
EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
GENETIKAI TANSZÉK

**A gímszarvas ciklikus fiziológiás és humán patológiás
csonttritkulásban szerepet játszó gének azonosítása**

doktori értekezés

Borsy Adrienn



BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Doktori iskola vezetője: Dr. Erdei Anna, akadémikus

KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA DOKTORI PROGRAM

Programvezető és Témavezető: Dr. Orosz László, akadémikus

BUDAPEST

2009

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK 1

1. BEVEZETÉS 3

- 1.1. A téma jelentősége és aktualitása 3
- 1.2. Mineralizáció és adszorpció a csontszövetben 5
- 1.3. Reszorpció a csontszövetben 7
- 1.4. A kalcium forgalom és szabályozása 8
- 1.5. Csontritkulás, a néma járvány 13
- 1.6. Specifikus oszteoporozis markerek 17
- 1.7. A csontritkulás genetikai háttere 18
- 1.8. Oszteoporozis állat modellek 20
- 1.9. A gímszarvas, *Cervus elaphus* 23
 - 1.9.1. A gímszarvas genetikája 24
 - 1.9.2. Az agancsiklus és hormonális szabályozása 25
 - 1.9.3. A ciklikus fiziológiás oszteoporozis 28

2. CÉLKITŰZÉS 31

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 33

- 3.1. Mintavétel 33
 - 3.1.1. Szarvas bordacsont 33
 - 3.1.2. Humán csontszövet 35
- 3.2. Elektronmikroszkópia 36
- 3.3. RNS izolálás 36
- 3.4. Gímszarvas borda cDNS könyvtárak létrehozása 37
- 3.5. mRNS amplifikálás 38
- 3.6. Mikroarray próbakészítés, hibridizálás és adatfeldolgozás 38
- 3.7. Northern hibridizáció 39
- 3.8. Relative Quantitative Real-Time PCR 39
- 3.9. Klónozási eljárások 40
- 3.10. Egy- és többváltozós statisztikai analízis 42
 - 3.10.1. Non-parametrikus Mann-Whitney U teszt 42
 - 3.10.2. Főkomponens Analízis – Principal Components Analysis (PCA) 42

4. EREDMÉNYEK 44

- 4.1. A gímszarvas lengőborda minták expressziós mintázatának összehasonlítása, az interspecifikus microarray hibridizálás eredményei 45
- 4.2. Humán involúciós oszteoporotikus és nem oszteoporotikus, kontroll minták génexpressziós szintű vizsgálata Real-Time PCR módszerrel 47
- 4.3. A humán oszteoporotikus és kontroll mintákban szignifikánsan eltérő mértékben expresszálódó gének meghatározása (egyváltozós) non-parametrikus Mann-Whitney U teszttel 49
- 4.4. A gének kapcsolatainak feltárása humán, involúciós csontritkulás folyamatában többváltozós statisztikai módszerekkel 49
- 4.4.1. A génaaktivitások közötti korrelációk vizsgálata standardizált főkomponens analízis (Principal Components Analysis, PCA) segítségével 50
- 4.4.2. A génszettek diszkriminatív erejének vizsgálata diszkriminancia analízis (Canonical Variates Analysis, CVA) segítségével 54
- 4.4.3. Nagyszámú csontgén expressziós adatainak elemzése standardizált főkomponens analízis (Principal Components Analysis, PCA) módszerrel 59

5. MEGVITATÁS 62

6. ÖSSZEFOGLALÁS 67

7. JAVASLATOK 68

8. SUMMARY 69

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 70

10. IRODALOMJEGYZÉK 71

11. MELLÉKLETEK 78

12. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 91

13. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK 93

1. BEVEZETÉS

1.1. A téma jelentősége és aktualitása

A kalcium emberi szervezetben betöltött szerepe a szénatom alapvető jelentőségével vetekszik. Jelen van a sejten belüli jelátvitelben, mint másodlagos hírvívó és az idegsejtek közötti kommunikációban egyaránt. Nélküle nem létezne normális vérárvadás, ahogyan izom-összehúzóds sem. A plazma kalcium koncentrációja 2,1-2,6 mmol/l, s csak szűk határok között változhat, mivel részt vesz a membránpotenciál fenntartásában. A kalcium anyagcserét szabályozó vegyületek közrejátszanak a vastagbél-, prosztatata- és emlőrák kialakulásában is, de nem elhanyagolható a kalcium közreműködése az érlemeszesedés kezdeti lépéseinél sem. Az emberi szervezetben átlagosan 1250 g kalcium van, ennek mindössze 1%-a kapcsolódik be az említett létfontosságú folyamatokba, 99%-a a csontokban és a fogakban raktározódik.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) kimutatása szerint a csontritkulás a szív- és érrendszeri és daganatos betegségek mellett a legjelentősebb egészségügyi probléma, a fehérbőrű népesség kb. 10%-át érinti. Európában, az Egyesült Államokban és Japánban mintegy 75 millió a betegek száma. Becslések szerint az egész világon 200-250 millió ember él csontritkulással. Az északi országokban a beteg lakosság számaránya valamivel magasabb, dél felé haladva az előfordulás csökkenést mutat. Európán belül a magyarok és a norvégok rendelkeznek a legalacsonyabb csontsűrűséggel.

Magyarországon több okból kifolyólag is különösen aktuális a kérdéskör. Egyrészt a lakosság közel egyharmada tejcukor-érzékenységben szenved, így nem fogyasztja a kalcium egyik fő forrását biztosító tejet; azaz a táplálékkal történő bevitel kalciumszükségletünk csupán harmadát fedezi (400-600 mg/nap a kívánatos 1000-1500 mg/nap helyett). Másrészt, mivel a kalcium felszívódását elősegítő D-vitamin előanyagai napfény hatására képződnek a bőrben, az alacsonyabb napsütéses órák száma miatt hazánkban a kalciumhiányos állapothoz a D-vitamin hiánya is társul (napi szükséglet 400-800 IU [1]).

E felismeréseknek komoly klinikai jelentősége van: a magyar lakosságot fokozottan veszélyezteteti az alacsonyabb csonttömeg és a fokozott csontvesztés. Az alacsonyabb csonttömegű, azaz csontritkulásos betegeknél lényegesen magasabb a kardiovaszkuláris és

daganatos betegségek kockázata; illetve *vica versa*, a szív- és érrendszeri betegeknél jóval nagyobb a csontritkulás valószínűsége.

Póór is munkatársai 600 III. kerületi budapesti lakost vizsgáltak a Európai Vertebrális Osteoporosis Study keretében [2]. E felmérés szerint Magyarországon 900 ezer-1 millió beteget tartanak nyilván, ebből 600 ezer nő. A mozgássérült emberek mintegy 30%-a csontritkulás miatt vált tartósan mozgássérültté, ezzel a betegség a súlyos fogyatékosság előidézésének okai között a második helyet foglalja el hazánkban. Az Európai Unióban a csontritkulás miatt bekövetkezett csípőtáji törések után az egy éven belüli halálozási arány 15-30%. A túlélők 50%-a képtelen segítség nélkül öltözködni, 90% képtelen 800 m-t gyalogolni vagy 0,5 m-t lépcsőn felmenni. A szövödmények miatt 6 betegből 1 meghal. A törést átélt betegek számára az életminőség romlása és a fájdalom érzése, családjuk számára pedig a tehetetlenség elfogadhatatlan [3].

1 millió embernek a gyógyítása komoly anyagi terhet ró a beteg családjára, az egészségügyre és így az egész társadalomra. 1999-ben Kricsfalusy és munkatársai 10 milliárd HUF feletti összegre becsülték a közvetlen ellátási költségeket [3], amely nem foglalja magába az otthoni betegápolásra kiadott összeget. Egy csípőtáji törés ellátása 500 ezer, míg egy perifériás törés ellátása 100 ezer HUF-ra tehető 2006-os adatok szerint. A költségek országonként nagymértékben eltérhetnek. Hazánkban az alacsony egészségügyi munkabérek, az egészségügy alulfinanszírozottsága és a kényszerű költségmegtakarítás következtében a törések ellátása az európai költségeknek csupán töredékét képezi.

A betegek száma évről évre emelkedik, mely tendencia mögött nemcsak a diagnosztika fejlődése és a betegség precízebb felismerése áll, hanem a várható élettartam emelkedése, a civilizált életmóddal együtt járó mozgásszegény és stresszes életvitel, valamint a számos újabb és újabb gyógyszer szedése. Komoly problémát jelent a túlzott alkoholfogyasztás, mértéktelen dohányzás, a tömegesen elterjedt foszfát-dús szénsavas üdítőitalok fogyasztása, a rendszertelen és egyoldalú táplálkozás. Az orvostudomány mai eszköztára elsősorban a kialakult oszteoporotikus állapot stabilizálását teszi lehetővé, valódi gyógymód az elsősorban tüneti kezeléssel túl jelenleg nem létezik.

A helyzet súlyosságát mutatja, hogy a WHO a 2000-2010-ig terjedő időszakban a „Csont és Ízület Évtizede” jegyében küzd a csontritkulás és következményei ellen.

kezdődik proteoglikánok és a kalciumot nagy affinitással kötő glikoproteinek – legnagyobb mennyiségben oszteonektin – hatására. A kalcium sók lerakódását gyorsítja, hogy azokat az oszteoblasztok intracitoplazmatikus vezikulákban koncentrálják, majd exocitózissal transzportálják a csont mátrix üregeibe. A fibrilláris kollagén hálózat nukleációs felületként, kristályosodási gócközpontként szolgál; a rendezett tü kristályok orientációját a kollagén orientációja determinálja.

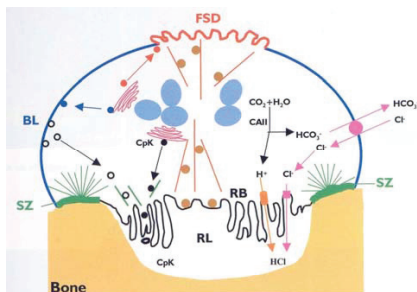
Az apatit kristályban a foszfát tetraédereket kalciumionok kötik össze. A rácspontokban hidroxid-, fluorid- és hidrokarbonát-anion valamint víz lehet jelen. A kristályrácsot stabilizáló hatás akkor a legkifejezettebb, ha a hidroxidionok 8-10 %-át fluorid ionok helyettesítik. Mivel a két ion mérete azonos, a csere az apatit szerkezetét nem változtatja meg, keménységét és kristályos jellegét azonban növeli. Így a csontokban és a fogakban hidroxiapatitot és fluorapatitot tartalmazó kristályok vannak jelen. A kristályok mérete az életkortól és a szövet fluorid tartalmától függ. Csecsemők csontjában nem mutatható ki kristályos szerkezet, időskorban viszont már 10x50x150 nm méretűek a kristályok. Mineralizáció során a hidroxiapatit képződése az apatithoz szerkezetileg hasonló, de foszfátban gazdagabb vízdékony vegyületekből történik. Ilyen pl. az oktakalcium-foszfát, amelynek átalakulását apatittá a fluoridionok már kis koncentrációban gyorsítják. Az optimálisnál nagyobb mennyiségű fluorid bevitele foltos fogzománcot és csontképzési zavart, ún. fluorozist okoz. A korrall előrehaladva exponenciálisan nő a kristályhibák száma elsősorban az intersticiális csontszövetben. Szintén az elszálló évek következménye a csökkenő kristályvíz tartalom és a csökkent folyadék kicserélődés az extracelluláris tér és csont állomány között [4, 5].

A magnéziumról *in vitro* tanulmányok kimutatták, hogy a hidroxiapatit kristályok felszínéhez kötődve, valamint a kalciummal kompetálva retardálják a nukleációt, akadályozzák a kristályok és a kristály intermedierek növekedését [6, 7]. A magnézium tartalom csökkenésével az apatit kristályok mérete növekszik, míg a magas magnézium tartalom apróbb kristályokat eredményez. A magnézium úgyszintén befolyásolja az oszteokalcin termelődését, illetve gátolja oszteokalcin hidroxiapatit-hoz kötődését. Az oszteokalcin gátolja a nukleációt és a prizmás brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) konverzióját hidroxiapatittá [6, 8].

1.3. Reszorpció a csontszövetben

A felnőtt, fiziológiás állapotú csontszövetben a csont képződése és felszívódása dinamikus egyensúlyban, parallel zajlik, míg oszteoporozis esetén a csontbontás irányába tolódik el az egyensúly. A reszorpcióért a nagyméretű, multinukleáris oszteoklasztok felelősek, melyek a csontállomány adszorbeálódó felszínein – a csont endoszteális és perioszteális felszínén illetve a Havers-csatornában – ún. Howship-féle lakunákban csücsülnek. Citoplazmájuk számos mitokondriumot és lizoszómát tartalmaz, ami az aktív lebontó tevékenységre utal. Hemopoetikus őssejtekből származnak, majd a monocita-makrofág fejlődési vonalból válnak le. Az oszteoklaszt prekursorok az endoszteális felszíneken fuzionálnak, így alakulnak ki a 6-8 sejtmaggal rendelkező klasztok. A sejtek jellegzetessége a speciális hullámos, rojtos határhártya, avagy. ruffled border, mely a csontfelszínnel érintkezve az aktív reszorpciós folyamatok tetthelye.

A reszorpciós ciklus korai fázisában az oszteoklasztok olyan szorosan tapadnak a csontfelszínre, hogy képesek elszigetelni a reszorpciós lakunát az extracelluláris folyadéktól. Ebben az izolált térben a V-típusú ATP-áz protonpumpa hidrogénionokat juttat a csontszöveti felszínre s a nagyszámú klorid csatornán átfolyó kloridionokkal karöltve a lokális pH-t 4,5 körülire csökkentik [9-11]. A savas közegben a kalcium és foszfát oldékonysági szorzata nagyobb, így a szerves állomány szolubilizálódik. Ennek az összefüggésnek jelentős szerepe van a hidroxapatit kristályok kiválásánál is alacsonyabb H^+ koncentráció esetén. A ruffled border laterális régiójában nemcsak ionok, hanem proteolitikus lizoszómális enzimek, főképp katepszin K és mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), is szekretálódnak, melyek a szerves állományt degradálják [12, 13]. A reszorpció következtében hátramaradó enyves, gélszerű hulladékot az oszteoklasztok a rojtos membránfelszín centrális zónáján át endocitózissal bekebelezik. Végül leválva a felszínről – feltehetően akár több reszorpciós ciklust követően – a csontfaló sejtek apoptózissal semmisülnek meg. A szövettani következmények a Volkman- és Havers-csatornák kitágult üregei, valamint rendezetlen oszteonok képében jelennek meg.



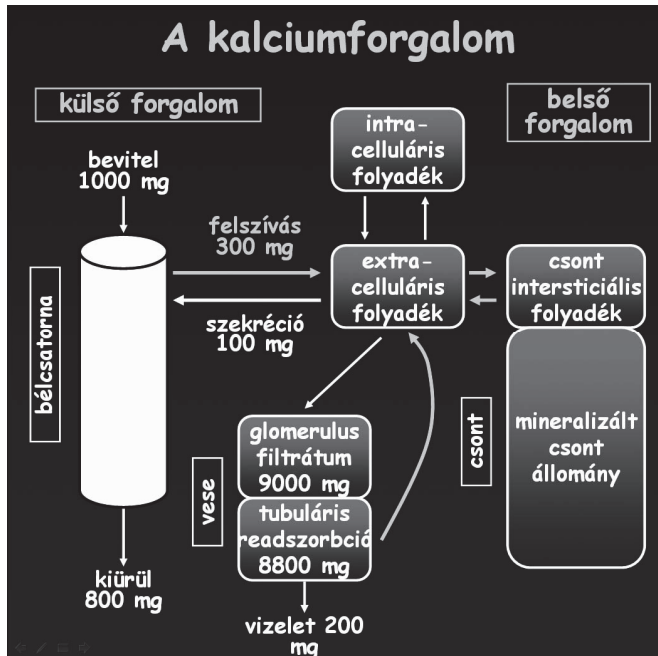
2. ábra: A csontfalo oszteoklasztok sematikus illusztrációja. Az aktiv, polarizált felépítésű oszteoklaszt membránja a következő doméneket foglalja magába: FSD: funkcionális szekréciós domén, BL: bazolaterális domén, SZ: szigetelő zóna, RB: rojtos határhártya, UN: ruffled border. RL: reszorpciós lakuna, CpK: Kateszpin K, CAII: szénsav-anhidráz [14]

1.4. A kalcium forgalom és szabályozása

A vérben a kalcium jelentős része fehérjemolekulákhoz kötötten található. A diffúzibilis kalcium nagy része ionizált, kisebb hányada anionokhoz (citrát, foszfát, hidrogénkarbonát) kötött. A fehérjéhez kapcsolódott és az ionizált kalcium közötti megoszlás függ a vérplazma pH-értékétől. Alkalózis esetén a fehérjékhez kötött kalcium mennyisége nagyobb, míg acidózis esetén fordított a helyzet, a szabad kalcium mennyisége növekszik meg a fehérjéről történő disszociáció révén.

Külső kalcium forgalom a felszívott és ürített kalcium együttes mennyisége. Pozitív kalciumegyensúly a növekedésben lévő és szoptatás alatt a női szervezet sajátja; máskülönben az embert negatív kalciumegyensúly jellemzi. A táplálékkal optimálisan bevitt kalcium 1000-1500 mg naponta, mely mennyiségnek csupán töredéke szívódik fel a béltraktusban. Nagyobb hányada a széklettel ürül, amelyhez hozzáadódik a bélbe szekretált mennyiség is. Az ürített kalcium másik része a vizeletben található. A mintegy 9000 mg kalcium tartalmú glomerulus filtrátum legnagyobb része passzívan a proximális, aktívan, hormonálisan szabályozott úton a disztális kanyarulat csatornáiban reabszorbeálódik (3. ábra).

A belső kalciumforgalom a csontból történő kalcium (és foszfát) kioldódás és visszaépülés folyamata. A csontszövetben kristályos állapotban található kalcium sók folyamatosan oldódnak az intersticiális térbe, illetve egyensúly esetén (inverz folyamatban) ugyanennyi ionizált kalcium épül be oldatlan formában a csontállományba. A kalcium anyagszere, valamint a csont építése és bontása, azaz a remodeling, végső soron a hormonrendszer kalciotrop hormonjainak szabályozása alatt áll. E hormonok a mellékpajzsmirigyben



3. ábra: A kalcium forgalom az emberi szervezetben [15].

termelődő parathormon (PTH), a D-vitaminből kialakuló kalcitriol és a pajzsmirigy parafolikuláris sejtjei által szekernált kalcitonin. Fontos hozzátenni, hogy a csontállomány megőrzéséhez szexuálissteroidok, androgének és ösztrogének, is szükségesek illetve glükokortikoid hormonok túlermelése esetén a remodeling a lebomlás irányába tolódik el.

A glandula parathyreoidea, azaz a mellékpajzsmirigy terméke a 84 aminosavból álló parathormon. A primer translációs termék a pre-pro-parathormon N-terminálisán elhelyezkedő szignál szekvencia lehasadása során keletkezik a biológiailag még inaktív pro-parathormon, melyről lehasadó N-terminális aminosavak révén jön létre a szekrécióra kerülő aktív peptid. A mellékpajzsmirigy hormontermelő sejtjeit közvetlenül szabályozza a vérplazma kalciumion szintje. Ha a 7-transzmembrán receptorok nem, vagy csupán kis

mennyiségben kötik a kalciumot (plazma $[Ca^{2+}]$: 1 mmol/l), akkor a sejtek – egyrészt az intracelluláris PTH-proteolízis csökkenése, másrészt az expresszió növekedése révén – maximális intenzitással szekretálnak parathormont. Hatására emelkedik a vér kalcium szintje; majd negatív feed-back mechanizmus gátolja a sejtek további hormon termelését. A parathormon szekrécióját hasonló mechanizmussal szabályozza a kalcitriol szint is.

A parathormon receptorai a mellékpajzsmirigy sejtein túl a vese, valamint a csont oszteoblaszt és éretlen oszteoklaszt sejteinek plazmamembránjában is megtalálhatók. Hatásait a 7-transzmembrán doménnel rendelkező receptoron, G-fehérje \rightarrow cAMP szignáltranszdukciós rendszer közvetítésével fejti ki. A PTH a vese proximális kanyarulat csatornáiban csökkenti a foszfát reabszorpcióját, így csökkenti a vérplazma foszfát koncentrációját. Ugyanitt fokozza a kalcitriol kialakulásában kulcsszerepet játszó 1- α -hidroxiláz aktivitását, s így a kalcitriol révén a bélben a kalcium felszívását segíti. A disztális kanyarulat csatornáiban is fokozza a kalcium visszaszívását, ezáltal is emelve a szérumban kalcium szintjét. A csontszövetben fokozza a kalcium csontból vérbe való kilépését. A ligand-receptor kölcsönhatás az oszteoblasztokból olyan mediátor anyagok felszabadulását eredményezi, amelyek az oszteoklasztokat aktiválják és ezáltal a csontszövet lízisét okozzák. Csökkenti a kollagén szintézist és a csont depozíciót. A csontvelőben fokozza a monocita-granulocita fejlődési vonalból az oszteoklaszt prekursorok leválását. Az éretlen oszteoklasztok PTH hatására tovább differenciálódnak.

A pajzsmirigy diffúzan elhelyezkedő parafolikuláris C-sejtjeiben (clear, világos sejt) expresszálódik a 32 aminosavból felépülő kalcitonin molekula. A biológiailag aktív hormon a prekursor peptid N- és C-terminális aminosavainak lehasadását követően keletkezik. Szabályozása hasonló a PTH-hoz, a C-sejtekben azonban a kalcium membrán receptorhoz való kötődése szekréciós ingert vált ki, azaz ebben az esetben a szérumban kalcium koncentráció emelkedése növeli a hormon elválasztását. A kalcitonin receptora a plazmamembránban található, intracellulárisan több G-fehérjével kölcsönhat. Ligandkötés hatására mind az adenil-cikláz \rightarrow cAMP, mind az $IP_3 \rightarrow Ca^{2+}$ jelátviteli útvonal aktiválódik.

Kalcitonin hatására az aktivált oszteoklaszt sejtek inaktiválódnak; a ruffled border elsimul, megszűnik a hidrogénion kiáramlás, az enzimszekréció illetve a fagocitózis is. Ez a csontreszorpció felfüggesztését jelenti s az egyensúly a kalcium beépülés irányába tolódik. A kalcium sók nem oldódnak be a csont intersticiális tereibe, ezáltal a vérplazma kalcium szintje csökken.

Az ergokalciferol vagy D₂-vitamin a táplálékkal jut a szervezetbe. A kolekalciferol, azaz D₃-vitamin forrása szintén lehet táplálék pl. csukamájolaj, de nagyobb része a bőrben keletkezik 7-dehidrokoleszterinből UV sugarak (290-310 nm) hatására fotolitikus átalakulással. A D₃-vitamin két hidroxilációs lépésen keresztül válik aktívvá. A májban a 25-ös szénatomon hidroxilálódik, majd a második, már szabályozott lépésért a vese proximális kanyarultas csatorna 1- α -hidroxiláz (CYP1) enzimje felelős. Így keletkezik az aktív 1,25-(OH)₂-kolekalciferol, más néven kalcitriol.

A hormon a vékonybél hámsejtjein az aktív transzcelluláris transzportfolyamatokhoz szükséges kalcium-kötő fehérjék, illetve a kalciumfelszíváshoz szükséges fehérjék expresszióját serkenti. Fokozza tehát a kalcium és foszfát vékonybélből való felszívódását. Elősegíti az oszteoklasztogenezist. Az oszteoblaszt sejtekben a receptoraihoz kötődve oszteoklasztokat aktiváló faktorok termelődnek, így lokális parakrin úton serkentve a csontszövet reszorpcióját.

1. táblázat: VDR/D-vitamin komplex által szabályozott gének [1]

Pozitívan szabályozott gének	Negatívan szabályozott gének
Oszteokalcin	PTH
Oszteopontin	Sialoprotein
β -3-integrin	PKA
24-hidroxiláz	PTH-related peptid
Calbindin	IL-2
p21	
PKC	

A kalcitriol közvetlenül csökkenti a PTH-szekréciót, illetve a vérplazma kalcium szintjének emelésén keresztül gátolja a PTH termelődését, így visszaszorítja az 1- α -hidroxiláz aktivitását. A kalcitriol szteroid származék. Ennek megfelelően az intracelluláris VDR receptor-ligand komplex a sejtmaghártján átjutva és adott gén VDRE régiójához kötődve génexpressziót szabályoz. Így módon pl. visszahat az 1- α -hidroxiláz gén transzkripciójára önmaga képződését gátolva ezzel.

Bár nem a kalcitrop hormonok sorát gyarapítják, mégis hatással vannak a kalcium anyagcserére, a csontépítő és -bontó folyamatokra a mellékvesekéregben képződő glükokortikoidok illetve az adenohipofízis szomatotrop sejtjeiben termelődő növekedési

hormon (GH). GH hatására a májban szintetizálódó IGF serkenti az oszteoblasztok érését, a kollagén és a non-kollagén fehérjék expresszióját, valamint gátolja a kollagén lebontását. A glükokortikoidok szuprafiziológiás koncentrációban gátolják az oszteoblasztok differenciálódását, csökkentik a kollagén expressziót, serkentik a mátrix bontását a kollagenáz és metalloproteinázok szintézisének fokozásával. Fiziológias koncentráció szükséges az oszteoklasztok normális működéséhez is.

Az utóbbi években újra az oszteoporózis kutatások középpontjába került az ugyanúgy férfiak, mint nők esetében jelentős ösztrogénhatás és a citokinek hatásának mechanizmusa. Az ösztrogén, szteroid lévén, receptorához az ER α -hoz kapcsolódva a magba transzlokálódik és ott fejti ki hatását. Csökkenti a monocita sejtek IL-1, TNF illetve a stroma sejtek M-CSF és IL-6 produkcióját, melynek eredményeképpen csökken az oszteoklasztok képződése. Menopauza idején az ösztrogén deficiencia – a vér kritikus ösztrogén koncentrációja 30 ng/ml – következtében az oszteoklasztok képződése felszabadul a gátlás alól, s a csontmetabolizmus a felszívódás irányába tolódik. Alternative citoplazmatikus szignáltranszdukciós útvonalon is hatva az ösztrogén az oszteoblasztok apoptózisát blokkolja.

Az oszteoklaszt képződést reguláló receptor aktivátorok között ott van a RANKL (OPGL vagy NF κ B ligand), amely faktorokat elsősorban a stroma sejtek, oszteoblasztok és aktivált T sejtek termelik. A RANKL tagja a TNF családnak; membránkötött és szolubilis formában egyaránt létezik. A RANKL az oszteoklaszt és oszteoklaszt prekursor sejtek felszínén ülő RANK membrán receptorokhoz kötődik, ha csak a számos hematopoietikus sejt által termelt szolubilis receptora az OPG ki nem titrálja a rendszerből. M-CSF jelenlétében a RANKL indukálja a monocita sejtek differenciálódását oszteoklasztokká, aktiválva a MAP kináz JNK enzimet, mely fokozza a transzkripcióját oszteoklasztogenetikus transzkripciós faktoroknak. Fiziológias körülmények között az IL-1, IL-6 és TNF csak alacsony koncentrációban termelődnek a csontvelőben. Patológias körülmények között azonban, gyulladás vagy ösztrogén deficiencia esetén megnövekedett mennyiségű kritikus fokozza az oszteoklasztok féléletidejét és aktivitását, bár az alapvető oszteoklasztogenezishez nem esszenciálisak.

Ha a fenti szabályozási folyamatok során a fiziológias állapot megbomlik, a vázrendszer szintjén a csontok leggyakoribb patológias elváltozásával, a csontitkulással kell szembenéznünk.

1.5. Csontritkulás, a néma járvány

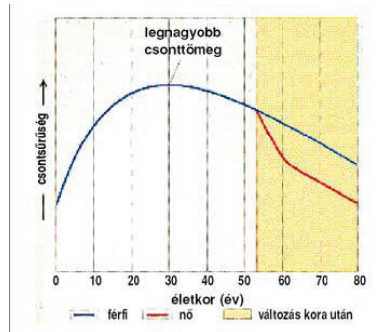
A csontritkulás, avagy oszteoporozis, az egyik leggyakoribb civilizációs csontanyagcsere betegség, mely elsősorban, de nem kizárólag nőket sújt.

A csonttömeg a hosszúnövekedés megszűnését követően 25-35 éves életkorig növekszik, s eléri az egyénre jellemző csúcscsonttömeget. Egy rövid egyensúlyi plató fázis után megindul a mennyiségnek életünk végéig tartó csökkenése. Nőkön 6-8 évig tartó, különösen jelentős csontfogyás a menopauza táján következik be, majd tovább folytatódik, de már lényegesen kisebb mértékben. Férfiakban a klinikailag jelentős fokú csontvesztés általában csak a 60-65. életév körül észlelhető. Mindezen folyamatok mértéke azonban egyénenként is különbözik (4. ábra).

A csontritkulás tehát a csúcscsonttömeghez képest megfogyatkozott csonttömeget, csökkent mértékben mineralizált és mikroszerkezetiileg degenerálódott csontszövetet jelent, amelyben megváltozik a fehérjék mennyisége és összetétele [16, 17]. A csontok ásványianyag-tartalmának és denzitásának meghatározása során a vizsgált egyénnél mért értéket összehasonlítjuk a nemben, korban illesztett, egészséges normálcsoport átlagával. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a 20 éves egészséges nők csúcscsonttömeg átlagától 2,5 SD-vel alacsonyabb kettős energiájú röntgen foton abszorpciometriás (DXA) csont ásványi anyag sűrűség (BMD) értéként definiálta a csontritkulást nőkben [18].

