

Hmgb1 elősegíti a matrilin-1 gén aktivációját a porcfejlődés korai szakaszában

SZÉNÁSI TIBOR

Bevezetés

Matrilin-1 (Matn1) extracelluláris fonalas hálózatot képezve a porcszövet sejtközötti állományának szerveződésében vesz részt. A matrilin-1 gén (*Matn1*) sajátossága, hogy a chondrogen csontosodás során a többi porcfehérje génnél később kapcsol be, és kifejeződése a növekedési korongban csak az oszlopos proliferatív és prehipertróf zónákra korlátozódik. A gén transzkripció szabályozásában amniotákban konzervált disztális (Dpe1 és Dpe2) és proximális DNS-elemek (Pe1), illetve az iniciátor elem (Ine) vesznek részt,¹ melyek porc-specifikus Sox faktorokat kötnek *in vitro*,^{2,3} így Sox9-et, a chondrogén differenciálódás fő transzkripció faktorát, valamint L-Sox5 és Sox6 faktorokat, melyek szintén nélkülözhetetlenek a gén bekapcsolásához. A rövid promóteren található SI és SII silencer elemek Nfi fehérjékkel hatnak kölcsön,⁴ de megtalálhatók más általános faktorok kötőhelyei is. A Sox fehérjék HMG box doménjük révén specifikus szekvenciát ismernek fel a DNS kis árkában, ellentétben a DNS nagy árkában szekvencia-specifikusan kötődő klasszikus transzkripció faktorokkal (pl. Nfi).

Hmgb1, a kromatin abundáns fehérjéje, szintén HMG box doménje révén, de nem szekvencia-specifikusan kötődik a DNS-hez és ez által fellazítja a kromatin szerkezetet.⁵ Bár Hmgb1 sokoldalúan befolyásolja a sejtek működését, szerepét a porcdifferenciálódásban nem vizsgálták. Funkcióját a vázrendszer fejlődésében az endochondralis csontosodás késői szakaszában írták le, a hipertróf porcsejtek, mint kemoatraktáns termelik, ami elindítja az osteoclast és osteoblast sejtek invázióját.⁶

A tanulmány szorosan kapcsolódik azokhoz az előzetes eredményekhez, melyek a gén egyedi transzkripció szabályozásának vizsgálata során az utóbbi években születtek a csoportban. Az irányító DNS-elemek és transzkripció faktorok azonosítása alapján egy hipotézist állítottunk fel a gén szűkített, porcfejlődési stádiumtól függő kifejeződésének magyarázatára.⁷

A térben és időben szűkített porcspecifikus kifejeződés szabályozásában domináns szerepe van a rövid promóternek és a konzervált DNS-elemek

¹ RENTSENDORJ ET AL. 2005, 705–716.

² RENTSENDORJ ET AL. 2005, 705–716.

³ SZABÓ ET AL. 1995,10212–10221.

⁴ SZABÓ ET AL. 1995,10212–10221.

⁵ BIANCHI – AGRESTI 2005, 496–506.

⁶ TANIGUCHI ET AL. 2007, 5650–5663.

⁷ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

különleges elrendeződésének a TATA motívum körül.⁸ A rövid promóter önmagában alacsony aktivitású mind transzgenikus egerekben, mind pedig tranziens expressziós kísérletekben. Magas aktivitásához szükség van távoli DNS-elemekre. A rövid promóter, együttműködve akár a homológ távoli DNS-elemekkel vagy a minden porcsejtben aktív heterológ *Col2a1* enhanszer elemekkel, a génexpressziót egyaránt disztális vázelemekbe és a növekedési korong meghatározott zónáiba irányítja.^{9,10} Más porcfehérje génekhez hasonlóan, a Sox faktorok szinergista kölcsönhatása fontos szerepet játszik a *Matn1* génkifejeződés regulációjában. Azonban a kulcsfontosságú Pe1 elemhez kötődő Sox9 transzaktiváló hatását az Ine elemhez kötődő L-Sox5/Sox6, más porcfehérje génektől eltérően, dózisfüggő módon befolyásolja. Alacsony dózisonál (korai fejlődési stádiumban) növeli, míg magas dózisonál (késői fejlődési stádiumban) csökkenti azt.¹¹ Ezen kívül Nfi faktorok is dózisfüggő módon befolyásolják a SOX9 transzaktiváló hatását. Így L-Sox5/Sox6 mellett az Nfi faktorok is fontos szerepet játszanak a *Matn1*, a porcfejlődési stádiumfüggő kifejeződésének szabályozásában.¹²

A csoport előzetes eredményei alapján egy modellt állítottunk fel a *Matn1* zónális kifejeződését irányító különleges transzkripció szabályozási mechanizmusára (*I. ábra*).

Hipotézisünk szerint a Sox és Nfi fehérjék kötődése elősegíti a gén bekapcsolását. Mivel az Nfi fehérjék képesek a hisztonokhoz kapcsolódni,^{13,14} valószínű, hogy a nukleoszóma struktúra fellazításában is szerepet játszanak (*I.A ábra*). A porcfejlődés kezdeti szakaszában még a kötőhelyek lefedettsége alacsony és Sox9 viszonylag nagy moláris feleslegben van L-Sox5/Sox6-hoz képest. L-Sox5/Sox6 kötődése az Ine elemhez elősegíti Sox9 kötődését a kulcsfontosságú Pe1 elemhez (*I.B ábra*). Sox faktorok kötődése a TATA környékére meghajlítja a DNS-t, elősegítheti TBP és RNS-polimeráz II kötődését. A DNS meghajlítása elősegítheti más, nem azonosított faktorok kötődését Pe1-hez és Ine-hez. Az SI elemhez kötő Nfi fehérjék szintén modulálják a Sox9 aktiváló hatását és hozzájárulnak a promóter aktiválásához azáltal, hogy közvetlen kölcsönhatásba lépnek általános transzkripció faktorokkal, különböző koaktivátorokkal és represzorokkal. Az Nfi jelenléte elősegítheti a transzkripció preiniciációs komplex és az enhanszoszóma képződését. A promóter aktivitása a késői poliferatív stádiumú chondroblastokban a legmagasabb, amikor a Sox9 és más faktorok kötődése optimális a Pe1 és a Dpe1 elemen (*I.C ábra*). Későbbi stádiumokban (pl.

⁸ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

⁹ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

¹⁰ KARCAGI ET AL. 2004, 605–618.

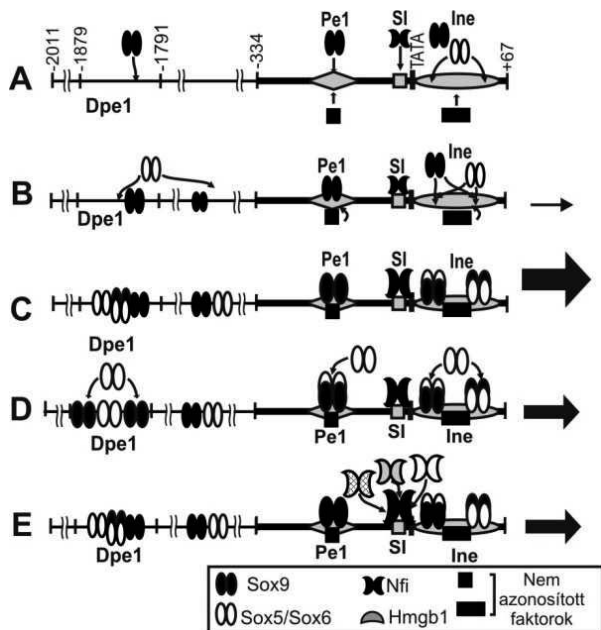
¹¹ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

¹² NAGY ET AL. 2011, 686–699.

¹³ ALEVIZOPOULOS ET AL. 1995, 3051–3066.

¹⁴ GRONOSTAJSKI 2000, 31–45.

hipertróf porcsejtekben) vagy amikor Sox trió szintje magas, L-Sox5/Sox6 vetélkedik a Sox9-cel a Pe1 Sox kötőhelyéért, ezáltal gátolhatja a Sox9 kötődését (1.D ábra), így csökken a Sox9 transzaktiváló hatása. A Sox helyek nagy telítettsége az Ine elemen interferálhat a preiniciációs komplex képződésével a TATA motívumon. Az Nfi felhalmozódása szintén csökkentheti a promóter aktivitását, kompetíció léphet fel különböző aktivátor és represszor Nfi izoformák között és ez blokkolhatja TBP kötődését a TATA-hoz (1.E ábra).



