhatóságukat.

A Syk a reumatoid artritisz egyik terápiás célpontja emberben is (80-82), a 2010-es évek elején több engedélyeztetési eljárás indult a fostamatinib reumatoid artritiszben és más hematológiai betegségekben való használatért, azonban a folyamatok a fázis III vizsgálatokon nem jutottak túl (81, 83). 2018-ban végül kereskedelmi forgalomba került egy fostamatinib tartalmú szer, mikor az USA Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala engedélyezte a Tavalisse klinikai alkalmazását krónikus trombocitopéniában (84, 85).

Mivel a Syk spontán mutációja nem ismert, a Syk genetikai hátterű vizsgálatára 1995-ig kellett várni, amikor két kutatócsoportnak is sikerült létrehoznia a Syk génhiányos (Syk KO, $Syk^{-/-}$) egeret, melyek perinatális letalitást, *in utero* petechiákat és károsodott B-sejt fejlődést mutattak (86, 87). Később kiderült, hogy a vizsgálatokat jelentősen hátráltató perinatális letalitást nem a petechiák miatt történik, hanem a vér- és nyirokerek szeparációjának károsodása okozza (48) (6. ábra).



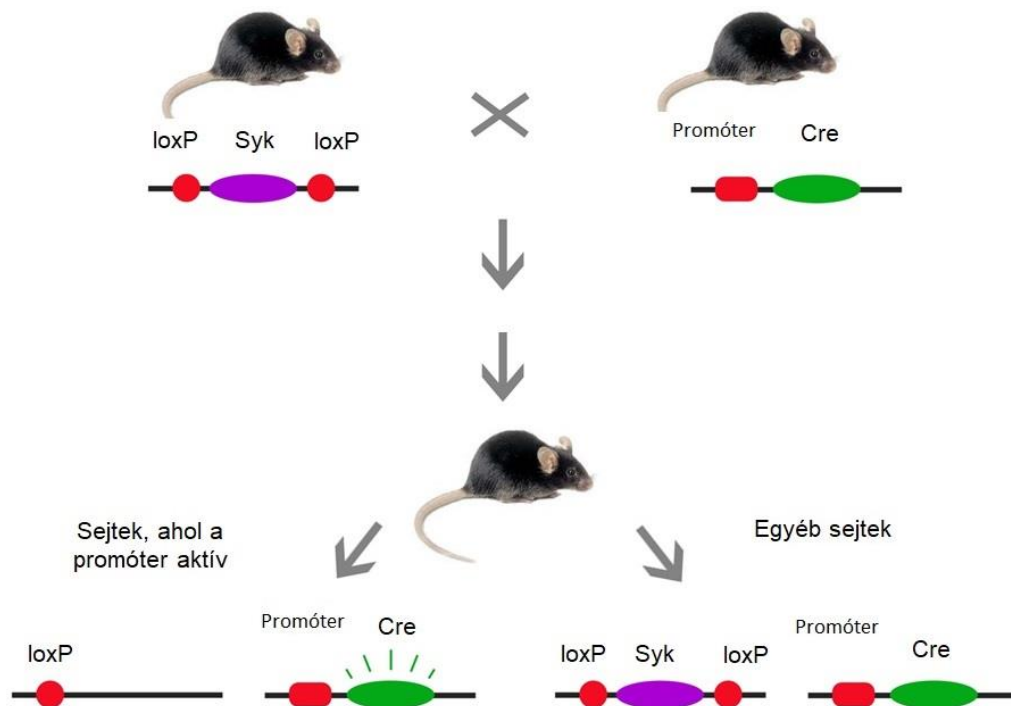
6. ábra: A vad típusú (VT) és $Syk^{-/-}$ egér embriók makroszkópikus képe az embriogenezis 17,5 napján

A Syk -hiányos egérembriókban a vér- és nyirokerek szeparációjának károsodása petechiákhoz hasonló elváltozásokat okoz.

Forrás: (61)

A korai halálozás megnehezíti a KO egerek vizsgálatát, de embrionális májtranszplantációval létrehozott ún. kiméra egerek segítségével a hemopoetikus rendszer – korlátozott keretek között – vizsgálható (61). Így sikerült leírni Syk -hiányos oszteoklasztok *in vitro* károsodott fejlődését és működését (49), makrofágok és neutrofilek csökkent fagocita funkcióját (88), valamint dendritikus sejtek antigén internalizációjának károsodását (89).

Más eredetű sejtek tanulmányozásához vagy komplexebb *in vivo* vizsgálatokhoz azonban egy ennél kifinomultabb rendszerre volt szükség. A Cre mediált kondicionális KO egerek (90) létrehozásával lehetőség nyílt szövetspecifikus és indukálható Syk törlésre (részletezve a 3.1.1. fejezetben) (52, 91, 92). A szövetspecifikus Cre kifejeződés megfelelő promóter által lehetővé teszi a Syk célzott törlését bizonyos sejttypusokban, míg azokban a sejtekben, ahol a Cre promótere nem aktiválódik, nem történik deléción. A folyamatra a megfelelő Cre promóter kiválasztásán túl nincs ráhatásunk, így a törlés időbelisége is a Cre promóterétől függ (7. ábra). A Cre kifejeződés és az általa való géntörlés hatékonysága ezért nagyban függ a választott promótertől.



7. ábra: A Cre-lox rendszer sematikus ábrázolása

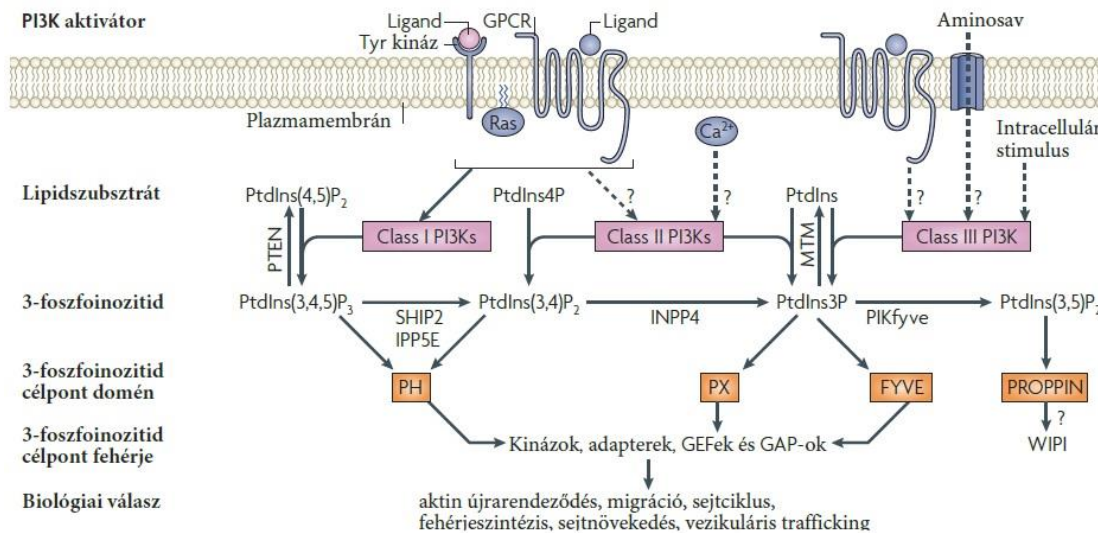
A szülők közül az egyik egér Syk génjét úgy módosították, hogy az első exon elé és mögé betettek Cre rekombinááz hasítási helyet tartalmazó loxP szekvenciákat (floxolás). A másik szülő az adott promóternek megfelelő sejtekben kifejezi a Cre rekombinázt. A későbbi generációk utódjaiban azokban a sejtekben, ahol a promóter aktív, a Cre is expresszáldódik és a Syk törlődik. Az egyéb sejtekben, ahol a promóter inaktív, nem történik törlés.

A Cre aktiválása kiváltható tamoxifen adásával indukálható módon, ha azt egy módosított ösztrogénreceptor ligandkötő doménjével fuzionáltatják (CreER^{T2}) (93). Ilyenkor a Cre expresszió és a Syk törlésének időbelisége is kontrollálható az ösztrogénreceptor-ligand tamoxifen adásával, amely felelős a receptor-Cre komplex sejtmagba jutásáért. Megfelelő szövetspecifikus promóter választásával ebben a rendszerben is limitálhatjuk a Cre expressziót bizonyos szövetekre. Problémát jelent azonban, hogy a tamoxifen – mint ösztrogén receptor antagonistá vagy adott esetben agonista – önmagában is kivált bizonyos biológia hatásokat. Agonistaként indirekt módon

gátolja az oszteoklasztokat, így adása befolyásolja a csontdenzitást (94), ami az *in vivo* csonthomeosztázis vizsgálata esetén jelentős hátrányt jelent.

1.2.3. A PI3K β szerkezete és működése

A foszfatidilinozitol 3-kinázokat (PI3K) az 1980-as évek közepén írták le először (95). Az enzimesalád tagjai különböző foszfatidilinozitolok inozitol gyűrűjének 3-as pozícióban történő foszforilálásával foszfoinozitid termékeket (PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃) hoznak létre (96). A PI3K-ok rendkívül változatos sejtfunkciókban játszanak fontos szerepet mint az aktin újrendeződés, migráció, sejtnövekedés, proliferáció, differenciáció, túlélés stb. (97) (8. ábra).



8. ábra: A 3-foszfoinozitid jelátvitel

A különböző PI3K osztályok (Class I, Class II és Class III) aktivátorai, szubsztrátjai, termékei, azok célpontjai és az általuk kiváltott biológiai válaszok.

Forrás: (97)

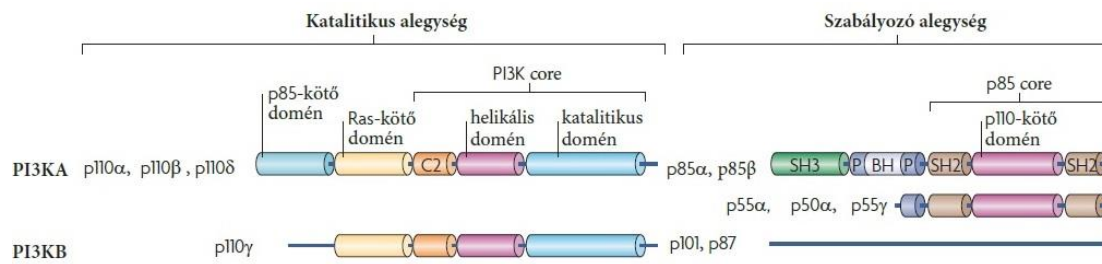
Az enzimesaládnak – szerkezeti tulajdonságai alapján – 3 klasszikus osztálya ismert (98), ezen osztályok tagjai eltérő reakciókat katalizálnak (99), sőt újabban egy strukturálisan eltérő IV. osztályt is elkülönítettek, melynek tagjai nem foszfatidilinozitolokat foszforilálnak, hanem szerin/treonin kináz aktivitással bírnak (100). A 4 osztály közül a legjobban ismert csoport az I. osztály (Class I), amely további

alosztályokra bontható: a PI3KA alosztályra, amely tagjai tirozin kináz receptorok szignalizációjában vesznek részt, valamint a PI3KB alosztályra, amely tagjai G-fehérje-kapcsolt receptorok jelpályáiban aktiválódnak (99). A PI3KA alosztály tagjai p110 α , p110 β , vagy p110 δ katalitikus alegységgel és p85 α , p85 β , p55 α , p50 α vagy p55 γ szabályozó alegységgel rendelkeznek. Ebbe az alosztályba tartozik a PI3K α , β és δ . A PI3KB alosztály tagja – a PI3K γ – p110 γ katalitikus alegységgel és p101 vagy p87 szabályozó alegységgel rendelkezik (97) (2. táblázat, 9. ábra:).

2. táblázat: A PI3K-ok csoportosítása

A különböző PI3K osztályokba (Class I, Class II és Class III) tartozó fehérjék és azok alegységei.

Osztály	Alosztály	Fehérje	Katalitikus alegység	Szabályozó alegység
Class I	PI3KA	PI3K α	p110 α	p85 α , p85 β , p55 α , p50 α vagy p55 γ
		PI3K β	p110 β	
		PI3K δ	p110 δ	
	PI3KB	PI3K γ	p110 γ	p101 vagy p87
Class II		PI3K-C2 α	C2 α	-
		PI3K-C2 β	C2 β	-
		PI3K-C2 γ	C2 γ	-
Class III		VPS34	Vps34	Vps15



9. ábra: A PI3K-ok I. osztályába tartozó tagjainak szerkezete

A PI3KA alosztály tagjai *p110α*, *p110β*, vagy *p110δ* katalitikus alegységgel és *p85α*, *p85β*, *p55α*, *p50α* vagy *p55γ* szabályozó alegységgel rendelkeznek. A PI3KB alosztály tagja *p110γ* katalitikus alegységgel és *p101* vagy *p87* szabályozó alegységgel rendelkezik.

Forrás: (97)

1.2.4. A PI3Kβ vizsgálata

A PI3K α , γ és δ izoformájáról több adat áll rendelkezésre, mint a β izoformáról, ugyanis azokban a génmódosított egerekben, ahol a PI3K β katalitikus alegysége teljesen törölt, embrionális letalitás tapasztalható (101). Ez a probléma kiküszöbölődött egy olyan egértörzs létrehozásával, ahol nem hiányzott a teljes katalitikus domén, hanem egy exon törlésével annak csak a kináz aktivitása szűnt meg, így az egerek túléltek (102).

A PI3K-ok farmakológiai alapú vizsgálatához az általános PI3K gátlószert, a gomba eredetű wortmannint használták, mellyel szemben a különböző PI3K osztályok eltérő szenzitivitással bírtak (103). Egy másik, szintetikus gátlószer, a LY294002 is mutatott (kevésbé potens) PI3K gátló hatást (104), azonban nem bizonyult kellően szelektívnek (105).

A PI3K-ok β izoformájának vizsgálatához szelektív gátlószerre vagy génmódosításra volt szükség. A TGX221 egy olyan gátlószer, amelynek IC₅₀ értéke nagyságrendekkel alacsonyabb a PI3K-ok ubikviter módon kifejeződő β izoformájának esetén (99) (3. táblázat).

3. táblázat: A PI3K I. osztályba tartozó tagjainak gátlószerei *in vitro* assay-ekben (IC₅₀, μ M)

A wortmannin és a LY294002 az általános PI3K gátlószerek közé tartozik hasonló, bár a wortmannin esetében lényegesen alacsonyabb IC₅₀ értékeik miatt. A TGX221 a PI3K β izoformára specifikus inhibitornak tekinthető.

Forrás: (99)

	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
wortmannin	0,001	0,014	0,005	0,009
LY294002	0,72	0,31	7,26	1,33
TGX221	5	0,01	3,5	0,1

1.3. Az oszteoklasztok fejlődése és működése

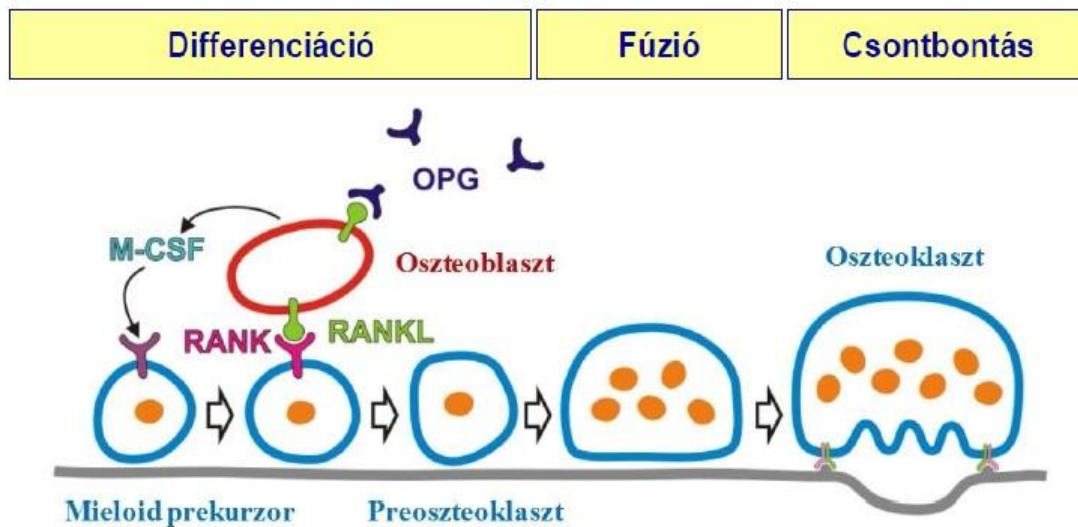
Az oszteoklasztokat, más néven csontfalósejteket, már megemlítettem az 1.1.1. fejezetben a csontot alkotó sejtek között. Mivel vizsgálataink középpontjában állnak, részletes jellemzésükre is sor kerül ebben a fejezetben.

Az oszteoklasztok hemopoetikus eredetű többmagvú óriássejtek, amelyek a mieloid előalakok egyedülálló biokémiai érésével és fúziójával jönnek létre (8, 9). Az oszteoklasztok érési folyamatának első része hasonló a makrofágok fejlődéséhez: a hemopoetikus őssejt mieloid prekursorra és makrofág-oszteoklaszt-előalakká differenciálódik. A folyamathoz elengedhetetlen az M-CSF (makrofág kolónia-stimuláló faktor) citokin jelenléte.

Ezek az előalakok a csontfelszín közelében az ott található oszteoblasztok hatására átprogramozódnak és oszteoklaszt irányba fejlődnek tovább. A folyamathoz nélkülözhetetlen az oszteoblasztokon megtalálható RANK ligand (RANKL; másnéven TNFSF11, TRANCE, OPGL, vagy ODF) és az oszteoklasztokon lévő RANK (az NF κ B receptor-aktivátora, másnéven TNFRSF11) interakciója. A RANKL nemcsak a RANK-hoz, hanem az oszteoblasztok által szecernált oszteoprotegerinhez (OPG vagy TNFSF11b) is képes kapcsolódni (10. ábra). A RANK-on keresztüli oszteoklaszt aktiváció erősségét a RANKL/OPG arány határozza meg, hiszen az OPG-hez, mint

szolúbilis decoy (csapda) receptorhoz kapcsolódott RANKL nem tudja stimulálni az oszteoklasztokat. Az oszteoklasztok indirekt, oszteoblasztokon keresztüli szabályozása is a RANKL/OPG arány változtatásával valósul meg. Parathormon, kalcitriol vagy glükokortikoidok hatására a RANKL termelése fokozódik, az OPG expressziója csökken, így a RANKL/OPG arány emelkedik, ami az oszteoklasztok aktivitásának fokozódását eredményezi. Ösztrogének és androgének hatására ezzel ellentétes folyamatoknak köszönhetően a RANKL/OPG arány – és ennek következtében az oszteoklasztok aktivitása – csökken.

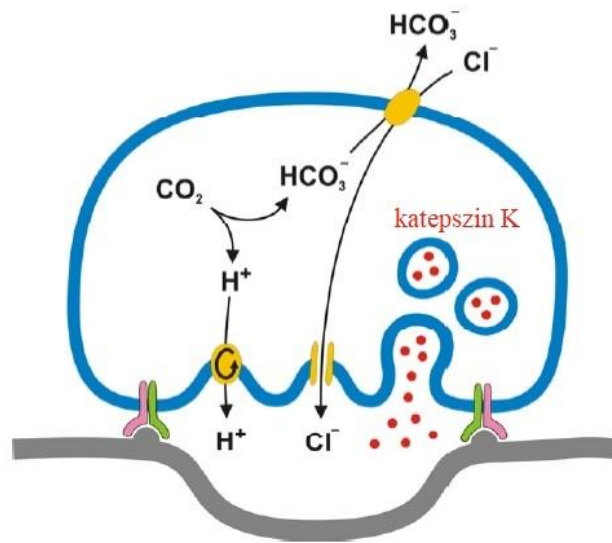
A RANK-RANKL kötődés hatására átíródnak az oszteoklasztokra jellemző és a fejlődésükben, működésükben kulcsszerepet játszó markerek: a c-Fos, az NFATc1 (aktivált T-sejt nukleáris faktor 1), az NF- κ B (nukleáris faktor κ B) és az AP-1 (aktivátor protein 1) transzkripciós faktorok, az OSCAR (oszteoklaszt-specifikus sejtheadhéziós fehérje), a TRAP (tartarát rezisztens savanyú foszfátáz), a katepszin K, az $\alpha_v\beta_3$ integrin és a kalcitonin-receptor fehérjék. A fúzióhoz nélkülözhetetlen DC-STAMP (dendritikus sejt-specifikus transzmembrán fehérje) expressziójának növekedése következtében létrejönnek az óriássejtek (106, 107). A fuzionált óriássejtek letapadása főként $\alpha_v\beta_3$ integrinen keresztül jön létre (108), ez a lépés készíti elő az oszteoklasztok csontbontó működését (10. ábra). Az említett jelátviteli utak működését a fejezet későbbi részében részletezem.



10. 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)

Az oszteoklasztok kizárólagosan felelősek a szervezetben a csontbontó funkcióért, oszteoklasztok hiányában még olyan gyulladásos környezetben sem jön létre csontbontás, ami normál esetben masszív csontvesztést eredményezne (109). Ehhez a jellegzetes funkcióhoz az oszteoklasztok szorosan a csontfelszínre tapadnak adhéziós molekulák (pl. $\alpha_v\beta_3$ integrin) segítségével. Ebben a folyamatban a citoszkeleton átrendezésével kialakuló aktingyűrű kulcsszerepet játszik. Az így kialakult környezettől elzárt kompartmentbe, a Howship-lakúnába (reszorpciós üregbe) szecernálják az oszteoklasztok a csontbontáshoz szükséges sósavat (V-típusú H^+ ATP-áz és $ClC7 Cl^-$ csatorna révén) és enzimeket (pl. katepszin K, exocitózis révén) (11. ábra:). A folyamathoz szükséges az oszteoklasztok polarizációja, a csont felé eső apikális oldal redőződésével pedig létrejön a hullámos határmembrán (ruffled border), ami biztosítja a megnövekedett felületet az intenzív transzportmechanizmusoknak. A kalciumsók kioldása és a szerves állomány lebontása után fennmaradó törmeléket a sejtek fagocitálják és megemésztik vagy transzcitózissal a bazolaterális oldalon ürítik.