Magának az oszteoporozisnak nincsenek specifikus tünetei, legfontosabb következménye a megnövekedett csonttörési kockázat. Porotikus törések mindazok, amelyek olyan körülmények között esnek meg, amelyek között egészséges ember nem törné csontját. Ezek jellemzően gerinccsigolya, borda, csípőtáji és csukló törések; a végtag csontjai közül pedig elsősorban a combcsontot és az alkar csontjait érintik. A csontritkulás és a törés kockázati tényezői részben eltérők.

Az oszteoporozis esetében bizonyított kockázati tényezők a női nem; a fehér rassz; az alultápláltság; a kis testsúly vagy több mint 10 %-nyi testtömeg veszteség; a pozitív családi, döntően anyai ági anamnézis oszteoporozisra; a korábbi prevalens csonttörés; az ösztrogén vagy tesztoszteron hiány; a hyperthyreosis; a glükokortikoid túltermelés; autoimmun kórképek pl. rheumatoid arthritis; renalis hypercalciuria; krónikus vese és májbetegségek; szervtranszplantáció utáni állapot; az immobilizáció; a súlytalanság; a dohányzás és tartós csontvesztést eredményező gyógyszerek szedése, mint a tiroxin, glükokortikoidok, citosztatikumok és antikonvulzívumok.



4. ábra: Minden ember kb. 25-35 éves koráig eléri az egyedre jellemző legnagyobb csonttömeget, az ún. csúscsonttömeget. Innentől kezdve, ahogy szállnak felettünk az évek, a csontmassza tömege fokozatosan csökken. Ebbe a lassú szövetvesztésbe szól bele a hormonrendszer a menopauza idején. Ekkor a nemi hormonszint drasztikus süllyedése következtében a csontfaló sejtek felszabadulnak a gátlás alól, és erőteljes reszorpció indul meg. Ez a nőknél fokozottabb, mert az ösztrogén szint esése ugrásszerűen következik be, nem olyan fokozatosan, mint férfiak esetén.

A törési kockázat tényezői esetében döntően az életkor, a prevalens törés, a gyakori esés, a pozitív anyai anamnézis a csípőtáji törésre és az alacsony testsúly játszanak igen fontos szerepet [3]. Lokalizációtól függetlenül ezek drámaian megemelik a törések előfordulását. A törés kockázati tényezői közé számos változót sorolhatunk, mint például a BMD, csont geometria, esési hajlam, stb.. Az egyes rizikófaktorok lehetnek bináris változók, pl. szex, vagy még gyakrabban folytonos valószínűségi változók pl a BMD. Egy populáción belül a törések előfordulása függ a törési kockázat és a rizikófaktor közötti korreláció erősségétől és a csonttritkulás kialakulásában szerepet játszó gének allélfrekvenciáitól [19].

Az oszteoporozist primer és szekunder formákra szokás felosztani. Az utóbbiak más betegségek szövődményeiként jelennek meg. A primer formák az öregedési folyamatokhoz kapcsolódnak, ezért involúciós oszteoporozisként emlegetik. Az involúciós oszteoporozisnak két típusát különítjük el: az I. típusú vagy posztmenopauzás – férfiaknál presenilis –, valamint II. típusú senilis vagy időskori formát.

A II. típusú involúciós oszteoporozisban az ösztrogénhiány extraskeletális hatásai kerülnek előtérbe. Az elsősorban 65-70 év felett jellemző csonttritkulás a trabekuláris és a kortikális csontrendszert egyaránt érinti. Jellemző töréstípusa a csípőtáji és

combnaktörések. Azonos csontsűrűségű, de eltérő korú személyek csonttörési rizikója különböző. Mégpedig az idősebbeké nagyobb, ami azzal magyarázható, hogy idősebb korban – mégha a csontdenzitás azonos is a fiatalokéval – szerkezetében jelentős minőségi romlás állt be, amely csökkenti a csontok szilárdságát. A csontminőség romlását az oszteoblaszt aktivitás csökkenés és az oszteoklasztok élettartamának növekedése, apoptózisának késése okozza, mely miatt a csontgerendák perforálódnak, kitornek. További csontminőség meghatározó tényező a csont szerkezetében keletkező mikropedések, a kis szilárdságú cementvonalak felszaporodása, a kortikális porozítás növekedése, a foltosan csökkenő mineralizáció az oszteonokban és a kollagénrostok rugalmasságának csökkenése. Az involúciós oszteoporozis során csökken a bélben a kalcium abszorpció és a vesében a kalcium reszorpciója, ezáltal a szérumban a kalcium szintje is esik. Ez szekunder parathyreosist eredményez és a fokozott parathormon szekréció fokozott csontvesztéshez vezet. Egyelőre nem teljesen világos, hogy a közvetlen posztmenopauza időszakában miért az ösztrogénhiány skeletális, később pedig az extraskeletális hatásai érvényesülnek.

Az I. típusú vagy posztmenopauzás – férfiaknál presenilis – oszteoporozisban mai ismereteink szerint mind nőkben, mind férfiakban az ösztrogénhiány skeletális hatásai dominálnak. A változások szerteágazóak és sok részlet a mai napig tisztázatlan. Az ösztrogén szint 90 %-os esése először egy felpörgött csont metabolizmussal és remodelinggel (azaz turnover) jellemezhető, mintegy 5 éven át tartó csontvesztéshez vezet, ami döntően a trabekuláris állományt érinti és évi akár 3%-os csontvesztéssel járhat. Ezt követően a progresszió lassul, eléri egy fél-plató fázist. Az évi 0.5-2 %-os csontvesztés már a trabekuláris és kortikális csontszövetet is érinti, illetve majd 25 %-kal emelkedik az oszteoporotikus törések kockázata. Szövödménye a kompressziós csigolyatörés.

Az ösztrogén multifunkcionális protektív szerepet tölt be a csontszövet homeosztázisában, valamint a csontsűrűség megtartásában. Deficienciája esetén legfontosabb kórfolyamat az oszteoblasztok és oszteoklasztok működési egyensúlyának megbomlása, a csont turnover fokozódása, elsősorban a gyulladáshoz vezető citokinek megemelkedett expressziójának következtében. Továbbá ösztrogén hiányában redukálódnak a növekedési faktorok szintézise és nő az oszteoklasztok aktivitása (*l.s.d. fent*).

Posztmenopauzás stádiumban az ösztrogénhiány mellett sok egyéb változás is bekövetkezik a női szervezetben: Nagymértékben lecsökken a progeszteron szintje, amely az oszteoblaszt sejtek differenciálódását stimulálja és számos gén (oszteokalcin, c-jun, c-fos) kifejeződését befolyásolja. Az ovárium funkciók megszűnését követően módosul az activin/inhibin/follistatin rendszer, mely szintén több különböző ponton szabályozza a

csontsejtek biológiai folyamatait. Irányítja az oszteoid állomány mineralizációját, az extracelluláris mátrix komponensek metabolizmusát és egyúttal hatással van néhány oszteoblaszt specifikus gén (oszteonektin, oszteopontin, alkalikus foszfatáz, I. típusú kollagén, mátrix metalloproteináz) transzkripciójára.

Annak ellenére, hogy a medencetörések egyharmadát férfiak szenvedik el, a férfiak oszteoporozisának tanulmányozása háttérbe szorul a nők oszteoporozisának elemzéséhez képest. Ennek az az oka, hogy körükben a csonttrikulást nehezebb tetten érni és tanulmányozni az eredendően magasabb csúcscsonttömeg, a törések relatíve alacsonyabb száma, valamint – a nőekkel ellentétben – egyenletesen bekövetkező hormonszint esés illetve a rövidebb várható élettartam következtében.

Pubertás előtt a csontok nagyságát és alakját illetően nincs szexuális dimorfizmus, a csontok lineáris növekedését döntően a növekedési hormon befolyásolja. A csontok nemre jellemző tulajdonságait alapvetően a nemi hormonok jelenléte illetve azok hiánya határozza meg, vérbeni szintjük változásának ideje eltérő csontrendszeri hatást okoz. Ez az ún. inverz nemi hiány elmélete.

A kialakuló androgénhiány változatlan hosszúságú, kisebb átmérőjű, míg az ösztrogén hiány hosszabb és szélesebb csontot eredményez. Az endoszteális appozíciót az ösztrogének míg a perioszteális appozíciót az androgének serkentik és ösztrogének gátolják, így eredményezve a nők férfiakhoz képest keskenyebb csontméretét, fiúknál pedig a hosszabb, nagyobb átmérőjű és szélesebb kortikális rétegű hosszú csöves csontok építését. Mindezek tudatában természetes, hogy a férfi hypogonadizmus is oszteoporozishoz vezet bármely életkorban. A 65. életév felett csökkenő össz- és szabad tesztoszteron szintek szerepet játszanak a férfi oszteoporozis kialakulásában.

Ugyanakkor a férfiak esetében is fontosak az ösztrogének, csakúgy, mint a nők esetében az androgének. Mindkét szexhormon fajta jelentős mennyiségben keletkezik az ellenkező nemben is. Ismert, hogy mutáns ösztrogén receptor esetén fiatal férfiakban a csontok ásványi anyag tartalma csökken. A nők esetében azt tapasztalták, hogy posztmenopauzális oszteoporozisos nők mellékvesekéreg eredetű dehidro-epiandroszteron-szulfát szintje alacsonyabb, mint a hasonló korú, de nem oszteoporozisos nők szérum koncentrációja.

Alapvető kérdés volt hosszú ideig, hogy a nők kezelésében kipróbált és hatásosnak bizonyuló gyógyszerek alkalmasak-e a férfiak csontvesztésének megelőzésére és milyen módon befolyásolják a férfiak törekenységét. A gyógyszeres beavatkozásra a férfiak a nőkkel egyező formában és mértékben reagálnak, bár erre kétségkívül kevesebb férfiadat

utal. Ezt indirekte azt is alátámasztja, hogy a nembéli eltérések ellenére a férfi és női csontritkulás molekuláris háttere ugyanaz.

A kórtörténet és klinikai tünetegyüttes, a kezelés és a posztmenopauzális oszteoporozis hátterében álló szövettani változások jól definiáltak, a molekuláris mechanizmust viszont nem ismerjük részletesen.

1.6. Specifikus oszteoporozis markerek

A human oszteokalcin (gla protein, BGP) 49 aminosavat tartalmazó polipeptid, amely három gamma-karboxiglutaminsav reziduumot is tartalmaz. Expresszióját az oszteoblasztokban az 1,25-(OH)₂-D-vitamin serkenti. Ez annak köszönhető, hogy a humán oszteokalcin génben D-vitamin rezponzív elem van. Főként oszteoblasztok szekretálják az oszteokalcint, azonban a dentinben és a kalcifikálódó porcban is megtalálható. Az oszteokalcin kb. 1%-át alkotja a csont szerves állományának. Az oszteoblasztból történő szekréciója után a fehérje hidroxipatithoz kötődik. Ez a kötődés alapvetően a gamma-karboxiglutaminsav maradékok karboxiláltságától függ. Alulkarboxiláltság esetén a kötődés nem, vagy lazábban következik be és úgy tűnik, ennek a csonttörékenységre is hatása van. A gamma-karboxiláltság alapvetően K-vitamin függő.

A szérum oszteokalcin és a csontspecifikus alkalikus foszfatáz az oszteoblaszt aktivitás, azaz a csontképzés indikátorai, mégsem változnak mindig párhuzamosan.

A kollagén képződése során az N illetve C-terminális végekről egy-egy propeptid hasad le, így keletkezik az érett kollagén molekula. Elsősorban a kollagén C-terminális propeptid mérése (PICP) tűnik biztatónak a kollagén szintézis, azaz a csontképzés paramétereiként. Az eddigi adatok szerint azonban a PICP rossz korrelációt mutat csont hisztomorfometriai paraméterekkel és kevésbé tükrözi a megváltozott csontanyagcserét, így a klinikai gyakorlatban nem terjedt el.

A csontreszorpciós markerek egyik legrégebbi módja a vizeletből történő hidroxiprolin mérés, amely anyag azonban más szövetekből is származhat, így lassan a módszer kiszorul a klinikai gyakorlatból.

A kollagénrostok érésük során keresztkötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Ezáltal a kollagén rugalmas lesz, és hálózatos szerkezetet alkotva alapjául szolgál a szervesetlen állománynak. A kollagenáz a kollagén bontása során a láncokat feldarabolja, de a

keresztköteket tartalmazó részeket érintetlenül hagyva kivágja a kollagén láncokból. Ezek a kollagén keresztköteket tartalmazó oligopeptidek metabolizáció nélkül ürülnek a vizelettel. A keresztkötekeknek két fő típusa van: a piridinolin (PYD), valamint a deoxipiridinolin (DPYD). Az utóbbi kizárólag I. típusú kollagénben fordul elő, amely csontspecifikus. Így a vizelet DPYD ürítése az I. típusú kollagén degradációjának, azaz a csontreszorpciónak a markere. Vizsgálatuk a reggeli első vizeletből történik. A PYD és DPYD keresztkötekeken túl mérni lehet a keresztkötés tartalmú telopeptideket is. Mind az N-terminális keresztkötés tartalmú telopeptid (NTX), illetőleg a C-terminális telopeptid (Crosslaps) jól tükrözi a csontreszorpciós aktivitást, valamint jelentős csökkenést mutat antireszorptív gyógyszerek hatására. A jelenleg forgalomban levő PYD és DPYD keresztköteket mérő ELISA kitek a fehérjéhez nem kötött szabad keresztköteket mérik. A vizeletben a kollagén keresztkötekeknek csak egy része található szabad formában, a többi fehérjéhez kötött. Ez utóbbi méréséhez HPLC módszerre van szükség. Az utóbbi időben lehetővé vált a szérum keresztkötés, illetve keresztkötés tartalmú peptidjeinek immunoassay alapú meghatározása is. Míg a vizeletből történő meghatározás egy adott periódus szummációját jelenti a csontbontás szempontjából, addig a szérum szint egy pillanatnyi képet mutat.

A szérumból a tartarát rezisztens savi foszfátáz (TRAP) mérése az oszteoklaszt aktivitásra szolgáltató bár nem specifikus- információt, mivel az enzimet számos más szövet is tartalmazza. Általában azonban elmondható, hogy a szérum magasabb TRAP aktivitása magasabb csont turnovervel jár együtt.

1.7. A csontritkulás genetikai háttere

Körülbelül 30 éves korunkra elérhető csúcscsonttömeget és a csontvesztés sebességét 60-80%-ban genetikai [20], s csupán 20-40%-ban környezeti tényezők határozzák meg [21, 22]. Ez a tény alátámasztja, hogy szükség van a probléma genetikai, molekuláris biológiai megközelítésére.

Gyógyszeres beavatkozásra a férfiak a nőkkel egyező formában és mértékben reagálnak, ami indirekte azt is alátámasztja, hogy a nembéli eltérések ellenére a férfi és női csontritkulás molekuláris háttere megegyezik. A csontfejlődést meghatározó genetikai

tényezők közel azonos formában érvényesülnek a két nemben; a poligenetikus befolyás ugyanúgy férfiak, mint ahogyan nők esetében feltételezhető.

A csont szerves állományának legnagyobb részét tehát az I. típusú kollagén alkotja, mely heterotrimer, kettő $\alpha 1$ és egy $\alpha 2$ lánc alkotja. *COL1A1* gén egyes polimorfizmusai emelik a csonttrikulás és csonttörések kockázatát [23, 24]. A gén Sp1 transzkripciósi faktort kötő, az első intronban elhelyezkedő régiójában leírt polimorfizmusról igazolták, hogy befolyásolja az Sp1 fehérje kötődését, ezen keresztül a gén transzkripcióját. Vagyis a polimorfizmus jelenlétében megnövekedett $\alpha 1$ lánc szintézis több $\alpha 1$ homotrimer



5. ábra: Osteogenesis imperfectában szenvedő újszülött karjáról készült Röntgen felvétel.

létrejöttéhez s így a csonttörékenység fokozódásához vezet. Egyetlen s allél jelenléte 62%-kal nagyobb törési kockázattal jár [25]. Az extrém törékeny üvegcsontok vagy osteogenesis imperfecta (5. ábra) kialakulásáért is a *COL1A1*, illetve a *COL1A2* gén autoszómális domináns pontmutációi felelősek, melynek következtében a fehérje aminosav szekvenciájában egy glicin ciszteinre cserélődik.

A D vitamin receptor (*VDR*) génjének mutációi X ivari kromoszómához kötött D-vitamin-rezisztens rachitist, azaz Angolkort okoznak. A betegség mineralizációs zavart, a bélből csökkent kalcium abszorpciót, hipokalcémiát és emelkedett kalcitriol szintet eredményez kompenzatórikusan. Az érintettek csökkent vagy teljesen hiányos válasszal rendelkeznek D₃-, D₂-vitamin vagy ezek 25-hidroxilált formáinak hatására [1].

A posztmenopauzában bekövetkező csontvesztés miatt az ösztrogén receptor (*ESR1*) egyike volt az elsőként vizsgált géneknek. Kapcsolatot találtak a gén promoter régiójában található TA repeat és az első intronban elhelyezkedő *PvuII* és *XbaI* polimorfizmusok és ásványianyag-tartalom között; bár az eredmények ellentmondásosak.

Az interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1ra) az egyik legerősebb csontfelszívódásért felelős faktornak, az IL-1-nek az antagonistája. Korrelációt találtak az IL-1ra gén második intronjában levő tandem repeat polimorfizmus és a posztmenopauzás csontvesztés között, ami azonban nagyobb esetszámot vizsgálva bizonytalan. Hasonló eredményre jutottak az IL-6 gén kapcsán is.

Az osteosclerosissal és fájó csontokkal járó Camurati-Engelmann szindróma hátterében a transforming growth factor β (*TGF β*) gén mutációját írták le, mely a fehérje szignálpeptid részét érinti. A negyedik intronban leírt deléción és az első exonban aminosav cseréhez vezető mutáció és az oszteoporozis előfordulása között is asszociációt mutattak ki. Az exonban lévő polimorfizmus posztmenopauzás nőknél összefüggést mutatott a csont ásványianyag-tartalmával, a porotikus törések gyakoriságával éppúgy, mint a szérumban lévő TGF β szintjével [25].

Az apolipoprotein E (ApoE) valószínűleg az oszteokalcin hidroxilációjában kofaktorként közreműködő K vitamin anyagcseréjén keresztül hat a csontanyagcserére. Az *E4* allél jelenléte alacsonyabb csontdenzitással és nagyobb csonttörékenységgel társul [26].

A pubertástól a 20-as évek végéig jelentkező fiatalkori oszteoporozissal és vaksággal járó osteoporosis-pseudoglioma szindróma hátterében egy a lipidanyagcserében szerepet játszó fehérjét kódoló gén, az *LRP5* (lipoprotein receptor-related protein 5) funkcióvesztéses mutációja igazolódott. Az emberi csontszöveten belül az *LRP5* gén expresszióját kimutatták oszteoblasztokban, remodelingben aktív részeken, az endosteumban és trabekuláris állományban. A gén hatása elsősorban a Wnt jelátviteli útvonalon keresztül érvényesülhet.

A klasszikus és molekuláris genetikai módszerekkel nyert ismeretek ma már a mindennapi orvosi gyakorlatban a csonttritkulás diagnosztikáját segítik, s új irányvonalakat jelölnek ki a gyógyításban is. A kutatások során állatmodellek sora segíti a betegség kialakulásában szerepet játszó eddig ismeretlen gének azonosítását.

1.8. Oszteoporozis állat modellek

Tökéletes egyezés az állatok és a humán csontanyagcsere, valamint az eltérő fajok oszteoporozis tüneteinek között nagyon ritkán fordul elő. Átgondolt kompromisszumokra és kritériumokra van szükség ahhoz, hogy a megfogalmazott kérdés megválaszolásához a megfelelő *in vivo* modellt választhassuk. A laboratóriumi modellállatok kiválasztásának kritériumai rugalmasak, kreatívak, valamint az újabb és újabb tudásanyag felhalmozódásával újragondolhatók. Ideális esetben a vázrendszer fiziológiás és patológiás folyamatainak feltárására a főemlősök a legalkalmasabbak, azonban ez rutinszerűen nem megvalósítható.

Csontrendszerének fiziológiás tulajdonságai kiváló laboratóriumi kísérleti alannyá teszik mind a patkányt, mind az egeret. Knock-out és transzgenikus egerek segítségével a reszorpcióban és depozícióban szerepet játszó szignáltranszdukciós útvonalak és gének azonosíthatók. Részben szövet szintű vizsgálatokra is alkalmasak: Patkánnyal folytatott kísérletek adták az első bizonyítékokat arra nézve, hogy a csont bontását oszteoklasztok végzik [27], s hogy ezen sejtek hematopoetikus eredetűek [28].

A klimax csontsűrűsége gyakorolt hatása jól modellezhető rágsálókban azáltal, hogy a szivacsos csontállományban rövid időn belül csontvesztés detektálható ovariectomiát követően. Nem így a kompakt régiókban. Ösztrogén elvonás hatására ugyanis az endokortikális felszíneken csontépítés is detektálható, mely válaszreakció nagyobb testű emlősökben hiányzik. Az ovariectomizált nőstény modellekhez hasonlóan a hímek ivartalanítása is magas turnoverű osteopeniához vezet. A kialakult csontsűrűség-csökkenés androgén pótlásra helyreáll [29].

Különlegesség, hogy SAM/P6 (senescence accelerated mouse) egyedekben involúciós oszteoporozis alakul ki, így vizsgálható, hogy az alacsony csontsűrűség hogyan vezethet porotikus törésekhez. Precíz hisztomorfometriai tanulmányozásra azonban a csontszövet alacsony ásványi anyag tartalma miatt az egerek kevésbé alkalmasak, ugyanis konvencionális módszerekkel csontjaikban a BMD változás megbízhatóan nem detektálható.

Az ivarérett kutyák megfelelő és megbízható oszteoporozis modelleknek tekinthetők. A kompakt és szivacsos állomány aránya hasonló a humánhoz. Igaz, az emberéhez képest felpörgetett formában, azonban a remodeling is jelen van; így potenciális gyógyszerkészítmények remodelingre gyakorolt hatása kiválóan vizsgálható kutyákon.

Beagle-eken végzett komplex kísérletsorozatban ösztrogén deficiencia/OVX hatására 6-9 %-os csontvesztést detektáltak, bár az emberben jellegzetes turnover emelkedést itt nem tapasztalták [30].

A sertéseket felhasználó eddigi tanulmányok nem biztatóak. Bár elkülöníthetők a csont növekedési fázisai, s az emberénél valamivel rövidebb ösztrogén ciklus is jelen van, hormonális depléciót követően nem vagy csupán minor mértékű csont denzitás csökkenést mértek. Disznókat sikeresen alkalmaztak viszont a mozgás csonttömegre gyakorolt hatásának tanulmányozása céljából [31].

6 hónappal az ovariectomiát követően egy 8 éves juh mind kortikális, mind szivacsos csontállományában megemelkedett csont remodeling mérhető biokémiai és morfológiai módszerekkel. A csigolyák és egyéb csontok is BMD csökkenést mutattak. Bár

szélesebb körű vizsgálatokra van szükség, a juh ígéretes *in vivo* posztmenopauzás oszteoporozis modell állat lehet.

Alkalmi tanulmányok megjelentek ugyan, amelyek posztmenopauzás oszteoporozis modellként tengeri malacot, nyulat vagy macskát használnak, de számuk és sikerük nem számottevő. A fent említett csonttrikulásban szenvedő emlősök egyike sem képes regenerálni a kialakult csontvesztést természetes úton. Ebből a szempontból a madarak tojóji képeznek figyelemreméltó kivételt, bár természetes úton s egyúttal hatalmas volumenben ez csakis gímszarvas bikák vázcsontozatában valósul meg minden évben.

Az ivarérett tojók szivacsos csontjainak építése és bontása a tojóciklus függvénye: a csont depozíció és reszorpció időben megfeleltethető a tojásrakás és tojás kalcifikáció folyamatainak [32].

A madár csontváz tömegének alakulásában is fontos szerepet játszik az ösztrogén státusz. A csontépítési fázis együtt jár a 17- β -ösztradiol szérum szintjének emelkedésével, míg a reszorpciós periódus a hormonszint csökkenésével. Tehát az ösztrogén válasz madarakban és emberben nagy vonalakban megegyezik egymással, ellenben a szövetszintű változások nagy különbséget mutatnak. Mindezen túl valószínűsítik, hogy nincs, vagy csekély mértékű a remodeling szárnyasok mind szivacsos, mind kompakt csontszövetében. Azért érdemes megjegyezni, hogy madár kísérleti alanyok segítségével jöttek rá a csontsejtek eredetére [33].

2. táblázat: Posztmenopauzás oszteoporozis *in vivo* állat modelljei

	Humán	Főmlős	Egér/Patkány	Madár	Kutya	Disznó	Juh
Növekedési és Felnőtt fázis	+	+	+	+	+	+	+
Hormonális ciklus	28nap	21-28 nap	Indukálható/ 4-5 nap	1 nap	205 nap	21 nap	21 nap
Természetes menopauza	+	+	+	-	-	?	?
Ösztrogénhiányra fellépő osteopenia és magas csont turnover	+	+	+	?	Nem megbízható	+/-	+
Reakció ösztrogén pótlásra*	turnover↓	turnover↓	turnover ↓	építés ↑	Nem megbízható	?	?
Válasz anti-oszteoporotikus szerekre	+	+/-	+/-	?	-	?	+/-
Oszteoporotikus törések	+	-	-	-	-	?	?
Remodeling	+	+	-	-	+	+	+
Időkompresszió		kevés	+		?	kevés	kevés
Kényelem**	+	+	+++	++	+	+	+

*Azoknál az ösztrogén deficienciás/posztmenopauzális nőknél, akik prompt ösztrogénpótlást kapnak, a csont turnover csekélyebb mértékű emelkedését, kisebb mértékű csontvesztést és alacsonyabb számú törést tapasztalnak. Ugyanez a természetes válasz elvárható valamennyi OVX állat modellben is.

**Egy állat modell használatát meghatározó kényelmi szempontok közé soroljuk a kezelhetőséget, költség igényt, tartási szükségleteket és a rövidebb életciklusból adódó idő megtakarítást.

1.9. A gímszarvas, *Cervus elaphus*

A gímszarvas, *Cervus elaphus*, a párosujjú patások rendjének (Artiodactyla) Cervidae családjába tartozik. Ez a család 17 nemzetséget és kb. 53 fajt foglal magába. Széchenyi Zsigmond [34] szép leírást ad a különféle szarvasok elterjedéséről és jellemzőikről. A szarvasfélék az egész világon elterjedtek, kivéve az Antarktisz, Ausztráliát, Madagaszkárt, Közép- és Dél-Afrikát, valamint Új-Zélandot. Európában a létszámát tekintve a nyugati állományok jelentősebbek, a minőséget azonban a közép-európai állományok képviselik hazánkkal az élen. Magyarországon, ahol a magyar-horvát Duna-Dráva-Gemenc-Bilje Nemzeti Parkban a világ legkiválóbb állománya honol, az európai gímszarvas kiválósága a számára optimális élőhely meglétének és a tudatos vadgazdálkodásnak köszönhető.

A gímszarvas testhossza 165-250 cm, fark hossza 12-14 cm, marmagassága 100-150 cm, tömege 100-350 kg. A szarvastehén negyedével, harmadával könnyebb, mint a bika. Eltekintve a borjak pettyezettségétől, a gímszarvas egyszínű: nyáron rozsdabarna, télen szürkésbarna. Testalkatuk erőteljes, mégis kecses (6. ábra).

A gímszarvasok a tisztásokkal és rétekkel tarkított lombos-elegyes erdőket kedvelik, a legjobb életteret a folyók árterei biztosítják számukra. Elsősorban lágyszárú növényeket legelnek, azonban tavasszal szívesen csipegetnek rügyeket, ősszel pedig a makterméssel egészítik ki étrendjüket, hogy vastag szalonna réteget fejleszthessenek télre. A gímszarvasok rudlikban élnek, amelyek – a bögési időszakot leszámítva – csak tehenekből és borjaikból vagy csak bikákból állnak.

Szaporodási időszakuk, a szarvasbögés ideje szeptember-októberre esik. A borjak a következő év május-júniusi időszakában jönnek a világra. A tehenek általában csak egy borjút ellenek, amely a következő ellésig marad az anyával.



6. ábra: Gímszarvasok (*Cervus elaphus*) a Pannon Lovasakadémia szarvasfarmján, Bószénfán.

1.9.1. A gímszarvas genetikája

A gímszarvas és a milu vagy Dávid-atyja szarvas (*Elaphurus davidianus*) keresztezése új fejezetet nyitott az interspecifikus keresztezések és a kérérdzők géntérképezésének történetében. E két faj a genetikai divergencia magas fokát mutatja, hasonlóan a *Mus spretus* és *Mus musculus* fajokhoz [35]. A két szarvasfaj mind megjelenésében (az agancs, a láb és a farok morfológiája), mind biológiájában (szezonáltság, betegségek elleni rezisztencia, viselkedés) jelentősen eltér egymástól, azonban kromoszóma számuk megegyezik ($2n=68$) és kariotípusuk is rendkívül hasonló [36]. A két faj hibridjei fertilisek, méghozzá – a Haldane fajhibridekre vonatkozó szabállyal ellentétben – a hímek. Ez rendkívül előnyös a géntérképezéshez szükséges nagy egyedszámú F_2 back-cross populáció létrehozásánál, amit tovább könnyít a mesterséges megtermékenyítés sikeres alkalmazása.

