



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A GÍMSZARVAS AGANCSFEJLŐDÉSÉBEN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK
EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

MOLNÁR ANDREA

**Gödöllő
2008.**

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztési Doktori Iskola

tudományága: állattenyésztés

vezetője: Dr. Mézes Miklós
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Takarmányozási Tanszék

témavezető: Dr. Orosz László
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
ELTE Természettudományi Kar
Genetikai Tanszék

.....
Dr. Mézes Miklós
iskolavezető

.....
Dr. Orosz László
témavezető

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEI

A csontfejlődés és a végtag-regeneráció molekuláris mechanizmusának megismerése alapvető probléma a fejlődésbiológiában. A gímszarvas évenként lehullatott és újranovesztett agancsa egyedülálló és látványos példája egy szerv teljes regenerálásának az emlősök körében. A gímszarvas bikája mintegy 100-120 nap alatt rakja fel az akár 14-17 kg-os hatalmas trófeáját. Ez napi 1-2 cm-es növekedést jelent ágvégeként, amihez hihetetlen gyors szövetgyarapodás és sejt-differenciáció szükséges. Ez az erőteljes növekedés a csúcsi részben elhelyezkedő embrionális jellegű mezenchimasejtek intenzív sejtosztódására vezethető vissza. Bár ezen őssejt jellegű mezenchimasejtek fejlődési potenciájáról még kevés ismeretünk van, az elmondható, hogy multipotens sejtek, amelyekből porc- és csontszövet mellett vérerek is fejlődnek, valamint idegek is regenerálódnak. Ezért az agancsfejlődés jobb megismerése nemcsak a porc- és csontfejlődés jobb megértésében, hanem a vaszkularizáció és az ideg regeneráció folyamatának feltárásában is előbbre visz. Emellett sok új információval szolgálhat a differenciáció és a regeneráció mechanizmusairól, amelyek korunk egyik legnagyobb orvos-biológiai kihívása.

A gímszarvas agancsfejlődése nagyon hasonló a testi csontok, elsősorban a csöves csontok, kialakulásához, 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. Az agancs nem közvetlenül a koponya csontjából alakul ki, hanem a homlokcsont állandó képződményéből, a rózsatóból, amely a pubertás korban a tesztoszteron hatására indul fejlődésnek – ezáltal egyetlen példája egy szerv késleltetett fejlődésének. Mind a rózsató, mind a belőle évenként regenerálódó agancs a homlokcsont csonthártyájának ún. agancsképző csonthártya (AP= antlerogenic periosteum) régiójára vezethető vissza. Agancs- és rózsatóképző tulajdonságát transzplatációs kísérletekkel bizonyították: az AP sejtek átültetése agancsfejlődést indukált. Miután a rózsató eléri fajspecifikus hosszát (ez a gímszarvas esetében 5-6 cm), az első agancs növekedése spontán megindul a rózsató distális részéből. Az agancs növekedése a csúcstól indul. Ebben a régióban több szövettípus van jelen, amelyek alapvetően két nagy csoportot alkotnak: a belső csontos-porcós állományt és a külső bőrt, a barkát. A barkát alkotó epidermisz/dermisz könnyen leválasztható az alatta elhelyezkedő csúcsi mezenchimáról, amelyre apró, nagy sűrűségben elhelyezkedő sejtek jellemzőek. Ebből a mezenchimális rétegből indul ki az endochondrális csontosodáshoz hasonló differenciálódási folyamat. Ennek eredményeként előbb a porcképzősejtek (chondroblastok), majd a porcsejtek (chondrociták) jelennek meg, kialakítva az ún. átmeneti zónát, illetve az agancs porcszövetét. Az agancsporcban a vérerek nagyok, a perivaszkuláris tér kiterjedt, szemben a test többi részén található porccal (beleértve az endochondrális csontosodásnál formálódót is), amelyek normális esetben nem tartalmaznak vérereket. Másik jelentős különbség, hogy az agancsporc mineralizálódása.