11. ábra: Az oszteoklasztok működése

A polarizálódott oszteoklasztok sósavat és emésztőenzimeket (pl. katepszin K) szecernálnak az általuk kialakított zárt térbe a csontfelszínen. (Mócsai Attila rajza)

1.3.1. M-CSF által aktivált jelátvitel

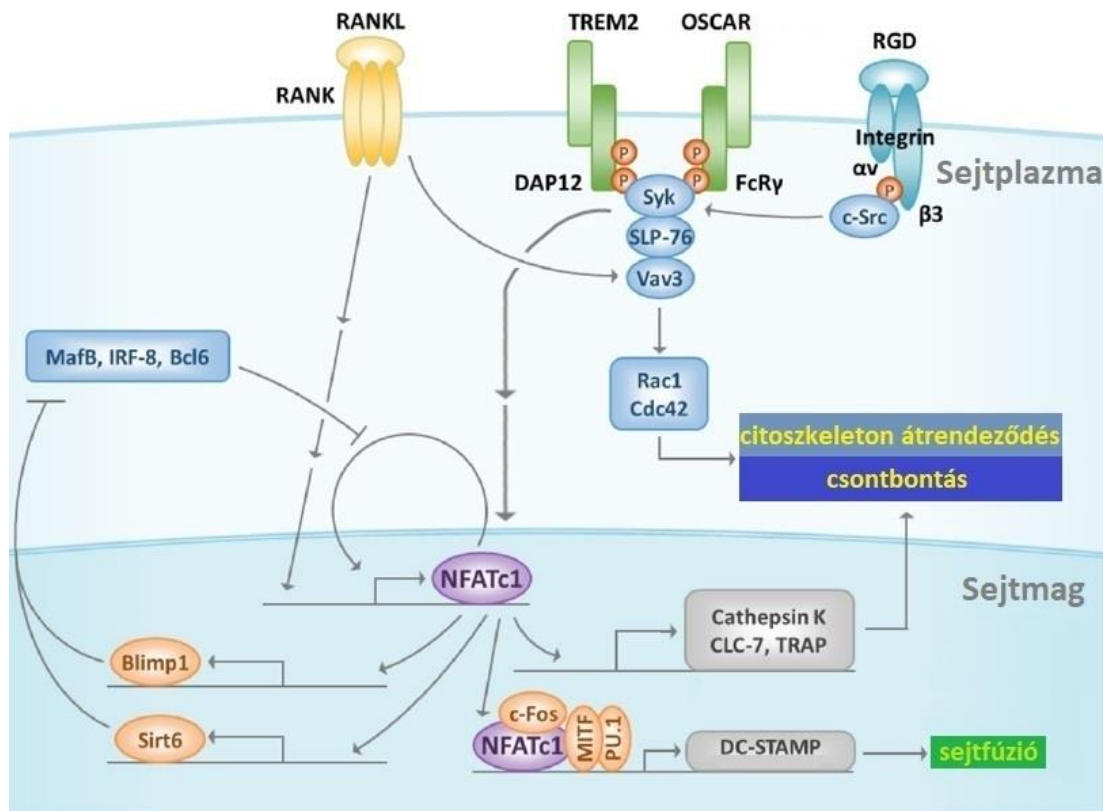
Az M-CSF (makrofág kolónia-stimuláló faktor, másnéven CSF1, kolónia-stimuláló faktor 1) kritikus jelentőségű az oszteoklasztok fejlődésében, M-CSF-hiányos egerekben súlyos oszteopetrózis alakul ki (110, 111). Az M-CSF-et az oszteoblasztokon kívül több más sejttípus is kifejezi (pl. endotél sejtek, T-limfociták, strómasejtek) (112). Az M-CSF receptora, a c-Fms megtalálható a makrofágszerű sejtekből fejlődő oszteoklasztokon, szükséges azok túléléséhez, proliferációjához és differenciációjához (113). A c-Fms a tirozin kináz receptorok közé tartozik, a ligand kötődése után kis G-fehérjéken keresztül az ERK1/2 aktiválódik, ami számos sejtproliferációhoz vezető jelátviteli útvonalat kapcsol be pl. ciklin-dependens kinázok révén (108). A c-Fms fokozza a RANK expresszióját és részt vesz a túlélési jel közvetítésében is, ami nélkülözhetetlen az oszteoklasztok további fejlődéséhez (114). A PU.1 transzkripciós faktor expressziójának növelésével a saját kifejeződését is fokozza, kialakítva egy pozitív visszacsatolási kört (115).

1.3.2. A RANKL által aktivált jelátvitel

Az M-CSF mellett az oszteoblasztok (116) (és oszteociták (117)) egy másik szabályozó molekula, a RANKL termeléséért is felelősek. Gyulladásos körülmények között T-limfociták is képesek az oszteoklasztokat ezen a jelpályán keresztül aktiválni (118). A RANKL receptora, a RANK, M-CSF hatására fejeződik ki az oszteoklasztok felszínén. Mind a RANKL-hiányos, mind a RANK-hiányos egerek súlyos oszteopetrotikus fenotípust mutatnak, ezekben az egerekben a fogak áttörése sem történik meg oszteoklasztok hiányában (23, 119).

A RANK a TNF receptor szupercsalád tagja, amelynek nincs enzimaktivitása, a ligandkötés után trimerizálódik és a TRAF6 adapterfehérje kapcsolódik hozzá, amin keresztül megtörténik a MAPK-ok, az NF- κ B és az AP-1 aktiválódása (120, 121). A következő lépésekben az NF- κ B és a MAPK-ok a c-Fos (122), az AP-1, az NF- κ B és a kialakuló kalciumoszillációk az NFATc1 aktiválódását okozzák (123). Az aktivált NFATc1 a sejtmagba jutva a saját és több oszteoklaszt-specifikus gén átírását fokozza (TRAP, $\alpha_v\beta_3$ integrinek, kalcitonin-receptor, DC-STAMP, V-típusú H^+ ATP-áz, ClC7, katepszin K) (123), ezen kívül gátolja a Blimp1 és Sirt6 átírását, ezzel gátolva néhány RANKL jelpályát gátló fehérjét (MafB, IRF-8, Bcl6) (124-127).

A RANKL jelpálya mellett az NFATc1 aktivációja létrejöhet TREM-2/DAP12 és OSCAR/FcR γ ITAM tartalmú és integrin mediált jelpályákkal való kooperáció révén is (12. ábra), ami rámutat a jelpálya jelentőségére és komplexitására (122).



12. ábra: Oszteoklaszt jelpályák

Az autoamplifikált NFATc1 fokozza az oszteoklaszt differenciációért, működésért és sejtfúzióért felelős gének átírását. A Blimp1 és Sirt6 expresszió fokozásával gátolja a MafB, IRF-8, és Bcl6 negatív regulátorokat. A MTF, c-Fos, és PU.1 transzkripciós faktorokkal együttműködve a DC-STAMP serkentésével elősegíti a sejtfúziót. Az RGD tartalmú vitronektin által aktivált $\alpha_v\beta_3$ integrin jelpályán keresztül aktiválódik a c-Src, amely foszforilálja a Syk-et. A Syk a TREM-2/DAP12 és OSCAR/FcR γ jelpályákon keresztül is aktiválódhat, az SLP-76-tal és Vav3-mal komplexet alkotva aktiválja a citoszkeleton átrendeződést és csontbontó funkciókat elősegítő Rac1-et és Cdc42-t.

Forrás: (122)

1.3.3. Integrin mediált jelátvitel

Az oszteoklasztok fejlődésében és működésében a sejt-sejt kapcsolatok mellett alapvető szerepe van a sejtek extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódásának. Ismert, hogy az oszteoklasztok *in vitro* kialakulásához a RANKL és M-CSF citokineken kívül a sejtek

letapadása is szükséges (128). Az integrinek olyan transzmembrán glikoproteinek, amelyek receptorként képesek az extracelluláris mátrixhoz vagy szomszédos sejtekhez kapcsolódni. Horgonyzó szerepükön túl fontos, kétirányú kommunikációs szerepük van a sejt és környezete között (inside-out és outside-in szignalizáció). Ligand (pl. fibronectin, vitronektin, kollagén, oszteopontin) kötődésének hatására a sejtben különböző szignalizációs utak aktiválódnak (citoszkeleton átrendeződés, sejtproliferáció, túlélés, immunreakciók, csontbontás stb.). Az integrinek heterodimer szerkezetű fehérjék, amelyek két transzmembrán alegységből (α és β) állnak. Mindkét alegységnek számos altípusa ismert.

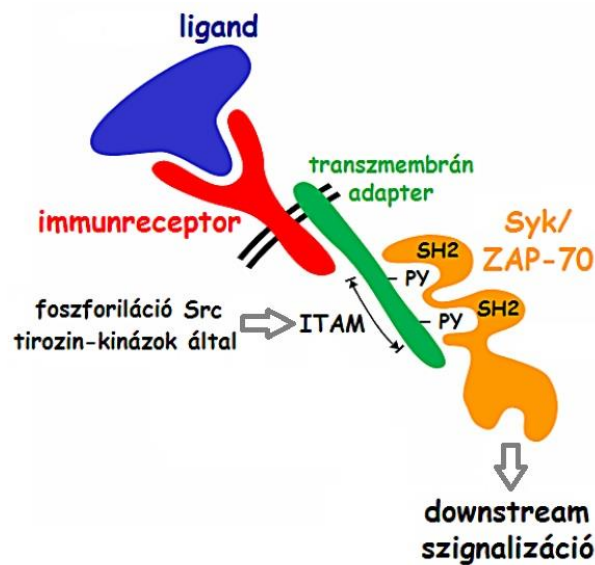
Az oszteoklasztokban az $\alpha_v\beta_3$ integrin játszik kulcsszerepet, gátlása csökkenti az oszteoklasztok csonthoz való tapadási és lebontó funkcióját (129, 130), a β_3 alegység genetikai hiánya oszteopetrózishoz vezet (131), ami *in vitro* kompenzálható nagy dózisu M-CSF-fel (132). Az oszteoklasztokban az $\alpha_v\beta_3$ integrin c-Src tirozin kináz közvetítésével aktiválja a fokális adhézis kinázokat és egyéb, csontbontáshoz vezető jelpályákat (133) (12. ábra). A c-Src-hiányos egerben nem alakulnak ki az aktíngyűrű struktúrák és oszteopetrózisban szenved (134). Az integrin mediált és az immunreceptor-szerű jelpályák közötti kapcsolat egyik fontos tényezője a c-Src aktiváció általi ITAM foszforiláció (12. ábra).

1.3.4. Immunreceptor-szerű jelátvitel

A fő klasszikus immunreceptorok (B-sejt és T-sejt receptorok, Fc-receptor) közös jelátviteli mechanizmusokat használnak (13. ábra). A receptorokhoz kapcsolódó adapterfehérjék ITAM-szekvenciákat tartalmaznak, amelyeket ligandkötés hatására Src-kinázok foszforilálnak, a foszforilált tirozinhoz SH2 domén tartalmú Syk vagy ZAP70 tirozin kinázok kapcsolódnak (ld. 1.2.1. fejezet), amelyek aktivációja további downstream szignalizációt eredményez (135, 136).

Az M-CSF, a RANKL és az adhézis jelpálya szerepe az oszteoklasztokban már régóta ismert és tisztázott, míg az immunreceptor-szerű jelpályák pontos helye az oszteoklaszt szignalizációban még nem egyértelmű.

Az ITAM tartalmú adapter fehérjékre (DAP12 és FcR γ), és a hozzájuk kapcsolódó receptorokra az említett fő oszteoklaszt jelpályák ko-stimulációs szignáljaiként tekintenek (49, 137). Ezeknek az adaptereknek nincsen extracelluláris ligandkötő doménjük, ezért egy immunreceptor molekulához kapcsolódnak. Ez a DAP12 esetén a TREM-2, az MDL-1 vagy a Siglec-15, míg az FcR γ esetén az OSCAR vagy a PIR-A, melyek közül soknak még nem ismert a ligandja (138). A TREM2 esetében az sem biztos, hogy egy vagy néhány konkrét endogén ligandról beszélünk, vagy egy olyan receptorról van szó, amely számos molekulát tud kötni aspecifikusan (139). Az OSCAR esetében az endogén ligand a kollagén I, II és III (140). Ligandkötés után az FcR γ -lánc ITAM szekvenciái foszforilálódnak, ami Syk aktivációhoz vezet (141). Az ITAM tartalmú adapterek az NFATc1 mesterregulátor aktivációjához szükséges kalcium-oszcillációt indíthatnak be, ami az oszteoklasztok differenciációjához szükséges (142) (12. ábra). Több ilyen ITAM tartalmú adapterfehérjének még nem teljesen ismert a működése (143). Abban sincs egyetértés, hogy az immunreceptor-szerű jelpálya a RANKL jelpályába (137), az M-CSF mediálta jelátviteli utakba (139) vagy az integrin szignalizációba (57) illeszkedik.



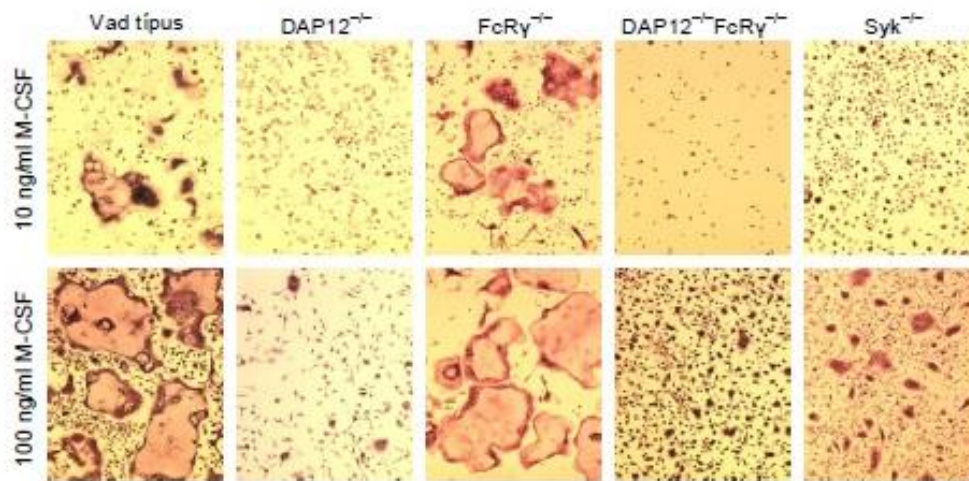
13. ábra: Immunreceptor jelpályák

Az immunreceptorok ligandkötése után a transzmembrán adapter ITAM szekvenciájában lévő tirozin aminosavak foszforilálódnak, ide kapcsolódnak a Syk és a ZAP-70 molekulák, amelyek beindítják a downstream szignalizációt.

Forrás: (57)

1.3.5. A Syk szerepe az oszteoklasztokban

Az oszteoklasztok fejlődésében nélkülözhetetlen jelpályák ITAM tartalmú adaptereket (DAP12 és FcR γ) aktiválnak, amelyek Syk-en keresztül szignalizálnak (137, 144, 145). Ezen adapter fehérjék vagy a Syk hiánya károsodott oszteoklaszt fejlődéshez és súlyos oszteopetrózishoz vezet (49, 137). *In vitro* adatok alapján elmondható, hogy a DAP12 hiányában, a DAP12^{-/-}FcR γ ^{-/-} kultúrákban, valamint a Syk hiányában jelentősen károsodik az oszteoklasztok fejlődése mind alacsony, mind magas citokinkoncentráció esetén. Az FcR γ hiánya önmagában nem okoz károsodást, de a DAP12 hiányát az FcR γ nem képes kompenzálni (49) (14. ábra).

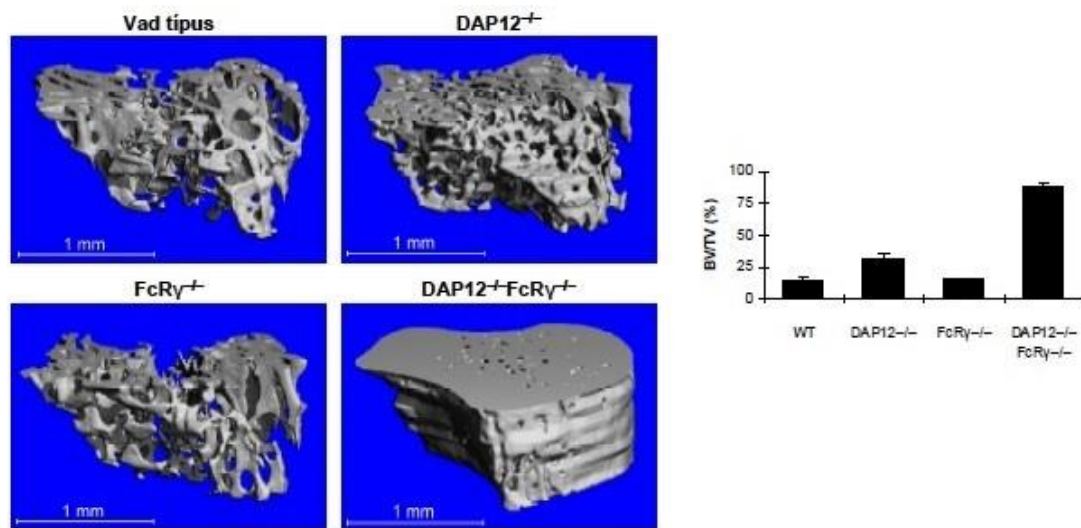


14. ábra: A DAP 12 és a Syk hiánya károsítja az oszteoklasztok fejlődését *in vitro*

A csontvelői sejtek 2 nap alacsony (10 ng/ml) koncentrációjú M-CSF kezelést követő 4 napon át tartó RANKL (70 ng/ml) és alacsony (10 ng/ml) vagy magas (100 ng/ml) koncentrációjú M-CSF kezelés hatására oszteoklaszt irányba differenciálódnak. Az ábrán az oszteoklasztok lilás színű, többmagvú óriássejtekként láthatóak. A DAP12, a DAP12 és FcR γ együttes, valamint a Syk hiányában jelentősen károsodik az oszteoklasztok fejlődése mind alacsony, mind magas citokinkoncentráció jelenlétében csökken az oszteoklasztok száma és mérete, az FcR γ hiánya nem okoz ilyen károsodást.

Forrás: (49)

Az *in vitro* eredményekkel részben ellentmondanak az *in vivo* megfigyelések. A mikro-CT felvételek azt mutatják, hogy a DAP12 FcR γ -ral való együttes hiánya esetén a csontdenzitás-növekedés robusztus, míg ez a változás kevésbé jelentős a DAP12 hiányos egerekben, ahol feltételezhető az FcR γ részleges kompenzáló hatása. Az FcR γ -hiányos egerek csontsűrűsége nem növekedett a kontrollhoz képest (49) (15. ábra). A Syk $^{-/-}$ egerek embrionális letalitása miatt erről a genotípusról *in vivo* adat nem áll rendelkezésre, mert az egerek nem érték el az ehhez szükséges 7-10 hetes kort. Ezen egerek csontszerkezetének vizsgálatát csak embriókon próbálták kivitelezni (146).



15. ábra: A DAP12 és az FcR γ hiánya oszteopetrózt okoz *in vivo*

Különböző genotípusú egerek tibiáit mikro-CT analízisnek vetették alá. A 3D rekonstrukciós képen látható trabekuláris szerkezet (bal oldal) és a kvantitatív analízisen (jobb oldal) is azt mutatja, hogy a DAP12 hiánya csontdenzitás-növekedést okoz, míg a FcR γ hiányában nem tapasztalunk csontsűrűség növekedést, de együttes hiányuk esetében a változás még robusztusabb.

Forrás: (49)

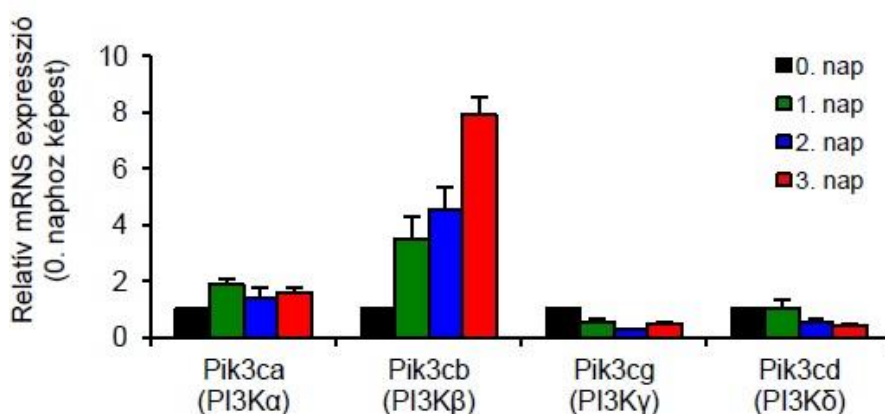
A Syk oszteoklaszt működésben betöltött szerepe más jelpályák vizsgálatakor is felmerült. Az $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediált jelátvitelben is kimutatták a Syk jelentőségét (146, 147). A Syk aktivációja szükséges az oszteoklasztokban kulcsfontosságú citoskeletális átrendeződéshez is (144, 146). A Syk gátlása protektív hatású lehet különböző csontvesztéssel járó modellekben mint a reumatoid artritisz vagy a kollagén indukálta artritisz (148). Ezek alapján kiemelt fontosságú, hogy a Syk szerepét tisztázzuk az *in vivo* csonthomeosztázisban.

1.3.6. A PI3-kinázok szerepe az oszteoklasztokban

Az általános PI3K gátlószer wortmannin oszteoklasztogenezist gátló hatását már a '90-es évek közepén kimutatták (149, 150). Később a kevésbé potens LY294002 hasonló hatását is leírták (151). A p85 α -hiányos egerekben is károsodott az oszteoklasztogenezis (152),

így felmerült a PI3KA alosztály jelentősége, munkacsoportunk pedig leírta ezen alosztály egyik tagjának, a PI3K β izoformának a szerepét (153). A projekt bővebb kifejtésére – dr. Győri Dávid eredményei alapján – részben ebben a fejezetben, az általam végzett kísérletek esetén pedig az eredmények fejezetben kerül sor.

A PI3K izoformák közül a PI3K β mutatta a legmagasabb mRNA expressziót oszteoklaszt kultúrákban, így ennek az izoformának a farmakológia és genetikai megközelítéssel történő vizsgálata került előtérbe (16. ábra).

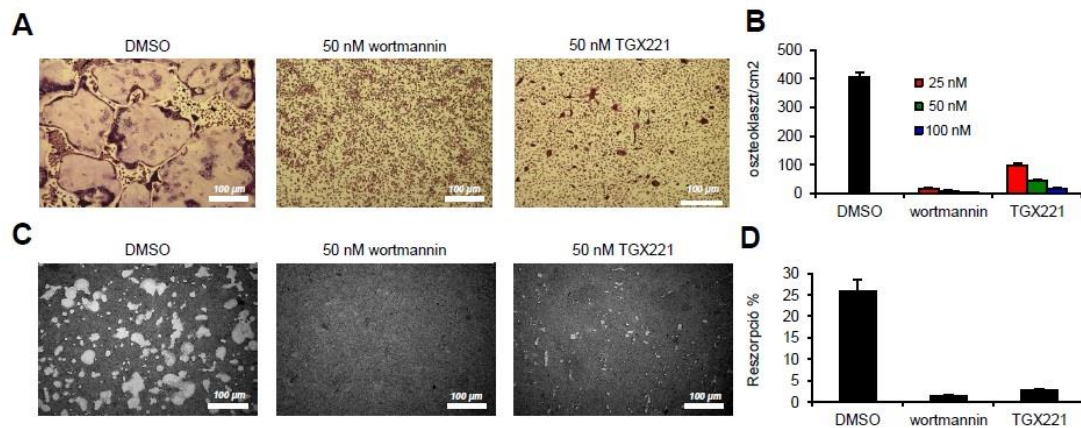


16. ábra: A PI3K izoformák mRNA expressziójának változása az oszteoklasztok érése során

In vitro oszteoklaszt kultúrákban a RANKL adását követő napokban (0-3. nap) folyamatosan nőtt a PI3K β mRNA expressziója, míg a többi izoforma szintje csökkent vagy stagnált. Átlag+SEM értékek genotípusonként 3 független kísérletből.