A szarvasfélék esetén hiányzott az előzetes genetikai térkép, de sikeresen alkalmazhatóak voltak az evolúciósan konzervált lókuszok, az ún. I-es típusú markerek a

kapcsoltsági csoportok meghatározásánál [37]. További térképpontok azonosítására felhasználtak szarvasmarha és birka mikroszatelliteket, amelyek a II-es típusú markerek közé tartoznak [38]. Ezek alapján 33 autoszómális kapcsoltsági csoportot alkottak. Az így kapott 2532 cM hosszú szarvas kapcsoltsági térkép rövidebb, mint a szarvasmarha (3532 cM) [39] vagy a birka (3063 cM) [40] géntérképe. Ennek okai lehetnek a szarvas genom térkép hiányai illetve, hogy az interspecifikus hibridekben a rekombinációs ráta alacsonyabb. Mindazonáltal a szarvas interspecifikus géntérkép alkalmas a haszonállatok összehasonlító géntérképezéséhez: bármely humán vagy egér gén gyorsan térképezhető szarvasban, és az összehasonlító géntérképezés révén gazdaságilag fontos génekre lehet következtetni, illetve a módszer a másik irányba is járható: a gímszarvastól más fajok felé.

1.9.2. Az agancsciklus és hormonális szabályozása

A szarvasfélék hímjének jellegzetes másodlagos nemi jelleget tükröző képződménye az agancs, amely a homlokcsont két csapjából, a rózsatöbblől minden évben kifejlődő csontos szerv. A fajok közötti megkülönböztetésben az agancs formája taxonómiai bélyeg, fajon belül az egyedek és törzsek [41] megkülönböztetésére is szolgál. A rénszarvas ill. a karibu kivételével csak a hímek viselnek agancsot. A bikák által viselt ágas-bogas agancs megjelenése tükrözi az állat korát és még inkább kondícióját. Az első évben csak egy-egy szár fejlődik (nyársak), a következő évben azonban már a közbeeső fokozatokat (villások) átugorva, akár hatos agancs is fejlődhet. A legjobb éveiben és ereje teljében lévő bika sokágú, erős agancsot fejleszt. Az kapitális bikák fejdíszre akár huszonnégy, kivételesen még ennél is többágú lehet. A legfelső ágak alkotják az ún. koronát. Az agancs messziről megmutatja viselője erejét, dominanciáját, méretei és az állat kondíciója között szoros összefüggés van. Amikor a szarvasbika túljutott élete delelőjén, agancsa is leszálló ágba kerül; ahogy a vadászok mondják: „a bika visszarak”.

A minden évben újra kifejlődő agancs egyedülálló példája egy teljes szerv tökéletes regenerációjának az emlősök körében [42, 43]. Az agancs évenkénti regenerálódása, az agancsciklus szorosan kapcsolódik a világosság és a sötétség óráinak változásaihoz. A mérsékelt égvői szarvasok késő tavasszal-kora nyáron fejlesztik koronájukat. Ez alól az őz (*Capreolus capreolus*) képez kivételt a téli agancsnövekedésével [44]. A tél végének közeledtével, mikor a nappalok egyre hosszabbak lesznek, a szarvasbikák korosztályonkénti késéssel lehullatják előző évi fejdíszüket. Néhány nappal ezután már

meg is indul az új agancs képződése, amely mintegy 110-120 nap alatt éri el teljes kifejltségét. Eme folyamat rendkívül intenzív, akár napi 20 dkg-os szövetgyarapodás és -differenciáció mellett játszódik le, ami napi 1 cm-es hossznövekedést is eredményezhet. Az agancs a nyár folyamán elcsontosodik, majd az agancsot borító bőr, a barka elhal (7. ábra).

A nappalok hossza a tobozmirigyben termelődő melatonin mennyiségén keresztül képes szabályozni az életfolyamatokat. A melatonin a hipotalamusz-hipofízis-ivarmirigy útvonalon keresztül nemcsak az agancsciklusra, de a szaporodási és egyéb szezonális életfolyamatokra (pl. szőrváltás) is hatással van. A fényt a retina sejtjei érzékelik, innen továbbítódik a jel a tobozmirigybe, ahol kémiai szignállá alakul a melatonin termelésére gyakorolt hatása révén. A melatonin szintje a vérben nappal alacsony, éjszaka

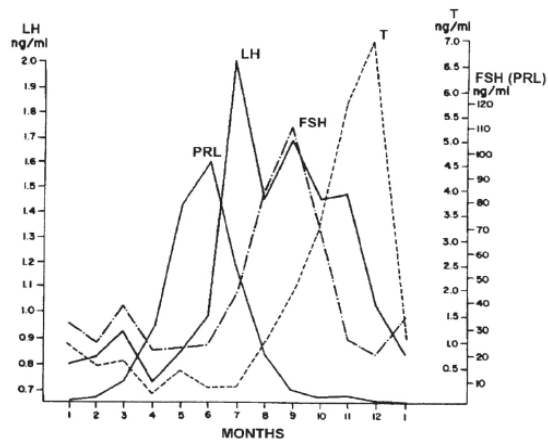


7. ábra: Kifejlett agancsú bikák (www.shakareedeerfarm.com).

megnövekszik [45-47]. Minél hosszabbak az éjszakák, annál több melatonin kerül a vérbe, így a szintje óráként és naptárként is szolgál. A tobozmirigy eltávolítása nem szünteti meg teljesen az életfolyamatokban megfigyelhető szezonalitást, azonban az évszakok során megfigyelhető különböző hormonok szintjeinek változásait összehozza [48]. Ilyen

hormon például a prolaktin (PRL), amely a melatoninnal épp ellenkező mintázatot mutat. Tavasszal a melatonin koncentrációjának csökkenését a PRL emelkedése követi, amely júniusban éri el maximumát. A prolaktin hatása a sárgatest serkentő hormonnal (luteinizáló hormon, LH) keresztül érvényesül, amely a testis Leydig-féle sejtjeinek tesztoszteron (T) szekrécióját stimulálja. A magas prolaktin koncentráció blokkolja az LH receptorokat a Leydig-féle sejteken, ezért a nyár folyamán bekövetkező gyors LH-szint emelkedést a tesztoszteron koncentrációjának növekedése csak pár hónappal követi (8. ábra).

A tesztoszteron az agancsciklus szabályozásának egyik kulcseleme. Az agancs növekedése alacsony tesztoszteron szint mellett indul el tavasszal. Ebben az időszakban a vérben lévő kevés tesztoszteron elsősorban a mellékveséből származik. A nemi hormon



8. ábra: A prolaktin (PRL), luteinizáló hormon (LH), follikulus stimuláló hormon (FSH) és a tesztoszteron (T) koncentrációja fehér farkú szarvas (*Odocoileus virginianus*) vérszérumában az agancsciklus alatt [49].

késő nyáron-kora ősszel megfigyelhető gyors emelkedése a herében meginduló tesztoszteron termelésre vezethető vissza (az LH késleltetett hatása, 8. ábra). Ekkor indul meg a spermiogenezis is, illetve ekkor kezdődik meg az agancs mineralizációja [44]. Tesztoszteron hiányában pl. kasztrálást követően az agancs nem csontosodik el, hanem

daganatszerű szövetszaporulatként, ún. parókás agancsként állandósul. A magas tesztoszteron koncentrációnak esszenciális szerepe van az agancs mineralizációjában, ugyanakkor a tavaszi alacsony tesztoszteron szint serkentőleg hat az agancs növekedésére [50, 51, 52].

A tesztoszteron különböző szervekben, szövetekben – herék, mellékvese, zsírszövet, fejlődő agancs – [49] női nemi hormonná, ösztrogénné alakulhat. Az ösztrogén hasonló szerepet tölthet be az agancsfejlődésben, mint a tesztoszteron, mi több az agancs elcsontosodásában 50-szer hatásosabbnak bizonyult [53]. Ugyanakkor az ösztrogén receptorai nem találhatóak meg az agancs csontszövetében, bár a porc- és csontthártyában, valamint a porcban kimutathatóak [54].

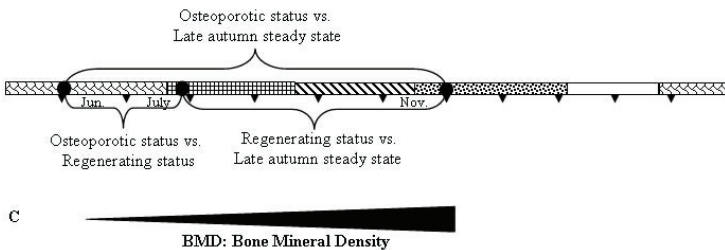
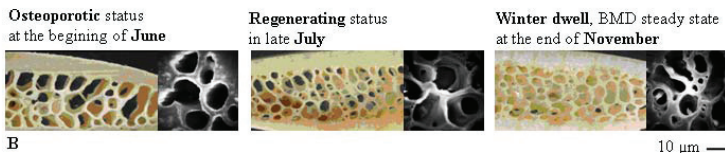
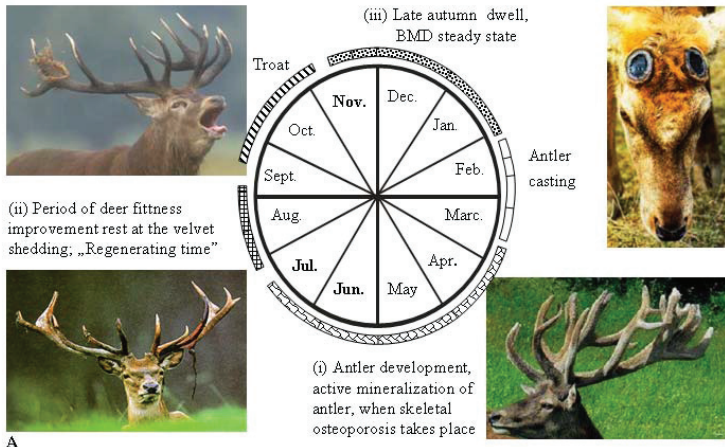
Végső soron elmondható, hogy a szaporodási ciklussal szorosan összefüggő agancsciklusban mind a tesztoszteron, mind az ösztrogén fontos szerepet játszik.

1.9.3. A ciklikus fiziológiás oszteoporózis

A disszertáció témájának ötletadó biológiai alapja a ciklikus fiziológiás oszteoporózis és regeneráció a gímszarvas szervezetében, mely az éves agancsciklushoz kötött.

Magyarországon a gímszarvas bikák februártól korosztályonkénti késéssel májusig lehullatják csontos agancsukat, amelyet szinte azonnal az új korona 100-120 napos építése követ. Ezen agancsfejlődési periódus utolsó 2-3 hete a mineralizáció legintenzívebb időszaka. Mivel igen rövid idő alatt egy átlagosan 7-8 kg, alkalmanként 14-17 kg-os csontszervbe kell hatalmas mennyiségű ásványi anyagot mobilizálni, ez kizárólag táplálkozás útján nem lehetséges. Így ideiglenesen vázelemekből – szegycsontból, bordákból, egyes csigolyákból – transzportálja a kalciumot és foszfátot az agancs mineralizációjához, ezzel csontsűrűség csökkenést, azaz fiziológiás csonttritkulást indukálva az érintett vázcsontokban. Később az ásványi sók a dőhérség kondíciójavító ideje alatt a dús vegetációból táplálkozás útján visszapótlódnak, azaz a csontsűrűség csökkenés regenerálódik a csontvázban. A téli hónapok mind agancspépítés, mind a váz ásványi anyag forgalma szempontjából nyugópontot jelentenek.

A szarvasfélék így a gímszarvas agancsának fejlődése az élővilágban ismert legintenzívebb



9. ábra A. Az éves agancsciklus és az agancsciklushoz kötött ciklikus fiziológias oszteoporózis [55]. B. Bordacsont keresztmetszeti képek (*bal*) és a hozzájuk tartozó scanning elektronmikroszkópos felvételek (*jobb*); C. A csont ásványi anyag sűrűségi (BMD) állapotok összehasonlítása. Tömött fekete karikák: bordacsont mintavételi időpontok. A növekvő csont ásványi anyag sűrűségű (BMD) állapotot nyíllal reprezentáltuk az ábra alsó részén.

csontfejlődés, ugyanakkor szigorúan kontrollált, pontosan szabályozott szignáltranszdukciós lépések sorozata, amely nagyon hasonlít a hosszú csöves csontok endochondrális csontosodásához [56, 57]. Mivel a gyarapodási ráta meghaladhatja a napi 100 g-ot május és július között, hatalmas csonttömeg – alkalmanként akár 14-17 kg – rakódik fel 100-120 napon belül. (A vázcsont súlyát az élősúly 10%-ra becsülik [58], ami megközelítőleg 25 kg mintavételi állataink esetén.) Az ásványi anyag prekursorok iránti igény meghaladja a táplálkozással felvehető mennyiséget, így törvényszerűen a hiány az ásványi anyagok vázcsontból történő mobilizálásával pótlódik. Mindez végeredményben egy ideiglenes csonttritkuláshoz, terminus technikussal élve ciklikus fiziológiás oszteoporozishoz vezet. [42, 59, 60]. Meg a bógési időszak előtt, júliusban és augusztusban a dőhérség idején a folyamat megfordul és a csontsűrűség helyreáll. Az ásványi anyag reszorpció a legmagasabb – eléri a 23%-ot – a bordakosárban, majd az agancsnövekedés befejeztével visszaesik kevesebb, mint 3%-ra [42]. A vázelemek tökéletes szöveti regenerációja az élővilágban oszteoporotikus csontvesztés esetén sohasem történik meg természetes úton ekkora volumenben. Ez a jelenség kuriozitása.

2. CÉLKITŰZÉS

Ezen doktori értekezés egy genomikai megközelítésből indítható genetikai analízis útvonal lehetőségének feltárását tűzte ki célul egy komplex biológiai jelenség, a csontritkulásos állapot vizsgálatán keresztül. A koncepció kibontását a genom programok iniciálta technológiai fejlődés tette lehetővé, amely rámutatott arra, hogy az emlősök genomja ugyanazon génekből áll. Az ortológok szekvenciája nagyon hasonló, tehát a gének konzerváltak.

Mindez lehetővé teszi, hogy olyan élettani folyamatok génexpressziós hátterét hasonlítsuk össze, amely egészséges állatok fiziológiás állapotának velejárója, míg emberben a civilizáció patológiás következménye.

A gímszarvas (*Cervus elaphus*) szervezetén belül a vázrendszer egyes elemeiben bekövetkező ciklikus csontdenzitás változások genetikai hátterét vizsgáljuk. Keressük azokat a géneket, amelyek szerepet játszanak az éves agancsépítés következtében létrejövő fiziológiás oszteoporózis és regeneráció kialakulásában.

Módszertanilag a gímszarvas borda csontritkult, regenerálódó és téli kontroll állapotaiban mintavételezett szövetek expressziós mintázatát vetjük össze microarray analízissel.

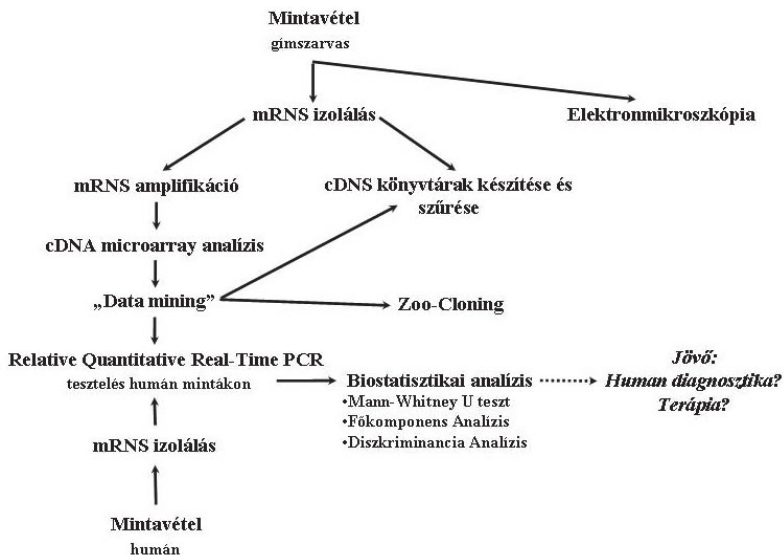
Kíváncsiak vagyunk arra, hogy a fenti jelenség vizsgálata során kiemelt gének emberi ortológjai a humán oszteoporotikus folyamatokban is részt vesznek-e, milyen ezen gének expressziós szintje a csont fiziológus és csontritkult, patológiás állapotában. Végül statisztikai módszerekkel igyekszünk rávilágítani a szelektált gének és a már ismert csontanyagcsere gének genetikai kapcsolatrendszerére.

Doktori értekezés fő céljainak bemutatása pontokban:

- Gímszarvas ciklikus fiziológiás oszteoporózisban és regenerációban szerepet játszó gének feltárása interspecifikus microarray hibridizálás segítségével
 - A kiemelt gének – humán ortológok – expressziós szintjének vizsgálata posztmenopauzás oszteoporotikus és kontroll posztmenopauzás nem oszteoporotikus humán mintákban
 - A csontritkulásban esszenciális szerepet játszó gének kiválasztása egy- és többváltozós statisztikai módszerek segítségével
 - A prediktált gének genetikai kapcsolatrendszerének feltárása többváltozós statisztikai módszerekkel.
-

Az összehasonlító genetikai eszköztár ember és szarvas között olyan géneket és genetikai kapcsolatrendszeret, útvonalakat tárhat fel, melyek részt vesznek a csontitkulás kialakulásában és a regenerációban, de eddig nem kerültek a csontanyagcserét kutatók látómezejébe. Mindezen eredmények hozzájárulhatnak a csontmedicina területén diagnosztikai és terápiás fejlesztésekhez.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK



10. ábra: A gmszarvas ciklikus fiziológiás és az ember patológiás oszteoporózisában szerepet játszó gének azonosítása. Az ábra a kivitelezés módszertani lépéseit szemlélteti.

3.1. Mintavétel

3.1.1. Szarvas bordacsont

A szarvas csontmintákat hivatásos vadászok és állatorvos segítségével 3 darab, egyenként 6, 7 és 8 éves gmszarvas, *Cervus elaphus*, bikákból gyűjtöttük. Hullott agancspárjaik 7-8 kg-ot nyomtak, ami komoly vadászati értéket képvisel. A sebészeti eljárások során az állatokat SBH-Ketamine (2.5 mg/kg élő súly) és Xylazine (0.2 mg/kg élő súly) kombináció *intra musc* injekcióval anaesztetizáltuk. Megközelítőleg 2-3 g lengőborda mintát távolítottunk el az operációk során. (A gmszarvasoknak 2 pár

lengőbordájuk van.) A csontdarabokat alaposan átmostuk steril PBS oldatban, hogy eltávolítsuk a vér és csontvelő maradványokat. 18 percen belül valamennyi mintát folyékony nitrogénben fagyasztottuk majd tároltuk. A fertőzések elkerülése végett az állatokat 10 ml/állat Tardomyocel comp. III. (Bayer AG, Leverkusen) *sub cutan* injekcióval kezeltük minden egyes steril operációt követően. A mintavétel során a Magyar Állatvédelmi Törvénynek (243/1998, XII. 31) megfelelően jártunk el. Engedélyszám: MÁB 20/2004. A kivitelezés Bószénfán, a Pannon Lovasakadémia Szarvaságzatának



11. ábra: Gimszarvas bordacsont mintavétel Bószénfán, a Pannon Lovasakadémia Szarvaságzatának telepén. Az operációkat állatorvos hajtotta végre az elkábított állatokon, míg mi, a labor dolgozói a felállított mobil laborban szeleteltük és fagyasztottuk a lengőborda darabokat folyékony nitrogénben.

telepén történt három alkalommal egy agancsciklushoz kötötten: Június elején, amikor a vázcsontozatban oszteoporozis alakul ki az agancs aktív mineralizációjának következtében; július végén, amikor a kialakult oszteoporozis regenerálódik, azaz a csontsűrűség helyreáll az érintett vázcsont elemekben, illetve november végén, amikor az ásványi anyagok lerakása és mobilizálás dinamikus egyensúlyban van egymással mind a váz- mind az agancsontban (9. ábra).

3.1.2. Humán csontszövet

A géneexpressziós mintázatot 7 posztmenopauzális stádiumú, oszteoporotikus (PP) és 10 posztmenopauzális, nem oszteoporotikus (PNP) független, magyar, kaukázusi nő csontmintájában vettük fel. Az oszteoporotikus betegek átlag életkora 67.71 ± 6.05 év volt, T-score < -2.5 SD; a kontroll csoporté 63.50 ± 7.95 év, T-score > -1.5 SD. A csontsűrűség (BMD) értékeket a combcsont és lumbális csigolyák (L2-L4) kettős energiájú röntgen foton abszorpciometriás (DXA) vizsgálatával állapították meg. Valamennyi minta klinikai és biokémiai jellemzőit a 3. táblázat foglalja össze. További részletek találhatóak Balla és mtsai közleményében [61]. A munkát a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásaitikai Bizottság (TUKÉB) engedélyével (6392-1/2004-1018EKU) illetve valamennyi páciens írásos beleegyezésével végeztük.

3. táblázat: A posztmenopauzális oszteoporotikus és nem oszteoporotikus nők klinikai és biokémiai jellemzői

Klinikai és biokémiai jellemzők	Oszteoporotikus (n = 7)	Nem-oszteoporotikus (n = 10)	p érték
Életkor	67.71 ± 6.50	63.50 ± 7.95	0.27
T-score L1-L4 (SD)	-2.3 ± 0.8	-0.2 ± 1.7	0.01
Z-score L1-L4 (SD)	-0.5 ± 0.6	0.4 ± 1.7	0.23
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0.884 ± 0.150	1.163 ± 0.201	0.01
T-score <i>total femur</i> (SD)	-2.5 ± 1.0	0.2 ± 1.2	0.0002
Z-score <i>total femur</i> (SD)	-0.8 ± 1.3	0.7 ± 1.2	0.02
BMD <i>total femur</i> (g/cm ²)	0.696 ± 0.113	1.022 ± 0.154	0.0002
Testsúly (kg)	64.71 ± 3.20	69.80 ± 5.92	0.06
Magasság (cm)	159.14 ± 8.07	160.50 ± 5.38	0.68
BMI	25.69 ± 2.55	27.22 ± 3.38	0.33
Szisztolés vérnyomás (Hg mm)	134.29 ± 7.87	131.00 ± 9.94	0.48
Diasztolés vérnyomás (Hg mm)	82.86 ± 7.56	81.00 ± 5.68	0.57
Pulzus (/min)	72.00 ± 7.30	68.00 ± 5.96	0.23
Beta-crossLaps (pg/ml)	424.80 ± 168.08	335.00 ± 147.13	0.26
Oszteokalcin (ng/ml)	22.29 ± 7.83	18.18 ± 7.60	0.29
Parathyroid hormon (pg/ml)	33.80 ± 7.15	30.13 ± 16.33	0.59
TSH (μU/l)	1.04 ± 0.45	2.56 ± 2.90	0.19
Vér glükóz (mmol/l)	5.52 ± 0.67	5.20 ± 0.57	0.30

Mean ± SD

3.2. Elektronmikroszkópia

A gímszarvas bordacsont 2 mm vastagságú szeleteit 1 N NaOH oldatban forraltuk a kontaminációk elkerülése miatt, majd kétszer mostuk desztillált vízben. A csontszeleteket felszálló etanol sorban dehidratáltuk (lépésenként 20 % koncentráció eltérés, 20 min inkubáció) majd a tökéletes kiszáritás előtt egy éjszakára izopropanolba merítettük. A metszeteket ca. 20 nm vastagságban arannyal vontuk be. Az elektronmikroszkópos felvételeket (9. ábra) LEO-Zeiss EM 910 elektronmikroszkóppal és Soft Imaging System SIS 3.0 software felhasználásával készítettük.

3.3. RNS izolálás

Mind a humán, mind a szarvas csont mintákat folyékony nitrogén alatt őröltük 6750-es fagyasztva őrölő készülékben (SPEX Certiprep Inc.), majd közvetlenül mRNS-t izoláltunk Dynabeads Oligo(dT)25 paramágneses partikulák (DynaL Biotech ASA) segítségével a gyártó által ajánlott pufferekkel és protokoll felhasználásával. Az RNS-t RNáz-mentes vízben eluáltuk, majd DNaseI (Promega) enzimmel kezeltük 37°C-on 15 percig 80 Unit RNasin RNase inhibitor (Promega) jelenlétében. Az mRNS mintákat végül NucleoSpin RNA Clean-up kit (Macherey–Nagel) segítségével tisztítottuk. Az RNS mennyiségét spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies) mértük. Minőségét egyrészt a minták A_{260}/A_{280} hányadosának mérésével kontrolláltuk, másrészt úgy ellenőriztük, hogy mintánként 10 ng templát felhasználásával amplifikáltuk a gliceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3PDH*) gén 983 bp fragmentjét. (Human *G3PDH* control amplimer set, Clontech Laboratories, 5' amplimer: 5'- TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTTGGT -3', 3' amplimer: 5'- CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC -3') One-Step RT-PCR módszerrel (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen).

3.4. Gímszarvas borda cDNS könyvtárak létrehozása

A cDNS szintézist és könyvtárak készítését a SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) felhasználásával végeztük. A cDNS szintézishez 1 µg mRNS mintát használtunk. A reverz transzkripciót SuperScript II RNaseH-minus reverse transzkriptase (Invitrogen) enzimmel végeztük CDSIII oligo(dT) primer és SMART IV oligo felhasználásával 20 µl térfogatban, a gyártó ajánlásának megfelelően. A duplaszálú cDNS amplifikálásához a 20 µl össztérfogatú elsősál cDNS szintézis reakcióelegyből 1 µl-t használtunk, továbbá 1 µl dNTP mixet (egyenként 10 mM), 10X BD Advantage2 PCR Puffert, 1-1 µl 10 µM CDSIII és 5'PCR primereket, 50X Advantage Polymerase mixet (Clontech) és 5 U KlenTaq LA DNA Polymerase mixet (Sigma) 50 µl végtérfogatban. A PCR reakció ciklusai a következők voltak: 5 min 94 °C-os kezdeti denaturációt, 25 ciklusban 94 °C-on 1 min denaturáció és 68 °C-on 7 min elongáció követett. A cDNS mennyiségét és minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük, 5 µl-t futtattunk 1 %-os gélen.

Tisztítás és kicsapás után 3 µg cDNS-t hasítottunk *Sfi*I (Promega) enzimmel, majd méret frakcionáltuk SizeSep400 (Pharmacia) kromatográfias oszlop segítségével. A keletkező terméket kicsapás után *Sfi*I emésztett, defoszforilált λTriplEx2 fág-karokba ligáltuk. A ligálási reakciókból 1 µl mennyiségeket használtunk az *in vitro* pakoláshoz (GigapackGold, Stratagene). Titrálást követően 1-2 x 10⁶ pfu/ml rekombináns fágot tovább sokszoroztuk *E. coli* XL1-Blue baktérium törzsben, így 10⁹ - 10¹⁰ pfu/ml nagyságrendű fágot kaptunk. A könyvtárakat -80 °C-on 1 x lambda pufferben 10% DMSO hozzáadásával tároljuk. A könyvtár készítése során felhasznált primerek: SMART IV Oligonucleotide 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'; CDS III/3' PCR Primer 5'-ATTCTAGAGCCGAGCGGCCGACATG-d(T)30N-1N-3' (N= A, G, C, vagy T; N-1 = A, G, vagy C); 5' PCR Primer 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; 5' Sequencing primer 5'-TCCGAGATCTGGACGAGC-3'; 3' Sequencing primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; 5' Insertscreening 5'-CTCGGAAGCGGCCATTGTGTTGGT-3'; 3' Insertscreening 5'-ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC-3'.

3.5. mRNS amplifikálás

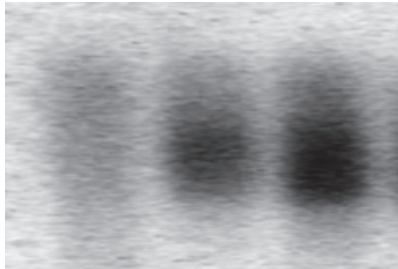
Microarray hibridizálás előtt az mRNS mintákat amplifikáltuk egy körben *in vitro* transzkripciósi eljárással a MessageAmp aRNA Amplification for Array Analysis Kit (Ambion) és protokoll felhasználásával. Az amplifikált RNS A₂₆₀/A₂₈₀ hányadosát spektrofotométerrel ellenőriztük: 1.9-2.1 (Nanodrop Technologies). Gélelektroforézissel vizsgáltuk a kitermelést, az integritást és a méretet.

