

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

Doktori tézisek

Dr. Csete Dániel

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



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

Dr. Rónai Zsolt, Ph. D., egyetemi docens

Dr. Vas Virág, Ph. D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Füst Zsuzsanna, az MTA doktora, professor emerita

Szigorlati bizottság

tagjai: Dr. Sipeki Szabolcs, Ph. D., egyetemi docens,

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

Budapest

2019

Bevezetés

A szervezetben a csontbontásért kizárólagosan felelős oszteoklasztok hemopoetikus eredetű többmagvú óriássejtek, amelyek a mieloid előalakok egyedülálló biokémiai érésével és fúziójával jönnek létre. Az oszteoklasztok érési folyamatának első része hasonló a makrofágok fejlődéséhez: a hemopoetikus őssejt mieloid prekuzorrá 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 és az oszteoklasztokon lévő RANK interakciója, valamint integrin-mediált jelátviteli utak aktivációja.

Az oszteoklasztok fejlődésében nélkülözhetetlen immunreceptor-szerű jelpályák ITAM tartalmú adaptereket aktiválnak, amelyek Syk-en keresztül szignalizálnak. *In vitro* adatok alapján elmondható, hogy a Syk hiányában jelentősen károsodik az oszteoklasztok fejlődése. A *Syk*^{-/-} egerek embrionális letalitása miatt erről a genotípusról *in vivo* adat nem áll rendelkezésre. Az ilyen jellegű vizsgálatokhoz sejtvonalspecifikus Syk törlésre van szükség.

A Syk oszteoklaszt működésben betöltött szerepe más jelpályák vizsgálatakor is felmerült. Az $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediált jelátvitelben is kimutatták a Syk jelentőségét. A Syk aktivációja szükséges az oszteoklasztokban kulcsfontosságú citoskeletális átrendeződéshez is. A Syk gátlása protektív hatású lehet különböző csontvesztéssel járó

modellekben mint a reumatoid artritisz vagy a kollagén indukálta artritisz. Ezek alapján kiemelt fontosságú, hogy a Syk szerepét tisztázzuk az *in vivo* csonthomeosztázisban.

Az általános foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) gátlószer wortmannin oszteoklasztogenezist gátló hatását már korábban kimutatták, de a különböző PI3K alosztályok szerepe nem volt ismert. Munkacsoportunk leírta a PI3K β izoformának a jelentőségét az oszteoklasztok fejlődésében és működésében. Annak tisztázására, hogy ez milyen módon történik, PI3K β -hiányos oszteoklasztokban több jellegzetes mechanizmust vizsgáltunk meg, ezek közül az aktingyűrű-képzés nagy jelentőséget mutatott. A génhányos sejtekben nemcsak a kialakult oszteoklasztok száma csökken, hanem az azokban létrejövő aktingyűrűk aránya is, az aktingyűrű-képzés szinte megszűnik. Az aktingyűrű dinamikus változásainak vizsgálata PI3K β izoformaspecifikus gátlószerrel való kezelés hatására lett az egyik következő célunk.

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?

Módszerek

Kísérleti állatok

A kísérletek során felhasznált egerek C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkeztek. A Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága a Ph.D. dolgozat megírásához felhasznált állatkísérleteket jóváhagyta.

Syk-hiányos egerek

A *Syk* gén floxolt allélvariációját, a *Syk*^{tm1.2Tara} mutációt hordozó egerek (továbbiakban *Syk*^{flox}) Alexander Tarakhovsky (Rockefeller University) laborjából származnak, 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.

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, emellett a *Commd10* gén inaktiválódik az adott lókuszon, 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*^{flox} allél Cre mediált törlésével létrejövő törölt allél a továbbiakban *Syk*^Δ allélként szerepel.

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. A *PI3Kβ*^{-/-} hím egerek infertilitást mutattak, így a kolóniát *PI3Kβ*^{-/-} nőstény és *PI3Kβ*^{+/-} hím egerekkel tartottuk fenn.

A Lifeact-EGFP rendszer

Michael Sixt (Institute of Science and Technology, Klosterneuburg, Ausztria) biztosította számunkra a transzgenikus Lifeact egereket, amelyben a Lifeact-EGFP ubikviter módon expresszálódik.

Mikro-CT analízis

A 9-hetes egerek leölése után az állatok jobb femurját mikro-CT analízisnek vetettük alá SkyScan 1172 készülék segítségével. A kvantitatív analízis során a disztális femorális metafízist vizsgáltuk, A következő paramétereket analizáltuk: relatív csonttérfogat (BV/TV),

trabekulaszám, trabekulavastagság, trabekulatávolság és struktúramodell index (SMI).

Szövetteni és immunhisztokémia vizsgálatok

9 hetes egerek jobb femurjait 4%-os paraformaldehidben (Sigma-Aldrich) tároltuk, majd Osteomoll (Merck) oldatban 3 hétig dekalcináltuk. 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.