Forrás: (153)

A PI3K β -ra specifikus TGX221 adásakor az oszteoklasztogenezis károsodása az általános PI3K inhibitor wortmannin hatásával volt összemérhető, hasonló eltérések tapasztalhatók a funkcionális vizsgálatok során is (17. ábra).



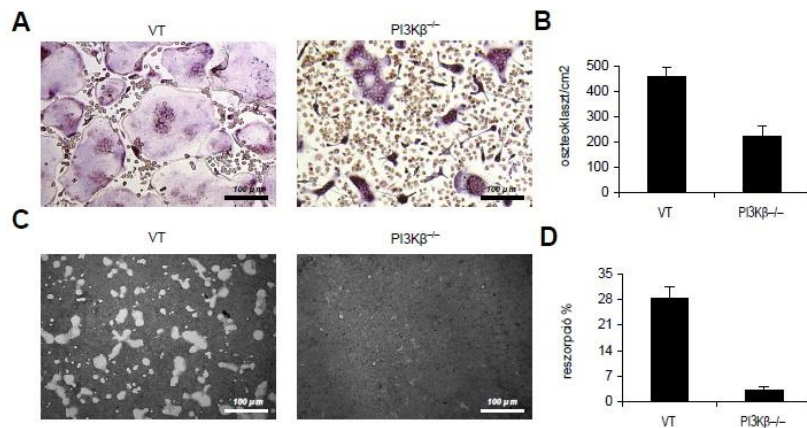
17. ábra: A PI3K β farmakológia gátlásának hatása az oszteoklasztok fejlődésére és működésére

Vad típusú egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében DMSO (vivőanyag), wortmannin (általános PI3K inhibitor) vagy TGX221 (PI3K β izoformaspecifikus gátlószer) hozzáadásával oszteoklaszt irányba differenciáltattunk. (A) TRAP-festés 3 nap differenciáltatás után. A wortmannin és a TGX221 jelentősen károsította az oszteoklasztok fejlődését. (C) Sötét látóteres mikroszkópos felvételek a hidroxipatit felszínről 11 nap differenciáltatás után (a lebontott részek világos területként jelennek meg). A wortmannin és a TGX221 jelenlétében csökkent oszteoklaszt funkciót tapasztalunk. (B, D) Kvantitatív analízis, oszteoklaszt szám és reszorpciós felszín.

Reprezentatív képek, valamint átlag+SEM értékek genotípusonként 3 független kísérletből.

Forrás: (153)

Hasonló eltéréseket mértünk a PI3K β génhiányos egerek vizsgálatakor is. Ezen egerekben az oszteoklasztogenezis jelentős mértékben károsodott a vad típushoz képest, és a mesterséges csontfelszínen okozott rágásnyomok is elmaradnak a kontrolltól (18. ábra).



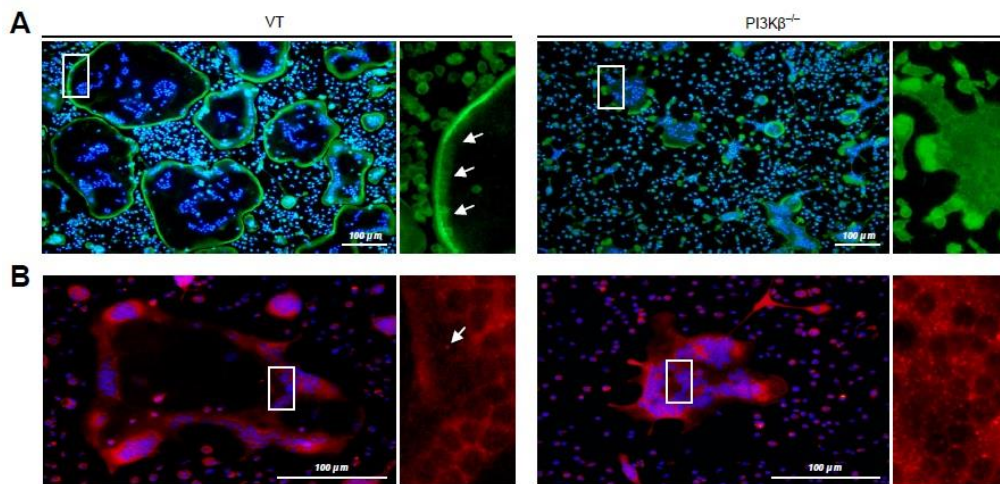
18. ábra: A PI3Kβ hiányának hatása az oszteoklasztok fejlődésére és működésére

Vad típusú és PI3Kβ^{-/-} egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltattunk. (A) TRAP-festés 3 nap differenciáltatás után (C) Sötét látóteres mikroszkópos felvételek a hidroxipapatit felszínről 11 nap differenciáltatás után (a lebontott részek világos területként jelennek meg). A PI3Kβ hiányában károsodik az oszteoklasztok fejlődése és működése. (B, D) Kvantitatív analízis, oszteoklaszt szám és reszorpciós felszín.

Reprezentatív képek, valamint átlag+SEM értékek genotípusonként 3 független kísérletből.

Forrás: (153)

A fentiek alapján elmondható, hogy a PI3Kβ szükséges az oszteoklasztok fejlődéséhez és működéséhez. Annak tisztázására, hogy ez milyen módon történik, PI3Kβ-hiányos oszteoklasztokban két jellegzetes mechanizmust vizsgáltunk meg: az aktingyűrű-képzést és a savas vezikula leadást. A 19. ábra A paneljén látható, hogy a vad típusú oszteoklasztok jelentős hányadában kialakul az oszteoklasztokra jellemző gyűrűszerű struktúra, míg a génhiányos sejtekben nemcsak a kialakult oszteoklasztok száma csökken, hanem az azokban létrejövő aktingyűrűk aránya is, az aktingyűrű-képzés szinte megszűnik. A 19. ábra B paneljén látható, hogy a vad típusú sejtekben kevés savas vezikula található, míg a génhiányos sejtekben jóval több ilyen vezikula van jelen. Vélhetően a vezikulák ürítése is károsodott a PI3Kβ-hiányos egerekben.



19. ábra: A PI3K β hiányának hatása az oszteoklasztok aktingyűrű-képzésére és savas vezikuláira.

Vad típusú (VT) és PI3K $\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői sejtek 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltatva. (A) Alexa488-falloidin festés segítségével láthatóvá tettük a sejtek aktin tartalmát. Zöld: aktin, kék: sejtmagok (DAPI festés), nyilak: aktingyűrű (B) LysoTracker Red festéssel láthatóvá tettük a sejtek savas vezikuláit. Piros: savas vezikulák, a bal oldali inzerten nyíllal megjelölve, a jobb oldali inzerten jelentős számú látható, jelölés nélkül, kék: sejtmagok (DAPI festés).

Reprezentatív képek genotípusonként 3 független kísérletből.

Forrás: (153)

A PI3K β oszteoklasztokban a TREM2/DAP12 és az M-CSF jelpályákon keresztül aktiválódik (154). Downstream a PLC γ 2, az ERK és az AKT fehérjéket aktiválja, melyek az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját, a túlélést, a proliferációt és a citoskeletális átrendeződést, valamint a vezikulatranszportot szabályozzák. Győri Dávid 2014-es cikkében leírtak szerint a PI3K β génhiányos egerekből indított kultúrák esetében nem tapasztalható károsodás a túlélésben, az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójában vagy a proliferációban, viszont kimutattuk a károsodást a vezikulatranszportban és az aktingyűrű-képzésben (19. ábra) (153). Az irodalomban a citoskeletális rendszer szabályozásáról más sejtekben és eltérő adatokat találni, egyes

források szerint a PI3K β – a Syk-hez hasonlóan - a RAC1, CDC42-et aktiválva okozza a citoskeletonális átrendeződést (155). Más forrás szerint a PI3K/AKT/MTOR jelpályán keresztül történik a szabályozás (156).

Az aktingyűrű dinamikus változásainak vizsgálata PI3K β izoformaspecifikus gátlószerrel való kezelés hatására az egyik célkitűzésem, így az ezzel kapcsolatos kísérletekről az Eredmények részben, a 4.2. fejezetben lesz szó.

2. Célkitűzések

Kísérleteim során a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- 1.) Milyen hatással van a Syk sejtvonalspecifikus törlése az *in vivo* csontanyagcserére?
- 2.) Milyen hatással van a Syk sejtvonalspecifikus törlése az *in vitro* oszteoklaszt fejlődésre és működésre?
- 3.) Mi okozza a Syk oszteoklaszt-specifikus és hemopoetikus törlése esetén tapasztalt eltéréseket?
- 4.) Milyen hatással van a PI3K β izoformaspecifikus gátlása az oszteoklasztok aktingyűrű-megtartására?

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

A kísérletek során felhasznált egerek C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkeztek. A vad típusú C57BL/6 állatokhoz saját tenyészetekből jutottunk hozzá, a kísérletek során nemben és korban megfelelő, lehetőleg alomtestvér egyedeket használtunk. Az állatokat egyedi szellőztetéssel felszerelt ketrecekben (Tecniplast) tartottuk a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Központjának (SE EOK) konvencionális vagy specifikus patogénmentes (SPF) állatházban. Az állatokat standard körülmények között, normál tápot használva tartottuk. Az *in vivo* kísérletekhez szigorúan 9 hetes egereket, az *in vitro* mérésekhez 9 hetes vagy idősebb állatokat használtunk. A Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága a Ph.D. dolgozat megírásához felhasznált állatkísérleteket jóváhagyta.

3.1.1. Syk-hiányos egerek

A *Syk* gén floxolt allélvariációját, a *Syk*^{tm1.2Tara} mutációt hordozó egerek (továbbiakban *Syk*^{flox}) Alexander Tarakhovsky (Rockefeller University) laborjából származnak (52), az egértörzset homozigóta formában tartottuk fenn (*Syk*^{flox/flox}).

A *Ctsk*^{tm1(cre)Ska} génmódosított egerekben (továbbiakban *Ctsk*^{Cre}) egy knock-in mutációnak köszönhetően egyrészt oszteoklaszt-specifikus módon, a *Ctsk* endogén promótere által szabályozva expresszálódik a Cre rekombinááz, másrészt a *Ctsk* gén inaktiválódik az adott lókuszon. Ezért ezeket az egereket heterozigóta formában tartottuk és használtuk fel (továbbiakban *Ctsk*-Cre). Az egerek Shigeaki Kato (University of Tokyo) bocsátotta rendelkezésünkre (157).

A *Commd10*^{Tg(Vav1-icre)A2Kio} transzgén mutációt hordozó egerek egy inzerciónak köszönhetően a teljes hemopoetikus kompartmentben kifejezik a Cre rekombinááz a *Vav1* exogén promótere által (158), emellett a *Commd10* gén inaktiválódik az adott lókuszon (159), így a Jackson Laboratory-ból származó egereket heterozigóta formában tartottuk fenn (továbbiakban *Vav*-Cre).

A *Ctsk*-Cre és *Syk*^{flox/flox} egerek keresztezéseskor az utódok között megjelentek a *Ctsk*^{Cre/+}*Syk*^{flox/flox} (továbbiakban *Syk*^{ΔOC}) állatok, amelyek esetén a *Syk* oszteoklaszt-specifikus törlését feltételeztük. A *Syk* teljes hemopoetikus kompartmentben való törléséhez a *Vav*-Cre és *Syk*^{flox/flox} egereket kereszteztük létrehozva a *Commd10*^{Tg(Vav1-icre)A2Kio/+}*Syk*^{flox/flox} (továbbiakban *Syk*^{ΔHaemo}) utódokat. A *Syk*^{ΔHaemo} egerek valamivel kisebbek a vad típushoz képest. A csökkent térfogatú csontvelő miatt kevesebb csontvelői sejt nyerhető ki belőlük. E mellett a *Syk* KO kiméra egerekhez hasonlóan vélhetően B-limfocita populációjuk hiányzik. Ezen kívül leírták ezen egerek nyirokváltozásait (ödéma, vérrel telt nyirokerek) (160).

A *Syk*^{flox} allél Cre mediált törlésével létrejövő törölt allél a továbbiakban *Syk*^Δ allélként szerepel.

3.1.2. PI3Kβ-hiányos egerek

A *Pik3cb*^{tm1.1Bvan/tm1.1Bvan} mutációt hordozó egerekben (továbbiakban *PI3Kβ*^{-/-}) a *PI3Kβ* p110β katalitikus alegységét módosították a gén 21-es és 22-es exonjának törlésével. Az egértörzset Bart Vanhaesebroeck (Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London) biztosította számunkra (102). A *PI3Kβ*^{-/-} hím egerek infertilitást mutattak, így a kolóniát *PI3Kβ*^{-/-} nőstény és *PI3Kβ*^{+/-} hím egerekkel tartottuk fenn. A *PI3Kβ*^{-/-} egerek csökkent testsúlyt és élettartamot mutattak (102).

3.1.3. A Lifeact-EGFP rendszer

Az oszteoklasztok működése során kritikus jelentőséggel bíró aktingyűrű kialakulásának nyomon követése fontos része az oszteoklasztokkal kapcsolatos mechanizmusok tisztázásának. A korábbi eljárás, mely során fluoreszcens falloidinnel (az F-aktinhez kötődő és azt stabilizáló toxikus anyaggal) festették meg a kultúrákat szükségessé tette a sejtek fixálását és permeabilizálását, így élő sejtek dinamikus változásait nem lehetett megfigyelni (161).

A sejtek hosszú távú, károsítás nélküli vizsgálatához Michael Sixt (Institute of Science and Technology, Klosterneuburg, Ausztria) biztosította számunkra a transzgenikus

Lifeact egereket, amelyben a Lifeact-EGFP ubikviter módon expresszálódik (162). A Lifeact egy 17 aminosavból álló peptid, ami nagy affinitással kötődik az F-aktinhoz anélkül, hogy stabilizálná vagy károsítaná azt (163), a hozzá fuzionált EGFP pedig lehetővé teszi az aktinstruktúrák dinamikájának fluoreszcens megfigyelését.

A Lifeact-EGFP transzgén állatokat $PI3K\beta^{+/-}$ egerekkel keresztezve a második generációban születtek olyan utódok, amelyek kifejezték a Lifeact-EGFP-t, de $PI3K\beta$ -hiányosak voltak.

3.2. Mikro-CT analízis

A 9-hetes egerek leölése után az állatok jobb femurját fogászati gyantával 1,5 ml-es Eppendorf-csővekben rögzítettük és mikro-CT analízisnek vetettük alá SkyScan 1172 készülék segítségével az alábbiak szerint (153, 164). A szkennelés során 70 kV és 124 μ A erősségű sugárforrást alkalmaztunk 0,5 mm-es alumíniumszűrő mellett. A mintákról 0,5°-onként készült felvétel, amiből a SkyScan NRecon szoftverrel rekonstruáltunk 5 μ m voxelméretű képeket, amelyeket Skyscan CTAn és CTVol szoftverekkel értékeltünk ki. A mintáknál azonos alsó csontdenzitás határértéket alkalmaztunk.

A kvantitatív analízis során a disztális femorális metafízist vizsgáltuk, a vizsgált terület a disztális növekedési zónától számított 50. (0,25 mm) és 400. (2 mm) réteg közötti trabekuláris állomány volt, amit manuálisan jelöltünk ki. Az itt lévő trabekuláris állományban intenzív az oszteoklasztok működése, így az oszteoklasztokban bekövetkezett változások következménye a femur disztális metafízisében tapasztalható csontdenzitás változásokon egyértelműen nyomon követhető. A következő paramétereket vizsgáltuk: relatív csonttérfogat (BV/TV), trabekulaszám, trabekulavastagság, trabekulatávolság és struktúramodell index (SMI). Az SMI a trabekuláris állomány geometriáját jellemzi, annak alakja alapján. A felszín és a térfogat alapján kiszámított paraméter a következő értékeket veheti fel: lapos elemek esetén 0, rúdszerű elemek esetén 3, gömbszerű elemek esetén pedig 4. A paraméter negatív is lehet konkáv felszínek esetében.

A reprezentatív keresztmetszeti képek a disztális növekedési zónától számított 200. rétegben (1 mm) készültek, a 3D képeken a 150. és 450. réteg közötti 500 μm átmérőjű és 1,5 mm magas tengelyirányú hengert mutatom be.

3.3. Szövettani és immunhisztokémia vizsgálatok

9 hetes egerek jobb femurjait 4%-os paraformaldehidben (Sigma-Aldrich) tároltuk, majd Osteomoll (Merck) oldatban 3 hétig dekalcináltuk. A mintákat dehidráció után a Leica EG1150H eszközzel paraffinba (Leica) ágyasztuk. Thermo Scientific HM340E mikrotómmal 8 μm -es metszeteket készítettünk, amelyeket a hisztomorfometriai vizsgálatokhoz hematoxilineozin festésekkel (Leica) kezeltünk. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során az oszteoklaszt-specifikus kalcitonin-receptor kimutatásához anti-Calcitonin Receptor (Abcam AB11042) elsődleges antitestet és anti-nyúl Alexa Fluor 488 (Life Technologies, A11034) másodlagos antitestet használtunk. A metszetekről a Nikon ECLIPSE Ni-U mikroszkóphoz csatlakoztatott Nikon DS-Ri2 kamerával készítettünk felvételeket.

3.4. *In vitro* oszteoklaszt és makrofág kultúrák, oszteoklaszt reszorpció vizsgálatok

Az *in vitro* oszteoklaszt kultúrákat a laborban beállított és megszokott módon hoztuk létre (153, 164). A vad típusú, $\text{Syk}^{\Delta\text{OC}}$ és $\text{Syk}^{\Delta\text{Haemo}}$ egerek hosszú csőves csontjaiból (femur és tibia) PBS-sel való átmosás után kinyertük a csontvelői sejteket, amelyeket α -MEM médiumban (Sigma) (10% FCS-sel (Gibco), 1% L-Glutaminnal és 1% antibiotikummal kiegészítve) 10 ng/ml rekombináns M-CSF (Peprotech) jelenlétében 2 napig tenyésztettünk. A nem letapadó sejteket 1.5×10^5 sejt/ cm^2 koncentrációban szövetkultúra-kezelt felszínre helyeztük és 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL (Peprotech) jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltattuk. Ezzel párhuzamosan hasonló körülmények között, de RANKL hozzáadása nélkül makrofág kultúrákat is létrehoztunk. A sejteken a médiumot kétnaponta cseréltük és az adott kísérletnél jelzett időpontig tartottuk fenn.

A kultúrák leállítása után az oszteoklasztokra specifikus TRAP-festést (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk. A felvételeket a Leica DMI6000B inverz mikroszkóppal készítettük, amelyeket ImageJ szoftverrel értékeltünk ki. Oszteoklasztoknak a TRAP-pozitív (lilas festődésű), legalább 3 magvú sejteket tekintettük.

Az *in vitro* csontbontásos vizsgálatok során a sejteket hasonló körülmények között differenciáltattuk oszteoklaszt irányba 7 napig mesterséges hidroxiapatit felszínen (Sigma-Aldrich), majd a sejteket 10%-os hipoklorit oldattal lemostuk. A felvételeket sötét látóteres mikroszkóppal készítettük és ImageJ szoftverrel értékeltünk ki.

3.5. Biokémiai vizsgálatok

Sejtfehérjék vizsgálata során a 3.4. fejezetben leírt módon létrehozott oszteoklaszt és makrofág kultúrákat a megadott napon leállítottuk, mosás után 10 percig kezeltük RIPA (radioimmunoprecipitation assay) alapú feltáró oldattal (a következők hozzáadásával: 0,1 U/ml aprotinin, 1:100 proteáz inhibitor komplex, 1:100 foszfatáz inhibitor komplex, 1 mM nátrium-vanadát, 1 mM PMSF (mind Sigma-Aldrich)). A teljes sejtlizátumot lecentrifugáltuk (10 perc, 15000 RPM, 4 °C), a felülúszót redukáló mintapufferben 10 percig 96 °C-on főztük. A mintákat 10%-os SDS (nátrium-dodecil-szulfát) gélen futtattuk, nitrocellulóz membránra blottoltuk (1,5 óra, 110V), blokkolás (1 óra) után Syk ellenes (N19; Santa Cruz, 1:1000, overnight, 4°C) és β -aktin ellenes (Clone AC-74; Sigma-Aldrich, 1:10000, overnight, 4°C) antitestekkel immunoblottoltuk. A megfelelő másodlagos antitestek (GE Healthcare, 1:5000, 30 perc, 25°C) adása és mosás után ECL reagensekkel (GE Healthcare) kezeltük a membránokat, a peroxidáz reakció eredményét röntgenfilmmel tettük láthatóvá. A fehérjemennyiségeket BCA protein assay (Thermo Scientific) használatával mértük le, az eredményeket ImageJ szoftver segítségével denzitometráltuk.

3.6. Génexpressziós vizsgálatok

Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának változását kvantitatív real-time PCR módszerrel vizsgáltuk (165). A 3.4. fejezetben leírt módon létrehozott oszteoklaszt és makrofág kultúrákat a megadott napon leállítottuk és TriPure reagenssel (Roche) RNS-t

preparáltunk. A reverz transzkripció az alább részletezett módon történt (153, 164). A qPCR vizsgálatokhoz a következő oszteoklaszt-specifikus TaqMan Assay-ekkel dolgoztunk: *Acp5* (TRAP; Taqman Mm00475698_m1), *Ctsk* (Katepszin K; Mm00484039_m1), *Calcr* (Kalcitonin-receptor; Mm00432271_m1), *Nfatc1* (NFATc1; Mm00479445_m1) és *Tm7sf4* (DC-STAMP; Mm04209235_m1). A Cre mRNS expressziójának méréséhez az 5'-TGACGGTGGGAGAATGTTAATC-3', forward és 5'-GCTACACCAGAGACGGAAATC-3' reverz primereket használtuk. Az értékek normalizálásakor a *Gapdh* (GAPDH; Mm99999915_g1) háztartási génhez viszonyítottunk. A relatív génexpressziók meghatározása során komparatív Ct módszert használtunk.

3.7. DNS szekvencia analízis

A *Syk*^{flox} allél nukleotidszekvenciájának pontos meghatározásához amplifikáltuk a *Syk* 1. exonjától 5' és 3' irányba eső loxP szekvenciák környezetét. Ehhez az 5'-GCC CGT TCT GTG CCT ACT GG-3' forward és az 5'-TAG CTA ACC AAA CCC ACG GC-3' reverz primereket, valamint az 5'-CCA AAG CGG AGT CCT CAC AT-3' forward és az 5'-GTC GGT CCC ATC TTT CC-3' reverz primereket használtuk. A PCR termékeket a Microsynth szekvenálta és a kapott nukleotidsorrendet beillesztettük a *Syk* gén ismert, vad típusú szekvenciájába, így megkapva a *Syk*^{flox} allél nukleotidszekvenciáját.

3.8. Genomiális PCR analízis

A 3.4. fejezetben leírt módon létrehozott oszteoklaszt kultúrákat a megadott napon leállítottuk, átmosás után genomiális DNS-t izoláltunk, amelyet standard PCR reakcióval vizsgáltunk (166).

