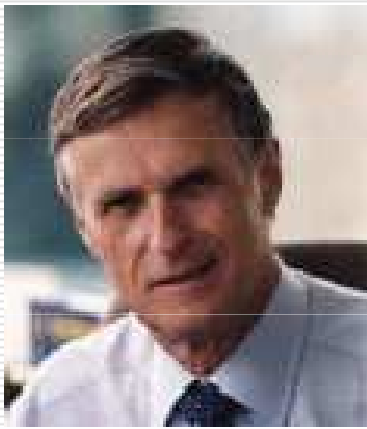


Evidence for a Role of p38 MAP Kinase in Expression of Alkaline Phosphatase During Osteoblastic Cell Differentiation

A. Suzuki, J. Guicheux, G. Palmer, Y. Miura, Y. Oiso,
J.-P. Bonjour, and J. Caverzasio



Jean-Phillipe Bonjour



Joseph Caverzasio



Nagoya University School of Medicine

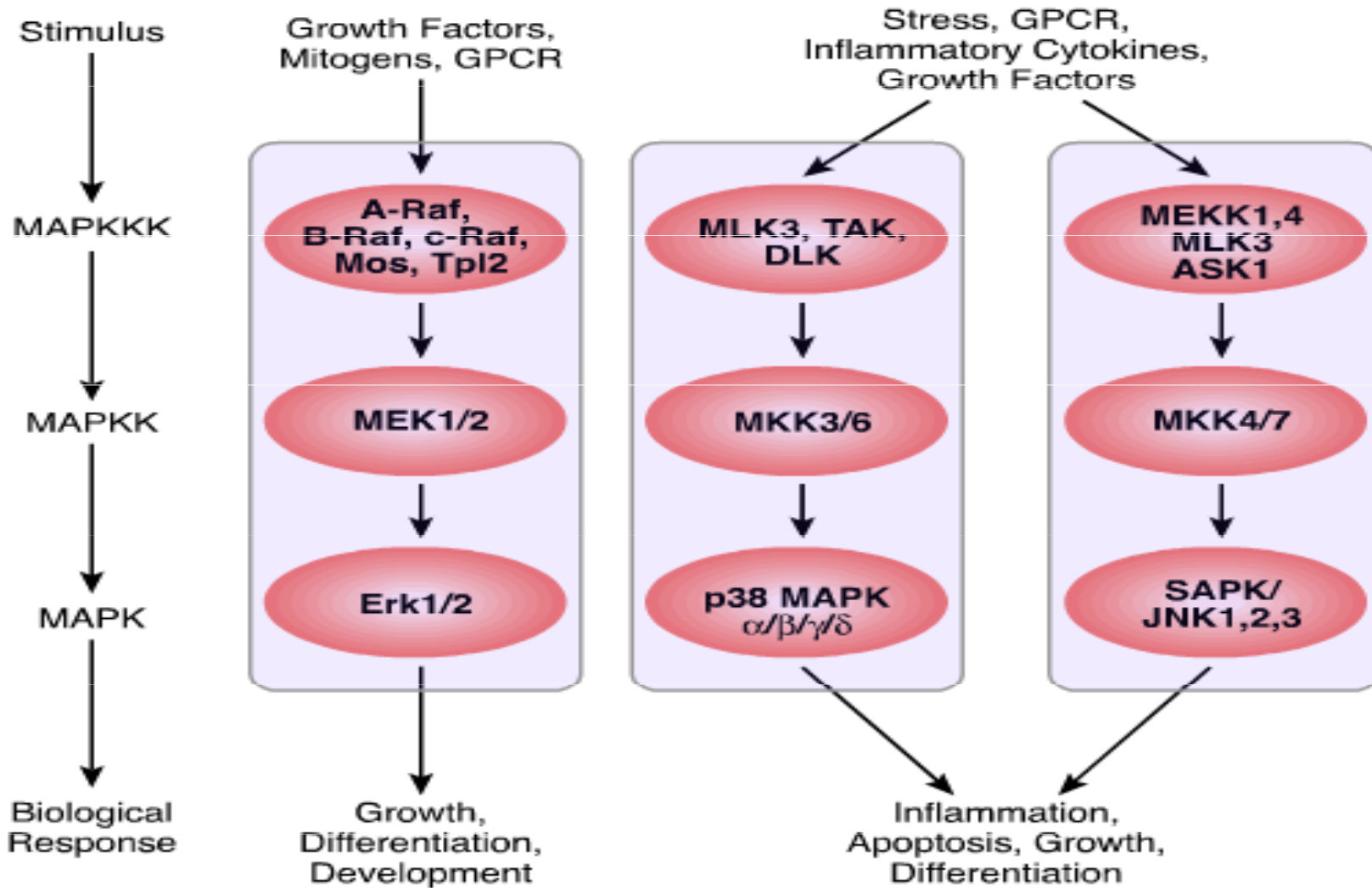


Hôpitaux universitaires de Genève

Úvod

- MAPK aktivované fetálním telecím sérem (FCS = fetal calf serum)
 - Role MAPK v diferenciaci osteoblastů
 - zjišťováno pomocí specifických inhibitorů: pro Erk dráhu UO126, pro p38 dráhu SB203580
-