Az embrionális vázfejlődés és az alacsonyabbrendű gerincesek regenerációs képességének vizsgálataiból egyre világosabbá válik, hogy ezek a folyamatok meglehetősen konzerválódtak az evolúció során, ezért feltételezhető, hogy az ismétlődő agancsciklusok során is hasonló folyamatok játszódnak le. A vizsgálatok kiindulási pontjai ezért legtöbbször a csontfejlődésben szerepet játszó faktorok. Emellett az agancsfejlődés az egyik legerőteljesebb szövetgyarapodás, amelyet az élővilágban ismerünk, még a malignus tumorok növekedését is túlszárnyalja. Ugyanakkor az oszteoszarkómát idéző, ún. parókás-tumoros agancsból sem tapasztaltak áttéteket, ami az intenzív növekedés hatékony ellenőrzöttségére és szabályozottságára utal. Ezt támasztja alá az évenként újrafejlődő agancs formájának, ágrendszerének nagyfokú állandósága is. Az agancsfejlődés mögött megbújó molekuláris biológiai folyamatok megismerése közelebb vihet a csontfejlődés, különböző csontbetegségek (pl.: oszteoporózis, osteogenesis imperfecta) megértéséhez. A robosztus növekedés szabályozásának ismerete felhasználható a tumor és a szervregeneráció kutatásában.

Munkánk során a fejlődő agancs különböző szöveteinek és a magzati növekedési porclemez génextpressziós mintázatát hasonlítottuk össze, célul tűzve ki:

- (i) a mezenchima→porc differenciációs útvonal génextpressziós változásainak megfigyelését,
- (ii) olyan gének azonosítását, amelyek szerepet játszhatnak a mezenchimasejtek intenzív osztódásának szabályozásában, illetve a porc-differenciáció folyamatában,
- (iii) az agancsfejlődést a magzati növekedési porclemezzel összevetve olyan gének felismerését, amelyek a robosztus fejlődésért felelősek.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Gímszarvas agancs és magzati minták

A munkánkhoz szükséges mintákat a Pannon Lovasakadémia bőszenfai szarvasfarmja biztosította. A kb. 80 napja fejlődő agancscsúcsok felső, mintegy 5 cm-es darabját távolítottuk el. A szarvasmagzat mintákat december közepétől január közepéig gyűjtöttük a szarvasfarm állományának selejtezése ideje alatt. Kísérleteinkhez a három-négy hónapos szarvasmagzat növekedési porclemezére volt szükségünk. Minden szövettípusból mRNS izolálás és szövettani vizsgálatok céljából is vettünk mintákat.

Molekuláris biológiai eljárások

Nukleinsavak izolálásában, kimutatásában és manipulációjában (nukleinsav izolálás, restriktációs endonukleázokkal való hasítás, elektroforetikus elválasztás, plazmid vektorba klónozás, polimeráz láncreakció, AFLP Differential Display, Southern, Northern és *in situ* hibridizációs technika, szekvenálás, valós-idejű mennyiségi RT-PCR) és a fehérje munkákban (Western blot és immunhisztokémiai analízis) a molekuláris biológiában általánosan használt, valamint a gyártó cégek által javasolt eljárásokat követtük.

EREDMÉNYEK

A fejlődő agancscsúcs három szövetének és a magzati növekedési porclemeznek a génextpresszióját hasonlítottuk össze. A különböző módszerek összekapcsolásával olyan kísérleti rendszert hoztunk létre, amely alkalmas az általunk vizsgált szövetek között az expressziós különbségeket mutató gének azonosítására.

Expressziós különbségek kimutatása AFLP-vel

A négy szövet génextpresszióinak összevetését AFLP Differential Display technikával végeztük el. 36 olyan gént azonosítottunk, amelynek expressziója erőteljesebbnek bizonyult a fejlődő agancs valamely zónájában a magzati növekedési porclemezzel szemben. A szekvencia-sorrend meghatározása után a kapott hasonlóságok alapján a géneknek két jelentősebb csoportja definiálható: a transzkripció és transláció folyamataihoz szükséges gének (6 db), valamint a daganatképződéssel kapcsolatba hozható/hozott gének csoportja (5 db: *α-tropomiozin (tpm1)*, *transgelin (tagln)*, *annexin 2 (anxa2)*, *foszfatidiletanolamint kötő fehérje (pebp)*, *apolipoprotein D (apoD)*). Az első csoport tagjainak fokozott expressziója nem meglepő eredmény, hiszen a transzkripció és transláció folyamataihoz szükséges gének aktivitása elengedhetetlen a robosztus agancsfejlődés magas metabolikus igényeihez. A második csoporthoz tartozó gének több lehetőséget rejtettek számunkra, mivel az agancs növekedését a sejtosztódás és –differenciáció nagy sebessége miatt párhuzamba állíthatjuk a sejtek rákos elfajulásával és a daganatképződéssel, ezért ezeknek a géneknek az expressziós profilját vizsgáltuk a továbbiakban.

