
EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET
GENETIKAI TANSZÉK

**A gímszarvas csontsűrűség változásáért felelős gének azonosítása az
agancsiklus alatt**
Doktori (PhD) értekezés
Stéger Viktor



BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Doktori iskola vezetője: Dr. Erdei Anna, MTA rendes tagja
KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA DOKTORI PROGRAM
Programvezető: Dr. Orosz László, MTA rendes tagja
Témavezető: Dr. Orosz László, MTA rendes tagja

BUDAPEST
2011

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A gímszarvas, <i>Cervus elaphus</i>	8
2.1.1. Általános jellemzés	8
2.1.2. A trófea értékmérő tulajdonságai	10
2.1.3. A gímszarvas genetikája	12
2.2. A gímszarvas ciklikus fiziológiás oszteoporózisa	14
2.3. Agancsfejlődés biológiai háttere	16
2.3.1. A fejlődő agancs felépítése	18
2.3.2. Általános hormonális és lokális hatások az agancsnövekedés alatt	21
2.3.3. Az agancs növekedés idegrendszeri szabályozása	26
2.4. A vázrendszer, csontfejlődés	28
2.4.1. Az endochondrális csontosodás és a növekedési porclemez	29
2.4.2. Az endochondrális csontosodás molekuláris mechanizmusa	31
2.2.3. A csontszövet élettana, csontátépülés és mineralizáció	34
2.4.4. Az oszteoporózis jelentősége és genetikai háttere	42
3. CÉLKITŰZÉSEK	45
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	47
4.1. Anyagok	47
4.1.1. Standard oldatok	47
4.1.2. Felhasznált baktériumtörzsek, fágok és táptalajok	48
4.2. Mintavételek	48
4.2.1. Szarvas agancs szövetek	48
4.2.2. Szarvas magzati porcszövetek	49
4.2.3. Gímszarvas csont mintavétel	49
4.2.4. Humán csontszövet minták	49
4.3. Szövetteni vizsgálatok	50
4.4. DNS izolálás	50
4.5. RNS izolálás	50
4.6. cDNS szintézis és könyvtárak létrehozása	51
4.7. Szarvas agancs cDNS microarray konstrukció létrehozása, „Agancs chip”	51
4.7.1. cDNS könyvtárak konvertálása	51
4.7.2. Klónok amplifikálása, méret szelektálása	52
4.7.3. Chip nyomtatás	52
4.7.4. Próbakészítés, hibridizálás és adatfeldolgozás	52
4.7.5. A kapott cDNS klónok szekvenálása	52
4.8. Szarvasmarha oligonukleotid microarray technológia (Affymetrix)	53
4.8.1. Próbakészítés, hibridizáció és az adatok beolvasása	53
4.8.2. Adatok feldolgozása és kiértékelése	54
4.9. PCR, DNS fragmentek klónozása	55
4.10. Northern hibridizáció	56
4.11. Kvantitatív valós idejű Q-RT-PCR	56
4.12. <i>In situ</i> hibridizáció agancs szöveteken	56
4.13. GC-MS extrakció és metabolit analízis	57
4.14. Bioinformatikai vizsgálatok	57
4.15. Többváltozós transzkriptomikai statisztikai adatelemzések	57

5. EREDMÉNYEK	59
5.1. A mineralizáló agancs porcszövetek vizsgálatai	59
5.1.1. Agancsporc mineralizációjának szövettani leírása	60
5.1.2. Az agancs cDNS chip létrehozása	62
5.1.3. Gének szűrése az Agancs Chipen: A mineralizáló porc génjei	63
5.1.4. Northern hibridizáció	66
5.1.5. A génextpressziók térbeli lokalizálása <i>in situ</i> hibridizációval	69
5.2. Csontsűrűség változás az agancs ciklus alatt	71
5.2.1. A vázcsontozat anatómiai elváltozásai az agancs ciklus alatt	71
5.2.2. A robosztus csont építés génjei: Bovine Affymetrix microarray	74
5.2.3. Affymetrix microarray adatok validálása Northern hibridizációval	79
5.2.4. Csont metabolitok elemzése, GC-MS analízis	82
5.2.5. „Agancs gének” a humán oszteoporózis diagnosztikában (Q-RT-PCR)	84
5.3. A gímszarvas col1A1 génje promóterének klónozása („Zoo Cloning”)	86
5.4. Az agancs gének bioinformatikai vizsgálatai	88
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	92
6.1. A csontmetabolizmus szabályozása az agancsfejlődés alatt	92
6.2. A mineralizáló agancs csúcs: Runx2 útvonal	95
6.3. Agancs csont: robosztus csontfejlődés	97
6.4. Agancs gének és humán csontritkulás	101
7. ÖSSZEFOGALÁS	102
8. JAVASLATOK	104
9. SUMMARY	106
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107
11. IRODALOMJEGYZÉK	108
12. MELLÉKLETEK	121

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGC:	Antler growth center/Agancs növekedési központ
ALP:	Alkalikus foszfatáz
AP:	Antlerogenic periosteum
BMD:	Bone mineral density, csontsűrűség
BMP:	Bone morphogenetic protein
BGLAP:	human ortholog of <i>osteocalcin</i> / az osteocalcin gén humán ortológja
BSA:	Bovine Serum Albumin
CGRP:	Calcitonin gene-related peptide
Col1A1:	I. típusú kollagén alfa 1 lánc
CVA:	Canonical variates analysis/Diszkriminancia Analízis
ECM:	Extracelluláris mátrix
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
ER:	Ösztrogén receptor
FGF2:	Fibroblast growth factor 2
FGFR:	Fibroblast growth factor receptor
GC-MS:	Gas chromatography-mass spectrometry
GH:	Növekedési hormon
IGF:	Insulin-like growth factor
IHH:	Indian hedgehog
MAE:	Mops-edta
Oc:	Osteocalcin, human ortholog BGLAP
Osx:	Osterix
PFU:	Plaque forming unit
PBS:	Phosphate buffered saline
PCA:	Principal components analysis/ Főkomponens Analízis
PNP:	Non-osteoporotic patients
PP:	Patients affected with age-related osteoporosis
PTH:	Parathormon
PTHrP:	Parathormon receptor
PTHrP:	Parathyroid hormone-related protein
RA:	Retionic acid
Runx2:	Runt-related transcription factor 2, régi neve Cbfa1
SHH:	Sonic hedgehog
SNP:	single nucleotid polymorphism/egy bázispárt érintő polimorfizmus
SDS:	Nátrium-dodecil-szulfát
SSC:	Konyhasós nátrium-citrát
SPARC:	osteonectin
TBE:	Trisz-bórsav-edta
TGF:	Transforming growth factor
TGFβ:	Transforming growth factor beta/transzformáló növekedési faktor béta
WNT:	A Drosophila Wingless ortológjai, wingless jelátviteli út
AB:	Antler bone, agancs csont
VB:	Vertebra bone, csigolya csont
RB:	Rib bone, borda csont
Stag1:	oszteoporózisos gímszarvas bikából származó minta neve
Stag2:	visszapótláskori gímszarvas bikából származó minta neve
Stag3:	nyugalmi gímszarvas bikából származó minta neve
bp:	bázispár

kbp:	kilobázispár
EMBOSS:	European Molecular Biology Open Software Suite
FGF:	fibroblast növekedési faktor
TGF:	transzformáló növekedési faktor béta
MGP:	matrix gamma-carboxyglutamate protein
PPARG:	peroxisoma proliferátor aktivált receptor gamma
RANK:	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL:	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
PICP:	I. típusú kollagén C-terminális propeptid
GAPDH:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GH:	növekedési hormon
IVT:	In vitro transzkripció

1. BEVEZETÉS

"A regenerálás eme évente ismétlődő, szinte oktalannak tetsző erő mutatójának, az életenergiák e látszólagos eltékozlásának magyarázatát a természet olyan titkos fiókba zárta, melynek lakatkulcsára még ma sem sikerült rátalálnunk."

Széchenyi Zsigmond (A szarvasok nyomában)

Az európai gímszarvas (*Cervus elaphus*) Magyarország faunájának legjelentősebb nagyvadja. A genetikai állományát tekintve a világ legjobbja. A legkiválóbb trófeák többsége a dél-dunántúli területen található (Zala, Somogy, Baranya, Tolna, Duna-Dráva Nemzeti Park Gemenc). A magyarországi gímszarvas állomány nemzeti kincs, „hungarikum”.

A gímszarvas agancsának fejlődése a leggyorsabb és leghatékonyabb csontfejlődés az élővilágban. Az emlősök között az egyetlen olyan szerv, amely évente képes teljesen regenerálódni. Fejlődése sok hasonlóságot mutat a csöves csontok fejlődésével, amelyekben endochondrális csontosodással zajlanak a csontfelépülési folyamatok (Rucklidge *et al.*, 1997). Ennek következtében az agancs, mint a csontfejlődés modellrendszere, nagy jelentőségre tett szert.

A gímszarvas bikák februártól lehullatják csontos agancsukat, amelyet szinte azonnal az új agancs építése követ. Az agancsfejlődési periódus utolsó néhány hete a mineralizáció legintenzívebb időszaka. Mivel igen rövid idő alatt egy akár 10-15 kg-os csonttömeget kell létrehozni, a szükséges ásványi anyagok mobilizálása kizárólag a táplálkozás útján nem lehetséges. Így ideiglenesen (fiziológiai csontitkulást indukálva az érintett szervekben) a vázcsontozatból, pl. bordákból, csigolyákból, lapockából, illetve a szegycsontból transzportálja a szervezet a kalciumot és foszfátot az agancs mineralizációja során. Később az ásványi sók (július - augusztus során) a dús vegetációból táplálkozás útján visszapótlódnak, azaz a csontsűrűség regenerálódik a csontvázban.



1. ábra: Gímszarvasok (*Cervus elaphus*). A Molecular Genetics and Genomics (MGG) címlapját 2011-től díszítő felvétel. Hivatkozással a folyóiratban közölt publikációkra. Az MGG a nemzetközi tudomány elsőként alapított genetikai folyóirata, Springer 1908. (Pannon Lovasakadémia szarvasfarmja, Bószénfa)

Az agancsképződés és a vele kapcsolt fiziológiás oszteoporózis folyamata nagy jelentőséggel bír orvos-biológiai szempontból is, mert rendkívül rövid idő alatt zajlik le a humán oszteoporózishoz képest, jó lehetőséget adva a csontépítés és csontbontás genetikai hátterének tanulmányozására.

A fejlett országokban, közöttük hazánkban is civilizációs népbetegség az oszteoporózis, amely a lakosság 10%-át érinti. A csonttrikulánsnak komoly halálozási, életminőségi, társadalmi és anyagi következményei vannak. Jelenlegi ismereteink szerint a csonttömeget és a csontvesztés sebességét 70%-ban genetikai, 30%-ban környezeti tényezők határozzák meg. Minden, ami a betegség korai diagnózisát, illetve kezelését elősegíti, hatalmas előrelépést jelent.

Korábbi munkánk során azonosítottunk olyan géneket, amelyek eltérően expresszáltak a gyorsan osztódó agancsszövetekben. Az agancs jellemzője a gyors osztódás, amely mindig szabályozott keretek között történik, eltérően a rákos szövetektől (Korpos *et al.*, 2005; Molnár *et al.*, 2007; Gyurján *et al.*, 2007; Villányi *et al.*, 2008). Azonosítottunk olyan géneket is, amelyek részt vesznek a vázcsontozat fiziológiás oszteoporózisában (Borsy *et al.*, 2009).

Jelen disszertációban közreadott munkában kifejlesztettünk egy „Agancs Chipet”, valamint egy szarvasmarha 24K cDNS platformra alapított heterológ microarray technológiát. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a gímszarvas bika csontosodó barkás agancsszövetei és a vázcsontozat a génexpressziós szintjeit. Kimutattuk, hogy a barkás agancs csontosodó részében erőteljesen expresszálódik a *coll1A1*, *coll1A2*, *col3A1*, *ibsp*, *mgp*, *sparc* és az *osteocalcin* gén. Eredményeink arra utalnak, hogy a *runx2* és *osx* (Nakashima *et al.*, 2002; Komori, 2010) transzkripció faktorok génjei fokozott expressziójának kulcs szerepe van a fent említett gének heves működésében. Integráltuk a génexpressziós és GC-MS metabolit vizsgálatok eredményeit abból a célból, hogy magyarázatot találjunk az agancs és a vázcsontozat közötti ásványi anyag forgalomra. Fel kívánjuk hívni a figyelmet a gímszarvas gének lehetséges felhasználhatóságára az emberi csonttritkulás kutatásában és klinikai diagnosztizálásában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A gímszarvas, *Cervus elaphus*

2.1.1. Általános jellemzés

A gímszarvas (*Cervus elaphus*) a párosujjú patások rendjének (*Artiodactyla*) szarvasfélék (*Cervidae*) családjába tartozik. A szarvasfélék az egész északi féltekén elterjedtek (Holarktikus). Az Antarktisz, Ausztráliát, Madagaszkárt, Közép- és Dél-Afrikát, valamint Új-Zélandot nem népesítette be. Új-Zélandra és Chilébe, ahol eredetileg nem volt őshonos a gímszarvas betelepítették. Új-Zéland a világ legnagyobb barkás agancs és szarvashús exportőre.

A kérődzők közül a homloknyúlványosok (*Pecora*) főcsaládjába sorolt agancsos szarvasfélék (*Cervidae*) kb. 20 millió évvel ezelőtt Közép-Ázsiában jelentek meg. A Pliocén földtörténeti korszakban (kb. 10 millió éve) elterjedtek változatos nagyságú villás agancsú szarvasok. A koronás agancsú szarvas ősei kb. 2 millió éve, a Pleisztocén korszakban jelentek meg. A ma ismert 68 kromoszóma számú gímszarvas rassz az utolsó jégkorszakot követően a Holocén korban (kb. 20 ezer éve) különböző változatokban terjedt el a Földön. A szarvasfélék családja az elülső végtag ötödik lábközépcsont anatómiai alakulása alapján újvilági és óvilági csoportra osztható. Hazai agancsos vadjaink közül az őzek alcsaládja (*Odocoileinae*) az óvilági csoportba tartozik, a valódi szarvasok alcsaládjába (*Cervinae*) sorolt dámvad és gímszarvas pedig az újvilágiba.

Az agancs formája taxonómiai bélyeg, amely a szarvasfélék családján belül a fajok megkülönböztetésére is alkalmas. Fajon belül pedig az alfajok, sőt egyedek azonosítására is alkalmas (Szederjei, 1960). A *Cervidae* család 17 nemzetséget és kb. 53 fajt foglal magába, amelyekről részletes leírást ad Széchenyi Zsigmond „A szarvasok nyomában” című könyvében (Széchenyi, 1979). Európában a legkiválóbb állományok Közép-európában és a Balkánon élnek (Magyarország, Horvátország, Szerbia, Románia, Bulgária). A magyar, elsősorban a dél-dunántúli, állomány kiválósága a gímszarvas számára optimális élőhely meglétének és a tudatos vadgazdálkodásnak köszönhető. A legtöbb világső trófea hazánkból került ki. A gímszarvasok tisztásokkal és rétekkel tarkított lombos (pl. tölgyes) és elegendő erdőket kedvelik, a legjobb életteret a folyók árterei biztosítják számukra, például a Duna és a Dráva melléke. A gímszarvasok ún. rudlikban élnek, amelyek - a bögési időszakot leszámítva - általában csak tehenekből és borjaikból vagy csak bikákból állnak. Alfajtól függően 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. Hazánk állományára a nagyobb méretek jellemzőek. Az ivari dimorfizmus ezen kívül alkati és etológiai eltérést is mutat, amelyek közül legfontosabb a bikákon másodlagos ivarjellekként fejlődő agancs. Eltekintve a borjak pettyezésétől, amely kéthónapos korban eltűnik, a gímszarvason nincs mintázat, szőrzete télen szürkésbarna, nyáron vörhenyesbarna (Faragó, 2002). A gímszarvas kecses mozgása és testalkata erőteljességgel párosul. Szaporodási időszakuk, a szarvasbögés ideje szeptembere esik. A borjak a következő év májusában jönnek a világra. A tehenek általában csak egy borjút ellenek, amely a következő ellésig marad az anyával.

2.1.2. A trófea értékmérő tulajdonságai

A trófea értéke két tulajdonságtól függ, egyrészt az agancs térfogatától, amelyért a robosztus porcfejlődésben szerepet játszó gének a felelősek, amelyek kialakítják a trófea alakját és térfogatát, másrészt fontos értékmérő tulajdonsága a trófea tömege, amely attól függ, hogy az állat mennyire képes a vázcsontozatából az ásványi anyagokat mobilizálni az agancsába, és milyen gyorsan tudja a vázcsontozatában a fiziológiás oszteoporózisos állapotot regenerálni. Mivel az agancs az egyed reprodukációs sikerességében kulcs szerepet játszik, a porc és csontfejlődési génekre mintegy 20 millió éve már pozitív szelekciós nyomás nehezedik (ld. A 2.1.1. fejezetben).

Kezdetben a trófeát szemmérték alapján bírálták az első trófeakiállítások idején a múlt század végén (pl. ágak száma alapján). A századforduló táján alakult ki az igény, hogy a legjellemzőbb közös tulajdonságokat írásban rögzítsék. Az 1896-os kiállításon alkalmaztak először pontozásos bírálatot, majd pedig megszületett az első igazi bírálati képlet, amelyet készítője, a Budapesti Állatkert egykori igazgatója a Nádler Herbert után, Nádler-képletnek neveztek el. Ezt később többször módosították jelenleg alábbi nemzetközi képlet (CIC) alapján bírálják az agancsokat:

Jobb és bal agancsszár hossz átlaga cm	x 0,5
Jobb és bal szemág hossz átlaga cm	x 0,25
Jobb és bal középpág hossz átlaga cm	x 0,25
Jobb és bal koszorú körméret átlaga cm	x 1
Jobb szár körmérete a szem- és középpág között cm	x 1
Bal szár körmérete a szem- és középpág között cm	x 1
Jobb szár körmérete a középpág és korona között cm	x 1
Bal szár körmérete a középpág és korona között cm	x 1
Száraz agancs tömege kiskoponyával mérve	x 2
Ágak száma	x 1

Szépségpontok:

- Szín	0-2 pont
- Gyöngyözés	0-2 pont
- Ágvégek	0-2 pont
- Jégágak	0-2 pont
- Korona	0-10 pont
Terpesztés:	0-3 pont
Esetleges levonások:	1-3 pont

Σ:

170-189,9 pontig	bronzérem
190-209,9 pontig	ezüstérem
210 ponttól	aranyérem
Nemzeti kincs érték ponthatár:	240 pont

Megjegyzendő, hogy a szakértők szerint az eredeti Nadler-képlet jobban kifejezi a trófea értékét, mint a CIC pontszám. A hazai állomány minősítések a Nádler képlet lenne az előnyösebb, mivel jobban kifejezi az agancs robosztusságát, „ösi” típusát.

A gímszarvas bika 11-13 éves életkorra éri el trófeaértékének a csúcsát. A gímszarvas agancsok trófeabírálatakor mérhető tulajdonságokat és szépségpontokat is figyelembe veszik, ezek összesített bírálati pontértéke határozza meg a trófea minősítését, az állat vadászati értékét és a vadgazdálkodás színvonalát.

Az agancs tehát a természetes szelekcióhoz, s ennek kapcsán a fajfenntartáshoz szükséges fegyvere a szarvasbikának, de nemcsak fegyvere, hanem egyúttal a hímek dominancia jelzője is. A jelenséget „display”-nek nevezzük

A kapitális agancsú szarvasbika már a puszta megjelenésével is tekintélyt kelt gyengébb agancsú társai előtt, és aktív küzdelme nélkül „birtokolhatja a szarvastehenek háremét”, s jut ez által szaporodási előnyhöz.

2.1.3. A gímszarvas genetikája

A párosujjú patások génértékezésének (köztük a gímszarvasénak is) az volt a fő célja, hogy termeléssel kapcsolatos mennyiségi jellegeket (QTL) azonosítsanak. A térképezéshez két fő markertípus használhattak (O'Brien *et al.*, 1993). Az egyik az ún. I-es típusú markerek, amelyek a fajok között erősen konzerváltak, de fajon belül nem variábilisak. A másik, az ún. II-es típusú markerek csoportja, amelyek általában polimorfok fajon belül, de alig konzerváltak a fajok között (pl. mikroszatelliták). Az összehasonlító génértékezés, azaz a gének helyzetének és sorrendjének fajok közötti összehasonlítása, alkalmas a genom-szerveződés evolúciós aspektusainak feltárására, valamint alkalmazható egy ismeretlen génértékű faj génértékének megismerésére egy már jól feltérképezett faj térkép adatai alapján. A gímszarvas QTL-ek térképezésének célja a hús- és agancstermeléssel kapcsolatos mennyiségi jellegek DNS markerekhez kapcsolása. Ebben segítséget nyújt az emlősök összehasonlító génértékezése is (Orosz, 2001). A gímszarvas és a milu, vagy más néven Dávid-anya szarvasa (*Elaphurus davidianus*), keresztezése új fejezetet nyitott az interspecifikus keresztezések és a kérdőzök génértékezésének történetében. E két rokon faj estében a valós gének sorrendje azonos a génértéken, a gének szekvenciája pedig nagyon erősen konzervált. Ugyan akkor a mikroszatelliták már kellően változatosak. Hasonló a helyzet, mint a *Mus spretus* és *Mus musculus* egér fajok estén (Bonhomme *et al.*, 1984). A két szarvas faj mind megjelenésükben (az agancs, a láb és a farok morfológiája), mind biológiájukban (szezonális, betegségek elleni rezisztencia, viselkedés) jelentősen eltérnek egymástól, azonban kromoszóma számuk megegyezik ($2n=68$) és kariotípusuk is rendkívül hasonló (Wang, 1988). A két faj hibridjei fertilisek, méghozzá a Haldane fajhibridekre vonatkozó szabállyal ellentétben a hímek is. Ez a génértékezéshez szükséges nagy egyedszámú F2 backcross populáció létrehozásánál volt rendkívül előnyös. Megoldották mesterséges megtermékenyítést is a backcross F2, azaz térképező populáció létrehozásához: gímszarvas x milu hibrid hím spermájával megtermékenyítettek nagyszámú gímszarvas tehenet és a népes utód populációt vizsgálták.

A gímszarvas térképezésekor sikeresen alkalmazhatóak voltak az ún. I-es típusú markerek a kapcsoltsági csoportok meghatározásához (Tate *et al.*, 1995). További térképpontok azonosítására szarvasmarha és birka mikroszatellitákat (II-es típusú markerek) is felhasználtak (Slate *et al.*, 2002). Ezek alapján 33 autoszómális

kapcsoltsági csoportot azonosítottak. Az így kapott gímszarvas térkép 2532 cM hosszú. Összehasonlításként a szarvasmarha térképe 3532 cM (Barendse *et al.*, 1994), a birkáé 3063 cM (de Gortari *et al.*, 1998). A gímszarvas genom térkép rövidegének oka lehet például az, hogy nem elég nagy a térképmarkerek sűrűsége, illetve az, hogy az interspecifikus hibridekben a rekombinációs ráta alacsonyabb. Mindazonáltal a gímszarvas 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.

A gímszarvas teljes genomja szekvenálását elvégezték Új-Zélandon. A szekvencia nem publikus. A fehérfarkú szarvas vagy más néven virginiai öszvérszarvas (*Odocoileus virginianus*) géntérképét az Egyesült Államokban határozzák meg (Seabury *et al.*, 2011).

2.2. A gímszarvas ciklikus fiziológiás oszteoporóziisa

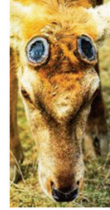
A gímszarvas bika vázcsontozatának ciklikus fiziológiás oszteoporóziisa és annak regenerációja az agancsnövekedés (éves ciklikusága) következtében alakul ki.

A tél végének közeledtével, mikor a nappalok egyre hosszabbak lesznek, a szarvasbikák korcsoportonkénti késéssel elkezdik elhullajtani az előző évi fejdíszüket. Az új agancs képződése néhány nappal később már növekedésnek is indul, amely mintegy 110-130 nap alatt éri el teljes kifejléttségét. Ez a folyamat rendkívül intenzív, akár napi 15-20 dkg-os szövetgyarapodás mellett játszódik és ez a robosztus növekedés az agancs napi 1-2 cm-es növekedési ütemét is elérheti. A szarvasfélék és így a gímszarvas agancsának növekedése és fejlődése az állatvilágban ismert legintenzívebb csontfejlődési folyamat. Az agancs növekedésének utolsó 2-3 hete az agancsmineralizáció legintenzívebb időszaka, ilyenkor az agancsot tápláló erek falában is ásványi anyagok rakódnak le, így az erek beszűkülnek és elzáródnak, ennek következtében az agancsot tápláló és borító bőr, a barka elhal és leválik (Banks és Newbrey, 1983), az állat letisztítja az agancsát és felkészül az üzekedési időszakra (Price és Allen, 2004). Az agancs mineralizációjához igen rövid idő alatt hatalmas mennyiségű ásványi anyagot (akár 5-6 kg-ot) kell mobilizálni. A táplálkozás útján ekkora ásványi anyag felvétele ilyen rövid idő alatt nem lehetséges, ezért a gímszarvas bika ideiglenesen a vázcsontozatból (csigolyák, bordák, szegycsont-, lapocka-, medencecsont) vonja el az ásványi sókat (Ca^{2+} , foszfátionok stb.).

A vér ion homeosztázisának biztosítását a finoman szabályozott csontátépülés (bone remodelling) biztosítja, amely létrehoz a vázcsontokban egy ideiglenes csonttritkulást, terminus technicussal élve a ciklikus fiziológiás oszteoporóziist (Chapman *et al.*, 1975; Banks *et al.*, 1968a; Banks *et al.*, 1968b; Bubenik, 1983). A jelenség anatómiailag és élettanilag (fokozott csontátépítés) hasonlít az emberi patológiás csonttritkulásra (Borsy *et al.*, 2009, Borsy, 2010 PhD disszertáció). A vázcsontozatban az ásványi anyag reszorpció a legmagasabb a bordákban, ami elérheti a csonttömeg 23% át is (Chapman *et al.*, 1975). Az agancs robosztus fejlődése roppant nagy terhet ró az állat ásványi anyag háztartására, a gímszarvas bikák szervezete 6-13 éves koruk között képes erre a hatalmas teljesítményre, 14 éves koruk után rohamosan romlik az állapotuk. A gímszarvas bika vázcsontozatának a tömegét az élősúly 10-15%-ra becsülik (Meadows és Hakonson, 1982), ami megközelítőleg 25-30 kg az általunk vizsgált egyedek esetén. Látható, milyen intenzív folyamatról is van itt szó (2. ábra).

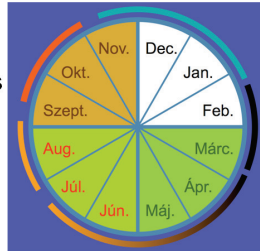


(iii) Téli **nyugalmi** időszak, vázcsontozat (BMD) dinamikus egyensúlyban „Stag3”



Bőgés

(ii) Döhérség **csontvisszapótlás** a vázcsontozatba „Stag3”



Agancs hullatás



(i) Agancsfejlődése és mineralizációja, aminek a következtében a vázcsontban **oszteoporózis** alakul ki „Stag1”



2. ábra: Az agancsfejlődés és a vele kapcsolt ciklikus fiziológiás oszteoporózis éves ciklusa a gímszarvasban

Később az ásványi sók a döhérség ideje alatt (július-augusztus) a dús vegetációból táplálkozás útján visszapótlódnak a vázcsontozatba, azaz a csontsűrűség (BMD) növekszik a csontvázban. A vázcsontozat ilyen tökéletes szöveti regenerációja az emberi oszteoporótikus csontvesztés esetén sohasem történik meg. A késő őszi és téli hónapok mind az agancsépítés, mind a váz ásványi anyag forgalma szempontjából egyensúlyi állapotot jelentenek.

A szarvasbikák a ciklikus fiziológiás oszteoporózisukat regenerálni tudják, tehát megtalálhatóak itt azok a gének, amelyek a „gyógyuláshoz” kellene, ezért a gímszarvas egy jó állat modellje csont regenerációknak.

2.3. Agancsfejlődés biológiai háttere

A minden évben újra kifejlődő agancs egyedülálló példája egy teljes szerv tökéletes regenerációjára az emlősök körében (Goss, 1983). A szarvasfélék hímjének jellegzetes másodlagos nemi jelleget tükröző képződménye az agancs, amely a homlokcsont két csapjából, minden évben kifejlődő csontos szerv. A gímszarvasbikák által viselt agancs megjelenése jelzi az állat korosztályát és még inkább kondícióját. Az első évben csak egy-egy szár fejlődik (nyársak), a következő évben azonban már a közbeeső villás fokozatot (villások) átugorva, akár hatos vagy nagyobb ágszámú agancs is fejlődhet. A legjobb éveiben és ereje teljében lévő szarvasbika sokágú, erős agancsot fejleszt. A kulminációs életkor után az öreg bikák agancsa gyengül, a szarvasbika „visszarak”. Az agancs messziről megmutatja viselője dominanciáját.

A gímszarvas agancsfejlődése nagyon hasonló a testi csontok, elsősorban a csöves csontok, kialakulásának fejlődésbiológiai és molekuláris genetikai folyamataihoz, annak egy rendkívül felgyorsított és leegyszerűsített változata. Felgyorsított, hiszen az agancs növekedésénél intenzívebb csontfejlődést nem ismerünk, és egyszerűbb, mivel a testi csontoknál jól ismert - és funkciójuk ellátásához nélkülözhetetlen - remodelling folyamata a gímszarvas agancsának fejlődésénél hiányzik.

Ahogy fentebb említettük már, az agancs nem közvetlenül a koponya csontjából alakul ki, hanem a homlokcsont állandó, maradandó csontos nyúlványáról, a csapról, amely a pubertás korban a tesztoszteron hatására indul fejlődésnek (Lincoln, 1973) ezáltal egyetlen példája egy szerv késleltetett fejlődésének (Price *et al.*, 2005). A növekvő agancs és a rózsató bőrből és csontból, valamint vérekből, idegekből és kötőszövetből épül fel.

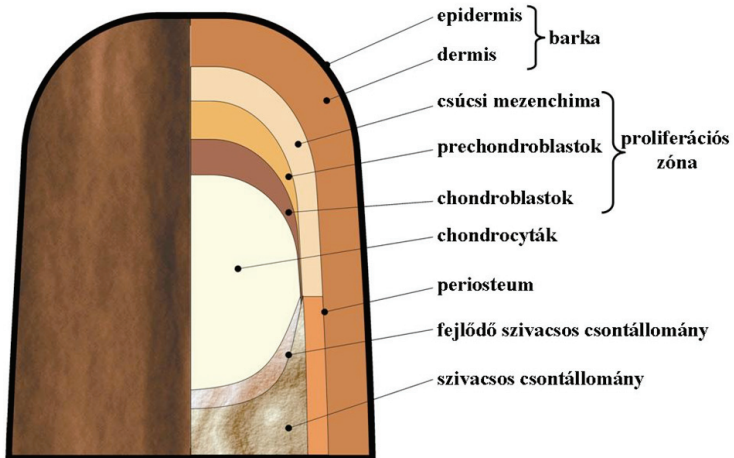
Mind a rózsató, mind a belőle évenként regenerálódó agancs a homlokcsont csonthártyájának ún. agancsképző csonthártya (AP: antlerogenic periosteum) régiójára vezethető vissza, amely a pubertás korban androgén hormonok hatására alakul ki. Azt feltételezik, hogy az agancs és a rózsató is velőlemez eredetű (Price és Allen, 2004). Az AP postnatálisan megmaradt embrionális szövetnek vélik szembeszökő differenciálódási képessége miatt (Li és Suttie, 2001). Magzati korban még mindkét nemem megtalálható, azonban az androgén stimulus elmaradása miatt szarvasteheneknél inaktív marad, kivételt ez alól a rénszarvas (*Rangifer tarandus*) képez, ahol a tehének is viselnek agancsot (Putman, 1989).

Az agancsképző periosteumnak (AP) az agancs- és rózsatőképző tulajdonságát transzplantációs kísérletekkel bizonyították: az AP sejtek átültetése agancsfejlődést indukált ectopikusan a test más területein is (Hartwig, 1967, Goss és Powel, 1985). Az AP xenograft transzplantációja immun-deficiens egér koponyájára egy csontos kinövést eredményezett. (Li és Suttie, 2001). A rózsató kialakulásakor az AP agancsképző sejtjei osztódnak és osteoblasttá differenciálódnak frontolaterális nyúlványt képezve desmális csontosodással. E szövet mechanikai nyomást gyakorol a felette elhelyezkedő bőrre, aminek következtében a csontosodási folyamat megváltozik: ún. átmeneti csontosodással csontos-porcós szövet képződik. Végül a rózsató fejlődése módosult endochondrális csontosodással fejeződik be, vérerekben gazdag porc jelenik meg, amely később elcsontosodik (Li és Suttie, 1994). Miután a csap eléri fajspecifikus hosszát (ez a gímszarvas esetében 5-6 cm), az első agancs növekedése spontán megindul. A bikák korszoportonkénti késéssel tél végén, tavasz elején hullatják el az agancsukat. Ez az agancs és a csap határán bekövetkező, osteoclast általi csontbontás eredménye. A csapon keletkezett seben néhány óra múlva heg keletkezik és megkezdődik a regeneráció. A kialakuló blasztéma sejtjei valószínűleg a csap csonthártyájának stem sejtjeiből származnak (Kierdorf *et al.*, 2003). Az agancs fejlődése sok tekintetben hasonlít az embrionális végtagfejlődésre (Allen *et al.*, 2002; Li és Suttie, 2001). Az embrionális csontfejlődéhez hasonlóan, az agancs növekedése és évenkénti regenerációja szisztémikus és lokális faktorok hatása alatt áll (ld. 2.3.2 fejezet).