Úvod



Mitogen-activated protein kinase cascades

Úvod

- MC3T3-E1 buňky
 - počáteční fáze – 1-7 den - proliferace
 - 8-10 den vykazování osteogenních markerů:
 - ALP (alkalická fosfatáza)
 - kolagen typ I
 - osteokalcin
 - maximální exprese těchto markerů přibližně po 25 dnech
-

Alkalická fosfatáza

- Důležitý osteogenní marker
 - Mineralizace kostních buněk
 - Hydrolýza P_{Pi} (anorganický pyrofosfát) – inhibitor mineralizace tkání
-

Metody

- Stanovení markerů diferenciace kostních buněk
 - ALP pomocí Lowryho metody
 - Syntéza kolagenu pomocí 4-hydroxyprolinu
 - Osteocalcin pomocí radioimunoassay (RIA)

 - Northern blotting

 - Western blotting a kinázová analýza
-

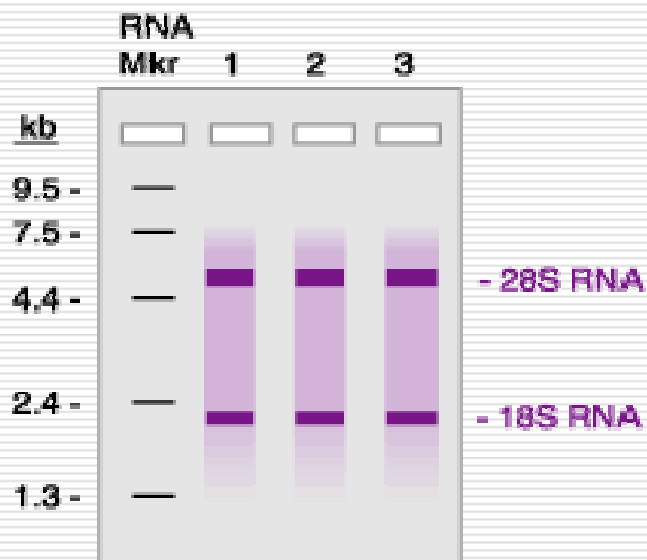
Lowryho metoda

- ❑ Biuretovo činidlo – chelatace měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidového řetězce v alkalickém pH – červený/fialový komplex
- ❑ Folin-Ciocalteauovo činidlo – kys. fosfomolybdenanová a kys. fosfowolframová – redukce tyrozinových zbytků proteinů – modrá
- ❑ Množství barvy je přímo úměrné množství peptidových vazeb



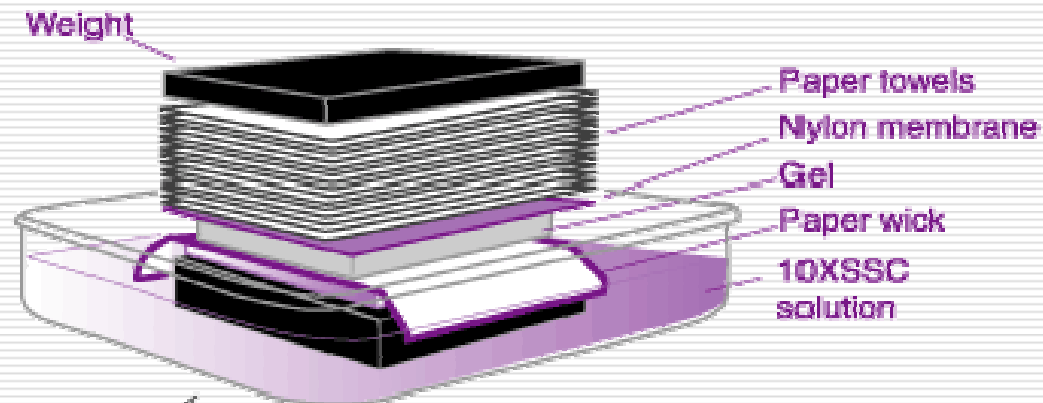
Northern blotting

- ❑ Izolace RNA
 - ❑ Elektroforéza na agarózovém gelu
 - ❑ Separovaná RNA je přenesena na membránu.
 - ❑ Kapilární blotting - blotovací membrána umístěna na povrchu gelu, který leží na porézní podložce v nádobě s přenosovým pufrem, na ní pak vrstva vlhkého filtračního papíru a řada vrstev suchých filtračních papírů. Celá jednotka je zatížena. Suchý papír nasává kapilárními silami puf, vzorek je tak tažen z gelu na membránu.
 - ❑ Specifická detekce se děje hybridizací s komplementární DNA sondou, která je značena.
-