A gímszarvas ortológ gének azonosítása

Az eredmények alátámasztásához az AFLP fragmenteknél (100-400 bp) hosszabb cDNS szekvenciákra volt szükségünk. A teljes cDNS meghatározáshoz a három cDNS-könyvtárunkat

használtuk fel, amelyek a megfelelő agancsszövetből izolált cDNS-poolból készítettünk el. Az AFLP-fragmenteket itt is próbaként használva hibridizációs technikával határoztuk meg a leghosszabb inzertet. Ezek szekvenciáját meghatároztuk, és a BLAST keresés megerősítette korábbi eredményeinket. A gímszarvas szekvenciák 83-94%-os hasonlóságot mutattak egér és 84-95%-os hasonlóságot humán génekkel. A szarvasmarha ortológokkal a hasonlóság elérte a 95-98%-ot.

Az mRNA expressziók mintázatának megerősítése

Az azonosított gímszarvas gének expresszióját az agancscsúcs szöveteiben és - természetesen - a magzati porcban Northern hibridizációs technikával bizonyítottuk, illetve ellenőriztük expressziós mintázatukat. Az α -tropomiozint kódoló gén expresszióját eddig csak a mezenchimában mutattuk ki, azonban a Northern hibridizáció alapján ez a gén a bársonyos-barkás agancs előporc és porcszövetében is kifejeződik alacsony intenzitással. A *transgelin* gén expressziós mintázata tökéletesen megegyezett előző eredményeinkkel: a mezenchimában erős, az előporcban közepes, a porcban gyenge expressziót detektáltunk. Mind a *transgelin*, mind az α -tropomiozin esetén a magzati porcban az expresszió nem volt detektálható. Ellentétben az *annexin 2* génnel, ahol a magzati növekedési porclemezben nagyon gyenge expressziót mutatott ki a Northern hibridizáció. Az *annexin 2* gén mindhárom agancsszövetben kifejeződik, azonban a legerőteljesebb expressziót a fejlődő agancs csúcsi mezenchimájában mutatja. A porcfejlődés előrehaladtával expressziójának erőssége fokozatosan csökken. Ehhez hasonló mintázatot mutatott a *pebp* gén, annyi különbséggel, hogy a *pebp* gén esetén erősebb hibridizációs jel keletkezett a magzati mintában. Az utolsó vizsgált gén az *apolipoprotein D*, amely a korábbi kísérletekben az agancs előporc és porcszövetében mutatott erőteljes expressziót. A Northern hibridizáció ezt teljes mértékben alátámasztotta, tovább finomítva a gén expressziós mintázatát. E szerint az *apolipoprotein D* expressziója a porcdifferenciálódás előrehaladtával jelentősen növekszik.

A génexpressziók mennyiségi analízise

Az expressziós különbségek mennyiségi analízisét valós idejű RT-PCR technika segítségével valósítottuk meg a három általunk kiválasztott gén (α -tropomiozin (*tpm1*), *annexin 2* (*anxa2*), *apolipoprotein D* (*apoD*)) esetén. A kapott értékeket a β -aktin gén expressziójához normalizáltuk. Az α -tropomiozin mRNA szintje 2,5-szeres a mezenchimában és csökken az előporc (0,51), porc (0,47) felé. Az *annexin 2* gén mRNA-szintje fokozatosan csökken az agancs mezenchimális régiója felől a porcos szövetekig: a mezenchimában 1,4-szeres, az előporcban 1,1-szeres, a porcban 0,33-szoros értéket mértünk. Az *apolipoprotein D* esetén a mezenchimában mért, minimális (0,03) expresszió drasztikusan megnövekszik az előporc zónájában (25,63), és a várakozásunknak megfelelően tovább növekszik az agancs porcszövetében (65,26).

A génexpressziók 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 meg kívántuk határozni azokat a sejttípusokat, amelyek kifejezik az adott gént.