2.3.1. A fejlődő agancs felépítése

Az agancs hosszanti növekedési folyamata proximális - disztális irányba történik az agancscsápól kiindulva az agancscsúcs felé, míg a sejt differenciáció pont ellentétes irányba halad. Az agancsporcs mátrixa biokémiaiilag nagyon hasonlít a többi hialin porchoz, azzal a különbséggel, hogy az agancsporcs erekkel gazdagon átszótt (vaszkularizált) és a porcmátrixban csontosodó trabekulák jönnek létre az ásványi anyag lerakódás miatt (Banks és Newbrey, 1981).

Az agancscsúcsban több szövettípus van jelen, amelyek alapvetően két nagy csoportot alkotnak: a belső csontos-porcos állományt és a külső bőrt más néven a barkát (4. ábra).



4. ábra: A fejlődő agancs felépítése. Sematikus hosszsmetszet (adoptálva: Banks és Newbrey, 1983).

A barka vérerekben és idegekben gazdag, amely a külső, szőrszálakban gazdag epidermisre és a belső rostokban gazdag dermisre osztható. Az egyes szövetrétegei egymástól könnyen elválaszthatók. A perichondrium és a periosteum között az átmenet folytonos. A periosteum belső, sejtjes rétege számos osteogenikus sejtet tartalmaz, amelyek biztosítják az agancs vastagodását. Ezen differenciálatlan mezenchima

sejtekből közvetlenül alakulnak ki osteoblastok. Ez hasonló folyamat a testi csontok vastagodását biztosító ráakódásos vagy periostális csontosodáshoz.

A csöves csontok növekedési porclemezét párhuzamba állítva a fejlődő aganccsal, a növekedési porclemez proliferációs zónája a agancs csúcsi mezenchimájával, a prechondroblastok és chondroblastok által alkotott régióval tekinthető azonosnak. A kétélrtűiek végtag-regenerációja hasonlít az agancs fejlődéséhez (Brookes, 1998).

Az agancs számos véreter tartalmaz, amelyek a hossz tengely mentén futnak. A differenciálatlan mezenchima sejtekre jellemző, hogy az osteoblast- és fibroblast sejtvonalakra jellemző I típusú kollagént termelik, ugyanakkor az előbb említett két sejtvonalra szintén jellemző alkalikus-foszfátáz nem (Price *et al.*, 1996). Ezek a mezenchimális sejtek nemcsak chondrogenikus, hanem osteogenikus képességekkel is rendelkezhetnek, amit alátámaszt az a tény is, hogy erőteljesen expresszálják az Osterix és a Runx2 csont mester regulátor transzkripció faktorokat is (Stéger *et al.*, 2010). Hasonlóan az oldalsó mezenchimához, amely biztosan rendelkezik ilyen képességekkel (Gyurján *et al.*, 2007, Gyurján, PhD disszertáció 2007). A prechondroblastokra és chondroblastokra nagy kiválasztási aktivitás jellemző, mivel megkezdik az egyre növekvő tömegű, porca jellemző extracelluláris mátrix termelését, többek között a IIA, IIB és X típusú kollagéneket (Price *et al.*, 1996), valamint a Link-proteint és a Matrilin 4-et (Korpos *et al.*, 2005). A vaszkuláris és perivaszkuláris tér fokozatosan növekszik, ahogy az agancs alap felé haladunk. A vérerek által megosztott differenciálódó porc-tömeg előbb helikális mintázat szerint rendeződik, majd hosszanti irányba gerendákat (trabekulákat) alkot, emlékeztetve a növekedési porclemez osztódó régiójának oszlopaira.

Az agancs porc véretekkel gazdagon átszőtt szemben a test többi porc feleségével (ahol a vérerek általában patológiás esetekben figyelhetők meg). Az agancs porc vérerei szállító kapacitása nagy. Másik jelentős különbség, hogy az agancs porc mineralizálódik/csontosodik. A kalcium és más ásványi anyagok berakódása elkülönülő gócpontokban kezdődik el a porc extracelluláris mátrixban, majd a kalcifikáció növekedésével a gócpontok összeolvadnak és létrejön a kalcifikált porcszövet.

Az agancs fejlődésénél, a növekedési porclemezzel ellentétben, nem figyelhető meg határozott hipertróf zóna. A hipertróf porcsejtek a trabekulák közepén jelennek. A hipertróf porcsejtek megjelenése mellett a mineralizált porcszövetből az agancstól

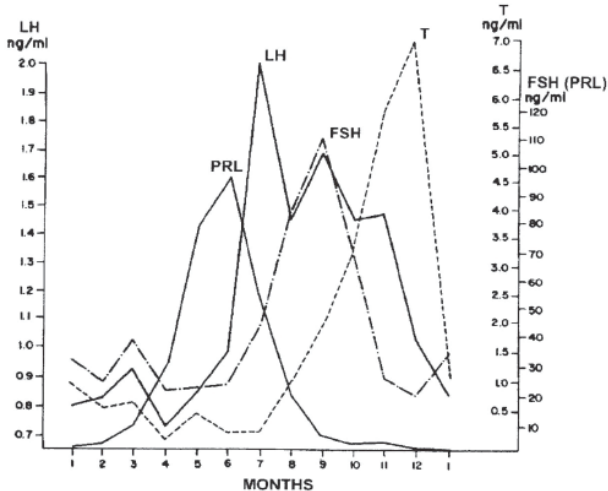
irányába haladva chondroclasia (porcbontást) és osteogenesis (csontépülést) lehet kimutatni.

A kalcifikált porcoszlopok felszínére, az oszlopok degradálódásával párhuzamosan, csont rakódik. A csontot, a porcfelszint beborító osteoblastok és osteocyták termelik. Az osteogenesis alatt is folytatódik a chondroclasia, míg a porc át nem adja helyét teljesen az újonnan formálódó tömött csontszövetnek. Ebből a kezdeti csontszövetből alakul ki az agancs szivacsos csontállománya. A periférián a csontállomány közvetlenül a periosteum csontképző sejtjeiből formálódik. Ez a rárakódásos csontosodás eredményezi az agancsszár és agancságak vastagodását, amely az agancs trófea pontszámának legjelentősebb tényezője (lásd 2.1.2. fejezetben).

2.3.2. Általános hormonális és lokális hatások az agancsnövekedés alatt

Az agancsfejlődés általános hormonális (szisztémikus) szabályozása

Az agancs növekedése éves ciklust mutat a gímszarvas szexuális ciklusával összhangban, amelyet a mérsékelt éghajlaton a fotoperiódus változása szabályoz. A mérsékelt égövi szarvasok késő tavasszal-kora nyáron fejlesztik agancsukat. Ez alól az őz (*Capreolus capreolus*) képez kivételt a téli agancsfejlődésével (Bubenik, 1990). A nappalok hossza a tobozmirigyben termelődő melatonin mennyiségén keresztül képes szabályozni az életfolyamatokat. A melatonin a hipotalamusz-hipofízis-ivarmirigy útvonalon keresztül nemcsak az agancs-ciklusra, 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 megnövekszik (Reiter, 1991). Minél hosszabbak az éjszakák, annál több kerül a vérbe, így a melatonin szintje óraként és naptárként is „szolgál”. A tobozmirigy eltávolítása nem szünteti meg teljesen az életfolyamatokban megfigyelhető szenzonalitást, azonban az évszakok során megfigyelhető különböző hormonok szintjeinek változásait összehavarja (Brown *et al.*, 1978). 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 hormon (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 hónap késéssel követi (3. ábra).



3.ábra: A prolaktin (PRL), luteinizáló hormon (LH), tüszőserkentő hormon (follikulus stimuláló hormon, FSH) és a tesztoszteron (T) koncentrációja fehérfarkú szarvas (*Odocoileus virginianus*) vérszérumában az agancs-ciklus alatt (adaptálva: (Bubenik 2006).

A tesztoszteron az agancs-ciklus 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 szaporodási időszakban a szarvasbőgés közeledtével a tesztoszteron szintje erősen megnövekszik (az LH késleltetett hatása, 3. ábra), leáll az agancs növekedése, majd az agancs teljes kalcifikációja megtörténik (Bubenik, 1990). A legmagasabb tesztoszteron szint őszele, a szaporodási időszakban, azaz a szarvasbőgés idején tapasztalható. A mérsékelt éghajlaton az agancshullatás alacsony tesztoszteron-szint mellett következik be.

Amennyiben az intenzív agancsnövekedés periódusában kasztrálják a szarvasbikákat, késni fog a barka levedlése és a mineralizáció sem tökéletes. A dámszarvas és őz esetében a kasztrálás vagy a herék sérülése egy oszteosarkóma szerű „parókás” agancs kialakulását eredményezheti. Ezek a fibrózus-csontos burjánzások jóindulatú daganatoknak tekinthetők (Kierdorf *et al.*, 2004).

A legintenzívebb agancsnövekedés a kora nyári periódusban történik, amikor bőségesen áll rendelkezésre táplálék. Intenzív agancsregeneráció arra az időszakra esik, amikor a reprodukív szervek inaktívak, ami azt is jelenti, hogy az agancs növekedés szabályozásában nem gonád eredetű stimulusok is vannak (Wislocki, 1943).

A magas tesztoszteron koncentrációnak esszenciális szerepe van az agancs mineralizációjában, ugyanakkor a tavaszi alacsony tesztoszteron szint serkentőleg hat az agancs növekedésére (Bartős *et al.*, 2000), mivel gátló hatása van a sejtproliferációra. Ezért van az, hogy a tesztoszteron a regeneráció egyik természetes inhibitora (Price és Allen, 2004). A tesztoszteron különböző szervekben, szövetekben (herék, mellékvese, zsírszövet, fejlődő agancs (Bubenik *et al.*, 2005) 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 (Morris és Bubenik, 1982). A vázcsontok fejlődése kapcsán már bizonyították, hogy a tesztoszteronnak részben indirekt a hatása, ui. az aromataz enzim ösztrogénné képes alakítani (Riggs *et al.*, 2002) és ez utóbbi fejt ki a hatást. Úgy gondolják, hogy az agancs esetében is ez lehet a helyzet (Price és Allen, 2004). Megfigyelték, hogy az agancsnövekedés érzékenyebb az ösztrogén adagolására, mint a tesztoszteronéra (Goss, 1968). Ösztrogén kezelés hatásaként leáll az agancsnövekedés és beindul a „barka hántása”. Az ösztrogén receptort (ER) kimutatták az agancs perichondriumban (Barell *et al.*, 1999), valamint az aromataz enzimet kódoló mRNS-t az agancscsúcsban (Price *et al.*, 2002). Immunitokémiai vizsgálatok szerint az ER α a domináns receptor izoforma. Az ösztrogén mennyiségének növekedése kettős hatást vált ki egyrészt gátolja a sejtproliferációt és elősegíti a differenciációt, másrészt fokozza a mineralizációt (Price és Allen, 2004).

Már itt megjegyezzük, hogy a kvantitatív Affymetrix mérések szerint az agancscsont sejtei az ösztrogén receptorát is nagyon nagymértékben expresszálják (lásd részletesen az 5.2.2. fejezetben). A konklúzió az, hogy a szaporodási ciklussal szorosan összefüggő agancs-ciklusban mind a tesztoszteron, mind az ösztrogén fontos szerepet játszik.

A sex-szteroidok meghatározó szerepe mellett az agancs ciklus egy másik jelentős szabályozási faktora az IGF-I, amely a májban szintetizálódik, és szintje párhuzamot mutat az agancsnövekedéssel (Suttie *et al.*, 1985). Az IGF-I receptorát azonosították az agancscsúcsban (Elliott *et al.*, 1992), valamint in vitro kísérletben bizonyították, hogy az IGF-I elősegíti az agancssejtek proliferációját (Price *et al.*, 1994;

Sadighi *et al.*, 1994). Az agancsciklus alatt egyéb hormonok szintje is változik, pl. a D-vitaminé (van der Eems *et al.*, 1988), a pajzsmirigy hormoné (Shi és Barrell, 1994), a kortizolé (Bubenik *et al.*, 1975), valamint a prolaktiné (Sempere *et al.*, 1983) is. A szexuál-szteroidok alacsony szintje az agancs növekedése/regenerációja szempontjából kedvező hatású, mivel magas szintjük gátolja a növekedést (Goss, 1968; Goss, 1983).

Az agancsfejlődés lokális szabályozása

Az agancsban jól kimutatható molekula a PTHrP és receptora PTHR (Fauchaux *et al.*, 2002); (Barling, 2004). Agancs sejtenyészetben a PTHrP serkenti a porcsejtek proliferációját és gátolja azok differenciációját (Fauchaux és Price, 1999). A PTHrP szintézis fokozható TGF- β hatására (Fauchaux *et al.*, 2004). Erős PTHrP expressziót figyeltek meg az agancs mezenchimában, az agancs előporcban, az agancs porchártyában és a perivaszkuláris sejtekben. Ellentétben a növekedési porclemmel a PTHrP nem detektálható az agancs porcsejtekben. A PTHrP és az Ihh szignalizációs útvonalak kölcsönhatása az agancsban az endochondrális zónában volt kimutatható (Fauchaux *et al.*, 2004). Az osteoblastok a PTHrP-t és a PTHR-t is expresszálják, ami arra utal, hogy az agancs gyors növekedése alatt a PTHrP szabályozhatja a sejt differenciálódást. Nem csak a porcsejtekét, hanem az osteoblastokét és osteoclastokét is.

Mind a vázfejlődés, mind a kétéltüek regenerációs folyamatainak szabályozásában szerepet játszanak a retinsav (RA) izoformái (Cash *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 1999). Az agancsfejlődésben betöltött szerepükről Allen és munkatársai úgy találták, hogy az alapvető lehet a sejt differenciációban (Allen *et al.*, 2002). A fejlődő agancsban több növekedési faktort is kimutattak: BMP2, BMP4, FGF, IGF-I és IGF-II, TGF β 1, TGF β 2, c-fos, c-myc és IGF (Mundy *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 1995; Francis és Suttie 1998). Szubtraktív technikával a dermatopontint és foszfolipid hydroperoxid glutation peroxidázt (GPX4) azonosították. Ez utóbbi a felnőtt szervezetben nem expresszálódik ami a fejlődő agancs embrionális jellegére utal (Lord *et al.*, 2001).

Az IGF-I, az IGF-II (és a receptoraik), amelyek megtalálhatóak a fejlődő agancs csúcsi régiójában, *in vitro* serkenti a mezenchima sejtek proliferációját (Price *et al.*, 1994; Sadighi *et al.*, 1994). A fejlődő agancs disztális régiójában a porcsejtek és az osteoblastok is termelik az IGF-I-et, amely azonban a disztális részek csontszövetének osteoblastjaiban már nem detektálható (Gu *et al.*, 2007).

A Wnt-szignál útvonal számos elemét (Msx-1, Msx-2, Runx2, Osterix) detektálták az agancsszövetekben. Ennek az útvonalnak a jelentőségét növeli, hogy nem csak a csont fejlődésében, hanem a csont fiziológiájában is fontos szerepet játszik (Gong *et al.*, 2001; Little *et al.*, 2002; Borsy *et al.*, 2009; Borsy, PhD dolgozat 2010).

A vérér képződésért felelős VEGF és receptorának jelenlétét is kimutatták az agancs porcshövetében, azonban a növekedési porclemével ellentétben nem csak a hipertróf porcsejtekben, hanem a barkában is megtalálható a VEGF és VEGFR-2 (Clark *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2007).

2.3.3. Az agancs növekedés idegrendszeri szabályozása

Az agancs robusztus növekedése együtt jár az erek és idegek inváziójával is, amelyek követik az agancs növekedési ütemét. Az agancs érző idegrostokkal gazdagon ellátott szerv, amely pozicionális információt nyújt a szarvasbikának agancsának helyzetéről, ezáltal segít megvédeni a fejlődésben lévő agancsot a sérülésektől.

Az agancsot a háromosztatú ideg temporális és szupraoptikus ágai idegzik be (Wislocki és Singer, 1946). Az agancs epidermis és dermis rétegében mielin hüvellyel ellátott és csupasz idegrostok egyaránt megtalálhatók (Vacek Z, 1955). Az ideg roncsolása után, az agancs növekedése visszamarad, formája torzul Wislocki és Singer (1946). Ha a csap periosteum szövetét elektromos úton stimulálták, az agancs mérete, tömege és alakja is megváltozott, a mineralizáció pedig késett (Bubenik *et al.*, 1982). A következő évben, elektromos stimulus nélkül is abnormális agancs fejlődött, a jelenséget trófikus memóriának nevezik. A fogalmat Bubenik és Pavlansky vezette be (Bubenik és Pavlansky, 1965), és arra utal, hogy az agancs sérülése esetén, a szarvas „teste” (innen a trófikus jelző) valami módon megjegyzi a sérülés emlékét és a rákövetkező években is torzult agancs fejlődik. Az egymást követő években a torzulás mértéke csökken.

Agancsban számos neuropeptidet és idegnövekedési faktort azonosítottak pl.: a Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substance-P. Mindkettő fontos szerepet játszik az agancs gyors növekedésében (Gray *et al.*, 1992). A Neurothrophin-3 és „Nerve growth factor” molekulákat mRNS szinten azonosították, expresszióikat szöveti zónákhoz rendelték (Garcia *et al.*, 1997; Li C *et al.*, 2006). Az idegrendszer hatása az agancsnövekedésben jelenleg a legkevésbé ismert folyamat.

Az idegi összeköttetéstől, amely az induktív periosteum (AP) és az agyban található, (feltételezett) agancsnövekedési központ (AGC) között létesül, úgy gondolják, hogy az AGC adja a trófikus útmutatást a faj-specifikus agancs méretéhez és mintázatához (Bubenik *et al.*, 1982; Bubenik, 1990). A hipotézis szerint az AGC és az induktív periosteum közötti összeköttetés nélkülözhetetlen az agancsnövekedés létrejöttéhez. Azonban, ha már létrejött az összeköttetés a csap szövetei már nem szükségesek a további agancsképzéshez. Amennyiben a csapot eltávolították, az nem gátolta meg a további agancs kialakulását; a seb gyógyultával az idegek és a periosteum találkozási pontjánál új agancs fejlődött (Bubenik és Pavlansky, 1965).

Feltételezhetjük, hogy az agancs növekedése és robosztus csontosodásában a *nervus trigeminus* által közvetített idegi stimulusoknak fontos szerepük van (lásd bővebben a disszertáció eredmények megvitatásában).

2.4. A vázrendszer, csontfejlődés

A vázrendszer tartást ad a testnek, meghatározza az alakját, megvédi a sérülékeny belső szerveket, lehetővé teszi a mozgást, tárlóhelye az ásványi anyagoknak, valamint a vérképzés szerve is. A vázrendszer két fő részre osztható: a tengelyvázra és a függelékivázra. A tengelyváz részei: a koponya, a csigolyák, a szegycsont és a bordák. A függelékivázhoz a végtagok csontjai tartoznak. A vázrendszer sejtjei három különböző embriológiai eredetű sejtvonalhoz sorolhatók: a velőléc sejtjei hozzák létre a kraniofaciális csontokat; a szomitákból (azaz paraxiális mezodermból) alakuló szklerotómok hozzák létre a tengelyváz elemeit; az oldalsó lemez mezoderma sejtjei hozzák létre a függelékiváz elemeit.

A csontfejlődésnek két fő formáját különböztetjük meg: az endochondrális csontosodást és az intramembrán csontosodást. Az endochondrális csontosodás során először egy porc-templát alakul ki, amely már meghatározza a leendő vázelem formáját. Ez a porcelem a fejlődés során fokozatosan degradálódik, az átmenetileg megmaradó porcoszlopok pedig alapot biztosítanak az oda települő osteoblastok részére. Az intramembrán (más néven dezmalis) csontosodás során a kondenzálódott mezenchima sejtek közvetlenül osteoblastokká alakulnak a csontosodási centrumokban porc-templát kialakulása nélkül. Intramembrán csontosodás által jönnek létre a kraniofaciális csontok, valamint a kulcscsont oldalsó része; endochondrális csontosodás pedig a végtagok csöves csontjaira, a koponyaalap csontjaira, csigolyatestekre, bordákra és a kulcscsont középső részére jellemző.

A tengelyváz kialakulása szoros összefüggésben van a mezoderma szelvényezettségének létrejöttével. Azt, hogy az anterior-poszterior tengely mentén milyen típusú csigolyák jelennek meg, alapvetően a Hox gének expressziója szabja meg (McGinnis és Krumlauf, 1992). A végtagok az oldalsó mezoderma lemezből alakulnak ki, ahol a megfelelő Hox expresszió szabja meg a létrejövő elülső- és hátulsó végtagok pozícióját (Ruvinsky és Gibson-Brown, 2000).

A mezenchima sejtek kondenzációja mind az endochondrális, mind pedig az intramembrán csontosodást megelőzi, a sejtek elkötelezettsége azonban már részben determinált. A szöveti környezet dönti el, hogy csont vagy porc irányban folytatódjon a fejlődés. A korai vázrendszer és az agancs fejlődésének (hasonló) folyamatairól részletes összefoglaló olvasható Gyurján István PhD disszertációjában (Gyurján, Doktori dolgozat 2007).

2.4.1. Az endochondrális csontosodás és a növekedési porclemez

A endochondrális csontosodás folyamata két fő szakaszra bontható: chondrogenesisre és osteogenesisre. A mezenchimális kondenzáció sejtjei porcsejteké differenciálódnak, létrehozva a leendő csont porcos előtelepét. A végső stádiumban a porcsejtek hipertrófiázódnak: osztódásuk megáll, megduzzadnak, majd zsugorodnak és elpusztulnak (Karsenty, 2001). Eközben az extracelluláris mátrix fokozatosan kalcifikálódik, majd a periféria felől vérerek törnek be, amelyek osteoblast-progenitorokat szállítanak. A progenitor sejtek a porcgerendákra tapadva differenciálódnak és megkezdik a csontra jellemző mátrix termelését.

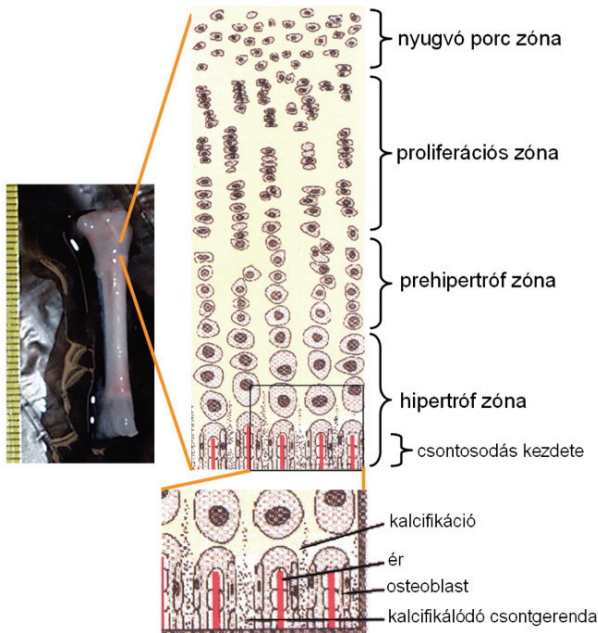
A csontszövet fokozatos kiterjedésével a porcsejtek egy keskeny zónába, az ún. növekedési vagy epifízis porclemezre korlátozódnak.

A növekedési porclemez egy olyan különleges képlet, amely biztosítja a fejlődő csontok hosszanti növekedését, valamint összekapcsolja a porcképződést a csontfejlődéssel az endochondrális úton fejlődő csontok csontosodási magvaiban.

A porclemez négy fő morfológiailag elkülöníthető zónára osztható, amelyek egy differenciációs sort alkotnak: a nyugvó (tartalék), a proliferációs (osztódó), a prehipertóf és hipertrof porc zónára (5. ábra).

Az ötödik régiót, a csontosodási zónát a vérerek betörése és az osteoblastok megjelenése jelzi (Szentágothai és Réthelyi, 1985).

Miután az osteoblast körbeveszi magát csontmátrixszal, lacunát alakít ki magának canaliculusokkal, és csontsejtté alakul. Az osteocyták mechanoreceptorként és kemoreceptorként viselkednek, a csont mechanikai, biokémiai ingerekre adott válaszreakcióit szabályozzák.

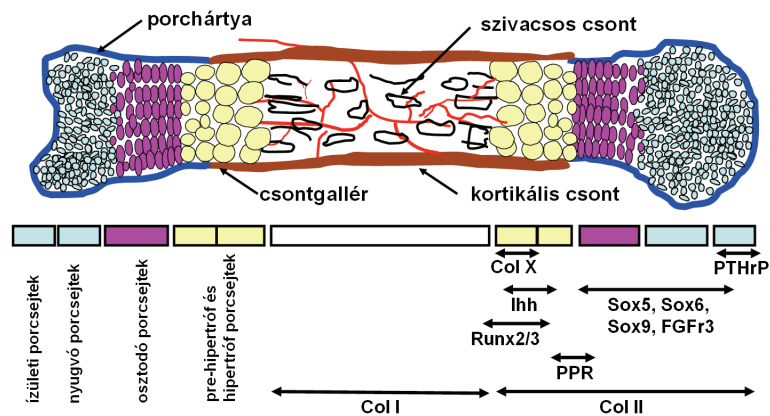


5. ábra: A növekedési porclemez (módosítva Karaplis, 2002 után). Az ábra bal oldalán egy gímszarvas magzat csőves csontja látható.

A növekedési porclemez egyes régiói a porcsejtek morfológiája és a specifikus molekuláris markerek alapján jól megkülönböztethetőek egymástól (Mundlos, 1994). A nyugalmi zónában a sejtek kicsik és kerekdedek. A proliferációs régióban a porcsejtek intenzíven osztódnak, az ellapult sejtek jellegzetes kukoricaszemekre emlékeztető oszlopokat hoznak létre. Mind a nyugalmi fázisban lévő, mind a proliferáló porcsejtek termelik a II. típusú $\alpha 1$ láncú kollagént. A prehipertróf chondrocyták is expresszálják a II. típusú $\alpha 1$ láncú kollagént, de alacsonyabb szintén. Végül a hipertróf porcsejtek a X. típusú $\alpha 1$ láncú kollagént termelik. Az alsó, már mineralizált hipertróf zóna sejtjei végül elhalnak, a X-es típusú kollagéntben gazdag mátrix lebontódik, miközben az erek inváziójával érkező osteoblastok elkezdik kialakítani a trabekuláris csontszövetet (Karaplis, 2002).

2.4.2. Az endochondrális csontosodás molekuláris mechanizmusa

A növekedési porclemmezben a porcsejtek egy finoman összehangolt és pontosan ellenőrzött folyamaton mennek keresztül, amely magába foglalja a sejtsztódást, sejterést és sejthalált (6. ábra). A folyamatot számos szisztémikus és lokális faktor szabályozza. A szisztémikus faktorokhoz különböző hormonok tartoznak, pl. a növekedési hormon, inzulinszerű növekedési hormon, a pajzsmirigy hormonok, ösztrogének, a glükokortikoidok, valamint a D-vitamin hormon (lásd 2.3.2. fejezetben). A lokálisan megjelenő, ill. ható transzkripciós- és növekedési faktorokat, valamint az egyes stádiumokra jellemző ECM molekulákat szemlélteti sematikusán a 6. ábra.



6. ábra: Az endochondrális csontosodásban szerepet játszó fontosabb szabályzó, és ECM fehérjék (adoptálva: Provot és Schipani, 2005; Goldring *et al.*, 2006)

A korai porcképződés nélkülözhetetlen mester regulátorai a Sox fehérjék: a Sox9, Sox5 és a Sox6, amelyek HMG (high-mobility-group) DNS-kötő domént tartalmazó transzkripciós faktorok. A Sox9 a csontfejlődés legkorábbi szakaszában megjelenik: alapvetően szükséges a mezenchimális kondenzációhoz, így a vázképződés iniciálásához és a porcsejt-differenciációhoz (Akiyama *et al.*, 2002). A porc mátrix kialakításában fontos szerepet játszó géneket, mint például: az *aggregán*, *matrilin-1* vagy a *II*, *IX* és *XI típusú kollagén* génjeit a Sox9 képes serkenteni (Sekiya *et al.*, 2000; Rentsendorj *et al.*, 2005; Bridgewater *et al.*, 1998). A Sox9 pozitívan szabályozza a proliferációt és negatívan a porcsejtek hipertrofizálódását (Bi *et al.*, 1999).

A PTHrP/Ihh visszacsatolás

A Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) egy auto/parakrin faktor, amely számos magzati és felnőtt szövetben termelődik. A PTHrP köti és aktiválja a PTH/PTHrP receptort, amelyet értelemszerűen a Parathormon (PTH) is működésbe hoz. A PTH kalcium/foszfát metabolizmus központi szabályozója. Ez a hormon a csontokban és a vesében fejt ki hatását. A PTHrP-t a perichondrium sejtjei és a periartikuláris régió proliferálódó porcsejtjei termelik, míg a *PTH/PTHrP* receptort a prehipertróf sejtek expresszálják (Vortkamp *et al.*, 1996). Az aktivált PTH/PTHrP receptorok gátolják a porcsejtek érését, differenciálódását hipertróf porcsejteké, ezáltal késleltetik a csont kialakulását (Lanske *et al.* 1996). A PTHrP emellett képes stimulálni a sejtosztódást, a CREB (cAMP response element-binding protein) foszforilálásán keresztül. A CREB ezután aktiválja a ciklin D1-et (Beier *et al.*, 2001; Ionescu *et al.*, 2001). A PTHrP hatását támogatja az Indian hedgehog (Ihh), amely az endochondrális csontfejlődés egyik központi irányítója. Az Ihh-t a prehipertróf porcsejtek expresszálják és a perichondrium sejtjeire hat, ahol fokozza a PTHrP szintézisét (St-Jacques *et al.*, 1999). Végső soron az Ihh gátolja a porcsejtek hipertrófiáját és késlelteti a porc mátrix mineralizálódását. Az Ihh és PTHrP között egy negatív visszacsatolás jön létre, mivel az Ihh hatására megnövekvő PTHrP gátolja a prehipertróf és hipertróf porcsejtek kialakulását, így végül az Ihh expresszióját is. Az PTHrP/Ihh útvonalal az FGF és a BMP szignalizációs útvonalak is kölcsönhatnak. Az FGF szignál gátolja az Ihh expresszióját, azonban ez a hatása a porcsejtek proliferációjára gyakorolt hatásától független (Minina *et al.*, 2002).

A BMP (bone morphogenetic protein) fehérjék a porcsejtek osztódására és érésére vannak befolyással. Valamint közvetítik a Ihh hatását a későbbi folyamatban (csontgallér képződés) (Long *et al.*, 2004). A BMP-k alapvetőek a legkülönbözőbb fejlődés folyamatokban. Szerepük van a mezenchimális kondenzációban is. A fejlődő csöves csontokban a perichondriumban expresszálódnak (elsősorban a BMP2, 3, 4, 5 és a 7), valamint a hipertróf porcsejtekben is megtalálható mRNS-ük (BMP2-nek és 6-nak) (Minina *et al.*, 2001).

A Runx2 szerepe a porcsejtek differenciálódásában

A porcsejtek terminális differenciációjában a Runx2 transzkripciós faktor a fő mesterregulátor molekula. A Runx2 (egyéb elnevezések: Cbfa1, Ost1, AML3 stb.) a Runt transzkripciós faktor családnhoz tartozik (Ogawa *et al.*, 1993), és az osteoblast differenciációhoz elengedhetetlen. A *Runx2*-deficiens egerekben nincs csontképződés. A *Runx2* túlermeltetése az osteoblast-specifikus gének (pl.: *osteocalcin*, *bone sialoprotein*, *alkalikus foszfatáz*) fokozott expresszióját eredményezi, valamint ektopikus csontképződéshez vezet (Ducy *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997).

A *Runx2* az egér csontváz fejlődésének legelején, a 10,5-12,5 napos embrióban, minden mezenchimális kondezációban expresszálódik. Ezt a molekuláris markert termelő mezenchimális sejtek az osteoblastok és a porcsejtek közös progenitorai. A fejlődés további szakaszában, az embrionális élet 14,5 napjától a születésig, a *Runx2* expressziója az osteoblast vonalban fokozódik, a prehipertróf porcsejtekben pedig csökken és a születéssel meg is szűnik (Takeda *et al.*, 2001). A növekedési porclemében a Runx2-öt a porcsejtek termelik, és ez a termelődés elindítja a porcsejtek hipertrófiázódását (Kim *et al.*, 1999). A Runx2 túlermeltetése transzgénikus egerekben a porcsejtek korai éréséhez vezetett (Takeda *et al.*, 2001).

A *Runx2*-deficiens egerekben a porcsejtek terminális differenciációja késést szenved. Ez a megfigyelés vezetett annak felismeréséhez, hogy egyéb faktorok is szükségesek a hipertróf porcsejtek megjelenéséhez. A Runx2 a Runx3-mal együtt indukálja a hipertrófiázódást (Yoshida *et al.*, 2002). Szintén e folyamat pozitív szabályozójaként azonosították a CBF β -t (core-binding factor β), amelynek hiánya a *Runx2*-deficiens mutáns egerekhez hasonló fenotípust eredményez, ami azt mutatja hogy a Runx2 és CBF β ugyan azon differenciálódási folyamat irányító kaskádjában játszik szerepet. A CBF β a Runx proteinekkal heterodimert képez. (Kundu *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004).

A Runx2 szerepet játszik a hipertrófiázódás másik jelenségében is, a véretek betörésében. A *Runx2*-deficiens egerekben a vázelemek nem vaszkularizáltak. *In vitro* kísérletekkel igazolták, hogy a Runx2 képes aktiválni (Zelzer *et al.*, 2001) a VEGF (vascular endothelial growth factor), egy angiogenikus faktor promóterét, amelyet normál esetben a hipertróf chondrocyták is termelnek.