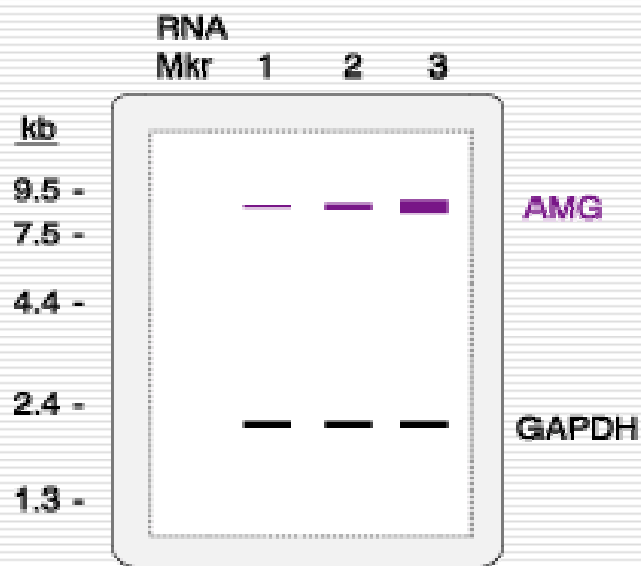
Formaldehyde-agarose gel

Transfer RNA by membrane blotting



Cross-link RNA to the membrane using UV light

Hybridize membrane with denatured ³²P-cDNA probe



Autoradiograph of washed filter

Figure 1.