1. ábra: Modell a promóter aktivitás Sox trió és Nfi faktorok általi finom hangolására

Ábrázoltuk faktokrok DNS-elemekhez kötődését a *Matn1* aktivációt a porcfejlődés kezdetén (A), a korai szakaszában (B), késői proliferatív porcsejtekben optimális arányok esetén (C), Sox5/Sox6 felhalmozódása esetén (D) és Nfi faktorok felhalmozódása esetén (E).

Célkitűzés

A *Matn1* kifejeződése és *Matn1* promóter működése transzgenikus egerekben eltér más porcfehérje génekétől, jellegzetes zónális mintázatot mutat a növekedési korongban. Csoportunk célja, hogy megismerjük a gén sajátos transzkripciósi szabályozási folyamatait, és más porcfehérje génekkel azonos és azoktól eltérő regulációs lépéseit. A csoport korábbi eredményei kromatin szintű szabályozásra is utaltak, ezért e tanulmány célja a Sox-faktorokkal rokon Hmgb1 hatásának és szerepének tisztázása a *Matn1* génexpresszió transzkripciósi szabályozásában.

Ebből a célból a jelen tanulmány keretében vizsgálni kívánjuk:

1. a porcdifferenciációban szerepet játszó marker gének expresszióját QRT-PCR analízissel;
2. a *Matn1* regulációjában fontos konzervált DNS-elemek Sox és Hmgb1 faktorkötő-képességét tisztított GST-fúziós fehérjékkel EMSA kísérletekben;
3. a konzervált Dpe1 elem porcspecifikus enhanszer hatását;
4. a Hmgb1 hatását kotranszfekciós kísérletekben a *Matn1* hosszú promóterére és Sox fehérjék szinergista kölcsönhatására;
5. a Hmgb1 csendesítés hatását állandósult chondrogen kultúrákban a porcspecifikus génexpresszióra.

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

Csirke embrió fibroblaszt (CEF), csirke embrió porcsejt (CEC) és mesenchyma kultúrák készítését előzőleg leírtuk.¹⁵ A kis sejtsűrűségű (LDM) és nagy sejtsűrűségű mesenchyma kultúrákból (HDM) 1×10^6 sejtet és 5×10^6 sejtet lemezelünk 35 mm átmérőjű Petri csészére 10% fetal borjúsavót tartalmazó DMEM tápfolyadékban.¹⁶ COS-7 sejtvonalat standard körülmények között tartottuk, 5×10^5 sejtet lemezelünk 35 mm átmérőjű Petri csészére. A HDM sejtkultúra korai proliferatív (Ia stádiumú) porcsejtekből áll, míg a CEC kultúrát késői proliferatív (Ib stádiumú) porcsejtek alkotják. Előbbire alacsony, utóbbira magas *Matn1* expresszió jellemző. Az LDM, CEF és COS-7 sejteket *Matn1*-et nem expresszáló kontrollként használtuk.

Kvantitatív reverz transzkripció-PCR (QRT-PCR)

Totál RNS-t preparáltunk CEC, CEF és differenciálódó HDM kultúrából RNS izoláló kit (Macherey-Nagel) segítségével. QRT-PCR-t génspecifikus primerekkel RotorGene 3000 készüléken a SyberGreen protokoll szerint végeztük: 15 perc 95 °C, 45 ciklus 95 °C 15 másodperc, 60 °C 25 másodperc és 72 °C 25 másodperc.^{17,18} Az egyedi C_t értékeket normalizáltuk három belső kontrol gén (*Gapdh*, 18S rRNS, és 28S rRNS). C_t értékének átlagára.

¹⁵ RENTSENDORJ ET AL. 2005, 705–716.

¹⁶ RENTSENDORJ ET AL. 2005, 705–716.

¹⁷ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

¹⁸ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

In vitro DNS-fehérje kölcsönhatási kísérletek (EMSA)

A két-szálú oligonukleotidokkal a –1879/–1791 pozíciók közötti Dpe1 elemet, három próbára tagoltuk: 5'-GAG TCC AGT GTT TTC GTT TTT GGA GGC CCG GGG AA-3' (Dpe1A), 5'-GGA AAA ATT ATG TTT CAT ATA TTA AAA ATA AAC A-3' (Dpe1B), 5'-AAA TAA ACA CTA CTT TTA CAG AGG TAT AAA TGC-3' (Dpe1C). A Pe1 és Ine elem szekvenciáját a (3.A ábra) mutatja.^{19,20} A Hmgb1 teljes kódoló régióját²¹ pGEX expressziós vektorba klónoztuk. A GST-fúziós L-Sox5, SOX9 és Hmgb1 fehérjéket BL21 codon+RIL sejtekben termeltettük, majd glutation-szefaróz oszlopon tisztítottuk.²² A kötési kísérletek során 30 fmol jelölt DNS próbát inkubáltunk 0,6-3,2 µg tisztított fehérjével 500 ng nem specifikus poli-(dGdC) kompetitor jelenlétében Sox-specifikus pufferben (100mM TrisHCl pH7,9, 20 mM MgCl₂, 05 mM EDTA, 11 mM DTT, 0,25% Igepal, 8% ficoll, 250 mg/ml BSA) inkubáltuk.²³

Immunfluoreszcencia

Az immunfluorezcenciát 10 µm-es acetone-fixált metszeteken végeztük, a nem specifikus antitest kötődést 10%-os normál kecske szérummal blokkoltuk. A mintákat 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel, a következő kombinációkban: affinitás-tisztított nyúl Matn1 antiszérum²⁴ (1:200 hígítás) vagy SOX9 antitest (Abcam, ab3697, 1:50) és egér monoklonális anti-HMGB1 antitest (MBL, M137-3, 1:200). A megfelelő másodlagos ellenanyagot szobahőmérsékleten és sötétben 1 órán át adtuk. Alexa 488-jelölt anti-nyúl IgG antiszérumot (Molecular Probes, 1:400) és Cy3-konjugált anti-egér IgG antitestet (Jackson Immunoresearch, 1:400) használtunk másodlagos antitestként. A mintákat Eclipse E600 mikroszkóppal vizsgáltuk és Nikon D5000 digitális fényképezőgéppel fényképeztük le. A fotózás után a fedőlemezt eltávolítva a metszeteket hematoxylinnal és eosinnal festettük meg.

Kotranszekciós kísérletek

A HDM kultúrát 5×10^6 sejt számmal, míg a LDM kultúrát 1×10^6 sejt számmal transzfektáltuk a Ca-foszfát precipitációs módszerrel.²⁵ CEF és CEC kultúra esetén ez a sejt szám 7×10^5 volt. Az AC8Luc, illetve Dpe1 4 kópiában

¹⁹ RENTSENDORJ ET AL. 2005, 705–716.

²⁰ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

²¹ DOPPLER ET AL. 2001, 3266–3279.

²² SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

²³ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

²⁴ HAUSER 1996, 32247–32252.

²⁵ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

tartalmazó riporter plazmidokból²⁶ LDM, HDM és COS-7 sejtek esetén 5 µg-t használtunk, míg CEF és CEC kultúráknál a riporter plazmidok mennyisége 2 µg volt. A kotranszfekció kísérleteinkben a következő expressziós plazmidokat használtuk: pcDNA5'UT-FLAG-L-Sox5 (pFSox5), pcDNA5'UT-FLAG-Sox6 (pFSox6) és pCDNA-SOX9 (pSOX9) vagy pcDNA5'UT-FLAG-SOX9 (pFSOX9)²⁷ és pHmgb1²⁸. A legtöbb kísérlethez, 125 ng pFSox5, 125 ng pFSox6 és 250 ng pSOX9 vagy 250 ng pFSOX9 plazmidot használtunk 100 ng pHmgb1 jelenlétében, illetve anélkül. Bizonyos esetekben emelkedő mennyiségű pHmgb1 (0–500 ng) vagy pFSox5 és pFSox6 (0–250 ng) plazmidokat használtunk. Minden mérést 3–10 alkalommal, hármassával végeztünk. Az eredmények statisztikai kiértékelése KyPlot version 2.0 beta 15. programmal, egy utas varianciaanalízissel (ANOVA) és Dunett-féle teszttel történt. A szignifikancia mértékét (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) az üres vektorral transzfektált riporterekre vonatkoztatva vagy (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001) a jelölt módon számoltuk.