3.6. Mikroarray próbakészítés, hibridizálás és adatfeldolgozás

A próbakészítés során mintánként 8 µg amplifikált gímszarvas mRNS-t írtunk át a június eleji oszteoporotikus, a késő júliusi regenerálódó és az őszi kontroll mintákból, majd hibridizáltuk Human A 20K és Human B 20K ResGen clone set (VAI, Grand Rapids, MI, USA) standard cDNA microarray lemezekre a Laboratories of Analytical, Cellular and Molecular Microscopy and of Microarray Technology of Van Andel Institute protokolljának (<http://www.vai.org/upload/documents/protocol.pdf>, <http://www.vai.org/Research/Services/LMT.aspx>.) megfelelően. Az interspecifikus hibridizációs procedúrát nem optimalizálták a szarvas-humán homológia szinthez, hanem a szigorú, standard humán-humán hibridizációs kondíciókat alkalmazták. Adataink alapján a szarvas-humán homológia szintje 86-95 % között ingadozik, átlagosan 91.9 % 29 génre számítva (2. melléklet) [57]. Azokat a géneket definiáltuk up- vagy downreguláltak, melyek esetén a három párhuzamos hibridizálás átlagos expressziós különbsége elérte a kettőt (1. melléklet). A fold change értékeket minden esetben az alacsonyabb BMD irányában határoztuk meg (9. ábra): Oszteoporotikus minta versus késő őszi kontroll, oszteoporotikus minta versus regenerálódó minta és regenerálódó minta versus kontroll. A három minta páronkénti összehasonlításának eredményeképpen egy 40000 × 3 adattáblához jutottunk. A microarray adatok elérhetők a GEO adatbázisban <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=tlybjcmmeskwora&acc=GSE8075>.

3.7. Northern hibridizáció

A totál RNS tisztítása során a Chomczynski és Sacchi féle módszert [62, 63] követtük. A folyékony nitrogénben tárolt szövetmintákat (kb. 500 mg-os darabokat) először porrá törtük, ezt követően két térfogat 5 M guanidium-tiocianátban homogenizáltuk, majd savas fenol-kloroformban vontuk ki. A totál RNS-t izopropanollal csaptuk ki, majd 80 %-os etanolban mostuk, szárítás után RNáz-mentes vízben oldottuk. A Northern analízishez 10 µg RNS mintákat futattunk 1,2 %-os formaldehid-agaróz gélen, majd HybondN+ (Amersham) membránra vittük át kapilláris blotolási technikával [64]. A próbákat (kb. 50 ng) [α^{32} P]dATP-vel jelöltük random hexamer és *E. coli* DNA Polymerase I Large Klenow Fragment (Promega) felhasználásával, „random priming” pufferben. A hibridizációkat 65 °C-on végeztük PerfectHyb TM Plus (Sigma) pufferben, majd a membránokat ugyanezen a hőmérsékleten 2xSSC-0,1%SDS, majd 0,2xSSC-0,1%SDS mostuk. A radioaktív jelet Storm Phosphorimager készülék (Molecular Dynamics) segítségével detektáltuk.



12. ábra: Bár amplifikált mRNS-sel végzett Northern analízis nem elfogadott módszertani eljárás, a mintavételi időpontok ellenőrzése és igazolása céljából mégis elvégeztünk egy hibridizációt. A radiogramon *ALOX15* gén próbával hibridizált gúmszarvas bordacsont kontroll, regenerálódó és oszteoporotikus (balról jobbra) amplifikált mRNS poolja látható. A Science egyik 2004-es publikációja [65] szerint az *ALOX15* gént Klein és mtsai a csontsűrűség negatív regulátoraként azonosították.

3.8. Relative Quantitative Real-Time PCR

100 ng humán mRNS cDNS-se írtunk át 55°C-on 200 U Superscript III RNase H-minus reverse transcriptase (Invitrogen), 125 ng random hexamer (Promega) és 40 U

RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) hozzáadásával 30 µl reakcióterfogatban. A ss cDNS-t minden egyes gén esetén 20 µl reakció térfogatban Quantitativ Real-Time PCR módszerrel amplifikáltuk: 1 µl cDNS, 10 µl TaqMan 2x Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG (Applied Biosystems), 1 µl gyári tervezésű, validált génspecifikus TaqMan Gene Expression Assay 20x (Applied Biosystems). Minden egyes szet génspecifikus forward, reverse primerpárt és fluorescencia-jelölt próbát tartalmazott, mely intronmentes targetet ír, így nem detektálta a genomi DNS-t. TaqMan Gene Expression Assay of ABI Prism 7500 Real-Time PCR rendszert (Applied Biosystems) alkalmaztuk a szelektált targetek amplifikálására. Minden egyes reakciót három párhuzamossal futtattunk 96-os optikai reakció plate-ekben a következő protokoll szerint: 10 min denaturáció 95°C, 50 ciklus során 15 sec denaturáció 95°C, 1 min annealing és elongáció 60°C-on. Belső kontrollként két, *G3PDH* és *ACTB*, háztartási gének egy-egy szakaszát többszöröztük, s végül a threshold ciklus szám (C_t) értékek normalizálásához a *G3PDH* gén expressziós szintjét használtuk. Az összegyűjtött C_t adatokat a Relative Quantification Study of 7500 System SDS Software 1.3 (Applied Biosystems) segítségével analizáltuk. A génspecifikus mRNS-ek relatív mennyiségét (RQ) a ΔC_t , azaz a target gén C_t – endogén gén C_t , átlagokból kalkuláltuk és analizáltuk mind a 32 transzkriptumra a mindkét betegcsoportban a fenti software segítségével Balla és mtsai [66] leírása szerint. A génextpressziók arányát (RQ PP/RQ PNP) az oszteoporotikus (PP) és nem oszteoporotikus (PNP) betegek RQ értékeiből számoltuk.

3.9. Klónozási eljárások

A microarray analízis során azonosított és kiválasztott gének szarvas ortológ szekvenciáit azonosíthatjuk a borda cDNS könyvtárak szűrésével, vagy hozzájuthattunk az ún. Zoo-Cloning [56] eljárással.

Szarvas bordacsont eredetű mRNS poolt oligo(dT) primerek felhasználásával reverz transzkriptáltuk ss cDNS-se, ezt követően génspecifikus primerekkel végeztük a ds DNS szintézist. A felhasznált primereket szarvas nukleotid szekvencia adatbázis hiányában a Zoo-Cloning eljárásnak megfelelően házi juh (*Ovis aries*), vagy szarvasmarha (*Bos taurus*) ortológ kontig szekvenciákra terveztük Oligo és Primer3 software segítségével. Az így kapott PCR fragmenteket pBluescriptKS (Stratagen) vagy pGEM-T Easy (Promega)

vektorokba ligáltuk, majd *E. coli* DH5 α baktériumtörzsbe transzformáltuk [67]. A transzformáláshoz használt kompetens sejteket a Mandel és Higa által 1970-ben közölt módszer [68] szerint készítettük és -80 °C-on tároltuk. Transzformálás során a kompetens sejteket 10 percig jégen tartottuk, majd a ligálási reakcióval elegyítve további 40 percig jégen hagytuk. Ezt követően 42 °C-on 2 min hősokkot követően 5 min-en át jégen inkubáltuk a sejteket, visszafogva ezzel a baktérium sejtek saját restrikciós-modifikációs rendszerét. A szelektív táptalajon való szélesztés előtt 1 órán keresztül antibiotikum-mentes LB tápoldatban, 37 °C-on regeneráltuk a sejteket. A klónozás sikerét a felnőtt baktériumtelepekből származó plazmid DNS restrikciós emésztésével illetve a klónozó helyet közrefogó primerekkel PCR reakció során ellenőriztük. Plazmid DNS tisztításához a QIAprep Plazmid Miniprep Kitet használtuk (Qiagen). A pozitív klónok valóságát szekvenálással igazoltuk, amelyet Perkin Elmer ABI prism 377 DNS szekvenáló készüléken végeztek a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont szekvenáló laboratóriumában. A gímszarvas nukleotid szekvencia adatok elérhetők a GenBank adatbázisban: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide>.

4. táblázat: A GenBank adatbázisban elérhető gímszarvas nukleotid szekvencia adatok azonosító számai

Gene name	GeneBank Ac No
<i>ATP2A2</i>	EF619479
<i>BIG1</i>	EF619478
<i>CKB</i>	EF619480
<i>COL1A1</i>	EF619481
<i>CTNNB1</i>	EF619482
<i>EIF3S4</i>	EF619483
<i>ENO1</i>	EF619484
<i>FABP4</i>	EF619485
<i>FKBP2</i>	EF619486
<i>IGSF4</i>	EF619487
<i>NLK</i>	EF619488
<i>OSTF1</i>	EF619489
<i>SFRS7</i>	EF619490
<i>TCF7L2</i>	EF619491
<i>TIMP2</i>	EF619492
<i>TMSB4X</i>	EF619493
<i>TRIB2</i>	DQ239795
<i>WIF1</i>	EF619494

3.10. Egy- és többváltozós statisztikai analízis

3.10.1. Non-parametrikus Mann-Whitney U teszt

A 25 humán ortológ közül egyetlen gén, a *BIG1*, nem adott szignált a Real-Time PCR során, így a továbbiakban 24 gén adataival dolgoztunk.

A non-parametrikus Mann-Whitney U teszt használatával az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus mintákban szignifikánsan eltérő mértékben expresszálódó géneket kerestük. A Mann-Whitney U teszt a nem normál eloszlású adathalmazok mediánjait veti össze egymással. Mind folytonos – mint esetünkben –, mind diszkrét valószínűségi változók esetében alkalmazható. Statisztikusan szignifikánsnak a $p \leq 0.1$ értékeket tekintettük. A tesztet SPSS for Windows, 13.0.1 (SPSS, Chicago, IL, USA) kiadásán futtattuk.

3.10.2. Főkomponens Analízis – Principal Components Analysis (PCA)

Mivel a 17 beteg mindegyikét számos gén expressziós adatai jellemezik, az egyváltozós Mann-Whitney U tesztel lehetetlen teljességgel felfedni mindazokat az információkat, amiket az adatok rejtnek; így többváltozós statisztikai módszerekhez folyamodunk.

A feldolgozás alapja egy gének \times páciensek adat mátrix \mathbf{X} , melyben x_{ij} jelenti az RQ értékeket, azaz a i génexpressziós szintet j páciensben adott génre nézve. Főkomponens Analízis (PCA) egy standard technika arra a célra, hogy feldolgozzunk egy többdimenziós adatstruktúrát néhány fontos és kevésbé jelentős, kevésbé jellemző dimenzióból – ezek az un. komponensek – szemlélve [69]. A grafikus biplot bármely két komponenst szemléllet, az objektumok (ez esetben a betegek) pontokként, míg a változók (ez esetben a gének) vektorokként jelennek meg. Ez az egyidejű reprezentáció lehetővé teszi annak tanulmányozását, hogy a human minták milyen csoportmintázatot vesznek fel. Értékelhetjük emellett, hogy gének közötti korrelációk, illetve az egyes gének relative hogyan járulnak hozzá e konfiguráció létrejöttéhez. Az RQ értékek standardizálására szükség volt a változók közötti túlzott nagyságrendi eltérések kiküszöbölése miatt, így

standardizált PCA-t alkalmaztunk; azaz a változók közötti korrelációs mátrixból indultunk ki az analízis során.

3.10.3. Diszkriminancia Analízis – Canonical Variates Analysis (CVA)

Amíg a PCA a totális varianciát vizsgálja az adatokban, a Diszkriminancia Analízis (CVA) előre definiált objektum csoportok elválását maximalizálja. A kanonikus tengelyek száma eggyel alacsonyabb, mint az elkülönítendő csoportok száma, így a mi esetünkben $2-1=1$, nem lehetséges grafikus megjelenítést generálni. Az oszteoporotikus és egészséges egyedek szeparációja csupán az objektumok score értékei alapján áll elő, megválaszolva a kérdést: a két csoport átfedő vagy elválik az egyetlen kanonikus tengelyen.

Egy praktikus korlátja a CVA-nak, hogy a változók (gének) száma nem haladhatja meg a vizsgálati objektumok (páciensek, esetünkben 17) számát. Ily módon számos CVA-t futtattunk különféle logikai alapon csokorba szedett gének (6. táblázat) felhasználásával. Teszteltük, hogy bizonyos szarvas géncsoportok hogyan befolyásolják az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus egyedek elválását.

Továbbá, hogy teszteljük, hogy bizonyos szarvas gének hogyan befolyásolják az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus egyedek elválását a 10 humán referencia génnel (5. táblázat, 6 táblázat), diszkriminancia analíziseket végeztünk gímszarvas-ember gén kombinációkkal is. Mivel esetünkben 15 volt a gének maximális száma, a 10 referencia gén mellé hozzárendeltük az összes lehetséges 5 génes kombinációját a 9 gént magába foglaló 5. számú génszetnek (6. táblázat), majd lefuttattuk a CVA-t az összes, szám szerint $126+10$ -es kombinációra.

Az analíziseket a SYNTAX 2000 [70] programcsomaggal hajtottuk végre.

4. EREDMÉNYEK

Az, hogy a gímszarvas agancs növekedése csakis a vázcsontozat oszteoporozisa árán valósulhat meg, idehaza 1978-ban fogalmazódott meg. Az év áprilisa és augusztusa között a gemenci erdő szonvovai területén Orosz László professzor egy szarvasbikákból álló rudliban figyelte az agancsok fejlődését. Az elfogyasztható növényi táplálék ásványi anyag tartalma alapján úgy becsülte, hogy egy 7-8 kg-os agancs esetében a bevitt kalcium mennyiség mintegy a felét biztosítja a szükségleteknek. Évekkel később ezen felvetés alapján indult el ez a kutatási téma a csoportban. A kutatómunka során nehezen fellelhető, szórványos irodalmakból és személyes közlések alapján kiderült, hogy a munkát kezdeményező felvetést tőlünk függetlenül mások is megtették. Egy 1968-ból származó publikáció [59, 60] metszetekkel támasztotta alá a jelenség – időközben a ciklikus fiziológiás oszteoporozis terminus technikussal illették – létezését. Mintavételezéskor a reális kivitelezhetőségre és az operációk megfelelő időzítésére kellett odafigyelnünk, amely hosszú előkészítést és szervezést igényelt. A fotók a lengőborda minták sósavval kezelt és zsírtalanított vékony lapjairól és a megfelelő scanning elektronmikroszkópos felvételek (9. ábra) azért készültek, hogy igazoljuk a mintavételezési időpontok helyességét. A jó időzítést a Bőszénfán dolgozó vadgazdasági szakemberek és hivatásos vadászok tapasztalatának és lelkiismeretes együttműködésének köszönhetjük.

Az elhatározásunk az volt, hogy a gímszarvas vázcsontozatában az oszteoporozis és regeneráció agancsciklushoz kötött kialakulásában szerepet játszó géneket illetve szignáltranszdukciós útvonalakat azonosítsunk, melyek részt vehetnek az emberi csonttritkulás kialakulásában is. Átfogó válaszadáshoz kézenfekvő módszerként adódott, hogy microarray hibridizálással találjuk meg a gímszarvas mintákban szignifikánsan eltérő mértékben expresszáldó géneket. Azonban – s nem csoda – a mai napig nem létezik gímszarvas microarray, s amikor a munkához hozzáláttunk, a *Bos taurus* chipek sem voltak teljesek illetve széles körben elérhetők. Előző vizsgálati eredményeink [56, 57] az emlős fajok és gímszarvas génjei között magas, 90-95% mRNS szekvencia homológia szintre (5. táblázat) utaltak. Így megbízható és megvalósítható alternatívának kínálkozott, hogy interspecifikus microarray hibridizálással derítsünk fényt a génextpressziós különbségekre.

4.1. A gímszarvas lengőborda minták expressziós mintázatának összehasonlítása, az interspecifikus microarray hibridizálás eredményei

Első lépésként a gödöllői laboratóriumban beállított módszerrel a csontszövetből direkte mRNS-t izoláltunk, amelyet két irányban dolgoztunk fel. Egyrészt, ennek közvetlen felhasználásával, elkészült a három expressziós könyvtár lambda fág vektorban; másrészt az mRNS-re a cDNS microarray próbakészítéshez volt szükség. Figyelembe véve, hogy 2-3 cm-es borda darabkák vékony kompakt héjból és szivacsos állományból felépülő csontszövetéből nem juthattunk annyi mRNS-hez, amely az egész kísérlet sor megvalósításához elegendő lett volna, az mRNS mintákat sokszorozni kellett. PCR technikát mellőző, *in vitro* transzkripción alapuló lineáris amplifikációval tudtuk biztosítani, hogy az mRNS poolokban az egyedi mRNS-ek aránya ne változzon. Így tehát az amplifikált borda mRNS mintáinkkal párban 40 000, humán géneket reprezentáló cDNS chipre hibridizáltunk humán próbára standardizált, azaz szigorú hibridizációs körülmények között. Három összehasonlításra volt lehetőség, összevetve az

- (1) oszteoporotikus és őszi nyugalmi kontroll, az
- (2) oszteoporotikus és regenerálódó illetve a
- (3) regenerálódó és kontroll állapotú gímszarvas lengőbordák expressziós mintázatát. Az oszteoporotikus borda mintákat a gímszarvas agancs exponenciális növekedési fázisában, míg a regenerálódó borda csontot az agancshántás, a barka ledörzsölésének idején emeltük ki; azaz a legfontosabb és legjobban definiálható időpontokban.

Csupán az élettelen kísérleti szempontokat tekintve persze előnyösebb lett volna az agancsciklus több pontján mintavételeznünk, azonban az állatok elhullásának kockázatát ez erőteljesen emelte volna. Ennek okán, illetve a szigorú hibridizációs kondíciók alkalmazása miatt valószínűleg elvesztettük a folyamat fázisaiban differenciáltan aktív működésű gének egy részét, azonban az utóbb említett körülmény a microarray hibridizálás során kapott nyers adatok megbízhatóságát is növelhette.

Mindösszesen 167 kétszeres vagy annál nagyobb génexpressziós eltérést detektáltunk, mely 138 eltérő gént jelent, s melyek közül 29 egynél több összehasonlításban is felbukkant. Az expressziós különbségek a következők szerint oszlottak meg:

- (1) oszteoporotikus *versus* őszi nyugalmi kontroll összehasonlításban 57 gén uperegulált és 2 downregulált;

(2) oszteoporotikus *versus* regenerálódó összehasonlításban 22 upregulált és 27 downregulált; míg

(3) regenerálódó *versus* kontroll állapotú szövetminták viszonylatában 3 up- és 56 downregulált gént mutattunk ki (1. melléklet).

A 138 eltérő gén között szembeötlő volt a Wingless szignáltranszdukciós útvonalhoz tartozó 5 gén, illetve 7 mátrix proteinekét kódoló gén jelenléte (1. melléklet).

Itt jegyezzük meg, hogy csupán azok a gének, amelyek a (3) összehasonlításban jelennek meg, hozhatók összefüggésbe a csontépítéssel és a remodelinggel, míg a másik két összehasonlítás génei összefüggésben lehetnek akár csontvesztéssel akár csontregenerációval. A hipotézis, hogy a csontregeneráció korai jelei észlelhetők a csigolyákban és bordákban a barka hántásának idején, a mintavételezésnél történt anatómiai megfigyeléseink is alátámasztják, miszerint a csigolyatestek erősen kocsonyás-kollagéndús képet mutattak.

Kísérleteink hosszú távú célja az, hogy olyan eddig nem jegyzett gének kerüljenek a látókörünkbe, melyek a humán csontritkulás kialakulásában, esetleg gyógyításában tölthetnek be szerepet. Ehhez a szarvas ciklikus oszteoporózisának megfigyelése szellemes megközelítésnek ígérkezett, s ebben a kontextusban a heterológ microarray hibridizálás eredményeit egy nyers kiindulási génhalmaznak tekintettük további szelekcióhoz.

A microarray hibridizálás eredményeinek Northern alapú validálásához nem állt rendelkezésünkre elegendő amplifikálatlan gímszarvas borda mRNS s az amplifikált RNS használata Northern hibridizáció vagy egyéb, microarray kísérletet validáló procedúra során nem elfogadott. Nem tekintettük szükségszerűnek a Real-Time PCR alapú igazolást sem. Hiszen a vizsgálatok nem a gímszarvas ciklikus fiziológiás csontritkulásának a beható megismerését tűzték ki fő célul, hanem a jelenség vizsgálata során felbukkant gének merítésül, irányadóul szolgálhattak a humán csontanyagcserét, csontritkulást befolyásoló, eddig azonosítatlan genetikai faktorok kutatása során. Mindazonáltal számos gímszarvas ortológ génnek egy-egy szakaszát Zoo-Cloning eljárással klónoztuk s szekvenáltattuk is a klónokat (4. táblázat, 2. melléklet).

4.2. Humán involúciós oszteoporotikus és nem oszteoporotikus, kontroll minták géneexpressziós szintű vizsgálata Real-Time PCR módszerrel

Így gondolkodva tehát a 138 génből néhány szubjektív szelekciós szempont figyelembevételével kiválogattunk 25 gént, melyek humán ortológjainak expressziós mintázatát involúciós, időskori emberi oszteoporozis (továbbiakban oszteoporozis) kapcsán vizsgálni kívántuk (5. táblázat, 2. melléklet):

- Belevettük a válogatásba az 5 Wnt gént (*CTNNB1*, *LRP4*, *NLK*, *TCF7L2*, *WIF1*) és 6 mátrix gént (*COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A2*, *FNI*, *MGP*, *TIMP2*), mivel ezek a gének szembeszökőn reprezentálva voltak a microarray eredményei között.
- Azonos családba tartozó 2 gént, a *FABP3* és *FABP4* géneket szintén kiválasztottuk, mivel kapcsolatban állnak az adipocita és oszteoblaszt differenciációval;
- az *OSTF1*-et a remodelingben betöltött potenciális szerepe [71] miatt szelektáltuk ki;
- a *TRIB2* agancs-specifikus gént [56] és
- számos egyéb gént (*ATP2A2*, *BIG1*, *CKB*, *EIF3S4*, *ENO1*, *FKBP2*, *IGSF4*, *SFRS7*, *SOX4*, *TMSB4X*), melyeket eddig nem azonosítottak, mint oszteoporozisban szerepet játszó faktorokat.

E 25 gén igen sokszínű képet mutat a celluláris lokalizáció (extracelluláris tér, membránspanning, citoplazmatikus, nukleáris), a signaling (Wingless, MAPK, protein tyrozin kináz pathway) és funkcióik (extracelluláris mátrix struktúr fehérje; nukleinsav-, protein- és lipidkötő; enzim; transzkripció faktor; vagy sejt adhézióban, migrációban, proliferációban, differenciációban, RNS splicingban, protein foldingban vagy lipid transzportban játszanak szerepet) tekintetében is.

Mint a szakirodalomban ismert humán oszteoporozis-referencia géneket, a következő 10 gént: *ALPL*, *BGLAP*, *BGN*, *COL1A1*, *ESR1*, *FNI*, *MGP*, *SPARC*, *SPP1* és *VDR* szintén bevontuk a vizsgálatokba (5. táblázat). Közülük 5 génnek (*ALPL*, *BGLAP*, *COL1A1*, *ESR1* és *VDR*) kiemelt szerepe van a csontritkulás klinikai diagnosztizálása során is. Mind a humán referencia gének, mind a szarvas ortológok (*COL1A1*, *FNI* és *MGP* közekek a két géncsoportban) expressziós intenzitását Relative Quantitative Real-Time PCR analízissel hasonlítottuk össze női posztmenopauzás oszteoporotikus és nem oszteoporotikus mintákon, majd a PCR eredményeket statisztikai módszerekkel értékeltük. A 25 humán ortológ közül egyetlen gén, a *BIG1*, nem adott szignált a Real-Time PCR során, így a továbbiakban 24 gén adataival dolgoztunk.

5. táblázat: Az interspecifikus microarray expressziós különbség és a Quantitative Real-Time PCR adatai 32 génre.

Gén neve	Fold change	Biológiai hatás	PP/PNP	M-W teszt
Szarvas ének				
Oszteoporotikus állapot vs. Regeneráló állapot				
<i>COL1A1</i>	4,76	csont szerves mátrix 90%-a	0,39	0,06
<i>EIF3S4</i>	4,21		0,72	0,27
<i>TIMP2</i>	3,72	MMP-k inhibitora	0,65	0,07
<i>SFRS7</i>	3,68		0,9	0,96
<i>COL5A2</i>	3,27	az I. típusú kollagén fibrillumok növekedését regulálja	0,7	0,54
<i>ENOL</i>	2,31	tumor szupresszor aktivitás, növekedési inhibitor hatás	0,98	0,96
<i>LRP4</i>	2,27	endocitózis, a Wnt signaling pathway potenciális negatív regulátora	0,78	0,96
<i>COL3A1</i>	2,23	csontszövetben nyomokban van jelen	0,39	0,47
<i>FKBP2</i>	2,14	protein folding és vezikuláris transzport	0,58	0,16
Oszteoporotikus állapot vs. Őszi nyugalmi kontroll állapot				
<i>COL5A2</i>	4,11	az I. típusú kollagén fibrillumok növekedését regulálja	0,7	0,54
<i>WIF1</i>	3,99	Wnt fehérjék aktivitását gátolja	0,86	0,96
<i>CKB</i>	3,9	részt vesz az energia homeosztázisban	0,61	0,81
<i>CTNNB1</i>	3,39	kanonikus Wnt signaling downstream effektor	1,04	0,38
<i>IGSF4</i>	3,38	sejt-sejt interakciók regulátora, pro-apoptotikus és onkoszupresszív aktivitás	0,39	0,03
<i>FABP4</i>	3,37	zsírsav kötő	2,59	0,06
<i>COL1A1</i>	3,36	csont szerves mátrix 90%-a	0,39	0,06
<i>FNI</i>	2,5	sejtadhéziós és migrációs folyamatokban vesz részt, kötés, kölcsönhatás fibrinnel, integrinnel, kollagénnel	1,01	0,36
<i>OSTF1</i>	2,32	oszteoklaszt-stimulátor	1,1	0,42
<i>TMSB4X</i>	2,21	részt vesz sejt proliferációban, migrációban és differenciálódásban; elősegíti a β -catenin útvonal aktiválását	0,18	0,19
<i>BIG1</i>	2,12			
<i>FKBP2</i>	2,1	protein folding és vezikuláris transzport	0,58	0,16
Regeneráló állapot vs. Őszi nyugalmi kontroll állapot				
<i>FABP3</i>	0,56	kandidáns tumor szupresszor gén, sejt proliferáció negatív regulátora	0,46	0,07
<i>MGP</i>	0,55	mineralizáció negatív regulátora	0,87	0,54
<i>TRIB2</i>	0,46	MAPK aktivitás regulátora, protein kináz (inhibitor) aktivitás	0,51	0,07
<i>NLK</i>	0,45	MAPK és Wnt signaling pathway kapcsolja össze	1,1	0,96
<i>TMSB4X</i>	0,39	<i>Isd. fentebb</i>	0,18	0,19
<i>CTNNB1</i>	0,39	<i>Isd. fentebb</i>	1,04	0,38
<i>ATP2A2</i>	0,38	endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz	1,71	0,81
<i>BIG1</i>	0,29			
<i>TCF7L2</i>	0,24	Wnt signaling pathway regulátora	0,8	1
<i>SOX4</i>	0,18	PTH és PTHrP downstream hatásait mediálja csontszövetben	3,29	0,89
<i>SFRS7</i>	0,16		0,9	0,96
Humán referencia és diagnosztikus (vastag) ének				
<i>ALPL</i>		ásványi sók depozícióját gátolja	0,41	0,02
<i>BGLAP</i>		regulálja az oszteoklasztok aktivitását	1,05	0,96
<i>BGN</i>		potenciálisan a csúcscsonttömeg genetikai meghatározásában fontos	0,52	0,09
<i>COL1A1</i>	4,76	<i>Isd. fentebb</i>	0,39	0,06
<i>ESR1</i>		támogatja az oszteoklaszt aktivitás szuppresszióját	0,58	0,54
<i>FNI</i>		<i>Isd. fentebb</i>	1,01	0,36
<i>MGP</i>		<i>Isd. fentebb</i>	0,86	0,54
SPARC		regulálja a kollagén fibrillogenezist, csontépítés pozitív regulátora, gátolja a mineralizációt és a remodelinget	0,56	0,19
<i>SPP1</i>			0,58	0,23
<i>VDR</i>		kalcium ionok abszorpciója bélben	1,18	0,67

Fold change: a microarray hibridizáció során detektált átlagos génexpressziós eltérés, PP/PNP: involúciós oszteoporotikus és nem oszteoporotikus paciensek relatív quantifikációs értékeinek aránya, Mann-Whitney teszt: a Mann-Whitney teszt p értéke (szignifikancia szint $p \leq 0.1$).

4.3. A humán oszteoporotikus és kontroll mintákban szignifikánsan eltérő mértékben expresszálandó gének meghatározása (egyváltozós) non-parametrikus Mann-Whitney U teszttel

A non-parametrikus Mann-Whitney U teszt használatával az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus mintákban szignifikánsan eltérő mértékben expresszálandó géneket kerestük. Statisztikusan szignifikánsnak a $p \leq 0.1$ értékeket tekintettük. A Mann-Whitney U teszt 6 humán ortológ gént detektált: *COL1A1*, *IGSF4*, *FABP3*, *FABP4*, *TIMP2* és *TRIB2*. A humán referencia gének közt az *ALPL*, *BGN* és a *COL1A1* mutatott szignifikáns eltérést a két vizsgálati csoportban (5. táblázat). Érdemes megemlíteni, hogy a *COL1A1*, *IGSF4* és *TIMP2* gének expressziója éppen ellentétesen változott a szarvas fiziológiás és humán öregedéssel járó oszteoporozisban.