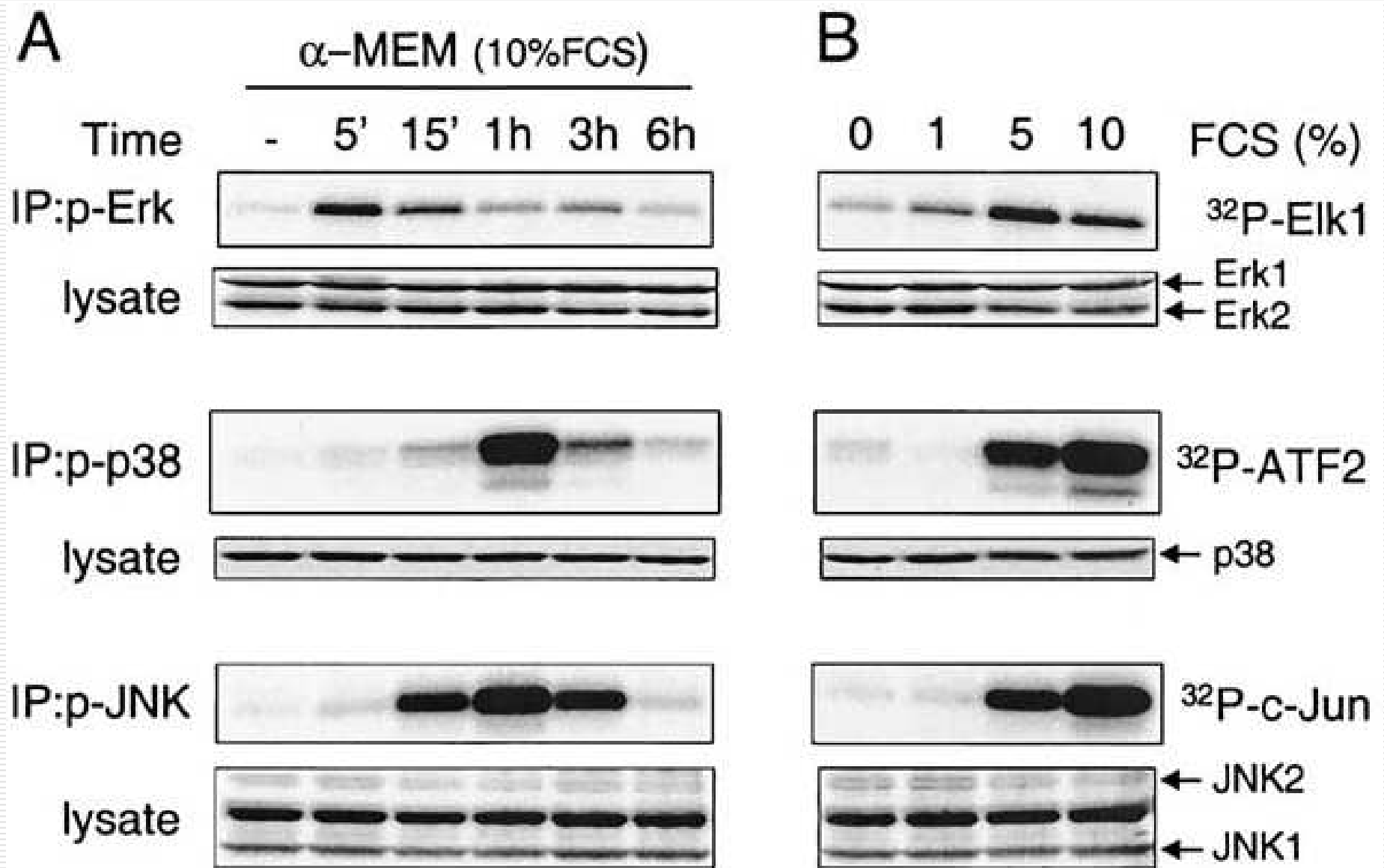


Figure 2.

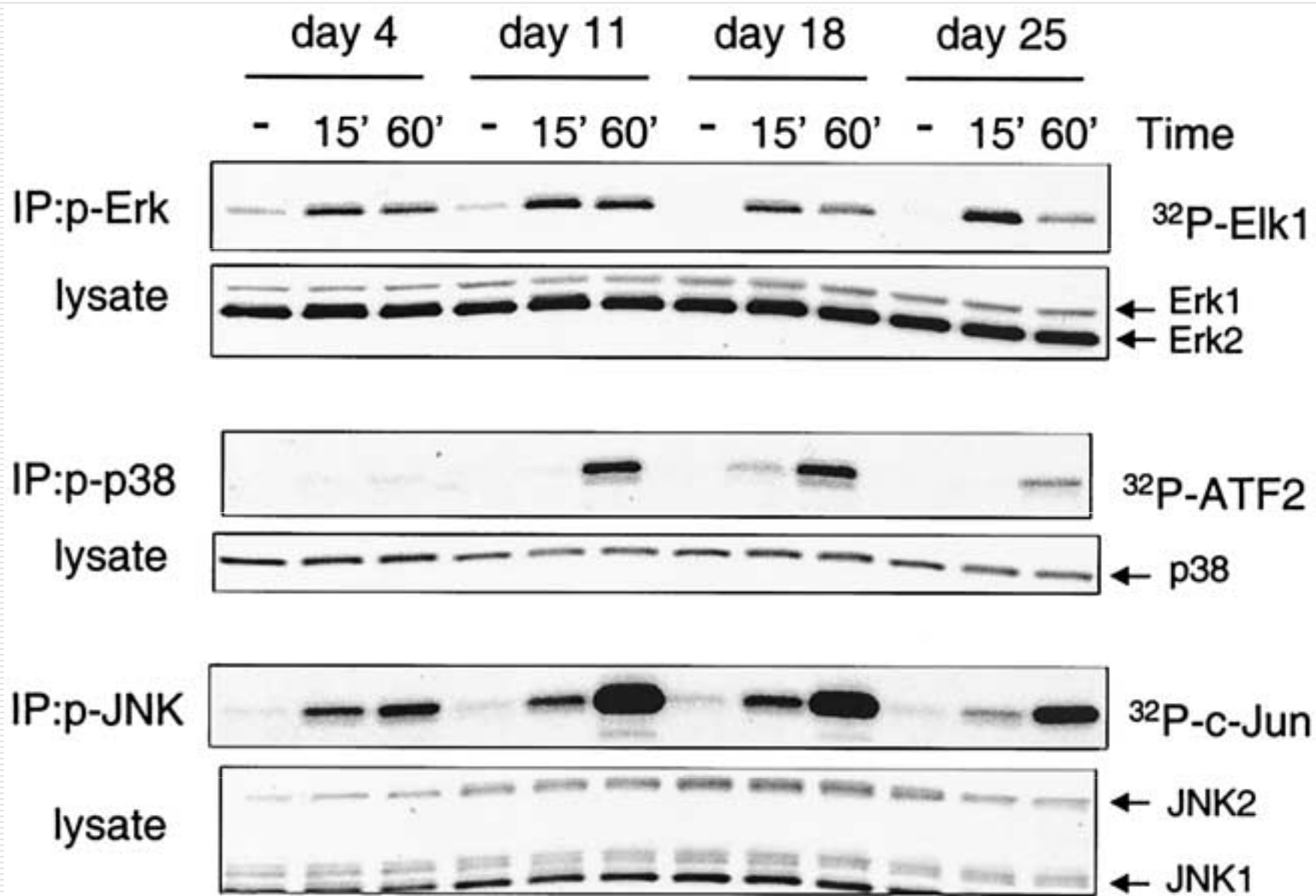


Figure 3.