Két különböző PCR assay-t használtunk, a PCR 1 reakcióban az 5'-GCC CGT TCT GTG CCT ACT GG-3' forward primert (P fwd) és az 5'-TAG CTA ACC AAA CCC ACG GC-3' reverz primert (P rev1) alkalmaztuk, hogy megkülönböztessük a *Syk*⁺ és *Syk*^{flox} alléleket (234 és 349 bp hosszú termékek). A PCR 2 reakció során, ugyanazt a P fwd forward primert és az 5'-GTC GGT CCC ATC TTT CC-3' reverz primert (P rev2)

használtuk a Syk^+ , Syk^{flox} és Syk^{Δ} allelek megkülönböztetéséhez (1314, 1560 és 452 bp hosszú termékek).

3.9. Aktingyűrű-vizsgálatok

A 3.1.3. fejezetben részletezett módon sikerült létrehozunk olyan állatokat, amelyek citoskeletális struktúráinak változását fluoreszcens mikroszkópiával hosszabb ideig nyomon tudtuk követni. A 3.4. fejezetben leírt módon létrehozott oszteoklaszt kultúrák sejtjei 3 nap RANKL kezelés után létrehozták a jellegzetes aktingyűrű struktúrákat. Ekkor a sejtekhez 50 nM TGX221 PI3K β -specifikus gátlószert vagy a vivőanyagot, dimetil szulfoxidot (DMSO-t) adtunk. A felvételeket a Nikon BioStation IM- Q eszközzel rögzítettük.

3.10. Statisztikai analízis

A kísérleteket az ábrák leírásában jelzett, egymástól független elemszámmal végeztük el. Az ábrákon az eredmények átlaga és azok standard hibája (SEM) látható. A mikro-CT mérések eredményeit kétutas ANOVA módszerrel értékeltük ki, ahol a független paraméterek a megfelelő Cre jelenléte a genomban és a Syk gén VT vagy floxolt variációja voltak. Ezekben a kísérletekben így négyes csoportokban vizsgáltuk az egereket, a 4 genotípus: 1.) vad típus, 2.) $Syk^{flox/flox}$. 3.) Cre (Ctsk-Cre vagy Vav-Cre) 4.) szövetspecifikus KO ($Syk^{\Delta OC}$ vagy $Syk^{\Delta Haemo}$). Mivel itt a 4 genotípust nem lehet egyértelműen 2 csoportba osztani, így a p értékeket nem az ábrán, hanem a szövegben jeleztük. A többi mérés során egyutas ANOVA módszert alkalmaztunk Tukey vagy „Unequal n HSD” post hoc analízissel. A morfológiai méréseknél az időbeli kinetikák összehasonlításához a függvény alatti területeket (area under the curve (AUC)) vettük figyelembe. A statisztikai analízishez a Statistica 8.0 szoftvert (Statsoft) használtuk. A 0,05 alatti p értékeket tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

Értekezésem következő részében a bevezetés fejezetben említett Syk és PI3K β fehérjékkel kapcsolatos eredményeket fogom bemutatni. Mindkettő fehérje oszteoklasztokban betöltött alapvető szerepéről voltak már adataink, melyek alapján további vizsgálatokat végeztünk.

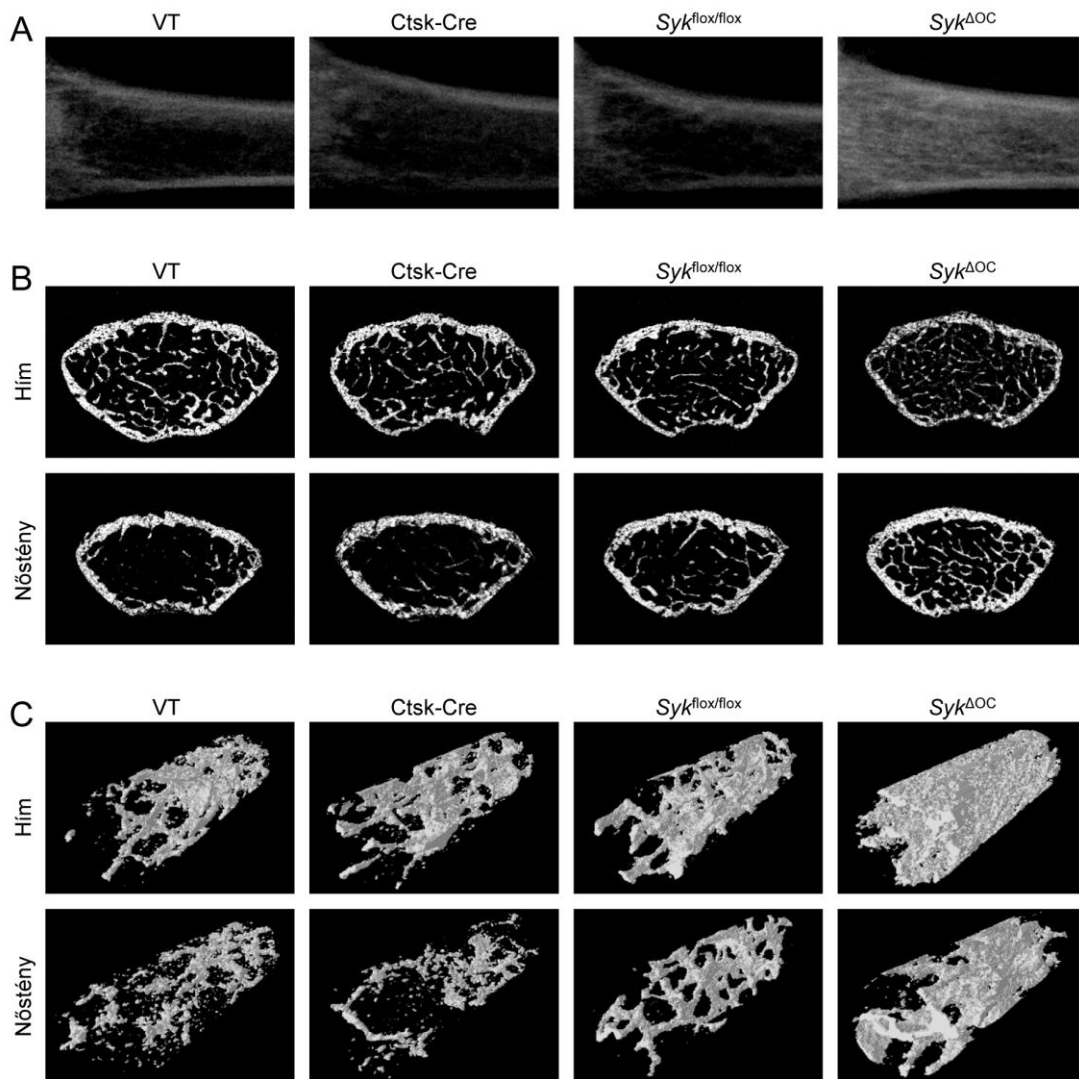
4.1. A Syk szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és az *in vivo* csonthomeosztázisban

Az itt bemutatott eredményeket 2019-ben a *Frontiers in Immunology* folyóiratban publikáltuk.

4.1.1. Mikro-CT – oszteoklaszt-specifikus Syk törlés

A Syk^{-/-} egerek perinatális letalitása miatt kifejlett Syk^{-/-} egereken eddig technikailag nem volt megoldható a csontstruktúra vizsgálata. Ennek kiküszöbölése céljából hoztuk létre a Syk ^{Δ OC} és Syk ^{Δ Haemo} egereket (lásd 3.1.1. fejezet), amelyeket mikro-CT analízisnek vetettünk alá.

A Syk ^{Δ OC} egerek és azok megfelelő kontrolljainak reprezentatív felvételeit a 20. ábra mutatja. Az A panel hosszanti felvételein látszik, hogy a Syk ^{Δ OC} nőstények trabekuláris állománya jelentősen sűrűbb a vad típusénál, amelyhez hasonló csontdenzitást mutatnak a Ctsk-Cre és Syk^{flox/flox} kontroll állatok. A B panel keresztmetszeti képei alapján is elmondható, hogy a Syk ^{Δ OC} egerek csontsűrűsége nagyobb, de a Ctsk-Cre és Syk^{flox/flox} egereké hasonló, mint a vad típusé. A C panelen mutatott 3D rekonstrukciós képek is prezentálják ezeket a különbségeket.



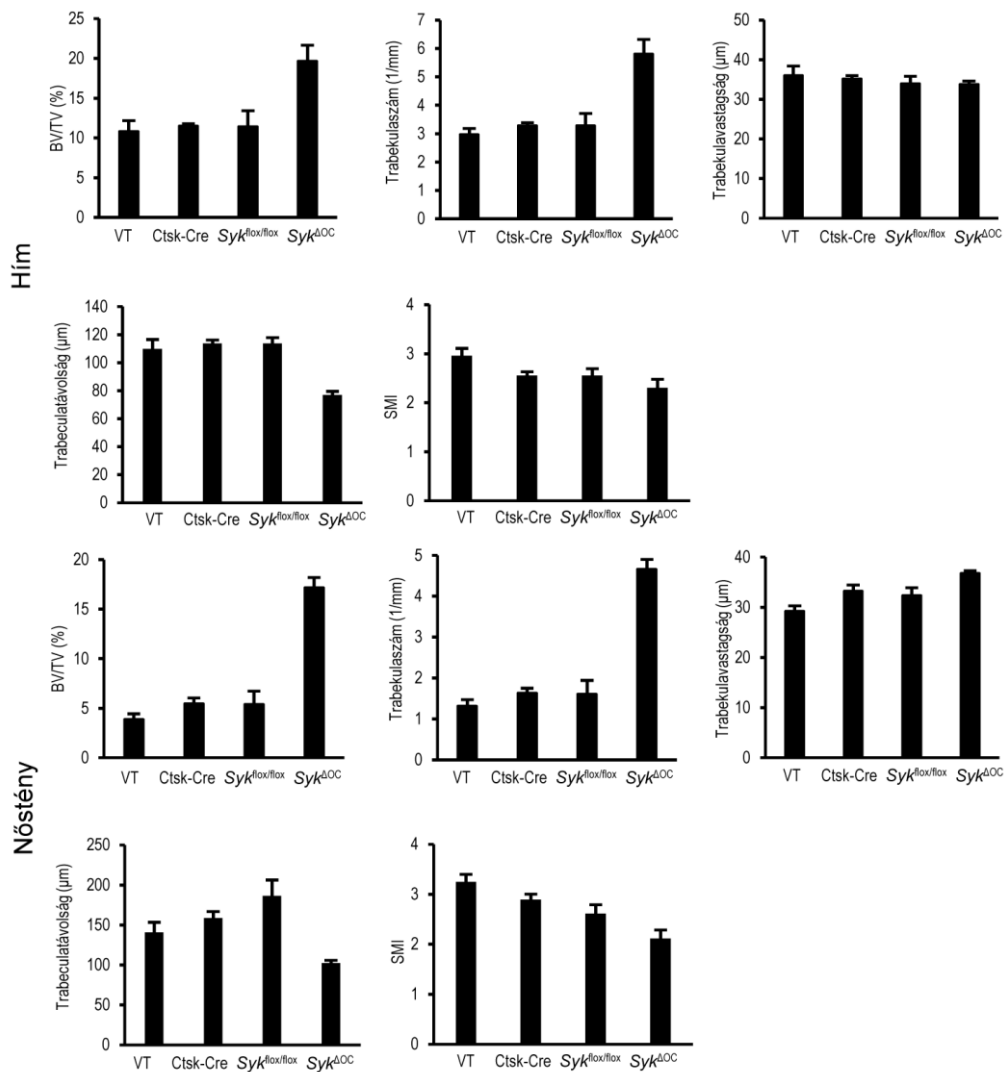
20. ábra: Oszteoklaszt-specifikusan Syk-hiányos egerek mikro-CT analízise

Reprezentatív mikro-CT felvételek 9 hetes vad típusú (VT) és génmódosított egerek femurjáról. (A) Hosszmetszeti képek nőstény egerek femurjáról. (B) Keresztmetszeti képek hím és nőstény egerek femurjáról. (C) Hím és nőstény egerek femurjainak disztális metafizisének 3D rekonstrukciója. Reprezentatív képek nemként és genotípusonként 5 független kísérletből.

A mikro-CT felvételek kvantitatív analízise (21. ábra) azt mutatja, hogy a relatív csontmennyiség (BV/TV, bone volume/total volume) jelentősen megnőtt a Syk^{ΔOC} egyedekben, míg a Ctsk-Cre és Syk^{flox/flox} állatok esetén nincs számottevő különbség a vad típushoz képest. A hím egereknek alapvetően majdnem háromszor magasabb a BV/TV értéke, mint a nőstényeké, de a Syk^{ΔOC} genotípus esetén bekövetkező változás

mindkét nemben látványos a kontrollhoz képest (nőstényekben több, mint négyszeres, hímekben közel kétszeres növekedés). A 3.10. fejezetben leírtak szerint kétutas ANOVA statisztikai analízist használtunk, amely szerint a két mutáció (Ctsk-Cre és $Syk^{flox/flox}$) együttes előfordulása ($Syk^{\Delta OC}$) szignifikáns különbségeket okozott hím ($p = 0,028$) és különösen nőstény ($p = 0,00005$) egerekben. Szintén szignifikáns eltérést tapasztaltunk a trabekulaszámban ($p = 0,0069$ és $0,00001$) és a trabekulatávolságban ($p = 0,00032$ és $0,0011$), de nem találtunk szignifikáns eltérést sem a trabekulavastagságban ($p = 0,85$ és $0,87$), sem a trabekulák alakját jellemző SMI értékben ($p = 0,61$ és $0,65$).

Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus törlésekor bekövetkező trabekuláris csonttömegnövekedés hátterében a trabekulák megemelkedett száma áll. Bár ez a növekedés jelentős, nem éri el a korábban mért, súlyosan oszteopetrotikus $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ egerekben tapasztalt robusztus csonttömegnövekedést (49).

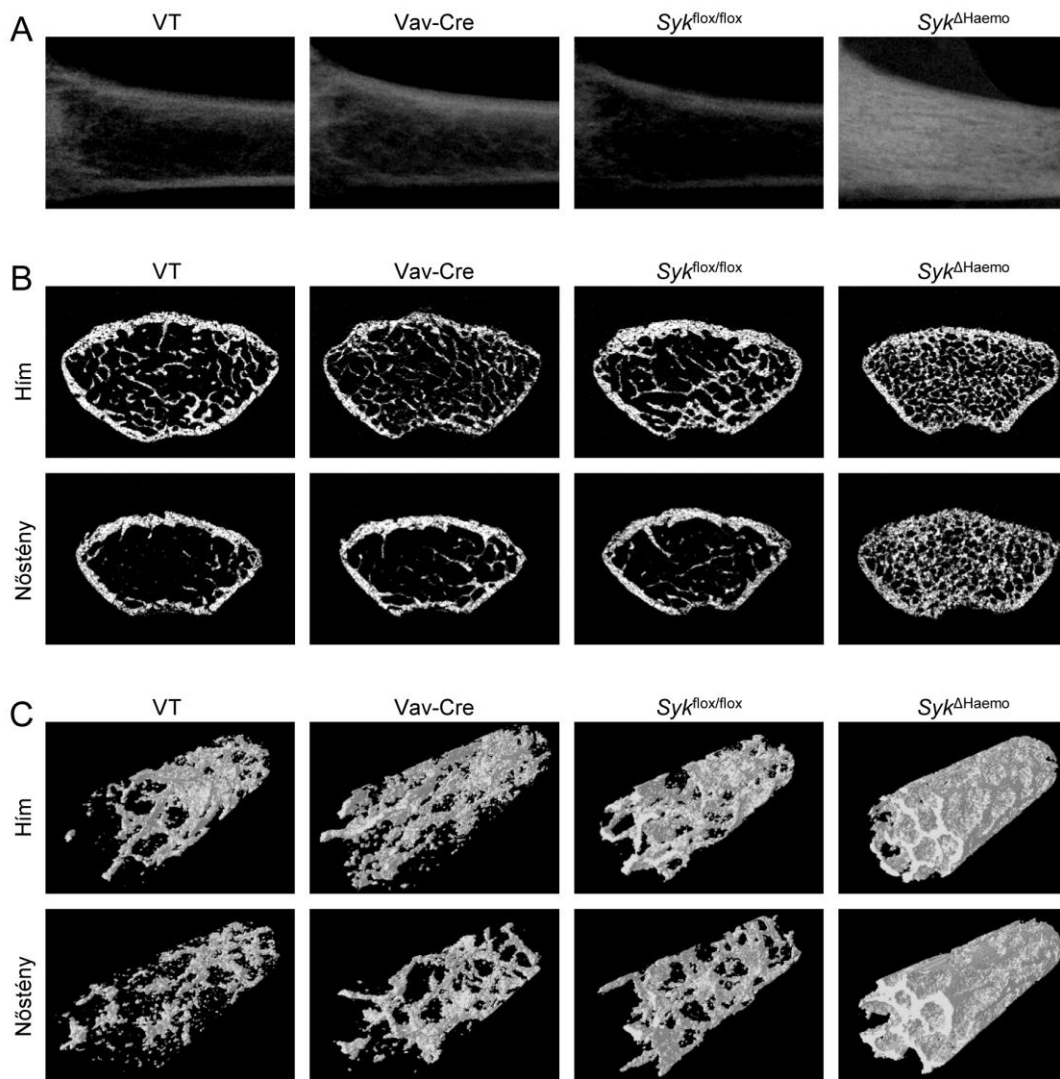


21. ábra: Oszteoklaszt-specifikusan Syk-hiányos egerek kvantitatív mikro-CT analízise

9 hetes vad típusú (VT) és génmódosított egerek femurjáról készült kvantitatív mikro-CT analízis a következő paraméterek alapján: relatív csonttérfogat (BV/TV), trabekulaszám, trabekulavastagság, trabekulatávolság és struktúramodell index (SMI). A grafikonokon átlag+SEM értékek láthatóak nemenként és genotípusonként 5 független kísérletből. A kétutas ANOVA p értékei a következők az egyes paramétereket tekintve: hímeknél: BV/TV, $p = 0,028$; trabekulaszám, $p = 0,0069$; trabekulatávolság, $p = 0,00032$; trabekulavastagság, $p = 0,85$; SMI, $p = 0,61$; nőstényeknél: BV/TV, $p = 0,00005$; trabekulaszám, $p = 0,00001$; trabekulatávolság, $p = 0,0011$; trabekulavastagság, $p = 0,87$; SMI, $p = 0,65$.

4.1.2. Mikro-CT – hemopoetikus Syk törlés

A $Syk^{\Delta OC}$ egerek $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ egerektől (49) elmaradó csonttömegnövekedése magyarázható a Syk kevésbé jelentős szerepével vagy a Syk tökéletlen törlésével $Syk^{\Delta OC}$ egerekben. Utóbbi ellenőrzése céljából a teljes hemopoetikus kompartmentben Syk-hiányos $Syk^{\Delta Haemo}$ egereken (és megfelelő kontrolljaikon) is elvégeztük a mikro-CT analízist. Ahogy az a 22. ábra felvételein látható, a hosszmetzeti és keresztmetzeti, valamint a 3D rekonstrukciós képeken is jelentős mértékű csontdenzitás-növekedést mutatnak a $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek, míg a Vav-Cre és $Syk^{flox/flox}$ kontroll állatok esetén nem látható jelentős változás a vad típushoz képest.



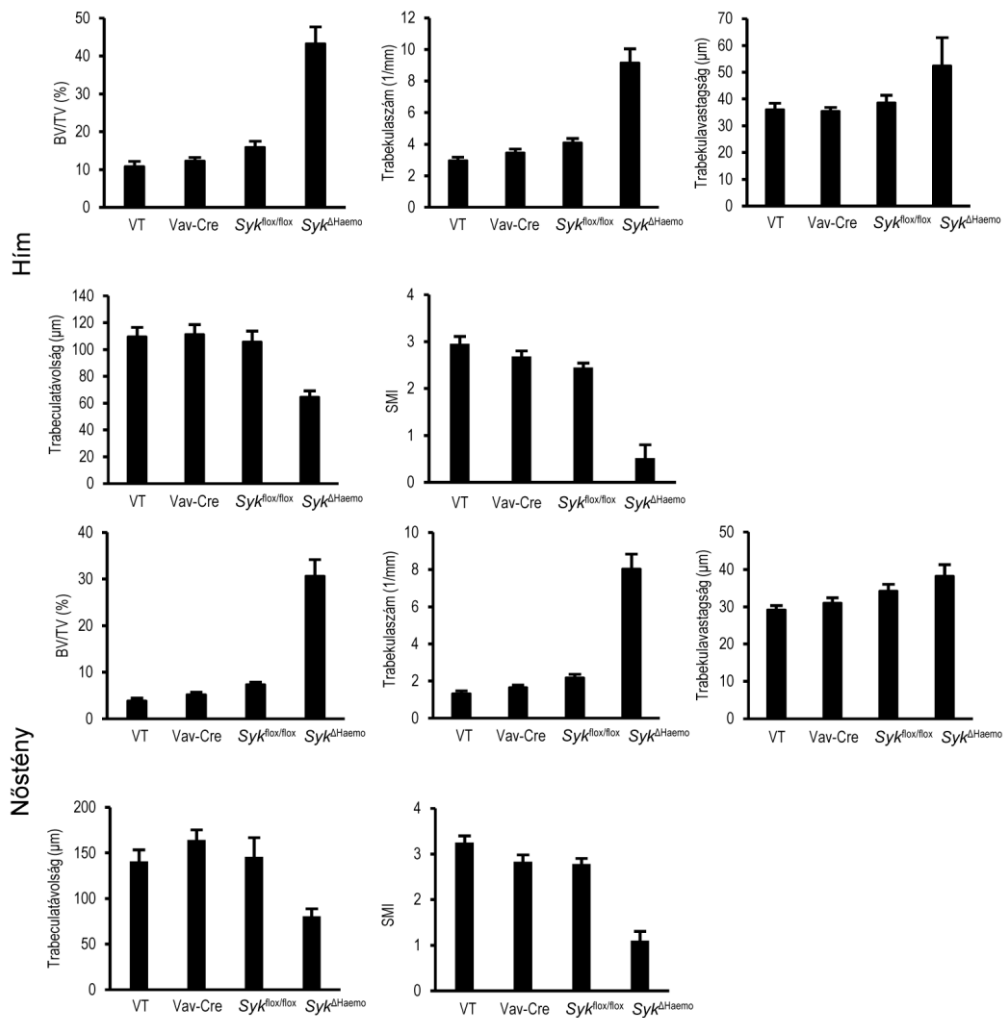
22. ábra: Hemopoetikusan Syk-hiányos egerek mikro-CT analízise

Reprezentatív mikro-CT felvételek 9 hetes vad típusú (VT) és génmódosított egerek femurjáról. (A) Hosszmetszeti képek nőstény egerek femurjáról. (B) Keresztmetszeti képek hím és nőstény egerek femurjáról. (C) Hím és nőstény egerek femurjainak disztális metafízisének 3D rekonstrukciója. Reprezentatív képek nemenként és genotípusonként 5-7 független kísérletből.