4.4. A gének kapcsolatainak feltárása humán, involúciós csontritkulás folyamatában többváltozós statisztikai módszerekkel

Mivel a 17 beteg mindegyikét számos gén expressziós adatai jellemzik, az egyváltozós Mann-Whitney U teszttel lehetetlen teljességgel felfedni mindazokat az információkat, amik az adatokban rejlenek; így többváltozós statisztikai módszerekhez is folyamodtunk.

Az további analízisek előtt azonban definiáltunk néhány géncsoportot (6. táblázat, 9 táblázat), mivel a többváltozós statisztikai elemzések egyike (diszkriminancia analízis) nem képes kezelni egyszerre nagyobb mennyiségű változót.

Egyrészt létrehoztunk olyan géncsoportokat, amelyek bizonyos logikai úton szerveződtek, pl. funkcionális alapon. Ezekben a csoportokban figyelembe vett gének listáját a 6. táblázat tartalmazza.

- 1. szortiment: 5 humán gén, melyek a csontritkulás jelenlegi klinikai gyakorlatában ismertek

-
- 2. szortiment: 10 humán oszteoporozis referencia gén, mely tartalmazza a diagnosztikában használatos 5 gént valamint 5 másik, az oszteoporozis szakirodalmában gyakran hivatkozott géneket
 - 3. szortiment: Mann-Whitney U teszt alapján a két betegcsoportban szignifikánsan eltérő mértékben expresszálódó 4 gén
 - 4. szortiment: a Wnt szignáltranszdukciós útvonalba tartozó 5 gén
 - 10. szortiment: 24 gímszarvas ortológ, azaz a BIG1 kivételével, amely nem adott jelet a Real-Time PCR során, valamennyi szelektált gén
 - 9. szortiment: 18 gímszarvas ortológ, azaz a 24 gímszarvas ortológ (a 10. szortiment) mínusz a 6 mátrix gén
 - 5. szortiment: 9 gímszarvas ortológ, azaz a 24 gímszarvas ortológ (a 10. szortiment) mínusz 15 gén (a 6 mátrix gén plusz 5 Wnt plusz 4 Mann-Whitney U teszt gén)
 - A többi logikai alapon szerveződő szortiment a fent definiált csoportok további kombinációi.

Másrészt véletlenszerűen, kombinatorikai alapon is generáltunk génszeteket nem véletlenül kiválasztott két szortiment bevonásával a következő módon: a kombinatorikus géncsoportok állandó résztvevője volt a már ismertett 10 humán oszteoporozis referencia gén, azaz a 2. szortiment tagjai, melyhez minden egyes alkalommal az 5. szortiment 9 darab génjéből választottunk ki 5-öt. A 9 gén ismétlés nélküli, 5. osztályú variációja összesen 126 szortimentet generál. Ezek közül csupán 6 (*9. táblázat*), az oszteoporotikus és kontroll betegcsoport egyedülállóan erős elválását (*15. ábra, 8. táblázat*) biztosító szortimentet emelek ki és mutatok be, amelyek messze jobb elválást adtak, mint a 15. szortiment, amely a 10 humán referencia génen túl a Wingless géneket foglalja magába.

4.4.1. A génaktivitások közötti korrelációk vizsgálata standardizált főkomponens analízis (Principal Components Analysis, PCA) segítségével

Hogy közelebb jussunk a gének aktivitásai és azok csontszövetbeni fenotípusos manifesztációja közötti kapcsolatot megértéséhez, standardizált főkomponens analízist (Principal Components Analysis, azaz PCA) alkalmaztunk valamennyi általunk definiált

6. táblázat: A többváltozós statisztikai analízisek (főkomponens és diszkriminancia analízis) során elemzett, logikai alapon szerveződő gén szortimentek.

Gén szortimentek	Gén szortimentek																
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
Gémszarvas gének																	
<i>ATP2A2</i>					•	•	•		•	•							•
<i>BIG1</i>																	
<i>CKB</i>					•	•	•		•	•							•
<i>COL1A1</i>										•							
<i>COL3A1</i>										•							
<i>COL5A2</i>										•							
<i>CTNNA1</i>				•			•	•	•	•		•	•		•	•	
<i>EIF3S4</i>					•	•	•	•	•	•							•
<i>ENO1</i>					•	•	•	•	•	•							•
<i>FABP3</i>			•			•		•	•	•		•	•		•	•	
<i>FABP4</i>			•			•		•	•	•		•	•		•	•	
<i>FKBP2</i>					•	•	•	•	•	•							•
<i>FNI</i>										•							
<i>IGSF4</i>			•			•		•	•	•		•	•		•	•	
<i>LRP4</i>				•			•	•	•	•		•	•		•	•	
<i>MGP</i>										•							
<i>NLK</i>				•			•	•	•	•		•	•				
<i>OSTF1</i>					•	•	•	•	•	•							•
<i>SFRS7</i>					•	•	•	•	•	•							•
<i>SOX4</i>					•	•	•	•	•	•							•
<i>TCF7L2</i>				•			•	•	•	•		•	•		•	•	
<i>TIMP2</i>										•							
<i>TMSB4X</i>					•	•	•	•	•	•							•
<i>TRIB2</i>			•			•		•	•	•		•	•		•	•	
<i>WIF1</i>				•			•	•	•	•		•	•		•	•	
Humán gének																	
<i>ALPL</i>	•	•									•	•	•	•	•	•	•
<i>BGLAP</i>	•	•									•	•	•	•	•	•	•
<i>BGN</i>	•	•											•	•	•	•	•
<i>COL1A1</i>	•	•									•	•	•	•	•	•	•
<i>ESR1</i>	•	•									•	•	•	•	•	•	•
<i>FNI</i>	•	•											•	•	•	•	•
<i>MGP</i>	•	•											•	•	•	•	•
<i>SPARC</i>	•	•											•	•	•	•	•
<i>SPPI</i>	•	•											•	•	•	•	•
<i>VDR</i>	•	•									•	•	•	•	•	•	•
Többváltozós statisztikai analízis																	
PCA	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
CVA	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

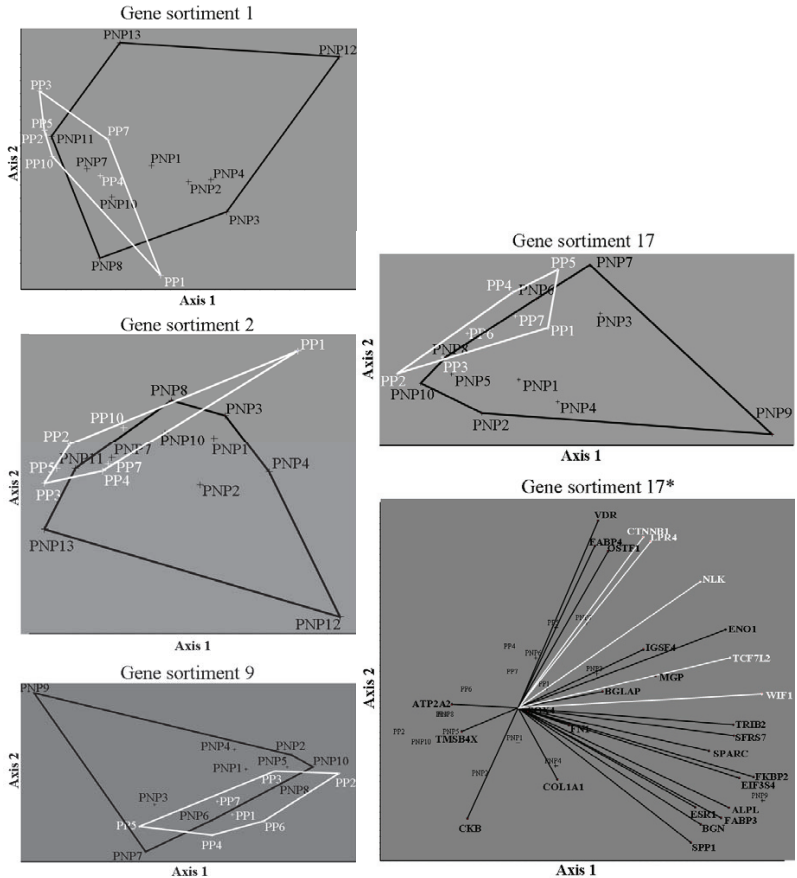
A tömött fekete pöttyök az adott szortimentbe tartozó géneket jelzik. Megjegyzés: azok a közös gének (*COL1A1*, *FNI*, *MGP*), amelyek mind a humán, mind a szarvas ortológok között szerepelnek, a szortiment szelekciós szempontjainak megfelelően csak az egyik sorban vannak jelölve.

gén szortimentum (6. táblázat) esetén. Az involúciós oszteoporózisban szenvedő nők csoportja meglehetősen homogénnek mutatkozott, szinte valamennyi általunk vizsgált gén esetében csökkent expressziós aktivitás jellemzi.

A 13. ábrán két olyan PCA ordináció látható, amelyek csakis humán oszteoporózis referencia géneket tartalmazó géncsoportokat elemznek (1 és 2 szortiment). E két eredményt vethetjük össze egy csak szarvas géneken (9 szortiment) illetve egy másik, a 10 humán referencia gén és 9 szarvas ortológ kombinációján (13. ábra) alapuló főkomponens analízissel. Valamennyi PCA eredménye megtekinthető a 3. mellékletben.

Figyelembe véve a konvex poligonok átfedő területeinek méretét illetve a páciensek pozícióit – annak ellenére, hogy a főkomponens analízis nem az objektumok elválását hivatott reprezentálni – az oszteoporotikus és kontroll vizsgálati anyagok diszkréten csoportosulnak az 13. ábrán feltüntetett valamennyi – ugyanúgy a csupán szarvas ortológokon, mint ahogyan humán és szarvas gének kombinációin vagy tisztán humán géneken alapuló – géncsoport esetén. Az 1 szortiment esetében, mely 5 humán diagnosztikában használatos gént tartalmaz, jóval gyengébb a csoportok elválása.

A 17 szortiment esetén a biplotot is mutatjuk, mely a gének közötti korrelációs mátrixból kiindulva a betegek és a gének egyidejű ordinációját ábrázolja. A kanonikus Wingless signaling *CTNNB* és a putatív Wingless negatív regulátor *LRP4* géneket reprezentáló vektorok által bezárt kicsiny szög a két génaktivitás közötti figyelemreméltóan erős korrelációt mutatja (13. ábra 17*). Az eredmények születésének idején még csupán feltételezhettük, hogy az *LRP4* a Wingless útvonal génjeinek sorát gazdagítja. Ma már Ohazama és mtsai munkája [72] alapján ezt tényként állíthatjuk.



13. ábra: Standardizált főkomponens analízis, PCA, a 7 oszteoporotikus és 10 nem oszteoporotikus paciens csontmintáinak génexpressziós mintázata alapján. A konvex poligonok a két betegcsoportot szimbolizálják az első és második ordinációs tengelyen az 1, 2, 9 és 17 szortiment esetén. A PCA biplot (17*) a 17 szortiment esetén mutatja a komponensek közötti korrelációkat. A gén szortimentek (1-17) listáját a 6. táblázat foglalja magába. Az involúciós oszteoporozisban szenvedő betegeket (PP) fehér színű, míg a posztmenopauzás, nem oszteoporotikus kontroll csoport tagjait (PNP) fekete konvex poligon jelöli. Látható, hogy a két csoport leginkább a 17 szortiment esetében különül el egymástól, leggyengébben az 1, míg közel azonos mértékben a 9 és 2 géncsoport esetében. A biplot ábrája szemlélteti a kanonikus Wnt útvonal *CTNNB1* és *LRP4* géneinek expressziója közötti erős korrelációt. (További PCA eredményeket a 3. melléklet tartalmaz.)

4.4.2. A génszetek diszkriminatív erejének vizsgálata diszkriminancia analízis (Canonical Variates Analysis, CVA) segítségével

A génextpressziós eltérések adatait diszkriminancia analízissel (Canonical Variates Analysis, azaz CVA) is elemeztük. Egy praktikus korlátja a CVA-nak, hogy a változók (gének) száma nem haladhatja meg a vizsgálati objektumok (páciensek, esetünkben 17) számát. Ily módon különféle logikai alapon csoportba szedett gének felhasználásával teszteljük, hogy a gímszarvas bikák ciklikus fiziológiás oszteoporózis génjeinek humán csontszövetben mért aktivitása képes-e egyértelműen elkülöníteni egymástól az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus személyek halmazát. Ha a számos jelöltből kiválogatjuk az elválást leginkább támogató géneket, akkor a legerősebb diszkriminatív erővel bíró génszet(ek) kombinatorikus esszék során át megtalálhatók. Ezek a szetek a későbbiekben diagnosztikai kitek alapjaként szolgálhatnak.

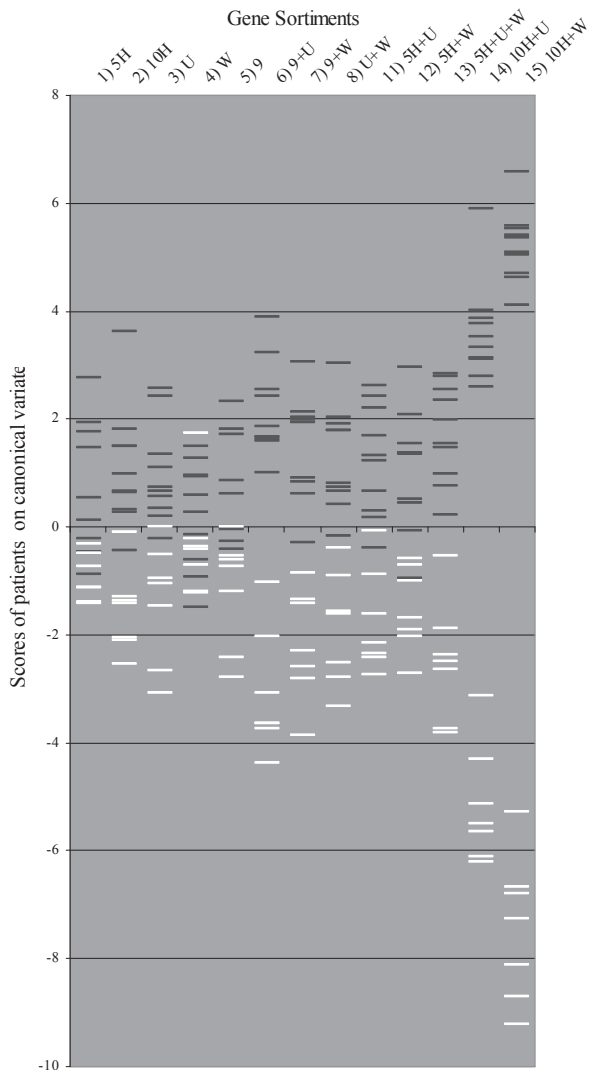
A humán, szarvas és kombinált gén szortimenteken (6. táblázat) futtatott CVA-k eredményei egyértelműen megmutatják számunkra, hogy a szarvas gének értékes diagnosztikai erővel bírhatnak. (14. és 15. ábra, 7. és 8. táblázat). Megfigyelhető, hogyha önmagában a szarvas gének humán ortológjain alapszik a CVA, akkor élesebben válnak el a betegek a kontroll csoporttól, mint a humán diagnosztikus illetve referencia gének esetében (14. ábra: 6, 7, 8 szortiment versus 1, 2).

Ha a szortimentekbe – akár a humán akár a szarvas géneket tartalmazóba – belefoglalom a Wingless géneket is, szignifikánsan javul az elválás (14. ábra: 7, 8, 12, 13, 15 szortiment versus 1, 2, 3, 5). Mindamelllett önállóan használva őket nem választják el élesen a porotikus és nonporotikus humán egyedeket (14. ábra: 4 szortiment). Különösen éles elválást tapasztalhatunk a Wingless gének 10 humán referencia génnel alkotott kombinációja esetén (14. ábra: 15 szortiment).

Azok a géncsoportok, amelyek a Mann-Whitney tesztben szignifikáns 4 gént foglalják magukba, szintén kétséget kizáróan választják el a két embercsoportot (14. ábra: 6, 13 szortiment) mi több tökéletesen elkülönítik azokat (14. ábra: 14 szortiment). A páciensek CVA score értékeit az 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. táblázat: A humán és szarvas orológó génekből logikai alapon képzett gén szortimenteken alapuló diszkriminancia analízisek (CVA) találati értékei: nem oszteoporotikus (fekete háttér) és korrall járó oszteoporozisban szenvedő (fehér háttér) betegek. E táblázat score értékei alapján készült a 14. ábra.

1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	11)	12)	13)	14)	15)
2.768 (3)	3.621 (2)	2.559 (6)	1.741 (1)	0.733 (1)	3.897 (7)	3.049 (7)	3.041 (6)	2.615 (6)	2.970 (4)	2.847 (6)	5.906 (4)	6.591 (4)
1.926 (2)	1.808 (3)	2.419 (9)	1.487 (1)	0.557 (4)	3.241 (9)	2.135 (3)	2.031 (1)	2.429 (9)	2.091 (7)	2.800 (1)	4.011 (7)	5.588 (5)
1.773 (9)	1.503 (4)	1.339 (4)	1.282 (6)	0.369 (2)	2.536 (2)	2.022 (8)	1.912 (9)	2.205 (4)	1.551 (1)	2.536 (4)	3.860 (6)	5.542 (6)
1.464 (4)	1.489 (9)	1.110 (3)	0.961 (7)	2.325 (9)	2.436 (8)	2.002 (4)	1.800 (4)	1.689 (2)	1.376 (9)	2.358 (9)	3.770 (2)	5.413 (10)
0.543 (1)	0.986 (7)	0.740 (7)	0.943 (4)	1.802 (3)	1.871 (5)	1.983 (1)	1.795 (3)	1.317 (1)	1.375 (2)	1.974 (2)	3.533 (10)	5.357 (2)
0.131 (7)	0.655 (10)	0.661 (5)	0.598 (8)	1.715 (8)	1.666 (6)	1.929 (9)	0.820 (7)	1.215 (3)	1.339 (3)	1.548 (7)	3.326 (3)	5.082 (9)
-0.223 (8)	0.646 (5)	0.562 (2)	0.277 (9)	0.864 (5)	1.665 (3)	0.898 (5)	0.736 (8)	0.662 (7)	0.508 (10)	1.474 (3)	3.138 (5)	5.041 (7)
-0.324 (2)	0.329 (6)	0.333 (1)	-0.135 (2)	0.609 (10)	1.626 (10)	0.826 (2)	0.669 (2)	0.291 (8)	0.445 (6)	0.969 (8)	3.102 (9)	4.710 (3)
-0.459 (6)	0.277 (1)	0.199 (10)	-0.220 (2)	-0.050 (2)	1.598 (4)	0.617 (10)	0.414 (10)	0.165 (10)	-0.065 (8)	0.750 (10)	2.787 (1)	4.614 (1)
-0.467 (10)	-0.097 (7)	-0.002 (2)	-0.373 (5)	-0.260 (6)	1.014 (1)	-0.283 (6)	-0.175 (5)	-0.077 (2)	-0.576 (6)	0.219 (5)	2.599 (8)	4.108 (8)
-0.495 (6)	-0.449 (8)	-0.216 (8)	-0.424 (7)	-0.401 (7)	-1.022 (2)	-0.843 (3)	-0.380 (7)	-0.396 (5)	-0.695 (2)	-0.528 (6)	-3.131 (6)	-5.269 (6)
-0.731 (7)	-1.303 (6)	-0.505 (6)	-0.606 (10)	-0.527 (4)	-2.037 (3)	-1.349 (1)	-0.900 (2)	-0.880 (6)	-0.961 (5)	-1.881 (7)	-4.293 (3)	-6.681 (5)
-0.880 (5)	-1.365 (3)	-0.957 (3)	-0.697 (6)	-0.604 (1)	-3.074 (7)	-1.419 (2)	-1.554 (3)	-1.606 (3)	-1.000 (3)	-2.362 (3)	-5.143 (5)	-6.802 (7)
-1.112 (3)	-1.416 (4)	-1.048 (7)	-0.933 (5)	-0.737 (3)	-3.64 (6)	-2.296 (7)	-1.602 (6)	-2.139 (7)	-1.692 (1)	-2.502 (4)	-5.495 (7)	-7.261 (2)
-1.116 (1)	-2.042 (5)	-1.453 (1)	-1.194 (3)	-1.190 (7)	-3.647 (1)	-2.595 (4)	-2.509 (4)	-2.340 (5)	-1.915 (7)	-2.644 (2)	-5.654 (1)	-8.117 (1)
-1.389 (4)	-2.112 (1)	-2.655 (4)	-1.212 (4)	-2.428 (6)	-3.742 (4)	-2.809 (6)	-2.785 (1)	-2.408 (1)	-2.029 (4)	-3.737 (5)	-6.106 (4)	-8.706 (4)
-1.409 (5)	-2.530 (2)	-3.087 (3)	-1.495 (3)	-2.777 (5)	-4.387 (5)	-3.866 (5)	-3.313 (5)	-2.743 (4)	-2.724 (5)	-3.820 (1)	-6.207 (2)	-9.209 (3)



14. ábra: A logikai alapon szerveződő gén szortimenteken alapuló diszkriminancia analízisek (Canonical Variates Analysis, azaz CVA) eredményei. A fehér téglalapok a 7 involúciós oszteoporózisban szenvedő, míg a fekete lapok a 10 posztmenopauzás, de nem oszteoporotikus egyedet szemléltetik. A logikai alapon szerveződő szortimenteket a 6. táblázat definiálja. Az

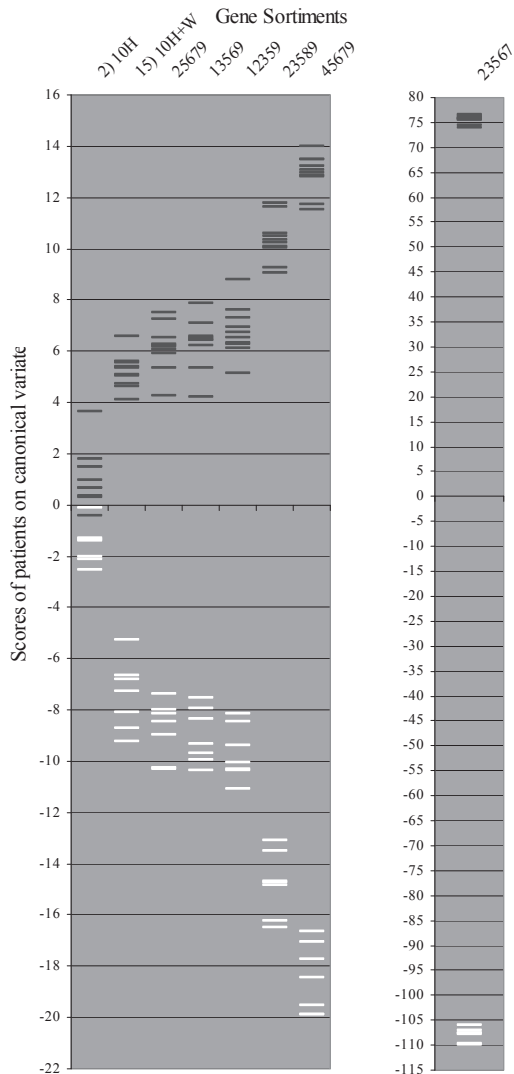
oszteoporotikus és kontroll egyed eredetű mintákat élesebben különítik el a csak szarvas ortológot magukba foglaló génszetek (6, 7 és 8 szortiment *versus* 1 és 2 szortiment). A legerősebb az elválás a 15 szortiment esetében, amely a 10 humán referencia gént és a Wnt géneket foglalja magába. A Wingless faktorok hozzáadása bármely szortimenthez fejleszti az adott szortiment diszkriminációs erejét (7, 8, 12, 13 és 15 szortiment); ugyanezt tapasztaljuk a Mann-Whitney tesztben szignifikáns gének hozzáadását követően is (6, 13 és 14 szortiment).

Diszkriminancia analízist 126 kombinatorikus úton létrehozott géncsoporton is futtattunk: a szortimenteket úgy állítottuk össze, hogy minden esetben tartalmazza a 10 humán referencia gént valamint a 6. táblázat 5. szortimentjéből ismétlés nélkül kiemelt 5 darab gént, azaz a 9 gén ismétlés nélküli 5-öd osztályú variációit.

Az elválás az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus csoport között kifejezetten éles volt a 126-ból 6 esetben (15. ábra: 25679, 13569, 12359, 23589, 45679, 23567 szortiment *versus* 15, 2 szortiment). Extrém diszkriminatív erővel bír a 23567-es géncsoport, mely a humán referencia géneken túl a *CKB*, *EIF3S4*, *FKBP2*, *OSTF1* és *SFRS7* szarvas ortológokat tartalmazza. Figyelemreméltó, hogy mind a 6 kiemelt kombinatorikus géncsoportban megtalálható az *FKBP2*, illetve 1 kivételével valamennyi tartalmazza a *TMSB4X* gént (9. táblázat).

8. táblázat: A kombinatorikus esszén alapuló diszkriminancia analízisek (CVA) score értékei nem oszteoporotikus (fekete háttér) és oszteoporozisban szenvedő (fehér háttér) paciensek esetén. E táblázat score értékei alapján készült a 15. ábra.

25679	13569	12359	23589	45679	23567
7,528 (6)	7,855 (6)	5,134 (6)	11,803 (4)	13,999 (7)	76,652 (7)
7,224 (4)	7,070 (4)	6,102 (5)	11,645 (6)	13,497 (1)	76,284 (1)
6,505 (3)	6,556 (8)	6,287 (4)	10,619 (2)	13,460 (2)	76,011 (2)
6,280 (8)	6,533 (3)	6,334 (10)	10,477 (3)	13,241 (9)	75,875 (9)
6,239 (2)	6,491 (2)	6,539 (9)	10,321 (10)	13,061 (5)	75,806 (8)
6,162 (9)	6,438 (9)	6,731 (8)	10,213 (8)	12,968 (10)	75,757 (3)
6,087 (10)	6,412 (10)	6,925 (3)	10,069 (9)	12,868 (3)	75,582 (10)
5,920 (5)	6,233 (5)	7,281 (1)	10,048 (5)	12,824 (8)	75,452 (5)
5,335 (1)	5,351 (1)	7,629 (2)	9,277 (7)	11,743 (6)	74,342 (6)
4,260 (7)	4,232 (4)	8,788 (7)	9,073 (1)	11,495 (4)	73,910 (4)
-7,378 (6)	-7,525 (6)	-8,136 (4)	-13,070 (5)	-16,670 (4)	-105,888 (4)
-7,984 (5)	-7,928 (7)	-8,435 (3)	-13,497 (6)	-17,036 (2)	-106,934 (2)
-8,146 (3)	-8,340 (5)	-9,389 (1)	-14,668 (3)	-17,716 (7)	-107,622 (7)
-8,447 (7)	-9,324 (1)	-10,054 (2)	-14,728 (7)	-18,453 (1)	-107,697 (1)
-8,981 (1)	-9,700 (3)	-10,310 (5)	-14,860 (1)	-19,520 (3)	-107,793 (3)
-10,282 (2)	-9,973 (2)	-10,343 (7)	-16,229 (2)	-19,865 (6)	-109,811 (5)
-10,329 (4)	-10,374 (4)	-11,075 (6)	-16,480 (4)	-19,913 (5)	-109,970 (6)



15. ábra: A kombinatorikus esszéken alapuló diszkriminancia analízisek (Canonical Variates Analysis, azaz CVA) eredményei. A fehér téglalapok a 7 oszteoporózisban szenvedő, míg a fekete lapok a 10 nem oszteoporotikus egyedét szemléltetik. A kombinatorikus géncsoportokban szereplő, 1-9-ig számozott géneket az 9. táblázatban listáztuk. Az oszteoporotikus és kontroll betegcsoportot a 15 és 2 gén szortimenttel összehasonlítva élesebben választja el a 25679, 13569, 12359, 23589, 45679 és a 23567-es gén szortiment. A 23567. gén szortiment extrém mértékben

szeparálja az oszteoporotikus és kontroll betegcsoportot. Figyeljük meg az eltérő találati skálát az utóbbi esetben. A kombinatorikus génszetek neveit (pl. 23567) a bennük szereplő gének sorszámaiból (9. táblázat) alkottuk.

9. táblázat: Az 1-9-ig számozott gének és előfordulásuk a 6 legjobban diszkrimináló kombinatorikus géncsoportban (15. ábra).