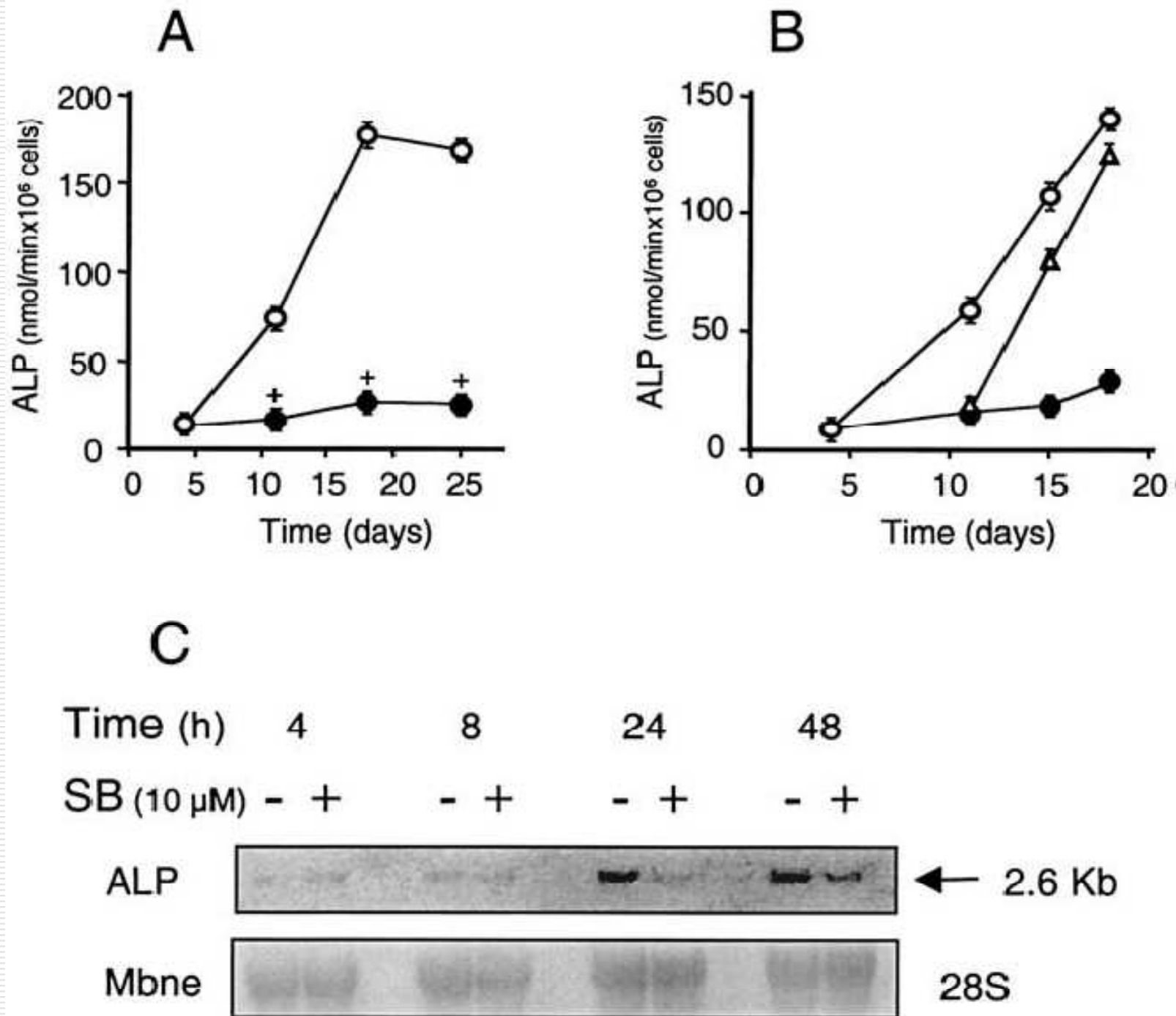
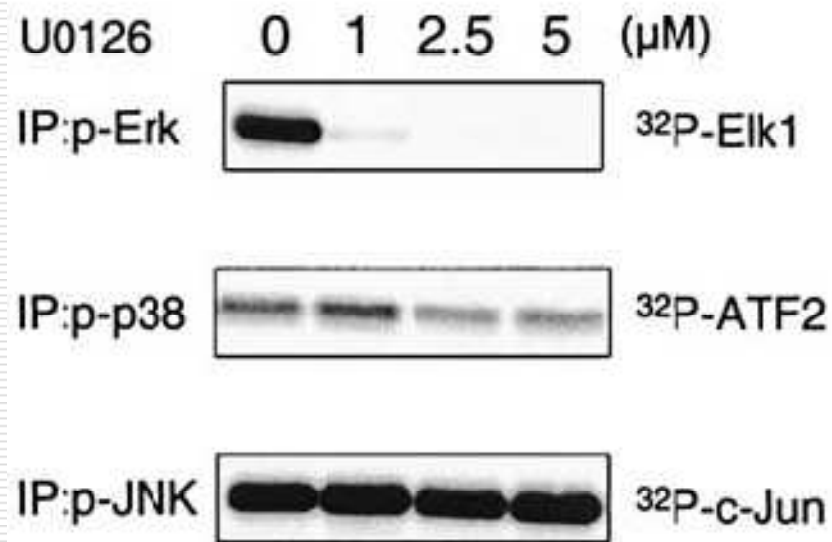
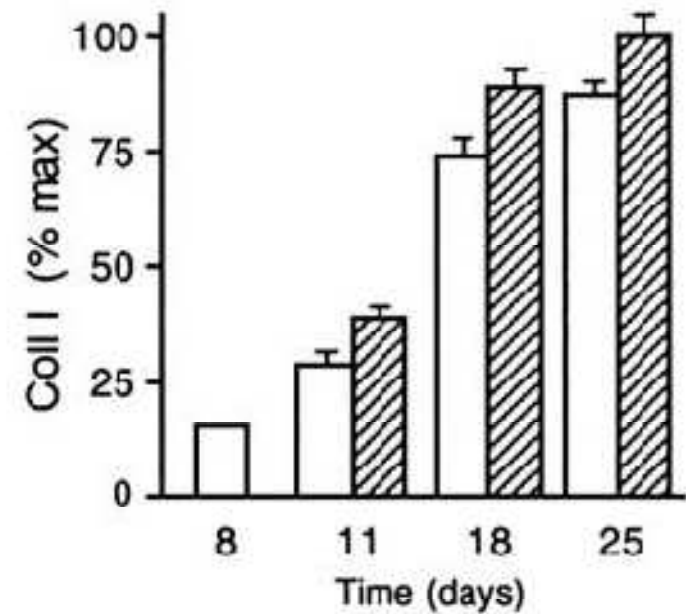