Az *in situ* hibridizációnál is szépen kirajzolódott az α -tropomiozin gén eddig ismert expressziós mintázata: a csúcsi mezenchimában megfigyelhető erős expresszió a differenciáció előrehaladtával lecseng. Az előporc (pre)chondroblastjában még határozott hibridizációs jelet adnak, azonban a porcsejteknek csak némelyikében tapasztalhatunk nagyon gyenge szignált. Az előző kísérletekben a porcszövetben kimutatott expressziót inkább a vérek körüli perivaszkuláris térben található fibroblast-szerű sejtekhez köthetjük. Az α -tropomiozin erős expresszióját érzékeljük a bőrben futó vérek esetén is. Az *in situ* hibridizáció feltárta az α -tropomiozin gén expressziójának egyik jellegzetességét, miszerint a csúcsi mezenchimába koncentrálnak az expressziója nem terjed ki az oldalsó mezenchimára.

Az *annexin 2* expressziója a mezenchimában volt a legerősebb és egyre gyengült az előporc, porcszövetben. Nagyobb nagyítás mellett megfigyelhetjük, hogy az előporcban megjelennek olyan sejtek, amelyekben a hibridizációs jel gyengébb intenzitású vagy egyáltalán nem detektálható, az

ilyen sejtek száma a porcban tovább növekszik. Az *annexin 2* expresszióját a bőrben is kimutattuk, itt a vérerek falára korlátozódik a gén kifejeződése. Az *annexin 2* nemcsak a bőrben lévő erek falában expresszálódik, hanem az alatta elhelyezkedő szöveteket sűrűn behálózó véredények falában is, az érkezdemény megjelenésétől expresszálódik. Szintén sikerült kimutatnunk a gén expresszióját az oldalsó mezenchimában, azonban a csúcsi mezenchimához képest nem olyan látványos az expresszió csökkenése, mint az α -tropomiozinál.

Az *apolipoprotein D* expressziója kizárólag a porcsejtekre korlátozódik (17/C ábra). A kevésbé differenciált régiókban nem látható hibridizációs jel. E gén mRNS-t a perivaszkuláris területen sem sikerült kimutatni *in situ* hibridizációval.

A gímszarvas Annexin 2 immunlokalizációja

Az Annexin 2 fehérje mindhárom szövettípusban megtalálható és elsősorban a sejtek szélén figyelhető meg, a sejthártyához asszociálva. Az irodalmi adatok alapján az extracelluláris mátrixban vártuk a megjelenését, azonban a sejtközötti anyagban csak a perivaszkuláris térben észlelhetjük a fehérje lerakódását.

Új tudományos eredmények

A gímszarvas bársonyos-barkás agancsát, amely az emlősök csontfejlődésének páratlan modellje rekombináns DNS technológiával kombinálva olyan géneket fedeztünk fel, amelyek szerepet játszanak (i) a csontfejlődés legkorábbi (mezenchima,) szakaszában, vagy (ii) az agancs robosztus fejlődésében (erősebb expresszió az agancs porcszövetében, mint a magzatiban).

1. Olyan metodikai koreográfiát állítottunk össze, amely alkalmas az agancscsúcs három, egymást követő (mezenchima, előporc, porc) szöveti régiójának a génexpressziós profilját megrajzolni és megerősíteni.
2. Megállapítottuk, hogy a gének két csoportja szembeötlően gyakori az AFLP-mintákban:
 - (a) az intenzív anyagcseréhez kapcsolható gének és a
 - (b) tumor marker gének.
3. Ennek eredményeként bebizonyítottuk hat gén (*α -tropomiozin, transzgelin, annexin 2, pebp* és az *apolipoprotein D*) intenzívebb expresszióját a fejlődő agancsban a magzati növekedési porclemezhez képest.
4. Három gén (*α -tropomiozin, annexin 2, apolipoprotein D*) esetén az expresszióbeli különbségeket számszerűsítettük valós-idejű mennyiségi PCR mérésekkel, és *in situ* hibridizációval fényt derítettünk arra, milyen sejtekben fejeződnek ki ezek a gének.
5. Az *α -tropomiozin* esetén bizonyítottuk, hogy erőteljes expressziója a csúcsi mezenchimára korlátozódik, az oldalsó mezenchimában jóval gyengébben fejeződik ki.
6. Az *apolipoprotein D* agancs porcszövetben mért magas expresszióját sikerült *in situ* hibridizációval a porcsejtekhez kötni.
7. Igazoltuk az Annexin 2 fehérje jelenlétét az agancs csúcsi mezenchimájában, előporc és porcszövetében, valamint kimutattuk, hogy ez a fehérje elsősorban a sejtek szélén, a sejtmembránhoz asszociálva jelenik meg.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Expressziós mintázatok értelmezése a fejlődő agancsban

Munkánk során AFLP Differential Display technikát használtuk az agancs fejlődése alatt bekövetkező génexpresszió-változások vizsgálatára. A technika adta korlátok miatt (pl.: adott magasságban több cDNS fragmentum lehet) szükséges volt a kiválasztott fragmentek tesztelése. Az expressziós mintázatok Southern hibridizációval ellenőriztük, és a 40 AFLP fragmentumból 36 esetén igazoltuk vissza az AFLP Differential Display eredményét.