Gén	No	Előfordulás
<i>FKBP2</i>	5	• • • • • •
<i>TMSB4X</i>	9	• • • • • •
<i>CKB</i>	2	• • • •
<i>EIF3S4</i>	3	• • • •
<i>OSTF1</i>	6	• • • •
<i>SFRS7</i>	7	• • •
<i>ATP2A2</i>	1	• •
<i>ENO1</i>	4	•
<i>SOX4</i>	8	•

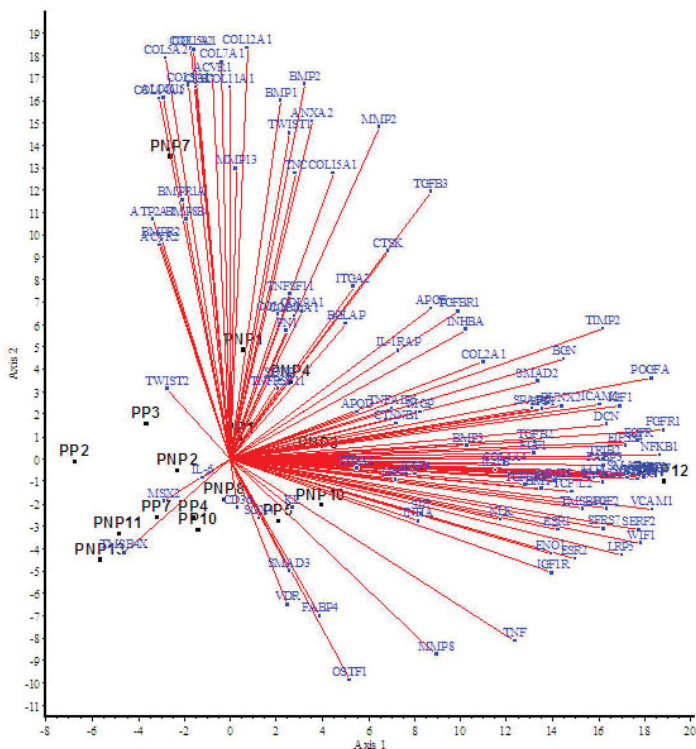
4.4.3. Nagyszámú csontgén expressziós adatainak elemzése standardizált főkomponens analízis (Principal Components Analysis, PCA) módszerrel

Kísérleteinkkel párhuzamosan és velünk kooperációban a SOTE I. számú Belgyógyászati Klinikája olyan géneket vizsgált [66], amelyek szerepe a csontanyagcserében a szakirodalom alapján ismert. A csoportunkban zajló agancsfejlődés kutatások során szintén felmerült néhány a csontanyagcserében vélhetően fontos szerepet játszó gén neve [56, 57]. Adódott a lehetőség, hogy mindezen faktorok expressziós mintázatát rögzítve az eddigi oszteoporozisban szenvedő és kontroll csoport csontmintáiban, főkomponens analízissel kísérreljük meg feltérképezni az egymással szorosabb korrelációban működő gének halmazait.

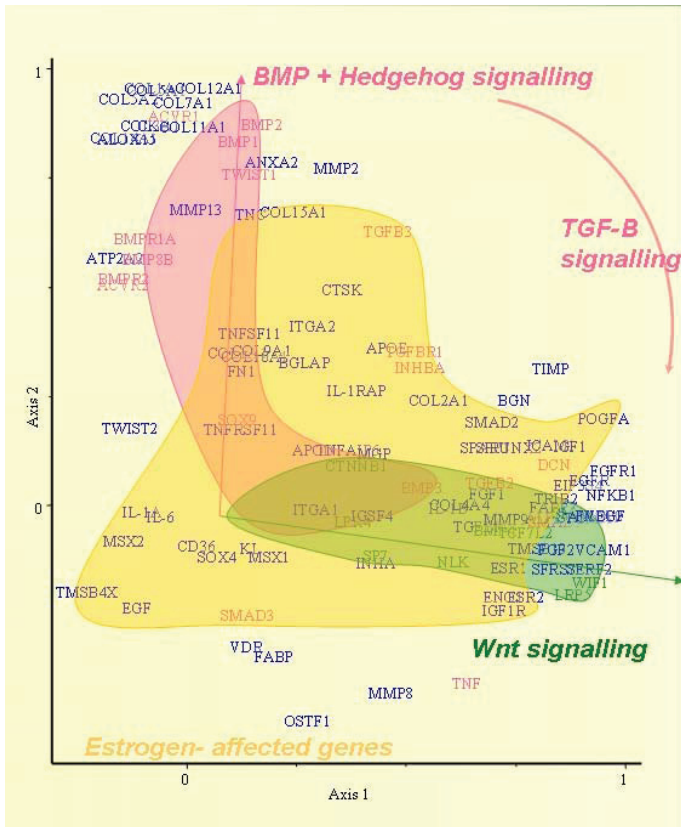
Az összesen 107 gén expressziós adatait magába foglaló korrelációs mátrix a 16. ábrán látható vektorrengeteget adta eredményül. Ha az eltérő szignáltranszdukciós útvonalakhoz tartozó géneket különböző színekkel illetjük, a 17. ábrán szemléltetett, az előbbinél rendezettebb kép bontakozik ki. Ha a PCA biplot képét intuitíve elemezzük: az ösztrogén hatású gének felhőjében a BMP-Hedgehog és a Wingless szignáltranszdukciós útvonal génjei jelennek meg. Az egyes útvonalakhoz tartozó gének vektorai által bezárt hegyesszőgek a génműködések közötti erős korrelációt jelentik meg. Ha azonban a két

kaszkád génjeit reprezentáló eredő vektorok által bezárt szöget figyeljük meg, az közel 90° . E derékszög a két szignáltranszdukciós útvonal egymástól független működésére utalhat az involúciós csontvesztés folyamata során.

Így az ábra további érdekes kérdéseket vet fel: Létezhet-e, hogy az öregedéssel járó csonttrikulás kialakulását egymástól függetlenül, két eltérő génkaszkádban bekövetkezett rendellenesség magyarázhatja? Tehát előfordulhat, hogy két eltérő típusú és eltérő gyógyszeres beavatkozást igénylő csonttrikulásról beszélhetünk az involúciós oszteoporózis kapcsán?



16. ábra: Gimszarvas ortológokon túl a szakirodalomból már ismert gének expressziós mintázatát is rögzítettük az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus csontmintákon. Ezen adatok felhasználásával készült az itt látható főkomponens analízis biplotja.



17. ábra: Gimszarvas ortológok és a szakirodalomból már ismert gének expressziós adatai alapján készült főkomponens analízis színezéssel elemzett biplotja. rózsaszín: BMP-Hedgehog útvonalban szerepet játszó gének, zöld: Wnt útvonalban szerepet játszó gének, narancs: ösztrogén hatású gének

5. MEGVITATÁS

Az ortológ gének szintjén az ember és a gímszarvas nagyon hasonló (2. melléklet). Az interakciók eltérései azóta formálódtak, amióta elhagyták a közös őst mintegy 70-80 millió évvel ezelőtt a Kréta és Paleocén idején. A csontritkulás, mint fenotípus mind az ember, mind a gímszarvas evolúciós fejlődésében megjelenik. Ennek egy különleges formája a szarvasbikákban évről-évre jelentkező ciklikus fiziológiás oszteoporozis, mely az agancsképzéshez kötött, ily módon indirekt járulva hozzá a reprodukció sikerességéhez. Ezzel ellentétben a humán csontritkulás egy évek során lappangva előretörő patológiás folyamat, ami leggyakrabban a menopauzával összeköthető. Tehát a reprodukciós időn túl megjelenvén a szelekciós nyomás szempontjából neutrális forma. Ismert, hogy mind a gímszarvas [73], mind az ember csontritkulása az alacsony perifériás ősztron szinttel van összefüggésben. Miközben tudatában vagyunk a lehetséges eltéréseknek, úgy gondoljuk, hogy a kétféle oszteoporozis mögött húzódoó génexpressziós hálózat számos génben átfed.

A csont ásványi anyag veszítést két antiparallel folyamat, a csont reszorpció és csont depozíció eltolódott egyensúlya eredményezi. A három kollagén gén magas expressziós szintje mind porotikus, mind regenerálódó csontban, illetve az *FNI* és *TIMP2* magas expressziós szintje a szarvas porotikus bordáiban az agancs intenzív növekedése idején arra utalhat, hogy a vázelemek antlerogenezissel kapcsolt csontritkulása a humán posztmenopauzás oszteoporozishoz hasonló magas turnovervel jár. Az adatok azt is sugallják, hogy a skeletális regenerációhoz köthető génexpressziós változások azon nyomban elindulnak, amint az agancsépítés és az őt kísérő oszteoporozis eléri csúcspontját (késő május-kora június). Ezen gének két fajban detektált reverz expressziós kinetikája – a turnoverbeli eltérésen túl – talán a gímszarvas fiziológiás és humán patológiás csontritkulás közötti alapvető eltérésre mutat rá. A szarvas feltehetően felpörgetett csont turnoverű csontritkulásának mechanizmusát még kutatjuk.

A gímszarvas ciklikus oszteoporozisa során kialakuló erőteljesebb génexpressziós változásokat követve kiemelhetünk egy néhány gént, melyek csontmetabolizmus tekintetében újak és eddig nem kerültek az orvosbiológiai kutatások látóterébe. A kiemelt gének humán ortológjainak expressziós aktivitását figyelembe véve világosan és megbízhatóan elkülöníthetjük az egészséges és csontritkult egyedeket egymástól;

élesebben, mint azt az eddigi klinikai gyakorlatból és kutatásokból ismert gének lehetővé tették.

Az azonosított gímszarvas gének három csoportja érdemel különös figyelmet: a Mann-Whitney U tesztben szignifikáns eltérést mutató gének, a Wnt pathway valamint a kombinatorikus assay génjei.

Mann-Whitney U teszt négy génre derített fényt, melyek markánsan eltérően expresszáltak az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus mintákban azonos irányú változást mutatva – *TRIB2*, *FABP3* és *FABP4* – illetve reverz módon – *IGSF4* – gímszarvasban és emberben (5. táblázat). Ezek a gének eltérő, látszólag egymástól független funkciókhoz köthetők. A *Drosophila* tribbles homolog 2 (*TRIB2*) feltűnése a BMD kapcsán nem meglepő, mivel a fejlődő agancsban is abundáns expressziót mutat [56, 74].

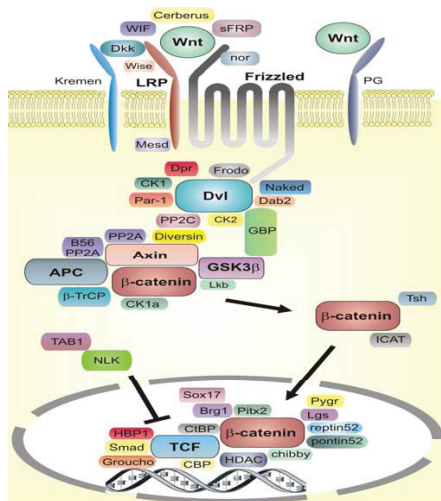
A *TRIB2*-vel ellentétben az immunoglobulin superfamily, member 4 (*IGSF4*) felbukkanása az oszteogenezisben eddig ismeretlen. Az IGSF4 proteinnek a szinaptikus sejtadhézióban [75] proapoptotikus és onkoszuppresszív folyamatokban van ismert szerepe [76].

A két zsírsav kötő és szállító fehérje, *FABP3* és *FABP4*, megjelenése a csontanyagcsereben szintén jogos lehet. Az oszteoblaszt és adipocita sejtvonalak közös csontvelői mezenchimális stem sejtekből származnak [22], így a zsírsanyagcsere és csontmetabolizmus szignálútjainak gyökere közös. Bruce és munkatársai megmutatták [77], hogy elhízott, *FABP4* vad típusú egerekben a *GDF3* – amely gátolja a BMP szignálút vonalat és aktiválja a *TGF-β/activin/nodal* pathway-t [78] – szintje downregulált. Tehát az elhízás hatására megemelkedő *FABP4* szérumszint [79] indirekte aktiválhatja a BMP indukálta csontképzést. Ennek megfelelően az elhízás és *FABP4* védelmet jelenthetnek a csontritkulással szemben. Az eredményeink nincsenek összhangban a fenti hipotézissel, mivel a *FABP4* szignifikánsan erősebb expresszióját detektáltuk oszteoporotikus státuszú csontban mind emberi, mind szarvas minták esetén. Érdemes azonban megjegyezni, hogy a *FABP4* és *GDF3* interakcióját mindeddig nem vizsgálták felnőtt szervezetben, kizárólag korai fejlődési stádiumokban, illetve a *FABP4* expressziós szintjét mi a csontszövetben, és nem szérumban határoztuk meg.

FABP3 vázképzésben betöltött funkciójáról eddig nem találtunk említést a szakirodalomban. Adataink szerint a *FABP3* expressziója finoman megemelkedik a magasabb csontdenzitású humán és gím mintákban egyaránt (5. táblázat). Nemrégiben detektálták a *FABP3* transzkriptum és a *CBFA1* koexpresszióját trabekuláris csontban és a csontthártya stratum osteogenicum rétegében [80].

A kanonikus Wingless (azaz Wnt/ β -catenin) szignáltranszdukciós útvonal proliferációt, differenciációt és a mezoderma és neuroektoderma mintázatképzését regulálja [81]. Alacsonyabbrendű gerincesekben bizonyítékot találtak arra nézve, hogy a Wnt pathway reaktiválódik epimorf szervregeneráció során [81]. Az agancs az egyetlen csontszerv, ami képes komplett regenerációra [82]. A Wnt szignálút működése számos mechanizmuson keresztül növeli a csonttömeget: progenitor stem sejtek megújulása, preoszteoblaszt replikáció stimulálása, oszteoblasztogenezis indukciója valamint oszteoblaszt és oszteocita apoptózis gátlása [83]. Eddig mindössze egyetlen Wnt gén, az *LRP5*, mutációiról írták le, hogy osteoporosis-pseudoglioma szindrómát és ún. magas csonttömeg betegséget [84, 85] okoz.

Eredményeink a Wnt gén kaskád szélesebb körű befolyására utalnak a korrall járó osteoporosisban. A *CTNFB1*, *LRP4*, *NLK*, *TCF7L2*, *WIF1* expressziók diagnosztikus erejét szemléltetjük.



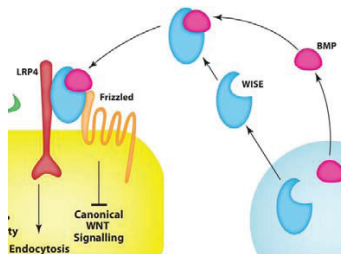
18. ábra: A kanonikus Wingless (azaz Wnt/ β -catenin) szignáltranszdukciós útvonal elemei.

A Frizzled receptor-LRP5/6 komplex ligandkötött állapotban végeredményben gátolja a GSK3 β -t s így a szubsztrátját, a β -catenin nem foszforilálódhat. Ebben a stabil állapotban a β -catenin akumulálódhat a citoplazmában, ahonnan a sejtmagba transzlokálódik és T-sejt specifikus transzkripciós faktornal (TCF) kötődik. Ennek következtében a korepressorokat koaktivátorok váltják fel a szabályozó komplexben, amely elindítja a target gén transzkripcióját. Wnt: wingless

related family of proteins, Fzd: frizzled homolog family of proteins; **Lrp**: low density lipoprotein receptor-related protein 5/low density lipoprotein receptor-related protein 6, **WIF**: Wnt inhibitory factor, Dvl: dishevelled, dsh homolog family of proteins, APC - adenomatosis polyposis coli, GSK3 β : glycogen synthase kinase-3 β , CK1: casein kinase 1, **NLK**: Nemo like kinase, **TCF**: Tcf family of transcription factors (ábra adaptáció a Wnt gene homepage nyomán www.stanford.edu/~russe/wntwindow.html)

A fenti gének között a low density lipoprotein receptor-related protein 4 (*LRP4*) külön figyelmet igényel, ugyanis *in vitro* dózis dependens módon szuppresszálta a kanonikus Wnt útvonalat, azaz potenciális negatív regulátorként a Wingless feltételezett tagjaként tartották számon [86]. A PCA eredményei is alátámasztották ezt a hipotézist, mivel a Wnt gének – elsősorban a *CTNNB1* – és az *LRP4* expressziója erős korrelációt mutatnak egymással (13. ábra 17*). Cikkünk [55] 2008 karácsonyi megjelenését követően december végén publikálták azt a tanulmányt [72], amely igazolja, hogy az *LRP4* transzmembrán receptorként a Wise-BMP ligand komplex megkötésével, versengve az *LRP5/LRP6* koreceptorokkal, gátolja a kanonikus Wnt/ β -catenin útvonalat.

Szerepe a csontfejlődésben egyéb irányból is megalapozott: a csont kalcifikációja *LRP4* knock-out egerekben szignifikánsan késik a vad típusúhoz képest [86]. Továbbá az *LRP4* gén deficienciáit kapcsolatba hozták eltérő penetranciájú polysyndactiliás esetekkel és fogfejlődési rendellenességekkel is [87, 88].



19. ábra: Az *LRP4* szerepe a Wnt/ β -catenin útvonalban. A BMP ligandok és a Wise komplexet alkotva egymással kapcsolódnak az *LRP4* receptorhoz, gátolva ezzel a Wnt szignálútvezetést. *LRP4* vagy Wise hiányában a BMP ligandok az *LRP5/LRP6*-Frizzled receptorokhoz kötődhetnek s ezzel aktiválják a Wingless utat. (ábra adaptáció Ohazama és mtsai cikke nyomán [72])

Ha a számos jelöltből kiválogatjuk az elválást leginkább támogató géneket, akkor a legerősebb diszkriminatív erővel bíró génszet(ek) kombinatorikus próbák során át megtalálhatók. Az általunk futtatott kombinatorikus assay (15. ábra, 8. táblázat) két gén – Immunophilin FK506-binding protein 2 (*FKBP2*) [89] és X chromosomal thymosin beta-4 (*TMSB4X*) [90, 91] – karizmatikus diszkrimináló erejére mutatott rá. A két gén egyikét sem írták le eddig, mint csontanyagcserében és csontfejlődésben szerepet játszó faktort. Itt érdemes megemlíteni, hogy néhány tagja az immunofilinnek képes közvetíteni az immunszupresszor FK506 (Fujimycin) és cyclosporin A kalcium-függő szignáltranszdukcióra gyakorolt gátló hatását, ezáltal okozva csontvesztést [92].

Az orvosbiológiai kutatásokban az összehasonlító genetika irányítúként szolgál genetikai markerek felkutatásához, amelyek azután lehetővé teszik modernebb, pontosabb diagnosztikai eljárások fejlesztését és célzottabb farmakológiai targeteket kijelölését. Az itt alkalmazott érzékeny ordinációs módszerek a génexpressziós adatanalízis innovatív útját nyitják meg.

Alkalmas lehet az expressziós mintázat felvétele a veszélyeztetett réteg kiszűrésére, a csonttritkulás előrejelzésére? Mi ennek a munkának a jelentősége?

A csont mRNA szintjének felmérésén alapuló diagnosztika elsősorban a beteg pillanatnyi állapotának megállapítására szolgálhat. Emellett hátránya, hogy invazív mintavételezést igényelne, mellyel szemben a klinikai rutin a kevésbé invazív, gyorsabb és fájdalommentesebb mintavételi utakat, azaz a vérvételt, vizelet vizsgálatát stb. preferálja. Ha jó előre prediktálni szeretnénk egy betegség kialakulását, a beteg genetikai hátterét kell feltérképeznünk, azaz DNS alapú diagnosztikai eljárást, pl. SNP screen, érdemes alkalmazni. A munka során újonnan felszínre hozott gének alkalmas diagnosztikai célpontok lehetnek, ehhez további analízisek szükségesek. Kooperáló partnereink a SOTE I. Belgyógyászati Klinikáján megkezdték néhány gén, így az *LRP4* gén SNP analízisét.

Egy másik erőfeszítés a vér alapú diagnosztika fejlesztéséhez, ha szérumbiokémiai vizsgálatokat végzünk és megpróbáljuk tetten érni egy adott génexpressziós változás következtében megváltozott vegyület szérumbiokémiai szintjét.

A gének közötti kapcsolatrendszer feltárása is fontos, mert a csontanyagcserét szabályozó szignalizációs hálóban stratégiaileg kiemelt ponton álló géneket tárhat fel, amelyek nemcsak diagnosztikai, hanem értékes gyógyszeripari célpontként is előtérbe kerülhetnek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS, TÉZISEK

- Munkánk során egy eddig példa nélküli megközelítést alkalmaztunk: Az összehasonlító genetikai eszköztár segítségével egy patológiás – a humán öregedéssel járó oszteoporozis – és egy fiziológiás – a gímszarvas ciklikus fiziológiás csonttritkulása – folyamat között [61] vontunk párhuzamot a csonttritkulás genetikai hátterének mélyebb megismerése céljából. (A gímszarvas ciklikus fiziológiás oszteoporozis jelenségén keresztül a csonttritkulás regenerációját is megtanulhatnánk a természetől, és alkalmazhatnánk a gyógyászatban.)
- A kapott molekuláris biológiai, génexpressziós adathalmazt olyan többváltozós statisztikai módszerekkel – diszkriminancia analízis (CVA) és főkomponens analízis (PCA) – dolgoztuk fel és kaptunk értékes információkat, amelyeket eddig elsősorban ökológiai kérdések megválaszolására alkalmaztak.
- Kijelöltünk olyan génszeteket, amelyek a korral járó oszteoporozist diagnosztizáló módszer alapjául szolgálhatnak. Álljon itt példaként az a géncsoport, mely a humán referencia géneket kiegészítve a legerősebben választja el egymástól a csonttritkulásban szenvedő és kontroll pacienseket: *CKB*, *EIF3S4*, *FKBP2*, *OSTF1*, *SFRS7*.
- Kiemeltünk olyan géneket, melyeket eddig nem publikáltak csontanyagcserében és csonttritkulásban szerepet játszó faktorokként: *LRP4*, *FKBP2*, *TMSB4X*, *FABP3*, *FABP4*, *TRIB2*.
- Rámutattunk a Wingless szignáltranszdukciónak a csonttritkulás kialakulásában; illetve megerősítettük a feltevést, miszerint az *LRP4* gén a Wingless tagja. Megmutattuk a lehetőségét annak, hogy az időskori oszteoporozist akár két, egymástól független – BMP-Hedgehog és Wnt – útvonalban fellépő defektus is okozhatja.

7. JAVASLATOK

A „Csont és Ízület Évtizede” jegyében igyekeztünk egy lépéssel megtoldani az utat és közelebb kerülni korunk egyik civilizációs betegsége, a csontritkulás genetikai hátterének megfejtéséhez. Munkánk során megmutattuk az összehasonlító genetikai eszköztár hasznát és erejét, párhuzamot vonva a humán patológiás korfüggő és a gímszarvas ciklikus fiziológiás csontritkulása között [61]. Az eddigi eredményekből kiindulva közelebbi és távlati javaslataim a következők:

- Humán csont minta bank létrehozása; további minták génexpressziós mintázatának felmérése.
- A prediktált gének genetikai kapcsolatrendszerének feltárása a többváltozós statisztikai módszereken túl hálózatelemzéssel; episztázis elemzéssel.
- A feltárt genetikai kapcsolatrendszer alapján farmakológiai targetek kijelölése.
- A BMP-Hedgehog és Wnt szignáltranszdukciós útvonal szerepének és kapcsolatának elemzése a csontritkulás kialakulásában.
- Gének polimorfizmusainak feltárása, SNP analízis (pl. *LRP4*, *FKBP2*); SNP mintázat-fenotípus asszociáció vizsgálata diszkrét matematikai eszközökkel.
- Diagnosztika fejlesztés a nagy diszkriminatív erővel bíró gének felhasználásával és szérumbiokémiai vizsgálatok, melyek az invazív csontbiopsziával szemben a vér alapú diagnosztikát tennék lehetővé.
- Kiemelt gének funkcionális vizsgálata, pl. *LRP4*, *TMSB4X* szerepének meghatározása a csontanyagcserében, oszteoporózisban.

8. SUMMARY

Osteoporosis is one of the most common metabolic bone diseases, attacking 10% of the population worldwide. Once the osteoporosis is diagnosed – human or model animal –, there is no treatment available today to achieve full recovery.

Regeneration in skeletal elements is the unique feature of our newly investigated osteoporosis model, the red deer (*Cervus elaphus*) stag. Cyclic physiological osteoporosis is a consequence of the annual antler cycle. In the period of intense antler growth, the demand for calcium and phosphate is partially filled by mobilizing minerals from the skeleton. This phenomenon raises the possibility to identify genes involved in the regulation of bone mineral density on the basis of comparative genomics between deer and human.

We compare gene expression activity of osteoporotic and regenerating rib bone samples *versus* autumn dwell control in red deer by microarray hybridization. Identified genes were tested on human femoral bone tissue from non-osteoporotic controls and patients affected with age-related osteoporosis. Expression data were evaluated by Principal Components Analysis and Canonical Variates Analysis.

Separation of patients into a normal and an affected group based on 10 formerly known osteoporosis reference genes was significantly improved by expanding the data with newly identified genes. These genes include *IGSF4*, *FABP3*, *FABP4*, *FKBP2*, *TIMP2*, *TMSB4X*, *TRIB2* and elements of the Wnt signaling. Moreover, our data strengthened the hypothesis that *LRP4* is a member of the Wnt signaling pathway; even raised the possibility that osteoporosis might develop in two independent ways, namely, due to a defect in either the BMP-Hedgehog or Wingless signaling.

This study supports that extensive comparative genomic analyses, in our case healthy deer and diseased human, provide a novel approach to identify genetic markers. The highly sensitive biostatistical methods applied here may open an innovative way in gene expression data analysis. Genes identified by the combination of comparative genomics and statistics in this study are potential diagnostic and pharmaceutical targets for osteoporosis prevention and treatment. The exact function of these factors in bone biology needs further clarification.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatomban olvasható eredmények nagyrészt Gödöllőn, az MBK Genetikai Intézetében 2002-2008 között születtek. A munka fennmaradó részét a SOTE I. Belgyógyászati Klinikán, valamint az ELTE Genetikai Tanszékén végeztem.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Orosz László Professor Úrnak a szakmai irányítást, az elméleti és gyakorlati képzést, a munka anyagi háttérének a biztosítását.

A téma megvalósíthatóságáért hálával tartozom Dr. Zomborszky Zoltánnak (KE). Dr. Lakatos Péter Professor Úrnak (SOTE) köszönöm, hogy bekapcsolódhattam a csoportjában folyó humán oszteoporosis kutatásba. Dr. Podani János Professor Úrnak (ELTE) is szeretnék kiemelt köszönetet mondani azért, hogy bevezetett a többváltozós statisztika rejtelmeibe s hogy együttműködésünk révén a molekuláris biológiai adatanalízis újszerű látásmódjára leltünk.

Hálával tartozom a fáradhatatlan technikai asszisztenciáért Péliné Tóth Magdolnáknak, Törökné Sánta Csilláknak valamint Gálné Szóráth Kornéliáknak. Köszönet a csoport jelenlegi és volt tagjainak Dr. Gyurján Istvánnak, Dr. Papp Péternek, Dr. Molnár Andreának, Szabolcsi Zoltánnak, Stéger Viktornak, Dr. Csiszovszki Zsoltnak, Dr. Ferenczy Szilamérnak, Dr. Blaha Bélának és Dr. Ganyu Anitának a felvetődött problémák megoldásában nyújtott segítségükért és barátságukért.

Köszönet illeti Dr. Nagy Ferenc és Dr. Kiss György Botond főigazgató urakat, hogy lehetővé tették munkámat a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban.

Köszönet illeti Balla Bernadettet, Dr. Buzás Zsuzsannát, Dr. Jakó Énéát, Kósa Jánost, Dr. Vellai Tibort, Dr. Kiss Jánost, Dr. Semsey Szabolcsot, Dr. Nagy Jánost a jól működő kooperációért, szakmai és emberi támogatásukért.

Külön köszönet az én jelenlegi csoportvezetőmnek, Dr. Welker Ervinnek, akinek nagyvonalú és türelmes hozzáállása nélkül nehezen íródott volna meg ez a dolgozat.

Köszönöm a Családomnak és a Barátaimnak, hogy ennyi éven keresztül támogattak és biztattak.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lakatos, P., Speer, G., A D-vitamin biológiai és klinikai hatásai. *Lege Artis Medicinæ*, 2001. 12(1): p. 8-17.
2. Poór, G., A csigolyadeformitás prevalenciája hazánkban: Az Európai Vertebrális Osteoporosis Study. *Orvosi Hetilap*, 1997. 42: p. 2647-2652.
3. P. Somogyi, A.B., M. Kricsfalusy, L. Schreithofer, I. Rápolthy, Cs. Udvardy, Cs. Horváth, Az osteoporosis eredetű csonttörések számának becslése Magyarországon. *Ca és Csont*, 2000. 3(3): p. 111-117.
4. Parfitt, A.M., Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*, 1994. 55(3): p. 273-86.
5. Schaffler, M.B., K. Choi, and C. Milgrom, Aging and matrix microdamage accumulation in human compact bone. *Bone*, 1995. 17(6): p. 521-25.
6. Sojka, J.E. and C.M. Weaver, Magnesium supplementation and osteoporosis. *Nutr Rev*, 1995. 53(3): p. 71-4.
7. Burnell, J.M., et al., Effects of dietary alteration of bicarbonate and magnesium on rat bone. *Am J Physiol*, 1986. 250(2 Pt 2): p. F302-7.
8. Wians, F.H., Jr., et al., The effect of hypermagnesemia on serum levels of osteocalcin in an animal model. *Magnes Trace Elem*, 1990. 9(1): p. 28-35.
9. Baron, R., et al., Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol*, 1985. 101(6): p. 2210-22.
10. Blair, H.C. and P.H. Schlesinger, Purification of a stilbene sensitive chloride channel and reconstitution of chloride conductivity into phospholipid vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. 171(3): p. 920-5.
11. Blair, H.C., et al., Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 1989. 245(4920): p. 855-7.
12. Littlewood-Evans, A., et al., Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone*, 1997. 20(2): p. 81-6.