Figure 4.

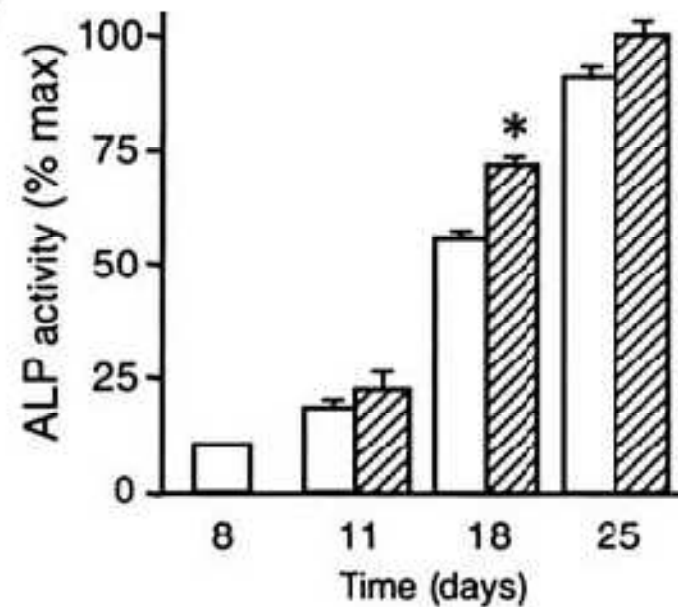
A



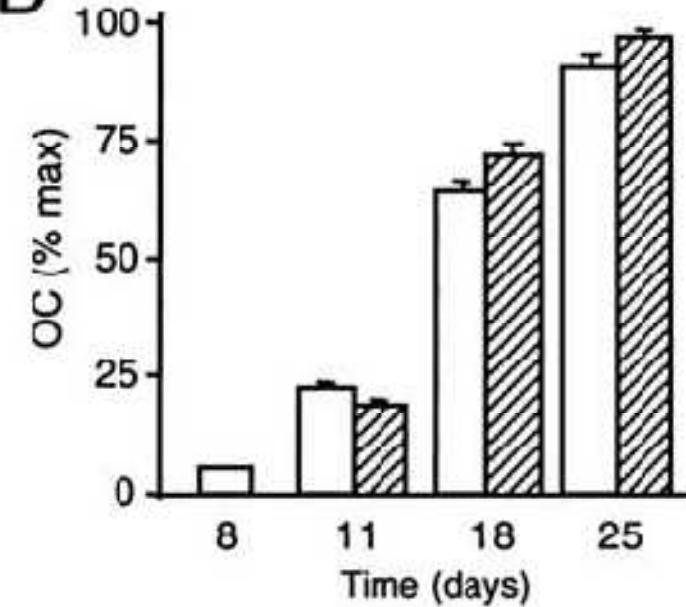
C



B



D



Tab. 1.