2.4.3. A csontszövet élettana, csontátépülés és mineralizáció

A csontszövet sejtekből és sejt közötti állományból áll. Jellegzetes sejtjei a csontképző osteoblastok, a belőlük kialakuló osteocyták és a csontbontó osteoclastok. A mezenchimális őssejtekből származó osteoblastok egy sejtmaggal rendelkező (mononucleáris) sejtek. Az osteoclastok nagyméretű, többmagvú sejtek, és a monocita-macrophag sejtfejlődési vonalhoz tartoznak. Az osteoclast különböző hidrolitikus enzimeket (pl. tartarát rezisztens savas foszfatáz, kollagenázok, mátrix metalloproteinázok) szekretál a környezetébe, ezek a mátrix proteinjeit, proteoglikánjait bontják le. Az osteoclastok csontok morfogenezisében, pl. a velőüreg képzésében és a trabekuláris csontszerkezet kialakításában is részt vesznek. Az osteocyták az érett csontban legnagyobb mennyiségben előforduló sejtípus, amely a mineralizálódott csontszövetet körbezárt osteoblastból fejlődik (Lakatos és Takács, 2006).

A csont épülés folyamata és mineralizáció

Az osteoblastok szintetizálják a csontszövet extracelluláris mátrixállományának (ECM) fehérje molekuláit, amelyet osteoid állománynak nevezünk, ez a csont szerves alkotóinak összessége. A csont alapállományának kb. 30-40% -a döntően kollagénből álló szerves állomány, aminek a 85-95% a csontra jellemző kollagén típus az I. típusú kollagén (COL1) alkotja. A molekula kétféle láncból alfa1 és alfa2 épül fel.

A kollagénlánc prolinban gazdag fehérje, valamint megtalálható benne a csontszövetre specifikus hidroxiprolin és hidroxilizin: csont bontásakor ezek a véráramba jutva a vizelettel kiürülnek. Az így ürülő mennyiségből a csontbontásra mértéke jól megítélhető. A csontban a kollagének közül még a III., V., X. típusú kollagén fordul elő kisebb mennyiségben, amelyek a COL1-rostok felszínéhez kapcsolódva a kollagén- hálózat integritásában játszanak szerepet. A csontban a kollagénfibrillumok között számos keresztkötés (cross-link) is kialakul, amelyek piridinium-gyűrűket képeznek. A csontszövet lebontása során ezek is beleszökkennek a véráramba, a vizelettel gyakorlatilag változatlan formában ürülnek: meghatározásuk a csontbontás mértékének klinikai célokra legjobban felhasználható, legpontosabb mutatója (Lakatos, 1999).

A kollagén mellett a csontszövetben más fehérjék is fontos szerepet játszanak a csont felépítésében. A nem kollagén típusú mátrix elemek közé tartoznak a proteoglikán-, a glikoprotein-, és a gamma-karboxilált- fehérjecsaldók tagjai. Ezek a

kisméretű mátrixmolekulák a kollagén fibrillumok közti keresztkötések és a sejt-mátrix kapcsolat kialakításáért, valamint fenntartásáért felelősek. Ilyen, sejteket összetartó kötőfehérje a fibronectin, integrinek, osteopontin. Az extracelluláris szerves mátrix alkotja az osteoid szövetet, amely a későbbiekben kalcifikálódik (mineralizálódik), és az érett csont mátrixállományát képezi (Lakatos és Takács, 2006).

A proteoglikánok savanyú poliszacharidokat (glükózaminoglikánokat) is tartalmazó makromolekulák, ilyen például a kondroitin-szulfát, a hialuronán és a heparin-szulfát. A glikoproteinek csoportjába az alkalikus foszfatáz, az osteonectin (SPARC) és tenascin C sorolható. A legnagyobb mennyiségben található nem kollagén fehérje az osteonectin. Ez a foszforilált glikoprotein erősen köti a kalciumot és a hidroxipapatitot. A fehérjék alakjának, kalciumkötő tulajdonságának és a mineralizációban való részvételének a legjobban kutatott, ismert példáját az osteonectin szolgálja. Oldott állapotban a fehérje pálcika alakú. Rendelkezik egy hidroxilapatit, egy kalcium és egy kollagénkötésre alkalmas doménnel. Oldott állapotban az osteonectin molekula nyújtott formájú, ebben a térszerkezetben a mineralizációt gátló hatású, de ha kollagénnel érintkezik, akkor a kalcium és hidroxipapatit-kötő helyei egymáshoz közel kerülnek (a molekula behajlik), és a kollagén lánc mentén az osteonectin (sparc) molekulák sorba rendeződnek és így biztosítanak lehetőséget a kalciumfoszfát molekulák kristályosodására (Lakatos, 1999; Siebel *et al.*, 2002).

A gamma-karboxilált fehérje család tagja az osteocalcin (oc/BGLAP), amely csak a csontban keletkezik. A család egy másik fontos tagja a matrix gla fehérje (MGP), amely a csontban és porcban egyaránt megtalálható.

Az osteocalcinnak az osteoblastból történő szekréciója után a fehérje hidroxipapatit-hoz kötődik (Lakatos és Takács, 2006). 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-vitaminfüggő folyamat. Gerard Karsenty által vezetett kutatócsoport 2007-ben közölte (Lee *et al.*, 2007), hogy az osteocalcin fehérje hormonként is működik, mégpedig úgy, hogy növeli az inzulin kiválasztást és növeli a sejtek inzulinérzékenységét, így a szervezet energia-anyagcseréjének ez egy kulcsfontosságú eleme. A fokozott csontépítés több tápanyagot igényel, amit osteocalcin fehérje az inzulin szint emelésén és a sejtek inzulinérzékenységén keresztül valósít meg, ezáltal a csontképződéshez több tápanyagot biztosít. Az osteocalcin egy kis hányada a véráramba is kikerül, aminek a

mennyiségéből jól lehet következtetni az osteoblast aktivitásra, ezért az osteocalcin csontképzés jó markere.

Mineralizáció

A mineralizáció során tű alakú, hidroxipatit [$\text{Ca}_5(\text{OH}(\text{PO}_4)_3$] kristályok keletkezése és növekedése zajlik. A folyamat az oldhatatlan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kollagén rostokra rakódásával kezdődik proteoglikánok és a kalciumot nagy affinitással kötő glikoproteinek (legnagyobb mennyiségben osteonectin) hatására. A szeretlen állomány Ca^{2+} - és PO_4^{2-} ionokból álló hidroxipatit kristályok formájában rakódik le a kollagén rostok által létrehozott térhálóban (Lakatos és Takács, 2006). A kalcium sók lerakódását gyorsítja, hogy azokat az oszteoblasztok intracitoplazmatikus vezikulákban koncentrálják, majd exocitózissal transzportálják a csont mátrix üregeibe. E vezikulumok „hólyagok” lipidekben gazdag belső membránjára rakódnak le a kristályok magvai, és itt nyerik el végső alakjukat és nagyságukat. A fibrilláris kollagén hálózati nukleációs felületként, kristályosodási göcközpontként szolgál. A rendezett tű 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 (Lakatos és Takács, 2006).

A csontbontás folyamata

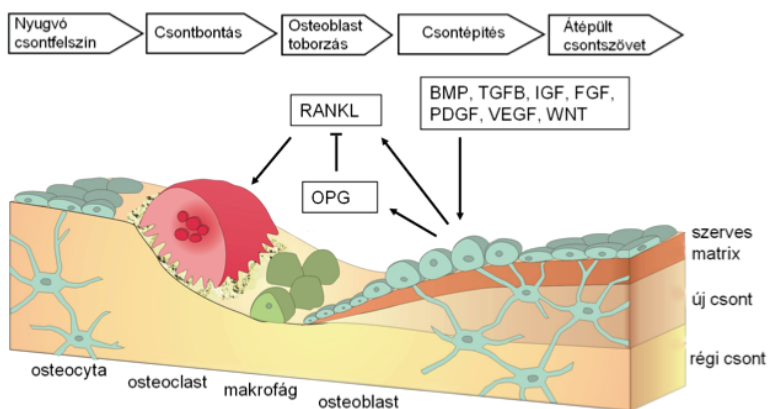
A reszorpciós ciklus korai fázisában az osteoclastok olyan szorosan tapadnak a csontfelszínre, hogy képesek elszigetelni a reszorpciós lakunát az extracelluláris folyadéktól. Ebben az izolált térben a V-típusú ATP-áz protonpumpa hidrogénionokat juttat a csontszöveti felszínre és a nagyszámú klorid csatornán átfolyó kloridionokkal karöltve a lokális pH-t 4,5 körülire csökkentik (Baron *et al.*, 1985; Blair *et al.*, 1990). A savas közegben a kalcium és foszfát oldékonysági szorzata nagyobb, így a szeretlen állomány szolubilizálódik.

Az osteoclastok alsó bordázott régiójában nemcsak ionok, hanem proteolitikus lizoszómális enzimek, főképp katepszin K és mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), is szekretálódnak, melyek a szerves állományt degradálják (Littlewood *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 1995). A reszorpció következtében hátramaradó enyves, gélszerű hulladékot az osteoclastok a rojtos membránfelszín centrális zónáján át endocitózissal bekebelezik. A bontási folyamat végén az osteoclastok leválnak a csont felszínről.

Csontátépülés, remodelling

A csontbontás és csontépítés folyamatai egymással szorosan összekapcsolódnak (coupling), fenntartva ezzel a csont anatómiai és strukturális integritását. A felnőttkori csontéletanra a remodelling folyamata jellemző, amely a felnőtt, érett csont folyamatos átépülését jelenti. A remodelling során a csontépítés, mineralizáció és csontbontás, reszorpció térben és időben szorosan kapcsolatos zajlik és egészséges szervezetben a két folyamat intenzitása megegyezik. A felnőtt szervezet tehát elvileg tartani tudja csúcs csonttömegét, miközben a folyamatos remodelling következtében a teljes vázrendszer megújul. A remodelling folyamata a trabekuláris csontállományban intenzívebben zajlik, mint a kompakt csontokban. Kiegyensúlyozott körülmények között egy év alatt a teljes csonttömeg 5-10%-a újul meg.

A szerves és szervesen állomány képzése több szinten szabályozott folyamat. A csontállomány termelése és bontása végeredményben az osteoblastok, az osteoclastok és az osteocyták jól összehangolt együttműködésének köszönhető (7. ábra).



7. ábra: A csontátépülés elemi egysége (forrás: BTR Image Library, University of York)

A remodelling legfontosabb eleme az osteoblast-osteoclast kapcsolat, amely a folyamat szabályozási csomópontja. Az aktív osteoblast számos olyan molekulát expresszál és épít az osteoid állományba, amelyek az osteoclastok működésének

következtében az osteoid állomány degradálódásával felszabadulnak és a csontsejtek érését, működését közvetlenül befolyásolják.

A vér ionhomeosztázisának a fenntartásában rendkívüli szerepe van a csontátépülésnek, mert innét fedezi a szervezet a szükséges ásványi anyagokat. Például közismert a kalcium emberi szervezetben betöltött esszenciális szerepe. Jelen van a sejten belüli jelátvitelben, mint másodlagos hírvívó és az idegsejtek közötti kommunikációban egyaránt. Nélküle nem létezne normális vérárvadás, ahogyan izomösszehúzódás sem.

A csont anyagcserét szabályozó molekulák és jelátviteli rendszerek

A csontanyagcserét szisztémás hormonok is befolyásolják, így a parathormon (PTH), az aktív D3- vitamin (kalcitriol) a kalcitonin. A parathormon a csontreszorpció egyik fő aktivátora. Hatására nő az érett osteoclastok száma és aktivitása, gyorsul a csontátépülés. A kalcitriol nélkülözhetetlen a csontrendszer normális növekedéséhez és megfelelő mineralizációjához, direkt csonthatása kettős, egyrészt a reszorpciót fokozza, másrészt elősegíti az érett osteoblastok kialakulását és kollagén szintézisét.

A RANK/RANKL/OPG rendszer kulcsfontosságú a csont élettani folyamatainak szabályozásában (Lorenzo *et al.*, 2008). A RANKL, amely az osteoblastok, limfociták és csontvelői sejtek terméke az osteoclastogenezis legerőteljesebb serkentője. Hatását az osteoclastok sejt felszíni receptorán a RANK szignálmolekulán keresztül fejti ki. A RANKL elősegíti az osteoclast képzést, fúziót, differenciációt, aktivációt, ezzel is a csontreszorpció, és a csontvesztés irányába hat. A RANKL specifikus receptorát, a RANK-ot (NF- κ B receptor aktivátor molekula) stimulálja, amely korlátozott számú sejt típusban (progenitor és érett osteoclastok, myeloid-eredetű dendritikus sejtek) expresszálódik. A RANK aktiváció a c-Jun, NF- κ B, Akt/PKB útvonalakat is magába foglaló intracelluláris kaskád beindulásához vezet (Yasuda *et al.*, 1998; Aubin és Bonnelye, 2000). Az OPG egy szolubilis RANKL kötő fehérje, így a csontbontás fiziológiás regulátora. Az OPG az osteoclastokban és dendritikus sejtekben expresszálódó (RANKL specifikus kötéséért felelős) RANK-kal versengve fejti ki hatását (Simonet *et al.*, 1997). Amennyiben az OPG szint csökken, vagy a RANKL expresszió megnő, a csontbontás fokozódik, a remodelling egyensúlya reszorpció irányába billen. Ellentétes hatású az OPG termelés megnövekedése, vagy a RANK mennyiségének csökkenése. A RANKL/RANK/OPG rendszer együttesen, egy citokin

hálózatot alkotva kulcsszerepet játszik a csontanyagcsere szabályozásában (7. ábra), és az osteoclastok biológiájában (Teitelbaum és Ross, 2003; Schoppet *et al.*, 2002).

A Wingless (WNT) jelátviteli rendszer szintén kulcsfontosságú a csont élettani folyamatainak szabályozásában. A WNT fehérjék fokozzák a közös mezenchimális őssejtek osteoblast irányú elköteleződését, ezzel szemben gátolják az adipogenezist. Hatásukra nő az alkalikus foszfatáz expresszió, valamint serkentik az osteoblastok differenciálódási és érési folyamatait. Génkiütött (knock out) egerekben, amelyekben a WNT jelátviteli kaszkád bizonyos tagjainak vagy a koreceptorainak (pl.:LRP5, (Johnson és Kamel, 2007) kifejeződését megszüntették csökkent a csonttömeg, az osteoblastok száma, különböző embrionális csontfejlődési rendellenességek jelentek meg, illetve alacsonyabb szérum osteocalcin szinteket mértek (Milat és Ng, 2009; Krishnan *et al.*, 2006).

A csont morfogenetikus protein (BMP) szignalizációs rendszer: a BMP-k a transzformáló növekedési faktor β (TGF β) polipeptid szupercsalád tagjai. A csont morfogenetikus fehérjék számos extraszkeletális szövetben expresszálódnak, de a csontszövet szempontjából legfontosabbak a BMP-2, -4, -6, és -7 molekulák. Alapvető funkcióik közé tartozik a mesenchimális sejtek differenciálása az osteoblastikus vonal irányába, elősegítve az osteoblastikus érést és működést. A BMP2 hiányos egér életképtelen, míg a BMP4 null mutáció a 6,5 és 9,5 gesztációs nap között elpusztul (a mesodermális differenciálódás hiánya miatt). A BMP6 null egerekben a sternum elégtelen csontosodása figyelhető meg (Canalis *et al.*, 2003). Mind a *BMP-2*, mind a *BMP-4* gén promotere tartalmazza az osteoblastok elköteleződését irányító transzkripció faktor, a Runx2 kötőhelyét. Mindkét BMP molekula fokozza a csontképzést stimuláló inzulinszerű növekedési faktor (IGF1) termelődését. Továbbá, a BMP-2 és BMP-7 a mesenchimális őssejtekben indukálja a Runx2 és egy másik, szintén esszenciális osteogén transzkripció faktor az Osterix/SP7 expresszióját (Xiao *et al.*, 2007). Az osteoblastogenesis szempontjából így egy kulcsfontosságú szabályozó mechanizmus alakul ki (Gazzerro és Canalis, 2006).

A Runx2 és Osterix szerepe a csontfejlődésben

A Runx2 erő teljesen expresszálódik az oszteoblasztokban és a porchártya sejteiben. A porcfejlő dés mellett első sorban az oszteoblaszt differenciációban betöltött szerepéről vált ismertté, hiszen a Runx2^{-/-} egereknek hiányzik mind az endochondrális -, mind pedig az intramembrán úton fejlődő csontozata (Ducy *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997). De nem csak az oszteoblaszt differenciációban játszik szerepet a Runx2, hanem felelős számos ECM molekula transzkripciójának aktiválásában is. Számos gén promóteréhez képes kapcsolódni, mint pl. az osteocalcin (*oc/BGLAP*), bone sialoprotein (*ibsp*), alkálikus foszfatáz (*AP*) és az I-es típusú kollagén (*coll1A1*) génekhez, így a mineralizációt is szabályozza.

Az Osterix (*Osx*) fehérje egy cink-ujj tartalmú, első sorban oszteoblaszt specifikus transzkripció faktor (Nakashima *et al.*, 2002). Nagyon kis mértékben a porcsejtek is termelik, de első sorban a perikondriumban, valamint a intramembrán csontosodással fejlődő vázelemek mesenchimális kondenzációiban expresszálódik az egérmagzat E13.5 stádiumában. Az *Osx*^{-/-} mutáns egér a születés körül elpusztul. Habár ezekben az egerekben a porcszövet normálisan kialakul, teljesen hiányzik mind az endochondrális -, mind pedig az intramembrán úton képződő csontszövet (Nakashima *et al.*, 2002). Az *Osx*-deficiens egerekben az I-es típusú kollagén (*coll1A1*) szintje minimális, az *osteonectin* (*sparc*), *osteopontin* (*op*) és *bone sialoprotein* (*ibsp*) csontspecifikus marker gének nem detektálhatók. Míg az *Osx*-null mutáns embriókban a Runx2 szintje normális, addig a Runx2⁻ null mutáns egérben az *Osx* transzkriptum nem detektálható. Ez azt mutatja, hogy az *Osx* „downstream” helyezkedik el a genetikai útvonalban a Runx2-höz képest (Nakashima és de Crombrugge, 2003).

A jelátviteli rendszerben I-es és II-es típusú BMP receptorokat (BMPRI, BMPRII) különböztetünk meg. A ligand kötődésekor a BMPRII heterodimert képez az I-es típusú receptorral. A BMPRII-t alkotó kináz aktiválja az I-es típusú kinázt és elindítja a foszforilációs kaszkádot, amely hatásai a sejtmagba jutva fokozzák, vagy gátolják a célgének transzkripcióját. Az I-es és II-es receptorok a BMP aktiválás előtt homomer és heteromer komplex formában a sejtfelszínen találhatóak. A BMP-k kötése a preformált heteromer receptor komplexhez, a Smad útvonal aktiválásához vezet (Canalis *et al.*, 2003; Kawabata *et al.*, 1998). A csont morfogenetikus proteinek multifunkcionális fehérjék, az egyetlen olyan jelátviteli molekulák, melyek képesek de novo csontképzésre. Ez az egyedülálló osteoinduktív tulajdonságuk tette lehetővé

terápiás felhasználásukat, elsősorban ortopédiai beavatkozások során (Xiao *et al.*, 2007; Granjeiro *et al.*, 2005).

A lokális citokinek szerepe is fontos. Ilyen az osteoblastok által termelt interleukin-1 (IL-1) kettős hatású molekula is. Egyfelől serkenti az osteoblastok kollagén termelését, másfelől részben közvetlenül, részben a reszorpciót fokozó interleukin-6 (IL-6) expressziójának és hatásának erősítésével az osteoclastokat aktiválja. A tumor nekrosis faktor (TNF) mindkét sejtre (osteoblast és osteoclast) serkentő hatású, tehát a teljes remodelling folyamatát fokozza.

2.4.4. Az oszteoporózis jelentősége és genetika háttere

A csonttritkulás világszerte jelentős népegészségügyi probléma, az egyik leggyakoribb civilizációs csontanyagcsere betegség. Európában, az Egyesült Államokban és Japánban mintegy 75 millió a betegek száma. Becslések szerint az egész világon 200-250 millió ember él csonttritkulással. Az északi országokban a beteg lakosság számaránya valamivel magasabb, dél felé haladva az előfordulás csökkenést mutat. Az Európai Unióban a csonttritkulás 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 átéltek számára az életminőség romlása és a fájdalom érzése, családjuk számára pedig a tehetetlenség elfogadhatatlan (Somogyi *et al.*, 2000). Európán belül a magyarok és a norvégok rendelkeznek a legalacsonyabb csontsűrűséggel. Magyarországon 900 ezer-1 millió beteget tartanak nyilván, ebből 600 ezer nő. Kricsfalusy és munkatársai 1999-ben 10 milliárd Forint feletti összegre becsülték a közvetlen ellátási költségeket (Somogyi *et al.*, 2000), amely nem foglalja magába az otthoni betegápolásra kiadott összeget. Egy csípőtáji törés ellátása 500 ezer, míg egy perifériás törés ellátása 100 ezer Forintra tehető 2006-os adatok szerint.

A csonttömeg a hossznövekedés megszűnését követően 25-35 éves életkorig növekszik, s eléri az egyénre jellemző csúcs csonttömeget. A körülbelül 30 éves korra elért csúcs csonttömegnek egy rövid ideig tartó egyensúlyi plató fázisa után megindul a csökkenése, amely életünk végéig tart. Nőkön 6-8 évig tartó, különösen jelentős csontfogyás a menopauza táján következik be, majd tovább fogy a csonttömeg, de már lényegesen kisebb mértékben. Férfiakban a klinikailag jelentős fokú csontvesztés általában csak a 60-65. életév körül észlelhető. A csontminőség romlását az osteoblast aktivitás csökkenés és az osteoclastok élettartamának növekedése, apoptózisának késése okozza, mely miatt a csontgerendák perforálódnak, kitornek.

Az oszteoporózisban mai ismereteink szerint mind nőkben, mind férfiakban az ösztrogén hiány skeletális hatásai dominálnak. Az ösztrogén szint 90 %-os esése először egy felpörgött csont metabolizmussal és „remodeling”-gel (azaz „turnover”-rel) jellemezhető, mintegy 5 éven át tartó csontvesztéshez vezet, ami döntően a trabekuláris állományt érinti és évi akár 3%-os csontvesztéssel járhat.

A gyógyszeres beavatkozásra a férfiak a nőkkel egyező formában és mértékben reagálnak. Ezt indirekt az is alátámasztja, hogy a nembéli eltérések ellenére a férfi és női csontritkulás molekuláris háttere ugyanaz.

Magának az oszteoporózisnak 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 kialakult oszteoporózisos állapot további romlását a mai gyógykezelés csak megállítani, ill. lassítani tudja, visszafordítani nem.

A csontvesztés sebességét 60-80%-ban genetikai, s csupán 20-40%-ban környezeti tényezők határozzák meg. Ez a tény alátámasztja, hogy nagy szükség van a betegség genetikai és molekuláris biológiai megközelítésére, diagnosztizálására.

Az oszteoporózisban szerepet játszó génpolimorfizmusok

A csontmetabolizmus és a csontsejtek szabályozásában részt vevő gének tanulmányozása során már több mint száz olyan génszakaszt azonosítottak, amelyeknek az osteoporosis kialakulásában illetve a csonttömeg csökkenésében szerepe van. A betegségek genetikai hátterében fontos szerepet játszó a kandidáns gének „single nukleotid polimorfizmusait” (SNP) vizsgálták és számos ilyen genetikai variáns összefüggését írták le a csontdenzitással és a törési rizikóval kapcsolatosan.

A kapcsoltsági viszonyok alapján a szignifikáns SNP-k valószínűsítik azokat a génszakaszokat, amelyeken belül megtalálható az eltérő fenotípushoz/funkcióhoz vezető allélikus variáns. A legfontosabb kandidáns gének az LRP5 (liporoprotein receptor- kapcsolt fehérje 5), a Col1A1, TGF- β (transzformáló növekedési faktor béta), BMP (csont morfogenetikus proteinek), VDR (D-vitamin receptor), RANKL (NF- κ B receptor aktivátor ligand), ESR1 (ösztrogén receptor alpha).

Kiemelendő a *coll1A1* gén első intronjában található Sp1 kötőhelyben található „S” illetve „s” allélikus polimorfizmus, amelyről először sikerült kimutatni, hogy befolyásolja a BMD-t (csont sűrűséget) és a csont minőséget. Ezáltal genetikai markere a oszteoporózis/csonttörési hajlamnak (Alvarez *et al.*, 1999). Az un. „s” allélt hordozó („S/s” illetve „s/s” genotípusú) egyéneknél alacsonyabb a BMD és fokozott az oszteoporotikus törések száma (S/S: 52 illetve s/s: 86%), szemben a „S/S” genotípussal.

A *coll1A1* gén az I. típusú kollagén $\alpha 1$ (I) láncát kódolja. I. típusú kollagén molekulát két $\alpha 1$ (I) lánc és egy $\alpha 2$ (I) lánc trimerje alkotja. A *coll1A1* gén G1245T polimorfizmusa esetében a báziscsere a Sp1 transzkripció faktor kötőhelyét érinti. A gén 1245. pozíciójában helyet foglaló 1245G allél jelölése: „S”, a 1245T allél jelölése „s”. Az 1245. pozícióban T nukleotid található (1245T), az allél transzkripciója. A „s” allél miatt megváltozik az $\alpha 1$ (I) és $\alpha 2$ (I) láncok aránya, mely a csontszövet erőssége, valamint a csontdenzitás csökkenéséhez vezet, ami növeli a törési rizikót.

3. CÉLKITŰZÉS

Előzmények: A gímszarvas molekuláris genetikai kutatások jelentőségét Orosz László akadémikus ismerte fel még a 70-es, 80-as évek fordulóján, majd évtizedes előkészületek után 1999-ben szervezte meg a téma laboratóriumi művelését Gödöllőn a Biotechnológiai Központban (MBK). A témára doktori iskola és program szerveződött (SZIE, ELTE). A gímszarvas molekuláris genetikai kutatások megteremtését több kedvező tényező együttállása hozta meg: (i) a gímszarvas (*Cervus elaphus*) genetikailag jól vizsgálható élőlény lett, mivel a miluval (*Elaphurus davidianus*) alkotott fajhibridje hímje visszakeresztezhető gímszarvas tehennel. Az „interspecifikus back cross” populáció a LOD elemzés és DNS markerek alkalmazhatósága segítségével géntérképezésre lehetőséget ad; (ii) az NKFP Széchenyi program (2001-2007) jelentős forrást biztosított a témához, amelyet jelentős OTKA, FVM, ETT támogatások is kiegészítettek és kiegészítenek; (iii) egy évtizedek óta, a kifinomult fág genetikán és a DNS technológiák teljes eszköztárán csiszolódott laboratórium elméleti és módszertani felkészültsége, kiváló infrastruktúrája állt a háttérben. A „Gímszarvas Molekuláris Genetika Laboratórium” 1999-ben állt fel, amelynek munkájába elsőéves egyetemistaként 2000-ben csatlakoztam. A kutató csoport akkor a gímszarvas agancs fejlődését irányító genetikai hátér feltárásával foglalkozott. Ez egy „pioneer” kutatás volt, mivel a molekuláris genetikai megközelítést integrálta a témában, ráadásul egy addig megközelíthetetlen kísérleti modellben.

A munka számos innovációt követelt, amelynek eredménye egy nemzetközileg is számottevő laboratórium és infrastruktúra kiépítése lett (pl. fág, plazmid, baktérium genetika, rekombináns DNS technológiák teljes vertikuma - génlónozás, szekvenálás, AFLP, Northern-, Western-, Southern-, *in situ*- hibridizációs technikák, cDNS-, genomi-és plazmid génkönyvtárak készítése, DNS chip technológiák, bioinformatikai feldolgozások, célirányos korszerű műszerezettség). Doktorandusz kollégáim Molnár Andrea és Gyurján István meghatározták, hogy az agancs rendkívül gyors növekedését alapvetően gátló gén aktivitások tartják szabályozott mederben és óvják meg a fejlődő agancsot a tumoros elfajulástól. Borsy Adrienn kolléganőm megtalálta a genetikai összefüggést a gímszarvas fiziológiás és az ember patológiás oszteoporóziása között.

Céljaim:

Az én feladatom az agancs csont robosztus csontosodása és a vázcsontozat csonttritkulása közötti epigenetikai összefüggés feltárása volt (azaz a folyamatban szereplő gének és aktivitásaik feltárása), amely a következő nagy részfeladatokat jelentette:

- (i) a ciklikus fiziológiás oszteoporózis és regenerációjának szövettani demonstrálása
- (ii) az agancs csúcs mineralizáció (kalcifikáció) gén aktivitásainak meghatározása
- (iii) az agancs csont és a váz csontozat génexpressziós változásainak leírása
- (iv) az agancs és a váz porcban és csontban a génaktivitások mértékének kvantitatív meghatározása
- (v) a kutatócsoport rendelkezésre álló infrastruktúra fejlesztése

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Anyagok

4.1.1. Standard oldatok

10xMAE	500 mM MOPS 100 mM EDTA
20xSSC	3M NaCl 0,3M nátrium-citrát
10xTBE	850 mM Tris bázis 850 mM bórsav 20 mM EDTA
10xlambda puffer:	1M NaCl 0,1M MgSO ₄ ·H ₂ O 0,35M Tris-HCl (pH 7,5)
1xlambda puffer:	10xlambda puffer 1:10 arányú hígítása desztillált vízzel és 0,01% zselatin hozzáadása
Random priming jelölő puffer:	500 mM Tris-HCl (pH 8) 50 mM MgCl ₂ 100 mM DTT dNTP mix (20 mM dCTP, dGTP, dTTP) 2 mM HEPES (pH 6,5)
Hibridizációs puffer (<i>in situ</i>)	50% formamid0 100 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1x Denhardt's reagens 500 mM NaCl 10% dextranszulfát 0,05% SDS 1 mM EDTA
50x Denhardt's reagens:	1% ficoll 1% polivinilpirrolidon 2% BSA
Detektáló puffer (<i>in situ</i>):	10% polivinil-alkohol 100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
10xPBS (pH 7,4):	1 370 mM NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM KH ₂ PO ₄
10xTBS (pH 7,4):	1 370 mM NaCl 27 mM KCl 250 mM Tris bázis

4.1.2. Felhasznált baktériumtörzsek, fágok és táptalajok

***E. coli* DH5a** *supE44ΔlacU169 (φ80LacZΔM15)*
(Hanahan, 1983) *hsdR17 RecA1 gyrA96 thi-1 relA1*

***E. coli* XL1-blue** *endA1 gyrA96 hsdR17 lac— recA1 relA1 supE44 thi-1*
(Wood *et al.*, 1985) *[F' lacIqZ DM15 proAB Tn10]*

λTriplex2 fág cDNS könyvtár (Clontech)

LB tápoldat (1 000 ml-ben): 10g Bacto tripton
(pH 7,0) 5g Bacto élesztő kivonat
10g NaCl

LB agar lemez: 12g agar/1 000ml LB tápoldat

LB top agar: 7g agar/1 000 ml LB tápoldat

4.2. Mintavételek

A munkámhoz szükséges gímszarvas agancs, vázcsont és magzati mintákat Pannon Lovasakadémia bőszenfai szarvasfarmja biztosította. A mintavétel a magyar állatvédelmi törvény (243/1998, XII. 31) szerint történt.

A kísérletek kardinális pontja a jó minőségű és jól dokumentált szövetminták gyűjtése, amelyek lehetővé teszik a sejtalkotók épségben történő kinyerését.

Az RNS-ek degradációjának lassítása érdekében a mintákat azonnal jégre helyeztük, majd szétdaraboltuk és 30 percen belül folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Felhasználásig folyékony nitrogénben vagy -80°C-on tároltuk.

A szövettani vizsgálatokhoz a szétdarabolt mintákat 4%-os 1x PBS-ben oldott paraformaldehidben fixáltuk 24 órán keresztül. Ezután a mintákat 70%-os etanolban tároltuk a paraffinba történő beágyazásig.

4.2.1. Szarvas agancs szövetek

A gímszarvasbikák bársonyos-barkás agancsaiból május-júniusban vettünk mintákat kísérleteinkhez. A fejlődő barkás agancs csúcsok felső 10-15 cm-es darabját távolítottuk el az agancs növekedés 80-90 napja között. A fejlődő agancs csont mintákat

a középág és jég ág közötti területről vettük. A bársonyos-barkás agancs általunk vizsgált szövettani rétegeinek (mezenchima, előporc és porc) elhelyezkedését Li és mtsai (2002) közlése alapján határoztuk meg. Bár az egyes szöveti zónák szemmel is jól elkülöníthetőek, a különböző zónák minden kétséget kizáró elválasztása érdekében a szövetek között kb. 0,5 cm-es átmeneti réteget kihagytunk.

4.2.2. Szarvas magzati porcszövetek

A szarvas magzat mintákat december közepétől január közepéig gyűjtöttük a szarvasfarm állományának selejtezési ideje alatt. Kísérleteinkhez a három-négy hónapos szarvasmagzat növekedési porclemezére volt szükségünk. Eltávolítottuk a hosszú csöves csontok végeiről az ízületi porcot, illetve a csont középső területét.