A Hmgb1 és Sox fehérjék egyidejű kimutatására előállítottuk a pHmgb1 expressziós plazmidot, a Hmgb1 kódoló régióját beépítve a pcDNA5'-UT-2FLAG vektorba.²⁹ COS-7 sejteket kotranszfektáltuk 10 µg AC8Luc riporterrel, állandó mennyiségű (1 µg) pFSOX9, pFSox6, pFSox5 és emelkedő mennyiségű pHmgb1 effektor plazmidokkal. A transzfektált sejteket lízáltuk, a felülúszóból a luciferáz mérés után Wetern analízist végeztünk polikonális nyúl anti-FLAG (Sigma) ellenanyaggal az előzőleg leírt módon.³⁰

Az endogén *Matn1* indukálhatóságának tesztelésére COS-7 sejteket kotranszfektáltunk 2µl TurboFect (ThermoScientific, R0531) reagens felhasználásával a következő plazmid mennyiségekkel 50 ng pFSOX9, 75 ng pFSox5 és 75 ng pFSox6 800 ng pHmgb1 jelenlétében, illetve anélkül. A transzfekciót duplikátumban végeztük három alkalommal. A mintákból RNS izoláltunk, majd cDNS-é írtuk át és *Matn1* mRNS szintet QRT-PCR határoztuk meg. A C_t értékeket Gapdh mRNS szintre normalizáltuk.

Hmgb1 csendesítés

A csendesítési kísérletet két human (C-28/I2,³¹ SW1353³²) és egy patkány (RCS³³) állandósult chondrogen sejtvonalon végeztük, az alábbi siRNS-ek (Bioneer Corporation, Daejeon, Korea) felhasználásával: human *HMGB1* 5'-caggaggaaucugaacau-3'; patkány *Hmgb1* 5'-cugucaacuucucagaguu-3'; human

²⁶ CSABAI 2011.

²⁷ LEFEBVRE – LI – DE CROMBRUGGHE 1998, 5718–5733.

²⁸ DOPPLER ET AL. 2001, 3266–3279.

²⁹ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

³⁰ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

³¹ GOLDRING ET AL. 1994, 2307–2316.

³² GEBAUER ET AL. 2005, 697–708.

³³ MUKHOPADHYAY ET AL. 1995, 27711–27719.

GAPDH 5'-gugugaaccaugagaagua-3' és negatív kontroll siRNS 5'-ccuacgccaccauuucgu-3'. $1,2-2,0 \times 10^5$ sejtet lemezelünk ki 6-lyukú lemezekre, majd 24 órával a kilemezelés után transzfektáltuk 100–400 pmoles siRNS duplexszel X-tremeGENE siRNS transzfekciós reagens (Roche Applied Science) felhasználásával. Az RCS sejteket 30 órával, a **C-28/I2** és SW1353 42 órával a transzfekció után gyűjtöttük be. RNS tisztítottunk és QRT-PCR analízissel követtük a marker géneexpressziót, amit az Rps18 mRNA szintjéhez viszonyítva ábrázoltunk.

Eredmények

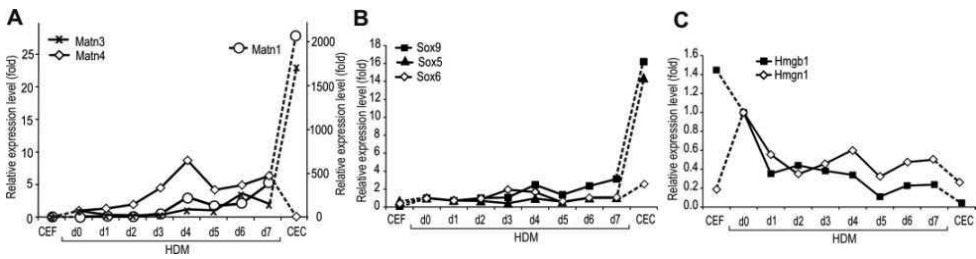
A marker géneexpresszió változása in vitro differenciálódó porckultúrákban

A porcdifferenciálódás különböző stádiumait modellező kultúrákban QRT-PCR analízissel követtük a marker gének expresszióját. Ebből a célból porccá differenciáltattunk nagy sűrűségű mesenchyma (HDM) kultúrát. Pozitív kontrollként a magas *Matn1* expressziójú CEC kultúrát, míg negatív kontrollként a gént nem expresszáló CEF kultúrát használtuk. Minden értéket a HDM 0. napos értékhez viszonyítva adtuk meg.

A porcdifferenciálódás korai stádiumát képviselő HDM kultúrában az L-Sox5 mRNA alacsony szintjével szemben a *Sox9* mRNA szintje fokozatosan emelkedett, a 4. napon kisebb csúccsal (2.A ábra). Legmagasabb értéket azonban mindkét mRNA expressziója a főként késői proliferatív porcsejtekből álló CEC kultúrában ért el. A *Sox6* két csúcsot adott, az elsőt a HDM kultúrában 3–4. napon, a másodikat CEC kultúrában. A *Matn1* aktivációját a 4. naptól detektáltuk, párhuzamosan a *Sox9* és a *Sox6* első csúcsával, majd szintje CEC kultúrában 2057-szeresére emelkedett (2.B ábra). Ez a legmeredekebb mRNA akkumuláció az ECM gének között, szemben a *Col2a1* mRNA 181-szeres relatív emelkedésével. Szemben a *Matn1* és *Matn3* expresszióval, a *Matn4* mRNA szint a csúcsát HDM kultúrában éri el, ami jelzi lehetséges szerepét a porcfejlődés korai szakaszában. A *Hmgn1* mRNA expressziója HDM 0. napos kultúrában érte el a maximumát, majd fokozatosan csökkent, alátámasztva a chondrogenesis korai szakaszában betöltött szerepét.³⁴ A Sox faktorokkal rokon HMGB domént tartalmazó *Hmgb1* mRNA szintje a nem expresszáló CEF-ben volt legmagasabb, majd meredeken és folyamatosan csökkent a porcdifferenciáció előrehaladtával (2.C ábra). A *Hmgb1* expressziós mintázata inverz korrelációt mutatott a *Sox9*, *Sox5* és ECM fehérje (*Matn1* és *Matn3*) génekével.

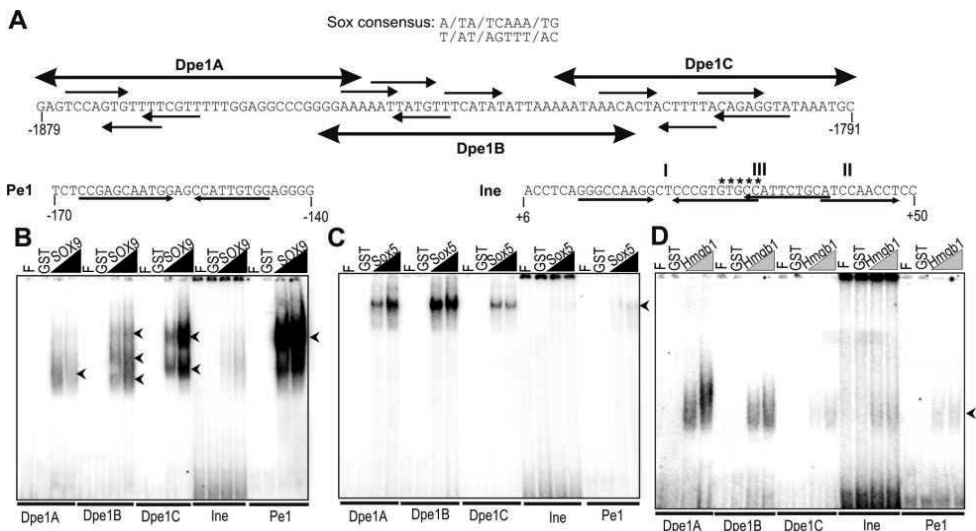
Tehát kimutattuk, hogy míg a Sox gének expressziója nő a chondrogenesis során, addig a *Hmgb1*-é csökken, hasonlóan a chondrogenesis kezdeti szakaszában szerepet játszó *Hmgn1* génhez.