Az AFLP Differential Display módszer egyik előnye, hogy előzetes szekvencia ismeret nélkül nyújt információt a minták közötti génexpressziós különbségekről. Ennek folytán az

expressziós mintázatok kontrollja után megmaradt 36 AFLP fragmentum szekvenciáját meg kellett határoznunk. A BLAST eredmények alapján több ismeretlen szekvencia is szerepelt a 36 fragmentum között. Az ismert szekvenciákkal hasonlóságot mutató AFLP fragmenteknek két nagyobb csoportja rajzolódott ki. Az első csoportot 6 gén alkotja, mindegyik riboszómális komponens vagy transzkripciós faktor, amelyek megemelkedett expresszióját a robosztus növekedéshez szükséges magas metabolikus igény magyarázza. Ezt a jelenséget korábban már leírták élesztőgombáknál. A másik csoportot olyan gének képezik, amelyeknél expresszió-változást mutattak ki tumorok esetén (*α -tropomiozin, transzgelin, annexin 2, foszfatidiletanolamint kötő fehérje és apolipoprotein D*).

Intenzív sejtosztódás a fejlődő agancscsúcsban

Az *tpm1*, *tagln*, *anxa2*, *pebp* és *apoD* gének fejlődő agancscsúcsban mutatott expressziós profiljai meglehetősen eltérnek egymástól, ennek ellenére egy közös jellegzetességgel rendelkeznek: mindegyikük expressziója csökken rosszindulatú daganat kialakulásakor. A *tpm1*, *anxa2* és *pebp* esetén kimutatták, hogy túltermelésük képes csökkenteni a tumor agresszivitását.

A *tagln* expressziójának megszűnését vastagbél- és tüdőrákban mutatták ki. A *transzgelin* expressziója a tumoros elfajulás nagyon korai szakaszában tűnik el, ezért a daganatképződés egy korai szignálját látják benne. A Transzgelin fehérje szerepe nem tisztázott, de downregulációja egy korai és érzékeny markere az elfajulás kezdetének. Ezzel ellentétben a fejlődő agancscsúcsban megfigyelt expresszió dinamikája, ahol az intenzív proliferációs zónában, a csúcsi mezenchimában a legerősebb az expressziója. Ezért vélelmezhetjük a tumor kialakulásával szembeni egyfajta szupresszív hatását, hasonlóan az *α -tropomiozin*hoz, amely egy tumor-szupresszor gén. A *tpm1* a fibroblastokban és az epiteliás sejtekben expresszálódik, és úgy tűnik, hogy expressziójának megszűnése a különféle emlős karcinogenezis egy közös biokémiai jelensége. A transzformált sejtekben expressziója gyorsan és még azelőtt szűnik meg, hogy a növekedési faktorokkal indukált elfajulásnak bármilyen morfológiai jele lenne. A sejtek rákos elfajulásában betöltött lényeges szerepét támasztja alá az a tény is, hogy az onkogén által transzformált és a mellrák sejtek rosszindulatú fenotípusa visszaszorítható az expressziójának visszaállításával. A gén túlműködtetése ugyanakkor gátolni képes a rákos sejtek áttétképződési hajlamát. Mindezek összhangban állnak a növekvő agancsban kimutatott expressziós mintázatával, hiszen expressziója kiugróan magas a csúcsi mezenchimában, ahol a sejtosztódás rendkívül élénk, ugyanakkor a mezenchimális sejteket tartalmazó, de intenzív proliferációval már kevésbé jellemezhető oldalsó mezenchimában, illetve a vérerek környezetében megtalálható, osztódásra szintén képes fibroblaszterű sejtekben expressziója visszaesik. A differenciált porcsejtekben a gén kifejeződése nem detektálható.

Sejtdifferenciáció az agancscsúcsban

Az agancsfejlődés és a magzati növekedési porclemez összevetésével olyan gének váltak azonosíthatóvá, amelyek részt vesznek a porcdifferenciálódásban. Vizsgálataink során két ilyen gén került látókörünkbe az *annexin 2* és a *pebp*.