4.2.3. Gímszarvas csont mintavétel

A gímszarvas csont mintákat az agancsciklushoz kötötten három időpontban vettük: (i) a vázcsontozat fiziológiás oszteoporózisakor június elején (Stag1), (ii) barka hántásakor azaz csontos agancs elkészültekor, az oszteoporózis regenerációkor, július közepén (Stag2), (iii) a csont „nyugalmi” állapotában, november végén (Stag3). A szarvasbikákat Stag1, Stag2, Stag3-nak mintának neveztük el. (2. ábra). Érdemes megjegyezni, hogy Stag1 8 éves korára kapitális trófeát rakott fel, az utolsó hullott agancsa 8 kg-os volt. Stag2 barka hántásakor agancsa 8,1 kg volt. A november végi Stag3 7 kg-os volt a trófeája. A mintavétel helyei: csigolya-, szegy-, medencetaraj-, lábszár (metatarsus)-, lapocka-, bordacsont. Az említett csontmintákon kívül vizelet és vérmintákat is vettünk.

4.2.4. Humán csontszövet minták

A mintákat a SOTE I. sz. Belgyógyászati Klinikán gyűjtötték postmenopauzális oszteoporótikus és nem oszteoporótikus nőkből. A munkát a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) engedélyével (6392-1/2004- 1018EKU) illetve valamennyi páciens írásos beleegyezésével történt. Az oszteoporótikus betegek átlag életkora $67,71 \pm 6,05$ év volt, T-score $< -2,5$ SD; a kontroll csoporté $63,50 \pm 7,95$ 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 (Balla *et al.*, 2007). A kísérlethez beválogatott postmenopausás korú nők nem részesültek semmilyenfajta hormonpótló vagy szteroid terápiában.

4.3. Szövetteni vizsgálatok

Metszetkészítés: a 4%-os paraformaldehidben fixált mintákat növekvő töménységű etanol sorozatban dehidratáltuk, majd xilollal kezeltük, végül alacsony olvadáspontú paraffinba (Paraplast, Sigma) ágyaztuk. HM 335 E rotációs mikrotommal 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket (3-aminopropyl) triethoxy-silane-nal kezelt tárgylemezre rögzítettünk. A szövettani vizsgálatokhoz minden esetben szükséges volt, hogy a metszeteket deparaffináljuk és rehidratáljuk.

Hematoxin-eozin festés: a metszeteket Mayer-féle hematoxinben festettük 10 percen keresztül, majd folyó csapvíz alatt tartottuk, amíg a sejtmagok elnyerték végső liláskék színüket. Ezt követően a metszeteket 1%-os eozin oldatban festettük 5 percen át. Az etanollal történő dehidrációt követően a metszeteket DPX mounting media-val (Fluka) fedtük le.

Alcian blue/alizarin red festés: a metszetek 3 percig álltak a 80%-os etanol-20%-os ecetsav elegyében feloldott 0,3%-os alcian blue festékben. Ezt követte a 2%-os KOH-oldattal történő mosás, majd a metszeteket az 1%-os KOH-ban feloldott 0,3%-os alizarin red-del festettük 1 percig. A dehidratációt acetonnal és xilollal végeztük és a metszeteket DPX mounting media-val (Fluka) fedtük le.

4.4. DNS izolálás

A DNS izolálás vérből és húsmintákból történt a QIAGEN QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN) használatával, a gyártó utasításai szerint.

4.5. RNS izolálás

Totál RNS: a mintákat folyékony nitrogén alatt homogenizáltuk, majd 300-500 mg szövetmintából savas fenol-kloroform extrakciót követően az RNS molekulákat 2,5- és 7,5 M-os LiCl₂ oldattal csaptuk ki és 75%-os etanollal mostuk, a szárítást követően 20 µl RNáz-mentes vízben oldottuk fel. Az RNS koncentrációját és minőségét Agilent Bioanalyzer, automatizált kapilláris elektroforézis rendszeren ellenőriztük a RNA6000 Pico Chip Kit felhasználásával. A minta intaktságát az RNS integritási számmal (RIN) jellemeztük, ami a 18S és a 28S riboszomális fragmentumok arányából, valamint az alapvonal alapján mutatja meg, hogy a vizsgált minta milyen minőségű RNS-t

tartalmaz. Az egytől tízig terjedő skálán a hétnél nagyobb RIN értékkel rendelkező mintákat vontuk be a kísérletekbe.

mRNS: az izolálás a Dynabeads Oligo(dT)25 paramágneses gyöngyök segítségével (DynaL Biotech) a gyártó által ajánlott pufferek és protokoll felhasználásával történt.

4.6. cDNS szintézis és könyvtárak létrehozása

A cDNS szintézist és könyvtárak készítését a SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) segítségével végeztük. A cDNS szintézishez 1 µg mRNS mintákat használtunk fel a CDSIII oligo(dT) primer és SMART IV oligó felhasználásával. A reverz-transzkripcióhoz SuperScript II RNaseH-minus reverse transcriptázt (Invitrogene) használtunk 20 µl térfogatban, a gyártó ajánlásának megfelelő eljárással. 3 µg dupla-szálú cDNS-et *Sfi*I endonukleázzal elhasítottunk, majd SizeSep400 (Pharmacia) kromatográfiás oszloppal méret szerint frakcionáltuk. Ezután a kicsapott cDNS-eket *Sfi*I enzimmal megemésztett, defoszforilált λTriplex2 vektorba építettük. A ligálási reakciókból 1 µl-t használtunk fel az *in vitro* pakoláshoz (GigapackGold, Stratagene). 1-2 x 10⁶ rekombináns fágot *E.coli* XL1 Blue törzsében sokszorozítottunk 10⁹-10¹⁰ fág/ml koncentrációig. A könyvtárakat 1x Lambda pufférben 10% DMSO hozzáadásával -70 °C-on tároltuk.

4.7. Szarvas agancs cDNS microarray platform létrehozása, az „Agancs chip”

Kereskedelmi forgalomban gímszarvas microarray nem kapható, ezért a gímszarvas agancs cDNS microarrayt, az „Agancs Chipet” saját magunk készítettük. Kereskedelmi forgalomban gímszarvas microarray nem kapható. Microarray vizsgálatainkhoz az emlősök ortológ géneinek nagyfokú szekvencia hasonlóságát kihasználva heterológ rendszereket használtunk eddig (gímszarvas cDNS vs. egér-, patkány-, humán-, majd később szarvasmarha cDNS platformokat).

4.7.1. cDNS könyvtárak konvertálása

A SMARTTM cDNS könyvtárakat plazmid klónokká konvertáltuk az *Escherichia coli* BM25.8 törzsében, a gyártó protokollja szerint.

4.7.2. Klónok amplifikálása, szelektálása

A kolónia PCR után 3200 cDNS-t random módon választottuk ki a chip készítéséhez. A cDNS inszerteket a magzati növekedési porclemesz, az agancs mezenchima, előporc, és a porc könyvtárakból amplifikált PCR segítségével, plazmid specifikus primerekkel, majd a MultiScreen-PCR plate segítségével tisztítottuk (Millipore, Billerica, MA, USA). A visszaoldás 50%-os dimethyl sulfoxidban történt.

4.7.3. Chip nyomtatás

A cDNS-eket a Microboti Total Array System (VioRobotics, Cambridge, UK) robottal vittük fel a chip tárgylemezre (FMB cDNA slides, Full Moon BioSystems, Sunnyvale, CA, USA) „chipekre” a MicroGrid Total Array System (BioRobotics, Cambridge, UK) chip-nyomtató robot segítségével. A nyomtató feje 16 db (4x4 –es formátumú) tűt tartalmazott. Az amplifikált cDNS-ek duplikátumban vittük fel minden egyes chipre. A „spot”-ok átmérője 200 µm volt. A hibridizáció előtt a lemezek 1xSSC, 0,2% SDS, 1% szarvasmarha albuminall blokkolva lettek 30 percig 42 °C-on, majd vizes mosás után meg szárítottuk.

4.7.4. Próbakészítés, hibridizálás és adatfeldolgozás

A hibridizációs próba készítéséhez 5 µg totál RNS-t irtunk át cDNS-sé a poly-dT primed Genisphere Expression Array 350 Detection Kit system kit segítségével (Genisphere, Hatfield, PA, USA) a gyártó utasításai szerint.

A cDNS chipekre rá mértük a jelölt próbákat a hibridizációhoz, ami a Ventana típusú hibridizációs állomáson történt (Ventana Discovery, Tucson, AZ, USA). A hibridizáció két körben történt. Az első hibridizáció a jelölt próbával történ 42 °C 6 órán át „FGL” hibridizációs pufferben (10x Denhardt solution, 0.25M sodium phosphate buffer pH 7.0, 1mM EDTA, 1xSSC, 0.5% SDS). Majd 2.5 µl Cy5 jelölő reagenst adtunk 200 µl hibridizációs pufferhez (Ventana) és 42 °C -on 2 órán át hibridizáltunk. A chipeket kétszer mostuk a0,2 x SSC vel szobahőmérsékleten 10 percig. Száradás után a chip jeleit beszekeneltük.

Az adatok feldolgozása az előzetesen már leírtak (Puskás *et al.*, 2002; Gyurján *et al.*, 2007) szerint történt.

4.7.5. A cDNS klónok szekvenálása

A bioinformatikai feldolgozás után a statisztikai elemzések szerint expressziós különbséget mutató cDNS-ek megfelelő klónjait előkerestük a glicerinen tárolt törzsgyűjteményből. A kolónokból kolónia PCR-t készítettünk plazmid specifikus

primerek segítségével, majd a klónozott fragmentumok bázis sorrendjét meghatároztuk (Applied Biosystems ABI prism 377 DNS szekvenáló készülék, MBK-BIOMI).

4.8. Szarvasmarha oligonukleotid microarray technológia (Affymetrix)

A csont minták vizsgálatakor már rendelkezésre állt a Bovine 24K Affymetrix microarray. Azért váltottunk erre a platformra, mert a bízunk a szarvasmarha és a gímszarvas gének nagyon nagyfokú szekvencia homológiájára (hiszen a két faj evolúciósan nagyon közel áll egymáshoz). Ezen felállással a fajok közötti szekvencia különbségekből adódó hibridizációs veszteségeket lényegében kiküszöböltük.

A jelen disszertációban közölt munkánk igazolta bizalmunk jogosságát, mivel cDNS szinten 97-100 % homológiákat tapasztaltunk. Megjegyzésre érdemes, hogy kedvező tapasztalatink voltak már más heterológ felállásoknál is (pl.: egér vs. gímszarvas (Gyurján *et al.*, 2007), humán vs. gímszarvas (Borsy *et al.*, 2009).

4.8.1. Próbakészítés, hibridizáció és az adatok beolvasása

A kiinduláshoz 4 µg totál RNS-t használtunk fel. A jelölést az amplifikációval egy lépésben végeztük el, a reakcióban biotinilált nukleotidokat építettünk be. Amelyhez az egy körös IVT (*in vitro* transzkripció) módszert használtuk. Első lépésben egy cDNS-t szintetizáltunk egy olyan poly-dT oligonukleotid segítségével, amely az 5' végén egy T7 bakteriofág promóter szekvenciát tartalmaz. A reakcióban az oligo-dT a mRNS molekula poly-A végéhez kötődik. Innen indul a reverz transzkripció. Ezáltal egy olyan duplaszálú hibrid molekulát kaptunk, amely tartalmazza az eredeti géntermék (mRNS) szekvenciáját, valamint az újonnan szintetizált komplementer cDNS szekvenciát. Ezt követően az eredeti templátot (mRNS) RNázH enzim segítségével eltávolítottuk, majd DNS-polimeráz segítségével duplaszálú cDNS molekulává egészítettük ki. Erről a molekuláról pedig végrehajtottuk az amplifikációt, amelynek lényege, hogy T7 RNS-polimeráz segítségével a cDNS molekulába épített T7 promóter szakaszról IVT-t hajtottunk végre. Az IVT során beépítésre kerültek a biotinilált nukleotidok. Ezáltal az eredeti molekulával (mRNS) komplementer biotinilált RNS molekulát kaptunk (jelölt cRNS). Az IVT első köre végére a teljes mRNS állomány torzítatlan, sokszorosított (10000x), jelölt (biotinilált) komplementer (cRNS) szekvenciáit kapjuk meg. A jelölt cRNS molekulákat tömény sóoldatban magas hőfokon fragmentáltuk, majd 16 órán keresztül, 60 rpm-en, 45°C fokon Chip-re hibridizáltuk, ahol a jelölt molekulák

hozzákapcsolódtak a Chip felszínére rögzített, ismert pozícióban lévő komplementer molekulákhoz. A hibridizációt követően különböző sókoncentrációjú és hőmérsékletű pufferek segítségével eltávolítottuk a nem kötődött, valamint a rosszul kötődött jelölt komponenseket (cRNS). Ezt követte a festés, ahol a módosított nukleotidokhoz fluoreszcens festéket kapcsolunk. Mivel egységnyi nukleinsavhoz egységnyi festék képes kötődni (ugyanolyan G:C arány mellett), így a fluoreszcencia intenzitásból következtethetünk a nukleinsav koncentrációjára, azaz génexpresszió mértékére. A fluoreszcens jelölés három lépcsőben történt, automatizált körülmények között. Ennek lényege a következő: a biotinhoz először egy streptavidin-phycoerythrin (SAPE) konjugátum kapcsolódik; a második lépésben egy SAPE specifikus biotinizált antitesttel végzünk immunreakciót; majd a harmadik lépésben ehhez az ellenanyaghoz ismét egy SAPE molekulát kapcsolunk. Ezáltal egy fordított piramis keletkezik a Chip felszínén, ami jelerősítésre szolgál. A következő lépés a Chip leolvasása. A Chip felszínét egy lézer gerjeszti 570 nm-en, és az emittált fluoreszcens jelet 1µm-es felbontással a számítógép detektálja, majd kép formátumban tárolja. A képből a szoftver egy cella fájlt (CEL) generál.

4.8.2. Adatok feldolgozása és kiértékelése

Az egyes cellákban (egy cella reprezentálja egy gén egy bizonyos szakaszát, egy „probe”-ot, amely 25mer hosszúságú oligo-nukleotid) mért fluoreszcencia intenzitásokat egy úgynevezett CEL fájl tárolja. A nyers fluoreszcencia intenzitásokból többféle módon állapítható meg a génexpressziós különbség. Ehhez a legjobb platform a BIOCONDUCTOR programcsomag, ami R környezetet használ. Számos csomag és függvény áll rendelkezésre a Chip-adatok kiértékelésére. Első feladat a minőségellenőrzés (QC, “Quality control”), amelynek elvégzésével információt kapunk a hibridizált Chip-ek minőségéről. Több QC eljárás is létezik, ilyen a “Present percent”, ami megmutatja, hogy a gének hány százaléka expresszált a sejtben, vagyis az adott Chip-en hány gén adott jelet. Ez általában 25-45% közötti érték. Ha ettől lényegesen eltér az érték amplifikációs vagy hibridizációs hiba lépett fel. Esetleg a minta nem volt megfelelő minőségű. Ha hét feletti RIN értékű RNS-ből indulunk ki a gyakorlatban ez nem fordulhat elő. További eszköz az “RNA digestion plot”, amely meredekségével megmutatja a kiindulási minta minőségét. A fluoreszcencia intenzitás eloszlása további információt ad a hibridizáció minőségéről. Második feladat az elő-feldolgozás (preprocessing), ami három lépésből áll: háttér korrekció, normalizáció és összegzés. Az első lépésben történik a háttérkorrekció, ahol kivonjuk a cellák körüli fluoreszcencia

intenzitást a cellákban mért értékekből. Ezt követően normalizáljuk a mintákat, ami azt jelenti, hogy közös szintre hozzuk az egyszerre vizsgált és elemzett Chip-ek fluoreszcencia intenzitás tartományát és eloszlását. Megkülönböztetünk Chip-en belüli és Chip-ek közötti normalizációkat. A normalizált értékeket leggyakrabban logaritmikusan transzformáció után származtatjuk. A normalizációt az összegzés követi, ahol az egy génhez tartozó fluoreszcencia intenzitásokról egyetlen értéket képezünk, ugyanis ugyanaz a gén több ponton van reprezentálva a Chip-eken. Vagyis a „probe”-okból „probe set” szintű információt képezünk. Az előfeldolgozott adatokból készül a különböző szinten expresszálandó gének kiválogatása („differential expression”, „feature selection”), vagyis az a génlista, amely a csoportok közötti szignifikáns expressziós különbséget mutató gének listáját tartalmazza a géneket Northern hibridizációval validáljuk.

4.9. PCR, DNS fragmentek klónozása

PCR reakcióhoz a következőket használtuk: 5 µl 10X PCR Gold Puffer, 3 µl 25 mM-os MgCl₂, 3 µl dNTP mixet (egyenként 10 mM), 1 µl-1 µl 20mM-os forward és reverse primer, 0,3µl AmpliTaq Gold enzim. Templát 15 ng cDNS vagy genomiális DNS a céltől függően. A végtérfogot 50 µl.

A PCR reakció ciklusai a következők voltak: 5 perc 94 °C-os kezdeti denaturáció egy ciklus hosszan, amelyet 94 °C-on 45 másodperces denaturáció, 58 °C-on 35 másodperces annealáció és 72 °C-on 3 perces elongáció követett 30-45 ciklus hosszan, attól függően mi volt a templát (cDNS vagy genomiális DNS).

A PCR technikával kapott fragmenteket 1,2%-os agaróz gélen választottuk el. A termékeket Qiagen DNS izoláló kittel a gyártó utasítása szerint visszaizoláltuk.

A nem a cDNS könyvtárból származó cDNS és DNS fragmenteket pBluescriptKS (Ramp) (Stratagen) vagy pGemTeasy (Ramp) (Promega) vektorba ligáltuk, majd DH5α baktériumtörzsbe transzformáltuk. A transzformáláshoz használt kompetens sejteket a Mandel és Higa (1970) által leírt módszer szerint készítettük és -80°C-on tároltuk (Mandel és Higa, 1970). A transzformálás első lépéseként a sejtekhez hozzákevertünk a bejuttatandó DNS-t, majd 40 percig jégen tartottuk őket. Ezután 2 perc 42 °C-os hősokk, majd 10 perc jég következett. Ezt követően a sejteket 1 órán át regeneráltuk LB tápoldatban, 37 °C-on. Ezután a baktériumokat ampicillin és x-Gal tartalmú szilárd LB táptalajra szélesztettük.

4.10. Northern hibridizáció

Az analízishez 5 µg total RNS mintát használtunk, amelyet 1,2 %-os formaldehid-agaróz gélen futtatunk, majd HybondN+ (Amersham) membránra vittünk át kapilláris blottolási technikával. A PCR technikával kapott cDNS (kb. 500 bázispár) fragmenteket (kb. 50 ng) [α 32P]dATP -vel jelöltük random hexamer primerekkel és *E. coli* DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega) felhasználásával, „random priming” 10X pufferben. A hibridizációkat 65 °C-on végeztük PerfectHyb TM Plus (Sigma) pufferben és a gyártó által megadott paraméterekkel végeztük el. A radioaktív jelet Storm Phosphorimager készülék (Molecular Dynamics) segítségével detektáltuk.

4.11. Kvantitatív valós idejű Q-RT-PCR

A génexpressziós mintázatokat 7 posztmenopauzás stádiumú, oszteoporótikus (PP) és 10 posztmenopauzás, nem oszteoporótikus (PNP) független, magyar, kaukázusi nő csontmintájában mértük fel.

100 ng humán mRNS-t cDNS-sé 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 reakciótérfogatban. TaqMan Gene Expression Assay of ABI Prism 7500 Real-Time PCR rendszert (Applied Biosystems) alkalmaztuk a szelektált célszekvenciák amplifikálására. Az kapott Ct adatokat a Relative Quantification Study of 7500 System SDS Software 1.3 (Applied Biosystems) segítségével analizáltuk.

További részletek találhatóak Balla és Borsy közleményében (Balla *et al.*, 2007; Borsy *et al.*, 2009).

4.12. *In situ* hibridizáció agancs szöveteken

A bársonyos-barkás agancs különböző zónáiból és a magzati porcából készült metszeteket deparaffináltuk, rehidratáltuk és 10 µg/ml Proteináz K-val előkezeltük. Az emésztés 37 °C-on végeztük, az agancs minták esetén 30, a magzati porcnál 20 perc hosszan. Az enzimes feltárást követően a metszeteket 4%-os paraformaldehiddel utófixáltuk és 0,25%-os ecetsav-anhidridben acetiláltuk. A RNS próbákat digoxigenin-UTP-vel (Roche) jelöltük az *in vitro* transzkripció során. A hibridizációt megelőzően a

próbákkal 3 percig 94 °C-on denaturáltuk, majd 55 °C-on 16-18 órán keresztül inkubáltuk metszeteket. A hibridizáció után a metszeteket 2XSSC, 50% formamid oldatban mostuk 30 percig a hibridizációs hőmérsékleten, majd 20 µg/ml RNáz A enzimmal kezeltük 37 °C-on 30 percig. Végül 0,2XSSC-vel mostuk kétszer 30 percig. A digoxigeninnel jelölt RNS-t birka anti-digoxigenin alkalikus-foszfátáz antitesttel (Fab fragment, Roche) detektáltuk. A detektálás alkalikus-foszfátáz reakción alapult, amelyhez nitrotetrazolium blue kloridot és 5-bromo-4-kloro-3-indolyl foszfátot alkalmaztunk kromogén szubsztatraként. A metszeteket Kaiser-féle glicerin zselatinnal (Merck) fedtük le.

4.13. GC-MS extrakció és metabolit analízis

A GC-MS vizsgálatokhoz 60 mg fagyasztott mintából indult ki a poláris extrakció. A minta előkészítése, származékolást és a metabolit analízist Nikiforova és mts. (2005) módszere szerint végeztük el. Rabbitot adtunk a mintákhoz belső referencia kontrollnak. A minták a „splitless” módban injektáltuk (1 µg/mintánként) és a quadropole-típusú GC-MS készülékkel analizáltuk (Finnigan Trace/DSQ, Thermo Electron Corp.). A kromatogramot és tömeg spektrum a XCALIBUR szoftver (Thermo Electron Corp.) és a NIST 2.0 könyvtár segítségével értékeltük ki.

4.14. Bioinformatikai vizsgálatok

Az összes szekvencia elemzése UNIX szoftver környezetben történt a BASH és PERL szkriptek alkalmazásával. A promóter szekvenciák elemzéséhez az ENSEMBL és DOOP adatbázisokra támaszkodtunk (Barta *et al.*, 2005). A motívum kereséseket és más szekvencia analíziseket az EMBOSS program csomaggal értékeltük ki.

4.15. Többváltozós transzkriptomikai statisztikai adatelemzések

Statisztikai elemzések: 15 szarvas gén humán ortológjának génexpressziós változását (*col1A1*, *col1A2* *col2A1*, *col3A1*, *col10A1*, *mgp*, *sparc*, *enol*, *fabp3*, *serf2*, *anxa1*, *tmsb4x*, *tmsb10*, *oc/BGLAP*, *runx2*) vizsgáltuk oszteoporózis és nem oszteoporotikus posztmenopauzális nőkben Real-Time PCR segítségével az előzetes munkánkban (Borsy *et al.*, 2009). A génexpressziós adatokat többváltozós statisztikai

elemzésekkel értékeltük ki (Borsy *et al.*, 2009). A főkomponens analízist (PCA, Principal Components Analysis) és diszkriminancia analízist (CVA, Canonical Variates Analysis) Podani János professzor SYNTAX 2000 program csomagja alkalmazásával végeztük el (Podani 2001).

5. EREDMÉNYEK

5.1. A mineralizálódó agancs porc szövetek vizsgálatai

Az agancs szövetek hisztológiai vizsgálatai

Az agancs csúcs szövettani leírásával korábban már számos publikáció részletesen foglalkozott (Banks és Newbrey 1983; Price *et al.*, 1996; Korpos *et al.*, 2005). Jelen disszertációban különös tekintettel, az agancscsúcsra jellemző szövetek vaszkularizációjának és mineralizációjának szempontjából vizsgáltuk tovább az eddigieket.

Részletesebb képet szerettünk volna kapni arról, hogy az itt található sejtek és szövetek miként vesznek részt az agancs mineralizációjában és későbbi elcsontosodásában.

Az agancs csúcs mezenchima szövetrétege intenzív osztódásával templátot szolgáltat új szövetek létrehozásához. A mezenchima szövet alsóbb rétegeiben a sejtek csillag formájúvá válnak és a differenciáció előrehaladtával megnő térfogatuk. A mezenchima réteg az agancs csúcsi részén a legvastagabb, ahonnan, mint valami sapka lehúzódik az agancs oldalsó területére, amit oldalsó mezenchimának nevezünk. Ezekből a sejtekből differenciálódik a későbbi perichondrium és periosteum belső sejt rétege. Az oldalsó mezenchimából közvetlen intramembrán csontosodással csontgallér is képződik. A csúcsi mezenchima már vékony, fejlődő hajszál ereket is tartalmaz. A további differenciálódás során ezeket az újonnan fejlődő ereket egy fokozatosan kialakuló, vastagodó ún. perivaszkuláris szövet ölel körül. A kifejlődő vérerek párhuzamosan futnak az agancs hossz tengelyével.

Az agancs előporc több mint 90 %-a prechondroblastokból áll, de kevés chondrocyta és chondroclast is kimutatható.

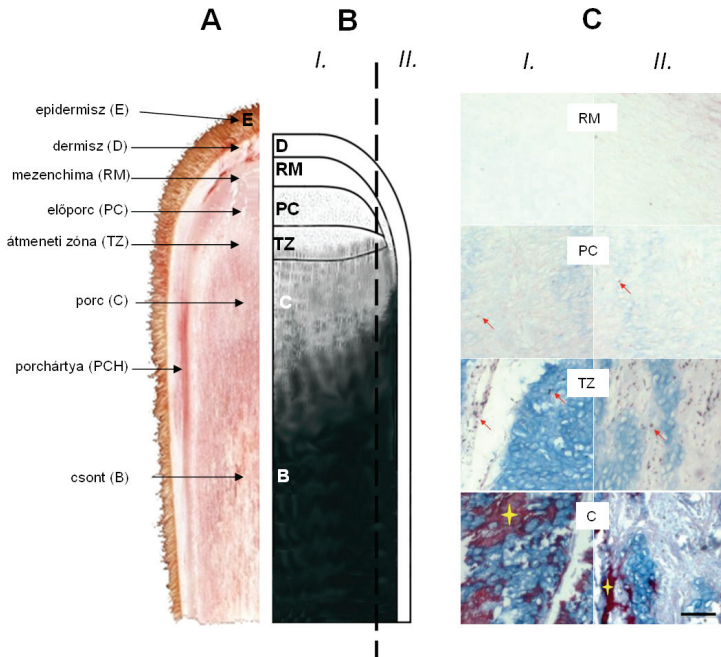
Az agancsporc kizárólag chondrocytákból áll (azaz sem prechondroblastok sem osteoblastok nem figyelhetők meg). A tojásdad és orsó alakú porc sejtek a vérerek mentén hengeres elrendezésben épülnek fel és porcgerendákat hoznak létre. A vérerek egyre vastagabbak, mint a mezenchimában és az előporcban. A perivaszkuláris zóna is egyre fejlettebb, vastagabb lesz a szövet differenciációja során.

A növekedő erek ugyanolyan tempóban fejlődnek, mint az agancs porcos zónája. Erre azért van szükség, hogy az intenzív építési folyamatok energiaigényét biztosítani lehessen. A vastag porcszövet táplálása (a testi porcokkal ellentétben) diffúzióval nem

megoldható, mert a hatásfoka elégtelen ahhoz, hogy az intenzív építési folyamatok energia igényét kielégítse.

5.1.1. Agancsporc mineralizációjának szövettani leírása

Agancs mintáinkat szövettani festésekkel elemeztük azzal a céllal, hogy képet kapjunk a extracelluláris mátrix (ECM) csontképzési és mineralizációs potenciáljáról. A választ megadja az alcian blue (alcian-kék) és alizarin red (alizarin vörös) szöveti festés (8. ábra).



8. ábra: A fejlődő agancs szövettani felépítése. **A** a barkás agancscsúcs parasagittális metszeti képe; **B** az ásványi anyagok lerakódása folyamatának sematikus képe (Banks és Newbrey, 1981 után módosítva); a fekete pontok sűrűsége megfelel az ásványi anyag sűrűségének és mintázatának. Megjegyzés: felhívjuk a figyelmet a mineralizált porc-sont határ kónikus alakjára (lásd 6.3. fejezet); **C** Alcian kék / alizarin vörös festés: kékfestés a GAG fehérjék mennyiségét jelzi, a vörös szín, az extracelluláris mátrix kalcium szintjét jelöli. Az **A,B** és **C** ábrán az **I** és **II** a belső és külső szöveti régiókat jelöli. A **C** ábrán a „Bar”: 0,25 mm.

Az agancs mezenchima, előporc és porc szöveteknek a differenciációja során egyre több extracelluláris mátrix fehérje (ECM) halmozódik fel, s ez jól megfigyelhető az alcián kék szövettani festés segítségével, ami a glükózaminoglikán fehérjéket (GAG) festi meg. Az alcián-kék festés a mezenchimában alig detektálható, az előporcban gyengén, míg a porcban erőteljes festődést mutat. Ez utóbbi megerősíti az ECM molekulák heves expresszióját, ami a génexpressziók *in situ* hibridizációs elemzéseken jól látható (10/A és 10/B ábrák). Az ECM fehérjék kötött számos fehérje csontképzési potenciállal is rendelkezik. Ezt alátámasztotta az a megfigyelésünk, hogy az agancs előporc és porcszövetek mátrixában (a testi porcokkal ellentétben) intenzív ásványi anyag kiválásokat tudunk kimutatni alizarin red festéssel (8. ábra).

A porcsejtek közötti alapállományban már különösen jelentős mennyiségű ásványi anyag lerakódást mutattunk ki (8C. ábra, a bíbor lila szín jelzi a kalcium lerakódást, amely egyáltalán nem jellemző az egészséges testi porcszövetekre). Az agancs porc mátrixban kialakuló mineralizációs göcök és csomók a csontsejtek későbbi megjelenésekor már egy jó alapot biztosítanak az ECM további gyors elcsontosodásához. Megfigyelésünk tehát azt jelenti, hogy már az agancs porcszövetek ECM-je is rendelkezik jelentős csontképzési potenciállal.

Érdemes itt megjegyezni, hogy az általunk vizsgált szarvas magzati növekedési porclemez kb. 90 %-ban chondrocytákat és 10 % osteoblastokat tartalmazott és nem volt nyoma se pre-chondroblastoknak se ásványi anyag kiválásnak (Korpos *et al.*, 2005; Molnár *et al.*, 2007).

5.1.2. Az agancs cDNS chip létrehozása

Abból a célból, hogy hatékonyan tudjuk azonosítani és izolálni az „agancs specifikus” géneket készítettünk egy gímszarvas géneket reprezentáló cDNS chipet, amelynek az „Agancs Chip” nevet adtuk.

Az Agancs Chip 3200 random kiválasztott cDNS klónt tartalmazott (részletek az Anyag és Módszer 4.7. fejezetben), amelyek a következő három egymást követő agancsszövet génextpresszióját reprezentálták: mezenchima, mineralizálódó előporc és mineralizált porc. Az Agancs Chip lehetővé tette a gének azonnali klónozását, azaz kiváltotta az előző munkákban kifejlesztett Zoo Cloning eljárást, valamint a nehézkes AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) „differential display” alapú cDNS izolálást. Az Agancs Chip további előnye, hogy egylépéses gímszarvas cDNS gén klónozást tesz lehetővé. Az agancsban upregulált cDNS gén a chip adott pozíciójában mutatózó expressziós többletet jelezte. A pozíciónak megfelelő gént hordozó baktérium klón a „könyvtárból” így azonnal kivehető volt, belőle plazmid tisztítható és szekvenálható volt (lásd 4.7. fejezet).

Az agancs chip készítése a következő lépésekben történt:

- 1, A cDNS könyvtárból származtatott lambda fág könyvtárat konvertáltam TrpIEx2 plazmidokká a BM 25.8 E. coli törzsben. Az eredmény: egyedi TrpIEx plazmid klónokat hordozó BM 25.8 baktériumok.
- 2, Az egyedi TrpIEx plazmid klónokat hordozó BM 25.8 baktérium kolóniák közül véletlenszerűen kiválasztottunk 8200 telepet, amelyeket kolónia PCR-el tovább vizsgáltunk az így amplifikált cDNS fragmentek gélelektroforoetikus tesztelése után szelektáltam, hogy megfelelő legyen a PCR termék mennyisége, egyetlen ELFO sávot („band”-et) adjanak (azaz homogén legyen az amplifikátum) és lehetőleg 400 bp.-nál hosszabbak legyenek.
- 3, Az egyedi cDNS amifikátumokból készült az Agancs Chip (részletek az Anyag és Módszer 4.7. fejezetben).
- 4, Az Agancs Chipen megjelenített 3200 egyedi klónnal szemben hibridizáltuk a három agancsszövet mintából származó mRNS mintákat, illetve a kontroll magzati növekedési porclemezből származó mRNS-t.

5.1.3. Gének szűrése az Agancs Chipen: A mineralizáló porc génjei

A fő célunk azoknak a géneknek az azonosítása volt, amelyek részt vesznek a csontosodó, növekvő báronyos agancs csúcs rendkívül gyors és robusztus mineralizációjában. Szövetteni vizsgálataink és megfigyeléseink egy megoldást nyújtottak, nevezetesen: a barkás agancs porcszöveteinek összehasonlítása a magzati növekedési porclemezzel. Ismert volt, hogy a porc mátrix mindkét szövetben hasonló főkomponensekből áll. Az agancs előporc és porc összehasonlítása a magzati porclemezzel rá tudott mutatni az eltérően működő gének egy pontos részalmazára, amelyek fontos szerepet játszhatnak a mineralizáció elindításakor.

Feltételeztük, hogy az itt feltárandó „mineralizációs” gének a csontszövet sejtjeiben is hatnak. Esélyt adtunk azon feltételezésünknek is, hogy ugyanezen gének működése a robusztus csontosodás alapjául szolgálnak az agancs csontos részében is.