³⁴ FURUSAWA ET AL. 2006, 592–604.



2. ábra: A marker génexpresszió összehasonlítása az *in vitro* porcdifferenciálódás során

A markerek mRNS szintjét QRT-PCR-rel követtük HDM kultúrában az *in vitro* chondrogenesis során, a relatív expressziós értékeket HDM 0 napos értékre három belső kontrolra vonatkoztatva adtuk meg. Az értékeket összehasonlítottuk a nem expresszáló CEF és a *Matn1*-t magasan expresszáló kultúrák mRNS szintjeivel.



3. ábra: GST-fúziós Sox és Hmgb1 fehérjék *in vitro* kötődésének összehasonlítása a *Matn1* konzervált DNS-elemeihez

A használt oligók szekvenciái és a Sox kötőhelyek (A) GST-fúziós SOX9 (B), L-Sox5 (C) és Hmgb1 (D) *in vitro* kötődési vizsgálata. *Western analízissel* és *QRT-PCR-rel* kombinált *kotranszfekció*.

Hmgb1 kötődik a Matn1 konzervált DNS elemeihez

A következő kísérletsorozatban tisztított Sox és Hmgb1 fehérjék *in vitro* kötődését vizsgáltuk a *Matn1* konzervált DNS elemeihez (3. ábra). SOX9 legerősebben a Pe1 elemhez és Dpe1 3' végi Sox motívumához kötődik, míg a Sox5 leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel (3.B. ábra). Érdekeség, hogy az Ine, amit leginkább a Sox5 és Sox6 ismer fel,³⁵ a többi elemhez képest gyenge kötőképességet mutat. Ezek után kíváncsiak voltunk, vajon Hmgb1 tud-e kötődni a DNS-elemekhez. Az EMSA kísérleteinkből kiderült, hogy a Hmgb1 a Sox9-cel ellentétben a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel leghatékonyabban (3.D ábra). Azontúl mindhárom fehérjével végzett kötési kísérleteink alapján a Hmgb1 jelenléte minden elemen befolyásolja a Sox faktorok kötődését.³⁶

Tehát a Hmgb1 a Sox9-cel ellentétes affinitással kötődik a *Matn1* konzervált DNS elemeihez, ami sugallja a gén szabályozásában betöltött szerepét.

Dpe1 elem porc-specifikus enhanszerként működik COS-7 sejtekben végzett kotranszfekciós kísérletekben

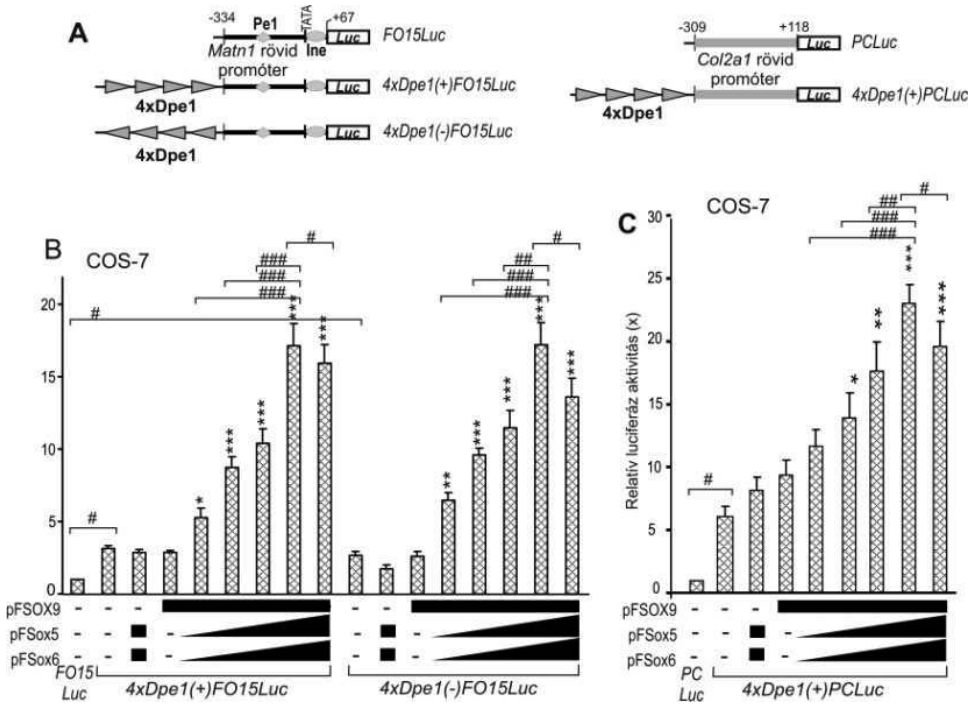
A konzervált Dpe1 elemről Dpe1 elem tranziens expressziós és transzgén egér kísérletekben jelentősen növelte rövid promóter aktivitását.³⁷ Ennek ellenőrzésére olyan konstrukciót készítettünk, amely Dpe1 elemet 4 kópiában reverz irányban tartalmazta, ugyanis az enhanszer működés független az irányultságtól. A Dpe1 elem képes fokozni a Sox trió mediálta aktivációt homológ és heterológ promótereken COS-7 sejtekben állandó mennyiségű SOX9 és növekvő mennyiségű L-Sox5, Sox6 koexpressziójakor (4. ábra A–C). A Dpe1 elem 4 kópiája irányultságtól függetlenül 3,1-szeresére növelte a *Matn1* rövidpromóter és 6-szorosára *Col2a1* rövidpromóter aktivitását Sox trió koexpressziója nélkül (4. ábra B és C). Az L-Sox5/Sox6 és SOX9 dózisfüggő módon 17-szeresére és 23-szorossáára növelte *Matn1* és *Col2a1* promóterek aktivitását (4. ábra B és C).

Tehát a korábbi tranziens expressziós és transzgén egér kísérleteink eredményét megerősítve igazoltuk, hogy a Dpe1 iránytól függetlenül porc-specifikus enhanszerként működik, ami képes homológ és heterológ promóter Sox trió mediálta aktiválására.

³⁵ NAGY ET AL. 2011, 686–699.

³⁶ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

³⁷ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.



4. ábra: A Dpe1 elem funkcionális analízise erőltetett expressziós kísérlettel COS-7 sejtekben
 (A) A riporterek plazmidok térképe, amelyekben a Dpe1 elem négy kópiáját fuzionáltattuk a homolog Matn1 vagy heterológ Col2a1 rövid promóterrel direkt vagy reverz orientációt feltüntetve (B-C). A riporterek dózis-függő szinergista aktivációja a Sox trió erőltetett expressziójának hatására. A relatív luciferáz aktivitást a Matn1 rövid promóterhez, (FO15Luc, B) vagy Col2a1 rövid promóterhez (PCLuc, C) képest tüntettük fel. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ szignifikancia a vektor- kotranszfektált vad típusú FO15Luc plazmidhoz képest vagy vs. vektor-kotranszfektált 4 × Dpe1-riporterekre számítva adtuk meg; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ –ként jelöltük. (Forrás: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939913001156>)