Az *annexin 2* szerepe sokrétű és még nem teljesen tisztázott. Számos folyamatban résztvevőjeként írták már le, mint például endo- és exocitózis, membránfúzió, plazmamembrán-citoszkeleton interakciók, feszültség-függő kalcium-csatornák kialakítása. Az *annexin2*-t ECM molekulák, mint például a tenascin C és a szöveti plazminogén aktivátor, sejtfelszín-receptoraként isjellemezték. Ezenkívül befolyással bír a sejtthártya mikrodomén szerveződésére és dinamikájára az aktinhoz és a lipidekhez való kötődése révén. Az *annexin 5* és az *annexin 6* mellett az *annexin 2*-nek is fontos szerep jut a mineralizációs folyamatok elindításában, amelyet alátámaszt az a tény, hogy az *annexin 2* sejt kultúrában képes indukálni a porcsejtek mineralizációját. Ugyanakkor az osteoblastok mineralizációs folyamataiban is szerepet játszik: elősegíti az ásványi anyagok lerakódását és növeli az alkalikus-foszfatáz aktivitását a lipid raftokban. Mind a raftok szétbomlása, mind az *anxa2* expressziójának gyengülése a mineralizáció csökkenéséhez vezet. Mindezek után nem meglepő, hogy *annexin 2* upregulált a patológiás ásványanyag berakódással járó

betegségeknel, mint például a reumatoid arthritis és az (osteo)arthritis. Az annexin 2 mineralizációban betöltött szerepe megmagyarázza fokozott expresszióját az agancs porcszövetében, azonban a mezenchimában és az előporcban nem. Az annexin 2 a sejtmotilitást, -adhéziót vagy -proliferációt befolyásoló hatásait nem nagyon vizsgálták, ugyanakkor egyértelműen bebizonyították, hogy az annexin 2 túltermeltetése képes csökkenteni a daganat- vagy az áttétképzési hajlamot. A mineralizáció beindítása és a tumor agresszivitásának csökkentése arra mutat, hogy az annexin 2-nek szerepe lehet a sejtek differenciáltabb állapotba való elmozdításának. A proliferáció és a differenciáció közötti egyensúly fenntartása alapvető fontossággal bír. Az egyensúly eltolódását a sejtosztódás irányába a rák fémjelének tekintik. A differenciáció megtörése, például az *anxa2* expressziójának megszűnése miatt, előnyhöz juttatja a proliferációs folyamatokat, amely daganat kialakulásához vezethet vagy – az agancsfejlődés esetében – a differenciálatlan mezenchima sejtöreg felszaporodásához.

Az annexin 2-höz hasonló expressziós mintázattal bír a *pebp* molekula (a magzati porcszövethez képest fokozott expresszió az agancsszövetekben, ahol az expresszió a mezenchima felől csökken a differenciáció előrehaladásával). Szerepe is hasonló lehet az annexin 2-höz. Erről a génről is feltételezik, hogy szerepet játszhat a differenciációban, és ezenkívül a növekedésben és a sejtek rákos elfajulásában. A *pebp* befolyásolja a protein kináz C (PKC) szignált a Raf-1 és a G protein szignalizáción keresztül, így rengeteg folyamatra hatást gyakorol. Kimutatták azt is, hogy a *pebp* egy lehetséges metasztázis szupresszor gén, amelynek expressziója lecsökken prosztata rák áttétnél. Az expressziójának visszaállítása ugyanakkor a metasztázis visszahúzóhatását okozza prosztata rák sejtvonalban.

A sejt differenciáció és a növekedés megállásának egy lehetséges markereként tartják számon az *apolipoprotein D* expresszióját, amelynek indukálása a növekedés lefékezésével és differenciációval jár együtt humán mellrák sejtekben. Pontos szerepe nem teljesen tisztázott, általában multifunkcionális és többféle ligandot is kötni képes fehérjeként jellemzik, kiemelve hidrofób jellegét. Az *apoD* mRNS többféle szövetben is kifejeződik, de expressziójának helye fajonként változik. Emberben és nyúlban például elsősorban a kisagyban, a mellékvesében és a lépben nyilvánul meg, míg az egérben főként a központi idegrendszerre (CNS) korlátozódik az expressziója. Az *apoD* magas expresszióját mutatták ki szöveti fibroblasztokban és felhalmozódását a perifériás idegek regenerációjánál és remielinációjánál. Az *apoD* transzkripciója specifikusan nyugalomban lévő vagy öregedő fibroblaszt-kultúrákban történik (Provost *et al.*, 1991a). Ezeknek közös jellemzője, hogy a sejtek nem osztódnak. Mindezekkel jól egybe vág az a tény is, hogy az *apoD* a kevésbé differenciált daganatokban alacsonyabban expresszálódik.