A hibridizációk során kontrollként a magzati növekedési porclemezből származó mRNS pool-t használtunk, ezt „vontuk ki” a mezenchimális-, előporc-, illetve az agancs porcszövetek által reprezentált mRNS pool-ból. Ezáltal az Agancs Chipen megkaptuk az agancs mezenchimára és az agancs előporcra jellemző expressziókat, illetve azokat a géneket, amelyek az agancs porcban upreguláltak.

Ezeknek a szöveteknek (sejttípusoknak) a transzkripciók mintázatainak a segítségével (a fent említett logika szerint), ki tudtuk mutatni azokat a géneket, amelyek az agancs robusztus csontosodásának korai szakaszában nyilvánulnak meg (azaz agancs előporcban és porcban).

Az Agancs Chipen reprezentált cDNS-ek közül 93 fokozott (upregulát) expressziót mutatott az agancsban a magzati növekedési porclemezhez viszonyítva. Az upreguláció mértéke 1,7-5,3 szerez sávban volt. Ebből a 93 cDNS-ből 66 -nak meghatároztuk a szekvenciáját. A 66 cDNS klón 28 génnek felelt meg a szekvencia elemzések után.

A kapott gének különböző funkcionális csoportokba sorolhatók: 8 gén kódolt olyan ismert fehérjéket, amelyek összefüggésben hozhatók a vázfejlődéssel (úgy mint, csontosodás, foszfát transzport, kalcium ion kötés, extracelluláris mátrix, 1A táblázat). 10 gén kódolt olyan fehérjéket, amelyek biztosítják a gyors növekedéshez szükséges megemelkedett metabolikus igényt (energiatranszport, riboszomális fehérjék, 1D táblázat). A maradék 6 gén jól meghatározott, de a porc és csont metabolizmusban

eddig nem ismert a szerepet játszik (1B táblázat). A további vizsgálatokhoz kiválasztottunk 14 gént, amelyek az 1A és 1B táblázatban vannak felsorolva.

1. táblázat: Agancs cDNS Chip hibridizációjának az eredményei. Az agancs fejlődésében szerepet játszó kandidáns gének, amelyek fokozottan expresszálódnak (1,7 -5,3 szoros expressziós különbséggel) a fejlődő agancs porc szöveteiben a magzati növekedési porclemezhez viszonyítva

A csontosodási folyamatokban ismert gének; B csontosodási folyamatokban nem ismert gének; C feltételezett gének; D a magas metabolikus aktivitást biztosító gének

Gének	Előfordulás	Génbanki azonosító	Biológiai folyamat	Molekuláris funkció
A I. típusú kollagén, alfa 1 (<i>col1A1</i>)	13	EF619481	vázfejlődés, csontosodás	extracelluláris csontmátrix fő összetevőjel
I. típusú kollagén, alfa 2 (<i>col1A2</i>)	4	FN868903	vázfejlődés,	csontszerkezet alkotó eleme
II. típusú kollagén, alfa 1 (<i>col2A1</i>)	8	FN868904	vázfejlődés,	extracelluláris mátrix
III. típusú kollagén, alfa 1 (<i>col3A1</i>)	2	FN868905	foszfát transzport	extracelluláris mátrix stukturális alkotó eleme
X. típusú kollagén, alfa 1 (<i>col10A1</i>)	1	FN868906	vázfejlődés	kalcium ion kötés
mátrix Gla fehérje (<i>mgp</i>)	2	FN868907	csont mineralizáció, porc, csontosodás	extracelluláris mátrix szerkezeti összetevője, kalcium ion kötés
secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (<i>sparc</i>)	2	FN868902	csontosodás	kalcium ion kötés, kollagén kötés
integrin-binding sialoprotein (<i>ibsp</i>)	2	FN868908	Csontosodás, sejt adhézió	fehérje kötés
B enolase 1, (alpha) (<i>eno1</i>)	1	EF619484	metabolikus folyamatok, fehérje ubikvinitáció	fehérje kötés, fémion kötés
fatty acid binding protein 3 (<i>fabp3</i>)	1	FN868909	transzport	transzport aktivitás, zsírsavkötés
small EDRK-rich factor 2 (<i>serf2</i>)	1	FN868910	transzkripció szabályozása,	DNS kötés, fehérjekötés
annexin A1 (<i>anx1</i>)	1	FN868921	sejt ciklus	foszfolipáz inhibitor
thymosin beta 4, X ch.d (<i>tmsb4x</i>)	4	EF619493	sejtváz szerkezet	aktin kötés
thymosin beta 10 (<i>tmsb10</i>)	3	FN868911	sejtváz szerkezet	aktin kötés

1. táblázat: folytatása

Gének	Előfordulás	Génbanki azonosító	Biológiai folyamat	Molekuláris funkció
C feltétezett gén, klón p424	1	FN868912	Ismeretlen	Ismeretlen
feltétezett gén, klón p425	2	FN868913	Ismeretlen	Ismeretlen
feltétezett gén, klón p426	1	FN868914	Ismeretlen	Ismeretlen
feltétezett gén, klón p427	2	FN868915	Ismeretlen	Ismeretlen
D chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta) (<i>CCT8</i>)	1	FN868916	Fehérje térszerkezet kialakítása	nukleinsav kötés, fehérje kötés
mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II	10	FN868917	energia, elektron transzport	légzési lánc alkotó eleme
cytochrome c oxidase subunit VIIc	1	FN868918	energia, elektron transzport	légzési lánc alkotó eleme
mitochondrially encoded cytochrome c oxidase III	1	FN868919	energia, elektron transzport	légzési lánc alkotó eleme
ribosomal protein S8	2	FN868920	transzláció	riboszóma alkotó eleme
mitochondrial ribosomal protein S12	1	FN868922	transzláció	riboszóma alkotó eleme
ribosomal protein L18a	1	FN868923	transzláció	riboszóma alkotó eleme
ribosomal protein, large, P1 (<i>RPLP1</i>)	1	FN868924	transzlációs elongáció	riboszóma alkotó eleme
mitochondrially encoded ATP synthase 6	1	FN868925	energia, elektron transzport	légzési lánc alkotó eleme
ornithine aminotransferase	1	FN868926	ornithine metabolikus folyamatok	ornithine-oxo-acid transzamináz aktivitás, fehérje kötés

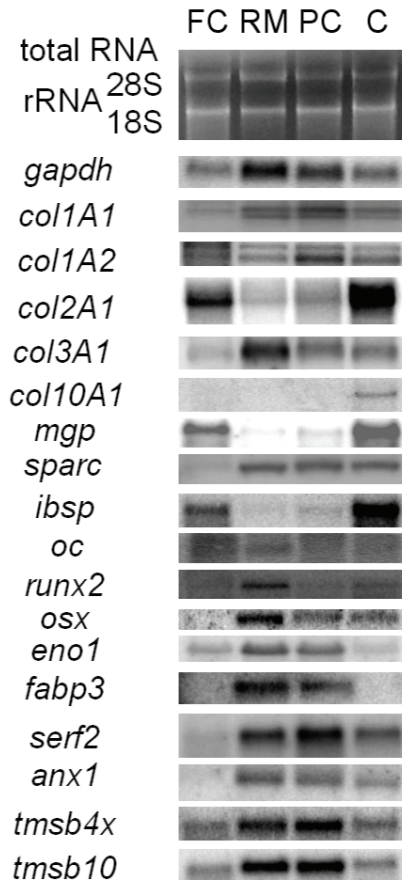
5.1.4. Northern hibridizáció

A 5.4 fejezetben tárgyalandó bioinformatikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy az 1A táblázatban felsorolt gének a Runx2 és az Osx transzkripció faktorok szabályozása alatt állnak. Ezen két génnel kiegészítettük az 1A és 1B táblázatból kiemelt 14 gént a további vizsgálatához, Northern analízisekhez. A vizsgálatokhoz belső kontrollnak a *gapdh* háztartási gén expresszióját választottuk, valamint a riboszomális 16S és 28S gének aktivitását.

A 9. ábrán bemutatott expressziós mintázatok megegyeztek az agancs chip-en észlelt expressziós mintázatokkal (vö: 9. ábrát és a 2. táblázatot).

Amint látható:

- (i) Az összes vizsgált gén expresszált az előporc és porc szövetekben.
- (ii) három gén a *coll1A1*, *fabp3*, *thymosin b10* legjobban az agancs mezenchimában expresszáldott.
- (iii) a csont marker gének, a *col1A1*, *mgp*, *sparc* és az *ibsp* hevesen expresszáltak már agancs mezenchimában, előporcban és porcban, azaz a korai fejlődésállapotokban.
- (iv) az agancs mezechima, előpoc és porc szöveteiben erős *osx* és *runx2* expresszió volt megfigyelhető. Ugyanakkor a csont specifikus *oc* (osteocalcin) gén expressziója alig volt detektálható a mezenhimában, míg az előporc és porc szövetben nem.
- (v) a fellelhető közlemények alapján az *osx* gén expressziója köthető leginkább a csontsejtek differenciációjához (Nakashima és de Crombrugghe, 2003). A Northern hibridizáció meglepő eredménye, hogy a három agancs szövetek legerősebben a mezenchimában fejeződött ki, majd expressziója fokozatosan "lecsengett" a porc felé vezető differenciálódásban.



9. ábra: Génexpressziós vizsgálatok Northern hibridizációs analízissel (Az Agancs Chip validálása). Agancs szövetek FC- növekedési porclemez, RM agancs rezerv mezenchima, PC- előporc, C- agancs porc.

Az agancs szövetekben a „Northern” jelek intenzitását megmértük, számszerűsítettük. Az így kapott különbségeket a *18S* és *28S rRNS* és a *gapdh* kontroll gének expressziójára normalizáltuk. A *collA1*, *collA2*, *col3A1*, *ibsp*, *mgp* és *sparc* gének 2-10 szerezsen intenzitással működtek az agancs porcban a növekedési porclemezhez viszonyítva (2. táblázat).

2. táblázat: Northern hibridizációk számszerűsítése. Génexpressziós változások az agancs szövetekben (RM, PC, C) a magzati növekedési porclemezhez (FC) viszonyítva

Gének	28S rRNA kontroll		
	RM per FC	PC per FC	C per FC
<i>coll1A1</i>	5.3	6.1	3.7
<i>coll1A2</i>	8.0	12.4	7.6
<i>col2A1</i>	0.4	0.7	2.3
<i>col3A1</i>	3.6	2.3	2.3
<i>col10A1</i>	i.m.	i.m.	>5.7
<i>Mgp</i>	0.4	0.7	2.2
<i>Sparc</i>	6.7	6.5	5.7
<i>Ibsp</i>	0.3	0.5	2.1
<i>Oc</i>	0.8	1.3	0.9
<i>runx2</i>	6.7	1.2	2.2
<i>Osx</i>	26.4	10.8	10.4
<i>Gapdh</i>	2.5	2.1	1.4

A génexpressziókat a *28S rRNS* és a *gapdh* gének expressziójára normalizáltuk. A különbségeket Northern blot analízis (9. ábra) eredményeiből számítottuk a Syngene program segítségével. A *18S rRNS* génhez normalizált adatok nagyon közel álltak a feltüntetett *28S rRNS* génre vonatkozó értékekhez.

FC: (foetal growth plate cartilage) magzati növekedési porclemez, RM: (antler reserve mesenchyme) agancs mezenchima, PC: (antler precartilage) agancs előporc, C: (antler cartilage) agancs porc, i.m.: (incommensurable) nem értelmezhető.

Az Agancs Chip használata tovább javította előző heterológ chip kísérleteink pontosságát és megbízhatóságát (ami vélhetően a szekvencia különbségek kiküszöbölésének köszönhető).

5.1.5. A géneexpressziók térbeli lokalizálása *in situ* hibridizációval

A bársonyos-barkás agancs szöveti zónái heterogén összetételűek, több sejttípust is megtalálhatunk az egyes rétegekben. A gének expressziós mintázatának további finomításához megkivántuk határozni azokat a sejttípusokat, amelyek kifejezik az adott gént. Ehhez az *in situ* hibridizációt hívtuk segítségül. A *coll1A1*, *col2A*, *col3A1*, *coll10A1*, *ibsp*, *mgp*, *sparc* gének esetén készítettük el az antiszensz RNS próbákat, amelyekkel agancs szöveti metszetekre hibridizáltunk.

Általánosan elfogadott, hogy a *coll1A1*, *ibsp*, *mgp* és a *sparc* gének a csont ásványi metabolizmusának indikátorai (Siebel *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 1999). A fejlődő agancs szövetekben ezek a gének erős expressziót mutatnak nem csupán a csontos részben, hanem agancs korábbi fejlődési állapotaiban is, amelyek megelőzik az agancs csont képződését.

A 10/A és 10/B ábra alapján elmondhatjuk, hogy:

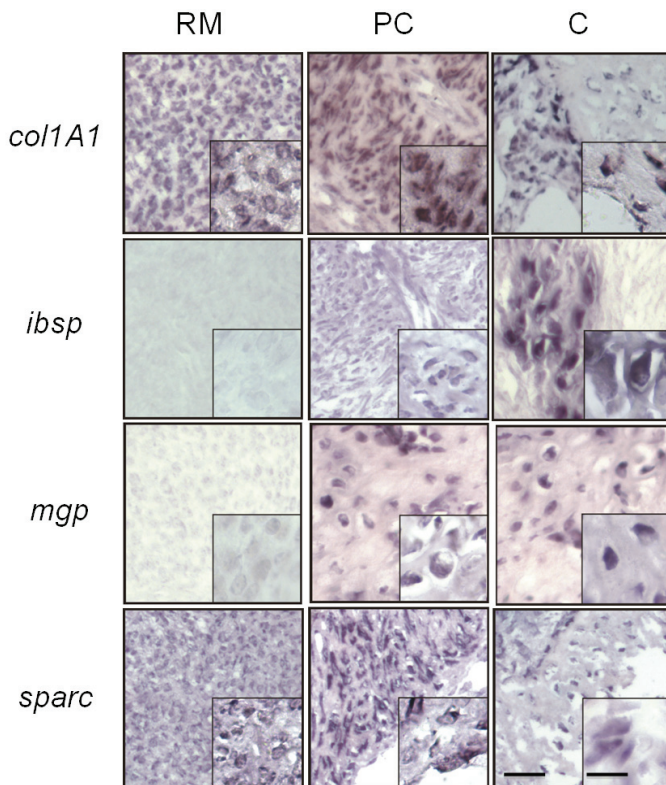
- (i) a *coll1A1* és *sparc* gének a mezenchimában, előporcban és a porcban expresszálódnak.
- (ii) az *ibsp* és *mgp* az előporcban és porcban.

Célunk volt, hogy meghatározzuk az expressziók pontos helyét és jellemző sejt típusokat. Ezért az *in situ* hibridizáció segítségével elvégeztük az *ibsp*, *mgp*, *sparc*, *coll10A1*, *col2A1* és *col3A1* géneknek expressziójának térbeli meghatározását. Ezt a technikát sikeresen alkalmazták régebben a *coll1A1* és *col2A1* és *coll10A1* expressziójának a meghatározására a növekvő agancsban (Price *et al.*, 1996).

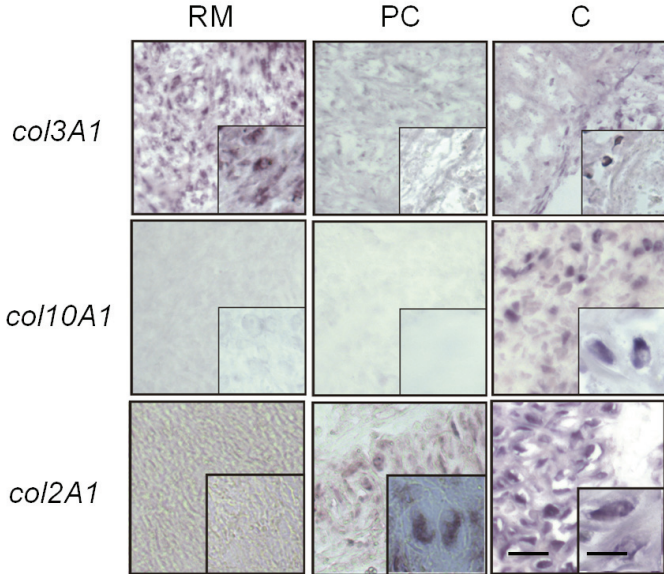
Látható a 10/A és B ábrán, hogy a négy csontosodási marker gének *coll1A1*, *sparc*, *ibsp*, *mgp* a chondroblastokban és chondrocytáiban expresszálódtak, hasonlóan, *col2A1* porc marker génhez. Megjegyzendő, hogy a mineralizációs gének közül a *coll1A1* és *sparc* a mezenchima sejtekben is erősen expresszáltak.

A *col3A1* géneexpressziós mintázata hasonló volt a *coll1A1*-éhez, míg a *coll10A1* csak a hipertofizálódó (agancs) kondrocitákban expresszált (10/B. ábra.)

Érdeemes megjegyezni, hogy ezen gének *in situ* lokalizálása tökéletesen megegyezett azzal, amit a Northern hibridizáció után vártunk (9. ábra)



10/A. ábra: A barkás agancs gén expresszióinak térbeli lokalizálása *in situ* hibridizációval. A vizsgálatok 8 μm vastagságú longitudinális metszeteken történtek. (RM) agancs mezenchima régió, (PC) előporc, (C) agancs porc. „Bars”: 0,25 és 0,1 mm. A jobb alsó sorokban: nagyobb nagyítás. Mind a három szövetrétegben megfigyelhető *collA1* és *sparc* gének erős expressziója, az *ibsp* és *mgp* gének az előporcban és porcban.



10/B ábra: A *col3A1* és *col10A1* expressziója lokalizációja *in situ* hibridizáció segítségével a barkás agancscsúcsban. A vizsgálatok 8 µm vastagságú longitudinális metszeteken történtek. (RM) agancs mezenchima régió, (PC) előporc, (C) agancs porc. „Bars”: 0,25 és 0,1 mm. A jobb alsó sorokban: nagyobb nagyítás.

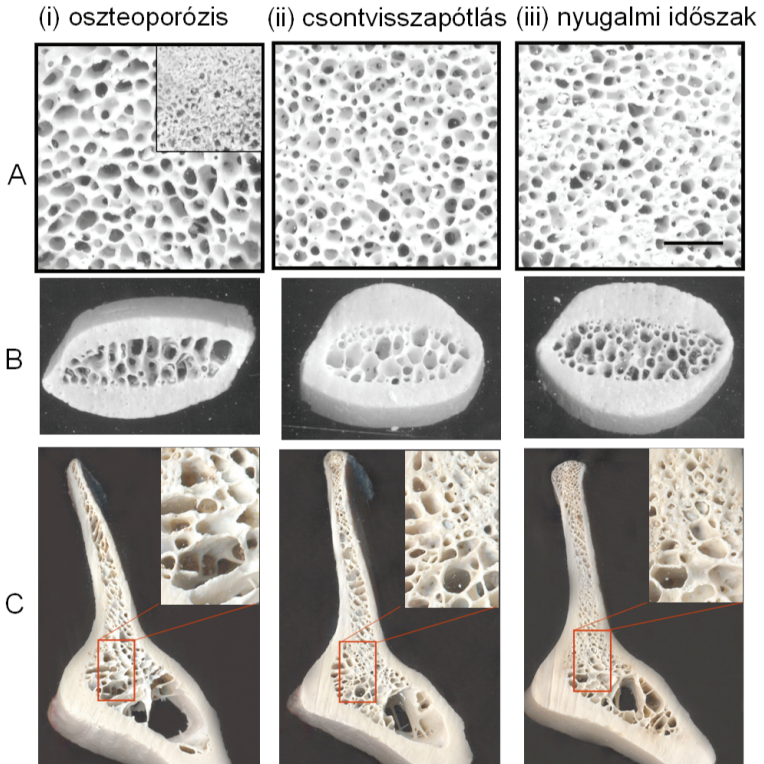
5.2. Csontsűrűség változás az agancs ciklus alatt

5.2.1. A vázcsontozat anatómiai elváltozásai az agancs ciklus alatt

Amint azt a bevezetőben már írtam, a gímszarvas agancs a csontfejlődés rendkívül felgyorsított és leegyszerűsített, robosztus változata. Az agancs csont robosztus fejlődésekor a kalcium és foszfor a váz csontozatból halmozódik át, eredménye fiziológiás oszteoporózis, amely a későbbi táplálkozás során néhány hét alatt megfordul és pótlódik.

A vázcsontozat változásának a nyomon követésére három kifejlett szarvasbikából (Stag1, Stag2, Stag3) az agancs ciklus három időpontjában mintákat vettünk (lásd 4.2.3

fejezet). Az állatok azonos csontjait hasonlítottuk össze, abból a célból, hogy a csontok sűrűségének változását tanulmányozzuk (11. ábra és 2. melléklet).



11. ábra: A gímszarvas csontváz ciklikus fiziológiai oszteoporózisa és regenerációja az éves agancsiklushoz kötött. A képen a Stag1, Stag2, Stag3 gímszarvas bikák lapocka, a borda, és csigolya csontjainak keresztmetszeti képei láthatók, a vázcsontozat fiziológiai oszteoporózisakor (Stag1, június 1), a csont visszapótlásakor, azaz barkahántáskor (Stag2, július 20), valamint a késő őszi nyugalmi időszakban (Stag3, november 30). **A**, csigolya csontok (bal felső kép jobb felső részén a barkás agancs csontos része látható összehasonlításul). „Bar” 3 mm. **B**, lengőborda minták **C**, lapocka csontok

A 11. ábrán és a 2. mellékletben szembeötlők a csontok állapotai közötti különbségek:

- (i) az agancs csont sokkal sűrűbb, mint bármely más csont.
- (ii) június eleji (oszteoporótikus) minták trabekuláris régióiban jelentősen nagyobbak a léziók mint a másik két mintavételi időszakban.
- (iii) a barkahántáskor (csontvisszapótlás) már megfigyelhető a trabekuláris léziók regenerálódása.
- (iv) a lapocka csontok keresztmetszeti képén jól látható (2. melléklet), hogy a csont nagyobb igénybevételnek kitett részein kisebb (pl. lapocka ízületi feje) az oszteoporózis mértéke, mint a kevésbé igénybe vett részeken (pl. lapocka „taraj” végein).

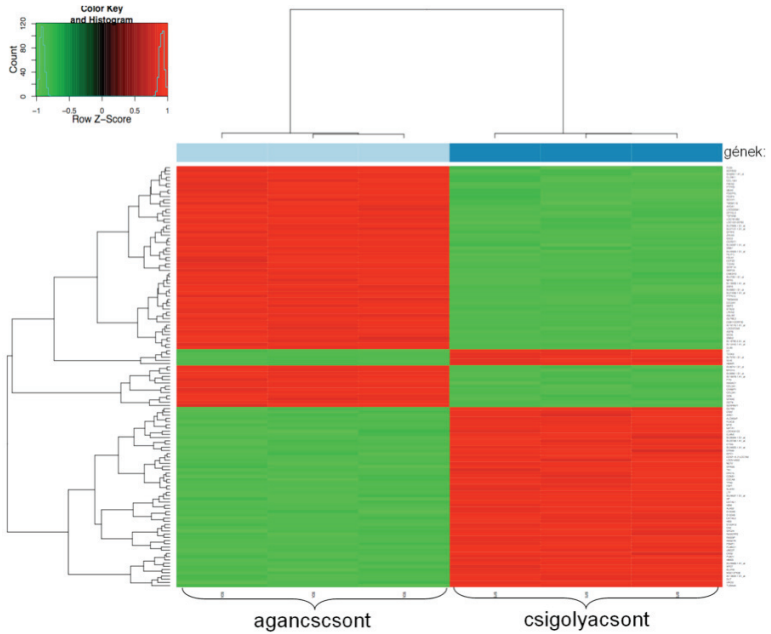
5.2.2. A robosztus csont építés génjei: Bovine 24K Affymetrix microarray vizsgálatok

Az „Agancs Chippel” megvalósított génszűrésünk a teljes transzkriptom egy frakcióját érintette. Célunk volt egy teljesebb képet kapni a teljes transzkriptomban található, a robosztus csontosodásban szerepet játszó gének számáraól.

Az Agancs Chip hibridizációs platformját a kereskedelembe éppen ekkor megjelenő szarvasmarha cDNS platformmal helyettesítettük (Bovine 24K Affymetrix oligonukleotid microarray), amelyen 24 ezer gén expresszióját követhettük. Fontos körülmény volt, hogy az addigra felhalmozott szekvencia adataink szerint (több mint 100 gímszarvas génről) a gímszarvas és a szarvasmarha szekvenciák között rendkívül nagy szekvencia azonosságot/konzerváltságot tapasztaltunk, 97-100%.

Reméltük, hogy olyan, eddig a csontosodásban még nem ismert gének kerülnek a látókörünkbe, amelyek további részletekkel szolgálnak gímszarvas agancs ciklus megértéséhez és bővíthetik a humán csonttrikulással és csontmetabolizmussal kapcsolatos ismereteinket, amelyek diagnosztikai fejlesztéseket kiindulópontjai is lehetnek.

A génextpressziós mintázatok meghatározásához egy gímszarvas bika (Stag1) 3 független csigolya mintájából és 3 agancs csont mintájából nyert chip eredményeket használtam fel. A gének szelekciójához SAM (serial analysis of microarrays) módszert használtam. Kiválasztottam a két csoportot (csigolya és agancs csontok) legjobban szétválasztó gén expressziókat, a „top131” gént. A „top131” gén tehát az a génlista, amelyek változása leginkább jellemző az agancscsont (csontépítés) vs. csigolyacsont (csont bontás) csont metabolizmus folyamataira. A gének szelekciójához a FoldChange (LogFC) és módosított p értékeket használtam, azaz azokat a változásokat vettem figyelembe, amelyek legalább 2x-es növekedést, vagy felére történő csökkenést mutattak, $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett. A két vizsgált csoport (agancs vs. csigolya) tökéletes elválasztását tette lehetővé a „top131” gén (12. ábra).



12. ábra: A top131 gén kiválasztása SAM módszerrel az agancs csoport és csigolya csoport között (felhívjuk a figyelmet a géncsoportok tökéletesen ellentétes viselkedésére).

Érdeemes megfigyelni, hogy a 12. ábrán abszolúte tökéletes a géncsoportok ellentétes viselkedése, azaz a ami az agancs csoportban upregulált az a csigolya csoportban „downregulált” és fordítva.

A gének neve az 1. mellékletben található. A legfontosabb génexpressziók eredményeit a 3 és 4 táblázatokban közöltük, ahol szerepelnek az eddigi munkák során azonosított gének is. Megjegyzendő, hogy az 5. táblázatban látható adatok egyúttal validáltak az Affymetrix méréseket.

3. táblázat: Agancs csontban „upregulált” gének, Bovine Affymetrix 24K cDNA microarray		
Hányszoros változás VB/AB	Gén neve	Gén szimbólum
5,82*	distal-less homeobox 5 (Dlx5)	DLX5
3,49*	runt-related transcription factor 2(Runx2)	RUNX2
4,79*	SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9)	SOX9
4,28*	bone morphogenetic protein 2 (Bmp2)	BMP2
2,79	msh homeobox 1 (Msx1)	MSX1
3,16	collagen, type I, alpha 1	COL1A1
3,29	collagen, type I, alpha 2	COL1A2
7,46*	collagen, type III, alpha 1	COL3A1
5,69*	collagen, type V, alpha 2	COL5A1
4,29*	collagen, type VI, alpha 1	COL6A1
5,38*	collagen, type XIII, alpha 1	COL13A1
6,19	integrin-binding sialoprotein	IBSP
3,37	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein	BGLAP/OC
5,05	matrix Gla protein	MGP
4,71	SPARC-like 1 (hevin)	SPARCL1
5,75*	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC
4,96	SPARC related modular calcium binding 2	SMOC2
6,86*	syndecan 2	SDC2
5,71*	decorin	DCN
4,25	biglycan	LUM
3,68	lumican	OMD
3,99	osteomodulin	POSTN
2,35	dentin sialophosphoprotein	DSPP
4,27	periostin, osteoblast specific factor	POSTN
4,33*	neogenin 1	NEO1
6,29*	fibulin 1	FBLN1
2,99	laminin, beta 1	LAMB1
2,74	transforming growth factor, beta 2	TGFβ2
2,80	transforming growth factor, beta 3	TGFβ3
2,96	insulin induced gene 2	INGSG2
6,11*	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5
5,78*	estrogen receptor 1	ESR1
2,34	parathyroid hormone-like hormone	PTH1H
4,02*	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN
4,29	melanoma antigen family D, 1	MAGED1
2,06	melanoma antigen family F, 1	MAGEF1
6,97*	Colon cancer secreted protein 1	CCSP1

AB: (antler bone) agancs csont; vázcsontok; VB: (vertebral bone) csigolya csont

4. táblázat: Agancs csontban „downregulált” gének, Bovine Affymetrix 24K cDNA microarray		
Hányszoros változás VB/AB	Gén neve	Gén szimbólum
-6,42	Matrix metallopeptidase 16 (membrane-inserted)	MMP16
-7,13*	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	ALOX5AP
-9,60*	Proteinase 3	Proteinase3
-7,92*	elastase, neutrophil expressed	ELANE
-10,39*	Azurocidin 1	AZU1
-4,04	SRY (sex determining region Y)-box 6	SOX6
-7,19*	S100 calcium binding protein A8	S100A8
-7,36*	S100 calcium binding protein A9	S100A9
-5,42*	S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)	S100A12
-7,80*	erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin)	EPB49
-5,47*	sperm associated antigen 5	SPAG5
-3,54*	deoxyuridine triphosphatase	DUT
-10,24*	haptoglobin	HP
-5,25*	phospholipase B domain containing 1	PLDB1
-5,37*	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2
-4,09*	Transferrin receptor protein 1	TFRC
-3,55*	testis-specific kinase 2	TESK2
-8,25*	olfactomedin 4	OLFM4
-5,02*	neutrophil cytosolic factor 2	NCF2
-4,51*	kinesin family member C1	KIFC1
-2,58*	Hyaluronan-mediated motility receptor	HMMR
-8,61*	cathepsin G	CTSG
-3,27*	Proteasome inhibitor subunit 1	PSMF1
-5,45*	origin recognition complex	ORC1L
-5,33*	hydroxymethylbilane synthase	HMBS
-4,35*	CENP-A protein	CENP-A
-6,84*	placenta-specific 8	PLAC8
-3,75*	immunoglobulin heavy constant epsilon	IGHE
-5,01*	carbonic anhydrase II	CA2
-5,31*	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	TAL1
-8,13*	Hemoglobin alpha 1	HBA

AB: (antler bone) agancs csont; vázcsontok; VB: (vertebral bone) csigolya csont

Említésre érdemes további gének heves expressziója:

(i) várakozásainknak és eddigi eredményeinknek megfelelően upregulált gének közül sok ECM fehérje génje került ki, amelyek az ásványi anyagok kötéséért, mineralizációjáért felelősek, valamint ezen gének transzkripciós mester regulátor faktorainak génjei. Eddigi eredményeinket, amelyek a Runx2 és Osx mester regulátorok rendkívül heves agancsi expressziójára vonatkoznak megerősítette és kiegészítette az Affymetrix vizsgálat, mivel a csontmetabolizmus további mester regulátor génjei heves expresszióját (Dlx5, a BMP-2, Msx1 és a Sox9) egyértelműen jelezte (3. táblázat).

(ii) új eredményünk, hogy sikerült kimutatnunk a ösztrogén receptor (ESR1) gén upregulációját is az agancs csontban. Ez összhangban van azzal, hogy az ösztrogén rendkívül fontos szerepét a csontfejlődésben már számos kísérletben igazolták (Lewis és Barrell, 1994; Barrell *et al.*, 1999).

(iii) sok lokális növekedési faktor gén heves expresszióját sikerült még kimutatnunk (pl.: TGF β 2, TGF β 3, IGF2, IGFBP5).

(iv) az extracelluláris fehérjék génjei közül heves expressziót jelzett pl.: MGP, IBSP, SPARC, Syndecan 2, Decorin, dentin sialoprotein, biglycan gén. A kollagének közül pedig a COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL6A1, COL13A1.

(v) eddigi eredményeink alapján (Molnár *et al.*, 2007; Gyurján *et al.*, 2007) szintén nem okozott meglepetést, hogy fontos tumor marker gének is megmutatták heves expressziójukat az agancscsontban.

Említésre érdemes agancs csontban downregulált gének közül a csont mátrix bontásáért felelős MMP16 és a Proteinase 3 gén.

A többi mátrix bontásért felelős gén expressziója nem tért el az agancs és a csigolya csontszövetben, ami azt mutatja, hogy az agancs csont robosztus építése tolja el az ásványi anyagok mennyiségét a váz csont rovására az agancscsont javára.

5.2.3. Affymetrix microarray adatok („csont gének”) validálása Northern hibridizációval

Az Affymetrix microarray eredményeket Northern hibridizációval erősítettük meg. Az eddig vizsgált csont marker géneket kiegészítettük a *runx2*, *osx*, *oc* génekkel (1A táblázat). A három gímszarvas bika (Stag1, Stag2, Stag3) agancs csont expresszióit összevetettük csigolya és borda mintáik expresszióival. A mintákat *g3pdh* expressziójához normalizáltuk.