-
13. Okada, Y., et al., Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*, 1995. 72(3): p. 311-22.
 14. Kalervo Vaananen, H.Z., Osteoclast Function, in *Principals of bone biology*. 2002, Academic Press: San Diego.
 15. Fonyó, A., *Az orvosi élettan tankönyve*. 2003, Budapest: Medicina Könyvkiadó.
 16. Kanis, J.A., et al., The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1994. 9(8): p. 1137-41.
 17. Kamel, H.K., Postmenopausal osteoporosis: etiology, current diagnostic strategies, and nonprescription interventions. *J Manag Care Pharm*, 2006. 12(6 Suppl A): p. S4-9; quiz S26-8.
 18. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 1994. 843: p. 1-129.
 19. Econs, M.J., *The genetics of osteoporosis and metabolic bone disease*. 2000, Totowa, New Jersey: Humana Press.
 20. Ralston, S.H. and B. de Crombrugge, Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev*, 2006. 20(18): p. 2492-506.
 21. Bilezikian, J.P., L.G. Raisz, and G.A. Rodan, *Principles of Bone biology*. Academic Press, San Diego, 2000. 2.
 22. Rosen, C.J. and M.L. Bouxsein, Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. 2(1): p. 35-43.
 23. Grant, S.F., et al., Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet*, 1996. 14(2): p. 203-5.
 24. Uitterlinden, A.G., et al., Relation of alleles of the collagen type Ialpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med*, 1998. 338(15): p. 1016-21.
 25. Takács, I., A csontszövet genetikája, in *Metabólikus csontbetegségek*, I.T. Péter Lakatos, Editor. 2006, Medintel Könyvkiadó: Budapest. p. 56.
 26. Shiraki, M., et al., Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J Bone Miner Res*, 1997. 12(9): p. 1438-45.
 27. Arnold, J.S. and W.S. Jee, Bone growth and osteoclastic activity as indicated by radioautographic distribution of plutonium. *Am J Anat*, 1957. 101(3): p. 367-417.
-

-
28. Marks, S.C., Jr. and G.B. Schneider, Evidence for a relationship between lymphoid cells and osteoclasts: bone resorption restored in ia (osteopetrotic) rats by lymphocytes, monocytes and macrophages from a normal littermate. *Am J Anat*, 1978. 152(3): p. 331-41.
 29. Vanderschueren, D., et al., Time-related increase of biochemical markers of bone turnover in androgen-deficient male rats. *Bone Miner*, 1994. 26(2): p. 123-31.
 30. Faugere, M.C., et al., Bone changes occurring early after cessation of ovarian function in beagle dogs: a histomorphometric study employing sequential biopsies. *J Bone Miner Res*, 1990. 5(3): p. 263-72.
 31. DM Raab, T.C., DB Kimmel and EL Smith, Cortical bone response in adult swine after exercise. *J Bone Miner Res*, 1991. 6: p. 741-749.
 32. Bloom, W. and F.C. Bloom M.A. and McLean, Calcification and ossification. Medullary bone changes in the reproductive cycle of female pigeons. *Anat. Rec.*, 1941. 79: p. 443-466.
 33. Kahn, A.J. and D.J. Simmons, Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. *Nature*, 1975. 258(5533): p. 325-7.
 34. Széchenyi, Z., *Szarvasok nyomában*. 1979, Budapest: Gondolat.
 35. Bonhomme, F., et al., Biochemical diversity and evolution in the genus *Mus*. *Biochem Genet*, 1984. 22(3-4): p. 275-303.
 36. Wang, Z., *Karyotypes of deer*. 1988, Peking: New Scientific.
 37. Tate, M.L., et al., A new gene mapping resource: interspecies hybrids between Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*). *Genetics*, 1995. 139(3): p. 1383-91.
 38. Slate, J., et al., A deer (subfamily Cervinae) genetic linkage map and the evolution of ruminant genomes. *Genetics*, 2002. 160(4): p. 1587-97.
 39. Barendse, W., et al., A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet*, 1994. 6(3): p. 227-35.
 40. de Gortari, M.J., et al., A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mamm Genome*, 1998. 9(3): p. 204-9.
 41. Szederjei, Á. *Szarvas*. 1960, Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.
 42. Chapman, D.I., et al., Antler- bone of contention. *Mammal Review*, 1975. 5(4).
 43. *Regeneration, Function and Evolution, in Deer antlers*, R. Goss, Editor. 1983, Academic Press: New York.
-

-
44. Bubenik, G.A., et al., Plasma LH, FSH, testosterone, prolactin and androstenedione in male white-tailed deer after ACTH and dexamethasone administration. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 1990. 95(1): p. 163-9.
 45. Asher, G.W., A.M. Day, and G.K. Barrell, Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J Reprod Fertil*, 1987. 79(2): p. 353-62.
 46. Reiter, R.J., Melatonin synthesis: multiplicity of regulation. *Adv Exp Med Biol*, 1991. 294: p. 149-58.
 47. Reiter, R.J., Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*, 1991. 79(1-3): p. C153-8.
 48. Brown, R.D., R.L. Cowan, and J.F. Kavanaugh, Effect of pinealectomy on seasonal androgen titers, antler growth and feed intake in white-tailed deer. *J Anim Sci*, 1978. 47(2): p. 435-40.
 49. Bubenik, G.A., et al., Testosterone and estradiol concentrations in serum, velvet skin, and growing antler bone of male white-tailed deer. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 2005. 303(3): p. 186-92.
 50. Muir, P.D., A.R. Sykes, and G.K. Barrell, Changes in blood content and histology during growth of antlers in red deer (*Cervus elaphus*) and their relationship to plasma testosterone levels. *J Anat*, 1988. 158: p. 31-42.
 51. Brown, R.D., R.L. Cowan, and L.C. Griel, Correlation between antler and long bone relative bone mass and circulating androgens in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Am J Vet Res*, 1978. 39(6): p. 1053-6.
 52. Price, J. and S. Allen, Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004. 359(1445): p. 809-22.
 53. Bubenik, G.A., et al., Photoperiodicity and circannual levels of LH, FSH, and testosterone in normal and castrated male, white-tailed deer. *Can J Physiol Pharmacol*, 1982. 60(6): p. 788-93.
 54. Barrell, G.K., R. Davies, and C.I. Bailey, Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in perichondrium of antlers in red deer (*Cervus elaphus*). *Reprod Fertil Dev*, 1999. 11(3): p. 189-92.
 55. Borsy, A., et al., Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Mol Genet Genomics*, 2009. 281(3): p. 301-13.
-

-
56. Gyurjan, I., Jr., et al., Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Mol Genet Genomics*, 2007. 277(3): p. 221-35.
 57. Molnar, A., et al., Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Mol Genet Genomics*, 2007. 277(3): p. 237-48.
 58. Meadows, S.D. and T.E. Hakonson, Contribution of tissues to body mass in Elk. *J Wildlife Man*, 1982. 46(3): p. 838-841.
 59. Banks, W.J., Jr., et al., Antler growth and osteoporosis. II. Gravimetric and chemical changes in the costal compacta during the antler growth cycle. *Anat Rec*, 1968. 162(4): p. 399-406.
 60. Banks, W.J., Jr., et al., Antler growth and osteoporosis. I. Morphological and morphometric changes in the costal compacta during the antler growth cycle. *Anat Rec*, 1968. 162(4): p. 387-98.
 61. Balla, B., et al., Different Gene Expression Patterns in the Bone Tissue of Aging Postmenopausal Osteoporotic and Non-osteoporotic Women. *Calcif Tissue Int*, 2007.
 62. Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.
 63. Chomczynski, P. and N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 2006. 1(2): p. 581-5.
 64. Sambrook J, F.E., Maniatis T, *A laboratory manual I-III*. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Laboratory Press.
 65. Klein, R.F., et al., Regulation of bone mass in mice by the lipoxigenase gene *Alox15*. *Science*, 2004. 303(5655): p. 229-32.
 66. Balla, B., et al., Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcif Tissue Int*, 2008. 82(1): p. 12-26.
 67. Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983. 166(4): p. 557-80.
 68. Mandel, M. and A. Higa, Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 1970. 53(1): p. 159-62.
-

-
69. Podani, J., *Introduction to the Exploration of Multivariate Biological Data*. Backhuys, Leiden, 2000.
 70. Podani, J., *SYN-TAX 2000: User's Manual*. Scientia Publishing, Budapest, 2001.
 71. Reddy, S.D., R.; Mena, C.; Nishimura, R.; Choi, S. J.; Dallas, M.; Yoneda, T.; Roodman, G. D, Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel peptide (OSF) that enhances osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol*, 1998. 177: p. 636-645.
 72. Ohazama, A., et al., Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *PLoS One*, 2008. 3(12): p. e4092.
 73. Baxter, B.J., R.N. Andrews, and G.K. Barrell, Bone turnover associated with antler growth in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat Rec*, 1999. 256(1): p. 14-9.
 74. Kiss-Toth, E., et al., Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, 2004. 279(41): p. 42703-8.
 75. Biederer, T., et al., SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*, 2002. 297(5586): p. 1525-31.
 76. Kuramochi, M., et al., TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet*, 2001. 27(4): p. 427-30.
 77. Witthuhn, B.A. and D.A. Bernlohr, Upregulation of bone morphogenetic protein GDF-3/Vgr-2 expression in adipose tissue of FABP4/aP2 null mice. *Cytokine*, 2001. 14(3): p. 129-35.
 78. Levine, A.J. and A.H. Brivanlou, GDF3 at the crossroads of TGF-beta signaling. *Cell Cycle*, 2006. 5(10): p. 1069-73.
 79. Rhee, E.J., et al., The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol*, 2009. 160(2): p. 165-72.
 80. Hecht, J., et al., Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene Expr Patterns*, 2007. 7(1-2): p. 102-12.
 81. Stoick-Cooper, C.L., et al., Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development*, 2007. 134(3): p. 479-89.
 82. Mount, J.G., et al., Evidence that the canonical Wnt signalling pathway regulates deer antler regeneration. *Dev Dyn*, 2006. 235(5): p. 1390-9.
 83. Krishnan, V., H.U. Bryant, and O.A. Macdougald, Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*, 2006. 116(5): p. 1202-9.
 84. Gong, Y., et al., LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 2001. 107(4): p. 513-23.
-

-
85. Semenov, M.V. and X. He, LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem*, 2006. 281(50): p. 38276-84.
 86. Johnson, E.B., R.E. Hammer, and J. Herz, Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(22): p. 3523-38.
 87. Simon-Chazottes, D., et al., Mutations in the gene encoding the low-density lipoprotein receptor LRP4 cause abnormal limb development in the mouse. *Genomics*, 2006. 87(5): p. 673-7.
 88. Johnson, E.B., et al., Defective splicing of *Megf7/Lrp4*, a regulator of distal limb development, in autosomal recessive mulefoot disease. *Genomics*, 2006. 88(5): p. 600-9.
 89. Grimmond, S., et al., Exclusion of the 13-kDa rapamycin binding protein gene (*FKBP2*) as a candidate gene for multiple endocrine neoplasia type 1. *Hum Genet*, 1995. 95(4): p. 455-8.
 90. Bock-Marquette, I., et al., Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature*, 2004. 432(7016): p. 466-72.
 91. Smart, N., et al., Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature*, 2007. 445(7124): p. 177-82.
 92. Sambrook, P., Cyclosporine and bone mass. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2000. 18: p. 93-96.

11. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Az interspecifikus microarray hibridizáció (i.e. gímzarvas cDNS *versus* 40K human cDNS array) eredményei. Árnyalt sorok: gének, amelyeket további vizsgálatokra szelektáltunk. Fold change: a microarray hibridizáció során detektált átlagos génextpressziós eltérés, a) 1-hez viszonyított érték, b) 0-hoz viszonyított érték. Megjegyzések: U) Mann-Whitney U teszt szignifikáns p értékei (szignifikancia szint $p \leq 0.1$); W) Wingless gének; M) mátrix proteinek kódoló gének.

Gén neve	Accession No	Fold change		Megjegyzések	
		a	b		
Oszteoporotikus állapot vs. Regeneráló állapot					
<i>COL1A1</i> : collagen, type I, alpha 1	R48844.NM_000088.Hs.172928	4.76	4.76	U	M
<i>EIF3S4</i> : eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 (delta, 44kD)	AA668703.NM_003755.Hs.28081	4.21	4.21		
ESTs, Weakly similar to I38022 hypothetical protein [H.sapiens]	T67547.Hs.111583	3.73	3.73		
<i>TIMP2</i> : tissue inhibitor of metalloproteinase 2	AA486280.NM_003255.Hs.6441	3.72	3.72	U	M
<i>SFRS7</i> : splicing factor, arginine/serine-rich 7 (35kD)	AA418813.Hs.184167	3.70	3.70		
<i>COL5A2</i> : collagen, type V, alpha 2	AA857098.Hs.82985	3.31	3.31		M
<i>LAMR1</i> : laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA)	AA629897.NM_002295.Hs.406308	2.89	2.89		
<i>H2AFO</i> : H2A histone family, member O	AA047260.NM_003516.Hs.795	2.58	2.58		
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586B1922 (from clone DKFZp586B1922)	AA485688.Hs.184779	2.55	2.55		
<i>PSMD13</i> : proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	A1279812.NM_002817.Hs.230338	2.53	2.53		
<i>HDAC5</i> : histone deacetylase 5	A1401021.NM_005474.Hs.9028	2.51	2.51		
<i>SFRS5</i> : splicing factor, arginine/serine-rich 5	A1263109.NM_006925.Hs.166975	2.33	2.33		
<i>ENO1</i> : enolase 1, (alpha)	AA708342.NM_001428.Hs.254105	2.32	2.32		
<i>LRP4</i> : low density lipoprotein receptor-related protein 4	A1369722.Hs.4930	2.28	2.28		W
<i>ETFb</i> : electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	A1364521.NM_001985.Hs.74047	2.24	2.24		
<i>TEX14</i> : testis expressed sequence 14	A1025320.NM_031272.Hs.131572	2.24	2.24		
<i>COL3A1</i> : collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	T98612.Hs.119571	2.23	2.23		M

<i>RPL10</i> : ribosomal protein L10	A1025348.NM_006013.Hs.308332	2.18	2.18
<i>FKBP2</i> : FK506-binding protein 2 (13kD)	R75820.NM_057092.Hs.227729	2.14	2.14
<i>FLOT1</i> : flotillin 1	AA456611.NM_005803.Hs.179986	2.10	2.10
<i>RBS14</i> : ribosomal protein S14	H73727.NM_005617.Hs.244621	2.04	2.04
Homo sapiens, RIKEN cDNA 2010100012 gene, clone MGC:14813 IMAGE:4133274	A1016688.Hs.11565	2.03	2.03
<i>AP3S1</i> : adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit	AA460727.NM_001284.Hs.80917	0.49	-2.04
<i>RPL24</i> : ribosomal protein L24	AA637768.NM_000986.Hs.184582	0.49	-2.04
<i>UBE2B</i> : ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	AA598492.NM_003337.Hs.811	0.49	-2.04
<i>HHP2</i> : huntingtin interacting protein 2	H78385.NM_005339.Hs.155485	0.48	-2.08
hypothetical protein FLJ21016	R11630.NM_025160.Hs.289069	0.48	-2.08
KIAA0630 protein: homeodomain interacting protein kinase 1-like protein	R28649.Hs.12259	0.48	-2.08
<i>MTCH2</i> : mitochondrial carrier homolog 2	AA121668.NM_014342.Hs.279609	0.48	-2.08
<i>PBX3</i> : pre-B-cell leukemia transcription factor 3	W48726.Hs.294101	0.48	-2.08
B7 protein	N90281.NM_006992.Hs.155586	0.47	-2.13
<i>CLGN</i> : calmagin	AA778675.NM_004362.Hs.86368	0.46	-2.17
<i>TARDBP</i> : TAR DNA binding protein	N69283.NM_007375.Hs.193989	0.46	-2.17
ESTs: G-protein coupled receptor 8	N47087.NM033760.Hs.302161	0.45	-2.22
KIAA1025 protein	AA449326.Hs.4084	0.45	-2.22
<i>TGFBR3</i> : transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kD)	N26658.Hs.342874	0.45	-2.22
<i>USP9Y</i> : ubiquitin specific protease 9, X chromosome	W74315.Hs.401941	0.45	-2.22
EST	W52378.	0.44	-2.27
ESTs	H61007.Hs.117915	0.42	-2.38
<i>POLR2B</i> : polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B (140kD)	N74956.NM_000938.Hs.296014	0.42	-2.38
Homo sapiens clone TCCCTA00142: Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1	R35245.Hs.326142	0.41	-2.44
<i>KPNB2</i> : karyopherin (importin) beta 2	AA453508.	0.41	-2.44
homolog of mouse quaking QKI (KH domain RNA binding protein)	R62996.Hs.15020	0.39	-2.56
hypothetical protein FLJ10276	W69677.NM_018045.Hs.333149	0.38	-2.63
Homo sapiens unknown mRNA	W88792.NM_031214.Hs.300624	0.37	-2.70
protein associated with PRK1	AA056096.NM_019006.Hs.83954	0.35	-2.86

Homo sapiens cDNA FLJ11723 fis, clone HEMBA1005314	T84084 , Hs.196008	0.33	-3.03
KIAA1673	N47682 , Hs.301444	0.29	-3.45
<i>HSP105B</i> : heat shock 105kD	AA485151 , NM_006644 , Hs.36927	0.26	-3.85

Östeoporotikus állapot vs. Öszi nyugalmi kontroll állapot

<i>COL5A2</i> : collagen, type V, alpha 2	AA857098 , NM_000393 , Hs.82985	4.11	4.11	M
<i>WIF1</i> : Wnt inhibitory factor-1	AA897696 , NM_007191 , Hs.284122	3.99	3.99	W
<i>CKB</i> : creatine kinase, brain	AA894557 , NM_001823 , Hs.173724	3.90	3.90	
N63807 Riken cDNS6230425C22	N63807 , .	3.83	3.83	
<i>Cnnb1</i> : catenin beta 1 (cadherin-associated protein) 88kDa	AA442092 , Hs.171271	3.39	3.39	W
<i>IGSF4</i> : immunoglobulin superfamily, member 4	N51362 , Hs.70337	3.38	3.38	U
<i>FABP4</i> : fatty acid binding protein 4, adipocyte	N92901 , NM_001442 , Hs.83213	3.37	3.37	U
<i>COL1A1</i> : collagen, type I, alpha 1	R48844 , NM_000088 , Hs.172928	3.36	3.36	U M
EST: endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8 (<i>EDG8</i>)	N47089 , NM_030760 , Hs.302161	2.68	2.68	
<i>GRP58</i> : glucose regulated protein, 58kD	R33030 , Hs.289101	2.65	2.65	
<i>H33B</i> : H3 histone, family 3B (H3.3B)	AA608514 , NM_005324 , Hs.180877	2.58	2.58	
EST	W52353 , .	2.57	2.57	
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586B1922 (from clone DKFZp586B1922)	AA485688 , Hs.184779	2.56	2.56	
hypothetical protein FLJ11307: spermatid perinuclear RNA binding protein (<i>STRBP</i>)	NS3133 , NM_018387 , Hs.8215	2.56	2.56	
<i>FN1</i> : fibronectin 1	RG2612 , NM_002026 , Hs.287820	2.50	2.50	M
<i>ACTR3</i> : (actin-related protein 3, yeast) homolog	N34974 , NM_005721 , Hs.380096	2.49	2.49	
<i>ARIH1</i> : ariadne (Drosophila) homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2-binding protein, 1	AA418032 , NM_005744 , Hs.181461	2.46	2.46	
<i>NCK1</i> : NCK adaptor protein 1	AA280214 , NM_006153 , Hs.54589	2.41	2.41	
CGI-48 protein	AA458968 , NM_016001 , Hs.6153	2.40	2.40	
hnRNP: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, ROA1	AA416785 , Hs.397430	2.36	2.36	
ESTs, Weakly similar to AF126743 1 DNAJ domain-containing protein MCJ	AA677960 , NM_145261 , Hs.349177	2.35	2.35	
<i>HMGN2</i> : high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 17	H93087 , NM_005517 , Hs.181163	2.34	2.34	
<i>STI3</i> : suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70-interacting protein)	H65676 , NM_003932 , Hs.119222	2.34	2.34	

<i>SMAP</i> : small acidic protein	AA490281.NM_014267.Hs.78050	2.33	2.33
ESTs	AI278518..Hs.145968	2.32	2.32
<i>OSTF1</i> : osteoclast stimulating factor 1	AA283693.NM_012383.Hs.95821	2.32	2.32
<i>PICALM</i> : phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	R59062..Hs.7885	2.31	2.31
<i>RAB1A</i> : member RAS oncogene family	N69689..Hs.3642	2.31	2.31
<i>SLC25A3</i> : solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	AA486200.NM_005888.Hs.78713	2.30	2.30
<i>CFDP1</i> : craniofacial development protein 1	AA682613.NM_006324.Hs.296460	2.27	2.27
ESTs, Moderately similar to CA1C RAT COLLAGEN ALPHA 1(XII) CHAIN [R.norvegicus]	AA478481.NM_004370.Hs.101302	2.27	2.27
<i>SLC25A5</i> : solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	AA404486.NM_001152.Hs.79172	2.25	2.25
<i>SMARCA2</i> : SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	AA481026.NM_139045.Hs.198296	2.25	2.25
<i>KRML</i> : Kreihsler (mouse) maf-related leucine zipper homolog	T50121..Hs.169487	2.23	2.23
<i>FUS</i> : fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma	AA025166.NM_004960.Hs.337761	2.22	2.22
<i>AWP1</i> : protein associated with PRK1	AA056096.NM_019006.Hs.83954	2.21	2.21
<i>TMS64X</i> : thymosin, beta 4, X chromosome	AA423800..Hs.378209	2.21	2.21
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog	N34436..Hs.30250	2.21	2.21
<i>ERF-1</i> : butyrate response factor 1 (EGF-response factor 1)	AA424743.NM_004926.Hs.85155	2.19	2.19
homolog of mouse quaking QKI (KH domain RNA binding protein)	R62996..Hs.15020	2.19	2.19
EST	W52378..	2.17	2.17
Homo sapiens cDNA: FLJ21333 fis, clone COL02535	AA026470..Hs.27865	2.16	2.16
<i>AP3S1</i> : adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit	AA460727.NM_001284.Hs.80917	2.15	2.15
<i>PFND3</i> : prefoldin 5	AA446453.NM_002624.Hs.288856	2.15	2.15
<i>HGRG8</i> : high-glucose-regulated protein 8	N70528.NM_016258.Hs.20993	2.14	2.14
<i>MYP1I</i> : myosin phosphatase, target subunit 1	W32763.NM_002480.Hs.16533	2.14	2.14
<i>TARDBP</i> : TAR DNA binding protein	N69283.NM_007375.Hs.193989	2.14	2.14
<i>BIG1</i> : brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	W89187.NM_006421.Hs.94631	2.12	2.12
<i>PNN</i> : pinnin, desmosome associated protein	AA707321.NM_002687.Hs.44499	2.11	2.11
<i>FKBP2</i> : FK506-binding protein 2 (13kD)	R75820.NM_057092.Hs.227729	2.10	2.10
<i>VT2</i> : vesicle-associated soluble NSF attachment protein receptor	AA704511.NM_006370.Hs.169206	2.08	2.08
<i>ZFP36</i> : zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	R38383.NM_003407.Hs.343586	2.08	2.08
<i>EIF4E</i> : eukaryotic translation initiation factor 4E	AA194246.NM_001968.Hs.79306	2.07	2.07

<i>RAB2</i> : member RAS oncogene family	R28020_Hs.78305	2.04	2.04
<i>UBE2B</i> : ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	AA598492.NM_003337.Hs.811	2.04	2.04
<i>CLGN</i> : calmagin	AA778675.NM_004362.Hs.86368	2.03	2.03
<i>EIF3S6</i> : eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 (48kD)	AA669674.NM_001568.Hs.106673	2.03	2.03
<i>HBZ</i> : hemoglobin, zeta	H60173.NM_005332.Hs.272003	0.46	-2.17
<i>FEN1/Elo2</i> : elongation of very long chain fatty acids, LONG CHAIN FATTY ACID SYNTHESIS PROTEIN SUR4-RELATED	AA465706.NM_022821.Hs.25597	0.43	-2.33

Regenerálódó állapot vs. Őszi nyugalmi kontroll állapot

<i>HBZ</i> : hemoglobin, zeta	H60173.NM_005332.Hs.272003	4.59	4.59
<i>UBE2C</i> : ubiquitin-conjugating enzyme E2C	R80790.NM_007019.Hs.93002	2.62	2.62
UNCHARACTERIZED	A1126837_Hs.164478	2.27	2.27
<i>FABP3</i> : fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)	AA044307_Hs.49881	0.68	-1.47 U
<i>MGP</i> : matrix Gla protein	AA460374_Hs.279009	0.65	-1.54 M
<i>EWSR1</i> : Ewing sarcoma breakpoint region 1	R32756.NM_005243.Hs.129953	0.50	-2.00
<i>ATRN</i> : attractin	AA974817_Hs.194019	0.49	-2.04
Homo sapiens cDNA: FLJ22844 fis, clone KAlA5181	AA975103_Hs.296322	0.48	-2.08
<i>AP3S1</i> : adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit	AA460727.NM_001284.Hs.80917	0.47	-2.13
<i>HNRP HF</i> : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	AA600181.NM_005520.Hs.245710	0.47	-2.13
hypothetical protein FLJ10648	A1000138_Hs.13809	0.47	-2.13
<i>MPDU1</i> : mannose-P-dolichol utilization defect 1	R77432.NM_004870.Hs.6710	0.47	-2.13
<i>TRIB2</i> : GS3955 protein	AA053865.NM_021643.Hs.155418	0.46	-2.17 U
Homo sapiens cDNA FLJ14883 fis, clone PLACE1003596, moderately similar to OLIGOSACCHARYL TRANSFERASE STT3 SUBUNIT	AA708422_Hs.183454	0.46	-2.17
MGCS2594	AA625765.NM_024050.Hs.181551	0.46	-2.17
<i>NBEA</i> : neurobeachin	AA775279.NM_015678.Hs.3821	0.46	-2.17
<i>PSMB1</i> : proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1	T68758.NM_002793.Hs.75748	0.46	-2.17
hypothetical protein LOC57187	AA452823_Hs.16411	0.45	-2.22
KIAA1460: protein:trinuclotide repeat containing 6	AA699500_Hs.6968	0.45	-2.22
<i>NLK</i> : nemo-like kinase	A1348580_Hs.3532	0.45	-2.22 W
<i>S100A1</i> : S100 calcium-binding protein A1	H49983.NM_006271	0.45	-2.22 U
<i>EIF3S6</i> : eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 (48kD)	AA669674.NM_001568.Hs.106673	0.44	-2.27

<i>KATNA1</i> : katanin p60 (ATPase-containing) subunit A 1	AA609740.NM_007044	0.43	-2.33	
<i>DIS155E</i> : NRAS-related gene	N54372.NM_007158.Hs.69855	0.43	-2.33	
<i>HNRPM</i> : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	AA504272.NM_031203.Hs.79024	0.42	-2.38	
KIAA0630 protein:homeodomain interacting protein kinase 1-like protein	R28649_ .Hs.12259	0.42	-2.38	
<i>RAB1A</i> : member RAS oncogene family	N69689_ .Hs.3642	0.42	-2.38	
<i>RAB2</i> : member RAS oncogene family	R28020_ .Hs.78305	0.42	-2.38	
<i>HOMER1B/SYN47</i> : Homer, neuronal immediate early gene, 1B	AA427406_ .Hs.349150	0.41	-2.44	
hypothetical protein FLJ12903	AA778560.NM_022753.Hs.14928	0.41	-2.44	
<i>CUL3</i> : cullin 3	H98621.NM_003590.Hs.78946	0.40	-2.50	
KIAA0874 protein	AA918819.NM_015208.Hs.27973	0.40	-2.50	
<i>PNN</i> : pinin, desmosome associated protein	AA707321.NM_002687.Hs.44499	0.40	-2.50	M
<i>GNS</i> : glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)	AA035347.NM_002076.Hs.334534	0.39	-2.56	
<i>TMSB4X</i> : thymosin, beta 4, X chromosome	AA634103.NM_021109.Hs.378209	0.39	-2.56	
<i>CTNNB1</i> : catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	AA442092_ .Hs.171271	0.39	-2.56	W
<i>ATP2A2</i> : ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch	AA598624.NM_001681.Hs.1526	0.38	-2.63	
<i>KRML</i> : Kreisler (mouse) maf-related leucine zipper homolog	T50121_ .Hs.169487	0.38	-2.63	
<i>PBX3</i> : pre-B-cell leukemia transcription factor 3	W48726_ .Hs.294101	0.38	-2.63	
<i>HNRPAI</i> : hypothetical protein FLJ20707	N93403_ .Hs.334657	0.37	-2.70	
2-ass SR140: U2-associated SR140 protein, 2610101N10Rik	AA459866_ .Hs.7976.KIAA0332 protein	0.37	-2.70	
<i>DYRK1A</i> : dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A,transcript variant 1	AA676749.NM_001396.Hs.75842	0.35	-2.86	
<i>SRM160</i> : Ser-Arg-related nuclear matrix protein (plenty of prolines 101-like)	R26536_ .Hs.18192	0.35	-2.86	
<i>CSNK1A1</i> : acidic protein rich in leucines,casein kinase 1, alpha 1	AA625758.NM_001892.Hs.283738	0.34	-2.94	
DKFZP434A043 protein	AA481540.NM_015396.Hs.102708	0.34	-2.94	
<i>FUS</i> : fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma	AA025166.NM_004960.Hs.337761	0.34	-2.94	
hypothetical protein FLJ10546	AA775444.NM_018133.Hs.129750	0.34	-2.94	
Homo sapiens clone TCCCTA00142: Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1	R35245_ .Hs.326142	0.33	-3.03	
<i>YWHAQ</i> : tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, gamma polypeptide	AA432085.NM_012479.Hs.25001	0.32	-3.13	
<i>HNRPAI</i> : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	AA416785_ .Hs.397430	0.31	-3.23	