A mikro-CT felvételek kvantitatív analízise alapján (23. ábra) a hím és a nőstény $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekben is rendkívül jelentős BV/TV emelkedés történt, nemcsak a vad típusúhoz képest, hanem a $Syk^{\Delta OC}$ állatokhoz (21. ábra) képest is. Itt is a nőstény egereknél volt komolyabb a változás (négyeszeres változás hím, közel nyolcszoros változás nőstény egyedekben, $p = 0,00032$ és $0,00003$). Az oszteoklaszt-specifikus törléshez hasonlóan a

jelentős csonttömegnövekedés háttérében elsősorban a trabekulák megnövekedett száma áll ($p = 0,001$ és $0,00001$), miközben a trabekulavastagság alig emelkedett ($p = 0,31$ és $0,61$). A trabekulatávolság is csökkent ($p = 0,0045$ és $0,0071$) és az SMI érték is szignifikánsan változott ($p = 0,0007$ és $0,0012$).

Összességében elmondható, hogy a Syk teljes hemopoetikus kompartmentben való törlése számottevő növekedést okozott a trabekuláris csonttömegben, ami a Syk kritikus szerepét feltételezi az *in vivo* csontanyagcserében. A $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek fenotípusa nagyságrendileg összevethető a $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ egerekével (49), felvetve annak a lehetőségét, hogy a DAP12/FcR γ jelátvitel jelentős része a Syk-en keresztül folyik *in vivo*. A $Syk^{\Delta OC}$ egerek fenotípusában történt jelentősen kisebb BV/TV változás miatt felmerül a kérdés, hogy ezekben az egerekben mennyire megfelelő a Cre expressziója és a Syk törlése.

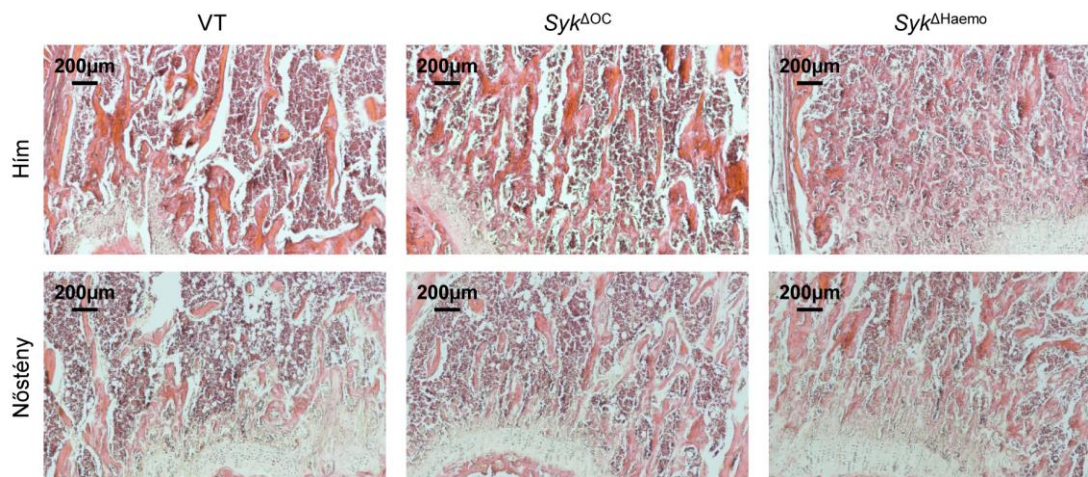


23. ábra: Hemopoetikusan Syk-hiányos egerek kvantitatív mikro-CT analízise

9 hetes vad típusú (VT) és génmódosított egerek femurjáról készült kvantitatív mikro-CT analízis a következő paraméterek alapján: relatív csonttérfogat (BV/TV), trabekulaszám, trabekulavastagság, trabekulatávolság és struktúramodell index (SMI). A grafikonokon átlag+SEM értékek láthatóak nemenként és genotípusonként 5-7 független kísérletből. A kétutas ANOVA p értékei a következők az egyes paramétereket tekintve: hímeknél: BV/TV, $p = 0,00032$; trabekulaszám, $p = 0,001$; trabekulatávolság, $p = 0,0045$; trabekulavastagság, $p = 0,31$; SMI, $p = 0,0007$; nőstényeknél: BV/TV, $p = 0,00003$; trabekulaszám, $p = 0,00001$; trabekulatávolság, $p = 0,0071$; trabekulavastagság, $p = 0,61$; SMI, $p = 0,0012$.

4.1.3. Szövettan és immunhisztokémia

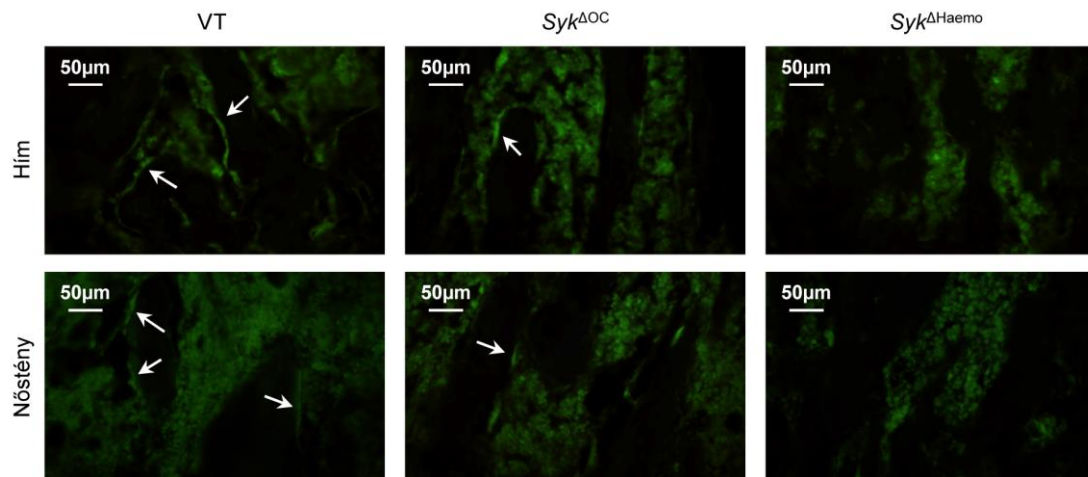
Vad típusú, $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek femurját szövettani analízisnek vetettük alá. Jóval sűrűbb trabekuláris hálózat jellemzi a $Syk^{\Delta OC}$ és főleg a $Syk^{\Delta Haemo}$ egereket, mint a vad típust. A különbség nőstény egerek esetében még látványosabb, hiszen a vad típusú nőstény egerekben a csontdenzitás eleve kisebb, mint a hímekben (24. ábra).



24. ábra: Oszteoklaszt-specifikusan és hemopoetikusan Syk-hiányos egerek szövettani analízise

9 hetes vad típusú (VT), $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek femurjainak disztális metafizisének trabekuláris állományáról készült szövettani felvételek. Hematoxin-eozin festés, 10 \times -es nagyítás. Reprezentatív képek nemenként és genotípusonként 3 független kísérletből.

Immunfestéssel vizsgáltuk az oszteoklasztok jelenlétét a trabekulákon. Ehhez oszteoklaszt-specifikus kalcitonin-receptor ellenes antitesteket használtunk. A 25. ábra alapján elmondható, hogy a vad típusú csontok sötét trabekuláin megjelennek a kalcitonin-receptor által okozott jelek (nyilakkal jelölve). Hasonló, de jóval kisebb számú jel látható a $Syk^{\Delta OC}$ metszetekben is, míg a $Syk^{\Delta Haemo}$ mintákon nem látható ilyen szignál. Ezek alapján feltételezzük, hogy a kalcitonin-receptort tartalmazó oszteoklasztok száma jelentősen lecsökkent a $Syk^{\Delta OC}$ egerekben, és szinte teljesen hiányoznak a $Syk^{\Delta Haemo}$ állatok esetén.



25. ábra: Oszteoklaszt-specifikusan és hemopoetikusan Syk-hiányos egerek immunhisztokémiai analízise

9 hetes vad típusú (VT), $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek femurjainak disztális metafizisének trabekuláris állományáról készült felvételek. Kalcitonin-receptor immunfestés, 40 \times -es nagyítás. A nyilak kalcitonin-receptor ellenes antitesttel jelölt sejtekre, valószínűleg oszteoklasztokra mutatnak. Reprezentatív képek nemenként és genotípusonként 3 független kísérletből.

4.1.4. *In vitro* oszteoklaszt fejlődés Syk hiányában

Az oszteoklasztok *in vitro* fejlődését vad típusú, $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek csontvelői sejtjeiből rekombináns M-CSF és RANKL jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltatott kultúrákon vizsgáltuk. A csontvelői sejteket először két napig alacsony (10 ng/ml) koncentrációjú M-CSF mellett tenyésztettük, majd a nem letapadó sejteket (mieloid progenitorokat) 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL hozzáadásával oszteoklaszt irányba differenciáltattuk. Különböző időpontokban végzett TRAP-festésekkel vizsgáltuk az oszteoklasztok morfológiáját a kultúrákban.

Az oszteoklasztok fejlődését a sokmagvú, TRAP-pozitív sejtek növekvő száma mutatja. Károsodott oszteoklasztogenezis esetén az oszteoklasztok száma lecsökken, szélsőséges esetben egyáltalán nem alakulnak ki ilyen sejtek. Intenzív oszteoklaszt fejlődés közben a sejtek fúziója miatt azok mérete is növekszik. Ha a fúzió gyorsabb, mint az új oszteoklasztok keletkezése, akkor intenzív oszteoklaszt fejlődés közben előfordulhat,

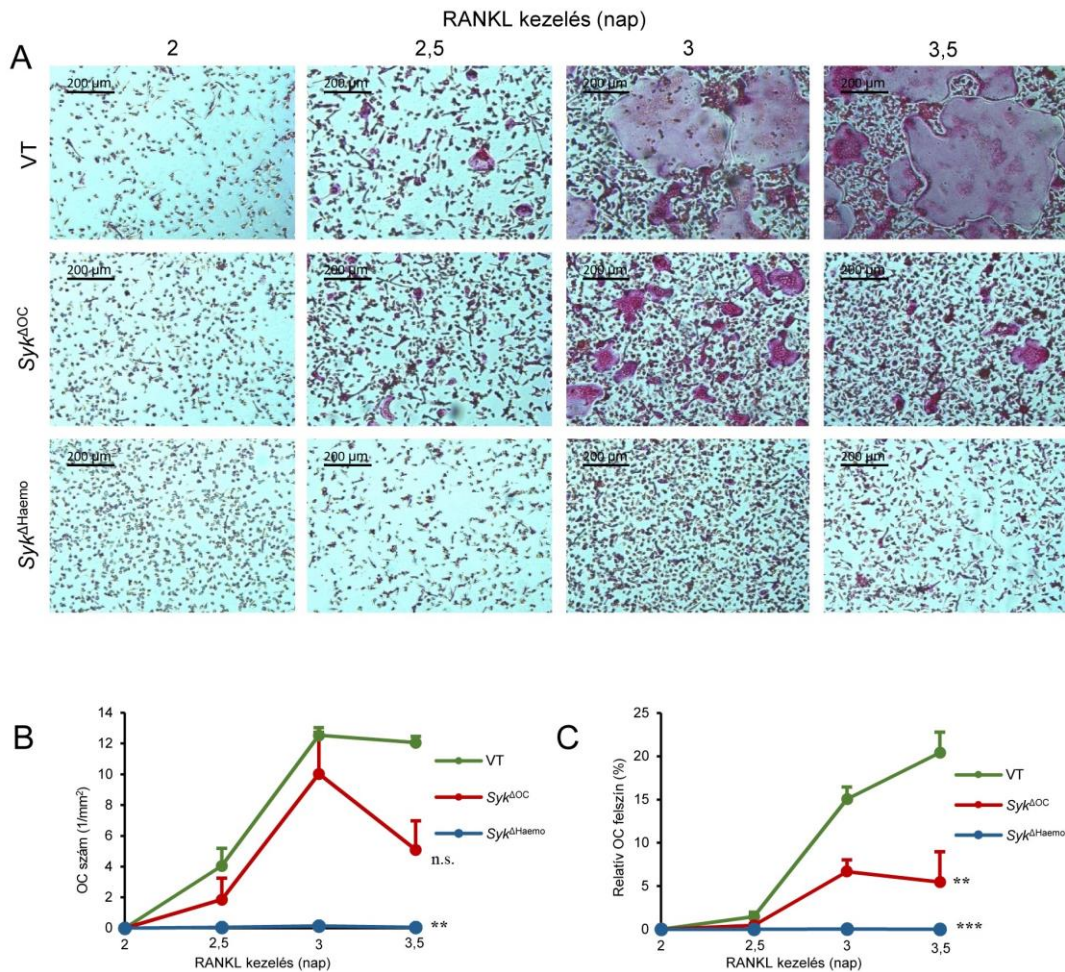
hogyan az óriássejtek kialakulása közben a sejtek összeolvadása miatt az oszteoklasztok száma csökken. Ezért az egységnyi területre jutó sejtszámok mellett a sejtek által lefedett összterületet is figyelembe vettük, így lemértük az oszteoklasztok – a well teljes felületéhez viszonyított – relatív összfelszínét is.

A 26. ábra A paneljén látható, hogy a sokmagvú, lilás színű (TRAP-pozitív) oszteoklasztok még nem jelennek meg a RANKL kezelés elkezdése utáni 2. napon. A 3. napon a vad típusú kultúrákban viszont már láthatóak az óriássejtek, amelyek mérete tovább nő a 3,5. napra. Ezekben az időpontokban a $Syk^{\Delta OC}$ kultúrák esetén is megjelennek oszteoklasztok, de azok mind számban, mind méretben elmaradnak a vad típustól. A $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrákban viszont egyáltalán nem jelennek meg oszteoklasztok.

A kvantifikált eredmények összhangban vannak a reprezentatív képekkel. A 26. ábra B és C panelje alapján elmondható, hogy vad típus esetén a RANKL adása utáni 2. napon még nincsenek oszteoklasztok, de a következő napon számuk intenzív növekedést mutat, majd a 3,5. napra enyhén lecsökken. Mivel az oszteoklasztok területe folyamatosan nő, ezért ez a csökkenés valószínűleg a nagyfokú fúzióknak tudható be. A $Syk^{\Delta OC}$ kultúrákban szintén növekszik a 3. napig az oszteoklasztok száma (hasonló értéket mutat, mint a vad típus), de utána egy drasztikusabb csökkenést tapasztalunk, és a vad típusú kultúrával szemben itt nem nő közben a sejtek összfelszíne. Ráadásul a sejtek mérete jelentősen elmarad a vad típustól, különösen a 3,5. napon, ami károsodott oszteoklasztogenezisre utal. A $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrákban gyakorlatilag nem fejlődnek oszteoklasztok, így azok összterülete is elhanyagolható.

Az adatok statisztikai analíziséhez a 26. ábra B és C paneljén látható függvények görbe alatti területét hasonlítottuk egymáshoz. Az oszteoklasztok száma esetén a vad típusú és $Syk^{\Delta OC}$ kultúrák között nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,12$), valószínűleg azért, mert az oszteoklasztok száma csak az utolsó mért időpontban csökkent jelentősen. Az oszteoklasztogenezis károsodására utal, hogy az oszteoklasztok relatív felszínét tekintve szignifikáns különbség volt a két genotípus között ($p = 0,00058$). A vad típusú és a $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrák összevetésekor mindkét paraméter esetén szignifikáns különbséget kaptunk ($p = 0,0013$ és $p = 0,00024$). Ezek az eredmények egyrészt megerősítik a Syk korábban leírt szerepét az oszteoklasztok fejlődésében (49), másrészt felvetik a Syk nem

teljes törlésének lehetőségét a $Syk^{\Delta OC}$ kultúrákban, hiszen itt nem történt teljes károsodás az oszteoklasztok fejlődésében ellentétben a $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrákkal.



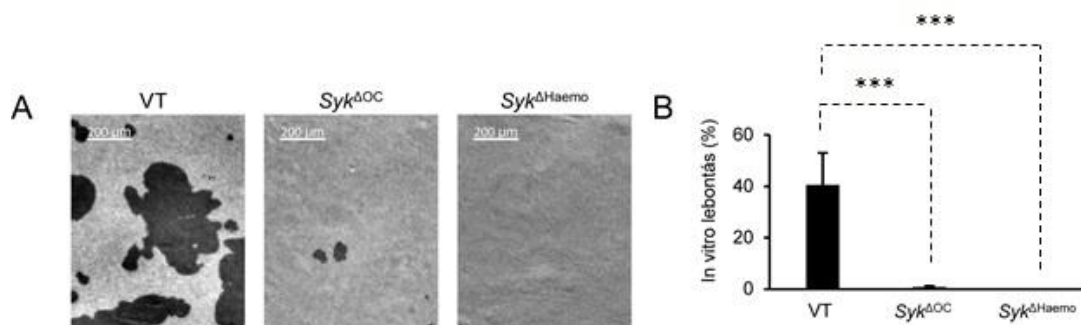
26. ábra: *In vitro* oszteoklasztfejlődés vizsgálata

Vad típusú (VT), $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltattunk a megadott időtartamig. (A) TRAP-festés, 10×-es nagyítás (B, C) Kvantitatív analízis, oszteoklaszt (OC) szám és relatív oszteoklaszt (OC) felszín. Reprezentatív képek, valamint átlag+SEM értékek genotípusonként 3-4 független kísérletből. AUC értékek: n.s.: nem szignifikáns; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,0005$

4.1.5. *In vitro* oszteoklaszt reszorpció Syk hiányában

Az oszteoklasztok *in vitro* fejlődését és működését együttesen vizsgáló módszer során a vad típusú, $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek mieloid prekursor sejtjeit mesterséges hidroxiapatit felszínen tenyésztettük 7 napig 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében. A folyamat során a kialakuló oszteoklasztok lebontják a hidroxiapatit felszínt, jellegzetes reszorpciós lakúnákat, rágásnyomokat létrehozva. A kialakult üregeket sötét látóteres mikroszkóppal vizsgáltuk.

A 27. ábra A paneljén látható, hogy a vad típusú oszteoklasztok a mesterséges hidroxiapatit felszín jelentős részét, közel felét lebontották sötét színű rágásnyomokat hagyva maguk után. A $Syk^{\Delta OC}$ esetén jóval kisebb számú és méretű rágásnyom keletkezett, míg a $Syk^{\Delta Haemo}$ sejtek esetén gyakorlatilag nem volt látható reszorpciós aktivitás. A statisztikai analízis szignifikáns különbséget mutatott a vad típushoz képest mind a $Syk^{\Delta OC}$ ($p = 0,00040$) mind a $Syk^{\Delta Haemo}$ ($p = 0,00038$) genotípus esetében.

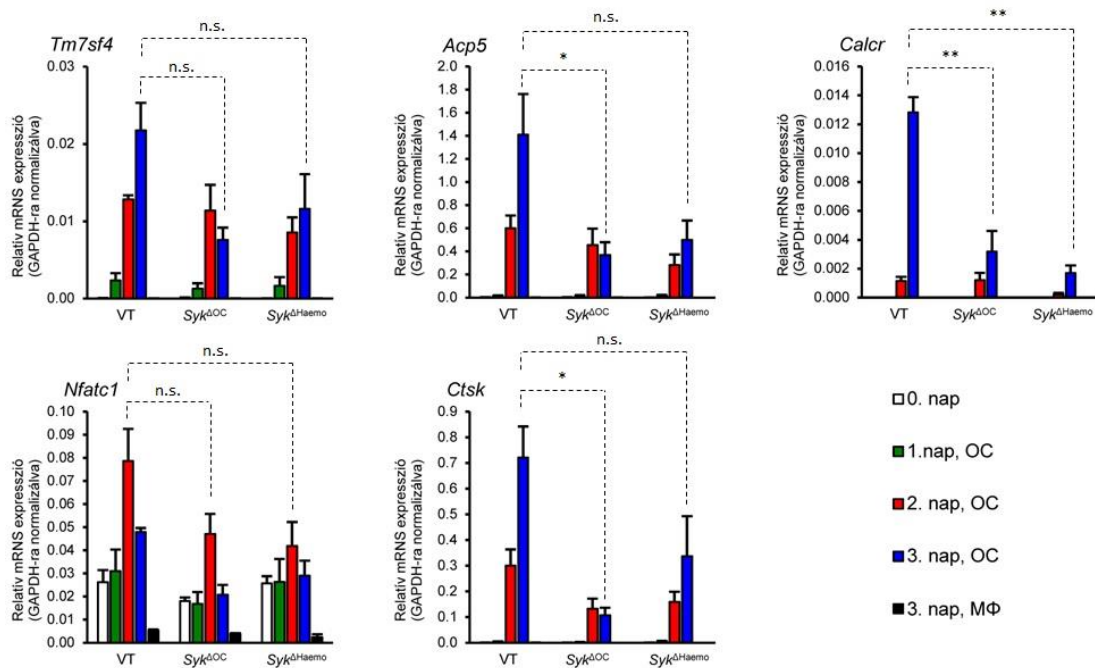


27. ábra: Oszteoklasztok reszorpciós képességének vizsgálata

Vad típusú (VT), $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekből származó csontvelői sejteket mesterséges hidroxiapatit felszínen 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltattunk 7 napig. (A) Sötét látóteres mikroszkópos felvételek a felszínről (a lebontott részek sötét területként jelennek meg) (B) Kvantitatív analízis, a lebontott terület relatív felszíne. Reprezentatív képek, valamint átlag+SEM értékek genotípusonként 3 független kísérletből. ***: $p < 0,0005$

4.1.6. Oszteoklaszt-specifikus gének expressziója

A következő lépésben real-time PCR módszerrel megvizsgáltuk, hogy hogyan változik az oszteoklaszt-specifikus gének expressziója a kultúrákban. Kontrollként makrofágokat is vizsgáltunk, amelyeket az oszteoklasztokkal megegyező körülmények között tenyésztettünk, de RANKL hozzáadása nélkül. A 28. ábra diagramjain látható, hogy a DC-STAMP, TRAP, kalcitonin-receptor, NFATc1 és katepszin K fehérjét kódoló gének (*Tm7sf4*, *Acp5*, *Calcr*, *Nfatc1* és *Ctsk*) expressziója jelentősen megemelkedik az oszteoklasztogenezis során, míg a makrofág kultúrákban nem tapasztalunk növekedést. Ezeknek a géneknek az expressziója különböző mértékben és eltérő szignifikanciával, de mind a *Syk*^{ΔOC} mind a *Syk*^{ΔHaemo} kultúrákban lecsökkent a vad típushoz képest. Az adatok alapján feltételezhető a *Syk* szerepe az oszteoklaszt-specifikus gének kifejeződésének szabályozásában.