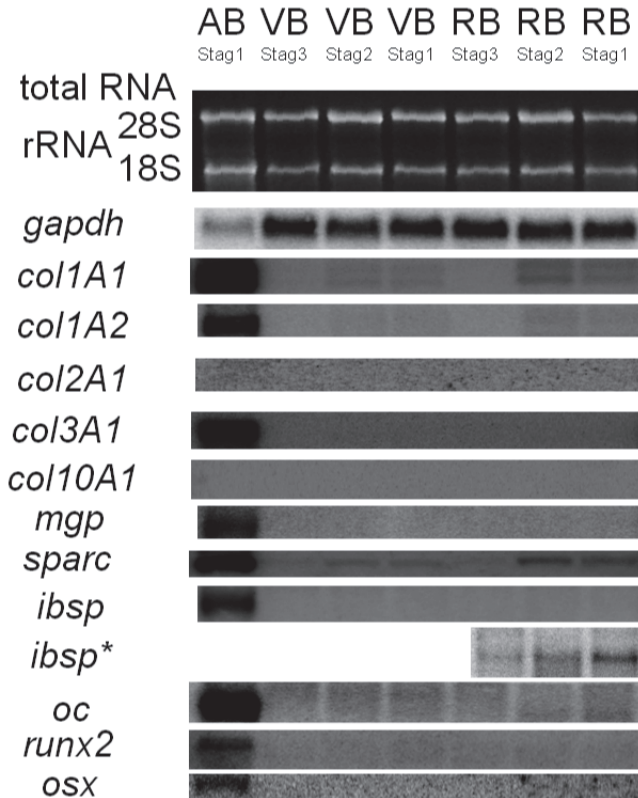
Kísérleteink az alábbiakat mutatja:

- (i) Legintenzívebben a *coll1a1* gén expresszálódik agancscsontban, ami nem meglepő, hiszen I-es típusú kollagén a csont fő mátrix fehérjéje.
- (ii) Nagyon erősen expresszálódik az I. típusú kollagén alfa 2 láncát kódoló *coll1a2* gén is.
- (iii) A *col2a1* és a *col10a1* porc és hipertróf porc sejt marker gének expresszióját nem figyeltük meg a csontmintákban, ami várható volt és igazolta a mintavételeink pontosságát (a kísérlet „negatív kontrollja”).
- (iv) Feltűnő a *col3a1* rendkívül heves expressziója az agancs csontban (Megj. feltehetően az agancs csont rendkívüli szilárdságát és rugalmasságát biztosítja).
- (v) A csigolya és borda csontokhoz képest az agancs csontban hevesen expresszálódtak a *Runx2* és *Osterix* transzkripciós mester regulátok szabályozása alatt álló mátrix gének: *mgp*, *sparc*, *ibsp* és *oc*.
- (vi) Külön kiemelendő az osteocalcin gén (*oc*) rendkívül heves expressziója. (Megj. az *oc* a *runx2* kontrollja alatt áll (a kísérlet „pozitív kontrollja”; az *oc* biztosítja a csontképzés energia igényét).
- (vii) A fentiekkel összhangban a csont mester regulátorai *runx2* és *osx* expressziója is rendkívül heves az agancs csontban a vázcsontokhoz képest.

Megjegyezzük:

Az Stag1 szarvas bikából származó agancscsont és csigolyacsont „Northern” jeleinek intenzitását számszerűsítettük (4.10. fejezet). Az így kapott különbségeket a *18S* és *28S rRNS* és a *gapdh* kontroll gének expressziójára normalizáltuk (5. táblázat).

Összefoglalva: a barkás agancsban képződő csontban a csont mátrix gének és az őket szabályozó mester gének (aktivátor gének) expressziója 10-30 szorosán múlja felül a vázcsontozat hasonló expresszióit (13. ábra és 5. táblázat).



13. ábra: Génexpressziós vizsgálatok Northern blot analízissel (csontszövetek; egyben az Affymetrix microarray validálása is).

AB: (antler bone) agancs csont; vázcsontok; VB: (vertebral bone) csigolya csont; RB: (rib bone) borda csont. Jól láthatóak a robosztus expressziós különbségek az AB-ben a VB és RB -hez képest. Stag1, Stag2, Stag3: szarvasbikák, amelyekből a minták származnak (lásd 4.2.3. fejezetet). *ibsp**: példa arra, hogy hosszú expozíció esetén az összes gén expressziója kimutatható a váz csontozatban is.

5. táblázat: Northern hibridizáció számszerűsítése. Génexpressziós változások az agancs csontban (AB) összehasonlítva a vázcsonttal (VB, RB) az agancsot növesztő szarvasbikában (Stag1)

Gének	28S rRNA kontroll		gapdh kontroll	Affymetrix microarray
	AB per VB	AB per RB	AB per VB	AB per VB
<i>coll1A1</i>	>7.6	>6.9	>17.0	8.9
<i>coll1A2</i>	>19.0	>11.0	>42.0	9.8
<i>col2A1</i>	i.m.	i.m.	i.m.	1.3
<i>col3A1</i>	>19.0	>15.0	>43.0	176.5
<i>col10A1</i>	i.m.	i.m.	i.m.	0.9
<i>Mgp</i>	>10.0	>7.0	>28.0	33.1
<i>Sparc</i>	>13.3	>5.8	>29.7	53.9
<i>Ibsp</i>	>40.0	>30.0	>100	73.2
<i>Oc</i>	>7.0	>7.0	>15.0	10.3
<i>runx2</i>	>3.0	>4.0	>7.0	3.5
<i>Osx</i>	>28.0	>17.0	>63.0	nincs adat
<i>Gapdh</i>	0.4	0.3	1.0	0.6

A génexpressziókat a 28S rRNS és a *gapdh* kontroll génekhez normalizáltuk. A különbségeket a Northern blot analízis (13. ábra) eredményeiből számítottuk a Syngene program segítségével, valamint Bovine 24K Affymetrix microarray mérési adatokból. Mivel a Northern detektációnál az AB összehasonlítása RB és VB-vel a kimutatási határ nagyon távol volt az AB és VB, RB minták között, így csak megközelítő pontossággal tudtunk számolni. Hosszabb expozíciónál egyértelmű Northern hibridizációs jelet kaptunk az RB és VB mintákban is a *coll1A1*, *coll1A2*, *ibsp*, *sparc* géneknél is (lásd például az *ibsp/ibsp**-t a 13. ábrán). A 18S rRNS génhez normalizált adatok nagyon közel álltak a feltüntetett 28S rRNS normalizálás értékeihez, az adatok nincsenek feltüntetve.

5.2.4. Csont metabolitok elemzése, GC-MS analízis

Agancs gének heves expressziójának következményei metabolit szinten is kimutathatóak voltak az agancs és a vázcsontozatban. Mindezt a GC-MS metabolit analízisek támasztják alá (14. ábra).

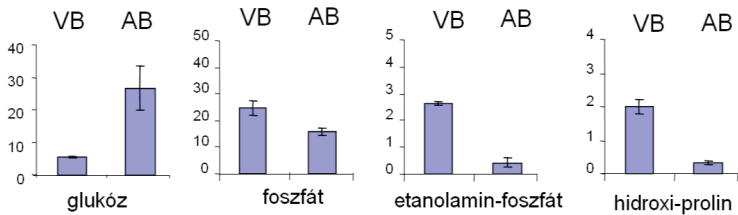
A GC-MS mérések során négy paramétert vizsgáltunk: (a) a hidroxiprolin szintet, amely egy hagyományos markere a kollagén lebomlásának (azaz a csont szerves anyaga bomlásának, csökkenésének), (b) a szabad, oldatban lévő foszfát koncentrációját, (c) a szabad etanol-amin foszfát koncentrációját („b és c” a csont szeretlen állományának összetevőiben történő változásokat jelzik), (d) a glükóz koncentrációt, amely az „energia igény” markere (azaz Runx2-Osteocalcin-Insulin útvonalon aktivált mineralizációs gének heves működése által előállt energia igényt biztosítja; érsd alatta a rendkívül intenzív fehérje szintézist; Siebel *et al.*, 2002; Whyte; 2002, Lee *et al.*, 2007).

Látható a 13. és 14. ábrákon, hogy a GC-MS adatok összhangban állnak a génexpressziók mértékével:

(i) a hidroxiprolin szintje 6-7 szer kisebb az agancs csontban, mint a váz csontozatban, ami jelzi hogy az agancs csontban sokkal kevésbé bomlik a kollagén, mint a váz csontozatban. (Megj. ez utóbbi egyik lehetséges oka lehet pl. az hogy kollagén vázra lerakódó ásványi anyagok védik a fehérjét a proteázoktól, egy másik ok lehet pl. hogy az agancs csontos részében sokkal kevesebb az osteoclast, mint a váz csontozatban, tehát a agancscsont turnover sokkal kisebb az agancsban).

(ii) az etanol-amin foszfát és a szabad szeretlen foszfát koncentrációja 40% -kal kevesebb az agancscsontban, mint a csigolya csontban. Ami jelzi, hogy az agancs csontban erőteljes a csont szeretlen összetevőinek lerakódása a szerves mátrixon, szemben a váz csontozattal.

(iii) a nagyon nagy glükóz koncentráció az agancscsontban (5-szöröse csigolyáénak) összhangban van az agancs csont robosztus növekedésének nagy energia felhasználásával. Az agancs csontban a mineralizációs gének rendkívül hevesen működnek, tehát nagyon intenzív a fehérje szintézis (anabolikus aktivitás). A mineralizációs gének felfokozott működéséért a Runx2 és Osx aktivátorok felelősek, emellett a Runx2 az *osteocalcin* (*oc*) gént is aktiválja, amely gén az inzulin szint növelésével és a csontsejtek inzulin érzékenységének fokozásával biztosítja a nagy mennyiségű glükózt a fehérje szintézis energia igényének kielégítéséhez.



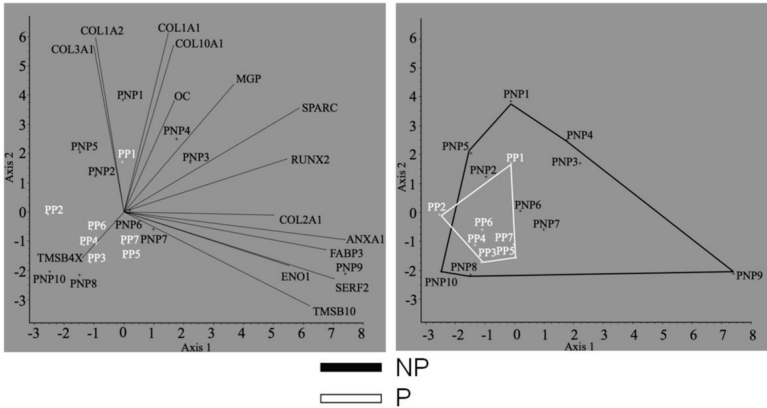
14. ábra: A metabolitok relatív mennyisége az agancs csontban és a csigolya csontokban: GC-MS analízis. AB: (Antler bone) agancsont, VB: (Vertebral bone) csigolya csont. Az adatok 1 mg szövetmintára vonatkoznak (További részletek a 4.13. fejezetben).

5.2.5. Agancs gének humán oszteoporózis diagnosztikában: Q-RT-PCR vizsgálatok

Az általunk azonosított gímszarvas gének (*coll1A1*, *coll1A2*, *col2A1*, *col3A1*, *coll10A1*, *mgp*, *sparc*, *eno1*, *fabp3*, *serf2*, *anx1*, *tmsb4x*, *tmsb10*, *oc/BGLAP*, *runx2*) human ortológjainak expressziós mintázatát összehasonlítottuk 7 oszteoporótikus és 10 nem oszteoporótikus páciensben (lásd részletesen 4.2.4. fejezetben).

Az eredmények statisztikai értékelése (PCA és CVA) alábbiakat jelezte:

- (i) Erős a korreláció a erős korreláció *fabp3* és *anx1*, *coll1A1*, *coll10A1*, *coll1A2* és a *col3A1* expressziója között, ami azt jelenti, hogy az egyik gén aktivitásának változása párhuzamos a többi gén aktivitásának változásával, mind az oszteoporótikus (PP) és nem oszteoporótikus (PNP) csoportban (15. ábra PCA).
- (ii) Az oszteoporózisban szenvedő betegekben általában csökkent a „gímszarvas javasolta gének” expressziója (15. ábra PCA).
- (iii) A „gímszarvas javasolta gének” expressziós mintázata igen egységes az oszteoporótikus betegekben. Mind ez azért figyelemre méltó, mert a oszteoporótikus betegek genetikai háttere különböző. Tehát az expressziós mintázat penetranciája nagy volt, ami élesen eltér a nem oszteoporótikus csoportban.
- (iv) A „gímszarvas javasolta gének” expressziós mintázatai alapján az oszteoporótikus és nem oszteoporótikus egyének egyértelműen azonosíthatóak. (16. ábra CVA).



15. ábra: A „gímszarvas javasolta gének” humán ortológjainak génexpressziós korrelációi: Főkomponens analízisek (PCA) 7 oszteoporótikus és 10 nem oszteoporótikus páciensben. Gének: *col1A1*, *col1A2*, *col2A1*, *col3A1*, *col10A1*, *mgp*, *sparc*, *enol*, *fabp3*, *serf2*, *anx1*, *tmsb4x*, *tmsb10*, *oc/BGLAP*, *runx2*. Bal oldali ábra: PCA analízis a gén expressziók korrelációi szerint. Jobb oldali ábra: PCA analízis a páciensek szerint.



16. ábra: A „gímszarvas javasolta gének” humán ortológjainak génexpressziós korrelációi: Diszkriminancia analízisek (CVA) 7 oszteoporótikus és 10 nem oszteoporótikus páciensben. Gének: *col1A1*, *col1A2*, *col2A1*, *col3A1*, *col10A1*, *mgp*, *sparc*, *enol*, *fabp3*, *serf2*, *anx1*, *tmsb4x*, *tmsb10*, *oc/BGLAP*, *runx2*. Megjegyzés: a CVA tökéletes elválasztja az oszteoporótikus és nem oszteoporótikus pácienseket.

5.3. A gímszarvas *coll1A1* génje promóterének klónozása

A humán, egér, szarvasmarha és sertés, valamint az általunk klónozott százánál több gímszarvas gén cDNS szekvenciái összehasonlítása rámutatott az emlős ortológ gének nagyfokú szekvencia hasonlóságaira (Gyurján *et al.*, 2007; Molnár *et al.*, 2007; Borsy *et al.*, 2009; Steger *et al.*, 2010). Az egér és a gímszarvas közötti cDNS szekvencia homológiák mértéke pl. 80-85% volt, a gímszarvas és ember között 90-95%, a gímszarvas és a szarvasmarha között 97-100%. Az értékek hűen tükrözték a fajok taxonómiai helyzetét is.

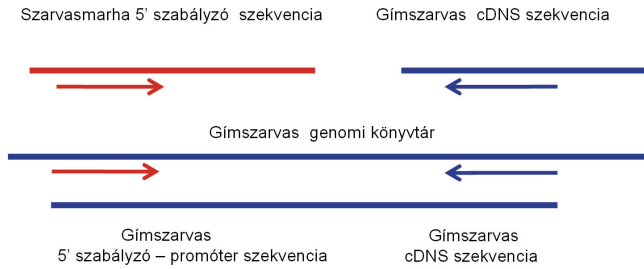
Az eredeti „Zoo Cloning” eljárásunkkal (Gyuján *et al.*, 2007; Gyurján I., 2008 PhD disszertáció) a gének kódoló részeinek (transz résznek) szekvenciáit határoztuk meg.

Az én doktori munkám során tovább fejlesztettük a „Zoo Cloningot” a gének promóter régiói klónozásához.

A klónozási logika és koreográfia a következő volt:

- (i) az adatbankokban időközben elérhetővé váltak a szarvasmarha genomi szekvenciák.
- (ii) kezünkben voltak a gímszarvas cDNS szekvenciák, amelyek mint fentebb említettük, 97-100% - ban megegyeztek a szarvasmarha szekvenciákkal.
- (iii) feltételeztük, hogy ez a nagyfokú szekvencia hasonlóság kiterjed a promóter régiók területére is (tehát genomi szekvenciákra is).
- (iv) primereket tervezhettünk tehát a gímszarvas cDNS szekvencia szerint, valamint a szarvasmarha genomi szekvencia szerint is (azaz a szarvasmarha promóter régió szekvenciája szerint).
- (v) PCR reakcióval a *coll1A1* gén promóter régió 1 kbp-nyi szakaszát amlifikáltuk gímszarvas genomi DNS-templáton. (Megj. mint utóbb kiderült a gímszarvas és szarvasmarha promóter régiók szekvencia hasonlósága 93%, ami záloga volt az elgondolásunk sikerének).

A klónozás lényegét a 17. ábra mutatja.



17. ábra: A gímszarvas *coll1A1* 1 kbp-nyi promóter szekvenciája klónozása (sematikus rajz) a tovább fejlesztett Zoo Cloning eljárás szerint.

5.4. Az agancs gének bioinformatikai vizsgálata

A gímszarvas mineralizálódó agancs szöveteiben upregulált 17 gén 1 és 5 kbp-nyi promóter szekvenciáit bioinformatikailag (*in silico*) elemeztük a humán és szarvasmarha ortológokon. (lásd a 4.14 fejezetben a felhasznált szoftvereket és adatbázisokat).

Szekvencia homológiák

Megállapítottuk az ortológ szekvenciák nagyfokú konzerváltságát (6. táblázat).

6. táblázat: A gímszarvas, ember, és szarvasmarha ortológjainak cDNS és 5' szabályozó (promóter) szekvenciák homológiája %-ban.

Gének	cDNA			Promóter ^a	
	Ce/Bt (%)	Ce/Hs (%)	Bt/Hs (%)	Bt/Hs (%)	1K 5K
<i>coll1A1</i>	97	91	93	82	74
<i>coll1A2</i>	98	91	90	94	74
<i>col2A1</i>	97	93	92	81	72
<i>col3A1</i>	97	91	88	82	80
<i>col10A1</i>	96	78	85	77	77
<i>mgp</i>	96	78	79	71	69
<i>sparc</i>	95	81	86	77	75
<i>ibsp</i>	95	83	80	77	77
<i>eno1</i>	92	79	86	86	73
<i>fabp3</i>	96	85	84	71	71
<i>serf2</i>	96	97	89	-	-
<i>anx1</i>	98	88	88	70	69
<i>tmsb4x</i>	96	86	86	72	70
<i>tmsb10</i>	98	87	88	66	66
<i>oc</i>	94	85	84	67	69
<i>runx2</i>	99	95	95	87	75
<i>osx</i>	96	85	84	82	77

Homológiák %-ban: Ce/Bt, Cervus elaphus versus Bos taurus; Ce/Hs Cervus elaphus versus Homo sapiens; Bt/Hs Bos taurus versus Homo sapiens. Az adatok a BLAST program eredményei. ^a A homológia a *coll1A1* gén promóter szekvenciájában 93% (lásd a szövegben).

Runx2 és Osx mester regulátorok kötőhelyei

A bioinformatikai feldolgozás eredményét a 7. táblázatban láthatjuk.

A táblázat adataiból leszűrhető:

- (i) Szembe ötlő a Runx2 és Osx transzkripció mester regulátor kötőhelyek nagy száma a vizsgált gének promótereiben.
- (ii) A *runx2* promóterében nagyszámú Runx2 kötőhely található, ami érthető, mivel a Runx2 saját maga pozitív auto upregulátora.
- (iii) Az *osterix* promótere számos Runx2 kötőhelyet hordoz, ami megfelel annak a ténynek, hogy az *osterix* gén upregulátora a Runx2, és az *osterix* downstream helyezkedik el a *runx2*-höz képest a genetikai útvonalon.
- (iv) Ez utóbbit alátámasztja az is, hogy a *runx2* promóterében kevés Osx kötőhely található.
- (v) Feltételezhető, hogy az Osterix is auto upregulálja saját promóterét, mivel az *osx* gén promóterében nagyszámú Osx kötőhely található.
- (vi) A pozitív kontroll az osteocalcin (*oc*) gén promótere volt, amelyről ismert volt már, hogy a Runx2 szabályozása alatt áll.

7. táblázat: A Runx2 és Osterix transzkripció faktorok DNS kötőhelyei száma a szarvasmarha, ember és gímszarvas ortológok 5' szabályozó régióiban

Gének	Runx2					Osx				
	Bt		Hs		Ce	Bt		Hs		Ce
	1K	5K	1K	5K	1K	1K	5K	1K	5K	1K
<i>coll1A1</i>	14	59	13	58	17	15	86	18	98	17
<i>coll1A2</i>	15	77	16	87		35	56	44	65	
<i>col2A1</i>	6	65	10	46		68	84	44	56	
<i>col3A1</i>	15	81	15	67		4	5	3	11	
<i>coll10A1</i>	9	92	26	91		4	9	0	15	
<i>mgp</i>	17	72	16	68		5	8	1	8	
<i>sparc</i>	8	71	18	89		11	26	6	20	
<i>ibsp</i>	19	82	10	80		0	12	0	8	
<i>enol</i>	8	70	6	73		29	40	31	55	
<i>fabp3</i>	11	70	7	74		25	58	24	46	
<i>serf2</i>	5	52	18	74		13	32	28	47	
<i>anx1</i>	13	73	27	68		1	2	2	6	
<i>tmsb4x</i>	9	12	20	62		22	28	39	56	
<i>tmsb10</i>	9	77	17	78		29	37	34	45	
<i>oc</i>	17	58	25	80		34	75	34	59	
<i>runx2</i>	34	88	40	85		3	7	1	5	
<i>osx</i>	9	61	20	86		30	60	28	77	

Az 1kbp (1K) és 5kbp (5K) hosszúságú promóter szekvenciák „in silico” elemzése. A TMSB4 gén szekvenciáját 1500 bp hosszú szakaszon vizsgáltuk. (Megj. Az Osterix transzkripció faktor az SP1 kötőhelyet is használja; lásd 18. ábra: y).

Bt, *Bos taurus*; Hs, *Homo sapiens*; Ce, *Cervus elaphus*.

A Runx2 és Osx regulátorok kötőhelyei a gímszarvas coll1A1 génben

A *coll1A1* gén a kollagén alfa 1 láncát kódolja, amely fehérje a csont szerves mátrix legfontosabb alkotó eleme, mintegy 40% teszi ki a szerves anyagnak. A *coll1A1* gén első intronjában található SNP (S/s allélek) nagy jelentőségük van a humán oszteoporózis diagnosztizálásában. A „s” allél hajlamosságot jelez az oszteoporózis kifejlődésére. A 18. ábrán feltüntetettük a *coll1A1* gén humán, szarvasmarha és gímszarvas ortológok és első intronjának sematikus géntérképét, bejelölve a Runx2 és Osx mester regulátorok, transzkripció faktorok kötőhelyeit.

Szembe ötlően jelenik meg a transzkripció kötőhelyek sorrendjének konzerváltsága, amely megnyilvánul egyrészt számos kötőhely pozíciójának co-linearitásában és bázis párta megegyező távolságában (comensurabilitás).

Érdekes megfigyelni, hogy Runx2 kötőhelyekből legnagyobb számban a gímszarvas ortológban találhatók (ember, szarvasmarha, gímszarvas szekvenciák 13,14,17 Runx2 kötőhely).

Runx2 kötőhelyek

```

HsPrE1COL1A1 5' -1---t-b-----O--f-----me-----TSS      +1 f--kvgs-      intron1
BtPrE1COL1A1 5' -----r-rp--q-O--f-cl j--n-r-----kvgs-      +1 f--kvgs-      +3'
CePrE1COL1A1 5' -1h-----r-rp-----O--a-f--i j--tn-----d-kvgs-      +1 f--kvgs-      +3'
  
```

Symbol	Binding site	Transfac ID
a	AACAACA	HS2IMP13_01
b	AACCAAC	HS2IMP13_01
c	AACCAGA	HS2IMP13_01
d	AACCGCA	HS2IMP13_01
e	ACCACAGC	OSF2_Q6
f	AGCCACA	HS2IMP13_01
g	AGGAGCCGGAGTCC	DR3_CONS
h	AGAGTCA	RAT\$RUNX2_Q2
i	GAGAACCAGGAATT	PEBB_Q6
j	GAGGACCCAGGAATT	PEBB_Q6
k	GAGTCCACAAGCT	PEBB_Q6
l	TAGGTCA	RAT\$RUNX2_Q2
m	TGCCACA	HS2IMP13_01
n	TCTGGAT	MOUSE\$A21COL_10
o	TGAGGAT	MOUSE\$A21COL_10
p	TGAGGCA	RAT\$RUNX2_Q2
q	TGAGTCT	RAT\$RUNX2_Q2
r	TGAGTCA	RAT\$RUNX2_Q2
s	TGCOTCA	RAT\$RUNX2_Q2
t	TGGGAT	MOUSE\$A21COL_10
v	TGTGGAC	MOUSE\$A21COL_10
x	TGTGGAG	MOUSE\$A21COL_10

Osx kötőhelyek

```

HsPrE1COL1A1 5' ---yy---yY-----Y-yyy---Y--yY--Yy-Y-YYY-Y--Y--Yy---Y-   TSS      intron1
BtPrE1COL1A1 5' -y-----Y-----y-----y-Y--Y--Y-Y-YYY-Y-Y--Y--Y-   +1 Y
CePrE1COL1A1 5' -yY-----Y-----y-----y-Y-y--Y--Y-YYY-Y-Y--Y--Y-   +1 Y
  
```

Symbol	Binding site	Transfac ID
y	HHGGGGCGGGNN	V\$SP1_Q4_01

- 20 bp

18. ábra: A Runx2 és Osx transzkripciós faktorok kötőhelyeinek helyzete a *col1a1* gén ortológjainak 1 kbp 5' szabályzó régiójában (promóter) és első intronjában (HS humán, Bt Bovine, C red deer). y: Osterix kötőhely. TSS, az mRNS transzkripció startpontja. mind a három faj ortológjaiban megfigyelhető számos pozíció co-linearitása (vastagított jelek). Az ábrán egy vonás 20 pb-nak felel meg. (szekvencia szinten valamennyi részlet megtekinthető Stéger *et al.*, 2010 publikáció mellékletében).

Megjegyzés: az Osterix transzkripciós faktor az SP1 kötőhelyet is használja; lásd 18. ábra: y). aminek diagnosztikus értéke van a humán oszteoporózis hajlam prediktálásában (további részletek az eredmények megvitatásában).

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A birtokunkban levő, részben már saját fejlesztésű géntechnológiai és DNS-CHIP eszköztárral folyamatos „génvadászatot” végeztünk két úton: (i) a robosztus csontfejlődésben szereplő gének felismerése és működésük jellemzése érdekében; valamint (ii) a fiziológiás csontitkulásban és visszapótlásában (szarvasbika vázcsontozatában) szereplő gének felismerése és működésük megértése érdekében.

Az agancs robosztus növekedése a mezenchima, előporc és porc régiókban valósul meg. A vázcsontozat fiziológiás csontitkulása az agancs porc és csont szerves mátrix rendkívül robosztus mineralizációjának (kalcifikálódás, a csont szeretlen anyagainak kikötése) következménye.

Az agancs porcos és csontos része sejtleszármazás szempontjából különbözik. A porcsejtek sejtvonala a csúcsi mezenchimából származtatható le. A csont progenitor sejtek független eredetűek: a porc sejtek hipertrofizációja és apoptózisa után a vérárammal jönnek és vándorolnak be a porcsejtek által elkészített mátrixba.

Ez indokolja, hogy külön foglalkozunk a porcszövet és a csont szövet mineralizációjának folyamatával, ill. ennek megfelelően az agancs csúcsi részével és elcsontosodott részével.

6.1. A csontmetabolizmus szabályozása az agancsfejlődés alatt

Célunk volt, hogy betekintést nyerjünk a csontbontás és építés epigenetikai szabályozásába a gímszarvas bika agancsfejlődése alatt.

A csontmetabolitok változása ezen időszak alatt két ellentétes folyamathoz kapcsolódik. Egyrészt a fejlődő barkás agancs robosztus csontosodáshoz, másrészt vázcsontozat rendkívül intenzív oszteoporózishoz. A jelenség neve fiziológiás oszteoporózis. Feltételeztük, hogy azon gének azonosítása, amelyek kapcsolatban vannak az agancsporc jellegzetes szövettani karakterisztikájával, nevezetesen intenzív kalcifikációjával („elő-csontosodásával”), közelebb visznek az agancs és a vázcsontozat ásványi anyag forgalmának megértéséhez.

A vizsgálatok céljából kifejlesztettük az „Agancs” cDNS chipet, amely lehetővé tette a növekvő barkás agancs porcos zónájában upregulált gímszarvas gének hatékony azonosítását és klónozását.

A géneket különböző funkcionális csoportokba soroltuk (1. táblázat). Különös figyelmet szenteltünk azoknak a géneknek, amelyek a csont biológiában „referencia géneknek” számítanak, vagy a mátrix gének közé tartoznak.

Azt tapasztaltuk, hogy ezek a gének 2-10 -szer hevesebben expresszáltak már az agancs chondrocytáiban és chondroblastokban, mint a magzati növekedési porclemez sejteiben (9, 10/A, 10/B ábrák és 2. táblázat). Ezen gének upregulációs mintázata megegyezett azzal a mintázattal, amelyet akkor kaptunk, amikor a barkás agancs robosztus csontosodását a vázcsontozat oszteoporóziséval hasonlítottuk össze. Azaz a gének expressziós szintje sokkal magasabb volt a barkás agancs csontos részében, mint a vázcsontozat borda és csigolya mintáiban. Méréseink azt mutatják, hogy a *coll1a1* gén expressziója 7-17 -szer magasabb az agancs csontban, mint a vázcsontozatban. Még nagyobb, különbségeket tapasztaltunk más mineralizációs gének esetében (5. táblázat). Génextpressziós méréseinkhez több belső viszonyító kontrollt is használtunk. A *18S rRNS*, *28S rRNS*, *gapdh* gének expressziójához viszonyítottuk a többi gén expresszióját. A Northern blot kvantitatív értékeit a Syngene program felhasználásával állapítottuk meg. Affymetrix microarray mérésekkel, egy független módszerrel is megerősítettük a kvantitatív értékeket az

Meg kell jegyeznünk, hogy a konkrét számszerűsítéseket, különösen a nagyon nagy értékeknél óvatosan kezeljük, mert végül is egy módosult endochondrális csontosodást (agancs) hasonlítottunk a vázcsontozat folyamataihoz.

Érdekes lenne látni a számszerűségeket (ha adaptálhatóak lennének) az emlős fajok női egyedek oszteoporózisánál, amely a vemhesség alatt alakul ki (jelentős csontvesztés figyelhető meg pl. az intenzíven tejelő szarvasmarha fajták tehenei szegy és medence csont szerkezetében, ami egy régóta ismert jelenség).

Feltételeztük hogy a fejlődő agancsban a csont „referencia marker” gének és a mátrix gének (azaz „mineralizációs gének”) hasonló genetikai szabályzás alatt állnak, ezért megvizsgáltuk a gének promóter régióit. Arra voltunk kíváncsiak, hogy mely transzkripciósi faktorok kötőhelyei találhatóak a gének távolabban értelmezett promóter régióiban (5' upstream régiók). Ezáltal prediktálni reméltük, hogy mely transzkripciósi faktorok és „génjeik” vehetnek részt a mineralizációs folyamat szabályozásában.

A szarvasmarha és gímszarvas gének nagyfokú homológiája lehetővé tette, hogy a gímszarvas *coll1a1* génjének promóter régióját a tovább fejlesztett Zoo Cloning segítségével amplifikáljuk (itt jegyezzük meg, hogy a módosított Zoo Cloning a sok más génre is alkalmazható).

A gímszarvas, szarvasmarha és az ember *coll1A1* génje 5' upstream szabályozó régiója szekvencia vizsgálata számos Runx2 és Osx kötőhelyet tárt fel (7. táblázat és 18. ábra). A Runx2 és Osterix transzkripció faktorok/génjeik a csont fejlődés mester regulátorai. Joggal feltételezhetjük tehát, hogy nemcsak a gímszarvas *coll1A1* génje, hanem a többi ortológ is a Runx2 és Osx szabályozása alatt állhat (7. táblázat).

Ezt a nézetet támasztja alá több kísérleti bizonyítékunk is:

(i) mind a három fajban (gímszarvas, szarvasmarha, ember) *coll1A1* génje 5' regulátor (promóter) régiója, nem csak nagyon gazdag Runx2 és Osx transzkripció faktor kötő helyekben, hanem a kötőhelyek egyformán konzerváltak, pozícióik sorrendje co-lineáris (a három fajban), sőt számos kötőhely sorrendjére vetítve a távolságok co-menzurálisak (azaz bázispárra megegyeznek, 18. ábra).

(ii) a *coll1A1* első intronjának az a 175 bp hosszúságú szakasza, amely tartalmazza az Sp1/Osx kötőhelyet (Jim *et al.*, 2009) nagyon erősen konzervált a kérődzőkben és az emberben. Ezen 175 bp régió tartalmazza azt az SNP helyet, amelynek allélikus variációit, mint az oszteoporózis „hajlam” markerét alkalmazza a humán DNS diagnosztika. A szekvencia „1245” pozíciójában G vagy T nukleotid található. Ez a pozíció határozza meg a S/s allélokot az Sp1 kötőhelyben. Maga az SNP kapcsolt a csontsűrűség fenotípussal (kvantitatív fenotípus) (Alvarez *et al.*, 1999). A S/s allélok intermedier öröklődésűek. A S/S genotípus csontsűrűsége tekinthető a normálisnak („vad típus”), a S/s heterozigóták csontsűrűsége csökkent, az s/s homozigóták csontsűrűsége a legkisebb. Az „s” allél jelenléte tehát a csonttritkulásra való fokozott hajlamot jelzi.

(iii) az agancs csontban az *osteocalcin* (*oc*) gén nagymértékben upregulált (13. ábra). Bizonyított, hogy az emlős modell rendszerekben az *osteocalcin* (*oc*) gén is a Runx2 transzkripció faktor szabályozása alatt áll (Stein *et al.*, 2002).