Az *apolipoprotein D* erős expressziójának kimutatása porcsejtekben új felfedezés. Mindeztől az *apoD* mRNS-t a vázfejlődéssel kapcsolatosan a Meckel porc előporc kondenzációjában, a nyakszirtecsont kezdeményében és a csigolyatestek szklerotomális kondenzációjában írtak le. A fejlődő agancscsúcsban mutatott expressziós mintázata összecseng differenciációs marker jellegével. A differenciált sejtek számának növekedésével az *apoD* expressziója is egyre erősebb lesz, ugyanakkor a kevésbé differenciált perivaszkuláris sejtekben nem fejeződik ki.

A proliferáció és a differenciáció szabályozása a fejlődő agancsban

Az agancs, más szervekhez hasonlóan, a sejtek osztódása és specializálódása során jön létre. A két folyamat egymással párhuzamosan zajlik, kényes egyensúlyt tartva. Az *α-tropomiozin*, *transzgelin*, *annexin 2*, *foszfatidiletanolamint kötő fehérje* és *apolipoprotein D* expressziós mintázatát és az agancsfejlődésben betöltött szerepüket összegezve egy szabályozó hálózat rajzolódik ki.

Az elképesztően gyors fejlődés során még hatalmasabb jelentőséggel bír az intenzív proliferáció szigorú kontrollja, amely egy erős gátló mechanizmuson keresztül valósul meg. Ennek a mechanizmusnak a része a *tpm1* és a *tagln*, amelyek fokozott expressziója a csúcsi mezenchimában a fékevesztett sejtosztódásnak szab gátat. Eközben downstream az *anxa2* és a *pebp*

a differenciálódás felé vezeti a sejteket, támogatva a chondrogenesis folyamatait. A specializálódási út végén megjelenik az *apoD* expressziója mintegy leintő zászlójául a differenciálódásnak.

Javaslatok

1. Vizsgálatainkat összegezve úgy véljük a fejlődő agancs kiváló lehetőséget nyújt a csontfejlődés modellezéséhez, mivel az egyes szövettani zónák jól elkülöníthetőek. A továbbiakban érdemes lenne kiterjeszteni a vizsgálatokat a fejlődő agancs további szövetrétegeire, külön figyelmet fordítva az oldalsó mezenchimára.

2. Az AFLP Differential Display technika lehetőséget adott, hogy előzetes szekvencia ismeretek nélkül hasonlíthassuk össze a szövetek génexpressziós mintázatát. Ezáltal olyan gének kerültek a látókörünkben, amelyek eddig ismeretlenek voltak a csontfejlődésben. Az AFLP-t követő módszertani koreográfiáinkkal biztosítottuk, hogy a fals expressziós mintázatokat adó géneket kiszűrjünk. A „génszűrési” technikát cDNS-microarray-jel lehet gyorsabbá tenni, ezt a csoportunkban létrehozott „agancs” cDNS-microarray-jel meg is valósítottuk. A gímszarvas és a szarvasmarha gének közötti nagyfokú homológia lehetővé teszi a szarvasmarha chipek használatát is az agancsfejlődés vizsgálatában. Ezen chipek alkalmazása nemcsak a csontfejlődésben szerepet játszó, hanem az angiogenesisben, az ideg regenerációban résztvevő gének expressziójának tanulmányozását is lehetővé tennék.

3. Az agancsfejlődés megismerése információt szolgáltat a rákos elfajulás jobb megértéséhez is. Eredményeink is azt igazolják, hogy az agancsregeneráció és a tumorigenezis génexpressziós mintázatának összehasonlítása számos olyan molekulára hívhatja fel a figyelmet, amely a sejtosztódás szabályozásában játszanak szerepet. A fejlődő agancs intenzíven proliferáló csúcsi mezenchimájának, az oldalsó mezenchima és a tumorok összevetése elsősorban negatív szabályozó faktorok szerepére világíthat rá.