Time (days)	DNA content ($\mu\text{g}/\text{well}$)		Protein content (mg/well)		Alkaline phosphatase activity (nmol/mL per minute)	
	Veh	SB	Veh	SB	Veh	SB
4	21.4 ± 0.4	—	0.20 ± 0.01	—	13.7 ± 6.7	—
11	46.6 ± 1.7	50.2 ± 1.9^a	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01	203.7 ± 7.7	53.3 ± 0.8^b
18	41.7 ± 1.3	50.2 ± 0.3^a	1.08 ± 0.01	0.93 ± 0.02^a	518.9 ± 22	102.5 ± 3.0^b
25	42.0 ± 1.1	46.6 ± 1.3	1.27 ± 0.01	1.15 ± 0.01^a	611.7 ± 4.0	101.7 ± 7.5^b

Figure 5.

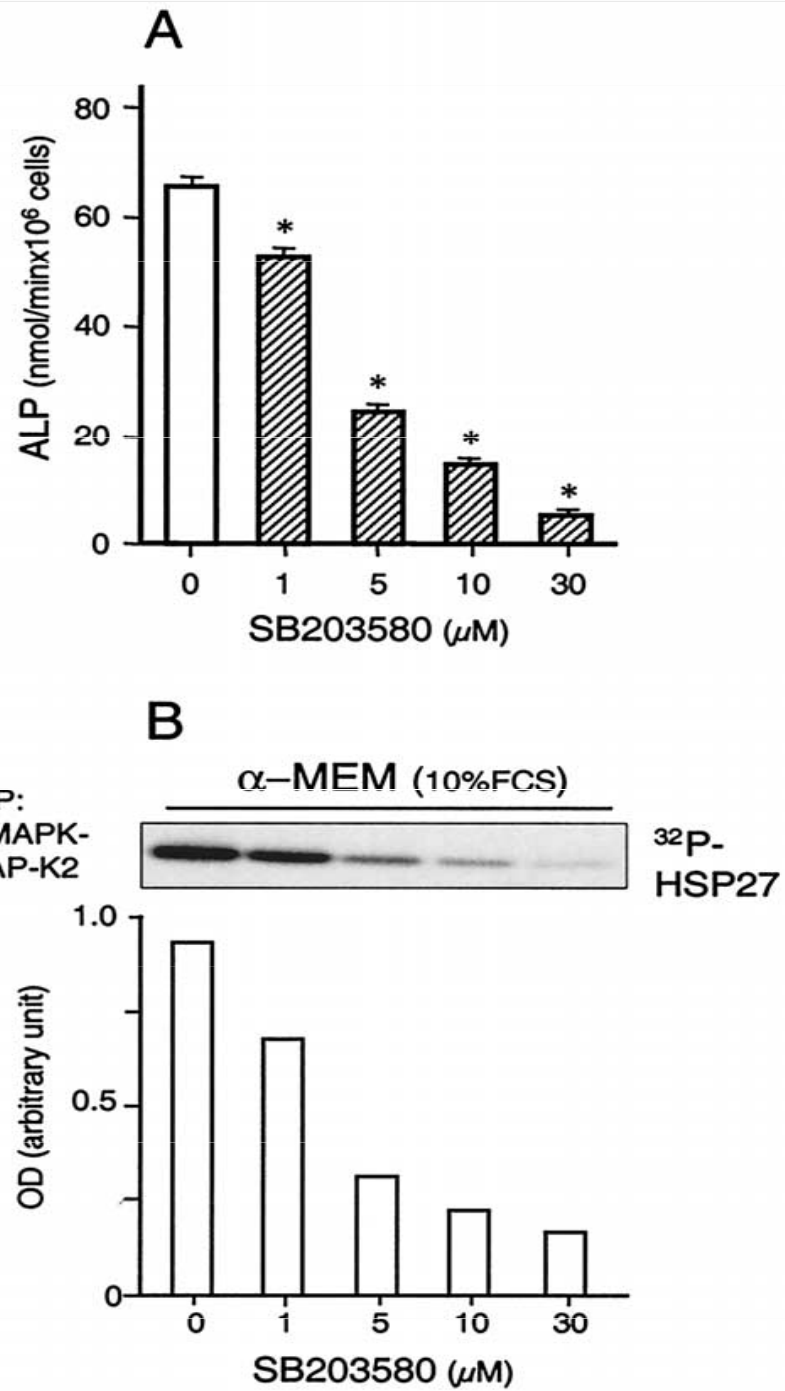
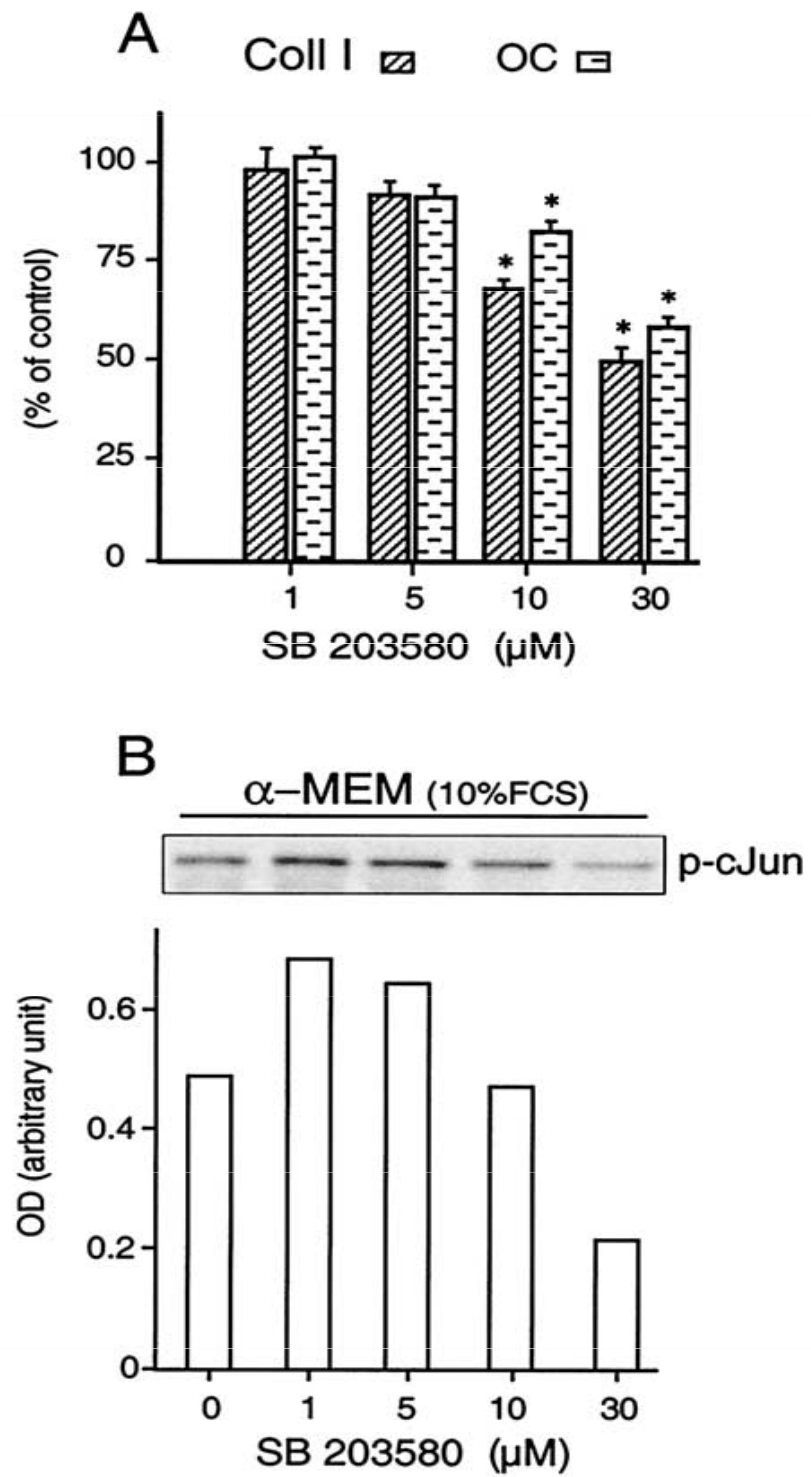


Figure 6.



Výsledky

- Erk dráha je aktivována v různých stádiích a je důležitá pro buněčnou proliferaci
 - p38 dráha je aktivována na začátku diferenciaci – kontrola exprese ALP
 - JNK dráha – aktivována během vývoje osteoblastů a její aktivita je nejvyšší během diferenciaci
-