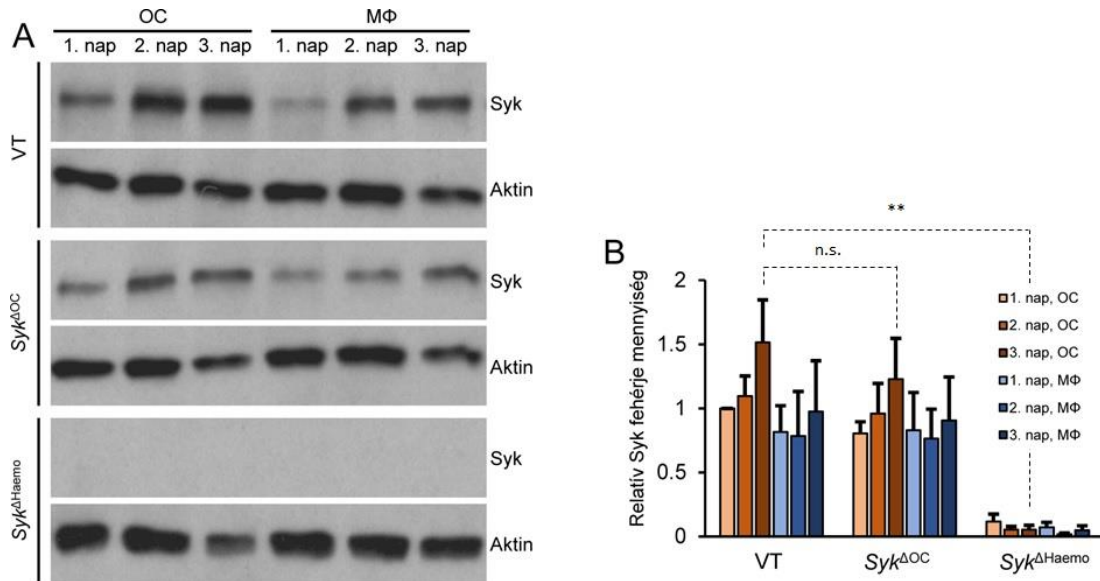
28. ábra: Oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának vizsgálata

Vad típusú (VT), Syk^{ΔOC} és Syk^{ΔHaemo} egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF jelenlétében és 50 ng/ml RANKL jelenlétében (oszteoklaszt, OC) vagy hiányában (makrofág, MΦ) differenciáltattunk 0-3 napig. Kvantitatív PCR-rel meghatároztuk az egyes gének GAPDH-hoz viszonyított mRNS szintjét. A következő géneket vizsgáltuk: Tm7sf4, Acp5, Calcr, Nfatc1 és Ctsk (amelyek rendre a következő fehérjéket kódolják: DC-STAMP, TRAP, kalcitonin-receptor, NFATc1 és katepszin K) A grafikonokon átlag+SEM értékek láthatóak genotípusonként 3 független kísérletből. n.s.: nem szignifikáns; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$

4.1.7. Syk fehérjeexpresszió

Az *in vivo* vizsgálatokban kapott eltérő adatok (20. ábra-25. ábra) és a különböző mértékű károsodás az oszteoklasztogenezisben a $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egyedek között *in vitro* (26. ábra-27. ábra) felveti azt az eshetőséget, hogy a Syk törlése nem teljes a $Syk^{\Delta OC}$ egerekben. Ennek vizsgálatához a Syk fehérjeexpressziót Western Blot analízissel vizsgáltuk oszteoklasztokban és makrofágokban (ez utóbbiak nem kaptak RANKL kezelést).

A 29. ábra A paneljén látható, hogy a Syk jelen van és enyhe növekedést mutat a vad típusú kultúrákban. A Syk kimutatható a $Syk^{\Delta OC}$ kultúrákban is, de teljesen hiányzik a $Syk^{\Delta Haemo}$ oszteoklasztokból és makrofágokból. A szemikvantitatív adatok alátámasztják ezt a megfigyelést, és egy enyhe, de nem szignifikáns csökkenést mutatnak a $Syk^{\Delta OC}$ oszteoklasztok esetében a vad típushoz képest. A $Syk^{\Delta OC}$ mutáció esetén a Syk nem törlődik teljesen az oszteoklasztokból. Az eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a Syk nem teljesen törlődik a $Syk^{\Delta OC}$ kultúrákban, míg teljesen hiányzik a $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrákból.



29. ábra: A Syk expressziójának vizsgálata Western Blottal

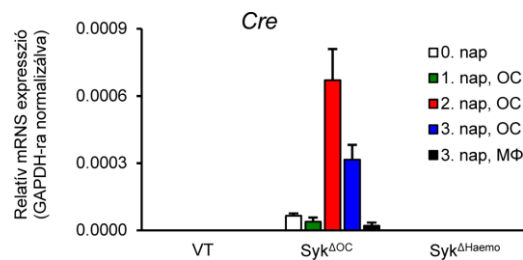
Vad típusú (VT), $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF jelenlétében és 50 ng/ml RANKL jelenlétében (oszteoklaszt, OC) vagy hiányában (makrofág, MΦ) differenciáltattunk 1-3 napig. A teljes sejtlizátumokból immunoblot eljárással mutattuk ki a Syk fehérjét és loading controlként az aktint. A grafikonokon átlag+SEM értékek láthatóak genotípusonként 3 független kísérletből. n.s.: nem szignifikáns; **: $p < 0,005$

4.1.8. Cre génexpresszió

A $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek között megfigyelt különbségek egyik lehetséges oka az, hogy a $Syk^{\Delta OC}$ esetében a Cre expresszió és a Syk gén törlése csak az oszteoklasztogenezis késői fázisában történik meg. Így a Syk fehérje szintjének csökkenésekor már az oszteoklasztok egy része kialakult és működik. Ezt alátámaszthatja az az eredmény, hogy a *Ctsk* gén mRNS szintje a RANKL adást követő 2. és 3. napban emelkedik (153, 164), (28. ábra), ami a *Ctsk*-Cre mutációt hordozó egerekben a Cre termelődésért felel.

A Cre expressziójának meghatározásához qPCR analízist végeztünk vad típusú, $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ oszteoklasztokon és makrofágokon. Nem meglepő, hogy a vad típusú sejtekben nem volt megfigyelhető Cre expresszió. A $Syk^{\Delta OC}$ kultúrák esetén az oszteoklasztokban a RANKL adását követő 2. napban kezdett el megnőni a Cre

expresszió, míg makrofágokban nem tapasztaltunk növekedést (30. ábra). Figyelembe véve a Cre működésbe lépéséhez és mindkét allélon való Syk törléséhez szükséges időt és azt, hogy a már megszintetizált Syk mRNS és fehérje nem tűnik el azonnal a sejtből, a kapott eredmények összhangban vannak a korábban kapott adatainkkal a $Syk^{\Delta OC}$ oszteoklasztok Syk fehérjeszintjét illetően (29. ábra). A $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrák a vizsgált időszakban nem mutattak Cre expressziót. Valószínűleg ezekben a sejtekben a Vav révén történő Cre expresszió – és így a Syk törlése – már a fejlődés korábbi szakaszában megtörténik (30. ábra).



30. ábra: A Cre expressziójának vizsgálata

Vad típusú (VT), $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF jelenlétében és 50 ng/ml RANKL jelenlétében (oszteoklaszt, OC) vagy hiányában (makrofág, MΦ) differenciáltattunk 0-3 napig. Kvantitatív PCR-rel meghatároztuk a Cre GAPDH-hoz viszonyított mRNS szintjét. A grafikonokon átlag+SEM értékek láthatóak genotípusonként 3 független kísérletből.

4.1.9. Syk allélvariációk szekvenálása

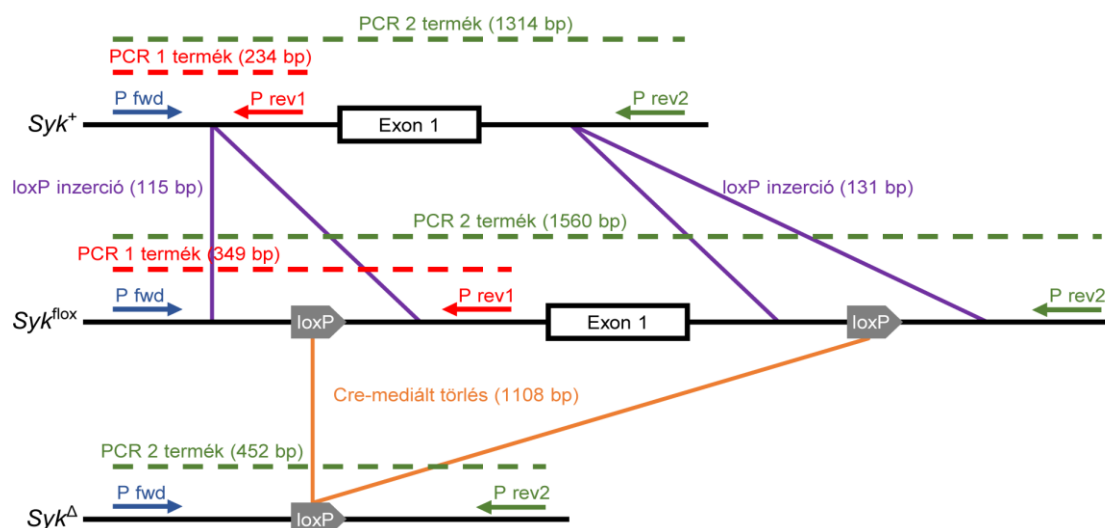
A Cre mediált törlés még alaposabb vizsgálatához PCR analízis segítségével megvizsgáltuk a Syk gén különböző variációit. Ehhez először megszekvenáltattuk a Syk^{flox} allélvariáció két loxP szekvenciája körüli DNS szakaszokat. Ezeket az adatokat, az egér Syk ismert genomiális szekvenciáját és a Syk^{flox} mutációt létrehozó leírást (52) felhasználva rekonstruáltuk a Syk^{flox} allél számunkra fontos, 1. exon körüli, loxP szekvenciákat tartalmazó részét (31. ábra).

1 AACCCAAGAGACTGAGGAGGGATGCATAGCTTTTCTTA **P fwd** **GCCCCGTTCTGTGCCTACTGGG**GGCCACCGGG 70
 71 GCTTTGAGTTCTCACTGGTTCTGTTCCGTGGACCACTGTCTACCCTCAGGGTACTACGCCCTTGAGGACT 140
 141 GTGTCCAAAGACTACTGTGCACTTCTCTTTTCTCAGTTTCTCTTA **~EcoRI** **GAATTTC**GACCTGCAGCCAAGCT 210
 211 AGCTTGGCTGGACGTAACTCCTCTTCAGACCTAATACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATAT 280
 281 TAAGGGTTATTGAATATGATCG **EcoRI** **GAATTC**CCTGTATTAAGTAAAAAAGAAATGATAGTGAATTG 350
 351 GGTCACCTTCGTCAAAA **P rev1** **GCCGTGGGTTTGGTTAGCTA**ACCACAGGATGTGTGTTGGGAGACCGTGGGAAT 420
 421 TAGGTAATAATAGAAAGTACCACACACCAACACACACACAGTGTAAAGCACTTAAGCTTGTATCCCTG 490
 491 TGGAAACGGTTCTGGTAGTCATAGCCAGTGTCTCTGTGGTTTGGGTCTGCATTGTGACTCTCCCGTCT 560
 561 **TGTGTTGGGCCCCAGGTACTTCTCCATACACTTCCCAGAACTCTGAAGGGGTGCAGACATGGCGGGAAGTGC** 630
 631 **TGTGGACAGCGCCAACCACTGACCTACTTTTTTGGCAACATCACCCGGGAAGAGGCTGAAGACTACCTG** 700
 701 **GTCCAGGGAGGCATGACCGATGGGCTCTACCTGCTACGCCAGAGCCGCAATTACCTGGGTGGTTTTGCTT** 770
 771 **TGTCGGTGGCTCACAACAGGAAGGCACACCACTACACCATCGAGAGGGAACCTAATGGCACCTACGCCAT** 840
 841 **CTCCGGGGGCGAGGGCCCATGCCAGCCAGCAGACCTCTGCCATTACCACTCCCAGGAACCTGATGGCCTT** 910
 911 **ATCTGCCTCCTTAAGAAGCCCTTCAACCGGCCCCCGGGAGTACAGCCCAAGACCGGACCTTTGAGGACC** 980
 981 **TGAAGGAGAACCTCATCAGGGAATATGTGAAACAGACCTGGAACCTTCAGGT**GAGTCTGCTGGGCTTGAG 1050
 1051 CCCACAGAGTTCTCTAAACATATTCAGAGCCTGTGCCTCCTTTACCCAAAGACTAGGATAGCAGATGCCT 1120
 1121 GTGTGCTGCTGCCCCCTCGCTGCCTCTCTTCCCACCCATCTGCTCATGGGACCAAAGCGGAGTCTCACA 1190
 1191 TCCTCTCTGCCCTCTCCTTTTACCACGAAGGAGAAGGTTGTGTTTTAACTTTATTCCTTTGAGTTTTTC 1260
 1261 TTCTTTGAAAGTCCAACCTCTGGCTATTCATTACCA **BglII** **AGATCT**CGACCTGCAGCCAAGCTAGCTTGGCTGGA 1330
 1331 CGTAAACTCCTCTTCAGACCTAATACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTATTG 1400
 1401 AATATGATCGGAATTCCTCGAGTCTA **~BglII** **GGATCT**GTTGTTCTCTCACTAGGAAGGAAAAGGGAACAGCCTT 1470
 1471 CTCCACACTTAATCCATCTCCATGTTGTTATTTCCACCTTGTTCCTTCTCGGTCCAGGCTGCTGGCCAGG 1540
 1541 GCCTCCTCTGATGGACTTCCTGCAGGAGTGTGGGGTA **P rev2** **GGAAAGATGGGACCGACGAC**ATGGCTGAACCC 1610

31. ábra: A Syk gén floxolt allélvariációjának nukleotidszekvenciája

A Syk gén 1. exonjának (sárga) és környezetének nukleotidszekvenciája a következő speciális szakaszok jelölésével: primerek (kék, piros és zöld), endonukleáz felismerő szekvenciák (lila), inzertált loxP szakaszok (szürke).

A pontos nukleotidszekvenciát felhasználva készítettünk egy sematikus ábrát a Syk^+ (vad típus), Syk^{lox} és Syk^{Δ} (Cre mediált törlés utáni) allélvariációkról, ami tartalmazza a beillesztett loxP szekvenciákat, a Cre mediált törlés helyét és eredményét, valamint az allélvariációk megkülönböztetéséhez használt primereket és az általuk létrehozott PCR termékeket (32. ábra).



32. ábra: A Syk gén allélvariációi

A Syk gén különböző (vad típusú, floxolt és törölt) variációi. Az 1. exon és környezetének sematikus ábrázolása a különböző PCR reakciók során használt primerek és PCR termékek megjelenítésével.

4.1.10. Cre mediált törlés

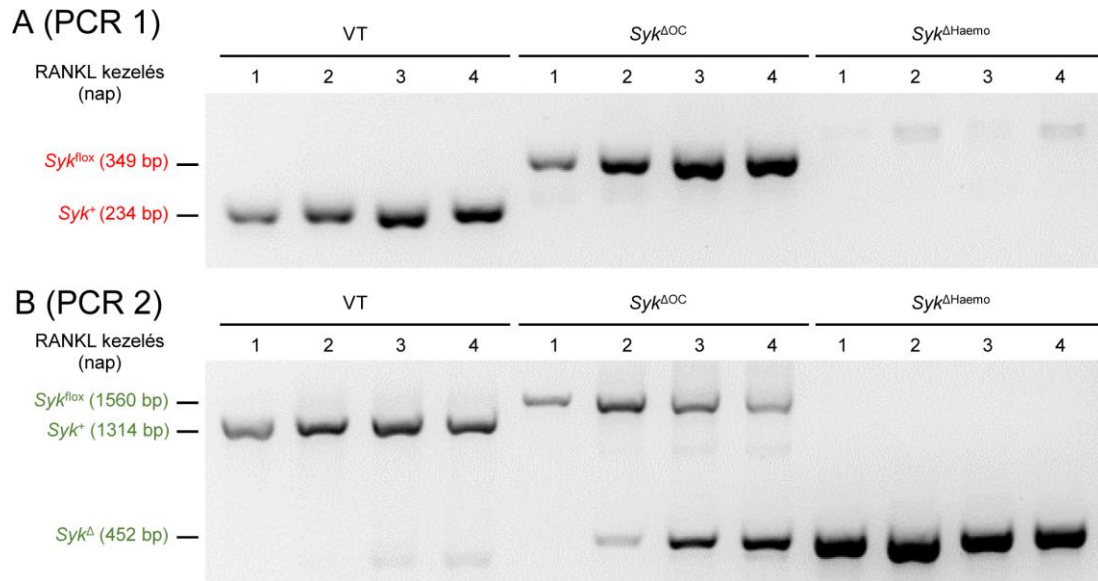
A szekvenálás eredménye (31. ábra) alapján két PCR protokollt terveztünk (PCR1 és PCR2), hogy a Syk allélvariációit (Syk^+ , Syk^{lox} és Syk^{Δ} , 32. ábra) amplifikálni tudjuk. A PCR1-et a standard genotipizáláshoz már használtuk a Syk^+ és a Syk^{lox} allélvariációk elkülönítéséhez. Ilyenkor a P fwd és P rev1 primerek segítségével kialakult DNS termék hosszabb a Syk^{lox} allél esetén a beillesztett loxP szekvenciának (115 bp) köszönhetően (52) (32. ábra és 33. ábra A panel). A módszer limitációja, hogy a Syk^{Δ} törölt allél detektálására nem alkalmas, mert a Cre mediált deléción a P rev1 primer szekvenciája is törlődik a genomból (32. ábra). Ennek kiküszöbölésére megterveztük a PCR2 protokollt, ahol ugyanazt a P fwd forward primert és egy új P rev2 reverz primert

használtunk, ami már kívül esik a floxolt szakaszon, így nem törlődik a Cre mediált deléción során (32. ábra). Ezzel a módszerrel már egyszerre detektálható mindhárom allélvariáció (33. ábra B panel).

Vad típusú, $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ oszteoklaszt kultúrákon elvégeztük a PCR1 és PCR2 analízist. A PCR1 eredményei a 33. ábra A paneljén a vártak megfelelően mutatják a vad típusú Syk^+ allél jelenlétét a vad típusú kultúrákban. A $Syk^{\Delta OC}$ kultúrákban a Syk^{flox} allélvariáció került kimutatásra, de egyik allélvariáció sincs jelen a $Syk^{\Delta Haemo}$ sejtekben, vélhetően a hemopoetikus fejlődés korábbi szakaszában történt törlés miatt. A PCR sajátosságai miatt nem tudjuk megítélni, hogy a megjelenő Syk^{flox} allélvariáció egy része törlésre kerül-e, mert a törléskor kialakuló Syk^{Δ} kompetitív templátja ebben a rendszerben nem amplifikálódik.

A PCR2 már képes kimutatni mindhárom (Syk^+ , Syk^{flox} és Syk^{Δ}) allélvariációt. A vad típusú kultúrákban továbbra is kizárólag a Syk^+ allél detektálható, és a $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrákban is csak a Syk^{Δ} allélvariáció jelenik meg, ami igazolja a korábbi szakaszban történt törlést. Ezzel szemben a $Syk^{\Delta OC}$ kultúrák egy dinamikus képet mutatnak: bár a RANKL adását követő 1. napon csak a Syk^{flox} allél van jelen, a következő napokban a Syk^{Δ} allél fokozatos növekedést mutat a Syk^{flox} allél csökkenése mellett (33. ábra B panel). Meg kell említeni, hogy a rövidebb Syk^{Δ} allélvariációnak valószínűleg kompetitív előnye van a hosszabb Syk^{flox} alléllal szemben az amplifikáció során, így az adatokból mennyiségi következtetést csak limitáltan lehet levonni. Az eredmények alapján elmondható, hogy a Ctsk-Cre mediált törlés a RANKL ligand adását követő 2-4. napon történik, de a folyamat során csak egy nem teljes törlés figyelhető meg.

A fenti eredmények a Syk^{flox} allél egy lassú, fokozatos törlésére engednek következtetni a $Syk^{\Delta OC}$ oszteoklasztok esetén, ami a *Ctsk* gén oszteoklasztogenezis során mutatott expressziójával összhangban van (153, 164). Ez megmagyarázza a $Syk^{\Delta OC}$ mutáció esetén tapasztalt kevésbé súlyos *in vivo* fenotípust (20. ábra-25. ábra) és a kevésbé károsodott *in vitro* oszteoklasztogenezist (26. ábra-27. ábra), valamint a Syk jelenlétét az oszteoklaszt kultúrákban (29. ábra), szemben a $Syk^{\Delta Haemo}$ mutáció esetén tapasztalt komplett és korai Syk törléssel és abszolút károsodott oszteoklasztogenezissel.



33. ábra: A Syk allélvariációk vizsgálata PCR-rel

Vad típusú (VT), Syk^{ΔOC} és Syk^{ΔHaemo} egerekből származó csontvelői sejteket 50 ng/ml M-CSF és 50 ng/ml RANKL jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltattunk 1-4 napig. A sejtekben található Syk allélvariációk DNS mennyiségét PCR-rel határoztuk meg. (A) PCR 1 reakció (P fwd és P rev1 primerekkel) a floxolt és vad típusú Syk allélvariációk megkülönböztetéséhez. (B) PCR 2 reakció (P fwd és P rev2 primerekkel) a floxolt vad típusú és törölt Syk allélvariációk megkülönböztetéséhez. Reprezentatív képek genotípusonként 4 független kísérletből.

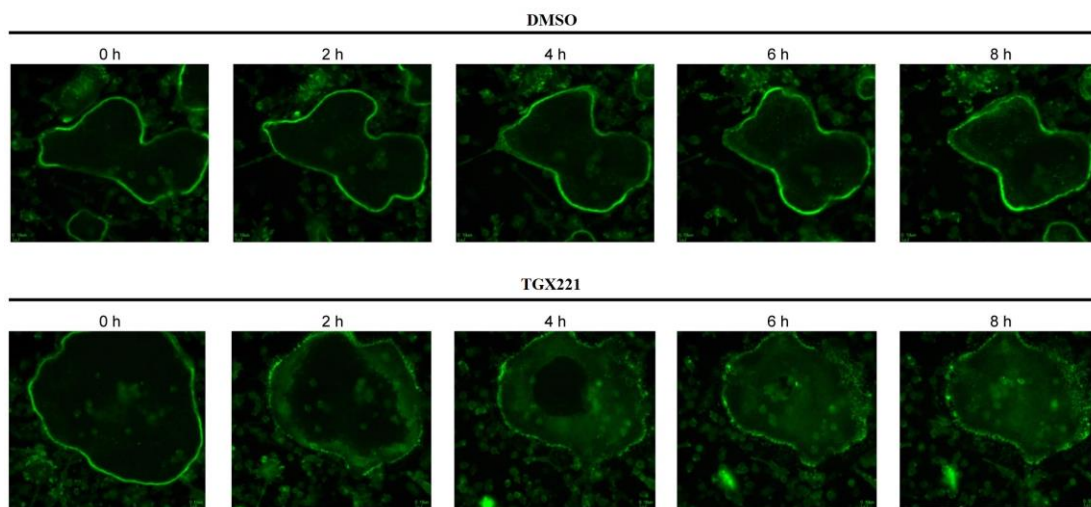
4.2. A PI3Kβ szerepe az oszteoklasztok működésében

Az ebben a fejezetben bemutatott eredményeket 2014-ben az Arthritis & Rheumatology folyóiratban publikáltuk. A fejezetben bemutatott kísérletekhez szorosan kapcsolódó előzmények megtalálhatóak az 1.3.6. fejezetben is, amely ábrák dr. Győri Dávid Ph.D. dolgozatában kerültek felhasználásra.