(iv) Az upregulált „agancs” gének szarvasmarha és humán ortológjai számos Runx2 és Osx kötőhelyet tartalmaznak. Bár a gímszarvas genomi szekvenciák még nem elérhetőek, feltételezhetjük, hogy promóterek és a cisz szabályozó régióik evolúciónan hasonlóan konzerváltak, mint ahogy azt a fent leírt *coll1A1* gén esetében már láttuk (gímszarvas és a szarvasmarha esetében a cisz régiók homológiája 93%, 18. ábra).

6.2. A mineralizálódó agancs csúcs: Runx2 útvonal

A barkás agancs porc mineralizációja kezdeteitől kulcs szerepet játszik a Runx2 transzkripciós faktor. A Runx2 a kalcifikálódó mátrix fehérjék fő mester regulátora („mineralizációs gének”). A Runx2-ről azt is tudni, hogy esszenciális szerepe van az emlős osteblastok differenciációjában és a váz kialakulásában, valamint a DNS nukleoszómák elrendezésében, ezáltal részt vesz gén expressziók transzkripciós szabályozásában (Komori *et al.*, 2010; Kohen, 2009). A runx2 saját maga pozitív auto upregulátora is.

Kísérleteinkben kimutattuk a *runx2* és a szabályozása alatt álló, downstream *osx* gén expresszióját az agancs csúcsi mezenchima sejtjeiben (9. ábra, és 2. táblázat). Ez a megfigyelés jelezte, hogy az agancs csúcsi mezenchima sejtek már elkötelezettek a porc és a csont fejlődés irányába. A runx2 pozitív auto upregulációját elindító „upstream” jel lehet az az erős PTHrP (Parathyroid hormone-related protein) expresszió, amelynek létét bizonyították már az agancs mezenchimában, előporcban és a perichondriumban is (Fauchaux *et al.*, 2002; Fauchaux és Price, 1999).

Az agancs porcba ellentétben a többi porcféleséggel betörnek és átszövik a véreket. A vérárammal további serkentő stimulusok érkezik, s ezek a stimulusok fenntartják a *runx2* és *osx* magas aktivitását a porcsejtokban.

A *runx2* expressziója által aktivált gének termelte nagy mennyiségű mineralizációs fehérje mátrix kiköti a vérből az ásványi anyagok alkotó elemeit (Ca, P, Mg). A chondrocyták apoptózisa után a mineralizált porc mátrix visszamarad. Az ásványi anyagok kirakódása következtében a fehérjemátrix egy jelentős része már védett a proteolitikus enzimek hasításával szemben, azaz bomlása gátolt. A porcsejtek pusztulása után a felszabaduló teret később az osteoblastok foglalják, amelyek majd létrehozzák a fejlődő agancs csontos részét.

Eredményeink összhangban vannak ezzel a nézettel, amelyet a génexpressziós és hisztológiai vizsgálataink is alátámasztanak:

- (i) nagy mineralizációs göcöket azonosítottunk az agancs porcban (8. ábra), amely az agancs csontos részében már csontosodási magvakként funkcionálnak.
- (ii) a mineralizációs gének erős expresszióját mutattuk ki az agancs porcsejtokban (10/A, 10/B).

- (iii) az agancs porcban a magzati növekedési porclemezhez képest 2-7-szeres expressziót mértünk a mineralizációs mátrixgénekénél (*coll1A1*, *coll1A2*, *sparc*) és a regulátor génjeiknél (*osx* és *runx2*) (9. ábra).

6.3. Agancs csont: robosztus csontfejlődés

Addig, amíg a mineralizálódó agancs porcnak nincs megfelelője a gímsszarvas testében, az agancs csont és a váz csontozat biokémiaiailag, összetételében megegyezik. A *runx2* gén a csontfejlődés általános mester regulátora, tehát egyaránt hat az agancs csontban és a vázcsontozatban. Az alapvető kérdés tehát nem az, hogy a Runx2 minként fokozza a csontosodást, hanem az, hogy miért csak az agancs csontban figyelhető meg a robosztus csontosodás, és miért nem érintett a vázcsontozat. Az agancs porccal ellentétben nehezebb megmagyarázni, hogy mi okozhatja a *runx2* fokozott lokális működését az agancsban.

Az egyik lehetséges scenárió az lehet, hogy az érző idegekből (amelyek beidegzik az agancs barkás bőrét és a periosteumot) diffúzibilis morfogén molekulák lépnek ki (Gray et al., 1992), amelyek hatására az osteoblastok receptorokat és ligandokat kezdenek el fokozatosan szintetizálni (pl. PTH/PTHrP, TGF- β /BMP, ECM és FGF2 stb.). A felsorolt molekulák valamennyien pozitív regulátorai a *runx2* génnek.

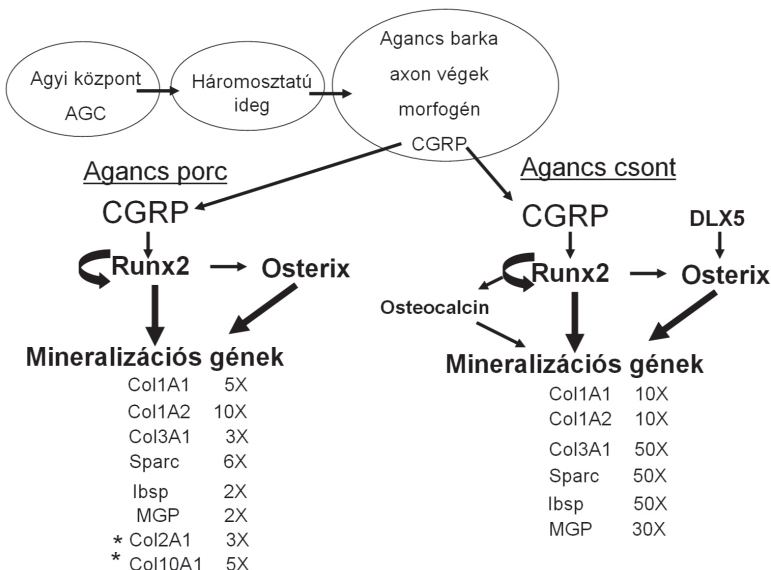
A legjobb jelölt egy ilyen diffúzibilis morfogén szerepre, amely helyi morfogénként hathat az agancscsontban a CGRP (Calcitonin gene-related peptide) neuropeptid. A CGRP-ről megállapították, hogy gyakori anyag az érző idegvégződésekben, beleértve azokat az érző idegeket is, amelyek a csontokat behálózzák.

A CGRP anabolikus szerepét igazolták a csont anyagcserében is: hatása erősíti az *osteocalcin* és a *PTH* gének kifejeződését (mindkét gén jelentős szerepet játszik a csont mátrix képzésében, Vignery és Mcarthy 1996; Hoch et al., 1988).

CGRP szabályozó hatását a *runx2* expressziójára az osteoblastokban nemrégiben közölték (Yang et al., 2009). Az agancs igen gazdag érzőideg végződésekben. Az érző idegvégződéseket az agancsban a *nervus trigeminus* (háromosztatú ideg) agyideg axonjai alkotják. A háromosztatú ideg kapcsolatban van a feltételezett agancs növekedési központtal (ACG, Antler growth center, Bubenik 1990).

Ezzel az anatómiai megközelítéssel tudjuk magyarázni, hogy miért a CGRP indíthatja az agancsra lokalizálódó morfogén aktivitást, beleértve annak csontos részét is.

A kezdő lépés után az osteoblastok később már fenn tudják tartani azoknak a géneknek az expresszióját, amelyek végül beindítják a *runx2* expresszió pozitív auto upregulációját (19. ábra).



19. ábra: Az agancs robusztus mineralizációja (epigenetikai) útvonala. Számok: Affymetrix és Northern kimutatások kvantifikálásából (Syngene) származtatott „upregulációk” mértéke. Agancs porc értékek: az agancs porcban mért génexpressziók a növekedési porclemez génexpressziókhöz viszonyítva. Agancs csont értékek: az agancs csontban mért génexpressziók a vázcsontok (csigolya, borda) génexpresszióihöz viszonyítva.

Számos növekedési faktor (BMP, FGF és TGF- β) szintézisét kimutatták már az agancsban (Mundy *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 1995 és 1997; Francis és Suttie 1998).

A további lépések során a *runx2* öngerjesztő expressziója aktiválja/upregulálja a szabályozása alatt álló downstream mineralizációs mátrix géneket az agancs csontban, beleértve az *osteocalcin* (*oc*) gén expresszióját is. Ezen folyamatok eredménye kettős: (i) a rendkívül intenzív fehérje szintézis következtében (mátrixgének) nagyon nagy az agancs csontban az energia igény és felhasználás, valamint (ii) a hatalmas mennyiségű mátrix fehérje (pl. Col1A1) megköti az ásványi anyagokat a véráramból.

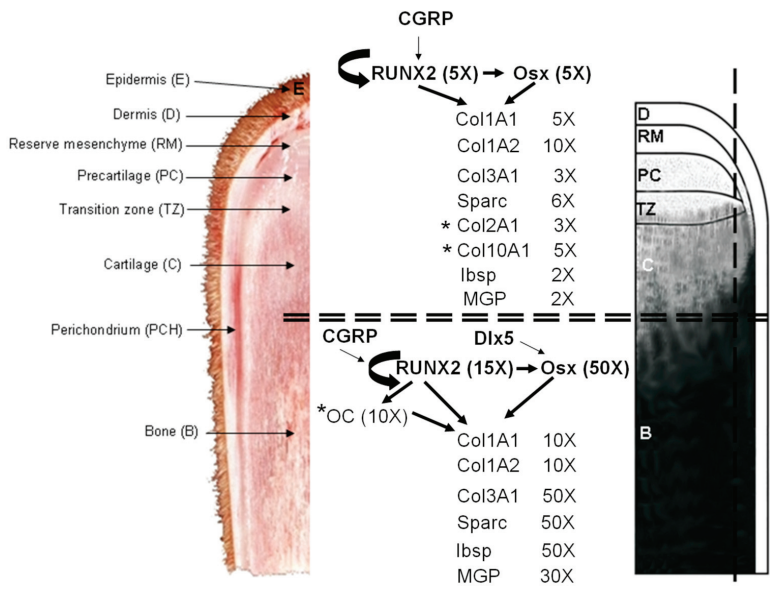
Mivel az agancs csontban kivonódnak az ásványi anyagok, így a kalcium is a vérből, a homeosztázis fenntartása érdekében pótlódnuk kell. A pótlás normális esetben a táplálék fedezi. Az agancs robusztus csontosodása során azonban olyan hatalmas mennyiségű kalcium vonódik ki a vérből, amelyet a táplálkozás (legelés) önmagában

nem tud fedezni, ezért a hiányzó részt a gímszarvas szervezete a vázcsont bomlásából egészíti ki (Banks *et al.*, 1968a; Moenet *et al.*, 1999; Moen és Pastor, 1996, modellje alapján).

Megfigyeléseink és a kísérleti eredményeink több ponton támasztják alá a fenti modellt:

- (i) A csontosodó agancscsúcsban a mineralizáció kezdetekor a kalcifikációs front alakja kónuszos (lásd. az agancs szagittális metszeti képén, 20. ábra). A kónikus formát a barkás bőrből befelé diffundáló morfogén (pl. CGRP) koncentráció grádiense, valamint a felfelé (disztálisan) növekvő agancs növekedés, a két folyamat eredője, alakíthatja ki.
- (ii) A Runx2 és Osx és az általuk szabályozott mineralizációs gének az expressziója hevesebb volt az agancs csontban, mint a vázcsont mintákban.
- (iii) GC-MS méréseink eredményei összhangban állnak az agancscsontban mért fokozott génexpressziók nagy energia igényével. Az agancs csont glükóz tartalma közel ötször magasabb, mint a vázcsonténak.
- (iv) Ez nagy glükóz fogyasztás összhangban van az *osteocalcin* gén (*oc*) magas expressziójával. Az osteocalcin hatásáról ismert, hogy glükóz felhasználásához szükséges magas inzulin-szintet és érzékenységet biztosítja (Lee *et al.*, 2007), amely a glükóz felhasználásához szükséges (vesd össze a 11., 13., és 14. ábrát).
- (v) A hidroxil prolin tartalom jelezte, hogy sokkal kisebb a kollagén bomlás mértéke az agancs csontban, mint a csigolyában, ami összhangban volt az agancs csont intenzív *coll1a1* expressziójával (lásd. 14. ábra).
- (vi) Az agancs csontban ez etanolamin foszfát és a szabad foszfát szintje sokkal alacsonyabb, mint a csigolya és borda csontokban, ami az ásványi anyagok egyirányú áramlásával magyarázható: a váz csontozatból (csont bomlás) az agancs mátrixa felé, ahol az ásványok kikötődnek a vérből („oldatból”).

Figyelembe véve a mineralizációs gének 10-30 szoros (vagy többszörös) aktivitását és az ennek során keletkező agancsmátrix nagy tömegét, ez önmagában elegendő ahhoz, hogy meghatározza az ásványi anyagok áramlási irányát és lerakódását a vázcsontozatból az agancs felé. Nincs szükség tehát arra, hogy a vázcsontozat aktívan gátolja az ásványi anyagok visszapótlását saját magába, ezzel is segítve az agancs robusztus csontosodását.



20. ábra: Az agancscsúcs mineralizációjának, szabályozásának sematikus képe.

6.4. Agancs gének és humán csontritkulás

Úgy gondoljuk a munkánk során feltárt gének és szabályozó mechanizmusok segítik az erőteljes és gyors csontszövet képzésének a háttérben lévő folyamatok megértését és feltérképezését.

Hisszük, hogy a gímszarvas robosztus csontfejlődésének tanulmányozása hasznos információkkal szolgálhatja az orvosi kutatásokat is. Egyszer még hozzájárulhat a csontritkulás korai diagnosztizálásához, gyógyszerek fejlesztéséhez és újszerű csont és porc pótló eljárások kidolgozásához. Mondandónk bizonyításához álljon itt a 15. és 16. ábra példája arról, hogy a gímszarvas javasolta gének expressziós mintázata alapján az oszteoporótikus és nem oszteoporótikus páciensek egyértelműen megkülönböztethetők.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Célunk volt a gímszarvas agancs robosztus fejlődését és az ezzel a vázcsontozatban kialakuló ciklikus fiziológiás oszteoporózist irányító, s az ásványi anyag forgalomban fontos szerepet játszó gének azonosítása. A gímszarvas agancs mineralizációja a vázcsontozat (szegycsont, bordák, csigolyák, medence) átmeneti, fiziológiás csontitkulását okozza, amelyet az állat később képes regenerálni, s az elveszett ásványi anyagokat pótolni. A folyamat következtében kialakuló csont szerkezeti változásokat (oszteoporózis és regenerációja, anatómiai eltéréseit a vázcsontozat különböző részeiben elsőként demonstráltuk.

A gímszarvas bika agancsfejlődése a leggyorsabb és legintenzívebb csontfejlődés az állatvilágban. Az ásványi anyagok lerakódása az agancsban már a csontszövet fejlődés előtti állapotban az előporcban, porcban megkezdődik, amely a fejlődő agancs egy specifikus tulajdonsága. Az általunk kifejlesztett Agancs Chip segítségével klónoztunk 28 gént, amelyek fokozottan működtek a mineralizálódó agancsporcban a magzati növekedési porclemezhez viszonyítva. Felvettük 15 gén expressziós profilját az agancs csúcsban, 7 gén expresszióját sejt szinten is lokalizáltuk.

A csont mátrix gének (*coll1A1*, *collA2*, *col3A1*, *ibsp*, *mgp*, *sparc*, és az *osteocalcin*), valamint a mester regulátoraik (*runx2*, *osx*) összehasonlítottuk a barkás agancs csontosodó részét a vázcsontozattal (bordák és csigolyák). Ezen géneknek az expressziója a barkás agancs csontos részében 10-30 szor nagyobb volt, mint a vázcsontozatban. A génexpressziós változásokkal összhangban a gének 5' reguláló régióinak vizsgálata (gímszarvas, szarvasmarha, ember) során nagyszámú Runx2 és Osx transzkripció faktor kötőhelyet találtunk. A GC-MS vizsgálatok megerősítették, hogy a glükóz, foszfát, etanolamin-foszfát és a hidroxiprolin metabolitok a mineralizációs gének magas aktivitása miatt a vázcsontozatból az agancsontba áramlanak. Integrált módon vizsgáltuk a génexpressziós mintázatokat és kvantitatív metabolit adatokat az agancs robosztus csontfejlődése alatt.

Feltártuk az agancs robosztus mineralizációja (epigenetikai) útvonalát: (i) agancs csúcsban (agancs növekedési agyi centrum (AGC) → háromosztatú ideg → agancs barka → CGRP morfogén neuropeptid → Runx2 → Osx → mátrix gének); (ii) agancs csontban (agancs növekedési agyi centrum (AGC) → háromosztatú ideg → agancs barka → CGRP morfogén neuropeptid → Runx2 → Oc és Osx → mineralizációs mátrix gének).

A minél teljesebb genetikai háttér megismerését átvezetjük az orvosi kutatásokba: oszteoporózis diagnosztikára és gyógyszerfejlesztési célpontok kijelölésére. Bizonyítottuk, hogy a gimszarvas javasolta gének expresszióival egyértelműen diagnosztizálhatók a csonttritkulásban szenvedő betegek.

8. JAVASLATOK

Az agancs csont expressziós mintázata az élővilág leggyorsabban mineralizálódó szövetének „fenotípusát” jelenti. Vizsgálatával közelebb kerülhetünk a csont metabolizmus hátterében zajló epigenetikai folyamatok megértéséhez.

Az agancs robosztus növekedése egy feltételezett idegi stimulusra indul, majd ezen kontroll szerint folytatódik. Fontosnak tartom a folyamat intenzív tanulmányozását: (i) az idegrostok mentén (nervus trigeminus) megtalálni az „utat” az agancs porc és csonthártyától, valamint a barkától „visszafelé” az agyi központba, véglegesen eljutva a feltételezett agancs növekedési központhoz (AGC, Antler Growth Center).

További megerősítő kísérletes bizonyítékokat látok szükségesnek a CGRP (Calcitonin gene-related peptide) expressziója vonatkozásában is: azaz hol termelődik ez az anyag és mely időpontokban a gímszarvas agyában az agancs ciklus során.

Az agancs növekedés idegrendszer általi szabályozása pontosabb megismerését olyan kísérletekkel lehetne jobban feltárni, amelyek az idegi stimulus hatására bekövetkező gén expressziós mintázat változásokon keresztül rávilágítanak arra, hogy milyen neuro kémiai folyamatok (neurohormonok) szabályozzák az agancs hihetetlen gyors növekedését és csontosodását. Egy ilyen kísérlet során a nervus trigeminust az agancs egyik szárán elvágnák (denerválnák), majd követnék és összehasonlítanák az ép és a denervált agancs száruk génexpressziós változásait. Úgy gondolom, hogy egy ilyen vizsgálat sorozat feltárná azokat a géneket az agancsban, amelyek közvetlenül az idegi stimulusk (neuropeptidek) szabályozása alatt állnak.

A gímszarvas gének 5' szabályozó régióinak a szekvencia meghatározását elkezdjük. Az agancs csontban upregulált gének (amelyek a 13. ábrán szerepelnek) promóter régióiban folyamatosan vizsgáljuk a csont és porc specifikus mester regulátorok kötő helyeit.

A gímszarvas vázcsontozatának különböző részeiben a génexpressziók vizsgálatával teljes képet kaphatunk a teljes vázcsontozatra vetített csonttrikulási dinamikáról.

Eddigi megfigyeléseink azt jelzik, hogy a vázcsontozat különböző részei más-más mértékben érintettek a gímszarvas ciklikus fiziológiás csonttrikulása során.

Az agancs csont és a gímszarvas vázcsontozatában eltérően expresszázó gének közül további biomarkerek kerülhetnek ki, amelyek ortológjai humán vizsgálatokban diagnosztikai célokat kielégítve hasznosulhatnak.

9. SUMMARY

Genes involved in the development of the red deer stag's antlers and in the coupled transport of mineral substances are targeted to be identified. Mineralization of red deer's antlers within a short time results temporarily in physiological osteoporosis in the skeleton (sternum, ribs, vertebrae, pelvis) of the animal. Deer stag has the ability to replenish the missing minerals in the skeleton after antler mineralization is completed. Gene expression patterns are to be monitored in the sternum, ribs, vertebrae and pelvis during antler's calcification with the aim to find genes (using DNA chip technique) involved in osteoporosis and its reversal in red deer stag. Understanding the genetic background of the process could be beneficial in genetics based human therapeutics (diagnostics) and pharmaceutical developments.

Antlers of deer display the fastest and most robust bone development in the animal kingdom. Deposition of the minerals in the cartilage preceding ossification is a specific feature of the developing antler. We have cloned 28 genes which are upregulated in the cartilaginous section (called mineralized cartilage) of the developing ("velvet") antler of red deer stags, compared to their levels in the foetal cartilage. Fifteen of these genes were further characterized by their expression pattern along the tissue zones (i.e. antler mesenchyme, precartilage, cartilage, bone), and by in situ hybridization of the gene activities at the cellular level. Expression dynamics of genes *coll1A1*, *coll1A2*, *col3A1*, *ibsp*, *mgp*, *sparc*, *runx2*, and *osteocalcin* were monitored and compared in the ossified part of the velvet antler and in the skeleton (in ribs and vertebrae). Expression levels of these genes in the ossified part of the velvet antler exceeded the skeletal levels 10-30 fold or more. Gene expression and comparative sequence analyses of cDNAs and the cognate 5' *cis*-regulatory regions in deer, cattle and human suggested that the genes *runx2* and *osx* have a master regulatory role. GC-MS metabolite analyses of glucose, phosphate, ethanolamine-phosphate, and hydroxyproline utilizations confirmed the high activity of mineralization genes in governing the flow of the minerals from the skeleton to the antler bone. Gene expression patterns and quantitative metabolite data for the robust bone development in the antler are discussed in an integrated manner. A model is proposed for the epigenetic pathway for the ossification of the developing antler. We also discuss the potential implication of our findings on the deer genes in human osteoporosis research.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatomban olvasható eredmények jelentős hányada az MBK Alkalmazott Fejlődésbiológiai és Génszabályozási Csoportban 2003-2010 között készült.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Orosz László Tanár Úrnak a szakmai irányítását, elméleti és gyakorlati képzésemet, a munka anyagi hátterének biztosítását.

Köszönettel tartozom a kitűnő technikai asszisztenciáért Péliné Tóth Magdolnának, Törökné Sánta Csillának, valamint Gálné Szóráth Nellinek.

Köszönet illeti munkatársaimat Dr. Molnár Andreát, Dr. Gyurján Istvánt, Dr. Borsy Adrienn, Szabolcsi Zoltán doktoranduszt, Hegedűs Attilát, Berta Andrászt és Dr. Papp Pétert a felvetődött problémák megoldásában nyújtott segítségükért. Köszönettel tartozom Dr. Barta Endrének és Molnár Jánosnak a bioinformatikai elemzésekhez nyújtott professzionális segítségért.

Külön köszönöm Dr. Semsey Szabolcsnak az együtt gondolkodást és a publikáció elkészítésekor nyújtott segítségét, értékes és hasznos tanácsait.

Köszönettel tartozom Dr. Zomborszky Zoltánnak, Dr. Nagy Jánosnak, Dr. Sugár László professzornak a mintagyűjtésben nyújtott segítségükért, Dr. Horn Péter akadémikusnak a lehetőségért, hogy a Pannon Lovas Akadémia Szarvas Farmja által nyújtott lehetőségeket igénybe vehettük.

Dr. Puskás László segítségével készült egy az Agancs Chip, köszönet érte. A chip kísérletek értékelésében Dr. Zvara Ágnes a jól működő kooperációért tartozom hálával.

Köszönöm az SOTE II. Belgyógyászati Klinika dolgozó kollégák segítségét, elsősorban Dr. Lakatos Péter professzornak, Spisák Sándor doktorandusznak, Dr. Galamb Orsolyának, Dr. Balla Bernadettnek és Dr. Kósa Jánosnak.

Köszönöm Dr. Csányi Sándor Professzor Úrnak, tanáromnak, hogy egyetemi éveim alatt a vadbiológiát és vadgazdálkodást megszerztette velem és értékes tanácsaival segítette fejlődésem.

Köszönöm Családomnak és Barátaimnak, hogy ennyi éven keresztül támogattak és biztattak munkám folytatására, legfőbbképp Édesapámnak tartozom hálával, aki mindig mellettem állt.

11. IRODALOMJEGYZÉK

- Akiyama H, Chaboissier M, Martin J, et al. (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813–2828
- Allen S, Maden M, Price J (2002) A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers. *Devl Biol* 251:409–423
- Alvarez L, Oriola J, Jo J, Ferró T, Pons F, Peris P, Guañabens N, Durán M, Monegal A, Martínez de Osaba M.J, Rivera-Fillat F, Ballesta A (1999) Collagen type I alpha1 gene Sp1 polymorphism in premenopausal women with primary osteoporosis: improved detection of Sp1 binding site polymorphism in the collagen type I gene. *Clin Chem* 45:904-6
- Aubin J, Bonnelye E (2000) Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos In.* 11:905-913
- Balla B, Kósa J, Kiss J, Borsy A, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Speer G, Orosz L, Lakatos P (2007) Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic women. *Calcif Tissue Int* 82(1): 12-26
- Banks W, Epling J, Kainer R, Davis R (1968a) Antler growth and osteoporosis, I. Morphological and morphometric changes in the costal compacta during the antler growth cycle. *Anat Rec* 162:387-398
- Banks W, Epling J, Kainer R, Davis R (1968b) Antler growth and osteoporosis, II. Gravimetric and chemical changes in the antler growth cycle. *Anat Rec* 162:399-406
- Banks W, Newbray J (1981) Antler development as a unique modification of mammalian endochondral ossification. Fig. 6. Antler development of Cervidae (part II, Ed. Brown RD) Texas A I University Kingsville, Texas 78363: 285
- Banks W, Newbrey J (1983) Light microscopic studies of the ossification process in developing antlers. In: Brown RD (ed) Antler development in Cervidae. *Caesar Kleburg Wildlife Research Institute*, Kingsville: p. 231-260
- Barendse W, Armitage S, Kossareck L, Shalom A, Kirkpatrick B et al. (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genet* 6:227-235
- Barling P, Liu H, Match J (2004) Expression of PTHrP and the PTH/PTHrP receptor in growing red deer antler. *Cell Biol Int* 28: 661–673
- Baron R, Neff D, Courtoy P (1985) 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* 101(6): 2210-22

- Barrell G, Davies R, Bailey C (1999) Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in perichondrium of antlers in red deer (*Cervus elaphus*). *Reprod Fertil Dev* 11(3): 189-92
- Barta E, Sebestyén E, Pálffy TB, Tóth G, Ortutay CP, Patthy L (2005) DoOP: Databases of Orthologous Promoters, collections of clusters of orthologous upstream sequences from chordates and plants. *Nucleic Acids Res* 33(Database issue): 86-90
- Bartös L, Schams D, Kierdorf U, Fischer K, Bubenik GA, Siler J, Losos S, Tománek M, Lastovková J (2000) Cyproterone acetate reduced antler growth in surgically castrated fallow deer. *J Endocrinol* 164(1):87-95
- Beier F, Ali Z, Mok D, Taylor A, Leask T, Albanese C, Pestell R, LuValle P (2001) TGF β and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. *Molecular Biology of the Cell* 12:3852-3863
- Bell D, Leung K, Wheatley S, Ng L, Zhou S, Ling K, Sham M, Koopman P, Tam P, Cheah K (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16:174-178
- Bi W, Deng J, Zhang Z, Behringer R, de Crombrugge B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22: 85-89
- Blair H, Schlesinger P (1990) Purification of a stilbene sensitive chloride channel and reconstitution of chloride conductivity into phospholipid vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 171(3): 920-5
- Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidian J, Chapman VN, Moriwaki K (1984) Biochemical diversity and evolution in genus *Mus*. *Biochem Genet* 22:257-303
- Borsy A, Podani J, Stéger V, Balla B, Horváth A, Kósa J, Gyurján I, Molnár A, Szabolcsi Z, Szabó L, Jakó E, Zomborszky Z, Nagy J, Semsey S, Vellai T, Lakatos P, Orosz L (2009) Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Mol Genet Gen* 281:301-313
- Bridgewater L, Lefebvre V, de Crombrugge B (1998) Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem* 273: 14998-15006
- Brookes JP (1998) Regeneration and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1377:M1-11
- Bubenik A, Pavlansky R (1965) Trophic responses to trauma in growing antlers. *J Exp Zool* 159: 289-302
- Bubenik G (1983) The endocrine regulation of the antler cycle. in: Brown R.D.(szerk.) Antler Development in Cervidae. Kingsville: Caesar Kleburg Wildlife Research Institute
- Bubenik G, Bubenik A, Brown G, Trenkle A, Wilson I (1975) Growth hormone and cortisol levels in the annual cycle of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Can J Physiol Pharmacol* 53: 787-792

- Bubenik G, Bubenik A, Stevens E, Binnington A (1982) The effect of neurogenic stimulation on the development and growth of bony tissues. *J Exp Zool* 219: 205-216
- Bubenik G, Miller K, Lister A, Osborn D, Bartos L, van der Kraak G (2005) Testosterone and estradiol concentrations in serum, velvet skin, and growing antler bone of male white-tailed deer. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol* 303(3):186-92
- Bubenik G, (1990) The Role of the Nervous System in the Growth of Antlers. In: G Bubenik and AB Bubenik, Editors, Horns, pronghorns and antlers, Springer, Hamburg 339-358
- Bubenik, G (2006) Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle. *Vet Arhiv* 76, S275-S285
- Canalis E, Economides A, Gazzerro E (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine reviews* 24:218-235
- Cash D, Bock C, Schugart K, Linney E & Underhill T (1997) Retinoic acid receptor α function in vertebrate limb skeletogenesis: a modulator of chondrogenesis. *J Cell Biol* 136:445–457
- Chapman D, Larkmead, Mills B, Bury S (1975) Antler- bone of contention. *Mammal Review* 5:No. 4
- Chapman D, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik S, Gibson-Brown J, Cebra-Thomas J, Bollag R, Silver L, Papaioannou V (1996) Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn* 206: 379-390
- Christopher J, Sue-Hwa L (2005) Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nature Reviews Cancer* 5, 21-28
- Clark D, Haines SR, Lord E, Wang W, Suttie J (2004) Antler and angiogenesis. *In Antler Science and Product Technology* 2 Suttie J (ed)
- de Gortari MJ, et al. (1998) A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mamm Genome* 9:204-209
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) OSF2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:1-20
- Elliott J, Oldham J, Ambler G, et al. (1992) Presence of insulin-like growth factor-I receptors and absence of growth hormone receptors in the antler tip. *Endocrinology* 130: 2513–2520
- Faragó S, (2002) Vadászati állattan. – Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Faucheaux C, Nicholls B, Allen S, Danks J, Horton M, Price JS (2004) Recapitulation of the parathyroid hormone-related peptide-Indian hedgehog pathway in the regenerating deer antler. *Dev Dyn* 231: 88-97

- Faucheux C, Horton M, Price J (2002) Nuclear localization of type I parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptors in deer antler osteoclasts: evidence for parathyroid hormone-related protein and receptor activator of NF-kappaB-dependent effects on osteoclast formation in regenerating mammalian bone. *J Bone Miner Res* 17: 455–464
- Faucheux C, Price J (1999) Parathyroid hormone-related peptide may play a role in deer antler regeneration. In: Danks J, Dacke C, Flik G, Gay C (ed): Calcium Metabolism: Comparative Endocrinology BioScientifica Ltd, Bristol. 131–138
- Feng J, Chen D, Esparza J, Harris M, Mundy G, Harris S (1995) Deer antler tissue contains two types of bone morphogenetic protein 4 mRNA transcripts. *Biochim Biophys Acta* 1263: 163-168
- Feng J, Chen D, Ghosh-Choudhury N, Esparza J, Mundy G, Harris S (1997) Bone morphogenetic protein 2 transcripts in rapidly developing deer antler tissue contain an extended 5' non-coding region arising from a distal promoter. *Biochim Biophys Acta* 1350: 47-52
- Ferguson C, Tucker A, Sharpe P (2000) Temporospatial cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. *Development* 127: 403-412
- Francis S, Suttie J (1998) Detection of growth factors and proto-oncogene mRNA in the growing tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler using reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *J Exp Zool* 281: 36-42
- Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2010) Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br J Cancer* 102(4):765-73
- Garcia R, Sadighi M, Francis SM, Suttie JM, Fleming J (1997) Expression of neurotrophin-3 in the growing velvet antler of the red deer (*Cervus elaphus*). *J Mol Endocrinol* 19: 173–182
- Gazzerro E, Canalis E (2006) Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 7:51-65
- Goldring M, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33–44
- Gong Y. et al. (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513–523
- Goss R (1968) Inhibition of growth and shedding of antlers by sex hormones. *Nature* 220:83–85
- Goss R (editor) (1983) in: Deer antlers. Regeneration, Function and Evolution. *Academic Press*, New York