Hmgb1 kifejeződési mintázata korrelál a Sox9 és Matn1 kifejeződésével

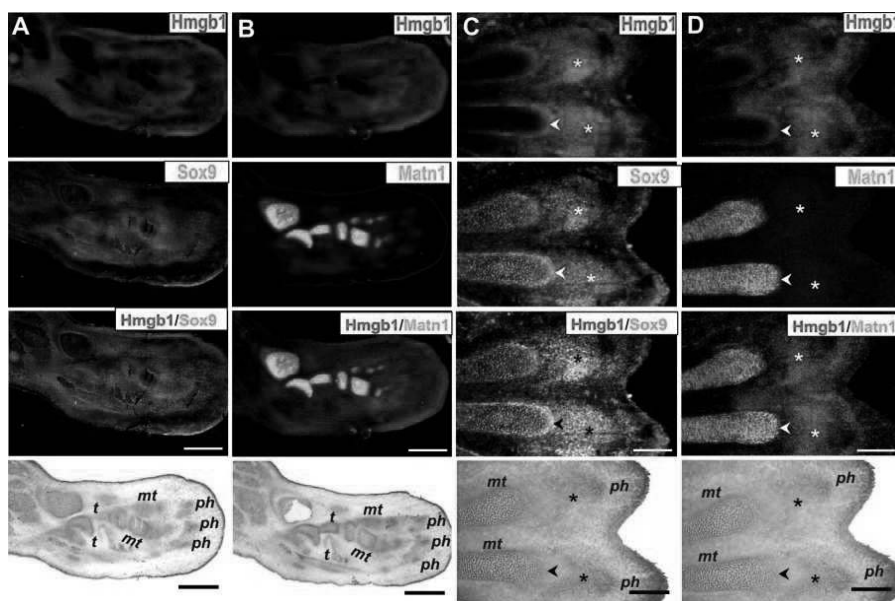
A Sox faktorok és a Hmgb1 hasonló HMGB DNS-kötő domént hordoznak és a hipertróf chondrocyták Hmgb1-et szekretálnak az endochondralis csontosodás késői szakaszában, lehetséges szerepét eddig nem vizsgálták. A Hmgb1 lehetséges szerepének nyomon követése érdekében kettős immunofluoreszcenciával vizsgáltuk a Hmgb1 expressziós mintázatát fejlődő egér végtagban. A Hmgb1 immunjel már a chondrogenesis korai szakaszában csökkenni kezdett, átfed a Sox9-cel kondenzált mesenchymákban, prechondrocytákban és korai chondroblastokban (5. ábra A és C). Az irodalmi és korábbi adatokkal összhangban,^{38,39} a Matn1 szűkített spatiotemporális

³⁸ KARCAGI ET AL. 2004, 605–618.

³⁹ LEFEBVRE – SMITS 2005, 200–212.

kifejeződést mutatott a Sox9-hez képest, kis késéssel a korai chondroblastokban volt detektálható (5. ábra B és D). Azokban a sejtekben, amelyekben még a Matn1 nem fejeződik ki, átfed a Hmgb1 és Sox9 immunjel, tehát a két fehérje együttesen jelen van a gén kifejeződése előtt.

Megerősítve a QRT-PCR eredményeket a Hmgb1 kifejeződése fejlődő egér végtagban is korrelál a Sox9 és Matn1 kifejeződésével. Az, hogy a Hmgb1 és Sox9 expresszió átfed a Matn1 még nem kifejező sejtekben, tovább erősíti szerepét a gén szabályozásában.



5. ábra: A Hmgb1 expresszió korrelál a Sox9 és Matn1 kifejeződésével fejlődő egér végtagban

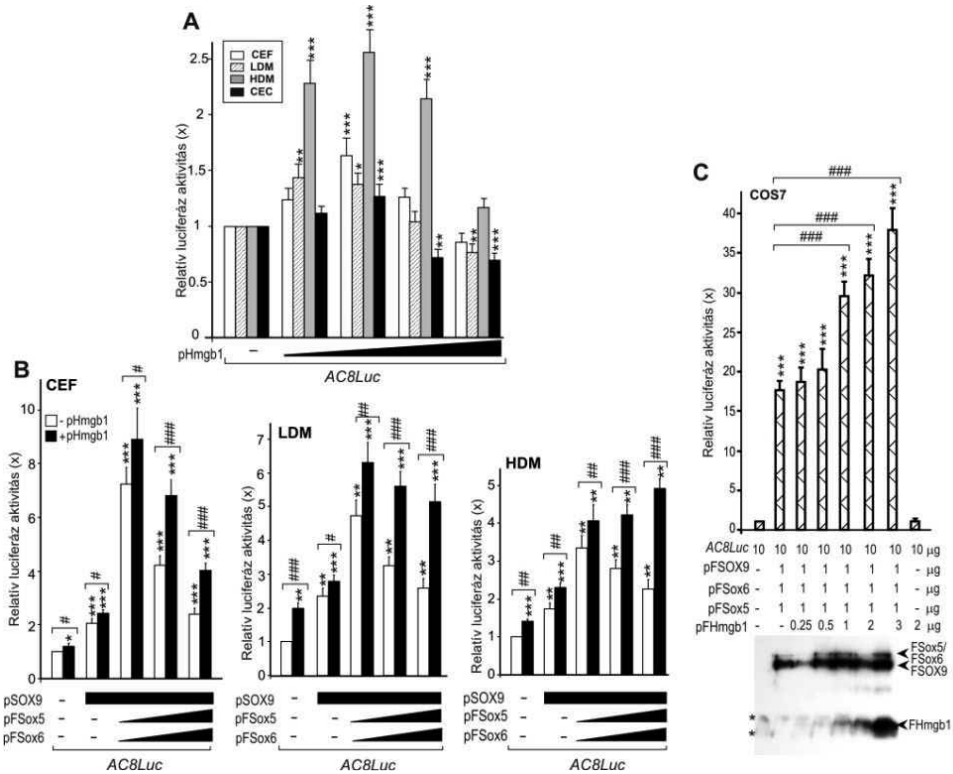
Dupla immunfluoreszcens E14,5 napos egér embriókból (A-D) készült kriosztát metszeteken. Hematoxylin-eosin festés ugyanazon metszeteken készültek az összehasonlítás érdekében. A Hmgb1 és Sox9 expresszió átfed a porc fejlődés korai szakaszában a *Matn1* aktivációja előtt. A Hmgb1 és Sox9 átfed a csillaggal jelölt kondenzált mezenchyma vagy prechondrocyta sejtekben és a nyílheggyel jelölt fejlődő metatarsalis chondroblastokban (A és D), amelyekben nincs Matn1 immunjel (B és D). A differenciálódott porc elemekben a Hmgb1 szignál lecsökken, korrelál a magas SOX9 és Matn1 szignálokkal (A-D). Mércék, 200 µm (C és D); 500 µm (A és B). mt, metatarsalia; ph, phalangia; t, tarsalia.

Hmgb1 hatása a *Matn1* hosszú promóterének aktivitására

A következő kísérletsorozatban Hmgb1 hatását vizsgáltuk a *Matn1* promóter aktivitására. Ebből a célból a gén hosszú promóterét tartalmazó, AC8Luc konstrukciót növekvő mennyiségű (50–500 ng) mennyiségű Hmgb1 fehérjét expresszáló plazmiddal kotranszfektáltuk az említett négy mesenchymális sejtkultúrában (6.A ábra). Az eredmények minden esetben átmeneti emelkedést

mutattak 100 ng pHmgbl-nél megfigyelt csúccsal. A Hmgbl hatása HDM sejt kultúrában volt a legnagyobb (2,57-szeres), míg a többi kultúrában csak 1,3–1,6-szoros aktiválást észleltünk. Ugyanakkor CEC kultúrában a magas Hmgbl értékek gátló hatásúak voltak.

A Hmgbl hatása a korai fejlődési stádiumot képviselő HDM kultúrában volt a legnagyobb, míg a késői fejlődési stádiumot képviselő CEC kultúrában jelenléte gátolt. Tehát a Hmgbl koncentrációtól függően aktivál vagy gátol. Mivel a maximális aktiváló hatást 100 ng mennyiségű pHmgbl esetén lehetett elérni, további kotranszfekciós kísérleteinkben is ezzel a mennyiséggel dolgoztunk.



6. ábra: A Hmgbl hatása Matn1 hosszú promóterére és Sox trió szinergista kölcsönhatására
A hosszú promóter dózis-függő aktivációja a Hmgbl hatására (A). Hmgbl és Sox trió együttes hatása a hosszú promóter aktivitására mesenchyma kultúrákban (B). Növekvő mennyiségű FLAG-jelölt Hmgbl és állandó mennyiségű Sox trió kotranszfekciójának hatása kombinált Western analízissel követve (C). A szignifikancia értékeket (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) az üres vektorral transzfektált mintákra vonatkoztatva és (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$) a jelölt módon adtuk meg.

A Hmgb1 elősegíti a Sox fehérjék szinergista kölcsönhatását a porcfejlődés korai szakaszában

Ezek után kíváncsiak voltunk, hogy a Hmgb1 jelenléte hogyan befolyásolja a Sox trió szinergista kölcsönhatását a chondrogenesis korai stádiumát képviselő kultúrákban. Ebből a célból állandó mennyiségű (250ng pSOX9) és növekvő mennyiségű (50ng, 125ng és 250ng) pL-Sox5 és pSox6 plazmidokat transzfektáltunk Hmgb1 nélkül és Hmgb1 jelenlétében CEF, LDM és HDM sejtekbe (6.B ábra). A Sox trió dóziszfüggő szinergista aktiváló hatását a Hmgb1 CEF kultúrában másfélszeresére, míg LDM és HDM kultúrában több mint kétszeresére növelte. Sőt HDM kultúrában a Hmgb1 ellensúlyozta a nagydózisú L-Sox5/Sox6 gátló hatását a SOX9-mediálta promóter aktiválásra.