4.2.1. Aktingyűrű-megtartás

Korábbi kísérleteink alapján feltételeztük, hogy a PI3Kβ nemcsak az oszteoklasztok fejlődéséhez, az aktingyűrű kialakításához (153), hanem az érett oszteoklasztok

működéséhez, az aktingyűrű fenntartásához is szükséges. Ennek vizsgálatához érett, 3 nap RANKL kezelésen átesett, kialakult aktingyűrűvel rendelkező oszteoklasztokhoz 50 nM koncentrációban a TGX221 PI3K β -specifikus gátlószert vagy a kontrollként a vivőanyagot, DMSO-t adtunk. A 34. ábra illusztrációin és a kísérletet dokumentáló videofelvételen látható, hogy a kontroll vizsgálatnál az aktingyűrű változatlan kinetikát mutat, míg a TGX221 hozzáadásakor azonnal megkezdődik az aktingyűrű struktúra fragmentálódása. Ezek alapján elmondható, hogy a PI3K β gátlásának hatására károsodik az oszteoklasztok aktingyűrű megtartása.



34. ábra: A TGX221 PI3K β -specifikus gátlószert hatása az oszteoklasztok aktingyűrűire

Lifeact egerekből származó érett, 3 nap RANKL kezelésben részesült, aktingyűrűvel rendelkező oszteoklasztokhoz 50 nM TGX221-et vagy kontrollként a vivőanyagot, 0,1%-os DMSO-t adtunk és további 8 órán át megfigyeltük a sejteket. Reprezentatív fluoreszcens felvételek 2 független kísérlet alapján.

A forrásvideó linkje megtekinthető itt:

http://semmelweis.hu/elettan/files/2014/04/Gyorieta_AR_Suppl_material.pdf

5. Megbeszélés

A $Syk^{-/-}$ egerek perinatális letalitása miatt (86, 87) a Syk *in vivo* csonthomeosztázisban betöltött szerepének igazolásához szövetspecifikus KO egerekre volt szükség. Létrehoztunk olyan egereket, ahol a Syk az oszteoklasztokban ($Syk^{\Delta OC}$) vagy a teljes hemopoetikus kompartmentben ($Syk^{\Delta Haemo}$) törlésre került. Mindkét esetben megemelkedett a csontdenzitás, valamint károsodott az *in vitro* oszteoklaszt fejlődés és működés. A két genotípus között azonban számottevő különbség mutatkozott: a $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek esetében jóval komolyabb változásokat tapasztaltunk *in vivo* és *in vitro* is. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a különbség oka a nem teljes és késői Syk törlés a $Syk^{\Delta OC}$ mutáció esetén, vélhetően a *Ctsk* gén által okozott későbbi és kevésbé intenzív Cre expresszió miatt.

A Syk fontos szerepét az *in vitro* oszteoklaszt fejlődésben és működésben már korábban kimutatták (49, 146, 167), de élő, kifejtett egérben erre nem volt lehetőség a $Syk^{-/-}$ egerek perinatális letalitása miatt, mindössze $Syk^{-/-}$ embriók megnövekedett csontsűrűségét sikerült kimutatni (146). Az *in vitro* és *in vivo* hatások eltérőek az oszteoklasztogenezishez szükséges más fehérjék (DAP12 (49, 137, 168, 169) és PLC γ 2 (164, 170, 171)) hiányában is, így pusztán *in vitro* eredményekből *in vivo* működésre következtetni nem lenne megalapozott. A Syk genetikai hiányában született *in vivo* eredményeink közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak a Syk alapvető szerepére az *in vivo* csonthomeosztázisban.

A két egérmodell különböző oldalról közelíti meg a Syk szerepének kérdését: a $Syk^{\Delta OC}$ egérben kapott eredmények rámutatnak az oszteoklaszt-specifikusságra, míg a teljes törlést okozó, de túlélő $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekben megtapasztalhattuk a maximális hatás mértékét.

Bár a vizsgált mutáns egerek alapján a Syk *in vivo* szerepe tisztázott az oszteopetrotikus fenotípus kialakításában, a hatásért felelős sejttípusok tekintetében még felmerülhetnek kérdések. A $Syk^{\Delta OC}$ egér esetén kapott eredmények igazolják, hogy a Syk csonthomeosztázisban betöltött szerepéhez az oszteoklasztok biztosan hozzájárulnak. Felmerül a kérdés, hogy a $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekben miért tapasztalható lényegesen komolyabb csontdenzitás-növekedés. Valószínűnek tartjuk, hogy ennek hátterében az áll, hogy a

$Syk^{\Delta OC}$ oszteoklasztokban csak részleges és később bekövetkező Syk törlés történik. Mindemellett nem zárhatjuk ki teljesen, hogy a hemopoetikus kompartment más sejteiben történő Syk törlés hatásai is megjelennek, amelyek akár indirekten oszteoblasztok általi csontbontást indukálhatnak. Fontos megjegyezni, hogy korábban leírták a $Syk^{-/-}$ oszteoblasztok normál csontépítő funkcióját (146), így az oszteoblasztok hozzájárulását a tapasztalt fenotípushoz nem feltételezzük még abban a valószínűtlen esetben sem, ha a más sejtekben expresszálandó Cre valamilyen módon az oszteoblasztokba jutna. A mikro-CT analízis során tapasztalt megnövekedett trabekulaszám és kevésbé változó trabekulavastagság szintén kérdéseket vet fel a megnövekedett csontdenzitásért felelős sejtek tekintetében. Különböző kutatócsoportok eredményei szerint az oszteoklasztok által okozott oszteopetrotikus fenotípusban eltérő paraméterek (trabekulaszám, trabekulavastagság) változása vezethet csonttömegnövekedéshez (49, 137, 153, 164), így a mikro-CT eredményekből ilyen jellegű következtetést nem vontunk le.

A mikro-CT paraméterek a legtöbb esetben különböztek a hím és a nőstény egyedek között. Adott genotípuson belül a nőstények általában alacsonyabb értéket mutattak a relatív csonttérfogat (BV/TV), a trabekulaszám és a trabekulavastagság tekintetében, míg a trabekulátávolság ennek megfelelően magasabb volt a hímekhez képest. A nőstény egyedek alacsonyabb csontdenzitása egybevág az irodalmi adatokkal. Érdekes módon a struktúramodell index esetében viszont hasonló értékeket mértünk a hímek és nőstények esetében. A nemek között különbség hiánya azzal magyarázható, hogy az SMI paraméter nem egy abszolút mennyiségi, hanem egy alaki, geometriai összehasonlítás alapján kerül kiszámításra.

Nem egyértelmű a $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ mutációk közötti különbség oka, ahogy az sem, hogy a Syk törlése miért lényegesen kevésbé hatékony a $Syk^{\Delta OC}$ egerekben. Az egyik lehetőség, hogy a *Ctsk*-Cre mutáció esetén túl későn (a RANKL adását követő 2. napon) kezdődik el a Cre aktiváció, ráadásul a már jelenlévő Syk mRNS és Syk fehérje mellett a Syk teljes eltűnése akkor történik meg, amikor már az oszteoklasztok kifejlődtek és csontbontó funkciójukat javarészt elvégezték. Mind a *Ctsk* gén (28. ábra), mind a Cre (30. ábra) aktiválódása, mind a Syk^{Δ} allél késői megjelenése (33. ábra) alátámasztják ezt a feltételezést. A másik felmerülő lehetőség, hogy az egy allélen megjelenő *Ctsk*-Cre mutáció esetén expresszált Cre nem elegendő a Syk mindkét allélen való teljes törléséhez.

Mindkét eshetőség egybevágh korábbi irodalmi adatokkal, ahol a *Ctsk*-Cre mutáció nem okozott teljes törlést (153, 164, 172). Ezek a kísérletek is rámutatnak arra, hogy a Cre expresszió specificitása mellett az időzítés is kritikus fontosságú.

Bár a kísérletek elsődleges célja a Syk *in vivo* szerepének meghatározása volt, az *in vitro* oszteoklasztfejlődés és -működés vizsgálatokor néhány érdekes mechanizmusra derült fény. A funkcionális vizsgálatoknál a $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrák között jelentősen kisebb volt a különbség, mint az oszteoklasztok fejlődésekor (26. ábra-27. ábra). A mesterséges hidroxipatit felszínén okozott rágásnyomok alapján kapott eredmények kiértékelése komplex, mert azt befolyásolják mind a fejlődésben, mind a működésben bekövetkező károsodások, ráadásul itt sokkal hosszabb ideig történt a sejtek tenyésztése, ami több időt enged a Cre expresszióra és a Syk törlésre. A 26. ábra B paneljén látható, hogy a $Syk^{\Delta OC}$ oszteoklasztok száma a RANKL adását követő 3,5 napra lecsökken. Ez lehet a vad típushoz hasonlóan a sejtek fúziója miatt, de a jelentősebb csökkenés hátterében az ekkora már nagyobb arányú Syk törlés is állhat.

Az *in vivo* adatokkal és az oszteoklaszt fejlődést vizsgáló kísérletek eredményeivel szemben a génexpressziós mérésekben nem láttuk az egyértelműen súlyosabb változást a $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrák esetén a $Syk^{\Delta OC}$ kultúrákkal szemben. A *Calcr* expresszió esetén látszódik ez a tendencia, a *Tm7sf4*, *Acp5*, *Nfatc1* és *Ctsk* esetén nem. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a károsodás hátterében nem kizárólag ezeknek az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának változása áll, vagy néhány gén expressziójának csökkenését más gének expressziója kompenzálja. A $Syk^{\Delta OC}$ oszteoklasztok *Ctsk* expressziójának (a $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrákhoz viszonyított) csökkenésének hátterében valószínűleg részben az áll, hogy ezen sejtek az egyik *Ctsk* allélen a *Ctsk*-Cre mutációt hordozzák ($Ctsk^{Cre/+}$).

Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziója a $Fc\gamma^{-/-}$ DAP12^{-/-} kettős KO oszteoklasztokban is károsodott. Irodalmi adatok alapján a TRAP mRNS expresszió 0, 2 és 24 órás RANKL kezelés esetén nem emelkedik az $Fc\gamma^{-/-}$ DAP12^{-/-} kettős KO sejtekben, míg kontroll oszteoklasztokban 24 h után jelentős expressziónövekedés tapasztalható (137).

Több irodalmi forrás is arra utal, hogy a Vav expresszió már az embrionális korban, egérben a 11,5-dik napon megkezdődik (173, 174). Egy egérmodellben a Vav-GFP

fuzionált fehérje segítségével egyértelműen látható, hogy a Vav jelen van már a hemopoetikus őssejtben és még a makrofágokban is (174). A mi qPCR méréseinkben azonban a $Syk^{\Delta Haemo}$ makrofágok (és oszteoklasztok) nem mutattak *Cre* expressziót. Irodalmi adatok alátámasztják a Syk és a Vav1 közötti interakciót(175), így a $Syk^{\Delta Haemo}$ makrofágokban tapasztalt *Cre* mRNS expresszió hiány magyarázható azzal, hogy a $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekben a Vav1 kifejeződés (és így a *Cre* expresszió) lecsökken a Syk törlése után.

Ismert, hogy a Syk szükséges az autoantitest-indukált artritisz kialakulásához egérben (61-64), és a Syk terápiás célpontként szolgál reumatoid artritiszben (80-82), aminek hátterében állhat a Syk lehetséges szerepe neutrofilekben, makrofágokban, hízósejtekben vagy vérlemezkékben (29, 46-48, 54, 60, 64, 66, 88). Mind az egér (61), mind a humán (21) reumatoid artritiszben komoly tünet a súlyos csonterosztózis, ezért a Syk oszteoklaszt-mediált csontbontásban betöltött szerepe további célpontot szolgáltat a gyulladásos betegségekben használt Syk-gátlószereknek. Ezen felül a Syk-mediált csontbontás gátlása felmerülhet más, megnövekedett csontvesztéssel járó betegségek esetén is mint az oszteoporózis (13) vagy az oszteolitikus áttétekkel járó tumorok (16, 17).

Korábban kimutattuk, hogy a PI3K β hiányában az egerek csontdenzitása megnő, az oszteoklasztok fejlődése és működés károsodik és nem alakulnak ki megfelelő aktingyűrű struktúrák (153). Érett oszteoklasztokban vizsgáltuk a PI3K β izoformaspecifikus gátlószereket, a TGX221-nek a hatását. Azt tapasztaltuk, hogy a gátlószert adását követően az aktingyűrűk felbomlanak, fragmentálódnak, tehát a PI3K β nemcsak az aktingyűrűk kialakulásához, hanem azok megtartásához is szükséges, ami fontos az oszteoklasztok megfelelő működéséhez.

6. Következtetések

A célkitűzésekben felvetett kérdéseknek megfelelő pontokban foglalom össze a következtetéseimet:

- 1.) Milyen hatással van a Syk sejtvonalspecifikus törlése az *in vivo* csontanyagcserére?

Kimutattam, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus törlése enyhébb, hemopoetikus törlése masszív csontdenzitás-növekedést okoz egérben *in vivo*.

- 2.) Milyen hatással van a Syk sejtvonalspecifikus törlése az *in vitro* oszteoklaszt fejlődésre és működésre?

Kimutattam, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus törlése esetén az *in vitro* oszteoklaszt fejlődés és működés jelentősen károsodik, míg hemopoetikus törlés esetén teljesen megszűnik.

- 3.) Mi okozza a Syk oszteoklaszt-specifikus és hemopoetikus törlése esetén tapasztalt eltéréseket?

Kimutattam, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus és hemopoetikus törlése esetén tapasztalt eltérések hátterében az áll, hogy a $Syk^{\Delta OC}$ egerek esetében a Syk törlése később, az oszteoklasztogenezis későbbi szakaszában történik meg, és a törlés nem tekinthető teljesnek az oszteoklaszt-fejlődés során, míg a $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek esetén már a sejtek fejlődésének korábbi szakaszában megtörténik a teljes törlés.

- 4.) Milyen hatással van a PI3K β izoformaspecifikus gátlása az oszteoklasztok aktingyűrű-megtartására?

Kimutattam, hogy PI3K β izoformaspecifikus gátlószer adásakor az oszteoklasztokban az aktingyűrű fragmentálódik, a PI3K β szükséges a kialakult aktingyűrűk megtartásához.

7. Összefoglalás

Az oszteoklasztok a csontbontásért kizárólagosan felelős, hemopoetikus eredetű sejtek. Fejlődésüket M-CSF és RANKL citokinek, valamint adhézión és immunreceptor-szerű jelpályák szabályozzák.

A Syk egy nem-receptor tirozin kináz, melynek az immunreceptor-szerű jelpályán keresztül betöltött szerepét az *in vitro* oszteoklaszt fejlődésben és működésben már korábban kimutatták. A Syk *in vivo* vizsgálata ezekben a kísérletekben nem volt lehetséges a Syk^{-/-} egerek perinatális letalitása miatt. Szövetspecifikus Syk törlés révén – Ctsk és Vav1 promótereket használva – létrehoztunk oszteoklaszt-specifikusan (Syk^{ΔOC}) és hemopoetikusan Syk-hiányos egereket. Az *in vivo* mikro-CT vizsgálatok mindkét genotípus esetén emelkedett csontdenzitást mutattak, de a Syk^{ΔHaemo} egérben ez a változás lényegesen jelentősebb volt. Az *in vitro* oszteoklaszt fejlődés és működés károsodott Syk^{ΔOC} és teljesen megszűnt a Syk^{ΔHaemo} kultúrákban. Az oszteoklaszt-specifikus gének mindkét genotípus esetén csökkent expressziót mutattak.

A Syk fehérjeexpressziót, a Cre expressziót és a PCR-rel végzett, Syk^{fllox} allél delécióját célzó vizsgálataink alapján a Syk^{ΔHaemo} kultúrákban teljes Syk törlés, míg a Syk^{ΔOC} sejtek esetén egy későbbi, nem teljes Syk törlés figyelhető meg. Ezek az eredmények megmagyarázzák a Syk^{ΔOC} és Syk^{ΔHaemo} mutációk közötti *in vivo* és *in vitro* különbségeket. Feltételezzük, hogy a Ctsk promóter egy későbbi Cre expressziót és aktiválódást eredményez, ami inkomplett Syk törléshez vezet. Ezen eredmények alapján igazoltuk a Syk szerepét az *in vivo* csonthomeosztázisban, ami fontos szempont lehet a Syk gátlószerek alkalmazásakor megemelkedett csonttömegvesztéssel járó betegségek (reumatoid artritisz, oszteoporózis és oszteolitikus metasztázisok) esetén.

Korábban már kimutattuk, hogy a PI3Kβ szükséges az oszteoklasztok fejlődéséhez, működéséhez és aktingyűrű-képzéséhez. Érett oszteoklasztokban vizsgáltuk a PI3Kβ izoformaspecifikus gátlószerét, a TGX221-et, amely az aktingyűrű struktúrák felbomlását okozta.

8. Summary

Osteoclasts are the unique bone resorbing cells of hemopoietic origin. Their development and function are regulated by M-CSF, RANKL cytokines, adhesive and immunoreceptor-like signals.

The role of Syk, a nonreceptor tyrosine kinase was previously shown to be mediated by immunoreceptor-like signals in *in vitro* development and function of osteoclasts. The analysis of Syk in *in vivo* bone metabolism was not possible in these studies because of the perinatal lethality of $Syk^{-/-}$ mice. By tissue specific Syk deletion – using Ctsk or Vav1 promoter driven Cre expression – we generated mice with osteoclast-specific ($Syk^{\Delta OC}$) or hematopoietic ($Syk^{\Delta Haemo}$) Syk deficiency. *In vivo* micro-CT analysis showed increased bone density in both genotypes, but more robust phenotype in case of $Syk^{\Delta Haemo}$ mice. *In vitro* osteoclast development and function was reduced in $Syk^{\Delta OC}$ and completely blocked in $Syk^{\Delta Haemo}$ cultures. Osteoclast-specific gene expression was reduced in both cases.

A complete deletion of Syk in the $Syk^{\Delta Haemo}$ cultures was observed based on the results of Syk protein level, Cre expression and PCR analysis of the Syk^{fllox} allele deletion while Syk was only incompletely deleted at a later stage of osteoclastogenesis in $Syk^{\Delta OC}$ cells. Those results explain the *in vivo* and *in vitro* difference between the $Syk^{\Delta OC}$ and $Syk^{\Delta Haemo}$ mutations, supposedly through a late activation of Cre expression by the Ctsk promoter causing incomplete Syk deletion. Based on these results we confirmed the role of Syk in *in vivo* bone homeostasis which might be an important aspect at the development of Syk inhibitors for the treatment of diseases characterized by excessive bone loss such as rheumatoid arthritis, osteoporosis and osteolytic cancer metastases.

We have previously shown that the PI3K β is required for osteoclast development, resorptive function and for the formation of actin rings. In mature osteoclasts we tested the effects of PI3K β isoform-selective inhibitor TGX221, which caused the fragmentation of the actin ring structures.

9. Irodalomjegyzék

1. Hall AC, Guyton JE. Textbook of medical physiology. W.B. Saunders, Philadelphia, 2005: 981.
2. Raisz L, Kream BE, Lorenzo JA. Textbook of Endocrinology. WB Saunders, Philadelphia, 2002: 1373–1410.
3. Aubin JE. (2001) Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*, 2: 81-94.
4. 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.
5. Bennett CN, 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 U S A*, 102: 3324-3329.
6. Rutkovskiy A, Stenslokken KO, Vaage IJ. (2016) Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res*, 22: 95-106.
7. Teitelbaum SL. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289: 1504-1508.
8. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423: 337-342.
9. Ono T, Nakashima T. (2018) Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol*, 149: 325-341.
10. Aguila HL, Rowe DW. (2005) Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunol Rev*, 208: 7-18.
11. Walsh MC, 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.
12. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. (2013) Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol*, 9: 522-536.
13. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. (2011) Osteoporosis: now and the future. *Lancet*, 377: 1276-1287.

14. Johnell O, Kanis JA. (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*, 17: 1726-1733.
15. Oei L, Koromani F, Breda SJ, Schousboe JT, Clark EM, van Meurs JB, Ikram MA, Waarsing JH, van Rooij FJ, Zillikens MC, Krestin GP, Oei EH, Rivadeneira F. (2018) Osteoporotic Vertebral Fracture Prevalence Varies Widely Between Qualitative and Quantitative Radiological Assessment Methods: The Rotterdam Study. *J Bone Miner Res*, 33: 560-568.
16. Clezardin P. (2017) Pathophysiology of bone metastases from solid malignancies. *Joint Bone Spine*, 84: 677-684.
17. Sousa S, Clezardin P. (2018) Bone-Targeted Therapies in Cancer-Induced Bone Disease. *Calcif Tissue Int*, 102: 227-250.
18. Handforth C, D'Oronzo S, Coleman R, Brown J. (2018) Cancer Treatment and Bone Health. *Calcif Tissue Int*, 102: 251-264.
19. Wang Q, Mo J, Zhao C, Huang K, Feng M, He W, Wang J, Chen S, Xie Z, Ma J, Fan S. (2018) Raddeanin A suppresses breast cancer-associated osteolysis through inhibiting osteoclasts and breast cancer cells. *Cell Death Dis*, 9: 376.
20. Firestein GS. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423: 356-361.
21. Schett G, Gravallese E. (2012) Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*, 8: 656-664.
22. Le Goff B, Berthelot JM, Maugars Y, Heymann D. (2013) Osteoclasts in RA: diverse origins and functions. *Joint Bone Spine*, 80: 586-591.
23. Kong YY, 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.
24. Takayanagi H. (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 7: 292-304.
25. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, Sawa S, Nitta T, Takayanagi H. (2017) Osteoimmunology: The Conceptual

- Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev*, 97: 1295-1349.
26. Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou NA. (2002) Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 41: 1232-1239.
 27. Jung YK, Kang YM, Han S. (2019) Osteoclasts in the Inflammatory Arthritis: Implications for Pathologic Osteolysis. *Immune Netw*, 19: e2.
 28. Fluck M, Zurcher G, Andres AC, Ziemiecki A. (1995) Molecular characterization of the murine syk protein tyrosine kinase cDNA, transcripts and protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 213: 273-281.
 29. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. (2010) The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*, 10: 387-402.
 30. Coopman PJ, Do MT, Barth M, Bowden ET, Hayes AJ, Basyuk E, Blancato JK, Vezza PR, McLeskey SW, Mangeat PH, Mueller SC. (2000) The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature*, 406: 742-747.
 31. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A. (2009) The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev*, 228: 41-57.
 32. Wang L, Duke L, Zhang PS, Arlinghaus RB, Symmans WF, Sahin A, Mendez R, Dai JL. (2003) Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res*, 63: 4724-4730.
 33. Latour S, Zhang J, Siraganian RP, Veillette A. (1998) A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *EMBO J*, 17: 2584-2595.
 34. Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. (2001) Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem*, 130: 177-186.
 35. Reth M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature*, 338: 383-384.
 36. Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim KH, Ashendel CL, Harrison ML, Geahlen RL. (1997) Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta*, 1355: 177-190.