<i>SFRS5</i> : splicing factor, arginine/serine-rich 5	AI263109.NM_006925.Hs.166975	0.30	-3.33	
<i>BIG1</i> : brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein1	W89187.NM_006421.Hs.94631	0.29	-3.45	
<i>PPM1B</i> : protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform	H99661.Hs.5687	0.29	-3.45	
hypothetical protein	H05782.Hs.5324	0.28	-3.57	
<i>TF7L2</i> : transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	AA029451.Hs.348412	0.24	-4.17	W
<i>PAPOLA</i> : poly(A) polymerase alpha	T84483.Hs.334648	0.23	-4.35	
<i>KPNB1</i> : karyopherin (importin) beta 1	AA424912.Hs.180446	0.22	-4.55	
TRP-ASP DOMAIN-CONTAINING PROTEIN (WITH WD REPEATS)	AA873339.NM_018315.Hs.31945	0.22	-4.55	
<i>SRY</i> : SRY (sex determining region Y)-box 4	N23606.Hs.351928	0.18	-5.56	
<i>SRM300</i> : RNA binding protein, NEUROFILAMENT TRIPLET H PROTEIN-RELATED	AA776677.NM_016333.Hs.197114	0.16	-6.25	
<i>SFRS7</i> : splicing factor, arginine/serine-rich 7 (35kD)	AA418813.Hs.184167	0.16	-6.25	

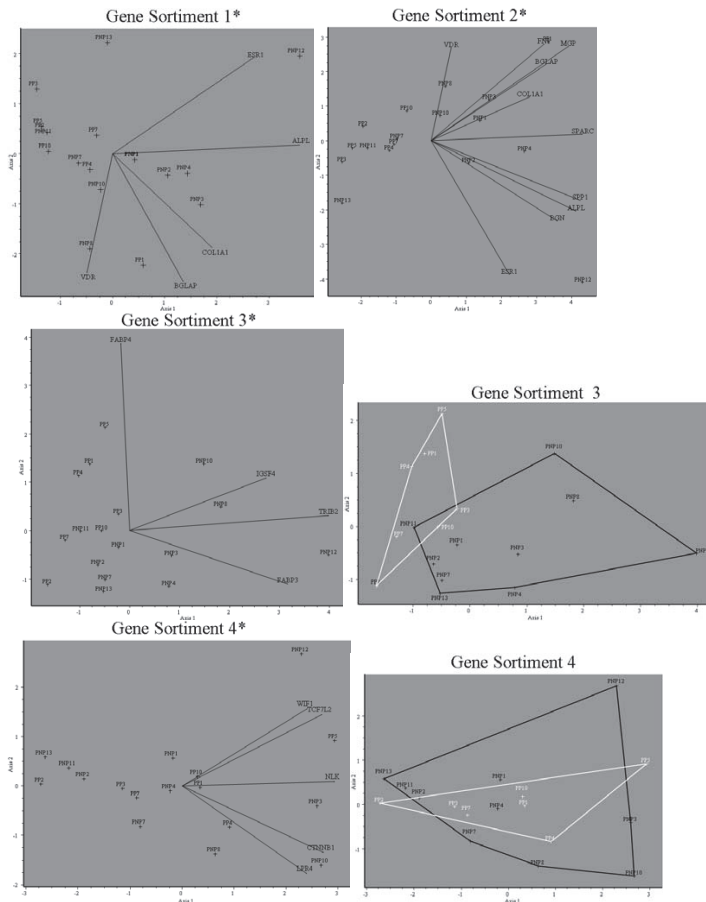
2. melléklet: Az interspecifikus microarray expressziós különbség és a Relative Quantitative Real-Time PCR adatai 32 génre. Ac No HS: *Homo sapiens* gén Accession Number azonosítója. Ac No CE: A Zoo-Cloning eljárással klónozott *Cervus elaphus* gén szekvenálás Accession Number azonosítója, Fold change: a microarray hibridizáció során detektált átlagos génextpressziós eltérés, PP/PNP: a korral járó oszteoporotikus és nem oszteoporotikus páciensek relatív kvantifikációs (RQ) értékeinek aránya, Mann-Whitney U teszt: a Mann-Whitney teszt p értéke (szignifikancia szint $p \leq 0.1$). A szekvenáció homológia százalék értékét BLAST eredmények alapján adtuk meg.

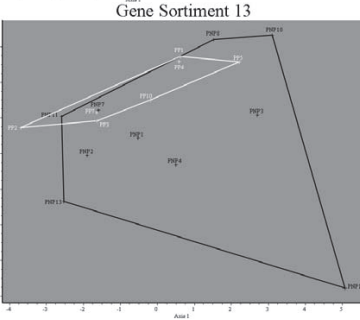
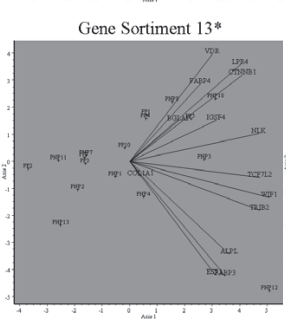
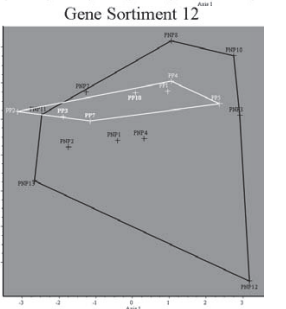
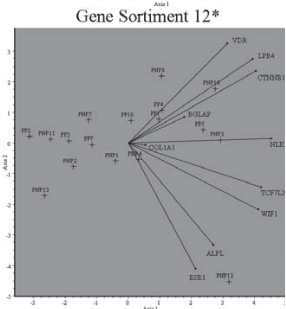
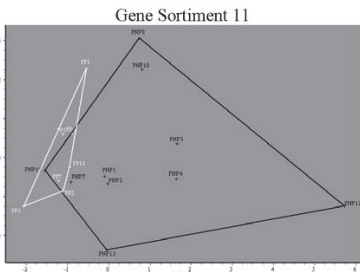
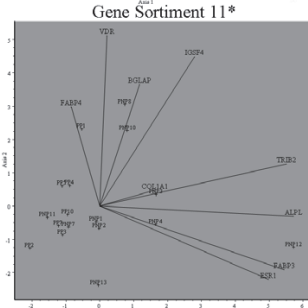
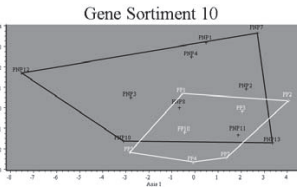
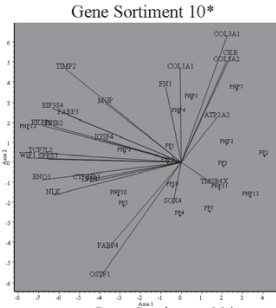
Gén neve	Ac No HS	Ac No CE	Fold change	Géntermék szerepe	ABI Assay ID	PP/PNP	M-W test	Szekvenáció homológia százalék CE/HS BLAST
Szarvasgének								
Oszteoporotikus állapot vs. Regenerálódó állapot								
<i>COL1A1</i> : collagen, type I, alpha 1	NM_000088	EF619481	4,76	csont szerves mátrix 90%-a	Hs00164004_m1	0,39	0,06	621,645 (96%)
<i>EIF3A</i> : eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4	NM_003755	EF619483	4,21		Hs00186772_m1	0,72	0,27	635,691 (91%)
<i>TIMP2</i> : tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	EF619492	3,72	MMP-k inhibitora	Hs00234278_m1	0,65	0,07	522,563 (92%)
<i>SFRS7</i> : splicing factor, arginine/serine-rich 7	NM_01031684	EF619490	3,68		Hs00196708_m1	0,9	0,96	577,618 (93%)
<i>COL5A2</i> : collagen, type V, alpha 2	NM_000393	-	3,27	az I. típusú kollagén fibrillumok növekedését regulálja	Hs00169768_m1	0,7	0,54	
<i>ENO1</i> : enolase 1, (alpha)	NM_001478	EF619484	2,31	limfocitáris proliferáció, növekedési inhibitor hatás	Hs00361415_m1	0,98	0,96	744,838 (88%)
<i>LRP4</i> : low density lipoprotein receptor-related protein 4	NM_002334	-	2,27	endoctézis, a Wnt signaling pathway negatív regulátora	Hs00391006_m1	0,78	0,96	
<i>COL3A1</i> : collagen, type III, alpha 1	NM_000900	-	2,23	csontszövetben nyomokban van jelen	Hs00164103_m1	0,39	0,47	
<i>FKBP2</i> : FK506-binding protein 2	NM_004470	EF619486	2,14	protein folding és vezikuláris transport	Hs00234404_m1	0,58	0,16	470,505 (93%)
Oszteoporotikus állapot vs. Őszi nyugalmi kontroll állapot								
<i>COL5A2</i> : collagen, type V, alpha 2	NM_000393	-	4,11	az I. típusú kollagén fibrillumok növekedését regulálja	Hs00169768_m1	0,7	0,54	
<i>WIF1</i> : Wnt inhibitory factor-1	NM_007191	EF619494	3,99	Wnt fehérjek aktivitását gátolja	Hs00183662_m1	0,86	0,96	681,744 (91%)
<i>CKP</i> : creatine kinase, brain	NM_001633	EF619490	3,9	élet vesz az energia homeosztázisban	Hs00176454_m1	0,61	0,81	816,874 (95%)
<i>Cttnb1</i> : catenin beta 1	NM_001994	EF619482	3,39	kanonikus Wnt signaling downstream effektora	Hs00170025_m1	1,04	0,38	853,895 (95%)
<i>IGSF4</i> : immunoglobulin superfamily, member 4	NM_014333	EF619487	3,38	sejt-sejt interakciók regulátora, pro-apoptotikus és onkogenexpresszív aktivitás	Hs00204937_m1	0,39	0,03	694,753 (92%)
<i>FABP4</i> : fatty acid binding protein 4	NM_001442	EF619485	3,37	zsírsav kötő	Hs00609701_m1	2,59	0,06	441,489 (90%)
<i>COL1A1</i> : collagen, type I, alpha 1	NM_000088	EF619481	3,36	csont szerves mátrix 90%-a	Hs00164004_m1	0,39	0,06	621,645 (96%)
<i>FN1</i> : fibronectin 1	NM_000088	-	2,5	sejthalmozás és migráció folyamatokban vesz részt. kötődik kölcsönhatás fibronectin, integrinnek, kollagénnel	Hs00277509_m1	1,01	0,36	
<i>OSTF1</i> : osteoclast stimulating factor 1	NM_012383	EF619489	2,32	oszteoklaszt-stimulátor	Hs00273458_m1	1,1	0,42	512,554 (92%)
<i>TMS6A4</i> : thymosin, beta 4, X chromosome	NM_021109	EF619493	2,21	élet vesz sejt proliferációban, migrációban és differenciálódásban, elősegíti a β -catenin útvonal aktiválását	Hs00864161_g1	0,18	0,19	412,471 (87%)
<i>BIG1</i> : brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	NM_006421	EF619478	2,12					864,959 (90%)
<i>FKBP2</i> : FK506-binding protein 2	NM_004470	EF619486	2,1	protein folding és vezikuláris transport	Hs00234404_m1	0,58	0,16	470,505 (93%)

Regenerálódó állapot vs. Ószi nyugalmi kontroll állapot

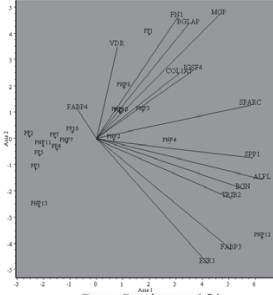
<i>FABP3</i> : fatty acid binding protein 3	NM_004102	-	0,56	kandidáns tumor szupresszor gén, sejtszervi proliferáció negatív regulátora	Hs00269758_m1	0,46	0,07
<i>MGP</i> : matrix Gla protein	NM_009990	-	0,55	mineralizáció negatív regulátora	Hs00179899_m1	0,87	0,54
<i>TRB2</i> : tribbles homolog 2	NM_021643	DQ232795	0,46	MAPK aktivitás regulátora, protein kináz (inhibitor) aktivitás	Hs00222224_m1	0,51	0,07 890/960 (92%)
<i>NLK</i> : nemo-like kinase	NM_016231	EF619488	0,45	MAPK és Wnt signaling pathway kapcsolódó	Hs00212076_m1	1,1	0,96 857/879 (97%)
<i>TMSB4X</i> : thymosin, beta 4, X chromosome	NM_021109	EF619493	0,39	<i>ltd. fenékb</i>	Hs00864161_g1	0,18	0,19 412/471 (87%)
<i>Ctnnb1</i> : catenin beta 1	NM_001940	EF619482	0,39	<i>ltd. fenékb</i>	Hs00170025_m1	1,04	0,38 853/895 (95%)
<i>ATP2A2</i> : ATPase, Ca ²⁺ transporting, Cardiac muscle, slow twitch	NM_001681	EF619479	0,38	endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz	Hs00155939_m1	1,71	0,81 655/693 (94%)
<i>BIG1</i> : brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein1	NM_006421	EF619478	0,29				864/959 (90%)
<i>TCF7L2</i> : transcription factor 7-like 2	NM_030756	EF619491	0,24	Wnt signaling pathway regulátora	Hs00181036_m1	0,8	1 796/862 (92%)
<i>SOX4</i> : SRY (sex determining region Y)-box 4	NM_031107	-	0,18	PTH és PTHrP downstream hatású mediátor csontszövetben	Hs00268388_s1	3,29	0,89
<i>SFRS7</i> : splicing factor, arginine/serine-rich 7	NM_001031684	EF619490	0,16		Hs00196708_m1	0,9	0,96 577/618 (93%)
Humán referencia és diagnosztikus gének							
<i>ALPL</i> : alkaline phosphatase	NM_000478	-	-	ásványi sók depozícióját gátolja	Hs00758162_m1	0,41	0,02
<i>BGLAP</i> : osteocalcin	NM_129173	-	-	regulálja az osteoclastok aktivitását	Hs01587813_g1	1,05	0,96
<i>BGN</i> : biglycan	NM_001711	-	-	potenciálisan a osteocytóma genetikai meghatározásában fontos	Hs00156076_m1	0,52	0,09
<i>COL1A1</i> : collagen, type I, alpha 1	NM_000088	-	4,76	<i>ltd. fenékb</i>	Hs00164004_m1	0,39	0,06
<i>ESR1</i> : estrogen receptor 1	NM_000125	-	-	támogatja az osteoclastok aktivitás szuppresszióját	Hs00174860_m1	0,58	0,54
<i>FN1</i> : fibronectin 1	NM_212474	-	-	<i>ltd. fenékb</i>	Hs00277509_m1	1,01	0,36
<i>MGP</i> : matrix Gla protein	NM_000990	-	-	<i>ltd. fenékb</i>	Hs00179899_m1	0,86	0,54
<i>SPARC</i> : osteonectin	NM_003118	-	-	regulálja a kollagén fibrillozozesist, csontépítés pozitív regulátora,	Hs00234160_m1	0,56	0,19
<i>SPP1</i> : osteopontin	NM_000582	-	-	gátolja a mineralizációt és a remodelinget	Hs00167093_m1	0,58	0,23
<i>VDR</i> : vitamin D(1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	NM_008376	-	-	kalcium ionok abszorpcóját belében	Hs00172113_m1	1,18	0,67

3. melléklet: Standardizált főkomponens analízis, PCA, a 7 korral járó oszteoporotikus és 10 nem oszteoporotikus paciens csontmintáinak génexpressziós mintázata alapján. A konvex poligonok a két betegcsoportot szimbolizálják az első és második ordinációs tengelyen a 6. táblázat szortimentjei alapján. A korral járó oszteoporozisban szenvedő betegeket (PP) fehér színű, míg a nem oszteoporotikus kontroll csoport tagjait (PNP) fekete konvex poligon jelöli. A csillaggal jelölt biplotok a génexpressziók közötti korrelációkat tükrözik.

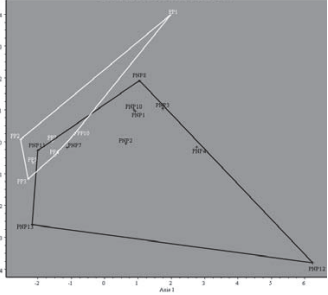




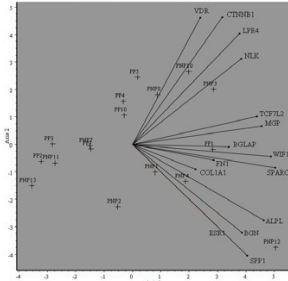
Gene Sortiment 14*



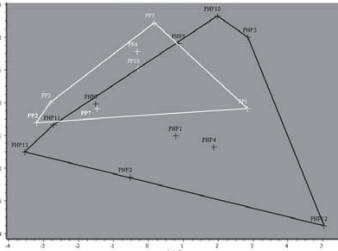
Gene Sortiment 14



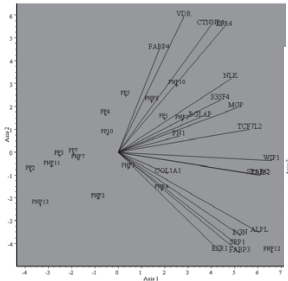
Gene Sortiment 15*



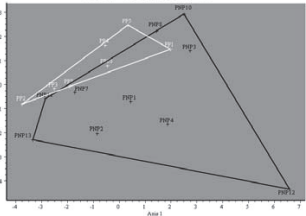
Gene Sortiment 15



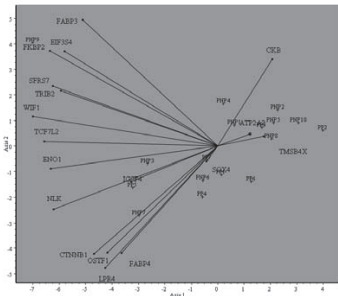
Gene Sortiment 16*



Gene Sortiment 16



Gene Sortiment 9*



12. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTB:	actin beta
ALP:	alkaline phosphatase / alkálikus foszfatáz
APOE:	apolipoprotein E
BGP:	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin) / human oszteokalcin
BMD:	bone mineral density / csont ásványi anyag sűrűség
BMP:	bone morphogenetic protein
cAMP:	ciklikus adenzin monofoszfát
CBFA1:	core binding factor 1
Cre:	Cre-rekombináz
Ct:	threshold cycle number
CVA:	Canonical Variates Analysis / diszkriminancia analízis
DPYD:	deoxipiridinolin
DXA:	Dual energy X-ray absorptiometry / alacsonyabb kettős energiájú röntgen foton abszorpciometria
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ESR1/ER α :	estrogen receptor 1, estrogen receptor alpha / ösztrogén receptor α
EST:	expressed sequence tag
G3PDH:	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDF3:	growth differentiation factor 3
GH:	growth hormone / növekedési hormon
HPLC:	High Pressure Liquid Chromatography / nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
IL-2:	interleukin-2
IP3:	inositol 1,4,5-triphosphate / inozitol trifoszfát
JNK:	JUN N-terminal kinase, mitogen-activated protein kinase 8
LB:	Luria-Bertani táptalaj
LH:	luteinizáló hormon / sárgatest serkentő hormonon
LRP5:	lipoprotein receptor-related protein 5
MAPK:	mitogene activated protein kinase
M-CSF:	macrophage colony-stimulating factor 1
MMP:	matrix metalloproteinase
OVX:	ovariectomy / ovárium eltávolítás
PCA:	Principal Components Analysis / főkomponens analízis
PICP:	kollagén C-terminális propeptid
PKA:	protein kinase A
PKC:	protein kinase C
PNP:	posztmenopauzás, nem oszteoporotikus
PP:	posztmenopauzás, oszteoporotikus
PRL:	prolaktin
PTH:	parathormon
PTHrP:	parathyroid hormon related peptide
PYD:	piridinolin
RANKL:	receptor activator of NF-kappa-B ligand
RQ:	relative quantity / génspecifikus mRNS-ek relatív mennyiségét jellemzi
SDS:	sodium-dodecil-sulfate / nátrium-dodecil-szulfát

SNP:	small nucleotid polimorphism
SSC:	konyhasós nátrium-citrát
TGF β :	transforming growth factor β
TNF:	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TRAP:	tartarate resistant acidic phosphatase / tartarát rezisztens savi foszfatáz
VDR:	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor / D-vitamin receptor
VDRE:	vitamin D responsive element / D-vitamin válaszoló elem
WHO:	World Health Organization / Egészségügyi Világszervezet
WNT:	a Drosophila Wingless ortológjai

13. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Borsy Adrienn

2009.08.27.

I. Nemzetközi publikációk és előadások (11)

Referált tudományos folyóiratban megjelent publikációk (5)

Kósa JP, Balla B, Speer G, Kiss J, **Borsy A**, Podani J, Takács I, Lazáry A, Nagy Z, Bácsi K, Orosz L, Lakatos P. *Effect of menopause on gene expression pattern in bone tissue of nonosteoporotic women*. Menopause. Volume: 16 Issue: 2 Pages: 367-77 Published: 2009 Mar-Apr. IF: 3.672

Borsy A, Podani J, Stéger V, Balla B, Horváth A, Kósa JP, Gyurján I Jr, Molnár A, Szabolcsi Z, Szabó L, Jakó E, Zomborszky Z, Nagy J, Semsey S, Vellai T, Lakatos P, Orosz L. *Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis*. Molecular Genetics and Genomics. Volume: 281 Issue: 3 Pages: 301-13 Published: 2009 Mar. IF: 2.978

Balla B, Kósa JP, Kiss J, **Borsy A**, Podani J, Takács I, Lazáry A, Nagy Z, Bácsi K, Speer G, Orosz L, Lakatos P. *Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women*. Calcified Tissue International. Volume: 82 Issue: 1 Pages: 12-26 Published: 2008 Jan. IF: 2.435

Gyurján I Jr, Molnár A, **Borsy A**, Stéger V, Hackler L Jr, Zomborszky Z, Papp P, Duda E, Deák F, Lakatos P, Puskás LG, Orosz L. *Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis*. Molecular Genetics and Genomics. Volume: 277 Issue: 3 Pages: 221-35 Published: 2007 Mar. IF: 2.978

Molnár A, Gyurján I, Korpos E, **Borsy A**, Stéger V, Buzás Z, Kiss I, Zomborszky Z, Papp P, Deák F, Orosz L. *Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus**. Molecular Genetics and Genomics. Volume: 277 Issue: 3 Pages: 237-48 Published: 2007 Mar. IF: 2.978

Referált tudományos folyóiratban megjelent konferencia összefoglalók (4)

Balla B., Kósa JP., Kiss J., **Borsy A.**, Podani J., Takács I., Lazáry Á., Nagy Z., Bácsi K., Speer G., Orosz L., Lakatos P. *Effect of estrogen deficiency on gene expression pattern in the bone tissue of postmenopausal versus premenopausal healthy women*. Journal of Bone and Mineral Research. Volume:22 Supplement: Suppl. 1 Pages: S261-S261 Published: 2007 Sep. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting Honolulu IF: 6.443

Gyurjan I, **Borsy A**, Molnar A, *Initiation of bone formation during antler development*. Bone. Volume: 39 Issue: 5 Pages: S26-S26 Published: 2006 nov. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research, Wien IF: 3.90

Borsy A, Balla B, Gyurján I, Stéger V, Molnár A, Szabolcsi Z, Kósa J, Zomborszky Z, Papp P, Vellai T, Lakatos P, Orosz L. *Red deer biology for biomedical research on human osteoporosis*. ECTS 33rd European Symposium on Calcified Tissues Prague, Czech Republic, Calcified Tissue International. Volume:78 Supplement: Suppl. 1 Pages: S74-S74 Published: 2006 IF 2.435

Szabolcsi, Z., Egyed, B, Zenke P, **Borsy A**, Padar Z, Zoldag L, Buzas Z, Rasko I and Orosz, L. *Genetic identification of red deer using autosomal STR markers*. Forensic Science International Genetics Supplement Series. Volume 1 Issue 1 Pages: 623-624 Published: Aug 2008, Progress in Forensic Genetics 12 - Proceedings of the 22nd International ISFG Congress IF: 1.864

Nemzetközi tudományos intézetekben tartott szakmai előadások (2)

Borsy A, Podani J, Balla B, Kósa JP, Gyurján I Jr, Lakatos P, Orosz L. *Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis*. Practical work on MDS and ELISA diagnostic systems, Department of Bionano Technology, Kyungwon University, Seoul, 2008. Aug.

Borsy A, Orosz L. *Cyclic gene expression changes in the skeleton of red deer*. Practical Course on Anatomy and Embryology of the Mouse (EMBO), Zagreb University School of Medicine, Zagreb, 2006. Sept.

II. Hazai publikációk és előadások (13)

Hazai referált tudományos folyóiratban megjelent publikációk (1)

Balla B, Kósa J, Takács I, Kiss J, Podani J, **Borsy A**, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Orosz L, Lakatos P. *A menopauza hatása a csontszöveti génkifejeződésre posztmenopauzális és premenopauzális korú nem oszteoporotikus nőkben*. Magyar Belorvosi Archívum Volume: 61 Issue: 3 Pages: 208-219 Published: 2008

Hazai konferencia összefoglalók (9)

Balla B, Kósa JP, Takács I, Kiss J, Podani J, **Borsy A**, Lazáry Á, Bácsi K, Speer G, Orosz L, Lakatos P. *Ösztrogén hiányában fellépő génexpressziós változás vizsgálata posztmenopauzális és premenopauzális nem osteoporosisos nők csontszövetében*. Ca és Csont. Volume: 10 Issue: 2 Pages: 51-51 Magyar Osteoporosis és Osteoarthrológiai Társaság XVI. Kongresszusa, Balatonfüred. Published: 2007 May

Balla B, **Borsy A**, Kósa JP, Kiss J, Lazáry Á, Takács I, Nagy Z, Speer G, Bácsi K, Orosz L, Lakatos P. *Génexpressziós mintázat vizsgálata posztmenopauzában levő egészséges és oszteoporotikus nők csontszövetében*. Ca és Csont. Volume: 9 Issue: 1 Pages:

11-11 Magyar Osteoporosis és Osteoarthrológiai Társaság XV. Kongresszusa, Balatonfüred. Published: 2006 May

Balla B, Kósa J, Takács I, Kiss J, **Borsy A**, Podani J, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Orosz L, Lakatos P. *Génexpressziós mintázat vizsgálata prae- és postmenopausas egészséges nők csontszövetében*. Magyar Belorvosi Archivum. Volume: 59 Issue: 1 Pages: 24-24 Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XXI. Kongresszusa, Debrecen. Published: 2006. május

Sziráki Sz, **Borsy A**, Papp P, Orosz L. *Gímszarvas agancsfejlődésében specifikusan megnyilvánuló gének azonosítása*. Eötvös Lorand Tudományegyetem, Tudományos Diákköri Konferencia, Budapest és Országos Diákköri Konferencia, Szeged. Published: 2004

Kerényi F, **Borsy A**, Papp P, Orosz L. *A szarvasagancsban megnyilvánuló gének azonosítása*. Szent István Egyetem, Tudományos Diákköri Konferencia, Gödöllő. Published: 2004

Gyurján I, Molnár A, **Borsy A**, Stéger V, Zomborszky Z, Puskás L, Deák F, Lakatos P, Orosz L és Papp P. *Gímszarvas genetika: agancsfejlődéstől a csontritkulásig*. V. Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok. Pages: 56 Published: 2003

Molnár A, Korpos É, Gyurján I, **Borsy A**, Stéger V, Zomborszky Z, Deák F, Orosz L, Papp P. *Az agancsban eltérő expressziót mutató gének in situ vizsgálata*. V. Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok. Pages: 120 Published: 2003

Borsy A, Gyurján I, Molnár A, Stéger V, Zomborszky Z, Orosz L, Papp P. *A szarvasagancs intenzív növekedésében és fejlődésében szerepet játszó gének azonosítása*. V Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok. Pages: 121 Published: 2003

Molnár A, Gyurján I, **Borsy A**, Stéger V, Orosz L és Papp P. *Az agancsfejlődést determináló gének azonosítása*. A Magyar Biokémiai Egyesület Mol. Biol. Szakosztálya 7. Munkaértekezlet, Keszthely, Pages: 137 Published: 2002

Hazai tudományos intézetekben tartott szakmai előadások (3)

Borsy A., Podani J, Balla B, Gyurján I, Stéger V, Molnár A, Szabolcsi Z, Kósa J, Puskás L, Zomborszky Z, Lakatos P, Orosz L. *Ciklikus fiziológiás oszteoporózis és regeneráció a gímszarvasban*. Állatbiotechnológiai kutatások Magyarországon. MTA, Felolvasó terem, Budapest 2006 szeptember 29.

Borsy A. *Ciklikus génexpressziós változások a gímszarvas vázcsontozatában*. Genetikai Műhelyek Magyarországon IV. Minikonferencia. MTA Szegedi Biológiai Központ (SZBK). Szeged 2005.09.09.

Borsy A, Papp PP, Orosz L. *Ciklikus génexpressziós változások a gímszarvas vázcsontozatában*. Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ (MBK) Napok. Gödöllő 2004