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

A vad típusú, $Sy^{k\Delta OC}$ és $Sy^{k\Delta Haemo}$ egerek hosszú csöves 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/cm² 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 kultúrák leállítása után az oszteoklasztokra specifikus TRAP-festést (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk.

Az *in vitro* csontbontásos vizsgálatok során a sejteket hasonló körülmények között differenciáltattuk oszteoklaszt irányba 7 napig mesterséges hidroxipatit felszínen (Sigma-Aldrich), majd a sejteket 10%-os hipoklorit oldattal lemostuk.

Biokémiai vizsgálatok

Sejtfehérjék vizsgálata során az oszteoklaszt és makrofág kultúrákat a megadott napon leállítottuk és teljes sejtlizátumot nyertünk ki. Ezeket SDS gélen megfuttattuk és immunoblottoltuk.

Génexpressziós vizsgálatok

Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának változását kvantitatív real-time PCR módszerrel vizsgáltuk. Az oszteoklaszt és makrofág kultúrákat a megadott napon leállítottuk és TriPure reagenssel (Roche) RNS-t preparáltunk. A qPCR vizsgálatokhoz oszteoklaszt-specifikus Taqman assay-eket használtunk.

Genomiális PCR analízis

Az oszteoklaszt kultúrákat a megadott napon leállítottuk, átmosás után genomiális DNS-t izoláltunk, amelyet standard PCR reakcióval vizsgáltunk.

Aktingyűrű-vizsgálatok

Az 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.

Statisztikai analízis

A kísérleteket minimum 3, egymástól független elemszámmal végeztük el. A mikro-CT mérések eredményeit kétutas ANOVA módszerrel értékeltük ki, a többi mérés során egyutas ANOVA módszert alkalmaztunk Tukey vagy „Unequal n HSD” post hoc analízissel. A statisztikai analízishez a Statistica 8.0 szoftvert (Statsoft) használtuk. A 0,05 alatti p értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

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

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 $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egereket, amelyeket mikro-CT analízisnek vetettünk alá.

A $Syk^{\Delta OC}$ egerek és azok megfelelő kontrolljainak reprezentatív hosszmetzeti felvételein látszik, hogy a $Syk^{\Delta OC}$ egerek trabekuláris állománya jelentősen sűrűbb a vad típusénál, amelyhez hasonló csontdensitást mutatnak a Ctsk-Cre és $Syk^{flox/flox}$ kontroll állatok. A keresztmetzeti képek alapján is elmondható, hogy $Syk^{\Delta OC}$ egerek csontsűrűsége nagyobb, de a Ctsk-Cre és $Syk^{flox/flox}$ egereké hasonló, mint a vad típusé. A 3D rekonstrukciós képek is prezentálják ezeket a különbségeket.

A mikro-CT felvételek kvantitatív analízise azt mutatja, hogy a relatív csontmennyiség (BV/TV, bone volume/total volume) jelentősen megnőtt a $Syk^{\Delta OC}$ egyedekben, míg a Ctsk-Cre és $Syk^{flox/flox}$ állatok esetén nincs számottevő különbség a vad típushoz képest. Kétutas ANOVA statisztikai analízist használtunk, amely szerint a két mutáció (Ctsk-Cre és $Syk^{flox/flox}$) együttes előfordulása ($Syk^{\Delta OC}$) szignifikáns különbségeket okozott. Szintén jelentős eltérést tapasztaltunk a trabekulaszámban és a

trabekulatávolságban, de nem találtunk szignifikáns eltérést sem a trabekulavastagságban sem a trabekulák alakját jellemző SMI értékben. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus törlésekor bekövetkező trabekuláris csonttömeg-növekedés hátterében a trabekulák megemelkedett száma áll.

Mikro-CT – hemopoetikus Syk törlés

A teljes hemopoetikus kompartmentben Syk-hiányos $Syk^{\Delta Haemo}$ egereken (és megfelelő kontrolljaikon) is elvégeztük a mikro-CT analízist. Ahogy a mikro-CT felvételeken 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.

A mikro-CT felvételek kvantitatív analízise alapján a $Syk^{\Delta Haemo}$ egerekben is rendkívül jelentős BV/TV emelkedés történt, nemcsak a vad típushoz képest, hanem a $Syk^{\Delta OC}$ állatokhoz képest is. Az oszteoklaszt-specifikus törléshez hasonlóan a jelentős csonttömeg-növekedés hátterében elsősorban a trabekulák megnövekedett száma áll, miközben a trabekulavastagság alig emelkedett. A trabekulatávolság is csökkent és az SMI érték is szignifikánsan változott.

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 $Syk^{\Delta OC}$ 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.

Szövettan és immunhisztokémia

Vad típusú, $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek femurját szövettani analízisnek vetettük alá. A vad típusnál jóval sűrűbb trabekuláris hálózat jellemezi a $Syk^{\Delta OC}$ és főleg a $Syk^{\Delta Haemo}$ egereket.