37. Keshvara LM, Isaacson C, Harrison ML, Geahlen RL. (1997) Syk activation and dissociation from the B-cell antigen receptor is mediated by phosphorylation of tyrosine 130. *J Biol Chem*, 272: 10377-10381.
38. Zhang Y, Oh H, Burton RA, Burgner JW, Geahlen RL, Post CB. (2008) Tyr130 phosphorylation triggers Syk release from antigen receptor by long-distance conformational uncoupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 11760-11765.
39. Yankee TM, Keshvara LM, Sawasdikosol S, Harrison ML, Geahlen RL. (1999) Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain. *J Immunol*, 163: 5827-5835.
40. Moon KD, Post CB, Durden DL, Zhou Q, De P, Harrison ML, Geahlen RL. (2005) Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 280: 1543-1551.
41. Deckert M, Tartare Deckert S, Couture C, Mustelin T, Altman A. (1996) Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity*, 5: 591-604.
42. Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. (1996) Phospholipase C- γ 1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol*, 16: 1305-1315.
43. Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, Siraganian RP. (2000) Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem*, 275: 35442-35447.
44. Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. (1998) BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity*, 9: 93-103.
45. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP. (1997) The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J*, 16: 2333-2341.
46. Meinders M, Hoogenboezem M, Scheenstra MR, De Cuyper IM, Papadopoulos P, Németh T, Mócsai A, van den Berg TK, Kuijpers TW, Gutierrez L. (2016)

- Repercussion of megakaryocyte-specific Gata1 loss on megakaryopoiesis and the hematopoietic precursor compartment. *PLoS One*, 11: e0154342.
47. Mócsai A, Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T, Lowell CA. (2003) G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood*, 101: 4155-4163.
 48. Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mócsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, Kahn ML. (2003) Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*, 299: 247-251.
 49. 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.
 50. Ziegenfuss JS, Biswas R, Avery MA, Hong K, Sheehan AE, Yeung YG, Stanley ER, Freeman MR. (2008) Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. *Nature*, 453: 935-939.
 51. Latour S, Veillette A. (2001) Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol*, 13: 299-306.
 52. Saijo K, Schmedt C, Su IH, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, Adachi T, Patke A, Santana A, Tarakhovsky A. (2003) Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- κ B activation during B cell development. *Nat Immunol*, 4: 274-279.
 53. Barker SC, Kassel DB, Weigl D, Huang X, Luther MA, Knight WB. (1995) Characterization of pp60c-src tyrosine kinase activities using a continuous assay: autoactivation of the enzyme is an intermolecular autophosphorylation process. *Biochemistry*, 34: 14843-14851.
 54. Fodor S, Jakus Z, Mócsai A. (2006) ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol Lett*, 104: 29-37.
 55. Thomas SM, Brugge JS. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 513-609.

56. Arias-Palomo E, Recuero-Checa MA, Bustelo XR, Llorca O. (2009) Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1794: 1211-1217.
57. 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.
58. Kerrigan AM, Brown GD. (2010) Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev*, 234: 335-352.
59. Hida S, Yamasaki S, Sakamoto Y, Takamoto M, Obata K, Takai T, Karasuyama H, Sugane K, Saito T, Taki S. (2009) Fc receptor γ -chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils. *Nat Immunol*, 10: 214-222.
60. 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.
61. Jakus Z, Simon E, Balázs B, Mócsai A. (2010) Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 62: 1899-1910.
62. Elliott ER, Van Ziffle JA, Scapini P, Sullivan BM, Locksley RM, Lowell CA. (2011) Deletion of Syk in neutrophils prevents immune complex arthritis. *J Immunol*, 187: 4319-4330.
63. Ozaki N, Suzuki S, Ishida M, Harada Y, Tanaka K, Sato Y, Kono T, Kubo M, Kitamura D, Encinas J, Hara H, Yoshida H. (2012) Syk-dependent signaling pathways in neutrophils and macrophages are indispensable in the pathogenesis of anti-collagen antibody-induced arthritis. *Int Immunol*, 24: 539-550.
64. Németh T, Futosi K, Szilveszter K, Viliñovszki O, Kiss-Pápai L, Mócsai A. (2018) Lineage-specific analysis of Syk function in autoantibody-induced arthritis. *Front Immunol*, 9: 555.
65. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, Tateno H, Uno J, Hirabayashi J, Mikami Y, Takeda K, Akira S, Saito T. (2009) C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 1897-1902.

66. Werninghaus K, Babiak A, Gross O, Holscher C, Dietrich H, Agger EM, Mages J, Mócsai A, Schoenen H, Finger K, Nimmerjahn F, Brown GD, Kirschning C, Heit A, Andersen P, Wagner H, Ruland J, Lang R. (2009) Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcR γ -Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J Exp Med*, 206: 89-97.
67. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mócsai A, Tschopp J, Ruland J. (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, 459: 433-436.
68. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, Rosewell I, Reis e Sousa C. (2009) Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, 458: 899-903.
69. Ku G, Malissen B, Mattei MG. (1994) Chromosomal location of the Syk and ZAP-70 tyrosine kinase genes in mice and humans. *Immunogenetics*, 40: 300-302.
70. MacGlashan D, Jr. (2016) Stability of Syk protein and mRNA in human peripheral blood basophils. *J Leukoc Biol*, 100: 535-543.
71. Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S, Yamamura H. (1991) Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem*, 266: 15790-15796.
72. Geahlen RL, McLaughlin JL. (1989) Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 165: 241-245.
73. Oliver JM, Burg DL, Wilson BS, McLaughlin JL, Geahlen RL. (1994) Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J Biol Chem*, 269: 29697-29703.
74. Roupe KA, Yanez JA, Teng XW, Davies NM. (2006) Pharmacokinetics of selected stilbenes: rhapontigenin, piceatannol and pinosylvin in rats. *J Pharm Pharmacol*, 58: 1443-1450.

75. Sweeny DJ, Li W, Clough J, Bhamidipati S, Singh R, Park G, Baluom M, Grossbard E, Lau DT. (2010) Metabolism of fostamatinib, the oral methylene phosphate prodrug of the spleen tyrosine kinase inhibitor R406 in humans: contribution of hepatic and gut bacterial processes to the overall biotransformation. *Drug Metab Dispos*, 38: 1166-1176.
76. Zhu Y, Herlaar E, Masuda ES, Burleson GR, Nelson AJ, Grossbard EB, Clemens GR. (2007) Immunotoxicity assessment for the novel Spleen tyrosine kinase inhibitor R406. *Toxicol Appl Pharmacol*, 221: 268-277.
77. Pine PR, Chang B, Schoettler N, Banquerigo ML, Wang S, Lau A, Zhao F, Grossbard EB, Payan DG, Brahn E. (2007) Inflammation and bone erosion are suppressed in models of rheumatoid arthritis following treatment with a novel Syk inhibitor. *Clin Immunol*, 124: 244-257.
78. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. (2006) R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks Fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 319: 998-1008.
79. Pine PR, Bahjat R, Chang B, Taylor V, Markovstov V, Hitoshi Y, Grossbard E. (2005) An orally bioavailable Inhibitor of FLT3 and Syk kinases prevents tumor growth in subcutaneously implanted human tumor xenografts and promotes cell death of FLT3 mutant AML cells. *Blood*, 106: 74A.
80. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres JL, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV, Grossbard E. (2008) Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 58: 3309-3318.
81. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. (2010) An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 363: 1303-1312.
82. Deng GM, Kyttaris VC, Tsokos GC. (2016) Targeting Syk in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol*, 7: 78.

83. Morales-Torres J. (2012) The status of fostamatinib in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*, 8: 609-615.
84. Mullard A. (2018) FDA approves first-in-class SYK inhibitor. *Nat Rev Drug Discov*, 17: 385.
85. Connell NT, Berliner N. (2019) Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Blood*, 133: 2027-2030.
86. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL. (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature*, 378: 298-302.
87. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. (1995) Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature*, 378: 303-306.
88. Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity*, 16: 547-558.
89. Sedlik C, Orbach D, Veron P, Schweighoffer E, Colucci F, Gamberale R, Ioan-Facsinay A, Verbeek S, Ricciardi-Castagnoli P, Bonnerot C, Tybulewicz VL, Di Santo J, Amigorena S. (2003) A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J Immunol*, 170: 846-852.
90. Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F. (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, 98: 600-603.
91. Yasuda T, Sanjo H, Pages G, Kawano Y, Karasuyama H, Pouyssegur J, Ogata M, Kurosaki T. (2008) Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity*, 28: 499-508.
92. Wex E, Bouyssou T, Duechs MJ, Erb KJ, Gantner F, Sanderson MP, Schnapp A, Stierstorfer BE, Wollin L. (2011) Induced Syk deletion leads to suppressed allergic responses but has no effect on neutrophil or monocyte migration in vivo. *Eur J Immunol*, 41: 3208-3218.
93. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6991-6995.

94. Starnes LM, Downey CM, Boyd SK, Jirik FR. (2007) Increased bone mass in male and female mice following tamoxifen administration. *Genesis*, 45: 229-235.
95. Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM. (1985) Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature*, 315: 239-242.
96. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 195-203.
97. 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.
98. Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. (1999) Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 219-225.
99. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans*, 34: 647-662.
100. Redondo-Munoz J, Pérez-García V, Carrera A. Phosphoinositide 3-kinase beta: when a kinase is more than a kinase. 2013.
101. 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.
102. 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.
103. Kumar DT, Doss CG. (2016) Investigating the Inhibitory Effect of Wortmannin in the Hotspot Mutation at Codon 1047 of PIK3CA Kinase Domain: A Molecular Docking and Molecular Dynamics Approach. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 102: 267-297.
104. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, 269: 5241-5248.

105. Arrowsmith CH, Audia JE, Austin C, Baell J, Bennett J, Blagg J, Bountra C, Brennan PE, Brown PJ, Bunnage ME, Buser-Doepner C, Campbell RM, Carter AJ, Cohen P, Copeland RA, Cravatt B, Dahlin JL, Dhanak D, Edwards AM, Frederiksen M, Frye SV, Gray N, Grimshaw CE, Hepworth D, Howe T, Huber KV, Jin J, Knapp S, Kotz JD, Kruger RG, Lowe D, Mader MM, Marsden B, Mueller-Fahrnow A, Muller S, O'Hagan RC, Overington JP, Owen DR, Rosenberg SH, Roth B, Ross R, Schapira M, Schreiber SL, Shoichet B, Sundstrom M, Superti-Furga G, Taunton J, Toledo-Sherman L, Walpole C, Walters MA, Willson TM, Workman P, Young RN, Zuercher WJ. (2015) The promise and peril of chemical probes. *Nat Chem Biol*, 11: 536-541.
106. 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.
107. 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.
108. Ross FP, Teitelbaum SL. (2005) α and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev*, 208: 88-105.
109. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Wagner EF, Schett G. (2002) Osteoclasts are essential for TNF- α -mediated joint destruction. *J Clin Invest*, 110: 1419-1427.
110. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr., 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.
111. 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.
112. Feng X, Teitelbaum SL. (2013) Osteoclasts: New Insights. *Bone Res*, 1: 11-26.

113. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG. (1997) Biology and action of colony--stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev*, 46: 4-10.
114. McGill GG, 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.
115. Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL. (1997) Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature*, 386: 81-84.
116. Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K. (2014) Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. *J Bone Miner Res*, 29: 830-842.
117. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, 17: 1231-1234.
118. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. (1998) Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*, 152: 943-951.
119. Dougall WC, 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*, 13: 2412-2424.
120. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. (1998) Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, 273: 20551-20555.
121. 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.

122. Park JH, Lee NK, Lee SY. (2017) Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells*, 40: 706-713.
123. 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.
124. Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H, Kamijo R. (2009) Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med*, 15: 1066-1071.
125. Kim K, Kim JH, Lee J, Jin HM, Kook H, Kim KK, Lee SY, Kim N. (2007) MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood*, 109: 3253-3259.
126. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T. (2010) The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *J Exp Med*, 207: 751-762.
127. Nishikawa K, Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kato S, Kodama T, Takahashi S, Calame K, Takayanagi H. (2010) Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 3117-3122.
128. 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.
129. Horton MA, Taylor ML, Arnett TR, Helfrich MH. (1991) Arg-Gly-Asp (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptor antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts. *Exp Cell Res*, 195: 368-375.
130. Engleman VW, Nickols GA, Ross FP, Horton MA, Griggs DW, Settle SL, Ruminski PG, Teitelbaum SL. (1997) A peptidomimetic antagonist of the

- alpha(v)beta3 integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo. *J Clin Invest*, 99: 2284-2292.
131. McHugh KP, 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.
 132. Faccio R, Takeshita S, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL. (2003) c-Fms and the $\alpha_v\beta_3$ integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J Clin Invest*, 111: 749-758.
 133. 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, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol*, 152: 181-195.
 134. 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.
 135. Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today*, 21: 148-154.
 136. Kane LP, Lin J, Weiss A. (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*, 12: 242-249.
 137. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*, 428: 758-763.
 138. Humphrey MB, Nakamura MC. (2016) A Comprehensive Review of Immunoreceptor Regulation of Osteoclasts. *Clin Rev Allergy Immunol*, 51: 48-58.
 139. Kober DL, Brett TJ. (2017) TREM2-Ligand Interactions in Health and Disease. *J Mol Biol*, 429: 1607-1629.
 140. Barrow AD, 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. *Journal of Clinical Investigation*, 121: 3505-3516.
141. Nemeth K, Schoppet M, Al-Fakhri N, Helas S, Jessberger R, Hofbauer LC, Goettsch C. (2011) The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology. *J Immunol*, 186: 13-18.
 142. Negishi-Koga T, Takayanagi H. (2009) Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev*, 231: 241-256.
 143. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC. (2005) Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev*, 208: 50-65.
 144. Zou W, Reeve JL, Liu Y, Teitelbaum SL, Ross FP. (2008) DAP12 Couples c-Fms Activation to the Osteoclast Cytoskeleton by Recruitment of Syk. *Mol Cell*, 31: 422-431.
 145. Yan L, Lu L, Hu F, Shetti D, Wei K. (2019) Piceatannol attenuates RANKL-induced osteoclast differentiation and bone resorption by suppressing MAPK, NF-kappaB and AKT signalling pathways and promotes Caspase3-mediated apoptosis of mature osteoclasts. *R Soc Open Sci*, 6: 190360.
 146. Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, Ginsberg MH, Ross FP, Teitelbaum SL. (2007) Syk, c-Src, the $\alpha_v\beta_3$ integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol*, 176: 877-888.
 147. 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.
 148. Jia Y, Miao Y, Yue M, Shu M, Wei Z, Dai Y. (2018) Tetrandrine attenuates the bone erosion in collagen-induced arthritis rats by inhibiting osteoclastogenesis via spleen tyrosine kinase. *FASEB J*, 32: 3398-3410.
 149. Nakamura I, Takahashi N, Sasaki T, Tanaka S, Udagawa N, Murakami H, Kimura K, Kabuyama Y, Kurokawa T, Suda T, et al. (1995) Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. *FEBS Lett*, 361: 79-84.

150. Hall TJ, Jeker H, Schaubelin M. (1995) Wortmannin, a potent inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int*, 56: 336-338.
151. Lee SE, 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.
152. Munugalavadla 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.
153. 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 Rheumatol*, 66: 2210-2221.
154. Long CL, Humphrey MB. (2012) Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling. *Bonekey Rep*, 1.
155. Vivanco I, Sawyers CL. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2: 489-501.
156. Fan Z, Li C, Qin C, Xie L, Wang X, Gao Z, Qiangbacuozen, Wang T, Yu L, Liu H. (2014) Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscle cells. *DNA Cell Biol*, 33: 12-19.
157. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. (2007) Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130: 811-823.
158. de Boer J, Williams A, Skavdis G, Harker N, Coles M, Tolaini M, Norton T, Williams K, Roderick K, Potocnik AJ, Kioussis D. (2003) Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol*, 33: 314-325.

159. Goodwin LO, Splinter E, Davis TL, Urban R, He H, Braun RE, Chesler EJ, Kumar V, van Min M, Ndukum J, Philip VM, Reinholdt LG, Svenson K, White JK, Sasner M, Lutz C, Murray SA. (2017) Large-scale discovery of mouse transgenic integration sites reveals frequent structural variation and insertional mutagenesis. *bioRxiv*: 236307.
160. Finney BA, Schweighoffer E, Navarro-Nunez L, Benezech C, Barone F, Hughes CE, Langan SA, Lowe KL, Pollitt AY, Mourao-Sa D, Sheardown S, Nash GB, Smithers N, Reis e Sousa C, Tybulewicz VL, Watson SP. (2012) CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood*, 119: 1747-1756.
161. Schmit AC, Lambert AM. (1990) Microinjected fluorescent phalloidin in vivo reveals the F-actin dynamics and assembly in higher plant mitotic cells. *Plant Cell*, 2: 129-138.
162. Riedl J, Flynn KC, Raducanu A, Gartner F, Beck G, Bosl M, Bradke F, Massberg S, Aszodi A, Sixt M, Wedlich-Soldner R. (2010) Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat Methods*, 7: 168-169.
163. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*, 5: 605-607.
164. Kertész Z, Győri D, Körmendi S, Fekete T, Kis-Tóth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavölgyi É, Dobó-Nagy C, Mócsai A. (2012) Phospholipase Cγ2 is required for basal but not oestrogen deficiency-induced bone resorption. *Eur J Clin Invest*, 42: 49-60.
165. Benko S, Magalhaes JG, Philpott DJ, Girardin SE. (2010) NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways. *J Immunol*, 185: 1681-1691.
166. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A. (2009) Critical role of phospholipase Cγ2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 206: 577-593.
167. Faccio R, Zou W, Colaianni G, Teitelbaum SL, Ross FP. (2003) High dose M-CSF partially rescues the Dap12^{-/-} osteoclast phenotype. *J Cell Biochem*, 90: 871-883.

168. Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, Sugahara A, Koito H, Ujike-Asai A, Nakamura A, Kanazawa K, Tan-Takeuchi K, Iwasaki K, Yokoyama WM, Kudo A, Fujiwara M, Asou H, Takai T. (2003) Osteopetrosis and thalamic hypomyelinoses with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin Invest*, 111: 323-332.
169. Humphrey MB, Ogasawara K, Yao W, Spusta SC, Daws MR, Lane NE, Lanier LL, Nakamura MC. (2004) The signaling adapter protein DAP12 regulates multinucleation during osteoclast development. *J Bone Miner Res*, 19: 224-234.
170. 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.
171. 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 γ 2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 283: 29593-29601.
172. Okamoto M, Murai J, Imai Y, Ikegami D, Kamiya N, Kato S, Mishina Y, Yoshikawa H, Tsumaki N. (2011) Conditional deletion of *Bmpr1a* in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice. *J Bone Miner Res*, 26: 2511-2522.
173. Bustelo XR, Rubin SD, Suen KL, Carrasco D, Barbacid M. (1993) Developmental expression of the *vav* protooncogene. *Cell Growth Differ*, 4: 297-308.
174. Perez-Cunningham J, Boyer SW, Landon M, Forsberg EC. (2016) Hematopoietic stem cell-specific GFP-expressing transgenic mice generated by genetic excision of a pan-hematopoietic reporter gene. *Exp Hematol*, 44: 755-764 e751.
175. Chen CH, Piraner D, Gorenstein NM, Geahlen RL, Beth Post C. (2013) Differential recognition of syk-binding sites by each of the two phosphotyrosine-binding pockets of the Vav SH2 domain. *Biopolymers*, 99: 897-907.

10. Saját publikációk jegyzéke

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1) **Csete D**, Simon E, Alatshan A, Aradi P, Dobó-Nagy C, Jakus Z, Benkő S, Győri DS, Mócsai A. (2019) Hematopoietic or Osteoclast-Specific Deletion of Syk Leads to Increased Bone Mass in Experimental Mice. *Frontiers in Immunology*, 10: 937.

IF: 4.716

2) 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

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK:

3.) Nemeth B, Doczi J, **Csete D**, Kacso G, Ravasz D, Adams D, Kiss G, Nagy A M, Horvath G, Tretter L, Mocsai A, Csepanyi-Komi R, Iordanov I, Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2016) Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB Journal*, 30 (1):286-300.

IF: 5.498

11. Társszerzők közötti munkamegosztás

1.) A Syk hemopoetikus és oszteoklaszt-specifikus törlése megnövekedett csonttömeget eredményez kísérleti egerekben:

Csete et al. Frontiers in Immunology 2019 10: 937

A projektért én voltam felelős. Az *in vitro* differenciációs és funkcionális méréseket én végeztem. A mikro-CT felvételeket Szabó Bencével és Dobó-Nagy Csabával közösen készítettük, az adatfeldolgozást én végeztem. A szövettani és immunfestéses kísérleteket Aradi Petrával és Jakus Zoltánnal, a génexpressziós vizsgálatokat Ahmad Alatshannal és Benkő Szilviával közösen végeztük. A genomiális PCR analízisben Simon Edina és én vettem részt. A projektet Mócsai Attila irányította és felügyelte.

2.) PI3K β szerepének vizsgálata az oszteoklasztok működésében és a csontanyagcserében:

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

A projektért Győri Dávid volt felelős. Az *in vitro* differenciációs és funkcionális méréseket közösen végeztük. Az aktingyűrű-képzéses vizsgálatok során a videókat én és Győri Dávid együtt készítettük el, az aktingyűrű-megszűnését vizsgáló kísérletek során a videókat én készítettem. A projektet Mócsai Attila irányította és felügyelte.

Az értekezés eredmény fejezetében bemutatott ábrák nem szerepelnek másik Ph.D. dolgozatban.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Prof. Mócsai Attilának, akinek laborjában először tudományos diákkörösként majd Ph.D. hallgatóként lehetőséget kaptam kutatómunka végzésére. Az általa megteremtett környezet, látásmód és színvonal egyedülálló Magyarországon és rendkívül sok segítséget nyújtott.

Köszönöm dr. Győri Dávidnak, hogy közvetlen témavezetőmként éveken át tanácsokkal, kritikával és segítséggel látott el nemcsak a labor, hanem az intézet működésével kapcsolatban is. Köszönöm dr. Kertész Zsuzsannának, hogy gyakorlatvezetőként majd témavezetőként felkeltette az érdeklődésemet a kutatás iránt. Köszönöm Prof. Hunyady Lászlónak, hogy intézetvezetőként biztosította a szükséges háttérrel a tudományos- és oktatómunkámnak. Külön köszönöm Dr. Ligeti Erzsébetnek, hogy Ph.D. program-, majd iskolavezetőként végig figyelemmel kísérte tudományos tevékenységemet.

Köszönöm a laboratóriumi háttérmunka során nyújtott kiemelkedő színvonalú segítségét Simon Edinának és Kiss Nórának. Hálás vagyok a Gyulladásélettani Labor és az Élettani Intézet munkatársainak, akikhez mindig bizalommal fordulhattam támogatásért, kiemelve Dr. Jakus Zoltán és Aradi Petra szövettani mérésekben nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Benkő Szilviának és Ahmad Alatshannak a génexpressziós mérésekben, valamint Prof. Dobó-Nagy Csabának és Szabó Bencének a mikro-CT vizsgálatokban nyújtott hozzájárulását.

Szeretném megemlíteni Shigeaki Kato és Alexander Tarakhovsky nevét, akik a génmódosított egerek egy részét rendelkezésre bocsátották.

Köszönöm feleségemnek, testvéremnek, családomnak és barátaimnak, hogy a kutatással telt hosszú évek során támogattak, motiváltak és kitartottak mellettem.