4. A szarvasfélék az egyetlen csoport az emlősök körében, amelyek képesek egy szerv teljes regenerációjára, és ezt minden évben megismétlik. E folyamat révén jobban megérthetjük, miért veszítették el az emlősök regenerációs képességüket, és hogy ezt hogyan lehet „felébreszteni”. Általános nézet, hogy a szervregeneráció folyamán az embrionális fejlődésben résztvevő gének aktiválódnak, ennek pontos feltérképezése az emberi gyógyászatban a súlyosan sérült szervek regenerálásában hozhat áttörést.

5. A gímszarvas robosztus agancsfejlődése és az ehhez kapcsolódó ciklikus fiziológiás oszteoporózis megismerése felhasználható humán gyógyászatban is, a népbetegségnek számító csontritkulás, illetve egyéb csontbetegségek gyógyításában, diagnosztikai fejlesztések és gyógyszer célpontok kijelölése révén. Ezen a vonalon csoportunk jelentős eredményeket ért el, amelyek publikálása folyamatban van.

6. A fejlődő agancs különböző szöveteiből kívánatos lenne szövetkultúrákat létrehozni, így mód nyílna a gének funkcióinak *in vitro* vizsgálatára.

7. A *tpm1* és a *tagln* tumorszupresszor hatását érdemes volna megfigyelni különböző eredetű rákos sejtvonalban, illetve az agancs csúcsi mezenchimájából származó sejtvonalakon vizsgálni, milyen hatást vált ki expressziójuk gátlása. Az *anxa2*, *pebp* és az *apoD* inaktiválása ezekben a sejtkultúrákban rámutathat a sejtek differenciált állapotba való elmozdításában játszott pontosabb szerepükre.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Lektorált, idegen nyelvű cikk

Molnár A., Gyurján I., Korpos É., Borsy A., Stéger V., Buzás Zs., Kiss I., Zomborszky Z., Papp P., Deák F., Orosz L. (2007) Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Molecular Genetics and Genomics* 277, 237-248 (IF: 2,632)

Gyurján I., **Molnár A.**, Borsy A., Stéger V., Hackler L., Zomborszky Z., Papp P., Duda E., Deák F., Lakatos P., Puskás L., Orosz L. (2007) Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis *Molecular Genetics and Genomics* 277, 221-35. (IF: 2,632)

Korpos É., **Molnár A.**, Papp P., Kiss I., Orosz L., Deák F. (2005) Expression of matrilins and other matrix proteins in developing antler of red deer. *Matrix Biology*: 24, 124-135. (IF: 4,104)

Konferencia kiadvány:

Nemzetközi konferencia:

Gyurján I., Borsy A., **Molnár A.**, Steger V., Szabolcsi Z., Orosz L. (2006): Initiation of bone formation during antler development. *Bone*, 39 (5) Poster abstract (P01) (IF: 3,900)

Borsy, B. Balla, I. Gyurján, V. Stéger, **A. Molnár**, Z. Szabolcsi, J. Kósa, Z. Zomborszky, P. Papp, T. Vellai, P. Lakatos, L. Orosz (2006) Red deer biology for biomedical research on human osteoporosis *Calcified Tissues International* 78 (Suppl.1): S74. (IF:2,258)

Korpos, E., Molnár, A., Papp, P., Kiss, I., Orosz, L., and Deák, F. (2005). Expression pattern of extracellular matrix proteins characterize distinct stages of cell differentiation during antler development. *FEBS Journal* 272, Supplement 1 (3,260)

Korpos É., **Molnár A.**, Papp P., Kiss I., Orosz L., Deák F. (2004) Regeneration of bony appendage: Monitoring the changes of matrix molecules during antler development_European Research Conference on "Cellular and Molecular Basis of Regeneration", San Feliu de Guixols, Spain

Hazai konferencia:

Korpos É., **Molnár A.**, Papp P., Kiss I., Orosz L., Deák F. (2005) Csontregeneráció követése a fejlődő szarvasagancsban a sejtközötti állomány molekuláinak változásán keresztül(Eger, VI. Magyar Genetikai Kongresszus, 2005.április 10-12.,131old.)

Korpos É., **Molnár A.**, Papp P., Kiss I., Orosz L., Deák F.:(2004) Regeneration of bony appendage:Monitoring the changes of matrix molecules during antler development (Straub Napok, SZBK, Szeged 2004 dec 7-9)

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

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

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

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