Tehát a Sox trió a koncentrációfüggő csökkenés HDM kultúrában koncentrációfüggő növekedésbe megy át Hmgb1 jelenlétében. A HDM kultúra a korai poliferatív stádiumot képviseli, ami azt igazolja, hogy a Hmgb1-nek a porcfejlődés korai szakaszában van szerepe, még pedig elősegíti a Sox fehérjék szinergista kölcsönhatását.

Annak megerősítésére, hogy a Hmgb1 elősegíti a Sox trió általi promóter aktivációt, COS-7 sejteket kotranszfektáltunk állandó mennyiségű Sox- és növekvő mennyiségű Hmgb1-expresszálo plazmidokkal és a luciferázmérést Wetern analízissel kombinálva követtük a *Matn1* promóter aktivitást (6.C ábra).

Míg a Sox trió önmagában 16-szoros promóter aktiválást mutatott, addig 3:1 Hmgb1: SOX9 moláris aránynál az aktiváció 38-szorosára emelkedett.

Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy az optimális mennyiségű Hmgb1 jelenléte elősegíti a Sox trió dóziszfüggő szinergista aktivációját a *Matn1* promóteren.

Transzkripció faktor	<i>Matn1</i> expressziós szint		
	$2^{-\Delta Ct} \pm SEM^a$	aktiválás	p érték
Üres Vektor	1.95E-06 \pm 1.47E-07	1	
Hmgb1	2.42E-06 \pm 2.87E-07	1.24	9.90E-01
Sox trió	5.03E-05 \pm 5.64E-06	25.76	7.08E-03
Sox trió + Hmgb1	1.54E-04 \pm 2.65E-05	78.68	2.25E-05

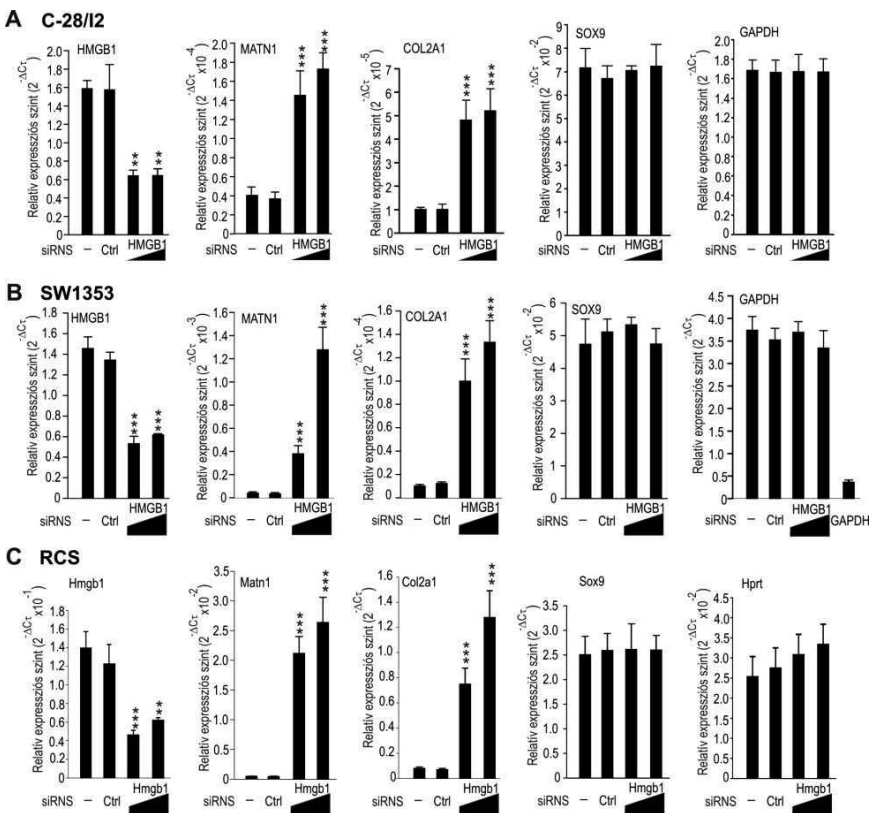
^a*Matn1* mRNS szintet az állandó Gapdh mRNS szinthez képest adtuk meg.

1. táblázat: Az endogén *Matn1* indukciója a gént nem expresszálo COS-7 sejtekben Sox trió és Hmgb1 hatására

A *Hmgb1* elősegíti az endogén **Matn1** Sox trió általi bekapcsolását, a gént nem termelő sejtekben

A következő kísérletsorozatban, azt vizsgáltuk, hogy vajon az optimális mennyiségű Sox trió elegendő-e ektoikus *Matn1* expresszió kiváltásához a fehérjét nem termelő COS-7 sejtekben, illetve *Hmgb1* vajon elősegíti-e az indukciót. Az optimális arányú és mennyiségű L-Sox5/Sox6 és Sox9 26-szorosára növelte a COS-7 sejtek a rendkívül alacsony endogén *Matn1* expressziós szintjét (1. táblázat). Ugyanakkor *Hmgb1* jelenlétében a Sox trió 79-szeresére növelte az endogén *Matn1* expressziós szintet az üres vektorral transzfektált kontrollhoz képest, ami háromszorosa a Sox trió egyedüli indukciós hatásának.

Ezek alapján a *Hmgb1* elősegítette Sox trió mediálta *Matn1* promóter aktivációt, sőt elősegítette a endogén *Matn1* Sox trió általi bekapcsolását, tehát az ektoikus génextpressziót.



7. ábra: A *Hmgb1* csenésítés hatása a porcspecifikus génextpresszióra RCS sejtekben

Az RCS sejteket növekvő mennyiségű (200 pmol és 400 pmol) patkány *Hmgb1* siRNS és negatív kontroll siRNS (Ctrl) duplexszel transzfektáltuk. QRT-PCR analízissel követtük a marker gént expressziót, az állandó Rps18 mRNS szinthez képest adtuk meg. A szignifikancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, amit a nem transzfektált mintákra vonatkoztattunk.

A Hmgb1 csendesítés hatása a porcspecifikus génexpresszióra

Ezek után csendesítési kísérleteket végeztünk állandósult chondrogén sejtvonalakon annak vizsgálatára, hogy a Hmgb1 hogyan hat az endogén *Matn1*-re a késői porcfejlődési stádiumokban. Az immortalizált borda porcsejt (C-28/I2)⁴⁰ és chondroszarkóma eredetű (SW1353)⁴¹ sejtvonalak a porcspecifikus géneket alacsony szinten termelik. Az RCS (patkány chondroszarkóma) sejtvonalban a porcspecifikus marker gének expressziója magasabb, de a primer sejt kultúrákban mért értéket nem éri el.⁴² Az irodalmi adatokkal összhangban, humán sejtvonalakban alacsony *MATN1* (3.99×10^{-5} C-28/I2-ban és 9.74×10^{-5} SW1353 sejtekben) és *COL2A1* (4×10^{-5} C-28/I2-ban és 1×10^{-5} SW1353 sejtekben) mRNS szintet mértünk (7.A és B ábra). A *SOX9* mRNS szint rendkívül alacsony (7.16×10^{-2} C-28/I2-ban és 4.74×10^{-2} SW1353 sejtekben) volt, szemben a magas *HMGB1* mRNS szinttel (1.59 C-28/I2-ban és 1.46 SW1353 sejtekben). RCS sejtek sokkal magasabb relatív *Col2a1* (8×10^{-2}), *Sox9*-(2.51) és *Matn1* (3.56×10^{-4}) mRNS szintet mutattak, míg a *Hmgb1* mRNS expressziója (1.39×10^{-1}) sokkal alacsonyabb volt patkány-, mint humán-sejtvonalakban (7.C ábra). Mivel ezekre a sejtvonalakra a primer sejt kultúrákkal ellentétben magas HMGB1 és alacsony porcspecifikus marker génexpresszió jellemző, ezért igen alkalmasak arra, hogy csendesítési kísérletben teszteljük hipotézisünket, mely szerint a SOX9-hez képest megemelkedett HMGB1 szint gátolhatja a marker expressziót chondrogén sejtekben.