- Goss R, Powel R (1985) Induction of deer antlers by transplanted periosteum. I. Graft size and shape. *J Exp Zool* 235: 359-373
- Granjeiro J, Oliveira R, Bustos-Valenzuela J, Sogayar M, Taga R (2005) Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 38:1463-1473
- Gray C, Hukkanen M, Kontinen YT, Terenghi G, Arnett T, et al. (1992) Rapid neural growth: calcitonin gene-related peptide and substance P-containing nerves attain exceptional growth rates in regenerating deer antler. *Neuroscience* 50: 953–963
- Gu L, Mo E, Yang Z, Zhu X, Fang Z, Sun B, Wang C, Bao J, Sung C (2007) Expression and localization of insulin-like growth factor-I in four parts of the red deer antler. *Growth Factor* 25(4):264-279
- Gyurján István (2007) A mezenchimális sejt-differenciáció tanulmányozása gímszarvas (*Cervus elaphus*) agancsán. Doktori (PhD) értekezés, Gödöllő.
- Gyurján J-I, Molnár A, Borsy A, Stéger V, Hackler J-L, Zomborszky Z, Papp P, Duda E, Deák F, Lakatos P, Puskás LG, Orosz L (2007) Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Mol Genet Gen* 277:221–235
- Hartwig H (1967) Experimentelle untersuchungen zur entwicklungsphysiologie der stangenbildung beim reh (*Capreolus capreolus* L. 1758). *Roux Arch Entwicklunsmech* 158: 358–384
- Hock J, Centrella M, Canalis E, (1988) Insulin-Like Growth Factor I Has Independent Effects on Bone Matrix Formation and Cell Replication. *Endocrinology* 122: 254-260
- Ionescu A, Schwarz E, Vinson C, Puzas J, Rosier R, Reynolds P, O’Keefe R (2001) PTHrP Modulates Chondrocyte Differentiation through AP-1 and CREB Signaling. *J Biol Chem* 276:11639–11647
- Isaac A, Rodriguez-Esteban C, Ryan A, Altabel M, Tsukui T, Patel K, Tickle C, Izpisua-Belmonte JC (1998) Tbx genes and limb identity in chick embryo development. *Development* 125: 1867-1875
- Jin H, van't Hof R, Albagha O, Ralston S (2009) Promoter and intron 1 polymorphisms of COL1A1 interact to regulate transcription and susceptibility to osteoporosis. *Hum Mol Genet* 18(15):2729-38
- Johnson M, Kamel M (2007) The Wnt signaling pathway and bone metabolism. *Curr Opin Rheum* 19:376-382
- Karaplis A (2002) Embryonic Development of Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondrial Bone Formation in bk. Principles of Bone Biology, 177-17833-53, Edited by Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, Academic press
- Karsenty G (2001) Chondrogenesis just ain't what it used to be. *J Clin Invest* 107:405-407

- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:49-61
- Kierdorf U, Kierdorf H, Schultz M, Rolf HJ (2004) Histological structure of antlers in castrated male fallow deer (*Dama dama*). *Anat. Rec. A. Discov. Mol Cell Evol Biol* 281:1352–1362
- Kierdorf U, Stoffels E, Stoffels D, Kierdorf H, Szuwart T és Clemen G (2003) Histological studies of bone formation during pedicle restoration and early antler regeneration in roe deer and fallow deer. *Anat Rec* 273, 741-751
- Kim I, Otto F, Zabel B, Mundlos S (1999) Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa. *Mechanisms of Development* 80:159-170
- Kohen M (2009) Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet* 149A(12):2629-4266
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764
- Komori T, (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 9(1):189-195
- Korpos É, Molnár A, Papp P, Kiss I, Orosz L, Deák F (2005) Expression pattern of matrilins and other extracellular matrix proteins characterize distinct stages of cell differentiation during antler development. *Matrix Biol* 24:124–135
- Koyama E, Golden EB, Kirsch T, Adams SL, Chandraratna RAS, Michaille J, Pacifici M (1999) Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. *Devl Biol* 208:375-391
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA (2006) Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 116:1202-1209
- Kundu M, Javed A, Jeon JP, et al. (2002) Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nat Genet* 32: 639–644
- Lai AK, Hou WL, Verdon DJ, Nicholson LF, Barling PM (2007) The distribution of the growth factors FGF-2 and VEGF, and their receptors, in growing red deer antler. *Tissue Cell* (1):35-46
- Lakatos P (1999) A kalciumháztartás és a csontszövet anyagcsere-betegségei. Medicina, Budapest.
- Lakatos P, Takács I (2006) Metabolikus csontbetegségek. Medintel, Budapest.
- Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize L, Ho C, Mulligan R, Abou-Samra A, Juppner H, Segre Gv, Kronenberg H (1996)

- PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273: 663–666
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn J, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee M, Jung D, Zhang Z, Kim J, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130(3):456-69
- Lewis L, Barrell G (1994) Regional distribution of estradiol receptors in growing antlers. *Steroids* 59(8):490-2
- Li C, Clark D, Lord E, Stanton J, Suttie J (2002) Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery. *Anat Rec* 268:125–130
- Li C, Stanton J, Robertson T, Suttie J, Sheard P, John Harris A, Clark D (2006) Nerve Growth Factor mRNA Expression in the Regenerating Antler Tip of Red Deer (*Cervus elaphus*). *PLoS ONE* 10: 2:e148
- Lickert H, Cox B, Wehrle C, Taketo M, Kemler Li C, Suttie J (2001) Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? *Anat Embryol* 204:375-388
- Li C, Suttie J (1994) Light microscopic studies of pedicle and early first antler development in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat Rec* 239(2):198-215
- Lincoln G (1973) Appearance of antler pedicles in early foetal life in red deer. *J Embryol Exp Morphol* 29, 431–437
- Little R. et al. (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 70:11-19
- Littlewood-Evans A, Bilbe G, Bowler W, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, Inaoka T, Sloane J, Evans D, Gallagher J (1997) Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone*, 20(2): 81-6
- Logan M, Tabin C (1999) Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* 283: 1736-1739
- Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon A (2004) *Development* 131 (2004) 1309–1318
- Lord E, Stanton J, Martin S, Li C, Clark D & Suttie J (2001) Characterisation of genes expressed in the growing velvet antler tip of red deer (*Cervus elaphus*). In *Antler science and product technology* (ed. J. S. Sim, H. H. Sunwoo, R. J. Hudson & B. T. Jeon) 189–199
- Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y (2008) Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocrine reviews* 29:403-440
- McGinnis W, és Krumlauf R (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302

- Meadows S, Hakonson T (1982) Contribution of tissues to body mass in Elk. *J Wildlife Man* 46(3): 838-841
- Milat F, Ng K (2009) Is Wnt signalling the final common pathway leading to bone formation? *Mol Cell Endocrinol* 310:52-62
- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz D, Vortkamp I A (2002) Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Developmental Cell* 3:439-449
- Minina E, Wenzel H, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahan A, Vortkamp, A (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128: 4523-4534
- Moen R, Pastor J (1996) Simulating antler growth and energy, nitrogen, calcium and phosphorus metabolism in caribou. *Rangifer, Special Issue* 10: 85-98
- Moen R, Pastor J, Cohen Y (1999) Antler growth and extinction of Irish elk. *Evolutionary Ecology Research* 1: 235-249
- Molnar A, Gyurjan I, Korpos E, Borsy A, Steger V, Buzas Z, Kiss I, Zomborszky Z, Papp P, Deak F, Orosz L (2007) Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Mol Genet Gen* 277:237-248
- Morris J, Bubenik G (1982) The effect of androgens on the development of antler bone. In: Antler development in Cervidae. (Brown, R. D, szerk.). Caesar Kleberg Wildl. Res. Inst, Kingsville, TX, USA, 123-141
- Mundlos S (1994) Expression patterns of matrix genes during human skeletal development. *Prog Histochem Cytochem* 28(3):1-47
- Mundy G, Gutierrez G, Gallwitz W, et al. (2001) Antler-derived bone growth factors and their potential for use in osteoporosis. In: Sim JS, Sunwoo HH, Hudson RJ, Jeon BT (Szerk.): Antler Science and Product Technology. Canada: Antler Science and Production Technology Research Centre 171-187
- Nakashima K, de Crombrugge (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet* 19: 458-466
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Min D, Behringer R, Crombrugge B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29
- Nikiforova V, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford M, Hesse H, Hoefgen R (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 138(1):304-18
- Noden DM (1991) Cell movements and control of patterned tissue assembly during craniofacial development. *J Craniofac Genet Dev Biol* 11: 192-213

- O'Brien SJ, Womack JE, Lyons LA, Moore KJ, Jenkins NA (1993) Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nat Genet* 3: 103-112
- Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y (1993) PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the drosophila runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci* 90:6859-6863
- Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M (1995) Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest* 72(3): 311-22
- Orosz L (2001) Géntérképektől génekig, génektől genetikai útvonalakhoz és iskolákhoz. *Székhogyalók a Magyar Tudományos Akadémián.* 407-437
- Somogyi P, Kricsfalussy M, Schreithofer L, Rápolthy I, Udvardy Cs, Horváth Cs (2000) Az osteoporosis eredetű csonttörések számának becslése Magyarországon. *Ca és Csont* 3(3): 111-117
- Podani J (2001) SYN-TAX 2000. User's Manual. *Scientia Publishing*, Budapest
- Poór G, (1997) A csigolyadeformitás prevalenciája hazánkban: Az Európai Vertebrális Osteoporosis Study. *Orvosi Hetilap* 42: 2647-2652
- Price J, Allen S (2004) Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philos Trans R Soc Lond* 359:809-822
- Price J, Allen S, Fauchaux C, Althanaian T, Mount J (2005) Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *J Anat.* 207: 603- 618
- Price J, Oyajobi O, Nalin M, Frazer A, Russell G, Sandell J (1996) Chondrogenesis in the regenerating antler tip in red deer: expression of collagen types I, IIA, IIB, and X demonstrated by in situ nucleic acid hybridization and immunocytochemistry. *Dev Dyn* 205, 332 – 347
- Price J, Nicholls B, Lanyon L, Allen S (2002) Estrogen rapidly induces bone formation in regenerating deer antler. *Bone* 30, 10S
- Price J, Oyajobi O, Oreffo R, Russell R (1994) Cells cultured from the growing tip of red deer antler express alkaline phosphatase and proliferate in response to insulin-like growth factor-1. *J Endocrinol* 143: R9-R16
- Provot S, Schipani E (2005) Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328:658-665
- Puskás L, Hackler L Jr, Kovács G, Kupihár Z, Zvara A, Micsik T, van Hummelen P (2002) Recovery of cyanine-dye nucleotide triphosphates. *Anal Biochem* 305(2):279-81

- Putman R (1989) The Natural History of Deer. In: The Natural History of Mammals (Helm C. szerk.) London, Cornell University Press.
- Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses J, Christensen L, Sharpe P, Presley R, Pedersen R, Rubenstein J (1997) Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx1, Dlx2 and Dlx1 and Dlx2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 185: 165-184
- Rentsendorj O, Nagy A, Sinko I, Daraba A, Barta E, Kiss I (2005) Highly conserved proximal promoter element harboring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *Biochem J* 389: 705-716
- Riggs B, Khosla S, Melton LJ (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23: 279-302
- Rivera-Perez J, Wakamiya M, Behringer R (1999) Goosecoid acts cell autonomously in mesenchyme-derived tissue during craniofacial development. *Development* 126: 3811-3821
- Rossel M, Capecchi M (1999) Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodelling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 126: 5027-5040
- Rucklidge G, Milne G, Bos KJ, Farquharson C, Robins S (1997) Deer antler does not represent a typical endochondral growth system: immunoidentification of collagen type X but little collagen type II in growing antler tissue. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118:303-308
- Ruvinsky I, Gibbson-Brown JJ (2000) Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution. *Development* 127: 5233-5244
- Sadighi M, Haines S, Skottner A, Harris A, Suttie J (1994) Effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II on the growth of antler cells in vitro. *J Endocrinol* 143: 461-469
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Methods of screening. In: Nolan C (ed) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Satokata I, Maas R (1994) Msx-1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6: 348-356
- Schoppet M, Preissner K, Hofbauer L (2002) RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:549-553
- Seabury C, Bhattarai E, Taylor J, Viswanathan G, Cooper S, et al. (2011) Genome-Wide Polymorphism and Comparative Analyses in the White-Tailed Deer

- (*Odocoileus virginianus*): A Model for Conservation Genomics. *PLoS ONE* 6(1): e15811. doi:10.1371/journal.pone.0015811
- Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Sekiya I, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2000) Sox9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is upregulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line TC6. *J Biol Chem* 275: 10738-10744
- Sempere A, Boissin J, Dutourne B, Lacroix A, Blanc M, Ravault J (1983) Variations in the plasma concentration of prolactin, LH and FSH and in testicular activity during the first year of life in the roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *Gen Comp Endocrinol* 52: 247-254
- Shi Z, Barrell G (1994) Thyroid hormones required for the expression of seasonal changes in red deer (*Cervus elaphus*) stags. *Proc Natl Acad Sci* 97: 7829-7834
- Siebel M, Eastell R, Gundberg C, Hannon R, Pols H (2002) Biochemical Markers of Bone Metabolism in bk. *Principles of Bone Biology, 1543-1549*, Edited by Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, Academic press
- Simonet W, Lacey D, Dunstan C, Kelley M, Chang M, Luthy R, Nguyen H, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes T, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309- 319
- Slate J, Van Stijn T, Anderson R, McEwan KM, Maqbool NJ, Mathias H, Bixley M, Stevens D, Molenaar A, Beever J, Galloway S, Tate M (2002) A deer (subfamily Cervinae) genetic linkage map and the evolution of ruminant genomes. *Genetics* 160: 1587-1597
- St. Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon A (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13, 2072- 2086
- Stéger V, Molnár A, Borsy A, Gyurján I, Szabolcsi Z, Dancs G, Molnár J, Papp P, Nagy J, Puskás L, Barta E, Zomborszky Z, Horn P, Podani J, Semsey S, Lakatos P, Orosz L (2010) Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: expression dynamics for regulatory and effector genes. *Molecular Genetics and Genomics* 284, 237-287
- Stein G, Lian J, Montecino M, Wijnen A, Stein J, Javed A, Zaidi K, (2002) Involvement of Nuclear Architecture in Regulating Gene Expression in Bone Cells in bk. *Principles of Bone Biology, 177-178*, Edited by Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, Academic press
- Suttie J, Gluckman P, Butler J, Fennessy P, Corson I, Laas F (1985) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antlerstimulating hormone? *Endocrinology* 116: 846-848

- Széchenyi Z, Szarvasok nyomában. (1979) Gondolat Kiadó, Budapest.
- Szederjei Á, (1960) Szarvas. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- Szentágothai J, Réthelyi M (1985) Funkcionális anatómia. Medicina Könyvkiadó, Budapest.
- Takeda S, Bonnamy J, Owen M, Ducey P, Karsenty G (2001) Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 15:467–481
- Tate M, Mathias H, Fennessy P, Dodds K, Penty J, Hill D (1995) A new gene mapping resource: interspecies hybrid between Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*). *Genetics* 139: 1383-1391
- Teitelbaum S, Ross F (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4:638-649
- Vacek Z (1955) Innervace lyci rostoucia parohu u cervidu. *Csika Morf* 3: 249-264
- Van der Eems K, Brown R, Gundberg C (1988) Circulating levels of 1,25 dihydroxyvitamin D, alkaline phosphatase, hydroxyproline, and osteocalcin associated with antler growth in white-tailed deer. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 118: 407–414
- Vignery és MCarthy (1996) The Neuropeptide Calcitonin Gene-Related Peptide Stimulates Insulin-like Growth Factor I Production by Primary Fetal Rat Osteoblasts. *Bone* 18, 331
- Villányi Z, Gyurján I, Stéger V, Orosz L (2008) Plaque Based competitive Hybridization. *Journal of Biomolecular Screening* 13, 80-84
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg H, Tabin C (1996): Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273:613-622
- Vu T, Shipley J, Bergers G, Berger J, Helms J, Hanahan D, Shapiro S, Senior R, Werb Z (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93(3):411-22
- Wang Z (1988) Karyotypes of deer. *New scientific*, Peking, Kína
- Whyte M (2002) Hypophosphatasia in bk. Principles of Bone Biology, 1235-1236, Edited by Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, Academic press
- Wislocki G (1943) Studies on growth of deer antlers. *In Essays in Biology*, p. 631–653. Berkeley, CA: University of California Press
- Wislocki G, Singer M (1946) The occurrence and function of nerves in the growing antlers of deer. *J Comp Neurology* 85: 1-19

- Xiao Y, Xiang L, Shao J (2007) Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362:550-553
- Yang C, Wang Z, Zhao H, Yao Y, Chen P (2009) The regulatory effect of calcitonin gene-related peptide on bone metabolism of osteoblast cells co-cultured with breast cancer cells. *Tumor* 29(9):833-837
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* 95:3597-3602
- Yoshida C, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T (2002) Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* 32: 633-638
- Yoshida C, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18: 952-963
- Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR (2001) Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 106:97-106
- Zhao Q, Behringer R, de Crombrughe B (1996) Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nat Genet* 13:275-283

12. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Agancs csont vs. csigolya expresszió változásai. Bovine Affymetrix microarray eredményei (* a 131top SAM alapján).

Gén szimbólum	Gén neve	Hányszoros változás VB/AB	Affymetrix azonosító
DLX5	distal-less homeobox 5	4,20	Bt.16059.1.S1_at
DLX5	distal-less homeobox 5	5,82*	Bt.8476.1.A1_at
RUNX2	runt-related transcription factor 2	3,49*	Bt.19978.1.A1_at
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	4,79*	Bt.6983.1.S1_at
BMP2	bone morphogenetic protein 2	4,28*	Bt.29956.1.A1_at
MSX1	msh homeobox 1	2,79	Bt.15556.1.A1_s_at
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	3,16	Bt.8549.1.S1_at
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	3,29	Bt.8124.1.S1_at
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	7,99*	Bt.23318.1.S1_at
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	7,46*	Bt.23318.1.S2_at
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	4,41	Bt.12912.1.S2_at
COL5A2	collagen, type V, alpha 2	5,69*	Bt.9966.1.S1_at
COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	4,29*	Bt.23508.1.A1_at
COL11A2	collagen, type XI, alpha 2	3,53	Bt.2303.1.S1_at
COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	2,73	Bt.11324.1.A1_s_at
COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1	3,25	Bt.23555.1.S1_at
COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1	5,38*	Bt.19502.1.A1_at
COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	5,39	Bt.20512.1.S1_at
COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	2,60	Bt.20512.2.S1_at
COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1	5,26	Bt.12697.1.S1_a_at
COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1	3,80	Bt.12697.1.S1_at
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	5,85	Bt.11942.1.S1_at
COL27A1	collagen, type XXVII, alpha 1	2,75	Bt.26635.1.S1_at
IBSP	integrin-binding sialoprotein	6,19	Bt.568.1.S1_at
BGLAP	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein	3,37	Bt.4055.1.S1_at
MGP	matrix Gla protein	5,05	Bt.3598.1.S1_at
SPARCL1	SPARC-like 1 (hevin)	4,71	Bt.5153.1.S1_at
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	5,75*	Bt.6768.1.S1_at
SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	4,96	Bt.8491.1.S1_at
SDC2	syndecan 2	6,27*	Bt.8260.1.A1_at
SDC2	syndecan 2	6,86*	Bt.11462.1.S1_at
SDC2	Syndecan 2	5,88	Bt.2494.2.S1_a_at
DCN	decorin	5,71*	Bt.23178.1.S1_at
DCN	decorin	4,56	Bt.23178.1.S2_at
BGN	biglycan	3,78	Bt.5351.1.S1_a_at
BGN	biglycan	4,25	Bt.5351.2.A1_x_at
LUM	lumican	3,68	Bt.2452.1.S1_at
OMD	osteonmodulin	3,99	Bt.114.1.S1_at
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	4,27	Bt.13028.1.S1_at
DSPP	dentin sialophosphoprotein	2,35	Bt.554.1.S1_at
NEO1	neogenin 1	4,33*	Bt.4726.1.S1_at
FBLN1	fibulin 1	6,29*	Bt.22545.1.S1_a_at
LAMB1	laminin, beta 1 (korpos)	2,99	Bt.1742.1.S1_at
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	4,09	Bt.23129.3.S1_a_at

Gén szimbólum	Gén neve	Hányszoros változás VB/AB	Affymetix azonosító
TGFβ2	transforming growth factor, beta 2	2,74	Bt.6438.1.A1_at
TGFβ3	transforming growth factor, beta 3	2,80	Bt.12650.1.S1_at
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor	6,12	Bt.5177.1.S1_at
INSIG2	insulin induced gene 2	2,96	Bt.20716.1.S1_at
INSIG2	insulin induced gene 2	2,52	Bt.20716.2.A1_at
IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	4,10	Bt.2214.1.S1_at
IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	4,77	Bt.23176.2.S1_a_at
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	3,10	Bt.422.1.S1_at
IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	2,92	Bt.7676.3.S1_at
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	2,51	Bt.9958.1.S1_at
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	6,11*	Bt.12440.1.A1_at
ESR1	estrogen receptor 1	5,78*	Bt.24926.1.S1_at
PTHLH	parathyroid hormone-like hormone	2,34	Bt.12848.1.S1_at
C1QTNF1	C1q and tumor necrosis factor related protein 1	2,77	Bt.4105.1.S1_at
EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	5,61	Bt.7572.1.S1_at
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	4,91	Bt.13670.1.S1_at
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	4,36	Bt.13670.1.S2_at
MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	2,42	Bt.13703.1.S1_at
MMP2	matrix metalloproteinase 2	4,96	Bt.5313.1.S1_at
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	2,59	Bt.13124.1.S1_at
CLDN11	claudin 11	5,53*	Bt.4817.1.A1_at
ANXA2	annexin A2	2,67	Bt.4314.1.S1_at
ANXA5	annexin A5	2,04	Bt.247.1.S2_at
FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	4,02*	Bt.2359.1.A1_at
MAGED1	melanoma antigen family D, 1	4,29	Bt.5519.2.S1_at
MAGEF1	melanoma antigen family F, 1	2,06	Bt.6114.1.S1_at
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	3,25	Bt.6527.1.S1_at
CDH2	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	5,73	Bt.4417.1.S1_at
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	4,04	Bt.21528.1.A1_at
APOA1	apolipoprotein A-I	6,82*	Bt.1229.1.S1_at
BTBD3	BTB (POZ) domain containing 3	4,26*	Bt.12872.1.S1_at
SCD5	stearoyl-CoA desaturase 5	6,02*	Bt.13249.1.A1_at
PEBP4	phosphatidylethanolamine-binding protein 4	6,98*	Bt.14398.1.S1_at
DSTN	destrin (actin depolymerizing factor)	5,01*	Bt.15705.1.S1_at
SNX7	sorting nexin 7	5,73*	Bt.15717.1.A1_at
PLS3	plastin 3 (T isoform)	6,04*	Bt.15906.1.S1_at
SMS2	Sphingomyelin synthase 2	5,48*	Bt.16176.1.A1_at
COP22	coatamer protein complex, subunit zeta 2	6,20*	Bt.1701.2.A1_a_at
PTPRD	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	5,63*	Bt.18753.1.A1_at
EST	EST	5,66*	Bt.18780.2.A1_at
ZNF704	Zinc finger protein 704	4,13*	Bt.19936.1.A1_at
TMEM119	transmembrane protein 119	7,22*	Bt.20234.1.S1_at
SRPX	sushi-repeat-containing protein, X-linked	3,77*	Bt.2046.1.S1_at
TMEM45A	transmembrane protein 45A	4,27*	Bt.2159.1.S1_at

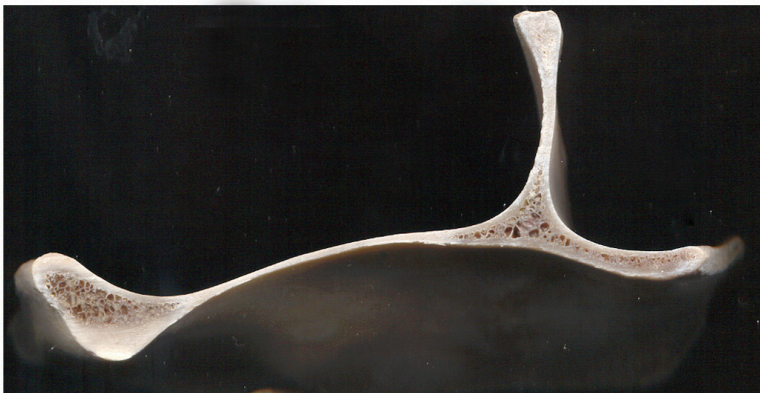
Gén szimbólum	Gén neve	Hányszoros változás VB/AB	Affymetix azonosító
PDE7B	phosphodiesterase	4,77*	Bt.21938.1.S1_at
ABLIM1	actin binding LIM protein 1	4,13*	Bt.22122.2.A1_at
CGREF1	cell growth regulator with EF-hand domain 1	7,02*	Bt.22210.1.S1_at
LOC781282	similar to polydom	4,35*	Bt.22768.1.A1_at
ASPN	asporin	5,54*	Bt.24211.1.A1_at
LOC537248	similar to ACPL2 protein	5,21*	Bt.24421.1.A1_at
CCSP1	Colon cancer secreted protein 1	6,97*	Bt.24587.1.A1_at
FILIP1L	Filamin A interacting protein 1-like	5,13*	Bt.24928.1.S1_at
LOC505941	similar to KIAA1398 protein	3,77*	Bt.24973.1.A1_at
SERF1A	small EDRK-rich factor 1A (telomeric)	4,42*	Bt.26048.1.A1_at
SERPINF1	serpin peptidase inhibitor	5,90*	Bt.2638.1.S1_at
LPHN2	latrophilin 2	3,86*	Bt.26764.1.A1_at
PRX1	Paired related homeobox 1	6,16*	Bt.27101.1.S1_at
SORBS2	Sorbin and SH3 domain containing 2	6,03*	Bt.27127.1.A1_at
mir199*	Pri-hsa-miR-199a2/214	5,81*	Bt.27856.1.S1_at
CNKSR3	CNKSR family member 3	4,42*	Bt.27901.1.S1_at
OLFML3	olfactomedin-like 3	4,10*	Bt.28472.1.S1_at
SCHIP1	schwannomin interacting protein 1	7,27*	Bt.2867.1.S1_at
TCEA3	transcription elongation factor A (SII), 3 chromosome 10 open reading frame 35	4,79*	Bt.3026.1.A1_at
C28H10ORF35	ortholog	2,86*	Bt.3689.1.A1_at
SMPD3	sphingomyelin phosphodiesterase 3	4,14*	Bt.3716.1.A1_at
LOC100125763	neuronal protein 3.1	4,65*	Bt.3780.1.S1_at
TSPAN6	tetraspanin 6	4,05*	Bt.3821.1.A1_at
CRABP1	cellular retinoic acid binding protein 1	7,84*	Bt.396.2.S1_a_at
P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II	5,22*	Bt.4381.1.A1_at
MYO10	myosin X	5,03*	Bt.4506.1.S1_at
SNAI2	snail homolog 2 (Drosophila)	5,39*	Bt.4565.1.S1_at
SFRP2	secreted frizzled-related protein 2	5,67*	Bt.4939.1.S1_at
PTPN13	protein tyrosine phosphatase	5,07*	Bt.5098.1.S1_at
DPYSL3	Dihydropyrimidinase-like 3	4,17*	Bt.5439.1.S1_at
RABAC1	Rab acceptor 1 (prenylated)	4,77*	Bt.5491.1.S1_at
GNAI1	guanine nucleotide binding protein (G protein)	5,92*	Bt.5546.1.S1_at
PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	6,01*	Bt.725.1.S1_at
ZFHX4	Zinc finger homeobox 4	5,41*	Bt.8437.1.A1_at
NPR3	C	4,31*	Bt.8909.1.S1_at
FKBP9L	FK506 binding protein 9-like	5,05*	Bt.9674.1.S1_at

Gén szimbólum	Gén neve	Hányszoros változás VB/AB	Affymetrix azonosító
MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	-6,42	Bt.2725.1.S1_at
ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	-7,13*	Bt.7066.1.S1_at
Proteinase 3	Proteinase 3	-9,60*	Bt.26564.1.S1_at
ELANE	elastase, neutrophil expressed	-7,92*	Bt.24739.1.S1_at
AZU1	Azurocidin 1	-10,39*	Bt.24637.1.S1_at
SOX6	SRY (sex determining region Y)-box 6	-4,04	Bt.24317.1.A1_at
GPI	glucose phosphate isomerase	-2,20	Bt.13505.1.S1_at
S100A8	S100 calcium binding protein A8	-7,19*	Bt.9360.1.S1_at
S100A9	S100 calcium binding protein A9	-7,36*	Bt.16201.2.A1_at
S100A12	S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)	-5,42*	Bt.357.1.S1_at
EPB49	erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin)	-7,80*	Bt.11032.1.S1_at
SPAG5	sperm associated antigen 5	-5,47*	Bt.11587.3.A1_a_at
DUT	deoxyuridine triphosphatase	-3,54*	Bt.11936.1.S1_a_at
HP	haptoglobin	-10,24*	Bt.12553.1.S1_at
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog	-6,91*	Bt.12781.1.S1_at
PLBD1	phospholipase B domain containing 1	-5,25*	Bt.12805.1.S1_at
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	-5,37*	Bt.13573.1.A1_at
TFRC	Transferrin receptor protein 1	-4,09*	Bt.13834.1.S1_at
TESK2	testis-specific kinase 2	-3,55*	Bt.13930.2.S1_at
OLFM4	olfactomedin 4	-8,25*	Bt.14100.1.S1_at
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	-5,02*	Bt.143.1.S1_at
KIFC1	kinesin family member C1	-4,51*	Bt.1440.1.S1_at
ARG1	arginase, liver	-7,89*	Bt.14681.1.A1_at
RAB3IP	RAB3A interacting protein (rabin3)	-4,47*	Bt.14853.1.A1_at
HMMR	Hyaluronan-mediated motility receptor	-2,58*	Bt.1518.1.S1_at
CCNB1	cyclin B1	-5,33*	Bt.15980.1.A1_at
C7	complement component 7	-3,58*	Bt.18557.1.S1_at
CTSG	cathepsin G	-8,61*	Bt.20057.1.S1_at
PSMF1	Proteasome inhibitor subunit 1	-3,27*	Bt.20110.1.S1_at
ORC1L	origin recognition complex	-5,45*	Bt.21111.1.S1_a_at
HMBS	hydroxymethylbilane synthase	-5,33*	Bt.21218.1.A1_at
CENP-A	CENP-A protein	-4,35*	Bt.21523.1.S1_at
PLAC8	placenta-specific 8	-6,84*	Bt.21883.1.S1_at
IGHE	immunoglobulin heavy constant epsilon	-3,75*	Bt.21996.1.S1_at
CA2	carbonic anhydrase II	-5,01*	Bt.22854.1.S1_at
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	-5,31*	Bt.23669.1.A1_at
HBA	Hemoglobin alpha 1	-8,13*	Bt.23728.1.A1_at
GATA1	GATA binding protein 1	-7,10*	Bt.24556.1.S1_at
EST	EST	-7,03*	Bt.24925.1.A1_at

Gén szimbólum	Gén neve	Hányszoros változás VB/AB	Affymetix azonosító
MGC127538	hypothetical protein MGC127538	-6,23*	Bt.2577.1.S1_at
RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family	-3,24*	Bt.2641.1.S1_at
UROD	uroporphyrinogen decarboxylase	-4,77*	Bt.26622.1.S1_a_at
RASGRP2	RAS guanyl releasing protein 2	-4,07*	Bt.26792.1.S1_at
PLXNC1	Plexin C1	-2,92*	Bt.26968.1.S1_at
CDCA8	cell division cycle associated 8	-5,75*	Bt.27319.1.A1_at
LOC514552	similar to cationic amino acid transporter 5	-4,79*	Bt.27532.1.S1_at
SLAIN1	SLAIN motif family, member 1	-5,00*	Bt.27859.1.S1_at
LOC404103	spleen trypsin inhibitor	-8,72*	Bt.28518.1.S1_s_at
TPX2	TPX2, microtubule-associated	-5,80*	Bt.28741.1.A1_at
UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	-3,29*	Bt.2915.1.S1_at
CATHL1	cathelicidin 1	-9,62*	Bt.310.1.S1_at
ALAS2	aminolevulinat, delta-, synthase 2	-10,69*	Bt.3230.1.A1_at
BLVRB	biliverdin reductase B	-6,26*	Bt.4093.1.S1_at
CATHL2	cathelicidin 2	-9,12*	Bt.4259.1.S1_at
LTF	lactotransferrin	-10,41*	Bt.4802.1.S1_at
TUBA4A	tubulin, alpha 4a	-5,37*	Bt.5183.1.S1_at
XPO7	Exportin 7	-4,68*	Bt.5460.1.A1_at
ERAF	erythroid associated factor	-7,65*	Bt.5772.1.S1_at
HBM	hemoglobin, mu	-10,88*	Bt.5773.1.S1_a_at
FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase 1	-4,69*	Bt.7033.2.S1_a_at
HBB	hemoglobin, beta	-8,73*	Bt.7056.1.S1_at
FHDC1	FH2 domain containig 1	-4,40*	Bt.7578.1.S1_at
SPC24	SPC24, NDC80 kinetochore complex component	-5,35*	Bt.9517.1.S1_a_at
TK1	thymidine kinase 1, soluble	-5,76*	Bt.964.1.S1_at

2. melléklet: A lapockacsontok metszetképei a három vizsgált mintavételi időpontban.

(iii) nyugalmi időszak



(ii) csontvisszapótlás



(i) osteoporózis



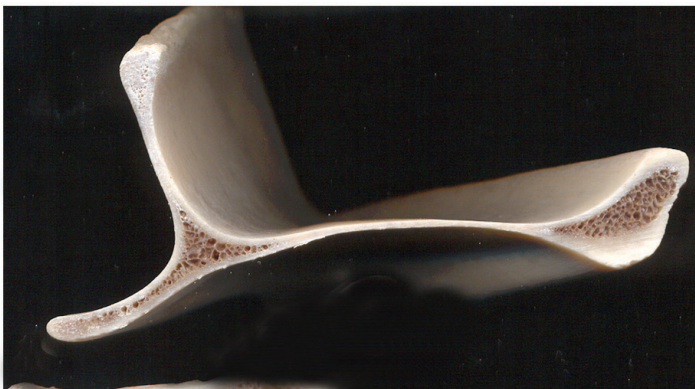
(i) oszteoporózis



(ii) csontvisszapótlás



(iii) nyugalmi időszak



(i) oszteoporózis



(ii) csontvisszapótlás



(iii) nyugalmi időszak