Immunfestéssel vizsgáltuk az oszteoklasztok jelenlétét a trabekulákon. Ehhez oszteoklaszt-specifikus kalcitonin-receptor ellenes antitesteket használtunk. A vad típusú csontok trabekuláin megjelennek a kalcitonin-receptor által okozott jelek. 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.

***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. Különböző időpontokban végzett TRAP-festésekkel vizsgáltuk az oszteoklasztok morfológiáját a kultúrákban.

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.

Ezek az eredmények egyrészt megerősítik a Syk korábban leírt szerepét az oszteoklasztok fejlődésében, másrészt felvetik a Syk nem teljes törlésének lehetőségét a $Syk^{\Delta OC}$ kultúrákban, hiszen itt nem történt teljes károsodás az oszteoklasztok fejlődésében a $Syk^{\Delta Haemo}$ kultúrákkal ellentétben.

***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 hidroxapatit felszínen tenyésztettük 7 napig. A vad típusú oszteoklasztok a mesterséges hidroxapatit felszín jelentős részét, közel felét lebontották. 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.

Oszteoklaszt-specifikus gének expressziója

Real-time PCR módszerrel megvizsgáltuk, hogy hogyan változik az oszteoklaszt-specifikus gének expressziója a kultúrákban. 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, de mind a $Syk^{\Delta OC}$ mind a $Syk^{\Delta Haemo}$

kultúrákban lecsökkent a vad típushoz képest. Az adatok alapján feltételezhető a Syk szerepe az oszteoklaszt-specifikus gének kifejeződésének szabályozásában.

Syk fehérjeexpresszió

Az *in vivo* vizsgálatokban kapott eltérő adatok és a különböző mértékű károsodás az oszteoklasztogenezisben a $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ egyedek között *in vitro* 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. 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. 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.

Cre génexpresszió

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. 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.

Cre mediált törlés

Vad típusú, $Syk^{\Delta OC}$ és $Syk^{\Delta Haemo}$ oszteoklaszt kultúrákon elvégeztük a PCR analízist. A vad típusú kultúrákban 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. 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. Ez megmagyarázza a $Syk^{\Delta OC}$ mutáció esetén tapasztalt kevésbé súlyos *in vivo* fenotípust és a kevésbé károsodott *in vitro* oszteoklasztogenezist, valamint a Syk jelenlétét az oszteoklaszt kultúrákban, szemben a $Syk^{\Delta Haemo}$ mutáció esetén tapasztalt komplett és korai Syk törléssel és abszolút károsodott oszteoklasztogenezissel.

A PI3K β szerepe az oszteoklasztok működésében

Aktingyűrű-megtartás

Korábbi kísérleteink alapján feltételeztük, hogy a PI3K β nemcsak az oszteoklasztok fejlődéséhez, az aktingyűrű kialakításához, hanem az érett oszteoklasztok működéséhez, az aktingyűrű fenntartásához is szükséges. Ennek vizsgálatához érett, 3 nap RANKL kezeléssel átesett, kialakult aktingyűrűvel rendelkező oszteoklasztokhoz 50 nM koncentrációban a TGX221 PI3K β -specifikus gátlószert vagy a kontrollként a vivőanyagot, DMSO-t adtunk. A kontroll vizsgálatnál az aktingyűrű változatlan kinetikát mutat, míg a TGX221 hozzáadásakor megkezdődik az aktingyűrű struktúra fragmentálódása. Ezek alapján elmondható, hogy a PI3K β gátlásának hatására károsodik az oszteoklasztok aktingyűrű-megtartása.

Következtetések

A célkitűzésekben felvetett kérdéseknek megfelelő pontokban foglalom össze a következtetéseimet:

- 1.) Kimutattam, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus törlése enyhébb, hemopoetikus törlése masszív csontdenzitás-növekedést okoz egérben *in vivo*.
- 2.) Kimutattam, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus törlése esetén az *in vitro* oszteoklaszt fejlődés és működés jelentősen károsodik, míg hemopoetikus törlés esetén teljesen megszűnik.
- 3.) Kimutattam, hogy a Syk oszteoklaszt-specifikus és hemopoetikus törlése esetén tapasztalt eltérések háttérében 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 oszteoklasztok fejlődése során, míg a $Syk^{\Delta Haemo}$ egerek esetén már a sejtek fejlődésének korábbi szakaszában megtörténik a teljes törlés.
- 4.) Kimutattam, hogy PI3K β izoformaspecifikus gátlószer adásakor az oszteoklasztokban az aktinyűrű fragmentálódik, a PI3K β szükséges a kialakult aktinyűrűk megtartásához.

Saját publikációk jegyzéke

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1) **Csete D**, Simon E, Alatshan A, Aradi P, Dobó-Nagy C, Jakus Z,3, 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