A HMGB1 2.5-szeres csendesítésének hatására C-28/I2 sejtekben a *MATN1* és a *COL2A1* expressziója 4-szeresére, illetve 5-szörösére emelkedett. SW1353 sejtekben *MATN1* és *COL2A1* expresszió szintjének növekedése 9.6–32-szeres és 10–13-szoros volt. Az aktiváció specifikus volt, mert sem a *GAPDH*, sem a *SOX9* mRNS szint nem változott. A legnagyobb expressziós változást RCS sejtekben mértük, ezért e tanulmányban azt ábrázoltuk (7.C ábra). Mikor csendesítés hatására RCS sejtekben a *Hmgb1* mRNS szintje 42–57-szer alacsonyabbra csökkent, mint a *Sox9* mRNS-é, akkor a *Matn1* és a *Col2a1* mRNS szintje 59–74-szeresére, illetve 9.3–15.9-szeresére emelkedett (7.C ábra). A *Hmgb1* csendesítése ebben az esetben sem okozott szignifikáns változást a *Hprt* és a *Sox9* mRNS szintjében, ezért a hatás specifikusnak tekinthető (7.A–C ábra).

Humán és patkány chondrogen sejtvonalakban siRNS-sel csökkentve a magas HMGB1/Hmgb1 mRNS szintet, a *MATN1/Matn1* és a *COL2A1/Col2a1* expressziója nagymértékben nőtt. Ez megerősíti azt hipotézisünket, hogy a

⁴⁰ GOLDRING ET AL. 1994, 2307–2316.

⁴¹ GEBAUER ET AL. 2005, 697–708.

⁴² MUKHOPADHYAY ET AL. 1995, 27711–27719.

Hmgb1 nagy mennyiségben interferálhat a Sox trió által mediált promóter aktivációval a *Matn1* és a *Col2a1* esetében.

Az eredmények megvitatása

A porcdifferenciálódás különböző stádiumait modellező kultúrákban QRT-PCR analízissel követtük a marker gének expresszióját. Kimutattuk, hogy a Sox gének expressziója nő a chondrogenesis során, a *Hmgb1* géné csökken, hasonlóan a chondrogenesis kezdeti szakaszában szerepet játszó *Hmgn1* génhez. Tisztított Hmgb1 fehérjével végzett *in vitro* kötési kísérletekben bizonyítottuk, hogy Hmgb1 kötődik a *Matn1* konzervált DNS elemeihez, leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel és jelenléte befolyásolja L-Sox5 és SOX9 fehérjék kötődését ezekhez az elemekhez. Igazoltuk, hogy a Pe1, Ine és Dpe1 elemek különböző affinitással kötnek SOX9, L-Sox5 és Hmgb1 faktorokat *in vitro*. SOX9 legerősebben a Pe1 elemhez és a Dpe1 3' végi Sox motívumához kötődik, míg Sox5 és Hmgb1 leghatékonyabban a Dpe1 5' végi motívumait ismeri fel. A Hmgb1 és Sox faktorok kötődését *in vitro* módszerek mellett alátámasztják a debreceni partnerünk által végzett ChIP kísérletek eredményei is.⁴³ A korábbi eredményeinket megerősítve⁴⁴ igazoltuk, hogy a Dpe1 iránytól függetlenül porcspecifikus enhanszerként működik, ami képes homológ és heterológ promóter Sox trió mediálta aktiválására. Kotranszfekciós kísérletekben kimutattuk, hogy Hmgb1 ugyancsak dóziszfüggő módon befolyásolja a Sox trió szinergista aktiválóhatását. Mivel ismert, hogy a Hmgb1 képes a hiszton H1 leszorításával fluidizálni a kromatin szerkezetet,⁴⁵ feltételezzük, hogy a Hmgb1 alacsony dózisonál a kromatin szerkezetet fellazítva segíti elő a Sox trió kötődését a DNS-elemekhez és a promóter aktiválását. Magas dózisonál azonban interferálhat a Sox faktorok kötődésével. További kísérletként a *Matn1*-et nem termelő COS-7 sejteken optimális mennyiségű SOX9, L-Sox5, Sox6 és Hmgb1 expresszázó plazmidokkal transzfektáltuk, melynek hatására ki tudtuk mutatni a endogén *Matn1* indukcióját és a *Matn1* mRNS expresszióját.

Chondrogén sejtvonalakon végzett csendesítési kísérleteinkben igazoltuk, hogy a Hmgb1 nagy dózisban gátolja a porcspecifikus génexpressziót. Human (C-28/I2, SW1353) és patkány (RCS) sejtvonalakban siRNS-sel csökkentve a magas HMGB1/Hmgb1 mRNS szintet, a *Matn1* és a *Col2a1* génexpressziója nagymértékben nőtt. A Hmgb1 magas expressziója más tumoros sejtekben is ismert.⁴⁶

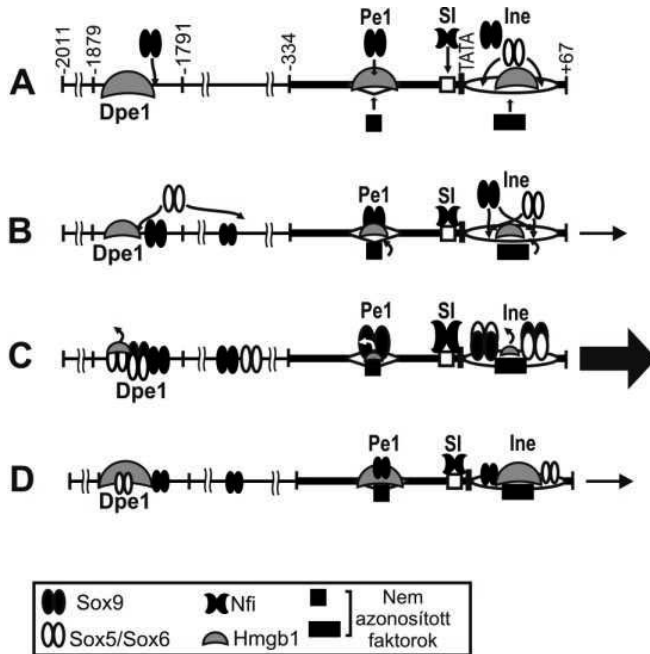
⁴³ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

⁴⁴ SZÉNÁSI ET AL. 2013, 1075–1091.

⁴⁵ BIANCHI – AGRESTI 2005, 496–506.

⁴⁶ HOCK ET AL. 2007, 72–79.

Ezek az adatok összhangban állnak a *Matn1* transzkripció szabályozását leíró korábbi közleményekkel, megerősítve és továbbfejlesztve a Sox trió dózisfüggő szinergista kölcsönhatását a promóteren. Eredményeink ugyancsak összhangban állnak a Hmgb1 széles körű hatásával és kiszélesítik azt.



8. ábra: Modell a *Matn1* promóter Hmgb1 és Sox faktorok általi szabályozására
 Ábrázoltuk a faktor kötődését a konzervált DNS-elemekhez a porcféjlődés kezdetén (A), a korai szakaszában (B), késői proliferatív porcsejtokban (C), és rákos sejtvonalakban (D).

A fenti eredmények alapján a *Matn1* különleges transzkripció szabályozására javasolt modellünket kiegészítettük a Hmgb1 szerepével. Hmgb1 kötődik a Dpe1, Pe1 és Ine elemhez fibroblasztokban és elkötelezett mesenchyma sejtekben (8.A ábra). A kromatin struktúra felnyitását a konzervált DNS-elemekhez kötődő és a hiszton H1-et leszorító Hmgb1 végzi, valójában még a Sox faktorok bekötődése előtt és ezáltal elősegíti a porcspecifikus Sox faktorok kötődését a TATA közelében a chondrogenesis korai szakaszában (8.B ábra). A gén transzkripció aktivitása megnő, amikor a Hmgb1 kötődését a Sox9 kötődése váltja fel és L-Sox5/Sox6 dózisfüggő módon növeli a Sox9 transzaktiváló hatását a késői proliferatív porcsejtokban (8.C ábra). A magas Hmgb1 expressziójú hipertróf porcsejtokban, vagy Hmgb1 fehérjét nagy mennyiségben termelő rákos sejtekben a Hmgb1 nagy dózisa és kötődése megakadályozza a Sox fehérjék kötődését (8.D ábra).

A *Matn1* zonális kifejeződését irányító transzkripció szabályozás felderítése elősegítheti a szöveti differenciáció jobb megértését és a növekedési korong fontos zónáira specifikus vektorok előállítását, ami hasznos lehet ízületi betegségek terápiás eljárásainak kidolgozásakor. Hmgb1 expresszió emelkedett szintjét mutatták ki arthritisben szenvedő betegekben,⁴⁷ ami adataink szerint a porcfehérje gének csökkenéséhez vezethet.

Irodalom

- ALEVIZOPOULOS ET AL. 1995 = Alevizopoulos, A. – Dusserre, Y. – Tsai-Pflugfelder, M. – von der Weid, T. – Wahli, W. – Mermoud N.: A proline-rich TGF-beta-responsive transcriptional activator interacts with histone H3. *Genes & development* 9 (1995) 3051–3066.
- BIANCHI – AGRESTI 2005 = Bianchi, M. E. – Agresti, A.: HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current opinion in genetics & development* 15 (2005) 496–506.
- CSABAI 2011 = Csabai Zs.: A távoli DNS elem szerepe a matrilin-1 gén transzkripció szabályozásában, in, szte, 2011.
- DOPPLER ET AL. 2001 = Doppler, W. – Windegger, M. – Soratroi, C. – Tomasi, J. – Lechner, J. – Rusconi, S. – Cato, A. C. – Almlöf, T. – Liden, J. – Okret, S. – Gustafsson, J. A. – Richard-Foy, H. – Starr, D.B. – Klocker, H. – Edwards, D. – Geymayer, S.: Expression level-dependent contribution of glucocorticoid receptor domains for functional interaction with STAT5. *Molecular and cellular biology* 21 (2001) 3266–3279.
- FURUSAWA ET AL. 2006 = Furusawa, T. – Lim, J. H. – Catez, F. – Birger, Y. – Mackem, S. – Bustin, M.: Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes. *Molecular and cellular biology* 26 (2006) 592–604.
- GEBAUER ET AL. 2005 = Gebauer, M. – Saas, J. – Sohler, F. – Haag, J. – Soder, S. – Pieper, M. – Bartnik, E. – Beninga, J. – Zimmer, R. – Aigner, T.: Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1beta, Osteoarthritis and cartilage. *OARS, Osteoarthritis Research Society* 13 (2005) 697–708.

⁴⁷ HOCK ET AL. 2007, 72–79.

- GOLDRING ET AL. 1994 = Goldring, M. B. – Birkhead, J. R. – Suen, L. F. – Yamin, R. – Mizuno, S. – Glowacki, J. – Arbiser, J. L. – Apperley, J. F.: Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *The Journal of clinical investigation* 94 (1994) 2307–2316.
- GRONOSTAJSKI 2000 = Gronostajski R.M.: Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 249 (2000) 31–45.
- HAUSER ET AL. 1996 = Hauser, N. – Paulsson, M. – Heinegard, D. – Morgelin, M.: Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan - Increased covalent cross-linking with tissue maturation. *Journal Biological Chemistry* 271 (1996) 32247–32252.
- HOCK ET AL. 2007 = Hock, R. – Furusawa, T. – Ueda, T. – Bustin, M.: HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends in cell biology* 17 (2007) 72–79.
- KARCAGI ET AL. 2004 = Karcagi, I. – Rauch, T. – Hiripi, L. – Rentsendorj, O. – Nagy, A. – Bösze, Z. – Kiss, I.: Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene in transgenic mice reveals modular arrangement of tissue-specific control elements. *Matrix biology. Journal of the International Society for Matrix Biology* 22 (2004) 605–618.
- LEFEBVRE – LI – DE CROMBRUGGHE 1998 = Lefebvre, V. – Li, P. – de Crombrughe, B.: A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The EMBO journal* 17 (1998) 5718–5733.
- LEFEBVRE – SMITS 2005 = Lefebvre, V. – Smits, P.: Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. Birth defects research. Part C. *Embryo today. Reviews* 75 (2005) 200–212.
- MUKHOPADHYAY ET AL. 1995 = Mukhopadhyay, K. – Lefebvre, V. – Zhou, G. – Garofalo, S. – Kimura, J. H. – de Crombrughe, B.: Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro-alpha 1(II) collagen gene. *The Journal of biological chemistry* 270 (1995) 27711–27719.
- NAGY ET AL. 2011 = Nagy, A. – Kenesi, E. – Rentsendorj, O. – Molnár, A. – Szénási, T. – Sinkó, I. – Zvara, A. – Oommen, S. T. – Barta, E. – Puskás, L. G. – Lefebvre, V. – Kiss, I.: Evolutionarily conserved, growth plate zone-specific regulation of the matrilin-1 promoter: L-Sox5/Sox6 and Nfi factors bound near TATA finely tune activation by Sox9. *Molecular and cellular biology* 31 (2011) 686–699.

- RENTSENDORJ ET AL. 2005 = Rentsendorj, O. – Nagy, A. – Sinko, I. – Daraba, A. – Barta, E. – Kiss, I.: Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *The Biochemical journal* 389 (2005) 705–716.
- SZABÓ ET AL. 1995 = Szabó, P. – Moitra, J. – Rencendorj, A. – Rákhely, G. – Rauch, T. – Kiss, I.: Identification of a nuclear factor-I family protein-binding site in the silencer region of the cartilage matrix protein gene. *The Journal of biological chemistry* 270 (1995) 10212–10221.
- SZÉNÁSI ET AL. 2013 = Szénási, T. – Kénesi, E. – Nagy, A. – Molnár, A. – Bálint, B. L. – Zvara, A. – Csabai, Zs. – Deák, F. – Boros Oláh, B. – Mátés, L. – Nagy, L. – Puskás, L. G. – Kiss, I.: Hmgb1 can facilitate activation of the matrilin-1 gene promoter by Sox9 and L-Sox5/Sox6 in early steps of chondrogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1829 (2013) 1075–1091.
- TANIGUCHI ET AL. 2007 = Taniguchi, N. – Yoshida, K. – Ito, T. – Tsuda, M. – Mishima, Y. – Furumatsu, T. – Ronfani, L. – Abeyama, K. – Kawahara, K. – Komiya, S. – Maruyama, I. – Lotz, M. – Bianchi, M. E. – Asahara, H.: Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. *Molecular and cellular biology* 27 (2007) 5650–5663.

Hmgb1 can facilitate activation of the matrilin-1 gene in early steps of chondrogenesis

TIBOR SZÉNÁSI

The architectural high mobility group box 1 (Hmgb1) protein acts as both a nuclear and an extracellular regulator of various biological processes, including skeletogenesis. Here we report its contribution to the evolutionarily conserved, distinctive regulation of the matrilin-1 gene (*Matn1*) expression in amniotes. We previously demonstrated that uniquely assembled proximal promoter elements restrict *Matn1* expression to specific growth plate cartilage zones by allowing varying doses of L-Sox5/Sox6 and Nfi proteins to fine-tune their Sox9-mediated transactivation.

Here, we dissected the regulatory mechanisms underlying the activity of a conserved distal promoter element 1, which works as an enhancer and allows promoter activation by the Sox5/6/9 chondrogenic trio. In early steps of chondrogenesis, declining *Hmgb1* expression overlaps with the onset of *Sox9* expression. Unlike repression in late steps, Hmgb1 overexpression in early chondrogenesis increases *Matn1* promoter activation by the Sox trio, and forced Hmgb1 expression in COS-7 cells facilitates induction of *Matn1* expression by the Sox trio. The conserved *Matn1* control elements bind Hmgb1 and SOX9 with opposite efficiency *in vitro*. They show higher HMGB1 than SOX trio occupancy in established chondrogenic cell lines, and HMGB1 silencing greatly increases *MATN1* and *COL2A1* expression. Together, these data thus suggest a model whereby Hmgb1 helps recruit the Sox trio to the *Matn1* promoter and thereby facilitates activation of the gene in early chondrogenesis. We anticipate that Hmgb1 may similarly affect transcription of other cartilage-specific genes.